

## Immobilizowane komórki glonów w ocenie toksyczności miedzi

*Alicja Kosakowska  
Instytut Oceanologii PAN, Sopot*

*Dorota Król  
Uniwersytet Gdański*

### 1. Wstęp

Testy toksykologiczne są szeroko stosowane do oceny oddziaływania związków chemicznych na organizmy żywe. Najczęściej w testach biologicznych związanych z badaniem środowiska wodnego, jako organizmów testowych używa się mikroorganizmów: bakterii, glonów i cyjanobakterii, ze względu na to, że w większości ekosystemów pełnią one istotną ekologiczną rolę i są stosunkowo czułe na toksykanty [34].

Standardy wykonania takich testów są szczegółowo opisane przez różne agencje ochrony środowiska w tym między innymi przez ISO (International Organization of Standardization) [14] i OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) [29].

Podstawą w testach glonowych są monospecyficzne komórki glonów, hodowane przez kilka pokoleń w określonym medium, zawierającym badaną substancję. Najczęściej w standaryzowanych testach toksykologicznych z użyciem glonów jako organizmów testowych używa się: zielenice, okrzemki oraz cyjanobakterie. Wskaźnikami stosowanymi do oceny toksycznego wpływu badanych substancji na mikroorganizmy są:

- EC<sub>x</sub> (*Effect Concentration*) – stężenie efektywne – stężenie substancji toksycznej, które w określonym czasie trwania badań powoduje x% (np. 50%) zahamowanie procesu życiowego organizmu testowego w stosunku do kontroli;

- LOEC (*Lowest Observed Effect Concentration*) – najniższe stężenie substancji toksycznej, które w określonym czasie trwania badań, powoduje statystycznie istotne zmiany ( $p < 0,05$ ) w stosunku do kontroli;
- NOEC (*No Observed Effect Concentration*) – najwyższe stężenie substancji toksycznej, które w określonym czasie trwania badań, nie wywołuje statystycznie istotnych zmian ( $p < 0,05$ ) w stosunku do kontroli.

Alternatywą dla testów z zastosowaniem komórek wolnych są testy, w których wykorzystuje się komórki immobilizowane.

Związane z nośnikiem komórki glonów stosuje się zarówno w testach biologicznych przeprowadzanych w laboratorium [1], a od niedawna również w oznaczaniu toksyczności w warunkach *in situ* [7, 24, 25, 33].

Technika immobilizacji zwiększa użyteczność glonów w oznaczaniu toksyczności, ponieważ daje uproszczenie w manipulowaniu glonami. Pozwala ona również na wyeksponowanie glonów na toksyczne ścieki w warunkach naturalnych oraz znosi problemy z testowaniem barwnych roztworów i mętnych ścieków [5].

Immobilizacja jest procesem polegającym na unieruchomieniu komórek poprzez ich związanie z powierzchnią nośnika lub uwięzienie w jego wnętrzu [21]. Przy wykonywaniu immobilizacji ważne jest zwrócenie szczególnej uwagi na właściwy dobór zarówno nośnika jak i techniki jego wiązania z komórką roślinną. Nośnikami stosowanymi do unieruchamiania komórek mogą być naturalne polimery organiczne (celuloza, alginian, agaroz), syntetyczne polimery organiczne (żele poliakrylamidowe) oraz nośniki nieorganiczne (włókna szklane, perlit) [21]. Również wśród metod unieruchamiania komórek roślinnych można wyróżnić kilka głównych grup w zależności od rodzaju wiązania nośnika. Są nimi: wiązanie na powierzchni ciał stałych, zamykanie we wnętrzu cząstek nośnika, tworzenie dużych agregatów wielokomórkowych. Najlepiej poznana i opisana metoda immobilizacji polega na zamykaniu komórek roślinnych we wnętrzu nośników, którymi są żele polisacharydowe o charakterze słabych kwasów. Do tego rodzaju nośników zalicza się między innymi alginian sodu. Jest to sól sodowa kwasu alginowego, pozyskiwanego z morskich brunatnic z gatunku *Macrocystis pyrifera*. Należy on do nośników z grupy naturalnych polimerów organicznych.

Stężenie miedzi w formie rozpuszczonej w wodach Bałtyku szacowane jest na poziomie od  $0,14 \pm 0,83 \mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$  [30]. W związku z przedostawaniem się miedzi do środowiska morskiego głównie z wodami rzecznyymi, zwiększone ilości tego pierwiastka mogą występować w strefach przybrzeżnych. W Zatoce Gdańskiej stężenie miedzi wynosi od dziesiątych części mikrograma do  $8,3 \mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$  [16, 32]. Spowodowane jest to dostarczaniem dużego ładunku tego

metalów wraz z wodami Wisły i Redy jak również poprzez ścieki pochodzące zarówno z portu w Gdańsku i Gdyni.

Dostępność metalu dla glonów w wodach naturalnych jest regulowana głównie przez związki chelatowe (kwasy humusowe, fulwokwasy), które mają duże powinowactwo do jonów metali i w ten sposób redukują ich aktywność. Poprzez tworzenie z nimi kompleksów zatrzymują je w roztworze. W kulturach glonów jako chelator stosuje się cytryniany, EDTA i ekstrakty z gleby humusowej [16, 17].

Miedź jest pierwiastkiem niezbędnym glonom do ich prawidłowego funkcjonowania. Bierze ona, bowiem udział w ważnych procesach życiowych takich jak fotosynteza i oddychanie komórkowe czy też metabolizm związków azotowych. Jednak po przekroczeniu stężeń fizjologicznych staje się ona toksyczna dla organizmu, powodując w nim liczne niekorzystne zmiany, które mogą prowadzić do obniżenia wydajności niektórych procesów życiowych lub nawet jego śmierci.

Celem niniejszej pracy była ocena potencjalnego zastosowania immobilizowanych komórek glonów w badaniach toksyczności metali ciężkich. Zbadano wpływ zmiennego stężenia miedzi na wzrost komórek w populacji zielenicy *Chlorella kessleri*. Dla celów porównawczych przeprowadzono eksperymenty z zastosowaniem hodowli płynnej *C.kessleri*.

## **2. Materiał i metody**

Materiał doświadczalny stanowiła jednokomórkowa akseniczna zielenica *Chlorella kessleri* H1901 pochodząca z Kolekcji Kultur w Pradze (CAUP) [31].

Do prowadzenia hodowli komórek *C. kessleri* stosowano dwa podłoża mineralne: BBM – przygotowanie inoculum [4] i podłoże ISO – hodowla właściwa [14].

W celu otrzymania inoculum komórek wolnych określoną objętość podłoża BBM pH 7,3±0,2 zaszczerpiono 7 dniową płynną hodowlą zielenicy. Próbkę inkubowano przez okres 10 dni, w temperaturze 24±1°C, przy oświetleniu ciągłym o natężeniu 54 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> (Hansatech Quantithem Light Meter Thermometer Seria Nr Q TP1 2007). Inoculum stanowiły komórki znajdujące się w logarytmicznej fazie wzrostu.

Inoculum komórek immobilizowanych, w formie kulek, otrzymano stosując alginian jako nośnik do ich unieruchamiania. W tym celu przygotowano 3% (w/v) wodny roztwór alginianu sodu, do którego po dokładnej homogenizacji, odpowietrzeniu (próżnia i ultradźwięki) dodano inoculum komórek wolnych o stężeniu 6·10<sup>6</sup> komórka·cm<sup>-3</sup>. Następnie zawiesinę alginianu z komórkami glonów dodawano kroplami, za pomocą strzykawki z igłą do 1% (w/v) roztworu chlorku wapnia przy jednoczesnym mieszaniu całego układu na mieszadle ma-

gnetycznym. Uformowane kulki pozostawiono w wodnym roztworze  $\text{CaCl}_2$  na mieszadło przez około 30 minut w celu uzyskania całkowitej twardości alginianu. Po kilkukrotnym odmyciu wodą dejonizowaną kulki zawieszano w pożywce ISO i przechowywano w ciemności w temp.  $4^\circ\text{C}$  do czasu rozpoczęcia doświadczeń. Tak przygotowane komórki stanowiły inoculum do hodowli immobilizowanych [12, 24, 27].

Badania nad oddziaływaniem miedzi na komórki *Chlorella kessleri* przeprowadzono w dwóch typach hodowli tj. immobilizowanych oraz hodowlach płynnych. Zarówno dla komórek wolnych jak i związanych z nośnikiem eksperymenty prowadzono w 3 wariantach stężenia Cu (II) (każdy w 3 powtórzeniach). Kontrolę stanowiła hodowla zielenicy na podłożu ISO. Stężenie miedzi II w próbce kontrolnej było na poziomie  $5,87 \cdot 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Zbadano oddziaływanie miedzi w stężeniach  $0,5 \cdot 10^{-6}$ ,  $5 \cdot 10^{-6}$  i  $50 \cdot 10^{-6} \text{ mol Cu} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

Początkowe stężenie komórek wynosiło  $1,3 \pm 0,06 \cdot 10^5$  komórek w  $1 \text{ cm}^3$  hodowli płynnych lub  $1 \text{ cm}^3$  kulek z alginianu wapnia zawierających uwięzione komórki w przypadku hodowli immobilizowanych. Hodowlę prowadzono przez okres 7 dni, w temperaturze  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , przy oświetleniu ciągłym o natężeniu napromieniowania  $54 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

Jako kryterium oceny wpływu miedzi na populację *Chlorella kessleri* przyjęto: pomiar liczebności komórek w jednostce objętości hodowli.

Oznaczenie liczebności populacji w hodowlach immobilizowanych wymagało uwolnienia komórek znajdujących się w kulkach z alginianu wapnia. W tym celu do kulek pochodzących z danej próbki, dodano 6% roztwór cytrynianu sodu i pozostawiono je na około 30 minut, aż do momentu całkowitego rozpuszczenia się alginianu. Próbki kilkakrotnie wytrząsano na mikrowstrząsarce. Po rozpuszczeniu alginianu i uwolnieniu komórek, próbki odwirowano (do 2000 obr/min, 10 min). Supernatant zdekantowano, a osadzone komórki, po dwukrotnym przemyciu pożywką o pH 6,0, zawieszono w  $5 \text{ cm}^3$  świeżego podłoża. W tak otrzymanej zawieszynie oznaczano liczebność komórek.

Oznaczanie liczebności populacji komórek *Chlorella kessleri* przeprowadzono przy użyciu komory Bürkera, pod mikroskopem świetlnym.

Tempa wzrostu glonów wyznaczano stosując poniższy wzór [14]:

$$k = \ln(N_1 - N_0) / t_1 - t_0$$

gdzie:

k – współczynnik tempa wzrostu [podział na dobę];

$N_0$  – początkowa liczebność populacji;

$N_1$  – końcowa liczebność populacji;

$t_1 - t_0$  – różnica czasu pomiędzy końcowym i początkowym oznaczeniem liczebności (doba)

Stężenie miedzi (II) w układzie doświadczalnym oznaczano metodą spektrofotometrii absorpcji atomowej (AAS). Oznaczanie miedzi prowadzono w Pracowni Biogeochemii Morza, Zakładu Chemii i Biochemii Morza, Instytutu Oceanologii Polskiej Akademii Nauk w Sopocie.

Oceny statystycznej wyników dokonano za pomocą testu F i testu t-Studenta, przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95% [20]. Wyniki wyraźnie odbiegające od pozostałych mogące mieć istotny wpływ na wartość średniej i odchylenia standardowego odrzucono korzystając z testu Q-Dixona z prawdopodobieństwem 95% [35].

### 3. Wyniki

Zmiany liczebności wolnych i immobilizowanych komórek *Chlorella kessleri* po ekspozycji na działanie jonów Cu (II) ( $0,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $50 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) przedstawiono na rys. 1A-B.

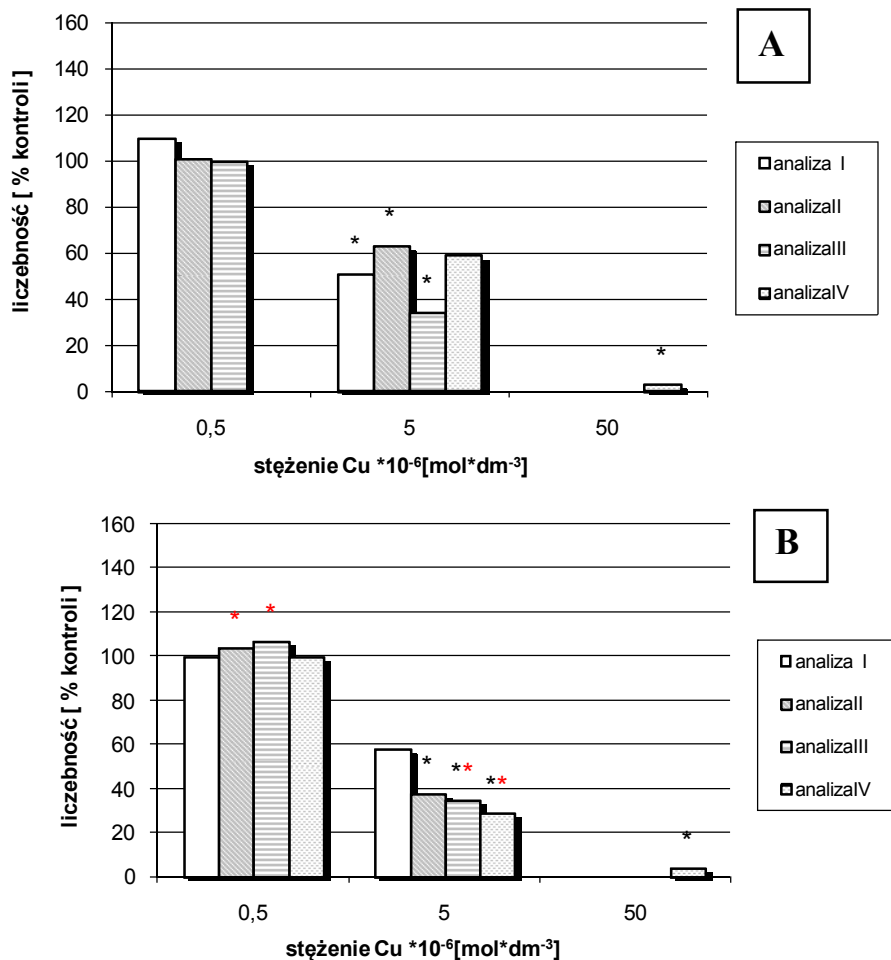
Efekty działania tego pierwiastka badano po 7 dniach prowadzenia hodowli. Kontrolę stanowiła hodowla, odpowiednio wolnych lub immobilizowanych komórek, inkubowanych na podłożu ISO.

#### a) komórki wolne

Wraz ze wzrostem stężenia metalu w podłożu obserwowano spadek liczebności komórek w hodowli płynnej. Przy najniższym z testowanych stężeń miedzi ( $0,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) nie obserwowano statystycznie istotnych różnic w liczebności hodowli w porównaniu z próbą kontrolną. Poziom wzrostu utrzymywał się na poziomie kontroli (100-110%). Stężenie miedzi o rząd wielkości wyższe ( $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) redukowało liczebność komórek o około 40÷65% w porównaniu do próby odniesienia. Natomiast najwyższe testowane stężenie Cu ( $50 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) powodowało prawie całkowite zahamowanie wzrostu populacji utrzymując jej liczebność, na poziomie około 3% wariantu kontrolnego.

#### b) komórki immobilizowane

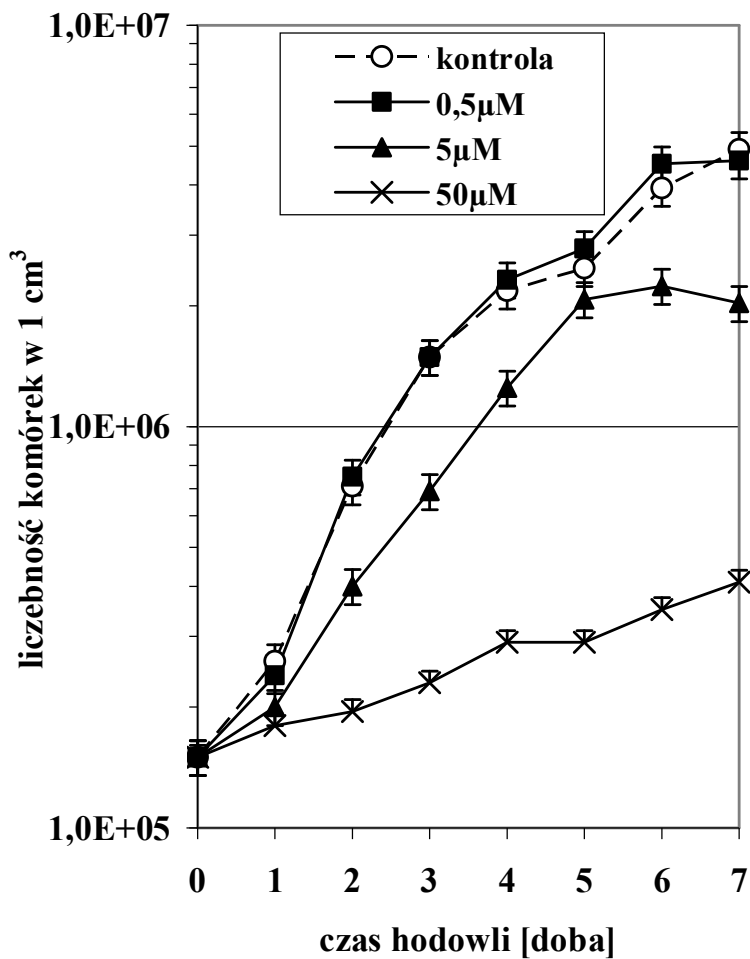
Stężenie miedzi  $0,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  w przypadku komórek immobilizowanych podobnie jak w przypadku komórek wolnych nie powodowało statystycznie istotnych zmian we wzroście, który utrzymywał się na poziomie 100÷110% w stosunku do kontroli. W pozostałych testowanych stężeniach miedzi obserwowano redukcję liczebności komórek. W wariantcie doświadczenia gdzie do podłoża hodowlanego dodano Cu w stężeniu  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , wystąpiło hamowanie wzrostu hodowli o około 40÷70% w odniesieniu do wariantu kontrolnego. Z kolei stężenie 10-razy wyższe ( $50 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ), powodowało największy spadek liczebności. W tym przypadku wzrost był na poziomie kilku procent w odniesieniu do kontroli.



**Rys. 1A-B.** Liczebność A) wolnych i B) immobilizowanych komórek *Chlorella kessleri* inkubowanych na podłożu ISO w obecności zmiennego stężenia miedzi II; \* – różnice statystycznie istotne w odniesieniu do próby kontrolnej ( $P<0,05$ ), \*\* – różnice statystycznie istotne w odniesieniu do próby z komórkami wolnymi ( $P<0,05$ )

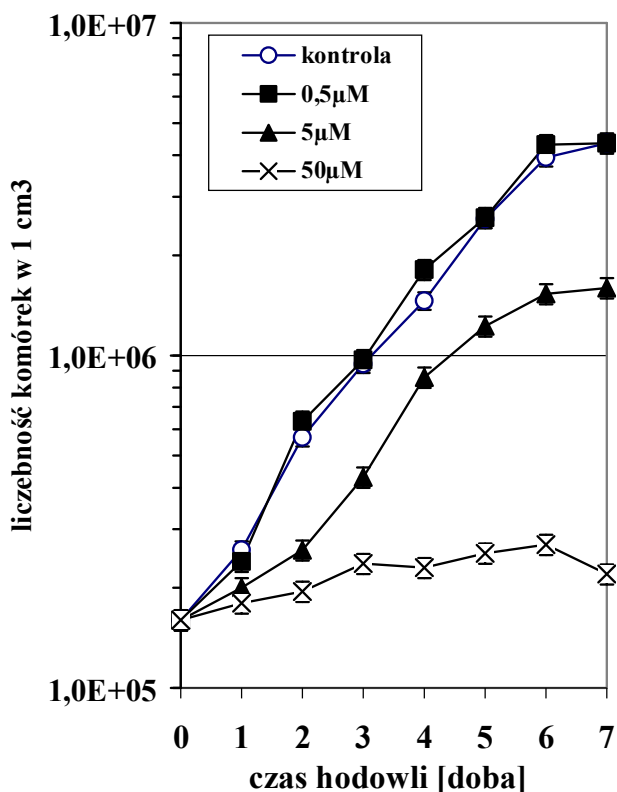
**Fig. 1A-B.** Density of *C.kessleri* A) free, B) immobilized cells incubated on ISO medium in the presence of different concentration of copper; \* – statistically significant differences to control at the significance level ( $P<0,05$ ). Error bars mean standard deviation between of replicates

W kolejnym etapie pracy określono wpływ zmiennego stężenia miedzi (II) ( $0,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  i  $50 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) na kinetykę wzrostu wolnych i immobilizowanych komórek *Chlorella kessleri*. Wyniki przedstawiono na rys. 2 A-B.



Rys. 2A. Krzywe wzrostu *Chlorella kessleri* wolnych komórek inkubowanych na podłożu ISO w obecności zmiennego stężenia miedzi II

Fig. 2A. Growth curves for *C.kessleri* free cells incubated on ISO medium in the presence of different concentration of copper



**Rys. 2B.** Krzywe wzrostu *Chlorella kessleri* immobilizowanych komórek inkubowanych na podłożu ISO w obecności zmiennej stężenia miedziII

**Fig. 2B.** Growth curves for *C.kessleri* immobilized cells incubated on ISO medium in the presence of different concentration of copper

a) komórki wolne

Najwyższe tempo wzrostu w trzecim dniu hodowli ( $k=0,76 \pm 0,77$ ) wykazywały komórki wolne zarówno w próbie kontrolnej jak i w najniższym testowanym stężeniu miedzi  $0,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . W kolejnych dniach hodowli tempo wzrostu sukcesywnie spadało w obydwu wariantach ( $k=0,49$ ). W przypadku działania miedzi w stężeniu  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  najwyższe tempo wzrostu występowało w trzecim i czwartym dniu analizy ( $k=0,51 \pm 0,53$ ), po czym w kolejnych dniach nieznacznie spadało ( $k=0,37$ ). Natomiast tempo wzrostu komórek w obecności miedzi w najwyższym z testowanych stężeń  $50 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  utrzymywało się na podobnym poziomie ( $k=0,13 \pm 0,16$ ) przez 7-dniowy okres hodowli.



b) komórki immobilizowane

Tempo wzrostu komórek immobilizowanych w próbce kontrolnej przez cały czas trwania hodowli utrzymywało się na zbliżonym poziomie ( $k=0,46\div 0,56$ ). W obecności miedzi w najniższym z badanych stężeń  $0,5\cdot 10^{-6}$  mol·dm<sup>-3</sup>, w czwartym dniu hodowli wystąpiła stymulacja wzrostu komórek ( $k=0,81$ ). W kolejnych dniach obserwowano spadek tempa wzrostu do wartości  $k=0,47$  uzyskanej na końcu testu. Z kolei w obecności miedzi w stężeniu  $5\cdot 10^{-6}$  mol·dm<sup>-3</sup> obserwowano najpierw spadek tempa w czwartym dniu hodowli, po czym nastąpił jego ponowny wzrost do wartości  $k=0,26$ . Wartość współczynnika tempa wzrostu w najwyższym testowanym stężeniu metalu  $50\cdot 10^{-6}$  mol·dm<sup>-3</sup> obniżała się w kolejnych dniach hodowli.

#### 4. Dyskusja

Dane literaturowe wskazują, że miedź może w sposób istotny modyfikować przebieg procesów biochemicznych w organizmach wodnych, w tym w glonach i cyjanobakteriach. Efekt ten jest zależny od stężenia metalu jak i jego formy fizyko-chemicznej.

W licznych badaniach nad wpływem miedzi na mikroglony wykazano, ograniczenie ich wzrostu wraz ze wzrastającym stężeniem tego pierwiastka w podłożu hodowlanym. W badaniach przeprowadzonych przez Jouany i in. [15] na zielenicy *Chlorella vulgaris* miedź w stężeniach od  $3,5\div 4,2\cdot 10^{-6}$  mol·dm<sup>-3</sup>, powodowała spadek liczebności w stosunku do kontroli o 50%. Ten sam efektu tropikalnego gatunku *Chlorella sp.* w zależności od wartości pH został wywołany w niższych stężeniach tego pierwiastka  $0,6\cdot 10^{-6}$  mol·dm<sup>-3</sup> i  $0,2\cdot 10^{-7}$  mol·dm<sup>-3</sup> [11]. Badania własne przeprowadzone na *Chlorella vulgaris*, szczep izolowany z wód Zatoki Gdańskiej oraz cyjanobakterii *Anabena variabilis* wykazały, że miedź w stężeniu  $0,79\cdot 10^{-6}$  mol·dm<sup>-3</sup> powoduje zahamowanie wzrostu, odpowiednio o około 50% i 80% [18]. Bajguz [2] z kolei wykazał, że miedź w stężeniu  $1\cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup> powodowała zahamowanie wzrostu komórek *Chlorella vulgaris* jedynie w około 30%. Natomiast do osiągnięcia 50% redukcji liczebności komórek tego gatunku niezbędne było 10-krotnie wyższe stężenie metalu rzędu około  $10^{-4}$  mol·dm<sup>-3</sup>. Inne badania wskazują, że w obecności miedzi w stężeniach  $3,6\div 4,4\cdot 10^{-6}$  mol·dm<sup>-3</sup>, powoduje również 50% zahamowanie wzrostu innej zielenicy *Scenedesmus quadricauda* [9, 10]. Jednak już w przypadku komórek gatunku *Scenedesmus subspicatus* do zahamowania wzrostu w 60÷70% niezbędne było wyższe stężenie miedzi mieszczące się w granicach  $1\div 4,6\cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup> [22]. Również badania przeprowadzone przez Nikookar i in. [28] na zielenicach *Dunaliella salina* i *Dunaliella tertiolecta* wykazały, że obecność miedzi w podłożu hodowlanym w stężeniu  $4,75\cdot 10^{-6}$  mol·dm<sup>-3</sup> powoduje już po 24 godzinach hamowanie wzrostu, odpowiednio o około 50% i 40%.

Porównywalne wyniki do danych literaturowych uzyskano w niniejszych badaniach, przeprowadzonych zarówno w hodowlach wolnych jak i immobilizowanych *Chlorella kessleri*. Dodatek miedzi w stężeniu  $0,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  nie powodował statystycznie istotnych zmian we wzroście zielenicy w porównaniu do kontroli. Dopiero obecność miedzi w podłożu hodowlanym na poziomie  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  zmniejszyła liczebność komórek zarówno w hodowli płynnej jak i immobilizowanej, w stosunku do kontroli, odpowiednio o około  $40 \div 65\%$  i  $30 \div 65\%$ .

Na podobny wpływ miedzi na wzrost przy najniższym z testowanych stężeń tego pierwiastka ( $0,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ), wskazują również badania przeprowadzone na dwóch gatunkach okrzemek. Okrzemka *Cyclotella maneghiniana* wykazywała maksimum swojej liczebności przy stężeniu miedzi w podłożu rzędu  $1,6 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  [19], a w przypadku gatunku *Skeletonema costatum* nie obserwowano hamowania wzrostu jeszcze przy stężeniu  $3,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol Cu} \cdot \text{dm}^{-3}$  [23].

W przeprowadzonych doświadczeniach ponad 90% zahamowanie wzrostu hodowli obserwowano w obecności Cu w stężeniu  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol Cu} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

Z danych literaturowych wynika, że całkowite hamowanie wzrostu glonów może wystąpić w zależności od rodzaju organizmu przy znacznie niższej zawartości metalu w podłożu. Jak podaje Hutchinson i Stokes [13] wzrost *Selenastrum capricornutum* był ograniczony przy stężeniu miedzi  $4,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol Cu} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Z kolei całkowite zahamowanie wzrostu *Chlamydomonas eugametis* i *Chlorella vulgaris* obserwowano odpowiednio już przy stężeniu  $1,4 \cdot 10^{-6} \text{ mol Cu} \cdot \text{dm}^{-3}$  i  $1,6 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Nieco wyższe stężenia miedzi skutkujące prawie całkowitym zahamowaniem wzrostu, nieprzekraczające jednak stężenia stosowanego w powyższych badaniach, podaje Nikooskar i in. [28] dla zielenicy *Dunaliella salina*, w przypadku, której stężenie miedzi rzędu około  $10 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  powodowało hamowanie wzrostu w około 80%. Podobny wynik uzyskano również dla okrzemki *Phaeodactylum tricornutum*, w stężeniu  $15,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol Cu} \cdot \text{dm}^{-3}$  [8].

Obserwowane zmniejszanie się liczby komórek wraz z rosnącym stężeniem miedzi w podłożu, mogło być wynikiem zmniejszenia szybkości podziałów komórkowych i uszkodzenia aparatu fotosyntetycznego, w wyniku wiązania  $\text{Cu}^{2+}$  z błonami chloroplastów i komórkowymi białkami. Jednocześnie przy najwyższym testowanym stężeniu miedzi mogło dojść do nieodwracalnych zniszczeń lamelli chloroplastowych co w konsekwencji najpierw hamowało fotosyntezę a następnie prowadziło do śmierci komórek [3, 6, 26].

Statystycznie istotne różnice pomiędzy hodowlą płynną i immobilizowaną występowały w połowie badanych przypadków zarówno w stężeniu miedzi  $0,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  i  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

## 5. Wnioski

Wyniki niniejszej pracy wskazują, że efekt działania miedzi na wzrost populacji *Chlorella kessleri* w hodowlach immobilizowanych jest podobny do odpowiedzi komórek testowanej zielenicy z hodowli płynnych.

Tak więc, istnieje potencjalna możliwość zastosowania immobilizowanych komórek glonów w oznaczaniu toksyczności miedzi

W dalszym etapie badań należy uwzględnić również właściwości wiązania metali ciężkich przez alginian.

## Literatura

1. **Abdel-Hamid M. I.**: *Development and application of a simple procedure for toxicity testing using immobilized algae*. Wat. Sci. Tech., 33(6): 129-138, 1996.
2. **Bajguz A.**: *Blockade of heavy metals accumulation in Chlorella vulgaris cells by 24-epibrassinolide*. Plant Physiol. Biochem., 38:797-801, 2000.
3. **Baranowska-Morek A.**: *Roślinne mechanizmy tolerancji na toksyczne działanie metali ciężkich*. Kosmos, 52(2-3):283-298, 2003.
4. **Bischoff H., Bold D.**: *Physiological Studies IV*. [w:] George, A. E. (red), Culture centre of algae and protozoa. List of Strains 1976. Institute of Terrestrial Ecology, Natural Environment Research Council. 1963.
5. **Bozeman J., Koopman B., et al.**: *Toxicity testing using immobilized algae*. Aquat. Toxicol., 14:345-352, 1989.
6. **Cenedo-Maldonado A., Swader J. A.**: *The cupric ion as an indicator of photosynthetic electron transport in isolated chloroplasts*. Plant Physiol., 50:698, 1972.
7. **Chen Y.-C.**: *Immobilized microalga Scenedesmus quadricauda (Chlorophyta, Chlorococcales) for long-term storage and for application for water quality control in fish culture*. Aquaculture, 195:71-80, 2001.
8. **Cid A., Herrero C., et al.**: *Copper toxicity on the marine microalga Phaeodactylum tricorutum: effects on photosynthesis and related parameters*. Aquat. Toxicol., 31:165-174, 1995.
9. **Fargašová A.**: *Interactive effect of manganese, molybdenum, nickel, copper I and II, and vanadium on the freshwater alga Scenedesmus quadricauda*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 67:688-695, 2001.
10. **Fargašová A., Bumbálová A., i in.**: *Ecotoxicological effects and uptake of metals ( $Cu^{+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Mo^{6+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $V^{5+}$ ) in freshwater alga Scenedesmus quadricauda*. Chemosphere, 38(5):1165-1173, 1999.
11. **Franklin N. M., Stauber J. L., i in.**: *pH – dependent toxicity of copper and uranium to a tropical freshwater alga (Chlorella sp.)*. Aquat. Toxicol., 48:275-289, 2000.
12. **Hertzberg S., Jensen A.**: *Studies of alginate – immobilized marine microalgae*. Bot. Mar., 32: 267-273, 1989.
13. **Hutchinson T.C., Stokes P.M.**: *Heavy metal toxicity and algal bioassays*. in: Water Quality Parameters, Am. Soc. Test. Mater. Spec. Tech. Publ., 573:320, 1975.

14. **International Organization for Standardization:** *Water quality – algal growth inhibition test*. Draft International Standard ISO/DIS 8692, Geneva, Switzerland. 1987.
15. **Jouany J.M., Ferard J.F., et al.:** *Interest of dynamic tests in acute ecotoxicity assessment in algae*. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 7:216, 1983.
16. **Kabata Pendias A., Pendias H.:** *Biogeochemia pierwiastków śladowych*. PWN, Warszawa. 1999.
17. **Kawecka B., Eloranta P.V.:** *Zarys ekologii glonów wód słodkich i środowisk lądowych*. PWN, Warszawa, 1994.
18. **Kosakowska A., Falkowski L., et al.:** *Effect of amino acids on the toxicity of heavy metals to phytoplankton*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 40:532-538, 1988.
19. **Kowalewska G., Łotocka M., i in.:** *Formation of the copper-chlorophyll complexes in cells of phytoplankton from the Baltic Sea*. *Pol. Arch. Hydrobiol.* 39:41-49, 1992.
20. **Łomnicki A.:** *Wprowadzenie do statystyki dla przyrodników*. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 2003.
21. **Malepszy S., i in.:** *Biotechnologia roślin*. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 2001.
22. **Ma M., Zhu W., et al.:** *Accumulation, assimilation and growth inhibition of copper on freshwater alga (*Scenedesmus subspicatus* 86.81 SAG) in the presence of EDTA and fulvic acid*. *Aquat. Toxicol.*, 63:221-228, 2003.
23. **Metaxas A.A., Lewis G.:** *Copper tolerance of *Skeletonema costatum* and *Nitzschia thermalis**. *Aquat. Toxicol.*, 19:265-280, 1991.
24. **Moreira dos Santos M., Moreno-Garrido I., et al.:** *An in situ bioassay for estuarine environments using the microalga *Phaeodactylum tricorutum**. *Environ. Toxic. Chem.*, 21(3):576-574, 2002.
25. **Moreira-Santos M., Soares A.M.V.M, et al.:** *An in situ bioassay for freshwater environments with the microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata**. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 59:164-173, 2004.
26. **Morel F.M.M., Morel-Laurens M.M.L.:** *Trace metals and plankton in the oceans: Facts and speculations*. In: C. S. WONG; E. A. BOYLE; W. K. BRULAND; E.D. GOLDBERG (eds). *Trace metals in sea water*. Plenum Press, New York 841-869. 1983.
27. **Moreno-Garrido I., Codd G.A., et al.:** *Cu and Zn accumulation by calcium alginate immobilized marine microalgal cells of *Nannochloropsis gaditana* (*Eustigmatophyceae*)*. *Ciencias Marinas*, 28(1): 107-119, 2002.
28. **Nikookar K., Moradshahi A., et al.:** *Physiological responses of *Dunaliella salina* and *Dunaliella tertiolecta* to copper toxicity*. *Biomolecular Engineering*, 22:141-146, 2005.
29. **Organization for Economic Cooperation and Development (OECD):** *Test Guideline 201 (Alga, Growth Inhibition test)*. Update draft. OECD. Paris, France. 1984.
30. **Pempkowiak J., Chiffolleau J.-F., i in.:** *The vertical and horizontal distribution of selected trace metals in the Baltic Sea of Poland*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 51: 115-125, 2000.

31. **Pliński M.:** *Glony Zatoki Gdańskiej. Klucz do oznaczania gatunków. Cz.V.* Uniwersytet Gdański, Gdańsk, 1980.
32. **Róžańska Z.:** *Zasoby, zanieczyszczenia i ochrona wód morskich za szczególnym uwzględnieniem Bałtyku.* PWN, Warszawa. 1987.
33. **Twist H., Edwards A.C., et al.:** *A novel in situ biomonitoring using alginate immobilized algae (*Scenedesmus subspicatus*) for the assessment of eutrophication in flowing surface waters.* *Wat. Res.*, 31(8):2066-2076, 1997
34. **Weyers A., Sokull-Klüttgen B., i in.:** *Acute toxicity data: a comprehensive comparison of results of fish, daphnia, and algae tests with new substances notified in the European Union.* *Environ. Toxicol. Chem.*, 19: 1931-1933, 2000.
35. **Zgirski A., Gondko R.:** *Obliczenia biochemiczne.* PWN, Warszawa. 1981.

## **Immobilized Algae Cells in Assessment of Copper Toxicity**

### **Abstract**

Toxicological tests are widely applied for assessment of impact of chemical compounds on living organisms. Most often microorganisms such as bacteria, algae and cyanoobacteria are used as test organisms. They are used because of in most of the ecosystems they play very important ecological role and they are relatively sensitive to toxicants [34].

Microalgae are sensitive indicators of environmental change and, as the basis of most freshwater and marine ecosystems, are widely used in the assessment of risk and development of environmental regulations for metals.

Copper is a trace element essential for all living organisms. In plants, it participates in photosynthetic electron transport and also plays a role as a cofactor of several oxidizing enzymes. Several heavy metals are essential for living beings at very low concentrations, but at higher doses most of them are toxic for organisms belonging to different levels of the trophic chain.

We examined the influence of copper on the growth of green algae *Chlorella kessleri* H1901 CAUP. The effect of copper(II) was defined in concentration range from  $5 \cdot 10^{-7}$  to  $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup> in ionic form. A comparative study on metal interaction in the free and alginate immobilized of algae cells was conducted. Cultures with free and immobilized cells were incubated for 7 days under conditions optimal for the growth of the test alga. Algal growth (cellular density) was used as toxicity response parameter.

The copper concentration inhibiting from 40 to 70% of algal growth of free and immobilized algal cells was  $5 \cdot 10^{-6}$  mol·dm<sup>-3</sup>. Both free and immobilized cultures showed similar response to Cu treatments.

Immobilization of microalgal cells in alginate beads could be a technique in order to monitor potential pollution (eg. heavy metals) of aquatic ecosystems.

