

**AKUMULACE A ELIMINACE MICROCYSTINŮ V RYBÁCH
(*CYPRINUS CARPIO*, *HYPOPHthalmichthys MOLITRIX*) A
HODNOCENÍ BIOMARKERŮ PO EXPOZICI SINICOVOU BIOMASOU
ACCUMULATION AND ELIMINATION OF MICROCYSTINS IN FISH (*CYPRINUS
CARPIO*, *HYPOPHthalmichthys MOLITRIX*) AND MODULATION OF
BIOMARKERS AFTER EXPOSURE TO CYANOBACTERIAL BLOOMS**

**ADAMOVSÝ O., KOPP R., HILSCEROVÁ K., PALÍKOVÁ M., NAVRÁTIL S.,
BLÁHA L.**

Abstrakt

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 (microcystin concentrations ranged 182–539 µg/g dry weight) followed by depuration in the clean water for next 8 weeks. Microcystin content in the muscle and hepatopankreas of both species was analysed by ELISA and modulations of biochemical markers (such as intracellular glutathione, GSH) were investigated. Microcystins accumulated in the muscle up to 1.4–29 ng/g fresh weight (fw) and 3.3–19 ng/g fw in silver carp and common carp, respectively. About an order of magnitude higher concentrations were detected in the hepatopankreas. Concentrations up to 226 ng/g fw were observed in silver carp. A peak (mean 132 ng/g fw) was recorded in the common carp after initial 4 weeks followed by a decrease during exposure (mean 69 ng/g fw after 9 weeks). After the transfer of fish to clean water, microcystins were relatively rapidly eliminated from both muscle and hepatopankreas within 1–2 weeks. From the biochemical markers, concentrations of GSH were significantly induced in both fish species indicating oxidative stress and enhanced detoxification processes. Common carp seemed to be more sensitive species. Risk assessment of microcystins accumulated in the edible fish tissues was performed using US EPA methodology and calculated hazard indexes indicated generally low health risks.

ÚVOD

Hepatotoxické microcystiny (MCs) jsou skupinou peptidů produkovaných některými druhy sladkovodních sinic jako jsou *Microcystis* sp., *Planktothrix* sp. aj. (Sivonen a Jones, 1999). 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 (Sivonen a Jones, 1999). MCs jsou inhibitory serin/threonin protein fosfatáz PP1 and PP2A a převážně se akumulují v játrech (Chorus a Bartram, 1999). 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 (Azevedo a kol., 2002, Briand a kol., 2003). Světová zdravotnická organizace (WHO) stanovila pro zmenšení rizika plynoucího z příjmu microcystinů maximální denní dávku na 0,04 µg.kg⁻¹.den⁻¹ korespondující s limitem pro pitnou vodu 1µg.l⁻¹, která platí i v ČR (Chorus a Bartram, 1999, WHO, 1998). Tyto limity platí pro nejvíce studovanou variantu microcystin-LR.

Zatímco toxicita pro člověka byla detailně studována, v akvatickém prostředí jsou jeho účinky málo prostudovány (Buryskova a kol., 2006, Malbrouck a Kestemont, 2006). Předešlé studie se zabývají metabolismem MCs a toxicitou pro ryby, avšak existuje jen málo detailních studií zabývajících se toxokinetikou a zdravotními riziky vyplývající z akumulace MCs v rybách (Rodger a kol., 1994, Wiegand a kol., 1999, Zimba a kol., 2001).

Oxidativní stres, což je nadprodukce kyslíkových radikálů (ROS) v buňce, je další důležitý mechanismus toxicity řady kontaminantů a také MCs dokumentovaný u laboratorních zvířat (Ding a kol., 1998), ryb (Li a kol., 2003) a jiných organismů (Pflumacher a kol., 2006). Mezi efekty způsobené oxidativním stresem patří na buněčné úrovni lipidní

peroxidáze (LPO), ovlivnění hladin glutathionu (GSH) (Jos a kol., 2005), aktivace komplexu detoxifikačních enzymů zahrnujících glutathion S-transferázu (GST), glutathion reduktázu (GR) a glutathion peroxidázu (GPx) (Vvan Der Oost a kol., 2003). 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 studována 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 METODIKA

Akumulační experiment usiloval o simulaci podmínek, které se běžně vyskytují v prostředí. Vybrané druhy ryb (kapr obecný, tolstolobik bílý; stáří 2 roky) byly odděleně drženy ve dvou venkovních nádržích (expoziční se sinicemi a kontrolní s čistou vodou) v rybochovných sádkách v Pohořelicích po dobu dvou měsíců. Kapr nebyl během experimentu dokrmován. Na začátku akumulacího experimentu byla průměrná váha kapra a tolstolobika 125 g a 202 g respektive. U eliminačního experimentu byla počáteční hmotnost ryb 46g a 421g respektive.

Dominantními rody synechie byly *Microcystis aeruginosa* (45 %), *Microcystis ichtyoblabe* (45 %) a *Anabaena flos-aque* (5 %). Koncentrace microcystinů v biomase a ve vodě byly stanovovány pomocí HPLC dle (Lawton a kol., 1994). Na začátku experimentu byla koncentrace rozpuštěného microcystinu ve vodě a v biomase 22,7 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, 539 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, ve 4. týdnu 13,8 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, 425 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, a v 9. týdnu 14,2 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, 182 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Eliminace byla studována na rybách pocházejících z rybníku s přirozeným výskytem vodního květu, a které přírodní cestou akumulovaly microcystiny. Parametry vody byly během akumulacího respektive eliminačního experimentu následující : teplota $18,9 \pm 3,8$, $19,6 \pm 1,3$ °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 odebírány 4. a 9. týden u akumulacího experimentu a 1., 2., 4., 6. a 8. týden u eliminačního experimentu (5 - 10 ryb při každém odběru). Vzorky tkání byly uskladněny v mrazáku při -80°C a následně analyzovány imunochemickou metodou ELISA na obsah MCs a hodnoceny na hladině biomarkerů.

Extrakce tkání byla převzata a optimalizována dle (Magalhaes a kol., 2001). Mražený vzorek (0,4 g) byl homogenizován v metanolu (3 mL) 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 stanovení lipidů ze vzorku.

Pro stanovení MCs byla použita velice citlivá metoda ELISA nově připravená a optimalizovaná v laboratořích RECETOX. Metoda využívá kompetitivní reakce microcystinů ze vzorku s enzymově značeným microcystinem (křenuvá peroxidáza). Koncentrace microcystinů je stanovena fotospektrometricky dle vývoje substrátu (TMB, absorbance při 420 nm, referenční délka 660 nm) (Zeck a kol., 2001). Kalibrační křivka byla pro každé měření 0,125 – 2 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Pro stanovení biomarkerů byl vzorek tkáně (1 mg) homogenizován na ledu s 1mL fosfátového pufru (PBS, pH 7,2), po centrifugaci (2500 g, 5 min, 4 °C) byl uskladněn při -80°C. Koncentrace proteinu byla stanovena dle (Lowry a kol., 1951) . Jako standard byl použit hovězí sérový albumin. Koncentrace glutathionu (GSH) byla stanovena dle (Ellmann, 1959) s použitím DTNB (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzová kyselina) jako substrátu. Před

analýzou byly vzorky ošetřeny trichloroctovou kyselinou (25 % w/v) pro odebrání 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) porovnávacím odhadovaný denní příjem (EDI) s tolerovaným denním příjmem (TDI=0,04 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{den}^{-1}$) (Kuiper-Goodman a kol., 1999). Vyjádřili jsme také kritické množství potřebné k dosažení TDI. Pro tyto kalkulace jsme využili metodologii (EPA, 1989), která předpokládá 48 rybích jídel ročně, s předpokládanou porcí 132 g pro člověka s váhou 70 kg.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Naše studie vystihuje toxokinetiku microcystinu v tkáních ryb kapra obecného a tolstolobika bílého. Podle dostupných zdrojů, předchozí studie zabývající se akumulací microcystinu v zooplanktonu, mušlích i rybách se detailně nevěnují eliminaci microcystinu z tkání (Amorim a Vasconcelos, 1999, Tencalla a kol., 1994, Thostrup a Christoffersen, 1999, Vasconcelos, 1995, Williams a kol., 1997).

Vývoj akumulace a eliminace microcystinů z tkání je na obr. 1 a 2. Microcystiny akumulované ve svalové tkáni kapra a tolstolobika dosahovaly průměrných hodnot 9,8 a 10,6 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ž.v. (živé váhy) (obr.1). O řád vyšší koncentrace byly nalezeny v hepatopankreatu, který je cílovým orgánem toxicity MCs a do něž se MCs dostávají pomocí selektivního transportního systému (Landsberg, 2002, Williams a kol., 1997). Poměr koncentrací ve svalovině a hepatopankreatu je v naší studii okolo 1:10 což je v souladu s předchozími studii, kde pozorovali rozdělení koncentrací MCs mezi svalem a hepatopankreatem respektive střevem v poměru 0,3 % a 4 % respektive vůči koncentraci ve střevě (Malbrouck a Kestemont, P., 2006).

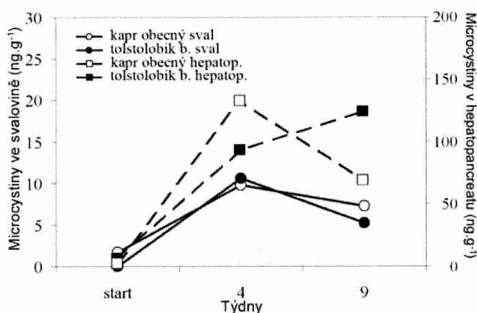
Průměrné koncentrace microcystinů jsou mezi našimi druhy ryb porovnatelné, nicméně maximální koncentrace v hepatopankreatu u tolstolobika se jeví menší než u kapra (porovnání 4.týdne akumulačního experimentu, hodnoceno dle průměru) (obr.1). Tento rozdíl může být vysvětlen možnou rezistencí fytoplanktofágního tolstolobika oproti bentkovornímu kaprovi tak jak předkládá (Snyder a kol., 2002). V porovnání s našim pozorováním byla zveřejněna studie z jezera v Číně, kde koncentrace MCs v hepatopankreasu byla u kapra 10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny a u tolstolobika 1,16 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny (Xie a kol., 2005).

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 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ (9.týden). Výsledky ukazují na rozdílnou míru akumulace a eliminace u obou druhů ryb (obr.) (Malbrouck a Kestemont, 2006). 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 taktéž mohou indikovat větší efektivitu metabolismu MCs u kapra obecného, ale tyto závěry se musejí v dalších studiích potvrdit.

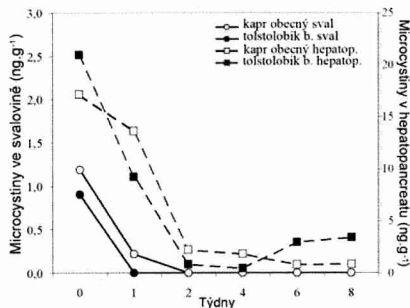
Eliminační experiment ukazuje, že MCs jsou poměrně rychle eliminovány z těl ryb obou druhů (obr.2). Dle dostupné literatury existuje jen omezené množství literatury zabývající se depurací MCs (Cazena a kol., 2005, Soares a kol., 2004, Xie a kol., 2004), ale žádná z nich se nevěnuje studii kapra obecného, který je nejčastěji chovanou rybou v Evropě a Asii. Studie s tilápií nilskou ukazují, že i v průběhu eliminace se i po 15 a 40 dnech mohou vyskytnout zvýšené koncentrace MCs v tkáních (Soares a kol., 2004, XIE, L. a kol., 2004). To je zřejmě v důsledku použité metody (HPLC), která by mohla detekovat konjugáty

s glutathionem, popřípadě s jinými biomolekulami (Soares a kol., 2004). Nicméně bližší informace objasňující eliminační kinetiku MCs u ryb chybí.

Součástí naší studie bylo i posouzení biomarkerů oxidativního stresu (obr. 3). Ve většině případů došlo ke zvýšení hladin těchto enzymů (data nejsou součástí tohoto příspěvku). Pozorovaná zvýšená hladina GSH reaguje na zvýšenou míru detoxifikace a oxidativního stresu vyvolanou toxickými sinicemi (Blaha a kol., 2004, Jos a kol., 2005, Li a kol., 2003). Nicméně tyto adaptace byly pouze dočasné a u prodloužené expozice vedly k známám obecné toxicity jako je suprese GSH (tolstolobik, 9.týden) (obr.3). 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 ranná známka pozdějších závažnějších toxických efektů u ryb.



Obr. 1. Průměrná koncentrace MCs ve svalovině a hepatopankreatu (ng.g⁻¹ ž.v.) během akumulčního experimentu.

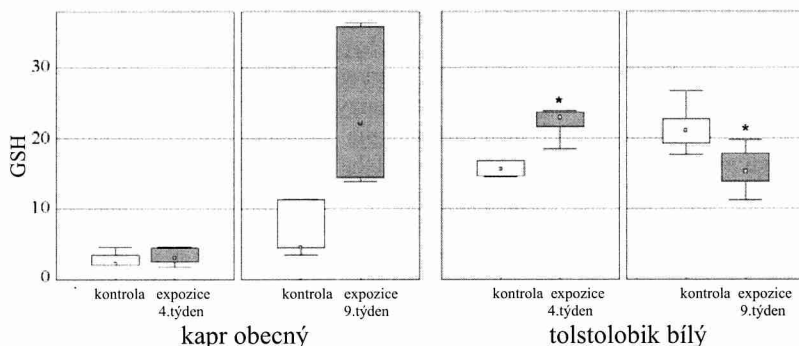


Obr. 2. Průměrná koncentrace MCs ve svalovině a hepatopankreatu (ng.g⁻¹ ž.v.) během eliminačního experimentu.

Microcystiny naakumulované v rybí tkáni mohou představovat pro člověka riziko spojené s konzumací těchto ryb. K tomuto tvrzení přispívá i fakt, že microcystiny jsou termostabilní a nejsou degradovány během vaření (Harada a kol., 1996). V naší studii jsme hodnotili analýzu rizik s využitím metodologie US EPA 1998. Pro tyto výpočty byly vzaty v úvahu maximální koncentrace ve svalovině kapra (18,8 ng.g⁻¹) a tolstolobika (29,3 ng.g⁻¹). Teoretické riziko, vyjádřené jako Index nebezpečnosti, 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 μg.kg⁻¹.den⁻¹. 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.

ZÁVĚR

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



Obr. 3. Biomarker oxidativního stresu - GSH (nmol.mg^{-1} proteinu) s vyznačením mediánu a výskytu 50% hodnot. Hvězdička ukazuje na statistickou významnost ($p < 0,05$).

Souhrn

Dva druhy kapr obecný a tolstolobik bílý, ryby běžné v jídelníčku Evropy i Asie, byly exponovány přirozenou biomasou sinic v kontrolovaném experimentu. Tyto druhy ryb byly taktéž součástí eliminačního experimentu pro zjištění rychlosti depurace MCs z tkání. U obou druhů ryb byly stanoveny koncentrace microcystinů a hodnocen oxidativní stres pomocí hodnocení koncentrací GSH. Microcystiny akumulované ve svalcích se pohybovaly v rozmezí 1,4 - 29 ng/g ž.v u tolstolobika a 3,3 - 19 ng/g ž.v u kapra. V hepatopankreatu se detekované koncentrace pohybovaly o řád výše (do 226 ng/g u tolstolobika a 132 ng/g u kapra). U kapra koncentrace spadla na 69 ng/g v 9.týdnu. V akumulačním experimentu bylo potvrzeno, že ryby po přesunu do čisté vody dokáží do 1-2 týdnů eliminovat MCs ze svaloviny i hepatopankreatu. U ryb byl analyzován i hladiny detoxifikačních enzymů a látek. Bylo potvrzeno, že v prostředí se sinicemi odpovídají zvýšenou aktivitou detoxifikačního aparátu (tvorba GSH). Analýza rizika dle metodologie US EPA ukázala relativně malá rizika při konzumaci ryb.

Poděkování

Předložená práce vznikla díky finanční podpoře z Výzkumného záměru Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky MSM 62 15712402 s názvem „Veterinární aspekty bezpečnosti a kvality potravin“ a projektu NAZV QH71015.

LITERATURA

- Amorim, A., Vasconcelos, V. 1999. Dynamics of microcystins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. 37: 1041-1052
- Azevedo, S. M. F. O., Carmichael, W. W., Jochimsen, E. M., Rinehart, K. L., Lau, S., Shaw, G. R., Eaglesham, G. K. 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru--Brazil. 181-182: 441-446
- Blaha, L., Kopp, R., Simkova, K., Mares, J. 2004. Oxidative stress biomarkers are modulated in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) exposed to microcystin-producing cyanobacterial water bloom. 73: 477-482
- Briand, J. F., Jacquet, S., Bernard, C., Humbert, J. F. 2003. Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Veterinary Research* 34: 361-377
- Buryškova, B., Hilscherova, K., Babica, P., Vrskova, D., Marsalek, B., Blaha, L. 2006. Toxicity of complex cyanobacterial samples and their fractions in *Xenopus laevis* embryos and the role of microcystins. 80: 346-354

- Cazenave, J., Wunderlin, D. A., Bistoni, M. D. L., Ame, M. V., Krause, E., Pflugmacher, S., Wiegand, C. 2005. Uptake, tissue distribution and accumulation of microcystin-RR in *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis* - A field and laboratory study. 75: 178-190
- Ding, W. X., Shen, H. M., Shen, Y., Zhu, H. G., Ong, C. N. 1998. Microcystic cyanobacteria causes mitochondrial membrane potential alteration and reactive oxygen species formation in primary cultured rat hepatocytes. Environ. Health Perspect. 106: 409-413
- Ellmann, G. L. 1959. Tissue sulfhydryl group. 82: 70-79
- Harada, K.-I., Tsuji, K., Watanabe, M. F. 1996. Stability of microcystins from cyanobacteria - III. Effect of pH and temperature. 35: 83-88
- Jos, A., Pichardo, S., Prieto, A. I., Repetto, G., Vazquez, C. M., Moreno, I., Camean, A. M. 2005. Toxic cyanobacterial cells containing microcystins induce oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis sp.*) under laboratory conditions. Aquat. Toxicol. 72: 261-271
- Kuiper-Goodman, T., Falconer, I. R., Fitzgerald, D. J. 1999. Human health aspects. 113-153
- Landsberg, J. H. 2002. The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. Reviews in Fisheries Science 10: 113-390
- Lawton, L. A., Edwards, C., Codd, G. A. 1994. Extraction and high-performance liquid chromatographic method for determination of microcystins in raw and treated waters. 119: 1525-1530
- Li, X. Y., Liu, Y. D., Song, L. R., Liu, H. T. 2003. Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to the toxicity of microcystin-LR. 42: 85-89
- Lowry, O. H., Rosenbrough, A. L., Farr, A. L., Randall, R. J. 1951. Protein measurements with Folin-Phenol reagents. 193: 256-275
- Magalhaes, V. F., Soares, R. M., Azevedo, S. 2001. Microcystin contamination in fish from the Jacarepagua Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. 39, 1077-1085
- Malbrouck, C., Kestemont, P. 2006. Effects of microcystins on fish. 25: 72-86
- 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
- Rodger, H. D., Turnbull, T., Edwards, C., Codd, G. A. 1994. Cyanobacterial (Blue-Green-Algal) Bloom Associated Pathology in Brown Trout, *Salmo-Trutta* L, in Loch Leven, Scotland. Journal of Fish Diseases 17: 177-181
- Sivonen, K., Jones, G. 1999. Cyanobacterial toxins. 41-111
- Snyder, G. S., Goodwin, A. E., Freeman, D. W. 2002. Evidence that channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), mortality is not linked to ingestion of the hepatotoxin microcystin-LR. Journal of Fish Diseases 25: 275-285
- Soares, R. M., Magalhaes, V. F., Azevedo, S. M. F. O. 2004. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions. 70: 1-10
- Tencalla, F. G., Dietrich, D. R., Schlachter, C. 1994. Toxicity of Microcystis-Aeruginosa Peptide Toxin to Yearling Rainbow-Trout (*Oncorhynchus mykiss*). 30, 215-224
- Thostrup, L., Christoffersen, K. 1999. Accumulation of microcystin in *Daphnia magna* feeding on toxic Microcystis. 145: 447-467
- Van Der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. P. E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ. Toxicol. Pharmacol. 13: 57-149
- Vasconcelos, V. M. 1995. Uptake and Depuration of the Heptapeptide Toxin Microcystin-Lr in *Mytilus galloprovincialis*. Aquat. Toxicol. 32: 227-237
- Wiegand, C., Pflugmacher, S., Oberemm, A., Meems, N., Beattie, K. A., Steinberg, C. E. W., Codd, G. A. 1999. Uptake and effects of microcystin-LR on detoxication enzymes of early life stages of the zebra fish (*Danio rerio*). 14: 89-95
- Williams, D. E., Craig, M., Dawe, S. C., Kent, M. L., Andersen, R. J., Holmes, C. F. B. 1997. ¹⁴C-labelled microcystin-LR administered to Atlantic salmon via intraperitoneal injection provides in vivo evidence for covalent binding of microcystin-LR in salmon livers. 35, 985-989
- Williams, D. E., Dawe, S. C., Kent, M. L., Andersen, R. J., Craig, M., Holmes, C. F. B. 1997. Bioaccumulation and clearance of microcystins from salt water mussels, *Mytilus edulis*, and in vivo evidence for covalently bound microcystins in mussel tissues. 35: 1617-1625
- Xie, L., Xie, P., Ozawa, K., Honma, T., Yokoyama, A., Park, H.-D. 2004. Dynamics of microcystins-LR and -RR in the phytoplanktivorous silver carp in a sub-chronic toxicity experiment. 127: 431-439
- Xie, L. Q., Xie, P., Guo, L. G., Li, L., Miyabara, Y., Park, H. D. 2005. Organ distribution and bioaccumulation of microcystins in freshwater fish at different trophic levels from the eutrophic Lake Chaohu, China. 20: 293-300
- Zeck, A., Eikenberg, A., Weller, M. G., Niessner, R. 2001. Highly sensitive immunoassay based on a monoclonal antibody specific for [4-arginine]microcystins. 441: 1-13

Zimba, P. V., Khoo, L., Gaunt, P. S., Brittain, S., Carmichael, W. W. 2001. Confirmation of catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), mortality from *Microcystis* toxins. Journal of Fish Diseases 24, 41-47

Adresy autorů:

Ondřej Adamovský^{1,2}, **Radovan Kopp**^{2,3}, **Klára Hilscherová**^{1,2}, **Miroslava Palíková**⁴, **Stanislav Navrátil**⁴,
Luděk Bláha^{1,2}

¹ Výzkumné centrum pro Chemii životního prostředí a Ekotoxikologii - RECETOX, Masarykova Univerzita, Kamenice 126/3, 62500 Brno

² Centrum pro cyanobakterie a jejich toxiny, Botanický ústav AV ČR, Kamenice 126/3, 62500 Brno

³ Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, oddělení Rybářství a Hydrobiologie, Zemědělská 1, 61300 Brno

⁴ Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1-3, 61242 Brno