

Anna WIĄCEK-ROSIŃSKA¹, Beata CWALINA^{1,2}, Zbigniew ŚLUSARCZYK¹

¹ Politechnika Krakowska, Instytut Zaopatrzenia w Wodę i Ochrony Środowiska,
31-155 Kraków, ul. Warszawska 24

² Śląska Akademia Medyczna, Katedra Biochemii i Biofizyki,
41-200 Sosnowiec, ul. Narczów 1

ZASTOSOWANIE BIOTESTU MICROTOX DO OCENY TOKSYCZNOŚCI WYBRANYCH JONÓW METALI

Streszczenie. W pracy badano toksyczność wybranych jonów metali, tj. Cr(III), Co(II), Cd(II), Zn(II), Cu(II) i Hg(II), za pomocą bakterii *Vibrio fischeri* w bioteście Microtox. Stwierdzono przydatność tego testu do oceny toksyczności jonów metali. Wykazano, że toksyczność metali powinna być badana po dłuższym czasie ekspozycji bakterii (30 min), z zastosowaniem co najmniej 4-5 powtórzeń analizy tej samej próbki. Utworzono szereg toksyczności badanych metali: Cr (III) > Co (II) > Cd (II) > Zn (II) > Cu (II) > Hg (II).

THE USE OF MICROTOX BIOASSAY FOR EVALUATION OF METAL IONS TOXICITY

Summary. Toxicity of selected metal ions has been carried out employing *Vibrio fischeri* bacteria in biotest Microtox. A sustainability of this biotest for such investigations has been confirmed. It was demonstrated, that toxicity of metal ions should be evaluated after minimum 30 minutes contact of bacteria with metal using minimum 4-5 aliquots of each sample tested. The following metals toxicity series has been formed: Cr (III) > Co (II) > Cd (II) > Zn (II) > Cu (II) > Hg (II).

WPROWADZENIE

Wykorzystywanie znacznych ilości metali (w tym także ciężkich) w różnych gałęziach przemysłu powoduje, że poziom stężeń jonów metali w środowisku naturalnym niebezpiecznie rośnie. Ich występowanie w wodach w ilościach wyższych od uznanych za dopuszczalne jest szkodliwe ze względu na hamowanie procesów samooczyszczania się wód, zakłócanie naturalnej równowagi biologicznej odbiorników, a przede wszystkim z uwagi na toksyczne działanie na organizmy żywe [1].

Skutki zanieczyszczeń środowiska z powodu przedostawania się do niego toksycznych ścieków i odpadów mogą być określane za pomocą różnych testów służących do monitoringu toksyczności, w tym także testów opartych na mikroorganizmach. Zwrócono przy tym uwagę

na bakterie, które są szczególnie atrakcyjne w testach toksyczności ze względu na fakt, że oparte na nich testy zostały rozwinięte jako metody alternatywne do testów na organizmach wyższych. Przykładem takiego testu jest Microtox (Microtox jest nazwą handlową firmy Microbiox Corporation, Carlsbad, California, USA). Test Microtox jest oparty na zaniku zdolności bakterii morskich do emisji światła w obecności substancji toksycznej. Biotest ten ma opinię dobrej metody wykrywania i monitoringu przypadkowych zanieczyszczeń wód, ścieków oraz osadów. Test ten może być traktowany jako pierwszy i szybki wskaźnik zanieczyszczenia środowiska, umożliwiający szybkie podjęcie działań zapobiegawczych w przypadku wykrycia źródła wypływu substancji toksycznych [2].

Celem pracy była analiza wyników dotyczących toksyczności wybranych jonów metali (badanej za pomocą posiadanego aparatu Microtox) oraz ocena możliwości zastosowania biotestu Microtox w monitoringu zanieczyszczeń środowiska jonami metali. Badano toksyczność jonów chromu, cynku, kadmu, kobaltu, miedzi i rtęci, zwracając uwagę zarówno na jakościowe, jak i ilościowe aspekty wpływu trucizn na jakość uzyskanych wyników. Otrzymane wyniki porównano z danymi literaturowymi.

MATERIAŁY I METODY

W badaniach toksyczności wybranych jonów metali wykorzystano roztwory chlorków: chromu Cr^{3+} ($\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), cynku Zn^{2+} (ZnCl_2), kadmu Cd^{2+} (CdCl_2), kobaltu Co^{2+} ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), miedzi Cu^{2+} ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), rtęci Hg^{2+} (HgCl_2). Badania prowadzono w zakresie odczynu pH 6-7. Rozpuszczalnikiem zastosowanym do przygotowania szeregu rozcieńczeń był 2% roztwór NaCl.

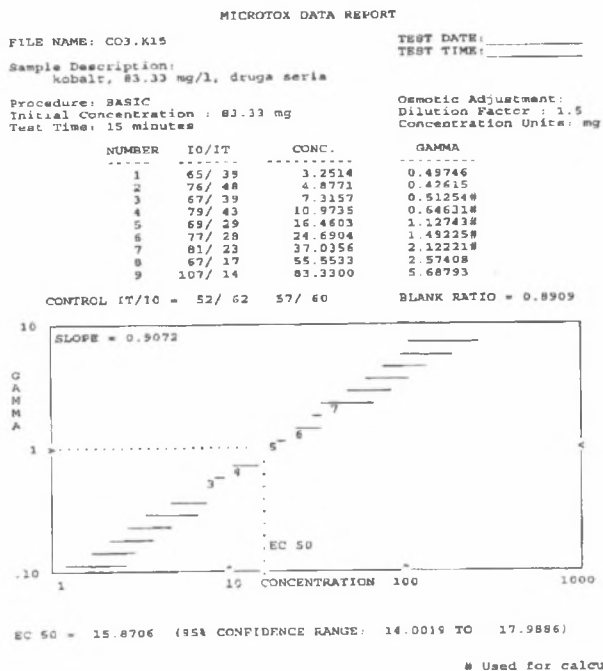
Test toksyczności przeprowadzono z użyciem liofilizowanych bakterii *Vibrio fischeri* (NRRL B-11177), przechowywanych w temperaturze -20°C , otrzymanych jako Microtox Acute Toxicity Test Reagent i rekonstruowanych zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta [3]. Badania wykonywano według procedury Basic Test, z dwiema próbkami kontrolnymi i z co najmniej sześciokrotnym powtórzeniem. Pomiary prowadzono po 5, 15 i 30 min inkubacji bakterii w temperaturze 15°C , przy nieobecności i w obecności jonów metali stosując szereg malejących stężeń badanego ksenobiotyku.

Wynikiem testu toksyczności jest średnia wartość EC50, określająca stężenie powodujące 50% zmniejszenie luminescencji bakterii, podana z 95% przedziałem ufności.

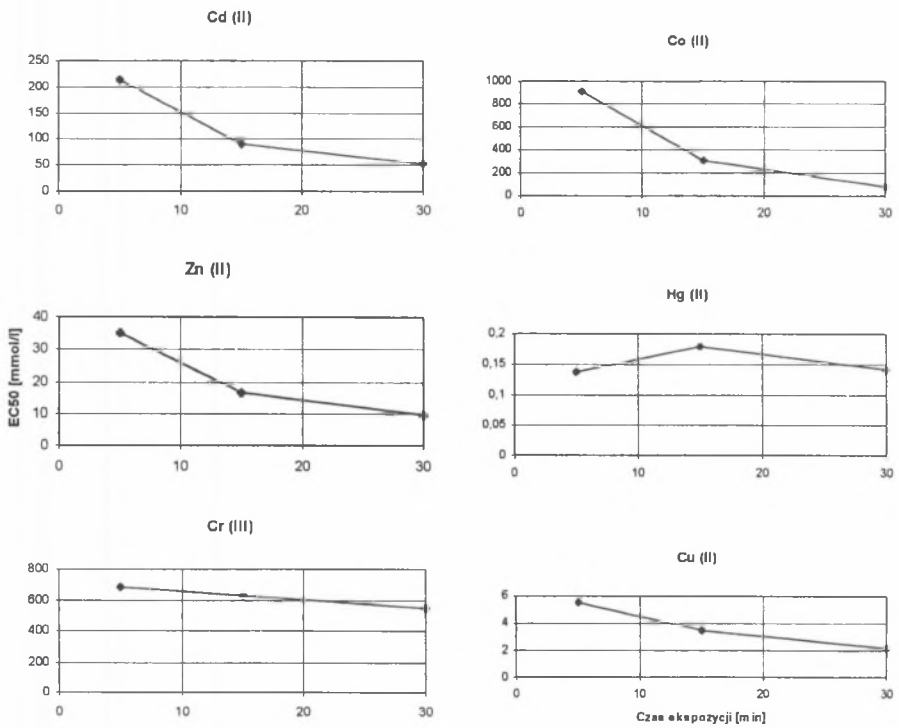
WYNIKI I DYSKUSJA

Analiza wykresów komputerowych uzyskanych za pomocą Microtox (przykładowy wykres komputerowy przedstawiono na rysunku 1) wskazuje na prawidłowy dobór zakresów stężeń metali. Świadczy o tym fakt, że wartość funkcji Gamma równa jedności ($\Gamma \approx 1$) mieściła się w badanym zakresie stężeń. Wartości tangensa kąta nachylenia (slope) prostej regresji reprezentującej zależność między wartością funkcji Gamma a stężeniem metalu mieściły się w zakresie od 0,7 do 6,4. Na rysunku 2 zilustrowano wpływ czasu ekspozycji bakterii *Vibrio fischeri* na wyniki badania toksyczności metali. Dla oceny toksyczności jonów wybranych metali (chromu, cynku, kadmu, kobaltu, miedzi i rtęci) za pomocą testu Microtox przeprowadzono obliczenia statystyczne, których rezultaty zamieszczono w tabeli 1. Zawiera ona średnie wartości EC50 wyznaczone dla różnych czasów ekspozycji na substancję toksyczną, które wyrażono w mg/l i przeliczono na stężenia molowe, a także przedziały

ufności, wielkości odchylenia standardowego i współczynnika zmienności. Obliczenia przeprowadzono na podstawie wyników uzyskanych dla co najmniej sześciu próbek każdego analizowanego metalu. Wcześniej stwierdzono rozkład normalny danych wykorzystywanych do obliczeń. Porównanie średnich wartości EC₅₀ (wyrażonych w $\mu\text{mol/l}$) uzyskanych po określonym czasie ekspozycji na poszczególne metale wykazuje, że były one największe w przypadku kobaltu (II) i chromu (III), kilkakrotnie mniejsze w przypadku kadmu (II) oraz znacznie mniejsze w przypadku cynku (II) i miedzi (II). Szczególnie niskie wartości EC₅₀ uzyskano dla rtęci (II). Biorąc pod uwagę stężenia molowe badanych metali, największe wartości EC₅₀ po 30 minutach ekspozycji na te metale stwierdzono w przypadku chromu (III). Siedmiokrotnie mniejsze były wartości EC₅₀ uzyskane dla kobaltu (II), natomiast 10-krotnie mniejsze – wartości uzyskane dla kadmu (II). W następnej kolejności należy wymienić cynk (II) oraz miedź (II). Najmniejsze stężenie EC₅₀ odnotowano w przypadku rtęci (II). Wynosiło ono zaledwie 0,141 $\mu\text{mol/l}$. Przedziały ufności wyznaczone dla wszystkich wyników uzyskanych dla zadanego czasu ekspozycji na każdy z badanych metali są szerokie, co skutkuje znacznymi wartościami odchylenia standardowego i współczynnika zmienności. Najmniejsze współczynniki zmienności odnotowano w przypadku miedzi (II). Są one też w najmniejszym stopniu zróżnicowane w zależności od czasu ekspozycji na metal (tabela 1). W przypadku rtęci (II) także stwierdzono małe zróżnicowanie współczynników zmienności, reprezentujących rozrzut wyników uzyskanych dla próbek poddanych ekspozycji przez określony czas (5, 15 lub 30 min), jednak wartości tych współczynników były większe niż w przypadku miedzi (II). Największą wartość współczynnika zmienności stwierdzono w przypadku chromu (III) po jego 5-minutowym oddziaływaniu na bakterie *Vibrio fischeri* w teście *Microtox*.



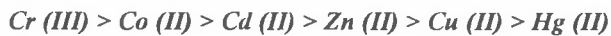
Rys.1. Przykładowy wykres komputerowy badania toksyczności kobaltu dla 15 min czasu kontaktu
 Fig.1. Toxicity of cobalt after 15 min incubation time (an example)



Rys. 2. Wpływ czasu ekspozycji bakterii *Vibrio fischeri* na wskaźnik toksyczności (E50) badanych jonów metali

Fig. 2. Influence of exposure time of *Vibrio fischeri* bacteria on metal ions toxicity

Na podstawie średnich wartości EC50 (wyrażonych w $\mu\text{mol/l}$) uzyskanych po 30 minutach ekspozycji na jony badanych metali, utworzono szereg ich toksyczności przedstawiony na rysunku 3.



wzrost toksyczności \rightarrow

Rys. 3. Szereg toksyczności wybranych jonów metali utworzony na podstawie wyników badań przeprowadzonych za pomocą testu Microtox

Fig. 3. Metal ions toxicity (Microtox) series

Tabela 1

Wyniki badania toksyczności metali wobec testu Microtox.

Metal	Wskaźnik toksyczności	Wartość średnia		Odchylenie standardowe [mg/l]	Współczynnik zmienności [%]
		[mg/l]	[$\mu\text{mol/l}$]		
Chrom Cr (III)	EC50 5	35,6	684,1	19,8	42,6
	EC50 15	32,7	629,8	8,4	21,2
	EC50 30	28,6	550,2	1,8	28,2
Cynk Zn (II)	EC50 5	2,3	35,1	0,7	19,2
	EC50 15	1,1	16,7	0,5	33,5
	EC50 30	0,6	9,5	0,3	37,0
Kadm Cd (II)	EC50 5	24,1	214,2	8,2	20,1
	EC50 15	10,1	89,6	4,8	27,0
	EC50 30	5,9	52,1	1,3	18,6
Kobalt Co (II)	EC50 5	53,6	907,7	10,9	15,3
	EC50 15	18,0	304,3	5,9	25,4
	EC50 30	4,7	79,2	1,1	17,9
Miedź Cu (II)	EC50 5	0,35	5,50	0,08	18,35
	EC50 15	0,22	3,47	0,05	19,69
	EC50 30	0,14	2,17	0,02	11,94
Rtęć Hg (II)	EC50 5	0,028	0,138	0,006	30,322
	EC50 15	0,036	0,181	0,017	32,557
	EC50 30	0,028	0,141	0,013	33,289

Analiza średnich wartości EC50 uzyskanych dla poszczególnych czasów ekspozycji wykazuje, że toksyczny wpływ metali na bakterie *Vibrio fischeri* w teście Microtox odzwierciedlał się w większym stopniu przy zastosowaniu dłuższego czasu ekspozycji, tj. 30 min (rys. 2). Z wyjątkiem rtęci (II), dla wszystkich pozostałych badanych metali stwierdzono spadek wartości EC50 [$\mu\text{mol/l}$] wraz z wydłużeniem czasu oddziaływania ksenobiotyku na bakterie. W przypadku chromu (III) spadek ten był liniowy, natomiast w przypadku kadmu (II), cynku (II), kobaltu (II) oraz miedzi (II) stwierdzono, że wartości EC50 zmniejszały się istotnie po 15 minutach ekspozycji, a dalszy spadek nie był już tak szybki.

Dla porównania toksyczności jonów wybranych metali (EC50, Microtox), wykazanych w niniejszej pracy i podanych w piśmiennictwie, opracowano tabelę 2.

Na podstawie danych przedstawionych w tabeli 2 można stwierdzić, że rezultaty uzyskane w niniejszej pracy mieściły się w zakresie danych przedstawionych w literaturze, jednak wyniki uzyskane przez różnych autorów były znacznie zróżnicowane.

Tabela 2

Porównanie wyników badań własnych i danych literaturowych
dotyczących toksyczności wybranych jonów metali

Wskaźnik toksyczności	Jednostki	Chrom (III)	Cynk (II)	Kadm (II)	Kobalt (II)	Miedź (II)	Rtęć (II)	Literatura
EC50 _{5 min}	μmol/l	684,1	35,1	214,2	907,7	5,50	0,138	prezentowana praca
EC50 _{15 min}	μmol/l	629,8	16,7	89,6	304,3	3,47	0,181	prezentowana praca
EC50 _{30 min}	μmol/l	550,2	9,5	52,1	79,2	2,17	0,141	prezentowana praca
EC50 _{15 min}	μmol/l	184	35	27	874	1,62	0,919	[4]
EC50 _{5 min}	mg/l	35,6	2,3	24,1	53,6	0,35	0,028	prezentowana praca
EC50 _{15 min}	mg/l	32,7	1,1	10,1	18,0	0,22	0,036	prezentowana praca
EC50 _{30 min}	mg/l	28,6	0,6	5,9	4,7	0,14	0,028	prezentowana praca
EC50 _{15 min}	mg/l	339,6	5,6	34,7	-	1,2	0,2	[5]
EC50 _{1 min}	mg/l	22,17	-	8,74	-	626,67	0,016	[6]
EC50 _{15 min}	mg/l	-	5,6	34,7	-	1,2	0,2	[7]
EC50 _{5 min}	mg/l	37,3	-	-	-	-	-	[8]
EC50 _{15 min}	mg/l	25,7	-	-	-	-	-	[8]
EC50 _{5 min}	mg/l	-	-	33,30	-	-	-	[9]
EC50 _{15 min}	mg/l	-	-	10,12	-	-	-	[9]
EC50 _{5 min}	mg/l	-	-	-	-	-	0,056	[10]
EC50 _{15 min}	mg/l	-	-	-	-	-	0,036	[10]

WNIOSKI

Na podstawie przeprowadzonych badań można sformułować następujące wnioski:

1. Potwierdzono przydatność testu *Microtox* do oceny toksyczności jonów metali.
2. Dość znaczny rozrzut wyników uzyskiwanych za pomocą testu *Microtox* nie pozwala na szacowanie toksyczności metali na podstawie zbyt małej (≤ 3) liczby powtórzeń analizy tej samej próbki.
3. Wydłużenie czasu ekspozycji bakterii *Vibrio fischeri* (będącej biologicznym wskaźnikiem toksyczności w teście *Microtox*) na działanie wybranych jonów metali powodowało zwiększenie efektu ich toksyczności (mniejsze wartości EC50).
4. Badania toksyczności jonów metali powinny być prowadzone przy czasie ekspozycji nie krótszym niż 15 minut (najlepiej: 30 minut).
5. Na podstawie uzyskanych wyników utworzono następujący szereg toksyczności badanych metali:



wzrost toksyczności 

LITERATURA

1. Świdarska-Bróz M.: *Mikrozanieczyszczenia w środowisku wodnym*, Politechnika Wrocławska, 1993.
2. Dominik J., Dobrowolski J.W., Kułakowski P., Wagner A. and Wiącek-Rosińska A.: *Evaluation of the Toxicity of Waste Water in the Region of Cracow by Microtox test and Preliminary Experiments on Snail Embryos Perspectives of the Development of Co-operation within Joint Pilot Projects*, Int. Conf. Euro-Eco'97, 1997.
3. *Microtox Acute Toxicity Basic Test Procedures*, Azur Environmental, 1995.
4. McCloskey J. T., Newman M. C., Clark S. B.: *Predicting the relative toxicity of metal ions characteristics: Microtox bioluminescence assay*, Environ. Toxicol. Chem., Vol. 15, No. 10, 1730 – 1731, 1996.
5. Codina J. C., Perez – Gracia A., de Vincente A.: *Detection of heavy metal toxicity and genotoxicity in wastewaters by microbial assay*, Wat. Sci. Tech., Vol. 30, No. 10, 145 – 151, 1994.
6. Bundy K. J., Mowat F.: *Speciation studies and toxicity assessment of complex heavy metal mixtures*, Proc. Conf. Envir., Albuquerque, NM, 35 – 47, 1996.
7. Codina J. C., Perez – Gracia A., Romero P., de Vincente A.: *A Comparison of microbial bioassays for the detection of metal toxicity*, Arch. Environ. Contam. Toxicol., 25, 250 – 254, 1993.
8. Villaescusa I., Marti S., Matas C., Martinez M., Ribo J.: *Chromium (IV) toxicity to luminescent bacteria*, Environ. Toxicol. Chem., Vol. 16, No. 5, 871 – 874, 1997.
9. Villaescusa I., Martinez M., Pilar M., Murat J. C., Hosta C.: *Toxicity of cadmium species on luminescent bacteria*, Fresenius J. Anal. Chem., 354, 566 – 570, 1996.
10. Ribo J. M., Yang J. E., Huang P. M.: *Luminescent bacteria toxicity assay in the study of mercury speciation*, Hydrobiologia, 188/189, 155 – 162, 1989.

Abstract

The aim of investigations was the evaluation of selected metal ions toxicity towards bacteria *Vibrio fischeri* in biotest Microtox.

The obtained results confirmed suitability of biotest Microtox for evaluation of metal ions toxicity. However, the samples' number must be sufficient (minimum 4-5 aliquots of each sample tested) for obtaining satisfactory precision of a method. The higher toxicity effect on *Vibrio fischeri* bacteria has been observed after long-time exposition to metal ions and was expressed by lower EC50 values. Thus, investigations of metal ions toxicity should be carried out for time not shorter than 15 min. (30 min. seems to be the optimal exposition time). Obtained data (expressed in molar concentration [$\mu\text{mol/l}$]) enabled us to form a toxicity series of investigated metals ions:



Pracę wykonano w ramach projektu badawczego Nr 3T09C00918 finansowanego przez Komitet Badań Naukowych w latach 2000-2001.

Recenzent: Prof. dr hab. Stanisław Kalembsa