

# CIANOBACTERIAS Y CIANOTOXINAS: NECESIDAD DE SU CONTROL EN EL AGUA DE CONSUMO HUMANO

## *CYANOBACTERIA AND CYANOTOXINS: NEED FOR THEIR CONTROL IN WATER FOR HUMAN CONSUMPTION*

Ana M<sup>a</sup> Cameán Fernández<sup>1</sup>, Isabel Moreno Navarro, Ángeles Jos Gallego, Guillermo Repetto Kuhn, Silvia Pichardo Sánchez y Ana Isabel Prieto Ortega

<sup>1</sup>Cátedra de Toxicología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.

### RESUMEN

Las floraciones de cianobacterias se están convirtiendo en un importante problema en la calidad del agua en muchos países del mundo, debido a la producción de cianotoxinas, con actividad hepatotóxica y neurotóxica, que las convierten en un riesgo para la salud. Entre ellas, las microcistinas (MC) son las toxinas más frecuentemente detectadas en aguas superficiales. En este trabajo revisamos de forma sucinta los posibles riesgos tóxicos derivados de la exposición a MC, fundamentalmente por consumo de aguas contaminadas, lo que justifica en definitiva la necesidad de llevar a cabo programas de monitorización y control de las mismas.

**PALABRAS CLAVE:** cianotoxinas, microcistinas, aguas consumo humano, toxicidad.

### INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se ha producido un incremento en la frecuencia, intensidad y distribución geográfica de episodios tóxicos en el medio acuático, debido a la proliferación masiva de algas cianofíceas (blue-green algae) o cianobacterias productoras de toxinas, motivado en parte por niveles cada vez mayores de nutrientes exógenos, de forma que hoy día se reconoce a nivel mundial que en cada país se presentan estos crecimientos anormales<sup>1</sup>.

Las cianotoxinas son muy diversas en su estructura química y toxicidad<sup>2</sup> y se clasifican según los efectos tóxicos producidos en animales y humanos en: dermatotoxinas (lipopolisacáridos, lyngbyatosina-a, aplisitoxinas), neurotoxinas (anatoxina-a, homoanatoxina-a, anatoxina-a(s), saxitoxinas), y hepatotoxinas (microcistinas, nodularina y cilindrospermopsi-

### ABSTRACT

Cyanobacterial waterblooms are becoming an important water quality problem in many countries in the world, as a result of its hepatotoxic and neurotoxic cyanotoxins production, which make these toxins a health risk. Microcystins (MC) are the most frequent cyanotoxins detected on superficial freshwaters. In the present work, toxic risks derived from exposure to MC have been revised, mainly due to the consumption of contaminated waters. This fact makes necessary to perform control and monitoring programs.

**KEYWORDS:** cyanotoxins, microcystins, water human consumption, toxicity.

na). Entre ellas, las microcistinas (MC) son las toxinas más frecuentemente detectadas en aguas superficiales. Poseen una estructura heptapeptídica, de bajo peso molecular, y son producidas por diferentes especies pertenecientes a los géneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Anaenopsis*, y *Aphanizomenon*. Han originado intoxicaciones tanto en animales como en humanos, a veces incluso fatales, destacando asimismo por su potencial capacidad de promover cáncer en humanos tras exposición crónica, por lo que están consideradas no sólo un problema ambiental, ecotoxicológico, sino también y principalmente, sanitario<sup>3</sup>.

Los estudios toxicológicos realizados hasta la actualidad han conducido al establecimiento de una ingesta diaria tolerable (IDT) de 0,04 µg/Kg/día de MC-LR<sup>4</sup> y de un valor guía provisional de 1,0 µg/L de MC-

**Correspondencia:** Ana M<sup>a</sup> Cameán Fernández. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. C/ Profesor García González nº 2, 41012 Sevilla. Tel.: 954 55 67 62. Fax: 954 23 37 65

LR en aguas de bebida, por la Organización Mundial de la Salud<sup>5</sup>, comprendiendo tanto las MC intra como las extracelulares. En España, el Real Decreto 140/2003 (7 de Febrero de 2003) regula que los niveles máximos de MC sean de 1 µg/L.

En este trabajo revisamos de forma sucinta los posibles riesgos tóxicos derivados de la exposición a MC, fundamentalmente por consumo de aguas contaminadas, lo que justifica en definitiva la necesidad de llevar a cabo programas de monitorización y control de las mismas. Entre los factores fundamentales a tener en cuenta en la evaluación de riesgos tóxicos<sup>6</sup> por MC, se encuentran:

- 1) la toxicidad de estas toxinas, responsables de intoxicaciones agudas y crónicas en humanos y animales, y
- 2) la probabilidad de exposición a MC, prestando especial atención a la exposición humana por consumo de aguas de bebida contaminadas.

### ESTRUCTURA QUÍMICA

La estructura de las MC se caracteriza por ser cíclica (900-1100 Daltons), bastante estable en agua, formada por siete aminoácidos, de los cuales cinco suelen ser comunes, destacando en posición 5, el residuo Adda (ácido 3-amino-9-metoxi-2, 6, 8-trimetil-10-fenildeca-4, 6- dienoico). Las variaciones más frecuentes se producen por sustituciones de dos L-aminoácidos distintos (en las posiciones 2 y 4) y por desmetilaciones de los aminoácidos de la posición 3 y/o 7. Los L-aminoácidos se indican con un sufijo de dos letras; por ejemplo MC-LR contiene leucina (L) en la posición 2 y arginina (R) en la posición 4. Actualmente se conocen unas 80 variantes de MC, destacando las MC-LR, MC-RR y MC-YR<sup>7</sup>.

Según su toxicidad se pueden clasificar en tres grupos:

- 1) Toxicidad elevada: MC-LR, -LA, -YR;
- 2) Toxicidad moderada: MC-WR, las MC desmetiladas en Mdha y β-Me-Asp;
- 3) las MC de toxicidad baja: MC-LY, -RR.

Los estudios acerca de la influencia de los sustituyentes sobre la acción tóxica de las toxinas han revelado que tanto los L-aminoácidos, el Adda y el D-glu libre juegan un papel muy importante en la hepatotoxicidad de las mismas.

### PRINCIPALES VÍAS DE EXPOSICIÓN

En humanos, la exposición a MC puede ocurrir por:

- 1) Vía oral, de forma directa por el consumo de agua contaminada con células de cianobacterias tóxicas, siendo ésta la principal fuente de exposición, que ha originado hepatotoxicosis agudas y crónicas. Se advierte hoy cada día más la necesidad de conocer otras posibles fuentes de exposición humana, de carácter indirecto, tales como alimentos. De hecho, se ha constatado la acumulación de toxinas en pescados, mejillones, que han ingerido dichas cianobacterias, y en vegetales regados con aguas contaminadas, así como la exposición

involuntaria por consumo de suplementos alimentarios de algas contaminados<sup>8</sup>.

- 2) Otras vías de exposición son la vía dérmica, por contacto con floraciones, originándose reacciones alérgicas.
- 3) La vía inhalatoria resulta ser minoritaria, por la práctica de duchas, baños y deportes acuáticos.

Debido al rechazo de la población a beber agua contaminada con cianobacterias por el mal olor y sabor producidos por éstas, no se han llegado a producir grandes fatalidades como resultado de la exposición a las MC. Sin embargo, se han producido intoxicaciones letales en pacientes sometidos a hemodiálisis, como la ocurrida en Brasil en 1996, debido a que el agua utilizada para el tratamiento procedía de un depósito contaminado con cianobacterias<sup>9</sup>.

### TOXICIDAD

La mayoría de los estudios existentes de toxicidad aguda con MC revelan que son toxinas primariamente hepatotóxicas en mamíferos, encontrándose cambios en la estructura celular, alteraciones bioquímicas séricas indicadoras del daño hepático<sup>10</sup>, dando lugar a una necrosis hepatocelular hemorrágica extensa y una disrupción sinusoidal. Asimismo se señalan daños celulares en riñón<sup>11</sup> e intestino, que podrían deberse igualmente a la presencia en estos tejidos del transportador de sales biliares responsable de la entrada de las MC a la célula. La DL-50 de los diferentes congéneres en ratón, vía intraperitoneal, varía entre 50 (MC-LR) y 600 (MC-RR) µg/Kg.

En comparación con los mamíferos, existe menos información sobre la patología inducida por MC en peces, afectándose además del hígado, otros órganos como riñón, corazón, branquias, piel, médula y sangre<sup>12</sup>. Se produce una disociación y degeneración de hepatocitos y dilatación de la cápsula de Bowman en riñón; a dosis mayores se destruye la arquitectura del parénquima hepático, se produce degeneración tubular renal y necrosis del epitelio tubular.

Siendo más significativos los estudios de toxicidad de dosis repetidas (subcrónicos) y crónicos a largo plazo, por la propia fuente de exposición en humanos (aguas), éstos sin embargo son muy escasos<sup>10, 13-14</sup>, observándose daños celulares a nivel hepático, renal, intestinal, corazón y glándulas adrenales.

En humanos tienen acción fundamentalmente hepatotóxica, aunque también dan lugar a alteraciones gastrointestinales, reacciones alérgicas e inmunotóxicas, y síntomas parecidos a la neumonía<sup>15</sup>. Se necesita investigar asimismo la potencial toxicidad renal y nerviosa de estas toxinas en humanos<sup>8</sup>. Aunque no han sido revisadas aún por la Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC), por su acción promotora de tumores en animales de experimentación y su actividad inductora de daño en el ADN por mecanismo citotóxico<sup>16</sup>, diversos estudios epidemiológicos sugieren una mayor incidencia de carcinoma hepatocelular y cáncer colorectal, en

zonas cuyas aguas de bebida están contaminadas por MC<sup>17-18</sup>. Por ello, es totalmente imprescindible una adecuada monitorización de las MC en aguas de bebida, advirtiéndose la necesidad de conocer otras posibles fuentes de exposición humana, tales como alimentos.

Estas toxinas se absorben fundamentalmente por un transportador específico de sales biliares localizado en el hepatocito<sup>19</sup>. Se acepta que a nivel subcelular son inhibidores específicos de las fosfatasa de proteína tipo 1 (PP1) y tipo 2A (PP2A), las cuales regulan multitud de procesos biológicos. Esta inhibición causa un aumento en la fosforilación de las proteínas celulares que activa la cascada de las caspasas desencadenándose el proceso de apoptosis con el consecuente daño celular<sup>20</sup>. Siendo éste el mecanismo de acción más aceptado, hoy día están tomando gran interés las evidencias que sugieren que el estrés oxidativo puede jugar un papel muy significativo en la patogenicidad de estas toxinas tanto en mamíferos<sup>21-22</sup> como en peces<sup>23</sup>.

#### NIVELES GUÍA

Los diversos estudios toxicológicos realizados hasta la actualidad han conducido al establecimiento de una Ingesta Diaria Tolerable (IDT) de 0,04 µg/Kg/día de MC-LR. El peligro de promoción de tumores por exposición crónica a través del agua de bebida ha sido la principal razón para el establecimiento de niveles de seguridad para estas toxinas por parte de la Organización Mundial de la Salud que ha adoptado<sup>5</sup> un valor guía provisional de 1,0 µg/L de MC-LR en aguas de bebida, comprendiendo tanto las MCs intra como las extracelulares. En Europa, las toxinas de cianobacterias aún no están claramente reguladas, aunque la Directiva 2000 (2000/60/EC) las considera específicamente como potenciales contaminantes peligrosos. Diversos países, como Brasil, Nueva Zelanda, y europeos como Gran Bretaña, Francia<sup>24</sup>, incluyendo España (R.D. Decreto 140/2003) han adoptado este valor guía. Otros como Canadá proponen el valor de 1,5 µg/L, y Australia propone un rango de valores comprendido entre 1,3 µg/L, para exposiciones a lo largo de toda la vida, y 10,0 µg/L en el caso de exposición a corto plazo.

Existe además una propuesta de valor guía de 10 µg/g de MC-LR en suplementos alimentarios, y en Oregón (USA), se ha establecido un valor máximo de 1 µg/g en alimentos<sup>25</sup>.

#### TOXICIDAD DE FLORACIONES EN LA PENÍNSULA IBÉRICA

A pesar de su ubicuidad, los estudios acerca de la toxicidad de floraciones en la región Mediterránea no son muy abundantes, a excepción de Portugal, Francia y Marruecos<sup>26</sup>. Las primeras evidencias de floraciones tóxicas de cianobacterias en la península Ibérica datan de la década de los 90, en aguas portuguesas. Diversas floraciones detectadas en el río Guadiana han provocado mortandad de peces y epi-

sodios de gastroenteritis en humanos en la zona sur, concretamente en Mértola<sup>27</sup>. En España, sin embargo, este fenómeno ha estado menos documentado<sup>28</sup>, siendo en fechas más recientes cuando se abordan los trabajos de identificación y cuantificación de las MC involucradas<sup>29</sup> en zonas diversas, como: diferentes embalses de Cataluña, río Tajo<sup>30,31</sup>, río Segura<sup>32</sup>, y embalses de la zona centro de Madrid<sup>33</sup>.

Investigaciones llevadas a cabo por nuestro equipo, en colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Franca (Unidad de Ecotoxicología del Instituto de Salud Ricardo Jorge de Lisboa), nos han permitido detectar floraciones tóxicas en el río Guadiana, cuyas aguas se destinan al riego de cultivos, actividades recreacionales y prácticas deportivas (pesca). Se cuantificaron concentraciones de MC superiores al límite máximo recomendado por la OMS, se aislaron y cultivaron las distintas especies implicadas, siendo el perfil toxicológico de tres estirpes de *M. aeruginosa* muy variable<sup>34,35</sup>. Se concluye que:

- 1) La aparición amplia y repentina de variaciones en la densidad fitoplanctónica de estas aguas, dependiendo de la distribución espacial de los sitios de muestreo y temporal, repercute en la dificultad de definir una estrategia adecuada de muestreo.
- 2) Al menos algunas de las floraciones tóxicas detectadas en el Guadiana en su curso por el sur de Portugal pueden tener su origen corriente arriba, en la parte española.
- 3) Se producen variaciones tóxicas inter e intra especies de cianobacterias dentro de una misma floración, lo que demuestra la naturaleza totalmente impredecible en lo que respecta a la toxicidad global de las aguas en las que se producen.

De forma general, se considera que la producción de toxinas en aguas naturales está influida por tres factores principales<sup>36</sup>:

- 1) la dinámica del fitoplancton, con variaciones espacial y temporal en la abundancia relativa o biomasa de especies productoras de toxinas;
- 2) la presencia variable de cepas productoras/no productoras de MC, con diferentes características tóxicas y de crecimiento, y
- 3) factores ambientales diversos (concentración de nutrientes, temperatura, luz, metales, etc.) que afectan a la producción de toxinas.

Consecuentemente, no existen aún modelos que puedan predecir las concentraciones de toxinas en aguas naturales, al no existir un patrón global de comportamiento en la presencia y toxicidad de las floraciones.

Aunque se han desarrollado diferentes métodos que permiten determinar la toxicidad en aguas superficiales, aún no se ha aceptado ninguno como método estándar por las agencias oficiales de medio ambiente; además, para una precisa evaluación de la toxicidad y estudio del perfil tóxico de las variantes presentes, se requiere más de una técnica<sup>37</sup>. Dichos métodos pueden ser biológicos, bien de tipo bioquímico como los ensayos de inhibición de las

fosfatasas de proteína, o pueden ser diferentes bioensayos (bioensayo en ratón, con invertebrados) o tratarse de ensayos inmunológicos (ELISA) muy sensibles y rápidos, utilizándose todos ellos como técnicas de screening semicuantitativas, cuyos resultados deben confirmarse por métodos más sofisticados, tales como los métodos químicos. Entre estos últimos destacan la cromatografía líquida de alta resolución (CLAE), con diferentes detectores, y la electroforesis capilar<sup>29</sup>, que permiten conocer la identidad y la cuantificación de las toxinas individuales en muestras diversas (aguas, floraciones de cianobacterias, pescados, etc.); en los últimos años, se está aplicando la espectrometría de masas acoplada a la cromatografía líquida (CL-EM)<sup>31-38</sup>. Mediante la técnica MALDI-TOF-MS, se consigue una rápida detección, con sólo pequeñas cantidades de material celular, sin necesidad de incluir etapas de extracción o purificación. Los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) están permitiendo la detección rápida de la potencialidad tóxica de las floraciones de cianobacterias, o de determinadas especies<sup>33</sup>.

En resumen, las investigaciones sobre el desarrollo y optimización de métodos sensibles, sencillos y rápidos que permitan una adecuada monitorización de estas toxinas, es un reto importante para los científicos dedicados a este tema. Ello nos permitirá disponer de datos más fiables para establecer un rango de concentraciones relevantes en el medio ambiente, y evaluar el riesgo derivado de la presencia de estas toxinas en aguas y alimentos contaminados. Controlando en definitiva, la calidad y seguridad de los mismos. Asimismo, es necesario profundizar y desarrollar estudios toxicológicos *in vivo* e *in vitro* de las MC, especialmente en el caso de otros congéneres diferentes a MC-LR, lo cual es imprescindible para mejorar el proceso de evaluación del riesgo tóxico por estas toxinas.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la CICYT (AGL-2002-02622) la financiación de las investigaciones contenidas en este trabajo.

#### BIBLIOGRAFÍA

- De Figueiredo D, Azeiteiro UM, Esteves SM, Goncalves FJM, Pereira MJ. Microcystin-producing blooms –a serious global public health issue. *Ecotox. Environ. Safety* 2004; 59: 151-163.
- Briand J-F, Jacket S, Bernard C, Humbert J-F. Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Vet. Res.* 2003;34: 361-377.
- Carmichael WW, Azevedo SM, An JS, Molica RJ, Jochimsen EM, Lau S, Rinch KL, Shaw GR, Eaglesham GK. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environ. Health Perspect.* 2001; 109: 663-668.
- Chorus I, Bartram J. *Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management.* E & FN Spon, London; 1999.
- WHO. *Guidelines for Drinking Water Quality, 2nd Edition, Addendum Volume 2, Health Criteria and other supporting information.* World Health Organization, Geneva; 1998.
- IPCS. *Assessing human health risks of chemicals: derivation of guidance values for health-based exposure limits.* Environmental Health Criteria. WHO, Geneva, p. 1-74; 1995.
- Sivonen K, Jones G. Cyanobacterial toxins. En: Chorus I, Bartram J (eds.). *Toxic Cyanobacteria in Water: a Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management.* E.& FN Spon, London; 1999. p. 41-111.
- Dietrich D, Hoeger S. Guidance values for microcystins in water and cyanobacterial supplement products (blue-green algal supplements): a reasonable or misguided approach?. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2005; 203:273-289.
- Azevedo SM, Carmichael WW, Jochimsen EM, Rinehart KL, Lau S, Shaw GR, Eaglesham GK. Human intoxication by microcystins during dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicology* 2002; 181-182: 441-446.
- Fawell JK, Mitchell RE, Everett DJ, Hill RE. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: I Microcystin-LR. *Human Exper. Toxicol.* 1999; 18:162-167.
- Nobre AC, Jorge MC, Menezes DB, Fonteles MC, Monteiro HS. Effects of microcystin-LR in isolated perfused rat kidney. *Braz. Med. Biol. Res.* 1999; 32:985-988.
- Fischer WJ, Dietrich DR. Pathological and biochemical characterization of microcystin-induced hepatopancreas and kidney damage in carp (*Cyprinus carpio*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2000;164; 73-81.
- Falconer IR, Burch MD, Steffensen DA, Choice A, Coverdale OR. Toxicity of the blue-green algae (cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in drinking water to growing pigs, as an animal model for human injury and risk assessment. *J. Environ. Toxicol. Water Qual.*, 1994; 9:131-139.
- Ueno Y, Makita Y, Nagata S, Tsutsumi T, Yoshida F, Tamura S, Sekijima M, Tashiro F, Harada T, Yoshida T. No Chronic Oral Toxicity of a Low Dose of Microcystin-LR, a Cyanobacterial Hepatotoxin, in Female BALB/c Mice. *Environ. Toxicol.* 1999; 14:45-55.
- Falconer IR. An overview of Problems caused by toxic Blue-Green Algae (Cyanobacterial) in drinking and recreational waters. *Environ Toxicol*, 1999; 14:5-12.
- Lankoff A, Krzowski L, Glab J, Banasik A, Lisowska H, Kuszewski T, Gozdz S, Wojcik A. DNA damage and repair in human peripheral blood lymphocytes following treatment with microcystin-LR. *Mutat. Res.* 2004; 559:131-142.
- Yu SZ. Primary prevention of hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 1995; 10:674-682.
- Zhou L, Yu H, Chen K. Relationship between microcystin in drinking water and colorectal cancer. *Biomed. Environ. Sci.* 2002;15:166-171.
- Runnegar MT, Berndt N, Kaplowitz N. Microcystin uptake and inhibition of protein phosphatases: Effects of chemoprotectants and self-inhibition in relation to known hepatic transporters. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995; 134:264-272.
- Hooser SB. Fulminant hepatocyte Apoptosis *in vivo* following Microcystin-LR administration to rats. *Toxicol. Pathol.* 2000;28: 726-733.

21. Bouaicha N, Maatouk I. Microcystin-LR and nodularin induce intracellular glutathione alteration, reactive oxygen species production and lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes. *Toxicol. Letters* 2004; 148:53-63.
22. Moreno I, Pichardo S, Jos A, Gómez-Amores L, Mate A, Vazquez CM, Cameán AM. Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to microcystin-LR administered intraperitoneally. *Toxicol* 2005; 45: 395-402.
23. Jos A, Pichardo S, Prieto Ai, Repetto G, Vazquez CM, Moreno I, Cameán AM. Toxic Cyanobacterial cells containing Microcystins induce oxidative stress in exposed Tilapia fish (*Oreochromis* sp) under laboratory conditions. *Aquat. Toxicol.* 2005;72:261-271.
24. Hoeger SJ, Hitzfeld BC, Dietrich DR. Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in drinking water treatment plants. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2005;203:231-242.
25. USEPA. Creating a cyanotoxin target list for the unregulated contaminant monitoring rule. United States Environmental Protection Agency Meeting, Cincinnati, USA; 2001.
26. Oudra B, Loudiki M, Sbiyyaa B, Martins R, Vasconcelos V, Namikoshi N. Isolation, characterization and quantification of microcystins (heptapeptides hepatotoxins) in *Microcystis aeruginosa* dominated bloom of Lalla Takerkoust lake-reservoir (Morocco). *Toxicol* 2001;39:1375-1381.
27. Vasconcelos VM. Cyanobacterial toxins in Portugal: effects on aquatic animals and risk for human health. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1999;32:249-254.
28. Garcia-Villada L, Rico M, Altamirano M, Sanchez-Martin L, Lopez-Rodas V, Costas E. Occurrence of copper resistant mutants in the toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*: characterization and future implications in the use of copper sulfate as algacide. *Water Res.* 2004;38:2207-2213.
29. Agute EC, Gago-Martinez A, Leao JM, Rodriguez-Vázquez JA, Menard C, Lawrence JF. HPLC and HPCE Analysis of Microcystins RR, LR, and YR Present in Algae Samples and Water by using Immunoaffinity Extraction. *Talanta* 2003;59:697-705.
30. Barco M, Rivera J, Caixach J. Analysis of cyanobacterial hepatotoxins in water samples by microbore reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2002; 959:103-111.
31. Barco M, Lawton LA, Rivera J, Caixach J. Optimization of intracellular microcystin extraction for their subsequent analysis by high-performance chromatography. *J. Chromatogr. A* 2005 (in press).
32. Aboal M, Puig M-A. Intracellular and dissolve microcystin in reservoirs of the river Segura basin, Murcia, SE Spain. *Toxicol* 2005; 45:509-518.
33. Ouahid Y, Pérez-Silva G, del Campo FF. Identification of Potentially Toxic Environmental Microcystis by Individual and Multiple PCR Amplification of Specific Microcystin Synthetase Gene Regions. *Environ Toxicol* 2005;20:235-242.
34. Moreno I, Cameán A, Tavares MJ, Pereira P, Franca S. Toxicity of Cyanobacteria isolated from the Guadiana River. *Aquatic Ecosystem Health and Management* 2003;6: 409-413.
35. Moreno I, Pereira P, Franca S, Cameán AM. Toxic cyanobacterial blooms in the Guadiana river (Southwest of Spain). *Biol. Res.* 2004;37:405-417.
36. Zurawell RW, Chen H, Burke JM, Prepas BE. Hepatotoxic cyanobacteria: A review of the biological importance of microcystins in freshwater environments. *J. Toxicol. Environ. Health Part B*, 2005;8:1-37.
37. McElhiney J, Lawton LA. Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2005; 203:219-230.