

DAPHNIAS spp. COMO ORGANISMOS BIOINDICADORES DE TOXICIDADE E CARACTERIZAÇÃO AMBIENTAL DE SISTEMAS AQUÁTICOS EUTROFIZADOS

Maria Virgínia da Conceição Albuquerque¹
Roberta Milena Moura Rodrigues²
Josivaldo Rodrigues Sátiro³
André Luiz Muniz Brito⁴
Wilton Silva Lopes⁵

RESUMO

Este artigo apresenta uma revisão sobre a avaliação da ecotoxicidade como ferramenta de caracterização ambiental em sistemas aquáticos eutrofizados utilizando como organismos bioindicadores a *Daphnias* spp. Utilizou-se como metodologia, a revisão de literatura de cunho qualitativo descritivo, que possibilitou um aprofundamento sobre o tema proposto. Diversas pesquisas apontaram que as cianotoxinas avaliadas causam inibição da atividade alimentar, diminuição no crescimento, baixo índice de reprodução, má formação de filhotes, diminuição do tempo de vida, estresse oxidativo e aumento da tolerância às toxinas ao longo de gerações de *Daphnias* spp. As análises de toxicidade aguda e crônica em *Daphnias* spp. apresentaram diferentes efeitos tóxicos, pois os resultados dependeram da cepa testada. Alguns fatores são atribuídos à toxicidade de extratos de cianobactérias em organismos zooplancctônicos, principalmente, a inadequação nutricional, diminuição da atividade de filtração, inibição de enzimas digestivas, bioacumulação e estresse oxidativo.

Palavras-chave: Ecotoxicidade, Cianobactérias, Cianotoxinas, Microcrustáceo.

INTRODUÇÃO

Há algumas décadas a avaliação dos efluentes in natura ou da água já tratada vindo sendo descrita e recomendada por métodos padrões de várias entidades internacionais como a Organização Internacional de Normalização (ISO), a Organização

¹ Doutoranda em Engenharia Ambiental pela Universidade Estadual da Paraíba - UEPB, virginia.albuquerque@yahoo.com.br;

² Doutoranda em Engenharia Ambiental pela Universidade Estadual da Paraíba - UEPB, robertamilenarm@gmail.com;

³ Doutorando em Engenharia Civil da Universidade da Beira Interior (UBI), Portugal, josivaldosatiro@gmail.com;

⁴ Mestrando em Ciência e Tecnologia Ambiental pela Universidade Estadual da Paraíba – UEPB, andre.brito@aluno.uepb.edu.br;

⁵ Prof. Doutor do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - UEPB, wiltonuepb@gmail.com.

de Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), a Agência de proteção ambiental dos EUA (USEPA), dentre outras organizações de proteção ambiental. Entre os métodos utilizados estão os ensaios ecotoxicológicos que são bem analisados e em muitos países eles são uma ferramenta padrão para caracterizar a qualidade do efluente (POWER e BOUMPHREY, 2004).

A cronologia das pesquisas ecotoxicológicas no Brasil tem seus primórdios no trabalho de Rocha et al. (1971) descritos no relatório da FESB-CETESB (1971); quando estes autores iniciaram o desenvolvimento de testes de toxicidade, utilizando a tilápia, com um efluente de uma indústria na região do rio Atibaia (SP). Já em termos metodológicos, foi a partir de 1975 que se deu o desenvolvimento e a adaptação de vários métodos de ensaios de toxicidade aguda e crônica, de curta duração, utilizando outros grupos e espécies de organismos, dentre os quais estão presente as algas, os microcrustáceos e os peixes de águas continentais e marinhas, além de testes com sedimentos, para avaliação da poluição hídrica. Em 1987 à Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT, por meio dos trabalhos desenvolvidos pelo GT02 (Grupo de Toxicidade) da Comissão Técnica de Qualidade das Águas, começa a publicar suas primeiras normas relativas a testes ecotoxicológicos com organismos aquáticos.

Uma das limitações encontradas para o emprego de organismos vivos como indicadores de toxicidade é a diferença de sensibilidades apresentada pelos organismos frente aos compostos químicos ou efluentes. Alguns esforços têm sido feitos com o objetivo de encontrar uma espécie de organismo que seja sensível a todos ou a maior parte dos compostos químicos. Porém, diversos estudos têm mostrado a diferença entre as respostas de toxicidade obtidas para um mesmo composto sobre organismos de espécies diferentes.

O estudo ecotoxicológico é uma ferramenta para a determinação de efeitos deletérios de agentes químicos sobre o meio ambiente, possibilitando a verificação das características ecotoxicológicas de substâncias químicas, mecanismos de ação sobre organismos vivos, definição de diretrizes para controle da qualidade de efluentes e avaliação da eficiência de processos de tratamento (RIZZO, 2011). Diante disso, este estudo apresenta uma revisão sobre a avaliação da ecotoxicidade como ferramenta de

caracterização ambiental em sistemas aquáticos eutrofizados utilizando como organismos bioindicadores a *Daphnias* spp.

METODOLOGIA

Neste estudo utilizou-se como metodologia, a revisão de literatura de cunho qualitativo descritivo, que possibilitou um aprofundamento sobre o tema proposto. Pautando-se em publicações contidas em livros, jornais e revistas nacionais e internacionais, direcionados a área científica e acadêmica, sendo realizada uma busca bibliográfica por meio das seguintes bases de dados: Web of Science, Scopus, Google Acadêmico e na biblioteca eletrônica Scientific Electronic Library Online (SciELO). As palavras chaves utilizadas para esta busca, foram: “*Daphia* spp.”, “ecotoxicidade” e “cianobactérias”, publicadas no período de 1990 a 2021.

REFERENCIAL TEÓRICO

A ecotoxicologia é uma vertente da toxicologia e diferencia-se desta no sentido de que integra os conceitos de ecologia aos estudos de toxicidade, ou seja, é a ciência que estuda os efeitos adversos das substâncias naturais ou sintéticas e efluentes sobre os organismos vivos, quando liberadas no meio ambiente. Os testes de toxicidade diferem principalmente quanto ao tempo de exposição do organismo teste ao agente ou substância a ser testada. Os testes de toxicidade aguda têm por objetivo mensurar a capacidade de determinadas substâncias químicas ou amostras ambientais, de causar efeitos deletérios sobre os organismos teste, durante um curto período de tempo (24 a 96 h) em relação ao período de vida do organismo-teste. Geralmente, o efeito medido nesse tipo de teste é a letalidade ou alguma outra manifestação do organismo que a antecedeu, como a imobilidade. Os resultados são avaliados através da Concentração Letal Mediana (CL₅₀), que corresponde a concentração da substância tóxica responsável por provocar a mortalidade de 50% dos organismos teste; ou através da Concentração Efetiva Mediana (CE₅₀), relacionada a concentração da substância que causa imobilidade a 50% dos organismos teste (BRASIL, 2011).

O efeito adverso da exposição dos organismos teste a concentrações subletais, são observados em testes de toxicidade crônica, ou seja, avaliam as concentrações que permitem a sobrevivência dos organismos, mas que afetam suas funções biológicas

(reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento e maturação) são avaliados por um período que pode abranger parte ou todo o ciclo de vida do organismo teste (WIECZERZAK, NAMIEŚNIK, KUDŁAK, 2016). Nestes testes, os resultados são expressos em Concentração de Efeito Não Observado (CENO), que corresponde a maior concentração da substância tóxica, que não causa efeito deletério estatisticamente significativo na sobrevivência e reprodução dos organismos nas condições de teste; e Concentração de Efeito Observado (CEO) que está relacionada a menor concentração nominal do agente tóxico, que causa efeito deletério (BRASIL, 2011).

No Brasil existem poucas leis referentes à toxicidade. Pode-se citar a Resolução CONAMA 430/2011 e a Lei Federal de Recursos Hídricos 9.433/97 como as mais importantes referências legais para controle de toxicidade no País.

A Lei Federal de Recursos Hídricos 9.433/97, que institui a Política Nacional de Recursos Hídricos e cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos, descreve em seu Art. 21: “Na fixação dos valores a serem cobrados pelo uso dos recursos hídricos devem ser observados, nos lançamentos de esgotos e demais resíduos líquidos ou gasosos, o volume lançado e seu regime de variação e as características físico-químicas, biológicas e de toxicidade do afluente” (BRASIL, 1997).

A Resolução CONAMA 430/2011 dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes (BRASIL, 2011). Nesta Resolução os seguintes artigos descrevem sobre toxicidade:

- Art. 7º, parágrafo único: “Eventuais interações entre substâncias, especificadas ou não nesta Resolução, não poderão conferir às águas características capazes de causar efeitos letais ou alteração de comportamento, reprodução ou fisiologia da vida”.

- Art. 8º, em seu § 1º “Também deverão ser monitorados os parâmetros para os quais haja suspeita da sua presença ou não conformidade”. No § 3º “A qualidade dos ambientes aquáticos poderá ser avaliada por indicadores biológicos, quando apropriado, utilizando-se organismos e/ou comunidades aquáticas”. E no § 4º “As possíveis interações entre as substâncias e a presença de contaminantes não listados nesta Resolução, passíveis de causar danos aos seres vivos, deverão ser investigadas

utilizando-se ensaios ecotoxicológicos, toxicológicos, ou outros métodos cientificamente reconhecidos”.

- Art. 34º em seus parágrafos 1º e 2º dispõe:

§ 1º O efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor, de acordo com os critérios de toxicidade estabelecidos pelo órgão ambiental competente.

§ 2º Os critérios de toxicidade previstos no § 1º devem se basear em resultados de ensaios ecotoxicológicos padronizados, utilizando organismos aquáticos, e realizados no efluente.

A ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) é uma das agências que elabora as normas de testes ecotoxicológicos, padronizando assim esses ensaios com organismos testes a serem utilizados, baseando-se nos conhecimentos adquiridos pelos pesquisadores desta, em relação às agências mais tradicionais, e, adaptando tais ensaios às nossas necessidades. Para avaliar a toxicidade de agentes químicos, é necessário realizar ensaios toxicológicos com organismos representativos de diferentes níveis tróficos. O conhecimento da toxicidade de substâncias tóxicas em diferentes organismos, possibilita estabelecer limites permissíveis destas substâncias para a proteção da vida e avalia o impacto que estes poluentes causam, permitindo estabelecer e avaliar critérios e padrões de qualidade das águas (ARAGÃO e ARAÚJO, 2006). Nos estudos do efeito agudo de produtos potencialmente tóxicos ao meio ambiente e aos seres humanos, são utilizados organismos-teste como peixes, microcrustáceos e microalgas, por serem sensíveis e representarem diferentes níveis tróficos (MATIAS, 2005).

Daphnia spp (Straus, 1820) é classificada taxonomicamente no filo Arthropoda, subfilo Crustacea, classe Branchiopoda, ordem Diplostraca, subordem Cladocera e família Daphnidae, apresentando larga distribuição no hemisfério norte e ocupam uma importante posição nas cadeias alimentares aquáticas (Ruppert e Barnes, 1996). Segundo estes mesmos autores, o nome Branchiopoda caracteriza a classe que possui coxas providas de epípodos achatados que servem como brânquias. Este zooplâncton da ordem Diplostraca mede cerca de 5 a 6 mm, apresenta a cabeça livre e o tronco fechado dentro de uma carapaça bivalve que termina posteriormente em um espinho apical. A

extremidade da ponta do tronco, o pós-abdômen, vira-se ventralmente e para frente, portando apresentam garras e espinhos especiais para limpeza da carapaça. (NBR 12.713/2016).

Considerados consumidores primários em um ecossistema aquático, estes organismos se alimentam de partículas em suspensão e fitoplâncton. A nutrição se dá pela captura das partículas em suspensão através da atração das cargas opostas das partículas e a superfície de um filtro. Este filtro é composto por cerdas finas dos apêndices do tronco e coleta partículas da corrente hídrica, transferindo-as para o sulco alimentar meio-ventral, e posteriormente para a boca. A excreção é realizada por glândulas, e justamente por isso, são os primeiros seres afetados pelas toxinas produzidas por cianobactérias, sofrem efeitos de bioacumulação, diminuição da filtragem de alimentos, que pode causar mortalidade ou consequências ao longo de gerações.

O seu desenvolvimento compreende quatro fases: ovo, juvenil, adolescente e adulto, no qual possuem uma expectativa de vida média de 60 dias. No estágio inicial do desenvolvimento, é possível observar a existência de uma estrutura – náuplio –, na qual as larvas se encontram protegidas no interior do ovo. Após sua eclosão, dá-se origem aos juvenis, morfologicamente idênticos aos adultos, que serão libertados cerca de dois dias após este acontecimento. A ausência de estágios larvais externos e a produção de juvenis idênticos aos adultos indica que se trata de um desenvolvimento direto (COVICH; THORP; ROGERS, 2010). Em geral, o ciclo de vida aumenta com o decréscimo da temperatura, em função da diminuição da atividade metabólica.

As espécies de *Daphnias* podem reproduzir-se tanto assexuadamente – sob condições ambientais favoráveis, uma fêmea pode dar origem a fêmeas juvenis geneticamente idênticas à progenitora (reprodução por partenogênese) ou, quando expostas a condições ambientais adversas (diminuição do nível da água, superpopulação, baixas temperaturas, entre outros), as fêmeas podem produzir machos – quanto sexuadamente: na presença de machos, algumas fêmeas produzem ovos sexuados (que sofreram meiose) que podem ser fecundados. Os ovos fecundados não se desenvolvem. Estes ovos são envoltos por uma membrana protetora, formando uma estrutura em forma de “rissol” denominada *ephippium* (ANTUNES E CASTRO, 2017).

Considerada uma espécie bioindicadora de toxicidade, o gênero *Daphnia* é a mais empregada em ensaios ecotoxicológicos para uma variada gama de compostos, bem como devido à sua importância ecológica, disponibilidade e facilidade para manejo em laboratório. Testes com *Daphnia sp.* são normalizados e padronizados internacionalmente pela OECD (Teste nº 202: *Daphnia sp.* Acute Immobilization Test, 2004) e pela ISO (ISO 6341:2012 - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia sp.* Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test) e no Brasil pela NBR 12.713 (ABNT, 2016).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diversas pesquisas apontam que as microcistinas causam inibição da atividade alimentar, diminuição no crescimento, baixo índice de reprodução, má formação de filhotes, diminuição do tempo de vida, estresse oxidativo e aumento da tolerância às toxinas ao longo de gerações de *Daphnia spp.* (DAO; DO-HONG; WIEGAND, 2010; RODRIGUÉZ; DAO; WIEGAND, 2012).

Segundo revelam Ferrão-Filho, Herrera e Echeverri (2014), a bioacumulação de microcistinas em animais aquáticos ocorre através de duas principais rotas: o consumo das células bacterianas durante as florações e a ingestão de água contaminada pelas toxinas dissolvidas. Em sua pesquisa, os autores utilizaram três espécies de cladóceros: *Moina micrura*, *Daphnia laevis* e *Daphnia similis*, os quais foram expostos por 96 horas a extratos aquosos de matéria liofilizada de florações em diferentes concentrações. Os resultados mostraram que a captação de microcistinas pelos zooplâncton foram diretamente proporcionais as concentrações dos extratos aquosos, mostrando, portanto, que a ingestão de água contaminada a partir da dissolução da toxina é também um fator determinante para bioacumulação. Este estudo mostrou, que a captação de microcistina da fração dissolvida por zooplâncton é possível, não apenas a partir da ingestão dessas cianotoxinas ou ligado a células.

Kosiba et al. (2018) em seu estudo buscou responder a hipótese do efeito das microcistinas dissolvidas se seria mais evidente em reservatórios e lagoas artificiais do que em águas naturais. No estudo, as concentrações de microcistinas dissolvidas nas

águas estudadas variaram de 0,07 a 0,81 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Os autores mostraram que as lagoas artificiais estavam mais sujeitas a florações de cianobactérias. Os zooplânctons presentes em lagoas artificiais foram expostos as concentrações significativamente mais altas de microcistinas dissolvidas do que as dos lagos naturais. Usando uma regressão do modelo linear geral (GLM), o estudo ainda identificou uma relação significativa entre microcistinas dissolvidas sobre a densidade, biomassa e riqueza de determinados grupos zooplanctônicos (ciliados, rotíferos, cladoceros, copépodes), os quais foram significativamente menores nas lagoas artificiais do que nos lagos naturais. O impacto das microcistinas e o tempo que elas permaneceram na água causaram alteração estrutural do fitoplâncton.

Ortiz-Rodriguez et al. (2018) avaliaram os efeitos agudos relacionados ao tempo de exposição da MC-LR em *D. magna* na biotransformação de suas enzimas antioxidantes (glutathione S-transferase, GST e catalase, CAT), subsequente peroxidação lipídica, no lactato e na enzima lactato desidrogenase (LDH). Neonatos *D. magna* (<3 dias) e adultos jovens (7 dias) foram expostos a concentrações crescentes de MC-LR (até 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$) por 24 e 48 h. As atividades de sGST em *D. magna* foram realizadas para ambas as idades, porém em adultos, foram aumentadas as concentrações de MC-LR. Foi verificado que as atividades metabólicas de *D. magna* foram diminuídas em exposições de concentrações mais altas de MC-LR, sugerindo menor capacidade de biotransformar a cianotoxina. A proteção oxidativa foi mais eficiente em neonatos, onde a TAC foi fortemente elevada e contribuiu para amortecer o estresse oxidativo, evidenciado pelas constantes concentrações de TBARS. A lactato desidrogenase LDH foi afetada negativamente em neonatos e adultos pela exposição de todas as concentrações utilizadas de MC-LR, levando as baixas concentrações constantes (LDH). Como esta enzima está envolvida na produção de energia rapidamente necessária, os resultados sugerem um comprometimento energético devido à presença de MC-LR.

Comparando a sobrevivência de *Brachionus calyciflorus* Pallas (Rotifera) e *Daphnia pulex* Leyding (Cladocera) expostos a microcistina pura (MC-LR), anatoxina-a (ANTX) e cinco extratos obtidos de cianobactérias *Microcystis*, *Planktothrix* e *Dolichospermus spp*, Pawlik-Skowrońska e colaboradores 2019 obtiveram resultados relevantes a diferentes respostas dos organismos zooplanctônicos a altas concentrações de MC-LR pura, ANTX e extratos complexos de cianobactérias. A toxicidade dos

extratos para os invertebrados foi maior que a exercida pelas cianotoxinas puras e dependia da composição dos metabólitos das cianobactérias: *Microcystis spp.* O extrato contendo anabaenopeptinas A e B, aeruginosamida, quatro variantes de cianopectolinas e cinco MCs não foram tóxicas para nenhum dos organismos, enquanto o extrato de *Planktothrix agardhii* (I), contendo anabaenopeptinas A, B, F, 915, oscililida Y, cinco diferentes aeruginosinas e quatro variantes de MC foram mais tóxicas para os *Daphnia* do que para os rotíferos. Isso sugere fortemente que os oligopeptídeos não ribossômicos e as MCs tiveram uma contribuição essencial para a toxicidade e seus efeitos em espécies ou populações específicas podem variar dependendo do perfil metabólico secundário das cianobactérias.

Investigando as reações fisiológicas de microcistina – LR produzida por *Microcystis aeruginosa* (PCC7806) em *Daphnia magna*, Savic et al. (2020) testaram as seguintes hipóteses: a) a presença de *D. magna* afetará negativamente o crescimento, aumentará a resposta ao estresse e a produção de metabólitos em *Microcystis aeruginosa*. b) A presença de *Microcystis aeruginosa* afetará negativamente as respostas fisiológicas e as características de vida em *D. magna*. Para testar estas hipóteses, os experimentos foram conduzidos em uma câmara de co-cultura especialmente projetada que permitiu a troca dos metabólitos sem contato direto. Um claro impacto foi evidenciado, uma vez que os metabólitos cianobacterianos reduziram a sobrevivência de *D. magna* e diminuíram a atividade da enzima de estresse oxidativo. Simultaneamente, a presença de *D. magna* não afetou a atividade fotossintética da cianobactéria. No entanto, houve diminuição da densidade celular, sugerindo possível alocação de energia para enzimas anti-oxidativas do estresse ou outros mecanismos de proteção contra os produtos químicos da *Daphnia*. A concentração elevada de microcistina-LR intracelular e extracelular, bem como concentrações intracelulares de aeruciclâmida A e D na presença de *Daphnia*, indicaram uma potencial função protetora.

Em estudo realizado por Shahmohamadloo et al. (2019) foram investigadas alterações da reprodução, crescimento e sobrevivência de *Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia magna* e *Hexagenia* cultivadas em laboratórios expostos a microcistinas através de uma série de bioensaios de ciclo de vida. Os organismos foram expostos a um gradiente de concentração variando de 0,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ a 300 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistinas, o que corresponde

aos valores normalmente encontrados em águas doces durante o processo de floração. As concentrações letais em *C. dubia* ($CL_{50} = 5,53 \mu\text{g.L}^{-1}$) e *D. magna* ($LC_{50} = 85,72 \mu\text{g.L}^{-1}$) expostas a microcistinas estavam entre as mais baixas registradas até o momento, e efeitos reprodutivos foram observados em concentrações tão baixas quanto $2,5 \mu\text{g.L}^{-1}$. O comprimento de *D. magna* foi significativamente afetado em tratamentos com concentrações de microcistina superiores a $2,5 \mu\text{g.L}^{-1}$. Todavia, não foi observada letalidade ou comprometimento do crescimento em *Hexagenia*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos avaliados apontaram que as cianotoxinas causam inibição da atividade alimentar, diminuição no crescimento, baixo índice de reprodução, má formação de filhotes, diminuição do tempo de vida, estresse oxidativo e aumento da tolerância às toxinas ao longo de gerações de *Daphnia sp.* As análises de toxicidade aguda em *Daphnia sp.* apresentaram diferentes efeitos tóxicos, pois os resultados dependeram da cepa testada. Alguns fatores são atribuídos à toxicidade de extratos de cianobactérias em organismos zooplancctônicos, principalmente, a inadequação nutricional, diminuição da atividade de filtração, inibição de enzimas digestivas, bioacumulação e estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

- ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12.713: **Ecotoxicologia aquática: toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera)**. Rio de Janeiro, 2016.
- ANTUNES, S C; CASTRO, B B. Pulgas-de-água (*Daphnia ssp.*). **Revista de ciência elementar**. 2017.
- ARAGÃO, M. A.; DOMINGUES, D. F.; BURATINI, S. V. & ARAUJO, R. P. A. Avaliação ecotoxicológica do reservatório do Guarapiranga, SP, com ênfase à problemática das algas tóxicas e algicidas. In: Congresso Latino-Americano de Ficologia, **Anais do Congresso Latino-Americano de Ficologia**, São Paulo, SP, pp. 63-81, 2006.
- BRASIL. **Resolução nº 430/ 2011 do CONAMA**. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março

de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente–CONAMA. Brasília –DF: CONAMA, 13 de maio de 2011.

COVICH, A P; THORP, J H; ROGERS, D C. Introduction to the Subphylum Crustacea. in Thorp, J H; Covich, A P. (org). Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates (3ª Ed.). 2010.

DAO, T. S. et al. Chronic effects of cyanobacterial toxins on *Daphnia magna* and their offspring. **Toxicon**, v. 55, p. 1244 – 1254. 2010.

FERRÃO-FILHO, A.S; COSTA, S. M.; RIBEIRO, A.D. Biomonitoring of cyanotoxins in two tropical reservoirs by cladocera toxicity bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*.

ORTIZ-RODRÍGUEZ, R., & WIEGAND, C. (2010). Age related acute effects of microcystin-LR on *Daphnia magna* biotransformation and oxidative stress. **Toxicon**, 56(8), 1342–1349. doi:10.1016/j.toxicon.2010.07.020

PAWLIK-SKOWROŃSKA, B., TOPOROWSKA, M., & MAZUR-MARZEC, H. (2019). Effects of secondary metabolites produced by different cyanobacterial populations on the freshwater zooplankters *Brachionus calyciflorus* and *Daphnia pulex*. **Environmental Science and Pollution Research**. doi:10.1007/s11356-019-04543.

POWER, E.A.; BOUMPHREY, R.S. *Ecotoxicology, International Trends in Bioassay Use for Effluent Management*, 13, 377–398, 2004.

RIZZO, L. Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation process in water and wastewater treatment. **Water Research**, v. 45, p. 4311-4340, 2011.

SAVIC, B. G., BORMANS, M., EDWARDS, C., LAWTON, L., BRIAND, E., & WIEGAND, C. Cross talk: Two way allelopathic interactions between toxic *Microcystis* and *Daphnia*. **Harmful Algae**, 94, 2020. 101803. doi:10.1016/j.hal.2020.101803.

SHAHMOHAMADLOO, R. S., POIRIER, D. G., ORTIZ ALMIRALL, X., BHAVSAR, S. P., & SIBLEY, P. K. (2019). Assessing the toxicity of cell-bound microcystins on freshwater pelagic and benthic invertebrates. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 109945. doi:10.1016/j.ecoenv.2019.109945

WIECZERZAK, M.; NAMIESNIK, J.; KUDLAK, B. Bioassays as one of the Green Chemistry tools for assessing environmental quality: A review. **Environment International**, v. 94, p. 341-361, 2016.