



Doctorat ParisTech

THESE

Pour obtenir le grade de docteur délivré par

**L'Institut des Sciences et Industries du  
Vivant et de l'Environnement  
(AgroParisTech)**

**Spécialité : écotoxicologie**

*présentée et soutenue publiquement par*

**Sylvain CORBEL**

le 14 novembre 2014

**Caractérisation des mécanismes de contamination de la  
tomate *Solanum lycopersicum* var. MicroTom par des  
cyanotoxines de type microcystine sur un système sol-plante  
et risques sanitaires associés**

Jury :

**Claire Chenu**, Professeur, AgroParisTech (Présidente)

**Vitor Vasconcelos**, Professeur, Université de Porto (Rapporteur)

**Muriel Raveton**, Maître de Conférences, Université Joseph Fourier-Grenoble (Rapporteur)

**Nathalie Demont-Caulet**, Maître de Conférences, Université Paris Diderot (Examinatrice)

**Noureddine Bouaïcha**, Maître de Conférences, Université Paris-Sud (Co-directeur de thèse)

**Christian Mougin**, Directeur de Recherche, INRA Versailles (Co-directeur de thèse)



**Remerciements**

Je remercie sincèrement Muriel Raveton et Vitor Vascancelos, rapporteurs de cette étude, ainsi que Claire Chenu et Nathalie Demont-Caulet, pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Ce projet, s'inscrivant dans un Domaine d'Intérêt Majeur (DIM) Agrosociétés, Ecologie des Territoires et Alimentation (ASTREA), a été financé par la Région Ile-de-France. J'en profite donc pour remercier toutes les personnes qui animent activement ce DIM notamment au travers des journées des doctorants et post-doctorants. Je pense tout particulièrement à Palmira de Carvalho, Sabine Riou et Christine Aubry.

J'en profite aussi pour remercier l'unité Physico-chimie et Ecotoxicologie des Sols d'Agrosystèmes Contaminés (PESSAC) et le laboratoire d'Ecologie Systématique et Evolution (ESE) pour m'avoir accueilli et avoir permis de réaliser l'ensemble des expérimentations tout au long de ces trois années.

Ce travail est aussi le résultat d'un suivi indéniable de la part de Christian Mougin et Nouredine Bouaïcha. Beaucoup de discussions et de réunions ont été nécessaires pour pouvoir rendre ce projet fertile dans une unité, PESSAC, où la plante était peu présente. Sans oublier ces cyanobactéries et leur cortège de toxines, également toutes nouvelles à PESSAC. Mais, en parlant de fertilité, rassurez-vous les plants de tomates ont su dépasser la phase de reproduction et donner de jolies petites tomates ...

Avec toutes ces « nouveautés » dans un projet qui tout compte fait s'est déroulé très rapidement, il m'est apparu indispensable de m'entourer de plusieurs scientifiques disposant de compétences très diverses, notamment pour la composition de mon comité de pilotage. Je pense notamment à François Laurent, pour tout ce qui concernait les plantes, Fabrice Martin-Laurent, pour la microbiologie des sols. Je n'oublie pas non plus la gente féminine avec Marie-Chantal Canivenc, plus spécialisée dans l'expérimentation animale. On n'aura pas été jusque-là mais c'est avec grand plaisir que j'ai pu échanger avec toi.

Je pense également à tous les autres collègues de PESSAC et de BIOGER qui ont su me guider au mieux au cours de ces trois années : Olivier Crouzet, Folkert van Oort, Isabelle Lamy et Jean-Marc Pradier notamment au travers des choix que j'ai dû effectuer. J'ai aussi une pensée toute particulière pour l'équipe de chimie de l'unité. Si cela n'était pas forcément prévu initialement Sylvie et Ghislaine ont su m'accueillir, me guider, m'expliquer quelques rudiments de chimie, au novice que j'étais. Merci à vous tous.

Je tiens également à remercier l'école doctorale ABIES qui propose des formations indispensables aux jeunes doctorants. Notamment les personnes en charge de l'organisation de ces formations, Irina Vassileva et Aline Gheysens ainsi qu'aux formateurs et en particulier Donald White et Eric Birlouez, dévoués et débordants de motivation. J'ai en particulier bénéficié énormément d'aide de la part de Donald. La langue de Shakespeare est loin d'être « ma tasse de thea », j'ai beaucoup appris en sa présence et j'espère rencontrer des formateurs tout aussi compétents pour combler mes lacunes. Quant aux futurs doctorants d'ABIES, j'espère que malgré le départ en retraite de Donald, ils auront la chance de côtoyer un formateur de sa trempe ...

Vous avez été nombreux à m'aider dans mes différentes expérimentations que ce soit au travers des conseils, de l'aide continue pendant ces (trop) longues manipulations mais aussi en vous dévouant pour m'aider lors des fins de manipulations, où les journées n'étaient plus assez longues. Je pense notamment à Christelle Marraud, Virginie Grondin, Ghislaine Delarue, Jessica Le Golvan, Françoise Poiroux, Nathalie Cheviron, Amélie Trouvé, Jean-Pierre de l'unité Pessac. Je n'oublie pas non plus l'aide de Jean-Pascal Meunier et Lilian Dahuron de l'Institut Jean-Pierre Bougin sur le site de l'INRA de Versailles qui nous ont permis de cultiver les tomates en toutes circonstances. Et il y a aussi les personnes très accueillantes de l'INRA de Dijon, Agroécologie notamment Jérémie Beguet et David Bru qui ont collaboré à ce travail. Enfin je tenais à remercier Valérie Bergheaud et Valérie Dumeny, de l'unité Environnement et Grandes Cultures (EGC) de l'INRA de Grignon pour leur aide, ainsi que tous ceux qui ont pu, à un moment, ou à un autre, participer à ces travaux et que j'aurai malencontreusement oubliés.

Enfin, merci pour le soutien et la bonne humeur de l'ensemble des collègues du bureau, Benjamin, Elodie, Léa, Kévin, Thérèse, Marine, Francesca, Gaël, Muhamad ...

J'en profite également pour remercier tous mes amis et collègues « galériens » de thèse issus de Besançon, François et Rémi. Il est tellement réconfortant de pouvoir se dire : « je ne suis pas le seul dans ce cas », à la seule différence que je devais être le seul à avoir soutenu ne pas vouloir faire de thèse en master 2 et maintenant la Soutenance se rapproche... A ce sujet, je tiens à remercier Badr Allaoui-Sossé et Mohamed, encadrants de stage de mon master 2, sans qui « je ne me serais sûrement pas lancé dans ce long projet ».

Enfin et par ce que ce sont sûrement vous qui avez le plus souvent enduré mon caractère morose et mes nombreux moments de doutes, je tiens à remercier tout particulièrement mes proches et en particulier Adeline, ma femme, toujours présente et à l'écoute. Et aussi Merci à mes parents et grands-parents qui m'avez porté et soutenu tout au long de mes études, et qui malgré tout avez essayé « de raccrocher les wagons » lorsque j'abordais mon sujet de thèse  
....



# Table des matières

Remerciements .....	III
Table des matières .....	VII
Glossaire des abréviations .....	XI
Liste des figures .....	XIII
Liste des tableaux .....	XVII
Introduction Générale .....	1
Contexte .....	1
Objectifs et structuration du mémoire.....	4
<b>Chapitre 1 : Etude Bibliographique</b>	
<b>Cyanobacterial toxins: Modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops – Revue bibliographique.....</b>	<b>9</b>
Résumé.....	11
Abstract: .....	12
1.1. Introduction .....	13
1.2. Cyanotoxins and their producers .....	15
1.3. Modes of actions in humans and mammals and occurrence of target biomolecules in vegetable organisms .....	19
1.3.1. Neurotoxins.....	19
1.3.2. Hepatotoxins .....	20
1.3.3. Cytotoxins.....	22
1.4. Environmental concentrations of cyanotoxins in freshwaters and fate in aquatic and soil ecosystems.....	22
1.4.1. Environmental concentrations of cyanotoxins.....	22
1.4.2. Fate in aquatic and soil ecosystems .....	26
1.5. Phytotoxicity effects of cyanotoxins .....	34
1.5.1. Neurotoxins.....	34
1.5.2. Hepatotoxins .....	35
1.5.3. Cytotoxic alkaloids.....	38
1.6. Bioaccumulation of cyanotoxins in vegetable foods and consequences on animals and human health.....	39
1.7. Conclusion and future directions .....	41
<b>Chapitre 2 : Matériels et Méthodes.....</b>	<b>43</b>
2.1. Matériels .....	45
2.1.1. Cyanobactéries, souche <i>Microcystis aeruginosa</i> (PCC 7820).....	45
2.1.2. Sol utilisé pour l'ensemble des expérimentations.....	45
2.1.3. Semences végétales utilisées .....	47
2.2. Méthodes .....	48
2.2.1. Cultures de <i>Microcystis aeruginosa</i> en milieu liquide.....	48
2.2.2. Extraction des microcystines de cyanobactéries.....	49
2.2.3. Suivi de la croissance de <i>Microcystis aeruginosa</i> en milieu liquide .....	49
2.2.4. Quantification des microcystines par test d'inhibition de la protéine phosphatase de type 2A .....	51
2.2.5. Suivi de la dynamique de biosynthèse des toxines de cyanobactéries .....	52

2.2.6. Identification des microcystines par analyse en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse.....	52
2.2.7. Bio-synthèse des microcystines radioactives marquées au carbone 14 .....	53
2.2.8. Purification de la MC-LR radiomarquée ( <sup>14</sup> C-MC-LR).....	55
2.2.9. Test de luminescence de bactéries <i>Vibrio fischeri</i> .....	56
2.2.10. Prélèvement et préparation des microcosmes de sol.....	57
2.2.11. Conditions expérimentales de culture et d'exposition en sol .....	57
2.2.12. Analyses effectuées sur le sol.....	59
a/ Activités enzymatiques.....	59
b/ Nitrification potentielle .....	60
c/ Extraction de l'ADN des sols et analyse par q-PCR en temps réel .....	61
d/ Extraction, identification et dosage des microcystines des échantillons de sols exposés pendant 90 jours .....	62
e/ « Devenir » de la MC-LR radiomarquée dans le sol.....	64
2.2.13. Préparation et conservation des échantillons de plantes .....	66
2.2.14. Analyses effectuées sur les plantes .....	66
a/ Tests et mesures de paramètres de développement et de croissance .....	66
i. Tests de germination sur différentes semences .....	66
ii. Tests de croissance des MicroTom sur sol contaminé.....	67
iii. Suivi du développement phénologique des plants de MicroTom pendant 90 jours .....	67
b/ Mesures de paramètres écophysiologicals sur les plants de tomates exposés pendant 90 jours.....	68
i. Fluorescence chlorophyllienne.....	68
ii. Concentrations en chlorophylles <i>a</i> et <i>b</i> .....	70
iii. Esters méthyliques d'acides gras contenus dans les feuilles.....	70
c/ Extraction et dosages des cyanotoxines absorbées par les tomates exposées pendant 90 jours à l'extrait de cyanobactéries .....	71
d/ Biodisponibilité et transfert des microcystines aux tomates.....	72
i. Transfert de la MC-LR radiomarquée contenue dans le sol aux plantules de tomates.....	72
ii. Transfert et accumulation de la MC-LR radiomarquée dans les plants de tomate .....	73
2.2.15. Analyses statistiques .....	74

**Chapitre 3 : Caractérisation chimique, phytotoxique et écotoxicologique d'un extrait de cyanobactéries issu de la culture in vitro de *Microcystis aeruginosa*, apporté sur un système sol-plante par irrigation. ....75**

3.1. Introduction .....	77
3.2. Résultats .....	80
3.2.1. Quantification et identification des congénères de microcystines obtenus dans l'extrait de <i>Microcystis aeruginosa</i> (PCC7820) .....	80
3.2.2. Résultats du test de luminescence de <i>Vibrio fischeri</i> .....	85
3.2.3. Effets de l'extrait de <i>Microcystis aeruginosa</i> contenant des microcystines sur la germination et la croissance des racicules après exposition in vitro .....	85
3.2.4. Effets de l'extrait de <i>Microcystis aeruginosa</i> contenant des microcystines sur la croissance de plantules de tomates <i>Solanum lycopersicum</i> var. MicroTom.....	89
3.2.5. Activités enzymatiques du sol et nitrification potentielle .....	91

3.2.6. Effets de l'extrait de <i>Microcystis aeruginosa</i> contenant des microcystines sur les abondances des communautés bactériennes et archéennes totales, ainsi que sur les communautés spécialisées dans la nitrification (AOA et AOB).....	93
3.3. Discussion.....	94
3.4. Conclusion.....	100
<b>Chapitre 4 : Devenir de la MC-LR dans un sol agricole et translocation à la tomate <i>Solanum lycopersicum</i> var. MicroTom .....</b>	<b>103</b>
4.1. Introduction .....	105
4.2. Résultats .....	107
4.2.1. Cinétiques de croissance des cyanobactéries et dynamique de biosynthèse des microcystines .....	107
4.2.2. Biosynthèse de microcystines radioactives .....	110
4.2.3. Cinétiques de minéralisation de la MC-LR radiomarquée dans le sol.....	111
4.2.4. Répartition de la microcystine radiomarquée ( <sup>14</sup> C-MC-LR) du sol .....	112
4.2.5. Purification et caractérisation des extraits de sols .....	113
4.2.6. Transfert des microcystines radiomarquées ( <sup>14</sup> C-MC-LR) vers les plantules.....	114
4.2.7. Translocation des microcystines radiomarquées ( <sup>14</sup> C-MC-LR) dans la plante .....	114
4.3. Discussion.....	117
4.4. Conclusion.....	123
<b>Chapitre 5 : Effet d'une irrigation chronique, durant 90 jours, d'un système sol-plante avec un extrait de <i>Microcystis aeruginosa</i> à différentes concentrations en microcystines.....</b>	<b>127</b>
5.1. Introduction .....	129
5.2. Résultats .....	130
5.2.1. Activités enzymatiques du sol, après 90 jours d'exposition journalière à un extrait de <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	130
5.2.2. Estimation de l'activité de nitrification potentielle du sol, après 90 jours d'exposition journalière à un extrait <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	131
5.2.3. Abondances des communautés microbiologiques des sols après 90 jours d'exposition à un extrait de <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	132
5.2.4. Quantification des MC-LR présentes dans le sol, après 90 jours d'exposition journalière à un extrait de <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	133
5.2.5. Effet d'une irrigation chronique avec un extrait de <i>Microcystis aeruginosa</i> dilué sur le développement et la croissance des tomates <i>Solanum lycopersicum</i> var. MicroTom .....	136
5.2.6. Effet d'une irrigation chronique avec un extrait de <i>Microcystis aeruginosa</i> dilué sur quelques paramètres physiologique des tomates <i>Solanum lycopersicum</i> var. MicroTom .....	142
5.2.7. Identification et quantification des microcystines absorbées par la plante, après 90 jours d'exposition.....	143
5.3. Discussion.....	145
5.4. Conclusion.....	152
<b>Chapitre 6 : Discussion générale, conclusions et perspectives .....</b>	<b>155</b>
6.1. Discussion générale.....	157

6.1.1. Le sol et ses communautés microbiennes .....	157
6.1.2. La plante .....	159
6.2. Conclusion générale .....	163
6.3. Perspectives .....	167
6.3.1. Vérifier le comportement des microcystines dans des sols de propriétés et caractéristiques variées .....	167
a/ Utiliser plusieurs types de sols.....	167
b/ Utiliser des concentrations environnementales de microcystines marquées.	167
6.3.2. Approfondir nos connaissances sur le devenir des toxines dans le sol .....	168
6.3.3. Contrôler les effets écotoxicologiques des microcystines sur les organismes de plusieurs sols.....	168
6.3.4. Approfondir les résultats sur le transfert et l'accumulation des microcystines par diverses plantes .....	169
6.3.5. Compléter les résultats concernant le stockage des microcystines dans les différents organes de la plante. ....	169
<b>Références Bibliographiques .....</b>	<b>171</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>197</b>
Articles scientifiques :.....	199
- Article de synthèse (Chemosphere, 2014, 96 :1-15).....	199
- Dynamics of the toxic cyanobacterial microcystin-leucine-arginine peptide in agricultural soil (Environmental Chemistry Letters, soumis le 24 juillet 2014).....	214
- Phytotoxicity and ecotoxicity of cyanobacterial extract containing microcystins under realistic environmental concentrations and in a soil- plant system (Chemosphere, soumis le 21 mai 2014).....	215
- MC-LR absorption, translocation and bioconcentration in tomato plants <i>Solanum lycopersicum</i> var. MicroTom (en preparation).....	216
Présentations orales.....	217
Communications affichées (Posters) .....	218
<b>Résumé .....</b>	<b>220</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>220</b>

## ***Glossaire des abréviations***

BMAA : L-beta-N-methylamino-L-alanine (neurotoxine)

CYN : cylindrospermopsine (cytotoxine)

DW : dry weight (poids sec)

i.p. : injection intra-péritonéal

LD50 : dose nécessaire pour induire la mort de 50% des individus

MC(s) : microcystine(s) dont les congénères cités sont répertoriés ci-dessous  
selon les acides aminés:

positions	MC-LR	MC-RR	MC-LY	MC-LW	MC-LF	MC-YR
X	leucine	arginine	leucine	leucine	leucine	tyrosine
Z	arginine	arginine	tyrosine	tryptophane	phénylalanine	arginine

MF : masse fraîche

MS : masse sèche

MW : poids moléculaire

NOD(s) : nodularine(s) (hépatotoxine)

NB : certaines abréviations qui sont utilisées dans le chapitre bibliographique  
sont laissées en anglais.



## Liste des figures

- Figure 1:** Photographie d'une efflorescence de cyanobactéries (*Microcystis aeruginosa*) dans le barrage Cheffia (Algérie) en 2011 (N. Bouaïcha)..... 3
- Figure 2:** Schéma résumant la structuration du manuscrit. .... 6
- Figure 3:** Structures of several neurotoxins, (A) anatoxin-a, (B) homoanatoxin, (C) anatoxin-a(s), (D) saxitoxin and (E) amino acid L-beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA)..... 16
- Figure 4:** Structures of different hepatotoxins, (A) microcystin where X and Z are variable L-amino acids, (B) nodularin and (C) cylindrospermopsin..... 18
- Figure 5:** Structure chimique générale des microcystines constituées de 7 acides aminés dont X et Z sont les 2 acides aminés variables..... 45
- Figure 6:** (A) Localisation sur une photographie aérienne (Géoportail) du site expérimental de la Pierre-Plate (Versailles, France) sous prairie permanente, délimité par le polygone bleu. Ce dernier peut être divisé en deux parties distinctes selon les altitudes visibles sur le profil altimétrique (trait rouge) (B) entre les deux points. Le sol utilisé provenait de la partie « haute » du site expérimental de la Pierre-Plate..... 46
- Figure 7:** Schéma représentant le cycle phénologique simplifié de la tomate *Solanum lycopersicum* variété MicroTom. .... 48
- Figure 8:** Schéma du dispositif permettant la culture des cyanobactéries de la souche *Microcystis aeruginosa* (PCC7820) dans un milieu contenant du bicarbonate de sodium marqué au carbone 14. La pompe 1 permettait l'apport d'air exogène, stérilisé par filtration, dans le milieu de culture par barbotage permanent. La pompe 2 permettait de récupérer une partie de l'air interne à la culture pouvant contenir du carbone 14 minéralisé (<sup>14</sup>C-CO<sub>2</sub>). Le circuit rouge permettait de mélanger l'air exogène à l'air interne à la culture. Le circuit vert quant-à-lui permettait de capturer une partie de l'air ambiant de la culture mis à buller dans un piège à CO<sub>2</sub> avant d'être aspiré par un système de ventilation..... 55
- Figure 9:** Schéma du montage expérimental permettant de suivre la minéralisation de la microcystine-LR marquée au carbone 14 apportée par irrigation sur la colonne de sol. .... 65
- Figure 10:** Chromatogramme obtenu par chromatographie liquide (A<sub>238</sub>) après injection d'un extrait aqueux de cyanobactéries (75% MeOH, v/v) obtenu après culture de la souche *Microcystis aeruginosa* (PCC7820) où apparaissent les 4 principaux congénères de microcystines : MC-LR , MC-LY, MC-LW et MC-LF. .... 81
- Figure 11:** Chromatogrammes obtenu en UPLC-MS/MS (MRM) après injection d'un extrait de cyanobactéries (75% MeOH, v/v) obtenu après culture de la souche *Microcystis aeruginosa* (PCC7820) où apparaissent les 13 congénères différents identifiés..... 84
- Figure 12:** Taux de germination (%) des tomates *Solanum lycopersicum* variétés MicroTom (A) et Saint-Pierre (B) et de la laitue *Lactuca sativa* variété capitata (C) après 7 jours d'exposition à différentes concentrations (50 µg L<sup>-1</sup> à 1 g L<sup>-1</sup>) de chlorure de cadmium (noir), ou à l'extrait de *Microcystis aeruginosa* (rouge) contenant différentes concentrations en microcystines (50 µg L<sup>-1</sup> à 20 mg L<sup>-1</sup>). Les données sont représentées par la moyenne ± σ (n=3). Des lettres différentes indiquent des différences significatives (p<0,05)..... 86

**Figure 13:** (A) Taux de germination (%) du blé *Triticum aestivum* BIO Atlass après 7 jours d'exposition à différentes concentrations (0 à 10 mg L<sup>-1</sup>) en extrait de *Microcystis aeruginosa* (rouge) ou à différentes concentrations (0 à 1 g L<sup>-1</sup>) d'une solution aqueuse de chlorure de cadmium (noir). Un zoom est effectué (B) sur les plus faibles concentrations comprises entre 5 et 20 mg L<sup>-1</sup> d'extrait de *M. aeruginosa* ou de chlorure de cadmium. Les données sont représentées par la moyenne ± σ (n=3). Des lettres différentes indiquent des différences significatives (p<0,05)..... 87

**Figure 14:** Evolution de la longueur des racines primaires (radicules) des tomates *Solanum lycopersicum* var. MicroTom (losanges noirs), *Solanum lycopersicum* var. Saint-Pierre (triangles rouges) et de la laitue *Lactuca sativa* var. capitata (carrés verts) exposés à différentes concentrations d'extrait de *Microcystis aeruginosa* (50 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup> à 20 mg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>) pendant 7 jours. Les données sont représentées par la moyenne ± σ (n=3). Des astérisques (\*) indiquent des différences significatives avec le groupe témoin non traité (p<0,05). ..... 88

**Figure 15:** Morphologie des racines primaires de tomates *Solanum lycopersicum* var. MicroTom après 7 jours d'exposition *in vitro* à l'eau distillée (1), à une solution aqueuse contenant 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup> (2) et 20 mg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup> (3). Les flèches indiquent la présence de poils absorbants. .... 89

**Figure 16:** Développement des plantules de tomates *Solanum lycopersicum* var. MicroTom (10 plantules/pot) semées dans le sol du site expérimental de la Pierre-Plate (Versailles, France) après 14 jours d'exposition à différentes concentrations en extrait de *Microcystis aeruginosa* (0 à 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>) (n=3)..... 90

**Figure 17:** Evolution de la biomasse sèche des parties aériennes (vert) et des racines (marron) des plantules de tomates *Solanum lycopersicum* var. MicroTom exposées 14 jours, par irrigation du sol, à différentes concentrations en extrait de *Microcystis aeruginosa* (0 à 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>). Les données sont représentées par la moyenne ± σ (n=3). Des astérisques (\*) indiquent des différences significatives avec le groupe témoin non traité (p<0,05). ..... 91

**Figure 18:** Evolution de la nitrification potentielle mesurée sur des sols frais traités pendant 14 jours avec différentes concentrations en extrait de *Microcystis aeruginosa* (0 à 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>) (n=3). Des astérisques (\*) indiquent des différences significatives avec le groupe témoin non traité (p<0,05). ..... 92

**Figure 19:** Evolution du nombre de copies de gènes 16S de bactéries et d'archées et de gènes amoA liés aux groupes fonctionnels des bactéries nitrifiantes (AOB) et archées nitrifiantes (AOA) dans des sols traités pendant 14 jours à différentes concentrations en extrait de *Microcystis aeruginosa* (0 à 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>). Les données sont représentées par la moyenne ± σ (n=3). Des astérisques (\*) indiquent des différences significatives avec le groupe témoin non traité (p<0,05). ..... 94

**Figure 20:** (A) Cinétiques de croissance de deux cultures de *Microcystis aeruginosa* par quantification des concentrations en chlorophylles *a* (µg L<sup>-1</sup>) et (B) cinétiques des concentrations en toxines (µg équiv. MC-LR g<sup>-1</sup> de cellules de cyanobactéries sèches), établies pour une durée de 21 jours après repiquage. Les cinétiques correspondent à une concentration en bicarbonate initiale de 10 mM (100% - carré) ou avec deux apports, un initial de 5 mM puis le second après 7 jours (50% - losanges). Les données sont représentées par la moyenne ± σ (n=3). Des astérisques (\*) indiquent des différences significatives entre les 2 cultures à un temps donné (p<0,05). ..... 109

**Figure 21:** (A) Cinétique de minéralisation du carbone de la  $^{14}\text{C}$ -MC-LR apportée par irrigation des 3 colonnes de sol (500 Bq colonne<sup>-1</sup>), obtenue sur une période de 28 jours post-exposition. (B) Cinétiques de minéralisation obtenues pour la colonne ayant reçu « 1 traitement » 28 jours plus tôt et pour la colonne ayant reçu un nouvel apport de  $^{14}\text{C}$ -MC-LR 28 jours après le premier traitement (500 Bq). ..... 112

**Figure 22:** Histogramme illustrant les différentes fractions de carbone 14 minéralisé, extrait au  $\text{CaCl}_2$ , à l'EDTA + pyrophosphate de sodium, au MeOH 20% ou encore la part non extractible pour une colonne mise à incuber 1 h (T0), ou 28 jours pour la colonne T28 et ayant reçu une seule application (500 Bq colonne<sup>-1</sup>). Enfin les colonnes T56 et T56 bis ont été mises à incuber 56 jours avec respectivement 1 ou 2 apports de 500 Bq. .... 113

**Figure 23:** Taux (%) de radioactivité mesurés dans les différents organes du plant de tomate *Solanum lycopersicum* variété MicroTom âgé de 84 jours et exposé aux  $^{14}\text{C}$ -MC-LR pendant 48 heures, en conditions hydroponiques (470 Bq ou 23  $\mu\text{g }^{14}\text{C}$ -MC-LR mL<sup>-1</sup>). En pointillé est représenté la proportion de radioactivité correspondant aux MC-LR libres extraites au MeOH 75% et en hachuré la proportion de radioactivité correspondant aux MC-LR non extractibles au MeOH. En orange sont représentées les proportions de radioactivité obtenues après combustions des organes. .... 115

**Figure 24:** Schéma récapitulant les concentrations en microcystines dans les différents organes d'un plant de tomate *Solanum lycopersicum* var. MicroTom exposé pendant 48 heures en conditions hydroponiques. En orange sont mentionnés les facteurs de bioconcentration dans chaque organe. .... 117

**Figure 25:** Nitrification potentielle obtenue sur des sols frais exposés pendant 90 jours à différentes concentrations en extrait de *Microcystis aeruginosa* (0 à 100  $\mu\text{g}$  équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>). Les données sont représentées par la moyenne  $\pm \sigma$  (n=5). Des astérisques (\*) indiquent des différences significatives avec le groupe témoin non traité (p<0,05). .... 132

**Figure 26:** Nombre de copies de gènes 16S de bactéries et d'archées et de gènes *amoA* liés aux groupes fonctionnels des bactéries nitrifiantes (AOB) et archées nitrifiantes (AOA) dans des sols exposés pendant 90 jours à différentes concentrations en extrait de *Microcystis aeruginosa* (0 à 100  $\mu\text{g}$  équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>). Les données sont représentées par la moyenne  $\pm \sigma$  (n=5). .... 133

**Figure 27:** Chromatogrammes obtenus en UPLC-MS/MS sur des extraits de sols (EDTA+ $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ) ayant été exposés à différentes concentrations en extrait de *Microcystis aeruginosa*, (A) témoin ou (B) 100  $\mu\text{g}$  équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>, pendant 90 jours. La transition majoritaire 995>135 (m/z) a été observée (A et B1) pour les deux traitements et les transitions de confirmation 995>107 (m/z) (B2) et 995>113 (m/z) (B3) ont été recherchées sur les extraits de sols traités par arrosage avec une concentration de 100  $\mu\text{g}$  équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>. .... 134

**Figure 28:** Cinétiques de croissance des plants de tomate *Solanum lycopersicum* var. MicroTom exposés, par irrigation, pendant 90 jours à différentes concentrations d'extrait de *Microcystis aeruginosa* (0 à 100  $\mu\text{g}$  équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>). Un zoom est effectué sur les valeurs obtenues après 90 jours d'exposition. Les données sont représentées par la moyenne  $\pm \sigma$  (n=5). Des lettres différentes indiquent des différences significatives (p<0,05). .... 137

**Figure 29:** Cinétiques des différents stades phénologiques des plants de tomates *Solanum lycopersicum* var. MicroTom exposés, par irrigation, à différentes concentrations en extrait de *Microcystis aeruginosa* (0 à 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>) correspondant (A) au nombre de jours nécessaire avant l'apparition des n feuilles, (B) au nombre de jours nécessaire avant l'apparition des n inflorescences et (C) le nombre de jour nécessaire avant que la 1<sup>ère</sup> fleur soit épanouie sur l'efflorescence n. Les données sont représentées par la moyenne ± σ (n=5). ..... 138

**Figure 30:** Différents indicateurs numériques de croissance des plants de tomates *Solanum lycopersicum* var. MicroTom exposés, par irrigation, à différentes concentrations en extrait de *Microcystis aeruginosa* (0 à 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>) pendant 90 jours. (A) nombre d'infructescences, (B) nombre d'infructescences ayant au moins une fleur épanouie, (C) nombre de fleurs ayant avorté, (D) nombre de tomates, (E) nombres de tomates vertes et (F) nombre de tomates rouges. Les données sont représentées par la moyenne ± σ (n=5). ..... 139

**Figure 31:** Biomasses sèche totale (g) des plants de tomates *Solanum lycopersicum* var. MicroTom exposés, par irrigation, à différentes concentrations en extrait de *Microcystis aeruginosa* (0 à 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>) pendant 90 jours. Les données sont représentées par la moyenne ± σ (n=5). ..... 140

**Figure 32:** Diagrammes représentant les proportions (%) des différents organes des plants de tomates *Solanum lycopersicum* var. MicroTom : feuilles (vert), fruits (rouge), tiges (orange) et racines (marron), obtenus après 90 jours d'irrigation avec (A) de l'eau distillée, (B) 5 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>, (C) 20 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>, (D) 50 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup> et (E) 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>. Les données sont représentées par la moyenne (n=5). ..... 141

**Figure 33:** Surface foliaire moyenne des plants de tomates *Solanum lycopersicum* var. MicroTom exposés à différentes concentrations en extrait de *Microcystis aeruginosa* (0 à 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>). Les données sont représentées par la moyenne du rapport de la surface foliaire sur le nombre de feuilles ± σ (n=5). ..... 141

**Figure 34:** (A) Rapports des concentrations en chlorophylles a/b et (B) Mesures de la fluorescence chlorophyllienne (rapport Fv/Fm) sur les feuilles issues de plants de tomates *Solanum lycopersicum* var. MicroTom exposés, par irrigation, à différentes concentrations en extrait de *Microcystis aeruginosa* (0 à 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>) pendant 90 jours. Les données sont représentées par la moyenne ± σ (n=5). ..... 142

**Figure 35:** Chromatogrammes obtenus en UPLC-MS/MS sur des extraits de (A et B) feuilles ou de (C et D) racines de plants de *Solanum lycopersicum* var. MicroTom exposés par irrigation à différentes concentrations en extrait de *Microcystis aeruginosa*, (A et C) témoin ou (B et D) 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>, pendant 90 jours. La transition majoritaire 995>135 (m/z) a été observée sur l'ensemble des échantillons (A, B1, C et D1) pour les deux traitements et les transitions de confirmation 995>107 (m/z) (B2 et D2) et 995>113 (m/z) (B3 et D3) ont été recherchées sur les extraits de plantes traités par arrosage avec une concentration de 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>. ..... 144

**Figure 36:** Schéma synthétisant les principaux résultats obtenus. .... 162

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Overview of some published cyanobacterial toxin concentrations from various countries. Concentrations are presented in $\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight (DW) or else in $\mu\text{g L}^{-1}$ as indicated. ....	25
<b>Tableau 2:</b> Caractéristiques physicochimiques de l'horizon superficiel (0-15 cm) du sol du site expérimental de la Pierre-Plate (Versailles, France), partie "haute" .....	47
<b>Tableau 3 :</b> Ions pseudo-moléculaires et fragments sources observés par UHPLC-MS dans les spectres de microcystines, dans l'extrait aqueux de cyanobactéries (75% MeOH, v/v) obtenu après culture de la souche <i>Microcystis aeruginosa</i> (PCC7820). ....	83
<b>Tableau 4:</b> Activités enzymatiques globales du sol ( $\text{mU g}^{-1}$ sol sec) obtenues après 14 jours de traitement, par irrigation, à différentes concentrations en extrait de <i>Microcystis aeruginosa</i> (50 à 100 $\mu\text{g}$ équiv. MC-LR $\text{L}^{-1}$ ). Les données sont indiquées par la moyenne $\pm \sigma$ (n=3). ....	92
<b>Tableau 5:</b> Rendements (%) de l'expérimentation de culture de <i>Microcystis aeruginosa</i> en milieu liquide contenant comme précurseur radioactif du bicarbonate de sodium (37 kBq $\mu\text{g}^{-1}$ ), permettant la biosynthèse de microcystines radiomarquées au carbone 14. ....	110
<b>Tableau 6:</b> Concentrations en MC-LR obtenues dans les différents organes d'un plant de tomate <i>Solanum lycopersicum</i> variété MicroTom âgé de 84 jours et exposé aux $^{14}\text{C}$ -MC-LR pendant 48 heures en conditions hydroponiques (470 Bq ou 23 $\mu\text{g}$ $^{14}\text{C}$ -MC-LR $\text{mL}^{-1}$ ). ....	116
<b>Tableau 7:</b> Activités enzymatiques globales du sol ( $\text{mU g}^{-1}$ sol sec) obtenues après 90 jours d'exposition, par irrigation, à différentes concentrations en extrait de <i>Microcystis aeruginosa</i> (0 à 100 $\mu\text{g}$ équiv. MC-LR $\text{L}^{-1}$ ). Les données sont indiquées par la moyenne $\pm \sigma$ (n=5). ....	131
<b>Tableau 8:</b> Concentrations en toxines de cyanobactéries dans le sol et rapports de ces concentrations par rapport à l'apport cumulé des toxines, obtenus en dosant les toxines par test d'inhibition des protéines phosphatases de type 2A (PP2A) ou par UHPLC-MS/MS, après 90 jours d'irrigation avec différentes concentrations d'un extrait de <i>Microcystis aeruginosa</i> (0 à 100 $\mu\text{g}$ équiv. MC-LR $\text{L}^{-1}$ ). Les données sont exprimées par la moyenne $\pm \sigma$ (n=5). Des lettres différentes indiquent des différences significatives ( $p < 0,05$ ). ....	135
<b>Tableau 9:</b> Valeurs des rapports d'acides gras foliaires des tomates <i>Solanum lycopersicum</i> var. MicroTom exposés par irrigation pendant 90 jours à des concentrations en extrait de <i>Microcystis aeruginosa</i> (0 à 100 $\mu\text{g}$ équiv. MC-LR $\text{L}^{-1}$ ). Les données sont représentées par la moyenne des rapports $\pm \sigma$ (n=5). ....	143
<b>Tableau 10:</b> Dosages des concentrations en microcystines ( $\text{ng MC-LR g}^{-1}$ MS) accumulées dans les racines ou les feuilles des plants de tomates <i>Solanum lycopersicum</i> var. MicroTom, après 90 jours d'exposition, par irrigation, à différentes concentrations en extrait de <i>Microcystis aeruginosa</i> (0 à 100 $\mu\text{g}$ équiv. MC-LR $\text{L}^{-1}$ ). Les données sont exprimées par la moyenne $\pm \sigma$ (n=5). Des lettres différentes indiquent des différences significatives ( $p < 0,05$ ). ....	145



## Introduction Générale

### **Contexte**

Ces dernières décennies, les changements sociétaux des pays développés n'ont cessé d'accroître la pression anthropique sur l'environnement avec notamment l'industrialisation et la modernisation de l'agriculture. Celle-ci s'est vue dotée de nouveaux engins mais a aussi utilisé de façon croissante des intrants : produits phytosanitaires et fertilisants. En conséquence, l'exploitation des gisements de minerais nécessaires à certaines activités n'a cessé d'augmenter. C'est le cas du phosphore et de l'azote dont les quantités extraites étaient respectivement de 191 Mt en 2005 et 187 Mt en 2011 ([Galloway et al., 2008](#); [Jasinski, 2012](#)). Concernant l'azote, environ la moitié de la production est utilisée pour la fabrication des engrais industriels épandus sur les surfaces agricoles ([Galloway et al., 2008](#)). Ces éléments essentiels à la croissance des plantes sont apportés à la surface des sols par épandage de fertilisants industriels, de produits résiduaux ou encore par dépôts atmosphériques en lien avec les activités humaines ([Sharpley et al., 1994](#); [Howarth et al., 1996](#); [Novotny, 2003](#)) pouvant modifier les cycles biogéochimiques ([Russell et al., 2005](#)). Cette forte quantité d'intrants apportée aux sols entraîne une saturation de ces derniers en éléments nutritifs. L'azote et le phosphore peuvent alors être exportés en grande quantité vers les eaux de surface ou souterraines, à la suite de phénomènes d'érosion ou de lixiviation ([Aber et al., 1989](#); [Vitousek et al., 1997](#); [Caraco and Cole, 1999](#)).

Les zones telles que les lacs, rivières, estuaires et côtes marines reçoivent des eaux riches en nutriments azotés et phosphorés. Déjà au début du XX<sup>ème</sup> siècle, suite à l'enrichissement en éléments nutritifs des milieux aquatiques, il avait été démontré une augmentation de l'activité biologique dans des tourbières ([Weber, 1907](#)) et en mer du Nord ([Johnstone, 1908](#)). Ce

phénomène d'enrichissement en éléments nutritifs dans les lacs, suivi d'une forte activité biologique était déjà décrit par [Rodhe \(1969\)](#), durant les temps géologiques et se définissait comme une eutrophisation des milieux aquatiques. Cependant, l'utilisation importante d'intrants à forte valeur nutritive accélère ce phénomène et semble d'autant plus accentué par le réchauffement climatique actuel ([Ficke et al., 2007](#)). En conséquent, l'intensification de l'activité biologique et principalement des organismes producteurs primaires va induire des changements importants de la composition de la structure des réseaux trophiques ([Smith et al., 2006](#)).

Les cyanobactéries sont capables de proliférer très rapidement sur une courte période ([Scott and Marcarelli, 2012](#)), leur biomasse devient alors importante et une écume verte ou efflorescence ou « bloom » de cyanobactéries se développe à la surface de l'eau (**Figure 1**). Cette prolifération intervient au détriment des autres espèces (plantes, animaux et microorganismes) présentes dans le milieu. De plus, certaines souches présentes dans les milieux aquatiques sont capables de synthétiser des métabolites secondaires toxiques pour un certain nombre d'espèces. Le rôle des toxines produites par les cyanobactéries reste encore mal compris mais elles les rendraient plus compétitives dans l'environnement. Ces toxines sont également capables de perturber le métabolisme d'organismes non inféodés au milieu aquatique et notamment les mammifères terrestres et l'homme. Elles sont souvent classées selon les organes ciblés par les toxines : hépatotoxines (le foie), neurotoxines (le système nerveux) et dermatotoxines (la peau et les muqueuses). Les toxines ont également des propriétés cytotoxiques qui peuvent induire la production cellulaire d'espèces réactives de l'oxygène ([Pflugmacher, 2004](#)).



**Figure 1:** Photographie d'une efflorescence de cyanobactéries (*Microcystis aeruginosa*) dans le barrage Cheffia (Algérie) en 2011 (N. Bouaïcha).

Ces toxines représentent donc un véritable problème pour les ressources en eau puisqu'elles sont présentes dans des eaux destinées à usage domestique (eaux potables), à des fins récréatives ou encore dans les eaux d'irrigation. L'agriculture est une activité très consommatrice d'eau puisée dans des retenues d'eau naturelles ou artificielles, peu ou pas contrôlées. La forte persistance de ces toxines et en particulier des microcystines, dans le milieu aquatique (plusieurs semaines) ([Jones and Orr, 1994](#); [Edwards et al., 2008](#)) peut alors les rendre dangereuses lors d'une irrigation répétée des sols et des cultures.

**Objectifs de mes travaux de recherche et structuration du mémoire**

Le devenir et l'impact de cyanotoxines apportées par irrigation dans des agrosystèmes restent peu étudiés comme nous le montrons dans le travail bibliographique présenté (Chapitre 1). De l'apport aux sols agricoles de cyanotoxines découlent trois principaux risques :

- Un risque de détérioration de la ressource sol avec une possible contamination avec des toxines dont on sait peu de chose sur leur devenir dans les sols. Le sol est bien sûr un support de production mais c'est aussi une niche écologique abritant de nombreux organismes : microorganismes, mésofaune, macrofaune..., qui jouent un rôle essentiel dans la structuration, le fonctionnement et *in fine* la fertilité du sol. Ainsi, il faut comprendre les perturbations que peuvent causer les toxines de cyanobactéries.
- Un risque de baisse des rendements agricoles après irrigation avec des eaux contaminées en cyanotoxines peut être envisagé. Une baisse de production présenterait alors un risque économique pour les agriculteurs utilisant ces ressources en eau contaminées.
- Enfin le risque de transfert des toxines du sol irrigué vers les plantes qui y sont cultivées, reste possible. A la fois le devenir des toxines dans le sol agricole mais aussi le transfert et l'accumulation de toxines dans la plante doivent être mieux connus. Ces deux derniers points nous amènent à quantifier un possible transfert dans les parties comestibles des plantes et à déterminer si un risque sanitaire résulte de cette accumulation.

Dans ce contexte, les principaux objectifs de mes recherches sont de répondre aux questions suivantes, lesquelles seront reprises dans chaque chapitre :

**Question 1 :** Quels sont les effets toxicologiques de l'extrait toxique de la souche *Microcystis aeruginosa* (PCC7820) contenant différentes microcystines, testé *in vitro* ?

**Hypothèse 1 :** L'extrait de cyanobactéries présente des propriétés toxiques importantes pour les plantes et les microorganismes, liées à sa composition en toxines.

**Q 1.1 :** Quels sont les différents congénères de microcystines présents dans l'extrait obtenu à partir de notre culture de la souche *Microcystis aeruginosa* (PCC7820) ?

**Q 1.2 :** Quels sont les effets d'une exposition *in vitro* à cet extrait, sur plusieurs variétés de semences ?

**Q 1.3 :** Quels sont les effets toxiques de cet extrait ajouté à l'eau d'irrigation lors d'une exposition sub-chronique, sur les microorganismes des sols et sur les plantules ?

**Question 2 :** Quels sont les effets de l'exposition sub-chronique ou chronique d'un système sol-plante à un extrait de cyanobactéries ?

**Hypothèse 2 :** L'utilisation d'une eau contaminée avec un extrait de cyanobactéries modifie (i) la croissance des tomates, *Solanum lycopersicum* var. MicroTom et (ii) les activités microbiennes du sol.

**Q 2.1 :** Quels sont les effets d'une irrigation chronique, à long terme, avec des microcystines sur les plantules de tomates ? (Y-a-t-il des modifications du développement ou des paramètres physiologiques ?)

**Q 2.2 :** Quels sont les effets d'une irrigation chronique, à long terme, avec des microcystines sur les microorganismes du sol ?

**Question 3 :** Que deviennent les microcystines, apportées à un sol agricole ?

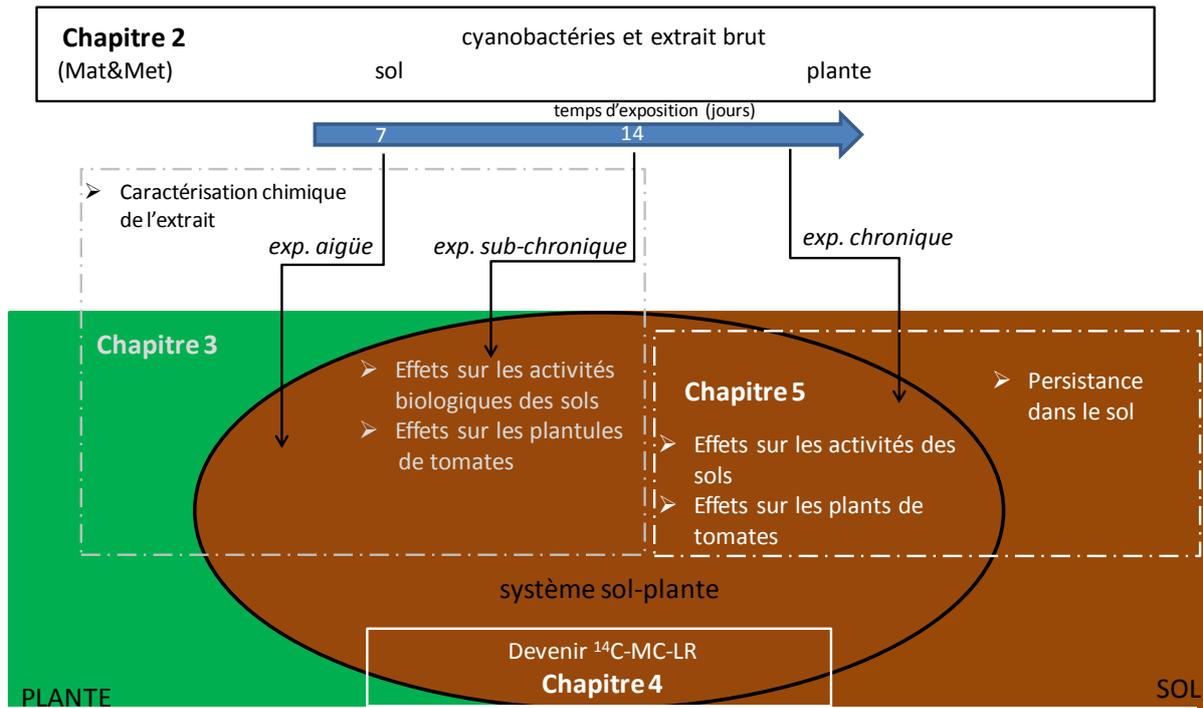
**Hypothèse 3 :** (i) Une partie des toxines va être dégradée par les microorganismes du sol, et une autre partie (ii) va être absorbée par les plants de tomates alors (iii) qu'une partie faiblement bio-disponible restera adsorbée au sol.

**Q 3.1 :** Les communautés microbiennes du sol sont-elles capables de dégrader les microcystines apportées au sol par irrigation ?

**Q 3.2 :** Les microcystines apportées par irrigation s'adsorbent-elles au niveau du sol ? Sont-elles sujettes à rester biodisponibles dans les sols ?

**Q 3.3 :** Les microcystines sont-elles absorbées par les tomates ? Que deviennent-elles dans la plante ?

Au travers ce manuscrit, nous nous proposons de répondre à ces différents objectifs en structurant le travail comme indiqué dans le schéma ci-dessous (**Figure 2**).



**Figure 2:** Schéma résumant la structuration du manuscrit.

Après l'étude bibliographique constituant le chapitre 1, ce mémoire s'organise en plusieurs chapitres schématisés sur la **Figure 2**, et détaillés ci-dessus :

- ✓ Le chapitre 2 décrit l'ensemble des matériels et des méthodes utilisés au cours des travaux.
- ✓ Le chapitre 3 présente les expériences préliminaires qui permettent de caractériser l'extrait de cyanobactéries obtenu. Cet extrait sera ensuite utilisé pour la totalité des expérimentations sans radioactivité. Dans un second temps, des tests écotoxicologiques sur les différents objets d'études (sol et plante) ont été réalisés afin de caractériser la phytotoxicité et l'écotoxicité de cet extrait. Ces tests ont été réalisés en s'appuyant sur des normes (test de germination, test de luminescence de *V. fisheri* et essai d'inhibition de la croissance des végétaux par une substance) et

sur d'autres indicateurs utilisés en écotoxicologie des sols (activités enzymatiques et nitrification potentielle) sur de courtes périodes d'exposition (7 et 14 jours).

- ✓ Le chapitre 4 permet de mieux comprendre le comportement dynamique des toxines radiomarquées ( $^{14}\text{C}$ -MC-LR) apportées par irrigation dans le sol. La capacité des toxines à s'adsorber au sol agricole est obtenue après différents temps d'incubation. La biodisponibilité des toxines dans le sol et leur capacité à être biodégradées par les microorganismes ont été mesurées. Enfin, le transfert et l'accumulation de la MC-LR dans des plantes ont pu être estimés.
- ✓ Enfin, le chapitre 5 permet une étude complète de l'exposition chronique d'un système sol-plante pendant toute la durée du cycle de vie de la plante. Des paramètres liés à la physiologie et à la croissance de la plante ont pu être mesurés pendant l'exposition ainsi qu'à la fin. En parallèle, les paramètres écotoxicologiques du sol ont été pris en considération ainsi que l'accumulation dans les différents organes.



**Chapitre 1 : Etude Bibliographique**  
**Cyanobacterial toxins: Modes of actions, fate in aquatic and  
soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in  
agricultural crops – Revue bibliographique**



## **Résumé**

La fréquence d'efflorescences (blooms) de cyanobactéries est très souvent accompagnée par la synthèse de cyanotoxines. Les toxines sont classées selon les organes touchés chez l'homme et les animaux : les hépatotoxines (le foie), les neurotoxines (le système nerveux), les alcaloïdes cytotoxiques et les dermatotoxines (le derme). Ces toxines ont souvent des effets secondaires très importants. Lorsque les toxines sont introduites dans des sols cultivés, par arrosage, elles peuvent modifier les mêmes voies métaboliques chez les plantes que celles identifiées pour les organes, tissus, cellules ou biomolécules animales. De plus, plusieurs indications nous montrent que les plantes cultivées, à des fins d'alimentation, peuvent accumuler des toxines, impliquant des risques sanitaires non négligeables pour l'Homme et les animaux. Récemment, de nombreux travaux se sont intéressés aux effets phytotoxiques des cyanotoxines sur des plantes à vocation agricole. Dans cette revue bibliographique, nous avons dans un premier temps, présenter les différentes cyanotoxines et leurs modes d'action sur l'Homme et les animaux ainsi que la fréquence de ces toxines dans les plantes. Dans un second temps, les concentrations environnementales en cyanotoxines dans les eaux douces ainsi que leur devenir dans les milieux aquatiques et terrestres sont présentées. Finalement, nous présenterons les résultats obtenus sur la bioaccumulation de cyanotoxines dans les plantes utilisées comme source alimentaire et les conséquences sur la santé animale et humaine. De façon générale, notre étude bibliographique montre que les informations concernant les effets des cyanotoxines sur les organismes terrestres sont particulièrement rares et qu'il y a un manque de connaissance sur le devenir de ces toxines dans les sols ainsi que sur leurs effets phytotoxiques.

Mots-clefs : Cyanobactéries, Cyanotoxines, Microcystines, Anatoxines, Cylindrospermopsin,

Devenir

**Abstract:**

The occurrence of harmful cyanobacterial blooms in surface waters is often accompanied by the production of a variety of cyanotoxins. These toxins are designed to target in humans and animals specific organs on which they act: hepatotoxins (liver), neurotoxins (nervous system), cytotoxic alkaloids, and dermatotoxins (skin), but they often have important side effects too. When introduced into the soil ecosystem by spray irrigation of crops they may affect the same molecular pathways in plants having identical or similar target organs, tissues, cells or biomolecules. There are also several indications that terrestrial plants, including food crop plants, can bioaccumulate cyanotoxins and present, therefore, potential health hazards for human and animals. The number of publications concerned with phytotoxic effects of cyanotoxins on agricultural plants has increased recently. In this review, we first examine different cyanotoxins and their modes of actions in humans and mammals and occurrence of target biomolecules in vegetable organisms. Then we present environmental concentrations of cyanotoxins in freshwaters and their fate in aquatic and soil ecosystems. Finally, we highlight bioaccumulation of cyanotoxins in plants used for feed and food and its consequences on animals and human health. Overall, our review shows that the information on the effects of cyanotoxins on non-target organisms in the terrestrial environment is particularly scarce, and that there are still serious gaps in the knowledge about the fate in the soil ecosystems and phytotoxicity of these toxins.

Keywords: Cyanobacteria, Cyanotoxins, Microcystins, Anatoxins, Cylindrospermopsin, Fate

### **1.1. Introduction**

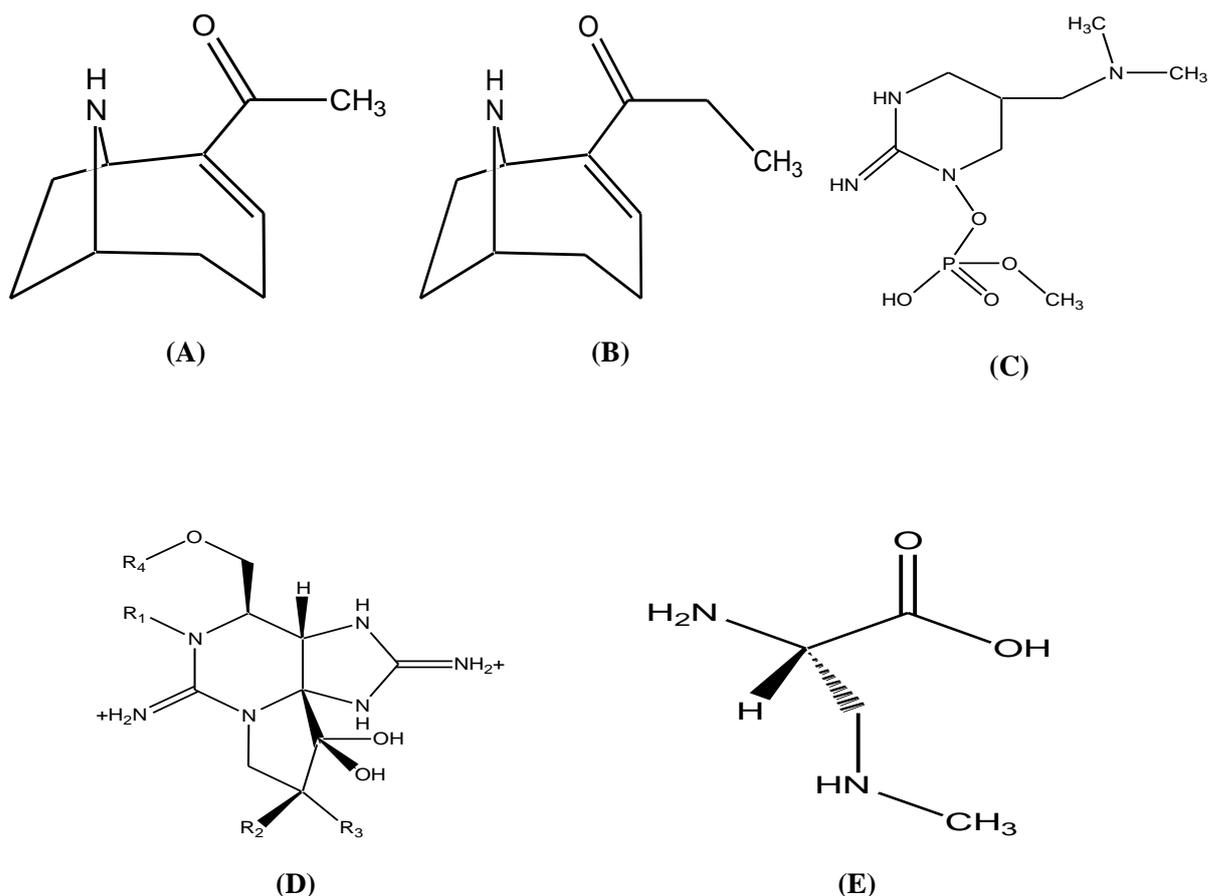
In light of global climate change, and particularly measurable rises in global temperature, as well as increased fluxes of certain nutrients (i.e., nitrates, phosphates) brought either by agricultural run-off or by sewage treatment plants and other anthropogenic sources, it has been suggested that cyanobacteria, including toxin-producing taxa, may be increasing in abundance, and thus represent an emerging human and environmental health concern (For review see in [O'Neil et al., 2012](#)). The presence of such toxins has been reported throughout the world and it appears that liver-toxic microcystins are more commonly found in 40–75% cyanobacterial blooms ([Sivonen and Jones, 1999](#)). The contamination of surface waters by these cyanotoxins can cause water quality problems for fisheries, aquaculture, farming, and sanitary hazard for human and animals. Humans are exposed to cyanobacteria toxins through many routes, including drinking water, recreational contact, and health food products made from cyanobacteria, and food chain. In recent years, several cyanobacterial toxins were investigated in regard to their ability to enter the food chain via freshwater seafood ([Ibelings and Chorus, 2007](#); [Ettoumi et al., 2011](#)), however, their ability to enter the food chain via agricultural crops has not been thoroughly investigated to date. Although no case of poisoning by these products has been reported in the literature, this eventuality must not be ignored. Indeed, a recent epidemiological study showed that the excessive incidence of amyotrophic lateral sclerosis in the population of the islands of Guam in the Pacific was linked to a consumption of the seeds of cycas contaminated by a neurotoxin, b-methylamino-L-alanine (BMAA), produced by a species of cyanobacteria of the genus *Nostoc* living in symbiosis in the roots of this plant ([Banack and Cox, 2003](#); [Cox et al., 2003](#); [Murch et al., 2004](#); [Steele and McGeer, 2008](#)). This last cited fact is gaining importance since plants could in a direct or indirect manner contribute to food chain cyanotoxin's transfer, and by the way constitute a potent health risk source. Indeed, numerous studies reported that both submerged and

emergent aquatic plants have been shown to absorb microcystins from low external concentrations (Pflugmacher et al., 1998; Yin et al., 2005; Saqrane et al., 2007). In terrestrial plants, Codd et al. (1999) reported that spray irrigation of commercial lettuce (*Lactuca sativa*) plants with water containing *Microcystis* resulted in colonies and single cells of the cyanobacterium being lodged on the leaves 10 d (days) after the last irrigation. MC-LR was present at 2.5 mg kg<sup>-1</sup> dry weight (DW) in the central leaves, 0.833 mg kg<sup>-1</sup> (DW) in the distal zone of mature leaves, and 0.094 mg kg<sup>-1</sup> (DW) in the basal zone of mature leaves. The last study indicated that toxins were absorbed by the plant as the central leaves would have been protected from irrigation. Similar conclusions were reached for rice (*Oryza sativa*) and rape (*Brassica napus*) by Chen et al. (2004). Therefore, the accumulation of cyanotoxins in the terrestrial food chain is at present remains more worrying and the proposed quality limits are rare, indeed, many aspects concerning these toxins are particularly scarce, notably those relative to the fate of cyanotoxins in the soil ecosystems and their toxicity and bioaccumulation on agricultural crops. There have been several reviews of the intensification and global expansion of harmful cyanoabcterial blooms in terms of abundance, geographic extent, factors that may be promoting this expansion, and prevention and management of cyanobacteiral blooms and their toxins, as well as effects on aquatic ecosystem health and transfer on food webs (Wiegand and Pflugmacher, 2005; Ibelings and Chorus, 2007; Paerl and Huisman, 2009; Aráoz et al., 2010; Kinnear, 2010; Merel et al., 2010; Jančula and Maršálek, 2011; O'Neil et al., 2012). However, the purpose of this review is to: (1) Highlight important findings of the last decade of modes of actions of cyanotoxins in humans and mammals and occurrence of target biomolecules in vegetable organisms; (2) Describe the fate of cyanotoxins in aquatic and soil ecosystems and focus in their phytotoxicity; and (3) Emphasize bioaccumulation of these toxins in vegetable foods and its consequences on animals and human health.

## **1.2. Cyanotoxins and their producers**

Recent research suggests that eutrophication and climate change are two processes they may promote the proliferation and expansion of harmful cyanobacterial blooms in freshwater, estuarine, and marine ecosystems. These microorganisms are known to biosynthesize a wide range of chemical classes of secondary metabolites such as peptides, macrolides, and glycosides (Patterson et al., 1994; Namikoshi and Rinehart, 1996) possessing a number of bioactivities: antiviral (Patterson et al. 1993, 1994), antifungal (Patterson et al., 1994), cytotoxic (Patterson et al., 1991), enzymatic inhibitor (Honkanen et al., 1995), antineoplastic (Moore, 1996), and allelopathic (Pushparaj et al., 1998). However, some of these cyanobacterial secondary metabolites encompass a diversity of alkaloid and peptide cyanotoxins which have been suggested to both pose threats to human and environmental health worldwide (Hawkins et al., 1985; Carmichael and Falconer, 1993; Kuiper-Goodman et al., 1999; Sivonen and Jones, 1999; Hitzfeld et al., 2000; Ettoumi et al., 2011). Toxic cyanobacteria that have been involved in such incidents belong essentially to the genera *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Planktothrix*, *Oscillatoria*, *Cylindrospermopsis* and less often *Gomphosphaeria*, *Coelosphaerium*, *Gloeotrichia*, *Nodularia* and *Nostoc* (Hawkins et al., 1985; Sivonen and Jones, 1999). The cyanotoxins are essentially endotoxins which can be released in the environment following a cellular lyse (Codd et al., 1989) or following treatment of cyanobacterial blooms with algaecides (Kenefick et al., 1993). They can be classified into four families according to the organs on which they act: neurotoxins (nervous system), hepatotoxins (liver), cytotoxins (several organs: liver, kidneys, adrenal glands, small intestine), and dermatotoxins (irritant toxins). Cyanobacterial neurotoxins (**Figure 3**) are divided in three groups: anatoxins (anatoxin-a, homoanatoxin-a, and anatoxin-a(s)), saxitoxins, and the neurotoxic amino acid L-beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA). Anatoxins and the BMAA are specific of cyanobacteria, while, saxitoxins are also synthesized

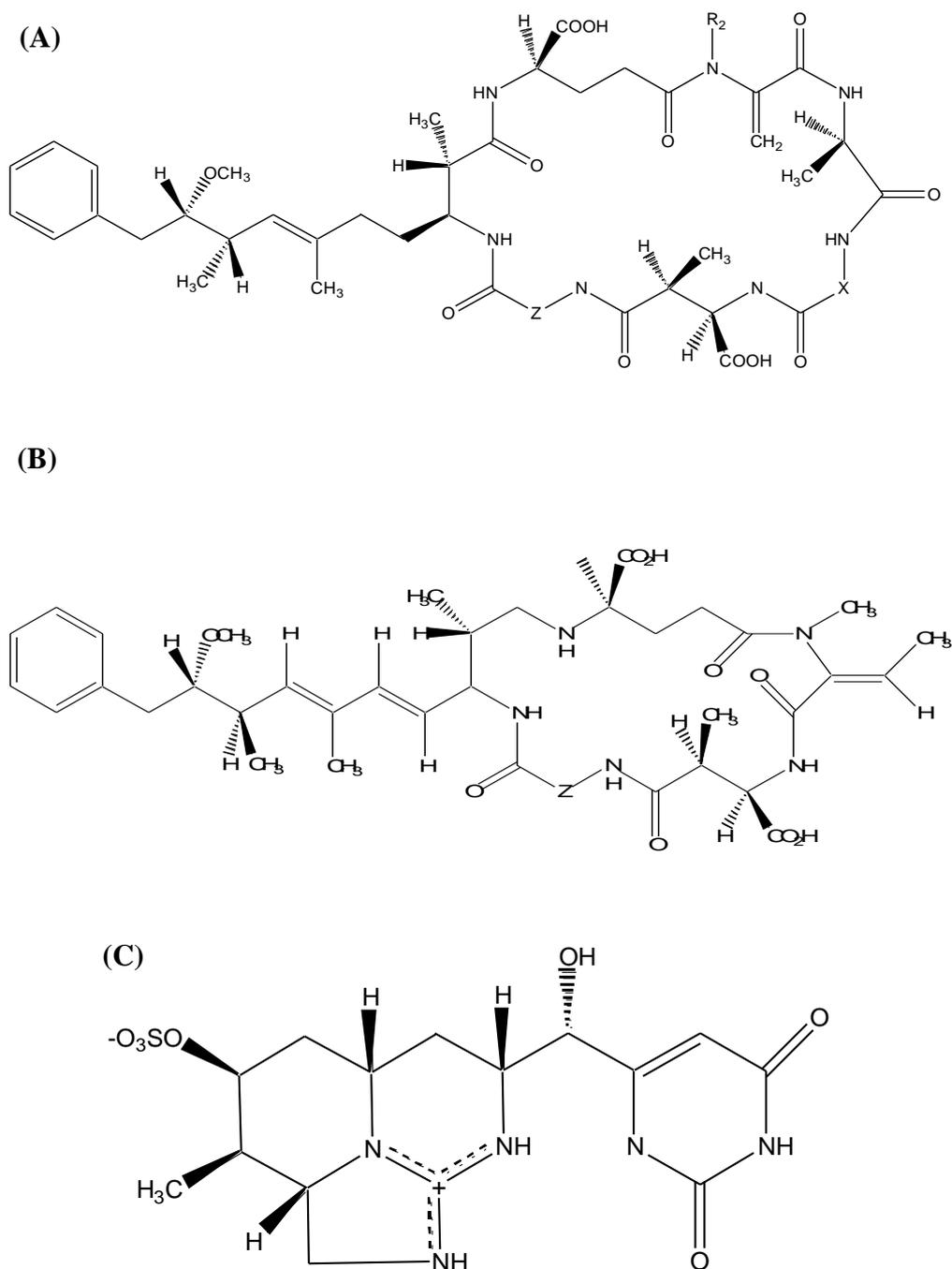
by some marine dinoflagellates and associated with the human disease paralytic shellfish poisoning or PSP (Falconer, 1991; Carmichael, 1994; Kaebernick and Neilan, 2001). By contrast to the other neurotoxins which production depends on the phylogeny of the species, the BMAA can be produced by almost all groups of cyanobacteria from freshwater, brackish, and marine environments (Cox et al., 2005; Banack et al., 2007).



**Figure 3:** Structures of several neurotoxins, (A) anatoxin-a, (B) homoanatoxin, (C) anatoxin-a(s), (D) saxitoxin and (E) amino acid L-beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA).

Hepatotoxins (Figure 4) are divided into two groups: Microcystins (MCs), cyclic heptapeptide hepatotoxins (MW 900–1200), that are regarded as the most frequently occurring and widespread of the cyanotoxins with more than 80 MC variants already reported (Sivonen and Jones, 1999; Cox et al., 2005; del Campo and Ouahid, 2010); and nodularins

(NODs) (MW 800–900) composed of five amino acids with only nine different natural analogs have been characterized (de Silva et al., 1992; Namikoshi et al., 1993; Rinehart et al., 1994; Codd et al., 2005). The hydrophilic alkaloid cytotoxin, cylindrospermopsin (MW 415) has been identified in the freshwater cyanobacteria *Cylindrospermopsis raciborskii* (Ohtani et al., 1992), *Umezakia natans* (Harada et al., 2004), *Aphanizomenon ovalisporum* (Sivonen and Jones, 1999), *Anabaena* sp. (Schembri et al., 2001), and *Raphidiopsis* sp. (Li et al., 2001). Today, only two congeners of cylindrospermopsin have been identified: 7-epicylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin. The freshwater cyanobacterial irritant toxins such as lipopolysaccharides, or endotoxins as they are commonly called, are major components of the cell wall in most Gram-negative bacteria including cyanobacteria (Jann and Jann, 1984; Mayer and Weckesser, 1984; Kaya, 1996; Stewart et al., 2006).



**Figure 4:** Structures of different hepatotoxins, (A) microcystin where X and Z are variable L-amino acids, (B) nodularin and (C) cylindrospermopsin.

### ***1.3. Modes of actions in humans and mammals and occurrence of target biomolecules in vegetable organisms***

#### **1.3.1. Neurotoxins**

Anatoxin-a is a potent postsynaptic depolarizing neuromuscular blocking agent that affects both nicotinic and muscarinic acetyl cholineacetylcholine receptors (Carmichael et al., 1979; Spivak et al., 1980). It acts as a depolarizing neuromuscular blocking agent mimicking the action of acetylcholine. However, this neurotoxin is not degraded by the acetylcholinesterase, and consequently its action on the muscular cells does not stop and, due to being stimulated, these cells are blocked and thereby resulting to muscle paralysis (Carmichael, 1994; Lilleheil et al., 1997). When the respiratory muscles are affected, the insufficient oxygenation of the brain engenders convulsions and the oppression (Carmichael, 1994; Humpage et al., 1994). The LD50 (lethal dose resulting in 50% deaths) of this neurotoxin is 200  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (mouse, i.p.) (Carmichael et al., 1979; Skulberg et al., 1992). Homoanatoxin-a is a homologue of anatoxin-a, that was reported to be a potent nicotinic agonist (Wonnacott et al., 1992). It enhances the release of acetylcholine from peripheral cholinergic nerves through opening of endogenous voltage dependent neuronal L-type calcium channels (Aas et al., 1996; Lilleheil et al., 1997). Despite the similarity in their names, anatoxin-a(s) and anatoxin-a are not structurally related (**Figure 3**) and exhibit different physiological properties. Anatoxina(s) belongs to the organophosphate class of neurotoxins and it acts as an irreversible inhibition of acetylcholinesterase at the nerve synapse (Mahmood and Carmichael, 1986, 1987). The LD50 (mouse, i.p.) of this toxin is about 20–40  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (Mahmood and Carmichael, 1987; Matsunaga et al., 1989; Carmichael et al., 1990). In animals, the mechanisms of action of paralytic shellfish poisoning toxins (saxitoxins) are based on the blockage of sodium conductance in axons (Kao et al., 1967; Henderson et al., 1973). They so inhibit the transmission of the electric activity and prevent the liberation of the acetylcholine (Nishiyama, 1968). Their toxicity is more important than

that of anatoxins with a LD50 (mouse, i.p.) in the same conditions for the saxitoxin of  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  (Gorham and Carmichael, 1988). Saxitoxins can also bind to calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) and potassium ( $\text{K}^+$ ) channels, interfering with the speed of opening and closing of these channels, which can in turn lead to alteration in the influx of ions to the cell (Wang et al., 2003; Su et al., 2004). In addition, the  $\text{Na}^+$ -channel blockage may alter the selective permeability of the membrane and may change the flow of ions, leading to damage to cellular homeostasis (Hille, 1992; Jablonski et al., 2007). Concerning the neurotoxic amino acid (BMAA), it acts in mammals as a glutamate agonist at AMPA, kainite and NMDA receptors (Spencer et al., 1986, 1987; Andersson et al., 1997; Seawright et al., 1999). Consequently, it increases the intracellular concentration of calcium in neurons and induces neuronal activity by hyperexcitation (Brownson et al., 2002). To our knowledge, no data regarding the toxicity of cyanobacterial neurotoxins in higher plants have been reported. However, interfering of some of them such as saxitoxins with the speed of opening and closing of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^+$  channels could modify ions transport in plant cells. For example, a modification of sodium signals can modify osmotic pressure in cells or the assimilation of  $\text{CO}_2$  for C4 plants (Brownell and Crossland, 1972). While sodium extrusion in animal cells and microorganisms (including yeast) is directly energized by ATP hydrolysis ( $\text{Na}^+$ -ATPases), these  $\text{Na}^+$  pumps are absent from higher plants (Horie and Schroeder, 2004).

### 1.3.2. Hepatotoxins

Cyanobacterial hepatotoxins type microcystin-LR are generally not able to penetrate vertebrate cell membranes and therefore, require uptake via the bile acid transport system present in hepatocytes and cells lining the small intestine (Runnegar et al., 1991). As a result of this, toxicity of these cyanotoxins is restricted to organs expressing the organic anion transporter on their cell membranes such as the liver (Fischer et al., 2005). However, in vegetable cells one relatively unexplored question regarding these toxins concerns the

mechanism of uptake, particularly the variants that would be predicted to be membrane impermeable based on polarity. They may cross cell membranes of plants by other mechanisms, including diffusion or by root absorption. [Pflugmacher et al. \(2001\)](#) have been reported that when the emergent reed plant *P. australis* was exposed to 0.5  $\mu\text{g}$  of  $^{14}\text{C}$ -labeled microcystin-LR  $\text{L}^{-1}$  for 3 d, it demonstrated a rapid uptake (since 0.5 h) of the toxin. The main uptake route appeared to be in the stem and rhizome, from which the toxin is transported into the higher parts of the plant to the leaves. Uptake directly through the leaves may also occur by direct contact of small plants or by the lowest leaves of a plant with surface water and with upper leaves by wave and spray contact ([Pflugmacher et al., 2001](#)). Once in both vertebrate and vegetable cells, microcystins and nodularins have been shown to be potent and specific inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A, and this inhibition accounts for their extreme toxicity ([MacKintosh et al., 1990](#); [Kurki-Helasma and Meriluoto, 1998](#); [Hastie et al., 2005](#)). Those proteins are involved in several physiological and molecular processes in higher plants ([Sheen, 1993](#); [Takeda et al., 1994](#)). Indeed, numerous studies reported that microcystins have several perturbatory effects on plant physiology and metabolism, when sufficient levels of toxin enter the plant cells ([MacKintosh et al., 1990](#); [Siegl et al., 1990](#); [Sheen, 1993](#); [Yamasaki, 1993](#); [Smith et al., 1994](#); [Abe et al., 1996](#); [Smith, 1996](#); [Kurki-Helasma and Meriluoto, 1998](#); [Weiss et al., 2000](#); [McElhiney et al., 2001](#); [Pflugmacher, 2002](#); [Romanowska-Duda and Tarczyńska, 2002](#); [Gehring et al., 2003](#); [Chen et al., 2004, 2011](#); [Mitrovic et al., 2005](#); [Saqrane et al., 2007, 2008](#); [Stüven and Pflugmacher, 2007](#); [Järvenpää et al., 2007](#); [Jang et al., 2007](#); [Peuthert et al., 2008](#); [Máthé et al., 2009](#); [Huang et al., 2009](#); [El Khalloufi et al., 2011, 2012](#); [Jámbrik et al., 2011](#); [Perron et al., 2012](#)). On the other hand, several studies have also reported that these hepatotoxins induce oxidative stress in mammal cells ([Žegura et al., 2003](#); [Botha et al., 2004](#); [Bouaïcha and Maatouk, 2004](#); [Puerto et al., 2010](#)). Therefore, their toxicity on aquatic plants seems to be also more linked to the induction

of oxidative stress manifested by elevated reactive oxygen species (ROS) production and malondialdehyde content (Lefevre et al., 1950; Pflugmacher, 2004; Hu et al., 2005; Leflaive and Ten-Hage, 2007).

### 1.3.3. Cytotoxins

The alkaloid cylindrospermopsin (CYN) is known as a general cytotoxin that blocks protein synthesis in mammal cells (Runnegar et al., 1995; Froscio et al., 2001, 2003). Implications of this effect can be also observed in vegetable cells. In fact, Froscio et al. (2008) reported that CYN was shown to inhibit the eukaryotic protein synthesis apparatus with similar potency in plant and mammalian cell extracts, half maximal inhibitory concentration of 334 nM in wheat germ extract and 110 nM in reticulocyte lysate. Metcalf et al. (2004) also showed that CYN inhibited pollen germination in tobacco plants (*Nicotiana tabacum*), with partial inhibition of protein production in the germinating pollen tubes following exposure to 138  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of toxin.

## ***1.4. Environmental concentrations of cyanotoxins in freshwaters and fate in aquatic and soil ecosystems***

### **1.4.1. Environmental concentrations of cyanotoxins**

The occurrence of cyanobacterial toxins was reported throughout the world in surface waters, where hepatotoxic microcystins are more commonly found in 50–75% cyanobacterial blooms (Ettoumi et al., 2011). Data on environmental concentrations of cyanotoxins have been compiled and reviewed in numerous papers (Sivonen and Jones, 1999; Falconer and Humpage, 2006; van Apeldoorn et al., 2007; Messineo et al., 2009). In this review, we give a summary on environmental concentrations focusing on irrigation waters with the ultimate aim to relate them to phytotoxicological data. Cyanotoxins are intracellular toxins contained within living cells, depending on both the nature of the toxin and the growth stage (Jungmann et al., 1996; Orr and Jones, 1998; Park et al., 1998a,b; Sivonen and Jones, 1999). They are

only released into the water, to form dissolved toxin, during cell senescence or cell death and lysis or through water treatment processes such as algaecide application, rather than by continuous excretion (James and Fawell, 1991; Gupta et al., 2001; Babica et al., 2006). The highest total (intracellular plus dissolved) cyanotoxin levels have been found in blooms and scums. For example, total MC concentrations in surface waters vary from trace to several milligrams per liter, being strongly influenced by the occurrence of these forms of cyanobacterial biomass. In surface waters used as irrigation source, total MC concentrations of 4–50  $\mu\text{g L}^{-1}$ , up to 6,500  $\mu\text{g L}^{-1}$ , have been reported in multiple locations, including but not limited to the Morocco (Oudra et al., 2001), Tunisia (El Herry et al., 2008), India (Prakash et al., 2009), Turkey (Gurbuz et al., 2009), and Finland (Spoof et al., 2003), but much higher levels up to 29,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  in Algeria (Nasri et al., 2008). It should be noted, however, that these very high concentrations of cyanotoxins would be from scums or from very dense cyanobacterial biomass. In the field, water samples with more than 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  total MCs, dissolved fraction did not comprise more than 10% of the combined intra and extracellular pool (Lindholm and Meriluoto, 1991; Jones and Orr, 1994; Tsuji et al., 1996; Ueno et al., 1996; Lahti et al., 1997). As well in some laboratory studies, where both intracellular and extracellular cyclic peptide toxins and saxitoxins have been measured, it is generally the case that in healthy log phase cultures, less than 10–20% of the total toxin pool is dissolved in the culture medium (Sivonen et al., 1990; Lehtimäki et al., 1997; Negri et al., 1997; Rapala et al., 1997). On the contrary, CYN may often be found at higher levels in dissolved form than within cells, as it readily leaks from cells under normal growth conditions (Norris et al., 2001; Falconer and Humpage, 2006; Wormer et al., 2008). For example, Shaw et al. (1999) found that in two instances of *A. ovalisporum* blooms around 80% of the total toxin content of the water was in free solution. Recently, Messineo et al. (2009) reported that in several Italian lakes of different characteristics and human uses, extracellular concentrations of total CYN

varied from non-detectable values up to 126  $\mu\text{g L}^{-1}$ . However, limited or no information is available about the proportion of dissolved form with respect to the total level for the cyanobacterial neurotoxins.

**Tableau 1** : Overview of some published cyanobacterial toxin concentrations from various countries. Concentrations are presented in  $\mu\text{g g}^{-1}$  dry weight (DW) or else in  $\mu\text{g L}^{-1}$  as indicated.

Country	Location	Use	Type	Concentrations ( $\mu\text{g L}^{-1}$ or $\mu\text{g g}^{-1}$ dw *)	Reference
Algeria	L. Oubeira	⌘	microcystin-LR	3-29,163	Nasri et al. (2008)
Argentina	R. San Roque	\$, £	microcystin-LR	920	Conti et al. (2005)
	-	-	microcystin-LR	48.6	Giannuzzi et al. (2011)
Australia	R. of drinking water	\$	saxitoxin	30	Orr et al. (2004)
	L. Julius	\$, £, ⌘	cyndrospermospin	2 .10 <sup>6</sup>	Saker and Griffiths (2001)
	R. Cania	\$, £, ⌘	cyndrospermospin	18.9	McGregor and Fabbro (2000)
	L. Cobaki Village	\$, £, ⌘	cyndrospermospin	101.4	Everson et al. (2011)
	Narrung Channel	\$	nodularin-R	1.6	Heresztyn and Nicholson (1997)
	L. Coolmunda	£	microcystin-LR	12	Stewart et al. (2006)
	L. Wivenhoe	£	cyndrospermospin	1-2	
Brazil	L. Bolonha	\$	microcystin	1.25	Vieira et al. (2005)
	Sao Paulo	\$, £	microcystin	0.5-100	Nobre, 1997
	Parana	\$	microcystin	0.2-6.6	Hirooka et al. (1999)
	D. Itaipu	£	microcystin	6,4-10	
	R. Tapacura	\$	saxitoxin	52	Molica et al. (2005)
	R. Armando Ribeiro Goncalves	\$	microcystin-LR	8.8	Costa et al. (2006)
			saxitoxin	3.14	
China	R. Haimen	\$	microcystin-LR	1,556	Ueno et al. (1996)
	L. Taihu	\$, £, ⌘	microcystin-LR	34.2	Liu et al. (2011)
Denmark	L. Knud so	-	homoanatoxin-a	2,300 *	Henriksen (1996)
		-	homoanatoxin-a	800*	
		-	homoanatoxin-a	60*	
	L. Ravn so	-	homoanatoxin-a	2,300*	
	L. Salten Langso	-	homoanatoxin-a	20*	
	L. Agerso	-	saxitoxin	37*	Kaas and Henriksen (2000)
	L. Bastrup so	-	saxitoxin	6.4*	
	L. Hvidesø	-	saxitoxin	85.1-182.5*	
	L. Vissiggaard so	-	saxitoxin	224.1*	
Finland	Prästträsket	\$, £, ⌘	microcystin-LR	42	Spoof et al. (2003)
	Södra Slemmern	\$, £, ⌘	nodularin-R	0.2	
	Högsjär	\$, £, ⌘	nodularin-R	0.5	
France	La Loue	£	anatoxin-a	8,000*	Gugger et al. (2005)
	L. Champs-sur-marne	£	saxitoxin	4.8-6.7	Ledreux et al. (2010)
Germany	20 water bodies	£	anatoxin-a	0.39-6.7	Bumke-Vogt et al. (1999)
	55 water bodies	-	microcystin-LR	10	Fastner et al. (1999)
	-	£	microcystin-LR	36	Ueno et al. (1996)
	Berlin water bodies	£	microcystin-LR	0.14-119	Fromme et al. (2000)
Greece	33 water bodies	-	microcystin-LR	50-1,600*	Cook et al. (2004)
Ireland	L. Caragh	\$, £	anatoxin-a	112-444	James et al. (1997)
		\$	homoanatoxin-a	1.4	Furey et al. (2003b)
	L. Lough Sillan	\$	homoanatoxin-a	24	Furey et al. (2003a,b)
	R. Innincarra	\$	homoanatoxin-a	34	Furey et al. (2003b)
	L. Lough Key	\$	homoanatoxin-a	12	
	L. Corbally	\$, £	anatoxin-a	60-100*	James et al. (1997)
Italy	R. Monteleone	\$	microcystin	226	Messineo et al. (2009)
	L. Albano	£	cyndrospermospin	126	
Japan	L. Inbanuma	\$, £	microcystin	52	Ueno et al. (1996)
	L. Suwa	-	microcystin	3.61	Park et al. (1998a,b)

About location: **L.** for lake, **R.** for reservoir, **D.** for dam. About use of water: (\$) for drinking supply, (£) for recreational activities, and (⌘) for agriculture (irrigation and pasture) and aquaculture. "-" absence of information.

Table 1 continued

Country	Location	Use	Type	Concentrations ( $\mu\text{g L}^{-1}$ or $\mu\text{g g}^{-1}$ dw *)	Reference	
Kenya	L. Baringo	⌘	anatoxin-a	0.05-0.21	Ballot et al. (2004)	
	L. Nakuru	-	anatoxin-a	5-223*		
	L. Baringo	⌘	anatoxin-a	0.05-0.21*	Ballot et al. (2003)	
	L. Bogoria	-	anatoxin-a	10-18*	Krienitz et al. (2003)	
			-	anatoxin-a	0.3-9*	Ballot et al. (2004)
	L. Simbi	-	microcystin-LR	19.7-39	Ballot et al. (2005)	
	L. Sonachi	-	microcystin-LR	1.6-12*		
Morocco	L. Norivasha	⌘, \$	microcystin-LR	0.041	Krienitz et al. (2013)	
	R. Lalla takerkoust	⌘, £, \$	microcystin	73*	Oudra et al. (2001)	
		⌘	microcystin	95.4	El Ghazali et al. (2011)	
Netherlands	L. 't Joppe	⌘, £	microcystin-LR	2.5	Kardinaal et al. (2007)	
	L. Volkerak	⌘, £	microcystin-LR	7		
New Zealand	L. Kinselmeer	⌘, £	microcystin-LR	18	Wood et al. (2006b)	
	L. Waitawa	-	microcystin-LR	28,000		
	L. Horowhenua	-	microcystin-LR	16,291		
	L. Ngaroto	-	microcystin-LR	1,535		
	L. Taupo	-	microcystin-LR	708		
	Neuma Pond	-	microcystin-LR	22,58		
	L. Rotoiti	⌘	microcystin-LR	10-760		Wood et al. (2006a)
Portugal	L. Rotoehu	⌘	microcystin-LR	23		
	-	⌘, £	microcystin	13.7	Ueno et al. (1996)	
Poland	R. Sulejow	⌘, £	microcystin-LR	1.17	Gągała et al. (2010)	
	L. Bninskie	£	microcystin-LR	1.87		
S. Africa	D. Nhanganzwane	-	microcystin	23,718	Oberholster et al. (2009b)	
	D. Makhohlolo	-	microcystin	0.317		
	L. Krugersdrift	-	microcystin	43.7		
S. Korea	R. Younglang	£	anatoxin-a	417*	Park et al. (1998b)	
	Jangsong	\$	anatoxin-a	1444*		
Serbia	L. Ludös	⌘, £	microcystin-LR	362.68	Svirčev et al. (2007)	
	R. Celije		microcystin-LR	650	Svirčev et al. (2009)	
Spain	R. Santillana	\$	microcystin	9.99-55.02	Carrasco et al. (2006)	
	R. Valmayor	\$	microcystin	1.2		
	R. Picadas	\$	microcystin	1.3		
	R. Oros	⌘, \$	microcystin	1.6*		
	R. Cenajo	⌘	microcystin	3*		
Tunisia	D. Lebna	⌘	microcystin-LR	5.485	El Herry et al. (2008)	
Turkey	L. Kovada	⌘, £, \$	microcystin-LR	0.73-48.5	Gurbuz et al. (2009)	
United States	L. Pinto	£	microcystin-LR	100	Miller et al. (2010)	
	San Francisco estuary	⌘	microcystin-LR	0.02	Lehman et al. (2007)	
	L. Doctors	£	microcystin-LR	1	Stewart et al. (2006)	
	L. Seminole	£	anatoxin-a	1		
	-	-	cylindrospermospin	100	Falconer and Humpage (2006)	
	St Johns river	£	microcystin-LR	0.1-31	Williams et al. (2007)	
			cylindrospermospin	0.07-1.6		
	L. Bufalo Springs	£	microcystin-LR	0.41-1.78	Billam et al. (2006)	
	L. Ransom Canyon	£	microcystin-LR	0.44-1.08		

About location: **L.** for lake, **R.** for reservoir, **D.** for dam. About use of water: (\$) for drinking supply, (£) for recreational activities, and (⌘) for agriculture (irrigation and pasture) and aquaculture. "-" absence of information.

#### 1.4.2. Fate in aquatic and soil ecosystems

Once they enter in aquatic and soil ecosystems, cyanotoxins can be removed according to various processes such as photochemical degradation by UV, adsorption in particles in suspension or onto sediments, and biodegradation (Tsuji et al., 1994; Rapala et al., 1994; Lahti et al., 1996; Chiswell et al., 1999; Welker and Steinberg, 1999; Kaebernick and Neilan, 2001; Mazur-Marzec et al., 2006; Wormer et al., 2008; Burns et al., 2009; Klitzke et al., 2010, 2011; Thirumavalavan et al., 2012). However, the four groups of cyanotoxins: hepatotoxins, neurotoxins, cytotoxins, and dermatotoxins, exhibit quite different chemical stabilities in these ecosystems. Hepatotoxin cyclic peptide cyanotoxins, microcystins and nodularins, are extremely stable compounds and may persist in aquatic systems for weeks after being released from the cells (Jones and Orr, 1994; Chen et al., 2008; Edwards et al., 2008). According to other studies, these toxins in natural conditions could persist for several months or years (Harada et al., 1996; Sivonen and Jones, 1999). However, numerous studies reported that photochemical degradation by sunlight UV and exposure to degrading bacteria may speed up their removal from the water (Bourne et al., 1996; Heresztyn and Nicholson, 1997; Sivonen and Jones, 1999; Park et al., 2001; Song et al., 2009; Ho et al., 2012). The photodegradation of MCs in full sunlight can take as little as two weeks or longer than six weeks, depending on the presence of water-soluble cell pigments (Tsuji et al., 1994; Welker and Steinberg, 2000). More recently, Thirumavalavan et al. (2012) showed in a laboratory experiment that the presence of humic acid and turbidity affected the photo-degradation process. Additionally, in sea water the rate of nodularin photolysis can be accelerated by the presence of some cell components and humic substance (Welker and Steinberg, 1999). Conversely, during the benthic phase, the photodegradation of these cyanotoxins is expected to be almost negligible due to low radiation penetration (Wörmer et al., 2010). In fact, Welker and Steinberg (2000) found that the half-life of MCs in the deep lakes is longer than the season of cyanobacteria growth, what suggests that the photolysis is significant only for shallow lakes. The alkaloid

cytotoxin, CYN, is relatively stable in the dark; however, in sunlight and in the presence of cell pigments degradation occurs quite rapidly with more than 90% within 2–3 d (Chiswell et al., 1999). The neurotoxin, anatoxin-a, is also relatively stable in the dark, but it undergoes rapid photochemical degradation in sunlight particularly in alkaline conditions, even in the absence of cell pigments (Stevens and Krieger, 1991; Smith and Sutton, 1993). However, no data are available for other cyanobacterial neurotoxins and lipopolysaccharides dermatotoxins. Cyanotoxins can also be retained on suspended particles or onto sediments in aquatic systems. Wörmer et al. (2011) showed the great importance of sedimentation processes in the fate of MCs in freshwaters with an amount of toxin associated to settling particles to be in the range of  $\text{mg d}^{-1} \text{ m}^{-2}$ . But other studies reported that no more than 20% of toxins can be adsorbed on sediments (Rapala et al., 1993; Lahti et al., 1996). Furthermore, it was suggested that the removal of cyanotoxins in this process was the result of both adsorption and biodegradation (Lahti et al., 1996). Therefore, biodegradation would appear to be the main fate for most cyanotoxins in aquatic systems and the relative performance of this process would be very site specific and dependent upon local sediment characteristics and microbial activity. It was recently reported that the data generated in laboratory and field studies strongly indicate that, in shallow lakes, low persistence and natural eliminations of MCs are due to biodegradation; suggesting that sediments play a crucial role in biodegradation by continuously supplying toxin-degrading bacteria to the water column (Chen et al., 2008; Mazur-Marzec et al., 2009; Chen et al., 2010). However, in deep sediments, biodegradation might be limited due to anoxic conditions (Grützmacher et al., 2002; Holst et al., 2003; Grützmacher et al., 2009) and sediments only bring nutrients for bacteria responsible of cyanotoxins biodegradation. Degradative heterotrophic bacteria of hepatotoxic cyanotoxins (MCs and NOD), and cytotoxins (CYN) have been found in various media, such as water columns (Jones and Orr, 1994; Cousins et al., 1996; Christoffersen et al.,

2002; Hyenstrand et al., 2003; Lemes et al., 2008; Mazur-Marzec et al., 2009; Chen et al., 2010), sediments (Rapala et al., 1994; Holst et al., 2003), sewage effluents (Lam et al., 1995) or soils (Miller et al., 2001; Grützmacher et al., 2002), with specific enzymatic pathways well characterized (Bourne et al., 1996; Okano et al., 2009; Zhang et al., 2010). Several previous studies have been indicated that MCs can be degraded by aquatic bacteria identified as pertaining especially to the genus *Sphingomonas* (Bourne et al., 1996; Harada et al., 2004; Ishii et al., 2004; Maruyama et al., 2006; Manage et al., 2009). Therefore, a microcystin-degrading gene cluster, mlrA, B, C and D was identified in these microorganisms, sequenced and the degradation process was proposed (Bourne et al., 2001; Saito et al., 2003; Imanishi et al., 2005). In the last two decades, several other species of bacteria capable of degrading peptidic cyanotoxins were identified, *Sphingomonas* sp. strain ACM-3962 (Jones and Orr, 1994), *Paucibacter toxinivorans* (Rapala et al., 2005), *Sphingosinicella microcystinivorans* (Maruyama et al., 2006), *Burkholderia* sp. (Lemes et al., 2008). The most toxic congener, Microcystin-LR, was also found susceptible to breakdown by *Sphingomonas*, which initiated ring-opening and the production of a linear compound 200 times less toxic (Bourne et al., 1996). Recently, Ho et al. (2012) identified another bacterium strain (TT25) whose genome is similar to *Sphingopyxis* sp. that it is able to degrade MCs. The ability of these all species to degrade other congeners of MCs and NODs was investigated and revealed that peptides with the Adda–Arginine bond were successfully degraded while MC-LF, with Adda–Phenylalanine bond and 6(z)-Adda-MC-LR and 6(z)-Adda-MC-RR were not significantly degraded (Imanishi et al., 2005). Another Japanese *Sphingomonas* isolate, 7CY, was shown to degrade a wider range of MCs, including MC-LR, -RR, -LY, -LW, and -LF but it was unable to degrade NOD-Har a NOD analog where arginine is replaced by homoarginine (Ishii et al., 2004). Biodegradation has also been shown to be an important process for the removal of the alkaloid cytotoxin, CYN, from contaminated water (Chiswell et al., 1999; Senogles et al.,

2002). By contrast, a laboratory study investigating biodegradation of CYN with bacterial communities from two water bodies in Spain, one having frequent exposure to CYN, the other rarely, has been shown that biodegradation of this toxin by an active microbial community does not take place during a 40-d (Wormer et al., 2008). A recent study demonstrated that CYN was degraded by indigenous microbial flora in waters with a history of *Cylindrospermopsis* blooms (Smith et al., 2008). Despite isolation of many bacteria from CYN enriched cultures, only a single isolate (*Delftia* sp.) capable of degrading CYN has been obtained (Smith, 2005). However, for cyanobacterial neurotoxins there are few reports on their persistence and biodegradation compared to cyanobacterial hepatotoxins, although the increasing occurrence of these toxins in surface waters. A recent study indicated that saxitoxins are predisposed to bacterial degradation during passage through bioactive treatment plant (Kayal et al., 2008). However, this study showed that structural modification during the biological treatment resulted to decrease of the predominant saxitoxin gonyautoxins variants and an increase in variants of gonyautoxins 2 and 3 which are more toxic than the C-toxins. Early work by Kiviranta et al. (1991) reported the isolation of a *Pseudomonas* sp. capable of rapid degradation of anatoxin-a, with a rate of 6–30 mg mL<sup>-1</sup> per 3 d. A later study reported by Rapala et al. (1994) has been shown the removal of anatoxin-a by microbial populations isolated from water and sediments of a eutrophic, oligotrophic, and humic lake. In conclusion, the period of photodegradation of cyanotoxins is relatively long in comparison to the degradation caused by the microbial activity. Recently, Hu et al. (2012) found that the *Bacillus* sp. strain EMB is able to completely remove 2.99 mg L<sup>-1</sup> of MC-RR and 2.15 mg L<sup>-1</sup> of MC-LR within 24 h. However, the biodegradation speed of cyanotoxins in aquatic ecosystems can be influenced by the initial concentration and nature of toxins (Edwards et al., 2008; Ho et al., 2012) and by additional factors such as the water temperature (Park et al., 2001; Ho et al., 2007; Smith et al., 2008; Hoefel et al., 2009) and the bacterial community

composition within the water body; not only the types of organisms present, but also their abundance (Hoefel et al., 2009; Ho et al., 2012). Hoefel et al. (2009) have demonstrated a direct relationship between the abundance of degrading organisms and the rate of degradation of MC-LR. Furthermore, although MCs are degraded by most of bacteria species, it seems that a lasting day's delay or weeks are necessary before the degradation is introduced. This result was in agreement with the conclusion of Hyenstrand et al. (2003) indicating that bacteria species have to adapt themselves at first to the cyanobacteria metabolites before the degradation of MCs becomes effective. Indeed, the results of this last study indicate a weaker degradation of the MC-LR in May compared with September where the occurrence of cyanobacteria is higher. Similarly, Smith et al. (2008) found that CYN was degraded by indigenous microbial flora in waters with a history of *Cylindrospermopsis* blooms. The physicochemical fate and the environmental concentrations of cyanotoxins in soil have been the subject of a range of recent studies. Several classes of these toxins have been detected in field soils, and the sorption behavior and degradation and transfer to vegetables have been studied to a large extent (Morris et al., 2000; Miller et al., 2001; Chen et al., 2006b; Bibo et al., 2008; Sathishkumar et al., 2011). The use of water from sources containing cyanobacterial blooms and toxins for spray irrigation of terrestrial plants, including food crop plants presents both a harmful effect on growth and development of plants and on soil ecosystems and potential health hazards through several exposure routes, including uptake into the food chain and accumulation of toxins on the external surfaces of edible plant material. Questions, therefore, arise about the persistence of total cyanotoxins (dissolved and within the cyanobacterial cells) when reach the soil ecosystem to produce phytotoxic effects. Once reach the soil ecosystem, cyanotoxins persist in the environment, depending on the efficiency of degradation (i.e., photolysis, hydrolysis and bacterial degradation). Microcystins can persist in agriculture soils for relatively long times, with a half-life ranging between 6 and 17.8 d (Chen

et al., 2006b). Jones et al. (1995) reported that scums of *M. aeruginosa* that dry on the shores of lakes may contain high concentrations of MCs for several months. Recently, Metcalf et al. (2012) found that MCs were detected in herbarium specimens of cyanobacteria which had been collected from aquatic and terrestrial environments in 11 countries throughout the world, dried, and stored at ambient temperatures in the dark for up to 170 years. Microcystins were also detected by HPLC and ELISA assays in desert crust samples from Qatar at concentrations between 1.5 and 53.7 ng g<sup>-1</sup> dry weight (Metcalf et al., 2012). Thus, the persistence of these toxins within dried cyanobacterial cells for long period suggests that they will be released back into the soil when re-immersed by irrigation water, particularly when cyanobacterial blooms are used in some countries as an organic fertilizer Chen et al., (2006a,b). However, as mentioned above for aquatic ecosystems, adsorption on sediments and specially exposure to degrading bacteria may also speed up their removal from the soil. The information on the adsorption of cyanotoxins in agriculture soil ecosystems is particularly scarce. However, adsorption of cyanobacterial hepatotoxins was measured in several batch studies to determine the applicability of bank filtration as an efficient removal strategy of these toxins from drinking water. For example, in batch experiments Miller et al. (2001) studied the adsorption of cyanobacterial hepatotoxins, MC-LR and NOD, in five soils with different physicochemical properties collected from regions around South Australia. They found that the soils with the high clay and/or organic carbon contents had the higher toxins adsorption coefficients. In similar experiments, Miller and Fallowfield (2001) found that the soils with the highest organic carbon content (2.9%) and the highest clay content (16.1%) were the most effective at removing these toxins in batch experiments. However, the sandy soil (98.5% sand) was incapable of the removal of cyanotoxins. This finding was supported by Morris et al. (2000) who reported that the clay content and its quality may be more important for the adsorption than other soil characteristics. However, Eynard et al. (2000)

suggested that soil was unable to protect groundwater from cyanotoxins that originated from surface waters. Thus, it seems that cyanotoxins sorption in soils is low and could potentially result in their high bioavailability to soil organisms and plants. In several studies, it seems that the major dissipation process for cyanotoxins in soil ecosystems is mainly via microbial degradation (Miller and Fallowfield, 2001; Chen et al., 2006b). In fact, numerous soil bacteria as *Arthrobacter* sp., *Brevibacterium* sp. and *Rhodococcus* sp. are able to breakdown MCs (Manage et al., 2009). Bourne et al. (2001) observed the same thing with *Sphingomonas* sp. that possesses a gene cluster involved in the degradation of MC-LR. Furthermore, Falconer et al. (1983) and Lambert et al. (1996) conclude that sand filtration alone is unable to remove dissolved cyanotoxins. However, slow sand filters can be expected to remove 99% of dissolved cyanotoxins (Keijola et al., 1988; Grützmacher et al., 2002). This can be explained by the formation of a biofilm on top of the filter that it allows for some biodegradation of cyanotoxins in slow sand filtration. No data are available for other cyanoabcterial toxins such as neurotoxins and dermatotoxins, but some degradation may be expected, again depending on the chemical conditions of soil. In conclusion, the scarce results on the fate of cyanotoxins in soil ecosystems are very variable, which do not allow affirming with certainty the necessary time for a complete disappearance of these toxins. This variability ensues partially from used methods (e.g. studies led in laboratory with non environmental concentrations of toxins and in free-soil systems). Therefore, the fate of cyanotoxins in soil ecosystems will require more studies before we are capable to formulate an opinion on their persistence and uptake into the food chain.

### **1.5. Phytotoxicity effects of cyanotoxins**

The information on the effects of cyanotoxins on non-target organisms in the terrestrial environment is particularly scarce. However, despite the impressive amount of information on their toxicity on mammals compiled during the last two decades, there are still serious gaps in the knowledge about the phytotoxicity of these toxins. The phytotoxic effects of cyanotoxins on higher plants were firstly focused on aquatic photoautotrophic organisms (algae and macrophytes) that are naturally exposed to cyanotoxins (Harper, 1992; Papke et al., 1997; Weiss et al., 2000; Yu et al., 2000; Ikawa et al., 2001; Pietsch et al., 2001; Mitrovic et al., 2004; Ha and Pflugmacher, 2013). Since few years, scientists were also interested by the effect of these toxins on terrestrial plants because, irrigation waters from sources containing cyanobacterial blooms and toxins are generally used without treatment for spraying agricultural crops and plants that might, therefore, induce a food chain contamination with a considerable health risk and potential economic losses.

#### **1.5.1. Neurotoxins**

The cyanobacterial neurotoxins have not received more research attention than have cyanobacterial hepatotoxins. This is a consequence of the many livestock deaths caused by cyanobacterial species producing hepatotoxic microcystins and their more widespread occurrence rather than species producing neurotoxins (Ettoumi et al., 2011). In addition, the recent inclusion of microcystin-LR as a toxic chemical in the World Health Organisation drinking water guidelines has further accelerated investigation of the toxic effects of microcystins on mammals and vegetables rather than cyanobacterial neurotoxins. Therefore, there are only few studies reported in the literature on the effects of cyanobacterial neurotoxins on crops and plants. Mitrovic et al. (2004) were exposed the free-floating aquatic plant *L. minor* and the filamentous macroalga *Chladophora fracta* to anatoxin-a at 0.1–25  $\mu\text{g L}^{-1}$  under laboratory conditions for 4–7 d. They found in both organisms significantly increase

of peroxidase activity after 4 d exposure at 25  $\mu\text{g L}^{-1}$  but not at lower concentrations. After 7 d exposure to this neurotoxin significant increase of glutathione-S-transferase activity and reduction of photosynthetic oxygen production were observed at 5 and 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  but not at lower concentrations in *L. minor*. In addition, [Ha and Pflugmacher \(2013\)](#) reported that this alkaloid neurotoxin at an environmentally relevant concentration (15  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), induced phytotoxic effects on the submerged aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum*, mediated by oxidative stress. Recently, [Esterhuizen-Londt et al. \(2011\)](#) investigated *in vitro* study the effect of BMAA at different environmentally concentrations (0.5, 1, 5, 50 and 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) for 24 h on the oxidative stress responses of the macrophyte *C. demersum*. The most pronounced effects found were activity-inhibiting effects on all the oxidative stress response enzymes at all exposure concentrations. However, enzymes not related to oxidative stress response were not affected by the BMAA in these experiments. For other neurotoxins, the literature search did not yield any results.

### 1.5.2. Hepatotoxins

The effects of cyanoabcterial toxins on photoautotrophic organisms have been most intensively studied for MCs, in line with their abundance and their mode of action. First experiments were focused on the ability of these hepatotoxins to act as general allelopathic compounds against planktonic microalgae, macroalgae and macrophytes in aquatic ecosystems. The allelopathic effects of *Aphanizomenon* and other cyanobacteria bloom formers on chlorophyte species are early documented in several studies ([Lefevre et al., 1950](#); [Tassinay and Lefevre, 1971](#); [Boyd, 1973](#)). Subsequently, [Ikawa et al. \(2001\)](#) and [Papke et al. \(1997\)](#) observed that cyanobacterial metabolites can induce the growth inhibition of the green alga *Chlorella pyrenoidosa* and the photosynthesis of other cyanobacteria species, respectively. Similarly, [Sukenik et al. \(2002\)](#) found that *Microcystis* sp., a MCs producer, severely inhibited the growth of the freshwater dinoflagellate *Peridinium gatunense* in mixed

laboratory cultures which was attributed to the excretion of allelopathic substances rather than to successful competition for nutrients. [Hu et al. \(2005\)](#) found that the growth of *Synechococcus elongatus* was reduced by 53.6% after 6 d of exposure to 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  of MC-RR suggesting that oxidative stress manifested by elevated reactive oxygen species levels and malondialdehyde contents might be responsible for the toxicity of MC-RR to this species. Moreover, [Singh et al. \(2001\)](#) demonstrated that MCs are strongly algicidal and point to the possibility that they may have an important role in establishment and maintenance of toxic blooms of *M. aeruginosa* in freshwater ecosystems. [Valdor and Aboal \(2007\)](#) demonstrated the inhibitory effect of both cyanobacterial extracts and pure MCs on the growth of microalgae. [Bártová et al. \(2010\)](#) examined effects of semipurified *Microcystis* extract containing MCs (0.2–20 nM) on age-induced cell differentiation of the filamentous cyanobacterium *Trichormus variabilis* and they found that heterocyst and akinete formation was significantly decreased after exposure to extract containing 2 or 20 nM of MCs within 10 d of exposure. Recently, [Perron et al. \(2012\)](#) evaluated the effect of four microcystins standards (variants MC-LF, -LR, -RR, -YR) at different concentrations (0.01–10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) and 0.01, 0.1, and 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  equivalent microcystins extracted from *Microcystis aeruginosa* (CPCC299), which is known to produce mainly MC-LR, on the fluorescence of four green algae (*Scenedesmus obliquus* CPCC5, *Chlamydomonas reinhardtii* CC125, *Pseudokirchneriella subcapitata* CPCC37 and *Chlorella vulgaris* CPCC111) and how they can affect the flow of energy through photosystem II. Their results showed that MCs affect the photosynthetic efficiency and the flow of energy through photosystem II from 0.01  $\mu\text{g mL}^{-1}$  within only 15 min and that MC-LF was the most potent variant, followed by MC-YR, -LR and -RR. It was also noticed that in eutrophic freshwaters dominated by cyanobacteria, a decrease in species diversity and in the growth of macrophytes often occurs ([Harper, 1992](#); [Weiss et al., 2000](#); [Yu et al., 2000](#); [Pietsch et al., 2001](#)). [Casanova et al. \(1999\)](#) found that the

abundance and the variety of macrophytes are reduced in the presence of cyanobacterial blooms. In Kirpenko (1986) showed for the first time the inhibition growth of water plants *Elodea* and *Lemna* by MCs isolated from a natural bloom. This allelopathic action was recently confirmed by Weiss et al. (2000) further to the coculture of the plant *Lemna minor* with the cells of *M. aeruginosa*. Moreover, Pflugmacher (2002) revealed that MC-LR induces allelopathic effects on the aquatic macrophytes such as *C. demersum* and *Myriophyllum spicatum*, resulting in growth inhibition, reduction in photosynthetic oxygen production, and changes in pigment pattern. Jang et al. (2007) found by examining cyanobacterial toxin production in response to direct exposure to an axenically cultured aquatic plant (*Lemna japonica* Landolt) using two toxic monoclonal strains of *M. aeruginosa* Kuzing (NIES strains 103 and 107) that reciprocal allelopathic responses have been observed between these two species *Microcystis* and *Lemna*. In several other studies, it occurred that MCs have the potential to exert toxic effects on growth and physiological processes, which all might be related to the inhibition of protein phosphatase activity or oxidative stress in aquatic moss (Wiegand et al., 2002) and in higher aquatic plants such as *Lemna gibba* (Saqrane et al., 2007), *Lemna* genus (Mitrovic et al., 2005), *L. japonica* (Jang et al., 2007), *Spirodela oligorrhiza* (Romanowska-Duda and Tarczyńska, 2002), *Phragmites australis* (Yamasaki, 1993; Máthé et al., 2009; Jámbrík et al., 2011), and *C. demersum* (Pflugmacher, 2004). There are also several indications that terrestrial plants, including food crop plants, can be altered by MCs present in irrigation waters, resulting principally to their serine/threonine phosphatases inhibition and reactive oxygen species (ROS) production. Sheen (1993) found that the marine phycotoxin okadaic acid, a potent inhibitor of serine/threonine protein phosphatases like MCs, efficiently blocks chlorophyll accumulation induced by light in etiolated maize leaves. It seems also that this phycotoxin blocks root hair growth and alter cortical cell shape of *Arabidopsis thaliana* L. at 3 nM (Smith et al., 1994). Takeda et al. (1994) found that okadaic

acid and MC-LR, inhibitors of protein phosphatases type 1 and 2A block the sugar-inducible gene expression in petioles of sweet potato *Ipomoea batatas*. Similarly, Siegl et al. (1990) reported that *in vivo* these toxins prevented the light-induced activation of sucrose-phosphate synthase that is generally activated by dephosphorylating by protein phosphatase 2A, and decreased sucrose biosynthesis and CO<sub>2</sub> fixation in spinach leaves. Yin et al. (2005) reported that MC-LR at 5 mg L<sup>-1</sup> is able to cause oxidative damage resulting in lipid peroxidation and decrease of glutathione GSH content and increases of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities on *A. thaliana* cells. Later, Stüven and Pflugmacher (2007) provide further evidence that cyanobacterial toxins as well as cyanobacterial crude extract containing MC-LR induce oxidative stress response in *Lepidium sativum* seedlings, manifested by lipid peroxidation, elevation of alpha- and beta-tocopherol concentrations and elevated activities of antioxidative enzymes like the glutathione peroxidase, glutathione S-transferase and glutathione reductase. El Khalloufi et al. (2012) showed that 30 d exposure of *Lycopersicon esculentum* to a cyanobacterial crude extract containing 2.22–22.24 µg MCs mL<sup>-1</sup> caused enhancement on peroxidase activity and phenolic content indicated that the extract caused an oxidative stress. The exposure of rice plants (*Oriza sativa*) to toxic *M. aeruginosa* cyanobacterial extracts containing 50 µg MC-LR L<sup>-1</sup> resulted in a significant increase in the glutathione-S-transferase activity in leaves of this plant (Prieto et al., 2011). Therefore, by acting as protein phosphatase inhibitors and inducers of reactive oxygen species production, MCs could be involved in several physiological and molecular processes in higher terrestrial plants.

### 1.5.3. Cytotoxic alkaloids

Cylindrospermopsin, a protein synthesis inhibitory cyanobacterial cytotoxin also led to a clear growth inhibition and anatomy modification through the alteration of microtubules organization of the common reed *P. australis* at concentrations 0.5–40 µg mL<sup>-1</sup> (Beyer et al.,

2009). Previous study demonstrated that CYN inhibited the growth of *Sinapsis alba* mustard seedlings at  $18.2 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Vasas et al., 2002). Short term exposure of rice plants (*Oriza s.*) to toxic *A. ovalisporum* cyanobacterial extracts containing  $0.13 \mu\text{g CYN L}^{-1}$  can lead to an increase of oxidative stress (increase in glutathione-S-transferase and glutathione peroxidase activities). Moreover, longer exposure periods can lead to tissue necrosis (loss of tissue fresh weight) concomitant with the oxidative stress. In addition, the plant exposure to a mixture of *A. ovalisporum* and *M. aeruginosa* cell extracts containing  $0.13 \mu\text{g CYN L}^{-1}$  and  $50 \mu\text{g MC-LR L}^{-1}$ , respectively, resulted in a significant increase in the glutathione-S-transferase and glutathione peroxidase activities, suggesting a synergistic effect of both extracts (Prieto et al., 2011).

### **1.6. Bioaccumulation of cyanotoxins in vegetable foods and consequences on animals and human health**

In aquatic ecosystems, several studies have been reported the bioaccumulation of cyanotoxins in common aquatic vertebrates and invertebrates, including zooplankton, mollusks and crustaceans, and fish, which pose a potential risk to both animal and human health if such aquatic animals are consumed (Ibelings and Chorus, 2007; Ettoumi et al., 2011). However, their ability to enter the food chain via agricultural crops has not been thoroughly investigated to date. Questions, therefore, arise about the health significance of spray irrigation of crops with water from sources containing cyanobacterial blooms and toxins. Nevertheless, several studies have been shown the accumulation potential of cyanotoxins in aquatic vegetable organisms, suggesting that terrestrial plants, including food crop plants, can also take up these toxins. Mitrovic et al. (2005) reported that the filamentous alga *C. fracta* accumulates MC-LR at a rate of  $8 \text{ ng g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . In addition, few amounts of MCs were detected in *C. vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda* cells only during the first 3 d of exposure, but not during the remaining period of the experiment, suggesting a possible

biotransformation of MCs in these algae (Mohamed, 2008). The emergent reed plant *P. australis* showed an apparent distribution of MC-LR in the different parts of the plant, after exposure to this toxin at  $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$  with highest uptake was detected in the stem and then the rhizome (Pflugmacher et al., 2001). In addition, *Lemna minor* has also been shown to accumulate MC-LR up to a concentration of  $0.2887 \pm 0.009 \text{ ng mg}^{-1}$  wet wt plant material, after 5 d of exposure to this toxin at  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  with an accumulation rate equivalent to  $58 \text{ ng g}^{-1} \text{ d}^{-1}$  (Mitrovic et al., 2005). However, Saqrane et al. (2007) reported that *L. gibba* could take up and biotransform microcystins. The chronic exposure of plant led to dose-dependent MCs accumulation which reached  $2.24 \mu\text{g g}^{-1}$  dry weight after being exposed to  $0.3 \mu\text{g mL}^{-1}$  of MCs (Saqrane et al., 2007). Recently, it has been shown that collected water chestnut (*Trapa natans*) from Lake Tai accumulated MCs at highest level up to  $7.02 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$  (Xiao et al., 2009). Terrestrial plants could be exposed to cyanobacterial toxins via the use of eutrophic water that may contain cyanobacterial blooms and toxins from irrigation and, therefore, they can take up cyanotoxins. Peuthert et al. (2007) have been reported that MC-LR could be absorbed by roots and be translocated from roots to shoots in seedlings of eleven agricultural plants. A second study by Crush et al. (2008) that used different species too, revealed a high level of MCs accumulation in lettuce (*L. sativa*) exceeding the tolerable daily intake of  $0.04 \mu\text{g kg}^{-1}$  of body weight  $\text{d}^{-1}$  recommended by the World Health Organization (Sivonen and Jones, 1999). However, the most of these studies have been performed in hydroponic conditions where the roots have been in direct contact with the toxin solutions and can, therefore, overestimate the bioaccumulation rate. In our knowledge the only study reported in the literature that was realized in soil showed that MC concentrations in roots did not exceed the tolerably limit, however, the concentration of MCs in aerial parts of the plant are not determined (Järvenpää et al., 2007). Both the roots and shoots of rice were reported to accumulate MC-LR in a laboratorial study (Chen et al., 2004). In addition, a recent study by

Chen et al. (2012) reported for the first time the accumulation of MC-LR in rice grains harvested from Lake Taihu in China. However, the concentration of MC-LR detected in rice grains was very low and thus may not pose threat to human health currently. In addition to the possibility of internal accumulation of MCs, irrigation may lead to accumulation of toxins on the external surfaces of edible plant materials when the contaminated water dries on the plant surface between irrigation periods or when the water becomes trapped in the centers of, for example, salad plants. In fact, Codd et al. (1999) have been reported that colonies and single cells of *M. aeruginosa* and microcystins were retained by salad lettuce after growth with spray irrigation water containing the microcystin-producing cyanobacteria. Recently, Kittler et al. (2012) reported that treatment of *Brassica oleracea* var. *sabellica*, *Brassica juncea*, and *S. alba* under varying experimental conditions showed significant CYN uptake, with CYN levels ranging from 10% to 21% in the leaves compared to the CYN concentration applied to the roots (18–35  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). These results suggest that crop plants irrigated with CYN-containing water may represent a significant source of this toxin within the food chain. However, further research is needed into the uptake and fate of microcystins and other cyanobacterial toxins by food plants and the persistence of these toxins in the edible plant materials.

### **1.7. Conclusion and future directions**

This review has established that cyanobacterial cells and toxins can be associated with crop plants after spray irrigation with water containing these agents. Therefore, the use of water from sources containing cyanobacterial blooms and toxins for spray irrigation of crop plants may not only inhibit growth of plants, but also can induce a food chain contamination with a considerable health risk and potential economic losses. Several studies have been shown that cyanotoxins could be absorbed by roots, transported to shoots, and then be translocated to grains and/or fruits. Nevertheless, the concentration of MC-LR detected, for example, in rice grains was very low and thus may not pose a threat to human health

currently. Cyanotoxins could be partially metabolized during the long distance transportation from roots to grains or fruits, which may resulted in the lower level of cyanobacterial hepatotoxins type microcystins detected in rice grains. In addition, MCs could bind to serine/threonine phosphatases during transport and thus could also affect their accumulation in grains and fruits. Therefore, further investigations are needed into the uptake and fate of microcystins and other cyanobacterial toxins by food plants during the totally period of vegetative and fruit development. However, there are gaps remaining concerning information on the future of cyanotoxins in soil in term of speciation, persistence, mode of degradation and impact on biological life in soils. The results of many existing tests and particularly laboratory studies on phytotoxicity of cyanotoxins are done in soil-free systems and using non realistic environmental concentration of toxins. Therefore, they are difficult to compare to field studies because both abiotic (e.g., soil conditions) as well as biotic (composition of the degrading biological community) factors can influence the outcome of such studies. In order to assess the relevance of phytotoxicity of cyanotoxins and their bioaccumulation in crop plants in the terrestrial environment, further research seems thus appropriate.

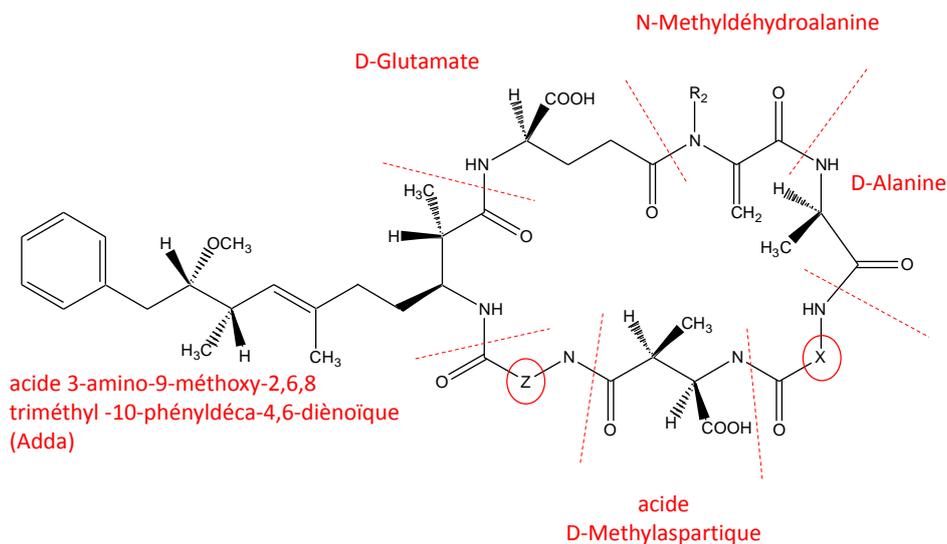
## **Chapitre 2 : Matériels et Méthodes**



## 2.1. Matériels

### 2.1.1. Cyanobactéries, souche *Microcystis aeruginosa* (PCC 7820)

La souche *Microcystis aeruginosa* PCC7820 a été utilisée pour l'obtention d'un extrait brut contenant différentes microcystines. Elle est issue de la collection de l'Institut Pasteur (Paris, France) et a été isolée en 1975 à partir d'un prélèvement dans le lac Balgavie Loch (Ecosse, Royaume-Uni). Cette cyanobactérie produit plusieurs cyanotoxines, qui sont toutes des hépatotoxines de type microcystine (**Figure 5**). La microcystine majoritairement produite est la microcystine leucine-arginine (MC-LR) comme décrit dans les travaux de [Robillot et al. \(2000\)](#) et [Gupta et al. \(2001\)](#).

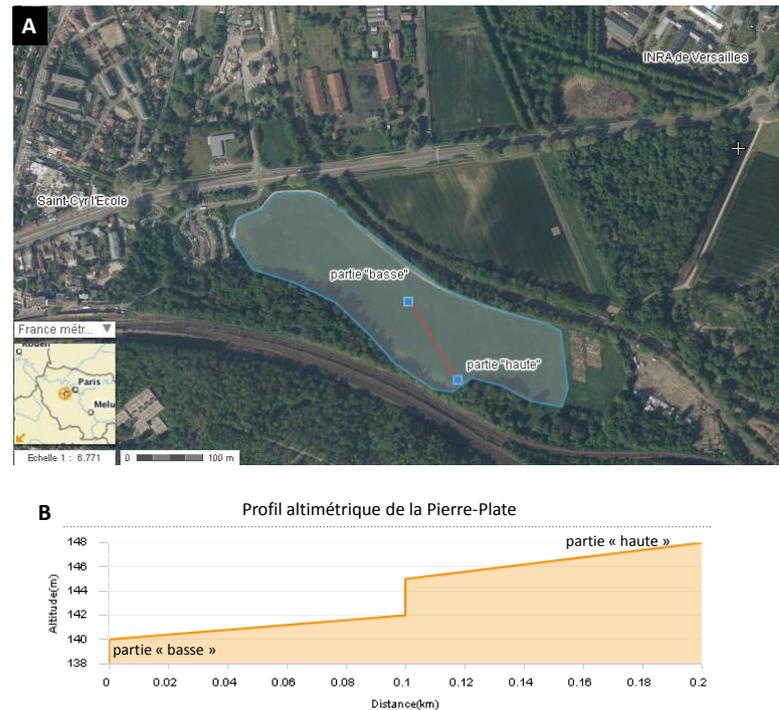


**Figure 5:** Structure chimique générale des microcystines constituées de 7 acides aminés dont X et Z sont les 2 acides aminés variables.

### 2.1.2. Sol utilisé pour l'ensemble des expérimentations

Le sol sélectionné pour nos expérimentations est issu du site expérimental de la Pierre-Plate (INRA, Versailles, France). Ce site expérimental est sous prairie permanente avec un léger dénivelé nous permettant de délimiter une partie « haute » et « basse » (**Figure 6**), ayant des caractéristiques texturales différentes. Dans notre étude, les prélèvements ont été effectués dans la partie « haute » (48° 47' 53.7066" N et E 2° 4' 51.366" E) du site. Seul l'horizon de

surface (0-15 cm) a été prélevé pendant la période estivale, en août 2012. Les caractéristiques du sol, inscrites dans le **Tableau 2** permettent de qualifier ce sol de sol sablo-limoneux identifié comme Luvic Cambisol/Cambisol (IUSS WRB, 2006). Les argiles sont majoritairement des illites/smectites.



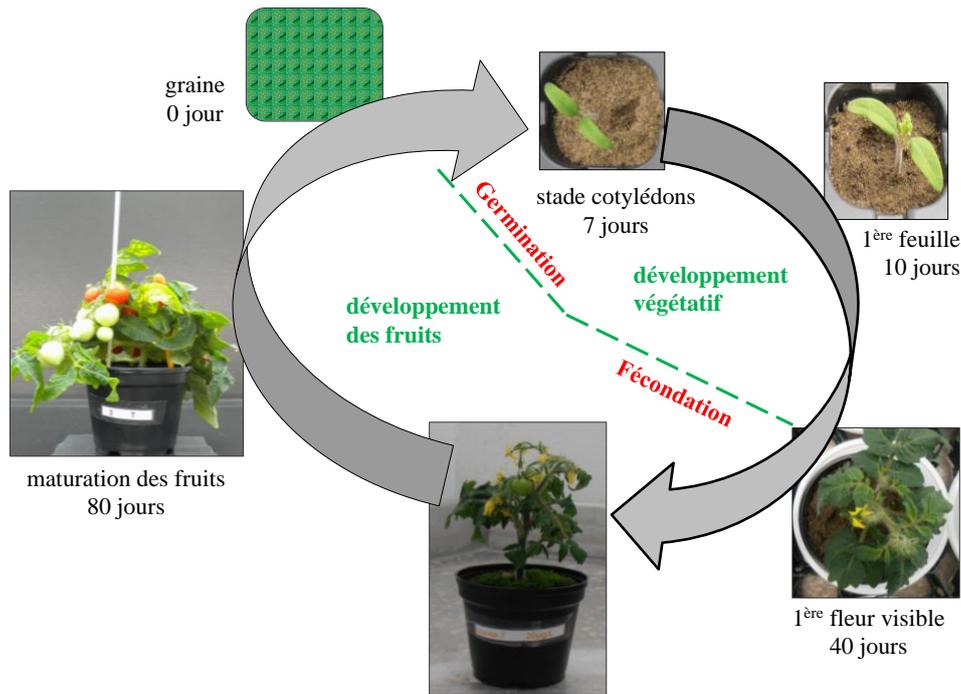
**Figure 6:** (A) Localisation sur une photographie aérienne (Géoportail) du site expérimental de la Pierre-Plate (Versailles, France) sous prairie permanente, délimité par le polygone bleu. Ce dernier peut être divisé en deux parties distinctes selon les altitudes visibles sur le profil altimétrique (trait rouge) (B) entre les deux points. Le sol utilisé provenait de la partie « haute » du site expérimental de la Pierre-Plate.

**Tableau 2:** Caractéristiques physicochimiques de l'horizon superficiel (0-15 cm) du sol du site expérimental de la Pierre-Plate (Versailles, France), partie "haute".

Pierre Plate « haut »	
Argiles (%)	11
Limons (%)	13
Sables (%)	76
MO (g kg <sup>-1</sup> )	38
pH	5,58
CRE (%)	35,5

### 2.1.3. Semences végétales utilisées

Le modèle végétal utilisé lors de ce projet scientifique est la tomate *Solanum lycopersicum*. Pour la variété, la tomate MicroTom a été choisie. Initialement créée pour des besoins d'ornement (Scott and Harbaugh, 1989) sa taille n'excède pas 15-20 cm de hauteur et son cycle de vie est court, environ 90 jours, ce qui en fait un modèle facile à étudier (**Figure 7**). La phase de reproduction de ces tomates a lieu au niveau des rameaux principaux avec l'apparition de « grappes » de fleurs appelées efflorescences de type cyme. Les fleurs de couleur jaune sont hermaphrodites enfermant à la fois les organes de reproduction mâles et femelles et la pollinisation se fait grâce à la vibration des plantes. Toutes les semences de tomates *Solanum lycopersicum* variété MicroTom proviennent de l'INRA d'Avignon (France).



**Figure 7:** Schéma représentant le cycle phénologique simplifié de la tomate *Solanum lycopersicum* variété MicroTom.

D'autres semences ont été utilisées afin de pouvoir comparer la toxicité de l'extrait de cyanobactéries obtenu avec d'autres espèces, notamment au travers de tests de germination. Des semences de blé tendre : *Triticum aestivum* Bio Atlass, de laitues : *Lactuca sativa* variété *capitata* ont été obtenues auprès de commerciaux français en semences, Semences de France (La Chapelle d'Armentières, France) et Vilmorin (La Méniltré, France), respectivement. Enfin, une autre variété de tomate *S. lycopersicum* variété Saint-Pierre fournie par Vilmorin (La Méniltré, France) a aussi été utilisée.

## 2.2. Méthodes

### 2.2.1. Cultures de *Microcystis aeruginosa* en milieu liquide

La souche *M. aeruginosa* PCC7820 est toujours repiquée en conditions stériles dans des Erlenmeyers de 6 L contenant 3 L de milieu de culture liquide BG<sub>11</sub> enrichi en nitrate de sodium (NaNO<sub>3</sub>, 2 mM) et en bicarbonate de sodium (NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM), préalablement stérilisés par autoclavage (120 °C, 20 min). De l'air filtré (0,22 µm Millipore, France) est

ensuite injecté afin de permettre un barbotage permanent du milieu de culture ( $Q_{\text{air}}=0,23 \text{ L min}^{-1}$ ). Les Erlenmeyers sont ensuite disposés dans une étuve, à 25 °C, équipée de deux tubes néons 8 Watts (Osram Sylvania, MA, USA) fournissant une intensité lumineuse de 5-10  $\mu\text{mol de photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  comme l'ont décrit [Gupta et al. \(2001\)](#). Après 3 semaines de culture, les cellules de cyanobactéries sont séparées du milieu de culture par centrifugation à 25 000  $g$  durant 5 min (Bekman Coulter, Pasadena, CA, USA). Les culots cellulaires sont ensuite récupérés et regroupés pour être congelés (-20 °C) avant d'être lyophilisés (environ 24 h) pour de plus amples extraction et analyse.

### 2.2.2. Extraction des microcystines de cyanobactéries

Après regroupement et lyophilisation des culots cellulaires, nous avons obtenu 1,43 g de matière sèche (MS). Le culot cellulaire est ensuite homogénéisé avec 150 mL de méthanol (MeOH) aqueux concentré à 75% (v/v). Le mélange solvant d'extraction et culot cellulaire lyophilisé est ensuite mis dans un bain à ultra-son pendant 3 min (Ultrasonic 300) avant d'être centrifugé à 6 000 rpm (10 min à 4 °C). Le surnageant est alors récupéré puis deux nouvelles extractions consécutives sont effectuées sur le culot résiduel, dans les mêmes conditions. Concernant la dernière extraction, après avoir mis le mélange dans le bain à ultra-son, la solution de MeOH aqueux 75% (v/v) est laissée incubée 12 h à 4 °C avant la dernière centrifugation et récupération du surnageant. Les 450 mL d'extrait brut de cyanobactéries, contenant différentes microcystines, sont alors conservés au congélateur (-20 °C) pour être utilisés dans les différentes expériences d'exposition.

### 2.2.3. Suivi de la croissance de *Microcystis aeruginosa* en milieu liquide

Certaines manipulations ont fait appel à des apports séquentiels de bicarbonate de sodium ainsi afin de connaître la dynamique de croissance de *M. aeruginosa* dans son milieu de culture en fonction de l'apport en bicarbonate de sodium et préparation de la MC-LR marquée

au carbone 14. Deux cultures de *M. aeruginosa* dans des Erlenmeyers de 6 L ont été mises en place à raison de 3 L de milieu stérile BG<sub>11</sub> enrichi en nitrate de sodium (2 mM). Le bicarbonate est quant à lui ajouté à raison de deux concentrations distinctes de 5 et 10 mM dans les Erlenmeyers que nous dénommerons E5 et E10. Le repiquage est ensuite réalisé à l'aide de 300 mL par Erlenmeyer de cyanobactéries issus d'un premier repiquage. Les deux cultures de *M. aeruginosa* sont ensuite placées en étuve à 25 °C dans les conditions de cultures décrites précédemment (cf. § 2.2.1). La croissance de la souche de *M. aeruginosa* dans les deux conditions est suivie par des dosages de la chlorophylle *a* tous les 2-3 jours pendant toute la durée de croissance de la souche. Ces dosages se font par prélèvement de 2 mL de culture, préalablement mélangée, à l'aide d'une seringue stérile et 3 répétitions ont été effectuées à chaque pas de temps. Ces échantillons de culture sont ensuite filtrés sur des filtres en fibre de verre de type GF/C (Whatman, United Kingdom) afin de récupérer les cellules de cyanobactéries. Le filtre est ensuite mis dans un tube contenant 5 mL d'acétone 90% (v/v), pendant 7 heures, à 4 °C dans l'obscurité. Après l'incubation, l'acétone contenant les chlorophylles est à nouveau filtré avant que la concentration en chlorophylle *a* ne soit dosée par spectrophotomètre à 630 nm, 645 nm et 663 nm. La turbidité est aussi vérifiée par la mesure de la densité optique à 750 nm. La concentration en chlorophylle *a* est alors exprimée en µg L<sup>-1</sup>, après avoir été calculée selon l'équation suivante (Unesco, 1966) :

$$Chl\ a = \frac{(11,64 \times Abs_{663}) - (2,16 \times Abs_{645}) - (0,1 \times Abs_{630}) \times v}{V \times l}$$

$v$  = volume d'acétone (en mL)

$V$  = Volume de l'échantillon filtré (en L)

$l$  = trajet optique (en cm)

#### 2.2.4. Quantification des microcystines par test d'inhibition de la protéine phosphatase de type 2A

La concentration en microcystines dans l'extrait de *Microcystis aeruginosa* est déterminée par le test d'inhibition de la protéine phosphatase de type 2A selon le protocole décrit par Bouaïcha et al., (2001). Une courbe étalon est réalisée en utilisant de la microcystine-LR purifiée (Novakits, France) à des concentrations comprises entre 20 et 1 000 pg mL<sup>-1</sup> permettant de déterminer la concentration en « équivalent MC-LR » (équi. MC-LR g<sup>-1</sup> MS). Brièvement, ce test consiste à mesurer la quantité de para-nitrophénol (p-NP) formée à partir de para-nitrophénol phosphate (p-NPP), à 37 °C, grâce à un lecteur microplaque Ceres 900 C (Bio-Tek, VT, USA). Le substrat p-NPP incolore forme, après action de l'enzyme, le p-NP, produit de couleur jaune. Le p-NPP (40 mM) est dilué dans du tampon phosphate composé de : 40 mM Tris-HCl, 34 mM MgCl<sub>2</sub>, 4mM EDTA et 4 mM Dithiothreitol à pH 8,3. La protéine phosphatase de type 2A (Novakits, France) est diluée à raison de 80 mU mL<sup>-1</sup> dans le tampon enzyme correspondant au tampon phosphate auquel est ajouté le sérum d'albumine bovine (0,5 mg mL<sup>-1</sup>). Tous les produits ont été obtenus auprès de Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA). Un volume de 2,5 et 10 µL d'extrait de cyanobactérie préalablement dilué par 50 dans du MeOH 50%, sont ajoutés dans du tampon Tris-HCl afin d'obtenir un volume final de 500 µL. Le mélange est ensuite réparti à raison de 100 µL par puits (n=4). Trois puits reçoivent 50 µL d'enzyme contenue dans le tampon enzyme alors que dans le dernier puits, correspondant au contrôle négatif, est ajouté 50 µL de tampon enzyme sans la PP2A. La plaque, recouverte de son couvercle, est ensuite agitée pendant 5 min sur un agitateur de microplaque, Microplate Genie (Scientific Industries Inc, NY, USA) et placée à l'étuve (37 °C) pendant 5 min. Le substrat est ensuite ajouté dans tous les puits. La plaque est à nouveau agitée puis mise à incuber à 37 °C pendant 1 h, avant d'effectuer la lecture à 405 nm. Toutes les mesures sont effectuées à raison de trois répétitions par échantillon.

### 2.2.5. Suivi de la dynamique de biosynthèse des toxines de cyanobactéries

Durant l'expérience de suivi de croissance de *Microcystis aeruginosa*, la toxicité de la culture et par conséquent la détermination de la quantité de toxines a pu être obtenue. Pour ce faire, 2 mL de solution étaient prélevés à chaque pas de temps, à raison de trois répétitions puis centrifugés à 13 000 rpm (5 min). Le surnageant (milieu de culture) était retiré et les tubes contenant le culot de cyanobactéries étaient congelés (-20 °C) avant lyophilisation, extraction et dosage des toxines par le test d'inhibition de la phosphatase de type PP2A (cf § 2.2.4. ).

### 2.2.6. Identification des microcystines par analyse en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

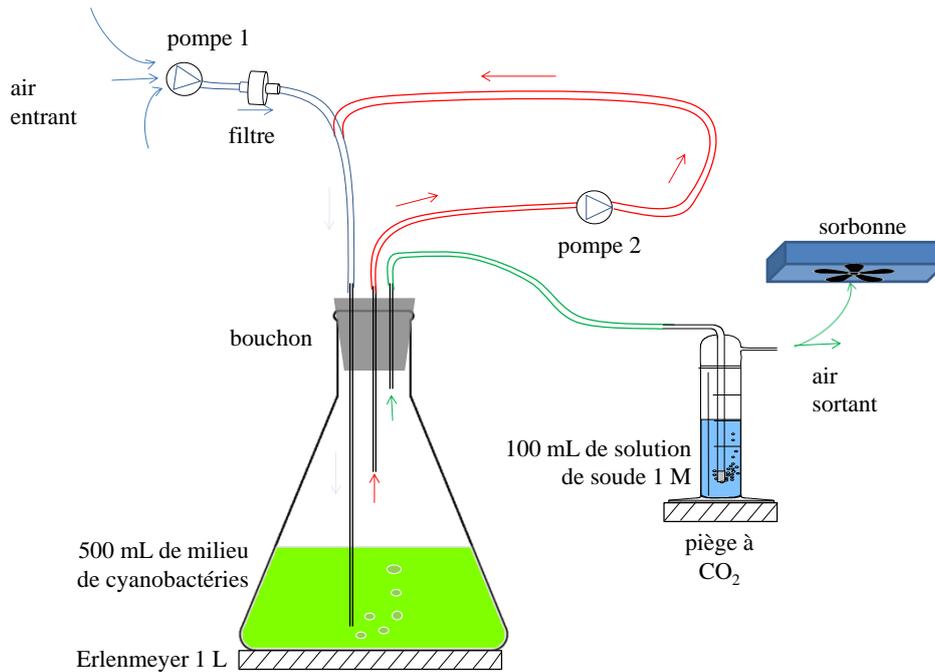
Afin d'identifier les différents congénères de microcystines présents dans l'extrait de *Microcystis aeruginosa*, une analyse par chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (UHPLC-MS/MS) via une interface de type électrospray a été réalisée. Nous avons utilisé un système « Waters Acquity Ultraperformance LC separations Module » couplé à un spectromètre de masse triple quadripôle Waters. La séparation chromatographique était effectuée sur une colonne Acquity UPLC BEH C18 (100 x 2,1 mm i.d., 1,7µm, Waters) avec un gradient linéaire (300 µL min<sup>-1</sup>) d'eau MilliQ + 0,1% acide acétique (solvant A) et d'acétonitrile + 0,1% d'acide acétique (solvant B). Le gradient commençait à 95% de solvant A, pour atteindre 45% après 7,5 min, puis 100% de solvant B à 8,5 min suivi d'un retour à 95% de solvant A à 9,6 min et maintenu pendant 4,5 min afin d'équilibrer la colonne. Le volume d'injection était de 5 µL. La source électrospray était utilisée en mode positif avec les réglages suivants : capillaire 3 kV, tension de cône 39 V, températures de la source et du gaz de désolvatation 120 °C et 300 °C respectivement. Les flux du gaz de désolvatation et du gaz du cône (azote) étaient respectivement de 800 L h<sup>-1</sup> et 20 L h<sup>-1</sup>. En mode spectre de masse (MS), les acquisitions ont été réalisées en mode spectre

complet entre 50 et 1200 Da. Les analyses MS-MS ont été réalisées en mode descendant en utilisant de l'argon pour induire la dissociation par collision (pression de 3,4 mbar). Les congénères de microcystines ont ensuite été identifiés sur la base des différents travaux de la littérature (Bateman et al., 1995; Robillot et al., 2000; Diehnelt et al., 2005, 2006; Xu et al., 2008; Ferranti et al., 2009; Miles et al., 2012) par comparaison de leurs temps de rétention en chromatographie liquide, de leurs ions pseudo-moléculaires et de leurs ions fragments.

### 2.2.7. Bio-synthèse des microcystines radioactives marquées au carbone 14

Les cultures de *Microcystis aeruginosa* permettant la synthèse des microcystines radioactives sont mises en place dans des Erlenmeyers d'une contenance d'1 L. A un volume de 500 mL de milieu de culture BG<sub>11</sub> stérile contenant 2 mM de NaNO<sub>3</sub><sup>-</sup> est ajouté 5 mM d'une solution de bicarbonate de sodium (NaHCO<sub>3</sub>), préalablement stérilisée (autoclavage, 20 min à 120 °C). Le milieu de culture est alors repiqué à l'aide de 50 mL d'une ancienne culture de *M. aeruginosa* en phase exponentielle, avant d'être mise à incuber 7 jours, sous barbotage d'air stérile permanent ( $Q_{\text{air}}=0,23 \text{ L min}^{-1}$ ) dans une étuve (25 °C) éclairée ayant pour cycle jour/nuit 16 h/8 h dont l'intensité de la lumière est de 5-10  $\mu\text{mol de photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Après cette période d'incubation, comme décrit par Hyenstrand et al. (2003) et Pflugmacher et al. (2001), une solution de bicarbonate de sodium marqué au carbone-14 : <sup>14</sup>C-NaHCO<sub>3</sub> (activité spécifique 37 kBq  $\mu\text{g}^{-1}$ ) obtenue auprès de la société American Radiolabeled Chemicals (Saint Louis, MO, USA) est utilisée. Elle est ajoutée à raison de 50  $\mu\text{L}$  le 7<sup>ème</sup>, 10<sup>ème</sup> et 13<sup>ème</sup> jour. Durant cette période et afin de connaître le rendement de biosynthèse de ces cultures de cyanobactéries, un montage hermétique est mis en place permettant de connaître la quantité de bicarbonate minéralisé en dioxyde de carbone radioactif, grâce à un piège à CO<sub>2</sub> contenant de la soude (1 M). D'autre part, une partie de l'air injectée pour le barbotage est composée de l'air prélevé dans l'enceinte de la culture elle-même, afin de réinjecter le carbone 14 dans la

solution et ainsi d'éviter une trop grosse perte de  $^{14}\text{C-CO}_2$  par minéralisation (**Figure 8**). Le 17<sup>ème</sup> jour, le milieu de culture est centrifugé (4 000 rpm, 10 min) afin de récupérer les cellules de cyanobactéries. Trois extractions sont alors effectuées sur les culots cellulaires tels que décrit précédemment à l'aide de MeOH 75% (v/v) (cf. § 2.2.2. ). Le bilan de la culture est estimé par scintillation liquide (cycle de 10 min) sur le milieu de culture et la soude, en utilisant un cocktail scintillant Optiphase Hisafe 2 obtenu auprès de Perkin Elmer (Waltham, MA, USA). Pour ce qui est des cellules de cyanobactéries, la quantité de radioactivité est mesurée en brûlant 500 mg de cyanobactéries sèches avec un Biological Oxidizer OX 700 (Zinsser Analytic, Frankfurt, Germany) paramétré à 900 °C pendant 5 min. Les flux d'oxygène et d'azote conduisaient le dioxyde de carbone marqué ( $^{14}\text{CO}_2$ ) dans un cocktail Oxysolve C400 (Zinsser analytic). Enfin, la quantité de radioactivité dans l'extrait de cyanobactéries, après les extractions, est obtenue par scintillation liquide.



**Figure 8:** Schéma du dispositif permettant la culture des cyanobactéries de la souche *Microcystis aeruginosa* (PCC7820) dans un milieu contenant du bicarbonate de sodium marqué au carbone 14. La pompe 1 permettait l'apport d'air exogène, stérilisé par filtration, dans le milieu de culture par barbotage permanent. La pompe 2 permettait de récupérer une partie de l'air interne à la culture pouvant contenir du carbone 14 minéralisé ( $^{14}\text{C-CO}_2$ ). Le circuit rouge permettait de mélanger l'air exogène à l'air interne à la culture. Le circuit vert quant-à-lui permettait de capturer une partie de l'air ambiant de la culture mis à buller dans un piège à  $\text{CO}_2$  avant d'être aspiré par un système de ventilation.

### 2.2.8. Purification de la MC-LR radiomarkée ( $^{14}\text{C-MC-LR}$ )

Afin de purifier la MC-LR radiomarkée contenue dans l'extrait de *Microcystis aeruginosa* obtenu après culture, l'échantillon a été passé sur une colonne Sep-Pack<sup>®</sup> C18 (Waters Corp., Milford, MA, USA) avec une vitesse de percolation d' $1 \text{ mL min}^{-1}$  préalablement conditionnée avec 20 mL de MeOH pur et 20 mL d'eau MilliQ, comme décrit par [Ramanan et al. \(2000\)](#). La colonne a ensuite été mise à sécher 5 min sous flux d'azote avant de procéder à l'élution avec 3 mL de MeOH acidifié avec de l'acide trifluoroacétique 0,1% (v/v). Après élution, l'échantillon semi-purifié contenant les microcystines est injecté sur une chaîne de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) équipée d'une colonne C 18 Kromasil (250 x 4,6 d.i., 5 $\mu\text{L}$ ) obtenue auprès de Macherey Nagel (Hoerd,

France). La phase mobile comprenait de l'eau (solvant A) et de l'acétonitrile (solvant B), acidifiés avec 0,05% de TFA. Le flux était de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . Le gradient commençait à 80% de solvant A pendant 10 min, puis une diminution à 60% de solvant A pendant 5 min, 20% de solvant A pendant 5 min et finalement 100% de solvant B durant 10 min. Le volume d'injection était de  $200 \mu\text{L}$  et l'absorbance de l'éluat était mesurée à 238 nm par un détecteur UV (Shimadzu SDD-10A) afin de récupérer le pic correspondant à la MC-LR. L'acétonitrile de l'éluat était ensuite évaporée sous flux d'azote et la quantité de radioactivité est obtenue par scintillation liquide à l'aide de  $50 \mu\text{L}$  de solution de MC-LR purifiée et de 5 mL de liquide à scintillation. Afin de pouvoir déterminer l'activité spécifique de la toxine, la quantité de MC-LR radiomarquée obtenue après purification est obtenue par analyse en chromatographie liquide avec une gamme réalisée avec un standard de MC-LR non radiomarqué (Sigma Aldrich).

### 2.2.9. Test de luminescence de bactéries *Vibrio fischeri*

Afin de caractériser la toxicité de l'extrait de cyanobactéries obtenu, un test d'inhibition de luminosité émise par des bactéries de type *Vibrio fischeri* NRRL B11177 (Microtox<sup>®</sup> test) a été choisi, conformément à la norme NF ISO 11348-3 (ISO, 2007). L'effet inhibiteur a été effectué après dilution dans une solution de chlorure de sodium à  $20 \text{ g L}^{-1}$  de l'extrait de cyanobactéries afin d'obtenir des concentrations finales de : 5, 20, 50 et  $100 \mu\text{g}$  équivalents MC-LR  $\text{L}^{-1}$ . L'inhibition des fonctions cellulaires des bactéries est visible par une diminution de l'intensité lumineuse émise par les bactéries. Ainsi cette dernière a été mesurée après 5, 15 et 30 minutes d'exposition et a été comparée à un contrôle. Les résultats de ces tests sont présentés avec la concentration efficace médiane ( $\text{CE}_{50}$ ) correspondant à la concentration en extrait de cyanobactérie permettant d'induire une baisse de l'intensité lumineuse émise par les bactéries de 50%, en comparaison avec le contrôle.

### 2.2.10. Prélèvement et préparation des microcosmes de sol

Le sol de la Pierre-Plate partie haute a été prélevé sur le terrain au mois d'août 2012 et aura permis d'effectuer l'ensemble des expérimentations décrites. Le prélèvement effectué, le sol a été séché à l'air ambiant (20 °C) puis tamisé (2 mm) avant d'être stocké. Les microcosmes de sols formés sont effectués dans des pots horticoles Teku® (Pöppelman, Rixheim, France) de diamètre 10 cm avec 350 g de sol sec. La taille des pots a été choisie afin de permettre un développement complet des plants de tomates MicroTom jusqu'à maturation des fruits. Les différentes ouvertures au fond du pot sont obstruées à l'aide de voile d'hivernage afin que le sol tamisé soit maintenu dans ces pots. Avant de disposer le sol dans les pots, le sol est mélangé puis quarté afin d'obtenir une certaine homogénéité du sol entre les pots.

### 2.2.11. Conditions expérimentales de culture et d'exposition en sol

Toutes les manipulations expérimentales avec cultures de plantes sur sol ont été effectuées à partir de semences de tomates *Solanum lycopersicum* variété MicroTom. Les semences ont été au préalable désinfectées, à raison de deux bains, dans une solution d'hypochlorite de sodium (1,6% de chlore actif) pendant environ 1 min, avant d'être rincées à l'aide d'eau MilliQ. Les graines sont ensuite plantées dans les cosmes de sol et ces derniers sont placés dans une chambre de culture régulée par un système Honeywell (Morristown, NJ, USA) dans laquelle les conditions d'éclairage consistaient en un cycle jour/nuit de 16 h/8 h avec des températures respectives de 26 °C/21 °C. L'éclairage était assuré par des tubes néons (Osram, Cool DayLight 865) fournissant une intensité d'éclairage de 160  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . L'humidité relative de l'air de la chambre était maintenue à environ 75-80% grâce à l'évaporation d'eau contenue dans des bacs pendant les phases d'éclairage et par un absorbeur d'humidité durant la nuit. Quelles que soient les manipulations effectuées, avant toute phase d'exposition, les microcosmes composés de sol sec sont ré-humectés à l'aide d'eau milliQ et

maintenus quotidiennement à 50% de la capacité de rétention en eau du sol pendant 15 jours. Après la phase de ré-humectation, les sols sont traités avec l'extrait de cyanobactéries dilué aux concentrations suivantes : 5, 20, 50 et 100  $\mu\text{g}$  équi. MC-LR  $\text{L}^{-1}$ . Les expositions se font par un arrosage quotidien à la surface du sol, de façon uniforme, afin de maintenir l'humidité des sols à 60-70%. Des témoins négatifs sont aussi mis en place avec la même concentration en MeOH aqueux que la plus forte concentration en extrait de cyanobactéries. Celle-ci n'excède pas 3,5‰ (v/v), en concentration finale. Les durées d'exposition varient entre 14 et 90 jours selon que l'on ait effectué une expérimentation dite « à court terme » ou à « long terme ».

Pour la manipulation de courte durée, impliquant une exposition de 14 jours et consistant en un protocole pour voir l'effet d'un sol contaminé sur la croissance des plantules de tomates, l'extrait de cyanobactéries a été dilué dans de l'eau MilliQ et 3 cosmes de sols ont été réalisés pour chacune des 4 concentrations en extrait de cyanobactéries (5, 20, 50 et 100  $\mu\text{g}$  équi. MC-LR  $\text{L}^{-1}$ ) ainsi que 3 témoins négatifs. Dans chaque cosme de sol, 10 graines ont été semées après la phase de ré-humectation.

Pour ce qui est de la manipulation à long terme, 90 jours, l'extrait de cyanobactéries a été dilué dans une solution nutritive obtenue à partir d'engrais soluble Plant-Prod, N-P-K (15-10-30) à 0,75  $\text{g L}^{-1}$ , provenant du commercial Fertil (Boulogne-Billancourt, France). Cinq répétitions ont été effectuées pour le contrôle négatif et chacune des 4 concentrations suivantes : 5, 20, 50 et 100  $\mu\text{g}$  équi. MC-LR  $\text{L}^{-1}$ . Après, 1 mois et demi les premières fleurs apparaissent. La pollinisation est effectuée par vibration manuelle des fleurs afin d'induire leur fécondation et cela dès que de nouvelles fleurs apparaissent sur les efflorescences.

Après les différentes périodes d'expositions, chaque échantillon de sol est mélangé et homogénéisé avant que deux aliquotes de sol frais soient utilisées pour les mesures d'activités enzymatiques et la nitrification potentielle. Une autre partie du sol est congelée à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  afin

de permettre les analyses de biologie moléculaire. Une autre partie des sols exposés pendant 90 jours congelés servira à l'extraction des toxines.

### 2.2.12. Analyses effectuées sur le sol

#### *a/ Activités enzymatiques*

Aussi bien sur une courte durée d'exposition (14 jours) que sur une longue durée (90 jours), les activités enzymatiques des sols ont été mesurées sur microplaque (96 puits) selon la technique mise en place par [Santiago-Martín et al. \(2013\)](#). Dans des tubes sont placés 4 g de sol frais et 25 mL d'eau MilliQ, lesquels sont mis à agiter (250 rpm) pendant 10 min à température ambiante (20 °C). Après cette période, une aliquote de 125 µL est utilisée pour la détermination de chaque activité enzymatique. Les activités enzymatiques dosées sont l'arylsulfatase, la β-D-glucosidase et la phosphatase pour des expositions aux extraits de cyanobactéries pendant 14 et 90 jours. Concernant l'uréase, elle a aussi été mesurée sur les sols exposés aux toxines de cyanobactéries pendant 14 jours. Cette activité n'a pas été mesurée pour la plus longue exposition car les sols étaient irrigués à l'aide de solution nutritive contenant une très grande d'azote, qui interférerait avec notre mesure. L'activité arylsulfatase a été mesurée après ajout du substrat : potassium-4-nitrophenylsulfate (25 mM) et une incubation de 4 h à 37 °C. Le substrat utilisé pour la mesure de la β-D-glucosidase est le 4-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside (0,05 M) mis à incuber avec la solution du sol pendant 1 h à 37 °C. Quant à l'obtention de l'activité phosphatase, elle fut mesurée à l'aide de 4-nitrophenyl phosphate (0,05 M) après 30 min d'incubation à 37 °C. Tous les substrats ont été obtenus auprès de Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA). Enfin l'activité uréase a été mesurée à l'aide d'ammonium :  $\text{NH}_4^+$  (0,4 M) obtenu auprès de la société Hach (Loveland, CO, USA) après 3 h d'incubation à 37 °C. Quatre répétitions ont été faites et toutes les activités enzymatiques ont été mesurées au pH de la solution de sol. Après les périodes d'incubation, les réactions sont stoppées à l'aide d'une solution de  $\text{CaCl}_2$  (0,5 M) et de Tris-HCl (0,1 M,

pH 12). Les microplaques sont ensuite mises à centrifuger (2 500 rpm, 5 min). Un volume de 200  $\mu\text{L}$  de surnageant est récupéré pour chaque puits et disposé sur une nouvelle plaque afin de mesurer l'absorbance à 405 nm (Safas, Monaco). Les résultats sont exprimés en  $\text{mU g}^{-1}$  de sol sec.

#### *b/ Nitrification potentielle*

Les mesures de la nitrification potentielle ont été effectuées selon le protocole mis en place par [Petersen et al. \(2012\)](#). Pour effectuer chaque mesure, 15 g de sol frais préalablement quarté ont été introduits dans un Erlenmeyer avec 60 mL d'un milieu azoté aqueux  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (pH 7,2) composé de deux solutions : une solution de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,2 M) et d'une solution de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,2 M). Les Erlenmeyers contenant le mélange sol avec milieu sont ensuite mis à incuber dans un Minitron Incubator Shaker (Infors, France), à 25 °C sous agitation orbitale (100 rpm) pour une durée totale de 46 h. Deux prélèvements de 2 mL sont effectués afin de pouvoir établir une cinétique de synthèse des nitrates dans ce milieu, l'un après 3 h et le second après 46 h. Les aliquotes prélevées sont placées dans des tubes Eppendorf (Hambourg, Allemagne) avant d'être mis à centrifuger (10 000 g, 5 min à 4 °C). Les surnageants sont prélevés à l'aide d'une seringue, puis filtrés à l'aide de filtres PES (0,45  $\mu\text{m}$ ), avant d'être congelés à -20 °C et analysés ultérieurement. La quantification des nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) se fait par la technique d'électrophorèse capillaire (Beckman Coulter, France). Le potentiel de nitrification est alors obtenu par le calcul ci-dessous, dont le résultat est exprimé en  $\mu\text{g de NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ sol frais h}^{-1}$  :

$$\text{Nitrification potentielle} = \frac{[\text{NO}_3^-]_{\text{final}} - [\text{NO}_3^-]_{\text{initial}}}{T_{\text{final}} - T_{\text{initial}}} \times V_s \div M$$

$V_s$  : Volume de solution

$T$  : Temps d'incubation

$M$  : Masse de sol frais

c/ *Extraction de l'ADN des sols et analyse par q-PCR en temps réel*

Tous les échantillons de sol conservés au congélateur (-80 °C) sont lyophilisés pendant 24 h. Un sous-échantillon de 0,5 g de sol est ensuite pesé afin de permettre l'extraction d'ADN selon les instructions fournies par le kit d'extraction : FastDNA SPIN Soil Kit (MP Biomedicals, Illkirch, France). Le volume des extraits obtenu est alors de 70 µL d'ADN qui seront conservés à -20 °C avant d'être utilisés pour diverses analyses. La quantité d'ADN contenue dans ces extraits est ensuite déterminée par l'absorption à 260 nm avec un spectrophotomètre : Smart Spec3000 (Biorad, Hercules, CA, USA). Les échantillons d'ADN sont ensuite utilisés pour des quantifications par réactions en chaîne par polymérase (q-PCR) en temps réel afin de déterminer les abondances de bactéries et d'archées en ciblant les séquences d'ARN ribosomique 16S. Brièvement, les amorces « sens » 341F : 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3' et « anti-sens » 534R 5'-ATTACCGCGGCTGCTGGCA-3' sont utilisées pour amplifier un fragment du gène 16S d'ARN ciblant les communautés bactériennes selon la méthode décrite par [Bru et al. \(2008\)](#). Les amorces « sens » 771F 5'-ACGGTGAGGGATGAAAGCT-3' et « anti-sens » 975R 5'-CGGCGTTGACTCCAATTG-3' sont utilisées pour quantifier l'ARN ribosomal 16S lié à la présence dans l'échantillon de communautés d'archées comme cela a été décrit par [Ochsenreiter et al. \(2003\)](#). Les abondances des archées et bactéries capables d'effectuer la nitrification c'est-à-dire la transformation de l'ion ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) en nitrates (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) par une réaction d'oxydation sont aussi mesurées par q-PCR en ciblant le gène *amoA* en accord avec les travaux de [Wessén et al. \(2011\)](#). Ces organismes sont plus communément appelés Ammonia-Oxidizing Archea (AOA) et Ammonia-Oxidizing Bacteria (AOB). Les amorces « sens » utilisées pour les bactéries sont amoA-1F : 5'-GGGGTTTCTACTGGTGGT-3' et « anti-sens » amoA-2R : 5'-CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC-3' et pour les archées, l'amorce « sens » CrenamoA23f : 5'-ATGGTCTGGCTWAGACG-3' et « anti-sens » CrenamoA616r: 5'-

GCCATCCATCTGTATGTCCA-3'. Les expérimentations par q-PCR ont été conduites par fluorescence avec du SYBR Green dans un volume final de 15  $\mu$ L contenant 7,5  $\mu$ L d'Absolute QPCR SYBR Green Rox (ThermoFisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France), 1  $\mu$ M de chaque amorce, 0,2 ng d'ADN de sol et 250 ng de T4Gp32 (QBiogene, Illkirch, France). Les réactions de q-PCR se sont faites selon deux cycles indépendants sur un thermocycleur StepOneplus thermal cycler (Life Technologies, USA). Afin de vérifier la spécificité des PCR, toutes les réactions se sont faites à partir d'une température de 80 °C et une augmentation par palier de 0,5 °C jusqu'à 95 °C. Les courbes de standard ont été obtenues en utilisant des séries de dilutions d'un plasmide linéaire (pGEM-T) contenant soit de l'ARN ribosomal 16S soit des séquences de gènes *amoA*. Des contrôles négatifs ne contenant pas d'ADN de sol ont été utilisés et les résultats obtenus étaient plus faibles que les valeurs limites de sensibilités ou négligeables. Les possibles effets d'inhibitions de la PCR ont été testés pour tous les échantillons en mélangeant une quantité connue du plasmide pGEM-T (Promega, France) avec l'extrait d'ADN du sol ou de l'eau avant de lancer la PCR avec les plasmides spécifiques T7 et SP6. Les mesures de seuils encore appelées « cycle threshold » (Ct) obtenues pour les différents extraits d'ADN du sol et les contrôles composés d'eau, n'étaient pas significativement différents, indiquant qu'aucune inhibition n'avait lieu.

*d/ Extraction, identification et dosage des microcystines des échantillons de sols exposés pendant 90 jours*

Une partie des sols de la manipulation dite « longue exposition » conservés au congélateur (-80 °C) et lyophilisés a été utilisée pour vérifier si des toxines étaient toujours présentes après exposition. La méthode d'extraction est adaptée des travaux de [Chen et al., \(2006a\)](#) où le rendement d'extraction sur sols et sédiments était d'environ 90%. Des manipulations d'exposition et d'extraction après 24 h d'exposition ont été préalablement effectuées afin de déterminer le rendement obtenu après extraction sur le sol sélectionné. Cinq grammes de sol sec, tamisé 2 mm ont été mis en solution avec 25 mL d'eau MilliQ contenant

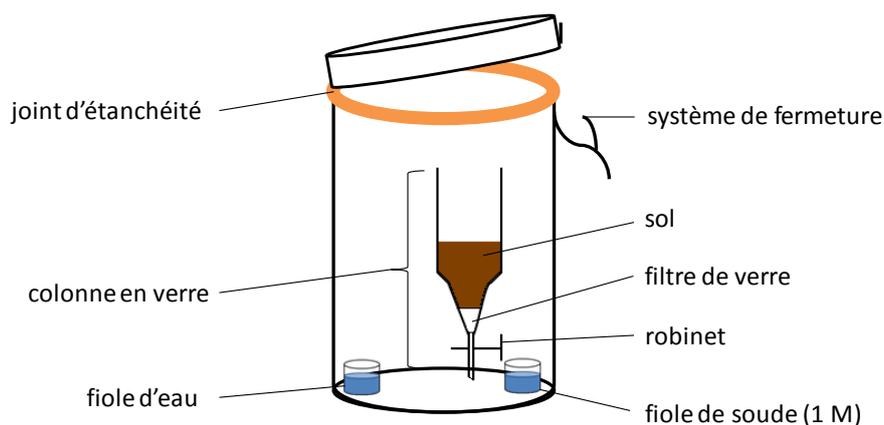
plusieurs concentrations en microcystines (0,5 et 5  $\mu\text{g}$  équi. MC-LR  $\text{g}^{-1}$  sol sec), à raison de 3 répétitions par concentration. Ils sont ensuite mis à agiter à l'aide d'un barreau aimanté pendant 10 min, à température ambiante. Les échantillons sont ensuite placés à 4 °C pendant 24 h. Après incubation, les solutions de sols sont mises au congélateur (-20 °C) avant d'être lyophilisées. Pour ces essais, l'extraction se fait à raison de 4 g de sol lyophilisé. Pour les échantillons, issus de la manipulation de 90 jours d'exposition, l'extraction s'effectue sur 8 g de sol lyophilisé, à l'aide de 15 mL d'une solution de pyrophosphate de sodium (0,1 M) et d'EDTA (0,1 M). Une fois le mélange obtenu, de l'acide trifluoroacétique (TFA) est ajouté (2 mM) et les tubes sont mis à agiter sur un agitateur orbital (300 rpm durant 5 min), à température ambiante. Après cette première étape, les tubes sont mis dans un bain à ultra-son (10 min à 4 °C) avant d'être centrifugés (4 000 g, 10 min à 4 °C). Le surnageant est ensuite récupéré et deux autres extractions sont effectuées dans les mêmes conditions sur les culots de sol. Après cela, pour chaque échantillon, le volume final obtenu est de 45 mL, lesquels vont être semi-purifiés par passage sur cartouches Bond Elut C18 (500 mg) obtenues auprès Agilent-Varian (Agilent Technologies, Les Ulis, France). Auparavant, les cartouches ont été conditionnées avec 5 mL de MeOH pur et 5 mL d'eau MilliQ. L'élution est quant à elle obtenue à l'aide de 3 mL de MeOH acidifié avec 0,1% (v/v) de TFA. Tous les solvants utilisés proviennent de Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA). Les échantillons ainsi obtenus sont ensuite évaporés à sec sous flux d'azote : N-evap (Organomation, MA, USA) afin de les reconcentrer dans un volume de 200  $\mu\text{L}$  de MeOH 50 % (v/v). Ces échantillons sont ensuite conservés à -20 °C avant d'être analysés par test d'inhibition de protéine phosphatase de type 2A (cf.§ 2.2.4. ) ou par UHPLC-MS/MS. Le dosage par PP2A est effectué à raison d'1  $\mu\text{L}$  d'extrait de sol par puits sur la microplaque. Pour les analyses en UHPLC-MS/MS, la présence de la microcystine MC-LR dans l'extrait a été vérifiée voire quantifiée en utilisant le mode d'acquisition MRM (multiple reaction monitoring). Dans ce

mode d'analyse, un ion-parent est sélectionné, fragmenté par collision et on cherche à détecter un ion fils donné. Le couple ion parent-ion fils, appelé transition, est caractéristique d'un composé. L'observation d'un signal à un temps correspondant au temps de rétention attendu et pour plusieurs transitions spécifiques permet une identification non équivoque. Pour la MC-LR, d'ion  $MH^+$  995 Da, nous avons recherché les transitions 995→135 ( $m/z$ ), 995→213 ( $m/z$ ) et 995→107 ( $m/z$ ) qui sont des transitions citées dans la littérature pour quantifier la MC-LR (Schmidt et al., 2013). La principale transition de la MC-LR : 995→135 ( $m/z$ ) correspondant à la perte du groupement ADDA a été choisie afin de quantifier la MC-LR dans les extraits de sols selon une gamme étalon dont la concentration en standard MC-LR (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) varie entre 5 et 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Les deux autres transitions sont des transitions de confirmation de la présence de MC-LR.

*e/ « Devenir » de la MC-LR radiomarquée dans le sol*

Trois colonnes en verre ( $\emptyset$  3,5 cm) contenant de 24 g de sol sec (tamisé à 2 mm) de la Pierre-Plate sont disposées dans 3 bocal hermétiquement fermés (**Figure 9**). Chaque bocal contient en plus, une fiole contenant de l'eau pour saturer d'humidité le cosme et éviter l'évaporation et une autre fiole contenant de la soude (1 M) servant de piège à  $\text{CO}_2$  pour le suivi de la minéralisation. Le sol, après avoir été déposé est ré-humecté, à 60% de sa capacité de rétention, recevait le lendemain la solution aqueuse de MC-LR marquée au carbone 14 ( $500 \text{ Bq colonne}^{-1}$ ), le sol était alors à 100% de sa capacité de rétention en eau (CRE). La minéralisation du carbone 14 contenue dans la toxine est mesurée par prélèvement et comptage de la solution de soude, tous les 7 jours pendant 28 jours d'incubation à 25 °C à l'obscurité, puis la colonne 1 a été congelée avant de plus amples analyses. La 3<sup>ème</sup> colonne était à nouveau exposée, après 28 jours, avec un second apport de 500 Bq et la cinétique de minéralisation était obtenue sur 28 jours supplémentaires. Après 56 jours, les colonnes T56 « 1 traitement » et T56 « 2 traitements » ainsi que la colonne ayant reçu un seul apport et 28

jours d'incubation subissent plusieurs extractions. Un volume de 25 mL d'une solution de chlorure de calcium (0,01 M) est versé à la surface des colonnes afin de simuler une pluie artificielle (OECD, 2004). Une aliquote de 500 µl de percolats est utilisée pour effectuer un comptage par scintillation liquide. Puis les sols saturés en eau sont récupérés et mélangés afin d'en récupérer environ 10 g (100% capacité de la rétention en eau), disposés dans des tubes dans lesquels sont effectués des extractions avec une solution d'EDTA et pyrophosphate comme décrit précédemment (cf § 2.2.12 d/). Selon le même protocole, des extractions sont effectuées avec des solutions de concentrations croissantes en MeOH : 20, 50 et 100% (v/v). La quantité de radioactivité, contenue dans les solutions d'extraction, fut obtenue par scintillation liquide et les échantillons sont concentrés et purifiés par passage sur colonne C18 comme décrit précédemment (cf. § 2.2.6 d/). Les échantillons sont conservés au congélateur (-20 °C) pour être ensuite analysés par chromatographie liquide à haute performance. Afin de procéder à un bilan, les sols qui ont servi à l'extraction sont mis à sécher à 20 °C pendant 72 h puis mélangés avant de procéder à la combustion de 500 mg. Des combustions de la silice des colonnes C18, ont aussi été réalisées comme décrit précédemment (cf. § 2.2.7. ).



**Figure 9:** Schéma du montage expérimental permettant de suivre la minéralisation de la microcystine-LR marquée au carbone 14 apportée par irrigation sur la colonne de sol.

### 2.2.13. Préparation et conservation des échantillons de plantes

A la fois pour les tests de germination et les expérimentations sur les plantules semées sur sols contaminés, les plantules sont analysées directement après l'exposition. Pour ce qui est des manipulations avec une exposition plus longue, de 90 jours, les feuilles, elles sont scannées afin de mesurer la surface foliaire avant tout autre conditionnement. Les organes prélevés (racines, tiges, feuilles et fruits) sont pesés pour obtenir la masse fraîche (MF) avant d'être congelées (-20 °C). Ils seront ensuite lyophilisés, ce qui permettra d'obtenir la masse sèche (MS) des différents organes et permettra aussi la conservation des échantillons à température ambiante avant d'effectuer de nouvelles analyses.

### 2.2.14. Analyses effectuées sur les plantes

#### a/ Tests et mesures de paramètres de développement et de croissance

##### i. Tests de germination sur différentes semences

Afin de pouvoir effectuer des tests de germination, quatre semences de différentes plantes ont été choisies : deux variétés de tomates *Solanum lycopersicum* variété MicroTom et Saint-Pierre, une variété de laitues *Lactuca sativa* var. *capitata* et une variété de blé tendre *Triticum aestivum* BIO Atlass. Dans chaque boîte de Pétri (Ø 8 cm) sont placées 20 graines d'une même espèce de plante. Les graines sont ensuite recouvertes d'un papier filtre. Le papier filtre est ensuite humidifié avec des solutions contenant l'extrait de cyanobactéries dilué dans de l'eau MilliQ à différentes concentrations comprises entre 0 (témoin) et 20 000 µg équi. MC-LR L<sup>-1</sup>. Le témoin négatif est constitué d'eau MilliQ et de MeOH à la concentration maximale de 1,35% (v/v), correspondant à la plus forte concentration en MeOH trouvée pour les semences exposées à l'extrait de cyanobactéries. Du chlorure de cadmium a aussi été utilisé à des concentrations comprises entre 50 µg et 1 g L<sup>-1</sup> afin de constituer un témoin positif comme cela est suggéré par la norme AFNOR X31-201 (AFNOR, 1986). Chaque boîte de Pétri constitue une répétition et trois répétitions par traitement ont été effectuées. Les boîtes de Pétri sont ensuite refermées et parafilmées afin d'éviter les pertes d'eau par évaporation.

Les boîtes sont placées dans une étuve à 25 °C, à l'obscurité pendant une semaine. Après ce temps d'incubation, le taux de germination est obtenu en considérant que toute graine ayant son tégument percé par une racine primaire (radicule) ou coléoptile pour le blé, est germée. D'autre part, pour toutes les graines germées, suite à l'exposition aux microcystines, la longueur des racicules (ou des coléoptiles, pour le blé) a été mesurée avec le logiciel ImageJ 1.46 (2012) (National Institutes of Health, USA). Pour les témoins positifs, seuls les racicules des semences de tomates MicroTom et les coléoptiles de blé ont été mesurés après une semaine d'exposition, comme décrit ci-dessus.

#### ii. Tests de croissance des MicroTom sur sol contaminé

Ces tests ont été effectués uniquement avec des graines de tomates *Solanum lycopersicum* var. MicroTom semées dans le sol de la Pierre-Plate partie haute, selon la norme NF EN ISO 22030 (ISO, 2011). La germination et le développement des plantules ont été suivis durant 14 jours d'exposition afin d'observer si un retard de croissance survenait dans certains pots. Puis, après la période d'exposition, les parties aériennes des plantules ont été prélevées et pesées afin d'en déterminer la masse fraîche obtenue pour chaque cosme. De même, les parties souterraines des plantules, sont nettoyées à l'eau MilliQ, l'excès d'eau a été retiré à l'aide de papier absorbant avant de déterminer la masse fraîche (MF) des racines obtenue pour chaque cosme. Les différentes parties des plantules ont ensuite été mises à sécher à l'étuve (70 °C, 24 h) afin de déterminer la masse sèche (MS) des différentes parties des plantules.

#### iii. Suivi du développement phénologique des plants de MicroTom pendant 90 jours

Le suivi du développement phénologique des plants de tomates de variété MicroTom a été effectué sur une période d'exposition aux toxines de 90 jours. Nous avons utilisé l'échelle de code BBCH (Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt et Chemische Industrie) d'après Feller et al. (1995) qui décrit les différents stades de développement des *Solanaceae*. L'objectif de cette approche est d'observer visuellement si un traitement avec l'extrait de cyanobactérie

avait un effet sur le développement de la tomate. En complément, la taille des plants a été mesurée tous les 15 jours pendant la durée de l'exposition. Enfin, d'autres paramètres ont été considérés en fin d'expérimentation : l'épaisseur du collet obtenue à l'aide d'un pied à coulisse micrométrique, la surface foliaire obtenue à l'aide d'un scanner Agfa SnapScan E50 (Mortzel, Belgique) et analyse des images avec le logiciel ImageJ 1.46 (2012), le nombre de feuilles, de fleurs et de fruits mûres (orange-rouges) et immatures (verts).

*b/ Mesures de paramètres écophysologiques sur les plants de tomates exposés pendant 90 jours*

Les prélèvements pour les dosages liés à la physiologie de la tomate ont été effectués une semaine avant la récolte des plants. Tous les dosages ou mesures relatifs à la physiologie de la plante ont été effectués sur la même feuille, c'est-à-dire la 3<sup>ème</sup> feuille en partant du pied de la plante, quel que soit le pied de tomate utilisé. En effet, selon l'âge de la feuille, des différences peuvent être observées, notamment au niveau de la quantité en chlorophylles comme ont pu le suggérer [Romero-Aranda et al. \(2001\)](#) qui préconisent d'utiliser les feuilles de tomates comprises entre la 5<sup>ème</sup> et 9<sup>ème</sup> position à partir de l'apex de la plante. Lors de nos expérimentations, la faible surface foliaire des feuilles de MicroTom nous a obligé à utiliser des feuilles plus âgées, notamment pour permettre les mesures de fluorescence chlorophyllienne.

*i. Fluorescence chlorophyllienne*

La fluorescence chlorophyllienne est directement liée à la photosynthèse de la plante. Lorsque les chloroplastes de la feuille sont stimulés par un flash, cela conduit à la photosynthèse, c'est-à-dire à l'utilisation de cette énergie pour le métabolisme de la plante effectué par le photosystème II. Une autre partie de l'énergie perçue est réémise sous forme de chaleur ou sous forme de fluorescence au niveau de la feuille. Ces trois mécanismes sont donc en compétition ([Maxwell and Johnson, 2000](#)). Le rendement du photosystème II est donc un indicateur très utilisé afin de connaître l'état physiologique d'une plante. Le

rendement quantique de la photochimie des centres des photosystèmes II ( $\Phi_{PSII}$ ) est mesuré selon l'équation suivante :

$$\Phi_{PSII} = \frac{Fv}{Fm} = (Fm - Fo)/Fm$$

$Fm$  : émission de fluorescence lorsque tous les centres sont fermés (lumière sursaturante)

$Fo$  : émission de fluorescence lorsque tous les centres sont ouverts (lumière modulée)

Lors de la mesure,  $F_0$  est établi avec une lumière modulée où les centres sont ouverts, puis un flash permet leur fermeture empêchant la photochimie et augmentant la fluorescence émise. Le rapport  $Fv/Fm$  permet alors d'estimer le rendement quantique du transport d'électrons dont la valeur optimale est d'environ 0,8 pour la plupart des plantes. Cependant, ce rapport peut diminuer en cas de stress biotique (Wagner et al., 2006) ou de stress abiotique (Takayama et al., 2011). L'utilisation d'herbicides tel que le diuron peut par exemple induire un stress visible au niveau du métabolisme photosynthétique des plantes (Haynes et al., 2000) avec une inhibition des photosystèmes II. Des études ont pu montrer que les microcystines ont un effet similaire avec une modification de la photosynthèse après exposition (Sheen, 1993; Weiss et al., 2000; El Khalloufi et al., 2012). Les mesures ont été effectuées selon le protocole mis en place par Murchie and Lawson (2013) sur une foliole de la 3<sup>ème</sup> feuille, en partant du pied de la plante avec un système Li-Cor 6400 (Li-Cor Biosciences, Lincoln, Ne, USA). Des plants (3) constituant un témoin positif ont été mis en place dans des cultures en hydroponie dans lesquelles la solution nutritive contient 2,5 mg L<sup>-1</sup> de diuron. Ils permettront de vérifier que cet herbicide a bien un effet délétère sur la photosynthèse du modèle choisi.

ii. Concentrations en chlorophylles *a* et *b*

Les concentrations en chlorophylles *a* et *b* ont été mesurées sur la même foliole que celle utilisée pour la mesure de fluorescence chlorophyllienne. Le protocole d'extraction est adapté de Geider and Osborne (1992) où 50 mg de MF de feuille sont broyés, dans l'obscurité, à l'aide d'un pilon et d'un mortier maintenu au frais dans de la glace. Au broyat est ajouté 0,5 mL d'acétone aqueux 80% (v/v). Le mélange est ensuite récupéré puis est mis à centrifuger (10 000 *g*, 5 min à 4 °C). Le surnageant est alors récupéré et deux autres extractions sont effectuées sur le culot. Une fois les trois extractions effectuées et regroupées, les concentrations en chlorophylles sont mesurées par spectrophotométrie en mesurant les absorbances à 663,6 nm et 646,6 nm, selon les équations suivantes (Porra, 2002) :

$$\text{Chl } a = 12,25 \times Abs_{663,6} - 2,55 \times Abs_{646,6}$$

$$\text{Chl } b = 20,31 \times Abs_{663,6} - 4,91 \times Abs_{646,6}$$

$$\text{Chl } a + b = 17,76 \times Abs_{663,6} - 7,34 \times Abs_{646,6}$$

Tous les résultats sont ensuite exprimés en  $\mu\text{g g}^{-1}$  MF de feuilles.

iii. Esters méthyliques d'acides gras contenus dans les feuilles

Les acides gras des feuilles peuvent être utilisés chez les végétaux comme des biomarqueurs de sols contaminés avec des métaux ou des polluants organiques. Nous avons utilisé une autre foliole de la même feuille pour mesurer la quantité d'esters méthyliques d'acides gras selon la norme X31-233 (AFNOR, 2012) et Guedard et al. (2008). Pour nos mesures, 50 mg de MF de feuilles ont été immergés dans 1 mL d'une solution MeOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (40/1 ; v/v), dans un tube en verre fermé. Les tubes sont ensuite placés 1 h à 80 °C dans un bain-marie. Cette étape permet à la fois d'extraire, d'hydrolyser et de trans-esterifier les acides gras phospholipidiques constitutifs des membranes. Les tubes sont ensuite refroidis dans la glace avant extraction liquide-liquide par ajout de 750  $\mu\text{L}$  d'hexane, puis de 1,5 mL d'eau MilliQ et agitation manuelle pendant 20 secondes. Ils sont ensuite centrifugés (300 *g*, 5 min), et la phase organique est récupérée pour analyse. Les acides gras sont analysés par

chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (4000 GC/MS, Varian) comme décrit par [Shahzad et al. \(2012\)](#). Brièvement, l'injection se fait en mode split-less (1 µL, température d'injection 250 °C) sur une colonne BPX70 (60 m, de Ø interne 0,25 mm) distribuée par SGE Analytical Science, (UK) avec l'hélium pour gaz vecteur. Le programme utilisé consistait à maintenir la colonne 5 min à 50 °C, puis à atteindre 165 °C avec une augmentation de température de 15 °C min<sup>-1</sup>, suivi d'une augmentation de 2 °C min<sup>-1</sup> pour atteindre 225 °C. Les acides gras analysés sont identifiés par comparaison avec le temps de rétention et les spectres de masse de plusieurs standards (C16:0; C16:1, C18:0, C18:1; C18:2 and C18:3) obtenus auprès de Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA) et différents rapports sont mesurés comme suit :

$$\text{rapport } 1 = \frac{\%C18:3}{\%C18:0 + \%C18:1 + \%C18:2}$$

$$\text{rapport } 2 = \frac{\%C16:0}{\%C16:1}$$

*c/ Extraction et dosages des cyanotoxines absorbées par les tomates exposées pendant 90 jours à l'extrait de cyanobactéries*

Des extractions des toxines libres ont été effectuées sur l'ensemble des organes de la plante préalablement lyophilisés puis broyés au mortier. Ainsi, 50 mg, 0,5 g et 2 g de poudre de racines, de tiges ou de feuilles et de fruits ont été respectivement utilisés. Le solvant d'extraction utilisé est identique à celui utilisé pour extraire les toxines de cyanobactéries, une solution de MeOH aqueux 75% (v/v). Pour chaque extraction, la suspension composée des poudres d'organes et de solvant est mise dans un bain à ultra-son pendant 3 min avant d'être centrifugée 10 min (2 800 g, 4 °C). Pour la dernière extraction après la sonication, la solution est mise à incuber (24 h à 4 °C), avant centrifugation. Après cela, les volumes finaux d'extraits sont de 6 mL, 21 mL et 60 mL pour les racines, tiges/feuilles et fruits. Les extraits

sont alors concentrés à l'aide d'un évaporateur rotatif Rotavapor® RE 120 (Büchi, France) et d'un évaporateur sous flux d'azote N-evap (Organomation, MA, USA). Les tubes sont ensuite nettoyés avec une solution de MeOH 50% (v/v) et les volumes obtenus sont de 1 mL, 3 mL et 5 mL pour les racines, tiges/feuilles et fruits. Ces échantillons sont ensuite semi-purifiés par passage sur cartouche C18 (Bond Elut C18, Agilent Technologies). Pour cette étape, les colonnes sont conditionnées par passage de MeOH pur (5 mL) puis d'eau MilliQ (5 mL), au goutte-à-goutte. Les échantillons ont été dilués avec de l'eau MilliQ afin d'avoir une concentration en MeOH de 20% (v/v). Les échantillons sont passés sur les colonnes toujours au goutte-à-goutte avant que ces dernières ne soient séchées et que l'élution s'effectue avec 3 mL de MeOH acidifié à 0,1% de TFA. Les échantillons sont alors à nouveau évaporés à sec, sous flux d'azote, avant d'être repris dans 100 µL d'une solution d'acétonitrile (ACN) 50% (v/v). Une partie des échantillons sera utilisée pour les dosages en UHPLC-MS/MS (cf. § 2.2.6. ) alors qu'une autre partie est évaporée en utilisant un SpeedVac (Thermo Fisher Scientific, Villebon, France) puis reprise dans une solution de MeOH 50% (v/v). Ces derniers seront utilisés pour les dosages par test d'inhibition de la protéine phosphatase de type PP2A (cf. § 2.2.4. ). L'ensemble des échantillons est conservé à -20 °C, avant dosages.

*d/ Biodisponibilité et transfert des microcystines aux tomates*

i. Transfert de la MC-LR radiomarquée contenue dans le sol aux plantules de tomates

Une quantité de 15 g de sol issu des colonnes et ayant été lessivés avec la solution de CaCl<sub>2</sub> (cf. § 2.2.12 e/), non utilisé pour les extractions, est mélangée avec 15 g de sol non contaminé. Le mélange, disposé dans des coupelles, sera utilisé pour quantifier le transfert de la <sup>14</sup>C-MC-LR vers les plantules de tomates *Solanum lycopersicum* var. MicroTom. Les concentrations en <sup>14</sup>C-MC-LR sont alors de 18 et 36 mg kg<sup>-1</sup>. Trois plantules de tomates, âgées de 14 jours, mises à germer sur du sable sont alors repiquées dans le mélange de sol contaminé. Les systèmes sol-plantule maintenus à 100% de la capacité de rétention en eau

sont disposés, à l'étuve à 25 °C, pendant 14 jours. Après ce laps de temps, les plantules sont prélevées et brûlées (cf.§ 2.2.7. ).

ii. Transfert et accumulation de la MC-LR radiomarquée dans les plants de tomate

Le transfert de la MC-LR marquée au carbone 14 dans des plants de tomate *Solanum lycopersicum* variété MicroTom a été étudié en conditions hydroponiques. Des graines, préalablement désinfecté à l'eau de javel pendant 10 min et rincé 3 fois, ont été semées dans du sable (2 mm). Le sable était maintenu saturé en eau et l'ensemble était disposé dans un incubateur à 25 °C sous une intensité lumineuse de  $160 \mu\text{mol de photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  procurée par 2 tubes fluorescents (55 W/864) avec un cycle 16 h/8 h (jour/nuit), pendant 14 jours. Après cette période, les plantules sont placées dans des Erlenmeyers de 100 mL contenant une solution nutritive N-P-K (15-10-30) à  $0,75 \text{ g L}^{-1}$ , obtenue auprès de la société Fertil (Boulogne-Billancourt, France), maintenue sous barbotage d'air permanent ( $Q_{\text{air}}=0,2 \text{ L min}^{-1}$ ) et placées à nouveau dans l'incubateur. Le volume de solution nutritive est réajusté tous les 2-3 jours pour compenser les pertes absorbées par le plant de tomate. Après 82 jours, le contenu de l'Erlenmeyer est renouvelé avec 36 mL de nouvelle solution radiomarquée. Cette dernière est constituée de 3 mL de solution de  $^{14}\text{C-MC-LR}$  diluée dans la solution nutritive, soit 470 Bq et une concentration de  $23 \mu\text{g MC-LR mL}^{-1}$ . L'Erlenmeyer contenant la solution marquée et le plant de tomate en hydroponie sont remis à incubées 24 h dans les conditions décrites précédemment. Après ce temps d'exposition, 20 mL de solution nutritive sont rajoutés dans l'Erlenmeyer et 24 h s'écoulent avant la récolte du plant exposé aux  $^{14}\text{C-MC-LR}$ . Après rinçage des racines à l'eau MilliQ, les organes des plants de tomates (racines, tiges, feuilles et fruits) sont séparés, pesés et mis à sécher à 80 °C pendant 24 h. Après séchage, nous avons déterminé les MS des différents organes, avant de les broyer manuellement dans des mortiers. Entre 0,05 g et 1 g de poudre de chaque organe ont été utilisés pour effectuer des extractions au MeOH à 75% (cf § 2.2.14 c/), afin de quantifier les MC-LR libres. Entre 100 et 200 mg de

MS des culots issus des extractions au MeOH à 75% ou de poudre d'organe de plante (non extraits) sont ensuite mis à brûler. Les solutions d'extraits au MeOH sont ensuite analysées par HPLC (cf § 2.2.8. ).

### **2.2.15. Analyses statistiques**

Les données présentées sont données selon la moyenne  $\pm$  écart-types des trois ou cinq répétitions effectuées, pour la manipulation durant 15 jours et 90 jours respectivement. Un test de normalité de Kolmogorov-Smirnov et d'homogénéité des variantes de Bartlett sont appliqués aux données avec un seuil de significativité de 5%. Si ces conditions sont respectées, nous utilisons une analyse des variances puis un test post-hoc de Tukey. A l'inverse, si l'une des conditions n'est pas respectée, un test de Kruskal-Wallis est préféré avec une probabilité de 0,05. Afin de permettre une comparaison entre les différents traitements, un essai post-hoc « nparcomp » est utilisé. Une matrice de corrélation de Pearson est aussi utilisée afin de déterminer des liens entre plusieurs variables. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées sur le logiciel « R » (R development Cor Team, 2012).

Afin de déterminer la concentration efficace médiane de microcystines ou de chlorure de cadmium lors des tests de germination, la Macro RegTox de [Vindimian \(2003\)](#) est utilisée à l'aide du logiciel Excel (Microsoft Software).

**Chapitre 3 : Caractérisation chimique, phytotoxique et  
écotoxicologique d'un extrait de cyanobactéries issu de la  
culture in vitro de *Microcystis aeruginosa*, apporté sur un  
système sol-plante par irrigation**



### **3.1. Introduction**

Les concentrations de cyanotoxines mesurées dans les eaux de surface destinées à l'irrigation sont variables selon les saisons, avec des pics de concentrations lors de la senescence des cyanobactéries et la distance de prélèvement par rapport à l'efflorescence. Cependant, les concentrations en toxines dépassent rarement les 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup> (Corbel et al., 2014). Les cyanotoxines les plus couramment détectées dans les eaux de surface sont les microcystines (Sivonen and Jones, 1999; Ettoumi et al., 2011), hépatotoxines constituées de sept acides aminés dont deux en position 2 et 4 sont variables. Actuellement, entre 80 à 90 congénères de microcystines ont été identifiés (Sivonen and Jones, 1999; Cox et al., 2005; del Campo and Ouahid, 2010; Puddick et al., 2013). Cependant, la microcystine leucine-arginine (MC-LR) reste le congénère le plus souvent rencontré dans les eaux douces et le plus étudié. L'Organisation Mondiale de la Santé a établi une valeur limite dans les eaux destinées à la consommation pour la MC-LR à 1 µg L<sup>-1</sup>.

De nombreuses études ont porté sur les effets toxiques des microcystines sur les animaux ou les plantes dont la plupart de ces dernières s'intéressaient à des plantes aquatiques, directement exposées dans leur milieu aux microcystines. Cependant, depuis quelques années, le développement des cyanobactéries dans les retenues d'eau destinées à l'irrigation des cultures agricoles a ouvert une nouvelle voie de recherche sur l'effet des microcystines sur les plantes terrestres. Des effets phytotoxiques, après exposition à des microcystines, ont été observés sur différents paramètres tels que : la germination, la croissance, la photosynthèse ou encore l'induction d'un stress oxydatif (Smith et al., 1994; Abe et al., 1996; Yin et al., 2005; Saqrane et al., 2008).

Pour autant, la plupart des études n'étaient pas réalisées selon des conditions environnementalement réalistes. En premier lieu, le choix des toxines utilisées pour effectuer l'exposition des plantes peut être abordé. Souvent, un seul congénère de microcystine est

utilisé dans certaines études pour observer des effets phytotoxiques (McElhiney et al., 2001; Järvenpää et al., 2007; Bibo et al., 2008; Chen et al., 2012) alors qu'une souche de cyanobactérie est capable de synthétiser un mélange de congénères de cyanotoxines. De ce fait, le plus souvent, un extrait de cyanobactéries est utilisé pour mimer au mieux les effets phytotoxiques obtenus dans l'environnement (Peuthert et al., 2007; Saqrane et al., 2009; El Khalloufi et al., 2012). Les concentrations utilisées dans les études sont également un point de discussion. Très souvent, les concentrations étaient de l'ordre du milligramme par litre ( $\text{mg L}^{-1}$ ), concentrations nettement supérieures à celles trouvées dans l'environnement (Kurki-Helasma and Meriluoto, 1998; Máthé et al., 2009; Saqrane et al., 2009; Jámbrík et al., 2011; El Khalloufi et al., 2012). Cependant, des études rapportaient des concentrations de quelques  $\mu\text{g L}^{-1}$  dans les eaux de surface (Corbel et al., 2014), excepté dans le cas particulier où le prélèvement s'effectuerait à l'endroit où se développent des efflorescences. Enfin le dernier point concerne les conditions d'exposition des plantes terrestres, qui se faisaient quelques fois en condition d'hydroponie (McElhiney et al., 2001; Stüven and Pflugmacher, 2007; Saqrane et al., 2008; Peuthert and Pflugmacher, 2010; Prieto et al., 2011) alors même que les semences utilisées sont des espèces terrestres, semées en champ. D'autres études utilisaient pour leurs semences des sols normalisés ou du sable (Järvenpää et al., 2007; Peuthert et al., 2007; Crush et al., 2008; El Khalloufi et al., 2011, 2012) peu représentatifs d'un sol agricole.

Afin de se placer dans des conditions les plus réalistes d'un point de vue environnemental, nous avons utilisé pour l'ensemble de nos travaux un extrait de cyanobactéries issu de cultures de *Microcystis aeruginosa* (PCC7820) obtenu *in vitro*. Cela impliquait pour premier objectif de caractériser cet extrait afin d'en connaître sa composition en cyanotoxines et de vérifier que ce dernier était suffisamment représentatif des proportions de toxines trouvées dans l'environnement. Le second objectif portait sur la caractérisation de sa toxicité au travers d'essais *in vitro* normalisés. Cette étape permettait de pouvoir comparer nos résultats à

d'autres études similaires. Pour ce faire, des tests de germination en boîte de Pétri ont été mis en place avec différentes concentrations en microcystines comprises entre 0 et 20 mg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup> sur deux espèces de tomates *Solanum lycopersicum* var. MicroTom et Saint-Pierre, sur du blé *Triticum aestivum* et sur la laitue *Lactuca sativa* var. *capitata*. Les effets ont été comparés à ceux du chlorure de cadmium (0 à 1 g L<sup>-1</sup>) utilisé comme témoin positif. Le troisième objectif de cette étude était d'observer les effets écotoxicologiques d'une irrigation avec des eaux contaminées en cyanotoxines, pour des concentrations n'excédant pas 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>, sur un système sol agricole-plante. Pour ce dernier point, les effets sur les activités enzymatiques globales du sol et sur l'activité nitrifiante ainsi que les abondances des communautés d'archées et de bactéries nitrifiantes ont été mesurés. Le modèle végétal utilisé est la variété *Solanum lycopersicum* var. MicroTom exposée du semis de la graine à la plantule pour voir les effets d'une exposition semi-chronique pendant 14 jours sur le développement et la croissance des plantules.

Ainsi, au travers de ce chapitre nous cherchons donc à répondre aux questions suivantes :

**Q 1.1 :** Quels sont les différents congénères de microcystines présents dans l'extrait obtenu à partir de la culture de la souche *Microcystis aeruginosa* (PCC7820) dans notre laboratoire ?

**Q 1.2 :** Quels sont les effets d'une exposition *in vitro* à cet extrait, sur plusieurs variétés de semences ?

**Q 1.3 :** Quels sont les effets toxiques de cet extrait ajouté à l'eau d'irrigation lors d'une exposition sub-chronique, sur les microorganismes des sols et sur les plantules ?

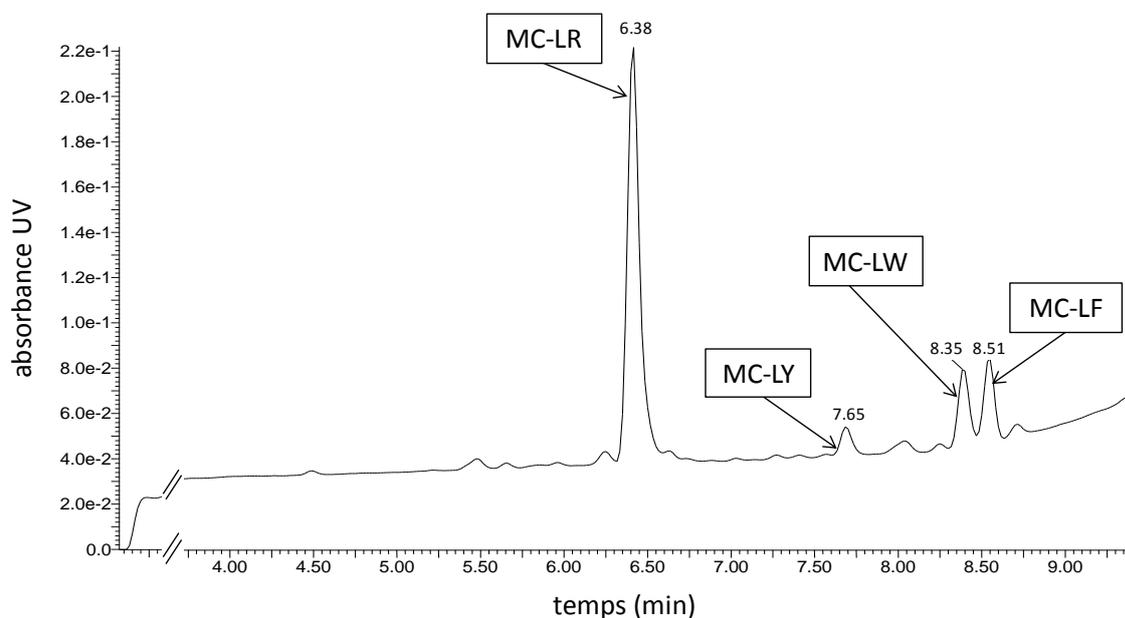
Nous serons alors en mesure de caractériser cet extrait de *Microcystis aeruginosa* obtenu, à la fois par sa composition chimique mais aussi par ses propriétés phytotoxiques et écotoxiques lors d'une irrigation d'un système sol-plante.

## 3.2. Résultats

### 3.2.1. Quantification et identification des congénères de microcystines obtenus dans l'extrait de *Microcystis aeruginosa* (PCC7820)

Les culots de cellules de quatre cultures de la souche *M. aeruginosa* PCC7820 ont été regroupés puis extraits au MeOH à 75%. Un dosage par test d'inhibition de la protéine phosphatase de type 2A, effectué avec l'extrait brut obtenu a permis d'établir une concentration de 21,6 mg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>, soit 6,77 mg équiv. MC-LR g<sup>-1</sup> de cellules sèches de cyanobactéries. Afin d'identifier les différents congénères de microcystines présents dans cet extrait, une analyse par UHPLC-MS/MS a été ensuite effectuée. L'ordre d'élution des différents congénères, leurs temps de rétention et leurs données structurales sont alors obtenus et permettent leur identification par comparaison avec la littérature. La souche de cyanobactéries utilisée synthétise majoritairement la MC-LR (**Figure 10**) comme cela a été décrit dans la littérature ([Bateman et al., 1995](#); [Lawton et al., 1995](#); [Robillot et al., 2000](#)), ayant un temps de rétention de 6,38 min. Le spectre de masse de ce composé (**Tableau 3** et **Figure 11**) comporte les ions pseudo-moléculaires [M+H]<sup>+</sup> et [M+2H]<sup>2+</sup> respectivement à *m/z* 995 et 498, ainsi que des fragments issus du clivage de l'acide aminé Adda à *m/z* 135 (ion Ph-CH<sub>2</sub>-CH=O<sup>+</sup>CH<sub>3</sub>) et à *m/z* 861 (soit la masse de [M+H]<sup>+</sup> moins 134 Da). Il a été démontré que ces ions pouvaient être issus à la fois de l'ion pseudo-moléculaire dichargé ([Yuan et al., 1999](#)) par clivage hétérogène puis transfert de proton ce qui conduit aux deux cations, ou également de l'ion monochargé par un clivage à charge piégée ([Diehnelt et al., 2005](#)). Par ailleurs, le spectre MS de la MC-LR comprend également un ion dichargé résultant de la perte de méthanol [M+2H-CH<sub>3</sub>OH]<sup>2+</sup> à *m/z* 482. Dans le même extrait et conformément aux travaux effectués sur cette souche de cyanobactérie, d'autres congénères ont pu être identifiés : la MC-LY, -LW et -LF avec des temps de rétentions respectifs de : 7,65 ; 8,35 et 8,51 min. Leurs spectres indiquent des masses [M+H]<sup>+</sup> respectives de 1002, 1025 et 986 Da. Dans

quelques cas, des adduits de sodium ( $\text{Na}^+$ ) ou de potassium ( $\text{K}^+$ ) sont observés mais aucun de ces congénères ne subit l'ajout de deux protons  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$  étant donné que l'acide aminé arginine est absent de leur structure.



**Figure 10:** Chromatogramme obtenu par chromatographie liquide ( $A_{238}$ ) après injection d'un extrait aqueux de cyanobactéries (75% MeOH, v/v) obtenu après culture de la souche *Microcystis aeruginosa* (PCC7820) où apparaissent les quatre principaux congénères de microcystines : MC-LR, MC-LY, MC-LW et MC-LF.

De la même façon que pour la MC-LR, des fragments  $[\text{M}+\text{H}-134]^+$  et  $m/z$  135 sont observés, mais ils ne peuvent être issus que de la fragmentation en source de  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Les spectres SM-SM obtenus sur les ions pseudo-moléculaires  $[\text{M}+\text{H}]^+$  de ces trois congénères sont en accord avec ceux observés dans la littérature (Bateman et al., 1995; Lawton et al., 1995; Diehnelt et al., 2005). De plus, la MC-YR (5,62 min) et des traces de MC-LM (8,01 min) ont été détectées alors que ces congénères étaient plutôt observés pour d'autres souches de *Microcystis* (Lawton et al., 1995; Yuan et al., 1999). Le spectre de masse de la MC-YR présente des ions portant une ou deux charges, les ions principaux résultant de la perte d'eau à partir des espèces mono- ou di-protonées ( $[\text{M}+2\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^{2+}$  et  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$  de masse 514 et 1027  $m/z$ , respectivement). Le spectre de masse de la MC-LM montrait les ions pseudo-

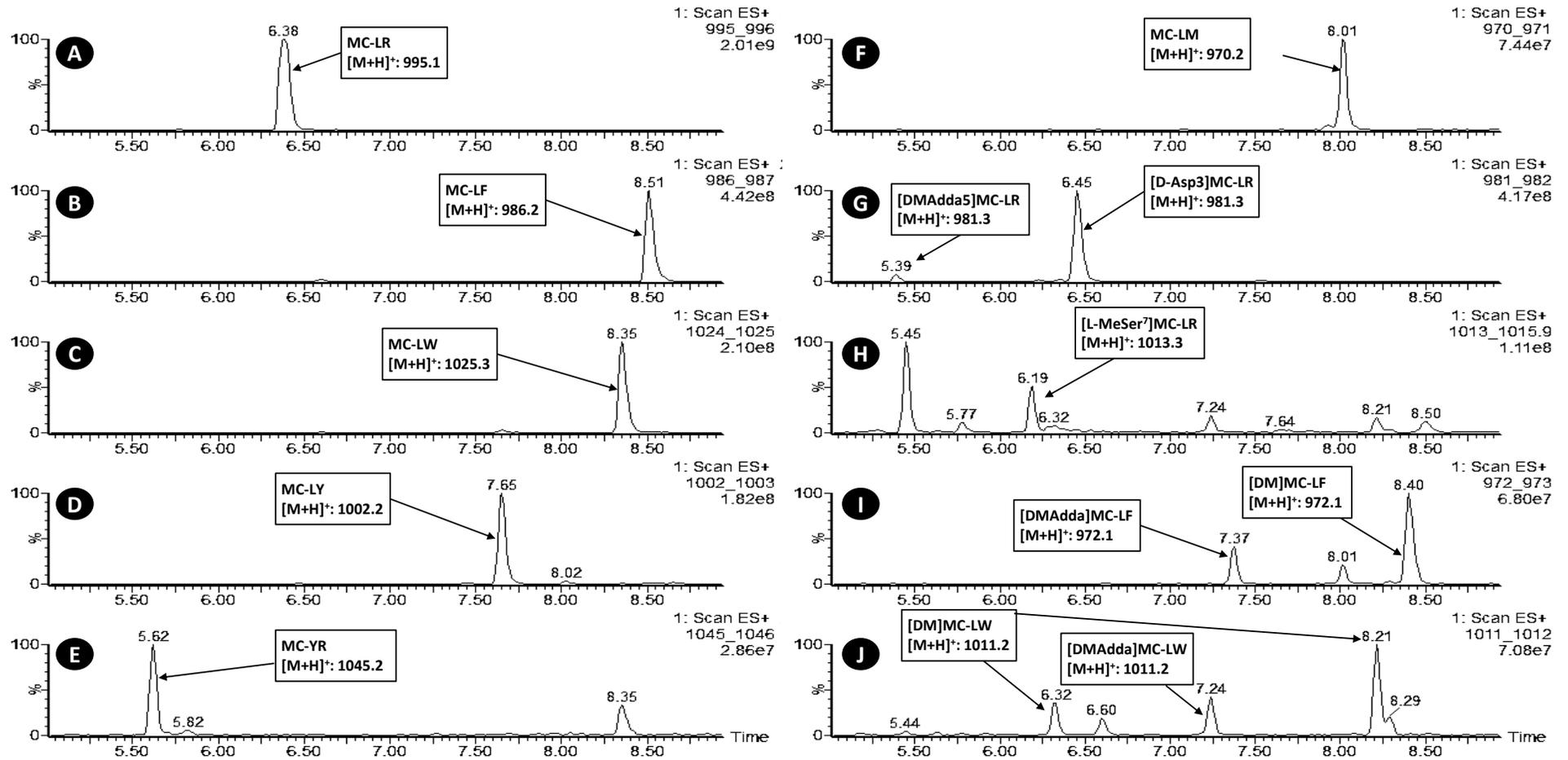
moléculaires  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$  et  $[M+H+K]^{2+}$  ayant pour masses respectives  $m/z$  970, 992, 1008 et 504,5, ainsi que les ions-fragments  $[M+H-134]^+$ ,  $[M+H-NH_3]^+$  et  $[M+H-134-NH_3]^+$  à  $m/z$  836, 953 et 819. Quant à la MC-LR, elle présentait aussi deux formes déméthylées à 5,39 et 6,45 min avec un ion  $[M+H]^+$  à 981 Da et plusieurs ions avec deux charges. Contrairement au second, le composé élué à 5,39 min ne présente ni l'ion  $[M+H-134]^+$  (à 847 Da) ni l'ion  $m/z$  135. Par contre, on observe à  $m/z$  861 un ion cohérent avec  $[M+H-120]^+$  soit  $[M+H-Ph-CH=CH-OH]^+$ , ce qui laisse penser que ce congénère correspond à une forme déméthylée sur le groupement Adda de la MC-LR. Le second, pratiquement co-élué avec la MC-LR, pouvait correspondre aux congénères  $[DAsp^3]MC-LR$  ou  $[DDha^7]MC-LR$ . Il a été possible de trancher en faveur de  $[DAsp^3]MC-LR$  sur la base des fragmentations MS-MS. En effet, le spectre MS-MS de ce composé comportait les fragments de masses 272, 383, 539, 556 et 682 ( $m/z$ ) décrits par [Yuan et al. \(1999\)](#) comme étant caractéristiques de la  $[DAsp^3]MC-LR$ , et correspondant respectivement à :  $[Asp-Arg + H]^+$ ,  $[MDha-Ala-Leu-Asp + H]^+$ ,  $[MDha-Ala-Leu-Asp-Arg + H]^+$ ,  $[MDha-Ala-Leu-Asp-Arg-NH_2 + 2H]^+$  et  $[Asp-Arg-Adda(+H-CH_3OH)-Glu]^+$ . Le congénère  $[Me-Ser^7]-LR$  était quant à lui détecté à 6,19 min ( $[M+H]^+$  1013) et son identification a été réalisée là aussi en MS-MS, sur la base des fragments de masses  $m/z$  393, 571, 862, 884 et 996 qui contiennent tous MeSer dans leur séquence (à la place de Mdha dans la MC-LR), ce résultat ayant déjà été décrit par [Diehnelt et al. \(2006\)](#). Des traces de microcystines déméthylées telle que la MC-LF (7,37 et 8,40 min,  $[M+H]^+$  972) et la MC-LW (6,32, 7,24 et 8,21 min,  $[M+H]^+$  1011) sont aussi suspectées. L'absence des fragments  $[M+H-134]^+$  et  $m/z$  135 sur les spectres et la présence d'ions  $[M+H-120]^+$  suggérait que les congénères élués à 7,37 et 7,24 min soient respectivement la DMAddaMC-LF et la DMAddaMC-LW.

**Tableau 3** : Ions pseudo-moléculaires et fragments sources observés par UHPLC-MS dans les spectres de microcystines, dans l'extrait aqueux de cyanobactéries (75% MeOH, v/v) obtenu après culture de la souche *Microcystis aeruginosa* (PCC7820).

Microcystine	tps ret (min)	[M + H] <sup>+</sup>	[M + 2H] <sup>2+</sup>	[M + H - 134] <sup>+</sup> ou [M + 2H - 135] <sup>+</sup>	m/z 135	Autres ions monochargés et leurs masses m/z	Autres ions dichargés et leurs masses m/z
MC-LR	6.38	995	498	861	Présent		[M + 2H - CH <sub>3</sub> OH] <sup>2+</sup> 482
MC-YR	5.62	1045	523	-	-	[M + H - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> 1027	[M + H + K] <sup>2+</sup> 542; [M + H + Na] <sup>2+</sup> 534 ; [M + 2H - H <sub>2</sub> O] <sup>2+</sup> 514 ; [M + 2H - H <sub>2</sub> O - CO] <sup>2+</sup> 500
MC-LY	7.65	1002	-	868	Présent	[M + Na] <sup>+</sup> 1024 ; [M + H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> 985 ; [M + H - 134 - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> 851	[M + H + K] <sup>2+</sup> 520.5
MC-LM	8.01	970	-	836	-	[M + K] <sup>+</sup> 1008; [M + Na] <sup>+</sup> 992 ; [M + H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> 953 ; [M + H - 134 - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> 819	[M + H + K] <sup>2+</sup> 504.5
MC-LW	8.35	1025	-	891	Présent	[M + Na] <sup>+</sup> 1047 ; [M + H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> 1008 ; [M + H - 134 - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> 874	[M + H + K] <sup>2+</sup> 532
MC-LF	8.51	986	-	852	Présent	[M + Na] <sup>+</sup> 1008 ; [M + H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> 969 ; [M + H - 134 - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> 935 ; [M + H - 2 NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> 952	[M + H + K] <sup>2+</sup> 512.6
[DMAdda]MC-LR	5.39	981	491	-	-	<b>[M + H - 120]<sup>+</sup> 861</b>	[M + H + K] <sup>2+</sup> 510 ; [M + 2H - H <sub>2</sub> O] <sup>2+</sup> 482
[DAsp <sup>3</sup> ]MC-LR	6.45	981	491	847	Présent		[M + H + K] <sup>2+</sup> 510; [M + H + Na] <sup>2+</sup> 502 ; [M + 2H - H <sub>2</sub> O] <sup>2+</sup> 482 ; [M + 2H - CH <sub>3</sub> OH] <sup>2+</sup> 475 ; [M + 2H - (H <sub>2</sub> N) <sub>2</sub> C=NH] <sup>2+</sup> 460
[L-MeSer <sup>7</sup> ]MC-LR	6.19	1013	507	879	Présent	[M + Na] <sup>+</sup> 1035 ; [Mdha + Glu + H] <sup>+</sup> 213	[M + H + K] <sup>2+</sup> 526; [M + H + Na] <sup>2+</sup> 518 ; [M + 2H - CH <sub>3</sub> OH] <sup>2+</sup> 491 ; [M + 2H - CH <sub>3</sub> OH - H <sub>2</sub> O] <sup>2+</sup> 482
[DMAdda]MC-LF	7.37	972	-	-	-	[M + Na] <sup>+</sup> 994 ; <b>[M + H - 120]<sup>+</sup> 852</b> ; [M + H - 120 - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> 835	
[DM]MC-LF	8.40	972	-	838	Présent	[M + Na] <sup>+</sup> 994 ; [M + H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> 820	
[DM]MC-LW	6.32	1011	-	877	-		[M + 2H - CH <sub>3</sub> OH] <sup>2+</sup> 490
[DMAdda]MC-LW	7.24	1011	-	-	-	[M + Na] <sup>+</sup> 1033 ; <b>[M + H - 120]<sup>+</sup> 891</b> ; [M + H - 120 - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> 874	[M + H + K] <sup>2+</sup> 525
[DM]MC-LW	8.21	1011	-	877	-	[M + Na] <sup>+</sup> 1033 ; [M + H - 134 - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> 860	[M + H + K] <sup>2+</sup> 525

tps ret : temps de rétention en UHPLC

- : non détecté



**Figure 11:** Chromatogrammes UHPLC-MS après injection d'un extrait de cyanobactéries (75% MeOH, v/v) obtenu après culture de la souche *Microcystis aeruginosa* (PCC7820) où apparaissent les 13 congénères différents identifiés par leurs courants d'ions  $[M + H]^+$ .

Les abondances relatives des différents variants ont été évaluées sur la base des acquisitions MS réalisées à tension de cône élevée (60 V), en utilisant les courants d'ions correspondant à la somme des ions les plus abondants (excédant 10% dans les spectres correspondants). Les 2 à 5 ions utilisés par MC correspondaient à des ions pseudo-moléculaires et des fragments obtenus en source. Ainsi, l'extrait de cyanobactéries issu de la culture de la souche de *Microcystis aeruginosa* (PCC7820) présente six principaux congénères de microcystines dont la MC-LR, la plus abondante (68,4% de la totalité des microcystines), suivi de la MC-LF (8,3%), de la [Asp<sup>3</sup>]-LR déméthylée (6,9%), la MC-LW (6,5%), la MC-LY (2,9%) et de la MC-YR (2,4%). Concernant les huit autres congénères, minoritaires, ils représentent moins de 4,6% de la totalité des microcystines en abondance. Leurs quantités respectives sont comprises entre 0,3 et 1,3%.

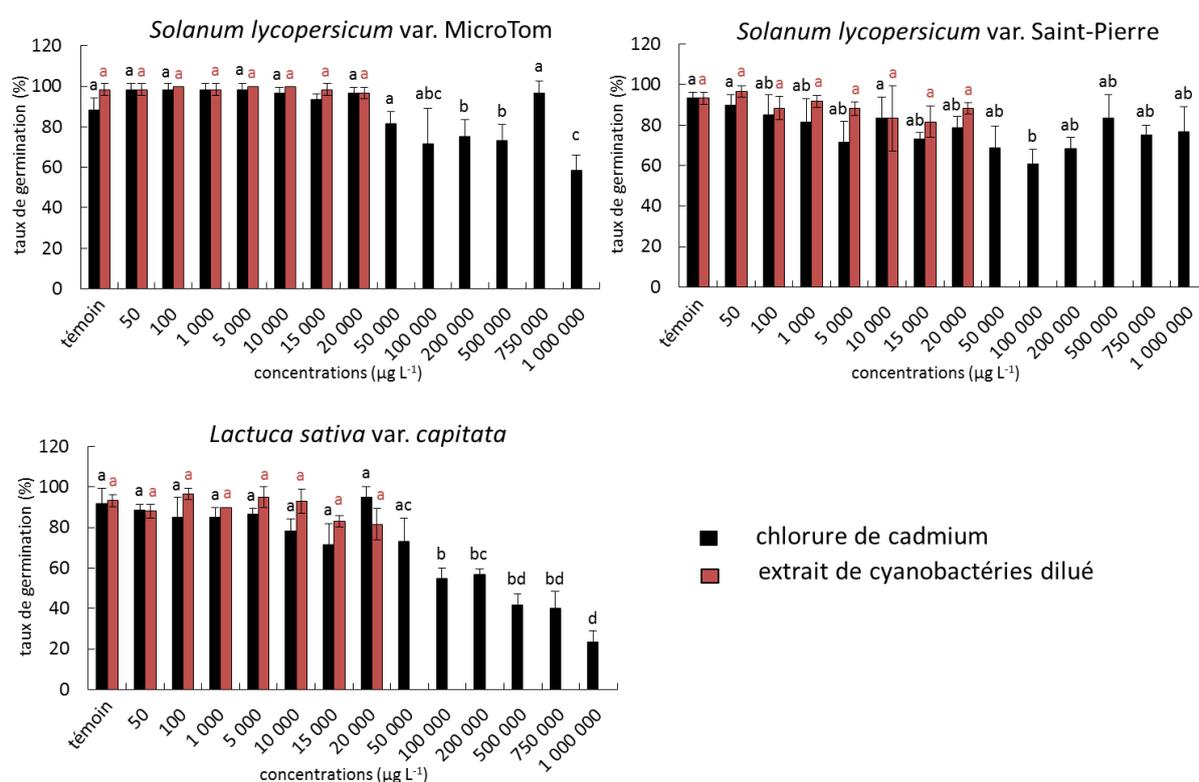
### **3.2.2. Résultats du test de luminescence de *Vibrio fischeri***

La luminescence des bactéries *Vibrio fischeri* (NRRL B11177) a été mesurée après plusieurs périodes d'incubation (5, 15 et 30 min) dans des solutions aqueuses contenant plusieurs concentrations en microcystines : 5, 20, 50 et 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>. Aucune inhibition de la luminescence des bactéries n'a été détectée. L'extrait de *Microcystis aeruginosa* dilué à ces concentrations n'est pas toxique pour *Vibrio fischeri* dans nos conditions d'exposition.

### **3.2.3. Effets de l'extrait de *Microcystis aeruginosa* contenant des microcystines sur la germination et la croissance des racicules après exposition *in vitro***

Les taux de germination obtenus sur différentes semences ont été déterminés après 7 jours d'exposition, *in vitro*, à différentes concentrations en microcystines ou de solutions de chlorure de cadmium. Les concentrations en microcystines dans l'extrait de cyanobactéries, issu de la souche *M. aeruginosa* (PCC7820), étaient comprises entre 0 et 20 mg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>. La solution aqueuse de chlorure de cadmium, utilisée comme témoin positif, était

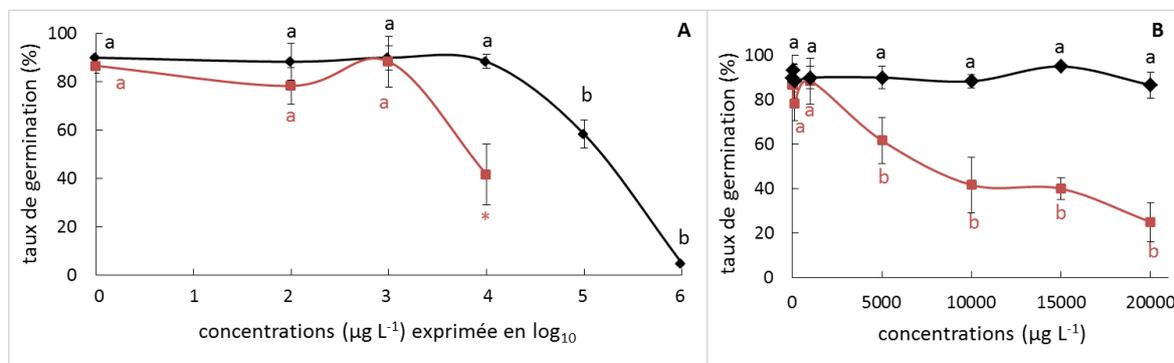
plus ou moins diluée avec des concentrations finales comprises entre 0 et 1 g L<sup>-1</sup> (**Figure 12** et **Figure 13**). Ces derniers sont obtenus sur quatre semences différentes, deux variétés de tomates : *Solanum lycopersicum* var. MicroTom et var. Saint-Pierre, sur une espèce de laitue *Lactuca sativa* var. capitata et sur une espèce de blé tendre *Triticum aestivum*. Quelle que soit l'espèce utilisée, le taux de germination des semences diminuait significativement en présence de la solution aqueuse de chlorure de cadmium ayant une concentration de 100 mg L<sup>-1</sup> (**Figure 12** et **Figure 13A**).



**Figure 12:** Taux de germination (%) des tomates *Solanum lycopersicum* variétés MicroTom (A) et Saint-Pierre (B) et de la laitue *Lactuca sativa* variété capitata (C) après 7 jours d'exposition à différentes concentrations (50 µg L<sup>-1</sup> à 1 g L<sup>-1</sup>) de chlorure de cadmium (noir), ou à l'extrait de *Microcystis aeruginosa* (rouge) contenant différentes concentrations en microcystines (50 µg L<sup>-1</sup> à 20 mg L<sup>-1</sup>). Les données sont représentées par la moyenne ± σ (n=3). Des lettres différentes indiquent des différences significatives (p<0,05).

Les CI<sub>50</sub>, concentrations médianes induisant une inhibition de la germination de 50% des semences, étaient de 145 mg L<sup>-1</sup> pour le blé, 390 mg L<sup>-1</sup> pour la laitue, et supérieures à 1 g L<sup>-1</sup> pour les deux variétés de tomates. Par contre, pour l'extrait de *M. aeruginosa* dont les

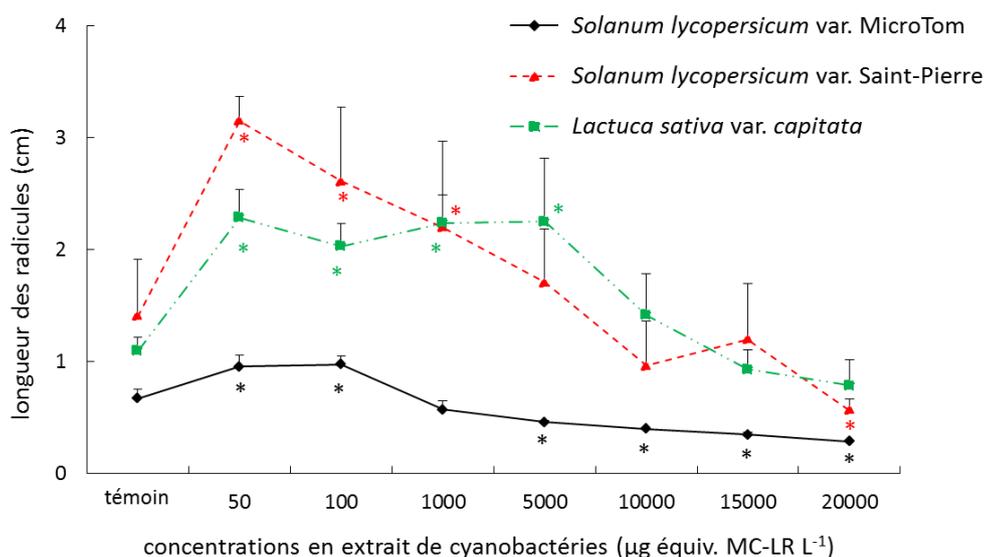
concentrations en microcystines étaient comprises entre 0 et 20 mg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>, seule la germination du blé (*T. aestivum*) était impactée avec une CI<sub>50</sub> de 11 mg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup> (**Figure 13B**).



**Figure 13:** (A) Taux de germination (%) du blé *Triticum aestivum* BIO Atlass après 7 jours d'exposition à différentes concentrations (0 à 10 mg L<sup>-1</sup>) en extrait de *Microcystis aeruginosa* (rouge) ou à différentes concentrations (0 à 1 g L<sup>-1</sup>) d'une solution aqueuse de chlorure de cadmium (noir). Un zoom est effectué (B) sur les plus faibles concentrations comprises entre 5 et 20 mg L<sup>-1</sup> d'extrait de *M. aeruginosa* ou de chlorure de cadmium. Les données sont représentées par la moyenne ± σ (n=3). Des lettres différentes indiquent des différences significatives (p<0,05).

Cependant, malgré l'absence d'effets visibles sur la germination, l'exposition des semences de tomates (*S. lycopersicum*) de variété MicroTom ou Saint-Pierre ainsi que celles de laitues (*L. sativa*) à différentes concentrations d'extrait de *M. aeruginosa* pendant 7 jours modifiait significativement le développement et la croissance des racines (**Figure 14**). Pour de faibles concentrations en toxines, comprises entre 50 et 100 μg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>, la longueur des racines de tomate Saint-Pierre et de la laitue augmentait significativement de 125% et 109%, par rapport aux témoins. A l'inverse, lorsque la concentration en extrait de *M. aeruginosa* était supérieure à 1 mg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>, les racines étaient moins longues, tout en conservant une longueur moyenne supérieure à celle des témoins jusqu'à une concentration de 10 mg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>. Au-delà de cette concentration, la longueur des racines devenait alors significativement plus faible que la longueur des témoins cependant seule la taille des racines de la tomate Saint-Pierre était significativement distincte de celle des témoins. Les mesures effectuées sur les racines de tomates MicroTom révélaient un

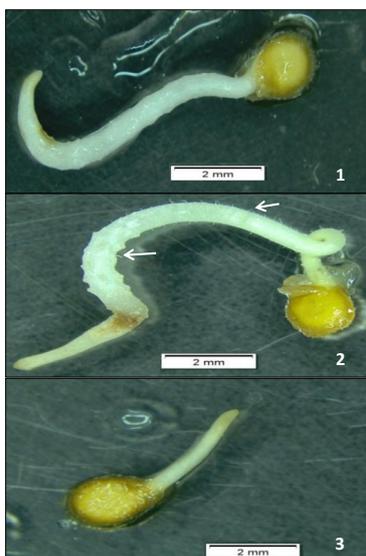
résultat similaire à ceux observés pour la tomate Saint-Pierre. Une première gamme de concentration (50 à 100  $\mu\text{g}$  équiv. MC-LR  $\text{L}^{-1}$ ) stimulait la croissance des racicules d'environ 146% par rapport au groupe témoin (**Figure 14**). Puis une seconde gamme de concentration (entre 5 et 20 mg équiv. MC-LR  $\text{L}^{-1}$ ) induisait une diminution significative de la longueur des racicules par rapport aux témoins, avec une longueur ne représentant plus que 43% de la taille des témoins.



**Figure 14:** Evolution de la longueur des racines primaires (radicules) des tomates *Solanum lycopersicum* var. MicroTom (losanges noirs), *Solanum lycopersicum* var. Saint-Pierre (triangles rouges) et de la laitue *Lactuca sativa* var. capitata (carrés verts) exposés à différentes concentrations d'extrait de *Microcystis aeruginosa* (50  $\mu\text{g}$  équiv. MC-LR  $\text{L}^{-1}$  à 20 mg équiv. MC-LR  $\text{L}^{-1}$ ) pendant 7 jours. Les données sont représentées par la moyenne  $\pm \sigma$  (n=3). Des astérisques (\*) indiquent des différences significatives avec le groupe témoin non traité ( $p < 0,05$ ).

Cette forte diminution de la croissance des racicules est aussi visible sur la **Figure 15** où, outre la taille des plantules plus élevée avec une concentration de 100  $\mu\text{g}$  équiv. MC-LR  $\text{L}^{-1}$ , les racicules étaient plus développées, avec la formation de poils racinaires absorbants. Pour le chlorure de cadmium, il provoquait une diminution de la taille des racicules pour une concentration comprise entre 5 mg et 1 g  $\text{L}^{-1}$ . En ce qui concerne le blé, aucune différence en

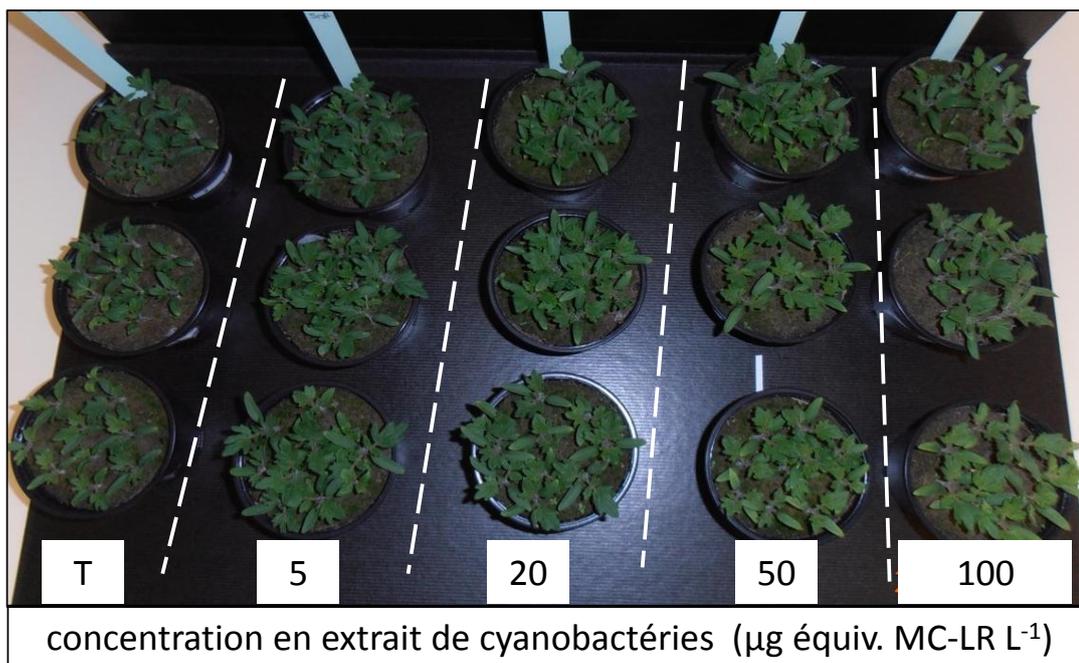
rapport avec l'émergence des racines primaires ou des coléoptiles n'a pu être observée après traitement avec l'extrait de *M. aeruginosa*.



**Figure 15:** Morphologie des racines primaires de tomates *Solanum lycopersicum* var. MicroTom après 7 jours d'exposition *in vitro* à l'eau distillée (1), à une solution aqueuse contenant 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup> (2) et 20 mg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup> (3). Les flèches indiquent la présence de poils absorbants.

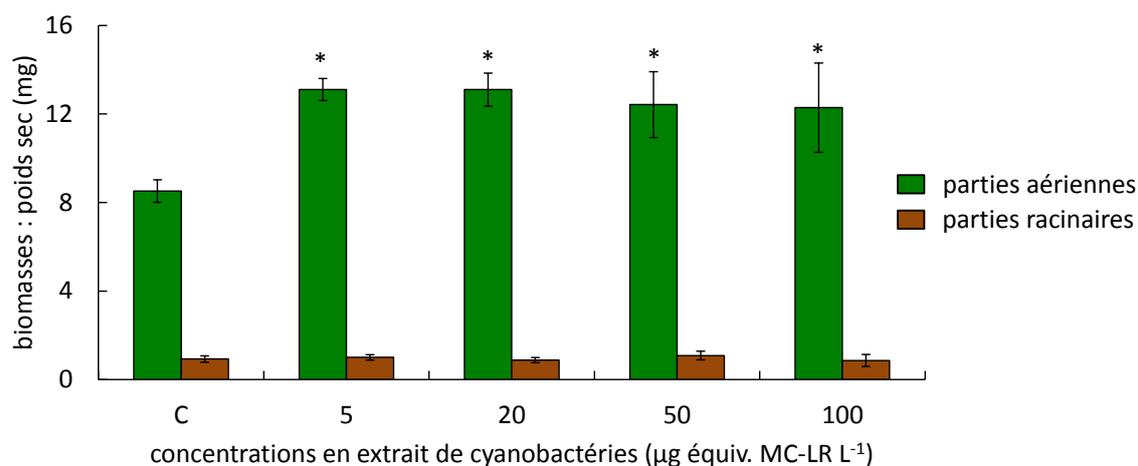
#### **3.2.4. Effets de l'extrait de *Microcystis aeruginosa* contenant des microcystines sur la croissance de plantules de tomates *Solanum lycopersicum* var. MicroTom**

La croissance des tomates *S. lycopersicum* var. MicroTom dans des pots remplis de sols et irrigués quotidiennement avec un extrait de *M. aeruginosa* dilué dans de l'eau MilliQ (5 à 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>) a été suivie pendant 14 jours. Par l'observation visuelle (**Figure 16**), les plants des pots traités avec l'extrait de *M. aeruginosa* semblaient posséder une surface foliaire totale plus importante que celle des plants des pots témoins, avec notamment les premières feuilles plus développées.



**Figure 16:** Développement des plantules de tomates *Solanum lycopersicum* var. MicroTom (10 plantules/pot) semées dans le sol du site expérimental de la Pierre-Plate (Versailles, France) après 14 jours d'exposition à différentes concentrations en extrait de *Microcystis aeruginosa* (0 à 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>) (n=3).

Cet effet a pu être confirmé par la détermination de la biomasse sèche des parties aériennes et racinaires après 14 jours d'exposition (**Figure 17**). Quelle que soit la concentration de l'extrait de *M. aeruginosa* utilisée pour l'irrigation (5 à 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>), les biomasses des parties aériennes des plantules exposées étaient significativement plus importantes que celles des témoins. A l'inverse, l'irrigation avec l'extrait ne modifiait pas significativement les biomasses sèches racinaires.



**Figure 17:** Evolution de la biomasse sèche des parties aériennes (vert) et des racines (marron) des plantules de tomates *Solanum lycopersicum* var. MicroTom exposées 14 jours, par irrigation du sol, à différentes concentrations en extrait de *Microcystis aeruginosa* (0 à 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>). Les données sont représentées par la moyenne ±  $\sigma$  (n=3). Des astérisques (\*) indiquent des différences significatives avec le groupe témoin non traité (p<0,05).

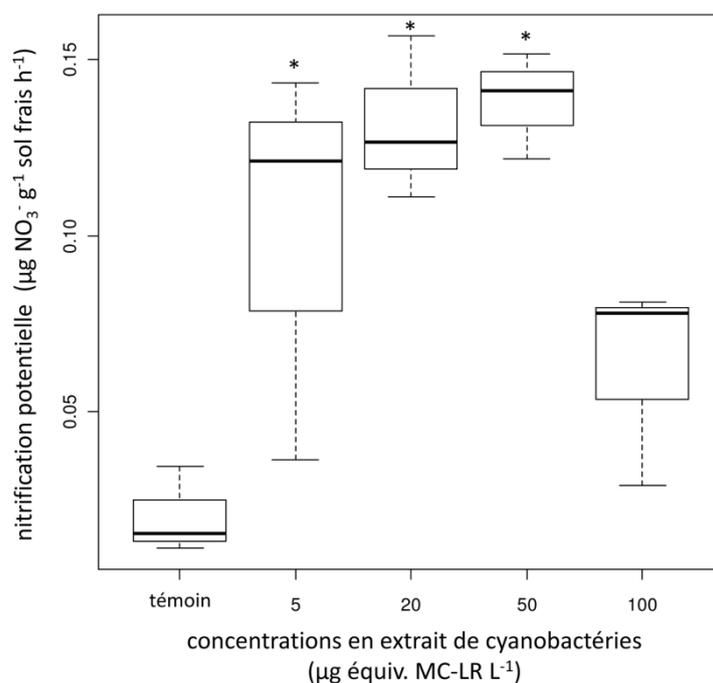
### 3.2.5. Activités enzymatiques du sol et nitrification potentielle

Dans le but de mettre en évidence un impact des cyanotoxines de type microcystine sur les microorganismes impliqués dans les cycles biogéochimiques, les mesures d'activités enzymatiques des sols (arylsulfatase, phosphatase, uréase et  $\beta$ -D-glucosidase) ont été mesurées après 14 jours d'irrigation avec un extrait de *Microcystis aeruginosa* à des concentrations de 0, 5, 20, 50 et 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup> (**Tableau 4**). Quelle que soit l'activité mesurée et la concentration de l'extrait de *M. aeruginosa*, aucune des quatre activités enzymatiques n'a été significativement modifiée.

**Tableau 4:** Activités enzymatiques globales du sol (mU g<sup>-1</sup> sol sec) obtenues après 14 jours de traitement, par irrigation, à différentes concentrations en extrait de *Microcystis aeruginosa* (50 à 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>). Les données sont indiquées par la moyenne ± σ (n=3).

	traitements avec l'extrait de cyanobactéries ( µg équiv. MC-LR L <sup>-1</sup> )				
	témoin	5	20	50	100
<b>phosphatase</b>	61,65 ± 10,09	65,84 ± 16,27	71,59 ± 7,41	76,19 ± 3,51	84,65 ± 18,69
<b>β-D-glucosidase</b>	8,20 ± 2,36	9,36 ± 1,98	8,91 ± 1,50	10,89 ± 0,53	12,66 ± 2,80
<b>arylsulfatase</b>	8,97 ± 1,59	10,66 ± 2,60	8,52 ± 1,51	8,61 ± 0,52	9,31 ± 1,35
<b>uréase</b>	0,036 ± 0,005	0,031 ± 0,003	0,030 ± 0,003	0,031 ± 0,005	0,034 ± 0,004

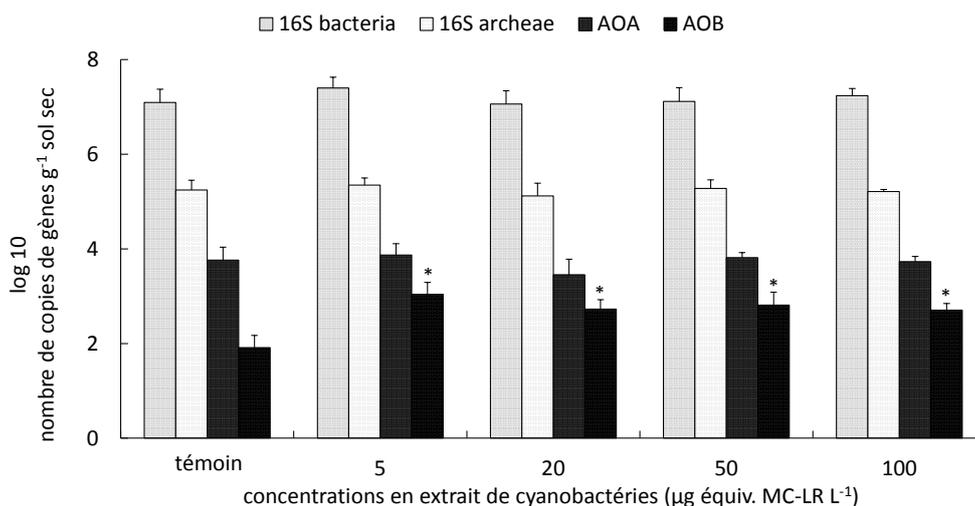
Dans les sols recevant des concentrations faibles en extrait de cyanobactéries (5 à 50 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>), l'activité nitrifiante augmentait de façon significative, en étant jusqu'à cinq fois supérieure à l'activité obtenue sur le sol témoin (**Figure 18**). Cependant, pour la plus forte concentration (100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>), l'activité n'était pas significativement différente de celle du sol non traité.



**Figure 18:** Evolution de la nitrification potentielle mesurée sur des sols frais traités pendant 14 jours avec différentes concentrations en extrait de *Microcystis aeruginosa* (0 à 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>) (n=3). Des astérisques (\*) indiquent des différences significatives avec le groupe témoin non traité (p<0,05).

### **3.2.6. Effets de l'extrait de *Microcystis aeruginosa* contenant des microcystines sur les abondances des communautés bactériennes et archéennes totales, ainsi que sur les communautés spécialisées dans la nitrification (AOA et AOB)**

L'ADN des sols a été extrait, après 14 jours d'apports quotidiens de différentes concentrations en extrait de *M. aeruginosa* (0 à 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>). Le nombre de copies de gènes d'acides ribonucléiques ribosomiques (ARNr) 16S de bactéries et d'archées a été déterminé, ainsi que le nombre de copies de gènes associés aux communautés bactériennes nitrifiantes (AOB) et aux communautés archéennes nitrifiantes (AOA), par qPCR en temps réel. La **Figure 19** illustre les dosages du nombre de copies de gènes 16S d'ARNr dans le sol afin d'en déduire les abondances totales en bactéries et archées. Les abondances des bactéries et des archées dans les sols traités ne sont pas significativement différentes de celles des sols témoins, quelle que soit la concentration en extrait de *M. aeruginosa* utilisée (0, 5, 20, 50 ou 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>) lors des arrosages journaliers. L'abondance des gènes *amoA*, qui traduisent les abondances d'archées nitrifiantes (AOA) est identique à celle du sol non traité, par conséquent la communauté des archées nitrifiantes n'était pas affectée par le traitement avec l'extrait de *M. aeruginosa*. En revanche, les abondances des bactéries nitrifiantes (AOB) étaient fortement modifiées par l'exposition des sols à l'extrait de *M. aeruginosa*. La quantité d'AOB était multipliée par 13 pour les sols exposés à des concentrations comprises entre 5 et 50 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>, par rapport au sol non traité. L'augmentation des bactéries nitrifiantes dans le sol était corrélée positivement et significativement ( $r=0,56$  ;  $p<0,05$ ) à l'augmentation de l'activité nitrifiante (**Figure 18**).



**Figure 19:** Evolution du nombre de copies de gènes 16S de bactéries et d'achées et de gènes *amoA* liés aux groupes fonctionnels des bactéries nitrifiantes (AOB) et archées nitrifiantes (AOA) dans des sols traités pendant 14 jours à différentes concentrations en extrait de *Microcystis aeruginosa* (0 à 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>). Les données sont représentées par la moyenne ± σ (n=3). Des astérisques (\*) indiquent des différences significatives avec le groupe témoin non traité (p<0,05).

### 3.3. Discussion

L'analyse en UHPLC-MS/MS de l'extrait de *Microcystis aeruginosa* obtenu après culture *in vitro* de *Microcystis aeruginosa* PCC7820 révèle la présence de six congénères majeurs de microcystines : MC-LR (68% de la totalité des microcystines), MC-LF, [DMAsp<sup>3</sup>]MC-LR, MC-LW, MC-LY et MC-YR et de huit autres congénères mineurs, représentant uniquement 4,6% de la totalité des microcystines. Cette caractérisation de l'extrait de *M. aeruginosa*, par identification structurale et détermination de leur potentiel toxique (6,78 mg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>), est en accord avec les précédentes études effectuées sur la même souche (Robillot et al., 2000; Akin-Oriola and Lawton, 2005; Ríos et al., 2013) où quatre congénères principaux (MC-LR, -LF, -LW et -LY) et entre deux et six congénères mineurs ont été identifiés.

Le premier objectif de ces travaux était d'examiner les effets de cet extrait de *M. aeruginosa* sur la capacité de germination des graines, par comparaison avec une substance toxique de référence, le chlorure de cadmium (contrôle positif). Pour ce faire, quatre variétés de plantes ont été utilisées : les tomates *Solanum lycopersicum* var. MicroTom et var. Saint-

Pierre, le blé tendre *Triticum aestivum* et la laitue *Lactuca sativa* var. *capitata*. Après 7 jours d'exposition à différentes concentrations d'extrait de *M. aeruginosa*, seule la germination du blé (*T. aestivum*) était inhibée avec une  $CI_{50}$  de 11 mg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup> alors que celle du chlorure de cadmium était de 145 mg L<sup>-1</sup>. L'extrait de cyanobactéries provoque une inhibition très importante de la germination du blé, avec une concentration 13 fois plus faible que celle du chlorure de cadmium. Des résultats similaires ont été trouvés par [Saqrane et al. \(2008\)](#), où un extrait aqueux de cyanobactéries contenant majoritairement la MC-LR inhibait fortement la germination du blé dur *T. durum* avec une  $CI_{50}$  de 11 mg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>. Pour les tomates, les travaux d'[El Khalloufi et al. \(2012\)](#) montraient une diminution de l'ordre de 40% du taux de germination, après exposition des semences à une concentration de 16 mg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>, provenant d'un extrait de cyanobactéries dont la MC-LR représente 75% de la concentration totale en microcystines. A l'inverse, nous n'avions pas observé d'effets sur les deux variétés de tomates testées. Ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer par des compositions différentes en microcystines dans les extraits. Pour autant, de fortes concentrations en microcystines peuvent modifier le métabolisme des semences avec une diminution de la germination, comme cela fut montré sur des semences de *Lens esculenta*, *Zea mays*, *Triticum durum* et *Pisum sativum* exposés à un extrait de cyanobactéries dilué à hauteur de 12 mg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup> ([Saqrane et al., 2008](#)). Mais l'intensité des effets des microcystines dépendent en partie des variétés de semences utilisées. Une autre étude a mis en évidence la plus forte résistance du riz aux microcystines par rapport au colza ([Chen et al., 2004](#)). D'autre part, ces travaux démontraient bien que l'effet des microcystines sur la capacité de germination des graines est à la fois dépendant de l'espèce et de la dose utilisée. Les comparaisons avec d'autres études restent difficiles car chaque extrait de cyanobactérie possède une composition en toxines qui lui est propre.

Si l'extrait de cyanobactéries, utilisé à des concentrations environnementales de microcystines comprises entre 0 et 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ , n'a aucun effet sur la germination des différentes semences, ces faibles concentrations ont des effets sur la croissance et la morphologie des racines de plantes. Par exemple, après 7 jours d'exposition, la taille des racines de tomates ou de laitue augmentait de façon significative par rapport à celles des témoins. Des résultats similaires ont déjà été observés sur *Brassica napus* et *Brassica chinensis* où de faibles concentrations, respectivement 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  et 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  de MC-RR provoquaient une stimulation de la croissance des plantules (Bibo et al., 2008). Il est aussi possible que les microcystines, contenues dans l'extrait, agissent dans les premières phases de développement du germe en accélérant le processus de germination des semences. En effet, dans cette étude, il était mis en évidence que des concentrations comprises entre 1 et 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  de MC-RR accéléraient la germination alors que des concentrations supérieures à 1  $\text{mg L}^{-1}$  la retardaient. Nous avons observé des résultats similaires. Une forte concentration (comprise entre 1 et 20  $\text{mg équiv. MC-LR L}^{-1}$ ) réduisait significativement la taille des racines de tomates. D'autres études ont montré que des changements morphologiques affectant la croissance ou la structure des racines étaient possibles chez plusieurs plantes comme *Arabidopsis thaliana*, *Solanum tuberosum*, *Sinapsis alba*, *Phaseolus vulgaris* et *Medicago sativa* (Kos et al., 1995; Kurki-Helasma and Meriluoto, 1998; McElhiney et al., 2001; Pflugmacher et al., 2006). Par exemple, les travaux de Chen et al. (2012) ont récemment montré que de fortes concentrations en MC-LR ( $>2 \text{ mg L}^{-1}$ ) affectaient la morphogénèse racinaire en inhibant l'élongation, le développement de la couronne racinaire et le développement des racines latérales résultant des primordia. A l'inverse, de faibles concentrations en cyanotoxines (0-200  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) n'avaient aucun effet sur la croissance des racines de riz Chen et al. (2004). Pour ce qui concerne le blé, dans cette étude aucune différence n'a pu être mise en exergue concernant la croissance des racines ou des coléoptiles

de blé quel que soit la concentration (faible ou forte) en toxines utilisée. Pour autant, [Pflugmacher et al. \(2007\)](#) ont démontré qu'un extrait de cyanobactéries dilué à 0,5 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup> inhibait de 44% la taille des racines de blé *T. aestivum*.

Le second objectif de cette étude était de déterminer l'effet d'un extrait de cyanobactéries à des concentrations environnementales en microcystines comprises entre 0 et 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>, sur la croissance des plantules de *Solanum lycopersicum* var. MicroTom et sur l'activité microbienne des sols. Aucun effet sur la biomasse racinaire des plantules n'a été observé après 14 jours d'exposition, mais la biomasse des parties aériennes était significativement plus importante sur les plants traités. Celle-ci augmentait de 44 à 53% après exposition aux différentes concentrations en extrait de cyanobactéries. Dans des conditions similaires, avec du sable comme substrat pour les plantes, [Saqrane et al. \(2009\)](#) ont montré que les biomasses de plusieurs espèces de *Poaceae* diminuaient de façon significative, après une exposition à 500 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>. Cependant cette famille de végétaux fait partie du clade des monocotylédones, lesquelles semblent être sensibles à l'exposition aux microcystines, comme en témoigne l'effet sur la germination du blé. Dans des conditions d'exposition en hydroponie, là aussi une inhibition de la croissance était le plus souvent observée sur des plantules d'*Oriza sativa* ([Chen et al., 2004](#)), *Pisum sativum* ([Saqrane et al., 2008](#)) et *Lepidium sativum* ([Gehring et al., 2003](#)). Pour autant, une étude récente d'[Azevedo et al. \(2014\)](#) démontrait que de faibles concentrations en MC-LR (0 à 78 µg L<sup>-1</sup>), ne modifiaient pas les biomasses racinaires et aériennes des plants de riz âgés de 20 jours et exposés pendant 7 jours. A l'inverse, une étude de [Gehring et al. \(2003\)](#) mettait en exergue une diminution de la biomasse de *Medicago sativa* après une exposition à de faibles concentrations en microcystines (5 et 10 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>). Tous ces résultats contradictoires, concernant les effets des extraits de cyanobactéries sur le développement de la racine ou des plantules pourraient s'expliquer par le fait que les extraits de cyanobactéries

utilisés sont composés de différents congénères et/ou par des dispositifs expérimentaux distincts tels que des cultures en hydroponie ou avec un substrat inerte (sable) contre des systèmes de culture sur sol. Ainsi, l'utilisation dans nos expérimentations d'un sol agricole contenant une forte proportion de matières organiques et une faible quantité d'argiles peut influencer sur la biodisponibilité des microcystines pour les microorganismes et les plantes et donc sur leur exposition. Cette hypothèse s'appuie sur les travaux de [Miller et al. \(2001\)](#), [Miller and Fallowfield, \(2001\)](#) et [Morris et al. \(2000\)](#) qui ont montré que des sols riches en matières organiques ou en argiles ont tendance à accroître l'adsorption des microcystines.

Après 14 jours d'irrigation du sol avec de faibles concentrations de microcystines (0-100  $\mu\text{g}$  équiv. MC-LR  $\text{L}^{-1}$ ), les activités enzymatiques globales du sol ne sont pas modifiées de façon significative par rapport au témoin. Cependant, dès la plus faible concentration utilisée (5  $\mu\text{g}$  équiv. MC-LR  $\text{L}^{-1}$ ), une augmentation significative de l'activité nitrifiante du sol est observée. Cette augmentation d'activité n'est pas liée à l'augmentation des abondances des bactéries et des archées. Cependant, [El Khalloufi et al. \(2011\)](#) observaient un effet des microcystines sur la quantité de bactéries de type rhizobium, formant moins de nodules sur les racines de *Medicago sativa*, lors de l'exposition. Ce changement dans la structure des communautés bactériennes du sol pourrait être bénéfique pour d'autres groupes tels que les organismes effectuant la nitrification à partir d'ammonium. A travers cette étude, nous avons observé pour la première fois une stimulation des communautés nitrifiantes du sol après 14 jours d'exposition à différentes concentrations en extrait de cyanobactéries (0-100  $\mu\text{g}$  équiv. MC-LR  $\text{L}^{-1}$ ). Seules les abondances des bactéries nitrifiantes (AOB) étaient significativement plus importantes après exposition du sol à l'extrait de cyanobactéries par rapport au témoin. D'autre part, la corrélation positive entre l'augmentation de l'activité nitrifiante et l'augmentation des abondances de bactéries nitrifiantes nous amène à penser que l'irrigation avec l'extrait de cyanobactéries stimule les abondances des communautés d'AOB. Ces

changements de structure et de physiologie des communautés bactériennes après expositions aux microcystines ont déjà été observés en milieu aquatique par [Giaramida et al. \(2013\)](#). D'autres études suggèrent aussi la stimulation des organismes hétérotrophiques durant les efflorescences de cyanobactéries ([Riemann and Winding, 2001](#); [Eiler and Bertilsson, 2007](#)), notamment de par un enrichissement du milieu en carbone organique. Cependant dans le sol, au vu des faibles quantités de carbone apportées par les microcystines ( $0,04 \text{ mg kg}^{-1}$  après 14 jours d'irrigation à  $100 \text{ } \mu\text{g } \text{équi. MC-LR L}^{-1}$ ), cette hypothèse semble peu probable. De plus, l'induction de la croissance des racines et des plantules ainsi que l'augmentation de la nitrification potentielle et des abondances de bactéries nitrifiantes pourraient s'expliquer par une inhibition des protéines phosphatases par les microcystines et/ou par la présence d'autres métabolites secondaire ayant des caractéristiques allopathiques. En effet, les protéines phosphatases sont connues pour réguler de très nombreux mécanismes physiologiques en déphosphorant certaines protéines ([Corbel et al., 2014](#)). D'autres études semblent nécessaires afin d'expliquer les résultats obtenus sur la physiologie des plantes. Déjà plusieurs études montraient que les microcystines, suivant leurs concentrations, se comportent comme des signaux chimiques capables de stimuler ou d'inhiber la croissance des communautés bactériennes ([Christoffersen, 1996](#); [Kearns and Hunter, 2001](#); [Babica et al., 2006](#)). Une étude portant sur l'effet de la MC-LR sur la croissance de plantules montrait une stimulation de la croissance après exposition à de faibles doses. Au vu des effets des microcystines sur la croissance des plantes, le concept d'hormèse avait déjà été avancé ([Bibo et al., 2008](#)).

### **3.4. Conclusion**

Les effets phytotoxiques de l'extrait de cyanobactéries issu de la culture *in vitro* de *Microcystis aeruginosa* (PCC7820) sont visibles notamment sur la germination du blé avec une  $CI_{50}$  de 11 mg équiv. MC-LR  $L^{-1}$ . Cependant, les autres semences étudiées et notamment celles de tomate *Solanum lycopersicum* var. MicroTom ne voient pas leur capacité de germination altérée. Pour autant la croissance des plantules qui se sont développées *in vitro* pendant 7 jours, en boîte de Pétri, est modifiée par l'extrait de cyanobactéries. Des concentrations environnementales (50 et 100  $\mu g$  équiv. MC-LR  $L^{-1}$ ) stimulent la croissance des radicules des tomates (MicroTom et Saint-Pierre) ainsi que des laitues, dont la taille peut être deux fois plus importante comparée aux témoins. A l'inverse de fortes concentrations (<1 g équiv. MC-LR  $L^{-1}$ ) vont inhiber la croissance des radicules de toutes les semences choisies. De la même façon en utilisant un sol comme support des plantules de MicroTom et des concentrations comprises entre 5 et 100  $\mu g$  équiv. MC-LR  $L^{-1}$  durant 14 jours, les parties aériennes sont plus développées. Ces résultats obtenus sur les plantules après 7 jours en conditions d'hydroponie ou après 14 jours sur du sol nous laissent supposer que des concentrations environnementales en extrait de cyanobactéries stimulent la croissance des plantules de tomates lors des premières étapes de développement observées ici. Ce premier constat nous amène à supposer que les toxines apportées à faibles concentrations au sol seraient capables d'être absorbées par la plante et par ce biais de stimuler leur croissance, tel un messenger chimique. En ce qui concerne les activités microbiennes des sols, aucune modification des activités enzymatiques, liées aux cycles géochimiques, n'est observée après 14 jours d'irrigation. Cependant, l'activité de nitrification des sols est stimulée pour des concentrations inférieures à 100  $\mu g$  équiv. MC-LR  $L^{-1}$ . Cette augmentation d'activité après exposition aux microcystines est fortement corrélée à une augmentation de l'abondance des bactéries nitrifiantes. Ainsi, ce changement des structures microbiennes des sols pourrait

résulter d'une dégradation biologique des microcystines contenues dans l'extrait par des microorganismes du sol. Nous nous proposons dans le chapitre suivant de mieux appréhender le devenir des toxines de cyanobactéries dans le sol après irrigation.



**Chapitre 4 : Devenir de la MC-LR dans un sol agricole et  
translocation à la tomate *Solanum lycopersicum* var.  
MicroTom**



#### **4.1. Introduction**

Le devenir des cyanotoxines présentes dans l'eau a été abondamment étudié au cours de ces dernières années notamment en conditions contrôlées. Outre la dégradation photochimique par les rayons UV, l'adsorption sur des particules en suspension dans des milieux aqueux ou sur des sédiments, la dégradation biologique a aussi été fortement étudiée (Corbel et al., 2014). Cependant, le devenir des toxines lors d'une irrigation des sols reste peu étudié, une partie des toxines peut être photo-dégradée en surface, comme cela est observé à la surface de l'eau (Welker and Steinberg, 2000). En raison de temps de demi-vie des toxines dans les sols variant de 6 à 17,8 jours (Chen et al., 2006b), les microcystines pourraient persister dans le sol suffisamment longtemps pour que des interactions physiques et biologiques soient observées. Chen et al. (2006a,b), Miller et al. (2001) et Morris et al. (2000) ont étudié l'adsorption des microcysties au niveau de différents sols agricoles. Ils ont démontré que la composition des sols en argiles et en matières organiques jouait un rôle essentiel dans l'adsorption des microcystines. Cependant, il semblerait que l'adsorption des microcystines au sol reste faible, les laissant fortement biodisponibles pour les organismes du sol tels que les microorganismes ou les plantes. Ainsi, certaines bactéries sont connues pour être capables de dégrader les microcystines : *Arthrobacter* sp., *Brevibacterium* sp., *Rhodococcus* sp. ou encore *Sphingomonas* sp. (Bourne et al., 2001; Manage et al., 2009) mais aucune étude ne s'est intéressée au devenir des microcystines dans les sols, apportées lors d'une irrigation. D'autre part, des études se sont intéressées à l'impact des microcystines sur les plantes terrestres (Yin et al., 2005; Saqrane et al., 2008; 2009; El Khalloufi et al., 2012) et montrent des effets sur la croissance, l'activité photosynthétique ou encore l'induction de la production d'espèces réactives de l'oxygène. Si ces résultats témoignent d'un transfert à la plante, cela fut confirmé par Peuthert et al. (2007) qui montraient l'absorption de la MC-LR dans les racines et une translocation jusqu'aux tiges. Depuis, des études s'intéressant aux concentrations accumulées

par les plantes cultivées dans des conditions réalistes en terme de support (sol) et de concentrations ont permis de doser des concentrations comprises entre 0,05 et 1,45  $\mu\text{g g}^{-1}$  (Crush et al., 2008; Mohamed and Al Shehri, 2009). Cependant, les dosages des toxines de type microcystine dans les organes de plantes ne s'intéressent qu'aux fractions libres. Or, il est probable que ces toxines soient capables de se lier à d'autres molécules comme ce fut observé chez les animaux (Nasri et al., 2008).

Par conséquent, notre premier objectif consistait à étudier le devenir des microcystines dans des conditions réalistes à l'aide de colonnes de sol et de MC-LR marquée au carbone 14 ( $^{14}\text{C}$ -MC-LR), comme marqueur de cette vaste famille d'hépatotoxines. La capacité d'adsorption de la MC-LR aux éléments du sol a été déterminée en effectuant un lessivage ou diverses extractions, juste après l'exposition ou après une incubation de 28 ou 56 jours. La biodégradation de la  $^{14}\text{C}$ -MC-LR a été estimée à partir de la minéralisation du carbone pendant ces temps d'incubation. D'autre part, un second apport de  $^{14}\text{C}$ -MC-LR, sur une colonne, 28 jours après la première exposition, a permis d'observer la réponse des microorganismes préalablement exposés afin d'observer si une résilience des microorganismes du sol était possible. Enfin les extraits de sol obtenus ont été analysés afin de déterminer si la  $^{14}\text{C}$ -MC-LR restait sous sa forme initiale ou était dégradée en métabolites.

Le second objectif consistait à déterminer si le transfert de la  $^{14}\text{C}$ -MC-LR à la plante était possible à la fois en conditions réalistes avec un sol pour support mais aussi en conditions hydroponiques. Cette dernière manipulation sur des plants mûres avait pour objectif d'établir un bilan de la bioconcentration des toxines par la tomate *Solanum lycopersicum* var. MicroTom dans les différents organes de la plante. En outre, cela permettait d'établir si un risque sanitaire pouvait être pris en considération suite à l'accumulation de toxines à l'intérieur des parties comestibles. Enfin la proportion de toxines libres et liées a pu être déterminée.

Ainsi, au travers ce chapitre nous cherchons donc à répondre aux questions suivantes :

**Q 3.1 :** Les communautés microbiennes du sol sont-elles capables de dégrader les microcystines apportées au sol par irrigation ?

**Q 3.2 :** Les microcystines apportées par irrigation s'adsorbent-elles au niveau du sol ? Sont-elles sujettes à rester biodisponibles dans les sols ?

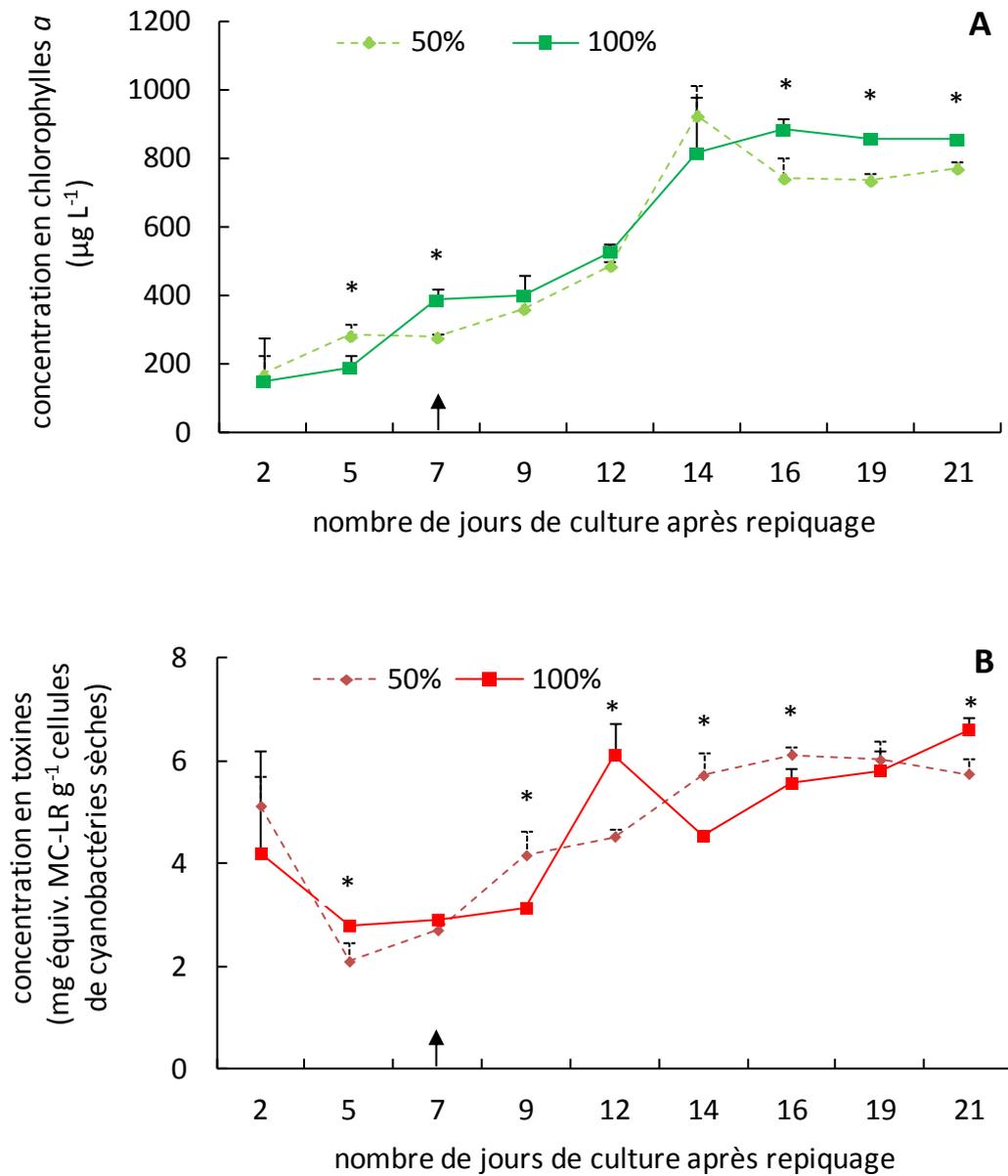
**Q 3.3 :** Les microcystines sont-elles absorbées par les tomates ? Que deviennent-elles dans la plante ?

## **4.2. Résultats**

### **4.2.1. Cinétiques de croissance des cyanobactéries et dynamique de biosynthèse des microcystines**

Lors de cette expérimentation, la croissance de la souche *Microcystis aeruginosa* (PCC7820), obtenue par dosage de la chlorophylle *a*, et la dynamique de biosynthèse des microcystines ont été suivies durant 21 jours avec ou sans apport fractionné de bicarbonate de sodium (**Figure 20**). Les résultats concernant la dynamique de croissance des cyanobactéries, montrent qu'un apport de bicarbonate retardé (50%) après les 7 premiers jours de culture, ne modifiait pas les cinétiques de croissance des cyanobactéries. Si la croissance était assez faible jusque 7 jours après le repiquage, elle augmentait ensuite de façon très importante pour atteindre un plateau après 14 jours de culture, quelles que soient les quantités de bicarbonates initiales. Cependant les concentrations en chlorophylle *a* atteignaient un plateau légèrement supérieur pour les cyanobactéries ayant reçu la totalité du bicarbonate lors du repiquage par rapport à la culture recevant la dernière moitié de bicarbonate 7 jours après le repiquage. Pour ce qui est du dosage des toxines, une très forte quantité de microcystines était extraite sur les cyanobactéries, peu après le repiquage avec des concentrations de 4 à 6 mg équiv. MC-LR  $\text{g}^{-1}$  MS. Puis les quantités de toxines extraites dans les cellules de cyanobactéries devenaient moindres avec des concentrations d'environ 3 mg équiv. MC-LR  $\text{g}^{-1}$  MS, 5 à 9 jours après le

repiquage. Les quantités de microcystines biosynthétisées augmentaient ensuite entre le 7<sup>ème</sup> et 12<sup>ème</sup> jour et cela quel que soit la façon dont a été apportée la solution de bicarbonate de sodium, en une ou deux fois. Les quantités en toxines intracellulaires atteignaient ensuite un plateau avec des concentrations d'environ 6 mg équiv. MC-LR  $\text{g}^{-1}$  MS après environ 16 jours de culture dans nos conditions, pour les deux cultures. Comme aucune différence n'a été observée sur la croissance des cyanobactéries et leur synthèse de toxines, seuls 5 mM (50%) de bicarbonate de sodium seront apportés pour la biosynthèse des toxines marquées. L'apport du précurseur marqué suivra 7 jours après le repiquage, moment à partir duquel les cyanobactéries commencent à synthétiser leurs microcystines.



**Figure 20:** (A) Cinétiques de croissance de deux cultures de cyanobactéries *Microcystis aeruginosa* par quantification des concentrations en chlorophylles  $a$  ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) et (B) cinétiques des concentrations en toxines ( $\mu\text{g}$  équiv. MC-LR  $\text{g}^{-1}$  de cellules de cyanobactéries sèches), établies pour une durée de 21 jours après repiquage. Les cinétiques correspondent à une concentration en bicarbonate initiale de 10 mM (100% - carrés) ou avec deux apports, un initial de 5 mM puis le second après 7 jours (50% - losanges). Les données sont représentées par la moyenne  $\pm \sigma$  ( $n=3$ ). Des astérisques (\*) indiquent des différences significatives entre les 2 cultures à un temps donné ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.2. Biosynthèse de microcystines radioactives

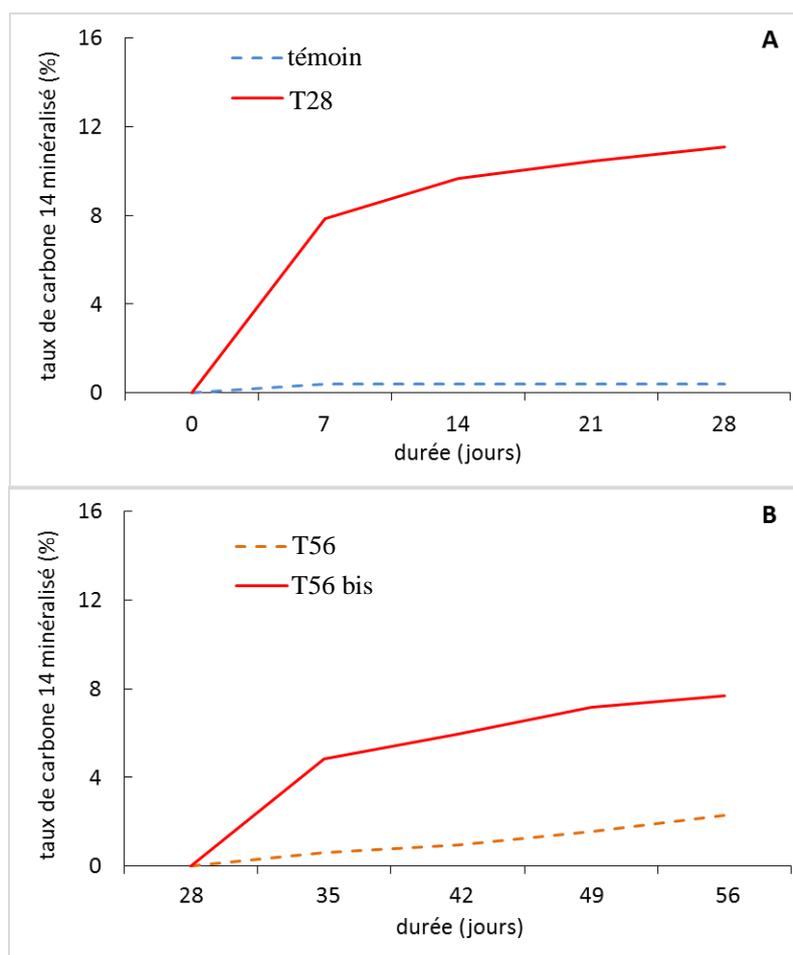
La biosynthèse des microcystines radioactives par la souche de cyanobactéries *Microcystis aeruginosa* (PCC7820) a été effectuée à l'aide d'une solution de bicarbonate de sodium marquée :  $^{14}\text{C}$ - $\text{NaHCO}_3$  (1,85 MBq). D'après les résultats du **Tableau 5**, une très grande partie de carbone 14 apportée à la culture de cyanobactéries était perdue sous forme de dioxyde de carbone radioactif, capturé dans des pièges à soude. Cette perte représentait 75,86% de la radioactivité initialement apportée. D'autre part, une autre partie du bicarbonate était retrouvée dans le milieu de culture après les 10 jours de culture avec la source radioactive, à raison de 9,03%. Environ 12% de radioactivités étaient retrouvés dans le culot de cyanobactéries obtenu après extraction des toxines au MeOH à 75%. Dans l'extrait de *M. aeruginosa* contenant les cyanotoxines intracellulaires la quantité de radioactivité représentait seulement 2,3% de la radioactivité initialement apportée au milieu où était cultivée la souche de cyanobactéries, soit 50 kBq. Après purification de l'extrait de cyanobactéries, la concentration de l'extrait de  $^{14}\text{C}$ -MC-LR était de  $0,27 \mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$  d'où une activité spécifique de  $0,58 \text{ Bq} \mu\text{g}^{-1}$  de MC-LR (équivalent à  $577 \text{ kBq} \text{ mmol}^{-1}$ ).

**Tableau 5:** Rendements (%) de l'expérimentation de culture de *Microcystis aeruginosa* en milieu liquide contenant comme précurseur radioactif du bicarbonate de sodium ( $37 \text{ kBq} \mu\text{g}^{-1}$ ), permettant la biosynthèse de microcystines radiomarquées au carbone 14.

	<b>% radioactivité initialement apportée</b>
<i>Suivi de la minéralisation (<math>^{14}\text{C}</math>-<math>\text{CO}_2</math>) pendant la culture</i>	75,86
<i>Milieu de culture</i>	9,03
<i>Cellules de cyanobactéries après extraction</i>	12,00
<i>Extrait de toxines de cyanobactéries</i>	2,70
<b>Quantité totale de radioactivité</b>	<b>99,59</b>

### 4.2.3. Cinétiques de minéralisation de la MC-LR radiomarquée dans le sol

Les cinétiques de minéralisation du carbone 14, composant les MC-LR apportées au sol, sont suivies pendant 28 jours après le premier apport de toxines radioactives (**Figure 21A**). La minéralisation des toxines était la plus forte lors des 7 premiers jours, où environ 7,8% de la radioactivité se retrouvait sous forme de dioxyde de carbone radioactif ( $^{14}\text{CO}_2$ ). Puis la minéralisation diminuait la seconde semaine, ne représentant plus que 1,8% de l'apport initial, ainsi après 14 jours 9,7% du carbone 14 avaient été minéralisés. Durant les 14 jours suivants, la minéralisation diminuait à nouveau et semblait se stabiliser pour ne plus représenter que 0,6% de carbone 14 minéralisés par semaine. Par conséquent après 28 jours d'incubation, environ 11% de la radioactivité était dégagée des colonnes de sol sous forme de  $\text{CO}_2$  marqué. Pour une des colonnes de sol, un second apport a eu lieu 28 jours après le premier apport (« 2 traitements ») et a été comparée à la minéralisation obtenue sur une colonne n'ayant pas reçu de second apport (« 1 traitement ») (**Figure 21B**). Le second apport a permis d'induire une nouvelle hausse de minéralisation d'environ 4,9%. Puis la quantité minéralisée diminuait à 1,1%, 14 jours après le second apport puis à 0,5%, 28 jours après cet apport. Puis 28 jours après le second apport, la quantité de carbone 14 minéralisée par semaine était similaire à celle de la colonne ayant reçu un seul apport de toxines. Ainsi, environ 7,7% du carbone marqué apporté, lors de la seconde exposition, ont été minéralisés.

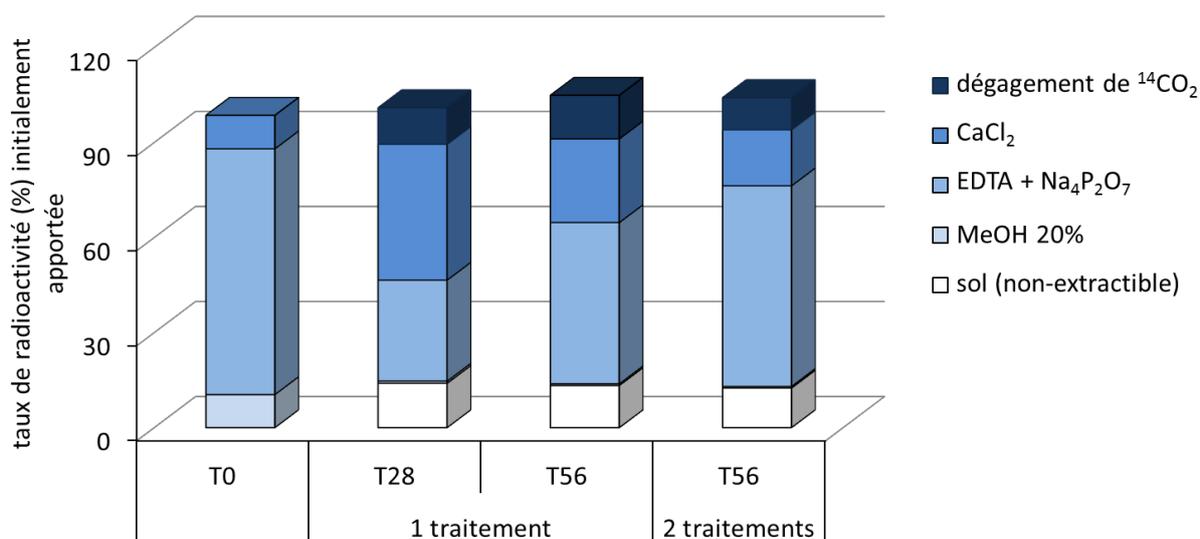


**Figure 21:** (A) Cinétique de minéralisation du carbone de la  $^{14}\text{C}$ -MC-LR, apportée par irrigation des 3 colonnes de sol ( $500 \text{ Bq colonne}^{-1}$ ), obtenue sur une période de 28 jours post-exposition. (B) Cinétiques de minéralisation obtenues pour la colonne ayant reçu « 1 traitement » 28 jours plus tôt et pour la colonne ayant reçu un nouvel apport de  $^{14}\text{C}$ -MC-LR 28 jours après le premier traitement ( $500 \text{ Bq}$ ).

#### 4.2.4. Répartition de la microcistine radiomarquée ( $^{14}\text{C}$ -MC-LR) du sol

Afin d'estimer la part labile de la MC-LR apportée au niveau des sols, les colonnes de sol ayant reçu un ou deux apports de  $^{14}\text{C}$ -MC-LR ont subi un lessivage suivi de plusieurs extractions après 1 h, 28 jours ou 56 jours d'incubation (**Figure 22**). La phase labile obtenue par percolation d'une solution de  $\text{CaCl}_2$  au travers des colonnes de sol indique que 10,6%, 42,9%, 26,4% et 17,7% de la totalité du carbone 14 apportée sont récupérés dans ces lixiviats pour respectivement les colonnes T0, T28, T56 et T56 bis. Une seconde extraction a ensuite été réalisée avec une solution d'EDTA et pyrophosphate de sodium permettant de récupérer

77,6%, 31,9%, 50,9% et 63,3% de la radioactivité initialement apportée aux colonnes T0, T28, T56 et T56 bis. L'extraction au MeOH 20% a permis de récupérer 10,4% de radioactivité pour le T0. Pour les colonnes laissées incuber, le complément de radioactivité se trouve sous forme non extractible comme en témoigne les combustions effectuées sur les sols préalablement utilisés pour les extractions. Ainsi, les quantités de  $^{14}\text{C}$  non extractibles du sol sont comprises entre 12,5 et 14%.



**Figure 22:** Histogramme illustrant les différentes fractions de carbone 14 minéralisé, extrait au  $\text{CaCl}_2$ , à l'EDTA + pyrophosphate de sodium, au MeOH 20% ou encore la part non extractible pour une colonne mise à incuber 1 h (T0), ou 28 jours pour la colonne T28 et ayant reçu une seule application ( $500 \text{ Bq colonne}^{-1}$ ). Enfin les colonnes T56 ont été mises à incuber 56 jours avec respectivement 1 ou 2 apports de  $500 \text{ Bq}$ .

#### 4.2.5. Purification et caractérisation des extraits de sols

Les étapes de purification des extraits de sol obtenus avec la solution de  $\text{CaCl}_2$  et la solution d'EDTA et pyrophosphate de sodium, sur cartouche C18, ont mis en évidence des pertes importantes de radioactivité lors de ces étapes. En effet, entre 50 et 80% de la radioactivité des extraits de  $\text{CaCl}_2$  et 20% de la radioactivité des extraits de la solution d'EDTA et pyrophosphate de sodium restaient fixés au niveau de la phase solide (silice greffée en C18) constituant la cartouche C18. Quant aux éluas de ces extraits de sol, les

analyses en HPLC révélèrent la présence de deux principaux pics radioactifs après 5 et 14 min. Le pic à 14 min semble correspondre à la MC-LR et représentait environ 80% de la radioactivité de l'extrait élué. Le pic obtenu après 5 min représentait seulement 5% de la radioactivité de l'extrait élué et pourrait correspondre à un métabolite issu de la  $^{14}\text{C}$ -MC-LR, plus polaire que cette dernière.

#### **4.2.6. Transfert des microcystines radiomarquées ( $^{14}\text{C}$ -MC-LR) vers les plantules**

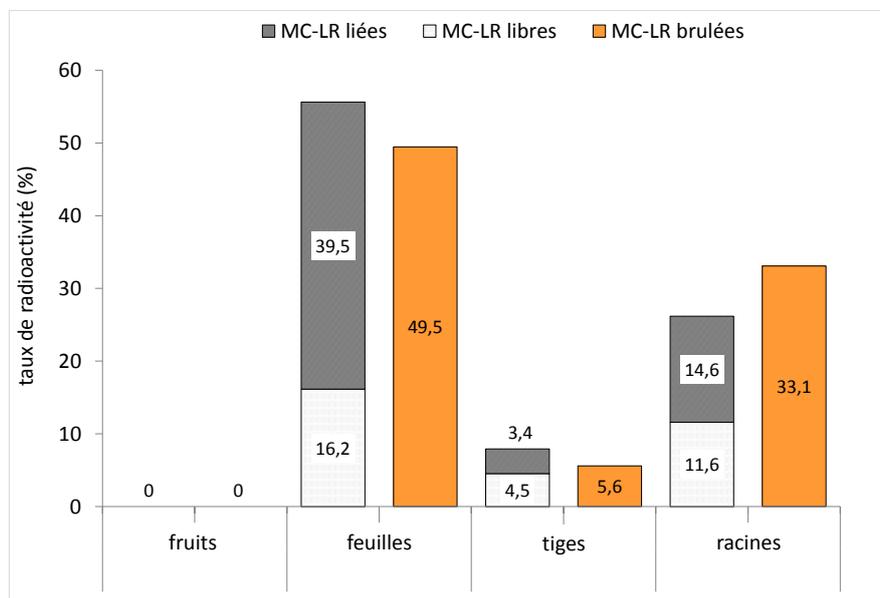
Des plantules de tomates *Solanum lycopersicum* variété MicroTom âgées de 14 jours ont été repiquées sur les sols contaminés (18 et 36 mg MC-LR  $\text{kg}^{-1}$  sol sec) pour une durée de 14 jours. Les concentrations en  $^{14}\text{C}$ -MC-LR transférées vers les plantules sont déterminées par combustion. Les plantules repiquées sur le sol où la concentration initiale était de 36 mg  $^{14}\text{C}$ -MC-LR  $\text{kg}^{-1}$  ont rapidement dépéri et n'ont pas pu être analysées. Par contre, les plantules repiquées sur le sol dont la concentration en  $^{14}\text{C}$ -MC-LR était de 18 mg  $\text{kg}^{-1}$  ont permis de déterminer une concentration en MC-LR de 6  $\mu\text{g g}^{-1}$  MF, pour l'ensemble de la plantule.

#### **4.2.7. Translocation des microcystines radiomarquées ( $^{14}\text{C}$ -MC-LR) dans la plante**

Le plant de tomate dont la croissance s'est effectuée en hydroponie pendant 82 jours a été exposé à la  $^{14}\text{C}$ -MC-LR pendant 48 heures. La quantité de radioactivité administrée était de 470 Bq correspondant à une concentration de 23  $\mu\text{g MC-LR mL}^{-1}$ . Après les 24 premières heures d'exposition, l'ensemble de la solution n'avait pas été absorbée et après 48 heures, quelques millilitres de solution restaient au fond de l'Erlenmeyer. Ainsi les fortes concentrations en MC-LR semblaient freiner l'absorption de la solution nutritive par la plante.

Les analyses des eaux de rinçage et du reste de la solution d'exposition montraient que 52% de la radioactivité initialement apportée étaient restés en solution ou étaient faiblement adsorbée aux racines.

Pour le reste la  $^{14}\text{C}$ -MC-LR a été absorbée par le réseau racinaire et transférée dans les différents organes (**Figure 23**). Aucune trace de carbone 14 n'a pas été détectée dans les fruits. A l'inverse, dans les feuilles, les tiges et les racines de la radioactivité a été détectée et quantifiée selon le gradient : feuilles>racines>tiges. Les résultats obtenus en cumulant les MC-LR libres (extraction avec du MeOH 75%) et les MC-LR liées sont approximativement similaires à ceux obtenus avec une combustion seule d'une partie des différents organes (MC-LR brûlées). La radioactivité dans les feuilles représente de 55,7% et 49,5% avec et sans extraction au MeOH respectivement. Dans les tiges, les proportions sont respectivement de 7,9% et 5,6% et dans les racines de 26,2% et 33,1%. Ainsi, cela renforce la pertinence d'effectuer des extractions au MeOH pour déterminer la fraction libre puisque les bilans sont corrects. De plus, si les proportions de toxines libres et liées sont presque identiques dans les racines et les tiges, dans les feuilles, où il y a la plus forte quantité de radioactivité, seule 1/3 des toxines sont libres, le restant étant non extractible.



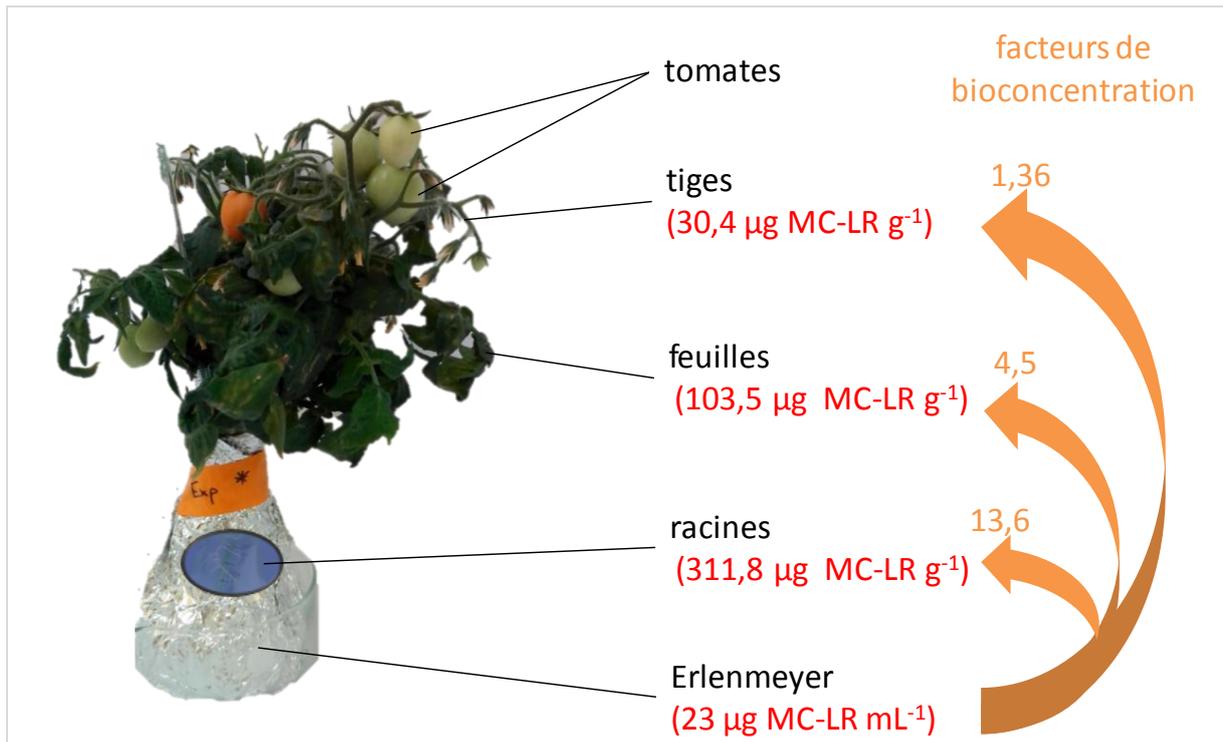
**Figure 23:** Taux (%) de radioactivité mesurés dans les différents organes du plant de tomate *Solanum lycopersicum* variété MicroTom âgé de 84 jours et exposé aux  $^{14}\text{C}$ -MC-LR pendant 48 heures, en conditions hydroponiques (470 Bq ou  $23 \mu\text{g } ^{14}\text{C}$ -MC-LR  $\text{mL}^{-1}$ ). En pointillé est représenté la proportion de radioactivité correspondant aux MC-LR libres extraites au MeOH 75% et en hachuré la proportion de radioactivité correspondant aux MC-LR non extractibles au MeOH. En orange sont représentées les proportions de radioactivité obtenues après combustions des organes.

A l'aide des rendements de radioactivité, les concentrations en toxines dans les différents organes de la plante ont pu être estimées. Les concentrations dans les tiges, feuilles et racines sont respectivement de  $30,4 \mu\text{g g}^{-1}$  MS,  $103,6 \mu\text{g g}^{-1}$  MS et de  $311,8 \mu\text{g g}^{-1}$  MS réparties selon les fractions libres et liées tel qu'indiqué dans le **Tableau 6**.

**Tableau 6:** Concentrations en MC-LR obtenues dans les différents organes d'un plant de tomate *Solanum lycopersicum* variété MicroTom âgé de 84 jours et exposé aux  $^{14}\text{C}$ -MC-LR pendant 48 heures en conditions hydroponiques ( $470 \text{ Bq}$  ou  $23 \mu\text{g } ^{14}\text{C-MC-LR mL}^{-1}$ ).

	concentrations en MC-LR ( $\mu\text{g g}^{-1}$ MS)	
	MC-LR libres	MC-LR liées
fruits	0,0	0,0
feuilles	30,1	73,5
tiges	17,4	13,0
racines	138,2	173,6

Ces résultats témoignent également de la capacité des plants de tomates à bioconcentrer des microcystines au niveau des différents organes (**Figure 24**). Les facteurs de bioconcentration des racines, tiges et feuilles sont respectivement de 13,6 ; 1,36 et 4,5. Ainsi les toxines s'accumulent préférentiellement dans les racines et les feuilles alors que très peu de toxines sont accumulées dans les tiges.



**Figure 24:** Schéma récapitulant les concentrations en microcystines dans les différents organes d'un plant de tomate *Solanum lycopersicum* var. MicroTom exposé pendant 48 heures en conditions hydroponiques. En orange sont mentionnés les facteurs de bioconcentration dans chaque organe.

### 4.3. Discussion

Lors de la biosynthèse des microcystines radiomarquées par les cyanobactéries, plus de 75% du carbone radiomarqué apporté avec la solution de bicarbonate de sodium sont perdus sous forme de  $^{14}\text{CO}_2$ . Ces pertes importantes s'expliquent par l'utilisation du carbone lors du métabolisme primaire des cyanobactéries en particulier lors de la respiration. D'autre part, une partie du  $\text{CO}_2$  a pu être perdue lors de l'acidification du milieu de culture au cours de la croissance des cyanobactéries par transformation du  $\text{NaHCO}_3$  en  $\text{CO}_2$ . En effet, le bicarbonate de sodium est peu stable et peut se retrouver sous forme de  $\text{CO}_2$  si le pH est en-dessous de 8. Seule une petite quantité (2,7%) de la radioactivité initialement apportée est retrouvée au niveau de l'extrait de cyanobactéries, expliquant la faible activité spécifique de la MC-LR purifiée :  $577 \text{ kBq mmol}^{-1}$  soit  $0,58 \text{ Bq } \mu\text{g}^{-1}$  de MC-LR. L'activité spécifique obtenue est

relativement faible par rapport aux travaux de [Craig et al. \(1996\)](#), [Hyenstrand et al. \(2003\)](#) et [Pflugmacher et al. \(1998\)](#) qui obtiennent respectivement 33 ; 2,96 et 18,3 Bq  $\mu\text{g}^{-1}$  MC-LR. Les différences de résultats pourraient s'expliquer par l'utilisation d'une souche de *Microcystis aeruginosa* différente ainsi que des conditions de culture différentes. Cependant, une étude récente de [Nybom et al. \(2012\)](#) sur la même souche, PCC7820, avait permis d'obtenir une activité spécifique similaire (0,5 Bq  $\mu\text{g}^{-1}$  de MC-LR) à celle trouvée dans la présente étude.

L'irrigation de colonnes de sols avec cette solution de MC-LR marquée au carbone 14 a permis de suivre le devenir de cette toxine. Du point de vu des interactions de la  $^{14}\text{C}$ -MC-LR avec le sol, le lessivage des colonnes simulant un épisode de pluie, avec une solution de  $\text{CaCl}_2$  nous permettait d'observer la phase labile de la MC-LR du sol. Cette phase contenait du carbone 14 en différentes concentrations selon les traitements. Elle était assez faible pour le sol exposé 1 h (10,6% de  $^{14}\text{C}$ ), un peu plus importante pour les sols exposés pendant 56 jours (environ 20%) et encore plus importante pour le sol exposé durant 28 jours (42,9%). Ainsi, la disponibilité de la MC-LR au niveau des sols semble varier au cours du temps avec une faible disponibilité juste après l'exposition, puis une plus forte disponibilité après 28 jours comparée à celle après 56 jours. L'utilisation de la solution d'EDTA et pyrophosphate de sodium permettait d'extraire une autre grande quantité de carbone 14 avec 77,6% pour le sol exposé 1 h et 31,9% après 28 jours d'incubation et plus de 50% pour les sols laissés incubés 56 jours. La part la plus importante de carbone 14 extraite par cette méthode concerne le sol exposé 1 h, démontrant la moins bonne disponibilité des toxines juste après irrigation. D'ailleurs sur ce même sol, les extractions au MeOH 20% permettent d'extraire une fraction importante (10%) du carbone marqué. Les rendements d'extraction avec la solution de  $\text{CaCl}_2$  et celle d'EDTA et pyrophosphate sont d'environ 80% ce qui rejoint les travaux de [Chen et al. \(2006a\)](#) où les rendements obtenus étaient compris entre 73 et 89% pour la MC-LR. Ceci

témoigne d'une forte disponibilité de la MC-LR, apportée au sol, avec un risque important de lessivage de cette toxine comme le montre l'utilisation de  $\text{CaCl}_2$ . Déjà [Eynard et al. \(2000\)](#) et [Chen et al. \(2006a\)](#) avaient observé la faible adsorption des microcystines au sol et avaient avancé ce risque avec la possibilité d'une contamination des nappes phréatiques sous-jacentes. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par [Chen et al. \(2006b\)](#) sur des sols de textures différentes, où le sol agricole sableux utilisé (64% de sable) avait la plus faible capacité à adsorber la MC-LR. Ces résultats peuvent aussi s'expliquer par les types d'argiles du sol (illite/smectite). En effet, au pH du sol (5,6), les argiles sont chargées négativement et vont faciliter la fixation des matières organiques fortement présentes dans ce sol prairial. De plus, il est connu que les microcystines sont chargées négativement pour des pH compris entre 2,19 et 12,48 ([de Maagd et al., 1999](#)). Par conséquent, les interactions électrostatiques entre ces trois composants induisent une faible adsorption des toxines aux particules du sol. Cette interprétation est en accord avec une précédente étude de [Miller et al. \(2001\)](#). Cependant entre 50 et 80% de la radioactivité des percolats de  $\text{CaCl}_2$  et 20% de la radioactivité des solutions d'EDTA et pyrophosphate de sodium restaient bloqué lors des étapes de purification. En milieu aquatique, les microcystines ont la capacité à se fixer à des particules en suspension ([Wörmer et al., 2011](#)) et les résultats obtenus ici semblent le confirmer avec une capacité forte des microcystines à se fixer aux substances labiles du sol tels que les acides humiques. Cependant, une fraction non-extractible de carbone 14 du sol a pu être observée sur tous les sols incubés 28 ou 56 jours. Elle était comprise entre 12,5 et 14% de l'ensemble du carbone marqué apporté, quel que soit le traitement, représentant une capacité d'adsorption d'environ  $5 \mu\text{g MC-LR g}^{-1}$  de sol sec. Cette forte disponibilité de la  $^{14}\text{C}$ -MC-LR a aussi permis une biodégradation d'environ 11% de l'apport initial en carbone 14, par minéralisation. Cependant, la minéralisation n'est pas constante au cours du temps avec un pic de minéralisation les 7 jours suivants l'apport de toxines. Ensuite la minéralisation diminuait

pour atteindre une minéralisation de 0,5% de carbone 14 par semaine. D'autre part, un second apport relançait la minéralisation qui restait plus faible par rapport au premier apport. Cela pourrait peut-être s'expliquer par une augmentation des toxines dans le sol, qui par leur capacité à inhiber les protéines phosphatases font légèrement décroître la biodégradation. Plusieurs études ont déjà démontré que certaines bactéries présentes en milieux aquatiques sont capables de dégrader les microcystines telles que *Sphingomonas* sp. (ACM-3962), *Paucibacter toxinivorans* et *Stenotrophomonas* sp. (Jones et al., 1994; Rapala et al., 2005; Chen et al., 2010). D'autres souches présentes dans les sols comme *Arthrobacter* sp., *Brevibacterium* sp. ou *Rhodococcus* sp. possèdent aussi la capacité de dégrader les microcystines (Manage et al., 2009). Pour autant, dans notre étude la minéralisation est restée faible ici alors que les activités enzymatiques globales n'étaient pas affectées pour des concentrations de 36 et 72 mg kg<sup>-1</sup> (données non montrées). Elles approchaient les valeurs moyennes trouvées dans des sols agricoles français et attestaient d'une activité microbiologique significative dans les colonnes de sol. Ce résultat est en accord avec ceux trouvés par Giaramida et al. (2013) sur les communautés de microorganismes d'eau douce où l'activité était maintenue avec une modification des communautés. La faible minéralisation pourrait s'expliquer par une adsorption des toxines aux particules du sol en solution qui pourrait diminuer la disponibilité des toxines pour les microorganismes du sol ou bien par la difficulté d'une dégradation complète de la MC-LR. En effet, la dégradation de cet héptapeptide demande l'intervention de plusieurs enzymes comme l'observait Bourne et al. (1996) et Takenaka and Watanabe (1997) avec respectivement *Sphingomonas* sp. et *Pseudomonas aeruginosa*. Les résultats de chromatographie liquide semblent confirmer la présence d'un seul intermédiaire plus polaire observé à 5 min qui pourrait résulter de la minéralisation de la MC-LR. Pour autant, la plus grande partie de radioactivité retrouvée est visible à 14 min correspondant au pic de la MC-LR. Ainsi après 28 ou 56 jours d'incubation,

une très grande quantité de MC-LR est encore présente dans le sol. Elle reste biodisponible et sous sa forme initiale. Ces résultats différents de ceux obtenus par [Chen et al. \(2006b\)](#) qui affirmaient que le temps de demi-vie de la MC-LR dans le sol était de 17 jours. Cependant, les techniques d'exposition sont différentes avec des expérimentations en solution de sol contre des colonnes de sol ici, ainsi que des sols différents. Enfin, une grande partie de la MC-LR n'étant pas dégradée, pourraient conserver leur capacité à modifier l'activité de certaines protéines phosphatases ([Corbel et al., 2014](#)).

Les résultats obtenus avec les plantules exposées aux toxines sur un sol contaminé aux  $^{14}\text{C}$ -MC-LR viennent confirmer que même après 28 jours d'incubation du sol et un évènement pluvieux, les toxines du sol restent bio disponibles pour l'absorption par les plants de tomates. Les concentrations alors mesurées dans les plantules sont de  $6 \mu\text{g MC-LR g}^{-1}$  MF de plantules. Ces concentrations sont du même ordre de grandeur que celles mesurées dans des tomates ou des produits issus d'exploitations agricoles ([Mohamed and Al Shehri, 2009](#); [Gutiérrez-Praena et al., 2014](#)). Cela nous permet d'affirmer qu'un risque sanitaire lié à l'irrigation d'un sol agricole avec des eaux contaminées reste envisageable, si toutefois elles étaient retrouvées dans les parties comestibles de la plante, les fruits.

Afin de confirmer cette dernière hypothèse, nous avons mesuré les concentrations de MC-LR radiomarquées dans les différents organes du plant de tomate exposé en milieu liquide. D'une part, avec ces résultats, l'absorption par les racines est confirmée. C'est aussi l'organe où la plus grande quantité de toxines a pu être mesurée. Les feuilles constituent ensuite l'organe accumulant le plus de toxines, suivies par les tiges. A l'inverse, les toxines n'ont pas été détectées dans les fruits, laissant supposer que les risques pour la santé humaine sont négligeables. Ces résultats sont quelques peu différents de ceux obtenus par [Gutiérrez-Praena et al. \(2014\)](#), travaillant aussi sur l'exposition de plants de tomates, où des concentrations comprises entre  $5,15$  et  $10,83 \mu\text{g kg}^{-1}$  MF étaient mesurées dans les fruits. L'absence de  $^{14}\text{C}$ -

MC-LR lors de notre expérimentation pourrait s'expliquer par des conditions d'exposition différentes, à la fois en terme de concentrations en toxines et de temps d'exposition. En effet, l'exposition étant plus courte, il est possible que les toxines n'aient pas pu atteindre le fruit ou bien que les fortes concentrations en toxines aient empêché le transfert dans cet organe de la plante. De plus, les concentrations en toxines trouvées dans les feuilles sont plus faibles que celles des racines lors de notre exposition par rapport aux résultats de [Gutiérrez-Praena et al. \(2014\)](#). Là aussi, des différences entre les conditions de culture et les variétés de tomates utilisées pourraient peut-être expliquer de telles différences. Pour détecter et déterminer les concentrations en MC-LR, [Gutiérrez-Praena et al. \(2014\)](#) ont utilisé des analyses en UHPLC-MS/MS qui permettent uniquement le dosage des toxines libres. Cette concentration de  $12,3 \mu\text{g MC-LR g}^{-1} \text{MF}$  était assez semblable à la concentration en MC-LR libres mesurée ici ( $17,4 \mu\text{g MC-LR g}^{-1} \text{MS}$ ). Ainsi, malgré une exposition bien plus importante lors de cette étude, les concentrations en toxines dans les feuilles varient peu et suggèrent la concentration maximale accumulée dans les feuilles. D'ailleurs cela expliquerait aussi la diminution du flux de sève brute dans la plante, visible par la diminution des besoins journaliers en eau de la plante.

L'utilisation de la  $^{14}\text{C}$ -MC-LR a également permis d'effectuer un véritable bilan du transfert et de l'accumulation des MC-LR tout en déterminant les proportions de toxines libres et liées de façon fiable. Si les concentrations dans les racines et les tiges sont similaires entre les fractions, cela n'est pas le cas des feuilles où  $2/3$  des concentrations de MC-LR sont retrouvées sous forme liée. Quelques études ont déjà démontré que les microcystines étaient capables de se lier au glutathion ou à des macromolécules présentes dans les plantes ([Pflugmacher et al., 1998](#); [Buratti et al., 2013](#)). Cependant, la forte proportion de MC-LR liées à des molécules au niveau des feuilles laisse supposer que dans ces dernières, les mécanismes de décontamination sont plus importants afin peut-être de préserver le métabolisme de photosynthèse des microcystines. En effet, avec de telles concentrations d'exposition, il est

fort possible que le métabolisme de la plante soit affecté telle qu'en témoigne la diminution du flux d'évapotranspiration. Cela s'explique en partie par le fait que les tomates sont capables de bioconcentrer de fortes concentrations en toxines. Ce facteur atteint tout particulièrement une valeur importante concernant les racines (13,6). Déjà [Peuthert et al. \(2008\)](#) avaient déterminé des facteurs moyens de bioconcentration de 3,6 et 8,4 pour les tiges et racines de plusieurs plantes agricoles. A l'inverse dans les tiges des plants de tomates, les toxines ne sont pas bioaccumulées et cet organe semble uniquement permettre l'acheminement de la sève et par voie de fait des toxines jusqu'aux feuilles.

#### **4.4. Conclusion**

Cette étude nous a permis d'observer quel était le devenir de la  $^{14}\text{C}$ -MC-LR dans les sols exposés par irrigation. Une très faible proportion de MC-LR est minéralisée ( $\approx 10\%$ ) après 28 et 56 jours d'incubation. La toxine peut alors, soit s'accumuler au niveau du sol (12-14%), soit subir un lessivage, comme cela fut simulé avec une solution de  $\text{CaCl}_2$ . En effet, sa capacité d'adsorption sur le sol choisi était très faible et entre 10 à 43% des  $^{14}\text{C}$ -MC-LR se retrouvaient dans la fraction lessivée s'expliquant en partie par la composition minéralogique des argiles, leur faible quantité et la forte proportion de matières organiques. La faible adsorption des microcystines laisse sous-entendre un possible lessivage suivi d'une contamination des nappes aquifères sur ce type de sol. Les toxines présentes dans la solution du sol étaient majoritairement liées à des matières solubles (50-80%) et se trouvaient bloquées sur la phase solide lors de la phase de semi-purification sur cartouche C18. De plus, quelle que soit la fraction, de lessivage ou d'extraction avec un solvant organique, les analyses en chromatographie liquide révélaient majoritairement la MC-LR. Un autre composé, plus polaire et non-identifié était aussi trouvé en très faible quantité et pourrait correspondre à un métabolite issu de la dégradation de la toxine par les microorganismes. Par conséquent, la

MC-LR restant sous sa forme initiale, elle est susceptible de conserver son potentiel toxique. Si l'activité biologique des microorganismes du sol ne semblait pas modifiée, les tomates *Solanum lycopersicum* var. MicroTom semblaient sensibles à cette contamination. Ainsi à la plus forte concentration ( $36 \text{ mg } ^{14}\text{C}\text{-MC-LR kg}^{-1} \text{ sol sec}$ ), la plantule a dépéri quelques jours après sa transplantation. Pour les autres plantules transplantées sur des sols contaminés à  $18 \text{ mg } ^{14}\text{C}\text{-MC-LR kg}^{-1} \text{ sol sec}$ , les mesures en MC-LR dans les plantules étaient de  $6 \text{ } \mu\text{g g}^{-1} \text{ MS}$ . Les résultats obtenus en hydroponie nous confirment que le transfert de la MC-LR à la plante est tout à fait possible. La  $^{14}\text{C}$ -MC-LR est absorbée par les racines avant d'être transloquée dans les différents organes. Les concentrations en toxines totales dans chaque organe varient entre  $311,8$  et  $30,4 \text{ } \mu\text{g } \text{équiv. MC-LR g}^{-1} \text{ MS}$ . Elles se répartissent dans les différents organes de la plante selon des concentrations décroissances, racines>feuilles>tiges. La majorité des toxines se retrouvent donc dans les racines et les feuilles correspondant respectivement aux organes d'entrée et de sortie d'eau et démontrant un acheminement dans la plante animé par l'évapotranspiration. Ce transfert est aussi à l'origine d'une bioconcentration, principalement racinaire et foliaire. Cette bioconcentration des toxines semble d'autant plus possible que la  $^{14}\text{C}$ -MC-LR va se lier à des macromolécules notamment au niveau des feuilles où la concentration de toxines liées est 2 fois supérieure à celle de toxines libres. Cette conjugaison est une réponse physiologique de la plante lui permettant la détoxification de la MC-LR notamment par fixation au glutathion. A l'inverse, la toxine n'a pas été acheminée jusqu'aux fruits dans nos conditions expérimentales. Ainsi le risque sanitaire lié à l'accumulation de microcystines dans les tomates serait rejeté. Cependant, d'autres plantes dont les feuilles ou les racines sont comestibles, pourraient être contaminées lors de telles expositions.

Ce chapitre nous a permis de vérifier qu'une accumulation de la MC-LR au niveau du sol était possible et pouvait par la suite induire un transfert à la plante où la toxine peut être transloquée et atteindre un organe essentiel au métabolisme des plantes, la feuille. Cependant,

nous ne savons pas quel serait à la fois le devenir de la toxine dans le sol et dans la plante après des apports chroniques réguliers de microcystines par irrigation. De plus, un apport régulier de toxines en solution, fortement biodisponibles pourrait provoquer des effets sur la croissance et le développement de la tomate *Solanum lycopersicum* var. MicroTom. C'est pourquoi nous nous proposons de répondre à ces différents points dans le prochain chapitre.



**Chapitre 5 : Effet d'une irrigation chronique, durant 90 jours,  
d'un système sol-plante avec un extrait de *Microcystis  
aeruginosa* à différentes concentrations en microcystines**



## **5.1. Introduction**

De nombreuses études ont mis en évidence les effets des cyanotoxines sur la croissance et le développement des plantes terrestres. Les fortes concentrations utilisées pour des expositions n'excédant pas 30 jours ont révélé des effets visibles sur de nombreux paramètres physiologiques et biochimiques tels que la croissance, la photosynthèse, la production d'espèces réactives de l'oxygène, signifiant un stress pour les plantes. Cependant peu d'études ont travaillé dans des conditions dites « environnementales » en termes de concentrations et de conditions d'exposition avec des expositions courtes et n'utilisant pas de substrat naturel tel que le sol. Or nous avons déjà observé que la MC-LR apportée au sol par irrigation était capable de persister plusieurs dizaines de jours dans le sol, faute d'une dégradation totale par les microorganismes. De plus, les analyses des extraits de sol révèlent la présence de la MC-LR ayant conservé leur structure initiale. Nous pouvons alors supposer que les microcystines pourraient conserver leurs propriétés toxiques. Enfin, la forte proportion de toxines dans la phase labile du sol semble indiquer une fraction fortement disponible, en particulier pour les plantes terrestres comme semble en témoigner une exposition à court terme des plantules de tomates MicroTom.

Ce chapitre a donc pour premier objectif d'observer les effets d'une irrigation quotidienne à des concentrations environnementales ( $\leq 100 \mu\text{g}$  équiv. MC-LR  $\text{L}^{-1}$ ), pendant 90 jours, d'un système sol-plante afin d'établir les effets écotoxicologiques. D'une part, certains paramètres liés à l'activité biologique des microorganismes du sol ont été observés, après cette exposition chronique. Les activités liées aux différents cycles biogéochimiques ainsi que les abondances de certaines communautés de microorganismes ont été considérées. D'autre part, la croissance des plants de tomate *Solanum lycopersicum* var. MicroTom a été suivie et certains paramètres physiologiques (concentrations en chlorophylles, fluorescence chlorophyllienne et concentrations en acides gras) ont été mesurés. Le second objectif consistait à vérifier que les

toxines se trouvant dans la phase labile du sol étaient biodisponibles pour la plante. Après extraction, les toxines ont donc été recherchées par UHPLC-MS/MS et la conservation de leurs propriétés toxiques a également été contrôlée sur des extraits de sols exposés quotidiennement pendant 90 jours. Les microcystines ont également été recherchées dans les différents organes de la plante (racines, tiges, feuilles, fruits) par UHPLC-MS/MS pour établir un éventuel transfert des toxines du sol vers la plante. Cette approche constitue une première étape vers la caractérisation du risque sanitaire.

Dans ce chapitre, nous essaierons donc de répondre aux questions suivantes :

**Q 2.1 :** Quels sont les effets d'une irrigation chronique, à long terme, avec des microcystines sur les plantules de tomates ? (Y-a-t-il des modifications du développement ou des paramètres physiologiques ?)

**Q 2.2 :** Quels sont les effets d'une irrigation chronique, à long terme, avec des microcystines sur les microorganismes du sol ?

**Q 3.3 :** Les microcystines sont-elles absorbées par les tomates ?

## **5.2. Résultats**

### **5.2.1. Activités enzymatiques du sol, après 90 jours d'exposition journalière à un extrait de *Microcystis aeruginosa***

Les analyses d'activités enzymatiques globales obtenues sur un sol exposé quotidiennement par irrigation à un extrait de *M. aeruginosa* dilué à des concentrations comprises entre 0 et 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup> sont obtenues dans le **Tableau 7**. L'activité phosphatase était comprise entre 41,1 et 54,1 mU g<sup>-1</sup> de sol sec. L'activité β-D Glucosidase variait quant à elle entre 7,9 et 11 mU g<sup>-1</sup> de sol sec et l'activité arylsulfatase était comprise entre 2,5 et 2,9 mU g<sup>-1</sup> de sol sec. Ces activités enzymatiques ne sont pas significativement

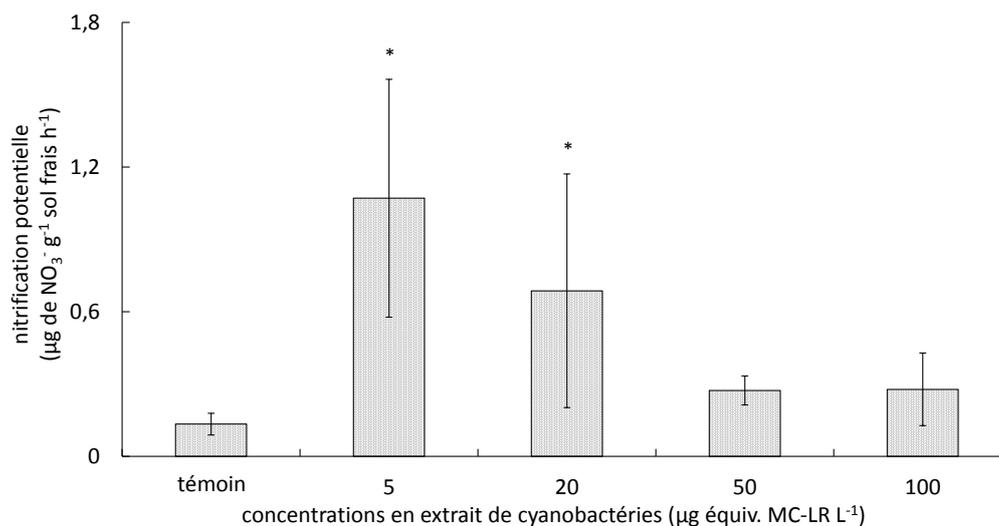
différentes entre le sol témoin et ceux exposés quotidiennement à différentes concentrations en extrait de *M. aeruginosa* pendant 90 jours.

**Tableau 7:** Activités enzymatiques globales du sol ( $\text{mU g}^{-1}$  sol sec) obtenues après 90 jours d'exposition, par irrigation, à différentes concentrations en extrait de *Microcystis aeruginosa* (0 à  $100 \mu\text{g}$  équiv. MC-LR  $\text{L}^{-1}$ ). Les données sont indiquées par la moyenne  $\pm \sigma$  ( $n=5$ ).

	traitements avec l'extrait de cyanobactéries ( $\mu\text{g}$ équiv. MC-LR $\text{L}^{-1}$ )				
	témoin	5	20	50	100
phosphatase	$45,5 \pm 14,0$	$42,7 \pm 8,1$	$41,1 \pm 8,4$	$45,2 \pm 5,8$	$54,1 \pm 11,1$
$\beta$ -D-glucosidase	$11,0 \pm 2,7$	$8,6 \pm 2,2$	$7,9 \pm 1,6$	$9,6 \pm 1,6$	$10,2 \pm 1,9$
arylsulfatase	$2,8 \pm 0,6$	$2,5 \pm 0,3$	$2,7 \pm 0,5$	$2,9 \pm 0,5$	$2,8 \pm 0,7$

### 5.2.2. Estimation de l'activité de nitrification potentielle du sol, après 90 jours d'exposition journalière à un extrait *Microcystis aeruginosa*

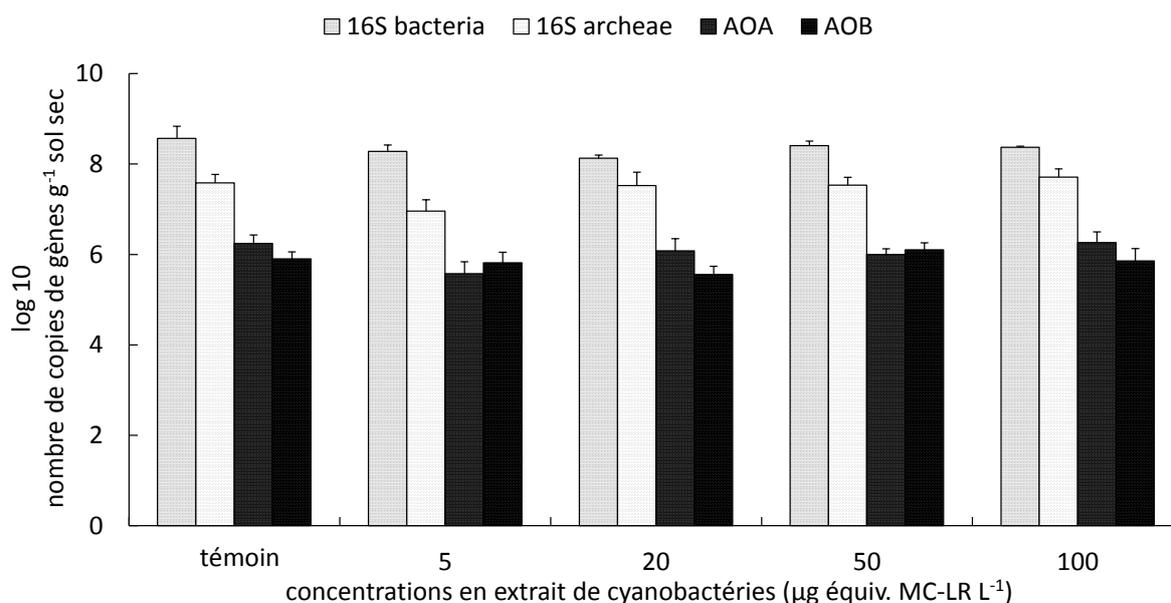
L'activité de nitrification potentielle dans les sols, exposés pendant 90 jours à l'extrait de *M. aeruginosa*, était significativement différente du témoin pour certains traitements (**Figure 25**). Pour les dilutions de l'extrait de *M. aeruginosa* à 5 et  $20 \mu\text{g}$  équiv. MC-LR  $\text{L}^{-1}$ , l'activité nitrifiante était multipliée respectivement par 7 et 5 en comparaison avec celle du sol témoin. Cependant, pour les plus fortes concentrations de 50 et  $100 \mu\text{g}$  équiv. MC-LR  $\text{L}^{-1}$  l'activité nitrifiante n'était pas modifiée significativement.



**Figure 25:** Nitrification potentielle obtenue sur des sols frais exposés pendant 90 jours à différentes concentrations en extrait de *Microcystis aeruginosa* (0 à 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>). Les données sont représentées par la moyenne ± σ (n=5). Des astérisques (\*) indiquent des différences significatives avec le groupe témoin non traité (p<0,05).

### 5.2.3. Abondances des communautés microbiologiques des sols après 90 jours d'exposition à un extrait de *Microcystis aeruginosa*

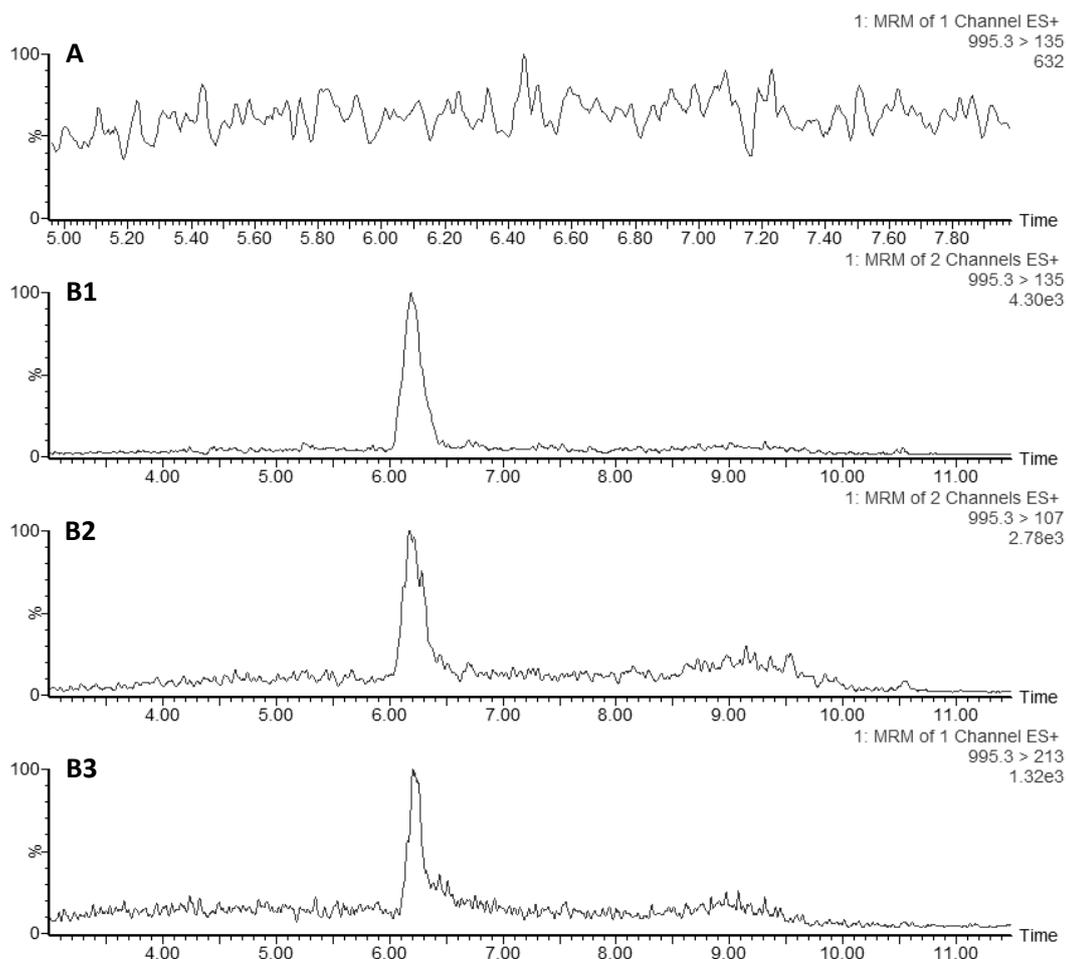
L'abondance des bactéries et des archées est quantifiée par q-PCR sur les gènes 16S de bactéries et d'archées, dans des sols exposés pendant 90 jours à un extrait dilué de *M. aeruginosa*. Ils n'indiquaient pas de différence entre les abondances d'archées et de bactéries totales malgré les traitements avec l'extrait de *M. aeruginosa*. D'autre part, les abondances des communautés bactériennes (AOB) et archéennes (AOA) nitrifiantes ont aussi été mesurées (**Figure 26**). Quelle que soit la concentration utilisée en extrait de *M. aeruginosa*, les abondances n'étaient pas significativement différentes entre les traitements pour les deux communautés nitrifiantes testées.



**Figure 26:** Nombre de copies de gènes 16S de bactéries et d'archées et de gènes *amoA* liés aux groupes fonctionnels des bactéries nitrifiantes (AOB) et archées nitrifiantes (AOA) dans des sols exposés pendant 90 jours à différentes concentrations en extrait de *Microcystis aeruginosa* (0 à 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>). Les données sont représentées par la moyenne  $\pm \sigma$  (n=5).

#### 5.2.4. Quantification des MC-LR présentes dans le sol, après 90 jours d'exposition journalière à un extrait de *Microcystis aeruginosa*

Afin de mettre en évidence de façon sélective et sensible la présence de la MC-LR, le congénère majoritaire dans l'extrait utilisé pour irriguer les sols, les extraits sont analysés en UHPLC-MS/MS en mode « Multiple Reaction Monitoring » (MRM) (**Figure 27**). La transition dominante utilisée est 995,3>135 (*m/z*) représentant la perte du groupement Adda de la MC-LR ([Schmidt et al., 2013](#)). Aucun pic n'était détecté avec cette transition concernant les sols témoin contrairement aux sols irrigués pendant 90 jours avec une concentration de 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup> où un pic apparaît à 6,20 min (**Figure 27 A et B1**). La présence de la MC-LR est confortée par les transitions de confirmation 995,3>107 *m/z* et 995,3>213 *m/z* qui apparaissent à 6,20 min sur le chromatogramme (**Figure 27 B2 et B3**).



**Figure 27:** Chromatogrammes obtenus en UHPLC-MS/MS sur des extraits de sols (EDTA+Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) ayant été exposés à différentes concentrations en extrait de *Microcystis aeruginosa*, (A) témoin ou (B) 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>, pendant 90 jours. La transition majoritaire 995>135 (*m/z*) a été observée (A et B1) pour les deux traitements et les transitions de confirmation 995>107 *m/z* (B2) et 995>213 *m/z* (B3) ont été recherchées sur les extraits de sols traités par arrosage avec une concentration de 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>.

Concernant les concentrations en microcystines obtenues dans les sols après 90 jours d'exposition journalière, deux méthodes ont été utilisées. L'une met en œuvre le test enzymatique d'inhibition de la protéine phosphatase de type 2A qui permet de déterminer une quantité totale en microcystines exprimée en équivalent MC-LR et l'autre analyse par UHPLC-MS/MS en mode MRM a été focalisée exclusivement et spécifiquement sur la MC-LR (Tableau 8).

**Tableau 8:** Concentrations en toxines de cyanobactéries dans le sol et rapports de ces concentrations par rapport à l'apport cumulé des toxines, obtenus en dosant les toxines par test d'inhibition des protéines phosphatases de type 2A (PP2A) ou par UHPLC-MS/MS, après 90 jours d'irrigation avec différentes concentrations d'un extrait de *Microcystis aeruginosa* (0 à 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>). Les données sont exprimées par la moyenne ± σ (n=5). Des lettres différentes indiquent des différences significatives (p<0,05).

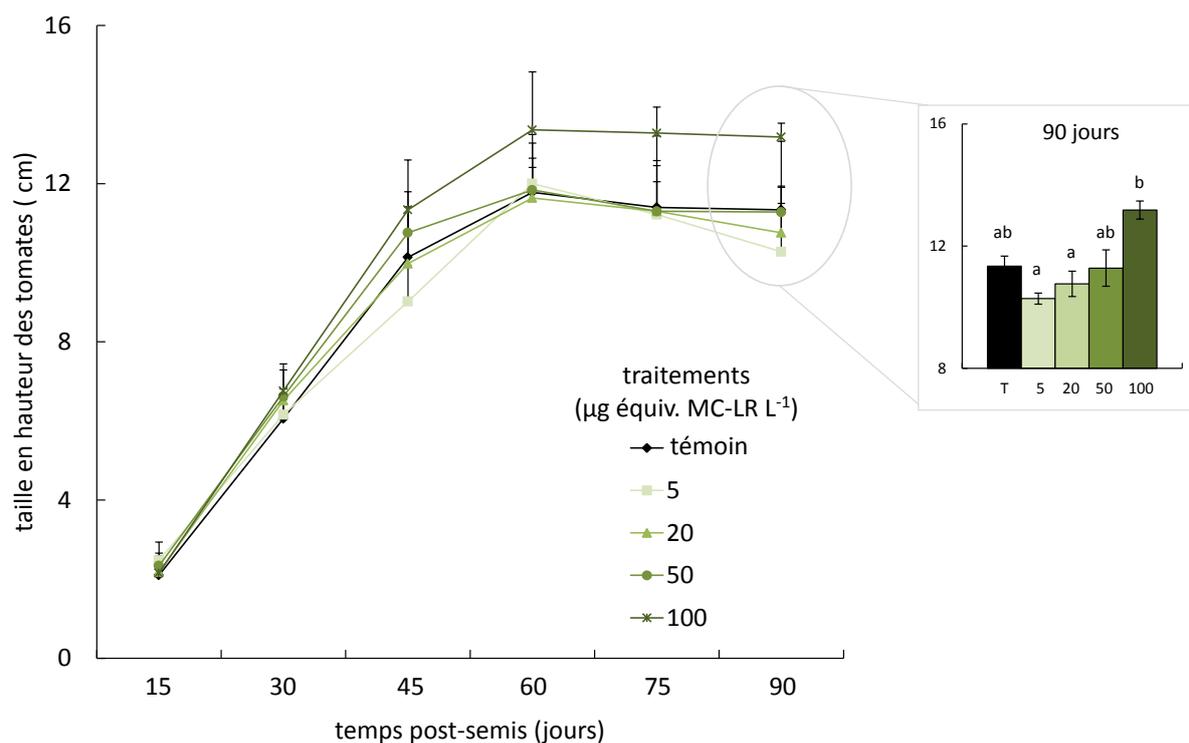
	traitements avec un extrait de cyanobactéries (µg équiv. MC-LR L <sup>-1</sup> )				
	témoin	5	20	50	100
<b>dosages par test PP2A</b>					
Concentrations (ng équiv.MC-LR g <sup>-1</sup> sol sec)	0 (a)	1,6 ± 0,2 (b)	1,7 ± 0,2 (b)	1,3 ± 0,1 (c)	3,9 ± 0,9 (d)
% de l'apport	-	3,5 ± 0,5 (a)	0,9 ± 0,1 (b)	0,3 ± 0,0 (c)	0,4 ± 0,1 (d)
<b>dosage par UPLC-MS/MS</b>					
Concentrations (ng MC-LR g <sup>-1</sup> sol sec)	0 (a)	0,34 ± 0,10 (b)	0,26 ± 0,12 (b)	0,32 ± 0,07 (b)	0,36 ± 0,17 (b)
% de l'apport	-	0,75 ± 0,21 (a)	0,14 ± 0,06 (b)	0,07 ± 0,01 (c)	0,04 ± 0,02 (d)

Par la méthode enzymatique, les concentrations en « équivalent MC-LR » étaient comprises entre 0 (témoin) et 3,9 ng équiv. MC-LR g<sup>-1</sup> de sol sec. Cette dernière concentration était retrouvée dans les échantillons de sol irrigués avec une concentration de 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>. Avec des dilutions de l'extrait de *M. aeruginosa* entre 5 et 50 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>, les quantités dosées dans le sol étaient comprises entre 1,3 et 1,7 ng équiv. MC-LR g<sup>-1</sup> de sol sec. Cependant, la quantité de toxines retrouvée n'est aucunement corrélée à la concentration en toxines dans les eaux d'irrigation. Ainsi la plus faible quantité dosée dans le sol était de 1,3 ng équiv. MC-LR g<sup>-1</sup> sol sec après une exposition à une concentration journalière de 50 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>, rendant la concentration dosée dans le sol exposé à 20 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup> supérieure à cette dernière. Le rapport entre la quantité de toxines dosée et la quantité initialement apportée révélait des concentrations retrouvées dans le sol très faibles n'excédant pas 1% de l'apport, excepté pour le traitement avec 5 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup> où le dosage représentait 3,5% de l'apport initial par l'extrait.

Les concentrations dans ces extraits en UHPLC-MS/MS se basaient sur la transition 995>135  $m/z$  correspondant à la principale transition recherchée pour quantifier la MC-LR. Les concentrations obtenues étaient comprises entre 0,26 et 0,36 ng. MC-LR  $g^{-1}$  de sol sec et ne sont pas significativement différentes entre les différents traitements, pouvant s'expliquer par des écart-types importants. Concernant les rapports de microcystines calculés en fonction aux apports initiaux, les quantités n'excédaient pas les 0,2% excepté pour le traitement à 5  $\mu g$  équiv. MC-LR  $L^{-1}$  où le rendement était de 1%.

#### **5.2.5. Effet d'une irrigation chronique avec un extrait de *Microcystis aeruginosa* dilué sur le développement et la croissance des tomates *Solanum lycopersicum* var. MicroTom**

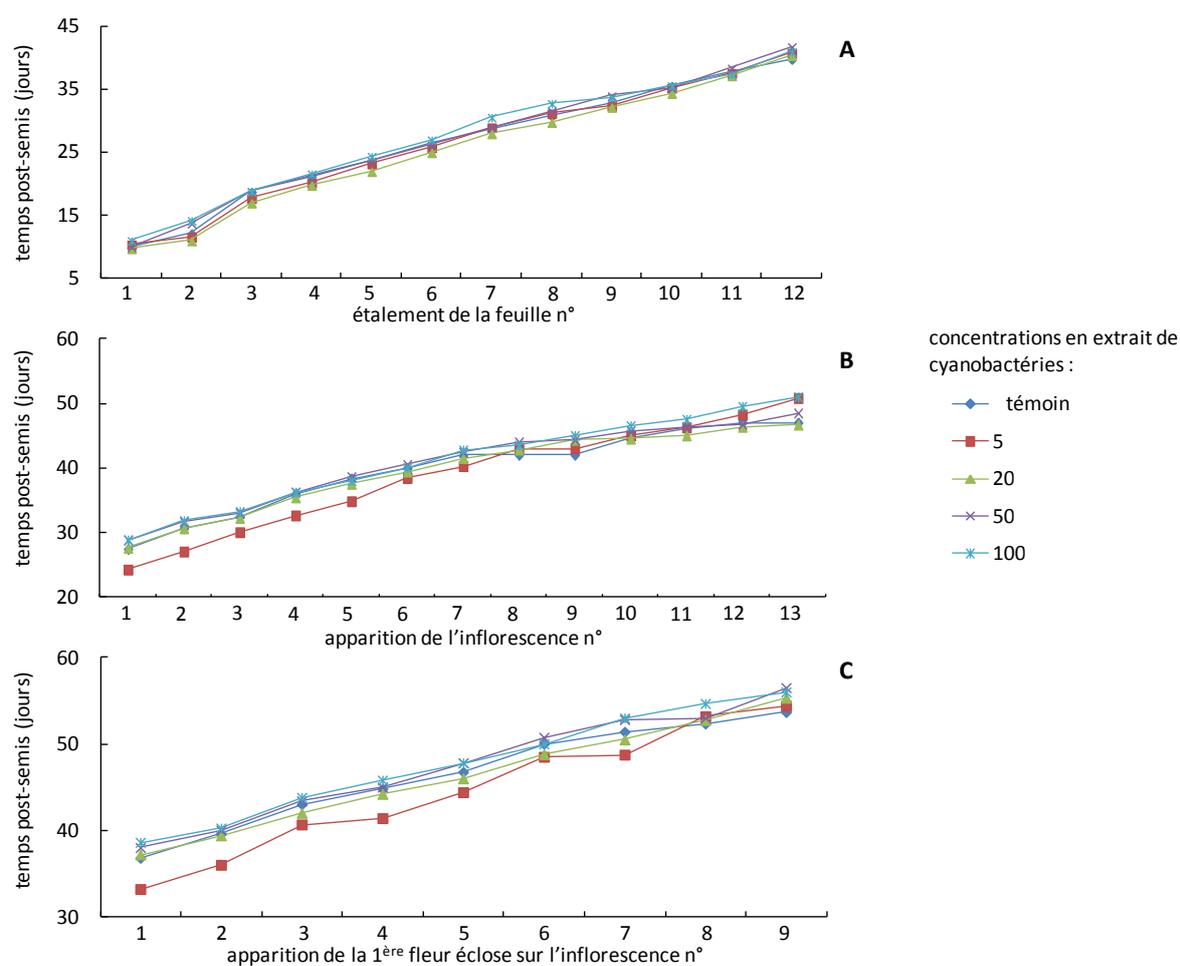
Durant les 90 jours d'exposition aux microcystines par irrigation des plants de tomates *Solanum lycopersicum* variété MicroTom, la taille des plants a été mesurée tous les 15 jours (**Figure 28**). Durant les 45 jours post-semis, la taille des tomates ne variait pas entre les différents traitements, avec ou sans eau contaminée avec des microcystines. Cependant, après 60 jours, les plants exposés à une concentration en extrait de *M. aeruginosa* de 100  $\mu g$  équiv. MC-LR  $L^{-1}$  étaient légèrement plus grands en taille que les autres traitements. Ce résultat était confirmé après 75 et 90 jours post-semis. En effet, après 90 jours d'exposition, les plants de tomate ayant été arrosés avec une solution contenant 100  $\mu g$  équiv. MC-LR  $L^{-1}$  avaient une taille moyenne de 13,2 cm, significativement supérieure à celle des plants arrosés avec des concentrations de 5 et 20  $\mu g$  équiv. MC-LR  $L^{-1}$ , de tailles respectives 10,3 et 10,8 cm. Ce résultat s'expliquait notamment par une diminution de la taille des plants traités avec des concentrations de 5 et 20  $\mu g$  équiv. MC-LR  $L^{-1}$ , sous le poids des fruits.



**Figure 28:** Cinétiques de croissance des plants de tomate *Solanum lycopersicum* var. MicroTom exposés, par irrigation, pendant 90 jours à différentes concentrations d'extrait de *Microcystis aeruginosa* (0 à 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>). Un zoom est effectué sur les valeurs obtenues après 90 jours d'exposition. Les données sont représentées par la moyenne ±  $\sigma$  (n=5). Des lettres différentes indiquent des différences significatives (p<0,05).

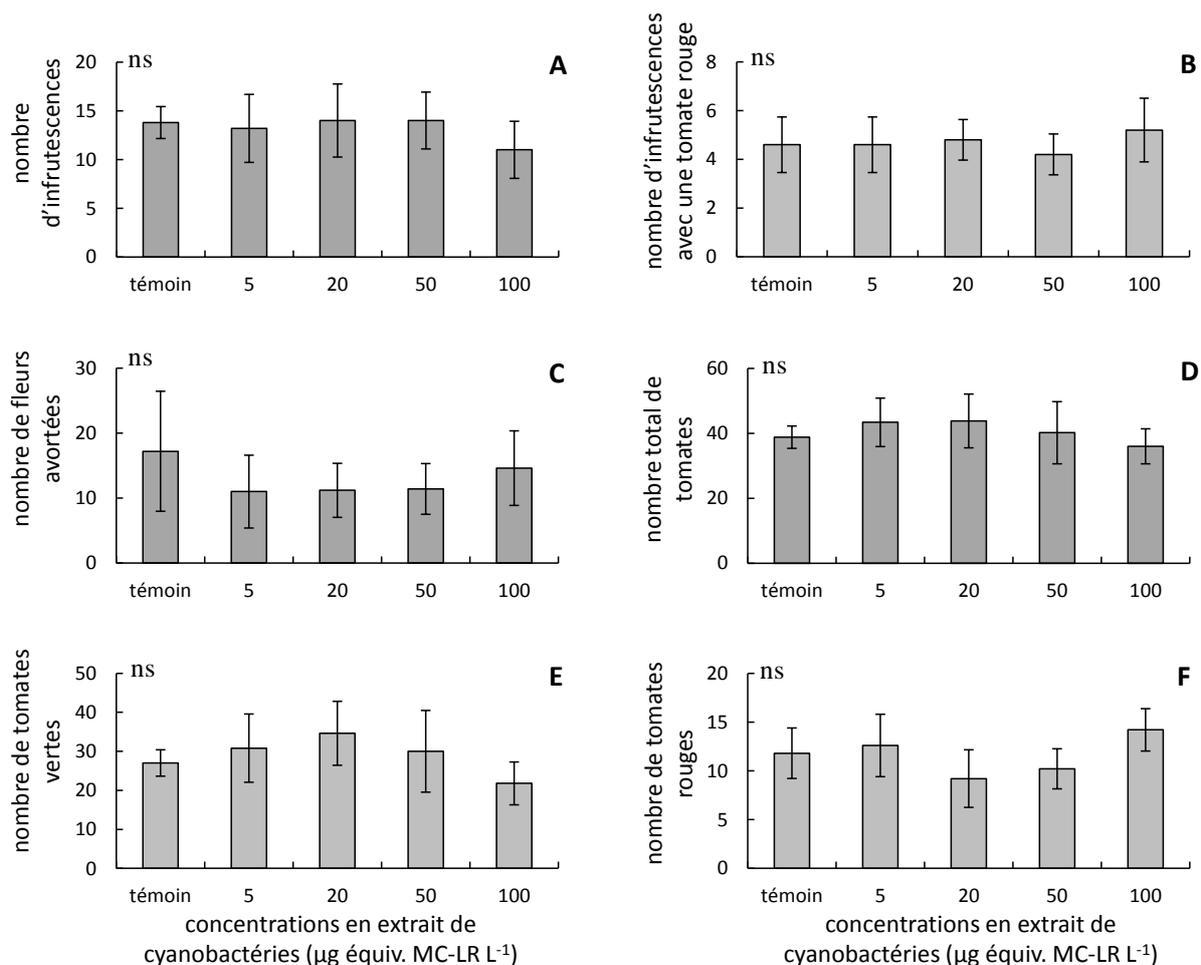
En parallèle de ces mesures, la phénologie des plants a été suivie quotidiennement et les résultats des cinétiques d'étalement des feuilles, d'apparition des inflorescences ou de la 1<sup>ère</sup> fleur éclore sur les différentes inflorescences sont indiqués sur la **Figure 29** pour chaque traitement. L'étalement des feuilles n'était pas influencé par le traitement administré aux plants. Par contre, les premières inflorescences semblaient apparaître plus rapidement sur les plantes recevant une solution diluée à 5 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>, 24 jours après semis par rapport aux traitements témoin, 20, 50 et 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup> où la première inflorescence apparaissait entre 27 et 29 jours. Cependant lors de l'apparition de la 6<sup>ème</sup> inflorescence, plus aucun traitement ne se détachait. Cette légère avance de développement des inflorescences observée pour les plants de tomates exposés à une concentration de 5 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup> était aussi visible au niveau de l'apparition de la 1<sup>ère</sup> fleur éclore. La 1<sup>ère</sup>

fleure éclose est observée 33 jours après le semis pour le traitement à 5  $\mu\text{g}$  équiv. MC-LR  $\text{L}^{-1}$  contre des périodes comprises entre 37 et 39 jours pour les autres traitements. Ce léger décalage est visible jusqu'à l'apparition de la 6<sup>ème</sup> inflorescence. Cependant, ces différences de développement observées pour le traitement à 5  $\mu\text{g}$  équiv. MC-LR  $\text{L}^{-1}$  par rapport aux autres traitements ne sont pas significativement différents de par la variabilité entre les plants d'un même traitement.



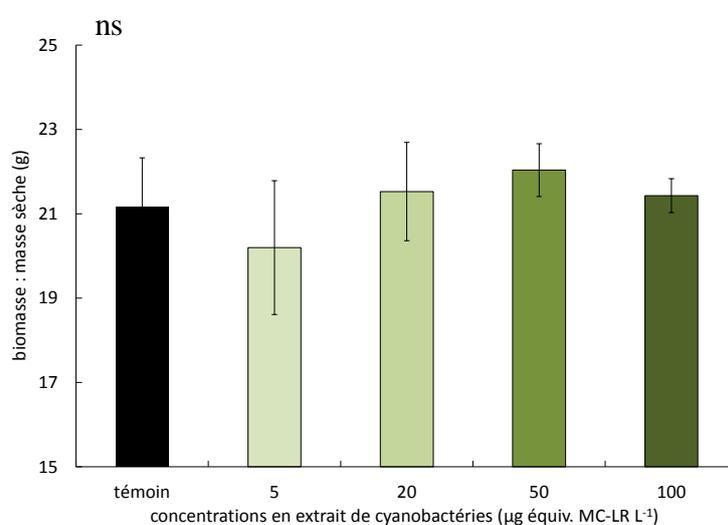
**Figure 29:** Cinétiques des différents stades phénologiques des plants de tomates *Solanum lycopersicum* var. MicroTom exposés, par irrigation, à différentes concentrations en extrait de *Microcystis aeruginosa* (0 à 100  $\mu\text{g}$  équiv. MC-LR  $\text{L}^{-1}$ ) correspondant (A) au nombre de jours nécessaire avant l'apparition des n feuilles, (B) au nombre de jours nécessaire avant l'apparition des n inflorescences et (C) le nombre de jours nécessaire avant que la 1<sup>ère</sup> fleur soit épanouie sur l'efflorescence n. Les données sont représentées par la moyenne  $\pm \sigma$  (n=5).

Après 90 jours d'expositions des plantes, d'autres paramètres liés à la phénologie des plants de tomates ont été observés tels que le nombre d'infrutescences, le nombre d'entre elles portant un fruit rouge, la quantité de fleurs avortées, les quantités numériques de tomates rouges et vertes (**Figure 30**). Ces indicateurs de développement sont identiques entre les différents traitements appliqués.

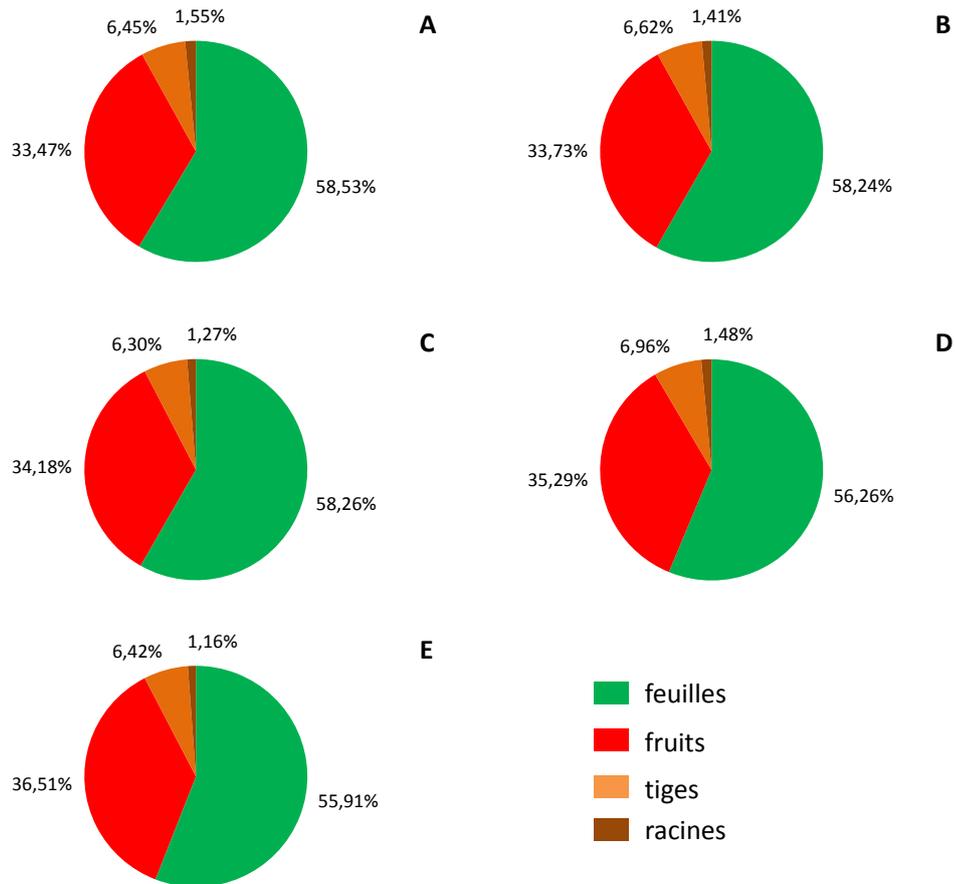


**Figure 30:** Différents indicateurs numériques de croissance des plants de tomates *Solanum lycopersicum* var. MicroTom exposés, par irrigation, à différentes concentrations en extrait de *Microcystis aeruginosa* (0 à 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>) pendant 90 jours. (A) nombre d'infrutescences, (B) nombre d'infrutescences ayant au moins une fleur épanouie, (C) nombre de fleurs ayant avorté, (D) nombre de tomates, (E) nombres de tomates vertes et (F) nombre de tomates rouges. Les données sont représentées par la moyenne ±  $\sigma$  (n=5).

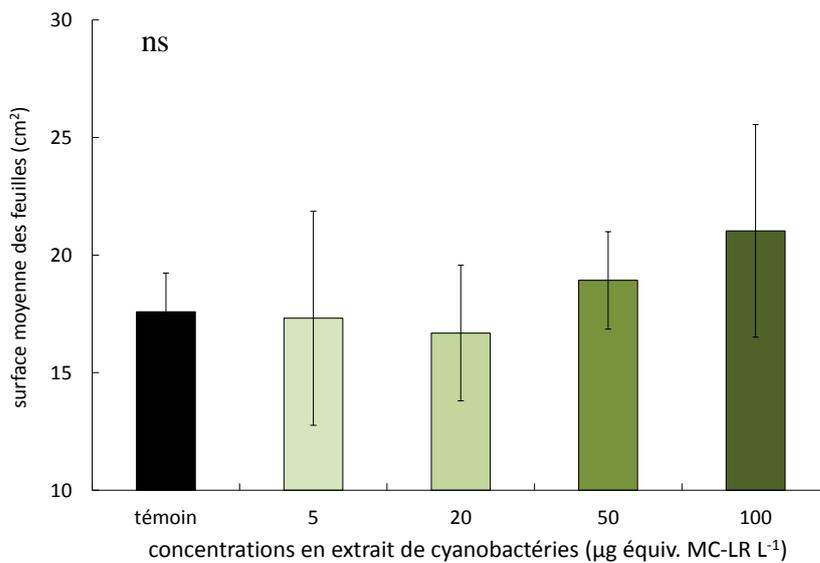
De la même façon, les biomasses des plants n'étaient pas significativement différentes entre les traitements (**Figure 31**) et les proportions de chaque organe (feuilles, fruits, tiges et racines) étaient semblables pour les différentes expositions (**Figure 32**), ce qui était confirmé par la surface foliaire des plants (**Figure 33**). Par conséquent, l'exposition quotidienne à différentes concentrations d'extrait de *M. aeruginosa*, pendant 90 jours ne modifiait pas significativement le développement et la croissance des plants de tomate.



**Figure 31:** Biomasses sèche totale (g) des plants de tomates *Solanum lycopersicum* var. MicroTom exposés, par irrigation, à différentes concentrations en extrait de *Microcystis aeruginosa* (0 à 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>) pendant 90 jours. Les données sont représentées par la moyenne ± σ (n=5).



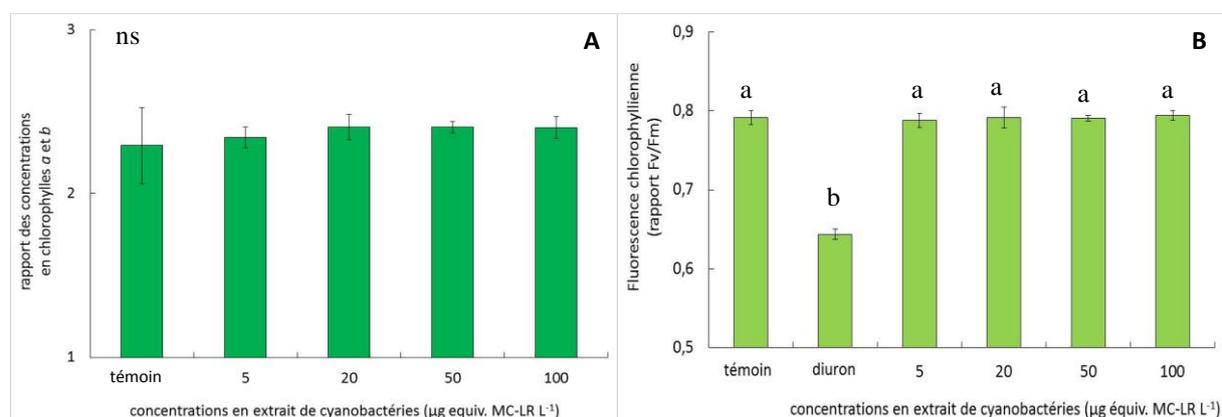
**Figure 32:** Diagrammes représentant les proportions (%) des différents organes des plants de tomates *Solanum lycopersicum* var. MicroTom : feuilles (vert), fruits (rouge), tiges (orange) et racines (marron), obtenus après 90 jours d'irrigation avec (A) de l'eau distillée, (B) 5 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>, (C) 20 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>, (D) 50 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup> et (E) 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>. Les données sont représentées par la moyenne (n=5).



**Figure 33:** Surface foliaire moyenne des plants de tomates *Solanum lycopersicum* var. MicroTom exposés à différentes concentrations en extrait de *Microcystis aeruginosa* (0 à 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>). Les données sont représentées par la moyenne du rapport de la surface foliaire sur le nombre de feuilles ± σ (n=5).

### 5.2.6. Effet d'une irrigation chronique avec un extrait de *Microcystis aeruginosa* dilué sur quelques paramètres physiologique des tomates *Solanum lycopersicum* var. MicroTom

Après 90 jours d'irrigation avec un extrait de *M. aeruginosa* dilué, les concentrations en chlorophylles sont mesurées et le rapport des chlorophylles *a/b* est obtenu (**Figure 34 A**). Ce rapport restait inchangé malgré l'exposition des plantes aux microcystines. De la même façon, la fluorescence (rapport  $F_v/F_m$ ) n'était pas modifiée avec une valeur moyenne de 0,79 (**Figure 34 B**). Les concentrations en acides gras foliaires restaient inchangées avec les traitements contenant des toxines (**Tableau 9**). Par conséquent l'exposition des plants de tomates ne modifiait pas les paramètres physiologiques pris en compte et aucun stress ne semblait apparaître suite à cette exposition.



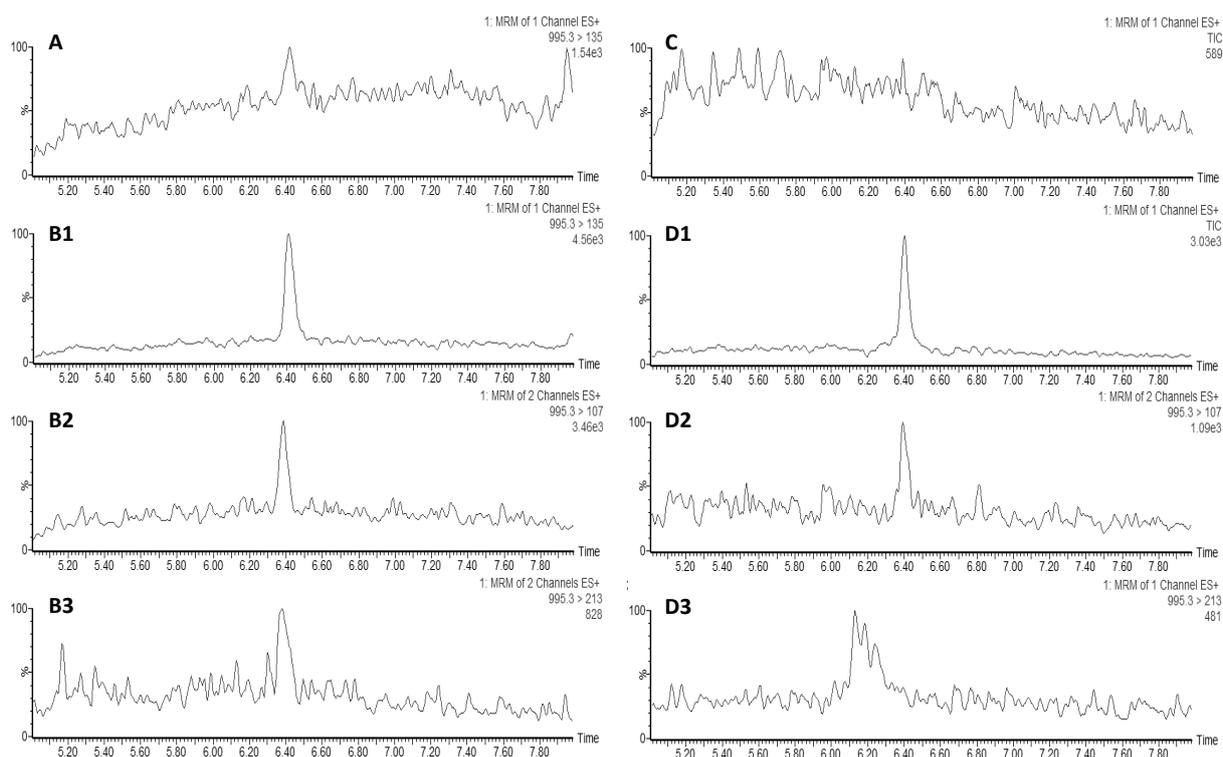
**Figure 34:** (A) Rapports des concentrations en chlorophylles *a/b* et (B) Mesures de la fluorescence chlorophyllienne (rapport  $F_v/F_m$ ) sur les feuilles issues de plants de tomates *Solanum lycopersicum* var. MicroTom exposés, par irrigation, à différentes concentrations en extrait de *Microcystis aeruginosa* (0 à 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>) pendant 90 jours. Les données sont représentées par la moyenne  $\pm \sigma$  (n=5).

**Tableau 9:** Valeurs des rapports d'acides gras foliaires des tomates *Solanum lycopersicum* var. MicroTom exposés par irrigation pendant 90 jours à des concentrations en extrait de *Microcystis aeruginosa* (0 à 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>). Les données sont représentées par la moyenne des rapports ± σ (n=5).

	traitements avec l'extrait de cyanobactéries ( µg équiv. MC-LR L <sup>-1</sup> )				
	témoin	5	20	50	100
$\frac{\% \text{C18:3}}{\% \text{C18:0} + \% \text{C18:1} + \% \text{C18:2}}$	7,2 ± 0,4	7,5 ± 0,7	7,3 ± 0,7	7,7 ± 1,1	7,6 ± 1
$\frac{\% \text{C16:0}}{\% \text{C16:1}}$	144,9 ± 16,6	138,4 ± 11,0	132,6 ± 13,2	154,4 ± 17,0	150,4 ± 20,1

### 5.2.7. Identification et quantification des microcystines absorbées par la plante, après 90 jours d'exposition

Seule la MC-LR a été recherchée par UHPLC-MS/MS dans les extraits des différents organes de plantes en ciblant la principale transition : 995>135 (*m/z*). Ces analyses ont révélé la présence de cette toxine dans les racines et les feuilles (**Figure 35**) alors qu'aucune toxine n'a été détectée dans les tiges et les fruits des plants de tomates exposés par irrigation à un extrait de *Microcystis aeruginosa* durant 90 jours. Plus précisément, l'absence de pic pour la transition 995,3>135 (*m/z*) révélait l'absence de MC-LR dans les feuilles et racines témoins (**Figure 35 A et C**). *A contrario*, les pics observés à 6,40 min pour cette même transition dans des extraits de feuilles et de racines issus de plants traités pendant 90 jours avec un extrait de *M. aeruginosa* dilué à 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup> témoignaient de la présence de MC-LR (**Figure 35 B1 et D1**). De plus, les pics également observés à 6,40 min pour les transitions de confirmation 995,3>107 (*m/z*) (**Figure 35 B2 et D2**) et 995,3>213 (*m/z*) (**Figure 35 B3**) confortaient le précédent résultat sur la présence de MC-LR dans les feuilles et les racines des plants de tomates traités. Seul le pic de la transition de confirmation 995,3>213 (*m/z*), pour l'extrait de racine traité à 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>, était décalé à 6,20 min (**Figure 35 D3**) contre 6,40 min pour les transitions précédentes.



**Figure 35:** Chromatogrammes obtenus en UHPLC-MS/MS sur des extraits de (A et B) feuilles ou de (C et D) racines de plants de tomates *Solanum lycopersicum* var. MicroTom exposés par irrigation à différentes concentrations en extrait de *Microcystis aeruginosa*, (A et C) témoin ou (B et D) 100  $\mu\text{g}$  équiv. MC-LR  $\text{L}^{-1}$ , pendant 90 jours. La transition majoritaire 995>135 ( $m/z$ ) a été observée sur l'ensemble des échantillons (A, B1, C et D1) pour les deux traitements et les transitions de confirmation 995>107 ( $m/z$ ) (B2 et D2) et 995>113 ( $m/z$ ) (B3 et D3) ont été recherchées sur les extraits de plantes traitées par arrosage avec une concentration de 100  $\mu\text{g}$  équiv. MC-LR  $\text{L}^{-1}$ .

Concernant la quantification des microcystines par UHPLC-MS/MS, dans les organes des plants de tomates (**Tableau 10**), les concentrations en MC-LR dans les racines étaient similaires pour les traitements avec 5 ; 20 et 50  $\mu\text{g}$  équiv. MC-LR  $\text{L}^{-1}$ , comprises entre 4,5 et 5,7 ng MC-LR  $\text{g}^{-1}$  MS alors que la concentration moyenne des plants traités à 100  $\mu\text{g}$  équiv. MC-LR  $\text{L}^{-1}$  atteignait 8,1 ng MC-LR  $\text{g}^{-1}$  MS. Dans les feuilles, les toxines ont pu être détectées et quantifiées uniquement dans les plants traités avec 20 ; 50 et 100  $\mu\text{g}$  équiv. MC-LR  $\text{L}^{-1}$  dont les concentrations respectives étaient de 0,29 ; 0,33 et 0,55 ng  $\text{g}^{-1}$  MS. Par conséquent, les concentrations en MC-LR dosées dans les organes de plantes n'augmentaient pas avec les concentrations croissantes en microcystines lors de l'exposition. Seul le

traitement à 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup> voyait ses concentrations légèrement supérieures aux autres traitements. Quant aux quantités trouvées dans les feuilles elles étaient plus faibles d'un facteur 15 par rapport aux racines, laissant penser à une faible mobilité des toxines entre la partie aérienne et racinaire des plants.

**Tableau 10:** Dosages des concentrations en microcystines (ng MC-LR g<sup>-1</sup> MS) accumulées dans les racines ou les feuilles des plants de tomates *Solanum lycopersicum* var. MicroTom, après 90 jours d'exposition, par irrigation, à différentes concentrations en extrait de *Microcystis aeruginosa* (0 à 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>). Les données sont exprimées par la moyenne ± σ (n=5). Des lettres différentes indiquent des différences significatives (p<0,05).

	témoin	traitements avec un extrait de cyanobactéries (µg équiv. MC-LR L <sup>-1</sup> )			
		5	20	50	100
<b>organes de plante</b>					
- racines	0 ± 0 (a)	4,5 ± 1,1(b)	4,8 ± 0,6 (b)	5,7 ± 0,8 (b)	8,1 ± 1,0 (c)
- feuilles	0 ± 0 (a)	0 ± 0 (a)	0,29 ± 0,06 (b)	0,33 ± 0,01 (b)	0,55 ± 0,19 (c)
ng MC-LR g <sup>-1</sup> MS					

### 5.3. Discussion

L'objectif principal de ce chapitre consistait à caractériser les effets d'une irrigation chronique avec un extrait de *Microcystis aeruginosa* sur un système sol-plante. D'après les résultats, l'irrigation avec un extrait dilué à des concentrations dites « environnementales » (≤100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>) ne modifiait pas les activités enzymatiques globales des microorganismes du sol. Cependant, l'activité nitrifiante montrait deux réponses distinctes selon l'utilisation de faibles concentrations (5 et 20 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>) ou de fortes concentrations (50 et 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>). Pour les faibles concentrations, l'activité nitrifiante était plus importante que celle des sols non traités. Les fortes concentrations à l'inverse ne stimulaient pas l'activité nitrifiante des microorganismes du sol. Cette augmentation de l'activité nitrifiante pourrait s'expliquer par la composition en azote des microcystines, lequel pourrait servir de substrat pour certains microorganismes. En effet, certains auteurs comme [Manage et al. \(2009\)](#) et [Bourne et al. \(2001\)](#) ont démontré que certaines bactéries du sol seraient capables de dégrader les microcystines tels que

*Arthrobacter* sp., *Brevibacterium* sp., *Rhodococcus* sp. et *Sphingomonas* sp.. L'extrait utilisé lors des irrigations contenait comme congénère majoritaire la MC-LR (68% de la totalité des microcystines), constituée majoritairement de carbone et de peu d'azote (14% de la toxine). Par conséquent les quantités d'azote apportées au sol restaient très faibles après 90 jours d'irrigation ( $140 \mu\text{g kg}^{-1}$  de sol sec). De plus l'absence de stimulation de l'activité nitrifiante pour les sols exposés à de fortes concentrations semblait démontrer que l'apport de toxines ne représentait pas forcément une source de nutriments azotés pour ces microorganismes. L'absence de stimulation d'activité par ces fortes concentrations mettrait plutôt en exergue un effet délétère sur les communautés nitrifiantes. Cependant, les abondances des différents microorganismes du sol restant semblables entre traitements, un apport d'extrait de *M. aeruginosa* dilué à 50 ou  $100 \mu\text{g}$  équiv. MC-LR  $\text{L}^{-1}$  ne provoquait pas d'effets létaux sur les microorganismes mais uniquement une modification de leur activité. Les microcystines agissant comme des messagers chimiques capables de modifier les activités des protéines phosphatases, il est possible que ces dernières aient modifié certaines activités microbiennes comme en témoignent les travaux de [Christoffersen \(1996\)](#) et [Valdor et Aboal 2007](#). D'après la littérature, les microorganismes du sol telles que certaines bactéries sont capables de dégrader les microcystines apportées au niveau du sol ([Rapala et al., 2005](#); [Manage et al., 2009](#); [Chen et al., 2010](#)), cependant la dégradation n'était pas totale après une exposition chronique de 90 jours. En effet, les dosages montraient la présence de microcystines avec des concentrations comprises entre 1,3 et 3,9 ng équiv. MC-LR  $\text{g}^{-1}$  sol sec et entre 0,34 et 0,36 ng équiv. MC-LR  $\text{g}^{-1}$  sol sec respectivement par dosage enzymatique et dosage chromatographique. Ainsi la réalisation des deux dosages pour les extraits de sol a permis de montrer la plus grande sensibilité de la méthode enzymatique, avec des différences significatives entre les différents traitements, par rapport à la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Les concentrations en toxines trouvées différaient aussi entre les

deux méthodes car 1) les concentrations obtenues par chromatographie informaient uniquement sur la détection de la MC-LR (transition  $995 > 135 \text{ m/z}$ ) et 2) malgré la purification des extraits, il est possible que la présence des interférents aie diminué le rendement d'ionisation en entrée du spectromètre de masse (phénomène classiquement nommé « effet matrice »). *A contrario*, la méthode enzymatique permettait la détection de tout congénère de microcystine inhibiteur de protéine phosphatase de type 2A, initialement apporté lors des irrigations. De plus, l'observation d'une inhibition des protéines phosphatases démontrait que les microcystines ou résidus de microcystines extraits du sol conservaient leur potentiel toxique. Les concentrations trouvées par ces méthodes variaient d'un facteur 10 tout en restant relativement faibles par rapport à l'apport initial (<5% de l'apport cumulé). La fraction des microcystines extraites du sol n'était pas dose-dépendante et restait suffisamment faible. Elle représentait une fraction qui n'avait pas été soumise à la photodégradation, à l'absorption racinaire ou encore à la dégradation microbienne. Cette partie des toxines pourrait être peu biodisponible, adsorbée sur des particules de sol comme l'ont déjà observé [Chen et al. \(2006\)](#) ; [Miller et al. \(2001\)](#) ; [Miller and Fallowfield \(2001\)](#) et [Morris et al. \(2000\)](#) et expliquerait les concentrations similaires entre les différents traitements excepté pour la concentration la plus forte ( $100 \mu\text{g équiv. MC-LR L}^{-1}$ ). En effet, pour cette dernière, la concentration mesurée par test d'inhibition de la PP2A indiquait une valeur deux fois plus forte que pour les autres traitements, ce qui pourrait s'expliquer par une dégradation incomplète de l'apport 24 h après le dernier apport. Concernant l'ensemble des autres toxines apportées et non retrouvées après l'étape de purification, il est possible qu'elles aient été dégradées par les microorganismes du sol, étant donné que le temps de demi-vie des microcystines dans le sol a été estimé entre 6 et 17,8 jours ([Chen et al., 2006b](#)) et que la dégradation pouvait s'effectuer régulièrement après chaque apport de faibles quantités. Ainsi les concentrations en microcystines extraites étaient assez faibles ( $3,9 \text{ ng équiv. MC-LR g}^{-1} \text{ sol sec}$  pour le traitement à  $100 \mu\text{g équiv. MC-LR L}^{-1}$ ),

ne semblant pas présenter un risque sanitaire. En effet en prenant l'exemple d'un enfant âgé de 6 ans (15 kg de masse corporelle), l'ingestion de 200 mg de sol par jour (Connor et al., 1998) induirait une exposition de 0,05 ng équiv. MC-LR kg<sup>-1</sup> jour<sup>-1</sup>, ce qui est 800 fois inférieur à la limite fixée par l'Organisation Mondiale de la Santé : 0,04 µg équiv. MC-LR kg<sup>-1</sup> jour<sup>-1</sup> (Chorus and Bartram, 1999).

Les résultats obtenus après exposition des plants de tomate MicroTom pendant 90 jours d'irrigation montraient peu de différences entre les différents traitements concernant la croissance et le développement. Cependant, dans les premiers jours, le traitement à 5 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup> était caractérisé par l'apparition plus précoce (environ 7 jours d'avance) des inflorescences et des fleurs écloses. Ce type de résultats était observé par Bibo et al. (2008) sur des plantules de colza (*Brassica napus* L.) et de chou (*Brassica oleracea*) exposées à de faibles concentrations en MC-RR (respectivement 10 et 1 µg L<sup>-1</sup>) où le concept d'hormèse était supposé. Cependant cette avance n'est pas conservée durant toute la durée d'exposition, n'étant plus visible 45 jours après semis des graines de MicroTom. La taille des plants de tomates est significativement différente après 90 jours entre le traitement à 5 et 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>, s'expliquant principalement par une diminution de la taille des tomates traitées avec 5 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>. Cette diminution de la taille pourrait s'expliquer par un affaissement plus important sous le poids des fruits, ce qui n'est pas observé pour le traitement à 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>. En ce qui concerne les paramètres physiologiques mesurés dans cette étude: concentration en chlorophylles, fluorescence chlorophyllienne et concentrations en acides gras foliaires, ils n'ont pas permis d'observer de stress ressenti par les plants. Dans la littérature, des résultats semblaient démontrer une diminution de la biomasse et de la taille des plants de tomates *Lycopersicon esculatum* après 30 jours d'exposition (El Khalloufi et al., 2012), cependant les concentrations atteignaient 2 000 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>. De même d'autres espèces telles que *Zea mays*, *Lens esculenta*, *Triticum*

*durum* et *Pisum sativum* voyaient leur croissance fortement diminuée lors d'une exposition à 500 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup> durant 30 jours (Saqrane et al., 2009). Mais les résultats différents obtenus, par rapport à ces études, peuvent s'expliquer par l'utilisation de concentrations plus faibles et d'un extrait de cyanobactéries de composition différente. D'autre part, dans notre étude, l'utilisation d'une solution nutritive lors des irrigations quotidiennes pourrait avoir limité l'effet des toxines sur la croissance des plants de tomate. Si certaines études ont démontré des effets sur les concentrations en chlorophylles de *Zea mays* et *Lens esculenta* après des expositions respectives de 4 200 et 2 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup> ou bien sur la fluorescence chlorophyllienne à partir de 500 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup> (Saqrane et al., 2009). Pour les tomates, la fluorescence chlorophyllienne est affectée à partir de 20 mg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup> (El Khalloufi et al., 2012), démontrant la plus faible sensibilité des tomates aux microcystines par rapport à d'autres cultures et expliquant l'absence de réponses lors d'une irrigation avec une concentration de 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>. Ces travaux nous démontrent que la croissance et le métabolisme des plants tomates exposés pendant 90 jours par irrigation du sol avec des microcystines, ne semblent pas avoir été modifiés. Si une partie des toxines a pu être dégradée par les microorganismes du sol tel que décrit précédemment, une autre fraction de microcystines aurait pu être absorbée par les plants, étant donné qu'elles ont tendance à s'adsorber faiblement au sol. D'ailleurs, certaines études rapportent un transfert possible dans différentes plantes telles que *Oryza sativa* (Chen et al., 2012), *Malus pumila* (Chen et al., 2011), *Brassica napus* (Chen et al., 2004), *Sinapis alba*, *Brassica oleracea* var. *italica* (Järvenpää et al., 2007), *Raphanus sativus*, *Eruca sativa*, *Lactuca* sp., *Anethum graveolens* L., *Petroselinum crispum* et *Brassica oleracea* L. (Crush et al., 2008; Mohamed and Al Shehri, 2009). Cette absorption des microcystines se ferait par pénétration ou diffusion au niveau de la membrane plasmique des racines (Chorus and Bartram, 1999) avant d'être transférées vers les parties aériennes (Peuthert et al., 2007; Crush et al., 2008; Mohamed and

Al Shehri, 2009; Chen et al., 2012). D'après les résultats obtenus après irrigation avec des concentrations environnementales en microcystines il est possible d'affirmer que les ces toxines sont capables d'être absorbées par les racines et d'atteindre les feuilles de tomates *Solanum lycopersicum* var. MicroTom. Les concentrations en MC-LR ont pu être obtenues uniquement en UHPLC-MS/MS, car les résultats par le test d'inhibition de la PP2A n'étaient pas exploitables. En effet, la matrice étant très chargée et colorée, les résultats ne permettaient pas d'effectuer des dosages corrects par ce test enzymatique. Les concentrations de MC-LR obtenues en UHPLC-MS/MS étaient de 8,1 ng g<sup>-1</sup> de MS dans les racines et de 0,55 ng g<sup>-1</sup> de MS dans les feuilles (ces valeurs sont potentiellement sous-évaluées à cause d'un effet matrice). Les quantités de toxines absorbées sont faibles par rapport aux précédentes études réalisées par Mohamed and Al Shehri (2009) où les concentrations en microcystines étaient comprises entre 0,05 et 1,2 µg g<sup>-1</sup> MF dans différents produits maraichers irrigués avec des concentrations en toxines n'excédant pas 2,3 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>. De même, une étude de Crush et al. (2008) rapportait des concentrations de 1,45 µg g<sup>-1</sup> MS dans les racines de trèfle (*Trifolium* sp.) cultivé sur un substrat sableux. Les différentes concentrations obtenues dans les plantes semblent résulter des capacités de chaque espèce à plus ou moins absorber les microcystines. Une récente étude a également permis de quantifier les microcystines présentes dans des grains de riz après prélèvement au champ et les concentrations étaient comprises entre 0,04 et 3,19 ng g<sup>-1</sup> (Chen et al., 2012), soit des concentrations semblables à celles trouvées dans nos travaux. Les faibles concentrations mesurées pourraient aussi s'expliquer par une faible disponibilité des microcystines au niveau du sol, dépendante de la composition du substrat. De plus, le passage des microcystines au travers les membranes biologiques n'est pas aisé d'après Svrcek and Smith (2004), de par la taille importante des microcystines. Avec des concentrations foliaires 13 fois plus faibles que celles retrouvées dans les racines, il semblerait que les microcystines étaient peu mobiles une fois à l'intérieur de la plante. Une

étude de [Mohamed and Al Shehri \(2009\)](#) démontrait que les concentrations étaient plus importantes dans les racines par rapport aux feuilles. La présence de toxines dans les feuilles démontrait qu'elles pouvaient transiter dans les plants de tomates, peut-être par la sève brute jusqu'aux feuilles, cette dernière étant animée par le flux d'évapotranspiration. Cette hypothèse était déjà avancée par [Gutiérrez-Praena et al. \(2014\)](#) travaillant sur des tomates âgées de 2 mois et exposées à des concentrations de 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>. Si le flux d'évapotranspiration semble être un moteur au transfert des microcystines aux feuilles, les concentrations sont restées très faibles (0,55 ng équiv. MC-LR g<sup>-1</sup> MS), ne provoquant pas de réponse physiologique visible. Cependant, il est aussi possible que la plupart des toxines qui ont atteint les feuilles soient prises en charge par le métabolisme antioxydant du glutathion ([Pflugmacher et al., 1998, 2001](#); [Esterhuizen-Londt et al., 2011](#)), expliquant les faibles concentrations retrouvées. Pour les autres organes de la plante, la MC-LR n'a pas été détectée au niveau des tiges et des fruits, après 90 jours d'irrigation avec un extrait de cyanobactéries à des concentrations comprises entre 5 et 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>. Une récente étude sur l'accumulation des microcystines dans les différents organes de plants de tomates avait démontré que les fruits étaient capables de contenir des toxines à des concentrations comprises entre 5,15 et 10,83 µg équiv. MC-LR kg<sup>-1</sup> MF une semaine après exposition à 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup> ([Gutiérrez-Praena et al., 2014](#)). Cependant, 14 jours après exposition, les toxines n'étaient plus détectées dans les fruits, c'est pourquoi les auteurs supposaient que les microcystines étaient capables de former des liaisons par exemple avec la forme réduite du glutathion (GSH), les rendant indétectable ([Pflugmacher et al., 1998](#)). Par conséquent, il se pourrait que les toxines absorbées régulièrement pendant 90 jours soient elles aussi non identifiables suite à la formation de liaisons avec la GSH ou d'autres molécules présentes dans le fruit. De façon générale, la contamination de légumes destinés à la consommation suite à l'utilisation d'eaux peu contaminées (0,65 à 2,3 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>) avait déjà été

démontrée par une étude de [Mohamed and Al Shehri \(2009\)](#) après analyses de produits issus de l'agriculture. Plus récemment, [Chen et al. \(2012\)](#) montraient aussi une accumulation de microcystines dans des grains de riz avec des concentrations d'environ 3,19  $\mu\text{g}$  équiv. MC-LR  $\text{kg}^{-1}$  MF, ce qui est inférieur à la limite d'ingestion journalière fixée à 0,04  $\mu\text{g}$   $\text{kg}^{-1}$ . La totalité de ces dosages de microcystines dans les plantes agricoles terrestres, exposées par irrigation du sol, sont en dessous de la limite établie par l'Organisation Mondiale de la Santé à 0,04  $\mu\text{g}$   $\text{kg}^{-1}$  de masse corporelle  $\text{jour}^{-1}$ . Par conséquent les légumes irrigués avec des eaux contaminées ne semblent pas présenter de risques sanitaires. Pour autant, il serait intéressant d'approfondir nos connaissances sur le devenir des microcystines dans ces légumes.

#### **5.4. Conclusion**

Au travers de ce chapitre, nous avons pu observer que des arrosages répétés, pendant 90 jours, d'un système sol-plante avec un extrait de *M. aeruginosa*, ne modifiait ni les activités microbiennes des sols ni la croissance des plantes. Les activités globales du sol restaient identiques à celles du témoin et seule l'activité nitrifiante se voyait stimulée pour des concentrations de 5 et 20  $\mu\text{g}$  équiv. MC-LR  $\text{L}^{-1}$ , sans pour autant se traduire par une augmentation d'abondance de microorganismes nitrifiants. Les microcystines ne sont pas totalement dégradées au niveau du sol après 90 jours d'irrigation journalière et ont conservé leur capacité à inhiber les protéines phosphatases et donc leur pouvoir toxique. Cependant, les concentrations dosées restent faibles, ne dépassant 5% de l'apport initial. Enfin, les microcystines ont aussi la capacité d'être absorbées au niveau des plantes où elles sont retrouvées à des concentrations n'excédant pas les 8 ng MC-LR  $\text{g}^{-1}$  MS racinaire et peuvent migrer jusqu'aux feuilles où les concentrations atteignaient 0,55 ng MC-LR  $\text{g}^{-1}$  MS. Cependant, la MC-LR n'a pas été détectée au niveau des fruits, ce qui s'expliquerait par une stimulation des mécanismes de détoxification, mise en place par la plante face à ce xénobiotique. Par conséquent, le risque sanitaire semble écarté à moins que les toxines

transférées dans les tomates ni soient stockées sous forme liée, tout en conservant leur propriétés toxiques.



## **Chapitre 6 : Discussion générale, conclusions et perspectives**



## **6.1. Discussion générale**

Ces travaux sont les premiers à s'intéresser au devenir et à l'impact écotoxicologique de cyanotoxines de type microcystine apportées en faibles doses au sol lors d'irrigations. L'utilisation de conditions réalistes permet en outre d'observer les effets d'irrigations répétées du sol sur le développement des plants de tomates, tout comme le transfert des toxines vers la plante.

### **6.1.1. Le sol et ses communautés microbiennes**

Cette étude a permis de répondre aux questions concernant le devenir et l'effet des microcystines apportées dans des conditions les plus proches possibles des conditions environnementales. Les toxines apportées sur un sol sableux y persistent plusieurs jours car elles sont très peu dégradées. Seule une faible portion subit une dégradation par les microorganismes du sol. Leur temps de demi-vie excède les 56 jours et les toxines ont tendance à s'accumuler au niveau du sol. Le comportement de ces dernières est différent selon le délai d'incubation dans le sol. Juste après exposition, les toxines sont peu disponibles, à l'inverse, après une période d'incubation plus longue, plus des  $\frac{3}{4}$  de la quantité de toxines se trouvent dans la phase labile du sol et sont facilement extractibles. Dans cette fraction, plus de la moitié des toxines sont adsorbées à des acides humiques contenus dans la fraction lessivable. Ce dernier résultat amène à considérer le risque de contamination de la nappe souterraine. Cependant, cette fixation à des acides humiques entraîne aussi un stockage important des microcystines sur la cartouche C18, lors de l'étape de semi-purification. L'augmentation de la période d'incubation a aussi pour effet d'induire une forte adsorption d'une partie des microcystines au sol, les rendant non-extractibles à l'aide de solvant organique (MeOH). Cette part de microcystines fortement fixée aux éléments du sol représenterait la fraction adsorbée à des matières organiques de tailles plus grosses ou à des

argiles constituant le sol. Ainsi, selon le type de sol, plus ou moins argileux ou riche en matières organiques, la part de microcystines adsorbée peut alors fortement varier.

Des concentrations environnementales en toxines apportées chroniquement par irrigation ne perturbent pas les activités enzymatiques globales liées aux cycles du carbone, de l'azote ou du soufre. Seule l'activité nitrifiante est significativement stimulée lors d'une exposition pour des concentrations comprises entre 5 et 20  $\mu\text{g}$  équiv. MC-LR  $\text{L}^{-1}$ , quel que soit le temps d'exposition (14 ou 90 jours). Pour une exposition à une concentration de 50  $\mu\text{g}$  équiv. MC-LR  $\text{L}^{-1}$  pendant 14 jours, l'activité nitrifiante est aussi significativement plus importante que le témoin alors que cette augmentation n'est pas observée après 90 jours d'exposition. Les différences de résultats entre ces deux temps d'incubation pour la même concentration d'exposition permettent d'affirmer que le facteur « durée d'exposition » joue un rôle et confirme l'accumulation de microcystines dans le sol. A l'inverse, quelle que soit la durée d'exposition une concentration de 100  $\mu\text{g}$  équiv. MC-LR  $\text{L}^{-1}$  ne stimule pas l'activité nitrifiante. D'autre part, si pour une période de 14 jours d'exposition, l'augmentation de l'activité nitrifiante est en relation avec l'abondance des bactéries nitrifiantes, cela n'est pas vérifié pour une plus longue période d'exposition (90 jours). Cette augmentation d'activité semble résulter d'une activité accrue des microorganismes pouvant résulter de l'interaction des microcystines avec les protéines phosphatases présentes dans les microorganismes du sol. La faculté des microcystines, extraites du sol exposé chroniquement pendant 90 jours, à inhiber les protéines phosphatases a été conservée démontrant qu'une partie des toxines extraites du sol conserve alors son pouvoir toxique. Les résultats de la littérature relatant des temps de demi-vie des MC-LR n'excédant pas 18 jours sont contredits par les résultats obtenus en utilisant notamment la  $^{14}\text{C}$ -MC-LR. Les microcystines ont plutôt tendance à s'accumuler et persister dans le sol due à leur faible biodégradation. Ces résultats mettent aussi en avant que les expérimentations effectuées en solution de sols, communément

trouvées dans la littérature, donnent des résultats très différents par rapport à l'expérimentation en conditions réalistes que ce soit en termes d'interactions avec les particules du sol ou en termes de biodégradation. En conclusion, la forte accumulation de microcystines dans le sol entraîne de forts risques de lessivage et de contamination des nappes phréatiques. Ces éléments nous amènent à considérer le fait que les microcystines apportées par irrigation, restant dans la phase mobile du sol, peuvent aussi être absorbées par les plantes terrestres cultivées sur ces sols agricoles.

### 6.1.2. La plante

Cette étude nous a permis de confirmer que les microcystines avaient des effets phytotoxiques sur le processus de germination des plantes lors d'expositions à de fortes concentrations. Pour autant, les résultats obtenus sur plusieurs variétés ont démontré que la sensibilité était différente selon la variété utilisée. A titre d'exemple, la tomate est une plante peu sensible aux microcystines par rapport au blé ou à la laitue et la sensibilité diverge selon les variétés de tomates utilisées. Les microcystines, apportées à des concentrations réalistes comparables à celles trouvées dans l'environnement, ont aussi des effets sur la croissance des plantes avec une augmentation significative de la biomasse des racines, pour des concentrations *in vitro* inférieures à 1 mg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>. De la même façon, les plantules cultivées sur sol, à des concentrations réalistes stimulent leur croissance pendant les 14 premiers jours. Cependant seuls les plants traités avec 5 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup> ont un développement floral plus précoce par rapport aux témoins et autres traitements d'environ 7 jours. Ainsi, il est possible que la germination ait été stimulée pour l'ensemble des plants, cependant seul les plants traités à une concentration de 5 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup> conservent cette précocité de développement jusqu'au stade floral. Cette croissance importante des plantules peut aussi être mise en relation avec une forte activité nitrifiante des sols pour cette faible concentration d'où résulte un apport d'azote supplémentaire pour les plantules. Excepté

ce léger délai observé, l'utilisation d'une eau contaminée avec des microcystines à des concentrations environnementales (5 à 100  $\mu\text{g}$  équiv. MC-LR  $\text{L}^{-1}$ ) ne perturbe pas la croissance et le développement des plants de tomate. Les rendements ne sont en aucun cas affectés par les traitements, ce qui ne semblerait pas impacter économiquement un agriculteur amené à utiliser des eaux contaminées pour l'irrigation. De la même façon, les paramètres physiologiques mesurés n'indiquaient pas un état de stress physiologique pour les plants de tomates. Cependant, comme les toxines sont faiblement dégradées et semblent s'accumuler dans le sol que nous avons utilisé, leurs concentrations peuvent alors devenir très importantes et létales pour la plante. En effet, une concentration de 36 mg MC-LR  $\text{kg}^{-1}$  sol sec entraînait la mort des plantules dans les 14 jours suivant le repiquage sur sol contaminé. De plus, les toxines présentes dans la phase labile du sol sont en partie absorbées par les racines de tomate et peuvent de surcroît atteindre les parties aériennes de la plante. Après les racines, les feuilles constituent l'organe aérien des plantes où les plus fortes concentrations en MC-LR ont été trouvées par UHPLC-MS/MS. Ce résultat diffère de ceux de la littérature où les feuilles accumuleraient plus que les racines. Ces différences peuvent s'expliquer par des conditions d'exposition différentes qui agissent sur le flux d'évapotranspiration, moteur du transfert des toxines aux parties aériennes de la plante. Cependant les concentrations sont relativement faibles par rapport aux résultats de la littérature où les conditions d'exposition sont souvent différentes. La MC-LR n'est pas détectée au niveau des fruits après 90 jours d'exposition, pouvant s'expliquer par une conjugaison avec la glutathion ou avec d'autres molécules. Pour autant l'utilisation de  $^{14}\text{C}$ -MC-LR confirme l'absence de toxines au niveau du fruit 48 heures après exposition. Par conséquent il semblerait que le risque de contamination par ingestion de fruits contaminés soit rejeté. Cependant d'autres études rapportent une contamination des fruits 7 jours après exposition, ainsi il est possible que le temps d'incubation (48 heures) n'ait pas été suffisant. D'autre part, il n'a pas été possible de déterminer si les toxines extraites de

la plante exposée 90 jours, avaient conservé leur capacité à inhiber les protéines phosphatases. En effet, les faibles concentrations détectées dans la plante (en UHPLC-MS/MS) et la forte quantité (50 à 75%) de toxines liées à d'autres molécules déterminée par la molécule marquée, expliqueraient la difficulté à mesurer l'inhibition des protéines phosphatases. L'ensemble des résultats obtenus sur les différentes questions de recherche exposées sont représentés schématiquement dans la **Figure 36**.

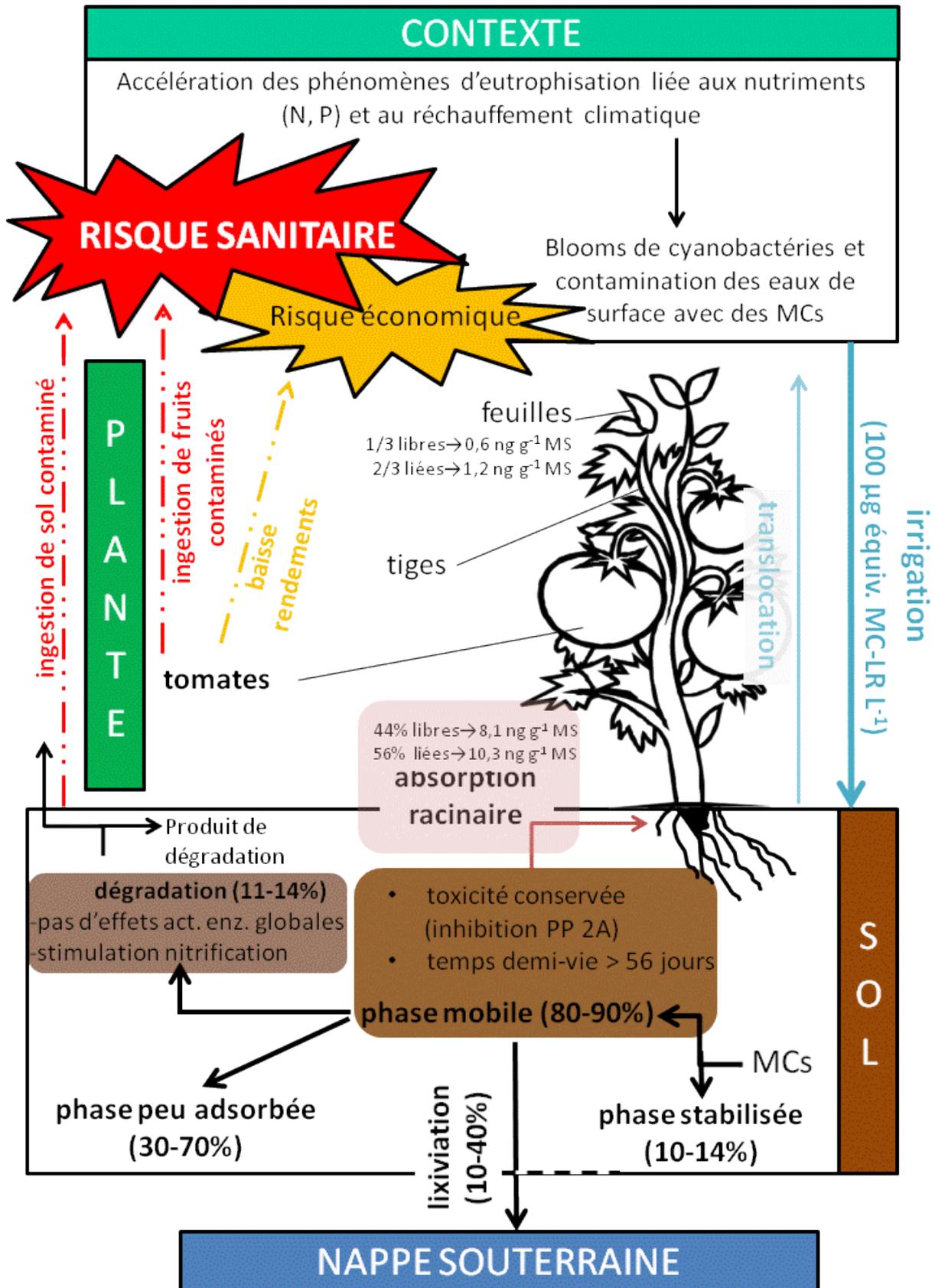


Figure 36: Schéma synthétisant les principaux résultats obtenus.

## 6.2. Conclusion générale

Cette étude avait pour objectifs de s'intéresser aux effets écotoxicologiques des toxines de cyanobactéries de type microcystine, apportées lors de l'irrigation de champs cultivés. Cette approche n'ayant pas été abordée jusqu'à maintenant, le travail s'est articulé en plusieurs parties consistant en : une caractérisation chimique et écotoxicologique de l'extrait de cyanobactéries, l'étude du devenir de la MC-LR dans les sols et du transfert de cette toxine aux plantes et enfin des effets écotoxicologiques d'une irrigation répétée d'un système sol-plante.

La caractérisation de l'extrait de *Microcystis aeruginosa* constitué de plusieurs microcystines : (MC-LR,-LF,-LW,-LY et -YR) a révélé une forte toxicité lors des tests d'inhibition des protéines phosphatases de type 2A. L'effet toxique de l'extrait a été démontré lors de tests de germination. Cependant selon les semences utilisées les résultats sont très différents, le blé étant l'espèce la plus sensible avec une  $CI_{50}$  de 11 mg équiv. MC-L<sup>-1</sup>. A l'inverse quelle que soit la variété de tomate utilisée dont la MicroTom, la faculté de germination n'est pas atteinte. Par contre, le processus de germination et de croissance des plantules sont accélérés lors de l'utilisation de doses environnementales (<100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>). Cette précocité des plantules traitées est alors maintenue jusqu'à 14 jours, après le semis des graines dans le sol. La masse des parties aériennes des plantules est alors multipliée par 1,5 en comparaison aux plantules non traitées. Concernant le sol, l'impact écotoxicologique de concentrations environnementales, sur les activités des microorganismes liés aux grands cycles géochimiques est nul. Cependant l'activité nitrifiante est stimulée pour des concentrations en extrait inférieures à 100 µg équiv. MC-LR L<sup>-1</sup>. Ce résultat est corrélé positivement à une plus forte abondance de bactéries nitrifiantes ( $r=0,56$ ). La stimulation du processus de germination semble indiquer une pénétration des toxines dans les graines de MicroTom.

Ces travaux ont aussi permis de confirmer que les toxines de type MC-LR sont capables de persister plusieurs jours dans un sol agricole et d'être absorbées par la plante quel que soit son stade de développement (plantule, plante mature). La MC-LR dans le sol est très peu dégradée par les microorganismes des sols et reste présente jusqu'à 56 jours après l'apport de toxines par irrigation. Par conséquent, les microcystines conservent majoritairement leur structure initiale. Une autre partie est dégradée révélant un nouveau métabolite, plus polaire que la MC-LR. L'étude de la dynamique de la toxine, dans le sol, permet de mettre en exergue une très forte mobilité de cette dernière, présente dans la phase labile du sol. Seule une faible proportion ( $\approx 10\%$  de l'apport) reste fortement adsorbée au sol. La présence de la MC-LR principalement dans la phase labile indique une forte biodisponibilité pour les plantes comme en témoigne le transfert dans les différents organes avec des concentrations croissantes dans les tiges < feuilles < racines, en conditions hydroponiques. Dans de telles conditions les concentrations en toxines libres et liées atteignent jusqu'à  $311 \mu\text{g}$  équiv. MC-LR  $\text{g}^{-1}$  MS avec des facteurs de concentration supérieurs à 13, pour les racines. Cependant, ni transfert, ni accumulation dans les fruits des MicroTom n'ont été observés. Enfin, le fait de trouver des concentrations en toxines liées deux fois supérieures à celles de toxines libres dans les feuilles, amène à supposer qu'une conjugaison a lieu dans les organes de la plante, ce qui les rend alors difficilement détectables.

Enfin, l'exposition répétée par irrigation d'un système sol-plante (concentration <  $100 \mu\text{g}$  équiv. MC-LR  $\text{L}^{-1}$ ) pendant toute la durée du cycle de développement de la MicroTom (90 jours), a permis de contrôler si de telles pratiques avaient des conséquences écotoxicologiques. D'une part seules 5% des toxines apportées ont pu être détectées dans les extraits de sol. L'analyse des extraits révèle la présence, dans le sol, de toxines fortement disponibles, libres, conservant leur capacité toxique, à inhiber les protéines phosphatases. En ce qui concerne les mesures d'activités biologiques des sols, seule l'activité nitrifiante est

stimulée pour des concentrations inférieures ou égales à 20  $\mu\text{g}$  équiv. MC-LR  $\text{L}^{-1}$ . Cette modification d'activité n'a pas pu être corrélée à une augmentation de l'abondance des microorganismes nitrifiants. D'autre part, les microcystines restant biodisponibles dans le sol sont absorbées par les racines avant d'être transloquées dans les feuilles. Malgré ce transfert dans la plante, les toxines ne perturbent pas la croissance et la physiologie de la plante, à de si faibles concentrations. Cela peut en partie s'expliquer par des concentrations faibles dans les organes. En effet, les dosages des toxines libres révèlent des concentrations comprises entre 8 et 0,55 ng MC-LR  $\text{g}^{-1}$  MS dans les racines et feuilles respectivement. A l'inverse, les toxines n'ont pas été détectées dans les fruits.

Ainsi, ces travaux ont établi pour la première fois que les toxines de type microcystine apportées dans des conditions proches de celles trouvées dans l'environnement pourraient présenter des risques de contamination des sols agricoles et de transfert dans les plantes comestibles. En effet, les toxines apportées au sol persistent plusieurs jours et ne sont pas totalement dégradées. Cette faible dégradation est sûrement liée à leur capacité d'adsorption à des éléments présents dans la phase labile du sol. Les toxines sont alors facilement lessivables lors d'épisodes pluvieux et font craindre des risques de contamination des nappes phréatiques. De plus, dans ces conditions, malgré la forte biodisponibilité et le transfert, la croissance des plantes n'a pas été impactée, n'impliquant pas de risque économique pour des producteurs contraints d'utiliser des eaux contaminées pour l'irrigation. En plus, les toxines n'ont pas été détectées dans les fruits, supposant un risque sanitaire faible. Les toxines se trouvent majoritairement dans les racines où le transfert sol-plante s'effectue ainsi que dans les feuilles où s'effectue l'évapotranspiration. Par contre, très peu de toxines sont retrouvées dans les tiges qui permettent seulement la translocation des toxines vers les organes aériens. Cependant, pour la première fois, des toxines libres et liées ont été détectés dans certains organes de la plante. La présence de toxines liées à des molécules démontre que la plante met

en place des processus de détoxification. Cela signifie aussi qu'il faut développer des méthodes de détection des formes liées des toxines qui, dans des parties comestibles pourraient être dangereuses en cas de consommation d'organes contaminés. Cela est d'autant plus vrai que des plants de tomate arrosés avec des concentrations environnementales ( $100 \mu\text{g équiv. MC-LR L}^{-1}$ ) absorberont des toxines sans que cela perturbe le développement, la croissance ou les paramètres physiologiques.

### **6.3. Perspectives**

A la suite de ces travaux, plusieurs perspectives de recherche émergent et permettraient une meilleure compréhension des résultats déjà observés.

#### **6.3.1. Vérifier le comportement des microcystines dans des sols de propriétés et caractéristiques variées**

##### *a/ Utiliser plusieurs types de sols*

Dans le cadre de nos travaux, nous nous sommes limités à un sol principalement sableux, propice à la culture des tomates cependant de nombreuses questions restent en suspens notamment sur le devenir des microcystines sur d'autres types de sols. Les données de la littérature concernant la plus forte adsorption des microcystines sur les argiles et les matières organiques pourraient être vérifiées en effectuant de nouvelles expérimentation à l'aide de la toxine marquée sur d'autres types de sols (limoneux, argileux). De telles données permettraient aussi de déterminer les risques de contamination du sol profond et de la nappe phréatique sous-jacente selon les sols de surface.

##### *b/ Utiliser des concentrations environnementales de microcystines marquées*

Concernant la biosynthèse de microcystines marquées au carbone 14, les faibles rendements obtenus en utilisant le bicarbonate de sodium nous ont empêchés d'utiliser des concentrations réalistes de toxines (concentration finale de 36 mg MC-LR kg<sup>-1</sup> de sol sec) lors d'expositions chroniques. Ainsi, il serait indispensable de disposer de microcystines à forte activité spécifique en utilisant un autre précurseur que le bicarbonate de sodium ou un autre procédé de synthèse. L'utilisation de concentrations environnementales de toxines marquées serait alors idéale pour observer la véritable réponse des microorganismes du sol notamment en termes de biodégradation.

### **6.3.2. Approfondir nos connaissances sur le devenir des toxines dans le sol**

Les microcystines sont capables d'établir des liaisons avec des éléments du sol présents dans la phase labile tels que les acides humiques. Ainsi il serait intéressant de savoir quels types de liaisons sont mises en place entre les toxines et les constituants du sol, afin de mieux caractériser l'adsorption. Enfin, ces interactions peuvent également interférer avec l'efficacité des procédures analytiques.

### **6.3.3. Contrôler les effets écotoxicologiques des microcystines sur les organismes de plusieurs sols**

En se concentrant sur l'exposition de sols aux caractéristiques physico-chimiques différentes, dans des conditions similaires, nous pourrions vérifier si les réponses des communautés microbiennes sont identiques quel que soit le sol utilisé. C'est en particulier la réponse des communautés nitrifiantes qui pourrait être surveillée étant un indicateur de l'exposition aux microcystines. Il serait alors intéressant d'observer les réponses de certaines communautés telles que les bactéries nitrifiantes, *in vitro* afin de mieux comprendre les réponses observées. En parallèle, des études génétiques des structures microbiennes permettraient de mieux comprendre comment les microcystines modifient les communautés microbiennes des différents sols. Enfin étant donné que les microcystines conservent leurs propriétés toxiques dans le sol, il serait intéressant d'observer les effets des toxines sur d'autres organismes constituant la macrofaune du sol (vers de terre, escargots terrestres). Les réponses enzymatiques et la production d'espèces réactives de l'oxygène pourraient être suivies dans ces organismes, après exposition des sols aux microcystines par irrigation, ainsi que leur transfert.

#### **6.3.4. Approfondir les résultats sur le transfert et l'accumulation des microcystines par diverses plantes**

Ces résultats témoignent d'un transfert et d'une faible accumulation de microcystines dans les plants de tomates lors de l'utilisation de conditions réalistes. Cependant les plants de tomates ne sont pas forcément les plantes les plus sensibles et accumulatrices de microcystines. Ainsi, répéter ces expérimentations avec d'autres espèces permettrait de classer les plantes selon les risques de transfert et d'accumulation. Ainsi il est possible que la salade, dont les feuilles ont une taille importante et représentent la partie comestible de la plante, accumule de grandes quantités de toxines.

#### **6.3.5. Compléter les résultats concernant le stockage des microcystines dans les différents organes de la plante.**

Au travers cette étude, il a été mis en avant le fait que les tomates sont capables de bioaccumuler dans les racines et dans les feuilles les toxines qui leur étaient apportées en excès en condition d'hydroponie. De plus, pour la première fois, il a été démontré qu'une partie des toxines présentes dans les plantes sont capables de se lier à d'autres molécules. Les toxines deviennent difficilement extractibles et détectables avec les extractions traditionnelles à l'aide de solvant. Une autre possibilité consisterait à déterminer la totalité des toxines présentes dans les plants en mettant au point un protocole d'extraction par oxydation sur les différents organes de la plante. Actuellement de tels résultats n'ont pu être obtenus. L'autre possibilité est d'utiliser des toxines radiomarquées ayant des activités spécifiques plus élevées, lors d'une exposition chronique afin de vérifier que dans des conditions environnementales, les toxines sont accumulées et stockées dans les cellules en se liant à d'autres molécules présentes dans la plante.

Enfin, l'étude du devenir des toxines accumulées dans les organes des plantes lors d'une ingestion de ceci serait un point à creuser. Si comme cela est décrit dans la littérature, les microcystines peuvent atteindre les fruits et s'y accumuler en se fixant à d'autres molécules, il

serait intéressant de savoir si ces dernières pourraient présenter un risque lors de l'ingestion de fruits contaminés.

## **Références Bibliographiques**



**A-**

Aas, P., Eriksen, S., Kolderup, J., Lundy, P., Haugen, J.E., Skulberg, O.M., Fonnum, F., 1996. Enhancement of acetylcholine release by homoanatoxin-a from *Oscillatoria formosa*. Environ. Toxicol. Pharmacol. 2, 223–232.

Abe, T., Lawson, T., Weyers, J.D.B., Codd, G.A., 1996. Microcystin-LR inhibits photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* primary leaves: implications for current spray irrigation practice. New Phytol. 133, 651–658.

Aber, J.D., Nadelhoffer, K.J., Steudler, P., Melillo, J.M., 1989. Nitrogen saturation in northern forest ecosystems. BioScience 39, 378–286.

Aboal, M., Puig, M.-A., 2005. Intracellular and dissolved microcystin in reservoirs of the river Segura basin, Murcia, SE Spain. Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology 45, 509–518.

AFNOR. 1986. AFNOR X31- 202. Essai d'inhibition de la croissance des végétaux par une substance. Association Française de Normalisation.

AFNOR. 2012. norme AFNOR X31-233. Détermination des effets des polluants sur la flore du sol - Effets des sols contaminés sur la composition en acides gras foliaires de *Lactuca sativa*.

Akin-Oriola, G.A., Lawton, L.A., 2005. Detection and quantification of toxins in cultures of *Microcystis aeruginosa* (pcc 7820) by hplc and protein phosphatase inhibition assay effect of blending various collectors at bulk. Afr. J. Sci. Technol. 6.

Andersson, H., Lindqvist, E., Olson, L., 1997. Plant-derived amino acids increase hippocampal BDNF, NGF, c-fos and hsp70 mRNAs. Neuroreport 8, 1813.

Aráoz, R., Molgó, J., Tandeau de Marsac, N., 2010. Neurotoxic cyanobacterial toxins. Toxicon 56, 813–828.

Azevedo, C.C., Azevedo, J., Osório, H., Vasconcelos, V., Campos, A., 2014. Early physiological and biochemical responses of rice seedlings to low concentration of microcystin-LR. Ecotoxicol. Lond. Engl. 23, 107–121.

**B-**

Babica, P., Bláha, L., Maršálek, B., 2006. Exploring the natural role of microcystins—a review of effects on photoautotrophic organisms. J. Phycol. 42, 9–20.

Ballot, A., Pflugmacher, S., Wiegand, C., Kotut, K., Krienitz, L., 2003. Cyanobacterial toxins in Lake Baringo, Kenya. Limnol. - Ecol. Manag. Inland Waters 33, 2–9.

Ballot, A., Krienitz, L., Kotut, K., Wiegand, C., Metcalf, J.S., Codd, G.A., Pflugmacher, S., 2004. Cyanobacteria and cyanobacterial toxins in three alkaline Rift Valley lakes of Kenya—Lakes Bogoria, Nakuru and Elmenteita. J. Plankton Res. 26, 925–935.

Ballot, A., Krienitz, L., Kotut, K., Wiegand, C., Pflugmacher, S., 2005. Cyanobacteria and cyanobacterial toxins in the alkaline crater lakes Sonachi and Simbi, Kenya. Harmful Algae 4, 139–150.

Banack, S.A., Cox, P.A., 2003. Biomagnification of cycad neurotoxins in flying foxes Implications for ALS-PDC in Guam. Neurology 61, 387–389.

Banack, S.A., Johnson, H.E., Cheng, R., Cox, P.A., 2007. Production of the neurotoxin BMAA by a marine cyanobacterium. Mar. Drugs 5, 180–196.

- Bártová, K., Hilscherová, K., Babica, P., Maršálek, B., 2010. Extract of *Microcystis* water bloom affects cellular differentiation in filamentous cyanobacterium *Trichormus variabilis* (Nostocales, Cyanobacteria). *J. Appl. Phycol.* 23, 967–973.
- Bateman, K.P., Thibault, P., Douglas, D.J., White, R.L., 1995. Mass spectral analyses of microcystins from toxic cyanobacteria using on-line chromatographic and electrophoretic separations. *J. Chromatogr. A* 712, 253–268.
- Beyer, D., Surányi, G., Vasas, G., Roszik, J., Erdődi, F., others, 2009. Cylindrospermopsin induces alterations of root histology and microtubule organization in common reed (*Phragmites australis*) plantlets cultured in vitro. *Toxicon* 54, 440–449.
- Bibo, L., Yan, G., Bangding, X., Jiantong, L., Yongding, L., 2008. A laboratory study on risk assessment of microcystin-RR in cropland. *J. Environ. Manage.* 86, 566–574.
- Billam, M., Tang, L., Cai, Q., Mukhi, S., Guan, H., Wang, P., Wang, Z., Theodorakis, C.W., Kendall, R.J., Wang, J.-S., 2006. Seasonal variations in the concentration of microcystin-LR in two lakes in western Texas, USA. *Environ. Toxicol. Chem. SETAC* 25, 349–355.
- Botha, N., Gehringer, M.M., Downing, T.G., Venter, M. van de, Shephard, E.G., 2004. The role of microcystin-LR in the induction of apoptosis and oxidative stress in CaCo2 cells. *Toxicon* 43, 85–92.
- Bouaïcha, N., Chézeau, A., Turquet, J., Quod, J.-P., Puiseux-Dao, S., 2001. Morphological and toxicological variability of *Prorocentrum lima* clones isolated from four locations in the south-west Indian Ocean. *Toxicon* 39, 1195–1202.
- Bouaïcha, N., Maatouk, I., 2004. Microcystin-LR and nodularin induce intracellular glutathione alteration, reactive oxygen species production and lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes. *Toxicol. Lett.* 148, 53–63.
- Bourne, D.G., Jones, G.J., Blakeley, R.L., Jones, A., Negri, A.P., Riddles, P., 1996. Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4086–4094.
- Bourne, D.G., Riddles, P., Jones, G.J., Smith, W., Blakeley, R.L., 2001. Characterisation of a gene cluster involved in bacterial degradation of the cyanobacterial toxin microcystin LR. *Environ. Toxicol.* 16, 523–534.
- Boyd, C.E., 1973. Biotic interactions between different species of algae. *Weed Sci.* 32–37.
- Brownell, P.F., Crossland, C.J., 1972. The requirement for sodium as a micronutrient by species having the C4 dicarboxylic photosynthetic pathway. *Plant Physiol.* 49, 794–797.
- Brownson, D.M., Mabry, T.J., Leslie, S.W., 2002. The cycad neurotoxic amino acid, beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA), elevates intracellular calcium levels in dissociated rat brain cells. *J. Ethnopharmacol.* 82, 159–167.
- Bru, D., Martin-Laurent, F., Philippot, L., 2008. Quantification of the detrimental effect of a single primer-template mismatch by Real-Time PCR using the 16S rRNA gene as an example. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1660–1663.
- Bumke-Vogt, C., Mailahn, W., Chorus, I., 1999. Anatoxin-a and neurotoxic cyanobacteria in German lakes and reservoirs. *Environ. Toxicol.* 14, 117–125.
- Buratti, F.M., Scardala, S., Funari, E., Testai, E., 2013. The conjugation of microcystin-RR by human recombinant GSTs and hepatic cytosol. *Toxicol. Lett.* 219, 231–238.

Burns, J.M., Hall, S., Ferry, J.L., 2009. The adsorption of saxitoxin to clays and sediments in fresh and saline waters. *Water Res.* 43, 1899–1904.

## C-

Caraco, N.F., Cole, J.J., 1999. Human impact on nitrate export: an analysis using major world rivers. *Ambio* 28, 167–170.

Carmichael, W.W., Biggs, D.F., Peterson, M.A., 1979. Pharmacology of Anatoxin-a, produced by the freshwater cyanophyte *Anabaena flos-aquae* NRC-44-1. *Toxicon* 17, 229–236.

Carmichael W. W., Mahmood N. A., Hyde E. G., 1990. Natural toxins from cyanobacteria (blue-green algae), in: *Marine Toxins*. American Chemical Society, pp. 87–106.

Carmichael, W.W., Falconer, I.R., 1993. Diseases related to freshwater blue-green algal toxins, and control measures Carmichael, W.W., 1994. The toxins of cyanobacteria. *Sci. Am.* 270, 64–70.

Carmichael, W. W., 1994. The toxins of cyanobacteria. *Sci Am.* 270, 64-70.

Carrasco, D., Moreno, E., Sanchis, D., Wörmer, L., Paniagua, T., Del Cueto, A., Quesada, A., 2006. Cyanobacterial abundance and microcystin occurrence in Mediterranean water reservoirs in Central Spain: microcystins in the Madrid area. *Eur. J. Phycol.* 41, 281–291.

Casanova, M.T., Burch, M.D., Brock, M.A., Bond, P.M., 1999. Does toxic *Microcystis aeruginosa* affect aquatic plant establishment ? *Environ. Toxicol.* 14, 97–109.

Chen, J., Song, L., Dai, J., Gan, N., Liu, Z., 2004. Effects of microcystins on the growth and the activity of superoxide dismutase and peroxidase of rape (*Brassica napus* L.) and rice (*Oryza sativa* L.). *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* 43, 393–400.

Chen, J., Hu, L.B., Zhou, W., Yan, S.H., Yang, J.D., Xue, Y.F., Shi, Z.Q., 2010. Degradation of microcystin-LR and RR by a *Stenotrophomonas* sp. strain EMS isolated from Lake Taihu, China. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 896–911.

Chen, J., Han, F.X., Wang, F., Zhang, H., Shi, Z., 2012. Accumulation and phytotoxicity of microcystin-LR in rice (*Oryza sativa*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 76, 193–199.

Chen, J.Z., Ye, J.Y., Zhang, H.Y., Jiang, X.J., Zhang, Y.X., Liu, Z.L., 2011. Freshwater toxic cyanobacteria induced DNA damage in apple (*Malus pumila*), rape (*Brassica napus*) and rice (*Oryza sativa*). *J. Hazard. Mater.* 190, 240–244.

Chen, W., Li, L., Gan, N., Song, L., 2006a. Optimization of an effective extraction procedure for the analysis of microcystins in soils and lake sediments. *Environ. Pollut.* 143, 241–246.

Chen, W., Song, L., Gan, N., Li, L., 2006b. Sorption, degradation and mobility of microcystins in Chinese agriculture soils: risk assessment for groundwater protection. *Environ. Pollut.* 144, 752–758.

Chen, W., Song, L., Peng, L., Wan, N., Zhang, X., Gan, N., 2008. Reduction in microcystin concentrations in large and shallow lakes: Water and sediment-interface contributions. *Water Res.* 42, 763–773.

Chen, X., Yang, X., Yang, L., Xiao, B., Wu, X., Wang, J., Wan, H., 2010. An effective pathway for the removal of microcystin LR via anoxic biodegradation in lake sediments. *Water Res.* 44, 1884–1892.

- Chiswell, R.K., Shaw, G.R., Eaglesham, G., Smith, M.J., Norris, R.L., Seawright, A.A., Moore, M.R., 1999. Stability of cylindrospermopsin, the toxin from the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*: Effect of pH, temperature, and sunlight on decomposition. *Environ. Toxicol.* 14, 155–161.
- Chorus, I., Bartram, J., 1999. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. 416 pp.
- Christoffersen, K., 1996. Ecological implications of cyanobacterial toxins in aquatic food webs. *Phycologia* 35, 42–50.
- Christoffersen, K., Lyck, S., Winding, A., 2002. Microbial activity and bacterial community structure during degradation of microcystins. *Aquat. Microb. Ecol.* 27, 125–136.
- Codd, G.A., Bell, S.G., Brooks, W.P., 1989. Cyanobacterial toxins in water. *Water Sci. Technol.* 21, 1–13.
- Codd, G.A., Metcalf, J.S., Beattie, K.A., 1999. Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystin by salad lettuce (*Lactuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacteria. *Toxicon* 37, 1181–1185.
- Codd, G.A., Lindsay, J., Young, F.M., Morrison, L.F., Metcalf, J.S., 2005. Harmful Cyanobacteria, in: Huisman, J., Matthijs, H.C.P., Visser, P.M. (Eds.), *Harmful Cyanobacteria*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, pp. 1–23.
- Connor, J.A., Bowers, R.L., Nevin, J.P., Fisher, R.T., 1998. Guidance manual for RBCA tool kit for chemical releases. *Groundw. Serv.*
- Conti, A.L.R., Guerrero, J.M., Regueira, J.M., 2005. Levels of microcystins in two Argentinean reservoirs used for water supply and recreation: differences in the implementation of safe levels. *Environ. Toxicol.* 20, 263–269.
- Cook, C.M., Vardaka, E., Lanaras, T., 2004. Toxic cyanobacteria in Greek freshwaters, 1987–2000: Occurrence, toxicity, and impacts in the Mediterranean region. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 32, 107–124.
- Corbel, S., Mouglin, C., Bouaïcha, N., 2014. Cyanobacterial toxins: Modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops. *Chemosphere* 96, 1–15.
- Costa, I. a. S., Azevedo, S.M.F.O., Senna, P. a. C., Bernardo, R.R., Costa, S.M., Chellappa, N.T., 2006. Occurrence of toxin-producing cyanobacteria blooms in a Brazilian semiarid reservoir. *Braz. J. Biol.* 66, 211–219.
- Cousins, I.T., Bealing, D.J., James, H.A., Sutton, A., 1996. Biodegradation of microcystin-LR by indigenous mixed bacterial populations. *Water Res.* 30, 481–485.
- Cox, P.A., Banack, S.A., Murch, S.J., 2003. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 13380.
- Cox, P.A., Banack, S.A., Murch, S.J., Rasmussen, U., Tien, G., Bidigare, R.R., Metcalf, J.S., Morrison, L.F., Codd, G.A., Bergman, B., 2005. Diverse taxa of cyanobacteria produce  $\beta$ -N-methylamino-l-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 5074–5078.
- Craig, M., Luu, H.A., McCready, T.L., Williams, D., Andersen, R.J., Holmes, C.F., 1996. Molecular mechanisms underlying the interaction of motuporin and microcystins with type-1 and type-2A protein phosphatases. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* 74, 569–578.

Crush, J.R., Briggs, L.R., Sprosen, J.M., Nichols, S.N., 2008. Effect of irrigation with lake water containing microcystins on microcystin content and growth of ryegrass, clover, rape, and lettuce. *Environ. Toxicol.* 23, 246–252.

## D-

De Silva, E.D., Williams, D.E., Andersen, R.J., Klix, H., Holmes, C.F.B., Allen, T.M., 1992. Motuporin, a potent protein phosphatase inhibitor isolated from the Papua New Guinea sponge *Theonella swinhoei* gray. *Tetrahedron Lett.* 33, 1561–1564.

Del Campo, F.F., Ouahid, Y., 2010. Identification of microcystins from three collection strains of *Microcystis aeruginosa*. *Environ. Pollut.* 158, 2906–2914.

De Maagd, P.G.-J., Hendriks, A.J., Seinen, W., Sijm, D.T.H.M., 1999. pH-Dependent hydrophobicity of the cyanobacteria toxin microcystin-LR. *Water Res.* 33, 677–680.

Diehnelt, C.W., Peterman, S.M., Budde, W.L., 2005. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry and accurate *m/z* measurements of cyclic peptide cyanobacteria toxins. *TrAC Trends Anal. Chem.* 24, 622–634.

Diehnelt, C.W., Dugan, N.R., Peterman, S.M., Budde, W.L., 2006. Identification of microcystin toxins from a strain of *Microcystis aeruginosa* by liquid chromatography introduction into a hybrid linear ion Trap-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer. *Anal. Chem.* 78, 501–512.

## E-

Edwards, C., Graham, D., Fowler, N., Lawton, L.A., 2008. Biodegradation of microcystins and nodularin in freshwaters. *Chemosphere* 73, 1315–1321.

Eiler, A., Bertilsson, S., 2007. Flavobacteria blooms in four eutrophic lakes: Linking population dynamics of freshwater bacterioplankton to resource availability. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3511–3518.

El Ghazali, I., Saqrane, S., Saker, M., Youness, O., Oudra, B., Vasconcelos, V., Del Campo, F.F., 2011. Caractérisation biochimique et moléculaire d'efflorescences à cyanobactéries toxiques dans le réservoir Lalla Takerkoust (Maroc). *Rev. Sci. Eau* 24, 117.

El Herry, S., Fathalli, A., Rejeb, A.J.-B., Bouaïcha, N., 2008. Seasonal occurrence and toxicity of *Microcystis* spp. and *Oscillatoria tenuis* in the Lebna Dam, Tunisia. *Water Res.* 42, 1263–1273.

El Khalloufi, F., Oufdou, K., Lahrouni, M., El Ghazali, I., Saqrane, S., Vasconcelos, V., Oudra, B., 2011. Allelopathic effects of cyanobacteria extracts containing microcystins on *Medicago sativa*-*Rhizobia* symbiosis. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 431–438.

El Khalloufi, F., El Ghazali, I., Saqrane, S., Oufdou, K., Vasconcelos, V., Oudra, B., 2012. Phytotoxic effects of a natural bloom extract containing microcystins on *Lycopersicon esculentum*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 79, 199–205.

Esterhuizen-Londt, Pflugmacher, S., Downing, T.G., 2011. The effect of  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine (BMAA) on oxidative stress response enzymes of the macrophyte *Ceratophyllum demersum*. *Toxicol. Off. J. Int. Soc. Toxinology* 57, 803–810.

Ettoumi, A., El Khalloufi, F., El Ghazali, I., Oudra, B., Amrani, A., Nasri, H., Bouaïcha, N., 2011. Bioaccumulation of cyanobacterial toxins in aquatic organisms and its consequences for public health. In: Kattel, G. (Ed), *Zooplankton and Phytoplankton: Types, Characteristics and Ecology*. Nova Science Publishers Inc., New York, pp. 1–34.

Everson, S., Fabbro, L., Kinnear, S., Wright, P., 2011. Extreme differences in akinete, heterocyte and cylindrospermopsin concentrations with depth in a successive bloom involving *Aphanizomenon ovalisporum* (Forti) and *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju. *Harmful Algae* 10, 265–276.

Eynard, F., Mez, K., Walther, J.-L., 2000. Risk of cyanobacterial toxins in Riga waters (Latvia). *Water Res.* 34, 2979–2988.

## F-

Falconer, Beresford, Runnegar, 1983. Evidence of liver damage by toxin from a bloom of the blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*. *Med. J. Aust.* 1, 511.

Falconer, I.R., 1991. Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 6, 177–184.

Falconer, I.R., Humpage, A.R., 2006. Cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water supplies: Cylindrospermopsins. *Environ. Toxicol.* 21, 299–304.

Fastner, J., Neumann, U., Wirsing, B., Weckesser, J., Wiedner, C., Nixdorf, B., Chorus, I., 1999. Microcystins (hepatotoxic heptapeptides) in german fresh water bodies. *Environ. Toxicol.* 14, 13–22.

Feller, C.H., Bleiholder, L., Buhr, H., Hack, M., Hess, R., Klose, U., Meier, R., Stauss, T., van den Boom, E., Weber, 1995. Phänologische Entwicklungsstadien von Gemüsepflanzen: II. Fruchtgemüse und Hülsenfrüchte. *Pflanzenschutzd* 47, 217–232.

Ferranti, P., Fabbrocino, S., Nasi, A., Caira, S., Bruno, M., Serpe, L., Gallo, P., 2009. Liquid chromatography coupled to quadruple time-of-flight tandem mass spectrometry for microcystin analysis in freshwaters: method performances and characterisation of a novel variant of microcystin-RR. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23, 1328–1336.

Ficke, A.D., Myrick, C.A., Hansen, L.J., 2007. Potential impacts of global climate change on freshwater fisheries. *Rev. Fish Biol. Fish.* 17, 581–613.

Fischer, W.J., Alheimer, S., Cattori, V., Meier, P.J., Dietrich, D.R., Hagenbuch, B., 2005. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203, 257–263.

Fromme, H., Köhler, A., Krause, R., Führling, D., 2000. Occurrence of cyanobacterial toxins—microcystins and anatoxin-a—in Berlin water bodies with implications to human health and regulations. *Environ. Toxicol.* 15, 120–130.

Froschio, S.M., Humpage, A.R., Burcham, P.C., Falconer, I.R., 2001. Cell-free protein synthesis inhibition assay for the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin. *Environ. Toxicol.* 16, 408–412.

Froschio, S.M., Humpage, A.R., Burcham, P.C., Falconer, I.R., 2003. Cylindrospermopsin-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. *Environ. Toxicol.* 18, 243–251.

Froschio, S.M., Humpage, A., Wickramasinghe, W., Shaw, G., Falconer, I.R., 2008. Interaction of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin with the eukaryotic protein synthesis system. *Toxicon* 51, 191–198.

Furey, A., Crowley, J., Lehane, M., James, K.J., 2003a. Liquid chromatography with electrospray ion-trap mass spectrometry for the determination of anatoxins in cyanobacteria and drinking water. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17, 583–588.

Furey, A., Crowley, J., Shuilleabhain, A.N., Skulberg, O.M., James, K.J., 2003b. The first identification of the rare cyanobacterial toxin, homoanatoxin-a, in Ireland. *Toxicon* 41, 297–303.

## G-

Gagała, I., Izydorczyk, K., Skowron, A., Kamecka-Plaskota, D., Stefaniak, K., Kokociński, M., Mankiewicz-Boczek, J., 2010. Appearance of toxigenic cyanobacteria in two Polish lakes dominated by *Microcystis aeruginosa* and *Planktothrix agardhii* and environmental factors influence. *Ecohydrol. Hydrobiol.* 10, 25–34.

Galloway, J.N., Townsend, A.R., Erisman, J.W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J.R., Martinelli, L.A., Seitzinger, S.P., Sutton, M.A., 2008. Transformation of the Nitrogen Cycle: Recent Trends, Questions, and Potential Solutions. *Science* 320, 889–892.

Gehring, M.M., Kewada, V., Coates, N., Downing, T.G., 2003. The use of *Lepidium sativum* in a plant bioassay system for the detection of microcystin-LR. *Toxicon* 41, 871–876.

Geider, R.J., Osborne, B.A., 1992. Algal photosynthesis. the measurement of algal gas exchange (*Current phycology* 2).

Giannuzzi, L., Sedan, D., Echenique, R., Andrinolo, D., 2011. An acute case of intoxication with cyanobacteria and cyanotoxins in recreational water in Salto Grande Dam, Argentina. *Mar. Drugs* 9, 2164–2175.

Giaramida, L., Manage, P.M., Edwards, C., Singh, B.K., Lawton, L.A., 2013. Bacterial communities' response to microcystins exposure and nutrient availability: Linking degradation capacity to community structure. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 84, 111–117.

Gorham, Pr., Carmichael, W.W., 1988. Hazards of freshwater blue-green algae (Cyanobacteria). *Algae Hum. Aff. Camb. Univ. Press N. Y.* 1988, P 403-431.

Grützmacher, G., Böttcher, G., Chorus, I., Bartel, H., 2002. Removal of microcystins by slow sand filtration. *Environ. Toxicol.* 17, 386–394.

Grützmacher, G., Wessel, G., Klitzke, S., Chorus, I., 2009. Microcystin elimination during sediment contact. *Environ. Sci. Technol.* 44, 657–662.

Guedard, M.L., Schraauwers, B., Larrieu, I., Bessoule, J.-J., 2008. Development of a biomarker for metal bioavailability: The lettuce fatty acid composition. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1147–1151.

Gugger, M., Lenoir, S., Berger, C., Ledreux, A., Druart, J.-C., Humbert, J.-F., Guette, C., Bernard, C., 2005. First report in a river in France of the benthic cyanobacterium *Phormidium favosum* producing anatoxin-a associated with dog neurotoxicosis. *Toxicon* 45, 919–928.

Gupta, N., Bhaskar, A.S.B., Dangi, R.S., Prasad, G.B.K.S., Rao, P.V.L., 2001. Toxin production in batch cultures of freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 67, 0339–0346.

Gurbuz, F., Metcalf, J.S., Karahan, A.G., Codd, G.A., 2009. Analysis of dissolved microcystins in surface water samples from Kovada Lake, Turkey. *Sci. Total Environ.* 407, 4038–4046.

Gutiérrez-Praena, D., Campos, A., Azevedo, J., Neves, J., Freitas, M., Guzmán-Guillén, R., Cameán, A.M., Renaut, J., Vasconcelos, V., 2014. Exposure of *Lycopersicon Esculentum* to microcystin-LR: Effects in the leaf proteome and toxin translocation from water to leaves and fruits. *Toxins* 6, 1837–1854.

**H-**

- Ha, M.-H., Pflugmacher, S., 2013. Time-dependent alterations in growth, photosynthetic pigments and enzymatic defense systems of submerged *Ceratophyllum demersum* during exposure to the cyanobacterial neurotoxin anatoxin-a. *Aquat. Toxicol.* 138–139, 26–34.
- Harada, K., Tsuji, K., Watanabe, M.F., Kondo, F., 1996. Stability of microcystins from cyanobacteria—III.\* Effect of pH and temperature. *Phycologia* 35, 83–88.
- Harada, K., Imanishi, S., Kato, H., Mizuno, M., Ito, E., Tsuji, K., 2004. Isolation of Adda from microcystin-LR by microbial degradation. *Toxicon* 44, 107–109.
- Harper, D., 1992. Prediction and modelling of the causes and effects of eutrophication, in: *Eutrophication of Freshwaters*. Springer Netherlands, pp. 167–214.
- Hastie, C.J., Borthwick, E.B., Morrison, L.F., Codd, G.A., Cohen, P.T.W., 2005. Inhibition of several protein phosphatases by a non-covalently interacting microcystin and a novel cyanobacterial peptide, nostocyclin. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1726, 187–193.
- Hawkins, P.R., Runnegar, M.T., Jackson, A.R., Falconer, I.R., 1985. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. *Appl Env. Microbiol* 50, 1292–1295.
- Haynes, D., Ralph, P., Prange, J., Dennison, B., 2000. The Impact of the herbicide diuron on photosynthesis in three species of tropical seagrass. *Mar. Pollut. Bull., Sources, Fates and Consequences of Pollutants in the Great Barrier Reef* 41, 288–293.
- Henderson, R., Ritchie, J.M., Strichartz, G.R., 1973. The binding of labelled saxitoxin to the sodium channels in nerve membranes. *J. Physiol.* 235, 783–804.
- Henriksen, P., 1996. Microcystin profiles and contents in Danish populations of cyanobacteria/blue-green algae as determined by HPLC. *Phycologia* 35, 102–110.
- Heresztyn, T., Nicholson, B.C., 1997. Nodularin concentrations in Lakes Alexandrina and Albert, South Australia, during a bloom of the cyanobacterium (blue-green alga) *Nodularia spumigena* and degradation of the toxin. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 12, 273–282.
- Hille, B., 1992. *Ionic channels of excitable membranes*, 2nd Ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates. ed.
- Hirooka, E.Y., Pinotti, M.H., Tsutsumi, T., Yoshida, F., Ueno, Y., 1999. Survey of microcystins in water between 1995 and 1996 in Paraná, Brazil using ELISA. *Nat. Toxins* 7, 103–109.
- Hitzfeld, B.C., Höger, S.J., Dietrich, D.R., 2000. Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment, and human risk assessment. *Environ. Health Perspect.* 108, 113–122.
- Ho, L., Hoefel, D., Bock, F., Saint, C.P., Newcombe, G., 2007. Biodegradation rates of 2-methylisoborneol (MIB) and geosmin through sand filters and in bioreactors. *Chemosphere* 66, 2210–2218.
- Ho, L., Tang, T., Monis, P.T., Hoefel, D., 2012. Biodegradation of multiple cyanobacterial metabolites in drinking water supplies. *Chemosphere* 87, 1149–1154.

Hoefel, D., Adriansen, C.M.M., Bouyssou, M.A.C., Saint, C.P., Newcombe, G., Ho, L., 2009. Development of an *mlrA* gene-directed TaqMan PCR assay for quantitative assessment of microcystin-degrading bacteria within water treatment plant sand filter biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5167–5169.

Holst, T., Jørgensen, N.O., Jørgensen, C., Johansen, A., 2003. Degradation of microcystin in sediments at oxic and anoxic, denitrifying conditions. *Water Res.* 37, 4748–4760.

Honkanen, R.E., Caplan, F.R., Baker, K.K., Baldwin, C.L., Bobzin, S.C., Bolis, C.M., Cabrera, G.M., Johnson, L.A., Jung, J.H., Larsen, L.K., Levine, I.A., Moore, R.E., Nelson, C.S., Patterson, G.M.L., Tschappat, K.D., Tuang, G.D., Boynton, A.L., Arment, A.R., An, J., Carmichael, W.W., Rodland, K.D., Magun, B.E., Lewin, R.A., 1995. Protein phosphatase inhibitory activity in extracts of cultured blue-green algae (*cyanophyta*). *J. Phycol.* 31, 478–486.

Horie, T., Schroeder, J.I., 2004. Sodium transporters in plants. Diverse genes and physiological functions. *Plant Physiol.* 136, 2457.

Howarth, R.W., Billen, G., Swaney, D., Townsend, A., Jaworski, N., Lajtha, K., Downing, J.A., Elmgren, R., Caraco, N., Jordan, T., Berendse, F., Freney, J., Kudryarov, V., Murdoch, P., Zhao-Liang, Z., 1996. Regional nitrogen budgets and riverine N & P fluxes for the drainages to the North Atlantic Ocean: Natural and human influences, in: Howarth, R.W. (Ed.), *Nitrogen Cycling in the North Atlantic Ocean and Its Watersheds*. Springer Netherlands, pp. 75–139.

Hu, L., Zhang, F., Liu, C., Wang, M., 2012. Biodegradation of Microcystins by *Bacillus* sp. strain EMB. *Energy Procedia* 16, Part C, 2054–2059.

Hu, Z., Liu, Y., Li, D., Dauta, A., 2005. Growth and antioxidant system of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* in response to microcystin-RR. *Hydrobiologia* 534, 23–29.

Huang, W., Xing, W., Li, D., Liu, Y., 2009. Morphological and ultrastructural changes in tobacco BY-2 cells exposed to microcystin-RR. *Chemosphere* 76, 1006–1012.

Humpage, A., Rositano, J., Bretag, A., Brown, R., Baker, P., Nicholson, B., Steffensen, D., 1994. Paralytic shellfish poisons from Australian cyanobacterial blooms. *Mar Freshw. Res* 45, 761–771.

Hyenstrand, P., Rohrlack, T., Beattie, K.A., Metcalf, J.S., Codd, G.A., Christoffersen, K., 2003. Laboratory studies of dissolved radiolabelled microcystin-LR in lake water. *Water Res.* 37, 3299–3306.

## I-

Ibelings, B.W., Chorus, I., 2007. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater “seafood” and its consequences for public health: A review. *Environ. Pollut.* 150, 177–192.

Ikawa, M., Sasner, J.J., Haney, J.F., 2001. Activity of cyanobacterial and algal odor compounds found in lake waters on green alga *Chlorella pyrenoidosa* growth. *Hydrobiologia* 443, 19–22.

Imanishi, S., Kato, H., Mizuno, M., Tsuji, K., Harada, K., 2005. Bacterial degradation of microcystins and nodularin. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 591–598.

Ishii, H., Nishijima, M., Abe, T., 2004. Characterization of degradation process of cyanobacterial hepatotoxins by a gram-negative aerobic *bacterium*. *Water Res.* 38, 2667–2676.

ISO, N., 2007. 11348-3, 1999, Qualité de l'eau-Détermination de l'effet inhibiteur d'échantillons d'eau sur la luminescence de *Vibrio fischeri* (Essai de bactéries luminescentes)-Partie 3: Méthode utilisant des bactéries lyophilisées. AFNOR 21p.

IUSS Working Group WRB 2006. World reference base for soil resources. 2nd Edition. World Soil Resources Reports, N° 103. FAO, Rome, 128 p.

## J-

Jablonski, E.M., Adrian Mattocks, M., Sokolov, E., Koniaris, L.G., Hughes Jr., F.M., Fausto, N., Pierce, R.H., McKillop, I.H., 2007. Decreased aquaporin expression leads to increased resistance to apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 250, 36–46.

Jámbrik, K., Máthé, C., Vasas, G., Beyer, D., Molnár, E., Borbély, G., M-Hamvas, M., 2011. Microcystin-LR induces chromatin alterations and modulates neutral single-strand-prefering nuclease activity in *Phragmites australis*. *J. Plant Physiol.* 168, 678–686.

James, H., Fawell, J.K., 1991. Detection and removal of cyanobacterial toxins from freshwaters. Foundation for Water Research.

James, K.J., Sherlock, I.R., Stack, M.A., 1997. Anatoxin-a in Irish freshwater and cyanobacteria, determined using a new fluorimetric liquid chromatographic method. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* 35, 963–971.

Jančula, D., Maršálek, B., 2011. Critical review of actually available chemical compounds for prevention and management of cyanobacterial blooms. *Chemosphere* 85, 1415–1422.

Jang, M.-H., Ha, K., Takamura, N., 2007. Reciprocal allelopathic responses between toxic cyanobacteria (*Microcystis aeruginosa*) and duckweed (*Lemna japonica*). *Toxicon* 49, 727–733.

Jann, K., Jann, B., 1984. Structure and biosynthesis of O-antigens. *Handb. Endotoxin* 1, 138–186.

Järvenpää, S., Lundberg-Niinistö, C., Spoof, L., Sjövall, O., Tyystjärvi, E., Meriluoto, J., 2007. Effects of microcystins on broccoli and mustard, and analysis of accumulated toxin by liquid chromatography-mass spectrometry. *Toxicon* 49, 865–874.

Jasinski, S.M., 2012. Phosphate rock. US Geological Survey (Ed.) Mineral commodity summaries, USGS (2012), 118–119.

Johnstone, J., 1908. Conditions of life in the sea: a short account of quantitative marine biological research. University press.

Jones, G.J., Bourne, D.G., Blakeley, R.L., Doelle, H., 1994. Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by aquatic bacteria. *Nat. Toxins* 2, 228–235.

Jones, G.J., Orr, P.T., 1994. Release and degradation of microcystin following algicide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay. *Water Res.* 28, 871–876.

Jones, G.J., Falconer, I.R., Wilkins, R.M., 1995. Persistence of cyclic peptide toxins in dried *Microcystis aeruginosa* crusts from lake Mokoan, Australia. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 10, 19–24.

Jungmann, D., Ludwichowski, K.-U., Faltin, V., Benndorf, J., 1996. A field study to investigate environmental factors that could effect microcystin synthesis of a *Microcystis* population in the Bautzen reservoir. *Int. Rev. Gesamten Hydrobiol. Hydrogr.* 81, 493–501.

**K-**

- Kaas, H., Henriksen, P., 2000. Saxitoxins (PSP toxins) in Danish lakes. *Water Res.* 34, 2089–2097.
- Kaebnick, M., Neilan, B.A., 2001. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35, 1–9.
- Kao, C.Y., Suzuki, T., Kleinhaus, A.L., Siegman, M.J., 1967. Vasomotor and respiratory depressant actions of tetrodotoxin and saxitoxin. *Arch. Int. Pharmacodyn. Thérapie* 165, 438–450.
- Kardinaal, W.E.A., Janse, I., Kamst-Van Agterveld, M., Meima, M., Snoek, J., Mur, L.R., Huisman, J., Zwart, G., Visser, P.M., 2007. *Microcystis* genotype succession in relation to microcystin concentrations in freshwater lakes. *Aquat. Microb. Ecol.* 48, 1–12.
- Kaya, K., 1996. Toxicology of microcystins. *Toxic Microcystis* 175–202.
- Kayal, N., Newcombe, G., Ho, L., 2008. Investigating the fate of saxitoxins in biologically active water treatment plant filters. *Environ. Toxicol.* 23, 751–755.
- Kearns, K.D., Hunter, M.D., 2001. Toxin-producing *Anabaena flos-aquae* induces settling of *Chlamydomonas reinhardtii*, a competing motile alga. *Microb. Ecol.* 42, 80–86.
- Keijola, A.M., Himberg, K., Esala, A.L., Sivonen, K., Hiis-Virta, L., 1988. Removal of cyanobacterial toxins in water treatment processes: Laboratory and pilot-scale experiments. *Toxic. Assess.* 3, 643–656.
- Kenefick, S.L., Hruday, S.E., Peterson, H.G., Prepas, E.E., 1993. Toxin release from *Microcystis aeruginosa* after chemical treatment. *Water Sci. Technol.* 27, 433–440.
- Kinnear, S., 2010. Cylindrospermopsin: A decade of progress on bioaccumulation research. *Mar. Drugs* 8, 542–564.
- Kirpenko, N., 1986. Phytophatic properties of blue-green algae toxin. *Hydrobiol. J.* 22, 44–47.
- Kittler, K., Schreiner, M., Krumbein, A., Manzei, S., Koch, M., Rohn, S., Maul, R., 2012. Uptake of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in *Brassica* vegetables. *Food Chem.* 133, 875–879.
- Kiviranta, J., Sivonen, K., Niemelä, S.I., Huovinen, K., 1991. Detection of toxicity of cyanobacteria by *Artemia salina* bioassay. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 6, 423–436.
- Klitzke, S., Apelt, S., Weiler, C., Fastner, J., Chorus, I., 2010. Retention and degradation of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in sediments – The role of sediment preconditioning and DOM composition. *Toxicon* 55, 999–1007.
- Klitzke, S., Beusch, C., Fastner, J., 2011. Sorption of the cyanobacterial toxins cylindrospermopsin and anatoxin-a to sediments. *Water Res.* 45, 1338–1346.
- Kos, P., Gorzo, G., Suranyi, G., Borbely, G., 1995. Simple and efficient method for isolation and measurement of cyanobacterial hepatotoxins by plant tests (*Sinapis alba* L.). *Anal. Biochem.* 225, 49–53.
- Krienitz, L., Ballot, A., Kotut, K., Wiegand, C., Pütz, S., Metcalf, J.S., Codd, G.A., Pflugmacher, S., 2003. Contribution of hot spring cyanobacteria to the mysterious deaths of Lesser Flamingos at Lake Bogoria, Kenya. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43, 141–148.

Krienitz, L., Dadheech, P.K., Fastner, J., Kotut, K., 2013. The rise of potentially toxin producing cyanobacteria in Lake Naivasha, Great African Rift Valley, Kenya. *Harmful Algae* 27, 42–51.

Kuiper-Goodman, T., Falconer, I., Fitzgerald, J., 1999. Cyanobacterial toxins. *Toxic Cyanobacteria Water E FN Spon Lond.* 113–153.

Kurki-Helasmo, K., Meriluoto, J., 1998. Microcystin uptake inhibits growth and protein phosphatase activity in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. *Toxicon* 36, 1921–1926.

## L-

Lahti, K., Kilponen, J., Kivimaeki, A., 1996. Removal of cyanobacteria and their hepatotoxins from raw water in soil and sediment columns. pp. 187–195.

Lahti, K., Rapala, J., Färdig, M., Niemelä, M., Sivonen, K., 1997. Persistence of cyanobacterial hepatotoxin, microcystin-LR in particulate material and dissolved in lake water. *Water Res.* 31, 1005–1012.

Lam, A.K.-Y., Fedorak, P.M., Prepas, E.E., 1995. Biotransformation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR, as determined by HPLC and protein phosphatase bioassay. *Environ. Sci. Technol.* 29, 242–246.

Lambert, G., Lambert, C.C., Waaland, J.R., 1996. Algal symbionts in the tunics of six New Zealand Ascidiaceans (Chordata, Ascidiacea). *Invertebr. Biol.* 115, 67–78.

Lawton, L.A., Edwards, C., Beattie, K.A., Pleasance, S., Dear, G.J., Codd, G.A., 1995. Isolation and characterization of microcystins from laboratory cultures and environmental samples of *Microcystis aeruginosa* and from an associated animal toxicosis. *Nat. Toxins* 3, 50–57.

Ledreux, A., Thomazeau, S., Catherine, A., Duval, C., Yéprémian, C., Marie, A., Bernard, C., 2010. Evidence for saxitoxins production by the cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* in a French recreational water body. *Harmful Algae* 10, 88–97.

Lefevre, M., Jakob, H., Nisbet, M., 1950. Sur la sécrétion, par certaines Cyanophytes, de substances algostatiques dans les collections d'eau naturelles. *CR Acad Sci* 230, 2226–2227.

Leflaive, J., Ten-Hage, L., 2007. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. *Freshw. Biol.* 52, 199–214.

Lehman, P.W., Boyer, G., Satchwell, M., Waller, S., 2007. The influence of environmental conditions on the seasonal variation of *Microcystis* cell density and microcystins concentration in San Francisco Estuary. *Hydrobiologia* 600, 187–204.

Lehtimäki, J., Moisander, P., Sivonen, K., Kononen, K., 1997. Growth, nitrogen fixation, and nodularin production by two baltic sea cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1647–1656.

Lemes, G.A.F., Kersanach, R., da S. Pinto, L., Dellagostin, O.A., Yunes, J.S., Matthiensen, A., 2008. Biodegradation of microcystins by aquatic *Burkholderia* sp. from a South Brazilian coastal lagoon. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 69, 358–365.

Li, R., Carmichael, W.W., Brittain, S., Eaglesham, G.K., Shaw, G.R., Liu, Y., Watanabe, M.M., 2001. First report of the cyanotoxins cylindrospermopsins and deoxycylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata* (cyanobacteria). *J. Phycol.* 37, 1121–1126.

Lilleheil, G., Andersen, R.A., Skulberg, O.M., Alexander, J., 1997. Effects of a homoanatoxin-a-containing extract from *Oscillatoria formosa* (cyanophyceae/cyanobacteria) on neuromuscular transmission. *Toxicon* 35, 1275–1289.

Lindholm, T., Meriluoto, J.A.O., 1991. Recurrent depth maxima of the hepatotoxic cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48, 1629–1634.

Liu, Y., Chen, W., Li, D., Huang, Z., Shen, Y., Liu, Y., 2011. Cyanobacteria-/cyanotoxin-contaminations and eutrophication status before Wuxi drinking water crisis in Lake Taihu, China. *J. Environ. Sci. China* 23, 575–581.

## M-

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 Lett.* 264, 187–192.

Mahmood, N.A., Carmichael, W.W., 1986. The pharmacology of anatoxin-a(s), a neurotoxin produced by the freshwater cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* 24, 425–434.

Mahmood, N.A., Carmichael, W.W., 1987. Anatoxin-a(s), an anticholinesterase from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC-525-17. *Toxicon* 25, 1221–1227.

Manage, P.M., Edwards, C., Singh, B.K., Lawton, L.A., 2009. Isolation and identification of novel microcystin-degrading bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6924–6928.

Maruyama, T., Park, H.-D., Ozawa, K., Tanaka, Y., Sumino, T., Hamana, K., Hiraishi, A., Kato, K., 2006. *Sphingosinicella microcystinivorans* gen. nov., sp. nov., a microcystin-degrading bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 85–89.

Máthé, C., Beyer, D., Erdődi, F., Serfőző, Z., Székvölgyi, L., Vasas, G., M-Hamvas, M., Jámbrik, K., Gonda, S., Kiss, A., Szigeti, Z.M., Surányi, G., 2009. Microcystin-LR induces abnormal root development by altering microtubule organization in tissue-cultured common reed (*Phragmites australis*) plantlets. *Aquat. Toxicol.* 92, 122–130.

Matsunaga, S., Moore, R.E., Niemczura, W.P., Carmichael, W.W., 1989. Anatoxin-a (s), a potent anticholinesterase from *Anabaena flos-aquae*. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 8021–8023.

Maxwell, K., Johnson, G.N., 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51, 659–668.

Mayer, H., Weckesser, J., 1984. Unusual lipid A's: structures, taxonomical relevance and potential value for endotoxin research. *Handb. Endotoxin* 1, 221–247.

Mazur-Marzec, H., Meriluoto, J., Pliński, M., 2006. The degradation of the cyanobacterial hepatotoxin nodularin (NOD) by UV radiation. *Chemosphere* 65, 1388–1395.

Mazur-Marzec, H., Toruńska, A., Błońska, M.J., Moskot, M., Pliński, M., Jakóbkiewicz-Banecka, J., Węgrzyn, G., 2009. Biodegradation of nodularin and effects of the toxin on bacterial isolates from the Gulf of Gdańsk. *Water Res.* 43, 2801–2810.

McElhiney, J., Lawton, L.A., Leifert, C., 2001. Investigations into the inhibitory effects of microcystins on plant growth, and the toxicity of plant tissues following exposure. *Toxicon* 39, 1411–1420.

McGregor, G.B., Fabbro, L.D., 2000. Dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanoprokaryota) in Queensland tropical and subtropical reservoirs: Implications for monitoring and management. *Lakes Reserv. Res. Manag.* 5, 195–205.

- Merel, S., Clément, M., Thomas, O., 2010. State of the art on cyanotoxins in water and their behaviour towards chlorine. *Toxicon* 55, 677–691.
- Messineo, V., Bogialli, S., Melchiorre, S., Sechi, N., Lugliè, A., Casiddu, P., Mariani, M.A., Padedda, B.M., Corcia, A.D., Mazza, R., Carloni, E., Bruno, M., 2009. Cyanobacterial toxins in Italian freshwaters. *Limnol. - Ecol. Manag. Inland Waters* 39, 95–106.
- Metcalf, J.S., Barakate, A., Codd, G.A., 2004. Inhibition of plant protein synthesis by the cyanobacterial hepatotoxin, cylindrospermopsin. *FEMS Microbiol. Lett.* 235, 125–129.
- Metcalf, J.S., Richer, R., Cox, P.A., Codd, G.A., 2012. Cyanotoxins in desert environments may present a risk to human health. *Sci. Total Environ.* 421–422, 118–123.
- Miles, C.O., Sandvik, M., Nonga, H.E., Rundberget, T., Wilkins, A.L., Rise, F., Ballot, A., 2012. Thiol Derivatization for LC-MS Identification of Microcystins in Complex Matrices. *Environ. Sci. Technol.* 46, 8937–8944.
- Miller, M.A., Critchley, M., Hutson, J., Fallowfield, H., 2001. The adsorption of cyanobacterial hepatotoxins from water onto soil during batch experiments. *Water Res.* 35, 1461–1468.
- Miller, M.A., Kudela, R.M., Mekebri, A., Crane, D., Oates, S.C., Tinker, M.T., Staedler, M., Miller, W.A., Toy-Choutka, S., Dominik, C., Hardin, D., Langlois, G., Murray, M., Ward, K., Jessup, D.A., 2010. Evidence for a novel marine harmful algal bloom: Cyanotoxin (Microcystin) transfer from land to sea otters. *PLoS ONE* 5, e12576.
- Miller, M.J., Fallowfield, H.J., 2001. Degradation of cyanobacterial hepatotoxins in batch experiments. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 43, 229–232.
- Miller, M.J., Critchley, M.M., Hutson, J., Fallowfield, H.J., 2001. The adsorption of cyanobacterial hepatotoxins from water onto soil during batch experiments. *Water Res.* 35, 1461–1468.
- Mitrovic, S.M., Pflugmacher, S., James, K.J., Furey, A., 2004. Anatoxin-a elicits an increase in peroxidase and glutathione S-transferase activity in aquatic plants. *Aquat. Toxicol.* 68, 185–192.
- Mitrovic, S.M., Allis, O., Furey, A., James, K.J., 2005. Bioaccumulation and harmful effects of microcystin-LR in the aquatic plants *Lemna minor* and *Wolffia arrhiza* and the filamentous alga *Chladophora fracta*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61, 345–352.
- Mohamed, Z.A., 2008. Polysaccharides as a protective response against microcystin-induced oxidative stress in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda* and their possible significance in the aquatic ecosystem. *Ecotoxicology* 17, 504–516.
- Mohamed, Z.A., Al Shehri, A.M., 2009. Microcystins in groundwater wells and their accumulation in vegetable plants irrigated with contaminated waters in Saudi Arabia. *J. Hazard. Mater.* 172, 310–315.
- Molica, R.J.R., Oliveira, E.J.A., Carvalho, P.V.V.C., Costa, A.N.S.F., Cunha, M.C.C., Melo, G.L., Azevedo, S.M.F.O., 2005. Occurrence of saxitoxins and an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. *Harmful Algae* 4, 743–753.
- Moore, R.E., 1996. Cyclic peptides and depsipeptides from cyanobacteria: A review. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 16, 134–143.
- Morris, R.J., Williams, D.E., Luu, H.A., Holmes, C.F.B., Andersen, R.J., Calvert, S.E., 2000. The adsorption of microcystin-LR by natural clay particles. *Toxicon* 38, 303–308.

Murch, S.J., Cox, P.A., Banack, S.A., 2004. A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 12228–12231.

Murchie, E.H., Lawson, T., 2013. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *J. Exp. Bot.* 64, 3983–3998.

## N-

Namikoshi, M., Choi, B.W., Sun, F., Rinehart, K.L., Evans, W.R., Carmichael, W.W., 1993. Chemical characterization and toxicity of dihydro derivatives of nodularin and microcystin-LR, potent cyanobacterial cyclic peptide hepatotoxins. *Chem. Res. Toxicol.* 6, 151–158.

Namikoshi, M., Rinehart, K., 1996. Bioactive compounds produced by cyanobacteria. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 17, 373–384.

Nasri, H., El Herry, S., Bouaïcha, N., 2008. First reported case of turtle deaths during a toxic *Microcystis* spp. bloom in Lake Oubeira, Algeria. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71, 535–544.

Negri, A.P., Jones, G.J., Blackburn, S.I., Oshima, Y., Onodera, H., 1997. Effect of culture and bloom development and of sample storage on paralytic shellfish poisons in the cyanobacterium *Anabaena Circinalis*. *J. Phycol.* 33, 26–35.

Nishiyama, A., 1968. Effect of saxitoxin on spontaneous release of acetylcholine from the frog's motor nerve endings. *Tohoku J. Exp. Med.* 95, 201–202.

Nobre, M.M.Z. de A, 1997. Detection of the toxins (microcystins) produced by cyanobacteria (blue algae) in reservoirs for public provision for immunosorbente assay method linked the enzyme (ELISA) and chemical identification, PhD thesis, Sao Paula, 154 p.

Norris, R.L.G., Eaglesham, G.K., Shaw, G.R., Senogles, P., Chiswell, R.K., Smith, M.J., Davis, B.C., Seawright, A.A., Moore, M.R., 2001. Extraction and purification of the zwitterions cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environ. Toxicol.* 16, 391–396.

Novotny, V., 2003. *Water Quality: Diffuse pollution and watershed management*. John Wiley & Sons.

Nybom, S.M.K., Dziga, D., Heikkilä, J.E., Kull, T.P.J., Salminen, S.J., Meriluoto, J.A.O., 2012. Characterization of microcystin-LR removal process in the presence of probiotic bacteria. *Toxicon* 59, 171–181.

## O-

O'Neil, J., Davis, T., Burford, M., Gobler, C., 2012. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae* 14, 313–334.

Oberholster, P.J., Botha, A.-M., Ashton, P.J., 2009a. The influence of a toxic cyanobacterial bloom and water hydrology on algal populations and macroinvertebrate abundance in the upper littoral zone of Lake Krugersdrift, South Africa. *Ecotoxicol. Lond. Engl.* 18, 34–46.

Oberholster, P.J., Myburgh, J.G., Govender, D., Bengis, R., Botha, A.-M., 2009b. Identification of toxigenic *Microcystis* strains after incidents of wild animal mortalities in the Kruger National Park, South Africa. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1177–1182.

Ochsenreiter, T., Selezi, D., Quaiser, A., Bonch-Osmolovskaya, L., Schleper, C., 2003. Diversity and abundance of *Crenarchaeota* in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR. *Environ. Microbiol.* 5, 787–797.

OECD, 2004. Test No. 312: Leaching in Soil Columns. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

Ohtani, I., Moore, R.E., Runnegar, M.T.C., 1992. Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *J Am Chem Soc* 114, 7941–7942.

Okano, K., Shimizu, K., Kawauchi, Y., Maseda, H., Utsumi, M., Zhang, Z., Neilan, B.A., Sugiura, N., 2009. Characteristics of a microcystin-degrading bacterium under alkaline environmental conditions. *J. Toxicol.* 2009, 1–8.

Orr, P.T., Jones, G.J., 1998. Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. *Limnol. Oceanogr.* 1604–1614.

Orr, P.T., Jones, G.J., Hamilton, G.R., 2004. Removal of saxitoxins from drinking water by granular activated carbon, ozone and hydrogen peroxide—implications for compliance with the Australian drinking water guidelines. *Water Res.* 38, 4455–4461.

Oudra, B., Loudiki, M., Sbiyyaa, B., Martins, R., Vasconcelos, V., Namikoshi, N., 2001. Isolation, characterization and quantification of microcystins (heptapeptides hepatotoxins) in *Microcystis aeruginosa* dominated bloom of Lalla Takerkoust lake-reservoir (Morocco). *Toxicol Off. J. Int. Soc. Toxinology* 39, 1375–1381.

## P-

Paerl, H.W., Huisman, J., 2009. Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environ. Microbiol. Rep.* 1, 27–37.

Papke, U., Gross, E.M., Francke, W., 1997. Isolation, identification and determination of the absolute configuration of Fischerellin B. A new algicide from the freshwater cyanobacterium *Fischerella muscicola* (Thuret). *Tetrahedron Lett.* 38, 379–382.

Park, H.-D., Iwami, C., Watanabe, M.F., Harada, K.I., Okino, T., Hayashi, H., 1998a. Temporal variabilities of the concentration of intra- and extracellular microcystins and toxic microcystins species in a hypertrophic lake, Lake Suwa, Japan. *Env. Toxicol Water Qual* 13, 61–72.

Park, H.-D., Kim, B., Kim, E., Okino, T., 1998b. Hepatotoxic microcystins and neurotoxic anatoxin-a in cyanobacterial blooms from Korean lakes. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 13, 225–234.

Park, H.-D., Sasaki, Y., Maruyama, T., Yanagisawa, E., Hiraishi, A., Kato, K., 2001. Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by a new bacterium isolated from a hypertrophic lake. *Environ. Toxicol.* 16, 337–343.

Patterson, G.M.L., Baldwin, C.L., Bolis, C.M., Caplan, F.R., Karuso, H., Larsen, L.K., Levine, I.A., Moore, R.E., Nelson, C.S., Tschappat, K.D., Tuang, G.D., Furusawa, E., Furusawa, S., Norton, T.R., Raybourne, R.B., 1991. Antineoplastic activity of cultured blue-green algae (Cyanophyta). *J. Phycol.* 27, 530–536.

Patterson, G.M.L., Smith, C.D., Kimura, L.H., Britton, B.A., Carmeli, S., 1993. Action of tolytoxin on cell morphology, cytoskeletal organization, and actin polymerization. *Cell Motil. Cytoskeleton* 24, 39–48. Patterson, G.M.L., Larsen, L., Moore, R., 1994. Bioactive natural products from blue-green algae. *J. Appl. Phycol.* 6, 151–157.

Perron, M.-C., Qiu, B., Boucher, N., Bellemare, F., Juneau, P., 2012. Use of chlorophyll *a* fluorescence to detect the effect of microcystins on photosynthesis and photosystem II energy fluxes of green algae. *Toxicon* 59, 567–577.

Petersen, D.G., Blazewicz, S.J., Firestone, M., Herman, D.J., Turetsky, M., Waldrop, M., 2012. Abundance of microbial genes associated with nitrogen cycling as indices of biogeochemical process rates across a vegetation gradient in Alaska. *Environ. Microbiol.* 14, 993–1008.

Peuthert, A., Chakrabarti, S., Pflugmacher, S., 2007. Uptake of microcystins-LR and -LF (cyanobacterial toxins) in seedlings of several important agricultural plant species and the correlation with cellular damage (lipid peroxidation). *Environ. Toxicol.* 22, 436–442.

Peuthert, A., Lawton, L., Pflugmacher, S., 2008. *In vivo* influence of cyanobacterial toxins on enzyme activity and gene expression of protein phosphatases in Alfalfa (*Medicago sativa*). *Toxicon* 52, 84–90.

Peuthert, A., Pflugmacher, S., 2010. Influence of the cyanotoxin microcystin-LR on tocopherol in Alfalfa seedlings (*Medicago sativa*). *Toxicon* 56, 411–417.

Pflugmacher S., Wiegand, C., Oberemm, A., Beattie, K.A., Krause, E., Codd, G.A., Steinberg, C.E., 1998. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. *Biochim. Biophys. Acta* 1425, 527–533.

Pflugmacher, S., Ame, V., Wiegand, C., Steinberg, C., 2001. Cyanobacterial toxins and endotoxins: their origin and their ecophysiological effects in aquatic organisms. *Wasser Boden* 53, 15–20.

Pflugmacher, S., 2002. Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems. *Environ. Toxicol.* 17, 407–413.

Pflugmacher, S., 2004. Promotion of oxidative stress in the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* during biotransformation of the cyanobacterial toxin microcystin-LR. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 70, 169–178.

Pflugmacher, S., Jung, K., Lundvall, L., Neumann, S., Peuthert, A., 2006. Effects of cyanobacterial toxins and cyanobacterial cell-free crude extract on germination of alfalfa (*Medicago sativa*) and induction of oxidative stress. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 2381–2387.

Pflugmacher, S., Hofmann, J., Hübner, B., 2007. Effects on growth and physiological parameters in wheat (*Triticum aestivum* L.) grown in soil and irrigated with cyanobacterial toxin contaminated water. *Environ. Toxicol. Chem. SETAC* 26, 2710–2716.

Pietsch, C., Wiegand, C., Amé, M.V., Nicklisch, A., Wunderlin, D., Pflugmacher, S., 2001. The effects of a cyanobacterial crude extract on different aquatic organisms: evidence for cyanobacterial toxin modulating factors. *Environ. Toxicol.* 16, 535–542.

Porra, R., 2002. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls *a* and *b*. *Photosynth. Res.* 73, 149–156.

Prakash, S., Lawton, L.A., Edwards, C., 2009. Stability of toxigenic *Microcystis* blooms. *Harmful Algae* 8, 377–384.

Prieto, A., Campos, A., Cameán, A., Vasconcelos, V., 2011. Effects on growth and oxidative stress status of rice plants (*Oryza sativa*) exposed to two extracts of toxin-producing cyanobacteria (*Aphanizomenon ovalisporum* and *Microcystis aeruginosa*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 1973–1980.

Puddick, J., Prinsep, M.R., Wood, S.A., Cary, S.C., Hamilton, D.P., Wilkins, A.L., 2013. Isolation and structure determination of two new hydrophobic microcystins from *Microcystis* sp. (CAWBG11). *Phytochem. Lett.* 6, 575–581.

Puerto, M., Pichardo, S., Jos, Á., Prieto, A.I., Sevilla, E., Frías, J.E., Cameán, A.M., 2010. Differential oxidative stress responses to pure Microcystin-LR and Microcystin-containing and non-containing cyanobacterial crude extracts on Caco-2 cells. *Toxicon* 55, 514–522.

Pushparaj, B., Pelosi, E., Jüttner, F., 1998. Toxicological analysis of the marine cyanobacterium *Nodularia harveyana*. *J. Appl. Phycol.* 10, 527–530.

## R-

Ramanan, S., Tang, J., Velayudhan, A., 2000. Isolation and preparative purification of microcystin variants. *J. Chromatogr. A* 883, 103–112.

Rapala, J., Sivonen, K., Luukkainen, R., Niemelä, S., 1993. Anatoxin-a concentration *Anabaena* and *Aphanizomenon* under different environmental conditions and comparison of growth by toxic and non-toxic *Anabaena*-strains — a laboratory study. *J. Appl. Phycol.* 5, 581–591.

Rapala, J., Lahti, K., Sivonen, K., Niemelä, S. i., 1994. Biodegradability and adsorption on lake sediments of cyanobacterial hepatotoxins and anatoxin-a. *Lett. Appl. Microbiol.* 19, 423–428.

Rapala, J., Sivonen, K., Lyra, C., Niemelä, S.I., 1997. Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2206–2212.

Rapala, J., Berg, K.A., Lyra, C., Niemi, R.M., Manz, W., Suomalainen, S., Paulin, L., Lahti, K., 2005. *Paucibacter toxinivorans* gen. nov., sp. nov., a bacterium that degrades cyclic cyanobacterial hepatotoxins microcystins and nodularin. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 1563–1568.

Riemann, L., Winding, A., 2001. Community dynamics of free-living and particle-associated bacterial assemblages during a freshwater phytoplankton bloom. *Microb. Ecol.* 42, 274–285.

Rinehart, K., Namikoshi, M., Choi, B., 1994. Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). *J. Appl. Phycol.* 6, 159–176.

Ríos, V., Moreno, I., Prieto, A.I., Soria-Díaz, M.E., Frías, J.E., Cameán, A.M., 2013. Comparison of *Microcystis aeruginosa* (PCC7820 and PCC7806) growth and intracellular microcystins content determined by liquid chromatography–mass spectrometry, enzyme-linked immunosorbent assay anti-Adda and phosphatase bioassay.

Robillot, C., Vinh, J., Puiseux-Dao, S., Hennion, M.-C., 2000. Hepatotoxin production kinetics of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7820, as determined by HPLC–Mass Spectrometry and protein phosphatase bioassay. *Environ. Sci. Technol.* 34, 3372–3378.

Rodhe, W., 1969. Crystallization of eutrophication concepts in northern Europe.

Romanowska-Duda, Z., Tarczyńska, M., 2002. The influence of microcystin-LR and hepatotoxic cyanobacterial extract on the water plant *Spirodela oligorrhiza*. *Environ. Toxicol.* 17, 434–440.

Romero-Aranda, R., Soria, T., Cuartero, J., 2001. Tomato plant-water uptake and plant-water relationships under saline growth conditions. *Plant Sci. Int. J. Exp. Plant Biol.* 160, 265–272.

Runnegar, M.T.C., Gerdes, R.G., Falconer, I.R., 1991. The uptake of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by isolated rat hepatocytes. *Toxicol.* 29, 43–51.

Runnegar, M.T.C., Kong, S.-M., Zhong, Y.-Z., Lu, S.C., 1995. Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 49, 219–225.

Russell, A.E., Laird, D.A., Parkin, T.B., Mallarino, A.P., 2005. Impact of nitrogen fertilization and cropping system on carbon sequestration in Midwestern mollisols. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 69, 413.

## S-

Saito, T., Okano, K., Park, H.-D., Itayama, T., Inamori, Y., Neilan, B.A., Burns, B.P., Sugiura, N., 2003. Detection and sequencing of the microcystin LR-degrading gene, *mlrA*, from new bacteria isolated from Japanese lakes. *FEMS Microbiol. Lett.* 229, 271–276.

Saker, M.L., Griffiths, D.J., 2001. Occurrence of blooms of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya and Subba Raju in a north Queensland domestic water supply. *Mar Freshw. Res* 52, 907–915.

Santiago-Martín, A. de, Cheviron, N., Quintana, J.R., González, C., Lafuente, A.L., Mougin, C., 2013. Metal contamination disturbs biochemical and microbial properties of calcareous agricultural soils of the mediterranean area. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 64, 388–398.

Saqrane, S., El Ghazali, I., Oudra, B., Bouarab, L., Vasconcelos, V., 2008. Effects of cyanobacteria producing microcystins on seed germination and seedling growth of several agricultural plants. *J. Environ. Sci. Health B* 43, 443–451.

Saqrane, S., ghazali, I.E., Ouahid, Y., Hassni, M.E., Hadrami, I.E., Bouarab, L., del Campo, F.F., Oudra, B., Vasconcelos, V., 2007. Phytotoxic effects of cyanobacteria extract on the aquatic plant *Lemna gibba*: Microcystin accumulation, detoxication and oxidative stress induction. *Aquat. Toxicol.* 83, 284–294.

Saqrane, S., Ouahid, Y., El Ghazali, I., Oudra, B., Bouarab, L., del Campo, F.F., 2009. Physiological changes in *Triticum durum*, *Zea mays*, *Pisum sativum* and *Lens esculenta* cultivars, caused by irrigation with water contaminated with microcystins: A laboratory experimental approach. *Toxicol.* 53, 786–796.

Sathishkumar, M., Pavagadhi, S., Vijayaraghavan, K., Balasubramanian, R., Ong, S.L., 2011. Concomitant uptake of microcystin-LR and -RR by peat under various environmental conditions. *Chem. Eng. J.* 172, 754–762.

Schembri, M.A., Neilan, B.A., Saint, C.P., 2001. Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environ. Toxicol.* 16, 413–421.

Schmidt, J.R., Shaskus, M., Estenik, J.F., Oesch, C., Khidekel, R., Boyer, G.L., 2013.

Variations in the microcystin content of different fish species collected from a eutrophic lake. *Toxins* 5, 992–1009.

Scott, J.T., Marcarelli, A.M., 2012. Cyanobacteria in freshwater benthic environments, in: Whitton, B.A. (Ed.), *Ecology of Cyanobacteria II*. Springer Netherlands, pp. 271–289.

Scott, J.W., Harbaugh, B.K., 1989. Micro-Tom-a miniature dwarf tomato. *Fla. Agric Exp Stn Circ* 370, 1–6.

Seawright, A., Ng, J., Oelrichs, P., Sani, Y., Nolan, C., Lister, A., Holton, J., Ray, D., Osborne, R., 1999. Recent toxicity studies in animals using chemicals derived from cycads.

Senogles, P., Smith, M., Shaw, G.R., 2002. Physical, chemical and biological methods for the degradation of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Am. Water Works Assoc.*

Shahzad, T., Chenu, C., Repinçay, C., Mougin, C., Ollier, J.-L., Fontaine, S., 2012. Plant clipping decelerates the mineralization of recalcitrant soil organic matter under multiple grassland species. *Soil Biol. Biochem.* 51, 73–80.

Sharpley, A.N., Chapra, S.C., Wedepohl, R., Sims, J.T., Daniel, T.C., Reddy, K.R., 1994. Managing agricultural phosphorus for protection of surface waters: Issues and Options. *J. Environ. Qual.* 23, 437.

Shaw, G.R., Sukenik, A., Livne, A., Chiswell, R.K., Smith, M.J., Seawright, A.A., Norris, R.L., Eaglesham, G.K., Moore, M.R., 1999. Blooms of the cylindrospermopsin containing cyanobacterium, *Aphanizomenon ovalisporum* (Forti), in newly constructed lakes, Queensland, Australia. *Environ. Toxicol.* 14, 167–177.

Sheen, J., 1993. Protein phosphatase activity is required for light-inducible gene expression in maize. *EMBO J.* 12, 3497–3505.

Siegl, G., MacKintosh, C., Stitt, M., 1990. Sucrose-phosphate synthase is dephosphorylated by protein phosphatase 2A in spinach leaves: Evidence from the effects of okadaic acid and microcystin. *FEBS Lett.* 270, 198–202.

Singh, D.P., Tyagi, M., Kumar, A., Thakur, J., Kumar, A., 2001. Antialgal activity of a hepatotoxin-producing cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 15–22.

Sivonen, K., Carmichael, W.W., Namikoshi, M., Rinehart, K.L., Dahlem, A.M., Niemelä, S.I., 1990. Isolation and characterization of hepatotoxic microcystin homologs from the filamentous freshwater cyanobacterium *Nostoc* sp. strain 152. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2650–2657.

Sivonen, K., Jones, G., 1999. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring, and management, Chorus I. & Bartram (eds). ed. Taylor & Francis.

Skulberg, O.M., Skulberg, R., Carmichael, W.W., Andersen, R.A., Matsunaga, S., Moore, R.E., 1992. Investigations of a neurotoxic *oscillatorialean* strain (*Cyanophyceae*) and its toxin. Isolation and characterization of homoanatoxin-a. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 321–329.

Smith, C., Sutton, A., 1993. The persistence of anatoxin-a in reservoir water. *Found. Water Res. Bucks.* UK.

Smith, C.J., 1996. Accumulation of phytoalexins: defence mechanism and stimulus response system. *New Phytol.* 132, 1–45.

- Smith, M.J., 2005. Biodegradation of the cyanotoxin cylindrospermopsin (School of Medicine). The University of Queensland.
- Smith, M.J., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K., Ho, L., Brookes, J.D., 2008. Elucidating the factors influencing the biodegradation of cylindrospermopsin in drinking water sources. *Environ. Toxicol.* 23, 413–421.
- Smith, R.D., Wilson, J.E., Walker, J.C., Baskin, T.I., 1994. Protein-phosphatase inhibitors block root hair growth and alter cortical cell shape of *Arabidopsis* roots. *Planta* 194, 516–524.
- Smith, V.H., Joye, S.B., Howarth, R.W., others, 2006. Eutrophication of freshwater and marine ecosystems. *Limnol. Oceanogr.* 51, 351–355.
- Song, H.-L., Li, X.-N., Lu, X.-W., Inamori, Y., 2009. Investigation of microcystin removal from eutrophic surface water by aquatic vegetable bed. *Ecol. Eng.* 35, 1589–1598.
- Spencer, P., Nunn, P., Hugon, J., Ludolph, A., Ross, S., Roy, D., Robertson, R., 1987. Guam amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism-dementia linked to a plant excitant neurotoxin. *Science* 237, 517–522.
- Spencer, P.S., Nunn, P.B., Hugon, J., Ludolph, A., Roy, D.N., 1986. Motorneurone disease on Guam: possible role of a food neurotoxin. *Lancet* 1, 965.
- Spivak, C.E., Witkop, B., Albuquerque, E.X., 1980. Anatoxin-a: A novel, potent agonist at the nicotinic receptor. *Mol. Pharmacol.* 18, 384–394.
- Spoof, L., Vesterkvist, P., Lindholm, T., Meriluoto, J., 2003. Screening for cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularin in environmental water samples by reversed-phase liquid chromatography–electrospray ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1020, 105–119.
- Steele, J.C., McGeer, P.L., 2008. The ALS/PDC syndrome of Guam and the cycad hypothesis. *Neurology* 70, 1984–1990.
- Stevens, D.K., Krieger, R.I., 1991. Stability studies on the cyanobacterial nicotinic alkaloid anatoxin-A. *Toxicon* 29, 167–179.
- Stewart, I., Schluter, P.J., Shaw, G.R., 2006. Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health – a review. *Environ. Health* 5, 7.
- Stüven, J., Pflugmacher, S., 2007. Antioxidative stress response of *Lepidium sativum* due to exposure to cyanobacterial secondary metabolites. *Toxicon* 50, 85–93.
- Su, Z., Sheets, M., Ishida, H., Li, F., Barry, W.H., 2004. Saxitoxin blocks L-type ICa. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308, 324–329.
- Sukenik, A., Eshkol, R., Livne, A., Hadas, O., Rom, M., Tchernov, D., Vardi, A., Aaron Kaplan, 2002. Inhibition of growth and photosynthesis of the dinoflagellate *Peridinium gatunense* by *Microcystis* sp. (cyanobacteria): A novel allelopathic mechanism. *Limnol. Oceanogr.* 47, 1656–1663.
- Svirčev, Z., Simeunović, J., Subakov-Simić, G., Krstić, S., Vidović, M., 2007. Freshwater cyanobacterial blooms and cyanotoxin production in Serbia in the past 25 years. *Geogr. Pannonica* 11, 32–8.
- Svirčev, Z., Krstic, S., Miladinov-Mikov, M., Baltic, V., Vidovic, M., 2009. Freshwater cyanobacterial blooms and primary liver cancer epidemiological studies in Serbia. *J. Environ. Sci. Health Part C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 27, 36–55.

Svrcek, C., Smith, D.W., 2004. Cyanobacteria toxins and the current state of knowledge on water treatment options: a review. *J. Environ. Eng. Sci.* 3, 155–185.

## T-

Takayama, K., Nishina, H., Iyoki, S., Arima, S., Hatou, K., Ueka, Y., Miyoshi, Y., 2011. Early detection of drought stress in tomato plants with chlorophyll fluorescence imaging practical application of the speaking plant approach in a greenhouse, in: *World Congress*. pp. 1785–1790.

Takeda, S., Mano, S., Ohto, M., Nakamura, K., 1994. Inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A block the sugar-inducible gene expression in plants. *Plant Physiol.* 106, 567–574.

Takenaka, S., Watanabe, M.F., 1997. Microcystin LR degradation by *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease. *Chemosphere* 34, 749–757.

Tassigny, M., Lefevre, M., 1971. Auto., heteroantagonisme et autres consequences des excretions d'algues d'eau douce ou thermale. *Mitt Int Ver. Theor Angew Limnol* 19, 26–38.

Thirumavalavan, M., Hu, Y.-L., Lee, J.-F., 2012. Effects of humic acid and suspended soils on adsorption and photo-degradation of microcystin-LR onto samples from Taiwan reservoirs and rivers. *J. Hazard. Mater.* 217–218, 323–329.

Tsuji, K., Naito, S., Kondo, F., Ishikawa, N., Watanabe, M.F., Suzuki, M., Harada, K., 1994. Stability of microcystins from cyanobacteria: effect of light on decomposition and isomerization. *Environ. Sci. Technol.* 28, 173–177.

Tsuji, K., Setsuda, S., Watanuki, T., Kondo, F., Nakazawa, H., Suzuki, M., Harada, K.-I., 1996. Microcystin levels during 1992–95 for lakes sagami and tsukui-japan. *Nat. Toxins* 4, 189–194.

## U-

Ueno, Y., Nagata, S., Tsutsumi, T., Hasegawa, A., Watanabe, M.F., Park, H.-D., Chen, G.-C., Chen, G., Yu, S.-Z., 1996. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis* 17, 1317–1321.

Unesco, S., 1966. Determination of photosynthetic pigments in sea water. *Monogr. Ocean. Method—UNESCO I.*

## V-

Valdor, R., Aboal, M., 2007. Effects of living cyanobacteria, cyanobacterial extracts and pure microcystins on growth and ultrastructure of microalgae and bacteria. *Toxicon* 49, 769–779.

Van Apeldoorn, M.E., van Egmond, H.P., Speijers, G.J.A., Bakker, G.J.I., 2007. Toxins of cyanobacteria. *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 7–60.

Vasas, G., Gáspár, A., Surányi, G., Batta, G., Gyémánt, G., M-Hamvas, M., Máthé, C., Grigorszky, I., Molnár, E., Borbély, G., 2002. Capillary electrophoretic assay and purification of cylindrospermopsin, a cyanobacterial toxin from *Aphanizomenon ovalisporum*, by plant test (blue-green *Sinapis* test). *Anal. Biochem.* 302, 95–103.

Vieira, J.M. dos S., Azevedo, M.T. de P., Azevedo, S.M.F. de O., Honda, R.Y., Corrêa, B., 2005. Toxic cyanobacteria and microcystin concentrations in a public water supply reservoir in the Brazilian Amazonia region. *Toxicon* 45, 901–909.

Vindimian, E., 2003. REGTOX: macro Excel<sup>TM</sup> for dose-response modelling. France.  
Téléchargeable sur : [http://www.normalesup.org/~vindimian/fr\\_index.html](http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_index.html)

Vitousek, P.M., Aber, J., Howarth, R.W., Likens, G.E., Matson, P.A., Schindler, D.W., Schlesinger, W.H., Tilman, G.D., 1997. Human alteration of the global nitrogen cycle: causes and consequences. Ecological Society of America Washington, DC, US.

## W-

Wagner, A., Michalek, W., Jamiolkowska, A., 2006. Chlorophyll fluorescence measurements as indicators of fusariosis severity in tomato plants. *Agron. Res.* 4, 461–464.

Wang, J., Salata, J.J., Bennett, P.B., 2003. Saxitoxin is a gating modifier of hERG K<sup>+</sup> channels. *J. Gen. Physiol.* 121, 583–598.

Wang, J., Pang, X., Ge, F., Ma, Z., 2007. An ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of microcystins occurrence in surface water in Zhejiang Province, China. *Toxicon* 49, 1120–1128.

Weber, K.A., 1907. Aufbau und vegetation der Moore Norddeutschlands.

Weiss, Liebert, H.P., Braune, W., 2000. Influence of microcystin-RR on growth and photosynthetic capacity of the duckweed *Lemna minor*. *J. Appl. Bot.* 74, 100–105.

Welker, M., Steinberg, C., 1999. Indirect photolysis of cyanotoxins: one possible mechanism for their low persistence. *Water Res.* 33, 1159–1164.

Welker, M., Steinberg, C., 2000. Rates of humic substance photosensitized degradation of microcystin-LR in natural waters. *Environ. Sci. Technol.* 34, 3415–3419.

Wessén, E., Söderström, M., Stenberg, M., Bru, D., Hellman, M., Welsh, A., Thomsen, F., Klemmedtson, L., Philippot, L., Hallin, S., 2011. Spatial distribution of ammonia-oxidizing bacteria and archaea across a 44-hectare farm related to ecosystem functioning. *ISME J.* 5, 1213–1225.

Wiegand, C., Peuthert, A., Pflugmacher, S., Carmeli, S., 2002. Effects of microcin SF608 and microcystin-LR, two cyanobacterial compounds produced by *Microcystis* sp., on aquatic organisms. *Environ. Toxicol.* 17, 400–406.

Wiegand, C., Pflugmacher, S., 2005. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203, 201–218.

Williams, C.D., Aubel, M.T., Chapman, A.D., D’Aiuto, P.E., 2007. Identification of cyanobacterial toxins in Florida’s freshwater systems. *Lake Reserv. Manag.* 23, 144–152.

Wonnacott, S., Swanson, K.L., Albuquerque, E.X., Huby, N.J.S., Thompson, P., Gallagher, T., 1992. Homoanatoxin: a potent analogue of anatoxin-a. *Biochem. Pharmacol.* 43, 419–423.

Wood, S.A., Briggs, L.R., Sprosen, J., Ruck, J.G., Wear, R.G., Holland, P.T., Bloxham, M., 2006a. Changes in concentrations of microcystins in rainbow trout, freshwater mussels, and cyanobacteria in Lakes Rotoiti and Rotoehu. *Environ. Toxicol.* 21, 205–222.

Wood, S.A., Holland, P.T., Stirling, D.J., Briggs, L.R., Sprosen, J., Ruck, J.G., Wear, R.G., 2006b. Survey of cyanotoxins in New Zealand water bodies between 2001 and 2004. *N. Z. J. Mar. Freshw. Res.* 40, 585–597.

Wormer, L., Cirés, S., Carrasco, D., Quesada, A., 2008. Cylindrospermopsin is not degraded by co-occurring natural bacterial communities during a 40-day study. *Harmful Algae* 7, 206–213.

Wörmer, L., Huerta-Fontela, M., Cirés, S., Carrasco, D., Quesada, A., 2010. Natural photodegradation of the cyanobacterial toxins microcystin and cylindrospermopsin. *Environ. Sci. Technol.* 44, 3002–3007.

Wörmer, L., Cirés, S., Quesada, A., 2011. Importance of natural sedimentation in the fate of microcystins. *Chemosphere* 82, 1141–1146.

## X-

Xiao, F.-G., Zhao, X.-L., Tang, J., Gu, X.-H., Zhang, J.-P., Niu, W.-M., 2009. Determination of microcystin-LR in water from lake Tai, China. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 82, 230–233.

Xu, W., Chen, Q., Zhang, T., Cai, Z., Jia, X., Xie, Q., Ren, Y., 2008. Development and application of ultra performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem triple quadrupole mass spectrometry for determination of seven microcystins in water samples. *Anal. Chim. Acta* 626, 28–36.

## Y-

Yamasaki, S., 1993. Probable effects of algal bloom on the growth of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. *J. Plant Res.* 106, 113–120.

Yin, L., Huang, J., Huang, W., Li, D., Liu, Y., 2005. Responses of antioxidant system in *Arabidopsis thaliana* suspension cells to the toxicity of microcystin-RR. *Toxicon* 46, 859–864.

Yu, G., Liu, Y., Qiu, C., Xu, X., 2000. Macrophyte succession in Dianchi Lake and relations with the environment. *J. Lake Sci.* 12, 73–80.

Yuan, M., Namikoshi, M., Otsuki, A., Watanabe, M.F., Rinehart, K.L., 1999. Electrospray ionization mass spectrometric analysis of microcystins, cyclic heptapeptide hepatotoxins: modulation of charge states and  $[M + H]^+$  to  $[M + Na]^+$  ratio. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 10, 1138–1151.

## Z-

Žegura, B., Sedmak, B., Filipič, M., 2003. Microcystin-LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line HepG2. *Toxicon* 41, 41–48.

Zhang, M., Pan, G., Yan, H., 2010. Microbial biodegradation of microcystin-RR by bacterium *Sphingopyxis* sp. USTB-05. *J. Environ. Sci.* 22, 168–175.

## **Annexes**



## Articles scientifiques :

## - Article de synthèse (Chemosphere, 2014, 96 :1-15)

Chemosphere 96 (2014) 1–15



Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/chemosphere](http://www.elsevier.com/locate/chemosphere)

Review

## Cyanobacterial toxins: Modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops

Sylvain Corbel<sup>a</sup>, Christian Mougin<sup>a</sup>, Nouredine Bouaïcha<sup>b,\*</sup><sup>a</sup>INRA, UR 251, PESSAC, F-78026 Versailles, France<sup>b</sup>Laboratoire Ecologie, Systématique et Evolution, UMR 8079-Univ. Paris-Sud, CNRS, AgroParisTech, Université Paris-Sud, F-91405 Orsay, France

## HIGHLIGHTS

- Phytotoxic effects of cyanotoxins on agricultural plants have been updated.
- We report mechanisms of cyanotoxins and target molecules in vegetable organisms.
- The effects of cyanotoxins in the terrestrial environment is particularly scarce.
- We describe fate of cyanotoxins in aquatic and soil ecosystems.
- We examine bioaccumulation of cyanotoxins in vegetable foods.

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 8 March 2013

Received in revised form 15 July 2013

Accepted 23 July 2013

Available online 4 September 2013

## Keywords:

Cyanobacteria

Cyanotoxins

Microcystins

Anatoxins

Cylindrospermopsin

Fate

## ABSTRACT

The occurrence of harmful cyanobacterial blooms in surface waters is often accompanied by the production of a variety of cyanotoxins. These toxins are designed to target in humans and animals specific organs on which they act: hepatotoxins (liver), neurotoxins (nervous system), cytotoxic alkaloids, and dermatotoxins (skin), but they often have important side effects too. When introduced into the soil ecosystem by spray irrigation of crops they may affect the same molecular pathways in plants having identical or similar target organs, tissues, cells or biomolecules. There are also several indications that terrestrial plants, including food crop plants, can bioaccumulate cyanotoxins and present, therefore, potential health hazards for human and animals. The number of publications concerned with phytotoxic effects of cyanotoxins on agricultural plants has increased recently. In this review, we first examine different cyanotoxins and their modes of actions in humans and mammals and occurrence of target biomolecules in vegetable organisms. Then we present environmental concentrations of cyanotoxins in freshwaters and their fate in aquatic and soil ecosystems. Finally, we highlight bioaccumulation of cyanotoxins in plants used for feed and food and its consequences on animals and human health. Overall, our review shows that the information on the effects of cyanotoxins on non-target organisms in the terrestrial environment is particularly scarce, and that there are still serious gaps in the knowledge about the fate in the soil ecosystems and phytotoxicity of these toxins.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## Contents

1. Introduction .....	2
2. Cyanotoxins and their producers .....	2
3. Modes of actions in humans and mammals and occurrence of target biomolecules in vegetable organisms .....	3
3.1. Neurotoxins .....	3
3.2. Hepatotoxins .....	3
3.3. Cytotoxins .....	4
4. Environmental concentrations of cyanotoxins in freshwaters and fate in aquatic and soil ecosystems. ....	4
4.1. Environmental concentrations of cyanotoxins. ....	4

\* Corresponding author. Tel.: +33 (0)1 69 15 49 90; fax: +33 (0)1 69 15 56 96.

E-mail address: [nouredine.bouaicha@u-psud.fr](mailto:nouredine.bouaicha@u-psud.fr) (N. Bouaïcha).

0045-6535/\$ - see front matter © 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.056>

4.2. Fate in aquatic and soil ecosystems.....	4
5. Phytotoxicity effects of cyanotoxins.....	7
5.1. Neurotoxins.....	7
5.2. Hepatotoxins.....	8
5.3. Cytotoxic alkaloids.....	9
6. Bioaccumulation of cyanotoxins in vegetable foods and consequences on animals and human health.....	9
7. Conclusion and future directions.....	9
Acknowledgement.....	10
References.....	10

## 1. Introduction

In light of global climate change, and particularly measurable rises in global temperature, as well as increased fluxes of certain nutrients (i.e., nitrates, phosphates) brought either by agricultural run-off or by sewage treatment plants and other anthropogenic sources, it has been suggested that cyanobacteria, including toxin-producing taxa, may be increasing in abundance, and thus represent an emerging human and environmental health concern (For review see in O'Neil et al., 2012). The presence of such toxins has been reported throughout the world and it appears that liver-toxic microcystins are more commonly found in 40–75% cyanobacterial blooms (Sivonen and Jones, 1999). The contamination of surface waters by these cyanotoxins can cause water quality problems for fisheries, aquaculture, farming, and sanitary hazard for human and animals. Humans are exposed to cyanobacteria toxins through many routes, including drinking water, recreational contact, and health food products made from cyanobacteria, and food chain. In recent years, several cyanobacterial toxins were investigated in regard to their ability to enter the food chain via freshwater seafood (Ibelings and Chorus, 2007; Ettoumi et al., 2011), however, their ability to enter the food chain via agricultural crops has not been thoroughly investigated to date. Although no case of poisoning by these products has been reported in the literature, this eventuality must not be ignored. Indeed, a recent epidemiological study showed that the excessive incidence of amyotrophic lateral sclerosis in the population of the islands of Guam in the Pacific was linked to a consumption of the seeds of cycas contaminated by a neurotoxin,  $\beta$ -methylamino-L-alanine (BMAA), produced by a species of cyanobacteria of the genus *Nostoc* living in symbiosis in the roots of this plant (Banack and Cox, 2003; Cox et al., 2003; Murch et al., 2004; Steele and McGeer, 2008). This last cited fact is gaining importance since plants could in a direct or indirect manner contribute to food chain cyanotoxin's transfer, and by the way constitute a potent health risk source. Indeed, numerous studies reported that both submerged and emergent aquatic plants have been shown to absorb microcystins from low external concentrations (Pflugmacher et al., 1998, 2001; Yin et al., 2005; Saqrane et al., 2007). In terrestrial plants, Codd et al. (1999) reported that spray irrigation of commercial lettuce (*Lactuca sativa*) plants with water containing *Microcystis* resulted in colonies and single cells of the cyanobacterium being lodged on the leaves 10 d after the last irrigation. MC-LR was present at 2.5 mg kg<sup>-1</sup> dry weight (DW) in the central leaves, 0.833 mg kg<sup>-1</sup> (DW) in the distal zone of mature leaves, and 0.094 mg kg<sup>-1</sup> (DW) in the basal zone of mature leaves. The last study indicated that toxins were absorbed by the plant as the central leaves would have been protected from irrigation. Similar conclusions were reached for rice (*Oryza sativa*) and rape (*Brassica napus*) by Chen et al. (2004). Therefore, the accumulation of cyanotoxins in the terrestrial food chain is at present remains more worrying and the proposed quality limits are rare, indeed, many aspects concerning these toxins are particularly

scarce, notably those relative to the fate of cyanotoxins in the soil ecosystems and their toxicity and bioaccumulation on agricultural crops.

There have been several reviews of the intensification and global expansion of harmful cyanobacterial blooms in terms of abundance, geographic extent, factors that may be promoting this expansion, and prevention and management of cyanobacterial blooms and their toxins, as well as effects on aquatic ecosystem health and transfer on food webs (Wiegand and Pflugmacher, 2005; Ibelings and Chorus, 2007; Paerl and Huisman, 2009; Aráoz et al., 2010; Kinnear, 2010; Merel et al., 2010; Jančula and Maršálek, 2011; O'Neil et al., 2012). However, the purpose of this review is to: (1) Highlight important findings of the last decade of modes of actions of cyanotoxins in humans and mammals and occurrence of target biomolecules in vegetable organisms; (2) Describe the fate of cyanotoxins in aquatic and soil ecosystems and focus in their phytotoxicity; and (3) Emphasize bioaccumulation of these toxins in vegetable foods and its consequences on animals and human health.

## 2. Cyanotoxins and their producers

Recent research suggests that eutrophication and climate change are two processes they may promote the proliferation and expansion of harmful cyanobacterial blooms in freshwater, estuarine, and marine ecosystems. These microorganisms are known to biosynthesize a wide range of chemical classes of secondary metabolites such as peptides, macrolides, and glycosides (Patterson et al., 1994; Namikoshi and Rinehart, 1996) possessing a number of bioactivities: antiviral (Patterson et al., 1993, 1994), antifungal (Patterson et al., 1994), cytotoxic (Patterson et al., 1991), enzymatic inhibitor (Honkanen et al., 1995), antineoplastic (Moore, 1996), and allelopathic (Pushparaj et al., 1998). However, some of these cyanobacterial secondary metabolites encompass a diversity of alkaloid and peptide cyanotoxins which have been suggested to both pose threats to human and environmental health worldwide (Hawkins et al., 1985; Carmichael and Falconer, 1993; Kuiper-Goodman et al., 1999; Sivonen and Jones, 1999; Hitzfeld et al., 2000; Ettoumi et al., 2011). Toxic cyanobacteria that have been involved in such incidents belong essentially to the genera *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Planktothrix*, *Oscillatoria*, *Cylindrospermopsis* and less often *Gomphosphaeria*, *Coelosphaerium*, *Gloeotrichia*, *Nodularia* and *Nostoc* (Hawkins et al., 1985; Sivonen and Jones, 1999). The cyanotoxins are essentially endotoxins which can be released in the environment following a cellular lyse (Codd et al., 1989) or following treatment of cyanobacterial blooms with algacides (Kenefick et al., 1993). They can be classified into four families according to the organs on which they act: neurotoxins (nervous system), hepatotoxins (liver), cytotoxins (several organs: liver, kidneys, adrenal glands, small intestine), and dermatotoxins (irritant toxins).

Cyanobacterial neurotoxins are divided in three groups: anatoxins (anatoxin-a, homoanatoxin-a, and anatoxin-a(s)), saxitoxins,

and the neurotoxic amino acid L-beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA). Anatoxins and the BMAA are specific of cyanobacteria, while, saxitoxins are also synthesized by some marine dinoflagellates and associated with the human disease paralytic shellfish poisoning or PSP (Falconer, 1991; Carmichael, 1994; Kaebnick and Neilan, 2001). By contrast to the other neurotoxins which production depends on the phylogeny of the species, the BMAA can be produced by almost all groups of cyanobacteria from freshwater, brackish, and marine environments (Cox et al., 2005; Banack et al., 2007). Hepatotoxins are divided into two groups: Microcystins (MCs), cyclic heptapeptide hepatotoxins (MW 900–1200), that are regarded as the most frequently occurring and widespread of the cyanotoxins with more than 80 MC variants already reported (Sivonen and Jones, 1999; Cox et al., 2005; del Campo and Ouahid, 2010); and nodularins (MW 800–900) composed of five amino acids with only nine different natural analogs have been characterized (De Silva et al., 1992; Namikoshi et al., 1993; Rinehart et al., 1994; Codd et al., 2005). The hydrophilic alkaloid cytotoxin, cylindrospermopsin (MW 415) has been identified in the freshwater cyanobacteria *Cylindrospermopsis raciborskii* (Ohtani et al., 1992), *Umezakia natans* (Harada et al., 1994), *Aphanizomenon ovalisporum* (Sivonen and Jones, 1999), *Anabaena* sp. (Schembri et al., 2001), and *Raphidiopsis* sp. (Li et al., 2001). Today, only two congeners of cylindrospermopsin have been identified: 7-epicylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin. The freshwater cyanobacterial irritant toxins such as lipopolysaccharides (LPS), or endotoxins as they are commonly called, are major components of the cell wall in most Gram-negative bacteria including cyanobacteria (Jann and Jann, 1984; Mayer and Weckesser, 1984; Kaya, 1996; Stewart et al., 2006).

### 3. Modes of actions in humans and mammals and occurrence of target biomolecules in vegetable organisms

#### 3.1. Neurotoxins

Anatoxin-a is a potent postsynaptic depolarizing neuromuscular blocking agent that affects both nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors (Carmichael et al., 1979; Spivak et al., 1980). It acts as a depolarizing neuromuscular blocking agent mimicking the action of acetylcholine. However, this neurotoxin is not degraded by the acetylcholinesterase, and consequently its action on the muscular cells does not stop and, due to being stimulated, these cells are blocked and thereby resulting to muscle paralysis (Carmichael, 1994; Lilleheil et al., 1997). When the respiratory muscles are affected, the insufficient oxygenation of the brain engenders convulsions and the oppression (Carmichael, 1994; Humpage et al., 1994). The LD<sub>50</sub> (lethal dose resulting in 50% deaths) of this neurotoxin is 200 µg kg<sup>-1</sup> (mouse, i.p.) (Carmichael et al., 1979; Skulberg et al., 1992). Homoanatoxin-a is a homologue of anatoxin-a, that was reported to be a potent nicotinic agonist (Wonnacott et al., 1992). It enhances the release of acetylcholine from peripheral cholinergic nerves through opening of endogenous voltage dependent neuronal L-type calcium channels (Aas et al., 1996; Lilleheil et al., 1997). Despite the similarity in their names, anatoxin-a(s) and anatoxin-a are not structurally related and exhibit different physiological properties. Anatoxin-a(s) belongs to the organophosphate class of neurotoxins and it acts as an irreversible inhibition of acetylcholinesterase at the nerve synapse (Mahmood and Carmichael, 1986, 1987). The LD<sub>50</sub> (mouse, i.p.) of this toxin is about 20–40 µg kg<sup>-1</sup> (Mahmood and Carmichael, 1987; Matsunaga et al., 1989; Carmichael et al., 1990). In animals, the mechanisms of action of PSP toxins (saxitoxins) are based on the blockage of sodium conductance in axons (Kao et al., 1967; Henderson et al., 1973). They so inhibit the trans-

mission of the electric activity and prevent the liberation of the acetylcholine (Nishiyama, 1968). Their toxicity is more important than that of anatoxins with a LD<sub>50</sub> (mouse, i.p.) in the same conditions for the saxitoxin of 10 µg kg<sup>-1</sup> (Gorham and Carmichael, 1988). Saxitoxins can also bind to calcium (Ca<sup>2+</sup>) and K<sup>+</sup> channels, interfering with the speed of opening and closing of these channels, which can in turn lead to alteration in the influx of ions to the cell (Wang et al., 2003; Su et al., 2004). In addition, the Na<sup>+</sup>-channel blockage may alter the selective permeability of the membrane and may change the flow of ions, leading to damage to cellular homeostasis (Hille, 1992; Jablonski et al., 2007). Concerning the neurotoxic amino acid (BMAA), it acts in mammals as a glutamate agonist at AMPA, kainite and NMDA receptors (Spencer et al., 1986, 1987; Andersson et al., 1997; Seawright et al., 1999). Consequently, it increases the intracellular concentration of calcium in neurons and induces neuronal activity by hyperexcitation (Brownson et al., 2002). To our knowledge, no data regarding the toxicity of cyanobacterial neurotoxins in higher plants have been reported. However, interfering of some of them such as saxitoxins with the speed of opening and closing of Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> channels could modify ions transport in plant cells. For example, a modification of sodium signals can modify osmotic pressure in cells or the assimilation of CO<sub>2</sub> for C4 plants (Brownell and Crossland, 1972). While sodium extrusion in animal cells and microorganisms (including yeast) is directly energized by ATP hydrolysis (Na<sup>+</sup>-ATPases), these Na<sup>+</sup> pumps are absent from higher plants (Horie and Schroeder, 2004).

#### 3.2. Hepatotoxins

Cyanobacterial hepatotoxins type microcystin-LR are generally not able to penetrate vertebrate cell membranes and therefore, require uptake via the bile acid transport system present in hepatocytes and cells lining the small intestine (Runnegar et al., 1991). As a result of this, toxicity of these cyanotoxins is restricted to organs expressing the organic anion transporter on their cell membranes such as the liver (Fischer et al., 2005). However, in vegetable cells one relatively unexplored question regarding these toxins concerns the mechanism of uptake, particularly the variants that would be predicted to be membrane impermeable based on polarity. They may cross cell membranes of plants by other mechanisms, including diffusion or by root absorption. Pflugmacher et al. (2001) have been reported that when the emergent reed plant *P. australis* was exposed to 0.5 µg of <sup>14</sup>C-labeled microcystin-LR L<sup>-1</sup> for 3 d, it demonstrated a rapid uptake (since 0.5 h) of the toxin. The main uptake route appeared to be in the stem and rhizome, from which the toxin is transported into the higher parts of the plant to the leaves. Uptake directly through the leaves may also occur by direct contact of small plants or by the lowest leaves of a plant with surface water and with upper leaves by wave and spray contact (Pflugmacher et al., 2001). Once in both vertebrate and vegetable cells, microcystins and nodularins have been shown to be potent and specific inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A, and this inhibition accounts for their extreme toxicity (MacKintosh et al., 1990; Kurki-Helasma and Meriluoto, 1998; Hastie et al., 2005). Those proteins are involved in several physiological and molecular processes in higher plants (Sheen, 1993; Takeda et al., 1994). Indeed, numerous studies reported that microcystins have several perturbatory effects on plant physiology and metabolism, when sufficient levels of toxin enter the plant cells (MacKintosh et al., 1990; Siegl et al., 1990; Sheen, 1993; Yamasaki, 1993; Smith et al., 1994; Takeda et al., 1994; Abe et al., 1996; Smith, 1996; Kurki-Helasma and Meriluoto, 1998; Weiss et al., 2000; McElhiney et al., 2001; Pflugmacher, 2002; Romanowska-Duda and Tarczyńska, 2002; Gehringer et al., 2003; Chen et al., 2004, 2011; Mitrovic et al., 2005; Saqrane et al., 2007, 2008; Stüven and Pflugmacher, 2007; Järvenpää et al.,

2007; Jang et al., 2007; Peuthert et al., 2008; Máthé et al., 2009; Huang et al., 2009; El Khaloufi et al., 2011, 2012; Jámbrik et al., 2011; Perron et al., 2012). On the other hand, several studies have also reported that these hepatotoxins induce oxidative stress in mammal cells (Žegura et al., 2003; Botha et al., 2004; Bouaicha and Maatouk, 2004; Puerto et al., 2010). Therefore, their toxicity on aquatic plants seems to be also more linked to the induction of oxidative stress manifested by elevated reactive oxygen species (ROS) production and malondialdehyde (MDA) content (Lefevre et al., 1950; Pflugmacher, 2004; Hu et al., 2005; Leflaive and Ten-Hage, 2007).

### 3.3. Cytotoxins

The alkaloid cylindrospermopsin (CYN) is known as a general cytotoxin that blocks protein synthesis in mammal cells (Runnegar et al., 1995; Froschio et al., 2001, 2003). Implications of this effect can be also observed in vegetable cells. In fact, Froschio et al. (2008) reported that CYN was shown to inhibit the eukaryotic protein synthesis apparatus with similar potency in plant and mammalian cell extracts, IC50 of 334 nM in wheat germ extract and 110 nM in reticulocyte lysate. Metcalf et al. (2004) also showed that CYN inhibited pollen germination in tobacco plants (*Nicotiana tabacum*), with partial inhibition of protein production in the germinating pollen tubes following exposure to 138  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of toxin.

## 4. Environmental concentrations of cyanotoxins in freshwaters and fate in aquatic and soil ecosystems

### 4.1. Environmental concentrations of cyanotoxins

The occurrence of cyanobacterial toxins was reported throughout the world in surface waters, where hepatotoxic microcystins are more commonly found in 50–75% cyanobacterial blooms (Ettoumi et al., 2011). Data on environmental concentrations of cyanotoxins have been compiled and reviewed in numerous papers (Sivonen and Jones, 1999; Falconer and Humpage, 2006; Van Apeldoorn et al., 2007; Messineo et al., 2009). In this review, we give a summary on environmental concentrations focusing on irrigation waters with the ultimate aim to relate them to phytotoxicological data. Cyanotoxins are intracellular toxins contained within living cells, depending on both the nature of the toxin and the growth stage (Jungmann et al., 1996; Orr and Jones, 1998; Park et al., 1998a,b; Sivonen and Jones, 1999). They are only released into the water, to form dissolved toxin, during cell senescence or cell death and lysis or through water treatment processes such as algaecide application, rather than by continuous excretion (James and Fawell, 1991; Gupta et al., 2001; Babica et al., 2006). The highest total (intracellular plus dissolved) cyanotoxin levels have been found in blooms and scums. For example, total MC concentrations in surface waters vary from trace to several milligrams per liter, being strongly influenced by the occurrence of these forms of cyanobacterial biomass. In surface waters used as irrigation source, total MC concentrations of 4–50  $\mu\text{g L}^{-1}$ , up to 6500  $\mu\text{g L}^{-1}$ , have been reported in multiple locations, including but not limited to the Morocco (Oudra et al., 2001), Tunisia (El Herri et al., 2008), India (Prakash et al., 2009), Turkey (Gurbuz et al., 2009), and Finland (Spoof et al., 2003), but much higher levels up to 29000  $\mu\text{g L}^{-1}$  in Algeria (Nasri et al., 2008) (Table 1). It should be noted, however, that these very high concentrations of cyanotoxins would be from scums or from very dense cyanobacterial biomass. In the field, water samples with more than 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  total MCs, dissolved fraction did not comprise more than 10% of the combined intra and extracellular pool (Lindholm and Meriluoto, 1991; Jones and Orr, 1994; Tsuji et al., 1996; Ueno et al., 1996;

Lahti et al., 1997). As well in some laboratory studies, where both intracellular and extracellular cyclic peptide toxins and STXs have been measured, it is generally the case that in healthy log phase cultures, less than 10–20% of the total toxin pool is dissolved in the culture medium (Sivonen et al., 1990; Lehtimäki et al., 1997; Negri et al., 1997; Rapala et al., 1997). On the contrary, CYN may often be found at higher levels in dissolved form than within cells, as it readily leaks from cells under normal growth conditions (Norris et al., 2001; Falconer and Humpage, 2006; Wörmer et al., 2008). For example, Shaw et al. (1999) found that in two instances of *A. ovalisporum* blooms around 80% of the total toxin content of the water was in free solution. Recently, Messineo et al. (2009) reported that in several Italian lakes of different characteristics and human uses, extracellular concentrations of total CYN varied from non-detectable values up to 126  $\mu\text{g L}^{-1}$ . However, limited or no information is available about the proportion of dissolved form with respect to the total level for the cyanobacterial neurotoxins.

### 4.2. Fate in aquatic and soil ecosystems

Once they enter in aquatic and soil ecosystems, cyanotoxins can be removed according to various processes such as photochemical degradation by UV, adsorption in particles in suspension or onto sediments, and biodegradation (Tsuji et al., 1994; Rapala et al., 1994; Lahti et al., 1996; Chiswell et al., 1999; Welker and Steinberg, 1999; Kaebnick and Neilan, 2001; Mazur-Marzec et al., 2006; Wörmer et al., 2008; Burns et al., 2009; Klitzke et al., 2010, 2011; Thirumavalavan et al., 2012). However, the four groups of cyanotoxins: hepatotoxins, neurotoxins, cytotoxins, and dermatotoxins, exhibit quite different chemical stabilities in these ecosystems. Hepatotoxin cyclic peptide cyanotoxins, microcystins and nodularins, are extremely stable compounds and may persist in aquatic systems for weeks after being released from the cells (Jones and Orr, 1994; Chen et al., 2008; Edwards et al., 2008). According to other studies, these toxins in natural conditions could persist for several months or years (Harada et al., 1996; Sivonen and Jones, 1999). However, numerous studies reported that photochemical degradation by sunlight UV and exposure to degrading bacteria may speed up their removal from the water (Bourne et al., 1996; Heresztyn and Nicholson, 1997; Sivonen and Jones, 1999; Park et al., 2001; Song et al., 2009; Ho et al., 2012). The photodegradation of MCs in full sunlight can take as little as two weeks or longer than six weeks, depending on the presence of water-soluble cell pigments (Tsuji et al., 1994; Welker and Steinberg, 2000). More recently, Thirumavalavan et al. (2012) showed in a laboratory experiment that the presence of humic acid and turbidity affected the photo-degradation process. Additionally, in sea water the rate of nodularin photolysis can be accelerated by the presence of some cell components and humic substance (Welker and Steinberg, 1999). Conversely, during the benthic phase, the photodegradation of these cyanotoxins is expected to be almost negligible due to low radiation penetration (Wörmer et al., 2010). In fact, Welker and Steinberg (2000) found that the half-life of MCs in the deep lakes is longer than the season of cyanobacteria growth, what suggests that the photolysis is significant only for shallow lakes. The alkaloid cytotoxin, CYN, is relatively stable in the dark; however, in sunlight and in the presence of cell pigments degradation occurs quite rapidly with more than 90% within 2–3 d (Chiswell et al., 1999). The neurotoxin, anatoxin-a, is also relatively stable in the dark, but it undergoes rapid photochemical degradation in sunlight particularly in alkaline conditions, even in the absence of cell pigments (Stevens and Krieger, 1991; Smith and Sutton, 1993). However, no data are available for other cyanobacterial neurotoxins and LPS dermatotoxins.

Cyanotoxins can also be retained on suspended particles or onto sediments in aquatic systems. Wörmer et al. (2011) showed the

**Table 1**Overview of some published cyanobacterial toxin concentrations from various countries. Concentrations are presented in  $\mu\text{g g}^{-1}$  dry weight (DW) or else in  $\mu\text{g L}^{-1}$  as indicated.

Country	Location	Use	Type	Concentrations ( $\mu\text{g L}^{-1}$ or $\mu\text{g g}^{-1}$ dw <sup>-1</sup> )	Reference
Algeria	L. Oubeira	□	microcystin-LR	3–29,163	Nasri et al. (2008)
Argentina	R. San Roque	\$, £	microcystin-LR	920	Conti et al. (2005)
	–	–	microcystin-LR	48.6	Giannuzzi et al. (2011)
Australia	R. of drinking water	\$	saxitoxin	30	Orr et al. (2004)
	L. Julius	\$, £, □	cyliospermospin	$2 \times 10^6$	Saker and Griffiths (2001)
	R. Cania	\$, £, □	cyliospermospin	18.9	McGregor and Fabbro (2000)
	L. Cobaki Village	\$, £, □	cyliospermospin	101.4	Everson et al. (2011)
	Narrung Channel	\$	nodularin-R	1.6	Herezstyn and Nicholson (1997)
	L. Coolmunda	£	microcystin-LR	12	Stewart et al. (2006)
	L. Wivenhoe	£	cyliospermospin	1–2	
Brazil	L. Bolonha	\$	microcystin	1.25	Vieira et al. (2005)
	Sao Paulo	\$, £	microcystin	0.5–100	Nobre (1997)
	Parana	\$	microcystin	0.2–6.6	Hirooka et al. (1999)
	D. Itaipu	£	microcystin	6.4–10	
	R. Tapacura	\$	saxitoxin	52	Molica et al. (2005)
	R. Armando Ribeiro Goncalves	\$	microcystin-LR	8.8	Costa et al., 2006
			saxitoxin	3.14	
China	R. Haimen	\$	microcystin-LR	1,556	Ueno et al. (1996)
	L. Taihu	\$, £, □	microcystin-LR	34.2	Liu et al. (2011)
Denmark	L. Knud so	–	homoanatoxin-a	2,300 <sup>†</sup>	Henriksen (1996)
		–	homoanatoxin-a	800 <sup>†</sup>	
		–	homoanatoxin-a	60 <sup>†</sup>	
	L. Ravn so	–	homoanatoxin-a	2,300 <sup>†</sup>	
	L. Salten Langso	–	homoanatoxin-a	20 <sup>†</sup>	
	L. Agerso	–	saxitoxin	37 <sup>†</sup>	Kaas and Henriksen (2000)
	L. Bastrup so	–	saxitoxin	6.4 <sup>†</sup>	
	L. Hvidesø	–	saxitoxin	85.1–182.5 <sup>††</sup>	
	L. Vissiggaard so	–	saxitoxin	224.1 <sup>†</sup>	
Finland	Prästräsket	\$, £, □	microcystin-LR	42	Spooft et al. (2003)
	Södra Slemmern	\$, £, □	nodularin-R	0.2	
	Högskär	\$, £, □	nodularin-R	0.5	
France	La Loue	£	anatoxin-a	8,000 <sup>†</sup>	Gugger et al. (2005)
	L. Champs-sur-marne	£	saxitoxin	4.8–6.7	Ledreux et al. (2010)
Germany	20 water bodies	£	anatoxin-a	0.39–6.7	Bumke-Vogt et al. (1999)
	55 water bodies	–	microcystin-LR	10	Fastner et al. (1999)
		£	microcystin-LR	36	Ueno et al. (1996)
	Berlin water bodies	£	microcystin-LR	0.14–119	Fromme et al. (2000)
Greece	33 water bodies	–	microcystin-LR	50–1,600 <sup>†</sup>	Cook et al. (2004)
Ireland	L. Caragh	\$, £	anatoxin-a	112–444	James et al. (1997)
		\$	homoanatoxin-a	1.4	Furey et al. (2003b)
	L. Lough Sillan	\$	homoanatoxin-a	24	Furey et al. (2003a,b)
	R. Innincarra	\$	homoanatoxin-a	34	Furey et al. (2003b)
	L. Lough Key	\$	homoanatoxin-a	12	
	L. Corbally	\$, £	anatoxin-a	60–100 <sup>†</sup>	James et al. (1997)
Italy	R. Monteleone	\$	microcystin	226	Messineo et al. (2009)
	L. Albano	£	cyliospermospin	126	
Japan	L. Inbanuma	\$, £	microcystin	52	Ueno et al. (1996)
	L. Suwa	–	microcystin	3.61	Park et al. (1998a,b)
Kenya	L. Baringo	□	anatoxin-a	0.05–0.21	Ballot et al., 2004
	L. Nakuru	–	anatoxin-a	5–223	
	L. Baringo	□	anatoxin-a	0.05–0.21 <sup>†</sup>	Ballot et al. (2003)
	L. Bogoria	–	anatoxin-a	10–18 <sup>†</sup>	Krienitz et al. (2003)
		–	anatoxin-a	0.3–9 <sup>†</sup>	Ballot et al. (2004)
	L. Simbi	–	microcystin-LR	19.7–39	Ballot et al. (2005)
	L. Sonachi	–	microcystin-LR	1.6–12 <sup>†</sup>	
	L. Norivasha	\$, □	microcystin-LR	0.041	Krienitz et al. (2013)
Morocco	R. Lalla takerkoust	\$, £, □	microcystin	73 <sup>†</sup>	Oudra et al. (2001)
		□	microcystin	95.4	El Ghazali et al. (2011)
Netherlands	L. 't Joppe	\$, £	microcystin-LR	2.5	Kardinaal et al. (2007)
	L. Volkerak	\$, £	microcystin-LR	7	
	L. Kinselmeer	\$, £	microcystin-LR	18	
New Zealand	L. Waitawa	–	microcystin-LR	28,000	Wood et al. (2006b)
	L. Horowhenua	–	microcystin-LR	16,291	
	L. Ngaroto	–	microcystin-LR	1,535	
	L. Taupo	–	microcystin-LR	708	
	Neuma Pond	–	microcystin-LR	22,58	
	L. Rotoiti	□	microcystin-LR	10–760	Wood et al. (2006a)
	L. Rotoehu	□	microcystin-LR	23	
Portugal	–	\$, £	microcystin	13.7	Ueno et al. (1996)
Poland	R. Sulejow	\$, £	microcystin-LR	1.17	Gagala et al. (2010)
	L. Bninskie	£	microcystin-LR	1.87	
S. Africa	D. Nhanganzwane	–	microcystin	23,718	Oberholster et al. (2009b)
	D. Makhohlolo	–	microcystin	0.317	
	L. Krugersdrift	–	microcystin	43.7	Oberholster et al. (2009a)

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Country	Location	Use	Type	Concentrations ( $\mu\text{g L}^{-1}$ or $\mu\text{g g}^{-1}$ dw <sup>a</sup> )	Reference
S. Korea	R. Younglang	£	anatoxin-a	417 <sup>b</sup>	Park et al. (1998b)
	Jangsong	\$	anatoxin-a	1444 <sup>b</sup>	
Serbia	L. Ludös	\$, £	microcystin-LR	362.68	Svirčev et al. (2007) Svirčev et al. (2009)
	R. Celije		microcystin-LR	650	
Spain	R. Santillana	\$	microcystin	9.99–55.02	Carrasco et al. (2006)  Aboal and Puig (2005)
	R. Valmayor	\$	microcystin	1.2	
	R. Picadas	\$	microcystin	1.3	
	R. Oros	£, □	microcystin	1.6 <sup>c</sup>	
	R. Cenajo	□	microcystin	3 <sup>c</sup>	
	D. Lebna	□	microcystin-LR	5.485	
Tunisia	L. Kovada	\$, £, □	microcystin-LR	0.73–48.5	El Herry et al. (2008)
Turkey	L. Kovada	\$, £, □	microcystin-LR	0.73–48.5	Gurbuz et al. (2009)
	L. Pinto	£	microcystin-LR	100	Miller et al. (2010)
United States	San Francisco estuary	□	microcystin-LR	0.02	Lehman et al. (2007)
	L. Doctors	£	microcystin-LR	1	Stewart et al. (2006)
	L. Seminole	£	anatoxin-a	1	
	–	–	cyndrospermospin	100	Falconer and Humpage 2006
	St Johns river	£	microcystin-LR	0.1–31	Williams et al. (2007)
	–	–	cyndrospermospin	0.07–1.6	
	L. Bufalo Springs	£	microcystin-LR	0.41–1.78	Billam et al. (2006)
	L. Ransom Canyon	£	microcystin-LR	0.44–1.08	

About location: L. for lake, R. for reservoir, D. for dam. About use of water: (\$) for drinking supply, (£) for recreational activities, and (□) for agriculture (irrigation and pasture) and aquaculture. "–" absence of information.

<sup>a</sup> Concentrations are presented in  $\mu\text{g g}^{-1}$  dry weight.

great importance of sedimentation processes in the fate of MCs in freshwaters with an amount of toxin associated to settling particles to be in the range of  $\text{mg d}^{-1} \text{m}^{-2}$ . But other studies reported that no more than 20% of toxins can be adsorbed on sediments (Rapala et al., 1993; Lahti et al., 1996). Furthermore, it was suggested that the removal of cyanotoxins in this process was the result of both adsorption and biodegradation (Lahti et al., 1996). Therefore, biodegradation would appear to be the main fate for most cyanotoxins in aquatic systems and the relative performance of this process would be very site specific and dependent upon local sediment characteristics and microbial activity. It was recently reported that the data generated in laboratory and field studies strongly indicate that, in shallow lakes, low persistence and natural eliminations of MCs are due to biodegradation; suggesting that sediments play a crucial role in biodegradation by continuously supplying toxin-degrading bacteria to the water column (Chen et al., 2008, 2010; Mazur-Marzec et al., 2009). However, in deep sediments, biodegradation might be limited due to anoxic conditions (Holst et al., 2003; Grützmacher et al., 2002, 2010) and sediments only bring nutrients for bacteria responsible of cyanotoxins biodegradation. Degradative heterotrophic bacteria of hepatotoxic cyanotoxins (MCs and NOD), and cytotoxins (CYN) have been found in various media, such as water columns (Jones and Orr, 1994; Cousins et al., 1996; Christoffersen et al., 2002; Hyenstrand et al., 2003; Lemes et al., 2008; Mazur-Marzec et al., 2009; Chen et al., 2010), sediments (Rapala et al., 1994; Holst et al., 2003), sewage effluents (Lam et al., 1995) or soils (Miller et al., 2001; Grützmacher et al., 2002), with specific enzymatic pathways well characterized (Bourne et al., 1996; Okano et al., 2009; Zhang et al., 2010). Several previous studies have been indicated that MCs can be degraded by aquatic bacteria identified as pertaining especially to the genus *Sphingomonas* (Bourne et al., 1996; Harada et al., 2004; Ishii et al., 2004; Maruyama et al., 2006; Manage et al., 2009). Therefore, a microcystin-degrading gene cluster, *mtrA*, B, C and D was identified in these microorganisms, sequenced and the degradation process was proposed (Bourne et al., 2001; Saito et al., 2003; Imanishi et al., 2005). In the last two decades, several other species of bacteria capable of degrading peptidic cyanotoxins were identified, *Sphingomonas* sp. strain ACM-3962 (Jones et al., 1994), *Paucibacter toxinivorans* (Rapala et al., 2005), *Sphingosinicella microcystinivorans* (Maruyama et al., 2006), *Burkholderia* sp. (Lemes et al., 2008). The most toxic congener, Microcystin-LR, was also

found susceptible to breakdown by *Sphingomonas*, which initiated ring-opening and the production of a linear compound 200 times less toxic (Bourne et al., 1996). Recently, Ho et al. (2012) identified another bacterium strain (TT25) whose genome is similar to *Sphingopyxis* sp. that it is able to degrade MCs. The ability of these all species to degrade other congeners of MCs and NODs was investigated and revealed that peptides with the Adda-Arginine bond were successfully degraded while MC-LF, with Adda-Phenylalanine bond and 6(z)-Adda-MC-LR and 6(z)-Adda-MC-RR were not significantly degraded (Imanishi et al., 2005). Another Japanese *Sphingomonas* isolate, 7CY, was shown to degrade a wider range of MCs, including MC-LR, -RR, -LY, -LW, and -LF but it was unable to degrade NOD-Har a NOD analog where arginine is replaced by homo-arginine (Ishii et al., 2004). Biodegradation has also been shown to be an important process for the removal of the alkaloid cytotoxin, CYN, from contaminated water (Chiswell et al., 1999; Senogles et al., 2002). By contrast, a laboratory study investigating biodegradation of CYN with bacterial communities from two water bodies in Spain, one having frequent exposure to CYN, the other rarely, has been shown that biodegradation of this toxin by an active microbial community does not take place during a 40-d (Wörmer et al., 2008). A recent study demonstrated that CYN was degraded by indigenous microbial flora in waters with a history of *Cylindrospermopsis* blooms (Smith et al., 2008). Despite isolation of many bacteria from CYN enriched cultures, only a single isolate (*Delftia* sp.) capable of degrading CYN has been obtained (Smith, 2005). However, for cyanobacterial neurotoxins there are few reports on their persistence and biodegradation compared to cyanobacterial hepatotoxins, although the increasing occurrence of these toxins in surface waters. A recent study indicated that saxitoxins (STXs) are predisposed to bacterial degradation during passage through bioactive treatment plant (Kayal et al., 2008). However, this study showed that structural modification during the biological treatment resulted to decrease of the predominant C-toxins variants and an increase in GTX2 and GTX3 which are more toxic than the C-toxins. Early work by Kiviranta et al. (1991) reported the isolation of a *Pseudomonas* sp. capable of rapid degradation of anatoxin-a, with a rate of  $6\text{--}30 \text{ mg mL}^{-1}$  per 3 d. A later study reported by Rapala et al. (1994) has been shown the removal of anatoxin-a by microbial populations isolated from water and sediments of a eutrophic, oligotrophic, and humic lake. In conclusion, the period of photodegradation of cyanotoxins is relatively long in

comparison to the degradation caused by the microbial activity. Recently, Hu et al. (2012) found that the *Bacillus* sp. strain EMB is able to completely remove  $2.99 \text{ mg L}^{-1}$  of MC-RR and  $2.15 \text{ mg L}^{-1}$  of MC-LR within 24 h. However, the biodegradation speed of cyanotoxins in aquatic ecosystems can be influenced by the initial concentration and nature of toxins (Edwards et al., 2008; Ho et al., 2012) and by additional factors such as the water temperature (Park et al., 2001; Ho et al., 2007a,b; Smith et al., 2008; Hoefel et al., 2009) and the bacterial community composition within the water body; not only the types of organisms present, but also their abundance (Hoefel et al., 2009; Ho et al., 2012). Hoefel et al. (2009) have demonstrated a direct relationship between the abundance of degrading organisms and the rate of degradation of MC-LR. Furthermore, although MCs are degraded by most of bacteria species, it seems that a lasting day's delay or weeks are necessary before the degradation is introduced. This result was in agreement with the conclusion of Hyenstrand et al. (2003) indicating that bacteria species have to adapt themselves at first to the cyanobacteria metabolites before the degradation of MCs becomes effective. Indeed, the results of this last study indicate a weaker degradation of the MC-LR in May compared with September where the occurrence of cyanobacteria is higher. Similarly, Smith et al. (2008) found that CYN was degraded by indigenous microbial flora in waters with a history of *Cylindrospermopsis* blooms.

The physicochemical fate and the environmental concentrations of cyanotoxins in soil have been the subject of a range of recent studies. Several classes of these toxins have been detected in field soils, and the sorption behavior and degradation and transfer to vegetables have been studied to a large extent (Morris et al., 2000; Miller et al., 2001; Chen et al., 2006b; Bibo et al., 2008; Sathishkumar et al., 2011). The use of water from sources containing cyanobacterial blooms and toxins for spray irrigation of terrestrial plants, including food crop plants presents both a harmful effect on growth and development of plants and on soil ecosystems and potential health hazards through several exposure routes, including uptake into the food chain and accumulation of toxins on the external surfaces of edible plant material. Questions, therefore, arise about the persistence of total cyanotoxins (dissolved and within the cyanobacterial cells) when reach the soil ecosystem to produce phytotoxic effects. Once reach the soil ecosystem, cyanotoxins persist in the environment, depending on the efficiency of degradation (i.e., photolysis, hydrolysis and bacterial degradation). Microcystins can persist in agriculture soils for relatively long times, with a half-life ranging between 6 and 17.8 d (Chen et al., 2006b). Jones et al. (1995) reported that scums of *M. aeruginosa* that dry on the shores of lakes may contain high concentrations of MCs for several months. Recently, Metcalf et al. (2012) found that MCs were detected in herbarium specimens of cyanobacteria which had been collected from aquatic and terrestrial environments in 11 countries throughout the world, dried, and stored at ambient temperatures in the dark for up to 170 years. Microcystins were also detected by HPLC and ELISA assays in desert crust samples from Qatar at concentrations between  $1.5$  and  $53.7 \text{ ng g}^{-1}$  dry weight (Metcalf et al., 2012). Thus, the persistence of these toxins within dried cyanobacterial cells for long period suggests that they will be released back into the soil when re-immersed by irrigation water, particularly when cyanobacterial blooms are used in some countries as an organic fertilizer (Chen et al., 2006a,b). However, as mentioned above for aquatic ecosystems, adsorption on sediments and specially exposure to degrading bacteria may also speed up their removal from the soil.

The information on the adsorption of cyanotoxins in agriculture soil ecosystems is particularly scarce. However, adsorption of cyanobacterial hepatotoxins was measured in several batch studies to determine the applicability of bank filtration as an efficient removal strategy of these toxins from drinking water. For example, in batch experiments Miller et al. (2001) studied the adsorption of cyanobac-

terial hepatotoxins, MC-LR and NOD, in five soils with different physicochemical properties collected from regions around South Australia. They found that the soils with the high clay and/or organic carbon contents had the higher toxins adsorption coefficients. In similar experiments, Miller and Fallowfield (2001) found that the soils with the highest organic carbon content (2.9%) and the highest clay content (16.1%) were the most effective at removing these toxins in batch experiments. However, the sandy soil (98.5% sand) was incapable of the removal of cyanotoxins. This finding was supported by Morris et al. (2000) who reported that the clay content and its quality may be more important for the adsorption than other soil characteristics. However, Eynard et al. (2000) suggested that soil was unable to protect groundwater from cyanotoxins that originated from surface waters. Thus, it seems that cyanotoxins sorption in soils is low and could potentially result in their high bioavailability to soil organisms and plants. In several studies, it seems that the major dissipation process for cyanotoxins in soil ecosystems is mainly via microbial degradation (Miller and Fallowfield, 2001; Chen et al., 2006b). In fact, numerous soil bacteria as *Arthrobacter* sp., *Brevibacterium* sp. and *Rhodococcus* sp. are able to breakdown MCs (Manage et al., 2009). Bourne et al. (2001) observed the same thing with *Sphingomonas* sp. that possesses a gene cluster involved in the degradation of MC-LR. Furthermore, Falconer et al. (1983) and Lambert et al. (1996) conclude that sand filtration alone is unable to remove dissolved cyanotoxins. However, slow sand filters can be expected to remove 99% of dissolved cyanotoxins (Keijola et al., 1988; Grützmacher et al., 2002). This can be explained by the formation of a biofilm on top of the filter that it allows for some biodegradation of cyanotoxins in slow sand filtration. No data are available for other cyanobacterial toxins such as neurotoxins and dermatotoxins, but some degradation may be expected, again depending on the chemical conditions of soil. In conclusion, the scarce results on the fate of cyanotoxins in soil ecosystems are very variable, which do not allow affirming with certainty the necessary time for a complete disappearance of these toxins. This variability ensues partially from used methods (e.g. studies led in laboratory with non environmental concentrations of toxins and in free-soil systems). Therefore, the fate of cyanotoxins in soil ecosystems will require more studies before we are capable to formulate an opinion on their persistence and uptake into the food chain.

## 5. Phytotoxicity effects of cyanotoxins

The information on the effects of cyanotoxins on non-target organisms in the terrestrial environment is particularly scarce. However, despite the impressive amount of information on their toxicity on mammals compiled during the last two decades, there are still serious gaps in the knowledge about the phytotoxicity of these toxins. The phytotoxic effects of cyanotoxins on higher plants were firstly focused on aquatic photoautotrophic organisms (algae and macrophytes) that are naturally exposed to cyanotoxins (Harper, 1992; Papke et al., 1997; Weiss et al., 2000; Yu et al., 2000; Ikawa et al., 2001; Pietsch et al., 2001; Mitrovic et al., 2004; Ha and Pflugmacher, 2013). Since few years, scientists were also interested by the effect of these toxins on terrestrial plants because, irrigation waters from sources containing cyanobacterial blooms and toxins are generally used without treatment for spraying agricultural crops and plants that might, therefore, induce a food chain contamination with a considerable health risk and potential economic losses.

### 5.1. Neurotoxins

The cyanobacterial neurotoxins have not received more research attention than have cyanobacterial hepatotoxins. This is a consequence of the many livestock deaths caused by cyanobacte-

rial species producing hepatotoxic microcystins and their more widespread occurrence rather than species producing neurotoxins (Ettoumi et al., 2011). In addition, the recent inclusion of microcystin-LR as a toxic chemical in the World Health Organisation (WHO) drinking water guidelines has further accelerated investigation of the toxic effects of microcystins on mammals and vegetables rather than cyanobacterial neurotoxins. Therefore, there are only few studies reported in the literature on the effects of cyanobacterial neurotoxins on crops and plants. Mitrovic et al. (2004) were exposed the free-floating aquatic plant *L. minor* and the filamentous macroalga *Chladophora fracta* to anatoxin-a at 0.1–25  $\mu\text{g L}^{-1}$  under laboratory conditions for 4–7 d. They found in both organisms significantly increase of peroxidase activity after 4 d exposure at 25  $\mu\text{g L}^{-1}$  but not at lower concentrations. After 7 d exposure to this neurotoxin significant increase of GST activity and reduction of photosynthetic oxygen production were observed at 5 and 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  but not at lower concentrations in *L. minor*. In addition, Ha and Pflugmacher (2013) reported that this alkaloid neurotoxin at an environmentally relevant concentration (15  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), induced phytotoxic effects on the submerged aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum*, mediated by oxidative stress. Recently, Esterhuizen-Londt et al. (2011) investigated in *in vitro* study the effect of BMAA at different environmental concentrations (0.5, 1, 5, 50 and 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) for 24 h on the oxidative stress responses of the macrophyte *C. demersum*. The most pronounced effects found were activity-inhibiting effects on all the oxidative stress response enzymes at all exposure concentrations. However, enzymes not related to oxidative stress response were not affected by the BMAA in these experiments. For other neurotoxins, the literature search did not yield any results.

### 5.2. Hepatotoxins

The effects of cyanobacterial toxins on photoautotrophic organisms have been most intensively studied for MCs, in line with their abundance and their mode of action. First experiments were focused on the ability of these hepatotoxins to act as general allelopathic compounds against planktonic microalgae, macroalgae and macrophytes in aquatic ecosystems. The allelopathic effects of *Aphanizomenon* and other cyanobacteria bloom formers on chlorophyte species are early documented in several studies (Lefevre et al., 1950; Tassinigny and Lefevre, 1971; Boyd, 1973). Subsequently, Ikawa et al. (2001) and Papke et al. (1997) observed that cyanobacterial metabolites can induce the growth inhibition of the green alga *Chlorella pyrenoidosa* and the photosynthesis of other cyanobacteria species, respectively. Similarly, Sukenik et al. (2002) found that *Microcystis* sp., a MCs producer, severely inhibited the growth of the freshwater dinoflagellate *Peridinium gatunense* in mixed laboratory cultures which was attributed to the excretion of allelopathic substances rather than to successful competition for nutrients. Hu et al. (2005) found that the growth of *Synechococcus elongatus* was reduced by 53.6% after 6 d of exposure to 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  of MC-RR suggesting that oxidative stress manifested by elevated ROS levels and MDA contents might be responsible for the toxicity of MC-RR to this species. Moreover, Singh et al. (2001) demonstrated that MCs are strongly algicidal and point to the possibility that they may have an important role in establishment and maintenance of toxic blooms of *M. aeruginosa* in freshwater ecosystems. Valdor and Aboal (2007) demonstrated the inhibitory effect of both cyanobacterial extracts and pure MCs on the growth of microalgae. Bártoová et al. (2010) examined effects of semipurified *Microcystis* extract containing MCs (0.2–20 nM) on age-induced cell differentiation of the filamentous cyanobacterium *Trichormus variabilis* and they found that heterocyst and akinete formation was significantly decreased after exposure to extract containing 2 or 20 nM of MCs within 10 d of exposure. Recently, Perron et al.

(2012) evaluated the effect of four microcystins standards (variants MC-LF, -LR, -RR, -YR) at different concentrations (0.01–10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) and 0.01, 0.1, and 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  equivalent microcystins extracted from *Microcystis aeruginosa* (CPCC299), which is known to produce mainly MC-LR, on the fluorescence of four green algae (*Scenedesmus obliquus* CPCC5, *Chlamydomonas reinhardtii* CC125, *Pseudokirchneriella subcapitata* CPCC37 and *Chlorella vulgaris* CPCC111) and how they can affect the flow of energy through photosystem II. Their results showed that MCs affect the photosynthetic efficiency and the flow of energy through photosystem II from 0.01  $\mu\text{g mL}^{-1}$  within only 15 min and that MC-LF was the most potent variant, followed by MC-YR, -LR and -RR.

It was also noticed that in eutrophic freshwaters dominated by cyanobacteria, a decrease in species diversity and in the growth of macrophytes often occurs (Harper, 1992; Weiss et al., 2000; Yu et al., 2000; Pietsch et al., 2001). Casanova et al. (1999) found that the abundance and the variety of macrophytes are reduced in the presence of cyanobacterial blooms. In 1986, Kirpenko showed for the first time the inhibition growth of water plants *Elodea* and *Lemna* by MCs isolated from a natural bloom. This allelopathic action was recently confirmed by Weiss et al. (2000) further to the coculture of the plant *Lemna minor* with the cells of *M. aeruginosa*. Moreover, Pflugmacher (2002) revealed that MC-LR induces allelopathic effects on the aquatic macrophytes such as *C. demersum* and *Myriophyllum spicatum*, resulting in growth inhibition, reduction in photosynthetic oxygen production, and changes in pigment pattern. Jang et al. (2007) found by examining cyanobacterial toxin production in response to direct exposure to an axenically cultured aquatic plant (*Lemna japonica* Landolt) using two toxic monoclonal strains of *M. aeruginosa* Küzing (NIES strains 103 and 107) that reciprocal allelopathic responses have been observed between these two species *Microcystis* and *Lemna*. In several other studies, it occurred that MCs have the potential to exert toxic effects on growth and physiological processes, which all might be related to the inhibition of protein phosphatase activity or oxidative stress in aquatic moss (Wiegand et al., 2002) and in higher aquatic plants such as *Lemna gibba* (Saqrane et al., 2007), *Lemna* genus (Mitrovic et al., 2005), *L. japonica* (Jang et al., 2007), *Spirodela oligorrhiza* (Romanowska-Duda and Tarczyńska, 2002), *Phragmites australis* (Yamasaki, 1993; Máthé et al., 2009; Jámbrík et al., 2011), and *C. demersum* (Pflugmacher, 2004).

There are also several indications that terrestrial plants, including food crop plants, can be altered by MCs present in irrigation waters, resulting principally to their serine/threonine phosphatases inhibition and reactive oxygen species (ROS) production. Sheen (1993) found that the marine phycotoxin okadaic acid, a potent inhibitor of serine/threonine protein phosphatases like MCs, efficiently blocks chlorophyll accumulation induced by light in etiolated maize leaves. It seems also that this phycotoxin blocks root hair growth and alter cortical cell shape of *Arabidopsis thaliana* L. at 3 nM (Smith et al., 1994). Takeda et al. (1994) found that okadaic acid and MC-LR, inhibitors of protein phosphatases type 1 and 2A block the sugar-inducible gene expression in petioles of sweet potato *Ipomoea batatas*. Similarly, Siegl et al. (1990) reported that in *in vivo* these toxins prevented the light-induced activation of sucrose-phosphate synthase (SPS) that is generally activated by dephosphorylating by protein phosphatase 2A, and decreased sucrose biosynthesis and CO<sub>2</sub> fixation in spinach leaves. Yin et al. (2005) reported that MC-LR at 5 mg L<sup>-1</sup> is able to cause oxidative damage resulting in lipid peroxidation and decrease of glutathione GSH content and increases of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities on *A. thaliana* cells. Later, Stüven and Pflugmacher (2007) provide further evidence that cyanobacterial toxins as well as cyanobacterial crude extract containing MC-LR induce oxidative stress response in *Lepidium sativum* seedlings, manifested by lipid peroxidation, elevation of alpha- and beta-

tocopherol concentrations and elevated activities of antioxidative enzymes like the glutathione peroxidase, glutathione S-transferase and glutathione reductase. El Khalloufi et al. (2012) showed that 30 d exposure of *Lycopersicon esculentum* to a cyanobacterial crude extract containing 2.22–22.24  $\mu\text{g MCs mL}^{-1}$  caused enhancement on peroxidase activity and phenolic content indicated that the extract caused an oxidative stress. The exposure of rice plants (*Oriza sativa*) to toxic *M. aeruginosa* cyanobacterial extracts containing 50  $\mu\text{g MC-LR L}^{-1}$  resulted in a significant increase in the GST activity in leaves of this plant (Prieto et al., 2011). Therefore, by acting as protein phosphatase inhibitors and inducers of ROS production, MCs could be involved in several physiological and molecular processes in higher terrestrial plants.

### 5.3. Cytotoxic alkaloids

Cylindrospermopsin, a protein synthesis inhibitory cyanobacterial cytotoxin also led to a clear growth inhibition and anatomy modification through the alteration of microtubules organization of the common reed *P. australis* at concentrations 0.5–40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Beyer et al., 2009). Previous study demonstrated that CYN inhibited the growth of *Sinapis alba* mustard seedlings at 18.2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Vasas et al., 2002). Short term exposure of rice plants (*Oriza s.*) to toxic *A. ovalisporum* cyanobacterial extracts containing 0.13  $\mu\text{g CYN L}^{-1}$  can lead to an increase of oxidative stress (increase in GST and GPx activities). Moreover, longer exposure periods can lead to tissue necrosis (loss of tissue fresh weight) concomitant with the oxidative stress. In addition, the plant exposure to a mixture of *A. ovalisporum* and *M. aeruginosa* cell extracts containing 0.13  $\mu\text{g CYN L}^{-1}$  and 50  $\mu\text{g MC-LR L}^{-1}$ , respectively, resulted in a significant increase in the GST and GPx activities, suggesting a synergistic effect of both extracts (Prieto et al., 2011).

## 6. Bioaccumulation of cyanotoxins in vegetable foods and consequences on animals and human health

In aquatic ecosystems, several studies have been reported the bioaccumulation of cyanotoxins in common aquatic vertebrates and invertebrates, including zooplankton, mollusks and crustaceans, and fish, which pose a potential risk to both animal and human health if such aquatic animals are consumed (Ibelings and Chorus, 2007; Ettoumi et al., 2011). However, their ability to enter the food chain via agricultural crops has not been thoroughly investigated to date. Questions, therefore, arise about the health significance of spray irrigation of crops with water from sources containing cyanobacterial blooms and toxins. Nevertheless, several studies have been shown the accumulation potential of cyanotoxins in aquatic vegetable organisms, suggesting that terrestrial plants, including food crop plants, can also take up these toxins. Mitrovic et al. (2005) reported that the filamentous alga *C. fracta* accumulates MC-LR at a rate of 8  $\text{ng g}^{-1} \text{d}^{-1}$ . In addition, few amounts of MCs were detected in *C. vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda* cells only during the first 3 d of exposure, but not during the remaining period of the experiment, suggesting a possible biotransformation of MCs in these algae (Mohamed, 2008). The emergent reed plant *P. australis* showed an apparent distribution of MC-LR in the different parts of the plant, after exposure to this toxin at 0.5  $\mu\text{g L}^{-1}$  with highest uptake was detected in the stem and then the rhizome (Pflugmacher et al., 2001). In addition, *Lemna minor* has also been shown to accumulate MC-LR up to a concentration of  $0.2887 \pm 0.009 \text{ ng mg}^{-1}$  wet wt plant material, after 5 d of exposure to this toxin at 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  with an accumulation rate equivalent to 58  $\text{ng g}^{-1} \text{d}^{-1}$  (Mitrovic et al., 2005). However, Saqrane et al. (2007) reported that *L. gibba* could take up and biotransform microcystins. The chronic exposure of plant led to

dose-dependent MCs accumulation which reached 2.24  $\mu\text{g g}^{-1}$  dry weight after being exposed to 0.3  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of MCs (Saqrane et al., 2007). Recently, it has been shown that collected water chestnut (*Trapa natans*) from Lake Tai accumulated MCs at highest level up to 7.02  $\text{ng g}^{-1} \text{dw}$  (Xiao et al., 2009).

Terrestrial plants could be exposed to cyanobacterial toxins via the use of eutrophic water that may contain cyanobacterial blooms and toxins from irrigation and, therefore, they can take up cyanotoxins. Peuthert et al. (2007) have been reported that MC-LR could be absorbed by roots and be translocated from roots to shoots in seedlings of eleven agricultural plants. A second study by Crush et al. (2008) that used different species too, revealed a high level of MCs accumulation in lettuce (*L. sativa*) exceeding the tolerable daily intake of 0.04  $\mu\text{g kg}^{-1}$  of body weight  $\text{d}^{-1}$  recommended by the World Health Organization (Sivonen and Jones, 1999). However, the most of these studies have been performed in hydroponic conditions where the roots have been in direct contact with the toxin solutions and can, therefore, overestimate the bioaccumulation rate. In our knowledge the only study reported in the literature that was realized in soil showed that MC concentrations in roots did not exceed the tolerably limit, however, the concentration of MCs in aerial parts of the plant are not determined (Järvenpää et al., 2007). Both the roots and shoots of rice were reported to accumulate MC-LR in a laboratorial study (Chen et al., 2004). In addition, a recent study by Chen et al. (2012) reported for the first time the accumulation of MC-LR in rice grains harvested from Lake Taihu in China. However, the concentration of MC-LR detected in rice grains was very low and thus may not pose a threat to human health currently. In addition to the possibility of internal accumulation of MCs, irrigation may lead to accumulation of toxins on the external surfaces of edible plant materials when the contaminated water dries on the plant surface between irrigation periods or when the water becomes trapped in the centers of, for example, salad plants. In fact, Codd et al. (1999) have been reported that colonies and single cells of *M. aeruginosa* and microcystins were retained by salad lettuce after growth with spray irrigation water containing the microcystin-producing cyanobacteria. Recently, Kittler et al. (2012) reported that treatment of *Brassica oleracea* var. *sabellica*, *Brassica juncea*, and *S. alba* under varying experimental conditions showed significant CYN uptake, with CYN levels ranging from 10% to 21% in the leaves compared to the CYN concentration applied to the roots (18–35  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). These results suggest that crop plants irrigated with CYN-containing water may represent a significant source of this toxin within the food chain. However, further research is needed into the uptake and fate of microcystins and other cyanobacterial toxins by food plants and the persistence of these toxins in the edible plant materials.

## 7. Conclusion and future directions

This review has established that cyanobacterial cells and toxins can be associated with crop plants after spray irrigation with water containing these agents. Therefore, the use of water from sources containing cyanobacterial blooms and toxins for spray irrigation of crop plants may not only inhibit growth of plants, but also can induce a food chain contamination with a considerable health risk and potential economic losses. Several studies have been shown that cyanotoxins could be absorbed by roots, transported to shoots, and then be translocated to grains and/or fruits. Nevertheless, the concentration of MC-LR detected, for example, in rice grains was very low and thus may not pose a threat to human health currently. Cyanotoxins could be partially metabolized during the long distance transportation from roots to grains or fruits, which may resulted in the lower level of cyanobacterial hepatotoxins type

microcystins detected in rice grains. In addition, MCs could bind to serine/threonine phosphatases during transport and thus could also affect their accumulation in grains and fruits. Therefore, further investigations are needed into the uptake and fate of microcystins and other cyanobacterial toxins by food plants during the totally period of vegetative and fruit development.

However, there are gaps remaining concerning information on the future of cyanotoxins in soil in term of speciation, persistence, mode of degradation and impact on biological life in soils. The results of many existing tests and particularly laboratory studies on phytotoxicity of cyanotoxins are done in soil-free systems and using non realistic environmental concentration of toxins. Therefore, they are difficult to compare to field studies because both abiotic (e.g., soil conditions) as well as biotic (composition of the degrading biological community) factors can influence the outcome of such studies. In order to assess the relevance of phytotoxicity of cyanotoxins and their bioaccumulation in crop plants in the terrestrial environment, further research seems thus appropriate.

### Acknowledgement

The research was supported with a Grant to S. Corbel from Région Ile-de-France, DIM-ASTREA program No ast110055.

### References

- Aas, P., Eriksen, S., Kolderup, J., Lundy, P., Haugen, J.E., Skulberg, O.M., Fonnum, F., 1996. Enhancement of acetylcholine release by homoanatoxin-a from *Oscillatoria formosa*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2, 223–232.
- Abe, T., Lawson, T., Weyers, J.D.B., Codd, G.A., 1996. Microcystin-LR inhibits photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* primary leaves: implications for current spray irrigation practice. *New Phytol.* 133, 651–658.
- Aboal, M., Puig, M.-A., 2005. Intracellular and dissolved microcystin in reservoirs of the river Segura basin, Murcia, SE Spain. *Toxicol. Off. J. Int. Soc. Toxicology* 45, 509–518.
- Andersson, H., Lindqvist, E., Olson, L., 1997. Plant-derived amino acids increase hippocampal BDNF, NGF, c-fos and hsp70 mRNAs. *NeuroReport* 8, 1813.
- Aráoz, R., Molgó, J., Tandeau de Marsac, N., 2010. Neurotoxic cyanobacterial toxins. *Toxicol.* 56, 813–828.
- Babica, P., Bláha, L., Maršálek, B., 2006. Exploring the natural role of microcystins—a review of effects on photoautotrophic organisms. *J. Phycol.* 42, 9–20.
- Ballot, A., Pflugmacher, S., Wiegand, C., Kotut, K., Krienitz, L., 2003. Cyanobacterial toxins in Lake Baringo, Kenya. *Limnologia* 33, 2–9.
- Ballot, A., Krienitz, L., Kotut, K., Wiegand, C., Metcalf, J.S., Codd, G.A., Pflugmacher, S., 2004. Cyanobacteria and cyanobacterial toxins in three alkaline Rift Valley lakes of Kenya—Lakes Bogoria, Nakuru and Elmenteita. *J. Plankton Res.* 26, 925–935.
- Ballot, A., Krienitz, L., Kotut, K., Wiegand, C., Pflugmacher, S., 2005. Cyanobacteria and cyanobacterial toxins in the alkaline crater lakes Sonachi and Simbi, Kenya. *Harmful Algae* 4, 139–150.
- Banack, S.A., Cox, P.A., 2003. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins in flying foxes. Implications for ALS-PDC in Guam. *Neurology* 61, 387–389.
- Banack, S.A., Johnson, H.E., Cheng, R., Cox, P.A., 2007. Production of the neurotoxin BMAA by a marine cyanobacterium. *Mar. Drugs* 5, 180–196.
- Bártová, K., Hilscherová, K., Babica, P., Maršálek, B., 2010. Extract of *Microcystis* water bloom affects cellular differentiation in filamentous cyanobacterium *Trichormus variabilis* (Nostocales, Cyanobacteria). *J. Appl. Phycol.* 23, 967–973.
- Beyer, D., Surányi, G., Vasas, G., Koszik, J., Erdődi, F., M-Hamvas, M., Bácsi, I., Serfőző, Z., Szigeti, Z.M., Vereb, G., Demeter, Z., Gonda, S., Máthé, C., 2009. *Cylindrospermopsis* induces alterations of root histology and microtubule organization in common reed (*Phragmites australis*) plantlets cultured *in vitro*. *Toxicol.* 54, 440–449.
- Bibo, L., Yan, G., Bangding, X., Jiantong, L., Yongding, L., 2008. A laboratory study on risk assessment of microcystin-RR in cropland. *J. Environ. Manage.* 86, 566–574.
- Billam, M., Tang, L., Cai, Q., Mukhi, S., Guan, H., Wang, P., Wang, Z., Theodorakis, C.W., Kendall, R.J., Wang, J.-S., 2006. Seasonal variations in the concentration of microcystin-LR in two lakes in western Texas, USA. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 349–355.
- Botha, N., Gehringer, M.M., Downing, T.G., van de Venter, M., Shephard, E.G., 2004. The role of microcystin-LR in the induction of apoptosis and oxidative stress in  $\text{CaCO}_3$  cells. *Toxicol.* 43, 85–92.
- Bouaicha, N., Maatouk, I., 2004. Microcystin-LR and nodularin induce intracellular glutathione alteration, reactive oxygen species production and lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes. *Toxicol. Lett.* 148, 53–63.
- Bourne, D.G., Jones, G.J., Blakeley, R.L., Jones, A., Negri, A.P., Riddles, P., 1996. Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR. *Appl. Environ. Microb.* 62, 4086–4094.
- Bourne, D.G., Riddles, P., Jones, G.J., Smith, W., Blakeley, R.L., 2001. Characterisation of a gene cluster involved in bacterial degradation of the cyanobacterial toxin microcystin-LR. *Environ. Toxicol.* 16, 523–534.
- Boyd, C.E., 1973. Biotic interactions between different species of algae. *Weed Sci.* 32–37.
- Brownell, P.F., Crossland, C.J., 1972. The requirement for sodium as a micronutrient by species having the C4 dicarboxylic photosynthetic pathway. *Plant Physiol.* 49, 794–797.
- Brownson, D.M., Mabry, T.J., Leslie, S.W., 2002. The cycad neurotoxic amino acid, beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA), elevates intracellular calcium levels in dissociated rat brain cells. *J. Ethnopharmacol.* 82, 159–167.
- Bumke-Vogt, C., Mailahn, W., Chorus, I., 1999. Anatoxin-a and neurotoxic cyanobacteria in German lakes and reservoirs. *Environ. Toxicol.* 14, 117–125.
- Burns, J.M., Hall, S., Ferry, J.L., 2009. The adsorption of saxitoxin to clays and sediments in fresh and saline waters. *Water Res.* 43, 1899–1904.
- Carmichael, W.W., Falconer, I.R., 1993. Diseases related to freshwater blue-green algal toxins, and control measures. In: Falconer, I.R. (Ed.), *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. Academic Press, London, UK, pp. 187–209.
- Carmichael, W.W., Biggs, D.F., Peterson, M.A., 1979. Pharmacology of Anatoxin-a, produced by the freshwater cyanophyte *Anabaena flos-aquae* NRC-44-1. *Toxicol.* 17, 229–236.
- Carmichael, W.W., Mahmood, N., Hyde, E., 1990. Natural toxins from cyanobacteria (blue-green algae). In: *Marine Toxins*, ACS Symposium Series. American Chemical Society, pp. 87–106.
- Carmichael, W.W., 1994. The toxins of cyanobacteria. *Sci. Am.* 270, 64–70.
- Carrasco, D., Moreno, E., Sanchis, D., Wörmer, L., Paniagua, T., Del Cueto, A., Quesada, A., 2006. Cyanobacterial abundance and microcystin occurrence in Mediterranean water reservoirs in Central Spain: microcystins in the Madrid area. *Eur. J. Phycol.* 41, 281–291.
- Casanova, M.T., Burch, M.D., Brock, M.A., Bond, P.M., 1999. Does toxic *Microcystis aeruginosa* affect aquatic plant establishment? *Environ. Toxicol.* 14, 97–109.
- Chen, J., Song, L., Dai, J., Gan, N., Liu, Z., 2004. Effects of microcystins on the growth and the activity of superoxide dismutase and peroxidase of rape (*Brassica napus* L.) and rice (*Oryza sativa* L.). *Toxicol.* 43, 393–400.
- Chen, W., Li, L., Gan, N., Song, L., 2006a. Optimization of an effective extraction procedure for the analysis of microcystins in soils and lake sediments. *Environ. Pollut.* 143, 241–246.
- Chen, W., Song, L., Gan, N., Li, L., 2006b. Sorption, degradation and mobility of microcystins in Chinese agriculture soils: risk assessment for groundwater protection. *Environ. Pollut.* 144, 752–758.
- Chen, W., Song, L., Peng, L., Wan, N., Zhang, X., Gan, N., 2008. Reduction in microcystin concentrations in large and shallow lakes: water and sediment-interface contributions. *Water Res.* 42, 763–773.
- Chen, X., Yang, X., Yang, L., Xiao, B., Wu, X., Wang, J., Wan, H., 2010. An effective pathway for the removal of microcystin LR via anoxic biodegradation in lake sediments. *Water Res.* 44, 1884–1892.
- Chen, J.Z., Ye, J.Y., Zhang, H.Y., Jiang, X.J., Zhang, Y.X., Liu, Z.L., 2011. Freshwater toxic cyanobacteria induced DNA damage in apple (*Malus pumila*), rape (*Brassica napus*) and rice (*Oryza sativa*). *J. Hazard. Mater.* 190, 240–244.
- Chen, J., Han, F.X., Wang, F., Zhang, H., Shi, Z., 2012. Accumulation and phytotoxicity of microcystin-LR in rice (*Oryza sativa*). *Ecotox. Environ. Safe.* 76, 193–199.
- Chiswell, R.K., Shaw, G.R., Eaglesham, G., Smith, M.J., Norris, R.L., Seawright, A.A., Moore, M.R., 1999. Stability of *Cylindrospermopsis*, the toxin from the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*: effect of pH, temperature, and sunlight on decomposition. *Environ. Toxicol.* 14, 155–161.
- Christoffersen, K., Lyck, S., Winding, A., 2002. Microbial activity and bacterial community structure during degradation of microcystins. *Aquat. Microb. Ecol.* 27, 125–136.
- Codd, G.A., Bell, S.G., Brooks, W.P., 1989. Cyanobacterial toxins in water. *Water Sci. Technol.* 21, 1–13.
- Codd, G.A., Metcalf, J.S., Beattie, K.A., 1999. Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystin by salad lettuce (*Lactuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacteria. *Toxicol.* 37, 1181–1185.
- Codd, G.A., Lindsay, J., Young, F.M., Morrison, L.F., Metcalf, J.S., 2005. Harmful cyanobacteria: from mass mortalities to management measures. In: Huisman, J., Matthijs, H.C.P., Visser, P.M. (Eds.), *Harmful Cyanobacteria*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, pp. 1–23.
- Conti, A.L.R., Guerrero, J.M., Regueira, J.M., 2005. Levels of microcystins in two Argentinean reservoirs used for water supply and recreation: differences in the implementation of safe levels. *Environ. Toxicol.* 20, 263–269.
- Cook, C.M., Vardaka, E., Lanaras, T., 2004. Toxic cyanobacteria in greek freshwaters, 1987–2000: occurrence, toxicity, and impacts in the Mediterranean region. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 32, 107–124.
- Costa, I.A.S., Azevedo, S.M.F.O., Senna, P.A.C., Bernardo, R.R., Costa, S.M., Chellappa, N.T., 2006. Occurrence of toxin-producing cyanobacteria blooms in a Brazilian semiarid reservoir. *Braz. J. Biol. Rev. Brasileira Biol.* 66, 211–219.
- Cousins, I.T., Bealing, D.J., James, H.A., Sutton, A., 1996. Biodegradation of microcystin-LR by indigenous mixed bacterial populations. *Water Res.* 30, 481–485.
- Cox, P.A., Banack, S.A., Murch, S.J., 2003. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 13380–13383.
- Cox, P.A., Banack, S.A., Murch, S.J., Rasmussen, U., Tien, G., Bidigare, R.R., Metcalf, J.S., Morrison, L.F., Codd, G.A., Bergman, B., 2005. Diverse taxa of cyanobacteria produce  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 5074–5078.

- Crush, J.R., Briggs, L.R., Sprosen, J.M., Nichols, S.N., 2008. Effect of irrigation with lake water containing microcystins on microcystin content and growth of ryegrass, clover, rape, and lettuce. *Environ. Toxicol.* 23, 246–252.
- De Silva, E.D., Williams, D.E., Andersen, R.J., Klix, H., Holmes, C.F.B., Allen, T.M., 1992. Motuporin, a potent protein phosphatase inhibitor isolated from the papua new guinea sponge *Theonella swinhoei* gray. *Tetrahedron Lett.* 33, 1561–1564.
- Del Campo, F.F., Ouahid, Y., 2010. Identification of microcystins from three collection strains of *Microcystis aeruginosa*. *Environ. Pollut.* 158, 2906–2914.
- Edwards, C., Graham, D., Fowler, N., Lawton, L.A., 2008. Biodegradation of microcystins and nodularin in freshwaters. *Chemosphere* 73, 1315–1321.
- El Ghazali, I., Saqrane, S., Saker, M., Youness, O., Oudra, B., Vasconcelos, V., Del Campo, F.F., 2011. Caractérisation biochimique et moléculaire d'efflorescences à cyanobactéries toxiques dans le réservoir Lalla Takerkoust (Maroc). *Revue des sciences de l'eau J. Water Sc.* 24, 117–128.
- El Herry, S., Fathalli, A., Rejeb, A.J.-B., Bouaicha, N., 2008. Seasonal occurrence and toxicity of *Microcystis* spp. and *Oscillatoria tenuis* in the Lebna Dam, Tunisia. *Water Res.* 42, 1263–1273.
- El Khaloufi, F., Oufdou, K., Lahrouni, M., El Ghazali, I., Saqrane, S., Vasconcelos, V., Oudra, B., 2011. Allelopathic effects of cyanobacteria extracts containing microcystins on *Medicago sativa*-*Rhizobia* symbiosis. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 74, 431–438.
- El Khaloufi, F., El Ghazali, I., Saqrane, S., Oufdou, K., Vasconcelos, V., Oudra, B., 2012. Phytotoxic effects of a natural bloom extract containing microcystins on *Lycopersicon esculentum*. *Ecotox. Environ. Safe.* 79, 199–205.
- Esterhuizen-Londt, Pflugmacher, S., Downing, T.G., 2011. The effect of  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine (BMAA) on oxidative stress response enzymes of the macrophyte *Ceratophyllum demersum*. *Toxicol. Environ. Chem.* 57, 803–810.
- Ettoumi, A., El Khaloufi, F., El Ghazali, I., Oudra, B., Amrani, A., Nasri, H., Bouaicha, N., 2011. Bioaccumulation of cyanobacterial toxins in aquatic organisms and its consequences for public health. In: Kattel, G. (Ed.), *Zooplankton and Phytoplankton: Types, Characteristics and Ecology*. Nova Science Publishers Inc., New York, pp. 1–34.
- Everson, S., Fabbro, L., Kinnear, S., Wright, P., 2011. Extreme differences in akinete, heterocyte and cylindrospermopsin concentrations with depth in a successive bloom involving *Aphanizomenon ovalisporum* (Forti) and *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju. *Harmful Algae* 10, 265–276.
- Eynard, F., Mez, K., Walther, J.-L., 2000. Risk of cyanobacterial toxins in Riga waters (Latvia). *Water Res.* 34, 2979–2988.
- Falconer, I.R., Humpage, A.R., 2006. Cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water supplies: cylindrospermopsins. *Environ. Toxicol.* 21, 299–304.
- Falconer, I.R., Beresford, A.M., Runnegar, M.T., 1983. Evidence of liver damage by toxin from a bloom of the blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*. *Med. J. Australia* 1, 511–514.
- Falconer, I.R., 1991. Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. *Environ. Toxicol. Water* 6, 177–184.
- Fastner, J., Neumann, U., Wirsing, B., Weckesser, J., Wiedner, C., Chorus, I., 1999. Microcystins (hepatotoxic heptapeptides) in German fresh water bodies. *Environ. Toxicol.* 14, 13–22.
- Fischer, W.J., Altheimer, S., Cattori, V., Meier, P.J., Dietrich, D.R., Hagenbuch, B., 2005. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203, 257–263.
- Fromme, H., Köhler, A., Krause, R., Führling, D., 2000. Occurrence of cyanobacterial toxins—microcystins and anatoxin-a—in Berlin water bodies with implications to human health and regulations. *Environ. Toxicol.* 15, 120–130.
- Frosco, S.M., Humpage, A.R., Burcham, P.C., Falconer, I.R., 2001. Cell-free protein synthesis inhibition assay for the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin. *Environ. Toxicol.* 16, 408–412.
- Frosco, S.M., Humpage, A.R., Burcham, P.C., Falconer, I.R., 2003. Cylindrospermopsin-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. *Environ. Toxicol.* 18, 243–251.
- Frosco, S.M., Humpage, A., Wickramasinghe, W., Shaw, G., Falconer, I.R., 2008. Interaction of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin with the eukaryotic protein synthesis system. *Environ. Toxicol.* 51, 191–198.
- Furey, A., Crowley, J., Lehane, M., James, K.J., 2003a. Liquid chromatography with electrospray ion-trap mass spectrometry for the determination of anatoxins in cyanobacteria and drinking water. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17, 583–588.
- Furey, A., Crowley, J., Shuilleabhain, A.N., Skulberg, O.M., James, K.J., 2003b. The first identification of the rare cyanobacterial toxin, homoanatoxin-a, in Ireland. *Toxicol.* 41, 297–303.
- Gągala, I., Izydorczyk, K., Skowron, A., Kamecka-Plaskota, D., Stefaniak, K., Kokociński, M., Mankiewicz-Boczek, J., 2010. Appearance of toxigenic cyanobacteria in two Polish lakes dominated by *Microcystis aeruginosa* and *Planktothrix agardhii* and environmental factors influence. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 10, 25–34.
- Gehring, M.M., Kewada, V., Coates, N., Downing, T.G., 2003. The use of *Lepidium sativum* in a plant bioassay system for the detection of microcystin-LR. *Toxicol.* 41, 871–876.
- Giannuzzi, L., Sedan, D., Echenique, R., Andrinolo, D., 2011. An acute case of intoxication with cyanobacteria and cyanotoxins in recreational water in Salto Grande Dam, Argentina. *Mar. Drugs* 9, 2164–2175.
- Gorham, P.R., Carmichael, W.W., 1988. Hazards of freshwater blue green algae (cyanobacteria). In: Lembi, C.A., Waaland, J.R. (Eds.), *Algae and Human Affairs*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 403–431.
- Grützmacher, G., Böttcher, G., Chorus, I., Bartel, H., 2002. Removal of microcystins by slow sand filtration. *Environ. Toxicol.* 17, 386–394.
- Grützmacher, G., Wessel, G., Klitzke, S., Chorus, I., 2010. Microcystin elimination during sediment contact. *Environ. Sci. Technol.* 44, 657–662.
- Gugger, M., Lenoir, S., Berger, C., Ledreux, A., Druart, J.-C., Humbert, J.-F., Guette, C., Bernard, C., 2005. First report in a river in France of the benthic cyanobacterium *Phormidium favosum* producing anatoxin-a associated with dog neurotoxicosis. *Toxicol.* 45, 919–928.
- Gupta, N., Bhaskar, A.S.B., Dangi, R.S., Prasad, G.B.K.S., Rao, P.V.L., 2001. Toxin production in batch cultures of freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 67, 0339–0346.
- Gurbuz, F., Metcalf, J.S., Karahan, A.G., Codd, G.A., 2009. Analysis of dissolved microcystins in surface water samples from Kovada Lake, Turkey. *Sci. Total Environ.* 407, 4038–4046.
- Ha, M.-H., Pflugmacher, S., 2013. Time-dependent alterations in growth, photosynthetic pigments and enzymatic defense systems of submerged *Ceratophyllum demersum* during exposure to the cyanobacterial neurotoxin anatoxin-a. *Aquat. Toxicol.* 138–139, 26–34.
- Harada, K., Ohtani, I., Iwamoto, K., Suzuki, M., Watanabe, M.F., Watanabe, M., Terao, K., 1994. Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. *Toxicol.* 32, 73–84.
- Harada, K., Tsuji, K., Watanabe, M.F., Kondo, F., 1996. Stability of microcystins from cyanobacteria—III. Effect of pH and temperature. *Phycologia* 35, 83–88.
- Harada, K., Imanishi, S., Kato, H., Mizuno, M., Ito, E., Tsuji, K., 2004. Isolation of Adda from microcystin-LR by microbial degradation. *Toxicol.* 44, 107–109.
- Harper, D., 1992. Prediction and modelling of the causes and effects of eutrophication. In: *Eutrophication of Freshwaters: Principles, Problems and Restoration*. Springer Netherlands Publishers, pp. 167–214.
- Hastie, C.J., Borthwick, E.B., Morrison, L.F., Codd, G.A., Cohen, P.T.W., 2005. Inhibition of several protein phosphatases by a non-covalently interacting microcystin and a novel cyanobacterial peptide, nostocyclin. *Biochim. Biophys. Acta* 1726, 187–193.
- Hawkins, P.R., Runnegar, M.T.C., Jackson, A.R.B., Falconer, I.R., 1985. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from domestic water supply reservoir. *Appl. Environ. Microb.* 50, 1292–1295.
- Henderson, R., Ritchie, J.M., Strichartz, G.R., 1973. The binding of labelled saxitoxin to the sodium channels in nerve membranes. *J. Physiol.* 235, 783–804.
- Henriksen, P., 1996. Microcystin profiles and contents in Danish populations of cyanobacteria/blue-green algae as determined by HPLC. *Phycologia* 35, 102–110.
- Heresztyn, T., Nicholson, B.C., 1997. Nodularin concentrations in Lakes Alexandrina and Albert, South Australia, during a bloom of the cyanobacterium (blue-green alga) *Nodularia spumigena* and degradation of the toxin. *Environ. Toxicol. Water* 12, 273–282.
- Hille, B., 1992. *Ionic Channels of Excitable Membranes*, second ed. Sinauer Associates, ed., Sunderland, MA.
- Hirooka, E.Y., Pinotti, M.H.P., Tsutsumi, T., Yoshida, F., Ueno, Y., 1999. Survey of Microcystins in water between 1995 and 1996 in Paraná, Brazil using ELISA. *Nat. Toxins* 7, 103–109.
- Hitzfeld, B.C., Höger, S.J., Dietrich, D.R., 2000. Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment, and human risk assessment. *Environ. Health Perspect.* 108, 113–122.
- Ho, L., Hoefel, D., Bock, F., Saint, C.P., Newcombe, G., 2007a. Biodegradation rates of 2-methylisoborneol (MIB) and geosmin through sand filters and in bioreactors. *Chemosphere* 66, 2210–2218.
- Ho, L., Hoefel, D., Saint, C.P., Newcombe, G., 2007b. Isolation and identification of a novel microcystin-degrading bacterium from a biological sand filter. *Water Res.* 41, 4685–4695.
- Ho, L., Tang, T., Monis, P.T., Hoefel, D., 2012. Biodegradation of multiple cyanobacterial metabolites in drinking water supplies. *Chemosphere* 87, 1149–1154.
- Hoefel, D., Adriansen, C.M.M., Bouyssou, M.A.C., Saint, C.P., Newcombe, G., Ho, L., 2009. Development of an mlrA gene-directed TaqMan PCR assay for quantitative assessment of microcystin-degrading bacteria within water treatment plant sand filter biofilms. *Appl. Environ. Microb.* 75, 5167–5169.
- Holst, T., Jørgensen, N.O., Jørgensen, C., Johansen, A., 2003. Degradation of microcystin in sediments at oxic and anoxic, denitrifying conditions. *Water Res.* 37, 4748–4760.
- Honkanen, R.E., Caplan, F.R., Baker, K.K., Baldwin, C.L., Bobzin, S.C., Bolis, C.M., Cabrera, G.M., Johnson, L.A., Jung, J.H., Larsen, L.K., Levine, I.A., Moore, R.E., Nelson, C.S., Patterson, G.M.L., Tschappat, K.D., Tuang, G.D., Boynton, A.L., Arment, A.R., An, J., Carmichael, W.W., Rodland, K.D., Magun, B.E., Lewin, R.A., 1995. Protein phosphatase inhibitory activity in extracts of cultured blue-green algae (cyanophyta). *J. Phycol.* 31, 478–486.
- Horie, T., Schroeder, J.L., 2004. Sodium transporters in plants. Diverse genes and physiological functions. *Plant Physiol.* 136, 2457.
- Hu, Z., Liu, Y., Li, D., Dauta, A., 2005. Growth and antioxidant system of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* in response to microcystin-RR. *Hydrobiologia* 534, 23–29.
- Hu, L., Zhang, F., Liu, C., Wang, M., 2012. Biodegradation of Microcystins by *Bacillus* sp. strain EMB. *Energy Procedia* 16 (Part C), 2054–2059.
- Huang, W., Xing, W., Li, D., Liu, Y., 2009. Morphological and ultrastructural changes in tobacco BY-2 cells exposed to microcystin-RR. *Chemosphere* 76, 1006–1012.

- Humpage, A., Rositano, J., Bretag, A., Brown, R., Baker, P., Nicholson, B., Steffensen, D., 1994. Paralytic shellfish poisons from Australian cyanobacterial blooms. *Mar. Freshwater Res.* 45, 761–771.
- Hyenstrand, P., Rohrlack, T., Beattie, K.A., Metcalf, J.S., Codd, G.A., Christoffersen, K., 2003. Laboratory studies of dissolved radiolabelled microcystin-LR in lake water. *Water Res.* 37, 3299–3306.
- Ibelings, B.W., Chorus, I., 2007. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater “seafood” and its consequences for public health: a review. *Environ. Pollut.* 150, 177–192.
- Ikawa, M., Sasner, J.J., Haney, J.F., 2001. Activity of cyanobacterial and algal odor compounds found in lake waters on green alga *Chlorella pyrenoidosa* growth. *Hydrobiologia* 443, 19–22.
- Imanishi, S., Kato, H., Mizuno, M., Tsuji, K., Harada, K., 2005. Bacterial degradation of microcystins and nodularin. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 591–598.
- Ishii, H., Nishijima, M., Abe, T., 2004. Characterization of degradation process of cyanobacterial hepatotoxins by a Gram-negative aerobic bacterium. *Water Res.* 38, 2667–2676.
- Jablonski, E.M., Adrian Mattocks, M., Sokolov, E., Koniaris, L.G., Hughes Jr., F.M., Fausto, N., Pierce, R.H., McKillop, I.H., 2007. Decreased aquaporin expression leads to increased resistance to apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 250, 36–46.
- Jámbrik, K., Máthé, C., Vasas, G., Beyer, D., Molnár, E., Borbély, G., M-Hamvas, M., 2011. Microcystin-LR induces chromatin alterations and modulates neutral single-strand-prefering nuclease activity in *Phragmites australis*. *J. Plant Physiol.* 168, 678–686.
- James, H., Fawell, J.K., 1991. In: *Water Research Centre (Ed.), Detection and Removal of Cyanobacterial Toxins from Freshwaters*. Foundation for Water Research Publisher, Great Britain, pp. 1–38.
- James, K.J., Sherlock, I.R., Stack, M.A., 1997. Anatoxin-a in Irish freshwater and cyanobacteria, determined using a new fluorimetric liquid chromatographic method. *Toxicol.* 35, 963–971.
- Jančula, D., Maršálek, B., 2011. Critical review of actually available chemical compounds for prevention and management of cyanobacterial blooms. *Chemosphere* 85, 1415–1422.
- Jang, M.-H., Ha, K., Takamura, N., 2007. Reciprocal allelopathic responses between toxic cyanobacteria (*Microcystis aeruginosa*) and duckweed (*Lemna japonica*). *Toxicol.* 49, 727–733.
- Jann, K., Jann, B., 1984. Structure and biosynthesis of O-antigens. *Handbook of Endotoxin* 1, 138–186.
- Järvenpää, S., Lundberg-Niinistö, C., Spoof, L., Sjöväll, O., Tyystjärvi, E., Meriluoto, J., 2007. Effects of microcystins on broccoli and mustard, and analysis of accumulated toxin by liquid chromatography-mass spectrometry. *Toxicol.* 49, 865–874.
- Jones, G.J., Orr, P.T., 1994. Release and degradation of microcystin following algicide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay. *Water Res.* 28, 871–876.
- Jones, G.J., Bourne, D.G., Blakeley, R.L., Doelle, H., 1994. Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by aquatic bacteria. *Nat. Toxins* 2, 228–235.
- Jones, G.J., Falconer, I.R., Wilkins, R.M., 1995. Persistence of cyclic peptide toxins in dried *Microcystis aeruginosa* crusts from lake Mokoan, Australia. *Environ. Toxicol. Water* 10, 19–24.
- Jungmann, D., Ludwichowski, K.-U., Faltin, V., Benndorf, J., 1996. A field study to investigate environmental factors that could effect microcystin synthesis of a *Microcystis* population in the Bautzen Reservoir. *Int. Rev. Ges. Hydrobiol.* 81, 493–501.
- Kaas, H., Henriksen, P., 2000. Saxitoxins (PSP toxins) in Danish lakes. *Water Res.* 34, 2089–2097.
- Kaebnick, M., Neilan, B.A., 2001. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35, 1–9.
- Kao, C.Y., Suzuki, T., Kleinhaus, A.L., Siegman, M.J., 1967. Vasomotor and respiratory depressant actions of tetrodotoxin and saxitoxin. *Arch. Int. Pharmacol. Ther.* 165, 438–450.
- Kardinaal, W., Janse, I., Kamst-van Agterveld, M., Meima, M., Snoek, J., Mur, L., Huisman, J., Zwart, G., Visser, P., 2007. *Microcystis* genotype succession in relation to microcystin concentrations in freshwater lakes. *Aquat. Microb. Ecol.* 48, 1–12.
- Kaya, K., 1996. Toxicology of microcystins. In: *Toxic Microcystis*. CRC Press, Boca Raton, pp. 175–202.
- Kayal, N., Newcombe, G., Ho, L., 2008. Investigating the fate of saxitoxins in biologically active water treatment plant filters. *Environ. Toxicol.* 23, 751–755.
- Keijola, A.M., Himberg, K., Esala, A.L., Sivonen, K., Hiis-Virta, L., 1988. Removal of cyanobacterial toxins in water treatment processes: laboratory and pilot-scale experiments. *Toxicol. Assess.* 3, 643–656.
- Kenefick, S.L., Hrudevy, S.E., Peterson, H.G., Prepas, E.E., 1993. Toxin release from *Microcystis aeruginosa* after chemical treatment. *Water Sci. Technol.* 27, 433–440.
- Kinnear, S., 2010. Cylindrospermopsin: a decade of progress on bioaccumulation research. *Mar. Drugs* 8, 542–564.
- Kittler, K., Schreiner, M., Krumbel, A., Manzei, S., Koch, M., Rohn, S., Maul, R., 2012. Uptake of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in *Brassica* vegetables. *Food Chem.* 133, 875–879.
- Kiviranta, J., Sivonen, K., Niemelä, S.I., Huovinen, K., 1991. Detection of toxicity of cyanobacteria by *Artemia salina* bioassay. *Environ. Toxicol. Water* 6, 423–436.
- Klitzke, S., Apelt, S., Weiler, C., Fastner, J., Chorus, I., 2010. Retention and degradation of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in sediments – the role of sediment preconditioning and DOM composition. *Toxicol.* 55, 999–1007.
- Klitzke, S., Beusch, C., Fastner, J., 2011. Sorption of the cyanobacterial toxins cylindrospermopsin and anatoxin-a to sediments. *Water Res.* 45, 1338–1346.
- Krienitz, L., Ballot, A., Kotut, K., Wiegand, C., Pütz, S., Metcalf, J.S., Codd, G.A., Pflugmacher, S., 2003. Contribution of hot spring cyanobacteria to the mysterious deaths of Lesser Flamingos at Lake Bogoria, Kenya. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43, 141–148.
- Krienitz, L., Dadhech, P.K., Fastner, J., Kotut, K., 2013. The rise of potentially toxin producing cyanobacteria in Lake Naivasha, Great African Rift Valley, Kenya. *Harmful Algae* 27, 42–51.
- Kuiper-Goodman, T., Falconer, I., Fitzgerald, J., 1999. Human health aspects. In: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.), *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. E and FN Spon, London, pp. 113–153 (chapter 4).
- Kurki-Helasma, K., Meriluoto, J., 1998. Microcystin uptake inhibits growth and protein phosphatase activity in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. *Toxicol.* 36, 1921–1926.
- Lahti, K., Kilponen, J., Kivimaeki, A., 1996. Removal of cyanobacteria and their hepatotoxins from raw water in soil and sediment columns. In: *International Symposium on Artificial Recharge of Groundwater, Helsinki (Finland), 3–5 June 1996*, pp. 187–195.
- Lahti, K., Rapala, J., Färdig, M., Niemelä, M., Sivonen, K., 1997. Persistence of cyanobacterial hepatotoxin, microcystin-LR in particulate material and dissolved in lake water. *Water Res.* 31, 1005–1012.
- Lam, A.K.-Y., Fedorak, P.M., Prepas, E.E., 1995. Biotransformation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR, as determined by HPLC and protein phosphatase bioassay. *Environ. Sci. Technol.* 29, 242–246.
- Lambert, G., Lambert, C.C., Waaland, J.R., 1996. Algal symbionts in the tunics of six New Zealand Ascidiaceans (*Chordata, Ascidiacea*). *Invertebr. Biol.* 115, 67–78.
- Ledreux, A., Thomazeau, S., Catherine, A., Duval, C., Yéprémian, C., Marie, A., Bernard, C., 2010. Evidence for saxitoxins production by the cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* in a French recreational water body. *Harmful Algae* 10, 88–97.
- Lefevre, M., Jakob, H., Nisbet, M., 1950. Sur la sécrétion, par certaines Cyanophytes, de substances algostatiques dans les collections d'eau naturelles. In: Vance 1965, B.D. (Ed.), *Composition and Succession of Cyanophycean Water Blooms*. CR. Acad. Sci. 230, Paris, pp. 2226–2227.
- Leflaive, J., Ten-Hage, L., 2007. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. *Freshwater Biol.* 52, 199–214.
- Lehman, P.W., Boyer, G., Satchwell, M., Waller, S., 2007. The influence of environmental conditions on the seasonal variation of *Microcystis* cell density and microcystins concentration in San Francisco Estuary. *Hydrobiologia* 600, 187–204.
- Lehtimäki, J., Moisaner, P., Sivonen, K., Kononen, K., 1997. Growth, nitrogen fixation, and nodularin production by two baltic sea cyanobacteria. *Appl. Environ. Microb.* 63, 1647–1656.
- Lemes, G.A.F., Kersanach, R., Pinto, L.D.A.S., Dellagostin, O.A., Yunes, J.S., Matthiensen, A., 2008. Biodegradation of microcystins by aquatic Burkholderia sp. from a South Brazilian coastal lagoon. *Ecotox. Environ. Saf.* 69, 358–365.
- Li, R., Carmichael, W.W., Brittain, S., Eaglesham, G.K., Shaw, G.R., Oudra, Y., Watanabe, M.M., 2001. First report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata* (cyanobacteria). *J. Phycol.* 37, 1121–1126.
- Lilleheil, G., Andersen, R.A., Skulberg, O.M., Alexander, J., 1997. Effects of a homoanatoxin-a-containing extract from *Oscillatoria formosa* (cyanophyceae/cyanobacteria) on neuromuscular transmission. *Toxicol.* 35, 1275–1289.
- Lindholm, T., Meriluoto, J.A.O., 1991. Recurrent depth maxima of the hepatotoxic cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48, 1629–1634.
- Liu, Y., Chen, W., Li, D., Huang, Z., Shen, Y., Liu, Y., 2011. Cyanobacteria/cyanotoxin-contaminations and eutrophication status before Wuxi drinking water crisis in Lake Taihu, China. *J. Environ. Sci. China* 23, 575–581.
- 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 Lett.* 264, 187–192.
- Mahmood, N.A., Carmichael, W.W., 1986. The pharmacology of anatoxin-a(s), a neurotoxin produced by the freshwater cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC 525–17. *Toxicol.* 24, 425–434.
- Mahmood, N.A., Carmichael, W.W., 1987. Anatoxin-a(s), an anticholinesterase from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC-525-17. *Toxicol.* 25, 1221–1227.
- Manage, P.M., Edwards, C., Singh, B.K., Lawton, L.A., 2009. Isolation and identification of novel microcystin-degrading bacteria. *Appl. Environ. Microb.* 75, 6924–6928.
- Maruyama, T., Park, H.-D., Ozawa, K., Tanaka, Y., Sumino, T., Hamana, K., Hiraishi, A., Kato, K., 2006. *Sphingosinella microcystinivorans* gen. nov., sp. nov., a microcystin-degrading bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microb.* 56, 85–89.
- Máthé, C., Beyer, D., Erdődi, F., Serfőző, Z., Székely, L., Vasas, G., M-Hamvas, M., Jámbrik, K., Gonda, S., Kiss, A., Szigeti, Z.M., Surányi, G., 2009. Microcystin-LR induces abnormal root development by altering microtubule organization in tissue-cultured common reed (*Phragmites australis*) plantlets. *Aquat. Toxicol.* 92, 122–130.

- Matsunaga, S., Moore, R.E., Niemczura, W.P., Carmichael, W.W., 1989. Anatoxin-a (s), a potent anticholinesterase from *Anabaena flos-aquae*. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 8021–8023.
- Mayer, H., Weckesser, J., 1984. Unusual lipid A's: structures, taxonomical relevance and potential value for endotoxin research. *Handbook of Endotoxin* 1, 221–247.
- Mazur-Marzec, H., Meriluoto, J., Pliński, M., 2006. The degradation of the cyanobacterial hepatotoxin nodularin (NOD) by UV radiation. *Chemosphere* 65, 1388–1395.
- Mazur-Marzec, H., Toruńska, A., Błońska, M.J., Moskot, M., Pliński, M., Jakóbkiewicz-Banecka, J., Węgrzyn, G., 2009. Biodegradation of nodularin and effects of the toxin on bacterial isolates from the Gulf of Gdańsk. *Water Res.* 43, 2801–2810.
- McElhiney, J., Lawton, L.A., Leifert, C., 2001. Investigations into the inhibitory effects of microcystins on plant growth, and the toxicity of plant tissues following exposure. *Toxicol.* 39, 1411–1420.
- McGregor, G.B., Fabbro, L.D., 2000. Dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanoprokaryota) in Queensland tropical and subtropical reservoirs: implications for monitoring and management. *Lakes Reservoirs: Res. Manage.* 5, 195–205.
- Merel, S., Clément, M., Thomas, O., 2010. State of the art on cyanotoxins in water and their behaviour towards chlorine. *Toxicol.* 55, 677–691.
- Messineo, V., Boglietti, S., Melchiorre, S., Sechi, N., Lugliè, A., Casiddu, P., Mariani, M.A., Padedda, B.M., Corcia, A.D., Mazza, R., Carloni, E., Bruno, M., 2009. Cyanobacterial toxins in Italian freshwaters. *Limnologia* 39, 95–106.
- Metcalf, J.S., Barakate, A., Codd, G.A., 2004. Inhibition of plant protein synthesis by the cyanobacterial hepatotoxin, cylindrospermopsin. *Fems Microbiol. Lett.* 235, 125–129.
- Metcalf, J.S., Richer, R., Cox, P.A., Codd, G.A., 2012. Cyanotoxins in desert environments may present a risk to human health. *Sci. Total Environ.* 421–422, 118–123.
- Miller, M.J., Fallowfield, H.J., 2001. Degradation of cyanobacterial hepatotoxins in batch experiments. *Water Sci. Technol.* 43, 229–232.
- Miller, M., Critchley, M., Hutson, J., Fallowfield, H., 2001. The adsorption of cyanobacterial hepatotoxins from water onto soil during batch experiments. *Water Res.* 35, 1461–1468.
- Miller, M.A., Kudela, R.M., Mekebr, A., Crane, D., Oates, S.C., Tinker, M.T., Staedler, M., Miller, W.A., Toy-Choutka, S., Dominik, C., Hardin, D., Langlois, G., Murray, M., Ward, K., Jessup, D.A., 2010. Evidence for a novel marine harmful algal bloom: cyanotoxin (microcystin) transfer from Land to Sea Otters. *PLoS ONE* 5, e12576.
- Mitrovic, S.M., Pflugmacher, S., James, K.J., Furey, A., 2004. Anatoxin-a elicits an increase in peroxidase and glutathione S-transferase activity in aquatic plants. *Aquat. Toxicol.* 68, 185–192.
- Mitrovic, S.M., Allis, O., Furey, A., James, K.J., 2005. Bioaccumulation and harmful effects of microcystin-LR in the aquatic plants *Lemma minor* and *Wolffia arrhiza* and the filamentous alga *Chladophora fracta*. *Ecotox. Environ. Saf.* 61, 345–352.
- Mohamed, Z.A., 2008. Polysaccharides as a protective response against microcystin-induced oxidative stress in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda* and their possible significance in the aquatic ecosystem. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 17, 504–516.
- Molica, R.J.R., Oliveira, E.J.A., Carvalho, P.V.V.C., Costa, A.N.S.F., Cunha, M.C.C., Melo, G.L., Azevedo, S.M.F.O., 2005. Occurrence of saxitoxins and an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. *Harmful Algae* 4, 743–753.
- Moore, R.E., 1996. Cyclic peptides and decapeptides from cyanobacteria: A review. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 16, 134–143.
- Morris, R.J., Williams, D.E., Luu, H.A., Holmes, C.F.B., Andersen, R.J., Calvert, S.E., 2000. The adsorption of microcystin-LR by natural clay particles. *Toxicol.* 38, 303–308.
- Murch, S.J., Cox, P.A., Banack, S.A., 2004. A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 12228–12231.
- Namikoshi, M., Rinehart, K., 1996. Bioactive compounds produced by cyanobacteria. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 17, 373–384.
- Namikoshi, M., Choi, B.W., Sun, F., Rinehart, K.L., Evans, W.R., Carmichael, W.W., 1993. Chemical characterization and toxicity of dihydro derivatives of nodularin and microcystin-LR, potent cyanobacterial cyclic peptide hepatotoxins. *Chem. Res. Toxicol.* 6, 151–158.
- Nasri, H., El Herry, S., Bouaicha, N., 2008. First reported case of turtle deaths during a toxic *Microcystis* spp. bloom in Lake Oubeira, Algeria. *Ecotox. Environ. Saf.* 71, 535–544.
- Negri, A.P., Jones, G.J., Blackburn, S.I., Oshima, Y., Onodera, H., 1997. Effect of culture and bloom development and of sample storage on paralytic shellfish poisons in the cyanobacterium *Anabaena circinalis*. *J. Phycol.* 33, 26–35.
- Nishiyama, A., 1968. Effect of Saxitoxin on spontaneous release of acetylcholine from the frog's motor nerve endings. *Tohoku J. Experim. Med.* 95, 201–202.
- Nobre, M.M.Z. de A., 1997. Detection of the toxins (microcystins) produced by cyanobacteria (blue algae) in reservoirs for public provision for immunosorbent assay method linked the enzyme (ELISA) and chemical identification. PhD thesis, Sao Paulo, 154p.
- Norris, R.L.G., Eaglesham, G.K., Shaw, G.R., Senogles, P., Chiswell, R.K., Smith, M.J., Davis, B.C., Seawright, A.A., Moore, M.R., 2001. Extraction and purification of the zwitterions cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environ. Toxicol.* 16, 391–396.
- Oberholster, P.J., Botha, A.-M., Ashton, P.J., 2009a. The influence of a toxic cyanobacterial bloom and water hydrology on algal populations and macroinvertebrate abundance in the upper littoral zone of Lake Krugersdrift, South Africa. *Ecotoxicol. Lond. Engl.* 18, 34–46.
- Oberholster, P.J., Myburgh, J.G., Govender, D., Bengis, R., Botha, A.-M., 2009b. Identification of toxigenic *Microcystis* strains after incidents of wild animal mortalities in the Kruger National Park, South Africa. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1177–1182.
- Ohtani, I., Moore, R.E., Runnegar, M.T.C., 1992. Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 7941–7942.
- Okano, K., Shimizu, K., Kawauchi, Y., Maseda, H., Utsumi, M., Zhang, Z., Neilan, B.A., Sugiura, N., 2009. Characteristics of a microcystin-degrading bacterium under alkaline environmental conditions. *J. Toxicol.* 2009, 1–8.
- O'Neil, J., Davis, T., Burford, M., Gobler, C., 2012. The rise of harmful cyanobacteria blooms: the potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae* 14, 313–334.
- Orr, P.T., Jones, G.J., 1998. Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. *Limnol. Oceanogr.* 1604–1614.
- Orr, P.T., Jones, G.J., Hamilton, G.R., 2004. Removal of saxitoxins from drinking water by granular activated carbon, ozone and hydrogen peroxide—implications for compliance with the Australian drinking water guidelines. *Water Res.* 38, 4455–4461.
- Oudra, B., Loudiki, M., Sbiyyaa, B., Martins, R., Vasconcelos, V., Namikoshi, N., 2001. Isolation, characterization and quantification of microcystins (heptapeptide hepatotoxins) in *Microcystis aeruginosa* dominated bloom of Lalla Takerkoust lake-reservoir (Morocco). *Toxicol.* 39, 1375–1381.
- Paerl, H.W., Huisman, J., 2009. Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environ. Microbiol. Reports* 1, 27–37.
- Papke, U., Gross, E.M., Francke, W., 1997. Isolation, identification and determination of the absolute configuration of Fischerellin B. A new alginate from the freshwater cyanobacterium *Fischerella muscicola* (Thuret). *Tetrahedron Lett.* 38, 379–382.
- Park, H.-D., Iwami, C., Watanabe, M.F., Harada, K.I., Okino, T., Hayashi, H., 1998a. Temporal variabilities of the concentration of intra- and extracellular microcystins and toxic microcystins species in a hypertrophic lake, Lake Suwa, Japan. *Environ. Toxicol.* 13, 61–72.
- Park, H.-D., Kim, B., Kim, E., Okino, T., 1998b. Hepatotoxic microcystins and neurotoxic anatoxin-a in cyanobacterial blooms from Korean lakes. *Environ. Toxicol. Water* 13, 225–234.
- Park, H.-D., Sasaki, Y., Maruyama, T., Yanagisawa, E., Hiraishi, A., Kato, K., 2001. Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by a new bacterium isolated from a hypertrophic lake. *Environ. Toxicol.* 16, 337–343.
- Patterson, G.M.L., Baldwin, C.L., Bolis, C.M., Caplan, F.R., Karuso, H., Larsen, L.K., Levine, I.A., Moore, R.E., Nelson, C.S., Tschappat, K.D., Tuang, G.D., Furusawa, E., Furusawa, S., Norton, T.R., Raybourne, R.B., 1991. Antineoplastic activity of cultured blue-green algae (*Cyanophyta*). *J. Appl. Phycol.* 27, 530–536.
- Patterson, G.M.L., Smith, C.D., Kimura, L.H., Britton, B.A., Carmeli, S., 1993. Action of toxin on cell morphology, cytoskeletal organization, and actin polymerization. *Cell Motil. Cytoskel.* 24, 39–48.
- Patterson, G., Larsen, L., Moore, R., 1994. Bioactive natural products from blue-green algae. *J. Appl. Phycol.* 6, 151–157.
- Perron, M.-C., Qiu, B., Boucher, N., Bellemare, F., Juneau, P., 2012. Use of chlorophyll a fluorescence to detect the effect of microcystins on photosynthesis and photosystem II energy fluxes of green algae. *Toxicol.* 59, 567–577.
- Peuthert, A., Chakrabarti, S., Pflugmacher, S., 2007. Uptake of microcystins-LR and -LF (cyanobacterial toxins) in seedlings of several important agricultural plant species and the correlation with cellular damage (lipid peroxidation). *Environ. Toxicol.* 22, 436–442.
- Peuthert, A., Lawton, L., Pflugmacher, S., 2008. *In vivo* influence of cyanobacterial toxins on enzyme activity and gene expression of protein phosphatases in Alfalfa (*Medicago sativa*). *Toxicol.* 52, 84–90.
- Pflugmacher, S., Wiegand, C., Oberemm, A., Beattie, K.A., Krause, E., Codd, G.A., Steinberg, C.E., 1998. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. *Biochim. Biophys. Acta* 1425, 527–533.
- Pflugmacher, S., Ame, V., Wiegand, C., Steinberg, C., 2001. Cyanobacterial toxins and endotoxins: their origin and their ecophysiological effects in aquatic organisms. *Wasser und Boden* 53, 15–20.
- Pflugmacher, S., 2002. Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems. *Environ. Toxicol.* 17, 407–413.
- Pflugmacher, S., 2004. Promotion of oxidative stress in the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* during biotransformation of the cyanobacterial toxin microcystin-LR. *Aquat. Toxicol.* 70, 169–178.
- Pietsch, C., Wiegand, C., Amé, M.V., Nicklisch, A., Wunderlin, D., Pflugmacher, S., 2001. The effects of a cyanobacterial crude extract on different aquatic organisms: evidence for cyanobacterial toxin modulating factors. *Environ. Toxicol.* 16, 535–542.
- Prakash, S., Lawton, L.A., Edwards, C., 2009. Stability of toxigenic *Microcystis* blooms. *Harmful Algae* 8, 377–384.
- Prieto, A., Campos, A., Cameán, A., Vasconcelos, V., 2011. Effects on growth and oxidative stress status of rice plants (*Oryza sativa*) exposed to two extracts of toxin-producing cyanobacteria (*Aphanizomenon ovalisporum* and *Microcystis aeruginosa*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 1973–1980.
- Puerto, M., Pichardo, S., Jos, Á., Prieto, A.L., Sevilla, E., Frías, J.E., Cameán, A.M., 2010. Differential oxidative stress responses to pure Microcystin-LR and Microcystin-containing and non-containing cyanobacterial crude extracts on Caco-2 cells. *Toxicol.* 55, 514–522.

- Pushparaj, B., Pelosi, E., Jüttner, F., 1998. Toxicological analysis of the marine cyanobacterium *Nodularia harveyana*. *J. Appl. Phycol.* 10, 527–530.
- Rapala, J., Sivonen, K., Luukkainen, R., Niemelä, S., 1993. Anatoxin-a concentration *Anabaena* and *Aphanizomenon* under different environmental conditions and comparison of growth by toxic and non-toxic *Anabaena*-strains – a laboratory study. *J. Appl. Phycol.* 5, 581–591.
- Rapala, J., Lahti, K., Sivonen, K., Niemelä, S.I., 1994. Biodegradability and adsorption on lake sediments of cyanobacterial hepatotoxins and anatoxin-a. *Let. Appl. Microbiol.* 19, 423–428.
- Rapala, J., Sivonen, K., Lyra, C., Niemelä, S.I., 1997. Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli. *Appl. Environ. Microb.* 63, 2206–2212.
- Rapala, J., Berg, K.A., Lyra, C., Niemi, R.M., Manz, W., Suomalainen, S., Paulin, L., Lahti, K., 2005. *Paucibacter toxinivorans* gen. nov., sp. nov., a bacterium that degrades cyclic cyanobacterial hepatotoxins microcystins and nodularin. *Int. J. Syst. Evol. Microb.* 55, 1563–1568.
- Rinehart, K., Namikoshi, M., Choi, B., 1994. Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). *J. Appl. Phycol.* 6, 159–176.
- Romanowska-Duda, Z., Tarczyńska, M., 2002. The influence of microcystin-LR and hepatotoxic cyanobacterial extract on the water plant *Spirodela oligorrhiza*. *Environ. Toxicol.* 17, 434–440.
- Runnegar, M.T.C., Gerdes, R.G., Falconer, I.R., 1991. The uptake of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by isolated rat hepatocytes. *Toxicol.* 29, 43–51.
- Runnegar, M.T., Kong, S.-M., Zhong, Y.-Z., Lu, S.C., 1995. Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 49, 219–225.
- Saito, T., Okano, K., Park, H.-D., Itayama, T., Inamori, Y., Neilan, B.A., Burns, B.P., Sugiura, N., 2003. Detection and sequencing of the microcystin LR-degrading gene, *mLR*, from new bacteria isolated from Japanese lakes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 229, 271–276.
- Saker, M.L., Griffiths, D.J., 2001. Occurrence of blooms of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya and Subba Raju in a north Queensland domestic water supply. *Mar. Freshwater Res.* 52, 907–915.
- Saqrane, S., Ghazali, I.E., Ouahid, Y., Hasmi, M.E., Hadrami, I.E., Bouarab, L., Del Campo, F.F., Oudra, B., Vasconcelos, V., 2007. Phytotoxic effects of cyanobacteria extract on the aquatic plant *Lemna gibba*: microcystin accumulation, detoxication and oxidative stress induction. *Aquat. Toxicol.* 83, 284–294.
- Saqrane, S., El Ghazali, I., Oudra, B., Bouarab, L., Vasconcelos, V., 2008. Effects of cyanobacteria producing microcystins on seed germination and seedling growth of several agricultural plants. *J. Environ. Sci. Heal. B* 43, 443–451.
- Sathishkumar, M., Pavagadhi, S., Vijayaraghavan, K., Balasubramanian, R., Ong, S.L., 2011. Concomitant uptake of microcystin-LR and -RR by peat under various environmental conditions. *Chem. Eng. J.* 172, 754–762.
- Schembri, M.A., Neilan, B.A., Saint, C.P., 2001. Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environ. Toxicol.* 16, 413–421.
- Seawright, A., Ng, J., Oelrichs, P., Sani, Y., Nolan, C., Lister, A., Holton, J., Ray, D., Osborne, R., 1999. Recent toxicity studies in animals using chemicals derived from cycads. In: Chen, C.-J. (Ed.), *Biology and Conservation of Cycads*, first ed. International Academic Publishers, Beijing, pp. 345–353.
- Senogles, P., Smith, M., Shaw, G.R., 2002. Physical, chemical and biological methods for the degradation of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. In: *American Water Works Association Water Quality Technology Conference and Exhibition: Proceedings*, Seattle, Washington, pp. 1–14.
- Shaw, G.R., Sukenik, A., Livne, A., Chiswell, R.K., Smith, M.J., Seawright, A.A., Norris, R.L., Eaglesham, G.K., Moore, M.R., 1999. Blooms of the cylindrospermopsin containing cyanobacterium, *Aphanizomenon ovalisporum* (Forti), in newly constructed lakes, Queensland, Australia. *Environ. Toxicol.* 14, 167–177.
- Sheen, J., 1993. Protein phosphatase activity is required for light-inducible gene expression in maize. *EMBO J.* 12, 3497–3505.
- Siegl, G., MacKintosh, C., Stitt, M., 1990. Sucrose-phosphate synthase is dephosphorylated by protein phosphatase 2A in spinach leaves: evidence from the effects of okadaic acid and microcystin. *FEBS Lett.* 270, 198–202.
- Singh, D.P., Tyagi, M., Kumar, A., Thakur, J., Kumar, A., 2001. Antialgal activity of a hepatotoxin-producing cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *World J. Microb. Biot.* 17, 15–22.
- Sivonen, K., Jones, G., 1999. Cyanobacterial toxins. In: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.), *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring, and Management*. E&FN Spon, London, pp. 41–111.
- Sivonen, K., Niemelä, S.I., Niemi, R.M., Lepistö, L., Luoma, T.H., Räsänen, L.A., 1990. Toxic cyanobacteria (blue-green algae) in Finnish fresh and coastal waters. *Hydrobiologia* 190, 267–275.
- Skulberg, O.M., Skulberg, R., Carmichael, W.W., Andersen, R.A., Matsunaga, S., Moore, R.E., 1992. Investigations of a neurotoxic oscillatoriacean strain (*Cyanophyceae*) and its toxin. Isolation and characterization of homoanatoxin-a. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 321–329.
- Smith, C., Sutton, A., 1993. The persistence of anatoxin-a in reservoir water. In: *UK Report No. FR0427. Foundation for Water Research, Buckinghamshire (UK)*.
- Smith, R.D., Wilson, J.E., Walker, J.C., Baskin, T.L., 1994. Protein-phosphatase inhibitors block root hair growth and alter cortical cell shape of *Arabidopsis* roots. *Planta* 194, 516–524.
- Smith, M.J., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K., Ho, L., Brookes, J.D., 2008. Elucidating the factors influencing the biodegradation of cylindrospermopsin in drinking water sources. *Environ. Toxicol.* 23, 413–421.
- Smith, C.J., 1996. Accumulation of phytoalexins: defence mechanism and stimulus response system. *New Phytol.* 132, 1–45.
- Smith, M.J., 2005. *Biodegradation of the Cyanotoxin Cylindrospermopsin*, PhD thesis, School of Medicine, The University Queensland, 162p.
- Song, H.-L., Li, X.-N., Lu, X.-W., Inamori, Y., 2009. Investigation of microcystin removal from eutrophic surface water by aquatic vegetable bed. *Ecol. Eng.* 35, 1589–1598.
- Spencer, P.S., Nunn, P.B., Hugon, J., Ludolph, A., Roy, D.N., 1986. Motorneuron disease on Guam: possible role of a food neurotoxin. *Lancet* 1, 965.
- Spencer, P.S., Nunn, P., Hugon, J., Ludolph, A., Ross, S., Roy, D., Robertson, R., 1987. Guam amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism-dementia linked to a plant excitant neurotoxin. *Science* 237, 517–522.
- Spivak, C.E., Witkop, B., Albuquerque, E.X., 1980. Anatoxin-a: a novel, potent agonist at the nicotinic receptor. *Mol. Pharmacol.* 18, 384–394.
- Spoof, L., Vesterkvist, P., Lindholm, T., Meriluoto, J., 2003. Screening for cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularin in environmental water samples by reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1020, 105–119.
- Steele, J.C., McGeer, P.L., 2008. The ALS/PDC syndrome of Guam and the cycad hypothesis. *Neurology* 70, 1984–1990.
- Stevens, D.K., Krieger, R.I., 1991. Stability studies on the cyanobacterial nicotinic alkaloids anatoxin-A. *Toxicol.* 29, 167–179.
- Stewart, I., Schluter, P.J., Shaw, G.R., 2006. Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health – a review. *Environ. Health* 5 (7), 1–23.
- Stüven, J., Pflugmacher, S., 2007. Antioxidative stress response of *Lepidium sativum* due to exposure to cyanobacterial secondary metabolites. *Toxicol.* 50, 85–93.
- Su, Z., Sheets, M., Ishida, H., Li, F., Barry, W.H., 2004. Saxitoxin blocks L-Type ICa. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308, 324–329.
- Sukenik, A., Eshkol, R., Livne, A., Hadas, O., Rom, M., Tchernov, D., Vardi, A., Kaplan, A., 2002. Inhibition of growth and photosynthesis of the dinoflagellate *Peridinium gatunense* by *Microcystis* sp. (cyanobacteria): a novel allelopathic mechanism. *Limnol. Oceanogr.* 47, 1656–1663.
- Svirčev, Z., Simeunović, J., Subakov-Simić, G., Krstić, S., Vidović, M., 2007. Freshwater cyanobacterial blooms and cyanotoxin production in Serbia in the past 25 years. *Geogr. Pannonica* 11, 32–38.
- Svirčev, Z., Krstić, S., Miladinov-Mikov, M., Baltić, V., Vidović, M., 2009. Freshwater cyanobacterial blooms and primary liver cancer epidemiological studies in Serbia. *J. Environ. Sci. Health C* 27, 36–55.
- Takeda, S., Mano, S., Ohto, M., Nakamura, K., 1994. Inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A block the sugar-inducible gene expression in plants. *Plant Physiol.* 106, 567–574.
- Tassigny, M., Lefevre, M., 1971. Auto-, heteroantagonisme et autres conséquences des excretions d'algues d'eau douce ou thermale. *Mitt. Int. Verein. Theor. Angew. Limnol.* 19, 26–38.
- Thirumavalavan, M., Hu, Y.-L., Lee, J.-F., 2012. Effects of humic acid and suspended soils on adsorption and photo-degradation of microcystin-LR onto samples from Taiwan reservoirs and rivers. *J. Hazard. Mater.* 217–218, 323–329.
- Tsuji, K., Naito, S., Kondo, F., Ishikawa, N., Watanabe, M.F., Suzuki, M., Harada, K., 1994. Stability of microcystins from cyanobacteria: effect of light on decomposition and isomerization. *Environ. Sci. Technol.* 28, 173–177.
- Tsuji, K., Setsuda, S., Watanuki, T., Kondo, F., Nakazawa, H., Suzuki, M., Harada, K.-I., 1996. Microcystin levels during 1992–95 for lakes sagami and tsukui-japan. *Nat. Toxins* 4, 189–194.
- Ueno, Y., Nagata, S., Tsutsumi, T., Hasegawa, A., Watanabe, M.F., Park, H.-D., Chen, G.-C., Chen, G., Yu, S.-Z., 1996. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in haimen and fusui, endemic areas of primary liver cancer in china, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis* 17, 1317–1321.
- Valdor, R., Aboal, M., 2007. Effects of living cyanobacteria, cyanobacterial extracts and pure microcystins on growth and ultrastructure of microalgae and bacteria. *Toxicol.* 49, 769–779.
- Van Apeldoorn, M.E., Van Egmond, H.P., Speijers, G.J.A., Bakker, G.J.L., 2007. Toxins of cyanobacteria. *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 7–60.
- Vasas, G., Gáspár, A., Surányi, G., Batta, G., Gyémánt, G., et al., 2002. Capillary electrophoretic assay and purification of cylindrospermopsin, a cyanobacterial toxin from *Aphanizomenon ovalisporum*, by plant test (Blue-Green *Sinapis* Test). *Anal. Biochem.* 302, 95–103.
- Vieira, J.M.dos S., Azevedo, M.T.de P., Azevedo, S.M.F.de O., Honda, R.Y., Corrêa, B., 2005. Toxic cyanobacteria and microcystin concentrations in a public water supply reservoir in the Brazilian Amazonia region. *Toxicol.* 45, 901–909.
- Wang, J., Salata, J.J., Bennett, P.B., 2003. Saxitoxin is a gating modifier of hERG K<sup>+</sup> channels. *J. Gen. Physiol.* 121, 583–598.
- Weiss, Liebert, H.P., Braune, W., 2000. Influence of microcystin-rr on growth and photosynthetic capacity of the Duckweed *Lemna minor*. *J. Appl. Bot.* 74, 100–105.
- Welker, M., Steinberg, C., 1999. Indirect photolysis of cyanotoxins: one possible mechanism for their low persistence. *Water Res.* 33, 1159–1164.
- Welker, M., Steinberg, C., 2000. Rates of humic substance photosensitized degradation of microcystin-LR in natural waters. *Environ. Sci. Technol.* 34, 3415–3419.
- Wiegand, C., Pflugmacher, S., 2005. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203, 201–218.
- Wiegand, C., Peuthert, A., Pflugmacher, S., Carmeli, S., 2002. Effects of microcystin SF608 and microcystin-LR, two cyanobacterial compounds produced by *Microcystis* sp., on aquatic organisms. *Environ. Toxicol.* 17, 400–406.

- Williams, C.D., Auel, M.T., Chapman, A.D., D'Aiuto, P.E., 2007. Identification of cyanobacterial toxins in Florida's freshwater systems. *Lake Reserv. Manage.* 23, 144–152.
- Wonnacott, S., Swanson, K.L., Albuquerque, E.X., Huby, N.J.S., Thompson, P., Gallagher, T., 1992. Homoanatoxin: a potent analogue of anatoxin-a. *Biochem. Pharmacol.* 43, 419–423.
- Wood, S.A., Briggs, L.R., Sprosen, J., Ruck, J.G., Wear, R.G., Holland, P.T., Bloxham, M., 2006a. Changes in concentrations of microcystins in rainbow trout, freshwater mussels, and cyanobacteria in Lakes Rotoiti and Rotoehu. *Environ. Toxicol.* 21, 205–222.
- Wood, S.A., Holland, P.T., Stirling, D.J., Briggs, L.R., Sprosen, J., Ruck, J.G., Wear, R.G., 2006b. Survey of cyanotoxins in New Zealand water bodies between 2001 and 2004. *New Zealand J. Mar. Freshw. Res.* 40, 585–597.
- Wörmer, L., Cirés, S., Carrasco, D., Quesada, A., 2008. Cylindrospermopsin is not degraded by co-occurring natural bacterial communities during a 40-day study. *Harmful Algae* 7, 206–213.
- Wörmer, L., Huerta-Fontela, M., Cirés, S., Carrasco, D., Quesada, A., 2010. Natural photodegradation of the cyanobacterial toxins microcystin and cylindrospermopsin. *Environ. Sci. Technol.* 44, 3002–3007.
- Wörmer, L., Cirés, S., Quesada, A., 2011. Importance of natural sedimentation in the fate of microcystins. *Chemosphere* 82, 1141–1146.
- Xiao, F.-G., Zhao, X.-L., Tang, J., Gu, X.-H., Zhang, J.-P., Niu, W.-M., 2009. Determination of microcystin-LR in water from lake Tai, China. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 82, 230–233.
- Yamasaki, S., 1993. Probable effects of algal bloom on the growth of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. *J. Plant Res.* 106, 113–120.
- Yin, L., Huang, J., Huang, W., Li, D., Liu, Y., 2005. Responses of antioxidant system in *Arabidopsis thaliana* suspension cells to the toxicity of microcystin-RR. *Toxicol.* 46, 859–864.
- Yu, G., Liu, Y., Qiu, C., Xu, X., 2000. Macrophyte succession in Dianchi Lake and relations with the environment. *J. Lake Sci.* 12, 73–80.
- Žegura, B., Sedmak, B., Filipič, M., 2003. Microcystin-LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line HepG2. *Toxicol.* 41, 41–48.
- Zhang, M., Pan, G., Yan, H., 2010. Microbial biodegradation of microcystin-RR by bacterium *Sphingopyxis* sp. USTB-05. *J. Environ. Sci.* 22, 168–175.

- **Dynamics of the toxic cyanobacterial microcystin-leucine-arginine peptide in agricultural soil (Environmental Chemistry Letters, soumis le 24 juillet 2014, accepté avec révisions)**

Sylvain Corbel<sup>a</sup>, Nouredine Bouaïcha<sup>b</sup>, Christian Mougin<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>INRA, UR251 PESSAC, F-78026 Versailles, France.

<sup>b</sup>Laboratoire Ecologie, Systématique et Evolution, UMR8079, Univ. Paris-Sud/CNRS/AgroParisTech, Université Paris-Sud, F-91405 Orsay, France.

\*Corresponding author

### Abstract

Microcystin-leucine-arginine (MC-LR) is a cyclic heptapeptide hepatotoxin produced by cyanobacteria like *Microcystis aeruginosa*. It's considered a threat to water quality, agriculture, and human and animal health. This congener of microcystins is generally recognized as being the most studied due to its high toxicity, and frequent detection with high concentrations in surface waters, whereas its fate in soil is unknown. In this study, the radiolabelled MC-LR (<sup>14</sup>C-MC-LR) was used to evaluate its fate and its potential transfer to plants in an artificial system constituted of agricultural soil and tomato seedlings *Solanum lycopersicum* var. MicroTom. <sup>14</sup>C-MC-LR were dissolved in water and applied by soil irrigation, one or two times with an interval of 28 days. After 28 or 56 days of incubation, the <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> from degradation of <sup>14</sup>C-MC-LR by soil microorganisms represented 11% of total radiolabeled carbon input and the majority of <sup>14</sup>C-MC-LR (74-80%) was found in extractible fractions by high pressure liquid chromatography analysis whereas the adsorption onto soil particulates was low (>14%). Presence of MC-LR in the labile phase showed an important risk of lixiviation during raining events and its potential infiltration in the groundwater. So this study highlighted, for the first time, the fate of MC-LR in a soil-plant system irrigated with contaminated water.

**Keywords:** Cyanotoxins, Microcystin-LR, Soil, Persistence, Mineralization, Plant transfer

- **Phytotoxicity and ecotoxicity of cyanobacterial extract containing microcystins under realistic environmental concentrations and in a soil-plant system (Chemosphere, soumis le 21 mai 2014, accepté avec révisions)**

Sylvain Corbel<sup>a</sup>, Christian Mougin<sup>a</sup>, Fabrice Martin-Laurent<sup>b</sup>, Olivier Crouzet<sup>a</sup>, David Bru<sup>b</sup>, Sylvie Nélieu<sup>a</sup>, Noureddine Bouaïcha<sup>c\*</sup>

<sup>a</sup>INRA, UR251 PESSAC, F-78026 Versailles, France.

<sup>b</sup>INRA, UMR1229 Agroécologie, F-21000 Dijon, France.

<sup>c</sup>Laboratoire Ecologie, Systématique et Evolution, UMR8079, Univ. Paris-Sud/CNRS/AgroParisTech, Université Paris-Sud, F-91405 Orsay, France.

### Abstract

In this study, we investigated the impact of a crude extract of *Microcystis aeruginosa* (PCC7820) containing 14 microcystin variants on seeds germination and primary roots development of four agricultural plants: two tomato varieties *Solanum lycopersicum* (cultivars: MicroTom and Saint-Pierre), the wheat *Triticum aestivum* and the lettuce *Lactuca sativa* var. *capitata*. In addition, the effect of 14 day-exposure to irrigation water containing environmental concentrations of microcystins (0 to 100 µg eq. microcystin-LR L<sup>-1</sup>) on the tomato MicroTom seedling growth was further evaluated on roots and aerial part biomasses. Impacts on soil microbial parameters, as such extracellular enzymatic activities, nitrification activity and abundances of ammonia-oxidizing microorganisms were also investigated. In hydroponic conditions, the cyanobacterial crude extract inhibited only the germination of the wheat seeds, with an EC<sub>50</sub> of 11 mg eq. microcystin-LR L<sup>-1</sup>; which is 13 times lower than that of the cadmium chloride (EC<sub>50</sub> of 145 mg L<sup>-1</sup>). Moreover, low concentrations of microcystins increased the growth of primary roots; however, high concentrations decreased it for all plants except for the wheat. In a soil-plant approach, only aerial part biomass of the tomato MicroTom was enhanced significantly. In addition, only soil nitrification potential and ammonia-oxidizing bacterial abundances were consistently impacted. A significant positive correlation (r=0.56) was found between the increase of nitrification potential and abundances of ammonia-oxidizing bacteria. This work suggested, that exposure to environmental microcystins concentrations could affect seed germination, depending plant species. It was also

highlighted, for the first time, disturbances in soil microbial functioning, evidences on soil nitrification process.

**Keywords:** microcystins, seed germination, plant growth, soil enzymatic activities, nitrification, ammonia-oxidizing bacteria.

\* Corresponding author: Tel.: +33 (0)1 69 15 49 90; fax: +33 (0)1 69 15 56 96

Email address: noureddine.bouaicha@u-psud.fr

- **MC-LR absorption, translocation and bioconcentration in tomato plants *Solanum lycopersicum* var. MicroTom (en preparation)**

### **Présentations orales**

**Corbel S**, Mougín C, Bouaïcha N, 2014. Transfert et accumulation de microcystines dans la tomate (*Solanum lycopersicum* var. MicroTom) après 3 mois d'irrigation. Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée, 1-2 juillet, Besançon, France

**Corbel S**, Mougín C, Martin-Laurent F, Bouaïcha N, 2014. Characterization of ecotoxicity and phytotoxicity of a cyanobacterial extract containing microcystins under realistic environmental concentrations and in a soil-plant system. Society of Environmental Toxicology and Chemistry Europe, 11-15 mai, Bâle, Suisse

**Corbel S**, Bouaïcha N, Mougín C, 2013. Effets d'une irrigation répétée avec des eaux contaminées en microcystines sur les communautés microbiennes du sol et sur la croissance des tomates (*Solanum lycopersicum* var. MicroTom). Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée, 3-4 juillet, Thionville, France

**Corbel S**, Bouaïcha N, Mougín C, 2013. Impact of irrigation with cyanotoxins on soil and tomatoes (*Lycopersicum esculatum* var. MicroTom). American Chemical Society National Meeting, Chemistry of Energy & Food, 7-11 avril, New Orleans, USA

#### **Best oral presenter of the session, Springer award**

**Corbel S**, Bouaïcha N, Mougín C, 2013. Caractérisation des mécanismes de contamination de la tomate (*Solanum lycopersicum* L.) par les cyanotoxines de type microcystine présentes dans les eaux d'irrigation : bioaccumulation des toxines dans les tissus vivants de la plante et risques sanitaires associés. Journée des doctorants et post-doctorants du DIM ASTREA, 29 mars, Paris

**Communications affichées (Posters)**

**Corbel S**, Mougin C, Crouzet O, Bru D, Néliu S, Martin-Laurent F, Bouaïcha N. 2014. Phytotoxicité et écotoxicité d'un extrait de cyanobactéries. Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée, 1-2 juillet, Besançon, France

**Corbel S**, Mougin C, Crouzet O, Bru D, Néliu S, Martin-Laurent F, Bouaïcha N. 2014. Phytotoxicité et écotoxicité d'un extrait de cyanobactéries. Colloque de restitution du DIM ASTREA, Paris, France

**Corbel S**, Bouaïcha N, Mougin C. 2013. Phytotoxic effects of microcystins on tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* var. MicroTom) and soil microbial communities. Journées des doctorant ABIÉS, 26-27 février, Paris

**Corbel S**, Bouaïcha N, Mougin C. 2012. Impact d'une irrigation avec des microcystines sur les sols et plantes (*Solanum lycopersicum* var. MicroTom). Colloque de restitution du DIM ASTREA 2008 - 2011, 1<sup>er</sup> octobre, Paris



## Résumé

Les microcystines, hépatotoxines produites par des cyanobactéries du genre *Microcystis* représentent les cyanotoxines les plus fréquemment trouvées dans les eaux d'irrigation. Leurs apports aux sols irrigués peuvent être importants en raison des fortes concentrations ( $<100 \mu\text{g}$  équiv. MC-LR  $\text{L}^{-1}$ ) dans les eaux. Nous avons étudié au laboratoire l'impact des microcystines sur les microorganismes du sol et la plante, ainsi que le devenir de ces contaminants dans le système sol-plante, lors d'irrigations successives. Les toxines sont peu adsorbées dans les sols où elles sont relativement biodisponibles, et peu dégradées. L'activité biologique globale des sols n'est pas modifiée par les apports d'eau contaminée, mais l'activité des bactéries nitrifiantes est stimulée. Concernant les plants de tomates *Solanum lycopersicum* variété MicroTom, la germination des graines est accélérée par l'exposition aux microcystines, durant les 14 jours post-semis. Par la suite, la croissance et les paramètres physiologiques ne sont plus affectés par ces apports quotidiens de microcystines. La plante absorbe les microcystines présentes dans le sol et les redistribue principalement dans ses feuilles où elles sont liées à d'autres molécules. Malgré cela, aucune microcystine libre ou liée, n'a été détectée dans les parties comestibles de la plante, suggérant un risque sanitaire négligeable pour les consommateurs de ces tomates. Nous concluons que dans nos conditions expérimentales, les microcystines n'exercent pas d'impact écotoxicologique majeur sur le système sol-plante.

**Mots clés** : microcystines, sol, irrigation, écotoxicologie, transfert, plante, accumulation

## Abstract

The microcystins, hepatotoxins produced by the genus *Microcystis*, are the most frequent cyanotoxins detected in irrigation waters, often at high concentrations. Their inputs to irrigated soils can be important because of high concentrations ( $<100 \mu\text{g}$  eq. MC-LR  $\text{L}^{-1}$ ) in water. We studied in laboratory experiments the impact of microcystins on soil microorganisms and higher plants, and the fate of these contaminants in the soil/plant system. The toxins are weakly adsorbed onto soil, are bioavailable and poorly degraded. Soil biological activity is globally unmodified by toxin inputs, but the nitrification activity was stimulated. About tomato plants *Solanum lycopersicum* cultivar MicroTom, the germination process is accelerated, 14 days post-sowing but after, the growth and physiological parameters were not affected by these daily microcystins inputs. However, the tomato absorbed the microcystins contained in the soil before being translocate mainly in its leaves where they were bound to plant molecules. Despite this, neither free microcystins, nor bound microcystins were found in the edible parts of the plants, so the sanitary risk is negligible for the consumers of these tomatoes. We conclude that microcystins did not cause strong ecotoxicological impacts on the soil-plant ecosystem, in our experimental conditions.

**Key words**: microcystins, soil, irrigation, ecotoxicology, transfer, plant, accumulation