# CIANOBACTERIAS TÓXICAS Y MORTANDADES MASIVAS EN EL PARQUE NACIONAL DE DOÑANA: RED DE ALERTA TEMPRANA Y ESTRATEGIAS DE GESTIÓN

# EDUARDO COSTAS<sup>1</sup> Y VICTORIA LÓPEZ-RODAS<sup>1</sup>

### **RESUMEN**

Durante los últimos años hemos analizado las cianobacterias tóxicas del Parque Nacional de Doñana (PND), que en 3 ocasiones han producido tres mortandades masivas de aves y peces. La cianobacteria tóxica *Microcystis aeruginosa*, productora de potentes hepatotoxinas (microcistinas – MCYST), es el principal problema de fitoplancton tóxico en el PND. Esta especie aparece en todo tipo de aguas del PND (lucios, charcas, canales...), a bajas densidades durante los períodos sin mortalidad y a muy altas densidades durante los periodos de mortandades masivas. *M. aeruginosa* presenta mucha variabilidad genética para toxicidad (con cepas tóxicas y no tóxicas dentro de la misma proliferación) así como para su rendimiento fotosintético, morfología, respiración, etc. Además presenta una gran capacidad de adaptación genética al cambio ambiental. Hemos estudiado en detalle los episodios de mortandades en masa de aves y peces que se produjeron en Doñana durante los veranos de 2004 y 2005. Estos análisis determinaron que la mortandad en masa de 2004 se debió a una intoxicación alimentaría por microcistinas producidas por *Microcystis aeruginosa*, mientras que la de 2005 fue producida por *Anabaena circinalis* conteniendo toxinas PSP. Las cianobacterias toxicas deberían ser consideradas en la gestión del PND.

**Palabras clave:** Microcistinas, PSP, cianobacterias tóxicas, mortalidad en masa, Parque Nacional de Doñana.

### **SUMMARY**

During the last years we have analyzed the toxic cyanobacteria, which have produced 3 mass mortalities in Doñana Nacional Park (DNP). The toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* is the main HAB (harmful algal bloom) problem in DNP. This species occurs in all kind of DNP waters (lagoons, ponds, chanels...), at very high density for the periods of mass mortalities and at low densities for the period without mortalities. *M. aeruginosa* show genetic variability for toxin production (toxic and nontoxic strains occurs in the course of the same bloom), as well as for photosynthesis performance, morphology, respiration rate and others. Furthemore, this species has great capability for genetic adaptation to environmental change. We have studied the mass mortalities of birds and fishes during the summer of 2004 and 2005. This study proves that the mass mortality during the summer of 2004

E-mail: ecostas@vet.ucm.es. E-mail: vlrodas@vet.ucm.es

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Departamentode Producción Animal. Facultad de Veterinaria. Avda. Puerta de Hierro s/n. Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid.

was due to an alimentary intoxication by microcystins produced by *Microcystis aeruginosa*, whereas the mortality of 2005 was as a result of PSP toxins produced by *Anabaena circinalis*. Toxic cyanobacteria should be taken in account in DNP management.

Key words: Microcystins, PSP, toxic cyanobacteria, mass mortalities, Doñana National Park.

# INTRODUCCIÓN

Las cianobacterias son una de las formas de vida más antiguas sobre la tierra. Su distribución es universal y así podemos encontrarlas tanto en el agua como en el suelo, desde fuentes termales hasta los hielos antárticos, distribuyéndose de manera general por las aguas dulces y marinas de todo el mundo. Su distribución más común es como organismos fitoplanctónicos en la columna de agua. Han desarrollado adaptaciones especiales, como la fijación de nitrógeno, la capacidad de regular su flotación, o la de producir formas de resistencia, que les dan grandes ventajas sobre sus competidores.

Las cianobacterias plantean grandes problemas a los seres humanos y a los animales, ya que pueden producir potentes toxinas entre las que destacan hepatotoxinas peptídicas y diversos alcaloides (neurotóxicos, citotóxicos, dermotóxicos), así como lipopolisacáridos irritantes y otros compuestos bioactivos (CARMICHAEL 1994, FALCONER et al. 1998, SIVONEN & JONES 1999). A menudo, son capaces de desarrollar grandes floraciones en forma de natas espesas que producen anoxia e impiden el paso de luz (CARPENTER & CARMICHAEL 1995). Se conocen decenas de especies de cianobacterias capaces de producir potentes toxinas (CARMICHAEL 1995, FALCONER et al. 1998), y continuamente se detectan nuevas especies tóxicas. Se ha demostrado que la exposición continua a algunas toxinas de cianofíceas puede inducir tumores hepáticos, asociándose la exposición crónica a estas cianotoxinas con elevadas incidencias de cánceres digestivos en seres humanos y en animales (UENO et al. 1996, KUIPER-GOODMAN et al. 1999).

Las cianobacterias también han sido las responsables de mortandades espectaculares de animales incluyendo peces, ranas, ratones y ratas, perros, ovejas y vacas (BURY et al. 1997, HARDING et al. 1995, ZAMBRANO & CANELO 1996). Incluso han llegado a producir la muerte de rinocerontes blancos (SOLL & WILLIAMS 1985). Especialmente afectan a aves acuáticas como gansos y patos, que han perecido por miles (CARMICHAEL 1994, MATSUNAGA et al. 1999). La mayoria de las muertes ocurren cuando los animales beben las aguas contaminadas. Dado que, en ocasiones, las cianobacterias alcanzan concentraciones espectaculares, los animales pueden beber fácilmente una concentración letal (CARMICHAEL 1995). Incluso se ha comprobado que los animales prefieren beber agua con grandes concentraciones de cianobacterias, lo que incrementa sus efectos dañinos (LÓPEZ-RODAS & COSTAS 1999).

En el verano de 2001, una proliferación masiva de cianobacterias tóxicas (*Microcystis* y *Anabaena*), produjo una gran mortandad de flamencos (y otras aves acuáticas) en el Lucio de la FAO del Parque Nacional de Doñana. Más de 500 flamencos murieron en pocos días (ALONSO-ANDICOBERRY *et al.* 2002). Aparentemente en Doñana ocurren reiteradamente mortandades de aves acuáticas debidas a cianobacterias tóxicas. Sin embargo un problema tan importante apenas ha sido estudiado en detalle. Desde su declaración como Parque Nacional hace 37 años han sucedido 18 episodios de mortandad en masa de fauna salvaje (Cuadernos de Campo de Doñana)

Los ambientes mesotróficos y eutróficos, con elevadas temperaturas y abundante luminosidad (como los que se dan en las lagunas, lucios, charcas y canales del Parque Nacional de Doñana) favorecen la aparición y proliferación de cianobacterias tóxicas. En muestreos realizados durante el año 2001 pudimos comprobar la presencia de la cianobacteria tóxica Microcystis aeruginosa en los lucios del Palacio -El Bolín- y de Cerrado Garrido -La Fao-, así como en la laguna de Santa Olalla. En total aislamos 26 clones de dicha especie que mostraron diferente grado de toxicidad (CARRILLO et al. 2003, LÓPEZ-RODAS et al. 2006). Microcystis aeruginosa Kütz. ex Lemmerm, que produce diversos tipos de microcistinas, es la especie de cianobacteria que con mayor frecuencia ha causado problemas tanto a la vida salvaje como en embalses de abastecimiento (SIVONEN & JONES 1999). Como ejemplo, la microcistina producida por Microcystis que crecían en el agua empleada para la diálisis de enfermos renales, fue responsable de la muerte de 53 pacientes en un hospital (JOCHIMSEN et al. 1998). Así mismo, hemos aislado otras cianobacterias tóxicas, pertenecientes al género Anabaena.

Para complicar las cosas, las actividades humanas, y en especial la eutrofización, favorecen la aparición y el desarrollo de grandes floraciones de microalgas en general, y de cianofíceas en particular. La eutrofización es uno de los principales problemas que sufren nuestras aguas dulces, no sólo por el deterioro ambiental que significa, sino también por la rapidez con que está teniendo lugar tanto en nuestro país y especialmente en Andalucía. En este sentido, la posible eutrofización en lucios de Doñana, debida entre otras a la presencia de innumerables animales (aves y mamíferos) que constituyen una fuente de nutrientes para sus aguas, es un hecho que debería tenerse en cuenta. La sequía también favorece la acumulación de cianobacterias, y Andalucía sufre sequías frecuentes. Por tanto, las cianobacterias y microalgas tóxicas son un problema que desgraciadamente plantea un desafío para la conservación de muchas especies

de aves acuáticas únicas que viven y crían en Doñana.

El Parque de Doñana está situado en el delta del río Guadalquivir y tiene una importancia extraordinaria desde el punto de vista internacional. Hay 132.000 hectáreas protegidas bajo legislaciones nacionales o internacionales. Las áreas protegidas incluyen 50.720 hectáreas como Parque Nacional (calificado como un área de protección especial para pájaros por la directiva europea 79/409) y 54.259 hectáreas de Parque Natural, bordeando el Parque Nacional. Fue declarado reserva de la biosfera por la UNESCO en 1981, y patrimonio de la humanidad en 1994. En Doñana existen 803 especies de plantas y 458 especies de animales, de las cuales 361 son aves de especial interés, ya que representan el 70% de todas las especies de aves europeas.

En este trabajo realizamos un estudio sistemático de las cianobacterias tóxicas existentes en el Parque Nacional de Doñana. Aunque en las aguas de abastecimiento para la población humana se realizan análisis y controles de estas cianobacterias tóxicas, la inspección y detección rutinaria de cianobacterias y microalgas dañinas no se han llevado a cabo hasta el momento de manera sistemática en el entorno de Doñana. El estudio de estas cianobacterias tóxicas y de sus toxinas, su dinámica en la cadena hídrica, y su posible evolución frente a un ambiente cambiante es un tema de extraordinario interés en el Parque Nacional de Doñana, máxime teniendo en cuenta que las proliferaciones de microalgas tóxicas suelen coincidir con los momentos de máxima escasez de recursos hídricos y con las grandes mortandades de aves. Así mismo hemos estudiado dos mortandades en masa: una de aves y peces durante el verano del año 2004 y una mortandad en masa de peces ocurrida en junio de 2005 en el Caño del río Guadiamar en la que murieron 20 toneladas de peces en 3 días.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Hemos realizado muestreos mensuales de fitoplancton en lagunas, lucios, caños y charcas del Parque Nacional de Doñana durante los años 2004 y 2005 en épocas sin mortandades masivas y muestreos diarios o semanales en las épocas de mortandades masivas.

Para los análisis de agua hemos medido in situ de forma automatizada 8 parámetros mediante una sonda multicanal (YSI 6802 CM). Además recogimos muestras de agua en cada uno de los lugares elegidos. Las muestras se transportaron refrigeradas y en oscuridad hasta su análisis en el laboratorio. La determinación y cuantificación de cianobacterias se llevó a cabo en hemocitómetros y en un microscopio Zeiss III equipado con epifluorescencia y contraste diferencial e interferencial Nomarsky.

Para la determinación de toxinas se sonicaron las células en tres pulsos de 20 segundos a 60 MHz (Vibracell TM, Sonics & Materials INC, Danbury CT, USA) en frío para romper las células. A continuación se centrifugó la muestra para eliminar los restos celulares. Recogimos el sobrenadante para la determinación de cianotoxinas que se efectuó mediante un inmunoensayo (Microcystin Quantitube Test Kit Envirogard, para la determinación de microcistinas) (más detalles en ALONSO-ANDICOBERRY et al. 2002) y (Ridascreen ® fase saxitoxin para la determinación de saxitoxinas) (más detalles en COSTAS & LÓPEZ-RODAS 1998). Así mismo se realizaron bioensayos de ratón según procedimientos normalizados y cumpliendo las normas de bienestar animal. Para cada una de las muestras se inyectaron intraperitonealmente 3 ratones utilizando también 3 ratones control a los que se inyectó suero fisiológico.

En los episodios de mortandades masivas se recogieron aves y peces recién muertos. En ellos se realizaron necropsias completas, ordenadas y sistemáticas, recogiendo muestras de hígados y ventrículos para la determinación de toxinas en el caso de las aves y solo el hígado en el caso de los peces (más detalles en LÓPEZ-RODAS *et al.*(a) in press).

También trabajamos en periodos en los que no hubo mortandades masivas como los años 2002 y 2003.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Incluso en los periodos sin mortalidad existen prácticamente en todos los lugares muestreados de Doñana cianobacterias tóxicas, de los géneros Microcystis, Anabaena y Pseudanabaena (Tabla 1). El número de colonias/mL que aparecen de mayo a septiembre en el año 2002 osciló entre 140 y 727 que produjeron un máximo de toxina de 0.06 mg/mL, siendo negativos todos los bioensayos realizados. En el año 2003 los resultados obtenidos son muy parecidos a los del año anterior en el mismo periodo de tiempo (las especies tóxicas son prácticamente las mismas, añadiéndose Anabaena circinalis, el número de colonias es relativamente bajo y osciló entre 88 y 586 col/mL). Además en estos periodos sin mortandades en masa hemos detectado y analizado variabilidad genética para toxicidad (CARRILLO et al. 2003, LÓPEZ-RODAS et al. 2006), para el tamaño y forma de las colonias (RICO et al. 2006) y hemos estudiado la adaptación de estos organismos a distintos contaminantes tanto naturales como de origen antropogénico (LÓPEZ-RODAS et al. (b) in press) y que van a determinar la presencia de estos microorganismos fotosintéticos del plancton en todo tipo de habitats, ya que son capaces de adaptarse mediante mutaciones preadaptativas, lo que les garantiza la supervivencia debido al tamaño ingente de sus poblaciones.

Durante la mortandad en masa del verano de 2004, los resultados de las especies de cianobacterias tóxicas, su abundancia y el bioensayo de

	Localidad	Bioensayo	Toxina μg/ml	Especies	Col/ml
Мауо	Bolin	0+	0.06	M. aeruginosa	194
				A. circinalis	356
	Santa Olaya	0+	0.02	M. aeruginosa	469
				P. catenata	178
Junio	Bolin	0+	0.02	M. aeruginosa	177
				P. catenata	422
Julio	Rocina	0+	0.04	M. aeruginosa	727
				A. flos-aquae	337
Septiembre	Santa Olaya	0+	00.1	M. aeruginosa	140
				A. flos-aquae	269
	Rocio	0+	0.01	Gomphosphaeria	978
AÑO 2003					
	Localidad	Bioensayo	Toxina μg/ml	Especies	Col/ml
Мауо	Bolin	0+	0.01	M. aeruginosa	373
Junio	Rocio	0+	0.01	M. aeruginosa	157
Agosto	Rocio	1+	0.26	M. aeruginosa	586
				A. flos-aquae	88
				P. catenata	168
	Guadiamar	0+	0.14	M. aeruginosa	493
				A. circinalis	128
	Pescador	0+	0.0.06	M. aeruginosa	296
	C. Marin	0+	0.01	P.catenata .	122
	C. Marin	0+	0.01	r.calenala	122

**Tabla 1.-** Especies de cianobacterias, abundancia, bioensayo y cantidad de toxina en distintas localidades del PND en épocas sin mortandades masivas.

Table 1.- Cyanobacteria species, cell density, bioassay and toxin amount in different locales of DNP during periods withouth mortalities.

las aguas recogidas en distintas localidades del Parque Nacional de Doñana aparecen en la Tabla 2. Todas las especies de cianobacterias detectadas eran especies tóxicas, siendo la más abundante de ellas *Microcystis aeruginosa* que el día 29 de junio de 2004 llegó a alcanzar más de 62.000 col/mL en el canal del Cherry. Así mismo encontramos cianobacterias muy tóxicas a altas concentraciones como *Pseudanabaena catenata* o *Anabaena flos-aquae*. La cantidad de toxina encontrada en el agua fue de 13,5 mg/mL de microcistina LR equivalente. Estos resultados son muy distintos de los encontrados en los veranos de 2002 y 2003, que fueron años sin mortandades en masa (Tabla 1).

Durante los últimos días de junio de 2004 se observaron espesas natas verde-azuladas en la laguna de los ánsares y en canales, lagunas y charcas próximas. Poco después se encontró en la misma zona una mortandad en masa de peces

y aves, que acabó en agosto tras afectar a más de 5.500 aves de 47 especies distintas (Equipo de Seguimiento de Procesos Naturales. Estación Biológica de Doñana. CSIC), entre las que se encontraban especies en peligro de extinción como Marmaronetta angustirostris y Oxyura leucocephala. La mortandad también se extendió a cientos de peces, anfibios, zooplancton... Las necropsias de los cadáveres de las aves mostraron petequias y hemorragias intrahepáticas. El contenido de los ventrículos mostraba una concentración tremenda de cianobacterias tóxicas de hasta 10<sup>5</sup> col/mL junto con semillas y otros restos vegetales. Un lavado del contenido invectado intraperitonealmente en ratones de 20 gramos, produjo la muerte de éstos en menos de 24 horas (Tabla 3). La concentración de microcistina en el hígado de las aves y peces muertos osciló entre los 25.7  $\mu$ g/g y los 75.9  $\mu$ g/g (Tabla 4). La gran abundancia de cianobacterias tóxicas como Microcystis aeruginosa, Pseudanabaena catenata y

Fecha de ratón	Localidad	Especies	Col/ml	Biensayo
20 Junio 2004	Los Ansares	M. aeruginosa P.catenata	3.890 18.300	3+
29 Junio 2004	Los Ansares	M. aeruginosa P. catenata	3.300 12.780	3+
	Canal Cherry	M. aeruginosa P.catenata A. flos-aguae	62.220 5.100 2.200	3+
	Casa de las Nuevas	M. aeruginosa P. catenata	13.200 15.660	3+
	Casa de los Corros	M. aeruginosa P. catenata A.flos-aquae	8.000 4.220 550	3+
	Casa de Leo Viaggi	M. aeruginosa P. catenata A. flos-aquae	10.770 5.100 3.000	3+
5 Julio 2004	Los Ansares	M. aeruginosa P.catenata	13.800 6.660	3*

**Tabla 2.-** Especies de cianobacterias, colonias por ml de agua y bioensayo de raton en 5 localidades del Parque Nacional de Doñana durante la mortandad del verano de 2004.

Table 2.- Cyanobacteria species, colonies per mL and mouse bioassay in five locales of DNP during mass mortalities during summer of 2004.

Especies	Fecha de muestreo	Contenido de ventrículos	Bioensayo en ratón
Anas platyrhynchos	Junio 29	M. aeruginosa (> 105 col ml-1), semillas , fragmentos vegetales Algas verdes filamentosas	3+
Anas platyrhynchos	Junio 29	M. aeruginosa (> 105 col ml-1), semillas , fragmentos vegetale	s 3+
Platalea leucorodia	Junio 29	M. aeruginosa (> 105 col ml-1), algas, zooplancton, insectos	3+
Fulica atra	Junio 29	M. aeruginosa (> 105 col ml-1), semillas , fragmentos vegetale	es 3+
Philomachus pugnax	Junio 29	M. aeruginosa (≈103 col ml-1) Zooplancton, peces,	3+
Larus ribundibus	Junio 29	Peces, crustáceos	3+
Larus ribundibus	Junio 29	Peces	3+
Podiceps cristatus	Junio 29	Peces	3+
Himanthopus himan	thopus Junio 29	Peces, insectos, zooplancton	3+
Tringa totanus	Junio 29	zooplancton	3+

Tabla 3.- Contenido de los ventrículos y bioensayo de toxicidad en 9 especies de aves de la mortandad en masa de año 2004.

 $\textbf{Table 3.-} \ \text{Ventriculi content and mouse bioassay in nine bird species during the mass mortality of 2004.}$ 

Especies	Concentración toxina en hígado (µg microcistina LR eqv/ g)
Anas platyrhynchos	34.3
Anas platyrhynchos	32.5
Anas platyrhynchos	26.6
Fulica atra	75.9
Larus ribundibus	37.4
Larus ribundibus	31.5
Podiceps cristatus	53.2
Tringa totanus	25.7
Himanthopus himanth	opus 28.4
Philomachus pugnax	72.4
Mugil cephalus	48.7
Ciprinus carpio	39.1

**Tabla 4.-** Concentración de toxina ( $\mu g$  microcistina LR eqv/g) en el hígado de las aves muertas durante el verano de 2004.

Table 4.- Toxin concentration ( $\mu g$  MICYST- LR eqv/g) in liver of bird died during 2004 summer.

Anabaena flos-aquae, así como la distribución espacio-temporal del patrón de mortalidad indican que la causa de esta mortandad era producida por una intoxicación alimentaría (THRUSFIELD 1995), la ingestión de cianobacterias tóxicas. Las cianotoxinas que producen estas especies son fundamentalmente hepatotoxinas (microcistinas) que provocan desestructuración del citoesqueleto hepático y aparición de hemorragias intrahepáticas (BISCHOFF 2001, MALBROUCK et al. 2003, WIEGAND & PFLUGMACHER 2005). En todas las aves analizadas pudimos comprobar la presencia de lesiones hepáticas asociadas a

Localidad	Especies	Col/ml	Saxitoxina en el agua (µg/L)	Saxitoxina en el hígad (μg/Kg)	lo Bioensayo
Caño del Guadiamar	Anabaena circinalis	88.880	492,52	1.056,75	3+

**Tabla 5.-** Especies, abundancia, bioensayo, microgramos de toxina en el agua y en el hígado de los peces durante la mortandad del año 2005 en el Caño del Guadiamar.

**Table 5.-** Species, aboundance, bioassay, mg of saxitoxin in water and liver of fishes died during mass mortality in Caño Guadiamar 2005...

hemorragias y la cantidad de toxina encontrada en el hígado era mucho más alta de la necesaria para provocar la muerte, lo que confirma el paso de la toxina a través de la cadena trófica. En este sentido encontramos que las aves filtradoras (consumidoras directas de fitoplancton) murieron de forma aguda y los cadáveres presentaban una buena condición corporal aunque con hemorragias hepáticas y un alto contenido de microcistina en el hígado (Tabla 4), también un elevado número de col/mL de cianobacterias en los ventrículos (Tabla 3). Sin embargo, los cadáveres de las aves piscívoras presentaban mala condición corporal y un proceso de emanciación, posiblemente porque la muerte se produjo por un proceso más lento al ingerir estas aves los peces muertos. Si la cantidad de toxina que se ingiere es menor y más sostenida en el tiempo, los daños hepáticos se manifiestan de forma progresiva, a medida que se va acumulando, lo que determina una pérdida significativa de peso antes de morir, que es probablemente lo que ocurrió en el caso de las aves limícolas cuyos cadáveres estaban muy delgados pero con una gran concentración de microcistina en el hígado.

En junio de 2005, veinte toneladas de peces murieron en solo 3 días en el caño del Guadiamar. El agua presentaba una coloración azul-verdosa. Los resultados de los análisis y los bioensayos de ratón aparecen en la tabla 5. El agua del caño del Guadiamar presentaba de forma casi monoespecífica una sola especie de cianobacteria *Anabaena circinalis* productora de una toxina nerviosa (saxitoxina). La concentración de saxitoxina detectada en el agua era de

492,52 mg/L , y la concentración de saxitoxina detectada en el hígado de los peces recogidos se estimó en 1.056,75 mg/Kg. En el bioensayo de ratón todos los ratones murieron en menos de 24 horas con síntomas paralíticos. La saxitoxina afecta directamente al canal de sodio en la placa neuromuscular bloqueándolo. Esta es la primera vez que se reporta en Europa una mortandad de peces producida por saxitoxina en aguas dulces.

Las mortandades en el Parque Nacional de Doñana son un fenómeno recurrente que está documentado desde el año 1973, al menos tres de estas mortandades en el año 2001, 2004 y 2005 han sido producidas por cianobacterias tóxicas. Estas cianobacterias existen en Doñana durante todo el año y cuando las condiciones ambientales son favorables proliferan dando mortíferas natas verde-azuladas, este hecho unido a la eutrofización creciente del agua del Parque como consecuencia del acúmulo cada vez mayor de aves, indican que estas mortandades van a producirse de forma natural y recurrente. Quizá alguna posibilidad de minimizar este fenómeno podría ser dejar desecar lucios y caños que se mantienen artificialmente inundados.

# **AGRADECIMIENTOS**

Trabajo financiado por el Proyecto del Ministerio de Medio Ambiente MAM 093/2002. A JOSE JUAN CHANS, ANA ANDREU y HUGO LEFRANC por su inestimable ayuda durante las mortandades y también durante todo el tiempo que pasamos en Doñana.

# REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONSO-ANDICOBERRY, C., GARCIA-VILLADA, L., LÓPEZ-RODAS, V. & COSTAS, E. (2002). Catastrophic mortality of flamingos in a spanish nacional park caused by cyanobacteria. Veterinary Record 151: 706-707.
- BISCHOFF, K. (2001). The toxicology of microcystin-LR: occurrence, toxicokinetics, toxicodynamics, diagnosis and treatment. Veterinary and Human Toxicology 43: 294-297
- BURY, N.R., MC GEER, J., EDDY, F.B. & CODD, G.A. (1997). Liver damage in brown trout *Salmo trutta* L. and rainbow-trout, *Oncorhychus mykiss* (Walbaum) following administration of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR via the dorsal aorta. Journal of Fish Disease 20: 209-215.
- CARMICHAEL, W.W. (1994). The Toxins of Cyanobacteria. Scientific American 270: 78-86.
- CARMICHAEL, W.W. 1995. Cyanobacterial Toxins. In: Manual on Harmful Marine Microalgae. IOC UNESCO Manual & Guides nº 33, pp 163-176.
- CARRILLO, E., FERRERO, L.M., ALONSO-ANDICOBERRY, C.B., LASANTA, A., MARTIN, A., LÓPEZ-RODAS, V. & COSTAS, E. (2003). Interstrain variability in toxin production of the cyanobacterium Microcysitis aeruginosa from water-supply reservoirs of Andalucía and lagoons of Doñana Nacional Park (southern Spain). Phycologia 42: 269-274
- COSTAS, E & LÓPEZ-RODAS, V. (1998). Paralytic phycotoxins in monk seal mass mortality. Veterinary Record 142: 643-644.
- FALCONER, I., BARTRAM, J., CHORUS, T., KUIPER-GOODMAN, H., UTKILEN, M., BURCH, M. & CODD, G.A. (1998). Safe levels and Safe Practices. In: *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and managemente*. I. Chorus & J. Bartram (eds). London, E. & F.N. Spon pp: 347-367.
- HARDING, W.R., ROWE, N., WESSELS, J.C., BEATTIE, K. A. & CODD, G.A. (1995). Death of a dog attributed to the cyanobacterial (blue-green algal) hepatotoxin nodularin in South Africa. Journal of the South African Veterinary Association 66: 256-259.
- JOCHIMSEN, E.M., CARMICHAEL, W.W., AN, J.S., CARDO, D.M., COOKSON, S.T., COLMES, C.E., ANTUNES, M.B., DE MELO FILHO, D.A., LYRA, T.M., BARRETO, V.S., AZEVEDO, S.M. & JAVIS, W.R. (1998). Liver failure and death after exposure to microcystins at a haemodialy-sis center in Brazil. New England Journal of Medicine 338: 873-878.
- KUIPER-GOODMAN, T. FALCONER, I & FITZGERALD, J. (1999). Human health aspects. In: Toxic Cyanobacteria in the Water. Eds I. Chorus, J. Bartram. London, E. & F.N. Spon pp 113-141
- LÓPEZ-RODAS, V. & COSTAS, E. (1999). Preferente of mice to consume *Microcystis aeruginosa* (toxin-producing cyanobacteria): A posible explanation for numerous fatalities of livestock and wildlife. Research in Veterinary Science 67: 107-110.
- LÓPEZ-RODAS, V., COSTAS, E., BAÑARES, E., GARCIA-VILLADA, L., ALTAMIRANO, M., RICO, M., SALGADO, C. & FLORES-MOYA, A. (2006). Analysis of poligenic traits of *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) strain by Restricted Maximum Likelihood (REML) procedures: 2. Microcystin net production, photosynthesis and respiration. Phycologia 45: 243-248.
- LÓPEZ-RODAS, V., MANEIRO, E., LANZAROT, M.P., PERDIGONES, N. & COSTAS, E. (a) (in press). Cyanobacteria cause mass mortality of wildlife in Doñana Nacional Park (Spain). Veterinary Record (in press).
- LÓPEZ-RODAS, V., FLORES-MOYA, A., MANEIRO, E., PERDIGONES, N., MARVA, F., GARCIA, M.E., & COSTAS, E. (b)(2007). Resistance to glyphosate in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* as result of preselective mutations. Evolutionary Ecology 21:535-547.
- MALBROUCK, C., TRAUSCH, G., DEVOS, P. & KESTEMONT, P. (2003). Hepatic accumulation and effects of microcystin-LR on juvenile goldfish *Carassius auratus* L. Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. 135: 39-48.

- MATSUNAGA, H., HARADA, K.I., SENAMA, M., ITO, Y., USHIDA, S. & KIMURA, Y. (1999). Posible cause of unnatural mass death of wild birds in a pond in Nishinomiya, Japan: sudden appearence of toxic cyanobacteria. Natural Toxins 7: 81-84.
- SIVONEN, K. & JONES, G. (1999). Cyanobacterial toxins. In: Toxic Cyanobacteria in Water. . Eds I. Chorus, J. Bartram. London, E. & F.N. Spon pp.
- SOLL, M.D. & WILLIAMS, M.C. (1985). Mortality of a white rhinoceros (Ceratotheratium simum) suspected to be associated with the blue-green alga Microcystis aeruginosa. Journal of the South African Veterinary Association 56: 49-51.
- THRUSFIELD, M. (1995). Veterinary Epidemiology. Blackwell Science. New York. USA
- UENO, Y., NAGATA, S., TSUTSUMI, A., HASEGAWA, A., WATANABE, M., PARK, H.D., CHEN, G. & YU. S. (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.
- WIEGAND, C. & PFLUGMACHER, S. (2005). Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites: a short review. Toxicol. Appl. Pharmacol. 203: 201-218.
- ZAMBRANO, F. & CANELO, E. (1996). Effects of microcystin-LR on the partial reactions of the Na(+)-K+ puma of the gill of carp (*Ciprinus Carpio* Linneo). Toxicon 34: 451-458.