



7^{mo}
Congreso de
Medio Ambiente

Actas 7mo Congreso de Medio Ambiente AUGM
22 al 24 de mayo de 2012. UNLP. La Plata Argentina

CARACTERIZACIÓN FILOGENÉTICA Y TOXICOLÓGICA DE UNA CEPA DE *MICROCYSTIS AERUGINOSA* PRODUCTORA DE MICROCYSTINAS AISLADA DEL AMBIENTE

**Toxicological and phylogenetic characterization of a strain of *Microcystin aeruginosa*, a
microcystin producer, isolated from the environment**

^aLorena Rosso, ^bJosep Caixach, ^cMaria Kolman, ^aDaniela Sedan, ^bCintia Flores, ^d Ricardo
Omar Echenique, ^cGraciela Salerno, ^aLeda Giannuzzi, ^aDarío Andrinolo

^a Laboratorio de Toxicología General, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La
Plata, Calle 48 y 115, La Plata, Argentina. danielasedan@yahoo.com.ar

^b Laboratori d' Espectrometria de Masses/Contaminants Orgànics Institut de Diagnosi Ambiental i
Estudis de l'Aigua (IDAEA) CSIC J.Girona, 18-26; 08034-Barcelona

^c CEBB-CIB Fundación para Investigaciones Biológicas Aplicadas (FIBA-Mar del Plata). Mar del
Plata Argentina

^d CIDCA-CONICET - Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Calle 47 y
116, La Plata, Argentina. dandrinolo@yahoo.com

Autor para correspondencia: +54 221 4250497 int 46: dandrinolo@exactas.unlp.edu.ar

Palabras claves: Microcystis aeruginosa, microcystina, curva de crecimiento

Key words: Microcystis aeruginosa, microcystin, growth curve

Título abreviado: Caracterización de una cepa de Microcystin aeruginosa

ABSTRACT

Cyanobacteria often form dense blooms in freshwater bodies worldwide. Some genera such as *Microcystis* spp., can synthesize toxic metabolites called microcystins (MCs).

The MCs are hepatotoxic cyclic peptides that represent a serious problem for human and animal health.

We report the identification, and phylogenetic and Toxicological characterization for the first strain of *Microcystis aeruginosa* Argentina (CAAT2005) isolated from the environment and maintained under culture conditions.

Morphological characterization shows the typical colonial architecture of *Microcystis aeruginosa*. Further phylogenetic analysis based on the sequence-ISM *cpcBA* confirms the identity given grouping with known sequences of strains of *M. aeruginosa*.

The strain of Microcystin CAAT2005 expresses a toxin variant, common in samples from the basin of the Salado river and La Plata basin, having a molecular ion $[M + H]^+ = 1037.8 \text{ m/z}$ was identified by LC-HRMS / Orbitrapas as [D-Leu 1] microcystin-LR.

This is the first strain of Argentine toxigenic cyanobacteria maintained under controlled growth conditions. The available national and international laboratories to study and compared with strains from around the world, as well as for technological development and production of analytical standards that correspond to variants of toxins that occur in our region.

RESUMEN

Cyanobacterias frecuentemente forman densos florecimientos en cuerpos de agua dulce en todo el mundo. Algunos géneros, como *Microcystis* spp., pueden sintetizar metabolitos tóxicos denominados microcystinas (MCs). Las MCs son péptidos cíclicos hepatóxicos que representan un serio problema para la salud human, animal y ambiental.

En este trabajo presentamos la identificación, caracterización toxicológica y filogenética de la primera cepa de *Microcystis aeruginosa* argentina (CAAT2005) aislada del ambiente y mantenida en condiciones de laboratorio.

La caracterización morfológica muestra la típica arquitectura colonial de *Microcystis aeruginosa*. Adicionalmente análisis filogenético sobre la base de la secuencia *cpcBA*-IGS confirman la identidad dado su agrupamiento con secuencias conocidas de cepas de *M. aeruginosa*.

La cepa CAAT2005 expresa una variante de Microcistina, frecuente en muestras de la cuenca del Plata y del Salado que presenta un ion molecular de $[M+H]^+ = 1037.8$ m/z y que fue identificada por LC- HRMS/Orbitrap como [D-Leu¹] microcystin-LR.

Esta es la primera cepa de cianobacterias toxígenas puesta en condiciones de crecimiento controladas. Esta a disposición de laboratorios nacionales e internacional a fin de su estudio y comparación con cepas del resto del mundo, así como para desarrollos tecnológicos y la producción de estándares analíticos que se correspondan con las variantes de toxinas que se presentan en nuestra región.

INTRODUCCIÓN

La creciente contaminación de cuerpos de aguas continentales conduce a una disminución en la calidad del agua. Estas condiciones favorecen el desarrollo y la persistencia de floraciones algales siendo una de las razones de la presencia de las mismas en distintas partes del mundo (Heisler et al., 2008). Debido a esta creciente eutrofización de las aguas, la biomasa de especies de cianobacterias aumenta exponencialmente produciendo floraciones (blooms) favorecidas además por otras condiciones, tales como temperatura (entre 15 y 30 °C), pH (neutro a básico) y calma climática (Oliver & Gant, 2000). Por esta razón, el período de primavera-verano es el de mayor incidencia.

Las cianofitas, cianobacterias o algas verde azuladas son organismos procariotas fotosintetizadores, de amplia distribución mundial. Si bien habitan un amplio espectro de ambientes, son predominantes en cuerpos de agua continentales, eutróficos. Las especies del género *Microcystis*, (Orden Chroococcales), son conocidas por su potencial capacidad de sintetizar toxinas, fundamentalmente microcystinas (MCs).

Las MCs son las hepatotoxinas más ampliamente distribuidas en el mundo, con una estructura química de heptapéptidos monocíclicos. Se conocen más de 50 variantes de esta toxina, todas conteniendo el péptido Adda, aminoácido característico de 20 carbonos (3-amino-9- metoxi-2,6,8 trimetil-10fenil-4,6ácido diecadenóico), diferenciándose según el grado de metilación, la configuración del Adda o en la variación de dos aminoácidos que se identifican como X e Y (Rinehart *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 1992).

Las intoxicaciones agudas generadas por MCs, clínicamente se expresan con vómitos, diarrea y debilidad general. Histológicamente revela disrupción masiva de la arquitectura lobular y sinusoidal del hígado con hemorragia intrahepática. Así, la Hepatitis Tóxica Aguda, asociada con floraciones de cianobacterias, es reconocida como una Toxicosis Cianobacteriana a raíz de la intoxicación de 126 personas y la muerte de 50 personas que estaban siendo dializadas en la ciudad brasilera de Caruarú en 1996 (Jochimsen *et al.*, 1998). Dicho evento fue adjudicado a la contaminación del agua potable con MCs ya que encontraron estas toxinas en varios puntos del sistema de tratamiento de diálisis y en el hígado de 39 de los pacientes fallecidos (Yuan *et al.*, 2006).

Las MCs son las principales cianotoxinas identificadas en la cuenca del Río de la Plata (De León *et al.*, 2001; Andrinolo *et al.*, 2007, Echenique *et al.*, 2008) y Río Uruguay (Concordia, Embalse Salto Grande), entre otros, producidas por diferentes especies del género *Microcystis*. Las floraciones de *Microcystis spp*, (*Microcystis aeruginosa*, *M. viridis*, *M. Flos-aquae*) en la costa bonaerense del Río de la Plata llegan a más de 6 mg de toxinas por g de peso seco de células, ubicándose entre las cepas mas tóxicas descritas en el mundo (Andrinolo *et al.*, 2007; Echenique *et al.*, 2008), con desarrollos masivos, principalmente entre fines de primavera y principios de verano.

Queda claro que frente a este panorama de distribución geográfica, la población argentina podría estar expuesta a intoxicaciones con MCs debido a la aparición de estas toxinas tanto en los cursos de agua utilizados para recreación como en la red de agua potable como sucede en las ciudades de Ensenada y La Plata (Echenique *et al.*, 2008); siendo por ello las floraciones algales tóxicas un problema medioambiental y sanitario.

El objetivo del presente trabajo fue identificar y caracterizar toxicológicamente y filogenéticamente una cepa de *Microcystis aeruginosa* aislada de un florecimiento detectado en la localidad de Pila (Buenos Aires, Argentina).

MATERIALES Y MÉTODOS

Identificación, aislamiento y cultivo de la cepa a estudiar a partir del florecimiento ambiental

El estudio se llevó a cabo en distintos puntos del canal de desagüe de la localidad de Pila, Argentina (35°59'49'' S, 58°08'11'' W). Las muestras para el análisis taxonómico se colectaron con red de plancton de malla de 30 µm de poro.

Para el aislamiento de las colonias se diluyó la muestra original y se tomó una colonia utilizando pipeta Pasteur y microscopio binocular. La colonia aislada fue lavada reiteradamente con el medio de cultivo a utilizar, para descartar la presencia de colonias secundarias u otro material contaminante.

Se llevan a cabo cultivos en batch no axénicos de las colonias aisladas utilizando como medio de cultivo BG-11(Msagati, et al., 2006), en cuarto de temperatura mantenido a 27°C ±1, sin

agitación, con ciclos de luz/oscuridad de 14/10, intensidad de iluminación $30 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Ouahid *et al.*, 2005).

Curva de crecimiento

En un Erlenmeyer de 1L se colocaron 800 ml de medio BG-11 esteril al que se le agregaron 100 ml de un inóculo de alta densidad, obtenido a partir de un cultivo denso de *Microcystis aeruginosa*. Este estudio fue desarrollado durante 30 días en las condiciones descriptas anteriormente con el agregado de burbujeo de aire humidificado y filtrado por filtros de celulosa $0.22 \mu\text{m}$ (osmonics).

Periódicamente se tomaron muestras de 6ml, introduciendo una pipeta estéril a mitad de altura del cultivo.

Recuento celular

Se prepararon diluciones de muestras en agua destilada y se fijaron con solución de lugol acético al 1%. El recuento celular se obtuvo en cámara de Neubauer utilizando microscopio óptico.

Clorofila-a

Para la determinación de este pigmento fotosintético, se centrifugó un volumen adecuado de muestra, dependiendo del estadio de crecimiento del cultivo, por centrifuga de eppendorff Centrolit PSelecta. Sobre el pellet se determinó clorofila-*a* mediante un método por extracción

con metanol, detección por espectrofotometría diferencial y cuantificación mediante cálculos propuestos por Marker *et al.* (1980).

Determinación de microcystinas

Dos mililitros de muestra se sometieron a 3 ciclos de congelado-descongelado con el fin de lisar las células para liberar las toxinas. Luego se procedió a filtrar las muestras por Osmonic de 0,45µm de diámetro de poro, y finalmente se realizó la purificación y concentración de la muestra por Sep-Pack (Andrinolo *et al.*, 2007.).

Los extractos purificados se analizaron mediante Cromatografía de Alta Resolución con detección UV con arreglos de diodos (HPLC-DAD), conectada a una columna de sílica C18 (Hypersil-Keystone 5µm, 150x4, 6 mm), con flujo 1 ml, régimen de gradiente de 30 a 60 % de ACN en 20 minutos. La presencia de MC-RR, -LR, -XR y -LA será confirmada por comparación de los tiempos de retención de los picos con estándares SIGMA Chemicals (St Louis, MO, USA).

PCR

Las reacciones de PCR se realizaron sobre 25 µL conteniendo PCR buffer (Biotools, Spain), MgCl₂, dNTPs, BSA, primers y DNA polimerasa. El termociclado fue llevado a cabo utilizando Sensoquest Labcycler. Para visualizar los productos se utilizó un gel de agarosa revelando con Bromuro de etidio.

Análisis de de MCs mediante LC/ESI-MS

Se utilizó un equipo de espectrometría de masas LC/ESI-HRMS Exactive /Orbitrap equipado con ionización electrospray (ESI) (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany).

La separación cromatográfica se realizó en una columna de fase reversa Phenomenex Luna C18 (2) (150 x 2.1 mm, 5 μ m).

La fase móvil fue hecha en base a agua Milli Q, como solvente A y acetonitrilo como solvente B, ambos conteniendo 0.08% de ácido fórmico, a una velocidad de flujo de 200 μ L/min. El gradiente lineal fue 10-30% B 10 min, 30-175 35% B 20 min, 35-55% B 15 min, 55% B 5 min, 55-90% B 2 min, 90% B 3 min y rotro a las condiciones iniciales (10% B 5 min). El volumen de inyección fue 10 μ L.

El análisis se realizó en ion positive ESI con spray voltage en 4.5 KV y ek voltage de lentes tubulares en 120V. La temperatura de transferencia fue 250 °C. Nitrógeno (pureza > 99.98%) se utilizó como gas, para limpieza de iones y gas auxiliar con un flujo de 30 psi, 0 and 5 a.u. (unidades arbitrarias), respectivamente. Escaneo completo y Disociación por colisión a Alta energía (HCD) experimentos de fragmentación (HCD voltaje 70eV) fueron realizados en un rango de masas de m/z 60 a 1200 con un alto poder de resolución (50,000 FWHM, m/z 200).

Análisis filogenético

El análisis filogenético esta basado en la comparación de secuencias nucleotídicas correspondientes al espaciador intergénico cpcAB-IGS. Fueron construidos filogramas tipo "neighbor-joining" con el programa MEGA4 después de realizar alineamientos múltiples de secuencias utilizando el programa CLUSTALX. Para la comparación se utilizaron secuencias disponibles en bases de datos públicas (NCBI) y de la secuencia nucleotídica clonada

correspondiente a la muestra aislada en Pila (CAAT-2005). Como grupo externo se utilizó la secuencia del alga roja *Aglaothamnion neglectum*.

RESULTADOS

Curva de crecimiento

Se llevó a cabo la cinética de crecimiento de la cepa de *Microcystis aeruginosa* aislada del limnotopo, determinando diversos parámetros cinéticos que permiten su caracterización (Figura 1).

El recuento celular se llevó a cabo hasta el día 30 mostrando un aumento del número de células/ml en el tiempo, seguida por una segunda etapa en la que se evidencia que tasa de crecimiento se hace constante.

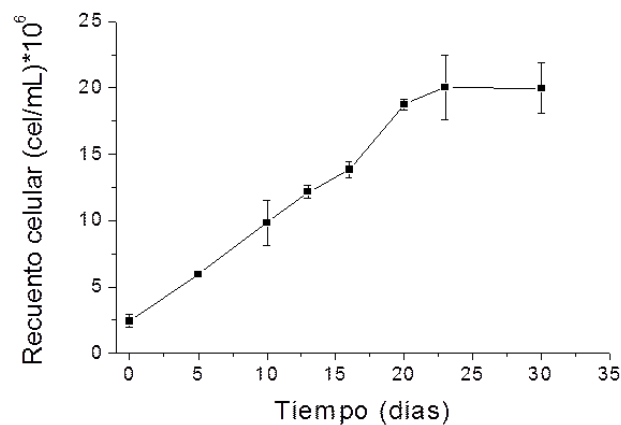


Figura 1. Cinética de crecimiento de *Microcystis aeruginosa* en medio BG-11 a 27°C, ($X \pm DS$, $n = 3$)

Figure 1. Growth kinetics of *Microcystis aeruginosa* in BG-11 medium at 27° C, ($X \pm DE$, $n = 3$)

El desarrollo de la cepa en cultivo pudo interpretarse matemáticamente con la ecuación de una recta

$$N_{\text{celulas/ml}} = N_0 + k \cdot (t - t_0)$$

donde N representa el recuento celular para un tiempo t y N_0 es el recuento celular con que se inicia la curva.

En la zona de desarrollo exponencial el valor de k correspondió al 0.067 células/ml.día siendo el coeficiente de correlación $R^2 = 0.98$. Asimismo, el tiempo de duplicación es de 11.5 días, periodo en el cual el numero de células se duplica.

Para el caso de los niveles de clorofila-*a* (Figura 2 A) los resultados indican una primera fase de adaptación del cultivo a las nuevas condiciones, seguidos de un incremento de clorofila-*a* hasta aproximadamente el día 15, y de una fase estacionaria que se continua hasta el día 30. En el tiempo de desarrollo de la curva de crecimiento el número de células correlaciona positivamente con el contenido de clorofila ($R = 0.98$) (Figura 2 B)

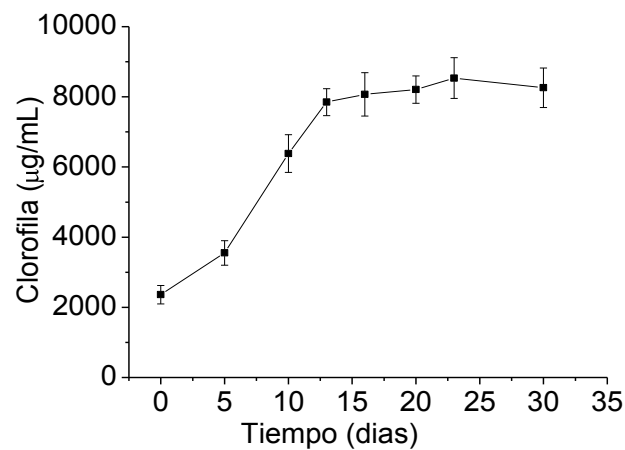


Figura 2 A. Clorofila-a vs Tiempo ($X \pm DE$, $n = 3$)

Figure 2 A. Chlorophyll-a versus time ($X \pm SD$, $n = 3$)

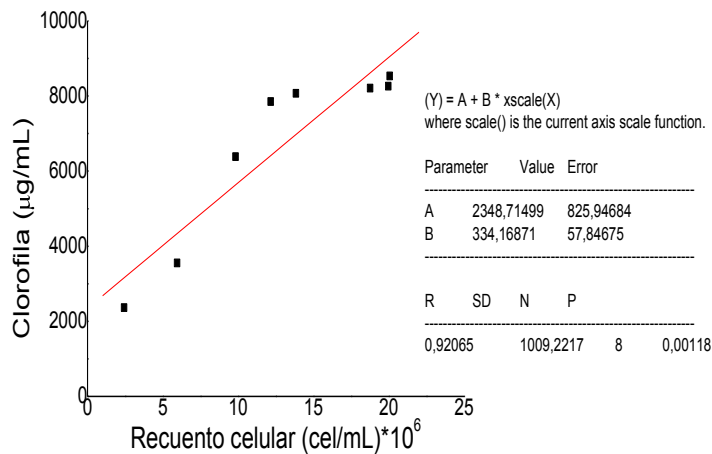


Figura 2 B. Clorofila-a vs recuento celular, cuya regresión lineal tiene un R de 0.92.

Figure 2 B. Chlorophyll-a vs. cell count, which has an R-linear regression = 0.92.

Otra relación que se llevo a cabo entre los datos de recuento celular y clorofila-*a* obtenidos durante el estudio se presentan en la Figura 3, en observa un descenso inicial abrupto de los valores de μg Clorofila-*a*/célula indicando un mayor aumento del recuento celular que del contenido de clorofila. La disminución más leve y paulatina de este cociente observada en el período siguiente (día 5 al 30) se relaciona con una división celular más activa y también con una mayor síntesis de clorofila derivada de un incremento en el metabolismo concordante con una fase de crecimiento exponencial.

Así mismo se realizó un análisis conjunto de los parámetros involucrados en crecimiento (recuento celular y clorofila a) y toxinas totales. Se observa una buena correlación lineal ($R=0.88$) que indica una producción constante y permanente durante la fase logarítmica del cultivo.

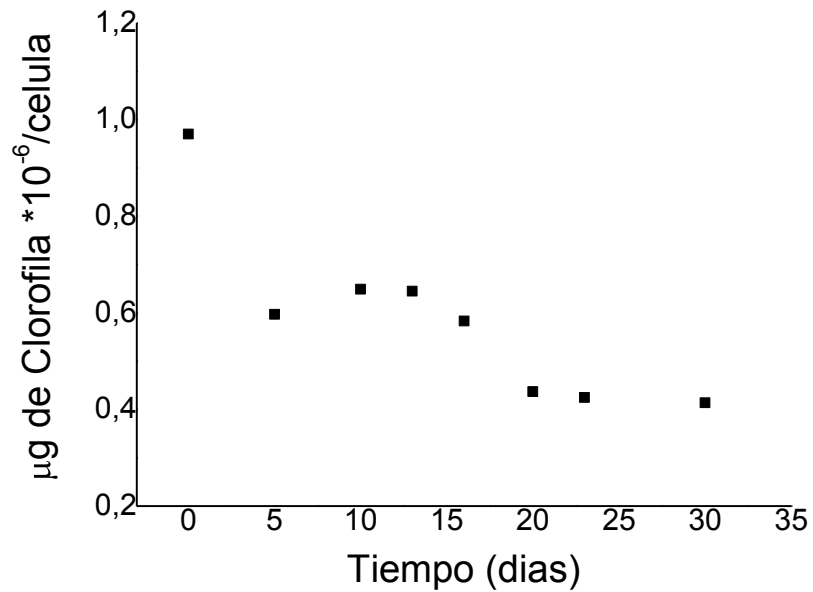


Figura 3. Relación entre µg de clorofila-*a* /células a lo largo del tiempo .

Figure 3. Relationship between µg chlorophyll-a / cells over time.

Caracterización toxicológica

Se llevó a cabo el análisis cromatográfico del cultivo encontrándose la presencia un subtipos de MCs. En la figura 4 se presenta un cromatograma correspondiente a la muestra del día 22 donde se aprecia la presencia mayoritaria de MC-XR, cuyo tiempo de retención de 10,452 min. coincide con el observado para el estandar (MC-XR t_R = 10,435 min.)

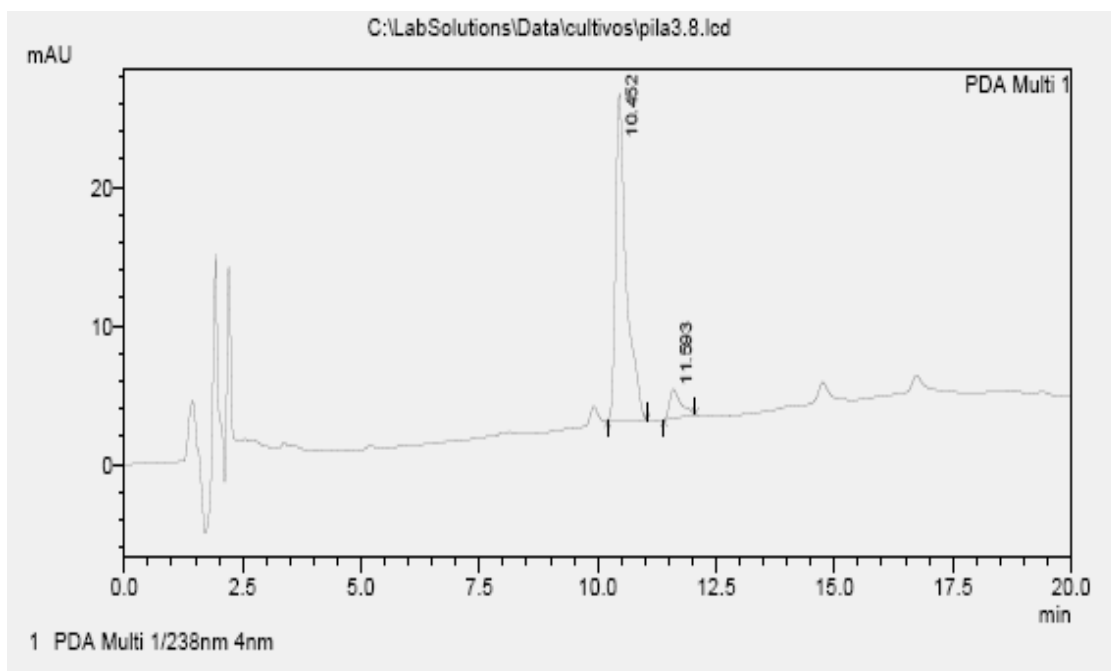


Figura 4. Cromatograma HPLC-DAD característico de CAAT-2005 correspondiente al día 22 de cultivo.

Figure 4. HPLC-DAD chromatogram typical of CAAT-2005 corresponding to day 22 of culture.

La MC-XR, un subtipo aún no completamente caracterizado y de frecuente presencia en florecimientos presentes en la cuenca del Plata (Andrinolo et al 2007), fue producida durante todas las etapas de crecimiento.

Identificación de [D-Leu1] Mcyst –LR mediante detección Masa-masa

La llamada Microcystin XR se ha identificado como [D-Leu1] Mcyst –LR , C₅₂H₈₀N₁₀O₁₂, M+H]⁺ : 1037.6035, (1.145 ppm) y se descarta [ADMAdda5] Mcyst-Lhar C₅₁H₇₆N₁₀O₁₃, M+H]⁺ 1037.5671 (-2.732 ppm), tanto por los errores /ppm como por la concordancia de los patrones isotópicos (Andrinolo et al 2008).

El espectro del producto ionico (fig 5b) confirma la asignación, en base a los fragmentos descritos en Toxicon 39 (2001) 855-862, Park et al 2001.

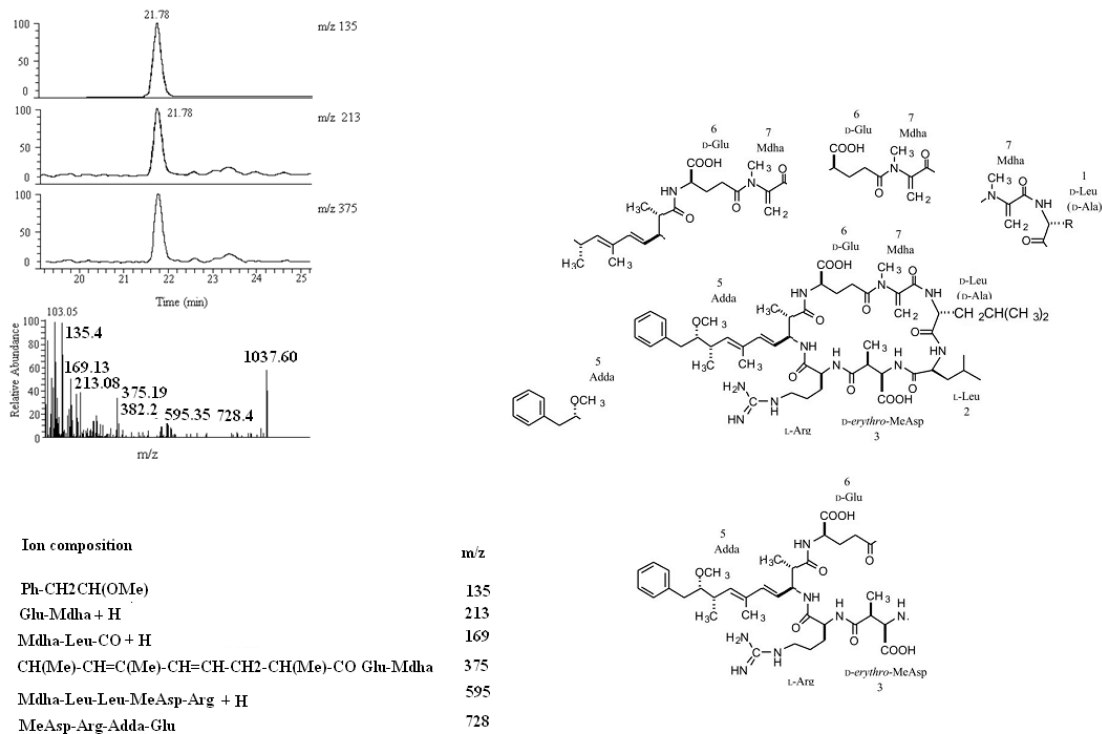


Figura 5. Identificación de [D-Leu1] Mcyst –LR. Fig 5 Corrida cromatográfica en registro de un solo ion característicos de microcistinas. 5B composición iónica de Microcistina determinado por ESIMS/CID/MS que corresponde a [D-Leu1] Mcyst –LR según Park et al 2001

Figure 5. A typical elution profile from LC/ESI-HRMS chromatogram and mass spectrum is shown on Fig 5A with three single ion recording chromatograms. All of them characteristic of microcystin. Fig 5B data that correspond to a Ion composition m/z described by Park et al 2001 for [D-Leu1] Mcyst –LR

Análisis filogenético

En la figura 6 se presenta el dendrograma basado en análisis RFLP de cianobacterias en la cual se ubica la cepa en estudio (CAAT 2005) y que permite caracterizarla como perteneciente a la especie *Microcystis aeruginosa*

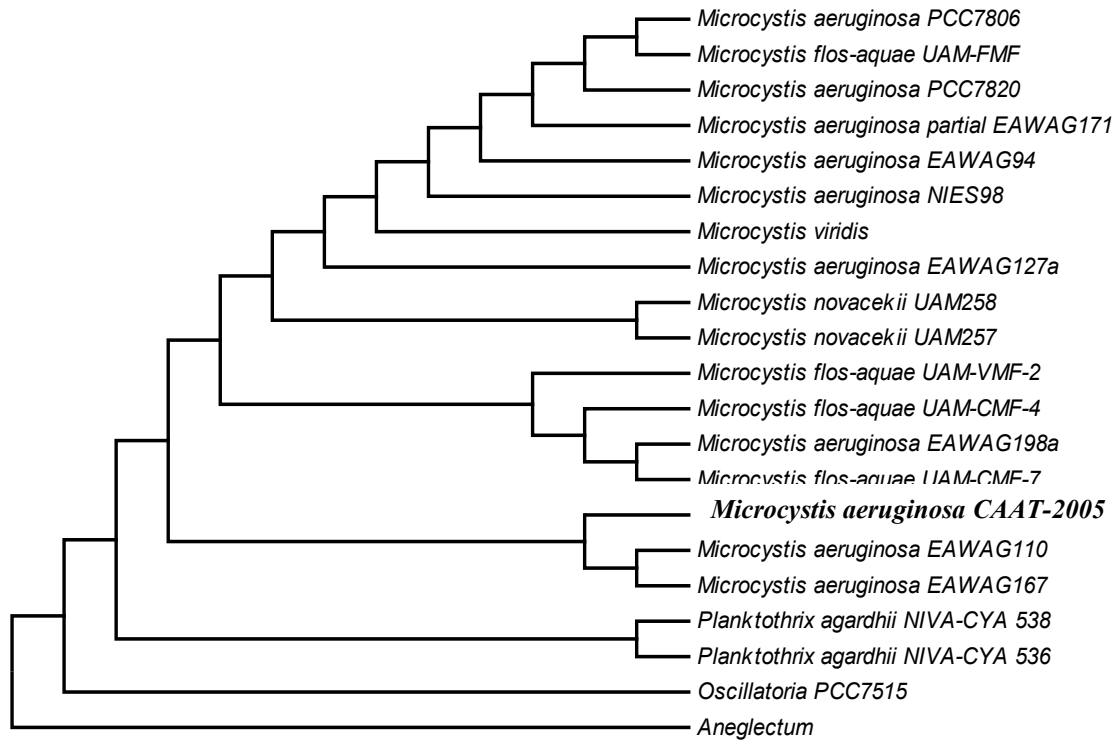


Figure 6. UPGMA dendrograma basado en RFLP de genes cyanobacterianos 16S rRNA

Figure 6. UPGMA dendrogram based on RFLP of 16S rRNA

La evaluación de las relaciones filogenéticas, fue realizada a partir de las secuencias obtenidas de las mini-bibliotecas genómicas construidas mediante la amplificación de la región espaciadora entre los genes *cpcA* y *cpcB* (*cpcBA*-IGS) indican su similitud con dos cepas previamente descritas (Tabla 1).

Tabla 1. Principales cepas de cianobacterias con un alineamiento positivo significativo con la cepa en estudio (CAAT 2005).

Table 1. Major cyanobacterial strains with significant positive alignment with the strain under study (CAAT 2005).

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
	Microcystis aeruginosa partial						
AJ003174.1	pcB and pcA genes, strain 1129 EAWAG127a		1129	100%	0.0	97%	
	Microcystis aeruginosa partial						
AJ003172.1	pcB and pcA genes, strain 1129 EAWAG110		1129	100%	0.0	97%	

DISCUSIÓN

En este trabajo se presenta la identificación y caracterización en condiciones de cultivo de la primera cepa argentina aislada del ambiente.

El análisis filogenético mediante técnicas de biología molecular permitió confirmar la primera identificación morfológica de la cepa CAAT 2005 como perteneciente a la especie *Microcystis aeruginosa*

Encontramos dos etapas distintas de crecimiento, una fase crecimiento inicial hasta los 20 días y posteriormente una fase estacionaria hasta el fin del estudio a los 35 días.

En concordancia con los estudios realizados por Winn-Jung Huang *et al.* (2007) que para el punto medio de la fase exponencial reporta una relación de clorofila-*a*/célula de 0,5

$\mu\text{g}/10^7$ células, nuestros resultados muestran valores de clorofila-*a* del orden de 1,2 $\mu\text{g}/10^7$ células para el mismo punto de la fase de crecimiento exponencial.

En este trabajo se identifica una variante de MC característica de nuestra región que ha sido identificada como [D-Leu1] Mcyst –LR ya que su patrón de ionización corresponde con el descrito por Park *et al.* (2001).

Este es una importante determinación ya que la cepa CAAT-2005 produce exclusivamente esta toxina y puede utilizarse como fuente para el aislamiento y purificación de estándares analíticos propios.

CONCLUSIONES

Esta es la primera vez que se aísla y caracteriza una cepa autóctona argentina.

La identificación y caracterización de la cepa estudiada, así como la determinación de similitud con otras especies descriptas es un paso fundamental en el estudio de las cianobacterias locales, constituyéndose en una importante herramienta para los investigadores.

Se logró caracterizar a CAAT 2005 como productora de toxinas la cual mayoritariamente corresponde a [D-Leu1] Mcyst –LR

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrinolo D, Pereira P, Giannuzzi L, Aura C, Massera S, Caneo M; Caixach J, Barco M & Echenique R. 2007. Occurrence of *Microcystis aeruginosa* and microcystins in Rio De La Plata River (Argentina). *Acta Toxicológica Argentina*, 15: 13-18
- De León L. & Yunes J. 2001. First report of a *Microcystis aeruginosa* toxic bloom in La Plata River. *Environmental Toxicology*, 16 (2): 110-112
- Echenique R, Rodríguez J, Caneo M, Gianuzzi L, Barco M, Rivera J, Caixach J & Andrinolo D. 2008. Microcystins in the drinking water supply in the cities of Ensenada and La Plata (Argentina). *Anais do XICBFic Livros do Museu Nacional*, Brasil: 125-129
- Genoni G P, Behra R, Montague CL, Gukttinger H & Ternay-Aegerter R.2001. Complex Dynamics of Adaptation in a Nonaxenic *Microcystis* Culture. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 48: 235-240
- Heisler J , Glibert PM, Burkholder JM, Anderson DM, Cochlan W, Dennison WC, Dortch Q, Gobler CJ, Heil CA, Humphries E, Lewitus A, Magnien R, Marshallm HG, Sellner K, Stockwell DA, Stoecker DK & Suddleson M. 2008. Eutrophication and harmful algal blooms: A scientific consensus. *Harmful Algae*, 8: 3–13
- ISO/CD 20179. Water Quality-Determination of Microcystins in Raw and Treated Waters-Method by Solid Phase Extraction (SPE) for Sample Enrichment and Clean-up Followed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with Ultraviolet (UV) Detection.
- Jochimsen EM, Carmichel WW, An J Cardo DM, Cookson ST, Holmes CEM, Antunes BC, Melo Filho DA, Lyra TM, Barreto VST, Azevedo SMFO & Jarvis WR. 1998. Liver failure and death after exposure to microcystin at a hemodialysis center in Brazil. *New England Journal of Medicine*, 338: 873-878

- Msagati TAM, Siame BA, Shushu DD. 2006. Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. *Aquatic Toxicology* 78: 382–397
- Oliver RL & Gant GG. 2000. Feshwater blooms. Cap 6: 149-194 En: Whitton BA & Potts M (Eds), *The ecology of cyanobacteria*. Kluwer Acad. Publishers, The Netherlands
- Park H, Namikoshi M, Brittainc SM, Carmichael WW & Murphy T. 2001. [d-Leu1] microcystin-LR, a new microcystin isolated from waterbloom in a Canadian prairie lake. *Toxicon*, 39: 855-862
- Rinehart KL, Namikoshi M & Choi BW. 1994. Structure and biosynthesis of toxins from bluegreen algae (cyanobacteria). *J Appl Phycol*, 6, 159–176
- Sivonen K & Jones G. 1999. Cyanobacterial toxins. P 41-111 En: Chorus I & Bartram J (Eds), *Toxic Cyanobacteria in Water: a Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. E&FN Spon, London
- Watanabe MM, Kaya K & Takamura N. 1992. Fate of the toxic cyclic heptapeptides, the microcystins, from blooms of *Microcystis* (cyanobacteria) in a hypertrophic lake. *J Phycol*, 28: 761-67
- Winn-Jung Huang , Chun-Hsi Lai & Yung-Ling Cheng. 2007. Evaluation of extracellular products and mutagenicity in cyanobacteria cultures separated from a eutrophic reservoir. *Science of the Total Environment* 377: 214–223
- Yuan M., Carmichael W W & Hilborn E D. 2006. Microcystin analysis in human sera and liver from human fatalities in Caruaru, Brazil 1996. *Toxicon*, 48 627–640