

Słowa kluczowe: zakwity sinicowe; mikrocyстина-LR; Daphnia pulex; Tetrahymena thermophila

Anna SIEROSŁAWSKA*, Anna RYMUSZKA*, Agnieszka ADAMCZYK**,
Adam BOWNIK*, Tadeusz SKOWROŃSKI* **

OCENA TOKSYCZNOŚCI ZAKWITU SINIC W ZBIORNIKU HODOWLANYM W POBLIŻU LUBLINA

Obserwowane w ostatnich latach zakwity sinic, występujące m.in. w zbiornikach hodowlanych, stanowią jeden z ważniejszych czynników obniżających jakość wód. Masowy rozwój sinic wiąże się m.in. z produkcją i uwalnianiem wysoce toksycznych substancji, cyjanotoksyn. Do grupy cyjanotoksyn należą m.in. mikrocystry (MCs), heptapeptydy o wysokiej hepatotoksyczności. Celem naszych badań było określenie stężenia MCs w ekstraktach wodnych uzyskanych z komórek sinic pobranych z kożucha powstałego podczas zakwitu w zbiorniku hodowlanym w pobliżu Lublina w lipcu 2007 r. Wykonano także oznaczenia taksonomiczne gatunków sinic, wchodzących w skład zakwitu oraz przeprowadzono pilotażowe testy toksyczności, z użyciem przedstawicieli skorupiaków i pierwotniaków (*Daphnia pulex* oraz *Tetrahymena thermophila*), poddanych działaniu uzyskanego ekstraktu. Oznaczenia stężenia MCs w badanych próbkach, wykonane testem ELISA (EnviroGard), wykazały obecność toksyny w bardzo wysokim stężeniu, przekraczającym 14 mg/l. W badaniu składu gatunkowego zakwitu wykryto obecność *Anabaena circinalis*, *Anabaena flos-aquae*, *Microcystis spp.*, *Aphanizomenon flos-aquae* oraz *Planktothrix agardhii*. Badania ekotoksykologiczne wykonane z użyciem mikrobiotestów Daphtoxkit F pulex oraz Protoxkit F (Microbiotests Inc., Belgia) wykazały wysoką toksyczność ekstraktu względem organizmów testowych, z EC₅₀ po 24-godzinnej ekspozycji wynoszącą odpowiednio 15,72 oraz 9,05 % ekstraktu wyjściowego.

1. WSTĘP

Obserwowane w ostatnich latach zakwity sinic, występujące m.in. w zbiornikach hodowlanych, stanowią jeden z ważniejszych czynników obniżających jakość wód. Poza takimi negatywnymi zjawiskami towarzyszącymi zakwitom, jak spadek stężenia tlenu, czy niższa bioróżnorodność, masowy rozwój sinic związany jest z produkcją i uwalnianiem do wód toksycznych substancji, określanymi mianem cyjanotoksyn [2]. Jednymi z częściej wykrywanych cyjanotoksyn są mikrocystry (MCs), wraz z najbardziej toksyczną mikrocystyną-LR (MC-LR).

* Katedra Fizjologii i Ekotoksykologii, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, ul. Norwida 4, 20-061, Lublin, email: ansie@kul.lublin.pl

** Stacja Badawcza Centrum Badań Ekologicznych PAN, ul. Niecała 18/3, 20-080 Lublin

Mikrocystyny są wtórnymi metabolitami wytwarzanymi przez sinice z rodzaju *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria* (*Planktothrix*), *Nostoc* czy *Anabaenopsis*, uwalnianymi do wód głównie podczas rozpadu komórek. Są one cykloheptapeptydami, o ciężarze cząsteczkowym 800–1100 Da, odpornymi na wysoką temperaturę oraz niskie, jak i wysokie wartości pH [4]. Toksyczność mikrocystyn dla zwierząt i człowieka jest wynikiem ich hamującego wpływu na serynowo-treoninowe fosfatazy białkowe, co prowadzi do uszkodzeń hepatocytów i w konsekwencji martwicy wątroby. Przewlekła ekspozycja na niskie dawki mikrocystyn może także doprowadzić do zmian nowotworowych [6]. Mikrocystyny stanowią zagrożenie dla organizmów wodnych, w tym ryb, zamieszkujących akweny objęte toksycznymi zakwitami, dla zwierząt dzikich i domowych pijących skażoną wodę, jak również dla ludzi spożywających wodę, ryby, czy rekreacyjnie wykorzystujących zanieczyszczone zbiorniki. Dopuszczalna koncentracja MC-LR w wodzie pitnej została przez WHO ustanowiona na poziomie 1 µg / litr, natomiast tolerowane dzienne pobranie (TDI) na 40 ng/kg m.c./dzień.

Celem naszych badań było określenie stężenia MCs w ekstraktach wodnych wykonanych z kożucha sinic w trakcie zakwitów na jeziorze Kunów w 2007 r. oraz oszacowanie siły działania toksycznego ekstraktów w stosunku do organizmów wskaźnikowych *Daphnia pulex* i *Tetrahymena thermophila*. Jezioro Kunów położone jest na Wysoczyźnie Lubartowskiej, w zlewni rzeki Czerwonki. Zbiornik jest mały (powierzchnia ok. 117 ha) i płytki (średnia głębokość - 2.1 m), bez stratyfikacji termicznej w okresie letnim. Jezioro leży w bezpośrednim sąsiedztwie pól uprawnych. Wody jeziora charakteryzują się obniżoną jakością, podwyższoną zasobnością w substancje organiczne i mineralne, małą przezroczystością wody (widzialność krążka poniżej 1 m) [3]. Jezioro wykorzystywane jest zarówno rekreacyjnie, jak również stanowi zbiornik hodowlany, zarybiany węgorzem, sandaczem, karpem, karasiem i linem.

2. MATERIAŁ I METODY

2.1. POBÓR PRÓBEK

Próbki do badań pobrano z górnych warstw wód strefy przybrzeżnej, w północno-wschodniej części jeziora Kunów 11 lipca 2007 r. w trakcie trwania zakwitów.

2.2. OZNACZENIA TAKSONOMICZNE

W celu identyfikacji taksonomicznej komórek sinic badaną próbę o objętość 100 ml przepuszczono przez celulozowy filtr (0.85 µm). Komórki analizowano mikroskopowo przy użyciu komory Bürkera.

2.3. PRZYGOTOWANIE EKSTRAKTÓW

Próbki zawierające komórki sinic poddano dezintegracji ultradźwiękowej za pomocą dezintegratora Sonoplus (Bandelin) przez 20 min, amplituda 80, następnie odwirowano przy 10.000 g, 15 min, temp. 12°C na wirówce MPW 375. Uzyskany ekstrakt poddano analizie na zawartość MCs oraz użyto w testach toksyczności.

2.4. OZNACZENIE STĘŻEŃ MIKROCYSTYN

Do oznaczeń stężenia mikrocystyn wykorzystano płytkowy test ELISA (EnviroGard, USA), o zakresie 0.1–1.6 µg równoważnika MC-LR na litr. Procedurę testu wykonano zgodnie z zaleceniami producenta. Serię rozcieńczeń ekstraktu z kożucha wykonano w wodzie destylowanej.

2.5. OKREŚLANIE TOKSYCZNOŚCI EKSTRAKTU

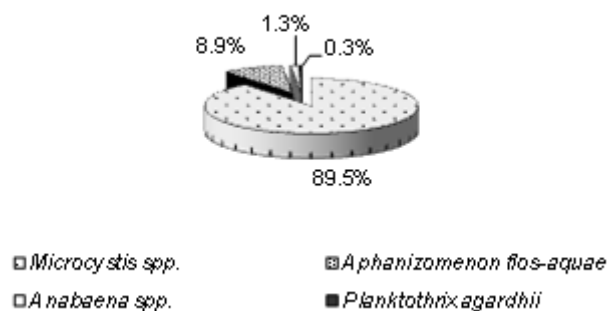
Toksyczność ostrą określano testem Daphtokit FTM pulex, z użyciem skorupiaka *Daphnia pulex*. Reakcją testową jest unieruchomienie lub śmierć organizmu. Test wykonano wg standardowej procedury producenta (Microbiotests, Belgia) zgodnej z normą OECD Guideline 202, z wykorzystaniem uzyskanego ekstraktu z komórek sinic oraz serii jego rozcieńczeń. Serię 6 kolejnych rozcieńczeń roztworu wyjściowego wykonano w stosunku 1:1 z użyciem pożywki dla organizmów testowych dołączonej do zestawu, uzyskując stężenia 100% - 3,125% ekstraktu. Procedurę testu wykonano dwukrotnie, każdorazowo w czterech powtórzeniach. Test umożliwia wyznaczenie wartości EC₅₀ po 24 h.

Toksyczność chroniczną określano testem Protoxkit FTM, z użyciem pierwotniaka *Tetrahymena thermophila*. Test ocenia wzrost 5–6 generacji organizmów w czasie 24 h. Reakcją testową jest zahamowanie rozmnażania i pobierania pokarmu, co wykrywa się poprzez pomiar gęstości optycznej próby przy długości fali 440 nm. O zahamowaniu pobierania pokarmu przez pierwotniaki w obecności substancji testowanej świadczy stopień mętności badanej próby. Test wykonano wg standardowej procedury producenta (Microbiotests, Belgia), z użyciem uzyskanego ekstraktu z komórek sinic oraz serii jego rozcieńczeń. Serię 7 kolejnych rozcieńczeń roztworu wyjściowego wykonano w stosunku 1:1 z użyciem wody dejonizowanej, uzyskując stężenia 100%–1,562%. Procedurę testu wykonano dwukrotnie, każdorazowo w dwóch powtórzeniach. Test umożliwia wyznaczenie wartości EC₅₀ po 24 h.

3. WYNIKI I DYSKUSJA

W badanej próbce dominowały komórki *Microcystis spp*, ich liczebność oszacowano na 3.45*10⁶ komórki na litr. Stwierdzono także obecność *Aphanizomenon*

flos-aquae, *Anabaena circinalis*, *Anabaena flos-aquae* oraz *Planktothrix agardhii* (rys. 1).



Rys. 1. Procentowa struktura zakwitu sinicowego na jeziorze Kunów w lipcu 2007 r.

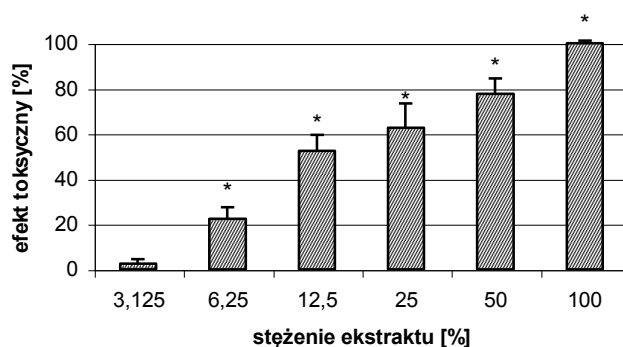
Sinice mogą wywierać istotny wpływ na organizmy bytujące w zbiorniku objętym zakwitem, zarówno planktonowe, jak i większe zwierzęta bezkręgowce i kręgowce [1]. Mechanizmy takiego oddziaływania są złożone i wielokierunkowe.

Oddziaływanie na zooplankton za Bednarską [1] można podzielić na pośrednie i bezpośrednie. Do pośrednich mechanizmów należy zmiana warunków abiotycznych, np. zmiana pH, deficyt tlenu, ograniczenie bazy pokarmowej, poprzez wpływ na wzrost i rozwój glonów, czy zmiana behawioru migracyjnego zooplanktonu, co z kolei doprowadza do zakłócania reakcji obronnych w stosunku do drapieżników. Natomiast jako oddziaływanie bezpośrednie sinic traktować należy ich niską wartość odżywczą, przy równoczesnej dominacji, czyli w momencie kiedy stanowią podstawowe źródło pokarmu dla zwierząt roślinożernych, ponadto mechaniczne zakłócanie przez komórki bądź kolonie sinic procesu filtracji oraz toksyczność. Ta ostatnia cecha uwarunkowana jest zdolnością do produkcji i uwalniania toksycznych wtórnych metabolitów, czy składników endogennych, jak np. lipopolisacharydów będących składnikami błony komórkowej. W chwili obecnej szacuje się, że spośród wszystkich opisanych gatunków sinic, niewiele ponad 2% produkuje cyjanotoksyny, a zmienność w tym zakresie dotyczy nawet poszczególnych szczepów tego samego gatunku [1]. Uważa się, że o toksyczności decydują różnice genotypowe w obrębie gatunku, ale nie bez znaczenia są także warunki środowiskowe, które predestynują określone populacje do rozwoju [2].

Ponieważ w badanym przez nas zakwicie zdecydowanie dominowały *Microcystis* spp, jak również stwierdzono obecność *Anabaena* spp. oraz *Planktothrix agardhii*, należących do potencjalnych producentów mikrocystyn, uzyskany ekstrakt z kożucha poddano analizie na obecność MCs. W ekstrakcie z kożucha wykryto obecność równoważnika MC-LR w bardzo wysokim stężeniu, wynoszącym 14 321 µg/l.

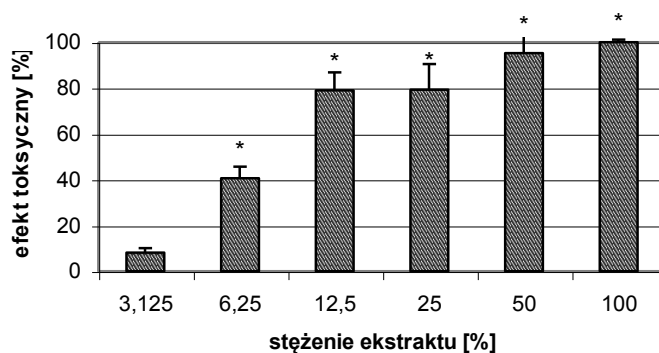
Obecność mikrocystyn w wodzie może stanowić silny czynnik stresowy dla zwierząt planktonowych. Toksyny te w wysokich stężeniach mogą powodować

bezpośrednie zatrucie i śmierć organizmów, szczególnie bardziej wrażliwych, z drugiej zaś strony, także przy niższych stężeniach, straty energii potrzebnej do detoksykacji tych szkodliwych związków mogą przekładać się na słabsze tempo wzrostu i rozmnażania eksponowanej populacji. Badany ekstrakt zawierający mikrocytyny poddaliśmy badaniom pod kątem siły działania toksycznego na organizmy planktonowe. Wykazano silne działanie toksyczne, zarówno ostre jak i chroniczne, w stosunku do użytych organizmów testowych. Zależność pomiędzy stopniem rozcieńczenia ekstraktu, a wielkością obserwowanego efektu toksycznego przedstawiono na rys. 2 i 3.



Rys. 2. Zależność pomiędzy stężeniem ekstraktu, a efektem toksycznym rozumianym jako śmierć lub unieruchomienie organizmu testowego *Daphnia pulex* po 24 h ekspozycji ($n = 8$, $\bar{x} \pm SD$); * – przy wartości efektu toksycznego $> 20\%$ przyjęto, iż próbka jest toksyczna [5]

Ekstrakt z komórek sinic (100%) spowodował śmierć całej eksponowanej populacji skorupiaka *Daphnia pulex* po 24 h.



Rys. 3. Zależność pomiędzy stężeniem ekstraktu, a stopniem zahamowania wzrostu hodowli organizmu testowego *Tetrahymena termophila* po 24 h ekspozycji ($n = 4$, $\bar{x} \pm SD$); * – przy wartości efektu toksycznego $> 20\%$ przyjęto, iż próbka jest toksyczna [5]

Przy kolejnych użytych rozcieńczeniach wielkość efektu toksycznego, czyli śmiertelności i immobilizacji, była odwrotnie proporcjonalna do stopnia rozcieńczenia ekstraktu. Najniższe użyte stężenie ekstraktu (3.125%) po 24 h wywołało efekt toksyczny u 2.5% eksponowanej populacji, w związku z czym można potraktować je jako nietoksyczne.

Obserwowano również wysoką toksyczność chroniczną w stosunku do orzęska *Tetrahymena thermophila*. Całkowite zahamowanie wzrostu testowanej populacji, przejawiające się zaprzestaniem pobierania pokarmu, obserwowano po 24 h inkubacji w obecności ekstraktu z komórek sinic, a przy 50% rozcieńczeniu wielkość efektu toksycznego oszacowano na 95%. Podobnie jak w przypadku testów na *D. pulex*, jedynie najniższe użyte stężenie (3.125% ekstraktu) uznano za nietoksyczne.

Na podstawie uzyskanych wyników obliczono metodą probitową wartości stężenia efektywnego (EC) ekstraktu, wyrażone jako procent ekstraktu z komórek sinic, przy którym obserwowany był efekt toksyczny u połowy eksponowanej populacji. Dla *Daphnia pulex* EC₅₀ po 24 godz. oszacowano na 15.72%, natomiast dla *Tetrahymena thermophila* na 9,05%.

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2007-2009 jako projekt badawczy.
Grant Nr N308 027 32/2393

LITERATURA

- [1] Bednarska A. 2006. *Sinice i ich wpływ na roślinożerne zwierzęta planktonowe*. Wiad. Ekol. 52: 59-87.
- [2] Burchardt L., Pawlik-Skowrońska B. 2005. *Zakwity sinic – konkurencja międzygatunkowa i środowiskowe zagrożenie*. Wiad. Botan. 49: 39-49.
- [3] Grzywna B. Jeziora. [W:] Raport o Stanie Środowiska Województwa Lubelskiego w 2002 r. WIOŚ Lublin, 123-135.
- [4] Kabziński A.K.M. 2005. Toksyczne zakwity sinicowe. Charakterystyka toksyn sinicowych, cz.III. Bioskop 2: 7-13.
- [5] 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 userfriendly toxicity classification system with microbiotests for natural waters and wastewaters*. Environ. Toxicol. 18: 395-402.
- [6] You S.Z. 1995. Primary prevention of hepatocellular carcinoma. J. Gastroenterol. Hepatol. 10: 674-682.

ASSESSMENT OF THE TOXICITY OF CYANOBACTERIAL BLOOM IN THE FISH POND NEAR LUBLIN

Observed in recent years cyanobacterial blooms, occurring among others in fish ponds, are one of the most important factors of water quality deterioration. Cyanobacteria are the source of highly toxic cyanotoxins, with hepatotoxic microcystin-LR. The aim of our study was to analyze taxonomic composition of the scum taken from fish pond near Lublin during bloom in 2007. Moreover toxicity of the scum extract for *Daphnia pulex* (Daphtoxkit FTM pulex) and *Tetrahymena thermophila* (Protoxkit FTM) was estimated. Determination of MCs concentration by the ELISA test (EnviroGard) revealed high toxin content, exceeding 14 mg/l. In the scum the following cyanobacteria were identified: *Microcystis* spp, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Anabaena* spp and *Planktothrix agardhii*. Tested extract showed high toxicity, with 24hEC₅₀ estimated to be 15,72% of initial sample concentration for *Daphnia pulex* and 9,05% for *Tetrahymena thermophila*.