

## Las microcistinas

Laura Vela, Emma Sevilla, Beatriz Martín, Silvia Pellicer,  
M<sup>a</sup> Teresa Bes, María F. Fillat, M<sup>a</sup> Luisa Peleato

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza. 50009-Zaragoza

### Resumen

La creciente eutrofización de los acuíferos ha provocado que frecuentemente se produzcan proliferaciones incontroladas de fitoplancton, principalmente de cianobacterias, que pueden tener carácter tóxico. Una de las cepas más virulentas es del género *Microcystis* y produce la cianotoxina más ubicua, la microcistina.

Las microcistinas producen graves problemas sanitarios y medioambientales, y la legislación Española contempla ya su control en aguas emergentes de depuradoras. Hay dos grandes problemas planteados en torno a la microcistina. En primer lugar se desconoce qué factores son los que desencadenan su síntesis, y en segundo lugar, qué papel fisiológico juegan en la cianobacteria, ya que se trata mayoritariamente de una endotoxina.

### Abstract

The increasing eutrophication of the fresh water reservoirs has lead to the frequent occurrence of uncontrolled proliferations of phytoplankton, mainly of cyanobacteria, which can have toxic character. One of the most virulent strains is the genera *Microcystis* which produces the most prevalent cyanotoxin, the microcystin.

The microcystins pose a serious health and environmental risk, and the Spanish current legislation already controls the level of the toxin in potable waters. There are two main open questions about microcystins that have been long discussed and still remain unresolved. Firstly, what the factors that trigger microcystin synthesis are, and secondly, what the physiological role of these molecules could be in the cyanobacteria, since they are mainly found as endotoxins.

## 1 “Blooms” o floraciones de cianobacterias

Desde ya hace muchos años se viene observando el progresivo deterioro de las aguas superficiales de todo el planeta. Una importante fuente de contaminación es el exceso de nutrientes, especialmente fosfatos y nitrógeno, lo cual lleva a la eutrofización de estos ecosistemas. Estos nutrientes provienen principalmente de aguas residuales tratadas insuficientemente, residuos agrícolas, abonos y otros desechos de industrias de ganado (Briand *et al*, 2003).

Debido a esta creciente eutrofización de nuestras aguas, la incidencia de proliferaciones incontroladas de cianobacterias o “blooms” es cada vez más frecuente. En estos casos, el hecho de que ciertas especies de cianobacterias dominen sobre otros organismos fitoplanctónicos en la superficie de las aguas, es debido a una serie de características de las primeras que les aportan cierta ventaja competitiva:

- en condiciones de poca luz, (debido a la gran densidad de población en aguas eutróficas que lleva a la turbidez de éstas), las cianobacterias pueden mantener una tasa de crecimiento relativamente mayor que el resto de organismos fitoplanctónicos presentes (Chorus *et al*, 1999);
- pueden regular su flotabilidad mediante vesículas de gas para colocarse en la columna de agua a aquellas profundidades donde la disponibilidad de nutrientes y luz es la adecuada (Walsby *et al*, 1989);
- tienen bajos requerimientos de nitrógeno y además poseen gránulos de reserva de fosfatos en su citoplasma.

Influye también la temperatura de las aguas así como el pH en la formación de las proliferaciones, siendo más propicias temperaturas de entre 20 y 30 grados y pH neutros o básicos. Por esta razón, el verano es la época de más incidencia, por darse condiciones de más temperatura y calma de las aguas. Estas floraciones masivas de cianobacterias en las aguas producen muchos efectos secundarios algunos de los cuales son:

- se puede consumir una gran cantidad de oxígeno por la respiración y por la degradación por parte de otras bacterias de la materia orgánica que sedimenta cuando la floración desaparece. Esto lleva a condiciones de anoxia ocasionando la muerte de los organismos (peces por ejemplo) que viven cercanos al sedimento.
- hay síntesis por parte de las cianobacterias de compuestos volátiles que dan un sabor y olor desagradable a las aguas.
- Puede haber síntesis de cianotoxinas

En cuanto a la producción de toxinas, estas proliferaciones de cianobacterias pasaron de ser un problema medioambiental, a serlo también sanitario cuando, en las pasadas

décadas, se descubrió la capacidad de ciertas cianobacterias de producir metabolitos secundarios con propiedades tóxicas para muchos organismos, incluyendo los humanos (Figueiredo *et al*, 2004). Se estima que el 50 % de estas floraciones de cianobacterias en aguas a nivel mundial son tóxicas (Roset *et al*, 2001). nicamente algunas cepas de cianobacterias pueden producir toxinas e incluso dentro de la misma especie pueden existir cepas productoras y no productoras. Estos compuestos se llamaron cianotoxinas y se suelen clasificar de acuerdo a sus efectos en:

1.- DERMATOTOXINAS: destacan lyngbyatoxina A y aplysiatoxina producidas por cianobacterias marinas como *Lyngbya* y *Oscillatoria*.

2.- NEUROTOXINAS: ejercen su efecto sobre el sistema neuromuscular y entre ellas se encuentran Anatoxina-a y anatoxina-a(s) producidas por *Anabaena*, *Microcystis* y *Oscillatoria*. También destaca la saxitoxina que es producida por dinofagelados marinos pero se ha visto que también la producen cianobacterias como *Aphanizomenon flosaquae*, *Anabaena circinalis* y *Planktothrix*.

3.- HEPATOTOXINAS: hay tres familias principales de cianotoxinas que afectan al hígado:

- a) Microcistina: es la que más está implicada en envenenamiento de animales y humanos y es producida por varios géneros de cianobacterias como *Microcystis*, *Anabaena* *Planktothrix* y *Oscillatoria*.
- b) Nodularina: producida por la especie *Nodularia spumigena* especialmente en aguas saladas.
- c) Cilindrospermopsina: es producida por *Cylindrospermopsis raciborskii* y *Aphanizomenon ovalisporum* entre otras.

Las primeras intoxicaciones de poblaciones humanas por consumo de agua contaminada con cepas tóxicas de cianobacterias fueron descritas en Australia, Inglaterra, China y África del Sur (WHO, 2003). El episodio más grave ocurrió en Brasil el año 1996 donde murieron más de 50 pacientes sometidos a tratamientos de hemodiálisis, en los que se utilizó agua contaminada de toxinas cianobacterianas (Jochimsen *et al*, 1998).

## 2 El género *Microcystis*

El género de cianobacterias *Microcystis* es uno de los principales productores de microcistinas, especialmente las especies *Microcystis aeruginosa* y *viridis*, aunque también las producen los géneros *Nostoc*, *Anabaena*, *Planktothrix* y *Oscillatoria*. *Microcystis* es una cianobacteria unicelular, con aspecto cocal, aunque se puede encontrar formando colonias de forma irregular. La capa de material extracelular que rodea a las células consta de exopolisacáridos, glicoproteínas y glicolípidos. Suele tener morfología lobulada y de fácil eliminación. En un primer momento el tamaño de las colonias es microscópico pero puede

ir aumentando su tamaño llegando a formar las mencionadas floraciones (Via-Ordorika *et al*, 2004).

Esta cianobacteria posee en su citoplasma numerosas vesículas de gas que le permiten mantener el grado de flotabilidad óptimo en hábitats acuáticos para alcanzar la profundidad adecuada y obtener la intensidad de luz, concentración de oxígeno u otros nutrientes adecuados. Las colonias que forma *Microcystis* tienen una tasa fotosintética elevada en la superficie de, por ejemplo, lagos, y acumulan grandes cantidades de carbohidratos. Éstos provocan la caída de las células desde la zona fótica a zonas más profundas y oscuras donde usan estos carbohidratos para la respiración y nueva síntesis de vesículas de gas para regresar a la zona fótica (Chorus *et al*, 1999).

### 3 Microcistinas

Las microcistinas son heptapéptidos cíclicos que contienen tanto aminoácidos proteicos como no proteicos. La fórmula general de estos péptidos es ciclo(D-Ala-X-D-MeAsp-Y-Adda-DGlu-Mdha). Existen más de 70 variantes de microcistinas por modificaciones estructurales como es la variación de los L-aminoácidos X e Y, siendo la más común la microcistina-LR (MC-LR), con un residuo de leucina en la posición 2 y una arginina en la 4. Otras variantes que también son relativamente abundantes son la MC-RR, MC-LA y MC-YR. Además, hay isoformas generadas por metilación, hidroxilación y epimerización (Neilan *et al*, 1999). Una misma cepa productora puede producir más de una variante de microcistina a la vez.

El  $\alpha$ -aminoácido Adda (3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetil-deca-4,6-ácido dienoi-co), es común en todas las microcistinas, y también está presente en las nodularinas. Se considera el principal responsable de la toxicidad de estos péptidos.

#### 3.1 Mecanismo de acción de las microcistinas.

La microcistina-LR no es capaz de cruzar las membranas celulares y por eso no entra en la gran mayoría de los tejidos. Después de ser ingerida, se transporta a través del íleon hacia el torrente sanguíneo por el transportador de ácidos biliares, presente en los hepatocitos y células de la mucosa del intestino delgado (Falconer *et al*, 1992). Posteriormente se concentra en el hígado por la captación por los hepatocitos.

Esta toxina es un potente inhibidor de las serín treonín proteín fosfatasas 1 y 2A (PP1 y PP2A), tanto de animales como de plantas superiores (MacKintosh *et al*, 1990). Mediante estudios de cinética enzimática se pudo ver que la microcistina-LR inhibe 40 veces más a la PP2A que a la PP1 (Honkanen *et al*, 1990).

### 3.2 Localización de las microcistinas en las células productoras.

Las microcistinas se localizan en un 90 % en el interior de las cianobacterias que las producen. Mediante estudios de inmunolocalización con partículas de oro (“immunogold”) realizados por Young *et al* (2005) se detectó la presencia de microcistina preferentemente asociada al área de los tilacoides (69 %), incluyendo la membrana externa de éstos, en el nucleoplasma (19 %) y en la periferia de los gránulos de polifosfato (3 %).

### 3.3 Efectos de las microcistinas.

Las proteínas fosfatasa PP1 y PP2A inhibidas por las microcistinas, están implicadas en muchos procesos celulares como la división celular, la síntesis de proteínas, la señalización celular, la contracción muscular, el transporte de calcio, etc. (Wera *et al*, 1995). De ahí que estos procesos se vean alterados cuando hay una ingesta de agua contaminada con cianobacterias tóxicas.

Una vez han alcanzado los hepatocitos, estas toxinas provocan la hiperfosforilación de las proteínas hepáticas. Esto afecta al citoesqueleto principalmente, ya que el equilibrio de polimerización/depimerización de los filamentos intermedios y microfilamentos se va a ver alterado hacia el estado de monomerización. Se produce deformación hepática, con colapso de la arquitectura del hígado. Se observa también hemorragia intrahepática y necrosis. Un consumo crónico de microcistina lleva a degeneración hepática vía necrosis, fibrosis progresiva e incluso tumorigénesis, llegando a provocar la muerte (Ito *et al*, 2003).

Cabe destacar que el año 2003 se propone la subunidad  $\beta$  ATP-sintasa como nueva diana intracelular de la microcistina-LR (Mikhailov *et al*, 2003). Se sugiere que es una diana secundaria, a la que solamente se unen cuando las células son expuestas a muy altas concentraciones de microcistina y que esto promovería la señalización apoptótica por la vía mitocondrial.

### 3.4 Factores que afectan a la síntesis de microcistina.

Para la prevención de los “blooms” tóxicos sería muy importante conocer los factores que regulan la síntesis de las toxinas. Se ha pensado que la variación de la toxicidad pueda deberse a cambios en la composición de las especies de cianobacterias, así como a diversos factores ambientales y nutricionales que han sido ampliamente estudiados en el laboratorio. A pesar de esto, los resultados obtenidos en diferentes estudios son muy contradictorios.

#### **Efecto de la luz.**

El efecto de la luz ha sido el único estudiado hasta el momento a nivel molecular (Kaebernick *et al*, 2000). Se investigaron los niveles de transcritos de los genes *mcyB* (péptido

sintetasa) y *mcyD* (policétido sintasa) a diferentes intensidades de luz observándose un aumento de la transcripción en condiciones de alta luz. A pesar de esto, los autores no han encontrado una correlación con la cantidad de microcistina, que es constante o incluso disminuye al aumentar la intensidad de luz. Para explicar estos resultados, han propuesto que quizás en condiciones de elevada luz, se produzca más microcistina pero que este péptido sea un derivado alterado no detectable por los ensayos de inhibición de la PP2A o bien sea fotodegradado, o se excrete de la célula.

### **Efecto del hierro.**

El hierro es uno de los nutrientes más interesantes cuyo metabolismo debe ser finamente regulado por su escasa disponibilidad biológica y su potencial toxicidad.

Sobre el efecto de este elemento en la síntesis de microcistina hay en la bibliografía tres artículos principales en los que existe controversia de resultados. En Lukak *et al* (1993) y Lyck *et al* (1996) se aportan resultados según los cuales en ausencia o a concentraciones bajas de hierro las células producen más cantidad de microcistina. Contrariamente, Utkilen *et al* (1995), observan un aumento de la concentración de microcistina en condiciones de elevado hierro.

### **Efecto del nitrógeno.**

Los estudios publicados sobre la implicación de este elemento en el crecimiento celular y la producción de microcistinas tampoco son esclarecedores. Sivonen (1990) observa que un aumento de las concentraciones de nitrógeno en lagos promueve fuertemente el crecimiento de las cepas de *Oscillatoria* y la producción de microcistinas. Otro artículo muestra que, bajo condiciones limitantes de nitrógeno, las células de *Microcystis aeruginosa* MASH 01-A19 crecen más rápido y tienen un mayor contenido de microcistina (Long *et al*, 2001).

### **Efecto del fosfato.**

Debido a la elevada concentración de este elemento durante los procesos eutróficos y a su implicación en la fisiología celular, los fosfatos se han considerado también implicados en la producción de toxinas.

Algunos estudios indican que el fósforo no influye la producción de microcistinas por *Microcystis aeruginosa* (Utkilen *et al*, 1995), pero otras publicaciones anteriores y posteriores muestran que en condiciones limitantes de fosfato, aumenta la síntesis de la toxina (Wicks *et al*, 1990; Oh *et al*, 2000). Sin embargo, informes del contenido de microcistina-LR en “blooms” de lagos canadienses del año 2002 revelan que una alta cantidad de fósforo disuelto se corresponde con una mayor concentración de dicha toxina (Vézic *et al*, 2002).

### **Efecto de otros factores.**

Se ha estudiado el impacto de otros factores sobre la síntesis de microcistina como es el pH o los elementos traza. Van der Westhuizen *et al* (1983) publicaron que, a pesar de que el crecimiento de las cianobacterias en cultivo era óptimo a pH 9, la toxicidad se

veía que era mayor a pH más extremos, mayores o menores que éste. Por otro lado se ha estudiado la capacidad de los metales cobre y zinc de afectar a la síntesis de microcistina en cultivos de *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 y PCC 7941 (Lukac *et al*, 1993). La presencia de zinc era imprescindible tanto para el crecimiento óptimo de las células como para la producción de la toxina. Sin embargo, no se vio implicación del cobre en el crecimiento de las cianobacterias ni en la producción de la toxina.

#### 4 Propuestas sobre el papel ejercido por las microcistinas.

Las microcistinas se han considerado como metabolitos secundarios, aunque, dada la complejidad de su estructura y el sistema de biosíntesis tan complicado que presentan, parece extraño que las cianobacterias productoras sinteticen este compuesto en cantidades tan elevadas si no les aporta ningún beneficio (Young *et al*, 2005). Por eso se lleva especulando muchos años sobre el posible papel que pueden ejercer estas moléculas en las células productoras así como en el exterior celular. Se han propuesto varias funciones para ellas sin haberse llegado aún a una conclusión clara.

Una de las principales hipótesis es que la producción de estas toxinas tiene el objetivo de disuadir al zooplancton de la ingesta de células de cianobacterias. El mecanismo aún no se ha descrito, pero se piensa que podría ser una estructura o sustancia perceptible de la membrana extracelular (Rohrlack *et al*, 2001). Esta suposición se basa en el hecho de que la microcistina se encuentra principalmente en el interior de las células productoras de manera que los organismos que ingieran estas células van a verse expuestos a la toxina. Sin embargo, mediante numerosos estudios realizados con crustáceos, solamente se ha podido explicar el efecto tóxico de *Microcystis aeruginosa* por la presencia de microcistina, pero no la inhibición de la ingesta por el zooplancton (Rohrlack *et al*, 1999).

Estudios filogenéticos realizados por Rantala *et al*, (2004), han permitido proponer que, dado que la habilidad de producir microcistinas, es anterior a la aparición de los metazoos, parece poco probable que estos péptidos surgieran como una forma de defenderse de ellos.

Otra posible función que se ha barajado es la producción de esta toxina como sustancia alelopática para aportar una ventaja sobre otras especies de cianobacterias competidoras (Kaebernick *et al*, 2001). En este caso sería imprescindible la exportación del péptido al exterior celular, lo cual es compatible con el descubrimiento de un posible transportador, McyH, por Pearson *et al* (2004). El mecanismo de acción que se propone para la microcistina en este caso sería la inhibición de las proteín fosfatasas de esas cianobacterias. Pero Shi *et al* (1999), hicieron una serie de experimentos en los que determinaron que las proteín fosfatasas PP1 y PP2 de cianobacterias son resistentes a las toxinas microcistina-LR y ácido okadaico. Así, se sugiere que, si estos metabolitos son producidos como arma de defensa, no están dirigidos contra otras cianobacterias.

Por otro lado, Hesse *et al* (2001) sugirieron que las microcistinas podrían tener un papel en los procesos de adaptación a la luz, puesto que vieron que los mutantes que no producían microcistina tenían un 20 % menos de pigmentos fotosintéticos. Esto plantea la posibilidad de que las moléculas de microcistina asociadas a las membranas tilacoidales pudieran ejercer un papel estructural en estos orgánulos.

También se ha visto la presencia de agrupaciones de moléculas de microcistina alrededor de los gránulos de polisulfato (Young *et al*, 2005). Estos gránulos se sabe que son capaces de atrapar, por ejemplo, iones de zinc (Andrade *et al*, 2004), y la microcistina se ha visto que puede formar complejos con cationes divalentes *in vitro* (Humble *et al*, 1997). Si esto ocurriera *in vivo*, sería lógico pensar que estos complejos serían demasiado grandes como para atravesar los poros de los gránulos de polisulfato y permanecerían en la periferia. Esto sugeriría una implicación de la microcistina en la detoxificación de metales del interior de la célula (Young *et al*, 2005). Humble *et al* (1997) observaron que, si adicionaban distintas cantidades de microcistina-LR y también LW y LF a soluciones de sulfato de cobre y de zinc, se daba una disminución del pico del metal observado por polarografía y que se desplazaba hacia valores más negativos de potencial.

Utkilen *et al* (1995) proponen, por otra parte, que esta toxina está actuando como un quelante intracelular que mantiene los niveles de  $Fe^{2+}$  libre bajos. Además, aceptan que las enzimas implicadas en su síntesis están controladas por el contenido de  $Fe^{2+}$  libre. Sin embargo, en todos los años posteriores, no se ha podido comprobar esta hipótesis. Posteriormente, Humble *et al* (1997), comprobaron que la microcistina también se unía a hierro además de a zinc y cobre.

Se ha planteado también que la microcistina pudiera actuar como molécula de señalización extracelular, controlando la densidad de población y la expresión de genes específicos en respuesta a esa densidad poblacional. Este fenómeno es conocido como “quorum sensing”, y se ha observado anteriormente en numerosas especies bacterianas, pero no en cianobacterias.

Se han realizado experimentos que consisten en la adición de microcistina a cepas de *Microcystis aeruginosa* no productoras de la toxina, viéndose una tendencia a la agregación celular y formación de pseudocolonias (Sedmak *et al*, 2005). Se ha visto que también se da agregación cuando se añade la misma toxina al alga verde *Scenedesmus quadricauda*. Además, se observa un aumento del volumen celular, así como del volumen de los cloroplastos, y también de cantidad de pigmentos fotosintéticos, lo cual indica un aumento del metabolismo celular. Como durante la formación de proliferaciones de cianobacterias, parecerían importantes los contactos entre células, y se conoce la existencia de un transportador que puede exportar microcistina al exterior celular (McyH), parece factible el papel de la microcistina como una molécula de comunicación entre células que coordina el comportamiento de células vecinas.

Recientemente se ha publicado un estudio en el que se adiciona microcistina-LR y extractos libres de células de *Microcystis* a cultivos de estas mismas células. Se observa que se induce la acumulación de McyB, y se producen más microcistinas, siendo más fuerte el efecto cuando se añaden los extractos (Schatz *et al*, 2007). Esto está en concordancia con la función de molécula de señalización que se está proponiendo en los últimos tiempos como su más factible papel.

## Referencias

- [1] 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.
- [2] Walsby, A. E., Hayes P. K. (1989) Gas vesicle proteins. Review article. *Biochemistry Journal*. 264 (313-322).
- [3] Chorus, I. and Bartram, J. (1999) Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. WHO.
- [4] 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.
- [5] Roset J, Aguayo S, Muñoz MJ. (2001) Detección de cianobacterias y sus toxinas. Una revisión. *Revista de Toxicología*. 18:65-71.
- [6] WHO (2003) Algae and cyanobacteria in fresh water. In: Guidelines for safe and recreational water environments. Vol 1: Coastal and fresh waters. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 136-158.
- [7] Jochimsen, E.M., Carmichael, W.W., An, J.S., Cardo, D.M., Cookson, S.T., Holmes, C.E., Antunes, M.B., de Melo Filho, D.A., Lyra, T.M., Barreto, V.S., Azevedo, S.M., Jarvis, W.R. (1998) Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis centre in Brazil. *The New England Journal of Medicine* 338(16):873-878.
- [8] Neilan, B. A., Dittmann, E., Rouhiainen, L., Bass, R. A., Schaub, V., Sivonen, K., Brner, T. (1999) Nonribosomal Peptide Synthesis and Toxicogenicity of Cyanobacteria. *Journal of Bacteriology* 181(13):4089-4097.
- [9] Falconer, I. R., Yeung, D. S. K. (1992) Cytoskeletal changes in hepatocytes induced by *Microcystis* toxins and their relation to hyperphosphorylation of cell proteins. *Chemico-Biological Interactions* 81:181-196.

- [10] MacKintosh, C., Beattie, K. A., Klumpp, S. Cohen, P., Codd, G. A. (1990) Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Letters* 264:187-192.
- [11] Honkanen, R. E., Zwiller, J., Moore, R. E., Daily, S. L., Khatral, B. S., Dukelow, M., Boynton A. L. (1990) Characterization of Microcystin-LR, a Potent Inhibitor of Type 1 and Type 2A Protein Phosphatases. *The Journal of Biological Chemistry* 265(32):19401-19404.
- [12] 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.
- [13] Wera, S., Hemming, B. A. (1995) Serine/threonine protein phosphatases. Review Article. *Biochemical Journal* 311:17-29.
- [14] Ito, E., Kondo, F., Terao, K. and Harada, K. I. (1997b) Neoplastic nodular formation in mouse liver induced by repeated intraperitoneal injections of microcystin-LR. *Toxicon* 35(9):1453-1457.
- [15] Mikhailov, A., Harmala-Brasken, A.S., Hellman, J., Meriluoto, J., Eriksson, J.E. (2003) Identification of ATP-synthase as a novel intracellular target for microcystin-LR. *Chemicobiological interactions* 142(3):223-37.
- [16] Kaebernick, M., Neilan, B., Börner, T., Dittmann, E. (2000) Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Applied and Environmental Microbiology* 66(8):3387-3392.
- [17] Lukak, M., Aegerter, R. (1993) Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon* 31(3):293-305.
- [18] Lyck, S., Gjølme, N., Utkilen, H. (1996) Iron starvation increases toxicity of *Microcystis aeruginosa* CYA 228/1 (Chroococcales, Cyanophyceae). *Phycologia* 35:120-124.
- [19] Utkilen, H., Gjølme, N. (1995) Iron-stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 61(2):797-800.
- [20] Sivonen K. (1990) Effects of light, temperature, nitrate orthophosphate and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 56(9):2658-2666.
- [21] Long, B. M., Jones, G. J., Orr, P. T. (2001) Cellular microcystin content in N-limited *Microcystis aeruginosa* can be predicted from growth rate. *Applied and Environmental Microbiology* 67(1):278-283.

- [22] Wicks, R. J., Thiel, P. G. (1990) Environmental factors affecting the production of peptide toxins in floating scums of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in a hypertrophic African reservoir. *Environmental Science and Technology* 24:1413-1418.
- [23] Oh, H., June, S., Jang, H., Yoon, B. (2000) Microcystin production by *Microcystis aeruginosa* in a phosphorous-limited chemostat. *Applied and Environmental Microbiology* 66(1):176-179.
- [24] Vézic, C., Rapala, J., Vaitomaa, J., Seitsonen, J., Sivonen, K. (2002) Effect of nitrogen and phosphorous on growth of toxic and nontoxic *Microcystis* strains and on intracellular microcystin concentrations. *Microbial Ecology* 43:443-454. -
- [25] Van der Westhuizen, A. J., Eloff, J. N. (1983) Effect of culture age and pH of culture medium on the growth and toxicity of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Z. Pflanzenphysiol.* 110:157-163.
- [26] Rohrlack, T., Dittmann, E., Brner, T., Christoffersen, K. (2001) Effects of cell-bound microcystins on survival and feeding of *Daphnia* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 67(8):3523-3529.
- [27] Rohrlack, T., Dittmann, E., Henning, M., Brner, T., Kohl, J-G. (1999) Role of microcystins in poisoning and food ingestion inhibition of *Daphnia galeata* caused by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 65(2):737-739.
- [28] Rantala, A., Fewer, D. P., Hisbergues, M., Rouhiainen, L., Vaitomaa, J., Brner, T., Sivonen, K. (2004) Phylogenetic evidence for early evolution of microcystin synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(2):568-573.
- [29] Kaebernick, M., Neilan, B. A. (2001) Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiology Ecology*. 35:1-9.
- [30] Pearson, L. A., Hisbergues, M., Brner, T., Dittmann, E., Neilan, B. A. (2004) Inactivation of an ABC transporter, *mcyH*, results in loss of microcystin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Applied and Environmental Microbiology* 70(11):6370-6378.
- [31] Shi, L., Carmichael, W. W., Kennelly, P. J. (1999) Cyanobacterial PPP family protein phosphatases possess multifunctional capabilities and are resistant to microcystin-LR. *The Journal of Biological Chemistry* 274(15):10039-10046.
- [32] Hesse, K., Dittmann, E., Brner, T. (2001) Consequences of impaired microcystin production for light-dependent growth and pigmentation of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *FEMS Microbiology Ecology* 37 (1):3943.

- [33] Andrade, L., Keim, C. N., Farina, M., Pfeiffer, W. C. (2004) Zinc detoxification by a cyanobacterium from a metal contaminated bay in Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 47:147-152.
- [34] Humble, A. V., Gadd, G. M., Codd, G. A. (1997) Binding of copper and zinc to three cyanobacterial microcystins quantified by differential pulse polarography. *Water Research*. 31(7):1679-1686.
- [35] Sedmak, B., Elersek T. (2005) Microcystins induce morphological and physiological changes in selected representative phytoplanktons. *Microbial Ecology* 50:298-305.
- [36] Schatz, D., Karen, Y., Vardi, A., Sukenik A., Carmeli, S., Brner, T., Dittmann, E., Kaplan, A. (2007) Towards clarification of the biological role of microcystins, a family of cyanobacterial toxins. *Environmental Microbiology* 9(4): 965-970.