

## TOXICITÁSI TESZTEK ALKALMAZÁSA HAZAI KAGYLÓFAJOKRA

NASSR-ALLAH ABDEL-HAMEID<sup>1</sup> – KOVÁTS NÓRA<sup>1</sup> – KOVÁCS KATA<sup>1</sup> – ÁCS ANDRÁS<sup>1</sup> – PAULOVITS GÁBOR<sup>2</sup><sup>1</sup>Pannon Egyetem, Limnológia Intézeti Tanszék, 8200 Veszprém, Wartha Vince u. 1., Pf.: 158.<sup>2</sup>MTA Balatoni Limnológiai Kutatóintézet, 8237 Tihany Klebelsberg Kuno út 3.

## ECOTOXICOLOGICAL TESTING ON NATIVE BIVALVE SPECIES

N.A. ABDEL-HAMEID<sup>1\*</sup> – N. KOVÁTS<sup>1</sup> – K. KOVÁCS<sup>1</sup> – A. ÁCS<sup>1</sup> – G. PAULOVITS<sup>2</sup><sup>1</sup>University of Pannonia, Department of Limnology, Wartha Vince u. 1., POB. 158., H-8200 Veszprém, Hungary<sup>2</sup>HAS Balaton Limnological Research Institute, Klebelsberg Kuno str. 3., H-8237 Tihany, Hungary

\*Corresponding author, e-mail: toxlab@vein.hu

**KIVONAT:** Kagylókat tesztszervezetként alkalmazó szabvány protokollt először az Egyesült Államokban fektettek le. Ezek közül valamennyi tengeri faj, amelyeknél stimulálással (különböző triggerek alkalmazásával) egész évben lehetséges embriók, ill. lárvák kinyerése. Már elfogadott az az ASTM protokoll, amely édesvízi kagylófajok glochidium lárváinak, ill. juvenilis egyedeinek alkalmazását szabályozza toxicitás-vizsgálatok céljára. Részben ennek a szabványnak az útmutatásai alapján, részben saját tapasztalatainkra alapozva hazai kagylófajok (*Anodonta anatina*, *Unio tumidus*, *Pseudanodonta complanata*) glochidium lárváinak érzékenységét vetettük össze a Balatonban és vízgyűjtőjén algicidként alkalmazott réz-szulfátra ( $\text{CuSO}_4$ ). Saját tapasztalataink alapján a vizsgált kagylófajok esetében az időzített toxicitási vizsgálat nem kivitelezhető. Ugyanakkor terepen begyűjtött gravid kagylókból kinyert glochidium lárvákkal a toxicitási tesztek kellő precizitással elvégezhetők. A három faj  $\text{CuSO}_4$ -re mutatott mortalitását összevetve számottevő különbséget nem figyeltünk meg, a gravid állatokból nyert glochidium lárvák száma, kezelhetősége alapján ugyanakkor mindenképpen a *P. complanata* tűnik a legmegfelelőbb ökotoxikológiai tesztszervezetnek. Védett státusza viszont korlátozza alkalmazhatóságát.

**Kulcsszavak:** toxicitás vizsgálat, *Anodonta anatina*, *Unio tumidus*, *Pseudanodonta complanata*

**ABSTRACT:** Standard test protocols using bivalves as test organisms were first initiated in the USA. These are marine species, which are able to produce embryos and larvae the whole year long, under certain stimulating conditions

(using different triggers). An ASTM protocol has already been introduced, which regulates the usage of glochidia and juvenile individuals of freshwater bivalves for toxicity testing. Partly regarding the instructions of this standard, partly based on our experience, we compared the responses of glochidia of native bivalve species (*Anodonta anatina*, *Unio tumidus*, *Pseudanodonta complanata*) against copper sulphate ( $\text{CuSO}_4$ ), which is commonly used as algicide in the watershed of Lake Balaton. We learned that a timed performing of the toxicity test is not possible. Then again, using glochidia obtained from gravid bivalves collected in the field, the toxicity test is well performable with adequate accuracy. There are no significant differences amongst the mortality results of the three bivalve species given against  $\text{CuSO}_4$ , while considering the number and conformability of the obtainable glochidia, *P. complanata* seems to be the most suitable for ecotoxicity testing. On the other hand its protected status sets limits to the usage of *P. complanata*.

**Key words:** toxicity testing, *Anodonta anatina*, *Unio tumidus*, *Pseudanodonta complanata*

## Bevezetés

Kagylókat tesztorganizetként alkalmazó szabvány protokollt először az Egyesült Államokban fektettek le (ASTM 1998). Ez a protokoll több faj használatát megengedi: *Crassostrea gigas* Thunberg, *C. virginica* Gmelin, *Mercenaria mercenaria* L. ill. *Mytilus edulis* L. (közülük az első az ajánlott, a többi elfogadott tesztorganizet). Valamennyien tengeri fajok, amelyeknél stimulálással (különböző triggerek alkalmazásával) egész évben lehetséges embriók, ill. lárvák kinyerése (LOOSANOFF és DAVIS 1963). Szabvány szerint ilyen stimulus a hőmérséklet hirtelen 5-10 °C-al történő megemelése, plusz ingert jelenthet hővel előlt kagylósperma hozzáadása. A toxicitás mértékét az abnormálisan fejlődő D-alakú lárvák és a kontroll lárvák arányából lehet becsülni.

A felsorolt tengeri fajok embrionális-lárva fejlődésén alapuló tesztet elterjedten alkalmazzák különböző szennyezők környezeti kockázatának becslésére, elsősorban azokban az esetekben, amikor a szennyeződés/szennyező komponensek tengerekbe is bejuthatnak. A teljesség igénye nélkül, ezek a vizsgálatok kiterjedtek PAH-ok (pl. BELLAS et al. 2008), nehézfémek (pl. CALABRESE et al. 1973), peszticidek (pl. BEIRAS és BELLAS 2008) toxicitásának értékelésére. Nemcsak egyes szennyező komponensek toxicitását becslik ezzel a tesztel, hanem egyes élőhelyek (pl. torkolatok, öblök) vizének minőségét is (pl. THAIN 1992).

Az Egyesült Államokban különös jelentősége van a kagylótesztek alkalmazásának, hiszen az Unionidae családba tartozó édesvízi kagylókat a fauna legveszélyeztetettebb tagjai közé sorolják (WILLIAMS et al. 1993). Különböző tényezők (túlhasználat, egzóta fajok, az élőhelyek szennyezettsége) miatt világszerte érzékeny, ill. veszélyeztetett taxonoknak minősülnek (LYDEARD et al. 2004).

Az E72494 jelzetű ASTM protokollnak, ill. az ebben felsorolt 4 tengeri kagylófajnak az az előnye, hogy a toxicitás tesztek bármikor elvégezhetők. Édesvízi kagylófajok esetében egyelőre a *Dreissena polymorpha* esetében ismertek olyan laboratóriumi tesztek, amelyek során a külső megtermékenyítés mesterséges stimulus hatására következik be – ez leggyakrabban szerotonin (KENNEDY et al. 2006).

Már elfogadott az az ASTM protokoll, amely édesvízi kagylófajok glochidium lárváinak, ill. juvenilis egyedeinek alkalmazását szabályozza toxicitás-vizsgálatok céljára (ASTM International standard guide for conducting laboratory toxicity tests with freshwater mussels /E2455-05/). Részben ennek a szabványnak az útmutatásai alapján, részben saját tapasztalatainkra alapozva hazai kagylófajok glochidium lárváinak érzékenységét vetettük össze a Balatonban és vízgyűjtőjén algicidként alkalmazott réz-szulfátra ( $\text{CuSO}_4$ ). További célunk olyan tesztprotokoll kidolgozása volt, amelyet a későbbiek során akár rutinjelleggel alkalmazhatunk egyes szennyezők környezeti kockázatának becslése során.

## Anyag és módszer

Tesztsszervezetek gyűjtése, a laboratóriumi tartás körülményei

Az *Anodonta anatina* és *Unio tumidus* példányokat a Balaton Keszthelyi-öblében és a Balatonmárfürdő előtt területen gyűjtöttük 2009 szeptemberében. Mindkét helyszínen előfordult mindkét faj, de a Keszthelyi-öbölben több *A. anatina*, míg Márfürdőnél több *U. tumidus* egyedet találtunk.

A *P. complanata* egyedeket a Marcali-tározón gyűjtöttük, 2009 novemberében. A tározó ekkor éppen leeresztés alatt állt. Gyűjtés után a kagylókat egy hétig laboratóriumi körülmények között akklimatizáltuk ( $t = 16-18^\circ\text{C}$ , oldott oxigén = 85-93%, pH = 7.98- 8.72). Az akváriumok vizét hetente cseréltük, az utánpótlás természetes vízfolyásból, a Csigere-patakból származott. Ez egyben elegendő tápanyagot is tartalmazott.

Toxicitás-vizsgálat glochidium lárvákkal

A glochidium lárvák kinyerését JOHNSON et al. (1993) útmutatásai szerint végeztük. A kagylók héját kinyitottuk, a lárvákat óvatosan fecskendővel kimostuk. A kinyert lárvákat többször átmostuk mesterségesen beállított keménységű vízzel: 170 mg/l  $\text{CaCO}_3$ , PH 8.38 (ASTM 2006), így az elpusztult lárvákat távolítottuk el. Az egyes glochidiumok életképességét koncentrált (240 g/l) NaCl oldatban ellenőriztük: megszámoltuk a nyitott héjú egyedeket expozíció előtt és után. Azokat tekintettük életképesnek, amelyek a sóoldatban be tudták zárni a héjukat.

Minden egyes tesztoldathoz 100 lárvát használtunk. A teszteket 150 ml-es lombikban, szobahőmérsékleten ( $20-22^\circ\text{C}$ ) végeztük, három párhuzamossal. Az expozíció 24 h volt.

A számolás menete a következő volt: először rögzítettük a nyitott héjú egyedek számát (N), ezután néhány csepp koncentrált NaCl-t adtunk a mintaoldathoz. Az életben levő glochidiumok összezárják a héjukat, ezért a nyitott héjú egyedeket számoljuk meg (M). A túlélők százalékos arányát a következő képlet alapján határoztuk meg:  $(M-N/M) \cdot 100$ . Ebből számítottuk a mortalitási százalékot, az Abott-formula (ABOTT 1925) segítségével:  $E = 100(A-M)/(100-M)$ , ahol E a kontrollhoz korrigált mortalitás, A az egyes mintákban mutatott mortalitás, M pedig a kontrollban tapasztalt átlagmortalitás.

## Eredmények

A három tesztelt kagylófajra (*Anodonta anatina*, *Pseudanodonta complanata* és *Unio tumidus*) kapott  $EC_{50}$  értékeket az 1. táblázat mutatja be. 24 órás expozícióval az *U. tumidus* mutatkozott legérzékenyebbnek ( $EC_{50} = 26,85 \mu\text{g/l}$ ). Némiképp alacsonyabb de számottevően nem különböző érzékenységet tapasztaltunk a *P. complanata* és az *A. anatina* esetében ( $EC_{50} = 34,341$  ill.  $35,73 \mu\text{g/l}$ ). Figyelemreméltó ugyanakkor, hogy a *P. complanata* esetében lényegesen kisebb volt a szórás.

48 órás expozíció esetében némiképp módosult a sorrend. Gyakorlatilag egyforma érzékenységet mutatott az *A. anatina* és az *U. tumidus* ( $EC_{50} = 18,972$  és  $19,022 \mu\text{g/l}$ ). A *P. complanata* esetében kisebb érzékenységet tapasztaltunk ( $EC_{50} = 29,396 \mu\text{g/l}$ ), de a különbség nem tekinthető lényegesnek.

**1. táblázat.** Akut  $EC_{50}$ s értékek Cu-ra (95% konfidencia tartomány mellett) 24 és 48 órás expozíció esetében

Faj	24 h túlélési ráta a kontrollban (%)	24 h $EC_{50}$ ( $\mu\text{g/l}$ )	48 h túlélési ráta a kontrollban (%)	48 h $EC_{50}$ ( $\mu\text{g/l}$ )
<i>A. anatina</i>	$91.59 \pm 0.896$	35.73 (20.12 - 70.20)	$91.44 \pm 0.57$	18.972 (10.095-31.145)
<i>P. complanata</i>	$91.575 \pm 0.705$	34.341 (29.972 - 39.459)	$90.85 \pm 0.537$	29.396 (25.406-34.03)
<i>U. tumidus</i>	$93.67 \pm 0.782$	26.850 (23.256 - 30.953)	$90.50 \pm 0.289$	19.022 (16.266 - 22.045)

Az adatok átlagos  $EC_{50} \pm$  szórásként kifejezve, a korrigált mortalitási értékek alapján, ahol korrigált mortalitás =  $100 (A-M)/(100-M)$ ; A: aktuális mortalitás és M: a kontrollban mért átlagos mortalitás.

A három vizsgált kagylófajt nemcsak érzékenységük, hanem „használhatóságuk” alapján is összevetettük. Ez alatt azt értjük, hogy rutinjellegű toxicitás vizsgálatok esetén mennyire könnyen kezelhetők a tesztszervezetek. A 2. tábla fajonként adja meg a begyűjtött egyedek méret szerinti megoszlását, mérettartományonként feltüntetve az egyedszámot, a gravid nőstények százalékát, a kinyert glochidium lárvák számát és méretét.

Az adatok átlag  $\pm$  standard szórásban kifejezve. Az egyes fajokra kifejezett átlageredmény szignifikáns különbséget mutat  $P \leq 0.05$  mellett.

## Konklúzió

Saját tapasztalataink alapján a vizsgálat kagylófajok (*Anodonta anatina*, *Pseudanodonta complanata* és *Unio tumidus*) esetében az időzített toxicitás vizsgálat nem kivitelezhető – időzített alatt azt értjük, amikor a tesztszervezet az év bármely szakában képes valamilyen megfelelő trigger hatására embriók képzésére. Ugyanakkor „kész” (azaz terepen begyűjtött gravid kagylókból kinyert) glochidium lárvákkal a toxicitás tesztek kellő precizitással elvégezhetők.

A három faj  $\text{CuSO}_4$ -re mutatott mortalitását összevetve számottevő különbséget nem figyeltünk meg – nem jelenthetjük ki egyértelműen, hogy egyik vagy másik faj érzékenysége alapján megfelelőbb tesztszervezet lenne.

**2. táblázat.** Az egyes fajokba tartozó egyedek mérettartomány szerinti megoszlása, mérettartományonként feltüntetve a gravid nőstények százalékos arányát, a kinyert lárvák számát és méretét.

Faj	Mérettartomány (cm)	N	Hossz(cm)	Magasság (cm)	Lárvák száma	Lárvák mérete (µm), n 10		% gravid egyedek
						Hossz	Magasság	
<i>A. anatina</i>	18	1	18	12.5	-	-	-	0
	14-15	4	14.25 ± 0.255	10 ± 0.234	-	-	-	0
	12-13	5	12.7 ± 0.30	8.0 ± 0.316	1566	205 ± 2.236 <sup>a</sup>	205 ± 1.667 <sup>a</sup>	20
	10	3	10.33 ± 0.333	6.50 ± 0.289	-	-	-	0
Átlag 6.69								
<i>P. complanata</i>	10-11.5	7	11.071 ± 0.277	5.80 ± 0.205	31163	209 ± 3.14 <sup>a</sup>	199 ± 10.049 <sup>a</sup>	57.14
	8-9	3	8.667 ± 0.1667	4.833 ± 0.1667	9141	208 ± 2.494 <sup>a</sup>	204 ± 4.989 <sup>a</sup>	100
	Átlag 80							
<i>U. tumidus</i>	14	1	14	6.5	1603	227 ± 4.484 <sup>c</sup>	194 ± 11.075 <sup>ab</sup>	100
	9	3	9	4.7 ± 0.120	1020	224 ± 3.711 <sup>c</sup>	218 ± 2.906 <sup>b</sup>	33.33
	6-7.5	4	6.875 ± 0.375	3.625 ± 0.479	-	-	-	0
	Átlag 25							

### Irodalom

- ABOTT, W.S. (1925): A method of computing the effectiveness of an insecticide. – *Journal of Economic Entomology* 18: 265–267.
- ASTM (2006): Standard guide for conducting laboratory toxicity tests with freshwater mussels (E2455-05). – ASTM International, West Conshohocken, PA.
- ASTM (1995): Standard test methods for measuring the toxicity of sediment-associated contaminants with fresh water invertebrates. Section E170695b. – American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA.
- ASTM (1998): Standard guide for conducting static acute toxicity tests starting with embryos of four species of saltwater bivalve molluscs. Section E72494 – American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA.
- BEIRAS, R. – BELLAS, J. (2008): Inhibition of embryo development of the *Mytilus galloprovincialis* marine mussel by organic pollutants; assessment of risk for its extensive culture in the Galician Rias. – *Aquaculture* 277(3-4): 208–212.
- BELLAS, J. – SACO-ÁLVAREZ, L. – NIETO, Ó. – BEIRAS, R. (2008): Ecotoxicological evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbons using marine invertebrate embryo–larval bioassays. – *Marine Pollution Bulletin* 57: 493–502.
- CALABRESE, A. – COLLIER, R.S. – NELSON, D.A. – MACINNES, J.R. (1973): The toxicity of heavy metals to embryos of the American oyster *Crassostrea virginica*. – *Marine Biology* 18: 162–166.
- JOHNSON, I.C. – KELLER, A.E. – ZAM, S.G. (1993): A method of conducting acute toxicity tests with the early life stages of freshwater mussels. In: LANDIS, W.G. – HUGHES, J.S. – LEWIS, M.A. (eds.) *Environmental Toxicology and Risk Assessment*, STP 1179. – American Society of Testing and Materials, Philadelphia, PA, pp. 381–396.
- KENNEDY, A.J. – MILLWARD, R.N. – STEEVENS, J.A. – LYNN, J.W. – PERRY, K.D. (2006): Relative Sensitivity of Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha*) Life-stages to Two Copper Sources. – *Journal of Great Lakes Research* 32: 596–606.
- LOOSANOFF, V.L. – DAVIS, H.C. (1963): Rearing of bivalve molluscs. – *Advances in Marine Biology* 1: 1–136.
- LYDEARD, C. – COWIE, R.H. – ONDER, W.F. – BOGAN, A.E. – BOUCHET, P. – CLARK, S.A. – CUMMINGS, K.S. – FREST, T.J. – GARGOMINY, O. – HERBERT, D.G. – HERSHLER, R. – PEREZ, K.E. – ROTH, B. – SEDDON, M. – STRONG, E.E. – THOMPSON, F.G. (2004): The global decline of nonmarine mollusks. – *BioScience* 54: 321–330.
- THAIN J. E. (1992) Use of the oyster *Crassostrea gigas* embryo bioassay on water and sediment elutriate samples from the German Bight. – *Marine Ecology Progress Series* 91: 211–213.
- WILLIAMS, J.D. – WARREN, M.L. JR – CUMMINGS, K.S. – HARRIS, J.L. – NEVES, R.J. (1993): Conservation status of freshwater mussels of the United States and Canada. – *Fisheries* 18: 6–22.