

## AKUMULACE A ELIMINACE MICROCYSTINŮ V RYBÁCH (*CYPRINUS CARPIO*, *HYPOPHTHALMICHTHYS MOLITRIX*) A HODNOCENÍ BIOMARKERŮ PO EXPOZICI SINICOVOU BIOMASOU

Ondřej ADAMOVSÝ<sup>1)</sup>, Radovan KOPP<sup>1)2)</sup>, Klára HILSCHEROVÁ<sup>1)</sup>, Pavel BABICA<sup>1)</sup>,  
Miroslava PALÍKOVÁ<sup>3)</sup>, Veronika PAŠKOVÁ<sup>1)</sup>, Stanislav NAVRÁTIL<sup>3)</sup>,  
Blahoslav MARŠÁLEK<sup>1)</sup>, Luděk BLÁHA<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> *Centrum pro cyanobakterie a jejich toxiny (Botanický ústav AV ČR, v.v.i. a RECETOX PFF MU), Kamenice 126/3, 625 00 Brno*

<sup>2)</sup> *Oddělení rybářství a hydrobiologie, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Zemědělská 1, 613 00 Brno*

<sup>3)</sup> *Veterinární a farmaceutická univerzita, Palackého 1-3, 612 42 Brno*

### Souhrn

Dva běžně chované druhy ryb kapr obecný (*Cyprinus carpio*) a tolstolobik bílý (*Hypophthalmichthys molitrix*) byly po dobu dvou měsíců chovány v prostředí se sinicemi produkujícími toxické microcystiny (dominantně rod *Microcystis*). Koncentrace microcystinu v suché biomase sinic se pohybovala v rozmezí 182 - 539 µg/g. Hladiny akumulovaných toxinů ve tkáni byly měřeny pomocí imunoanalytické velmi citlivé metody ELISA. Koncentrace toxinu ve svalovině ryb byly 1,4 - 29 ng/g tkáň u tolstolobika a 3,3 - 19 u kapra. V hepatopankreatu byly stanoveny o řád vyšší koncentrace (s maximem 226 ng/g tkáň). Po přesunu ryb do čisté vody probíhala eliminace microcystinů relativně rychle, a to do 1 - 2 dvou týdnů (sval i hepatopankreas). Poločas eliminace byl vyčíslen na 0,7 dne u svalu tolstolobika a na 8,4 dny u hepatopankreatu kapra. Tato studie ukázala také významnou modulaci hladin vybraných biochemických markerů v hepatopankreatu u ryb vystavených působení komplexní biomasy. Hladina glutathionu (GSH) a hodnoty aktivit glutathion S-transferázy (GST) a glutathion reduktázy (GR) byly zvýšeny u obou druhů ryb po expozici sinicemi indikující oxidativní stres a aktivaci detoxifikačních procesů. Kalkulace indexů nebezpečnosti s použitím standardní metody US EPA ukazuje na poměrně malé riziko spojené s akumulací microcystinů v požitelných částech ryby.

### Klíčová slova

Microcystiny; bioakumulace; toxokinika; biomarkery; analýza rizik

### Summary

Two species of common edible fish - common carp (*Cyprinus carpio*) and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) were exposed to *Microcystis* spp. dominated natural cyanobacterial water bloom for two months (concentrations of cyanobacterial toxin microcystin, MC, ranged 182-539 µg/g biomass dry wt). Toxins accumulated up to 1.4 to 29 ng/g fresh weight (fresh wt) and 3.3 to 19 ng/g in the muscle of silver carp and common carp, respectively (determined by enzyme-linked immunoassay, ELISA). An order of magnitude of higher concentrations were detected in hepatopancreas (up to 226 ng/g in silver carp) with a peak after initial four weeks. Microcystins were completely eliminated within 1 to 2 weeks from both muscle and hepatopancreas after the transfer of fish with accumulated toxins to clean water. Mean estimated elimination half lives (t<sub>1/2</sub>) ranged from 0.7 day in silver carp muscle to 8.4 days in common carp liver. The study also showed significant modulations of several biochemical markers in hepatopancreas of fish exposed to cyanobacteria. Levels of glutathione (GSH), and catalytic activities of glutathione-S-transferase (GST) and glutathione reductase (GR) were induced in both species indicating oxidative stress and enhanced detoxification processes. Calculation of hazard indexes using conservative U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA) methodology indicated rather low risks of MCs accumulated in edible fish but there are several uncertainties that should be explored.

### Key words

Microcystins; bioaccumulation; toxicokinetics; biomarkers; risk assessment

### Úvod

Hepatotoxické microcystiny (MCs) jsou skupinou peptidů produkovaných některými druhy sladkovodních sinic jako jsou *Microcystis* sp., *Planktothrix* sp. aj. [1]. V jedné buňce může být během růstu produkováno i více variant microcystinů a celkově mohou tvořit až 1% váhy sušiny biomasy. Ačkoli je menší množství microcystinů produkováno do okolního prostředí, většina zůstává uvnitř sinicových buněk, odkud se během kolapsu vodního květu dostává ve velkém množství do prostředí [1]. MCs jsou inhibitory serin/threonin protein fosfatáz PP1 a PP2A a převážně se akumulují v játrech

[2]. Lze je však detekovat i v jiných orgánech, jako jsou svaly, kůže a krev. Kromě hepatotoxicity a promoce karcinogeneze v játrech jsou dokumentovány a studovány i jiné druhy toxicity [3]. Světová zdravotnická organizace (WHO) stanovila maximální denní dávku na  $0,04 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{den}^{-1}$  korespondující s limitem pro pitnou vodu  $1\mu\text{g}/\text{l}$ , která platí i v ČR [4]. Tyto limity platí pro nejvíce studovanou variantu microcystin-LR. Zatímco toxicita pro člověka byla detailně studována, v akvatickém prostředí jsou účinky microcystinů málo prostudovány. Předěšlé studie se zabývají metabolismem MCs a toxicitou pro ryby, avšak existuje jen málo detailních studií zabývajících se toxikokinetikou a zdravotními riziky vyplývajícími z akumulace MCs v rybách [5].

Oxidativní stres, což je nadprodukce kyslíkových radikálů (ROS) v buňce, je další důležitý mechanismus toxicity řady kontaminantů a také MCs, dokumentovaný u laboratorních zvířat [6], ryb [7] a jiných organismů. Mezi efekty způsobené oxidativním stresem patří na buněčné úrovni lipidní peroxidace (LPO), ovlivnění hladin glutathionu (GSH) [8], aktivace komplexu detoxifikačních enzymů zahrnujících glutathion S-transferázu (GST), glutathion reduktázu (GR) a glutathion peroxidázu (GPx) [9]. Tyto parametry jsou často používány jako biomarkery toxicity včetně studií s rybami. Cílem této studie bylo zjistit míru akumulace i rychlost eliminace microcystinů ze tkání dvou druhů ryb – kapra *Cyprinus carpio* a tolstolobika bílého *Hypophthalmichthys molitrix*. Dále byla studován odpověď detoxifikačních enzymů a antioxidačního aparátu v prostředí s přirozeným výskytem sinicové biomasy. Oba druhy ryb patří mezi nejvíce chované masné druhy ryb jak v Asii, tak v Evropě. Tato studie obsahuje nová data v oblasti kinetiky i eliminace microcystinu a hodnotí související zdravotní rizika.

### **Materiál a metody**

Akumulační experiment usiloval o simulaci podmínek, které se běžně vyskytují v prostředí. Vybrané druhy ryb (kapr obecný, tolstolobik bílý) byly odděleně drženy ve dvou venkovních nádržích (expoziční se sinicemi a kontrolní s čistou vodou) po dobu dvou měsíců. Dominantními rody sinic byly *Microcystis aeruginosa* (45%), *Microcystis ichtyoblae* (45%) a *Anabaena flos-aque* (5%). Koncentrace microcystinů v biomase a ve vodě byly stanovovány pomocí HPLC dle Lawton (1994) [10]. Na začátku experimentu byla koncentrace rozpuštěného microcystinu ve vodě a v biomase  $22,7 \mu\text{g}/\text{l}$ ,  $539 \mu\text{g}/\text{g}$ , ve 4.týdnu  $13,8 \mu\text{g}/\text{l}$ ,  $425 \mu\text{g}/\text{g}$ , a v 9.týdnu  $14,2 \mu\text{g}/\text{l}$ ,  $182 \mu\text{g}/\text{g}$ . Eliminace byla studována na rybách pocházejících z rybníku s přirozeným výskytem vodního květu a které přírodní cestou akumulovaly microcystiny. Parametry vody byly během akumulačního (respektive eliminačního experimentu) následující: teplota  $18,9\pm 3,8 / 19,6\pm 1,3 \text{ }^\circ\text{C}$ ; rozpuštěný kyslík  $18,2\pm 2,0 / 11,1\pm 3,2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ; pH  $9,4\pm 0,4 / 9,1\pm 0,2$ . Ryby byly odebrány 4. a 9. týden u akumulačního experimentu a 1., 2., 4., 6., a 8. u eliminačního experimentu. Vzorky tkání byly uskladněny při  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  a následně analyzovány imunochemickou metodou ELISA na obsah MCs a hodnoceny na hladiny biomarkerů.

Extrakce tkání byla převzata a optimalizována dle Magalhaes 2001 [11]. Mražený vzorek (0,4g) byl homogenizován v metanolu (3mL) a ultrazvukován po 30 minut v ultrazvukové lázni. Poté centrifugován (4000 RPM, 10 min.). Supernatant odebrán a pelet opět rozpuštěn v 3 ml metanolu. Celý proces byl opakován celkem 3krát. Do získaného etanolového extraktu byl třikrát přidán 1 ml hexanu. Vzniklá hexanová vrstva byla odebrána pro odstranění lipidů ze vzorku.

Pro stanovení MCs byla použita velice citlivá metoda ELISA, nově připravená a optimalizovaná v laboratořích Centra pro cyanobakterie, RECETOX PřF MU. Metoda využívá kompetitivní reakce microcystinů ze vzorku s enzymově značeným microcystinem (MC-křenová peroxidáza). Koncentrace microcystinů je stanovena spektrofotometricky dle vývoje substrátu (TMB, absorbance při 420 nm, referenční délka 660 nm) [12]. Kalibrační křivka byla pro každé měření  $0,125 - 2 \mu\text{g}/\text{l}$ .

Pro stanovení biomarkerů byl vzorek tkáně (100 mg) homogenizován na ledu s 1ml fosfátového pufru (PBS, pH 7,2), po centrifugaci (2500 g, 5 min, 4 °C) byl uskladněn při  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ . Koncentrace proteinu byla stanovena dle Lowry (1951) [13]. Jako standard byla použit hovězí sérový albumin. Koncentrace glutathionu (GSH) byla stanovena dle Ellmann (1959) [14] s použitím DTNB (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzeová kyselina) jako substrátu. Před analýzou byly vzorky ošetřeny trichloroctovou kyselinou (25% w/v) pro odstranění proteinů a centrifugovány (6000 g, 10 min). Absorbance konjugátu GSH-DTNB byla stanovena při 420 nm a koncentrace GSH byla spočítána dle kalibrační křivky s využitím standardu GSH.

Rizika vyplývající z konzumace ryb byla kalkulována s využitím indexu nebezpečnosti (HI)

porovnávající odhadovaný denní příjem (EDI) s tolerovaným denním příjmem (TDI=0,04  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{den}^{-1}$ ) [15]. Vyjádřili jsme také kritické množství potřebné k dosažení TDI. Pro tyto kalkulace jsme využili metodologii US EPA, která předpokládá 48 rybních jídel ročně, s předpokládanou porcí 132 g pro člověka s váhou 70 kg [16].

### **Výsledky a diskuze**

Naše studie popisuje toxokinetiku microcystinu v tkáních ryb kapra obecného a tolstolobika bílého. Podle dostupných zdrojů se předchozí studie zabývající se akumulací microcystinu v zooplanktonu, mušlicích i rybních detailně eliminaci microcystinu z tkání nevěnují [17, 18, 19].

Koncentrace microcystinů ve tkáních během akumulace a eliminace ukazuje tab.1 a obr.1. Microcystiny akumulované ve svalové tkáni kapra a tolstolobika dosahovaly průměrných hodnot 9,8 a 10,6 ng/g ž.v. (nanogram/gram živé váhy). O řád vyšší koncentrace byly nalezeny v hepatopankreatu, který je cílovým orgánem toxicity MCs a do něž se MCs dostávají pomocí selektivního transportního systému [20]. Poměr koncentrací ve svalovině a hepatopankreatu je v naší studii okolo 1:10, což je v souladu s předchozími studiemi, kde bylo pozorováno rozdělení dávky mezi svaly a játra v poměru 0,3% a 4%, respektive vůči obsahu ve střevě [21].

Průměrné koncentrace microcystinů jsou mezi našimi druhy ryb porovnatelné, nicméně maximální koncentrace v hepatopankreatu u tolstolobika se jeví menší než u kapra (porovnání 4. týdne akumulačního experimentu) (tab.1). Tento rozdíl může být vysvětlen možnou rezistencí tolstolobika oproti kaprovi tak, jak předkládá Snyder (2002) [22]. V porovnání s našim pozorováním byla zveřejněna studie z jezera v Číně, kde koncentrace MCs v hepatopankreatu byla u kapra 10  $\mu\text{g/g}$  sušiny a u tolstolobika 1,16  $\mu\text{g/g}$  sušiny [23].

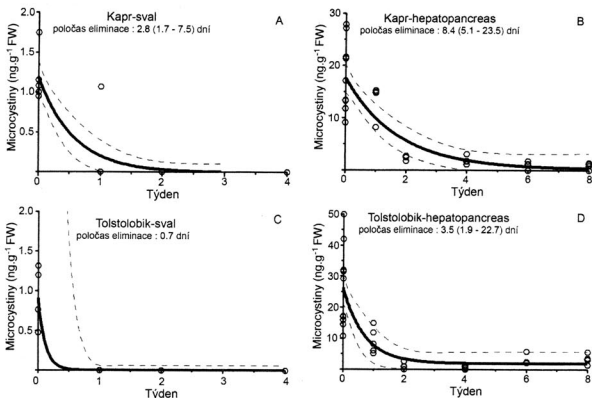
Během našeho experimentu jsme zaznamenali různé kinetiky akumulace MCs do jater u obou druhů ryb. U kapra došlo v 9.týdnu k poklesu koncentrace MCs v játrech i svalech v porovnání s 4.týdnem. Na druhou stranu jsme zaznamenali pokračující akumulaci MCs v játrech tolstolobika až na 124 ng/g (9. týden). Výsledky ukazují na rozdílnou míru akumulace a eliminace u obou druhů ryb (tab.1) [21]. Rozdíly mezi druhy mohou být vysvětleny fytoplanktofágním způsobem příjmu potravy u tolstolobika (aktivní příjem sinicových buněk) v porovnání s pasivním příjmem omnivorního a benktofágního kapra. Výsledky takéž mohou indikovat větší efektivitu metabolismu MCs u kapra obecného, ale tyto závěry se musí v dalších studiích potvrdit.

Eliminační experiment ukazuje, že MCs jsou poměrně rychle eliminovány z těl ryb obou druhů (tab. 1). U obou druhů ryb byly poločasy života MCs kratší u svalů (0,7 - 2,8 dnů) než u hepatopankreatu (3,5 - 8,4 dní). Dle dostupné literatury existuje jen omezené množství informací zabývajících se eliminací MCs [24, 25 ], ale žádná z nich se nevěnuje studii kapra obecného, který je jednou z nejčastěji chovaných ryb v Evropě a Asii. Studie, kde byl MCs velmi rychle odbourán z těla, je studie se sladkovodními plži [26] (8 dní) a mlži [27] (3,0 - 4,8 dní). Studie s Tilapií nilskou ukazují, že i v průběhu eliminace se i po 15 a 40 dnech mohou vyskytnout zvýšené koncentrace MCs v tkáních [25]. To je zřejmě v důsledku použité metody (HPLC), která by mohla detekovat konjugáty MC s glutathionem, popřípadě s jinými biomolekulami [25]. Nicméně bližší informace objasňující eliminační kinetiku MCs u ryb chybí.

Součástí naší studie bylo i posouzení biomarkerů oxidativního stresu (GSH, GST, GR a GPx). Ve většině případů došlo k zvýšení hladin těchto enzymů (data nejsou součástí tohoto příspěvku). Pozorovaná zvýšená hladina GSH reaguje na zvýšenou míru detoxifikace a oxidativního stresu vyvolanou toxickými sinicemi [28]. Nicméně tyto adaptace byly pouze dočasné, a u prodloužené expozice vedly ke známkám obecné toxicity, jako je suprese GSH (tolstolobik, 9.týden). Modulace těchto biomarkerů v naší studii ukazují na důležitou roli oxidativního stresu v toxicitě celkové sinicové biomasy a také ukazují, že tyto parametry se dají použít jako časně varování před pozdějšími závažnějšími toxickými efekty u ryb.

Microcystiny naakumulované v rybí tkáni mohou představovat pro člověka riziko spojené s konzumací těchto ryb. K tomuto tvrzení přispívá i fakt, že MCs jsou termostabilní a nejsou degradovány během vaření [29]. V naší studii jsme hodnotili analýzu rizik s využitím metodologie US EPA (1998). Pro výpočty byly vzaty v úvahu maximální koncentrace ve svalovině kapra (18.8 ng/g) a tolstolobika (29.3 ng/g). Teoretické riziko, vyjádřené jako index nebezpečnosti (HI), ukázalo vyšší hodnoty u tolstolobika (HI=0,19) než u kapra (0,12). Koncentracím odpovídají i maximální denní porce, které by při konzumaci nevyhověly stanovenému dennímu limitu 0,04  $\mu\text{g/kg/den}$ . Kritické

množství pro tolstolobika z naší studie je 698 g a pro kapra 1087 g. Z výsledků naší studie vyplývá, že při konzumaci ryb s těmito koncentracemi nedochází k vážnému ovlivnění lidského zdraví ( $HI < 1$ ).



**Obr.1.** Eliminace MCs z tkání kapra (A,B) a tolstolobika (C,D). Prezentovány jsou jednotlivé koncentrace, eliminační křivka (celá čára) s 95% intervalem spolehlivosti (čárkovaná linie) a poločasy eliminace (průměrná hodnota a její 95% interval spolehlivosti).

### Závěr

Naše studie objasňuje kinetiku akumulace a eliminaci MCs u dvou nejčastěji chovaných zástupců ryb v Evropě i Asii (kapr obecný, tolstolobík bílý). Maximální koncentrace ve svalovině se objevila ve 4. týdnu a v prodloužené expozici (9. týden) nevedla k jednoznačnému zvýšení koncentrací. Role oxidativního stresu a aktivace detoxifikačních enzymů byla potvrzena modulací hladin GSH a také výraznou eliminací MCs ze tkání během 1 - 2 týdnů po přesunutí ryb do čisté vody. Kalkulace rizik založená na US EPA metodologii ukázala relativně malá rizika ( $HI < 1$ ).

### Poděkování:

Výzkum je podporován projektem NAZV QH71015 a MŠMT (VZ0021622412 "INCHEMBIOL", VZ6215712402).

### Použitá literatura

- [1] SIVONEN, K. and G. JONES, *Cyanobacterial toxins. Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Public Health Significance, Monitoring and Management*, 1999: p. 41-111.
- [2] CHORUS, I. AND J. BARTRAM, *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. 1999, London: E&FN Spon. 432.
- [3] BRIAND, J.F., ET AL., *Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems*. *Veterinary Research*, 2003. 34(4): p. 361-377.
- [4] WHO, *Guidelines for drinking water quality*. Second edition, Addendum to volume 2, Health criteria and another supporting information. 1998, Geneva: World Health Organisation.
- [5] WIEGAND, C., et al., *Uptake and effects of microcystin-LR on detoxication enzymes of early life stages of the zebra fish (Danio rerio)*. *Environmental Toxicology*, 1999. 14(1): p. 89-95.
- [6] DING, W.X., ET AL., *Microcystic cyanobacteria causes mitochondrial membrane potential alteration and reactive oxygen species formation in primary cultured rat hepatocytes*. *Environmental Health Perspectives*, 1998. 106(7): p. 409-413.

- [7] LI, X.Y., ET AL., *Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (Cyprinus carpio L.) to the toxicity of microcystin-LR*. *Toxicol.*, 2003. 42(1): p. 85-89.
- [8] JOS, A., ET AL., *Toxic cyanobacterial cells containing microcystins induce oxidative stress in exposed tilapia fish (Oreochromis sp.) under laboratory conditions*. *Aquatic Toxicology*, 2005. 72(3): p. 261-271.
- [9] VAN DER OOST, R., J. BEYER, AND N.P.E. VERMEULEN, *Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2003. 13(2): p. 57-149.
- [10] LAWTON, L.A., C. EDWARDS, AND G.A. CODD, *Extraction and high-performance liquid chromatographic method for determination of microcystins in raw and treated waters*. *Analyst*, 1994. 119: p. 1525-1530.
- [11] MAGALHAES, V.F., R.M. SOARES, and S. AZEVEDO, *Microcystin contamination in fish from the Jacarepagua Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk*. *Toxicol.*, 2001. 39(7): p. 1077-1085.
- [12] ZECK, A., ET AL., *Highly sensitive immunoassay based on a monoclonal antibody specific for [4-arginine]microcystins*. *Analytica Chimica Acta*, 2001. 441: p. 1-13.
- [13] LOWRY, O.H., ET AL., *Protein measurements with Folin-Phenol reagents*. *Journal of Biology and Chemistry*, 1951. 193: p. 256-275.
- [14] ELLMANN, G.L., *Tissue sulfhydryl group*. *Arch Biochem Biophys*, 1959. 82: p. 70-79.
- [15] KUIPER-GOODMAN, T., I.R. FALCONER, and D.J. FITZGERALD, *Human health aspects. Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Public Health Significance, Monitoring and Management*, 1999: p. 113-153.
- [16] EPA, *Risk Assessment - Guidance for Superfund Volume I., Human Health Manual (Part A), Interim final*. 1989, Washington: Office of Emergency and Remedial Response US EPA.
- [17] AMORIM, A. and V. VASCONCELOS, *Dynamics of microcystins in the mussel Mytilus galloprovincialis*. *Toxicol.*, 1999. 37(7): p. 1041-1052.
- [18] TENCALLA, F.G., D.R. DIETRICH, and C. SCHLATTER, *Toxicity of Microcystis-Aeruginosa Peptide Toxin to Yearling Rainbow-Trout (Oncorhynchus-Mykiss)*. *Aquatic Toxicology*, 1994. 30(3): p. 215-224.
- [19] WILLIAMS, D.E., ET AL., *Bioaccumulation and clearance of microcystins from salt water mussels, Mytilus edulis, and in vivo evidence for covalently bound microcystins in mussel tissues*. *Toxicol.*, 1997. 35(11): p. 1617-1625.
- [20] WILLIAMS, D.E., ET AL., *<sup>14</sup>C-labelled microcystin-LR administered to Atlantic salmon via intraperitoneal injection provides in vivo evidence for covalent binding of microcystin-LR in salmon livers*. *Toxicol.*, 1997. 35(6): p. 985-989.
- [21] MALBROUCK, C. and P. KESTEMONT, *Effects of microcystins on fish*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2006. 25(1): p. 72-86.
- [22] SNYDER, G.S., A.E. GOODWIN, and D.W. FREEMAN, *Evidence that channel catfish, Ictalurus punctatus (Rafinesque), mortality is not linked to ingestion of the hepatotoxin microcystin-LR*. *Journal of Fish Diseases*, 2002. 25(5): p. 275-285.
- [23] XIE, L.Q., ET AL., *Organ distribution and bioaccumulation of microcystins in freshwater fish at different trophic levels from the eutrophic Lake Chaohu, China*. *Environmental Toxicology*, 2005. 20(3): p. 293-300.
- [24] XIE, L., ET AL., *Dynamics of microcystins-LR and -RR in the phytoplanktivorous silver carp in a sub-chronic toxicity experiment*. *Environmental Pollution*, 2004. 127(3): p. 431-439.
- [25] SOARES, R.M., V.F. MAGALHAES, and S.M.F.O. AZEVEDO, *Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in Tilapia rendalli (Cichlidae) under laboratory conditions*. *Aquatic Toxicology*, 2004. 70(1): p. 1-10.
- [26] OZAWA, K., ET AL., *Accumulation and depuration of microcystin produced by the cyanobacterium Microcystis in a freshwater snail*. *Limnology*, 2003. 4(3): p. 131-138.
- [27] YOKOYAMA, A. and H.D. PARK, *Depuration kinetics and persistence of the cyanobacterial toxin microcystin-LR in the freshwater bivalve Unio douglasiae*. *Environmental Toxicology*, 2003. 18(1): p. 61-67.
- [28] BLAHA, L., ET AL., *Oxidative stress biomarkers are modulated in silver carp (Hypophthalmichthys molitrix Val.) exposed to microcystin-producing cyanobacterial water bloom*. *Acta Veterinaria Brno*, 2004. 73(4): p. 477-482.
- [29] HARADA, K.-I., K. TSUJI, and M.F. WATANABE, *Stability of microcystins from cyanobacteria - III. Effect of pH and temperature*. *Phycologia*, 1996. 35(6 Supplement): p. 83-88

**Tabulka 1.** Změny koncentrací microcystinu ve svalovině, hepatopankreatu (ng MC/g tkáně) a koncentrace MCs ve vodě (µg/L) a biomase (hodnoty v závorkách; µg/g sušiny) v jednotlivých odběrových časech. Počty analyzovaných jedinců jsou uvedeny v závorkách (N).

Týden	MCs ve vodě (biomase)	Toistolobik bílý			Kapr obecný		
		Váha ryby (g)	Sval	Hepato - pankreas	Váha ryby (g)	Sval	Hepato - pankreas
<b>Akumulace</b>							
0	22.7 (539)	202 ± 46 (N=10)	0 (N=3)	0 (N=3)	125 ± 28 (N=10)	0 (N=4)	0 (N=4)
	13.8 (425)	319 ± 78 (N=10)	10.6 ± 9.9 (N=10)	93.2 ± 50.7 (N=10)	127 ± 42 (N=10)	9.8 ± 6.4 (N=7)	132 ± 59 (N=7)
9	14.2 (182)	324 ± 78 (N=10)	5.2 ± 3.4 (N=7)	124 ± 56 (N=7)	128 ± 37 (N=10)	7.3 ± 4.6 (N=7)	68.7 ± 42.3 (N=7)
<b>Eliminace</b>							
0	—	421 ± 92 (N=10)	0.9 ± 0.3 (N=5)	21.0 ± 14.8 (N=5)	46 ± 9 (N=10)	1.2 ± 0.3 (N=5)	17.2 ± 7.0 (N=5)
	—	380 ± 102 (N=10)	0 (N=5)	9.3 ± 3.7 (N=5)	47 ± 16 (N=10)	0.2 ± 0.4 (N=5)	13.7 ± 2.7 (N=5)
2	—	435 ± 86 (N=10)	0 (N=5)	0.9 ± 0.9 (N=5)	40 ± 10 (N=10)	0 (N=5)	2.3 ± 0.4 (N=5)
	—						