

Robert Hanczaruk

Uniwersytet Śląski w Katowicach
e-mail: roberthanczaruk@gmail.com

BIOINDYKACJA ZANIECZYSZCZEŃ WÓD POWIERZCHNIOWYCH Z ZASTOSOWANIEM MIKROBIOTESTU DAPHTOKIT

BIOINDICATION OF SURFACE WATER CONTAMINATION USING DAPHTOKIT MICROBIOTEST

DOI: 10.15611/pn.2017.494.04

JEL Classification: Q25, Q53

Streszczenie: W biomonitoringu ekosystemów wodnych szerokie zastosowanie znajdują mikrobiotesty toksyczności ostrej. Przykładem mikrobiotestu zgodnego z wytycznymi OECD Guideline 202 i ISO 6341 jest Daphtoxkit F magna. Skorupiaki *Daphnia magna* występują powszechnie w biocenozach słodkowodnych, są wrażliwe na szeroki zakres zanieczyszczeń środowiskowych i odgrywają ważną rolę w łańcuchu pokarmowym. Celem badań była ocena przydatności *Daphnia magna* w bioindykacji zanieczyszczeń wód powierzchniowych związkami kadmu. Badania wykazały wysoką wrażliwość *Daphnia magna* na chlorek kadmu (48h-LC₅₀ = 0,77 mg/l). Wartości stężeń letalnych świadczą również o bardzo wysokiej ostrej toksyczności chlorku kadmu (48h-TU = 130,30). Wyniki badań wskazują na konieczność regularnego monitoringu zanieczyszczeń ekosystemów wodnych związkami kadmu i przydatność *Daphnia magna* w badaniach bioindykacyjnych.

Słowa kluczowe: bioindykacja, wody powierzchniowe, metale ciężkie, mikrobiotest, toksyczność ostra, *Daphnia magna*.

Summary: Acute toxicity bioassays are widely used in the biomonitoring of aquatic ecosystems. An example of bioassay, conforming to OECD Guideline 202 and ISO 6341 is Daphtoxkit F magna. Crustaceans *Daphnia magna* are common in freshwater biocenoses, characterized by sensitivity to a wide range of environmental contamination and play an important role in food chain. The aim of the study was to evaluate the usefulness of *Daphnia magna* in the bioindication of cadmium compounds in the surface water. The results show high sensitivity of *Daphnia magna* to cadmium chloride (48h-LC₅₀ = 0.77 mg/l). Values of lethal concentration indicate also the very high acute toxicity of cadmium chloride (48h-TU = 130.30). The results of the study pointed to the necessity of regular monitoring of cadmium compounds in aquatic ecosystems and the usefulness of *Daphnia magna* in their bioindication.

Keywords: bioindication, surface water, heavy metals, mikrobiotest, acute toxicity, *Daphnia magna*.

1. Wstęp

Konsekwencją coraz szybszego postępu cywilizacyjnego, urbanizacji, industrializacji, rozwoju rolnictwa i transportu jest wzrost koncentracji metali ciężkich w wodach powierzchniowych [Piontek i in. 2014, s. 71; Romanowska-Duda 2015, s. 14; Hua i in. 2016, s. 1530]. Akumulowane przez organizmy zooplanktonowe jony metali w wyniku procesu biomagnifikacji mogą się przemieszczać na wyższe ogniwa łańcucha troficznego, stanowiąc realne zagrożenie dla zdrowia człowieka [Kaniuczak, Augustyn 2011, s. 34; Łuszczek-Trojnar i in. 2011]. Do najbardziej toksycznych, szeroko rozpowszechnionych w środowisku wodnym zanieczyszczeń należą związki kadmu. Biomagnifikacja kadmu może wywoływać niekorzystne zmiany w organizmie człowieka, objawiające się zaburzeniami w pracy nerek, wątroby i innych organów, upośledzeniem funkcji rozrodczych, deformacją kości oraz powstaniem zmian nowotworowych [Czeczot, Majewska 2010, s. 73-76].

Potrzeba dokładniejszego poznania mechanizmów i skutków oddziaływania substancji toksycznych na organizmy żywe sprawia, iż w ocenie jakości wód, obok standardowo stosowanych metod fizyczno-chemicznych coraz większe znaczenie zyskują techniki bioindykacyjne [Romanowska-Duda 2015, s. 14; Szczerbińska, Gałczyńska 2015, s. 185]. Ważnym narzędziem nowoczesnego biomonitoringu są mikrobiotesty toksyczności ostrej. Ich zaletą jest stosunkowo niski koszt wykonania analiz oraz krótki czas i powtarzalność odpowiedzi badanych organizmów [Kuczyńska i in. 2003, s. 694]. Biotesty umożliwiają ocenę oddziaływania badanej substancji na organizmy doświadczalne w krótkim (do 96 godzin) czasie ekspozycji. Wyznaczana jest wartość stężenia letalnego (*lethal concentration*, LC_{50}), powodującego 50% śmiertelności organizmów testowych [Traczewska 2011, s. 28-33]. Jednym z najpopularniejszych obecnie w skali globalnej mikrobiotestów jest Daphtoxkit F magna, zgodny z wytycznymi OECD Guideline 202 oraz ISO 6341. Wykorzystywane w teście skorupiaki *Daphnia magna* są organizmem modelowym w badaniach toksykologicznych związków chemicznych i monitoringu stanu wód powierzchniowych. Rozwielitki są szeroko rozpowszechnione w biocenozach słodkowodnych na całym świecie i charakteryzują się wysoką wrażliwością na szeroką gamę zanieczyszczeń środowiskowych. Jako źródło pokarmu dla większych bezkręgowców wodnych i ryb odgrywają istotną rolę w sieci troficznej. Niewielkie rozmiary, krótki cykl życiowy oraz wysokie zdolności reprodukcyjne sprawiają, że rozwielitki są łatwe w hodowli w warunkach laboratoryjnych. Dobrze poznana biologia gatunku, opisana w licznych publikacjach i doniesieniach naukowych, pozwala natomiast na właściwą interpretację wyników badań [Persoone i in. 2009, s. 5; Seda, Petrussek 2011, s. 337; Siciliano i in. 2015, s. 1; Vu Le i in. 2016, s. 2].

Celem badań prezentowanych w niniejszym artykule była ocena przydatności skorupiaków *Daphnia magna* w bioindykacji zanieczyszczeń wód powierzchniowych związkami kadmu.

2. Materiał i metody

W badaniu toksyczności ostrej chlorku kadmu wykorzystano mikrobiotest Daphtoxkit F magna. Przyjęto metodykę przedstawioną w instrukcji producenta testu [Tigret 2011]. Pożywkę hodowlaną – wodny roztwór NaHCO_3 , CaCl_2 , MgSO_4 i KCl w celu właściwego nasycenia tlenem napowietrzano przez okres 20 minut. Na szalkę z pożywką wprowadzono effipia *Daphnia magna*. Szalkę inkubowano przez okres 72 godzin w temperaturze 21°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$) i przy stałym oświetleniu 6000 luksów. Wykonano serię rozcieńczeń wyjściowego roztworu chlorku kadmu w stosunku 1:1 w pożywkę hodowlaną, uzyskując stężenia CdCl_2 w zakresie 0,625-20 mg/l. W celu zapewnienia rezerwy energetycznej organizmom testowym zastosowano karmienie proszkiem Spirulina. Dołki płytki testowej napełniono w kolejności wzrastających stężeń roztworu chlorku kadmu do objętości 10 ml. Do każdego dołka wprowadzono po 10 osobników *Daphnia magna*. Tak przygotowaną płytkę testową przykryto parafilmem i inkubowano w ciemności w temperaturze 21°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$). Po 24 i 48 godzinach inkubacji odnotowano liczbę martwych organizmów testowych. Wartości stężeń letalnych (LC_{50}) wyznaczono, stosując metodę interpretacji graficznej. Wykresy sporządzono w skali logarytmicznej [Litchfield, Wilcoxon 1949, s. 99-113]. Wartości LC_{50} przeliczono na jednostki toksyczności (TU) według poniższego wzoru:

$$TU = \frac{1}{\text{LC}_{50}} \times 100,$$

W ocenie stopnia toksyczności chlorku kadmu względem skorupiaków *Daphnia magna* posłużono się klasyfikacją zaproponowaną przez Persoone i in. [2003, s. 399; tab. 1].

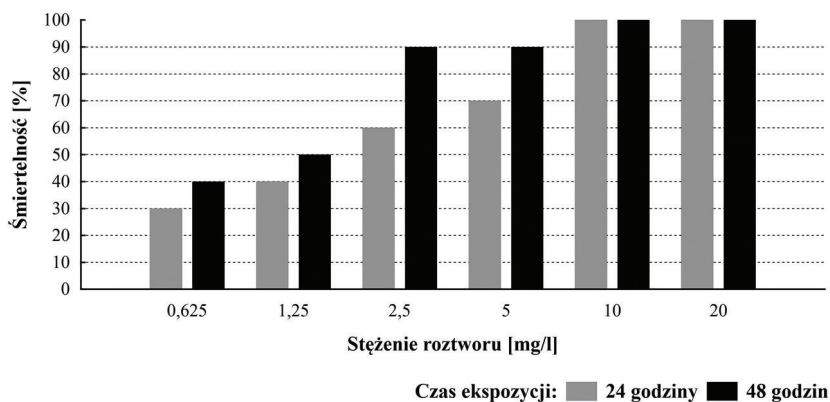
Tabela 1. System klasyfikacji toksyczności substancji

Jednostki toksyczności [TU]	Klasa toksyczności	Toksyczność
<0,4	I	brak ostrej toksyczności
0,4-1	II	mała ostra toksyczność
1-10	III	ostra toksyczność
10-100	IV	wysoka ostra toksyczność
>100	V	bardzo wysoka ostra toksyczność

Źródło: [Persoone i in. 2003, s. 399].

3. Wyniki

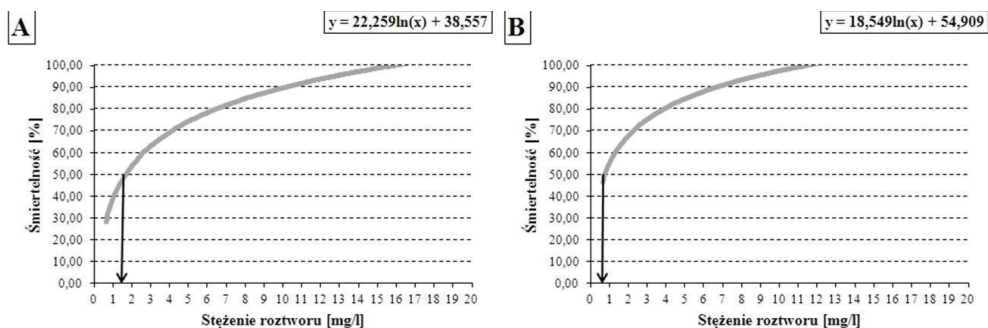
Na rys. 1 przedstawiono śmiertelność skorupiaków *Daphnia magna* po 24 i 48 godzinach ekspozycji na roztwór chlorku kadmu w zakresie stężeń 0,625-20 mg/l.



Rys. 1. Śmiertelność *Daphnia magna* po 24- i 48-godzinnej intoksykacji roztworem chlorku kadmu w zakresie stężeń 0,625-20 mg/l

Źródło: opracowanie własne.

Przeprowadzone badania wykazały toksyczne oddziaływanie chlorku kadmu na organizmy testowe. Podwyższoną (30%) śmiertelność *Daphnia magna* stwierdzono w najniższym (0,625 mg/l) stężeniu CdCl_2 już po 24 godzinach intoksykacji. Po 48 godzinach ekspozycji śmiertelność badanych organizmów wzrosła o kolejne 10% [Persoone i in. 2003, s. 398; rys. 1].



Strzałką zaznaczono wartość stężenia letalnego (LC_{50})

Rys. 2. Zależność śmiertelności *Daphnia magna* od stężenia roztworu chlorku kadmu po 24 (A) i 48 (B) godzinach ekspozycji

Źródło: opracowanie własne.

Wartości stężenia letalnego (LC_{50}) obniżają się wraz z czasem narażenia organizmów doświadczalnych, aż do osiągnięcia wartości progowej. Wartości LC_{50} odnotowane po 24 (1,67 mg/l) i 48 godzinach (0,77 mg/l) intoksykacji świadczą o przy-

roście reakcji testowej. Wraz z wydłużeniem czasu ekspozycji wzrasta toksyczność chlorku kadmu względem *Daphnia magna* [Walker i in. 2002, s. 136; rys. 2].

Ocena stopnia toksyczności chlorku kadmu wykazała wysoką ostrą toksyczność chlorku (IV klasa toksyczności; 59,80 TU) po 24-godzinnej i bardzo wysoką ostrą toksyczność (V klasa toksyczności; 130,30 TU) po 48-godzinnej intoksykacji badanego związku wobec *Daphnia magna* [Persoone i in. 2003, s. 399; tab. 2].

Tabela 2. Ocena toksyczności roztworu chlorku kadmu wobec *Daphnia magna*

Czas ekspozycji [h]	Stężenie letalne [LC ₅₀ , mg/l]	Jednostki toksyczności [TU]	Klasa toksyczności	Toksyczność
24	1,67	59,80	IV	wysoka ostra toksyczność
48	0,77	130,30	V	bardzo wysoka ostra toksyczność

Źródło: opracowanie własne na podstawie [Persoone i in. 2003, s. 399].

4. Dyskusja wyników

Nowoczesne metody bioindykacyjne wykorzystujące mikrobiotesty toksyczności ostrej stanowią cenne narzędzie w ocenie stanu wód powierzchniowych. Specyficzne reakcje organizmów testowych (śmiertelność, zmiany behawioralne, fizjologiczne, morfologiczne) pozwalają na szybszą detekcję zanieczyszczeń oraz określenie efektów toksycznego oddziaływania ksenobiotyków na organizmy żywe [Banaszkiewicz 2010, s. 39; Trusz-Zdybek i in. 2012, s. 422; Szczerbińska, Gałczyńska 2015, s. 193-194]. Przykładem organizmu modelowego o długiej historii stosowania w badaniach toksykologicznych ekosystemów wodnych są skorupiaki *Daphnia magna* [Piontek i in. 2012, s. 413; Vu Le 2016, s. 2].

Wyniki badań prezentowanych w niniejszym artykule wykazały wysoką (24h-TU = 59,80) i bardzo wysoką (48h-TU = 130,30) ostrą toksyczność chlorku kadmu wobec rozwielitek. Kadm jako pierwiastek o znacznych zdolnościach do biomagnifikacji stanowi realne zagrożenie dla zdrowia człowieka [Persoone i in. 2003, s. 399; Campbell 2006, s. 388; Mohod, Dhote 2013, s. 2992; Afshan i in. 2014, s. 76; Sharma i in. 2015, s. 1]. Stwierdzona wysoka wrażliwość rozwielitek na CdCl₂ (24h-LC₅₀ = 1,67 mg/l; 48h-LC₅₀ = 0,77 mg/l) potwierdza przydatność badanych organizmów w bioindykacji zanieczyszczeń wód powierzchniowych związkami kadmu, co zostało szeroko opisane w licznych publikacjach naukowych z zakresu ekotoksykologii. Teodorovic i in. [2009, s. 486] w pracy dotyczącej toksyczności ostrej metali ciężkich wykazali, że wartości LC₅₀ dla *Daphnia magna* w przypadku kadmu (48h-LC₅₀ = 0,17 mg/l) były przynajmniej dwu- (Zn: 48h-LC₅₀ = 0,41 mg/l) lub nawet 440-krotnie niższe (Pb: 48h-LC₅₀ = 74,73 mg/l) niż w przypadku innych pierwiastków. Fikirdęşici i in. [2012, s. 545], badając wody zanieczyszczone metalami ciężkimi, wykazali znacznie wyższą wrażliwość rozwielitek na chlorek kadmu

(24h-LC₅₀ = 0,44 mg/l) aniżeli na trójtlenek arsenu (24h-LC₅₀ = 5,09 mg/l). W badaniach Piontek i in. [2012, s. 414; 2014, s. 78] wartości stężeń letalnych dla rozwielitek po 48 godzinach ekspozycji na chlorek kadmu i azotan kadmu były zbliżone i wyniosły odpowiednio 0,37 mg/l oraz 0,40 mg/l. W pracy Guilhermino i in. [2000, s. 359], poświęconej biotestom toksyczności ostrej z *Daphnia magna*, wartości LC₅₀ w przypadku CdCl₂ wyniosły 0,071 mg/l po 24 i 0,017 mg/l po 48 godzinach intoksykacji. Podobne wyniki uzyskali Ward i Robinson [2005, s. 2341], testując oporność *Daphnia magna* na 8 różnych źródeł kadmu (48h-LC₅₀ = 0,26-1,2 mg/l).

5. Wnioski

1. Skorupiaki *Daphnia magna* wykazują wysoką wrażliwość na chlorek kadmu (48h-LC₅₀ = 0,77 mg/l).

2. Chlorek kadmu jest substancją o bardzo wysokiej ostrej toksyczności wobec *Daphnia magna* (V klasa toksyczności; 48h-TU = 130,30).

3. Wyniki badań wskazują na konieczność regularnego monitoringu zanieczyszczeń wód powierzchniowych związkami kadmu oraz przydatność *Daphnia magna* w badaniach bioindykacyjnych.

Literatura

- Afshan S., Shafaqat A., Ameen U.S., Farid M., Bharwana S.A., Hannan F., Ahmad R., 2014, *Effect on different heavy metal pollution on fish*, Research Journal of Chemical and Environmental Sciences, vol. 2, no. 1, s. 74-79.
- Banaszkiewicz T., 2010, *Biomonitoring in the assessment of chemical threats to the environment*, Contemporary Problems of Management and Environmental Protection, vol. 5, s. 31-41.
- Campbell P.G.C., 2006, *Cadmium – A priority pollutant*, Environmental Chemistry, vol. 3, no. 6, s. 387-388.
- Czczot H., Majewska M., 2010, *Kadm – zagrożenie i skutki zdrowotne*, Farmacja Polska, t. 66, nr 4, s. 243-250.
- Fikirdęřici, S., Altindađ A., Özdemir E., 2012, *Investigation of acute toxicity of cadmium-arsenic mixtures to Daphnia magna with toxic units approach*, Turkish Journal of Zoology, vol. 36, no. 4, s. 543-550.
- Guilhermino L., Diamantino T., Silva M.C., Soares A.M.V.M., 2000, *Acute toxicity test with Daphnia magna: An alternative to mammals in the prescreening of chemical toxicity?*, Ecotoxicology and Environmental Safety, vol. 46, s. 357-362.
- Hua Z., Yinghui J., Tao Y., Min W., Guangxun S., Mingjun D., 2016, *Heavy metals concentrations and risk assessment of sediments and surface water of the Gan River, China*, Polish Journal of Environmental Studies, vol. 25, no. 4, s. 1529-1540.
- Kaniuczak J., Augustyn J., 2011, *Zawartość jonów metali w wodach powierzchniowych przeznaczonych do zaopatrzenia ludności w wodę do spożycia*, Inżynieria Ekologiczna, nr 27, s. 33-45.
- Kuczyńska A., Wolska L., Namieśnik J., 2003, *Zastosowanie biotestów w badaniach środowiskowych*, [w:] Namieśnik J., Chrzanowski W., Szpinek P. (red.), *Nowe horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu środowiskowym*, Centrum Doskonałości Analityki i Monitoringu Środowiskowego, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, Gdańsk, s. 668-669.

- Litchfield J.T., Wilcoxon F., 1949, *A simplifield method of evaluating dose-effect experiments*, Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol. 96, no. 2, s. 99-113.
- Luszczek-Trojnar E., Drag-Kozak E., Popek W., 2011, *Bioakumulacja metali ciężkich w wybranych tkankach karpia (Cyprinus carpio L.) pochodzącego ze stawów hodowlanych zasilanych wodą rzeki Rudawy*, Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych, nr 47, s. 112-120.
- Mohod C.V., Dhote J. 2013, *Review of heavy metals in drinking water and their effect on human health*, International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology, vol. 2, no. 7, s. 2992-2996.
- Persoone G., Baudo R., Cotman M., Blaise C., Thompson K.CI., Moreira-Santos M., Vollat B., Törökne A., Han T., 2009, *Review on the acute Daphnia magna toxicity test – Evaluation of the sensitivity and the precision of assays performed with organisms from laboratory cultures or hatched from dormant eggs*, Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems, no. 393, s. 1-29.
- Persoone G., Marsalek B., Blinova I., Törökne A., Zarina D., Manusadzianas L., Nałęcz-Jawecki G., Tofan L., Stepanova N., Tothova L., Kolar B., 2003, *A Practical and user-friendly toxicity classification system with microbiotests for natural waters and wastewaters*, Environmental Toxicology, vol. 18, no. 6, s. 395-402.
- Piontek M., Fedyczak Z., Łuszczczyńska K., Lechów H., 2014, *Toksyczność miedzi, cynku oraz kadmu, rtęci i ołowiu dla człowieka, kręgowców i organizmów wodnych*, Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Zielonogórskiego, Seria: Inżynieria Środowiska, nr 155(35), s. 70-83.
- Piontek M., Walczak B., Czyżewska W., Lechów H., 2012, *Miedź, kadm i cynk w pyłe drogowym miast oraz określenie toksyczności związków tych metali metodą biologiczną*, Kosmos, t. 61, nr 3, s. 409-415.
- Romanowska-Duda Z., 2015, *Metale ciężkie jako specyficzne zanieczyszczenia środowiska wodnego*, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Łódź.
- Seda J., Petrussek A., 2011, *Daphnia as a model organism in limnology and aquatic biology: Introductory remarks*, Journal of Limnology, vol. 70, no. 2, s. 337-344.
- Sharma H., Rawal N., Mathew B.B., 2015, *The characteristic, toxicity and effects of cadmium*, International Journal and Nanoscience, vol. 3, s. 1-9.
- Siciliano A., Gesuele R., Guida M., 2015, *How Daphnia (Cladocera) assays may be used as bioindicators of health effects?*, Journal of Biodiversity & Endangered Species, vol. S1, no. 005, s. 1-6.
- Szczerbińska N., Gałczyńska M., 2015, *Biological methods used to assess surface water quality*, Archives of Polish Fishers, vol. 23, s. 185-196.
- Teodorovic I., Planojevic I., Knezevic P., Radak S., Nemet I., 2009, *Sensitivity of bacterial vs. acute Daphnia magna toxicity tests to metals*, Central Journal of Biology, vol. 4, no. 4, s. 482-492.
- Tigret 2011, DAPHTOXKIT F MAGNA. Procedura testu, <http://www.tigret.eu/images/stories/produkt/ToksSrodowiskowa/daphtokit%20f%20magna%20slide%20show%20pl.pdf> (26.08.2017).
- Traczewska T.M., 2011, *Biologiczne metody oceny skażenia środowiska*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław.
- Trusz-Zdybek A., Szymczycha-Madej A., Traczewska T.M., Piekarska K., 2012, *Zastosowanie systemu Microtox w bioindykacji próbek środowiskowych*, Kosmos, t. 61, nr 3, s. 417-423.
- Vu Le. Q-A., Sekhon S.S., Lee L., Min J., 2016, *Daphnia in water quality biomonitoring – “omic” approaches*, Toxicology and Environmental Health Sciences, vol. 8, no. 1, s. 1-6.
- Walker C.H., Hopkin S.P., Sibly R.M., Peakall D.B., 2002, *Podstawy ekotoksykologii*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Ward T.J., Robinson W.E., 2005, *Evolution of cadmium resistance in Daphnia magna*, Environmental Toxicology and Chemistry, vol. 24, no. 9, s. 2341-2349.