



Cyanotoxins: Detection methods and control measures – A mini-review (Cyanotoxines : Méthodes de détection et mesures de contrôle – Mini-revue)

**M. Douma¹, B. Sabour^{2*}, N. Manaut³, M. Hassouani²,
A. Schamel², B. Oudra¹, M. Loudiki¹**

⁽¹⁾ *Laboratory of Biology and Biotechnology of microorganisms, Department of Biology, Faculty of Sciences Semlalia, University Cadi Ayyad, P.O. Box 2390 Marrakech, Morocco.*

⁽²⁾ *Phycology Research Unit, Department of Biology, Faculty of Sciences, University Chouaib Doukkali, P.O. Box 20, El Jadida, Morocco.*

⁽³⁾ *The Regional Centre of Education and Formation Training, P.O. Box 439 Marrakech, Morocco.*

Received 21 Jun 2016, Revised 26 Sep 2016, Accepted 30 Sep 2016

*For correspondence: Email: sabour.b@ucd.ac.ma

Abstract

The presence of cyanobacterial toxins in aquatic ecosystems used for drinking water, irrigation or recreational activities, is a major risk to human and environmental health. Several cyanotoxins detection approaches have been developed by their sensitivity and selectivity. This work presents and discusses a synthesis of different analytical techniques (biological, chemical, and molecular) used scientific laboratories and surveillance programs « biomonitoring » of cyanotoxins. The reasons for selection; the advantages and limitations of each approach were briefly discussed. Particular interest was given to preventive measures to control cyanobacteria in aquatic ecosystems and water supply storage facilities as well as water treatment processes for cyanotoxin removal. This mini-review gives background and practical information not only for the scientific community but also guidance for the managers of aquatic environments and wetlands.

Keywords: Cyanotoxins, bioassays, physicochemical methods, Molecular techniques, control.

Résumé

La présence des cyanotoxines dans les eaux utilisées pour l'alimentation en eau potable, l'irrigation ou les activités récréatives, constitue un risque majeur pour la santé humaine et environnementale. Plusieurs approches de détection des cyanotoxines ont été développées par leur degré de sensibilité et sélectivité. Ce travail présente une synthèse de différentes techniques d'analyses (biologiques, physicochimiques, et moléculaires) utilisées dans les laboratoires scientifiques et dans les programmes de surveillance « biomonitoring » des cyanotoxines. Les raisons de choix ; les avantages et les limites de chaque approche ont été brièvement discutées. Un intérêt particulier a été accordé aussi aux différentes mesures d'interventions pour le contrôle des proliférations de cyanobactéries toxiques au niveau des écosystèmes aquatiques infectés, et à travers les filières de traitement des eaux contaminées par les cyanotoxines. Cette mini-revue donne des informations générales et pratiques non seulement pour la communauté scientifique, mais aussi des conseils pour les gestionnaires des milieux aquatiques et des zones humides.

Mots-clés : Cyanotoxines, bioessais, méthodes physicochimiques, techniques Moléculaires, contrôle.

1. Introduction

Les Cyanobactéries occupent une place prépondérante au sein de la grande communauté microbienne procaryotique. Outre leurs intérêts écologiques et biotechnologiques [1], ces micro-organismes sont connus par leur implication dans des proliférations massives et remarquables dans les eaux aquatiques formant souvent des efflorescences ou blooms toxiques [2] (Figure 1). Ce phénomène est généralement le résultat d'une eutrophisation accélérée.

Selon la taxonomie botanique, les cyanobactéries appartiennent toutes à la classe des cyanophycées qui est divisée en quatre ordres (Chroococcales, Nostocales, Oscillatoriales, Stigonématales), eux-mêmes divisés en familles regroupant environ 150 genres et 2500 espèces [3]. La structure morphologique des cyanobactéries est très variée, on rencontre des formes unicellulaires solitaires coccoïdes ou coloniales, filamenteuses avec ou sans ramification ou encore avec ou sans cellules différenciées (Figure 2). Plus de 100 espèces de Cyanobactéries ont été évaluées comme toxiques, appartenant à 40 genres dont les plus rencontrés sont : *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya*, *Microcystis*, *Nostoc*, *Nodularia* et *Oscillatoria* [4]. La plupart d'entre elles sont planctoniques et capables de former des efflorescences algales. Parmi ces genres, *Microcystis* est le plus incriminé dans la formation des blooms toxiques [5].



Bloom à *Microcystis*,
Lac Waterloo, Québec, Septembre 2007



Bloom à *Aphanizomenon*/*Microcystis*,
Lac Roxton, Québec, Septembre 2007



Bloom à *Microcystis*,
Lac Oued Mellah, Maroc, Juin 1999



Bloom à *Microcystis*,
Lac Lalla Takerkoust, Maroc, Aout 2005

Figure 1 : Exemples de proliférations cyanobactériennes (Photos : B. Sabour).

Les cyanobactéries toxiques produisent diverses variantes de toxines, nommées "Cyanotoxines" qualifiées d'ailleurs comme des métabolites secondaires. Les Cyanotoxines sont essentiellement des endotoxines qui peuvent être subdivisées en deux catégories : les biotoxines et les cytotoxines. Les premières sont ainsi nommées parce que leur activité toxique est testée sur l'animal entier (souris ou invertébrés aquatiques), alors que les cytotoxines ont une activité cytotoxique sur des cultures de cellules. Parmi cette catégorie nous citons : les Anabaenopeptines, les Microviridines, les Acutiphycines et les Tantazoles [6].

Les biotoxines sont les plus étudiées vu les risques qu'elles posent sur la santé publique. Nous distinguons principalement deux grands groupes : les neurotoxines et les hépatotoxines [7]. Les hépatotoxines (Microcystines et nodularines) sont les plus rencontrées dans les blooms toxiques, aussi bien dans les eaux douces que saumâtres [8]. A ceux-là s'ajoutent des produits irritants (dermatotoxines) et allergiques, dont les plus connus sont les lipopolysaccharides [9]. La figure 3 montre les structure chimiques des types de toxines les plus fréquents.

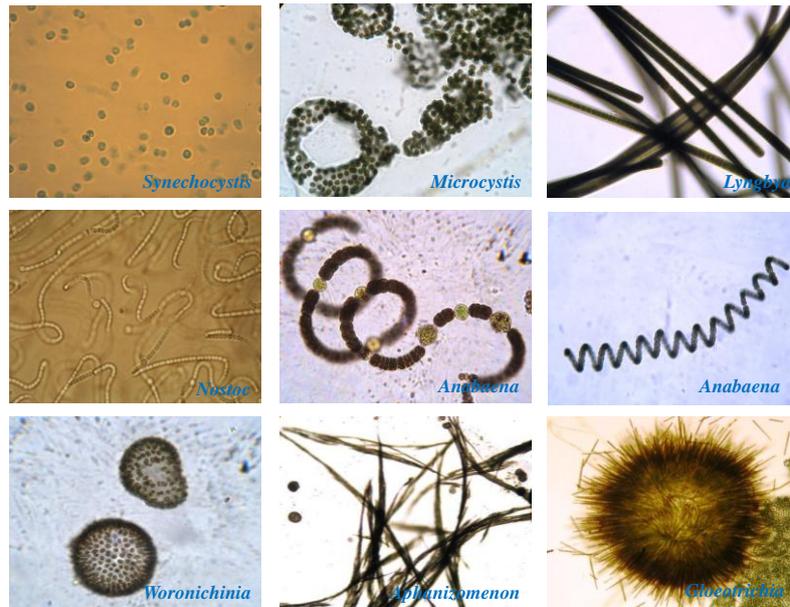


Figure 2 : Diversité morphologique des cyanobactéries (Photos : B. Sabour).

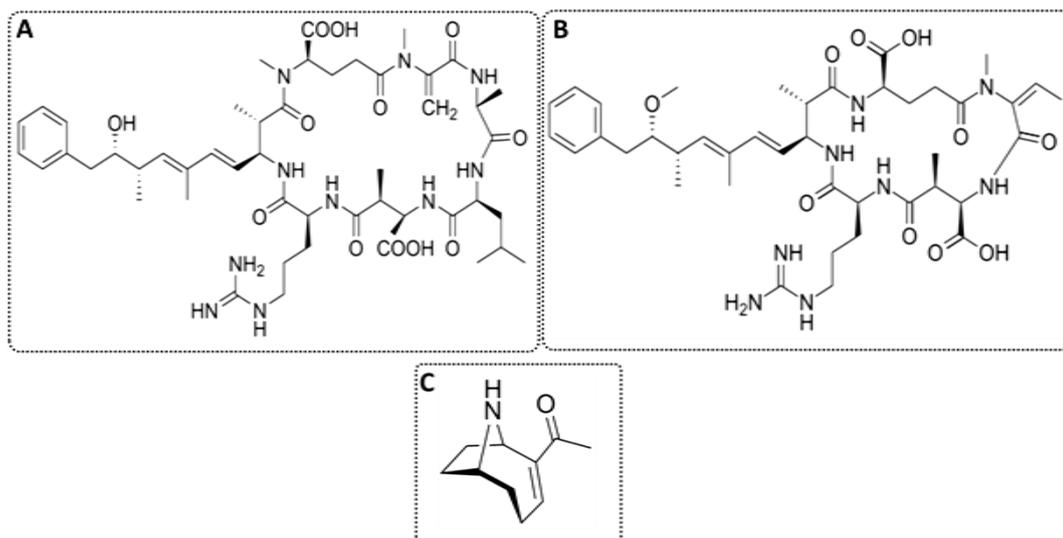


Figure 3 : Structures chimiques générales de la microcystine (A), la nodularine (B) et une neurotoxine (Anatoxine) (C) [6,10].

L'apparition des blooms à Cyanobactéries toxiques dans les écosystèmes aquatiques utilisées pour l'alimentation en eau potable, l'irrigation ou les activités récréatives, constitue un risque direct pour la santé humaine et animale après le contact ou l'ingestion d'une eau contaminée [11], ou indirect via la consommation de la faune piscicole ou bien des produits agricoles irrigués par ces eaux [12,13, 14, 15].

La prolifération des Cyanobactéries pour de longues durées produit également des effets néfastes sur la qualité esthétique de l'eau, notamment par le changement de sa couleur et le dégagement des mauvaises odeurs dues à la diminution de l'oxygène, à la libération de l'ammoniac après décomposition des Cyanobactéries, et à la mort des poissons et du zooplancton [2]. Ceci oblige les gestionnaires de traitement des eaux à utiliser des moyens efficaces pour diminuer les biomasses et éliminer les concentrations en toxines dans l'eau.

De par le monde, la communauté scientifique et managériale des eaux ne cesse d'adapter et développer des méthodes biologiques, physicochimiques et moléculaires pour l'identification, la détection et le biomonitoring des Cyanobactéries. Aujourd'hui, Les méthodes d'analyse utilisées dans le biomonitoring des toxines de Cyanobactéries se différencient par leur degré de sensibilité et de sélectivité (capacité d'identifier les types et le

taux de toxines). Toutefois, le type de méthode sélectionnée doit tenir compte du coût, de la logistique, de la rapidité à évaluer le risque et du type de l'information recherchée.

2. Cyanotoxines et biomonitoring : Tests et techniques d'analyses

2.1. Tests biologiques

Les bioessais utilisés comme des tests de toxicité permettent l'établissement d'un diagnostic simple et rapide des échantillons, basé sur l'évaluation globale de la toxicité et de leurs effets.

2.1.1. Biotest souris

Le biotest souris est l'approche la plus ancienne pour déterminer la toxicité des échantillons de Cyanobactéries. Les extraits de toxines sont administrés par voie intrapéritonéale. Ce test permet la quantification globale de la toxicité (DL_{50} ; dose létale de 50% des animaux testés) et la détermination du type de toxicité (neurotoxicité ou hépatotoxicité) déduite d'après les réponses et les symptômes remarqués. Dans ce sens, les hépatotoxines peptidiques (microcystines et nodularines) causent généralement la mort dans les 4 heures avec des symptômes d'engorgement du sang dans le foie. Les neurotoxines peuvent entraîner la mort beaucoup plus rapidement (dans les 15 minutes) avec des symptômes neuromusculaires [16]. Toutefois, le test souris est beaucoup moins sensible pour les échantillons à faibles concentrations en toxines. Une autre limite réside dans l'éthique d'utilisation des animaux comme substrats de biotests, surtout avec le nombre élevé de souris utilisées [17].

2.1.2. Biotest *Artemia*

Un test alternatif simple et peu coûteux est le biotest *Artemia*. Il est largement utilisé et il ne nécessite que peu d'expertise. Ce test montre des réponses plus fiables et significatives pour les hépatotoxines que le test souris [18, 19]. Les Artémies sont exposées aux différentes concentrations de l'extrait de l'échantillon à tester. La durée d'exposition est de 18h à 45h. La toxicité est exprimée en CL_{50} (concentration de l'échantillon qui a causé 50% de mortalité). Ce test biologique reste moins spécifique car il peut être fortement influencé par d'autres composés antibiotiques de l'échantillon testé.

2.1.3. Autres Biotests

D'autres biotests ont été utilisés chez les invertébrés : *Daphnia pulex*, *Drosophila melanogaster* [20, 21], les larves de moustiques [22], le crustacé *Thamnocephalus platyurus*, des plantes : *Sinapis alba* [23], *Lepidium sativum* [24] ou des cellules animales en cultures: hypatocytes ou erythrocytes [20]. Ces tests, bien qu'ils aient montré une capacité de détecter la présence de cyanotoxines, ils ne sont pas encore normalisés pour une large utilisation dans les monitorings routiniers.

2.2. Tests biochimique et immunologique

2.2.1. Tests d'inhibitions enzymatiques (PP1, PP2A)

Les méthodes biochimiques ont exploité les propriétés des toxines dans l'inhibition de certaines protéines phosphatases (PP). Les dosages sont aussi sensibles, rapides et accessibles en raison de la disponibilité commerciale des enzymes. Deux types d'enzymes ont été couramment utilisées : PP1 (Protéine Phosphatase Type 1) et PP2A (Protéine Phosphatase Type 2A). La réaction de la microcystine avec PP1 est environ 50 fois moins sensible que celle de PP2A [25]. L'activité de la phosphatase est mesurée soit par un test radiochimique, soit par un test colorimétrique. La méthode colorimétrique est basée sur l'utilisation du para-nitrophénylphosphate (PNPP), composé incolore, qui après déphosphorylation par diverses phosphatases libère le para-nitrophénol, composé coloré absorbant à 405 nm. Récemment, des substrats fluorescents ont été utilisés dans le but d'améliorer la sensibilité du test d'inhibition de PP2A permettant ainsi la détection de quantités très faibles en microcystines de l'ordre du picogramme [25].

2.2.2. Test ELISA (Enzyme-Linked diverse ImmunoSorbent Assays)

Actuellement, les méthodes de détection des microcystines les plus prometteuses impliquent l'utilisation des anticorps convenables aux réactions avec les microcystines. Les tests immunoenzymatiques ELISA utilisent des anticorps polyclonaux anti-microcystine-LR ou monoclonaux permettant l'évaluation du contenu total en microcystines dans les échantillons. Cette méthode destinée à analyser une seule toxine, comme la microcystine-LR ou la nodularine, présente des problèmes de réactivité croisée avec des métabolites, des adduits (liaisons covalentes) à des protéines ou d'autres toxines congénères [26, 27].

2.3. Techniques Physicochimiques

2.3.1. HPLC

L'HPLC permet la séparation des cyanotoxines. Les microcystines, les nodularines, les cylindrospermopsines, de même que les anatoxines ou les saxitoxines, sont des composés peu volatiles. Par conséquent, la chromatographie en phase liquide à polarité de phase inversée suivie d'une détection en UV est largement utilisée [28]. L'échantillon à séparer (soluté) est mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans la colonne chromatographique. La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié, les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.

L'utilisation d'un détecteur à barrette de diode permet de déterminer la présence des toxines ainsi que leur nature par comparaison à des spectres d'absorption lorsque l'on dispose de standards. La plupart des microcystines et des nodularines ont un spectre d'absorption maximum à 238 nm [29]. L'HPLC-PDA (*Chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrette de diode*) est aujourd'hui la technique analytique la plus efficace par rapport aux autres utilisées dans le biomonitoring des eaux [30].

2.3.2. LC-SM (*Chromatographie liquide couplée à la Spectrométrie de Masse*)

La spectrométrie de masse couplée aux différentes techniques, telle la chromatographie liquide, permet l'identification et la confirmation de la présence des cyanotoxines dans des échantillons d'algues et d'eau [31]. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). En fait, le spectromètre de masse comporte une source d'ionisation suivie d'un ou plusieurs analyseurs qui séparent les ions produits selon leur rapport m/z , d'un détecteur qui compte les ions et amplifie le signal, et enfin d'un système informatique pour traiter le signal. Le résultat obtenu est un spectre de masse représentant les rapports m/z des ions détectés ainsi que leur abondance relative [32].

2.4. Techniques Moléculaires

Avec le développement des méthodes de détection et de caractérisation des acides nucléiques, comme l'extraction, l'hybridation, le séquençage de l'ADN, et l'amplification *in vitro*, de nouvelles approches moléculaires de monitoring environnemental des Cyanobactéries ont été émergées [33].

2.4.1. PCR (*Réaction en chaîne par polymérase*)

La PCR constitue un moyen efficace pour caractériser les génotypes toxiques ou non, utilisés dans le monitoring des Cyanobactéries toxiques. L'amplification se fait par utilisation des amorces spécifiques capables d'amplifier dans une région (séquence partielle) d'un gène ou séparément dans plusieurs gènes [34]. Si l'amplification utilise simultanément plusieurs amorces en mixture, la réaction PCR est qualifiée de multiplex [35].

Les microcystines sont des heptapeptides biosynthétisées par voie non ribosomale en faisant intervenir un complexe enzymatique multifonctionnel. Elles sont codées par un groupe de gènes spécifiques dits *mcy* [34]. Les gènes *mcy* de *Microcystis* sont organisés en un cluster (groupe de gènes) à deux opérons dont la transcription se fait en deux directions opposées (Figure 4): le premier inclut les gènes à NRPS (Nonribosomal Peptide Synthetase) (*mcyA*, *mcyB* et *mcyC*), et l'autre contient le gène à PKS (Polyketide Synthase) (*mcyD*). Deux gènes hybrides (*mcyE* et *mcyG*) correspondent aux NRPS et PKS. Par ailleurs, les gènes *mcyF*, *mcyH*, *mcyI*, *mcyJ* impliqués dans la synthèse de microcystines utilisent des modules accessoires (Tailoring Enzyme, ABC Transporter) autres que ceux de NRPS et PKS [34, 35].

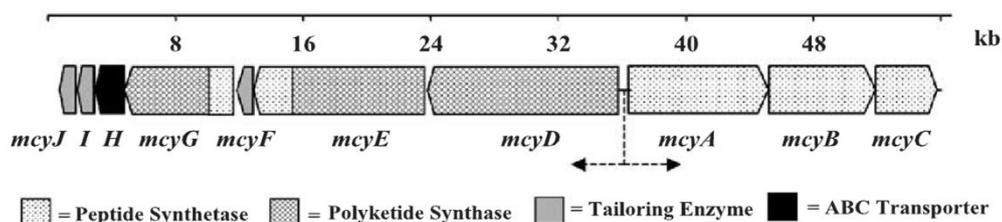


Figure 4 : Modèle d'organisation de clusters de gènes codant pour la biosynthèse des Microcystines chez *Microcystis* [34].

2.4.2. RAPD (*Amplification aléatoire d'ADN polymorphe*)

La technique RAPD (de l'anglais random amplification of polymorphic DNA), couplée à une PCR, a été employée pour l'identité taxinomique des organismes au niveau de la souche [36]. Les amorces utilisées s'hybrident aléatoirement avec des fragments de l'ADN testé. L'analyse par électrophorèse des fragments amplifiés donnera un profil particulier, caractéristique de l'ADN de départ. Cette technique est sensible et spécifique, car l'ensemble du génome d'un organisme est utilisé comme base pour la production du profil de l'ADN [37].

2.4.3. RFLP (*Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction*)

La technique RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), relativement simple et rapide, a été appliquée pour l'identité taxinomique et toxigénique des Cyanobactéries [36]. Elle utilise une enzyme de restriction découpant le génome en plusieurs parties dépendant du nombre de sites de restriction présents pour l'enzyme utilisée. Le nombre de ces sites et leur position diffèrent en fonction de l'individu. Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction permet de réaliser une empreinte génétique grâce à cette méthode. Il permet ainsi de différencier deux individus. Lorsque deux individus homozygotes sont comparés, suite à une digestion enzymatique et une hybridation de leur ADN avec une sonde donnée, des profils d'électrophorèse différents des sites de restriction sont obtenus.

3. Cyanobactéries toxiques : contrôle et moyens de lutte

La prolifération des Cyanobactéries toxiques dans un hydrosystème, utilisé dans l'approvisionnement en eau potable ou pour d'autres activités récréatives ou agricoles, pose un sérieux problème pour la santé humaine et environnementale [38, 39 ; 19, 40]. Les procédés de traitement de l'eau contaminée par les cyanotoxines doivent être renforcés par d'autres mesures préalables intégrant des interventions directes et/ou indirectes. L'intervention indirecte consiste en général à mettre en place des actions préventives au niveau de l'hydrosystème. Ces actions visent le contrôle des facteurs déterminants de l'eutrophisation via la maîtrise des paramètres qui régulent la croissance des Cyanobactéries. Les actions directes correspondent à des techniques qui minimisent le transfert des blooms de Cyanobactéries aux systèmes d'approvisionnement en eau potable (station de traitement..) (Tableau 1).

Tableau 1. Options d'intervention pour le contrôle des Cyanobactéries dans les réservoirs d'eau.

Type d'intervention	Options
Contrôle physique	
- Réduire la contamination des zones d'approvisionnement	- Elimination sélective : choix de la profondeur de prise d'eau, utilisation de barrières flottantes
- Limiter l'accès à la lumière	- Brassage, destratification, couverture des lieux de stockage
- Réduire le taux de croissance	- Dilution pour diminuer le taux de séjour de l'eau
Contrôle des nutriments	
- Apport externe	- Gestion en amont des bassins versants
- Actions au niveau du réservoir	- Décantation des nutriments
- Apport local	- Techniques d'élimination du sédiment : dragage, aération et brassage, oxygénation hypolimnitique, chélation du phosphore par l'alun, la chaux, le sulfate ferrique,...
Contrôle chimique	
- Algicides	- Produits à base de cuivre, coagulants (e.g. chaux), chlore, peroxyde d'hydrogène
Contrôle biologique	
- Biomanipulation	- Elimination des poissons zooplanctonophages et encouragements des poissons phytoplanctonophages, introduction des macrophytes,...

Par ailleurs, les cyanotoxines peuvent être éliminées à travers les filières de traitement, selon la charge de l'eau, en combinant un ou plusieurs procédés: 1) Préoxydation par un agent chloré ou par l'ozone, souvent comme étape d'optimisation de la coagulation. 2) Clarification, par procédés de coagulation-floculation, décantation, flottation, filtration rapide (dégrossissage sur biolites...) ou filtration lente sur sable. 3) Oxydation par l'ozone ou le chlore afin de dégrader la matière organique. 4) Filtration sur charbon actif afin d'adsorber la matière organique dissoute. 5) Désinfection finale, pour l'élimination des organismes pathogènes, par des agents chlorés, l'ozone, l'utilisation d'ultraviolets ou par des procédés physiques comme la filtration sur membranes. Les traitements qui se sont révélés très efficaces pour l'élimination des cyanotoxines sont l'utilisation du charbon actif et l'ozonation. D'autres traitements comme l'irradiation UV et les couplages ozonation-filtration par le charbon actif en grain et flottation-ozonation [28] ont donné de bons résultats pour la dégradation des microcystines. La microfiltration et l'ultrafiltration sur membranes sont également très efficaces pour éliminer les Cyanobactéries et les cyanotoxines.

Conclusion

Cette synthèse bibliographique montre la diversité des méthodes de détection et de biomonitoring des cyanotoxines. Le choix du mode de biomonitoring approprié et efficace passe par un très bon diagnostic préalable et ceci ne peut se faire que via une connaissance profonde des principes, avantages et limites des techniques d'analyse. Les méthodes d'analyse utilisées dans le biomonitoring des toxines de Cyanobactéries dans les écosystèmes aquatiques se différencient par leur degré de sensibilité et de sélectivité (capacité d'identifier les types et le taux de toxines). Toutefois, le type de méthode sélectionnée doit tenir compte du coût, de la logistique, de la rapidité à évaluer le risque, et du type de l'information recherchée. Une bonne maîtrise des modalités d'intervention pour la lutte contre la présence des cyanobactéries toxiques dans l'environnement aquatique demande une meilleure connaissance des spécificités et particularités des cyanobactéries et cyanotoxines.

References

1. Berry J.P., Gantar M., Perez M. H., Berry G., Noriega F.G., *Mar. Drugs*. 6 (2008) 117.
2. Falconer I. R., *Lakes Reserv. Res. Manag.* 7(2002) 136.
3. Komarek J., And Anagnostidis K. Cyanoprokaryota, 2. Teil Oscillatoriales. Heidelberg: Süßwasserflora von Mitteleuropa, Elsevier Spektrum, (2005).
4. Jayatissa L.P., Silva E.I.L., Mcelhiney J., Lawton L.A., *Syst Appl. Microbiol.* 29 (2006) 156.
5. Carmichael W.W., *In Toxic Microcystis* (1996) 1.
6. Carmichael W.W., *Adv. Bot. Res.* 27 (1997) 211.
7. Carmichael W.W., *Sc. Amer.* 270 (1994) 78.
8. Msagati, T. A. M., Siame B. A., and Shushu D. D., *Aquat. Toxicol.* 78 (2006) 382.
9. Rapala J., Lahti K., Rasanen L. A., Esala A.-L., Niemela S. I., and Sivonen K., *Water Res.* 36 (2002) 2627.
10. Skulberg O.M., Carmichael W.W., Anderson R.A., Matsunaga S., Moore R.E., Skulberg R., *Environ. Toxicol. Chem.* 11 (1992) 321.
11. Wiegand C., and Pflugmacher S., *Tox. Appl. Pharmacol.* 203 (2005) 201.
12. De Figueiredo D. R., Azeiteiro U. M., Esteves S. M., Gonçalves F. J.M., Pereira M., *J. Ecotoxicol. Environ. Saf.* 59 (2004) 151.
13. Codd G.A., Morrison L.F., Metcalf J. S., *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203 (2005) 264.
14. Stewart I., Carmichael W.W., Backer L.C., Fleming L.E., Shaw G.R. Recreational Exposure to Cyanobacteria. In: *Encyclopedia of Environmental Health*. Burlington VT: Elsevier Science Publishers 4 (2013) 776.
15. Lahrouni M., Oufdou Kh., Oudra B., *J. Mater. Environ. Sci.* 6 (2015) 2986.
16. Falconer I.R., *Phycol.* 35 (1996) 6.
17. Falconer I.R., Algal toxins and human health. In: *The Handbook of Environmental Chemistry 5C* (1998) 54.
18. Kiviranta J., Sivonen K., Niemela S.I., *Environ. Toxicol. Wat. Qual.* 6 (1991) 423.
19. Douma M., Ouahid Y., del Campo F. F., Loudiki M., Mouhri Kh., Oudra B., *Environ. Monit. Asses.* 160 (2010) 439.
20. Dow C.S., Swoboda U. K., Cyanotoxins. In: *The ecology of Cyanobacteria, their diversity in time and space*. Kluwer Academic Publishers (2000) 613.

21. Ferrao-Filhoa A.D., Soares M.C.S., Magalhaes V.D., and Azevedo S.M.F.O. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72 (2009) 479.
22. Turell MJ., And Middlebrook J.L., *Toxicon* 26 (1988) 1089.
23. Rapala J., and Lahti K., Methods for detection of cyanobacterial toxins. In: Detection methods for algae, protozoa and helminths in fresh and drinking water. Wiley Publishers, (2002) 108.
24. Gehringer M.M., Kewada V., Coates N., Downing T.G., *Toxicon* 41 (2003) 871.
25. Bouaïcha N., Maatouk I., Vincent G., Levi Y., *Food and Chem. Toxicol.* 40 (2002) 1677.
26. Metcalf J.S., Bell S.G., Codd G.A., *Water Res.* 34 (2000) 2761.
27. Pyo D., Lee J., and Choi E., *Microchem. J.* 80 (2005) 165.
28. Tsuji K., Watanuki T., Kondo F., Watanabe M.F., Suzuki S., Nakazawa H., Suzuki M., Uchida H., Harada K. I., *Toxicon.* 33 (1995) 1619.
29. Lawton L.A., Edwards C., Codd G.A., *Analyst.* 119 (1994) 1525.
30. Clark S., and Smith D. W., *J. Environ. Eng. Sci.* 3 (2004) 155.
31. Sirén H., Jussila M., Liu H., Peltoniemi S., Sivonen K., Riekkola M.L., *J. of Chromat.* 839 (1999) 203.
32. Diehnelt C.W, Peterman S.M and Budde W.L., *Trend Anal. Chem.*, 24 (2005) 622.
33. Pearson L.A and Neilan B.A., *Curr. Opin. Biotech.* 19 (2008) 281.
34. Oberholster P.J., Botha A.M., Cloete T.E., *Lak. Res. Manage.* 11(2006) 111.
35. Dittmann E., Börner T., *Toxicol. Appl. Pharm.* 203 (2005) 192.
36. Neilan B. A., *Environ. Microbiol.*, 61 (1995) 2286.
37. Oberholster P. J., Botha A-M., and Grobbelaar J. U., *Afr. J. Biotechnol.* 3 (2004)159.
38. Oudra B., Loudiki M., Sbiyyaa B., Martins R., Vasconcelos V., and Namikoshi M., *Toxicon*, 39 (2001) 1375.
39. Douma M., Loudiki M., Oudra B., Mouhri K., Ouahid Y., and del Campo F. F. *J. Wat. Sc.* 22 (2009) 435.
40. Arash Z., Sherri L. M., Yan F., Natasha M., Sarah D., Sébastien S., Michèle P. *Wat. Res.* 46 (2012) 1511.

(2016) ; <http://www.jmaterenvirosci.com>