

**INFLUENCIA DE FACTORES
AMBIENTALES EN LA PRODUCCIÓN
DE MICROCISTINAS, UN TIPO DE
CIANOTOXINAS, EN *SCYTONEMA
JAVANICUM* BORNET ET THURET
EX BORNET ET FLAHAULT**

Natalia Gómez Peral

Tutora: Antonia Dolores Asencio Martínez

Área de Botánica

Departamento de Biología Aplicada

Grado en Biotecnología

Facultad de Ciencias Experimentales

Curso académico 2014/2015



AGRADECIMIENTOS

Quisiera empezar el trabajo de fin de grado dando las gracias.

En primer lugar a Toñi, mi tutora, por haber confiado en mí desde el primer momento, por haberme dado la oportunidad de aprender y la libertad de opinión sobre cómo se podía mejorar diferentes procesos. Su dedicación y motivación ha sido determinante para poder llevar a cabo el presente trabajo, a pesar de todos los imprevistos que nos han surgido.

A Rocío, técnico de laboratorio, que de tantos apuros nos ha sacado y que sin duda este trabajo no se podría haber concluido. Se ha preocupado porque pudiera continuar con el trabajo y por su disponibilidad y positividad en todo momento.

A mi familia por confiar en mí, en especial a mi hermano Isaac que de cierto modo también ha contribuido ayudándome en los momentos que necesitaba y a mi abuelo por hacerme ver las cosas más sencillas de lo que son y por su constancia preguntarme cada vez que le veía como llevaba el trabajo, lo que hacía que me diera más fuerza para continuar.

Especialmente a mis compañeras y amigas de la universidad, Adela, Carolina, Clara y Susana por ayudarme a continuar y animarme en los peores momentos.

Por último y no por ello menos importante, a mis amigos de fuera de la universidad que en todo momento me han apoyado, por su entusiasmo de querer intentar entender lo que estaba haciendo sin tener conocimiento del mundo de la ciencia y por ayudarme a despejarme y desconectar en los momentos más difíciles y estresantes.

ÍNDICE

RESUMEN Y PALABRAS CLAVE	4
INTRODUCCIÓN.....	5
Características generales	5
Cianotoxinas y sus efectos en el medio ambiente.....	7
Características de las microcistinas	7
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	11
MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
Lugar de estudio y medición de los parámetros ambientales	12
Recolección, observación e identificación del material	13
Diseño experimental.....	14
Análisis estadístico	18
RESULTADOS	19
Identificación taxonómica y registro de parámetros ambientales	19
Influencia de los factores ambientales en la síntesis de microcistinas.....	20
I. Radiación.....	20
II. Temperatura.....	21
III. Salinidad.....	21
IV. Amonio.....	22
DISCUSIÓN	24
CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA.....	27
BIBLIOGRAFÍA.....	28

RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

RESUMEN

Se ha determinado *Scytonema javanicum* Bornet et Thuret ex Bornet et Flahault y se han registrado los valores de parámetros ambientales en el río Vinalopó a su paso por Elche donde se desarrolla. Se ha estudiado la capacidad de esta especie para sintetizar microcistinas (MC), concretamente MC-LW y se ha investigado cuáles son los factores ambientales que participan en su producción. Los resultados indican que la radiación ($T=3,22$; $p<0,01$), la temperatura ($T=2,95$; $p<0,01$), la salinidad ($T=2,92$; $p<0,01$) y el amonio ($T=2,88$; $p<0,01$) influyen negativamente en la síntesis de microcistinas en *S. javanicum*.

ABSTRACT

It has been determined *Scytonema javanicum* Bornet et Thuret ex Bornet et Flahault and environmental parameters in the Vinalopó river in Elche where it develops. It has been studied the ability of this specie to synthesize microcystins (MC), particularly the MC-LW and it has been investigated which environmental factors are involved in their production. The results indicate that the radiation ($T=3,22$; $p<0,01$), temperature ($T=2,95$; $p<0,01$), salinity ($T=2,92$; $p<0,01$) and ammonium ($T=2,88$; $p<0,01$) negatively influence the synthesis of microcystins in *S. javanicum*.

PALABRAS CLAVE/ KEYWORDS: cianobacteria/ cyanobacteria, microcistina/ microcystin, parámetros ambientales/ environmental parameters, río/ river, toxicidad / toxicity.

INTRODUCCIÓN

Características generales

Las cianobacterias, también llamadas cianofíceas, cianoprocariotas o algas verde-azuladas, son un amplio grupo de organismos fotosintéticos procariotas que se encuentran presentes en la Tierra desde hace más de 3,5 billones de años (Kump, 2014).

Las cianofíceas pueden vivir en una gran variedad de ambientes tanto acuáticos como terrestres, e incluso en los más extremos debido a sus estrategias de supervivencia. Estos organismos incluyen aproximadamente 150 géneros y más de 2000 especies y presentan una amplia diversidad morfológica, ya que pueden ser unicelulares, coloniales o filamentosas (Komárek y Anagnostidis, 2005; Komárek, 2013).

Las cianoprocariotas (Figura 1) presentan tanto características de bacterias como de las algas. Las características más destacadas respecto a las bacterias son la ausencia de orgánulos rodeados de membranas y la estructura de la pared celular. Por otra parte tienen en común con las algas la presencia de clorofila *a*, la estructura de tilacoides y la participación como productores primarios en la naturaleza (Asencio, 1997).

La estructura celular general de las cianobacterias, desde el exterior hasta el interior, consiste en una membrana externa que está formada por mucopolisacáridos, denominada vaina que presenta un grosor variable ya que puede acumular agua manteniendo la actividad metabólica en condiciones de sequía. Esta capa puede ser coloreada por la acumulación de pigmentos que actúan como filtro frente a la radiación ultravioleta. A continuación, se encuentra la pared celular Gram - constituida por una sustancia llamada mureína o peptidoglicano. La membrana plásmatica se encuentra justo después de la pared celular y ya en el interior celular están los tilacoides, que no están organizados en cloroplastos, donde se encuentran los pigmentos fotosintéticos (clorofila *a*, carotenoides y ficobilinas), gránulos de cianoficina que almacenan sustancias nitrogenadas, gránulos de volutina donde se concentran molécula de ATP, gránulos de glucógeno que son los principales productos de la fotosíntesis, carboxisomas que contienen enzimas fotosintéticos y vacuolas gasíferas que acumulan gas y les permiten flotar. Las cianobacterias carecen de flagelos y su movimiento se produce por deslizamiento (Llimona y col., 1985).

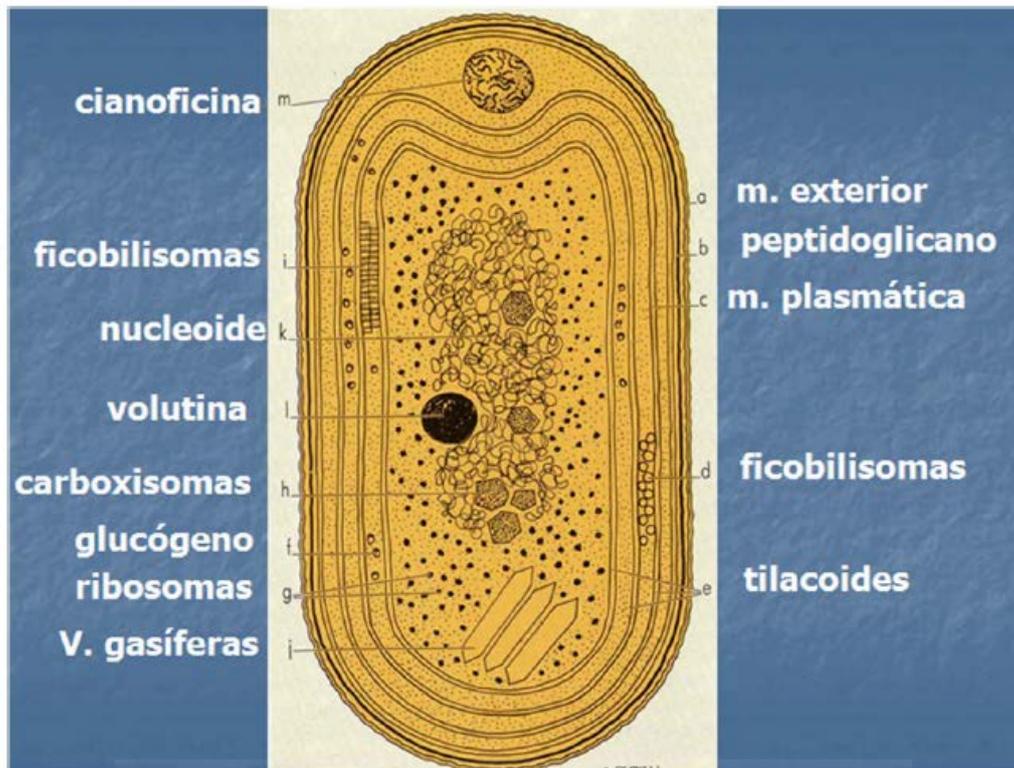


Figura 1.- Estructura general de una cianobacteria (Llimona y col.1985).

Las cianofíceas son capaces de fijar nitrógeno atmosférico gracias a la enzima nitrogenasa que es inhibida por el oxígeno por lo que es incompatible con la fotosíntesis. Muchas cianobacterias han separado ambos procesos en el tiempo, realizando la fotosíntesis durante el día y la fijación de nitrógeno durante la noche. Sin embargo, algunas especies han solucionado este problema mediante los heterocitos (Figura 2), células de mayor tamaño que el resto y con una pared gruesa, donde se realiza la fijación del nitrógeno. Como en los heterocitos no existe el fotosistema II, no hay producción de oxígeno y la nitrogenasa puede actuar correctamente. Estas estrategias permiten el desarrollo normal de las cianobacterias en condiciones de bajos niveles de nitrógeno (Asencio y Aboal, 2011).



Figura 2.- Heterocito en *Anabaena* sp (Campbell y col., 2005).

Cianotoxinas y sus efectos en el medio ambiente

Desde hace décadas las aguas superficiales de todo el planeta están sufriendo un progresivo deterioro. Una de las causas es la eutrofización que ocurre cuando hay un exceso de nutrientes, especialmente fosfatos y nitrógeno, que propician proliferaciones incontroladas de cianobacterias o *blooms*. Este exceso de nutrientes proviene de aguas residuales tratadas insuficientemente, residuos agrícolas, abonos, etc (Briand y col., 2003).

En esas condiciones las cianobacterias presentan ventajas frente a otros organismos ya que mantienen su tasa de crecimiento, regulan su flotabilidad mediante las vesículas de gas, producen compuestos volátiles que dan sabor y olor desagradable a las aguas y sintetizan metabolitos secundarios con propiedades tóxicas para muchos organismos que producen efectos agudos y crónicos en bacterias, plantas, animales y humanos, llamados cianotoxinas (Figueiro y col., 2004; Wiegand y Pflugmacher, 2005; Zaccaroni y Scaravelli, 2008).

A partir del descubrimiento de la toxicidad de estos metabolitos, las proliferaciones de cianobacterias pasaron de ser un problema medioambiental a serlo también sanitario.

Se ha producido intoxicaciones debido a la presencia de cianotoxinas en agua potable, que a concentraciones bajas pueden producir efectos carcinogénicos (Zegura y col., 2011). Además hay evidencias de que las toxinas pueden quedar retenidas en las plantas regadas por aguas contaminadas con cianotoxinas. Esto ha implicado que se maximice el control de estas sustancias ya que se van acumulando a lo largo de la cadena trófica (Pereira y col., 2009).

Las cianotoxinas se pueden clasificar según sus efectos en hepatotoxinas, neurotoxinas, citotoxinas, dermatoxinas y toxinas con poder irritante (lipopolisacáridos) que pueden afectar al tracto gastrointestinal y respiratorio (Codd y col., 2005a; Wiegand y Pflugmacher, 2005). Por otra parte, atendiendo a sus estructuras químicas las podemos clasificar en péptidos cíclicos (microcistinas y nodularinas), alcaloides (anatoxinas, saxotoxinas, cilindrospermopsinas, aplisianotoxinas y lingbiatoxinas) y lipopolisacáridos.

Características de las microcistinas

Las microcistinas son consideradas el grupo más tóxico de las cianotoxinas. El nombre de microcistinas se debe al organismo del cual se aislaron por primera vez, *Microcystis aeruginosa* (Carmichael y col., 1988).

Las cianobacterias son los organismos productores de microcistinas pero dentro de este grupo de organismos no todos los géneros poseen especies productoras, así los géneros descritos como potencialmente productores más importantes son: *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Anabaenopsis*, *Hapalosiphon*, *Woronichinia* y *Aphanocapsa*. El género productor de microcistinas más común en la zona mediterránea es *Microcystis*, dentro del cual las especies más comunes son: *M. aeruginosa*, *M. flos-aquae*, *M. viridis* y *M. wesenbergii* (Cook y col., 2004). Cabe destacar que ni todas las especies de estos géneros poseen la capacidad de producir microcistinas ni dentro de una especie productora todas las cepas son capaces de sintetizarlas (Fastner y col., 1999).

Respecto a la estructura química de las microcistinas (Figura 3), son heptapéptidos cíclicos constituidos por siete aminoácidos, incluyendo D-aminoácidos y dos aminoácidos menos usuales que son el N-metildehidroalanina (Mdha) y el β -aminoácido, 3-amino-9metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienoico (Adda) que se considera el principal responsable de la toxicidad de estos péptidos (Botes y col., 1985; Rao y col., 2002). La fórmula general de estos péptidos es ciclo (-D-Ala¹-Xaa²-D-MeAsp³-Yaa⁴-Adda⁵-D-Glu⁶-Mdha⁷-) donde la variación de los aminoácidos X e Y dan lugar a más de 70 variantes de microcistinas, que hay por ahora descritas, cuya toxicidad es variable ya que depende de diversos factores ambientales y nutricionales (Codd y col., 2005b).

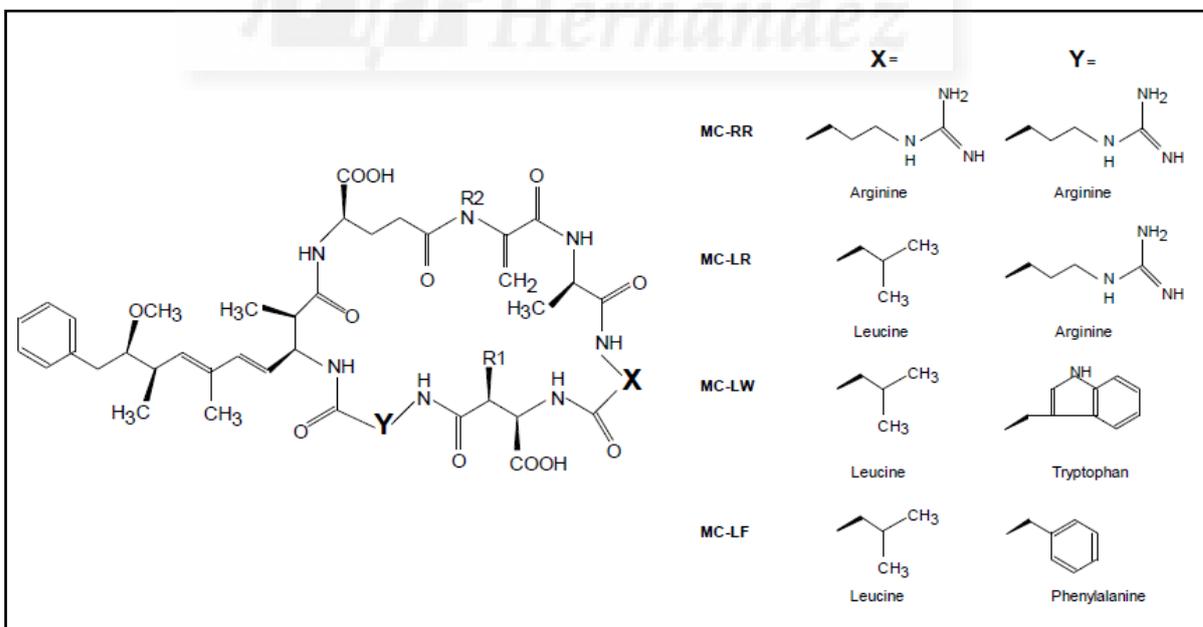


Figura 3.- Estructura general de las microcistinas y ejemplos de sustituciones en la posición X e Y dando lugar a las variantes MC-RR, MC-LR, MC-LW y MC-LF si las posiciones R1 y R2 están metiladas (Faassen y Lürling, 2013).

La microcistina (MC) más común es la MC-LR, que es caracterizada por la presencia de L-leucina y L-arginina en las posiciones 2 y 4 (Xaa²=L: Ala, Yaa⁴=R: Arg) (Gulledge y col., 2002). Otras variantes que también son relativamente abundantes son la MC-RR, MC-YR, MC-LF y MC-LW, además de la variabilidad de los aminoácidos X e Y, el resto de aminoácidos que forman el péptido pueden presentar isoformas generadas por metilación, hidroxilación y epimerización. Una misma cepa puede producir más de una variante de microcistina a la vez. La función natural de estos metabolitos todavía no está clara, ya que se han propuesto varias hipótesis como la defensa contra depredadores, implicación en la fotosíntesis, en la señalización y división celular, y molécula quelante del hierro. Ninguna de estas hipótesis ha sido demostrada ni completamente descartada.

Las microcistinas se localizan en un 90% en el interior de las cianobacterias que las producen. Esto se pudo comprobar mediante estudios de inmunolocalización con partículas de oro, *immunogold*, detectándose la presencia de microcistinas mayoritariamente en los tilacoides (69%), incluyendo la membrana externa de éstos, en el nucleoplasma (19%) y en la periferia de los gránulos de polifosfato (3%) (Young y col., 2005).

Las microcistinas no están codificadas en el ADN, son sintetizadas por una ruta alternativa a la vía ribosomal. Para su síntesis intervienen dos tipos de enzimas, sintetetas peptídicas no-ribosómicas (NRPS) y las poliquétido sintetas (PKS). Las primeras se encargan de activar, modificar y condensar cada uno de los aminoácidos que forman el péptido y las PKS son las responsables de la síntesis del Adda.

Pertenecen al grupo de las hepatotoxinas debido a que las microcistinas solo pueden atravesar las membranas celulares con el uso de un transportador que las reconozca, en este caso se trata del transportador de los ácidos biliares y por lo tanto los daños observados en los mamíferos suelen localizarse en el hígado. Una vez dentro de los hepatocitos, las microcistinas inhiben las fosfatasa PP1 y PP2A debido a la unión covalente del Adda al residuo de cisteína que poseen las dos enzimas en su centro catalítico, Cys-226 en el caso de la PP1 y Cys-273 en el caso de la PP2A (Dittmann y Wiegand, 2006). No obstante no es necesaria esta unión ya que basta con que el Adda se sitúe en el bolsillo hidrofóbico. Además, provocan hiperfosforilación en las proteínas hepáticas, lo que afecta gravemente al citoesqueleto. Se produce deformación hepática, hemorragia intrehepática y necrosis y con un consumo crónico de microcistinas lleva a la degeneración hepática vía necrosis, fibrosis progresiva e incluso tumorigénesis, llevando a provocar la muerte (Ito y col., 1997).

El efecto de las microcistinas en el ecosistema no está claro todavía pero lo que sí es evidente es que son capaces de producir efectos sobre otros grupos de organismos como es el fitoplancton, en el que estudios realizados por Singh y col., (2001) muestran que la microcistina LR aumentaba la lisis de cianobacterias no productoras como *Nostoc muscorum*, mientras que su efecto sobre la alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* fue la disminución en la motilidad y por tanto el posterior aumento en la sedimentación (Kearns y Hunter, 2001). En el caso de las plantas acuáticas se ha estudiado que también le afecta al crecimiento la presencia de microcistinas. Pero en el caso de los animales el mecanismo de toxicidad es claramente distinto ya que en los animales existen órganos diana para estas toxinas, siendo el hígado y el riñón los órganos más afectados (Wiegand y Pflugmacher, 2005).

Múltiples ejemplos de muerte de animales, fundamentalmente aves, vacas y perros, se han debido a la ingesta accidental, al beber o comer afloramientos de cianobacterias productoras de microcistinas (Codd y col., 2005a).

Por último, cabe destacar que las microcistinas también afectan a los seres humanos provocando enfermedades relacionadas con el hígado. A lo largo de la historia han ocurrido diversos accidentes por intoxicaciones por estos compuestos. Además de la ingestión oral, existen otras formas usuales de exposición de estas toxinas en los seres humanos como son por contacto epidérmico y por inhalación que está limitada a las exposiciones relacionadas con los deportes acuáticos que se realizan en ríos y pantanos (Asencio, 2013). Debido a los posibles efectos adversos sobre los seres humanos, en 1997 la OMS estableció un valor guía de 1µg/L de microcistinas. Este valor se calculó utilizando la microcistina LR, la única para la cual existen valores realistas de toxicidad. A partir de este valor guía una serie de países pudieron regular los valores máximos que deben cumplir las aguas de consumo (Chorus, 2005). Uno de ellos fue España que en 2003 presentó una legislación de aguas de consumo en los que se estableció un valor máximo de 1µg/L de microcistina total en aguas de consumo (Real decreto 140/2003).

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Dentro de la gran diversidad de compuestos que pueden ser sintetizados por las cianobacterias destacan las microcistinas, tanto por el efecto tóxico que pueden llegar a presentar como por su abundancia en los lugares donde hay agua dulce (Faster y col., 1999). Estudios anteriores apoyan que los factores ambientales como la luz, temperatura, concentración de nutrientes, la turbidez del agua y la velocidad y dirección del viento son factores que afectan al crecimiento de las cianobacterias como el género *Microcystis* y por consiguiente a la síntesis de microcistinas (Wang y col., 2009). Sin embargo, se desconoce si otras condiciones ambientales tales como la radiación, la salinidad y el amonio afectan la síntesis de estos compuestos o si existe alguna relación sinérgica entre ellas.

Los géneros más importantes descritos como potencialmente productores de microcistinas son: *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Anabaenopsis*, *Hapalosiphon*, *Woronichinia* y *Aphanocapsa*. El género *Scytonema* destaca por la capacidad de sintetizar pigmentos capaces de absorber la radiación ultravioleta para contrarrestar los efectos perjudiciales que provoca en su metabolismo (Fleming y Castenholz, 2007), pero no ha sido estudiado hasta el momento como productor de microcistinas.

Objetivos

Debido a los riesgos que presentan diversas sustancias producidas por las cianofíceas en los ecosistemas acuáticos para el resto de seres vivos, cada día cobra más importancia la necesidad de conocer cuáles son los factores ambientales que incitan a estos organismos a su producción, como ocurre en el caso de las microcistinas.

En este trabajo se pretende conocer el efecto de diversos factores ambientales en la síntesis de microcistinas por la cianobacteria seleccionada. Para ello se plantearon los siguientes objetivos parciales:

- Determinar la especie seleccionada para este estudio y comprobar si es capaz de sintetizar microcistinas.
- Averiguar si parámetros ambientales como la radiación, la temperatura, la salinidad y el amonio afectan a la síntesis de microcistinas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio incluye tanto trabajo de campo, en lo referente a la recolección de las muestras y medidas de parámetros ambientales, como trabajo de laboratorio, en cuanto al estudio e identificación de la especie seleccionada y al diseño experimental para determinar la influencia de los factores ambientales en la síntesis de microcistinas.

Lugar de estudio y medición de los parámetros ambientales

El río Vinalopó (Figuras 4 y 5) fue el lugar seleccionado para recoger las muestras. Este río atraviesa de norte a sur la provincia de Alicante, pasando por más de 10 municipios entre ellos Elche, lugar donde se recogieron las muestras.



Figura 4.- Lugar de recogida de las cianobacterias, zona del puente Bimilenario.



Figura 5.- Zona de crecimiento de las cianobacterias.

Con el objetivo de conocer las condiciones ambientales en las que se desarrolla la cianobacteria a estudio, se tomaron medidas de Temperatura, Humedad relativa, Radiación Activa Fotosintética (RAF), Radiación Ultravioleta A (UVA) y Radiación Ultravioleta B (UVB).

Estas medidas fueron registradas puntualmente una mañana de primavera del año 2015. Para llevar a cabo estas medidas se utilizó un Termohigrómetro Delta Ohm HD 8501 H (Figura 6) para detectar la temperatura y la humedad. Las medidas de radiación de luz visible, de radiación ultravioleta A y B fueron tomadas con un Fotorradiómetro Delta Ohm Do 9721 (Figura 7) colocando los electrodos sobre la roca donde se recolectó la muestra seleccionada.



Figura 6.- Termohigrómetro.



Figura 7.- Fotorradiómetro.

Recolección, observación e identificación del material

La recolección de las cianobacterias se realizó manualmente y de forma aleatoria. Se transportaron al laboratorio en sobres, posteriormente se colocaron en placas Petri y se conservaron a temperatura ambiente.

Las distintas muestras recogidas fueron lavadas con agua destilada y observadas en primer lugar con una lupa binocular LAN OPTICS (Figura 8) con el fin de identificar diferentes texturas y coloraciones. Posteriormente, se seleccionó el material y se realizaron varias preparaciones para ser observadas con el microscopio óptico OLYMPUS BX41 (Figura 9).

El procedimiento que se siguió en cada muestra fue, primero se hizo un barrido por los diferentes aumentos del microscopio, desde el objetivo de 10 aumentos hasta el de 100 aumentos, a la vez que se hacían microfotografías de las diferentes estructuras de las células, lo cual facilitó el proceso de identificación de la especie. Para la realización de las microfotografías se utilizó una cámara digital OLYMPUS CAMELIA C-5060 que viene acoplada en el microscopio, a su vez conectada a una televisión. En algunas muestras era complicada su visualización debido a la enorme cantidad de materia orgánica y de carbonato, para poderla dispersar se utilizó ácido acético y ácido etildiaminotetracético (EDTA).



Figura 8.- Lupa binocular.



Figura 9.- Microscopio óptico acoplado a una cámara digital y una televisión.

Con las fotos tomadas y las condiciones del lugar donde se desarrollaban se pudo determinar tanto el género como la especie de las diferentes comunidades encontradas, para ello se hizo uso de los textos de Geitler (1932) y Komárek (2013).

Diseño experimental

El material recolectado se lavó con agua estéril para eliminar las impurezas y se distribuyó en placas Petri con 3ml de medio de cultivo líquido BG11 (Stanier y col., 1971) (Figura 10). Se prepararon un total de 52 placas, de las cuales 40 se introdujeron en una cámara de crecimiento (Ing. Climas, modelo GROW) (Figura 11) a una temperatura de 20°C, 4 placas a 30°C, 4 placas restantes a 40°C y las 4 placas restantes no sufrieron ningún tratamiento posterior que se utilizaron como control.



Figura 10.- Cianobacterias en placa Petri con medio de cultivo.

De las 40 placas que crecieron a 20°C, se diferenciaban en las siguientes características; 12 placas con tres concentraciones distintas de amonio (4 con 0 μM NH_4Cl , 4 con 50 μM NH_4Cl y 4 con 300 μM NH_4Cl), 12 placas con tres valores diferentes de conductividad (4 con 3731 $\mu\text{S}/\text{cm}$,

4 con $5207\mu\text{S}/\text{cm}$ y 4 con $7360\mu\text{S}/\text{cm}$), 4 placas a luz visible y luz ultravioleta A, otras 4 placas a luz visible y a luz ultravioleta A y B, finalmente 4 placas que solo recibían luz visible y el medio BG11 sin alterar.

Todas las placas estuvieron expuestas a $93,1\ \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ de luz visible proporcionada por el tubo F36W/54-765-TB. Además de la luz visible, 4 placas estuvieron expuestas a $6,44\ \text{W}/\text{m}^2$ de luz ultravioleta A proporcionada por el tubo FL-PHP-40W/09 y otras 4 placas estuvieron expuestas a $1,51\ \text{W}/\text{m}^2$ de luz ultravioleta B proporcionada por el tubo TL-40W/12-RS. Por otro lado, todas las placas se incubaron durante 10 días, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad y la posición de las placas se cambiaba diariamente para eliminar cualquier efecto de localización (Figura 12). En el caso de la luz ultravioleta B solo incidía sobre las placas durante 4 horas al día. Para que a todas las placas les llegara la luz adecuada se cubrían con filtros para que dejara pasar la luz correspondiente a cada placa, en el caso de las placas que solo debían recibir luz visible se cubrían con filtros RAF 226 lee, las placas que debían recibir luz visible y ultravioleta A se cubrían con filtros PA 130 lee y las placas que debían recibir luz visible, ultravioleta A y ultravioleta B se cubrían con filtros PAB 216 lee de acetato de celulosa.



Figura 11.- Cámara de crecimiento.



Figura 12.- Placas en la cámara de crecimiento iluminadas.

Transcurridos los 10 días se levantó la experiencia y se sacó el material de las placas correspondientes y se pusieron en tubos de crioconservación, eliminando el medio de cultivo y

se congelaron a una temperatura de -18°C . Posteriormente se descongelaron las muestras. A partir de aquí una placa de cada condición, 13 placas en total, se utilizaron para determinar la cantidad de clorofila a y carotenoides. El resto, las 39 placas, siguieron el proceso de extracción y concentración de microcistinas.

A partir de este momento se trabajó siempre en oscuridad para evitar la fotodegradación de los diferentes compuestos de las muestras.

Respecto a la extracción y concentración de las microcistinas, se introdujeron las muestras en tubos Eppendorf, se le añadió 1ml de metanol grado HPLC y se trituró el material. Una vez procesadas todas las muestras se pusieron en el sonicador Elma D-78224 Singen7HtW (Figura 13) durante 15 minutos a una temperatura de $30-35^{\circ}\text{C}$. A continuación se retiró el sobrenadante y se guardó en tubos nuevos de crioconservación. Todo este proceso se realizó 3 veces hasta obtener al final unos 3 ml de extracto de cada muestra que se volvieron a congelar a -18°C . Posteriormente se descongelaron de nuevo y se procedió a la concentración de la muestra con el uso de un rotavapor Hei-Vap Value (Figura 14), se vació el contenido de cada muestra en balones de 250ml. El baño se encontraba a una temperatura de 45°C . Después de la primera ronda, en las siguientes dos rondas se añadió 2ml de metanol y se volvió a poner en el rotavapor. Una vez acabada la tercera ronda, se añadió 1ml de metanol para recoger todo el extracto del balón y se recogió con una jeringuilla acoplada a un filtro GF/F, se depositó en viales para cromatografía y se congelaron a -18°C .



Figura 13.- Sonicador.



Figura 14.- Rotavapor.

Análisis de microcistinas

Una vez que las muestras fueron extraídas con metanol, el contenido de toxinas se detectó mediante cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) con un equipo HPLC VWR Hitachi (Figura 15) que posee una columna de fase inversa. La fase móvil estaba compuesta por un gradiente desde el 70% TFA (0,5ml/L) hasta 0 y 30% TFA en acetonitrilo al 100% hasta los 45 minutos y de nuevo al 70% TFA en agua y 30% TFA en acetonitrilo desde el minuto 46 hasta el minuto 55. La velocidad del flujo fue de 1ml/min. Como detector se utilizó una matriz de fotodiodos con longitudes entre 200 y 300nm (Meriluoto y col., 1990; Gjolme y Utkilen, 1996).



Figura 15.- Equipo de HPLC.

Se prepararon diferentes concentraciones: 25, 15, 5, 0,1, 0,5 y 0,1 μ g/ml de microcistinas comerciales MC-LR, MC-LW, MC-YR, MC-LF y MC-RR suministradas por Axxora[®] con el fin de utilizarlas como patrón y poder cuantificar las muestras.

Análisis de clorofila a y carotenoides

Por otro lado, para la determinación de clorofila *a* y carotenoides las muestras se añadieron a tubos Eppendorf con 1ml de acetona pura y se trituraron. Después se guardaron en oscuridad y a 4°C durante 24 horas. Posteriormente se centrifugaron a 6000rpm durante 30 minutos en una centrífuga Ortoalresa Digicen 21R (Figura 16). El sobrenadante se recogió también con jeringuillas acopladas a un filtro GF/F y se midió la absorbancia a 3 longitudes de onda diferentes 384 nm, 490 nm y 663 nm, con un espectrofotómetro UV/ Visible Modelo 4201/50 (Figura 17). Se cuantificaron clorofila *a* y carotenoides totales con las siguientes ecuaciones:

$$A^*_{663}(\text{Clorofila } a) = 1,02A_{663} - 0,027A_{384} - 0,01A_{490}$$

$$A^*_{490}(\text{Carotenoides}) = 1,02A_{490} - 0,08A_{384} - 0,026A_{663}$$

Donde A_λ = la medida de absorbancia a λ , A^*_{663} (Clorofila a) = la absorbancia a 663 contribuida por clorofila a y A^*_{490} (Carotenoides) = la absorbancia a 490 contribuida por carotenoides totales (García-Pichel y Castenholz 1991).



Figura 16.- Espectrofotómetro.

Análisis estadístico

El análisis de los datos obtenidos en este estudio se realizó con ayuda de Microsoft Excel y el programa estadístico SPSS v17.0. Para determinar si las diferencias entre las diferentes radiaciones, temperaturas, salinidad y amonio eran significativas o no se llevó a cabo un análisis de varianza ANOVA de un factor. Para determinar si las diferencias entre el control y cada una de las condiciones (radiación, temperatura salinidad y amonio) eran significativas o no, se llevó a cabo con una prueba T-Test. El nivel de significación estadística que se estableció fue Sig < 0,01.

RESULTADOS

Se presenta la descripción de la especie seleccionada, los valores de radiación activa fotosintética (RAF), de radiación ultravioleta A y B, de temperatura y de humedad relativa correspondientes a la zona donde se desarrolla, así como la participación de los factores ambientales en la síntesis de microcistinas.

Identificación taxonómica y registro de parámetros ambientales

Se trata de la especie *Scytonema javanicum* Bornet et Thuret ex Bornet et Flahault 1887 que se caracteriza por formar talos postrados de 2mm de grosor, de color verde azulado o pardo amarillento (Figuras 5 y 10).

Scytonema javanicum posee filamentos entre 11-15 μ m de anchura (Figuras 17a y b), ramificados con ramas geminadas (Figura 17c) y ramas laterales (Figura 17d) con vainas amarillentas o incoloras. Las células son más cortas que anchas, 6-8 x 8-10 μ m de color verde claro. Además presentan heterocitos esféricos, intercalares o terminales, de 7-9 μ m (Figura 17e).

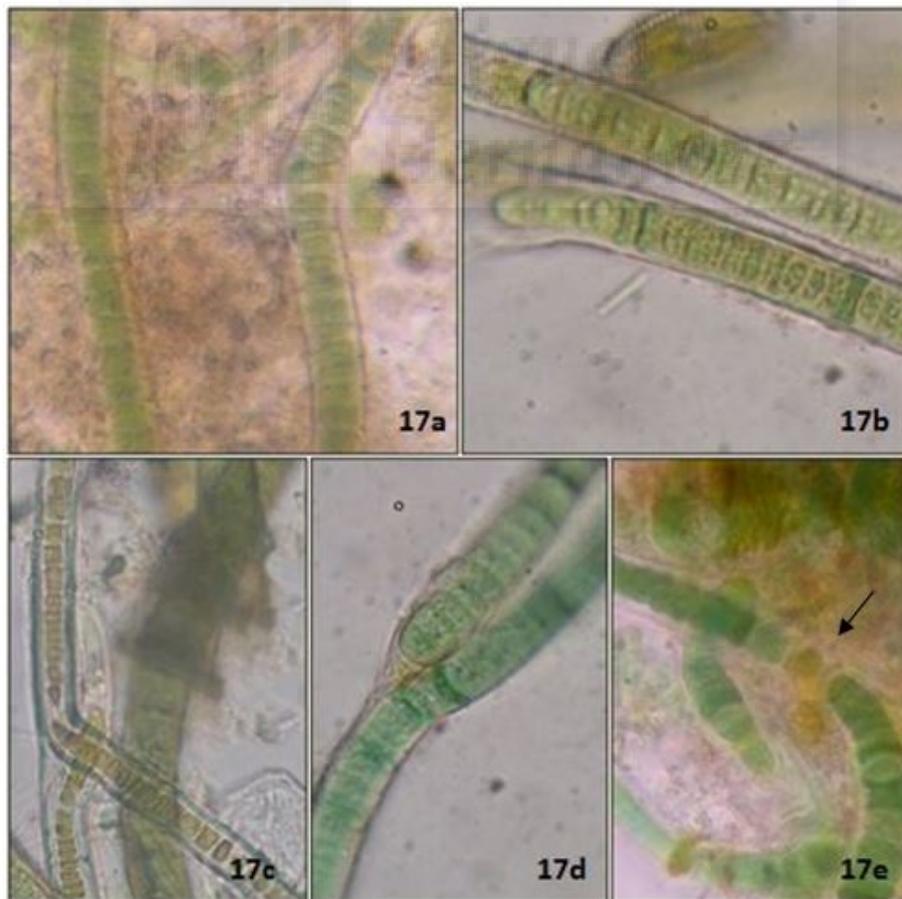


Figura 17.- Filamentos de *Scytonema javanicum* a 100 aumentos. La flecha indica el heterocito.

En el río Vinalopó a la altura de Elche bajo del puente Bimilenario, *Scytonema javanicum* se desarrolla en primavera con una humedad relativa que oscila entre 50-55% y una temperatura entre 22-23°C. Respecto a la radiación, soporta valores de luz visible entre 1630-1650 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, de radiación ultravioleta A entre 4,5-5 W/m^2 y la de ultravioleta B entre 0,14-0,17 W/m^2 .

Influencia de los factores ambientales en la síntesis de microcistinas

Se analizó la presencia de cinco microcistinas: MC-LR, MC-LW, MC-YR, MC-LF y MC-RR y solo se detectó la microcistina LW en las muestras analizadas. Se observó un descenso significativo ($p < 0,01$) del contenido en microcistinas en células expuestas a cada una de los tratamientos estresantes. Los efectos de los tratamientos individuales (radiación, temperatura, salinidad y amonio) se exponen a continuación.

l) Radiación

Se realizó un experimento en el cual *Scytonema javanicum* fue expuesta a distintas radiaciones de luz visible, UVA, UVB, sin amonio, con una temperatura de 20°C y con una salinidad de 3731 $\mu\text{S}/\text{cm}$ que es la que posee el medio de cultivo BG11. Los valores de microcistinas LW detectados en los tres casos son inferiores significativamente a los registrados en el control como nos indica el T-Test ($T=3,22$; $p < 0,01$) (Tabla 5). Además, si se compara los valores de MC-LW en cada una de las 3 radiaciones se observa que la cantidad de MC-LW en condiciones de UVA+RAF disminuye con respecto a los otros dos casos en los que la presencia ha sido mayor (Tabla 1), por lo que se puede afirmar que la radiación afecta de manera no significativa a la producción de microcistinas. En todos los casos, el descenso de la cantidad de microcistinas va acompañado por un aumento en el contenido celular de clorofila *a* y de carotenoides (Tabla 6).

	Control	RAF	UVA+RAF	UVA+UVB+RAF
Concentración MC-LW ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	2,56 \pm 2,51	0,95 \pm 0,05	0,62 \pm 0,07	1,01 \pm 0,01

Tabla 1. Contenido en microcistinas LW de *Scytonema javanicum* a distintos tratamientos de radiación. Los datos se expresan en unidades de concentración ($\mu\text{g}/\text{ml}$) y representan la media y la desviación estándar ($n=3$).

II) Temperatura

Se realizó un experimento en el cual *Scytonema javanicum* fue expuesta a temperaturas de 20°C, 30°C y 40°C bajo radiación visible, sin amonio y con una salinidad de 3731µS/cm que es la que posee el medio de cultivo BG11. Los valores de microcistinas LW detectados en los tres casos son inferiores significativamente a los registrados en el control como nos indica el T-Test ($T=2,95$; $p<0,01$) (Tabla 5). Además, si se comparan los valores de MC-LW en las 3 temperaturas se observa que con el aumento de la temperatura la presencia de microcistinas disminuye (Tabla 2), por lo que se puede afirmar que la temperatura afecta de manera no significativa a la concentración de microcistinas. En todos los casos, el descenso del contenido de microcistinas va acompañado por un aumento en el contenido celular de clorofila *a* y de carotenoides (Tabla 6).

	Control	20°C	30°C	40°C
Concentración MC-LW (µg/ml)	2,56±2,51	0,95±0,05	0,54±0,12	0,31±0,02

Tabla 2. Contenido en microcistinas LW de *Scytonema javanicum* a distintos tratamientos de temperatura. Los datos se expresan en unidades de concentración (µg/ml) y representan la media y la desviación estándar ($n=3$).

III) Salinidad

Se realizó un experimento en el cual *Scytonema javanicum* fue expuesta a distintas salinidades de 3731µS/cm, 5207µS/cm, 7360µS/cm bajo radiación visible, sin amonio y con una temperatura de 20°C en el medio de cultivo BG11. Los valores de microcistinas LW detectados en los tres casos son inferiores significativamente a los registrados en el control como nos indica el T-Test ($T=2,92$; $p<0,01$) (Tabla 5). Además, si se comparan los valores de MC-LW en cada una de las 3 salinidades se observa que con el aumento de la salinidad la presencia de microcistinas disminuye (Tabla 3), por lo que se puede afirmar que la salinidad afecta de manera no significativa a la concentración de microcistinas. En todos los casos, el descenso de la cantidad de microcistinas va acompañado por un aumento en el contenido celular de clorofila *a* y de carotenoides (Tabla 6).

	Control	Salinidad baja (3731 μ S/cm)	Salinidad media (5207 μ S/cm)	Salinidad alta (7360 μ S/cm)
Concentración MC-LW (μ g/ml)	2,56 \pm 2,51	0,95 \pm 0,05	0,50 \pm 0,09	0,38 \pm 0,02

Tabla 3. Contenido en microcistinas LW de *Scytonema javanicum* a distintas salinidades. Los datos se expresan en unidades de concentración (μ g/ml) y representan la media y la desviación estándar (n=3).

IV) Amonio

Se realizó un experimento en el cual *Scytonema javanicum* fue expuesta a distintas concentraciones de amonio de 0 μ M NH₄Cl, 50 μ M NH₄Cl, 300 μ M NH₄Cl, bajo radiación visible, con una temperatura de 20°C y con una salinidad de 3731 μ S/cm que es la que posee el medio de cultivo BG11. Los valores de microcistinas LW detectados en los tres casos son inferiores significativamente a los registrados en el control como nos indica el T-Test (T=2,88; p<0,01) (Tabla 5). Además, si se compara los valores de MC-LW en cada una de las 3 concentraciones de amonio se observa que con el aumento de la concentración de amonio la concentración de microcistinas disminuye (Tabla 4), por lo que se puede afirmar que la presencia de amonio afecta de manera no significativa a la concentración de microcistinas. En todos los casos, el descenso de la cantidad de microcistinas va acompañado por un aumento en el contenido celular de clorofila *a* y de carotenoides (Tabla 6).

	Control	NH ₄ Cl bajo (0 μ M)	NH ₄ Cl medio (50 μ M)	NH ₄ Cl alto (300 μ M)
Concentración MC-LW (μ g/ml)	2,56 \pm 2,51	0,95 \pm 0,05	0,67 \pm 0,04	0,39 \pm 0,08

Tabla 4. Contenido en microcistinas LW de *Scytonema javanicum* a distintas concentraciones de amonio. Los datos se expresan en unidades de concentración (μ g/ml) y representan la media y la desviación estándar (n=3).

Microcistina LW			
Radiación	Temperatura	Salinidad	Amonio
T=3,22**	T=2,95**	T= 2,92**	T=2,88**

*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; ^{ns} no significativa

Tabla 5. Comparación del contenido en microcistinas LW en los diferentes tratamientos evaluada por T-Test.

Con el fin de verificar la validez de los resultados obtenidos se midió el contenido de dos pigmentos, la clorofila *a* y los carotenoides de todas las muestras de *Scytonema javanicum* para comprobar que continuaban con vida después de haber recibido los correspondientes tratamientos. La comparación se hizo respecto a la muestra control que no recibió ningún tratamiento. Tras el análisis se pudo concluir que todas las muestras estaban vivas debido a que el contenido en clorofilas *a* y en carotenoides era prácticamente el mismo (Tabla 6).

TRATAMIENTOS	PIGMENTOS	
	Clorofila <i>a</i> (A_{663})	Carotenoides (A_{490})
RAF	0,66 ± 0,01	0,50 ± 0,01
UVA	0,76 ± 0,01	0,68 ± 0,02
UVB	0,72 ± 0,02	0,67 ± 0,02
20 °C	0,66 ± 0,01	0,50 ± 0,01
30 °C	0,65 ± 0,01	0,54 ± 0,01
40 °C	0,70 ± 0,01	0,54 ± 0,01
3731 $\mu\text{S}/\text{cm}$	0,66 ± 0,01	0,50 ± 0,01
5207 $\mu\text{S}/\text{cm}$	0,64 ± 0,02	0,58 ± 0,01
7360 $\mu\text{S}/\text{cm}$	0,70 ± 0,02	0,62 ± 0,01
0 $\mu\text{M NH}_4\text{Cl}$	0,66 ± 0,01	0,50 ± 0,01
50 $\mu\text{M NH}_4\text{Cl}$	0,71 ± 0,01	0,54 ± 0,01
300 $\mu\text{M NH}_4\text{Cl}$	0,75 ± 0,01	0,57 ± 0,01
Control	0,73 ± 0,01	0,63 ± 0,01

Tabla 6. Contenido en pigmentos de *Scytonema javanicum* después de los distintos tratamientos realizados. Los datos se expresan en unidades de absorbancia y representan la media y la desviación estándar ($n=3$).

DISCUSIÓN

Para evitar los efectos nocivos de la toxicidad de las cianobacterias es muy importante conocer qué factores son los que regulan la síntesis de las toxinas. Debido a la existencia de una gran heterogeneidad en cuanto a la producción de microcistinas, esto se suele atribuir a factores ambientales, pues los estudios de laboratorio han demostrado que la producción de microcistinas varía en función de la concentración de nitrógeno y fósforo presente en el medio, de la radiación y de la temperatura (Kotak y col., 2000; Kaebernick y Neilan, 2001).

El impacto de la radiación ultravioleta B es perjudicial para los ecosistemas acuáticos fundamentalmente para los organismos que se encuentran en la parte más superficial. Varios estudios han demostrado que la radiación UVB provoca daños severos en las cianobacterias, dañando el ADN y produciendo especies reactivas de oxígeno (ROS) (Häder y col., 2005; He y col., 2002). Experimentos recientes indican que las microcistinas desempeñan un papel importante en las cianobacterias bajo condiciones de estrés como la luz UVB (Dziallas y col., 2011) lo que justificaría la mayor concentración de microcistina LW con radiación UVB que con UVA en el presente trabajo Zilliges et al. (2011) propone que estos cianopéptidos actúan como una proteína moduladora del metabolismo y que protege del estrés oxidativo demostrando que su unión a diversas enzimas del ciclo de Calvin es superior en condiciones de estrés como la luz UVB.

La temperatura del agua es un factor crítico para el desarrollo de cianofíceas productoras de microcistinas. La temperatura interviene en la síntesis de vesículas de gas, la fotosíntesis y por consecuencia a la producción de carbohidratos. En estudios realizados se ha determinado que la temperatura óptima para el crecimiento y por lo tanto de producción de microcistinas es alrededor de los 20 grados (Robarts y Zohary, 1987) coincidiendo con los resultados de este estudio.

La salinidad es considerada un factor ecológico que afecta al crecimiento en cianobacterias como *Nostoc spumigena* (Nordin y Stein, 1980). Se han realizado diversos estudios sobre cómo afecta la salinidad al crecimiento y a la producción de cianotoxinas de esta especie comparando entre su crecimiento en agua dulce y agua de mar y se obtuvo que las tasas de crecimiento fueron significativamente inferiores a alta salinidad que a baja salinidad. Lo que indica que una salinidad extrema no favorece el desarrollo de *blooms* y en consecuencia tampoco el contenido de cianotoxinas (Blackburn y col., 1996). Comparando con estos datos

se confirma que al aumentar la salinidad en el medio donde habitan la concentración de cianotoxinas se ve afectada negativamente como se ha obtenido en este estudio.

Las grandes floraciones de cianobacterias provocan un aumento en los niveles totales de nitrógeno además de la disminución de oxígeno. En diversos lagos de China se realizó un estudio sobre cómo afecta la cantidad de nitrógeno disuelto en el agua con la producción de microcistinas LR y RR del género *Microcystis*. Se obtuvo que las concentraciones de MC-LR se correlacionaban positivamente con la cantidad de nitrógeno (Ye y col., 2014). Sin embargo, estudios previos demostraron que la MC-RR se encontraba a mayor concentración a menor cantidad de nitrógeno disuelto (Xie y col., 2003), coincidiendo con los resultados expuestos en este trabajo ya que a mayor concentración de amonio las cantidades de microcistina LW disminuyen. Se observa como los resultados existentes hasta el momento no son muy esclarecedores a la hora de evaluar cómo afectan los niveles de amonio al crecimiento y producción de microcistinas por parte de las cianobacterias.

Respecto a la microcistina LW hay pocos estudios realizados sobre su producción y toxicidad debido a su baja presencia en aguas que contienen microcistinas. De todas las conocidas hasta ahora, la microcistina más abundante es la MC-LR ya que el reemplazamiento de la leucina (L) y de la arginina (R) en las posiciones X e Y respectivamente reduce la toxicidad (Zurawell y col., 2055). Pero recientemente se ha observado en estudios *in vitro* que las microcistinas MC-LW y MC-LF, consideradas minoritarias, en las que la posición Y es ocupada por un triptófano o una fenilalanina respectivamente son más tóxicas que la MC-LR. Se observaba más citotoxicidad en hepatocitos que la provocada por MC-LR (Fischer y col., 2010; Vesterkvist y col., 2012).

Un estudio realizado en diferentes zonas de los Países Bajos cuantificó la presencia de MC-LW en 25 de las 77 muestras de agua, lo que indica que la presencia de esta microcistina era de un 32% del total de las muestras que contenían microcistinas. La media de MC-LW detectada fue de 300µg/L. Este porcentaje es considerablemente mayor que la presencia de MC-LW en otros estudios, pero menos del 45% de los lagos de Estados Unidos. Por lo que se puede observar que las MC-LW contribuyen a la toxicidad total (Faassen y Lürling, 2013).

Las cianobacterias están frecuentemente expuestas a condiciones ambientales extremas (Gabani y Singh, 2013) como sucede con *Scytonema javanicum*. El hecho de que la concentración de microcistinas LW sea mayor en los controles indica que, en general, la máxima producción de toxinas suele darse en condiciones óptimas de crecimiento de las cianobacterias de acuerdo con Sivonen y Jones (1999) y Kaebernick y Neilan (2001). Sin embargo, los componentes genéticos también parecen jugar un papel importante en estas variaciones (Martín y col., 2004).



CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

Según los objetivos propuestos para este estudio, se determinaron las siguientes conclusiones:

1. La especie *Scytonema javanicum* Bornet et Thuret ex Bornet et Flahault que se desarrolla en el río Vinalopó a su paso por Elche es capaz de sintetizar sustancias tóxicas como son las microcistinas.
2. *S. javanicum* produce microcistinas LW y no sintetiza otras microcistinas como MC-LR, MC-YR, MC-LF y MC-RR.
3. Parámetros ambientales como la radiación ultravioleta, la temperatura, la salinidad y el amonio afectan a la síntesis de microcistinas LW en *S. javanicum*.
4. Valores elevados de radiación UVA y UVB, temperatura, salinidad y amonio afectan negativamente a las cantidades finales de microcistinas LW en *S. javanicum*.
5. Altas radiaciones de UVB junto con radiación UVA inducen mayor concentración de microcistinas que si solo están expuestas a una de ellas.

De acuerdo con los resultados obtenidos que indican que la concentración de microcistinas se ve reducida en *Scytonema javanicum* mediante la aplicación de radiación ultravioleta A y B, altas temperaturas, elevados valores de salinidad y altas concentraciones de amonio, se podría profundizar en esta investigación para intentar predecir futuros escenarios de cambio climático donde se podría producir un incremento de los *bloom* pero no de la toxicidad.

BIBLIOGRAFÍA

- Asencio, A.D. (1997). Flora algal y condiciones ambientales de las cuevas y abrigos con pinturas ruprestres de la Región de Murcia. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- Asencio, A.D., Aboal, M. (2011). In situ nitrogen fixation by cyanobacteria at the Andragulla cave, Spain. *Journal of Cave and Karst Studies*, 73: 130-136.
- Asencio, A.D. (2013). Determination of microcystins in reservoirs of different basins in a semiarid area. *Journal of Applied Phycology*, 25:1753–1762.
- Blackburn S., Malcolm A. McCausland, Christopher J. S. Bolch, Stuart J. Newman, and Gary J. Jones. (1996). Effect of salinity on growth and toxin production in cultures of the bloom-forming cyanobacterium *Nodularia spumigena* from Australian waters. *Phycologia*, vol.35(6), 511-522.
- Botes DP, Wessels PL, Kruger H, Runnegar MTC, Santikarn S, Smith RJ, et al.(1985). Structural studies on cyanoginosins-LR, YR, YA, and YM, peptide toxins from *Microcystis aeruginosa*. *J Chem Soc Perkin Trans 1*:2747–8.
- Briand, J., Jacquet, S., Bernard, C., Humbert, J. (2003). Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Vertebrate Research* 34:361-377.
- Campbell, N., Jane B. (2005) *Biología*. (Séptima edición).Capítulo 27, pág: 539.
- Carmichael WW, Beasley V, Bunner DL, Eloff JN, Falconer I, Gorham P, Harada K, Krishnamurthy T, Min-Juan Y, Moore RE, Rinehart K, Runnegar M, Skulberg OM, y Watanabe M (1988). Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon* 26: 971-973.
- Chorus I (2005). Editorial and summary. Current approaches to cyanotoxins risk assessment, risk management and regulations in different Countries. *Umweltbundesamt, Dessau, Germany*, pp 1-8.
- Codd G.A., Morrison LF, Metcalf JS (2005a). Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicol Appl Pharmacol* 203:264–72.
- Codd, G.A., J. Lindsay, F. M. Young, L. F. Morrison, and J. S. Metcalf. (2005b). Harmful cyanobacteria: from mass mortalities to management measures. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203: 264-272.
- Cook CM, Vardaka E, y Lanaras T (2004). Toxic cyanobacteria in Greek freshwaters, 1987-2000: occurrence, toxicity, and impacts in the Mediterranean region. *Acta Hydrochimica Et Hydrobiologica* 32: 107-124.
- Dittmann E, Wiegand C. (2006). Cyanobacterial toxins— occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. *Mol Nutr Food Res* 50:7-17.
- Dziallas C, Grossart HP. (2011). Increasing oxygen radicals and water temperature select for toxic *Microcystis* sp.

- Faassen, Elisabeth J., and Lüring Miquel (2013). Occurrence of the Microcystins MC-LW and MC-LF in Dutch Surface Waters and Their Contribution to Total Microcystin Toxicity. *Drugs*, 11, 2643-2654.
- Fastner J, Neumann U, Wirsing B, Weckesser J, Wiedner C, Nixdorf B, y Chorus I (1999). Microcystins (hepatotoxic heptapeptides) in German fresh water bodies. *Environmental Toxicology* 14: 13-22.
- Figueiredo, D.R., Azeiteiro, U. M., Esteves, S. M., Gonzalves, F. J.M., Pereira, M. J. (2004). Microcystin-producing "bloom"-s- a serious global public health. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59:15116.
- Fischer, A.; Hoeger, S.J.; Stemmer, K.; Feurstein, D.J.; Knobloch, D.; Nussler, A.; Dietrich, D.R. (2010). The role of organic anion transporting polypeptides (OATPs/SLCOs) in the toxicity of different microcystin congeners *in vitro*: A comparison of primary human hepatocytes and OATP-transfected HEK293 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 245, 9–20.
- Fleming ED, Castenholz RW. (2007). Effects of periodic desiccation on the synthesis of the UV screening compound, scytonemin, in cyanobacteria. *Environ Microbiol* 9: 1448–55.
- Gabani, P., Singh, O.V. (2013). Radiation-resistant extremophiles and their potential in biotechnology and therapeutics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97 (3): 993-1004.
- García-Pichel, F., Castenholz, R. W. (1991). Characterization and biological implications of scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment. *Journal of Phycology*, 27 (3): 395-409.
- Geitler, L. (1932). Cyanophyceae. In *Cyanophyceae*. Johnson.
- Gjolme N, Utkilen H (1996). The extraction and the stability of microcystin-RR in different solvents. *Phycologia* 35:80-82.
- Gulledge BM, Aggen JB, Huang H-B, Nairn AC, Chamberlin AR. (2002). The microcystins and nodularins: cyclic polypeptide inhibitors of PP1 and PP2A. *Curr Med Chem* 9: 1991–2003.
- Häder DP, Sinha RP. (2005). Solar ultraviolet radiation-induced DNA damage in aquatic organisms: potential environmental impact. *Mutation Research* 571(1–2):221–233.
- He YY, y Häder DP. (2002). Involvement of reactive oxygen species in the UV-B damage to the cyanobacterium *Anabaena* sp. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 66(1): 73–80.
- Ito, E., Kondo, F., Terao, K. and Harada, K. I. (1997). Neoplastic nodular formation in mouse liver induced by repeated intraperitoneal injections of microcystin-LR. *Toxicol* 35(9):1453-1457.
- Kaebernick, M. y B. A. Neilan (2001). Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 35: 1-9.

- Kearns KD y Hunter MD (2001). Toxin-producing *Anabaena flos-aquae* induces settling of *Chlamydomonas reinhardtii*, a competing motile alga. *Microbial Ecology* 42: 80-86.
- Komárek J., Anagnostidis K. (2005). Cyanoprokaryota 19/2: Oscillatoriales. In: Büdel B, Gärtner G, Krienitz L, Schagerl M. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag.
- Komárek, J. (2013). Cyanoprokaryota 19/3: Heterocystous genera. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Heidelberg, Springer Spektrum.
- Kotak B. G., A. K. Y. Lam, E. E. Prepas y S. E. Hrudey (2000). Role of chemical and physical variables in regulating microcystin-LR concentration in phytoplankton of eutrophic lakes. *Can. J. Fish. Aq. Sci.*, 57: 1584–1593.
- Kump, L. R. (2014). Earth's oxygen unravelled. *Nature Geoscience*, 7 (4): 248-248.
- Llimona, X., Ballesteros, E., Brugués, M., Comín, F.A., Cros, R.M., Molero, J., Romero, J., Tomás, X., Torrella, F. (1985). Història natural dels països catalans. 4, Plantes inferiors. Enciclopèdia Catalana. Barcelona.
- Martín A., Carrillo E. y Costas E. (2004). Variabilidad genética para la producción de toxina en poblaciones de *Microcystis aeruginosa* en dos embalses de abastecimiento de Andalucía. *Limnética*, V. 23 n. 1-2 p. 153-158.
- Meriluoto JAO, Ermsson JE, Harada KI, Dahlem AM, Sivonen K, Carmichael WW (1990). Internal surface reverse phase high-performance liquid chromatographic separation of the cyanobacterial peptide toxins microcystin-LR, -YR, -RR and nodularin. *J Chromatogr* 509:390-395.
- Nordin R.N. y Stein J.R. (1980). Taxonomic revision of *Nodularia* (Cyanophyceae/Cyanobacteria). *Canadian Journal of Botany* 58:1221-1224.
- Pereira S, Saker M, Vale M, Vasconcelos VM (2009). Comparison of sensitivity of grasses (*Lolium perenne* L. and *Festuca rubra* L.) and lettuce (*Lactuca sativa* L.) exposed to water contaminated with microcystins. *Bull Environ Contam Toxicol* 83:81-84.
- Rao PV, Gupta N, Bhaskar AS, Jayaraj R. (2002). Toxins and bioactive compounds from cyanobacteria and their implications on human health. *J Environ Biol* 23:215–24.
- Roberts RD, Zohary T (1987). Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration, and growth rates of bloom-forming Cyanobacteria. *N Z J Mar Freshw Res* 21:391–399.
- Singh DP, Tyagi MB, Kumar A, Thakur JK, y Kumar A (2001). Antialgal activity of a hepatotoxin-producing cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 17: 15-22.
- Sivonen, K. y G. Jones (1999). Cyanobacterial toxins. In: Toxic Cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. I. Chorus y J. Bartram (eds): 41-111. Routledge, London.

- Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M., Cohen-Bazire, G. (1971). Purification and properties of unicellular blue-green algae (order *Chroococcales*). *Bacteriological reviews*, 35 (2): 171.
- Vesterkvist, P.S.M.; Misiorek, J.O.; Spoof, L.E.M.; Toivola, D.M.; Meriluoto, J.A.O. (2012). Comparative cellular toxicity of hydrophilic and hydrophobic microcystins on Caco-2 cells. *Toxins* 4, 1008–1023.
- Wang H, Gruden CL, Bridgeman TB, Chafin JD (2009). Detection and quantification of *Microcystis* spp. and microcystin-LR in Western Lake Erie during the summer of 2007. *Water Sci Technol* 60:1837–1846.
- Wiegand C, Pflugmacher S. (2005). Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites: a short review. *Toxicol Appl Pharmacol* 203:201–18.
- Xie L., Xie P., Li S., Tang H., Liu H. (2003). The low TN: TP ratio, a cause or a result of *Microcystis* blooms? *Water Res.* 37:2073–2080.
- Ye R, Shan K, Gao H, Zhang R, Xiong W, Wang Y, Qian X. (2014). Spatio-temporal distribution patterns in environmental factors, chlorophyll-a and microcystins in a large shallow lake, Lake Taihu, China. *Int J Environ Res Public Health*.
- Young, F. M., Thomson, C., Metcalf, J. S., Lucocq, J. M., Codd, G. A. (2005). Immunogold localisation of microcystins in cryosectioned cells of *Microcystis*. *Journal of Structural Biology* 151:208-214.
- Zaccaroni A, Scaravelli D (2008). Toxicity of freshwater algal toxins to humans and animals. In: Evangelista V, Barsanti L, Gualtieri P (eds), *Algal toxins, occurrence, effect and detection*. Springer, Dordrecht, pp.45-89.
- Zegura B, Straser A, Filipic M (2011). Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins—a review. *Mutat Res* 727:16-41.
- Zilliges Y, Kehr JC, Meissner S, Ishida K, Mikkat S et al. (2011). The cyanobacterial hepatotoxin microcystin binds to proteins and increases the fitness of *Microcystis* under oxidative stress conditions.
- Zurawell, R.W.; Chen, H.; Burke, J.M.; Prepas, E.E. (2005). Hepatotoxic cyanobacteria: A review of the biological importance of microcystins in freshwater environments. *J. Toxicol. Environ. Health Part B*, 8, 1–37.