

BADANIE TOKSYCZNOŚCI ŚRODOWISKA WODNEGO METODĄ BIOINDYKACJI

Grzegorz Nałęcz-Jawecki

Zakład Badania Środowiska, Wydział Farmaceutyczny Akademii Medycznej w Warszawie
ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

tel./fax: +22 5720738; e-mail: grzegorz.nalecz-jawecki@wum.edu.pl

Otrzymany 20.01.2003; zaakceptowany 4.07.2003; zamieszczony 4.08.2003

STRESZCZENIE

Dotychczas nie skonstruowano aparatury, za pomocą której możliwe byłoby badanie toksyczności związków chemicznych. Jedynie organizmy żywe, na różnym poziomie organizacji, pozwalają na ocenę toksyczności badanej próbki. Bioindykacja jest metodą wykorzystującą jako wskaźnik organizm żywy, którego reakcja może być podstawą oceny ogólnej aktywności biologicznej badanego układu. Pozwala to na poznanie sumarycznej toksyczności wszystkich szkodliwych substancji, w wielu przypadkach działających synergistycznie. Obecnie za podstawowe zadania analizy bioindykacyjnej uważa się określenie charakterystyki toksykologicznej substancji biologicznie aktywnej, bądź jej formy użytkowej. Bioindykacyjna ocena różnych technologii produkcji, a także bieżący monitoring ścieków i odpadów sprzyjają tworzeniu technologii proekologicznych. W ujęciu ekologicznym bioindykacja służy do oceny stanu ekosystemów, do ustalenia pojemności ekosystemów wobec toksyn, a także do oceny interakcji między toksynami oraz między toksyną a środowiskiem. Ostatnim celem bioindykacji jest ochrona wodociągów poprzez system reakcji alarmowej. Organizmy różnią się wrażliwością na obecność substancji toksycznych. Stąd w badaniach ekotoksykologicznych zaleca się stosowanie baterii bioindykatorów. W pracy przedstawiono szereg metod bioindykacyjnych, wraz z przykładami ich zastosowania w badaniach wód przeprowadzonych w Zakładzie Badania Środowiska Akademii Medycznej w Warszawie.

SŁOWA KLUCZOWE: biotesty, toksyczność, jakość wody

ABSTRACT

WATER ENVIROMENT TOXICITY INVESTIGATED BY BIOASSAYS

Physicochemical analysis is inadequate to provide information on unknown hazardous compounds in environment and their potential harmful effect on man and aquatic ecosystems. No instrument has been devised by man that can measure the toxicity. Only living organisms could show some response to hazardous chemical compounds. A bioassay - an aquatic toxicity test, is a procedure in which the responses of organisms are used to detect or measure the presence of toxicants in environmental samples. The main goals of bioassays include: the assessment of the toxicity of pure compounds, their mixtures, effluents and waters; assessment of the influence of environmental factors on the toxicity of toxicants; assessment of the effectiveness of different waste treatment methods; identification of sources of toxicity; and raising the alarm over the pollution of drinking water sources. Organisms differ in their susceptibility to various classes of chemical agents. Therefore to estimate the possible effect of xenobiotics on the environment a battery of tests is required. In the paper some bioassay techniques are presented with the examples of their use in ecotoxicological studies carried out in the Department of Environmental Health Sciences in the Medical University of Warsaw.

KEYWORDS: bioassay, toxicity, water quality

WSTĘP

Dotychczas nie skonstruowano aparatury, za pomocą której możliwe byłoby badanie toksyczności związków chemicznych. Jedynie organizmy żywe, na różnym poziomie organizacji, pozwalają na ocenę aktywności biologicznej badanego materiału. Przemysł chemiczny wytwarza obecnie tysiące produktów o nieznanym działaniu na człowieka i środowisko przyrodnicze, które mogą przedostać się do zbiorników wodnych. Istniejący system analiz wody pozwala na ocenę parametrów fizycznych (barwa, zapach, temperatura) oraz wybranych parametrów chemicznych (pH, chemiczne zapotrzebowanie na tlen - ChZT, twardość, stężenia niektórych substancji) badanych układów. W rutyn-

nowej analizie chemicznej oznaczane są jedynie niektóre toksyczne substancje. Ogromna część zanieczyszczeń przechodzi przez sito analityczne i jest uwzględniana tylko w ogólnych parametrach chemicznych wody takich jak ChZT lub OWO (ogólny węgiel organiczny). Trudno jest jednak wychwycić w ten sposób trucizny działające już w minimalnych stężeniach (pestycydy). Każdego roku do istniejących w środowisku licznych związków chemicznych dochodzi kilka tysięcy nowosyntetyzowanych, często o bardzo wysokiej aktywności biologicznej. Rozwój nowych metod analizy chemicznej umożliwia wykrycie i oznaczenie większości związków, lecz, z jednej strony jest to bardzo kosz-

towne, z drugiej - nie daje odpowiedzi na dwa podstawowe pytania:

- jak dana próbka może działać na organizmy żywe bytujące w środowisku?
- jak może wpłynąć bezpośrednio i pośrednio na organizm człowieka?

Definicja bioindykacji

Bioindykacja jest metodą wykorzystującą jako wskaźnik organizm żywy, którego reakcja może być podstawą oceny ogólnej aktywności biologicznej badanego układu. Pozwala to na poznanie sumarycznej toksyczności wszystkich szkodliwych substancji, w wielu przypadkach działających synergistycznie. Mimo pozornej różnicy obie metody: biologiczna i chemiczna opierają się na tej samej zasadzie. W analizie chemicznej wykorzystuje się substancje, które łącząc się z substancjami badanymi dają charakterystyczne efekty ilościowe i jakościowe, np. efekty barwne. W metodach biologicznych żywy organizm jest swoistym "odczynnikiem", wewnątrz którego zachodzą procesy biochemiczne, a ich rezultatem są obserwowane symptomy np.: zmiany morfologiczne ciała, choroba, a w końcu śmierć organizmu. Cel obu metod jest jednak całkowicie odmienny. Za pomocą analizy chemicznej bada się stężenia konkretnych związków chemicznych. Uzyskuje się odpowiedź na pytanie: co i w jakiej ilości znajduje się w próbce? Natomiast przy zastosowaniu analizy bioindykacyjnej ocenia się ogólną toksyczność badanego układu, bez wskazania, który związek jest toksyczny, ważny jest sumaryczny efekt działania.

Współczesna bioindykacja powstała na początku dwudziestego wieku. W pierwszym okresie - opisowym (do lat 60-tych) próbowano określić wpływ wszystkich szkodliwych substancji na podstawowe grupy organizmów żywych, zajmujących ważne miejsce w łańcuchu troficznym (skorupiaki, ryby) [1]. Stworzono wówczas podstawy badań: sposoby prowadzenia analiz, oceny wyników (wprowadzono pojęcie EC50 oraz matematyczny sposób jego obliczania - metodę probitową stosowaną do dziś), opisano symptomy zatrucia dla wielu organizmów wodnych. Opracowano pierwsze standardowe procedury wykorzystujące ryby - standardy ASTM (*American Society for Testing and Materials*). Na początku lat 60-tych postawiono pytanie: co właściwie ma być celem bioindykacji? Czy środowisko przyrodnicze, czy człowiek? Nastąpił wówczas podział poglądów i odąd rozwój bioindykacji postępuje w dwóch, pozornie różnych kierunkach. W pierwszym, można go nazwać środowiskowym, kontynuuje się badania wpływu czystych związków oraz ścieków na środowisko przyrodnicze. Wybierane są organizmy charakterystyczne dla danych biocenoz, obok pojedynczych gatunków stosuje się całe ekosystemy (naturalne i sztucznie konstruowane stawy, strumienie i ekosystemy lądowe). Drugi kierunek bioindykacji zajmuje się bezpośrednio środowiskiem człowieka. Organizmy testowe wybierane są pod kątem szczególnej wrażliwości na związki chemiczne szkodliwe dla człowieka. Stanowią one rodzaj alarmu ostrzegającego przed skażeniem. Testy "alarmowe" wprowadzone zostały w wielu krajach do rutynowych badań wód, szczególnie ujęć wody pitnej. Oczywiście oba te kierunki mają wiele wspólnych płaszczyzn działania - wyniki badań naukowych służą często obu celom. W latach 70-tych pojawia się wiele standardów akceptowanych przez

prawodawstwo międzynarodowe i krajowe (także w Polsce). Coroczne sympozja sprzyjają poszerzaniu wykazów organizmów testowych. Lata 80-te i 90-te to okres powstawania prac przeglądowych, a także postępującej internacjonalizacji metod badawczych. Pojawiają się próby wyjaśnienia mechanizmów działania toksyn, zależności działania od struktury związku, a także interakcji między toksynami. Z okresu badań opisowych bioindykacja wkracza w okres opracowań statystycznych, prób modelowania ekosystemów, przewidywania działania nowych związków na podstawie istniejących wyników.

Cele bioindykacji

Obecnie za podstawowe zadania analizy bioindykacyjnej uważa się określenie charakterystyki toksykologicznej substancji biologicznie aktywnej, bądź jej formy użytkowej. Bioindykacyjna ocena różnych technologii produkcji, a także bieżący monitoring ścieków i odpadów sprzyja tworzeniu technologii proekologicznych. W ujęciu ekologicznym bioindykacja służy do oceny stanu ekosystemów, do ustalenia pojemności ekosystemów wobec toksyn, a także do oceny interakcji między toksynami oraz między toksyną a środowiskiem. Ostatnim celem bioindykacji jest ochrona wodociągów oraz biologicznych oczyszczalni ścieków poprzez system reakcji alarmowej.

Bioindykatorem może być układ żywy na różnym poziomie organizacji począwszy od pojedynczego organizmu skończywszy na ekosystemach [2]. Wielu ekotoksykologów uważa, iż do oceny substancji biologicznie aktywnych konieczne jest zastosowanie ekosystemów modelowych, gdyż zmiany w ekosystemach nie są jedynie sumą zmian w populacjach tworzących ekosystem, ale także są wypadkową zaburzeń i/lub przystosowań ekosystemu jako całości. Badania na ekosystemach - mimo, że najpełniejsze i dające najwięcej informacji ekologicznych, są, z uwagi na ogromny koszt prowadzone w nielicznych ośrodkach na świecie [1,3].

Organizmy testowe

W związku z koniecznością uwzględnienia rachunku ekonomicznego ponad 90% testów wykorzystuje jako bioindykator populację należącą do jednego gatunku. Dotychczas stosowano kilkadziesiąt różnych grup organizmów testowych [4,5,6,7]. Wiele z nich pojawiło się tylko jednorazowo jako efekt krótkotrwałego zainteresowania, inne są przedmiotem licznych opracowań i prac przeglądowych. Najszerzej jako organizmy testowe stosowane są ryby. Bukema i wsp. [8] wymieniają ponad 150 gatunków ryb proponowanych do testów toksyczności przez wiodące amerykańskie organizacje: APHA (American Public Health Association), USEPA (US Environmental Protection Agency) i ASTM (American Society Testing and Materials). Europejskie Centrum Ekotoksykologii w swej bazie danych [7] zamieściło 60 gatunków ryb na ogólną liczbę 122 gatunków bioindykatorów stosowanych w badaniach toksykologicznych. Ryby są w pełni akceptowane przez prawodawstwo wielu państw jak i organizacje międzynarodowe [9,10] jednakże ich stosowanie wymaga dużego, dobrze zorganizowanego laboratorium.

Spośród bezkręgowców najszerzej rozpowszechnionymi organizmami testowymi są dafnie wprowadzane już w latach 40-tych naszego stulecia. Zdecydowały o tym

względem zarówno naukowe jak i praktyczne [6]. Po pierwsze dafnie występują na całym świecie, w wielu różnych biocenozach słodkowodnych. Pełnią one ważną rolę w łańcuchu troficznym między producentami a rybami. Z drugiej strony ich fizjologia jest dobrze poznana, co umożliwia prowadzenie hodowli laboratoryjnej, a także długoterminowych testów chronicznych. Jednocześnie są wrażliwe na szerokie spektrum zanieczyszczeń środowiskowych. Ze względu na małe rozmiary wymagają małych objętości badanych próbek oraz niewielkiej przestrzeni w laboratorium, zarówno do prowadzenia hodowli, jak i do testów.

Trzecią ważną grupą organizmów testowych stosowanych od wielu lat są glony - będące reprezentantem producentów. Różne odpowiedzi testowe glonów pozwalają na wykrycia nie tylko związków toksycznych (obniżenie tempa wzrostu bądź produkcji biomasy), ale także na ocenę zagrożenia substancjami biogennymi wywołującymi stymulację wzrostu komórek [5,11,12,13].

Organizmy różnią się wrażliwością w stosunku do różnych substancji toksycznych. W związku z tym do badań bioindykacyjnych stosuje się baterie bioindykatorów należących do różnych grup biologicznych. Organizacje międzynarodowe zalecają stosowanie 4 rodzajów bioindykatorów: rozwielitki *Daphnia magna* lub *D. pulex* [14,15,16]; ryby - różne gatunki [9,10,17], glony - zielenice *Scenedesmus subspicatus* lub *Selenastrum capricornutum* [12,13,18] oraz bakterie *Pseudomonas putida* [19] i *Vibrio fischeri* [20]. W naszym kraju istnieją Polskie Normy zalecające podobne bioindykatory jak w standardach międzynarodowych: glon - *Chlorella sp.*, skorupiaki - *Daphnia magna* i *Gammarus varsoviensis* oraz ryba - *Lebistes reticulatus*. Normy te wymagają jednak drobnych korekt dostosowawczych, które będą przeprowadzone w najbliższym czasie [4,21].

Organizmom, które mają być szeroko stosowane, stawia się szereg wymagań [2,22,23]. Muszą być po pierwsze łatwo dostępne - i to w dużych ilościach, przez cały rok. Jednocześnie powinny być mało zróżnicowane pod względem genetycznym oraz wolne od chorób i pasożytów. Po drugie muszą przeżywać w dobrej kondycji w warunkach prowadzenia testu - najczęściej w laboratorium w niewielkich naczyniach testowych. Po trzecie symptomatologia reakcji testowej musi być wyraźna i powtarzalna, łatwa do obserwacji i interpretacji. Po czwarte, w przypadku stosowania w analizach środowiskowych, organizmy testowe powinny być charakterystyczne dla danego kraju/regionu, zaś do stosowania w sytuacjach alarmowych powinny być wrażliwe na szerokie spektrum substancji toksycznych. Rand i wsp. [1] dodają, iż test musi być szeroko akceptowany przez środowisko naukowe. Procedura testowa musi mieć podstawy statystyczne, być powtarzalna - wewnątrz laboratorium jak i w kalibracjach międzylaboratoryjnych. Natomiast APHA [5] zwraca uwagę na to, iż organizmy testowe powinny także mieć duże znaczenie ekonomiczne bądź ekologiczne. Oczywiście idealny bioindykator nie istnieje i organizmy żywe różnią się wrażliwością na poszczególne grupy substancji toksycznych.

Nowoczesne testy bioindykacyjne

Organizm testowy musi odpowiadać wielu surowym wymaganiom dotyczącym m. in. ciągłej dostępności i jednorodności genetycznej. Ciągłą dostępność bioindykatorów

można osiągnąć dwoma sposobami. Po pierwsze, można prowadzić stałą hodowlę organizmów testowych. Jest to kosztowne, a jednocześnie należy pamiętać, iż populacje hodowlane ulegają zmianom mogącym spowodować znaczne różnice wrażliwości bioindykatorów pochodzących z różnych laboratoriów [6]. Zmiany wynikają z różnic w metodach hodowli, a także ze zmian genetycznych populacji. Po drugie, można kupować bioindykatory ze sprawdzonych źródeł. Obecnie wprowadzane są gotowe testy sprzedawane w postaci pakietów pozwalające na ocenę toksyczności badanych prób w krótkim czasie. Zawierają one formy kryptobiotyczne bioindykatorów (pochodzące ze standardowej hodowli), które mogą być długo przechowywane i w razie potrzeby w krótkim czasie przygotowane do testu. Analizy mogą być prowadzone nawet przez małe placówki analityczne zarówno do bieżącej oceny toksyczności środowiska jak i w sytuacjach alarmowych. Pierwszym tego typu testem bioindykacyjnym był system Microtox®, który powstał w 1979 roku w USA [24]. Łączy on właściwą bioindykację z precyzją analizy instrumentalnej. Jako bioindykator zastosowane zostały bakterie luminescencyjne *Vibrio fischeri*, które w normalnych warunkach około 10% metabolizmu zużywają na wytwarzanie światła. W obecności substancji toksycznych luminescencja obniża się wraz ze wzrostem toksyczności ogólnej próbki. Liofilizowane bakterie mogą być przechowywane przez 1 rok w temperaturze minus 20°C i użyte do testu w każdej chwili po zawieszeniu ich w wodzie dejonizowanej. Bakterie umieszczone w płynie do rozcieńczeń (2% NaCl) świecą ze stałą intensywnością przez okres 1-1,5 godzin. Obsługa systemu nie wymaga specjalistycznego przeszkolenia ani doświadczenia w pracy z bioindykatorami. Ta stała gotowość do wykonania analiz, a także otrzymywanie wyników już po godzinie od dostarczenia próbki do laboratorium, zaowocowały bardzo szybkim rozpowszechnieniem testu na całym świecie. W chwili obecnej jest on prawdopodobnie najczęściej stosowanym testem bioindykacyjnym, a jednocześnie najlepiej poznany. Wrażliwość testu, oceniona na przeszło 1300 związkach chemicznych, w większości przypadków jest zbliżona do wrażliwości organizmów wyższych (skorupiaki, ryby) [25]. Opracowano podobne systemy oparte na tym samym bioindykatorze: m. in. niemiecki - Lumistox, fiński - Biotox. Analizy międzylaboratoryjne toksyczności czystych substancji wskazują na wysoką zbieżność wyników uzyskanych w różnych laboratoriach. Wynika to głównie z faktu, iż po pierwsze, wszystkie materiały i odczynniki pochodzą od jednego producenta. Po drugie, test, a przede wszystkim inkubacja, są prowadzone w ściśle określonych, kontrolowanych warunkach. Eliminacja hodowli organizmów testowych znacznie obniża koszty analiz, a jednocześnie umożliwia stosowanie testu Microtox® w małych pracowniach (terenowych), a nawet w laboratoriach zainstalowanych w samochodach. Ma to szczególne znaczenie w badaniach regionu odległego od laboratorium, a przede wszystkim w przypadku nadzwyczajnych zagrożeń, gdy konieczna jest ciągła analiza skażenia wody powierzchniowej lub pitnej.

Toxkits

Zespół prof. Guido Persoone z Uniwersytetu w Ghent w Belgii stworzył testy zwane Toxkits [26,27,28]. Organizmy dostarczane są w formie kryptobiotycznej: wrotki w formie cyst, skorupiaki - w formie jaj przetrwalnych, zaś

glony - jako komórki unieruchomione w nośniku - "kulkach" zabezpieczonych przed rozwojem specjalnym roztworem. Formy te mogą być przechowywane w lodówce przez okres kilku miesięcy. Przed testem cysty muszą być umieszczone w wodzie. Pod wpływem silnego światła następuje rozwój rozwój form przetrwalnych i po okresie od 18 do 96 godzin (w zależności od organizmu) następuje wylęg młodych osobników gotowych do testu. Eliminacja hodowli pozwala na obniżenie kosztów badań. Wykorzystanie standardowych organizmów umożliwia standaryzację testu i otrzymanie powtarzalnych wyników w różnych laboratoriach. Testy Daphtoxkit oraz Algaltoxkit są zgodne z wymaganiami standardów OECD. Szeroko zakrojone badania porównawcze wykazały pełną zgodność wyników uzyskanych za pomocą Toxkitów z metodami tradycyjnymi, tj. wykorzystującymi hodowle bioindykatorów prowadzone w laboratoriach.

Można przypuszczać, że formy kryptobiotyczne organizmów stanowią przyszłość bioindykacji. Stosowanie tych samych organizmów przez wszystkie laboratoria umożliwi porównywanie wyników analiz. Eliminacja hodowli pozwoli obniżyć koszt badań, ale przede wszystkim udostępni metody bioindykacyjne laboratoriom, które wykonują tego typu testy rzadko i będą mogły zamawiać bioindykatory jak zwykły odczynnik chemiczny.

Istnieją dwa podstawowe rodzaje testów bioindykacyjnych:

- Test przesiewowy (*screen*) odpowiadający na pytanie - czy próbka jest toksyczna? Pozwala on na ocenę dużej ilości nieznanek próbek, np. wody pitnej pochodzącej ze studni leżących na pewnym obszarze;
- Test główny odpowiadający na pytanie - jaka jest toksyczność próbki? Pozwala on na porównanie próbek między sobą oraz pewną charakterystykę toksyczności dotyczącą np. stopnia rozcieńczenia wody, przy którym toksyczność zanika.

Przykłady analiz bioindykacyjnych wykonanych w Zakładzie Badania Środowiska Akademii Medycznej W Warszawie

Testy toksyczności

Microtox® - test wykorzystujący bakterie luminescencyjne *Vibrio fischeri*. Reakcją testową jest obniżenie luminescencji (świecenia) bakterii. Czas inkubacji jest wyjątkowo krótki - tylko 15 minut. Test wykonano wg standardowej procedury producenta [29] przy użyciu analizatora M 500 i liofilizowanych bakterii. Obliczenia wyników dokonano przy zastosowaniu programu producenta: mtx7.exe

Spirotox - test wykorzystujący pierwotniaki *Spirostomum ambiguum* opracowany w Zakładzie Badania Środowiska AM w Warszawie [30]. W teście tym obserwuje się dwa rodzaje reakcji testowych: przyżyciowe deformacje komórki oraz śmierć komórki. Na podstawie wyników obliczane są dwie wartości: EC50 - stężenie wywołujące 50% przyżyciową reakcję testową oraz LC50 - stężenie wywołujące 50% śmiertelną reakcję testową. Standardowy czas trwania testu (inkubacji) wynosi 24 godziny, chociaż w wielu przypadkach reakcje testowe występują już po 2 godzinach.

Protoxkit F™ - Toxkit wykorzystujący pierwotniaka *Tetrahymena thermophila*. Reakcją testową jest inhibicja wzrostu pierwotniaków. Jej miarą jest spadek gęstości pokarmu (bakterii) mierzony spektrofotometrycznie. Jest to test

chroniczny pozwalający w ciągu jedynie 24 godzin ocenić wpływ badanej próbki na kilka pokoleń pierwotniaków. Test wykonano wg procedury producenta Creasel (Deinze, Belgia).

Rotoxkit F™ - Toxkit wykorzystujący wrotka *Brachionus calyciflorus*. Reakcją testową jest śmierć organizmu. Test wykonano wg procedury producenta Creasel (Deinze, Belgia).

Daphtoxkit F™ magna - Toxkit wykorzystujący skorupiaaka *Daphnia magna*. Standardowy test toksyczności przeprowadzony wg zaleceń OECD. Reakcją testową jest zahamowanie ruchu skorupiaków (immobilizacja) obserwowana po 24 i 48 godzinach inkubacji. Test wykonano przy zastosowaniu dafni świeżo wylęgłych z jaj przetrwalnych (Creasel, Deinze, Belgia). Procedura ta umożliwia eliminację ciągłej hodowli organizmów testowych.

Thamnotoxkit F™ - Toxkit wykorzystujący skorupiaaka *Thamnocephalus platyurus*. Reakcją testową jest śmierć skorupiaków. Test wykonano przy zastosowaniu organizmów świeżo wylęgłych z jaj przetrwalnych (Creasel, Deinze, Belgia). Test ten polecany jest jako tańsza alternatywa dla testu Daphnia. W wielu przypadkach test ten jest bardziej czuły na obecność substancji toksycznych niż standardowy test Daphnia.

Wykonanie testów

Test przesiewowy. W naczyniach testowych umieszczono nierozcieńczone próbki. W teście Microtox® do próbek dodano 10-krotnie rozcieńczonego wodnego roztworu NaCl (22%) aby dostosować ciśnienie osmotyczne do wymaganego przez bakterie luminescencyjne (2% NaCl). Kontrolę stanowiły roztwory zalecane przez producentów testów. Następnie wprowadzono bioindykatory i prowadzono testy wg standardowych procedur. Stosowano po 3 powtórzenia testu dla każdej próbki. Po inkubacji w każdej próbce odczytano % reakcji testowych. Wyniki podzielono na 3 kategorie: próbki toksyczne - jeżeli wystąpiło ponad 50% reakcji testowych, niskotoksyczne - 20 - 50 % reakcji testowych i nietoksyczne - poniżej 20% reakcji testowych.

Test zasadniczy. Służy on do porównania stopnia toksyczności próbek. W teście tym ocenia się tylko te próbki, które w teście przesiewowym były toksyczne. W tym celu w naczyniach testowych wykonano szereg rozcieńczeń badanych próbek stosując nietoksyczne roztwory zalecane przez producentów testów, tzw. płyny do rozcieńczeń. Następnie wprowadzono bioindykatory. Po inkubacji w każdym rozcieńczeniu próbki odczytano % reakcji testowych. Na tej podstawie obliczono wartości EC50 (lub LC50), czyli takie stężenia badanych próbek, które powodują powstanie 50% efektu testowego. Dla lepszego zobrazowania wyników wartości EC50 przeliczono na jednostki toksyczności: TU = 100 / EC50.

Badane próbki

1. Gospodarstwa indywidualne województwa kieleckiego. Pobrano 47 próbek wody pitnej ze studni czerpanych oraz 3 próbki ścieków z szamb zlokalizowanych przy gospodarstwach. Probki oceniano przy użyciu 2 testów: Microtox® i Spirotox.
2. Zbiornik wód podziemnych województwa opolskiego. Pobrano 2 serie po 25 próbek pochodzących z piezome-

trów różnej głębokości. Zastosowano baterię wszystkich 6 biotestów prezentowanych w materiałach i metodach.

Próbki wody pobierano do szklanych naczyń, chłodzono do temp. 4°C. Testy wykonywano w ciągu 24 godz.

WYNIKI

Wody ze studni indywidualnych

Wyniki toksyczności testu skринingowego 47 próbek wody pitnej ze studni gospodarstw indywidualnych województwa kieleckiego zamieszczono w Tabeli 1. Na ogólną liczbę 47 próbek wody pitnej jedynie 40% i 68% nie wywoływały reakcji testowych odpowiednio w testach Spirotox i Microtox®. Natomiast aż 30% próbek było toksycznych dla pierwotniaka *Spirostomum ambiguum*. Wszystkie te próbki były toksyczne bądź lekko toksyczne dla bakterii luminescencyjnych. Próbki lekko toksyczne w teście Spirotox nie powodowały obniżenia luminescencji bakterii. Natomiast tylko jedna próbka oddziaływała niekorzystnie na bakterie nie wykazując działania wobec pierwotniaków. Wskazuje to na wyższą wrażliwość pierwotniaków wobec zanieczyszczeń występujących w badanych wodach.

Tabela 1. Toksyczność próbek wody pitnej gospodarstw indywidualnych oceniana w teście skринingowym.

		Microtox®			
		NT	LT	T	Razem
Spirotox	NT	19	1	-	20
	LT	13	-	-	13
	T	-	7	7	14
	Razem	32	8	7	47

^a NT- próbka nietoksyczna

^b LT- próbka lekko toksyczna. Reakcja testowa = 20 - 50 %

^c T - próbka toksyczna. Reakcja testowa > 50%.

W celu oceny stopnia toksyczności próbek toksycznych wykonano test zasadniczy. Szczegółowe wyniki zamieszczono w Tabeli 2.

Próbki wykazywały wyrównaną toksyczność wobec pierwotniaka, TU wynosiło najczęściej 5,6. Jedynie dwie z nich nr 22 i 29 były 2-krotnie bardziej toksyczne. Rozrzut wyników testu Microtox® był większy. W czterech przypadkach test ten był bardziej wrażliwy niż test Spirotox. Najbardziej toksyczną była próbka nr 22, gdzie TU obu bioindykatorów wynosiło powyżej 10.

Tabela 2. Toksyczność próbek wody pitnej gospodarstw indywidualnych oceniana w teście zasadniczym.

Nr próbki	Microtox® - LT	Spirotox	Nr próbki	Microtox® - T	Spirotox
	% I ^a	TU [24h-EC50] ^b		TU [15 min-EC50]	TU [24h-EC50]
20	49	5,6	5	4,4	5,6
21	44	5,6	8	6,8	5,6
27	48	5,6	11	10,9	5,6
31	49	5,6	22	15,1	11,2
37	36	2,8	29	6,5	11,2
42	24	5,6	34	3,5	5,6
43	48	2,8	40	9,7	5,6

^a procent reakcji testowej próbki nierozcieńczonej

^b TU jest jednostką toksyczności, równą 100 / EC50

Ścieki z gospodarstw indywidualnych

Wyniki toksyczności ścieków pochodzących z szamb gospodarstw indywidualnych województwa kieleckiego zamieszczono w Tabeli 3. Toksyczność badanych ścieków dla testu Spirotox była niewiele wyższa niż toksyczność niektórych próbek wody pitnej. Natomiast w przypadku testu Microtox® ściek nr 2 okazał się bardzo toksyczny (TU=10000). Świadczy to o obecności wysokoaktywnych związków bakteriobójczych bądź bakteriostatycznych.

Tabela 3. Toksyczność ścieków z szamb gospodarstw indywidualnych.

Nr	Microtox® TU ^a [15 min-EC50]	Spirotox TU [24h-EC50]
1	10	14
2	10 000	14
3	4,9	6,7

^a TU jest jednostką toksyczności = 100 / EC50

Badane próbki wody i ścieków pochodziły z przypadkowo wybranych gospodarstw województwa kieleckiego. Wg danych Ośrodka Doradztwa Rolniczego (dane nie publikowane) badany obszar charakteryzuje się płytkimi ujęciami wód i bardzo gęstą zabudową wsi przy jednoczesnym braku kanalizacji i nieszczelnych szambach. Rutynowe badania fizykochemiczne wskazują na znaczne zanieczyszczenie wód pitnych azotanami. Nie wykonywano dodatkowych analiz fizykochemicznych mogących pomóc w ustaleniu przyczyn występowania toksyczności. Jednakże wysoka toksyczność ścieków z szamb oraz dane o ich nieszczelności mogą wskazywać na tę drogę zanieczyszczenia wód gruntowych.

Zbiornik wód podziemnych województwa opolskiego

Wyniki toksyczności wód pochodzących z ujęć podziemnych województwa opolskiego zamieszczono w Tabeli 4. Zastosowano baterię 6 biotestów obejmującą: Spirotox, Microtox®, Thamnotoxkit F, Protoxkit F, Rotokit F oraz Daphtoxkit F magna. Pobrano 2 serie po 25 próbek pochodzących z piezometrów różnej głębokości, przy czym za pierwszym razem (1 seria) oceniono toksyczność przy użyciu tylko 3 pierwszych biotestów. Najbardziej wrażliwym biotestem okazał się Spirotox, który zareagował na 30% próbek. Wyniki przedstawiono jako procent reakcji testowej próbki nierozcieńczonej

Tabela 4. Toksyczność próbek wód podziemnych województwa opolskiego w teście skriningowym.

Nr	Spirotox		Microtox®		Thamnotoxkit		Protoxkit	Rotoxkit	Daphtoxkit
1	80	0	0	0	0	40	0	0	0
2	0	0	0	0	0	27	0	0	0
3	33	50	0	0	10	25	0	0	0
4	90	0	0	0	0	22	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	40	0	39	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	25	0	0	0
9	100	50	0	0	100	0	0	0	0
10	100	60	0	0	0	0	0	0	0
11	0	23	0	0	0	21	24	0	0
12	0	100	0	0	0	0	0	0	0
13	0	40	0	0	0	0	0	100	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	100	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	100	100	85	100	100	100	0	100	100
22	50	20	0	0	0	26	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	60	70	0	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Najmniej wrażliwy był Protoxkit F, dla którego lekko toksyczna była tylko jedna próbka. Przyczyną tego może być niska wrażliwość pierwotniaka na występujące zanieczyszczenia, bądź obniżona biodostępność toksyn wskutek ich adsorpcji na zawieszanie pokarmu dodawanej w tym teście. Próbka nr 21 była bardzo toksyczna dla wszystkich bioindykatorów (z wyjątkiem pierwotniaka *Tetrahymena termophila*). W celu oceny stopnia toksyczności tej próbki przeprowadzono test zasadniczy - z rozcieńczeniami. Najsilniej zareagowały skorupiaki w teście Thamnotoxkit F, toksyczność wyniosła TU = 20. Dwukrotnie mniej wrażliwe okazały się bakterie luminescencyjne TU = 10, 4-krotnie pierwotniaki w teście Spirotox TU = 5,6, a 10-krotnie mniej wrażliwe były skorupiaki Daphnia i wrotki, dla których TU = 2. Przeprowadzone szczegółowe analizy chemiczne tej próbki wykazały obecność jonów Zn^{2+} w stężeniu 4,6 mg/L. Mogą one być jedną z przyczyn toksyczności, ale nie jedyną, gdyż wartości EC50 dla jonów cynku wynoszą: 0,4 mg/L dla testów Spirotox i Thamnotoxkit F oraz 2 mg/L dla testu Microtox® (Zakład Badania Środowiska AM, Warszawa materiały niepublikowane). W badanej wodzie prawdopodobnie występują inne niezidentyfikowane substancje toksyczne dla bioindykatorów, bądź zwiększające toksyczność cynku.

PODSUMOWANIE

W części eksperymentalnej zaprezentowano dwie analizy bioindykacyjne wód pitnych oraz analizę ścieków

bytowych. Zaobserwowano niespodziewanie wysoką toksyczność badanych próbek wód, zwłaszcza dla pierwotniaka *Spirostomum ambiguum*. Uzyskane wyniki wskazują na konieczność podjęcia szeroko zakrojonych badań studni wiejskich. Obok rutynowych analiz fizykochemicznych powinny być zastosowane testy bioindykacyjne, nie w celu ich zastąpienia, ale wskazania, na które próbki należy zwrócić szczególną uwagę. Przeprowadzona analiza 3 ścieków bytowych wskazuje, iż mogą one być bardzo poważnym, choć obecnie lekceważonym źródłem toksycznych zanieczyszczeń środowiska. Coraz szersze stosowanie środków biobójczych (środków dezynfekcyjnych, antybiotyków itp.) w gospodarstwach indywidualnych może zaburzyć procesy oczyszczania ścieków zarówno w wodach powierzchniowych jak i oczyszczalniach biologicznych.

Nie stwierdzono korelacji pomiędzy wynikami uzyskanymi dla różnych bioindykatorów. Konieczne jest więc stosowanie baterii testów bioindykacyjnych obejmującej organizmy należące do różnych grup.

WYKAZ SKRÓTÓW

ChZT	- chemiczne zapotrzebowanie na tlen
OWO	- ogólny węgiel organiczny
ASTM	- American Society for Testing and Materials
APHA	- American Public Health Association
USEPA	- United States Environmental Protection Agency
ECETOX	- Europejskie Centrum Ekotoksykologii

- OECD - *Organization for Economic Cooperation and Development*
 ISO - *International Organization for Standardization*
 EC50 - stężenie powodujące powstanie 50% przyżyciowego efektu testowego
 LC50 - stężenie powodujące powstanie 50% śmiertelnego efektu testowego

BIBLIOGRAFIA

- Rand G.M., Wells P.G., McCarty L.S. (1995). Introduction to aquatic toxicology. [w]: [ed.] Rand G.M. Fundamentals of aquatic toxicology. 2nd Ed. Taylor & Francis. Washington. s. 3-70.
- Persoone G., Gillett J. (1990). Toxicological versus ecotoxicological testing. [w]: [ed.] P. Bourdeau Short-term toxicity tests for non-genotoxic effects. SCOPE. John Wiley & Sons. Ltd.
- Cairns J. Jr. (1982). Biological monitoring in water pollution, Pergamon Press.
- Słomczyńska B. (1988). Metody określania toksyczności zanieczyszczeń wprowadzanych do wód. Wiadomości Ekologiczne 34, 307-323.
- APHA (1989). "Standard methods for the examination of water and wastewater". 17th ed. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation - Washington DC. Rozdz. 8.
- Persoone G., Janssen C.R (1993). "Freshwater invertebrate toxicity tests". [w]:ed. Calow P. Handbook of Ecotoxicology Vol. 1, Chapter 4. Blackwell Scientific Publ.
- ECETOX (1993). Technical Report 56. Aquatic toxicity data evaluation. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals. Brussels.
- Buikema A.L.Jr., Niederlehner B.R., Cairns J. Jr. (1982). Biological Monitoring. Part IV. Toxicity testing. Water Res. 16, 239-262.
- OECD 203. (1997). Wytyczna OECD do badań substancji chemicznych. "Ryby, badanie toksyczności ostrej". Instytut Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego. Sosnowiec.
- ISO 7346-1996. Water quality - Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)].
- Lewis M.A. (1995). Algae and vascular plant tests. [w]: [ed.] Rand G.M. Fundamentals of aquatic toxicology. 2nd Ed. Taylor & Francis. Washington. s.135-170.
- ISO 8692-1994. Water quality - Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*.
- OECD 201. (1997). Wytyczna OECD do badań substancji chemicznych. "Glony, badanie hamowania wzrostu". Instytut Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego. Sosnowiec.
- ISO 6341-1996. Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea).
- OECD 202. (1997). Wytyczna OECD do badań substancji chemicznych. "Daphnia, ostry test unieruchomienia i badanie rozmnażania". Instytut Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego. Sosnowiec.
- EC-C2 (1992). Methods for the determination of ecotoxicity. "Acute toxicity for *Daphnia*". Official Journal of the European Communities. L 383 A/172.
- EC-C1 (1992). Methods for the determination of ecotoxicity. "Acute toxicity for fish". Official Journal of the European Communities. L 383 A/169.
- EC-C3 (1992). Methods for the determination of ecotoxicity. "Algal inhibition test". Official Journal of the European Communities. L 383 A/179.
- ISO 10712-1995. Water quality - *Pseudomonas putida* growth inhibition test.
- ISO 113480. Water quality - Determination of the inhibitory effects of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri*. (Luminescent bacteria test).
- Słomczyńska B. (1997). Testy toksykologiczne w pracach ISO (Międzynarodowej Organizacji Normalizacyjnej). [w]: Kańska Z., Gromiec M. [ed.] Badania toksykologiczne w ochronie wód. IAWQ. Warszawa 69 - 79.
- Abram F.S.H. (1993). Invertebrates - Their use in marine and estuarine monitoring. [w]: Richardson M. [ed.] Ecotoxicology monitoring. VCH Weinheim. s. 59-69.
- Suess M.J. (1982). Examination of water for pollution control. A reference handbook. Vol. 3. WHO. Copenhagen. Pergamon Press, 251-255.
- Bulich A.A.(1982). A practical and reliable method for monitoring the toxicity of aquatic samples. Process. Biochem. 17, 45-47.
- Kaiser K.L.E., Esterby S.R. (1991). Regression and cluster analysis of the acute toxicity of 267 chemicals to six species of biota and the octanol/water partition coefficient. Sci. Total. Environ. 109/110, 499-514.
- Persoone G. (1992). Cyst - based toxicity tests: I. A promising new tool for rapid and cost-effective toxicity screening of chemicals and effluents. Zeitschr. für Angew. Zool. 79, 17-36.
- Persoone G. (1992). Cyst - based toxicity tests: VI. Toxkits and Fluotox tests as cost-effective tools for routine toxicity screening. str. 563-576. [w]: K.G. Steinhauser, P.D. Hansen. Biologische Testverfahren. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Calleja M.C., Persoone G. (1992). Cyst - based toxicity tests: IV. The potential of ecotoxicological tests for the prediction of acute toxicity in man as evaluated on the first ten chemicals of the MEIC programme. ATLA. 20, 395-405.
- Microtox manual. Microbics Corporation, 1992.
- Nałęcz-Jawecki G., Sawicki J. (1998). Toxicity of inorganic compounds in the Spirotox test - a miniaturized version of the Spirostomum ambiguum test. A. Environ. Contam. Toxicol. 34, 1-5.