1.3. TOSSINE DA CIANOBATTERI: PROPRIETÀ CHIMICHE E TOSSICITÀ

Laura Achene
Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Le cianotossine sono un gruppo formato da tossine naturali diverse sia dal punto di vista chimico che tossicologico, responsabili di fenomeni di avvelenamento sia acuto che cronico negli animali e nell'uomo.

Le principali comprendono: le epatotossine (microcistine, MC; e nodularine, NOD), le neurotossine (anatossina-a, omoanatossina-a, anatossina-a(s), saxitossine, BMAA), le citotossine quali la cilindrospermopsina, tossine gastrointestinali e con effetti cutanei acuti quali aplisiatossina, debromoapsiatossina e lingbiatossina prodotte da cianobatteri di origine marina e le endotossine lipopolisaccaridiche (LPS), potenzialmente irritanti (1, 2).

Generalmente le tossine maggiormente riscontrate appartengono alla famiglia delle MC e delle NOD.

1.3.1. Peptidi ciclici

1.3.1.1. Microcistine

Struttura chimica e proprietà

Le MC sono eptapeptidi monociclici a basso peso molecolare, costituiti da un carboidrato di bloccaggio, sette residui aminoacidici e una metilammina. Gli eptapeptidi si diversificano tra loro mediante due L-aminoacidi variabili (L-R1 e L-R2) (Figura 1).

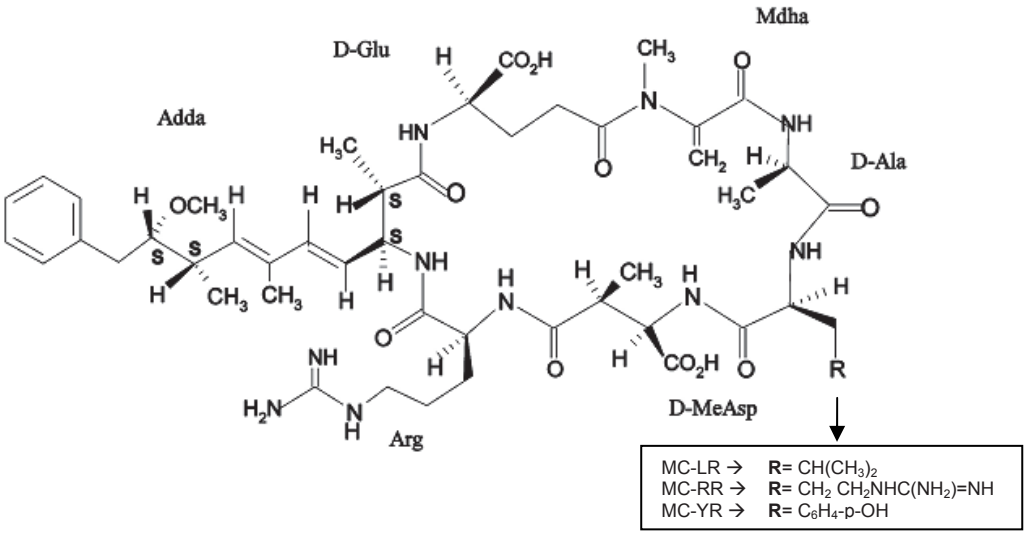

Figura 1. Struttura chimica delle microcistine più comuni

Finora sono state isolate in tutto il mondo più di 80 varianti diverse dalla prima tossina identificata, la MC-LR (2).

Le MC sono solubili in acqua, metanolo ed etanolo, insolubili in acetone, etere, cloroformio e benzene; esse sono resistenti all'idrolisi chimica e all'ossidazione a valori di pH neutri. Una rapida idrolisi chimica può avvenire solo in condizioni controllate di laboratorio quali ad es. in presenza di HCl 6M ad alta temperatura; sono ossidate invece dall'ozono e da altri agenti ossidanti forti.

Le MC sono molto stabili alla luce solare, mentre la luce UV ai valori di assorbimento massimo della MC-LR e della MC-RR le degrada rapidamente (3).

Tossicità

Meccanismo di azione

La MC-LR e la maggior parte dei suoi congeneri sono fortemente idrosolubili e generalmente non in grado di attraversare le membrane cellulari dei vertebrati e necessitano, pertanto, di una proteina trasportatrice adenosina-trifosfato dipendente (ATP).

Attraverso l'ileo grazie al sistema di trasporto degli anioni organici la MC-LR raggiunge il fegato (3); qui, all'interno degli epatociti, svolge la sua attività come potente inibitore delle fosfatasi 1 e 2A.

Tale inibizione, alle alte dosi, porta ad una iperfosforilazione delle proteine del citoscheletro e rottura finale dell'ultrastruttura epatica. Il fegato si rigonfia raddoppiando il suo volume a causa di una cospicua emorragia intraepatica centro lobulare, preceduta dal rigonfiamento degli epatociti e dalla rottura dei sinusoidi epatici.

Alle dosi più basse si ha induzione della proliferazione cellulare e ipertrofia epatica.

Alcune sostanze chimiche sono state usate in via sperimentale su animali da laboratorio per prevenire l'epatotossicità delle MC. Queste comprendono la ciclosporina A, la rifampicina e la silimarina. La loro efficacia è massima quando sono somministrate prima o contemporaneamente alla tossina (4). Altri organi che possono accumulare quantità significative della tossina sono l'intestino e i reni.

Alcuni autori giapponesi (5) hanno determinato la tossicità di 21 varianti di MC e della NOD sulla base della loro capacità di inibizione della fosfatasi 2A (IC_{50}: = *Inibitory Concentration* 50%).

I risultati indicano che la MC-LR è l'inibitore più potente della fosfatasi 2A. Sulla base di questi valori di inibizione gli autori hanno calcolato un fattore di conversione per calcolare le concentrazioni di MC e di NOD come equivalenti di MC-LR, come riportato in Tabella 1, applicando la seguente formula:

$$\text{Fattore di conversione} = IC_{50}\ \text{MC-LR}/IC50\ MC_{\text{considerata}}.$$

Alcuni studi pubblicati suggeriscono che le MC potrebbero agire come promotori tumorali, agenti che non causano tumori, ma stimolano la proliferazione delle cellule cancerogene.

Nel giugno del 2006, la IARC (*International Agency for Research on Cancer*) ha riunito un gruppo di esperti per valutare la tossicità della MC-LR e della NOD (6, 7). La commissione concluse che non vi erano adeguate evidenze negli animali di laboratorio della cancerogenicità della MC-LR.

Tabella 1. Fattori di conversione e valori di IC50 per le 21 varianti di microcistine e della nodularina

Tossina	IC_{50} (nM)	Fattore di conversione
MC-LR	0,032±0,004	1,000
MC-RR	0,056±0,002	0,571
MC-FR	0,069±0,003	0,464
MC-LF	0,096±0,0019	0,333
[D-Asp^3]MC-HtyR	0,098±0,006	0.327
[D-Asp^3, (Z)-Dhb^7]MC-HtyR	0,110±0,008	0,291
MC-LW	0,114±0,003	0,291
[D-Asp^3, (E)-Dhb^7]MC-HtyR	0,122±0,005	0,262
MC-YR	0,125±0,005	0,256
MC-LA	0,161±0,002	0,199
[D-Asp^3, (Z)-Dhb^7]MC-LR	0,164±0,010	0,195
[Dha7]MC-LR	0,167±0,003	0,192
MC-WR	0,179±0,011	0,179
[D-Asp^3, (E)-Dhb^7]MC-LR	0,201±0,003	0,159
[D-Asp^3, Dha^7]MC-RR	0,220±0,012	0,145
[D-Asp^3, Dha^7]MC-LR	0,254±0,004	0,126
[Dha^7]MC-RR	0,293±0,012	0,109
[D-Asp^3]MC-RR	0,300±0,009	0,107
[Dha^7]MC-YR	0,379±0,003	0,084
NOD	0,540±0,063	0,059
[6-(Z)-ADDA^5]MC-RR	0,126±0,314	0,003

Farmacocinetica

Il fegato risulta essere l'organo bersaglio principale sia per quanto riguarda l'accumulo che l'escrezione delle MC. Negli studi di distribuzione tissutale su animali da laboratorio a seguito di somministrazione intraperitoneale e intravenosa di MC-LR, il 50-70% era ritrovato nel fegato, un altro 7-10% nell'intestino e la rimanente quantità distribuita in tutto il corpo. È probabile che il trasporto possa avvenire anche nel rene, dal momento che questo organo ha anche un sistema di trasporto della bile, simile a quello delle cellule intestinali dei ratti. Le MC sono resistenti all'idrolisi enzimatica e di conseguenza alla degradazione nei tessuti (8); la loro escrezione con la bile avviene come tossine tal quali o a seguito della loro coniugazione (9). Il fegato svolge un ruolo fondamentale nella detossificazione di queste tossine (10). I prodotti di detossificazione sono stati rilevati nelle urine e nelle feci. Sono stati identificati tre prodotti metabolici derivati da reazioni di coniugazione rispettivamente con il glutatione, con la cisteina e con il diene ADDA ossidato (11). A seguito di studi su topi è risultata una eliminazione plasmatica biesponenziale della MC-LR, con emivite di 0,8 e 6,9 minuti (12).

La MC-LR viene escreta rapidamente, il 75% dell'escrezione totale avviene entro 12 ore. Il restante 24% viene escreto dopo 6 giorni, di cui il 9% con le urine e il 15% più lentamente con le feci (13).

Esposizione umana

L'uomo può essere esposto alle tossine per via orale attraverso il consumo di acqua o attraverso l'assunzione di integratori a base di alghe oppure per via cutanea attraverso il contatto con acque contaminate di laghi e fiumi nel corso di attività sportive (4). Una fonte minore di esposizione è l'inalazione attraverso le docce e durante gli sport acquatici (inalazione di spray e goccioline) (2).

Effetti a breve termine

In letteratura sono riportati diversi episodi di intossicazioni acute per consumo di acque contaminate da MC con implicazioni per la salute umana dalla gastroenterite al decesso (14). Il consumo di pesce, in particolare del fegato, proveniente da acque in cui sono presenti fioriture di cianobatteri, può causare la sindrome di Haff consistente in vomito, produzione di urine di colore marrone scuro, dolori muscolari, morte per insufficienza respiratoria (4). L'uomo può essere esposto anche attraverso il consumo di integratori alimentari a base di alghe, potenzialmente pericolosi se contengono alcune specie tossiche di cianobatteri. Molti di questi prodotti contengono *Aphanizomenon flos-aquae*, un'alga verde azzurra che coesiste con *Mycrocistis aeruginosa*, la quale può in tal modo entrare nella composizione di questi prodotti ad uso umano. I Dipartimenti della Salute e dell'Agricoltura dell'Oregon (USA) hanno stabilito un limite di legge di 1 μg/g per la presenza di MC nei prodotti a base di alghe verdi-azzurre e l'obbligo di test atti a rilevare la presenza di tossine algali (15). L'esposizione cutanea, invece, può avvenire durante lo svolgimento di attività ricreative o durante l'uso di docce alimentate con acqua contaminata e può causare produzione di vescicole sulle labbra e reazioni allergiche quali dermatite da contatto, asma, febbre da fieno e congiuntiviti (4).

Effetti a lungo termine

Gli effetti sull'uomo derivanti da esposizione cronica a basse dosi di MC non sono conosciute (1). In Cina sono stati condotti studi al fine di determinare l'importanza delle MC come fattore di rischio nello sviluppo di carcinoma epatocellulare nell'uomo. L'incidenza di questa malattia in Cina è altissima, con una distribuzione geografica variabile. Le fioriture di cianobatteri ad esempio sono molto abbondanti nelle acque superficiali nel sud-est della Cina dove l'incidenza di questa tumore è la più alta di tutto il Paese (10).

Elaborazione del NOAEL e del TDI

Nel 1998 la *World Health Organization* ha elaborato un valore guida provvisorio per la presenza della sola MC-LR nell'acqua destinata al consumo umano (16). Nelle conclusioni era evidenziata l'impossibilità di elaborare valori guida provvisori per le altre MC diverse dalla LR. Tale impossibilità rimane tuttora valida. Il limite stabilito per la MC-LR nelle acque per consumo umano derivava da un NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*), per danni epatici, di 40 μg/kg di peso corporeo ottenuto da uno studio a 13 settimane su topi trattati con acqua di abbeverata contenente MC-LR. Sulla base di questo valore era derivato un TDI (*Tolerable Daily Intake*) di 0,04 μg/kg pc/giorno, usando un fattore di sicurezza di 1000 (100 per le differenze tra specie e intra-specie e 10 per l'esiguità dei dati disponibili). Dal TDI era ottenuto un valore guida (*Guidance Value*, GV) di 1,0 μg/L per la concentrazione della MC-LR, avendo considerato che l'assunzione attraverso l'acqua potabile rappresenti l'80% della assunzione totale (*Allocation Factor*, AF 0,80) e un consumo di 2 L di acqua/giorno per una persona di 60 kg di peso (10). Tale valore guida è supportato da uno studio a 44 giorni su suini abbeverati con acqua addizionata con un estratto di *M. aeruginosa* contenente MC-LR.

Nel caso siano presenti oltre alla MC-LR altre MC potrebbe essere necessario utilizzare i *Toxicity Equivalent Factor* (TEF) ed esprimere la tossicità della miscela contenente differenti MC in MC-LR equivalenti. Wolf e Frank (17) hanno calcolato i valori dei TEFs per altre MC sulla base del valore della LD_{50} (*Lethal Dose* 50%) da studi di tossicità acuta intaperitoneale sul topo. La tossina di riferimento può essere considerata la MC-LR, cosicché il suo TEF è =1. Il TEF individuale di una tossina X può essere calcolato dal rapporto tra il valore di LD_{50} della MC-LR e della tossina X, secondo l'equazione:

$$TEF_X = LD_{50}\ \text{MC-LR} / LD_{50}(X)$$

lo stesso valore della MC-LR era adottato per le MC-LA, -YR e -YM, per le MC (D-asp3(E)-Dhb7)-RR e RR i valori erano rispettivamente 0,2 e 0,1.

1.3.1.2. Nodularine

Struttura chimica e proprietà

Le NOD (Figura 2) sono pentapeptidi monociclici con una struttura simile alle MC, contenenti l'aminoacido ADDA (18): ad oggi si conoscono pochi congeneri, identificati per la variabilità dell'unico L-amminoacido presente in posizione 2, oltre a piccole modificazioni strutturali come le demetilazioni. I vari congeneri possono avere tossicità molto diverse tra loro; è stata identificata anche una variante non tossica contenente il 6Z-stereoisomero dell'ADDA. Nella spugna di origine marina *Thenella swinhoei* è stato ritrovato un analogo della NOD chiamato motuporina, il quale presenta al posto della polare L-arginina, l'idrofobica L-valina. La motuporina potrebbe essere di origine cianobatterica dal momento che la spugna che la produce accoglie cianobatteri simbionti. La NOD è prodotta solamente dalla *Nodularia spumigena*, cianobatterio presente nelle acque salmastre. Saito *et al*. (19) hanno isolato e identificato una nuova NOD, chiamata NOD-Har, la quale presenta al posto dell'arginina l'omoarginina.

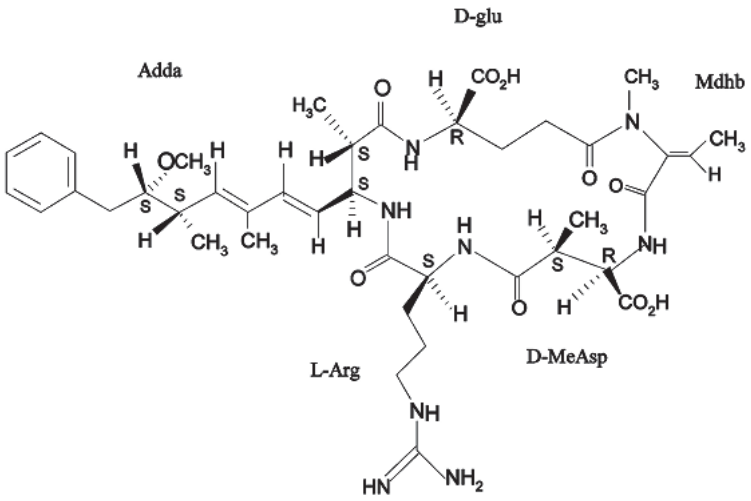

Figura 2. Struttura chimica della nodularina

Tossicità

Il meccanismo di tossicità delle NOD è molto simile a quello delle MC; sono potenti epatotossici. Le tossine entrano immediatamente nel circolo sanguigno attraverso l'ileo trasportati dagli acidi trasportatori della bile che convogliano le tossine attraverso la mucosa. Successivamente, le tossine sono trasportate in maniera preferenziale negli epatociti mediante la bile e infine le tossine inducono cambiamenti nei microfilamenti dell'actina, negli elementi delle cellule del citoscheletro con il risultato di una densa aggregazione di microfilamenti in prossimità del centro della cellula. La perdita del supporto cellulare causa rigonfiamento delle

cellule e rottura delle cellule sinusoidi endoteliali. In qualche caso, la distruzione delle cellule parenchimali e sinusoidi del fegato può causare emorragie letali intraepatiche nel giro di alcune ore o insufficienza epatica nel giro di alcuni giorni (15). Come nel caso delle MC l'attività epatotossica e cancerogena di queste tossine è associata all'inibizione delle fosfatasi 1 e 2 (20, 21). La NOD induce emorragie epatiche nel topo con una LD_{50} di 50 µg/kg (somministrazione per via intraperitoneale). A dosi più basse può agire come promotore tumorale favorendo la divisione delle cellule epatiche (22).

Effetti sull'uomo

Non si hanno dati sugli effetti tossici sull'uomo della *N. spumigena* (3). Nel 1991 in Australia presso il Lago Alexandrina, alcune persone mostrarono eczema cutaneo dopo contatto con le acque contenenti tossine provenienti principalmente da *Nodularia* e *Microcystis* (23).

Elaborazione del NOAEL e del TDI

Non è stato elaborato un NOAEL per le NOD per mancanza di dati tossicologici idonei. Dal momento che il meccanismo di tossicità della MC-LR e delle NOD è molto simile, il valore guida della MC-LR potrebbe essere utilizzato anche per le NOD.

1.3.1.3. Cilindrospermopsina

Struttura chimica e proprietà

La cilindrospermopsina (CYN) appartiene alla classe degli alcaloidi guanidinici. La molecola è costituita da un gruppo guanidico triciclico combinato con idrossimetil-uracile (Figura 3). Essa è considerata una citotossina, dal momento che produce sia effetti citotossici che nefrotossici, sebbene anche altri organi (timo e polmone) possono essere danneggiati a seguito dell'esposizione alla tossina (1, 2); è considerata anche un potenziale cancerogeno (24). Somministrata per via orale può causare gastroenteriti a causa di lesioni alle pareti dell'intestino, epatiti per danni alle cellule epatiche, disfunzioni nel funzionamento dei reni per danni alle cellule renali ed emorragie per danni ai vasi sanguigni.

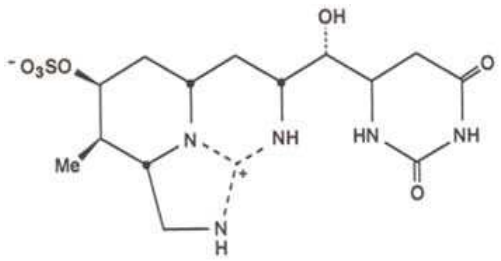

Figura 3. Struttura chimica della cilindrospermopsina

Sono state identificate otto specie di cianobatteri produttori di CYN: *Cylindrospermopsis raciborskii, Aphanizomenon ovalisporum* e *Aphanizomenon flos-aquae, Umezakia natans, Rhaphidiopsis curvata* e *Anabaena bergii, Anabaena lapponica,* e *Lygnbya wollei* (25). Tra questi *Cylindrospermopsis raciborskii* è la specie che rappresenta il problema maggiore su scala mondiale (26). La CYN è altamente idrofila; il suo assorbimento intestinale necessita di sistemi di trasporto attivo così come l'ingresso negli epatociti, utilizzando la bile come sistema di

trasporto. A causa delle ridotte dimensioni della molecola, può verificarsi una diffusione passiva, anche se limitata, attraverso la membrana cellulare, come risulta da studi *in vitro* che dimostrano gli effetti citotossici su una linea cellulare senza la presenza della bile come sistema di trasporto (27).

Tossicità

A basse dosi la CYN sopprime la sintesi proteica glutatione-coniugata, probabilmente inibendo la traduzione ribosomiale attraverso il legame ad una proteina associata con il sistema di traduzione eucariotico; ma a maggiori concentrazioni domina un processo più rapidamente tossico, metabolismo-dipendente (28,29); la sua tossicità acuta sembra essere mediata da metaboliti citocromo p 450- generati (30). Essa ha una tossicità acuta ritardata e progressiva. Il danno epatico acuto è localizzato nelle aree centro lobulari, con vacuolizzazione degli epatociti e aumentata pigmentazione dei nuclei e del citoplasma. Le principali azioni tossiche a carico dei reni si manifestano con necrosi e aumento della sezione dei tubuli prossimali e alterazione dei glomeruli. La CYN potrebbe agire anche come interferente endocrino in quanto uno studio ha evidenziato che la tossina potrebbe alterare il rapporto progesterone/estrogeni nelle donne (31). Alcuni studi su animali da laboratorio sono a favore di un possibile effetto genotossico (32) e carcinogenetico (33).

Farmacocinetica

Studi condotti su topi trattati per via intraperitoneale con 0,2 mg/kg di ^{14}C CYN hanno dimostrato che la maggior parte della radioattività era escreta nel corso delle prime 12 ore (70,9%), principalmente nelle urine (59,6% negli animali che mostravano effetti tossici e 70,5% negli animali privi di effetti tossici). L'accumulo avveniva principalmente nel fegato con picchi del 20,6 % dopo 6 ore, e in misura minore nei reni (34).

Effetti sull'uomo

L'esposizione per via orale con acqua contaminata può causare disturbi gastrointestinali con diarrea sanguinolenta, grave disidratazione con perdita di proteine, elettroliti, glucosio e chetoni con le urine. Tutti i casi di persone esposte alla CYN necessitavano di ricovero ospedaliero, dove ricevevano cure intensive con terapie per endovena.

Elaborazione del NOAEL e del TDI

Sono stati utilizzati due studi per l'elaborazione di un NOAEL/TDI. Il primo studio a 90 giorni su topi abbeverati con acqua contaminata ha prodotto un NOAEL di 150 µg/kg di peso corporeo e sulla base di tale valore è stato calcolato un TDI di 0,3 µg/kg pc/giorno usando un fattore di sicurezza di 500 (10 per la variabilità intraspecie, 10 per quella interspecie e 5 per la durata dell'esposizione inferiore alla durata della vita dell'animale). Dal TDI era ottenuto un GV di 9 µg/L avendo considerato che l'assunzione attraverso l'acqua potabile rappresenti il 100% della assunzione totale e un consumo di 2 L di acqua/giorno per una persona di 60 kg di peso (33).

Il secondo studio è stato condotto su topi trattati per gavaggio per 11 settimane, con un NOAEL di 30 µg/kg di peso corporeo e un TDI di 0,06 µg/kg pc/giorno usando un fattore di sicurezza di 500 (10 per la variabilità intraspecie, 10 per quella interspecie e 5 per la durata dell'esposizione inferiore alla durata della vita dell'animale). Dal TDI era ottenuto un GV di 1,8 µg/L avendo considerato che l'assunzione attraverso l'acqua potabile rappresenti il 100% della assunzione totale e un consumo di 2 L di acqua/giorno per una persona di 60 kg di peso (35). Alcuni autori raccomandano un ulteriore fattore 10 di sicurezza per potenziali effetti genotossici.

1.3.2. Alcaloidi

1.3.2.1. Anatossine

Struttura chimica e proprietà

L'anatossina-a (ANA-a) e l'omoanatossina-a sono alcaloidi a basso peso molecolare ad azione neurotossica. In particolare l'ANA-a è un alcaloide amminico biciclico con peso molecolare di 165 Da, un'ammina secondaria 2-acetyl-9-azabicyclo(4-2-1)non-2-ene) (36). È prodotta da *Anabaena flos-aquae*, *Anabaena* spp. (*flos-aquae-lemmermannii group*), *Anabaena planktonica*, *Oscillatoria*, *Aphanizomenon* e *Cylindrospermum*, è sintetizzata nella cellula a partire dall'amminoacido ornitina attraverso la putrescina con la partecipazione dell'enzima ornitina decarbossilasi. L'ANA-a non è suscettibile ad idrolisi enzimatica da parte della colinesterasi dal momento che non è un estere. L'omoanatossina-a (179 Da) è un analogo dell'ANA-a ed è isolata da un ceppo di *Oscillatoria formosa* (*Phormidium formosum*). Essa ha un gruppo propionilico in posizione C-2 invece del gruppo acetilico presente nell'ANA-a (1, 23). La ANA-a(s) ha una struttura chimica diversa essendo un estere fosforico della N-idrossi guanidina.

Tossicità

Meccanismo di azione

L'ANA-a è un potente agente depolarizzante pre- e postsinaptico. Si lega ai recettori dell'acetilcolina nel sistema nervoso centrale e periferico e nelle giunzioni neuromuscolari, con blocco della trasmissione dell'impulso nervoso. La morte sopraggiunge per paralisi muscolare e asfissia. Gli effetti acuti sembrano rappresentare il rischio principale per la salute umana. L'ANA-a(s) inibisce l'attività del'acetilcolinesterasi ma solo nel sistema nervoso periferico. A causa del blocco dell'idrolisi l'acetilcolina si accumula con conseguente ipereccitabilità nervosa. Il tipo di azione è simile a quello di molti organofosfati, comunemente usati come pesticidi (2, 37, 38).

Effetti sull'uomo

Non si hanno dati a disposizione sull'uomo, sebbene un recente episodio di morte accidentale di un ragazzo avvenuto negli Stati Uniti sia stato attribuito all'ANA-a a seguito di ingestione di acqua contaminata nel corso di attività ricreative.

Elaborazione del NOAEL e del TDI

I dati sono insufficienti per ottenere un NOAEL o un LOAEL e calcolare un TDI.

1.3.3. Altre tossine

1.3.3.1. Lingbiatossine

La lingbiatossina-a trovata in un ceppo di *Lyngbya majuscola* presente in acque superficiali è stata collegata alla comparsa di dermatiti e gravi infiammazioni orali e gastrointestinali nell'uomo. Inoltre può agire come promotore di tumori cutanei (39).

1.3.3.2. Aplisiatossina, debromoaplisiatossina

I sintomi caratteristici derivanti dall'avvelenamento da queste tossine consistono in disturbi intestinali e grave irritazione della bocca e della gola (39).

Bibliografia

1. Chorus I, Bartram J (Ed.). *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. London and New York: E & F.N. Spon; 1999.
2. Carmichael WW. Health effects of toxin-producing cyanobacteria:"The CyanoHabs". *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 2001;7(5):1393-407.
3. Hitzfeld BC, Höger SJ, Dietrich DR. Cyanobacterial toxins, removal during drinking water treatment, and human risk assessment, *Environment Health Perspect* 2000;108(Suppl 1):113-22.
4. Rao PV L, Gupta N, Bhaskar ASB, Jayaraj R. Toxins and bioactive compounds from cyanobacteria and their implications on human health. *Journal of Environmental Biology* 2002;23(3):215-24.
5. Ikehara T, Imamura S, Sano T, Nakashima J, Kuniyoshi K, Oshiro N, Yoshimoto M, Yasumoto T. The effect of structural variation in 21 microcystins on their inhibition of PP2A and the effect of replacing cys269 with glycine. *Toxicon* 2009;54(4):539-44.
6. IARC. *Ingested nitrates and nitrites, and cyanobacterial peptide toxins.* Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2006.
7. Grosse Y, Baan R, Straif K, Secretan B, El Ghissassi F, Cogliano V. Carcinogenicity of nitrate, nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. *The Lancet Oncology* 2006;7(8):628-9.
8. Runnegar MTC, Gerdes RG, Falconer IR. The uptake of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by isolated rat hepatocytes. *Toxicon* 1991;29(1):43-51.
9. Lambert TW, Holmes CFB, Hrudney SE. Microcystin class of toxins: health effects and safety of drinking water supplies. *Environmental Review* 1994;2(2):167-86.
10. Runnegar MTC, Falconer IR. Isolation, charachterization, and pathology of the toxinsfrom the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. In: Carmichael WW (Ed.). *The water environment: algal toxins and health*. New York: Plenum Press; 1981. p. 325-42.
11. Falconer IR, Buckley TH, Runnegar MTC. Biological half-life, organ distribution and excretion of 125I-labelled toxic peptide from blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Australian Journal of Biological Sciences* 1986;39(1):17-21.
12. Brooks WP, Codd GA. Distribution of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin and interactions with hepatic microsomes in mice. *Pharmacology and Toxicology Journal* 1987;60(3):187-191.
13. Kondo F, Matsumoto H, Yamada S, Ishikawa N, Ito E, Nagata S, Ueno Y, Suzuki M, Harada KI. Detection and identification of metabolites of microcystins formed *in vivo* in mouse and rat livers. *Chemical Research Toxicology* 1996;9(8):1355-9.
14. DeVries SE, Galey FD, Namikoshi M, Woo JC. Clinical and pathologic findings of blue-green algae (*Microcystis aeruginosa*) intoxication in a dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1993;5(3):403-8.
15. Gilroy DJ, Kauffman KW, Hall RA, Huang X, Chu FS. Assessing potential health risks from microcystin toxins in blue-green algae dietary supplements. *Environmental Health Perspect* 2000;108(5):435-9.
16. World Health Organization. *Guidelines for drinking-water quality 1998, 2nd Ed. Addendum to Volume 2 Health criteria and other supporting information*. Geneva: WHO; 1998. p. 94–110.

17. Wolf HU, Frank C, Toxicity assessment of cyanobacterial toxin mixtures. *Environmental Toxicology* 2002;17(4):395-9.

18. Rinehart KL, Harada K, Namikoshi M, Chen C, Harvis CA. Nodularin, microcystin and the configuration of Adda. *Journal of the American Chemical Society* 1988;110(25):8557-8.

19. Saito K, Konno A, Ishii H, Saito H, Nishida F, Abe T, Chen C. Nodularin- Har, a new nodularin from *Nodularia*. *Journal of Natural Products* 2001;64(1):139-41.

20. Eriksson JE, Meriluoto JA, Kujari HP, Osterlund K, Fagerlund K, Hallbom L. Preliminary characterization of a toxin isolated from the cyanobacterium *Nodularia spumigena*. *Toxicon* 1988;26(2):161-6.

21. Honkanen RE, Dukelow M, Zwiller J, Moore RE, Khatra BS, Boynton AL. Cyanobacterial nodularin is a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. *Molecular Pharmacology* 1991;40(4):577-83.

22. Ohta T, Sueoka E, Iida N, Komori A, Suganuma M, Nishiwaki R, Tatematsu M, Kim SJ, Carmichael WW, Fujiki H. Nodularin, a potent inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A, is a new environmental carcinogen in male F344 rat liver. *Cancer Research* 1994;54:6402-6.

23. Duy TN, Lam PKS, Shaw G, Connell DW. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (bluegreen algal) toxins in water. *Reviews of Environmental Contamination & Toxicology* 2000;163:113-86.

24. Humpage AR, Fenech M, Thomas P, Falconer IR. Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Mutation Research* 2000;472(1-2):155-61.

25. Pearson L, Mihali T, Moffitt MK, Kellmann R Neilan B. On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. *Marine Drugs* 2010;8(5):1650-80.

26. Neilan BA, Saker ML, Fastner J, Torokne A, Burns BP. Phylogeography of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Molecular Ecology* 2003;12(1):133-40.

27. Chong MWK, Wong BSF, Lam PKS, Shaw GR, Seawright AA. Toxicity and uptake mechanism of cylindrospermopsin and lophyrotomin in primary rat hepatocytes. *Toxicon* 2002;40(2):205-11.

28. Froscio SM, Humpage AR, Burcham PC, Falconer IR. Cell-free protein synthesis inhibition assay for the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin. *Environmental Toxicology* 2001;16(5):408-12.

29. Froscio SM, Humpage AR, Wickramasinghe W, Shaw G, Falconer IR. Interaction of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin with the eukaryotic protein synthesis system. *Toxicon* 2008;51(2):191-8.

30. Humpage AR, Fontaine F, Froscio S, Burcham P, Falconer IR. Cylindrospermopsin genotoxicity and cytotoxicity : role of cytochrome P-450 and oxidative stress. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, 2005;68(9):739-53.

31. Young FM, Micklem J, Humpage AR. Effects of blue-green algal toxin cylindrospermopsin (CYN) on human granulosa cells *in vitro*. *Reproductive Toxicology* 2008;25(3):374-380.

32. Rogers EH, Zehr RD, Gage MI, Humpage AR, Falconer IR, Marr M, Chernoff N. The cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin, induces fetal toxicity in the mouse after exposure late in gestation. *Toxicon* 2007;49(6):855-64.

33. Falconer IR, Humpage AR. Preliminary evidence for *in vivo* tumour initiation by oral administration of extracts of the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii* containing the toxin cylindrospermopsin. *Environmental Toxicology* 2001;16(2):192–195.

34. Briand JF, Jacquet S, Bernard C, Humbert JF. Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Veterinary Research* 2003;34(4):361-77.

35. Griffiths DJ, Saker ML. The palm island mystery disease 20 years on, a review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin. *Environmental Toxicology* 2002;18(2):78-93.

36. USEPA. *Creating a cyanotoxin target list for the unregulated contaminant monitoring rule*. USEPA Technical Service Center, Cincinnati, Ohio, USA, Meeting Summary May 17–18, 2001.

37. Devlin JP, Edwards OE, Gorham PR, Hunter NR, Pike RK, Stavric B. Anatoxin-a, a toxic alkaloid from *Anabaena flos-aquae* NRC-44h. *Canadian Journal of Chemistry* 1977;55(8):1367-71

38. Astrachan NB, Archer BG, Hilberlink DR. Evaluation of the subacute toxicity and teratogenicity of anatoxin-a. *Toxicon* 1980;18(5-6):684-8.

39. Osborne NJT,Webb P, Shaw GR. The toxins of *Lyngbya majuscula* and their human and ecological health effects. *Environmental International* 2001;27(5):381-92.