

Słowa kluczowe: WWA, stężenia bezpieczne, mikrokosm

Monika ZAŁĘSKA-RADZIWIŁŁ, Maria ŁEBKOWSKA, Radosław KALINOWSKI

OCENA WPLYWU BEZPIECZNYCH STĘŻEŃ WYBRANYCH WWA NA BIOCENOZY WODNE

W pracy dokonano weryfikacji wpływu „bezpiecznych” stężeń naftalenu, fenantrenu, antracenu i pirenu (obliczonych na podstawie jednogatunkowych testów toksykologicznych) na biocenozy w modelowym, laboratoryjnym ekosystemie wodnym typu mikrokosm. Ocenę zmian strukturalnych i funkcjonalnych w ekosystemach przeprowadzono na podstawie analizy ilościowej i jakościowej fito- i zooplanktonu, osadu dennego, wzrostu roślin naczyniowych, oznaczeń enzymatycznych, mikrobiologicznych i wskaźników fizyczno-chemicznych. W końcowym okresie trwania badań zaobserwowano rozwój glonów, głównie zielenic *Scenedesmus quadricauda* i *Selenstrum capricornutum* a w niektórych próbkach także i *Chlorella vulgaris*. W warunkach doświadczeń licznie rozwijały się *Heterocypris inconguretus* i *Brachionus calyciflorus*. Nie zaobserwowano wystąpienia efektów letalnych u ryb *Lebistes reticulatus*. Analiza mikroskopowa osadu dennego wykazała obecność licznych pierwotniaków zarówno w próbkach kontrolnych jak i z dodatkiem WWA. Aktywność enzymatyczna osadu dennego charakteryzowała się fluktuacjami, zależnie od dopływu substratów pokarmowych pochodzących z obumierania organizmów. Na podstawie badań mikrobiologicznych stwierdzono, że liczebność bakterii w wodzie obniżyła się o rząd wielkości we wszystkich próbkach badanych i w kontrolnych w okresie 14-42 dni w porównaniu z ich ilością wykrytą w czasie pierwszych 7 dni doświadczeń. Liczebność grzybów na ogół uległa znacznemu obniżeniu w czasie eksperymentu. Reasumując wyniki badań uzyskane w 42 dniowym eksperymencie przeprowadzonym w modelowym ekosystemie wodnym, należy stwierdzić, że wyznaczone na podstawie jednogatunkowych testów toksykologicznych stężenia „bezpieczne” badanych WWA nie wpłynęły negatywnie na strukturę i funkcjonowanie biocenoz mikrokosmów wodnych.

1. WPROWADZENIE

Występowanie WWA we wszystkich elementach środowiska – w powietrzu, w wodzie, w glebie oraz w osadach dennych powoduje, że narażenie na ich działanie ma charakter powszechny. Informacje dotyczące toksyczności ostrej WWA w stosunku do organizmów ekosystemów wodnych są jednak niepełne i wykazują rozbieżności w uzyskiwanych wynikach badań.

* Politechnika Warszawska, Zakład Biologii

Baza danych ECOTOX [1] podaje wartości stężeń letalnych i efektywnych, które różnią się nawet o 3 rzędy wielkości dla tego samego bioindykatora i punktu końcowego testu.

W doniesieniach naukowych praktycznie brak jest również informacji dotyczących wpływu tych związków na wielogatunkowe układy typu mikro- czy mezokosm. Jednocześnie wiadomo, że jednogatunkowe testy toksykologiczne dostarczają informacji o względnej toksyczności związków i względnej wrażliwości organizmów a wykorzystywanie wyników tych testów do oceny ryzyka na poziomie ekosystemu jest niemiarodajne. Badania wielogatunkowe przyczyniają się do zmniejszania niepewności wynikającej z ekstrapolacji danych, umożliwiają walidację wyników z badań laboratoryjnych, a także ułatwiają obserwację zmian strukturalnych i funkcjonalnych biocenoz w warunkach realistycznego narażenia oraz pomiar efektów pośrednich i zdolność do regeneracji populacji czy zbiorowisk [12].

Badania wielogatunkowe w mikro- i mezokosmach stosowane są także do weryfikacji stężeń „bezpiecznych” związków chemicznych wyznaczonych na podstawie baterii jednogatunkowych testów toksykologicznych, co łącznie z szacowaniem ryzyka ma istotne znaczenie w ocenie oddziaływania zanieczyszczeń na ekosystemy wodne.

2. CEL I ZAKRES

Celem pracy była ocena wpływu „bezpiecznych” stężeń naftalenu, fenantrenu, antracenu i pirenu (obliczonych na podstawie jednogatunkowych testów toksykologicznych) na biocenozy w modelowym, laboratoryjnym ekosystemie wodnym typu mikrokosm.

Zakres badań obejmował ocenę zmian strukturalnych i funkcjonalnych na podstawie następujących oznaczeń:

- hydrobiologicznych (analiza ilościowa fito- i zooplanktonu, osadu dennego, kontrola wzrostu roślin naczyniowych),
- mikrobiologicznych (ogólna liczba bakterii, ogólna liczba grzybów)
- enzymatycznych (aktywność dehydrogenazowa mikroorganizmów osadu dennego),
- fizyczno–chemicznych (temperatura, odczyn, azot amonowy, azot azotynowy, azot azotanowy, fosforany, chlorki, ChZT, całkowity węgiel organiczny, oznaczenia chromatograficzne).

3. METODYKA

3.1. BADANE ZWIĄZKI

Do badań użyto wybrane wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne – naftalen ($C_{10}H_8$), fenantren ($C_{14}H_{10}$), antracen ($C_{14}H_{10}$) i piren ($C_{16}H_{10}$), o czystości >95% pochodzących z firmy Merck. Roztwory podstawowe związków przygotowano w acetonie o 99,9% czystości (POCH).

3.2. OBLICZENIE STĘŻEŃ BEZPIECZNYCH

Stężenia letalne i efektywne związków użyte do dalszych obliczeń zostały wyznaczone we wcześniejszych badaniach ekotoksyczności prowadzonych w Zakładzie Biologii [16]. Stężenia bezpieczne dla biocenoz wodnych obliczono zmodyfikowaną metodą Załęskiej-Radziwiłł [15] wg wzoru (1):

$$C_{\delta} = \exp(x_m - k \cdot S_m) \quad (1)$$

gdzie: C_{δ} - stężenie niebezpieczne dla δ frakcji gatunków

x_m - średnia arytmetyczna x_i

x_i - $\ln(\text{NOEC})$ i-tego gatunku

$$k = \frac{1}{\sqrt{\delta}}$$

δ - frakcja gatunków w środowisku, których NOEC może być niższe od C_{δ}

S_m - próbkowe odchylenie standardowe x_i

Stężenie NOEC zdefiniowano jako

$$\text{NOEC} = \frac{\text{LC}(\text{EC})50-t}{\text{ACR}} \quad (2)$$

gdzie: NOEC – najwyższe stężenie nie powodujące obserwowalnych zmian u bioindykatorów w porównaniu z kontrolą.

LC(EC)50-t – stężenie letalne (efektywne) powodujące śmiertelność (lub inne efekty) u 50% osobników w porównaniu z kontrolą, po czasie t trwania testu.

Zgodnie z danymi literaturowymi dotyczącymi ekstrapolacji pomiędzy toksycznością ostrą a chroniczną dla wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych przyjmuje się $\text{ACR}=5$ [3].

3.3. MODELOWE EKOSYSTEMY WODNE TYPU MICROCOSM

Akwaria o pojemności 10 dm³ napełniono wodą uzdatnioną po biofiltrze, zasiedlono roślinami: *Lemna minor* i *Elodea canadensis* oraz glonami *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella vulgaris*, organizmami zwierzęcymi: *Daphnia magna*, *Thamnocephalus platyurus*, *Brachionus calyciflorus*, *Heterocypris inconguretus*, rybami *Lebistes reticulatus*, oraz w wydzielonych krystalizatorach organizmami osadu czynnego. Po 2 tygodniach okresu adaptacji do akwariów wprowadzono obliczone stężenia „bezpieczne” związków. Po 3 tygodniach badań dokonano ponownej aplikacji wytypowanych stężeń. Łączny czas badań wynosił 6 tygodni.

3.4. OZNACZENIA CHEMICZNE

Oznaczenie biochemicznego zapotrzebowania tlenu (BZT5) wykonano metodą manometryczną przy użyciu systemu OxiTop.

Oznaczenie chemicznego zapotrzebowania tlenu (ChZT_{Cr}) wykonano zgodnie z PN-74C-04578-03 [8].

Oznaczenie ogólnego węgla organicznego (OWO) wykonano metodą spektrofotometryczną w aparacie TOC5000 [13].

Oznaczenie azotu amonowego wykonano metodą kolorymetryczną z odczynnikiem Nesslerera [7].

Oznaczenie azotu azotanowego wykonano metodą kolorymetryczną z kwasem sulfanilowym i α -naftyloaminą [5].

Oznaczenie azotu azotanowego wykonano metodą kolorymetryczną z kwasem fenylodwusulfonowym [6].

Oznaczenie rozpuszczalnych ortofosforanów wykonano metodą kolorymetryczną z molibdenianem amonowym i chlorkiem cynawym [4].

Oznaczenie chlorków wykonano metodą argentometryczną wg Mohra [11].

Oznaczenie temperatury wykonano przy użyciu termometru rtęciowego.

Oznaczenie odczynu wykonano metodą elektrometryczną przy użyciu pehametru z elektrodą wskaźnikową typ pH/CONDUCTIVITY METER, CPC-501.

3.5. OZNACZENIA ZAWARTOŚCI WWA W WODZIE

Pobrane próbki wody przygotowywano do analizy zgodnie z PN-EN ISO 17993:2005 z modyfikacją dotyczącą ekstrahenta [10]. Oznaczenia zawartości wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w wodzie wykonywane były metodą chromatografii gazowej na aparacie Hewletta Packarda 5890A przy zastosowaniu kolumny SPB-1 (Supelco 60m x 0,32 mm x 1 μ m). Wyniki podano w μ g/dm³.

3.6. ANALIZY MIKROBIOLOGICZNE

Analizy mikrobiologiczne obejmowały oznaczenie ogólnej liczby bakterii w próbkach wody, metodą płytkową Kocha na podłożu agarowym odżywczym MPA metodą posiewu głębinowego. Ogólną liczbę grzybów oznaczono na podłożu Sabourauda metodą posiewu powierzchniowego [2]. Wynik podano w JTK/cm³.

3.7. ANALIZA ZMIAN JAKOŚCIOWYCH I ILOŚCIOWYCH ORGANIZMÓW PLANKTONU I MIKROBENTOSU

Wykonano analizę mikroskopową próbek planktonu i osadu dennego (po odpowiednim rozcieńczeniu) w komorach Sedgwick-Raftera przy powiększeniu 100 krotnym. Wynik podano jako liczbę organizmów w 1 cm³.

3.8. OCENA AKTYWNOŚCI DEHYDROGENAZOWEJ ORGANIZMÓW OSADU CZYNNEGO

Test TTC przeprowadzono zgodnie z metodyką PN-87C-04616/08 [9]. Aktywność organizmów wyrażono w μ katalach/kg białka w warunkach endogennych jak i z dodatkiem łatwo przyswajalnego substratu – glukozy.

3.9. ANALIZA ZMIAN ILOŚCIOWYCH ROŚLIN NACZYNIOWYCH

Określono przyrost długości i masy *Elodea canadensis* oraz przyrost powierzchni i ilości listków *Lemna minor*. Pomiaru powierzchni dokonano przy użyciu oprogramowania komputerowego do cyfrowej analizy obrazu ImageTool wersja 3.0 [14]. Obserwowane zmiany parametrów wzrostu roślin w czasie wyrażono w % i odniesiono do próby kontrolnej.

4. WYNIKI BADAŃ

Wyniki jednogatunkowych testów toksykologicznych przeprowadzonych z użyciem wybranych związków na przedstawicielach łańcucha troficznego ekosystemu wodnego przedstawiono w tabeli (tab. 1).

Na podstawie wyznaczonych wartości LC(EC)50-t obliczono stężenia bezpieczne tych związków dla biocenoz wodnych (tab. 2).

Badane związki w niewielkim stopniu wpłynęły na zmiany wskaźników zanieczyszczenia wody mikrokosmu. Na zwiększone wartości ChZT i TOC w końcowym okresie trwania badań w porównaniu z okresem początkowym miał wpływ rozwój glonów, głównie zielenic *S. quadricauda* i *S. capricornutum*, a w niektórych próbkach także i *C. vulgaris*. Wartości ChZT osiągały poziom na ogół 30–60 mgO₂/dm³. Nie stwierdzono widocznych przemian związków azotowych. W okresie 21–42 dni trwania eksperymentu stężenie azotu amonowego było w granicach od 0,01 do na ogół 0,05 mgN_{NH4}/dm³ a azotu azotanowego najczęściej 0,1–0,9 mgN_{NO3}/dm³. Zawartość fosforanów była w granicach około 2–4 mg PO₄/dm³. Wartości BZT₅ w omawianym okresie wynosiły od 5 do 25 mgO₂/dm³. Odczyn prób był lekko zasadowy i wynosił około 8. Oznaczenia chromatograficzne nie wykazały obecności WWA w wodzie.

Aktywność enzymatyczna osadu dennego wykazywała fluktuacje, zależnie od dopływu substratów pokarmowych pochodzących z obumierania organizmów. W każdym przypadku w próbkach z dodatkiem glukozy była wyższa niż w próbach endogennych, co świadczy o niedoborach w środowisku wodnym mikrokosmów łatwo przyswajalnych źródeł węgla dla mikroorganizmów.

Analiza mikroskopowa osadu dennego wykazała obecność licznych pierwotniaków zarówno w próbkach kontrolnych jak i z dodatkiem WWA. Szczególnie licznie, w ostatnim okresie badań, występowały rodzaje *Arcella* i *Coleps* w próbkach zawierających antracen i fenantren – ich liczebność sięgała od 12000 do 19000 osobników w cm³ oraz dość licznie w próbce z naftalenem; mniejsze ich ilości wykrywano w obecności pirenu – około 5000 osobników w cm³. W próbkach kontrolnych ilość tych pierwotniaków wynosiła średnio około 3000 osobników w cm³ (*Arcella*) i 1000 osobników w cm³ (*Coleps*). Spośród innych orzęsków w próbkach z antracem i fenantrenem licznie występował rodzaj *Aspidisca*. Wykrywano także wrotki, ale głównie w początkowym okresie badań. Podkreślić należy, że najwięcej

organizmów w ostatnim dniu badań zaobserwowano w próbkach z antracemem i fenantrenem, mniej w obecności pozostałych WWA i w próbkach kontrolnych.

Badania mikrobiologiczne wykazały, że liczebność bakterii obniżyła się o rząd wielkości we wszystkich próbkach badanych i w kontrolnych w okresie 14–42 dni w porównaniu z ich ilością stwierdzaną w czasie pierwszych 7 dni doświadczeń. W końcowym okresie badań ilość mikroorganizmów była w granicach $0,8\text{--}2,2 \cdot 10^4$ JTK/cm³ (początkowo $43\text{--}44 \cdot 10^4$ JTK/cm³). Świadczyło to o niewielkiej dostępności substratów pokarmowych dla mikroorganizmów, prawdopodobnie pochodzących z rozkładu martwych komórek innych organizmów czy fekalii. Nie stwierdzono wpływu dodatku WWA na wzrost liczebności drobnoustrojów. Liczebność grzybów także uległa znacznemu obniżeniu w czasie eksperymentu z nielicznymi wyjątkami w 42 dniu badań.

W trakcie badań obserwowano przyrost masy i długości moczarki z wyjątkiem próbek z 42 dnia zawierającymi antracem i fenantren. Przypuszczać należy, że na ten fakt miał wpływ intensywny rozwój glonów konkurujących o światło. We wszystkich próbkach stwierdzono intensywny rozwój rzęsy drobnej osiągający nawet więcej niż 8000% (naftalen - w zakresie przyrostu listków).

Badania hydrobiologiczne wykazały, że liczebność glonów ulegała fluktuacjom osiągając najwyższy przyrost w okresie 12–28 dni trwania badań (próbki kontrolne oraz z antracemem i fenantrenem), a w całym okresie doświadczeń w obecności pirenu. Nie stwierdzono hamowania rozwoju glonów w obecności WWA, a raczej pewną tendencję do stymulacji wzrostu. Nie stwierdzono wpływu WWA na organizmy zwierzęce w wodzie badanych mikrokosmów. W warunkach doświadczeń licznie rozwijały się *Heterocypris inconguretus* i *Brachionus calyciflorus*. Nie zaobserwowano wystąpienia efektów letalnych u ryb *Lebistes reticulatus*.

Tab. 1. Wyniki jednogatunkowych testów toksykologicznych dla wybranych WWA [28]

Organizm testowy	Rodzaj testu	Czas trwania testu	LC(EC50)-t (95% przedziały ufności) [mg/l]			
			Naftalen	Fenantren	Antracen	Piren
<i>Lebistes reticulatus Peters</i>	Przeżywalności	96 h	138,11 (97,66-195,31)	22,87 (3,52-148,70)	141,42 (100,00-200,00)	176,78 (12,64-2472,84)
<i>Chironomus sp.</i>	Przeżywalności	48 h	74,98 (52,99-106,11)	56,33 (44,00-72,11)	6,4 (6,19-6,61)	197,7 (181,40-215,45)
<i>Tubifex tubifex</i>	Przeżywalności	48 h	166,70 (87,02-319,35)	191,21 (185,87-196,71)	15,69 (11,28-21,82)	156,54 (153,30-159,84)
<i>Artemia salina</i>	Przeżywalności	24 h	623,26 (277,95-1428,42)	22,91 (13,39-39,22)	10,87 (4,26-27,72)	47,43 (24,98-90,08)
<i>Daphnia magna Strauss</i>	Przeżywalności	48 h	53,99 (38,57-75,56)	40,05 (36,62-43,80)	30,44 (26,46-35,01)	107,81 (106,71-108,92)
	Enzymatyczny – FLUOTOX	1 h	0,71 (0,40-1,26)	0,17 (0,10-0,30)	8,81 (5,36-14,51)	7,77 (6,93-8,72)
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Wzrostowy	72 h	775,51 (469,94-1279,77)	3,81 (0,25-58,82)	7,09 (3,50-14,34)	19,05 (9,04-40,13)
<i>Vibrio fischeri</i>	Enzymatyczny – LUMISTox	15 min	17,88 (14,04-22,77)	2,11 (1,42-3,14)	0,67 (0,40-1,13)	2,27 (0,50-10,32)

Tab. 2. Wartości stężeń bezpiecznych dla wybranych WWA uzyskane ze zmodyfikowanego modelu Załęskiej-Radziwiłł

Związek	Stężenie bezpieczne [µg/dm ³]
Naftalen	0,654
Fenantren	0,108
Antracen	2,494
Piren	5,195

5. WNIOSEK KOŃCOWY

Reasumując wyniki badań uzyskane w 42 dniowym eksperymencie przeprowadzonym w modelowym ekosystemie wodnym, należy stwierdzić, iż wyznaczone na podstawie jednogatunkowych testów toksykologicznych stężenia „bezpieczne” badanych WWA nie wpłynęły negatywnie na strukturę i funkcjonowanie biocenozy mikrokosmów wodnych.

LITERATURA

- [1] Environmental Protection Agency ECOTOX Database, <http://www.epa.gov/ecotox/>.
 [2] Grabińska-Loniewska A. 1999. *Ćwiczenia laboratoryjne z mikrobiologii ogólnej*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa.

- [3] Neff J.M., Stout S.A., Gunstert D.G., (2005), *Ecological risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons In sediments: identifying sources and ecological hazard*, Integrated Environmental Assessment and Management, 1, 1, 22-33.
- [4] PN-C-04537-02:1973, *Woda i ścieki – Badania zawartości związków fosforu – Oznaczenie rozpuszczalnych ortofosforanów – Metoda kolorymetryczna przy użyciu molibdenianu amonowego i chlorku cynawego jako czynnika redukującego.*
- [5] PN-C-04576-06:1973, *Woda i ścieki. Badania zawartości związków azotu. Oznaczenie azotu azotanowego metodą kolorymetryczną z kwasem sulfanilowym i 1-naftyloaminą.*
- [6] PN-C-04576-08:1973, *Woda i ścieki – Badania zawartości związków azotu – Oznaczenie azotu azotanowego – Metoda kolorymetryczna z kwasem fenolodwusulfonowym.*
- [7] PN-C-04576-4:1994, *Woda i ścieki. Badania zawartości związków azotu. Oznaczenie azotu amonowego w wodzie metodą bezpośredniej nessleryzacji.*
- [8] PN-C-04578-03:1974, *Woda i ścieki. Badania zapotrzebowania tlenu i zawartości węgla organicznego. Oznaczenie chemicznego zapotrzebowania tlenu (ChZT) metodą dwuchromianową.*
- [9] PN-C-04616-08:1982, *Woda i ścieki. Badania specjalne osadów. Oznaczenie aktywności dehydrogenaz w osadzie czynnym metodą spektrofotometryczną z TTC.*
- [10] PN-EN ISO 17993:2005, *Jakość wody. Oznaczenie 15 wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) w wodzie metodą HPLC z detekcją fluorescencyjną po ekstrakcji cieczy-ciecz.*
- [11] PN-ISO 9297:1994, *Jakość wody. Oznaczenie chlorków. Metoda miareczkowania azotanem srebra w obecności chromianu jako wskaźnika (Metoda Mohra).*
- [12] Streloke M. (2002). *Objectives and design of aquatic field microcosm studiem for pesticide registration. Notes from technical workshop: Regulatory evaluation of aquatic microcosm studies with pesticides.* Brighton, UK.
- [13] TOC Instruction Manual. *Total Organic Carbon Analyzer Model TOC 5000*, Shimadzu Corporation, Environmental Analyzers Plant, Analytical Instruments Division.
- [14] UTHSCSA ImageTool, Version 3.0 Final, <http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>.
- [15] Załęska-Radziwiłł M., (1999), *Wyznaczanie bezpiecznych stężeń zanieczyszczeń w wodach powierzchniowych na podstawie testów toksykologicznych*, Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych, 18, 491-501.
- [16] Załęska-Radziwiłł M., Kalinowski R. (2006), *Badanie toksyczności wybranych WWA*, Praca Statutowa PW, 504G/1112/0014/06.

ECOTOXICOLOGICAL ASSESSMENT OF PAHS SAFETY CONCENTRATIONS – AQUATIC MICROCOSM STUDY

The aim of this study was to verify naphthalene, anthracene, phenantrene and pyrene safety concentrations calculated using single species toxicity tests in model, laboratory microcosm ecosystem. Changes in structure and functionality were evaluated based on phyto- and zooplankton, sediments, macropytes, enzymatic reactions, microbiological and physico-chemical parameters. In the late period of this study increase of algae, mainly Chlorophyta - *Scenedesmus quadricauda* and *Selenstrum capricornutum* and sometimes also *Chlorella vulgaris* was observed. High growth of *Heterocypris inconguretus* and *Brachionus calyciflorus* was pointed out. No lethality of fish *Lebistes reticulatus* was observed. Microscopic analysis of sediments showed many protozoan species both in control and treated samples. Enzymatic activity of sediment fluctuated according to fluxes of food substrates. Based on microbiological analysis it was pointed out that the number of bacteria decreased by order of magnitude in all samples. Number of fungi highly decreased during 42 days of study. Results indicate that the calculated safety concentrations based on single species toxicity tests did not have negative influence on structure and functionality of microcosms.