

Effect of biomass of *Anabaena* sp. containing the microcystin-LR, grown at different phosphorus concentrations on the zooplankton, *Daphnia magna*

Rostami F.¹; Farhadian O.^{1*}; Mahboobi Soofiani N.¹

*omfarhad@cc.iut.ac.ir

1-Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

Received: February 2026

Accepted: April 2026

Published: July 2026



Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introduction

Eutrophication of freshwater ecosystems has led to a worldwide increase in the frequency of harmful cyanobacterial blooms (Paerl and Otten, 2013; Preece *et al.*, 2017). Many cyanobacteria produce secondary metabolites known as cyanotoxins, among which microcystins are the most widespread and ecologically significant (Spoof and Catherine, 2017). Microcystin-LR (MC-LR) is recognized as the most toxic and prevalent microcystin variant in freshwater systems (Li *et al.*, 2017). Species within the genus *Anabaena* are globally distributed and capable of producing microcystins under favorable environmental conditions (Welker and Döhren, 2006). Zooplankton—particularly cladocerans such as *Daphnia magna*—play a pivotal role in aquatic food webs and are widely regarded as sensitive indicators of cyanobacterial toxicity (Ferrao-Filho *et al.*, 2008; Ger *et al.*, 2016). Cyanotoxins are thought to act as chemical defenses against grazing, thereby constraining energy transfer from primary producers to higher trophic levels (Ferrao-Filho and Kozlowsky-Suzuki, 2011). In addition to their acute lethal effects, a growing body of evidence indicates that microcystins can induce a broad range of sublethal and chronic responses in zooplankton, including reduced feeding activity, impaired growth, delayed maturation, and diminished reproductive performance (Ferrao-Filho *et al.*, 2000; Vilar *et al.*, 2014). These chronic effects are ecologically significant because they may alter the population dynamics of primary consumers even at toxin concentrations below those causing immediate mortality (Ferrao-Filho and Kozlowsky-Suzuki, 2011). Moreover, prolonged exposure to cyanobacterial biomass can promote the accumulation of microcystins in zooplankton tissues, thereby increasing the potential for trophic transfer and biomagnification within aquatic food webs (Ferrao-Filho *et al.*, 2014; Pham and Utsumi, 2018). Despite extensive research on cyanobacterial toxicity, relatively little is known about how phosphorus availability influences microcystin production and the resulting acute and chronic effects on zooplankton.

Methodology

Anabaena sp. was cultured under four phosphorus concentrations, including a control treatment corresponding to the basal BG-11 medium phosphorus (7.1 mg/L P) and three elevated phosphorus

levels (7.74, 8.38 and 9.66 mg/L P). Cyanobacterial biomass was harvested, freeze-dried, and used for toxin quantification and toxicity experiments. Microcystin-LR concentrations were measured using an ELISA method following standard protocols (Fan *et al.*, 2022). Acute toxicity tests were conducted using neonates (<24 h old) of *D. magna* exposed to different concentrations of freeze-dried cyanobacterial biomass (0–1000 mg dry weight L⁻¹) for 96 hours, and mortality was recorded periodically (Ferraio-Filho *et al.*, 2014). Median lethal concentration (LC₅₀) values were calculated using Probit analysis. Chronic toxicity tests were performed over a 15-day exposure period at lower biomass concentrations (12.5, 25, and 50 mg DW/L). Survival, time to first reproduction, and total offspring production were recorded according to established methods (Smutna *et al.*, 2014; Herrera *et al.*, 2015). At the end of the exposure period, microcystin-LR accumulation in *D. magna* tissues was quantified using ELISA.

Results

Phosphorus concentration significantly influenced microcystin-LR (MC-LR) production in *Anabaena* sp. cultured under different experimental treatments. ELISA analysis showed that MC-LR concentrations in freeze-dried cyanobacterial biomass ranged from 33.41 to 300.5 pg/mL. The highest MC-LR content was recorded in the treatment with 8.38 mg/L P, followed by 9.66 mg/L P, while the lowest toxin concentration was observed in the control treatment (7.1 mg/L P). Statistical analysis revealed significant differences among treatments ($p < 0.05$), indicating that phosphorus availability markedly affected toxin production. Acute toxicity assays demonstrated clear dose-dependent effects of cyanobacterial biomass on the survival of *D. magna*. Mortality increased with increasing biomass concentration in all treatments. Biomass derived from the 8.38 mg/L P treatment caused the highest mortality, reaching 100% at 1000 mg DW/L within 96 hours. At intermediate concentrations (500 and 250 mg DW/L), mortality rates of approximately 70% and 50%, respectively, were observed for the 8.38 mg/L P treatment. In contrast, the control treatment exhibited the lowest toxicity, with mortality rates of 40%, 20%, and 10% at biomass concentrations of 1000, 500, and 250 mg DW/L, respectively. The lowest 96-h LC₅₀ value (271.12 mg DW/L) was observed for the 8.38 mg/L P treatment, whereas higher LC₅₀ values were observed for the remaining treatments, indicating lower toxicity. Chronic toxicity experiments revealed significant lethal and sublethal effects of *Anabaena* sp. biomass on *D. magna* during the 15-day exposure period. Survival rates declined with increasing biomass concentration, particularly in treatments associated with higher phosphorus levels. The highest mortality rates were observed in the 8.38 and 9.66 mg/L P treatments at biomass concentrations of 50 and 100 mg DW/L. In contrast, no mortality was recorded in the control group without cyanobacterial biomass. Reproductive performance of *D. magna* was markedly affected by chronic exposure to cyanobacterial biomass. The total number of offspring produced over the experimental period decreased significantly with increasing biomass concentration in all treatments. The lowest cumulative number of neonates was recorded in the 8.38 mg/L P treatment, particularly at 100 mg DW/L, where reproduction was strongly suppressed. In contrast, the control group showed the highest reproductive output. Additionally, the time

to first reproduction was delayed in all exposed groups compared to the control, with reproduction occurring one day later in treatments containing cyanobacterial biomass. Analysis of microcystin-LR accumulation in *D. magna* tissues indicated relatively low toxin concentrations at the end of the chronic exposure period. No detectable MC-LR was found in zooplankton exposed to 25 mg DW/L across all treatments. However, measurable toxin levels were detected at higher biomass concentrations, particularly in the 8.38 and 9.66 mg/L P treatments. The highest accumulation was observed at 100 mg DW/L, although concentrations remained low across all treatments.

Discussion and conclusion

The enhanced toxicity observed under phosphorus-enriched treatments can be attributed to increased microcystin-LR production and shifts in the biochemical composition of cyanobacterial biomass. Previous studies have shown that phosphorus can indirectly regulate microcystin production by promoting biomass accumulation and increasing cellular energy availability (Halstvedt *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010). Phosphorus also plays a central role in ATP synthesis, providing the energy required for microcystin biosynthesis (Li *et al.*, 2023). Chronic-exposure experiments revealed significant lethal and sublethal effects in *D. magna*, including reduced survival, delayed reproduction, and decreased offspring production. These responses are characteristic of chronic cyanobacterial toxicity and have been widely documented in cladocerans exposed to microcystins (Ferrao-Filho and Kozlowsky-Suzuki, 2011; Vilar *et al.*, 2014). Although microcystin accumulation in *D. magna* tissues was relatively low overall, accumulation increased with prolonged exposure and under phosphorus-enriched conditions, consistent with previous reports of microcystin bioaccumulation and trophic transfer (Ferrao-Filho *et al.*, 2014; Pham and Utsumi, 2018). Overall, these findings suggest that nutrient-driven cyanobacterial blooms may have long-term impacts on zooplankton populations through both direct toxicity and disruption of key life-history traits. In conclusion, cyanobacterial toxicity to *D. magna* appears to depend strongly on biomass dose and phosphorus-mediated toxin production, and chronic exposure may pose substantial ecological risks even at sublethal concentrations. Ultimately, these effects may compromise the population stability of primary consumers and reduce energy transfer in eutrophic freshwater ecosystems.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement

The authors gratefully acknowledge the Faculty of Natural Resources, Isfahan University of Technology, for providing laboratory facilities and technical support for this research. They also thank the faculty members and laboratory staff who assisted with the experimental work.

مقاله علمی - پژوهشی:

اثر زیست توده سیانوباکتری *Anabaena sp.* حاوی سم Microcystin-LR، رشد یافته در غلظت‌های مختلف فسفر بر زئوپلانکتون *Daphnia magna*

فاطمه رستمی^۱، امیدوار فرهادیان*^۱، نصرالله محبوبی صوفیانی^۱

*a.jafarpour@sanru.ac.ir

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ چاپ: تیر ۱۴۰۵

تاریخ پذیرش: فروردین ۱۴۰۵

تاریخ دریافت: بهمن ۱۴۰۴

چکیده

سیانوباکتری‌های تولیدکننده سم به عنوان یکی از عوامل تهدیدکننده زنجیره‌های غذایی آبزیان شناخته می‌شوند. هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر حاد و مزمن زیست توده سیانوباکتری *Anabaena sp.* حاوی سم Microcystin-LR، پرورش یافته در غلظت‌های مختلف فسفر، بر زئوپلانکتون *Daphnia magna* بود. بدین منظور، سیانوباکتری *Anabaena sp.* به مدت ۱۰ روز در معرض غلظت‌های مختلف فسفر شامل غلظت ۷/۱ میلی‌گرم بر لیتر به عنوان تیمار شاهد و غلظت‌های ۷/۷۴، ۸/۳۸ و ۹/۶۶ میلی‌گرم بر لیتر فسفر در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و نور فلورسنت با شدت ۳۵ میکرومول فوتون بر ثانیه کشت داده شد. نتایج نشان داد که میزان تولید سم Microcystin-LR به طور معنی‌داری تحت تأثیر غلظت فسفر قرار دارد ($p < 0.05$) به طوری که بیشترین مقدار سم در تیمار ۸/۳۸ میلی‌گرم بر لیتر فسفر با ۳۰۰/۵ پیکوگرم بر میلی‌لیتر و کمترین مقدار آن در تیمار شاهد با ۳۳/۴۱ پیکوگرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. ارزیابی سمیت حاد زیست توده سیانوباکتری بر زئوپلانکتون *D. magna* نشان داد که کمترین مقدار LC₅₀ ۹۶ ساعته (بیشترین سمیت) در تیمار ۸/۳۸ میلی‌گرم بر لیتر فسفر مشاهده شد که ۲۷۱/۱۲ میلی‌گرم وزن خشک زیست توده بر لیتر بود و با سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار داشت ($p < 0.05$). در آزمایش سمیت مزمن نیز بیشترین میزان مرگ و میر در تیمار ۸/۳۸ میلی‌گرم بر لیتر فسفر با میزان زیست توده خشک ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد که ۶۰ درصد بود. هیچ مرگ و میری در تیمار شاهد مشاهده نشد. بیشترین تعداد نوزادان در تیمار شاهد و کمترین تعداد نوزاد متولد شده نیز مربوط به تیمار ۸/۳۸ میلی‌گرم بر لیتر فسفر بود که به ترتیب ۲۱ و ۱۰ عدد شمارش شدند. اولین زمان تولیدمثل برای تیمار شاهد روز ۸ و برای سایر تیمارها روز ۹ ثبت گردید. نتایج حاصل بیانگر آن است که افزایش غلظت فسفر محیط می‌تواند از طریق افزایش تولید Microcystin-LR، سمیت زیست توده سیانوباکتری *Anabaena sp.* را تشدید کرده و تهدیدی جدی برای زئوپلانکتونها و پایداری اکوسیستم‌های آبی ایجاد کند.

لغات کلیدی: Microcystin-LR *Anabaena sp.*، سمیت، *Daphnia magna*، فسفر

*نویسنده مسئول



Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

مقدمه

مواد مغذی قرار دارد (Song *et al.*, 2015)، اما تولید آنها رابطه نزدیکی با رشد زیست‌توده سیانوباکتری‌ها دارد (Xue *et al.*, 2016). از میان عوامل محیطی موثر، فسفر به‌عنوان مهم‌ترین عنصر شیمیایی، محرک شکوفایی سیانوباکتری‌ها و افزایش سنتز Microcystin شناخته شده است (Qian *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2012).

زئوپلانکتون‌ها نقش اساسی در ساختار و عملکرد اکوسیستم‌های آبی ایفاء می‌کنند و به‌عنوان واسطه انتقال انرژی از تولیدکنندگان اولیه به سطوح بالاتر غذایی شناخته می‌شوند (Rahman *et al.*, 2022). با این‌حال، سیانوتوکسین‌ها به‌ویژه Microcystins می‌توانند اثرات حاد و مزمن متعددی بر زئوپلانکتون‌ها ایجاد کنند که شامل کاهش نرخ تغذیه، اختلال در رشد و تولیدمثل و همچنین افزایش مرگ‌ومیر است (Ferrao-Filho *et al.*, 2008; Vilar *et al.*, 2014). به دلیل این حساسیت، زئوپلانکتون‌ها به‌عنوان شاخص‌های زیستی مناسبی برای ارزیابی حضور و سمیت سیانوتوکسین‌ها در محیط‌های آبی در نظر گرفته می‌شوند (Ger *et al.*, 2016). مطالعات نشان داده‌اند که قرارگیری زئوپلانکتون *Daphnia magna* در معرض عصاره‌ها یا زیست‌توده سیانوباکتریایی باعث کاهش نرخ فیلتراسیون، اختلال در حرکات شنا و در موارد شدید، مرگ می‌شود (Ferrao-Filho *et al.*, 2008; Herrera *et al.*, 2015). علاوه بر اثرات مستقیم، زئوپلانکتون‌ها قادر به تجمع زیستی Microcystins هستند و می‌توانند این سموم را از طریق مصرف سلول‌های سیانوباکتریایی یا جذب فرم‌های محلول در آب دریافت کنند (Ferrao-Filho and Kozlowsky-Suzuki, 2011; Ferrao-Filho *et al.*, 2014). این تجمع زیستی می‌تواند منجر به انتقال Microcystins در طول زنجیره غذایی و افزایش خطر برای سطوح تغذیه‌ای بالاتر شود (Sotton *et al.*, 2014; Preece *et al.*, 2017).

باتوجه به نقش کلیدی فسفر در تنظیم تولید Microcystins و حساسیت بالای *Daphnia magna* به این سم، بررسی سمیت سیانوباکتری *Anabaena sp.* پرورش‌یافته در غلظت‌های مختلف فسفر، می‌تواند درک بهتر پیامدهای اکولوژیک شکوفایی سیانوباکتری‌ها و مدیریت ریسک‌های زیست‌محیطی مرتبط با آنها نقش مؤثری ایفاء کند.

افزایش ورود مواد مغذی به‌ویژه فسفر و نیتروژن، از عوامل اصلی بروز شکوفایی سیانوباکتری‌ها در محیط‌های آبی است (Paerl and Otten, 2013). برخی از گونه‌های سیانوباکتری‌ها در چنین شرایطی متابولیت‌های ثانویه سمی تولید می‌کنند (Ferrao-Filho and Kozlowsky-Suzuki, 2011). شکوفایی‌های سمی سیانوباکتری‌های و انتشار سموم آنها، در سال‌های اخیر به یک مشکل جهانی در اکوسیستم‌های آبی تبدیل شده است و تحت تأثیر بارگذاری مواد مغذی و تغییرات اقلیمی، تشدید می‌شود (Ger *et al.*, 2016; Preece *et al.*, 2017). شکوفایی سیانوباکتری‌ها با کاهش شفافیت، افت اکسیژن محلول، تغییر ترکیب فیتوپلانکتونی و تولید سیانوتوکسین‌ها موجب افت کیفیت آب می‌گردد (O'Neil *et al.*, 2012). سیانوتوکسین‌ها دسته‌ای از متابولیت‌های ثانویه سیانوباکتری‌ها هستند که بنا بر نوع اثر به هیپاتوتوکسین‌ها، نوروتوکسین‌ها، سیتوتوکسین‌ها و درماتوتوکسین‌ها تقسیم می‌شوند (Bownik, 2016) که در میان آنها Microcystins به‌ویژه نوع MC-LR فراوان‌ترین و خطرناک‌ترین ترکیب گزارش شده در اکوسیستم‌های آبهایی شیرین و لب شور محسوب می‌شوند (Li *et al.*, 2017; Spoof and Catherine, 2017). سیانوباکتری *Anabaena sp.* نیز یکی از عوامل اصلی تولیدکننده سم میکروسیستین در محیط‌های آبی است (Welker and Döhren, 2006). پایداری بالا، قابلیت تجمع زیستی و ارتباط مستقیم این ایزومر با شکوفایی سیانوباکتری‌ها موجب شده است که سازمان‌های بین‌المللی کیفیت آب از Microcystin-LR به‌عنوان ترکیب شاخص در ارزیابی خطرات اکولوژیک و پایش سمیت استفاده کنند (WHO, 2020).

Microcystins عمدتاً با مهار آنزیم‌های پروتئین فسفاتاز نوع ۱ و ۲ باعث اختلال در هموستاز سلولی و آسیب بافتی می‌شوند (Chen *et al.*, 2016). این ترکیبات علاوه بر مهار مستقیم، در تنظیم بیان ژن‌های مرتبط نیز نقش دارند (Valerio *et al.*, 2016). غلظت Microcystins در محیط‌های آبی تحت تأثیر نور، تخریب زیستی و ترکیب

مواد و روش کار

کشت سیانوباکتری‌ها در غلظت‌های مختلف فسفر

آزمایش در چهار غلظت مختلف فسفر شامل غلظت ۷/۱۰ میلی‌گرم بر لیتر به عنوان تیمار شاهد (غلظت فسفر پایه محیط کشت BG-11) و غلظت‌های ۷/۷۴، ۸/۳۸ و ۹/۶۶ میلی‌گرم بر لیتر فسفر که به ترتیب با افزایش حدود ۱۰، ۲۰ و ۴۰ درصدی از غلظت پایه بودند، در سه تکرار انجام گرفت. برای کشت سیانوباکتری *Anabaena sp.* از محیط کشت

BG-11 استفاده شد (جدول ۱). محیط‌های کشت با غلظت‌های مختلف فسفر، در ارلن مایرهای ۲ لیتری آماده، pH آغازین در ۷/۱ تنظیم گردید و سپس ۳۰۰ میلی‌لیتر از استوک خالص سیانوباکتری *Anabaena sp.* به آنها اضافه و به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در زیر نور فلورسنت سفید با شدت ۳۵ میکرومول فوتون بر ثانیه سفید نگهداری و بررسی شدند.

جدول ۱: ترکیبات محیط کشت BG-11 (Stanier et al., 1971)

Table 1: Composition of BG-11 culture medium (Stanier et al., 1971)

	Stocks	Concentration (g L ⁻¹)
	1	NaNO ₃ 150.00
	2	K ₂ HPO ₄ 4.00
	3	MgSO ₄ .7H ₂ O 7.50
Macroelement nutrients	4	CaCl ₂ . 2H ₂ O 3.60
	5	Citric acid 0.60
	6	Ammonium ferric citrate green 0.60
	7	EDTANa ₂ 0.10
	8	Na ₂ CO ₃ 2.00
Microelement nutrients		H ₃ BO ₃ 2.86
		MnCl ₂ .4H ₂ O 1.81
	9	ZnSO ₄ .7H ₂ O 0.22
		Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O 0.39
		CuSO ₄ .5H ₂ O 0.08
		Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O 0.05
	Medium Per Liter	
	Stock solutions 1 – 8 10 mL of each	
	Stock solution 9 1.0 mL	

از دستگاه خوانش الیزا انجام گرفت. نتایج به صورت پیکوگرم سم Microcystin-LR در هر گرم زیست‌توده خشک بیان شدند.

سمیت حاد و مزمن سیانوباکتری *Anabaena sp.* کشت و نگهداری زئوپلانکتون‌ها

زئوپلانکتون *D. magna* مورد استفاده برای آزمایش سمیت، از کشت‌های آزمایشگاه اکولوژی آبریان در دانشگاه صنعتی اصفهان تهیه و تا زمان انجام آزمایش تحت pH=۷

تجزیه و تحلیل سم Microcystin-LR و آزمایش سمیت

پس از اتمام دوره کشت زیست توده‌های سیانوباکتری در هر تیمار جداگانه جمع آوری، با روش خشک کن انجمادی خشک و برای مراحل بعدی آزمایش نگهداری شدند. محتوای Microcystin-LR زیست توده‌های سیانوباکتری *Anabaena sp.* با استفاده از کیت ELSA و روش Fan و همکاران (۲۰۲۲) تعیین گردید. آزمایش در سه تکرار انجام شد و خوانش نمونه‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر و با استفاده

حاوی محیط کشت زئوپلانکتون و غلظت مشخص شده از زیست‌توده خشک سیانوباکتری، قرار داده شدند. زئوپلانکتون‌ها به مدت ۱۵ روز در معرض محلول آزمایش قرار گرفتند. محلول آزمایش هر ۷۲ ساعت تجدید و زئوپلانکتون‌ها با استفاده از ریز جلبک سبز *C. vulgaris* تغذیه شدند. نوزادان جدید متولد شده روزانه ثبت و جمع آوری شدند. سن تولید مثل اول و تعداد نوزادان در پایان آزمایش محاسبه گردید (Smutna et al. 2014; Herrera et al. 2015).

اندازه‌گیری میزان تجمع سم Microcystin-LR در زئوپلانکتون‌ها

برای اندازه‌گیری سم Microcystin در نمونه‌های زئوپلانکتون، ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از محلول متانول-آب ۷۵ درصد به ویال‌ها اضافه و بافت‌های هر نمونه با یک دسته هاون همگن شد. این عصاره‌ها در ۱۶۰۰۰ g سانتیفریوژ شده و مایع رویی با یک ویال دیگر برداشته، خشک و در ۱ میلی‌لیتر آب دیونیزه دوباره به حالت تعلیق درآمد. این نمونه‌ها به منظور تعیین مقدار Microcystin به‌وسیله کیت ELISA، با رقت مناسب در صورت لزوم (x - ۱۰۰) تجزیه و تحلیل شدند (Fan et al. 2022).

روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار انجام شد. برای تعیین پارامتر سمیت (LC₅₀) از نرم افزار Probit (نسخه ۱/۵) استفاده گردید. برای بررسی وجود تفاوت آماری معنی‌دار از تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه^۱ و مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ انجام گرفت. از نسخه ۲۶ نرم افزار آماری SPSS استفاده شد.

نتایج

اثر فسفر بر مقدار تولید سم Microcystin-LR

نتایج تجزیه و تحلیل نمونه‌های سیانوباکتری با استفاده از کیت الایزا نشان داد که نمونه‌های لیوفیلیزه حاصل از کشت

۸، دمای متوسط ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۲ ساعته نگهداری شد. از جلبک سبز *Chlorella vulgaris* در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر به‌عنوان غذا برای تغذیه زئوپلانکتون‌ها استفاده گردید.

سمیت حاد

سنجش سمیت حاد زیست‌توده سیانوباکتری *Anabaena* sp. با استفاده از زئوپلانکتون *D. magna* انجام شد. برای این منظور زیست‌توده خشک *Anabaena* sp. (برداشت شده از کشت‌های با ۷/۱، ۷/۷۴، ۸/۳۸ و ۹/۶۶ میلی‌گرم بر لیتر فسفر) به محیط کشت *D. magna* اضافه شد تا مخلوط‌های با غلظت‌های صفر، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر تهیه شود. مخلوط‌ها به مدت ۲۴ ساعت نگهداری و سپس به مدت ۱۵ دقیقه تحت امواج فراصوت (۲۰ کیلو هرتز) قرار گرفتند. پس از آن، سوسپانسیون‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند تا عصاره‌های آبی به‌دست آیند. سمیت حاد با اضافه کردن ۱۰ عدد زئوپلانکتون *D. magna* به ۳۰ میلی‌لیتر عصاره آبی *Anabaena* sp. ارزیابی شد. محیط کشت استاندارد مورد استفاده برای نگهداری زئوپلانکتون‌ها، بدون زیست‌توده سیانوباکتری، به عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت. در تمام تیمارها جلبک‌های سبز *Chlorella vulgaris* به عنوان غذا مورد استفاده قرار گرفتند. تعداد تلفات زئوپلانکتون‌ها در ظرف‌های آزمایش در روز اول هر ۴ ساعت و پس از آن تا روز چهارم روزانه شمارش و ثبت شدند. کلیه شرایط فیزیکی و شیمیایی آب و محیط (pH، دما) و سایر فراسنجه‌ها طی آزمایش، کنترل شد (Ferraio-Filho et al., 2014).

سمیت مزمن

آزمایش سمیت مزمن در سه غلظت زیست‌توده سیانوباکتریایی شامل ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم ماده خشک بر لیتر و یک گروه شاهد، هر کدام در ۳ تکرار انجام شد. ۱۶ عدد زئوپلانکتون *D. magna* برای هر غلظت به صورت جداگانه در ظروف مخصوص پلاستیکی ۳۰ میلی‌لیتری

¹ One-Way ANOVA

آزمایش سمیت حاد

نتایج به دست آمده در آزمایش سمیت حاد با استفاده از نمونه‌های لیوفیلیزه سیانوباکتری رشد یافته در غلظت‌های مختلف فسفر تفاوت‌هایی را بین زئوپلانکتون‌ها در حساسیت به نمونه‌های سیانوباکتری نشان داد به طوری که تیمار ۸/۳۸ میلی گرم بر لیتر فسفر با ۱۰۰ درصد کشندگی در غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم وزن خشک بر لیتر طی ۹۶ ساعت، نشان داد که افزایش سمیت با افزایش غلظت فسفر و زیست توده همراه بوده است (شکل ۱). کمترین میزان مرگ و میر نیز در تیمار شاهد (۷/۱ میلی گرم بر لیتر) مشاهده گردید. کمترین مقدار LC_{50} ۹۶ ساعته (بیشترین سمیت) در تیمار ۸/۳۸ میلی گرم بر لیتر فسفر و بیشترین مقدار آن در تیمار شاهد نیز مشاهده شد که به ترتیب ۲۷۱/۱۲۵ و ۱۷۹۰/۳۱ میلی گرم وزن خشک زیست توده بر لیتر محاسبه شدند (جدول ۳).

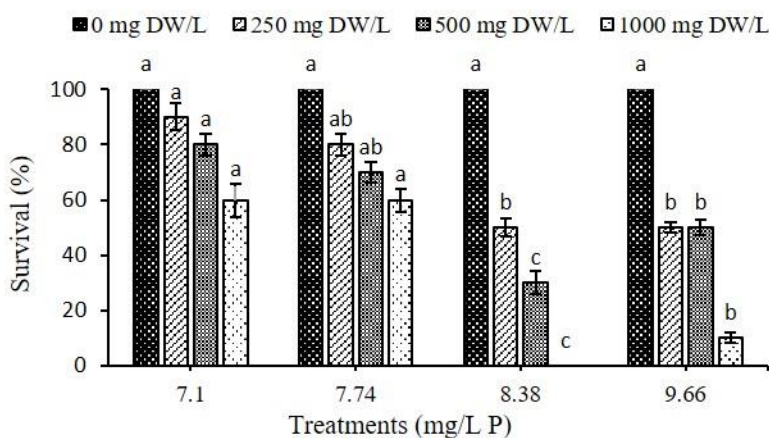
سیانوباکتری در غلظت‌های مختلف فسفر شامل سم Microcystin-LR با مقادیری در دامنه ۳۰/۵-۳۳/۴۱ پیکوگرم بودند (جدول ۲). بیشترین میزان سم Microcystin-LR نمونه‌ها در تیمار ۸/۳۸ میلی گرم بر لیتر فسفر و پس از آن در تیمار ۹/۶۶ میلی گرم بر لیتر فسفر مشاهده شد که با همدیگر و با سایر تیمارها اختلاف معنی داری داشتند ($p < 0.05$). تیمار شاهد نیز دارای کمترین میزان سم بود.

جدول ۲: میانگین (میانگین \pm انحراف معیار) میزان سم Microcystin-LR اندازه گیری شده با استفاده از کیت ELISA در غلظت‌های مختلف فسفر

Table 2: Average (mean \pm standard deviation) levels of microcystin-LR measured using the ELISA kit at different phosphorus concentrations

Treatments (mg/L P)	Microcystin-LR (pg/mL)
7.1	33.41 \pm 0.97 ^a
7.74	68.41 \pm 1.98 ^b
8.38	300.50 \pm 8.69 ^d
9.66	186.75 \pm 5.40 ^c

میانگین‌ها در هر ستون با حروف مختلف نشان دهنده وجود تفاوت آماری معنی دار بین تیمارهاست ($p < 0.05$). Means in each column with different letters indicate a statistically significant difference between treatments ($p < 0.05$).



شکل ۱: درصد بازماندگی زئوپلانکتون *Daphnia magna* قرار گرفته در برابر غلظت‌های مختلف زیست توده خشک سیانوباکتری *Anabaena sp.* در قالب سمیت حاد

Figure 1: Survival percentage of *Daphnia magna* exposed to different concentrations of *Anabaena sp.* dry biomass in the form of acute toxicant

آزمایش سمیت مزمن

نتایج آزمایش سمیت مزمن که با استفاده از زیست‌توده خشک سیانوباکتری *Anabaena sp.* طی یک دوره ۱۵ روزه انجام گرفت نشان داد که زیست‌توده خشک این سیانوباکتری می‌تواند اثرات سمی و کشنده وابسته به دوز بر زئوپلانکتون *D. magna* داشته باشد. بیشترین میزان مرگ و میر در تیمارهای با غلظت‌های بالاتر فسفر با میزان

زیست‌توده خشک ۱۰۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد که به ترتیب ۶۰ و ۳۰ درصد برای تیمار ۸/۳۸ میلی‌گرم بر لیتر فسفر و ۶۰ و ۴۰ درصد در تیمار ۹/۶۶ میلی‌گرم بر لیتر فسفر بود. هیچ مرگ‌ومیری در تیمار کنترل (محیط کشت زئوپلانکتون‌ها بدون زیست‌توده خشک)، مشاهده نشد و میزان بازماندگی ۱۰۰ درصدی برای آنها ثبت گردید (شکل ۲).

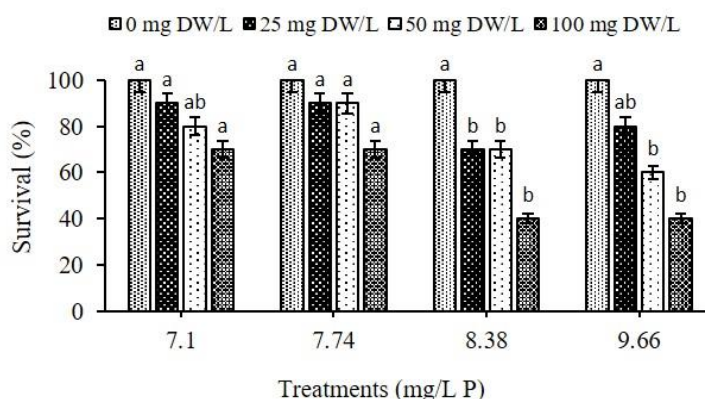
جدول ۳: غلظت کشنده متوسط (LC50) در ۹۶ ساعت مواجهه زئوپلانکتون *Daphnia magna* در برابر زیست‌توده *Anabaena sp.*

Table 3: Median lethal concentration (LC50) in 96 hours of exposure of *Daphnia magna* to *Anabaena sp.* dry biomass

Treatments (mg/L P)	LC ₅₀ -96 h (mg DW/L)
7.1	1790.31 ± 51.76 ^d
7.74	1435.42 ± 41.50 ^c
8.38	271.12 ± 7.84 ^a
9.66	314.81 ± 9.10 ^b

میانگین‌ها در هر ستون با حروف مختلف نشان دهنده وجود تفاوت آماری معنی‌دار بین تیمارهاست ($p < 0.05$).

Means in each column with different letters indicate a statistically significant difference between treatments ($p < 0.05$).

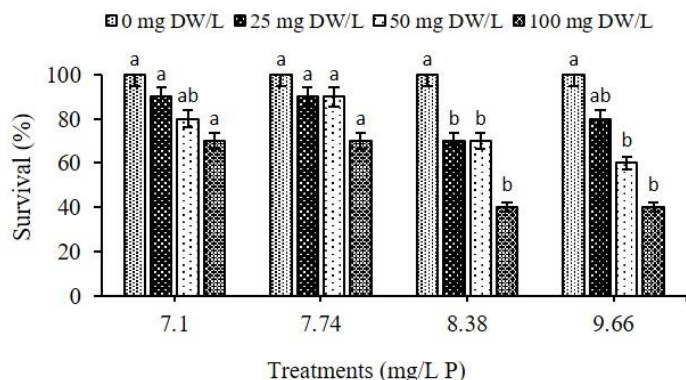


شکل ۲: میزان بازماندگی *Daphnia magna* قرار گرفته در معرض غلظت‌های مختلف زیست‌توده خشک سیانوباکتری *Anabaena sp.* در انتهای دوره ۱۵ روزه پرورش در قالب سمیت مزمن

Figure 2: Survival percentage of *Daphnia magna* exposed to different concentrations of *Anabaena sp.* dry biomass at the end of the 15-day culture period in a chronic toxicity model.

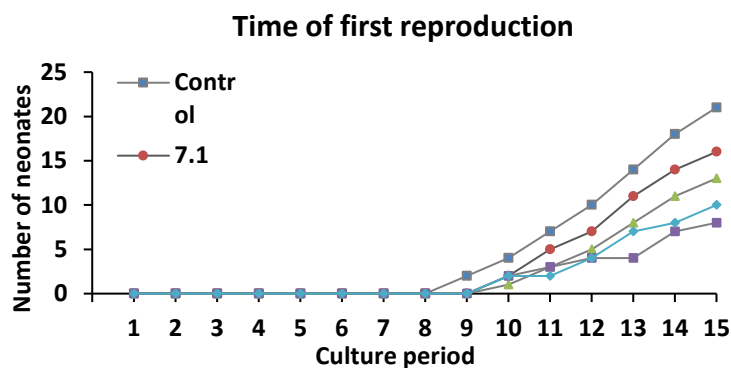
سایر تیمارها معنی‌دار بود ($p < 0.05$). به طور کلی تعداد تجمعی نوزادان در تیمارها به ترتیب ۲۱، ۱۶، ۱۳، ۸ و ۱۰ عدد در پایان دوره بود. زمان اولین تولیدمثل نیز متأثر از میزان غلظت زیست‌توده و فسفر تیمارها بود به طوری که اولین زمان تولیدمثل برای تیمار شاهد روز ۸ و برای سایر تیمارها روز ۹ ثبت گردید (شکل ۴).

تعداد نوزادان در انتهای دوره ۱۵ روزه پرورش در تیمار شاهد (محیط کشت زئوپلانکتون‌ها بدون زیست‌توده خشک)، بیشتر از سایر تیمارها بود (شکل ۳). کمترین میزان نوزادان متولد شده مربوط به غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم وزن خشک بر لیتر زیست‌توده در همه تیمارها بود و نشان داد افزایش میزان زیست‌توده خشک سیانوباکتری میزان تولد نوزادان را به طور قابل توجهی سرکوب می‌کند. اختلاف بین تعداد نوزادان در تیمار ۸/۳۸ میلی‌گرم بر لیتر فسفر با



شکل ۳: میزان بازماندگی *Daphnia magna* قرار گرفته در معرض غلظت‌های مختلف زیست توده خشک سیانوباکتری *Anabaena sp.* در انتهای دوره ۱۵ روزه پرورش در قالب سمیت مزمن

Figure 2: Survival percentage of *Daphnia magna* exposed to different concentrations of *Anabaena sp.* dry biomass at the end of the 15-day culture period in a chronic toxicity model



شکل ۴: اثر غلظت‌های مختلف زیست توده خشک سیانوباکتری *Anabaena sp.* بر زمان اولین تولید مثل *Daphnia magna*

Figure 4: Effect of different concentrations of *Anabaena sp.* dry biomass on the time of first *Daphnia magna* reproduction

پایینی از سم Microcystin بودند. در غلظت ۲۵ میلی گرم وزن خشک زیست توده از تمامی تیمارها، هیچ مقداری از سم در زئوپلانکتون‌ها یافت نشد. بیشترین میزان سم اندازه‌گیری شده مربوط به غلظت ۱۰۰ میلی گرم زیست توده خشک بود.

ارزیابی میزان تجمع سم Microcystin-LR در زئوپلانکتون *D. magna* با توجه به جدول ۴، زئوپلانکتون‌های *D. magna* قرار گرفته در معرض زیست توده خشک سیانوباکتری *Anabaena sp.* طی یک دوره ۱۵ روزه دارای مقادیر نسبتاً

جدول ۴: مقدار تجمع سم microcystin در زئوپلانکتون *Daphnia magna* (پیکوگرم بر میلی لیتر) در انتهای دوره ۱۵ روزه پرورش

Table 4: Amount of microcystin toxin accumulation in *Daphnia magna* (pg/mL) at the end of the 15-day culture period

Treatments (mg/L P)	Different concentrations of cyanobacterial dry biomass (mg DW/L)		
	25	50	100
7.1	0	0	0.004
7.74	0	0	0.010
8.38	0	0.09	0.16
9.66	0	0.015	0.10

میانگین‌ها در هر ستون با حروف مختلف نشان دهنده وجود تفاوت آماری معنی‌دار بین تیمارهاست ($p < 0.05$).

Means in each column with different letters indicate a statistically significant difference between treatments ($p < 0.05$).

بحث

نتایج نشان داد که افزایش فسفر اثر خطی بر تولید Microcystin-LR ندارد بلکه به وضعیت فیزیولوژیک سلول و تعادل بین رشد و متابولیسم ثانویه وابسته است (Downing et al. 2001; Horst et al. 2014). در تیمار ۸/۳۸ میلی‌گرم بر لیتر فسفر، غلظت Microcystin-LR افزایش یافت که احتمالاً بیانگر فراهمی سطح بهینه فسفر برای رشد فعال و تحریک مسیرهای بیوسنتزی سم است. در مقابل، کاهش میزان سم در تیمار شاهد (۷/۱ میلی‌گرم بر لیتر فسفر) می‌تواند ناشی از محدودیت فسفر و افت فعالیت متابولیک سلول‌ها باشد، زیرا در کمبود مواد مغذی انرژی سلول عمدتاً صرف بقاء می‌شود و سنتز متابولیت‌های ثانویه مانند Microcystin کاهش می‌یابد (Long et al. 2002; Vezie et al. 2001). براساس گزارش Halstvedt و همکاران (۲۰۰۷) تولید Microcystin تحت تاثیر هم‌زمان فراوانی سوبیه‌های سمی و مقدار سم تولیدی هر سلول قرار دارد و با افزایش زیست‌توده، سطح سم نیز افزایش می‌یابد. با این حال، Wang و همکاران (۲۰۱۰) بیان کردند که فسفر بالا به طور مستقیم تولید سم را افزایش نمی‌دهد بلکه از طریق افزایش زیست‌توده موجب تجمع Microcystin می‌شود. همچنین گزارش شده است که حضور فسفر موجب افزایش نرخ رشد سلولی و محتوای Microcystin در مقایسه با شرایط کم فسفر می‌شود (Davis et al., 1966). براساس شواهد اخیر، نقش فسفر در تنظیم سنتز Microcystin به‌واسطه مشارکت آن در سنتز ATP و فراهم سازی انرژی مورد نیاز برای مسیرهای بیوسنتزی است (Li et al., 2023). بنابراین، تولید Microcystin-LR در *Anabaena sp.* نتیجه برهم‌کنش میان وضعیت تغذیه‌ای فسفر، رشد زیست‌توده و کنترل متابولیسم ثانویه است و حداکثر تولید در شرایط فسفر بهینه، نه بیشینه، رخ می‌دهد.

بررسی سمیت حاد زیست‌توده *Anabaena sp.* بر زئوپلانکتون *D. magna* نشان داد که شدت اثرات سمی به کیفیت زیست‌توده و محتوای ترکیبات به‌ویژه Microcystin-LR، وابسته است. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که *D. magna* نسبت به سیانوباکتری‌های تولید

کننده Microcystin حساس است و مواجهه با این سموم می‌تواند منجر به مرگ و میر حاد، کاهش تحرک، اختلال در تغذیه و آسیب به بافت‌های کبدی و گوارشی در این زئوپلانکتون شود (Ferrao-Filho et al., 2000; Gerard et al., 2009). افزایش سمیت در تیمار با ۸/۳۸ میلی‌گرم بر لیتر فسفر با افزایش مقدار Microcystin-LR در همان تیمار هم‌سو بود و نشان داد که غلظت سم نقش اصلی در پاسخ زیستی *D. magna* دارد. وجود رابطه مشخص دوز-پاسخ با افزایش غلظت زیست‌توده در تمام تیمارها مؤید آن است که میزان مرگ‌ومیر وابسته به ترکیب شیمیایی زیست‌توده و حضور سیانوتوکسین‌هاست. کمترین میزان تلفات در تیمار شاهد احتمالاً به محدودیت فسفر و کاهش سنتز Microcystin مربوط است. یافته‌های سایر پژوهش‌ها نیز روند مشابهی گزارش کردند به‌طوری‌که افزایش غلظت عصاره‌های خام سیانوباکتری موجب تلفات بالاتر زئوپلانکتون‌ها شده است (Ferrao-Filho et al., 2014; Vilar et al., 2014; Herrera et al., 2015). مجموعاً، نتایج این مطالعه تایید می‌کند که زیست‌توده *Anabaena sp.* با محتوای بالای Microcystin-LR می‌تواند سمیت حاد قابل توجهی بر *D. magna* ایجاد کند. این اثر مستقیماً به وضعیت تغذیه‌ای فسفر و محتوای سم در سلول‌ها مرتبط است.

نتایج آزمایش سمیت مزمن نشان داد که زیست‌توده خشک *Anabaena sp.* علاوه بر افزایش مرگ‌ومیر، موجب بروز اثرات زیرکشنده نظیر تأخیر در بلوغ جنسی و کاهش تولیدمثل در *D. magna* شد. این ویژگی‌ها از شاخص‌های شناخته شده سمیت مزمن سیانوباکتری‌ها هستند و معمولاً در غلظت‌هایی کمتر از حد کشنده نیز رخ می‌دهند (Ferrao-Filho and Kozlowsky-Suzuki, 2011). کاهش باروری و تأخیر در زمان اولین تولیدمثل بیانگر اثرات جمعی Microcystin-LR و سایر متابولیت‌های ثانویه بر متابولیسم انرژی و تخصیص منابع سلولی است (Ferrao-Filho et al., 2000). شدت سمیت در تیمارهای با ۸/۳۸ و ۹/۶۶ میلی‌گرم بر لیتر فسفر با افزایش محتوای Microcystin-LR در زیست‌توده همخوانی داشت که نشانگر نقش تغذیه‌ای فسفر در تحریک تولید

آسیب‌ها طی مراحل اولیه رشد یا در سلول‌های مادری ایجاد گردند، پیامدهای آن می‌تواند به صورت تأخیری و بین نسلی حتی با حذف مواجهه مستقیم با سم، ظاهر شود (Ortiz-Rodriguez *et al.*, 2012). بنابراین، اثرات بین نسلی Microcystin-LR حاصل بر هم‌کنش همزمان سمیت مستقیم، استرس اکسیداتیو، اختلال در متابولیسم انرژی و تغییرات اپی‌ژنتیک پایدار است که می‌توانند پایداری جمعیت‌های زئوپلانکتونی را در مقیاس زمانی طولانی تحت تاثیر قرار دهند.

نتایج این مطالعه نشان داد که شدت سمیت زیست‌توده سیانوباکتری *Anabaena sp.* بر زئوپلانکتون *D. magna* به طور مستقیم وابسته به دوز زیست‌توده و شرایط تغذیه‌ای فسفر است. افزایش غلظت زیست‌توده موجب تشدید مرگومیر در سمیت حاد و بروز اثرات زیرکشنده در سمیت مزمن، از جمله کاهش بقاء و اختلال در ویژگی‌های تولیدمثلی شد. اگرچه میزان تجمع سم Microcystin-LR در بافت زئوپلانکتون‌ها محدود بود، اما شواهد حاصل از آزمایش سمیت مزمن نشان داد که حتی مقادیر پایین سم نیز می‌تواند عملکرد زیستی و تولیدمثلی این موجودات را تحت تاثیر قرار دهد. از نظر زیست محیطی، نتایج تاکید می‌کند که افزایش ورودی فسفر به اکوسیستم‌های آبی با تقویت سمیت سیانوباکتری‌ها می‌تواند پویایی جمعیت‌های زئوپلانکتون و انتقال انرژی در زنجیره غذایی را مختل کند و پیامدهای نامطلوبی برای پایداری اکوسیستم‌های آب شیرین به‌همراه داشته باشد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مسئولان و کارکنان دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان برای فراهم نمودن امکانات آزمایشگاهی و همکاری‌های ارزشمند در اجرای آزمایش‌ها صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

Apel, K. and Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55:373–399. DOI:10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701

سیانوتوکسین‌ها و خطرات اکولوژیک مرتبط برای زئوپلانکتون‌هاست (Ger *et al.*, 2016). مطالعات پیشین نیز نشان داده‌اند که قرارگیری مزمن در برابر Microcystin باعث تجمع سم در دافنی‌ها، مهار فعالیت فسفاتازها و وابستگی شدت اثر به میزان انباشت در بافت‌های مختلف است (Wiegand and Pflugmacher, 2005; Chen *et al.*, 2005; Herrera *et al.*, 2015). تاثیرات درازمدت مواجهه با سیانوباکتری‌های سمی شامل کاهش نرخ بقاء و تولیدمثل، کاهش اندازه تخم‌ها و نوزادان و اختلال در چرخه زادآوری گزارش شده است (Dao *et al.*, 2017; Ferrão-Filho *et al.*, 2010). همچنین شواهد بین نسلی نشان می‌دهد که قرارگیری والدین در معرض Microcystin-LR می‌تواند موجب کاهش رشد، ضعیف دفاع آنتی‌اکسیدانی و تغییر در تحمل سم در نسل بعد شود (Ortiz-Rodríguez *et al.*, 2012). این اثرات احتمالاً از طریق مهار فسفاتازهای پروتئینی نوع ۱ و ۲ (PP1 و PP2A) و به‌دنبال آن اختلال در فسفوریلاسیون پروتئین‌ها، چرخه سلولی و رشد بروز می‌کند (Mackintosh *et al.*, 1990; Runnegar *et al.*, 1995). افزون بر آن، قرارگیری طولانی مدت می‌تواند تغییرات اپی‌ژنتیک پایداری (متیلاسیون DNA و تنظیم ژن‌های استرس و رشد)، ایجاد کند که بدون تغییر ژنتیکی، منجر به تغییر فنوتیپ نسل بعدی می‌شود (Head *et al.*, 2012).

تجمع زیستی Microcystin-LR در بافت‌های *D. magna* با اختلال در عملکرد میتوکندری و کاهش کارایی تولید ATP همراه است که منجر به بازتخصیص انرژی از مسیرهای رشد و تولیدمثل به مکانیسم‌های بقاء و ترمیم سلولی می‌شود (Ferrao-Filho and Kozlowsky, 2011; Suzuki, 2011; Chen *et al.*, 2016). این تغییرات متابولیک در نهایت موجب کاهش رشد و ضعف دفاع آنتی‌اکسیدانی به‌ویژه در نسل‌های بعدی می‌گردد. به‌علاوه، افزایش گونه‌های فعال اکسیژن ناشی از مواجهه با Microcystin موجب پراکسیداسیون لیپیدها، آسیب به پروتئین‌های ساختاری و تنظیمی و اختلال در مسیرهای رشد سلولی می‌شود (Apel and Hirt, 2004). اگر این

- Bownik, A., 2016.** Harmful algae: Effects of cyanobacterial cyclic peptides on aquatic invertebrates - a short review. *Toxicon*, 124:26–35.
DOI:10.1016/j.toxicon.2016.10.017
- Chen, W., Song, L., Ou, D. and Gan, N., 2005.** Chronic toxicity and responses of several important enzymes in *Daphnia magna* on exposure to sublethal microcystin-LR. *Environmental Toxicology*, 20(3):323–330.
DOI:10.1002/tox.20108
- Chen, L., Chen, J., Zhang, X. and Xie, P., 2016.** A review of reproductive toxicity of microcystins. *Journal of Hazard Materials*, 301:381–399.
DOI:10.1016/j.jhazmat.2015.08.041
- Dao, T.S., Do-Hong, L.C. and Wiegand, C., 2010.** Chronic effects of cyanobacterial toxins on *Daphnia magna* and their offspring. *Toxicon*, 55(7):1244–1254.
DOI:10.1016/j.toxicon.2010.01.014
- Davis, E.B., Tischer, R.G. and Brown, L.R., 1966.** Nitrogen fixation by the blue-green, *Anabaena flos aquae* A-37. *Physiologia Plantarum*, 19:823-826.
DOI:10.1111/j.1399-3054.1966
- Downing, J.A., Watson, S.B. and McKauley, E., 2001.** Predicting cyanobacteria dominance in lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 58(10):1905-1908. DOI:10.1139/f01-143
- Fan, L., Huang, J.J., Lo, C.Y., Zhou, B. and Fu, X., 2022.** Simplified validation of the ELISA kit determination of microcystins in surface water. *Water Science and Technology*, 85:900–913.
DOI:10.2166/wst.2021.640
- Ferrão-Filho, A.S., Azevedo, S.M.F.O. and DeMott, W.R., 2000.** Effects of toxic and non-toxic cyanobacteria on the life history of tropical and temperate cladocerans. *Freshwater Biology*, 45(1):1–19.
DOI:10.1046/j.1365-2427.2000.00613.x
- Ferrao-Filho, A.S., da Costa, S.M., Ribeiro, M.G.L. and Azevedo, S.M.F.O., 2008.** Effects of a saxitoxin-producer strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) on the swimming movements of cladocerans. *Environmental Toxicology*, 23(2):161–168.
DOI:10.1002/tox.20320
- Ferrao-Filho, A.D.S. and Kozlowsky-Suzuki, B., 2011.** Cyanotoxins: Bioaccumulation and effects on aquatic animals. *Marine Drugs*, 9(12):2729–2772.
DOI:10.3390/md9122729
- Ferrao-Filho, A.S., Herrera, N. and Echeverri, L.F., 2014.** Microcystin accumulation in cladocerans: First evidence of MC uptake from aqueous extracts of a natural bloom sample. *Toxicon*, 87:26–31.
DOI:10.1016/j.toxicon.2014.05.015
- Ferrão-Filho, A., de Abreu, S., Silva, D., de Oliveira, T.A., de Magalhães, V.F., Pflugmacher, S. and da Silva, E.M., 2017.** Single and combined effects of microcystin- and saxitoxin-producing cyanobacteria on the fitness and antioxidant defenses of cladocerans. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(10):2689-2697.
DOI:10.1002/etc.3819

- Ger, K.A., Urrutia-Cordero, P., Frost, P.C., Hanson, L.A., Sarnel, O., Wilson, A.E. and Lurling, M., 2016.** The interaction between cyanobacteria and zooplankton in a more eutrophic world. *Harmful Algae*, 54:128–144.
DOI:10.1016/j.hal.2015.12.005
- Gérard, C., Poullain, V., Lance, E., Acou, A. and Brient, L., 2009.** Influence of toxic cyanobacteria on community structure and feeding behaviour of zooplankton. *Freshwater Biology*, 54(1):236–246.
DOI:10.1016/j.envpol.2008.08.017
- Halstvedt, C.B., Rohrlack, T., Andersen, T., Skulberg, O. and Edvardsen, B., 2007.** Seasonal dynamics and depth distribution of *Planktothrix* spp. in lake Steinsfjorden (Norway) related to environmental factors. *Journal of Plankton Research*, 29:471–482.
DOI:10.1093/plankt/fbm036
- Head, J.A., Dolinoy, D.C. and Basu, N., 2012.** Epigenetics for ecotoxicologists. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 31(2):221–227.
DOI:10.1016/j.mrgentox.2013.08.008
- Herrera, A.N., Echeverri, L.F. and Ferrao-Filho, A.S., 2015.** Effects of phytoplankton extracts containing the toxin microcystin-LR on the survival and reproduction of cladocerans. *Toxicon*, 95:38–45.
DOI:10.1016/j.toxicon.2014.12.016
- Horst, G.P., Sarnelle, O., White, J.D., Hamilton, S.K., Kaul, R.B. and Bressie, J.D., 2014.** Nitrogen availability increases the toxin quota of a harmful cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*, *Water Research*. 54:188-198.
DOI:10.1016/j.watres.2014.01.063.
- Li, J., Li, R. and Li, J., 2017.** Current research scenario for microcystins biodegradation a review on fundamental knowledge, application prospects and challenges. *Science of the Total Environment*, 595(Suppl. C):615–632.
DOI:10.1016/j.scitotenv.2017.03.285
- Li, Z., An, L., Yan, F., Shen, W., Du, W. and Dai, R., 2023.** Evaluation of the effects of different phosphorus sources on *Microcystis aeruginosa* growth and microcystin production via transcriptomic surveys. *Water*, 15:1938. DOI:10.3390/w15101938
- Long, B.M., Jones, G.J. and Orr, P.T., 2001.** Cellular microcystin content in N-limitation *Microcystis aeruginosa* can be predicted from growth rate. *Applied and Environmental Microbiology Journal*, 67(1):278-83. DOI:10.1128/AEM.67.1.278-283.2001
- Mackintosh, C., Beattie, K.A., Klumpp, S., Cohen, P. and 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 Letters*, 264(2):187–192. DOI:10.1016/0014-5793(90)80245-e
- O’Neil, J.M., Davis, T.W., Burford, M.A. and Gobler, C.J., 2012.** The rise of harmful cyanobacteria blooms: the potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae*, 14:313–334.
DOI:10.1016/j.hal.2011.10.027

- Ortiz-Rodríguez, R., Dao, T.O. and Wiegand, C., 2012.** Transgenerational effects of microcystin-LR on *Daphnia magna*. *Journal of Experimental Biology*, 215(16):2795-805.
DOI:10.1242/jeb.069211
- Paerl, H.W. and Otten, T.G., 2013.** Harmful cyanobacterial blooms: causes, consequences, and controls. *Microbial Ecology*, 65:995–1010.
DOI:10.1007/s00248-012-0159-y
- Preece, E.P., Hardy, F.J., Moore, B.C. and Bryan, M., 2017.** A review of microcystin detections in estuarine and marine waters: environmental implications and human health risk. *Harmful Algae*. 61(Suppl. C):31–45. DOI:10.1016/j.hal.2016.11.006
- Qian, H.F., Pan, X.J., Chen, J., Zhou, D.M., Chen, Z.G., Zhang, L. and Fu, Z.W., 2012.** Analyses of gene expression and physiological changes in *Microcystis aeruginosa* reveal the phytotoxicities of three environmental pollutants. *Ecotoxicology*, 21:847–859.
DOI:10.1007/s10646-011-0845-4
- Rahman, M.Kh., Hossain, M.B., Majumdar, P.R., Mustafa, M.G., Noman, M.A., Albeshr, M.F., Bhat, E.A. and Arai, T., 2022.** Macrobenthic assemblages, distribution and functional guilds from a freshwater-dominated tropical estuary. *Diversity*, 14:1-15.
DOI:10.3390/d14060473
- Runnegar, M., Berndt, N. and Kaplowitz, N., 1995.** Microcystin uptake and inhibition of protein phosphatases: Effects of chemoprotectants and self-inhibition in relation to know hepatic transporters. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 134(2):264–272.
DOI:10.1006/taap.1995.1192
- Smutná, M., Babica, P., Jarque, S., Hilscherová, K., Maršálek, B., Haeba, M. and Bláha, L., 2014.** Acute, chronic and reproductive toxicity of complex cyanobacterial blooms in *Daphnia magna* and the role of microcystins. *Toxicon*, 79:11-18. DOI:10.1016/j.toxicon.2013.12.009
- Song, H., Coggins, L.X., Reichwaldt, E.S. and Ghadouani, A., 2015.** The importance of lake sediments as a pathway for microcystin dynamics in shallow eutrophic lakes. *Toxins Basel*, 7(3):900–918.
DOI:10.3390/toxins7030900
- Sotton, B., Guillard, J., Anneville, O., Marechal, M., Savichtcheva, O. and Domaizon, I., 2014.** Trophic transfer of microcystins through the lake pelagic food web: Evidence for the role of zooplankton as a vector in fish contamination. *Science of the Total Environment*, 466:152–163.
DOI:10.1016/j.scitotenv.2013.07.020
- Spoof, L. and Catherine, A., 2017.** Appendix 3 - tables of microcystins and nodularins. *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*. John Wiley & Sons, Ltd. Hoboken, NJ, USA. pp. 526–537.
DOI:10.1002/9781119068761.app3
- Stanier, R.Y., Kunisawa, R., Mandel, M. and Cohen-Bazire, G. 1971.** Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriological*

- Reviews*, 35:171–205.
DOI:10.1128/br.35.2.171-205.1971
- Valerio, E., Vasconcelos, V. and Campos, A., 2016.** New insights on the mode of action of microcystins in animal cells - a review. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 16(13):1032–1041.
DOI:10.2174/1389557516666160219130553
- Vézie, C., Rapala, J., Vaitomaa, J., Seitsonen, J. and Sivonen, K., 2002.** Effect of nitrogen and phosphorus on growth of toxic and nontoxic *Microcystis* strains and on intracellular microcystin concentrations. *Microbial Ecology*, 43(4):443–454.
DOI:10.1007/s00248-001-0041-9
- Vilar, M.C.P., de Araújo-Castro, C.M.V. and Moura, A.N., 2014.** Acute toxicity of *Microcystis* spp. (Cyanobacteria) bloom on *Moina minuta* (Cladocera) in a tropical reservoir, Northeastern Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 9(1):93–98.
DOI:10.5132/eec.2014.01.012
- Wang, X., Qin, B., Gao, G. and Paerl, H.W., 2010.** Nutrient enrichment and selective predation by zooplankton promote *Microcystis* (Cyanobacteria) bloom formation. *Journal of Plankton Research*, 32:457–470. DOI:10.1093/plankt/fbp143
- Welker, M. and Döhren, H., 2006.** Cyanobacterial peptides - nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*, 30:530–563.
DOI:10.1111/j.1574-6976.2006.00022.x
- Wiegand, C. and Pflugmacher, S., 2005.** Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites, a short review. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203:201–218.
DOI:10.1016/j.taap.2004.11.002
- World Health Organization (WHO), 2020.** Cyanobacterial toxins: Microcystins. Guidelines for drinking-water quality. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 63P.
- Xue, Q., Su, X., Steinman, A.D., Cai, Y., Zhao, Y. and Xie, L., 2016.** Accumulation of microcystins in a dominant Chironomid larvae (*Tanytus chinensis*) of a large, shallow and eutrophic Chinese lake, lake Taihu. *Scientific Reports*, 6:31097.
DOI:10.1038/srep31097
- Zhu, X., Kong, H., Gao, Y., Wu, M. and Kong, F., 2012.** Low concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons promote the growth of *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Hazardous Materials*, 237-238:371–375.
DOI:10.1016/j.jhazmat.2012.08.029