

mgr inż. Grzegorz Pasternak, prof. dr hab. Barbara Kołwzan,
dr inż. Andrzej M. Dziubek

Wydział Inżynierii Środowiska Politechniki Wrocławskiej
Wybrzeże S. Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław
Faculty of Environmental Engineering, Wrocław University of Technology

ZASTOSOWANIE TESTU MICROTOX DO OCENY JAKOŚCI WODY I ŚCIEKÓW

UTILIZATION OF MICROTOX TOXICITY ASSAY IN WATER AND WASTEWATER QUALITY ASSESSMENT

Streszczenie

Zanieczyszczenie wody i ścieków ma charakter niejednorodny, a charakterystyka składu ilościowego i jakościowego zawartych w nich zanieczyszczeń nigdy w pełni nie obrazuje ich szkodliwości w stosunku do organizmów żywych. Z tego względu obiektywną ocenę stopnia zagrożenia środowiska wodnego różnymi zanieczyszczeniami dają jedynie badania toksykologiczne. Spośród różnych metod badań jakościowych na uwagę zasługuje zestaw testów systemu Microtox, gdzie w charakterze bioindykatora zostały zastosowane bakterie luminescencyjne *Vibrio fischeri*. Bakterie te w normalnych warunkach około 10% metabolizmu zużywają na wytwarzanie energii świetlnej, natomiast w obecności substancji toksycznych ich bioluminescencja zmniejsza się wraz ze wzrostem toksyczności ogólnej badanej próbki. Prosta konstrukcja tego testu pozwala na badanie różnego rodzaju próbek środowiskowych, takich jak woda, ścieki, gleba itp.

W pracy przedstawiono wyniki analizy przydatności testu Microtox do oceny jakości wody i ścieków. Badane próbki pochodziły z różnych etapów ich oczyszczania. Określono wpływ procesów oczyszczania na zmianę toksyczności próbek, a także podjęto próbę wskazania związku odpowiedzialnego za toksyczność wody i ścieków, korzystając z analiz toksykologicznych i instrumentalnych oraz posługując się metodami statystycznymi. Zastosowanie testu Microtox do oceny postępu procesu oczyszczania wód wykazało jego dużą przydatność, a uzyskane wyniki obrazują w sposób wiarygodny przebieg procesu technologicznego. Szybkość z jaką otrzymuje się wyniki analizy toksyczności sprawia, że korekta procesu technologicznego może następować bardzo szybko, umożliwiając uzyskanie odpowiednich wyników w krótkim czasie. Wykazano ponadto, że w przypadku próbek środowiskowych, korzystając z metod statystycznych, można wskazać związki stanowiące składnik mieszaniny odpowiedzialny za toksyczność danej próbki.

Abstract

Water and wastewater contamination is known to be heterogeneous. The qualitative and quantitative characteristics of pollutants present in sample is never sufficient for determination of its interaction with living forms. Due to this reason, the best solution to evaluate the risk connected with different pollutants in aquatic environment is a toxicological study. Among all of available toxicity assays, the Microtox method is worth to note. In this method bacterial strain called *Vibrio fischeri* is used as an bioindicator. In typical conditions, these bacteria use approximately 10% of metabolism for

luminous energy. However, in the presence of toxic compounds the luminescence ratio is decreasing proportionally to pollutant concentration. The simple construction of Microtox system lets to test different types of samples like water, effluents soil and others.

In this paper the results of suitability analysis of Microtox system in water and wastewater quality assessment is presented. The samples tested in this study were derived from different stages of treatment processes. The influence of different stages of treatment process on toxicity of the samples was assessed. Moreover, authors of this paper made an attempt to indicate the compound responsible for toxicity of tested samples. This was done by using toxicological study, chemical analysis and statistical evaluation. The application of Microtox system in treatment process assessment appears to be a good method to monitor its efficiency. The Microtox assay may be done rapidly and therefore, changes in technological conditions of treatment plant may be done very fast, as a consequence. Moreover, in case of environmental samples it is possible to indicate the compound responsible for toxicity of particular sample.

1. WSTĘP

Zanieczyszczenie środowiska ma charakter niejednorodny. Duże zróżnicowanie składu ilościowego i jakościowego zanieczyszczeń oraz ich wzajemne oddziaływanie utrudnia jednoznaczną ocenę istniejącego stanu zagrożenia, przewidywanie skutków skażenia. Pojawiają się problemy z doбором odpowiednich metod analitycznych służących do wykrywania i szacowania ilości występujących w środowisku substancji zanieczyszczających [4]. Techniki analityczne służące do kontroli zanieczyszczeń chemicznych są kosztowne, czasochłonne i ograniczone do testów laboratoryjnych. Koszt jest mniejszy, kiedy wymagane jest ilościowe określenie znanego zanieczyszczenia, jednak znacznie rośnie przy analizach jakościowych i ilościowych próbek wieloskładnikowych. Charakterystyka składu ilościowego i jakościowego zanieczyszczeń nigdy nie obrazuje w pełni szkodliwości zanieczyszczeń w stosunku do organizmów żywych [2]. Obiektywną ocenę stopnia zagrożenia dają jedynie badania toksykologiczne.

Na uwagę zasługuje zestaw testów systemu Microtox, które wykorzystują do oceny toksyczności bakterie luminescencyjne zdolne do emitowania światła (*Photobacterium (vibrio) fisheri*, *P. phosphoreum* i *Beneckea harleyi*). W systemie transportu elektronów u tych bakterii lucyferaza katalizuje utlenienie zredukowanego substratu (zredukowanego mononukleotydu flawinowego, fosforanu ryboflawinowego lub dwunukleotydu flawinowo-adeninowego), a podczas tego procesu zachodzi luminescencja świetlna mierzona za pomocą fotometru [1]. Pozostałe substraty uczestniczące w tej reakcji to tlen i długołańcuchowy aldehyd. W normalnych warunkach bakterie testowe około 10% energii zużywają na świecenie (luminescencję). W obecności substancji wpływających ujemnie na metabolizm komórkowy bardzo szybko reagują spadkiem luminescencji. Prosta konstrukcja testu pozwala na badanie różnego rodzaju prób środowiskowych (woda, ścieki, gleba itp.).

Celem niniejszych badań jest określenie przydatności testu Microtox do oceny toksyczności próbek wody.

2. MATERIAŁY I METODY

Materiał do badań toksykologicznych stanowiły próbki ścieków komunalnych, wody powierzchniowej pobieranej do celów wodociągowych oraz wód podziemnych skażonych odpadami pogazowniczymi. Dla próbek wody powierzchniowej oraz ścieków komunalnych wykonano podstawowe analizy fizykochemiczne, zastosowana metodyka była zgodna z obowiązującymi normami. W przypadku próbek zanieczyszczonej produktami ubocznymi pirolizy węgla oznaczono stężenia szeregu związków organicznych z grupy BTEX, fenoli oraz WWA. Do tego celu wykorzystano technikę GC/MS.

Testy toksyczności poszczególnych próbek prowadzono z wykorzystaniem systemu Microtox (Strategic Diagnostics Inc., Newark, USA). W teście w charakterze bioindykatora zastosowane zostały bakterie luminescencyjne *Vibrio fischeri*. Liofilizowane 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 godziny. Reakcją testową jest obniżenie luminescencji bakterii po 15 minutach inkubacji w obecności badanej substancji. Test wykonano według standardowej procedury producenta (SDI) przy użyciu analizatora M 500 i liofilizowanych bakterii. Obliczenia wyników dokonano przy zastosowaniu programu producenta MicrotoxOmni.

Analizy statystyczne wykonano korzystając z pakietów Statgraphics oraz R, analizę regresji przeprowadzono wykorzystując model liniowy, wykładniczy, potęgowy oraz odwrotny.

3. WYNIKI BADAŃ

Test Microtox został zastosowany do oceny jakości wód powierzchniowych, ścieków i wód podziemnych. Analizowane próbki pochodziły z różnych etapów ich oczyszczania. Badano, czy proces oczyszczania wpływa bezpośrednio na zmianę toksyczności wód. Podjęto także próbę wskazania związku odpowiedzialnego za toksyczność badanych wód korzystając z analiz toksykologicznych i instrumentalnych oraz posługując się metodami statystycznymi.

Zastosowanie testu Microtox do oceny postępu procesu oczyszczania wód podziemnych skażonych odpadami pogazowniczymi wykazało jego dużą przydatność a uzyskane wyniki obrazują w sposób wiarygodny przebieg procesu technologicznego. Szybkość, z jaką pozyskuje się wyniki analizy toksyczności sprawia, że korekta procesu oczyszczania może następować bardzo szybko umożliwiając uzyskanie odpowiednich wyników w krótkim przedziale czasowym.

Wykazano ponadto, że w przypadku próbek środowiskowych za pomocą metod statystycznych, można wskazać precyzyjnie związki stanowiące składnik mieszaniny odpowiedzialny za toksyczność pobranej próbki. Przedmiotem analizy statystycznej były wyniki analiz toksykologicznych i instrumentalnych (tab. 1).

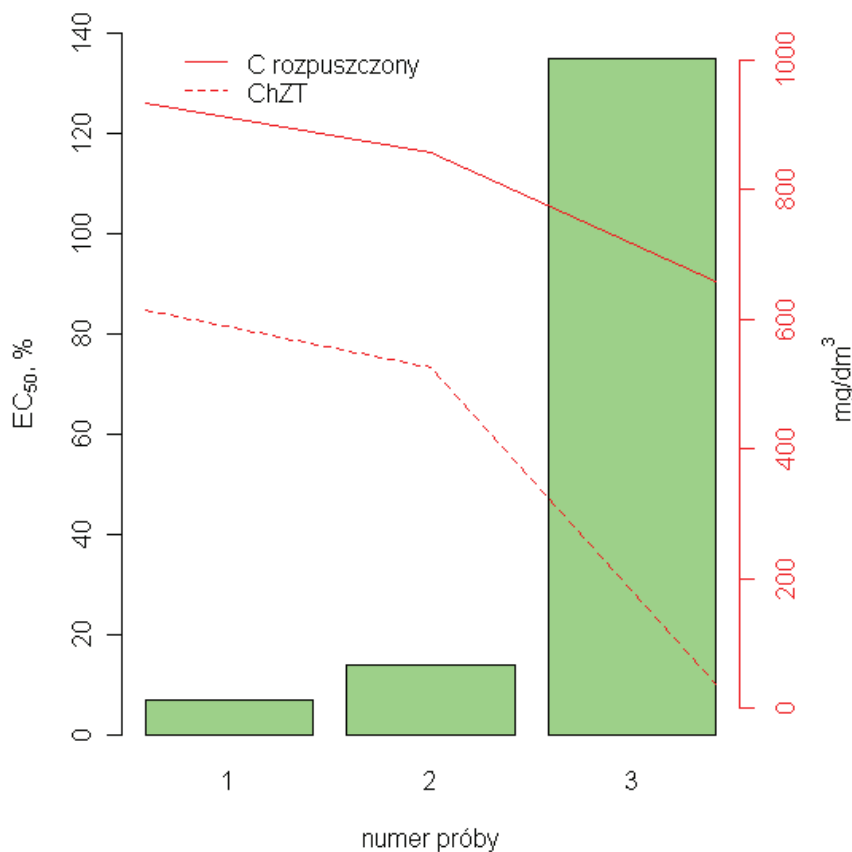
Tab. 1. Skład ilościowy i jakościowy zanieczyszczeń obecnych w wodzie podziemnej

Badany parametr	Jednostka	Próbka wody podziemnej			
		W1	W2	W3	W4
Toksyczność	EC50 %	0,8	2,3	2,8	4,5
Benzen	µg/l	5372	12,4	21,2	25,1
Toluen	µg/l	741,6	64,1	58,6	52,9
Etylobenzen	µg/l	395,4	53,7	32,5	18,4
o-ksylen	µg/l	281,9	162,8	125,6	115,2
m-,p- ksylen	µg/l	851,2	488,7	373,1	343,1
1,3,5-trimetylobenzen	µg/l	130,9	79,1	66,6	65
1,2,4-trimetylobenzen	µg/l	343,7	197,8	166,9	157,2
Suma węglowodorów aromatycznych BTEX	µg/l	8116,7	1058,6	844,5	776,9
Naftalen	µg/l	3245	65,2	86,7	27,3
Acenaftalen	µg/l	42,4	38	23,9	20,2
Aceften	µg/l	168,5	148	92,7	108,6
Fluoren	µg/l	24,7	19,8	12	13,5
Fenantren	µg/l	28,7	19,3	10,5	6,02
Antracen	µg/l	2,2	1,91	1,18	1,17
Fluoranten	µg/l	3,16	2,14	1,68	1,66
Piren	µg/l	2,15	1,78	1,23	1,27
Benz(a)antracen	µg/l	1,9	1,13	0,87	0,7
Chryzen	µg/l	0,83	0,27	0,31	0,19
Benzo(b)fluoranten	µg/l	0,24	0,06	0,08	0,05
Benzo(k)fluoranten	µg/l	0,18	0,06	0,07	0,04
Benzo(a)piren	µg/l	0,41	0,11	0,13	0,07
Dibenzo(a,h)antracen	µg/l	0,03	<0,01	0,02	<0,01
Benzo(g,h,i)perylene	µg/l	0,15	0,02	0,03	<0,01
Indeno(1,2,3-c,d)piren	µg/l	0,27	0,06	0,13	0,02
Suma WWA	µg/l	3521	297,84	231,53	180,79
fenol	µg/l	630	32	26	10
2-metylofenol	µg/l	2300	280	91	8,7
3-metylofenol	µg/l	3200	280	66	3,5
3-etylofenol	µg/l	3500	600	180	17
4-etylofenol	µg/l	3600	1500	1100	730
2,3-dimetylofenol	µg/l	9800	8000	5200	3000
2,4-dimetylofenol	µg/l	18300	7900	3300	73
2,6-dimetylofenol	µg/l	3900	3400	2700	1700
3,4-dimetylofenol	µg/l	3300	1200	640	160
3,5-dimetylofenol	µg/l	2000	730	510	170
2,3,5-trimetylofenol	µg/l	1000	900	690	510
2,3,6-trimetylofenol	µg/l	570	420	310	290
2,4,6-trimetylofenol	µg/l	2100	1900	1400	1300
3,4,5-trimetylofenol	µg/l	71	66	50	52
1-naftol	µg/l	91	100	39	3,2
2-naftol	µg/l	120	100	56	35
Suma fenoli	µg/l	67692	32308	18888	8547,4

Polegała ona na analizie korelacji zachodzących między wynikami analiz toksykologicznych a zawartością w wodzie poszczególnych grup zanieczyszczeń: BTEX, WWA i fenoli.

W badaniach zastosowano cztery modele statystyczne: liniowy, wykładniczy, odwrotny i potęgowy. Wykazano, że zależność liniowa występuje jedynie w przypadku grupy zanieczyszczeń fenolowych. Między pozostałymi zanieczyszczeniami a toksycznością dominowały inne typy zależności. Oznacza to, że dla tych zanieczyszczeń gwałtowny wzrost toksyczności pojawia się dopiero po przekroczeniu pewnych wartości granicznych.

Graficzne zestawienie wyników testów toksyczności ujęto na rysunku 1. Zarówno w przypadku ścieków komunalnych jak i wody powierzchniowej zaobserwowano wzrost toksyczności dla prób pobranych po etapie oczyszczania mechanicznego. Wynik ten potwierdza, że do prognozowania potencjalnej toksyczności nie wystarczy sama znajomość procesu technologicznego. Obserwowane wartości EC_{50} rosły wraz ze spadkiem poziomu zanieczyszczenia próby mierzonych wskaźnikami ChZT oraz węgla rozpuszczonego.



Rys. 1. Najwyższy spadek luminescencji obserwowany dla stężenia wyjściowego 81%
1 – ścieki surowe, 2 – ścieki po mechanicznym oczyszczaniu, 3 – ścieki oczyszczone

Szerokie zastosowanie testu Microtox sprawia, że staje się on dobrym narzędziem nie tylko do oceny wpływu stężenia modelowych substancji ale również doskonałą metodą skringingową. Metodę taką wykorzystać można w celu szybkiego podejmowania decyzji związanych z procesem technologicznym czy decyzji środowiskowych. Ponadto, wedle obowiązujących przepisów oraz z powodów technicznych i ekonomicznych standardowa ocena jakości wód i ścieków nie obejmuje wielu grup zanieczyszczeń występujących w niewielkich ilościach [3]. Ich stężenia mogą sporadycznie wzrastać – wówczas szybki test toksyczności staje się nieoceniony w aspekcie minimalizacji ryzyka środowiskowego.

Tab. 2. Analiza zależności między toksycznością a stężeniem podstawowych grup zanieczyszczeń w wodzie podziemnej

Zmienna x	Model			
	liniowy	wykładniczy	odwrotny	potęgowy
	$Y = a+bx$	$Y = e^{a+bx}$	$1/y = a+bx$	$Y = ax^b$
BTEX	$Y=3,51-0,00034x$ ^[1]	$Y = \exp[1,29-0,00009x]$	$1/y = 0,22+0,000127x$	$Y = 215x^{-0,62}$
	$R^2 = 65\%$	$R^2 = 87\%$	$R^2 = 97\%$	$R^2 = 91\%$
WWA	$Y = 3,39-0,00075x$	$Y = \exp[1,22-0,00041]$	$1/y = 0,27+0,00028x$	$Y = 51x^{-0,51}$
	$R^2 = 64\%$	$R^2 = 87\%$	$R^2 = 97\%$	$R^2 = 94\%$
Fenole	$Y = 4,38-0,000056x$	$Y = \exp[1,68-0,000028x]$	$1/y = 0,0046+0,000018x$	$Y = 7187x^{-0,80}$
	$R^2 = 89\%$	$R^2 = 99\%$	$R^2 = 96\%$	$R^2 = 92\%$
	$R = -0,94$			

[1] współczynnik statystycznie nieistotny nawet przy $\alpha = 0,20$

4. WNIOSKI

1. System Microtox jest przydatny do oceny postępu procesu oczyszczania wód skażonych odpadami pogazowniczymi. Uzyskane wyniki wskazują również na możliwość jego zastosowania w przypadku ścieków komunalnych.
2. Wykazano, że za toksyczność wód podziemnych odpowiedzialne były fenole.
3. Metodami statystycznymi można określić zależność między toksycznością a stężeniem związków stanowiących zanieczyszczenie i wskazać związek odpowiedzialny za toksyczność próbek.

Tab. 3. Analiza fizykochemiczna ścieków oraz wyniki testów toksyczności

Wskaźnik	ścieki			Jednostka
	surowe	po osadnikach wstępnych	oczyszczone	
EC ₅₀	14	7	135	%
najwyższy obserwowany efekt	69	80	22	%
pH	7,75	7,27	6,93	
zasadowość	8	7,9	3	mval/dm ³
zawiesiny ogólne	196	65	11	mg/dm ³
zawiesiny mineralne	96	16	3	mg/dm ³
zawiesiny lotne	100	49	8	mg/dm ³
sucha pozostałość	1054	999	669	mg/dm ³
pozostałość po prażeniu	647	635	457	mg/dm ³
strata prażenia	407	364	212	mg/dm ³
ciała rozpuszczone	858	934	658	mg/dm ³
ciała mineralne	551	619	454	mg/dm ³
ciała lotne	307	315	204	mg/dm ³
BZT ₅	458	318	7,9	mgO ₂ /dm ³
ChZT	615	526	37,3	mgO ₂ /dm ³
ortofosforany	28	21,4	0,447	mgPO ₄ /dm ³
fosfor ogólny	9,33	7,13	0,149	mgP/dm ³
azot ogólny	81,1	76,1	25	mgN/dm ³
azot amonowy	51,5	48,1	0,256	mgN/dm ³
azotany	0,584	0,249	17,2	mgN/dm ³
azotyny	–	–	0,069	mgN/dm ³
azot organiczny	–	–	7,48	mgN/dm ³
chlorki	144	–	–	mgCl/dm ³
żelazo	0,953	–	–	mgFe/dm ³
glin	2,37	–	–	mgAl/dm ³

4. LITERATURA

- [1] Girotti S., Ferri E.N., Fumo M.G., Maiolini E.: Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria. *Analytica Chimica Acta*, 608, 1, 2008, 2-29.
- [2] Kong L.R., Han S.K., Wang L.S., Zhou F.F., Kong Z.M. & Ma W.Y. (1995): Chemical Analysis and Toxicity Tests of Organic Pollutants in Xi River Water and Suspended Sediment of Shenyang City. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 59(2), 187-196.
- [3] Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 11 lutego 2004 r. w sprawie klasyfikacji dla prezentowania stanu wód powierzchniowych i podziemnych, sposobu prowadzenia monitoringu oraz sposobu interpretacji wyników i prezentacji stanu tych wód. *Dz. U. z 2004 r. Nr 32, poz. 284.*
- [4] Schwarzenbach R.P., Escher B.I., Fenner K., Hofstetter T.B., Johnson C.A., Gunten U., Wehrli B.: The Challenge of Micropollutants in Aquatic Systems. *Science* 313 (5790), 1072.