

Monika Załęska-Radziwiłł, Maria Łebkowska, Radosław Kalinowski

## Badania wpływu bezpiecznych stężeń wybranych WWA na biocenozę wodną

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) to grupa ponad 500 substancji chemicznych. Są to związki o zróżnicowanej strukturze, składające się z kilku lub kilkunastu pierścieni benzenowych ułożonych w różnej konfiguracji (liniowej, kątowej lub klasterowej). WWA charakteryzują się wysoką temperaturą topnienia, małą prężnością par i są praktycznie nierozpuszczalne w wodzie. Ich właściwości fizyczno-chemiczne są niemal liniowo zależne od logarytmów ich mas cząsteczkowych. Szkodliwość tych związków polega głównie na mutagennym i kancerogennym działaniu ich metabolitów, które powstają w trakcie biotransformacji przy udziale enzymów mikrosomalnych związanych z cytochromem P-450. Mutagenność tych związków została wykazana zarówno w stosunku do ssaków, jak i szkarłupni, skorupiaków, ryb i mięczaków [3,10].

Informacje dotyczące toksyczności ostrej WWA są niepełne i wykazują rozbieżności w wynikach badań. Baza danych ECOTOX [5] podaje wartości stężeń śmiertelnych i skutecznych, które różnią się nawet o trzy rzędy wielkości w przypadku tego samego bioindykatora i punktu końcowego testu. Przykładowo, wartości EC50-48 h w przypadku pirenu w stosunku do immobilizacji *Daphnia magna* wahają się w granicach  $4 \div 1024 \text{ mg/m}^3$ , a fenantrenu w stosunku do wzrostu *Selenastrum capricornutum* –  $180 \div 1228 \text{ mg/m}^3$ . Na brak danych oraz znaczne różnice w wynikach toksyczności ostrej zwracają uwagę autorzy metodycznej pracy [8], dotyczącej wyznaczania standardów jakości środowiska w przypadku 10 wybranych WWA. Przegląd literatury dokonany przez nich pozwolił na zastosowanie procedur statystycznych jedynie w przypadku siedmiu (środowisko wodne), trzech (środowisko glebowe) i jednego (powietrze) węglowodoru. Podkreślono, że dane toksykologiczne ograniczają się do zwierząt, a niewiele jest informacji o toksyczności WWA w stosunku do roślin (w tym glonów) i bakterii luminescencyjnych. W pracy [11] przetestowano 5 różnych związków (naftalen, fenantren, antracen, piren i benzo(a)piren) przy użyciu immobilizowanego rekombinanta szczepu *Escherichia coli* wykazującego luminescencję. Piren i benzo(a)piren w stężeniach odpowiednio poniżej  $6,3 \text{ g/m}^3$  i  $23,3 \text{ g/m}^3$  nie wykazały toksycznego działania w stosunku do bakterii. Stężenia EC50-15 min naftalenu, fenantrenu i antracenu przekraczały  $3 \div 35$ -krotnie ich rozpuszczalność w wodzie i wynosiły odpowiednio  $276,4 \text{ g/m}^3$ ,  $4,375 \text{ g/m}^3$  i  $2,301 \text{ g/m}^3$ . W badaniach nad detoksykacją fluorenu, fenantrenu, karbazolu i p-krezolu w kolumnach z piaskiem określono szkodliwość tych substancji testem Microtox

w stosunku do *Vibrio fischeri* [21]. Obliczona wartość IC50-15 min w przypadku fenantrenu wyniosła  $140 \text{ mg/m}^3$ . W pracy [4] wykazano przeszło 50-krotnie większe wartości IC50-t w stosunku do inhibicji bioluminescencji u *Vibrio fischeri*, tj.  $7,33 \text{ g/m}^3$  i  $8,09 \text{ g/m}^3$ , odpowiednio w przypadku toksyczności ostrej – 15 min i chronicznej – 18 h. Antraceni i piren w stężeniu do  $4 \text{ g/m}^3$  nie wykazały zarówno toksyczności ostrej, jak i chronicznej. Zbliżoną wrażliwość grzybów mikroskopowych na działanie antracenu zaobserwowali autorzy pracy [2]. Stężenia powodujące 50-proc. inhibicję wzrostu u 9 gatunków grzybów po 72 godz. kontaktu wahały się w zakresie  $20,44 \div 30,34 \text{ g/m}^3$ . Większą opornością wykazał się gatunek *Cladosporium herbarium* z rodzaju *Deuteromycotina*, w przypadku którego IC50-72 h wynosiło  $66,8 \text{ g/m}^3$ .

Ze względu na zwiększenie toksyczności WWA poddanych działaniu promieniowania świetlnego prowadzi się testy w różnych warunkach naświetlenia. W pracy [26] stwierdzono, że 48-godz. inkubacja w świetle słonecznym z dodatkową 2-godz. ekspozycją na promieniowanie UV spowodowała blisko 3-krotne zwiększenie toksyczności fenantrenu w stosunku do *Daphnia magna*, w porównaniu z próbkami umieszczonymi w ciemności. Wartości EC50-48 h wynosiły odpowiednio  $272,64 \text{ mg/m}^3$  i  $730,67 \text{ mg/m}^3$ . Wyniki podobnych badań z antraceniem i fenantrenem opisano w pracy [1], w której wykazano algistatyczne działanie antracenu w stosunku do *Scenedesmus armatus* podczas naświetlania ( $64 \text{ W/m}^2$  i  $48 \text{ W/m}^2$ ). Toksyczność fenantrenu nie uległa zmianie w różnych warunkach naświetlania i nasycania hodowli CO<sub>2</sub>.

Występowanie WWA we wszystkich elementach środowiska (powietrze, woda, gleba i osady dennie) powoduje, że narażenie na ich działanie ma charakter powszechny, jednakże w doniesieniach naukowych praktycznie brak jest 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 zmniejszenia niepewności wynikającej z ekstrapolacji danych, umożliwiają walidację wyników z badań laboratoryjnych, a także ułatwiają obserwację zmian strukturalnych i funkcjonalnych biocenozy w warunkach realistycznego narażenia oraz pomiar skutków pośrednich i zdolność do regeneracji populacji czy zbiorowiska [22].

W badaniach wielogatunkowych istotne znaczenie ma nie tylko wybór odpowiedniego modelu (zależnego od celu badań, charakterystyki analizowanych zanieczyszczeń i typu ekosystemu, który ma być imitowany), ale również ściśle

określenie badanych punktów końcowych obejmujących zmiany w ekosystemie. Ocena punktów końcowych w kontekście zmian strukturalnych w badaniach mikro- i mezokosmowych dotyczy głównie gęstości (liczebności) i biomasy populacji obejmujących mikroskorupiaki (*Cladocera*, *Copepoda*, *Ostracoda*), makroskorupiaki (*Amphipoda*, *Isopoda*, *Anostraca*), owady, ryby, wrotki, pozostałe makrobezkręgowce, glony i makrofity [25]. Zmiany funkcjonalne określane są głównie na podstawie przebiegu procesów metabolizmu organizmów i chociaż są one wskaźnikiem tzw. zdrowia ekosystemu, to – w porównaniu ze zmianami strukturalnymi – uważane są za mniej czułe [9,6]. Badane punkty końcowe zmian funkcjonalnych obejmują m.in. oznaczenia stężenia tlenu, pH, produkcji, respiracji, zawartości biogenów oraz rozkładu drobnej zawiesiny. Badania wielogatunkowe w mikro- i mezokosmach stosowane są także do weryfikacji tzw. bezpiecznych stężeń związków chemicznych, wyznaczonych na podstawie baterii jednogatunkowych testów toksykologicznych, co łącznie z szacowaniem ryzyka ma istotne znaczenie w ocenie oddziaływania zanieczyszczeń na ekosystemy wodne.

### Cel i zakres badań

Celem badań była ocena wpływu tzw. bezpiecznych stężeń naftalenu, fenantrenu, antracenu i pirenu (obliczonych na podstawie jednogatunkowych testów toksykologicznych) na biocenozę w modelowym, laboratoryjnym ekosystemie wodnym typu mikrokosm. Zakres badań obejmował:

- przygotowanie modelowego ekosystemu wodnego typu mikrokosm,
- ocenę zmian strukturalnych i funkcjonalnych ekosystemu wodnego na podstawie 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) oraz fizyczno-chemicznych (temperatura, pH, azot amonowy, azotyny, azotany, fosforany, chlorki, BZT<sub>5</sub>, ChZT, OWO).

### Metodyka badań

#### Badane związki i obliczanie stężeń bezpiecznych

Do badań użyto wybrane wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne – naftalen (C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>), fenantren (C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>), antracenu (C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>) i piren (C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>), o czystości 95% (Merck). Roztwory podstawowe tych związków przygotowano w acetonie o czystości 99,9% (POCH).

Stężenia śmiertelne i skuteczne związków użyte do dalszych obliczeń zostały wyznaczone we wcześniejszych badaniach ekotoksyczności [28]. Stężenia WWA bezpieczne dla biocenozy wodnej obliczono zmodyfikowaną metodą Załęskiej-Radziwiłł [27] ze wzoru:

$$c_{\delta} = \exp(\bar{x}_m - kS_m) \quad (1)$$

w którym:

$c_{\delta}$  – stężenie niebezpieczne dla frakcji  $\delta$  gatunków

$\bar{x}_m$  – średnia arytmetyczna  $x_i$

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

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

$\delta$  – frakcja gatunków w środowisku, których NOEC może być mniejsze od  $c_{\delta}$

$S_m$  – próbkowe odchylenie standardowe  $x_i$

Stężenie NOEC zdefiniowano w postaci zależności:

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

w której:

NOEC – największe stężenie, które nie powoduje obserwowalnych zmian u bioindykatorów w porównaniu z próbką kontrolną

LC(EC)50-t – stężenie śmiertelne (skuteczne) powodujące śmiertelność (lub inne skutki) u 50% osobników w porównaniu z próbką kontrolną po czasie t trwania testu

Zgodnie z danymi literaturowymi, dotyczącymi ekstrapolacji pomiędzy toksycznością ostrą a chroniczną, w przypadku wielopierścieniowych węglowodórów aromatycznych przyjmuje się ACR=5 [12].

#### Modelowy ekosystem wodny typu mikrokosm

Akwaria o pojemności 10 dm<sup>3</sup> napełniono wodą uzdatnioną w biofiltrze, zasiedlono roślinami naczyniowymi *Lemna minor* i *Elodea canadensis* oraz glonami *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella vulgaris*, organizmami zwierzęcymi *Daphnia magna*, *Thamnocephalus platyurus*, *Brachionus calyciflorus*, *Heterocypris inconguretus*, *Lebistes reticulatus* oraz w wydzielonych krystalizatorach organizmami osadu dennego. Po 2 tyg. adaptacji do akwariów wprowadzono obliczone bezpieczne stężenia wybranych WWA. Po 3 tyg. badań ponownie wprowadzono wytypowane stężenia WWA. Łączny czas badań wynosił 6 tyg. W czasie trwania eksperymentu wykonano kontrolne analizy chemiczne wody, badania mikrobiologiczne, badania hydrobiologiczne fito- i zooplanktonu, ocenę mikroskopową organizmów osadu dennego, ocenę aktywności enzymatycznej organizmów osadu dennego, pomiary inhibicji wzrostu roślin wyższych oraz przeżywalności ryb.

#### Oznaczenia chemiczne

Oznaczenie BZT<sub>5</sub> wykonano metodą manometryczną przy użyciu systemu OxiTop, natomiast OWO oznaczono w aparacie TOC-5000 (Shimadzu) [23]. Oznaczenia ChZT [17], azotu amonowego [16], azotynów [14], azotanów [15], ortofosforanów [13] i chlorków [20] wykonano zgodnie z PN. Do oznaczenia pH wykorzystano pH-metr z elektrodą CPC-501.

Próbki wody do oznaczenia zawartości WWA metodą chromatograficzną przygotowano zgodnie z PN-EN ISO 17993:2005 z modyfikacją dotyczącą ekstrahenta [19]. Do pobranej do szklanej butelki próbki wody dodano 25 cm<sup>3</sup> cykloheksanu i mieszano przez 1 h. Następnie rozdzielono zawartość naczynia w szklanym rozdzielaczu. Ekstrakt cykloheksanowy suszono przez 30 min bezwodnym siarczanem sodu. W przypadku uzyskania emulsji odwirowano ją przez 10 min przy obrotach 3000/min. Probki zateżono w łaźni wodnej w temperaturze 30 °C pod zmniejszonym ciśnieniem 200 hPa, uzyskując próbkę o objętości 2 cm<sup>3</sup>. Oznaczenie zawartości WWA w wodzie wykonano metodą chromatografii gazowej w aparacie Hewlett Packard 5890A z kolumną SPB-1 (Supelco 60 m × 0,32 mm × 1 μm). Warunki rozdzielania były następujące: temperatura dozownika 275 °C, temperatura detektora 300 °C, temperatura początkowa 40 °C, czas początkowy 1 min, przyrost temperatury 25 °C/min do 140 °C, a następnie 10 °C/min, temperatura końcowa 290 °C, czas końcowy 25 min. Wyniki analiz podano w mg/m<sup>3</sup>.

Tabela 1. Wyniki jednogatunkowych testów toksykologicznych wybranych WWA [28]  
 Table 1. Results of single species toxicity tests conducted with the PAHs of choice [28]

Organizm testowy	Rodzaj testu	Czas trwania testu h	LC(EC50)-t (95% przedział ufności) g/m <sup>3</sup>			
			naftalen	fenantren	antracen	piren
<i>Lebistes reticulatus Peters</i>	Przeżywalności	96	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	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	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	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	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	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	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	0,25	17,88 (14,04÷22,77)	2,11 (1,42÷3,14)	0,67 (0,40÷1,13)	2,27 (0,50÷10,32)

### Analizy biologiczne

Analizy mikrobiologiczne obejmowały oznaczenie ogólnej liczby bakterii w próbkach wody metodą płytkową Kocha na agarze odżywczym MPA metodą posiewu wgłębnego. Ogólną liczbę grzybów oznaczono na podłożu Sabourauda metodą posiewu powierzchniowego [7]. Wyniki podano w jtk/cm<sup>3</sup>.

Analizę mikroskopową próbek planktonu i osadu dennego (po odpowiednim rozcieńczeniu) wykonano w komorach Sedgwick-Raftera przy powiększeniu 100-krotnym. Wynik podano jako liczbę organizmów w 1 cm<sup>3</sup>.

Ocenę aktywności dehydrogenazowej organizmów osadu dennego (test TTC) przeprowadzono zgodnie z metodyką PN-87C-04616/08 [18]. Aktywność organizmów wyrażono w  $\mu\text{kat/kg}$  białka w warunkach endogennych, jak i z dodatkiem łatwo przyswajalnego substratu – glukozy.

W celu analizy 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 [24]. Obserwowane zmiany parametrów wzrostu roślin w czasie wyrażono w procentach i odniesiono do próbki kontrolnej.

### Wyniki badań

Wyniki jednogatunkowych testów toksykologicznych przeprowadzonych z użyciem wybranych WWA na przedstawicielach łańcucha troficznego ekosystemu wodnego przedstawiono w tabeli 1. Na podstawie wyznaczonych wartości LC(EC)50-t obliczono następnie stężenia bezpieczne tych związków dla biocenozy wodnych (tab. 2). Stwierdzono, że badane związki w niewielkim stopniu wpłynęły na zmianę wartości wskaźników zanieczyszczenia wody mikrokosmu (tab. 3).

Zwiększenie wartości ChZT oraz ilości OWO i fosforanów w 14 d badań wynikało z wymieszania zawartości akwariów przed analizami fizyczno-chemicznymi, co spowodowało

Tabela 2. Stężenia bezpieczne wybranych WWA wg zmodyfikowanego modelu Załęskiej-Radziwiłł  
 Table 2. Safety concentrations of the PAHs chosen, according to the modified Załęska-Radziwiłł model

Związek	Stężenie bezpieczne mg/m <sup>3</sup>
Naftalen	0,654
Fenantren	0,108
Antracen	2,494
Piren	5,195

obecność metabolitów zwierzęcych i innych cząstek stałych w fazie wodnej. Na zwiększone wartości ChZT i OWO w końcowym czasie badań, w porównaniu z ich początkiem, miał wpływ rozwój glonów, głównie zielenic *S. quadricauda* i *S. capricornutum*, a w niektórych próbkach także *C. vulgaris*. ChZT osiągało na ogół wartości z zakresu 30÷60 mgO<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup>.

Nie stwierdzono widocznych przemian związków azotu. W czasie 21÷42 d trwania badań stężenie azotu amonowego było w granicach 0,01÷0,05 gNH<sub>4</sub><sup>+</sup>/m<sup>3</sup>, a azotanów najczęściej 0,1÷0,9 gNO<sub>3</sub><sup>-</sup>/m<sup>3</sup>. Zawartość fosforanów wynosiła 2÷4 gPO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/m<sup>3</sup>. Wartości BZT<sub>5</sub> w omawianym czasie wynosiły od 5 gO<sub>2</sub>/m<sup>3</sup> do 25 gO<sub>2</sub>/m<sup>3</sup>. Stwierdzono lekko zasadowe pH próbek wody (ok. 8). Oznaczenia chromatograficzne nie wykazały obecności WWA w wodzie.

Aktywność enzymatyczna osadu dennego (tab. 4) wykazała fluktuacje, zależnie od dopływu substratów pokarmowych pochodzących z obumierania organizmów. Wartości aktywności endogennej w próbkach kontrolnych i z dodatkiem WWA w czasie od 14 d do 42 d trwania doświadczeń wahały się w granicach 12÷90  $\mu\text{kat/kg}$  białka (niekiedy nawet powyżej 100  $\mu\text{kat/kg}$  białka). W każdym przypadku aktywność enzymatyczna próbek z dodatkiem glukozy była większa niż próbek endogennych, co świadczyło o niedoborach łatwo przyswajalnych źródeł węgla dla mikroorganizmów w środowisku wodnym mikrokosmu.

Tabela 3. Charakterystyka fizyczno-chemiczna wody w wielogatunkowym teście toksykologicznym typu mikrokosm  
 Table 3. Physicochemical characteristics of the water, established in the multi-species toxicity test of microcosm type

WWA	Wskaźnik, jednostka	Czas, d						
		1	7	14	21	28	35	42
Antracen	temperatura, °C	22	25	21	21,5	21	22,5	23,5
	pH	8,2	8,1	8,2	8,35	8,42	8,5	8,5
	BZT <sub>5</sub> , gO <sub>2</sub> /m <sup>3</sup>	10	40	30	5	5	5	5
	ChZT, gO <sub>2</sub> /m <sup>3</sup>	25,6	31,2	136,3	11,2	45,6	45,7	25,5
	OWO, gC/m <sup>3</sup>	9,99	10,28	40,01	11,5	15,1	16,57	15,29
	azot amonowy, gNH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /m <sup>3</sup>	0,06	0,1	2,7	1,1	0,2	0,6	0,1
	azotyny, gNO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /m <sup>3</sup>	0,015	0,04	0,02	0,079	0,047	0,065	0,011
	azotany, gNO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /m <sup>3</sup>	0,9	1,1	0,6	0,2	0,9	0,9	0,11
	fosforany, gPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> /m <sup>3</sup>	0,042	0,14	6,9	3,5	3,1	3,4	2,4
	chlorki, gCl <sup>-</sup> /m <sup>3</sup>	31	38	41	40	47	45	52
Fenantren	temperatura, °C	22	25	21	21,5	21	22,5	23,5
	pH	8,2	8,1	8,2	8,02	8,38	8,5	8,5
	BZT <sub>5</sub> , gO <sub>2</sub> /m <sup>3</sup>	10	40	15	10	5	5	10
	ChZT, gO <sub>2</sub> /m <sup>3</sup>	25,6	31,2	176	39,3	55,8	60,9	51
	OWO, gC/m <sup>3</sup>	9,99	10,28	45,72	14,73	16,83	20,26	19,93
	azot amonowy, gNH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /m <sup>3</sup>	0,06	0,1	4,2	0,5	0,2	0,3	0,2
	azotyny, gNO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /m <sup>3</sup>	0,015	0,04	0,027	0,008	0,007	0,015	0,007
	azotany, gNO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /m <sup>3</sup>	0,9	1,1	0,5	0	0,2	0,4	0,2
	fosforany, gPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> /m <sup>3</sup>	0,042	0,14	6,8	3,8	2,8	3,6	3,3
	chlorki, gCl <sup>-</sup> /m <sup>3</sup>	31	38	40	39	45	46	47
Naftalen	temperatura, °C	22	25	21	21	21,5	22	23
	pH	8,2	8,1	7,7	7,23	7,75	8,47	8,28
	BZT <sub>5</sub> , gO <sub>2</sub> /m <sup>3</sup>	10	40	100	15	10	10	15
	ChZT, gO <sub>2</sub> /m <sup>3</sup>	25,6	31,2	140	67,3	45,7	96,4	86,7
	OWO, gC/m <sup>3</sup>	9,99	10,28	67,36	18,13	17,17	24,57	78,76
	azot amonowy, gNH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /m <sup>3</sup>	0,06	0,1	0,44	0,44	0,7	0,5	0
	azotyny, gNO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /m <sup>3</sup>	0,015	0,04	0	0,017	0,002	0,051	0,006
	azotany, gNO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /m <sup>3</sup>	0,9	1,1	0,2	0,3	0,2	0,4	0,2
	fosforany, gPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> /m <sup>3</sup>	0,042	0,14	2,91	2,13	2,71	3,38	2,63
	chlorki, gCl <sup>-</sup> /m <sup>3</sup>	31	38	38	39	39	43	48
Piren	temperatura, °C	22	25	21	21	21,5	22	23
	pH	8,2	8,1	7,8	7,46	7,97	8,42	8,4
	BZT <sub>5</sub> , gO <sub>2</sub> /m <sup>3</sup>	10	40	65	10	5	5	15
	ChZT, gO <sub>2</sub> /m <sup>3</sup>	25,6	31,2	124,9	33	35,5	55,5	40,8
	OWO, gC/m <sup>3</sup>	9,99	10,28	35,5	11,56	10,18	15,45	25,12
	azot amonowy, gNH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /m <sup>3</sup>	0,06	0,1	0,62	2,1	0	0	0,1
	azotyny, gNO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /m <sup>3</sup>	0,015	0,04	0,019	0,127	0,102	0,095	0,028
	azotany, gNO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /m <sup>3</sup>	0,9	1,1	0,4	0,2	1,4	1,4	1,2
	fosforany, gPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> /m <sup>3</sup>	0,042	0,14	2,04	2,41	2,95	3,59	2,34
	chlorki, gCl <sup>-</sup> /m <sup>3</sup>	31	38	38	38	43	42	57
Próbka kontrolna	temperatura, °C	22	25	21,8	22	22,8	23	22,6
	pH	8,2	8,1	8,1	8,2	8,1	8,5	8,1
	BZT <sub>5</sub> , gO <sub>2</sub> /m <sup>3</sup>	10	40	10	5	15	15	15
	ChZT, gO <sub>2</sub> /m <sup>3</sup>	25,6	31,2	60,7	38,89	35,9	73,05	73,6
	OWO, gC/m <sup>3</sup>	9,99	10,28	20,01	11,72	14,04	25,51	26,71
	azot amonowy, gNH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /m <sup>3</sup>	0,06	0,1	0,4	0	1	0,08	0,16
	azotyny, gNO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /m <sup>3</sup>	0,015	0,04	0,13	0,2	0	0,006	0,004
	azotany, gNO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /m <sup>3</sup>	0,9	1,1	0,2	2,6	1,2	0,02	0,04
	fosforany, gPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> /m <sup>3</sup>	0,042	0,14	1,17	3,1	3,2	0,26	0,22
	chlorki, gCl <sup>-</sup> /m <sup>3</sup>	31	38	41	47	51	43	51,5

Tabela 4. Aktywność dehydrogenazowa organizmów osadu dennego w wielogatunkowym teście toksykologicznym typu mikrokosm  
 Table 4. Dehydrogenase activity of the organisms present in the bottom sediments, established in the multi-species toxicity test of microcosm type

WWA	Wskaźnik, jednostka	Czas, d						
		1	7	14	21	28	35	42
Antracen	zawartość białka, mg/cm <sup>3</sup> wyciągu bezkomórkowego	3,24	4,70	2,46	3,26	3,75	3,06	2,97
	AW – próbka endogenna $\mu$ kat/kg białka	116,31	28,20	53,37	26,58	21,11	13,41	46,24
	AW – próbka z glukozą $\mu$ kat/kg białka	182,67	28,93	65,31	30,32	30,58	20,32	77,32
Fenantren	zawartość białka, mg/cm <sup>3</sup> wyciągu bezkomórkowego	3,24	4,70	4,67	4,00	3,87	3,32	4,16
	AW – próbka endogenna $\mu$ kat/kg białka	116,31	28,20	32,16	22,34	25,61	12,36	65,47
	AW – próbka z glukozą $\mu$ kat/kg białka	182,67	28,93	43,58	31,89	28,45	24,73	112,92
Naftalen	zawartość białka, mg/cm <sup>3</sup> wyciągu bezkomórkowego	3,24	4,70	3,25	4,07	3,82	3,78	3,52
	AW – próbka endogenna $\mu$ kat/kg białka	116,31	28,20	44,74	19,12	33,06	75,45	19,82
	AW – próbka z glukozą $\mu$ kat/kg białka	182,67	28,93	80,17	32,70	95,98	113,89	20,80
Piren	Zawartość białka, mg/cm <sup>3</sup> wyciągu bezkomórkowego	3,24	4,70	4,14	3,66	3,84	3,09	3,14
	AW – próbka endogenna $\mu$ kat/kg białka	116,31	28,20	37,95	11,75	64,61	94,91	6,98
	AW – próbka z glukozą $\mu$ kat/kg białka	182,67	28,93	106,74	21,47	69,77	206,41	17,44
Próbka kontrolna	zawartość białka, mg/cm <sup>3</sup> wyciągu bezkomórkowego	3,24	4,70	3,18	3,98	4,71	3,02	3,56
	AW – próbka endogenna $\mu$ kat/kg białka	116,31	28,20	12,44	56,78	94,95	7,68	44,13
	AW – próbka z glukozą $\mu$ kat/kg białka	182,67	28,93	15,03	64,35	121,34	10,69	47,19

AW – aktywność właściwa

Analiza mikroskopowa osadu dennego (tab. 5) wykazała obecność licznych pierwotniaków zarówno w próbkach kontrolnych, jak i z dodatkiem WWA. Szczególnie licznie, pod koniec badań, występowały rodzaje *Arcella* i *Coleps* w próbkach zawierających antracen i fenantren – ich liczebność sięgała 12÷19 tys./cm<sup>3</sup> oraz dość licznie w próbce z naftaleniem, natomiast mniej osobników wykryto w obecności pirenu – około 5 tys./cm<sup>3</sup>. W próbkach kontrolnych liczba pierwotniaków z rodzaju *Arcella* wynosiła średnio około 3 tys./cm<sup>3</sup>, zaś *Coleps* – 1 tys./cm<sup>3</sup>. Spośród innych orzęsków w próbkach z antraceniem i fenantrenem licznie występował rodzaj *Aspidisca*. Wykryto także wrotki, ale głównie na początku badań. Należy podkreślić, że najwięcej organizmów w ostatnim dniu badań zaobserwowano w próbkach z antraceniem i fenantrenem, natomiast mniej w obecności pozostałych WWA i w próbkach kontrolnych.

Badania mikrobiologiczne (tab. 6) wykazały, że liczebność bakterii zmniejszyła się o rząd wielkości we wszystkich próbkach badanych i kontrolnych w czasie 14÷42 d, w porównaniu z ich liczbą stwierdzoną w czasie pierwszych 7 d doświadczeń. W końcowym czasie badań liczba mikroorganizmów wynosiła 0,8÷2,2·10<sup>4</sup> jtk/cm<sup>3</sup> (początkowo 43÷44·10<sup>4</sup> jtk/cm<sup>3</sup>). Świadczyło to o niewielkiej dostępności substratów pokarmowych dla mikroorganizmów, prawdopodobnie pochodzących z rozkładu martwych komórek innych organizmów. Nie stwierdzono wpływu dodatku WWA na wzrost liczebności drobnoustrojów. Liczebność grzybów także uległa znacznemu zmniejszeniu w czasie badań, z nielicznymi wyjątkami w 42 d.

W trakcie badań zaobserwowano przyrost masy i długości moczarki, z wyjątkiem próbek z 42 d zawierających antracen

i fenantren (tab. 7). Należy przypuszczać, 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 (tab. 8) wykazały, że liczebność glonów ulegała fluktuacjom, osiągając najwyższy przyrost w czasie 12÷28 d trwania badań (próbki kontrolne oraz z antraceniem i fenantrenem), a w całym czasie doświadczeń w obecności pirenu. Nie stwierdzono hamowania rozwoju glonów w obecności WWA, a raczej pewną tendencję do stymulacji ich wzrostu.

Nie stwierdzono wpływu WWA na organizmy zwierzęce w wodzie badanych mikrokosmów (tab. 9). W warunkach doświadczeń licznie rozwijały się *Heterocypris inconguretus* i *Brachionus calyciflorus*. Nie zaobserwowano wystąpienia skutków śmiertelnych u ryb *Lebistes reticulatus*.

## Podsumowanie

Przeprowadzone badania wpływu bezpiecznych stężeń wybranych WWA na biocenozę wodną wykazały, że badane związki w niewielkim stopniu wpłynęły na zmiany wartości wskaźników zanieczyszczenia wody mikrokosmu. Nie stwierdzono widocznych przemian związków azotu. Na zwiększone wartości ChZT i OWO w końcowym okresie trwania badań miał wpływ rozwój glonów. Aktywność enzymatyczna osadu dennego wykazała fluktuacje i we wszystkich próbkach z dodatkiem glukozy była większa niż próbek endogennych, co świadczy o niedoborach w środowisku wodnym mikrokosmów łatwo przyswajalnych źródeł węgla

Tabela 5. Charakterystyka mikroskopowa osadu dennego w wielogatunkowym teście toksykologicznym typu mikrokosm (org./cm<sup>3</sup>)  
 Table 5. Microscopic characteristics of the bottom sediments, established in the multi-species toxicity test of microcosm type (org/cm<sup>3</sup>)

WWA	Organizm wskaźnikowy	Czas, d						
		1	7	14	21	28	35	42
Antracen	<i>Arcella</i> sp.	2405	7280	4750	3250	14500	15750	18000
	<i>Difflugia</i> sp.	0	0	0	0	1750	1000	500
	<i>Amphileptus</i> sp.	0	1120	0	0	0	4750	7000
	<i>Litonotus</i> sp.	0	0	10500	750	750	1000	10500
	<i>Coleps</i> sp.	93	560	6750	9250	12500	12000	19500
	<i>Aspidisca</i> sp.	3700	1680	5750	2250	3750	1750	250
	<i>Paramecium caudatum</i>	0	0	0	1500	0	250	0
	<i>Colpidium colpoda</i>	93	0	0	0	0	0	0
	<i>Opercularia</i> sp.	1943	0	2000	0	0	0	0
	<i>Vorticella</i> sp.	1203	0	0	0	0	0	0
	<i>Rotatoria</i> nd.	1943	4480	2000	2750	1000	0	0
	<i>Nematoda</i> nd.	0	0	0	0	0	0	7000
	<i>Aelosoma</i> sp.	0	0	0	0	0	0	500
	<i>Tardigrada</i> nd.	185	0	0	0	250	750	0
Fenantren	<i>Arcella</i> sp.	2405	7280	2250	5250	15500	18000	16750
	<i>Difflugia</i> sp.	0	0	0	0	750	500	250
	<i>Amphileptus</i> sp.	0	1120	0	0	0	250	4000
	<i>Litonotus</i> sp.	0	0	0	2500	0	1250	2500
	<i>Coleps</i> sp.	93	560	4000	10250	13750	10750	13750
	<i>Aspidisca</i> sp.	3700	1680	750	3000	4500	4000	2250
	<i>Paramecium caudatum</i>	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Colpidium colpoda</i>	93	0	0	0	0	0	0
	<i>Opercularia</i> sp.	1943	0	0	0	0	0	0
	<i>Vorticella</i> sp.	1203	0	0	0	0	0	0
	<i>Rotatoria</i> nd.	1943	4480	2750	1750	2000	0	250
	<i>Nematoda</i> nd.	0	0	0	0	0	0	4500
	<i>Aelosoma</i> sp.	0	0	0	0	2000	250	500
	<i>Tardigrada</i> nd.	185	0	0	0	750	250	0
Naftalen	<i>Arcella</i> sp.	2405	7280	3360	6110	7990	3620	12530
	<i>Difflugia</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Amphileptus</i> sp.	0	1120	0	0	6580	0	0
	<i>Litonotus</i> sp.	0	0	1340	470	0	0	0
	<i>Coleps</i> sp.	93	560	1680	3760	940	3250	6270
	<i>Aspidisca</i> sp.	3700	1680	335	0	0	0	1960
	<i>Paramecium caudatum</i>	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Colpidium colpoda</i>	93	0	0	0	0	0	0
	<i>Opercularia</i> sp.	1943	0	0	0	0	0	0
	<i>Vorticella</i> sp.	1203	0	0	0	0	0	0
	<i>Rotatoria</i> nd.	1943	4480	1340	3290	0	360	0
	<i>Nematoda</i> nd.	0	0	670	0	0	0	0
	<i>Aelosoma</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Tardigrada</i> nd.	185	0	0	0	470	0	0
Piren	<i>Arcella</i> sp.	2405	7280	7840	4700	7260	5640	5330
	<i>Difflugia</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Amphileptus</i> sp.	0	1120	2800	0	0	0	0
	<i>Litonotus</i> sp.	0	0	2240	470	0	0	3450
	<i>Coleps</i> sp.	93	560	1680	4320	2990	4700	4390
	<i>Aspidisca</i> sp.	3700	1680	0	0	0	0	0
	<i>Paramecium caudatum</i>	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Colpidium colpoda</i>	93	0	0	0	0	0	0
	<i>Opercularia</i> sp.	1943	0	0	0	0	0	0
	<i>Vorticella</i> sp.	1203	0	0	0	0	0	0
	<i>Rotatoria</i> nd.	1943	4480	2240	1410	0	470	0
	<i>Nematoda</i> nd.	0	0	0	470	0	0	630
	<i>Aelosoma</i> sp.	0	0	0	0	855	0	0
	<i>Tardigrada</i> nd.	185	0	1120	0	430	0	0
Próbka kontrolna	<i>Arcella</i> sp.	2405	7280	4718	648	2035	5365	2498
	<i>Difflugia</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Amphileptus</i> sp.	0	1120	185	648	0	0	0
	<i>Litonotus</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Coleps</i> sp.	93	560	2775	648	648	555	1018
	<i>Aspidisca</i> sp.	3700	1680	93	1018	0	93	278
	<i>Paramecium caudatum</i>	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Colpidium colpoda</i>	93	0	0	0	0	0	0
	<i>Opercularia</i> sp.	1943	0	0	0	0	0	0
	<i>Vorticella</i> sp.	1203	0	0	0	0	0	0
	<i>Rotatoria</i> nd.	1943	4480	1110	278	278	278	370
	<i>Nematoda</i> nd.	0	0	278	1295	278	0	648
	<i>Aelosoma</i> sp.	0	0	93	0	93	0	93
	<i>Tardigrada</i> nd.	185	0	93	0	0	0	93
	<i>Rotatoria</i> nd.	1943	4480	1110	1758	740	833	925
	<i>Nematoda</i> nd.	0	0	463	0	0	1480	278
	<i>Aelosoma</i> sp.	0	0	93	93	0	93	93
	<i>Tardigrada</i> nd.	185	0	0	0	0	0	93

Tabela 6. Liczebność bakterii i grzybów w wodzie w wielogatunkowym teście toksykologicznym typu mikrokosm (jtk/cm<sup>3</sup>)  
 Table 6. Number of bacteria and fungi present in the water, established in the multi-species toxicity test of microcosm type (cfu/cm<sup>3</sup>)

WWA	Wskaźnik	Czas, d						
		1	7	14	21	28	35	42
Antracen	Ogólna liczba bakterii ( $\cdot 10^4$ )	43	44,15	0,94	2,69	0,87	2,07	1,5
	Ogólna liczba grzybów ( $\cdot 10^2$ )	184,5	121,67	36,5	7,75	34,07	95,93	190
Fenantren	Ogólna liczba bakterii ( $\cdot 10^4$ )	43	44,15	3,41	1,05	2,9	7280	0,8
	Ogólna liczba grzybów ( $\cdot 10^2$ )	184,5	121,67	30	0,9	146	4,65	16,7
Naftalen	Ogólna liczba bakterii ( $\cdot 10^4$ )	43	44,15	13,83	0,59	1,64	1,83	2,06
	Ogólna liczba grzybów ( $\cdot 10^2$ )	184,5	121,67	36	5,9	13,47	87	12,8
Piren	Ogólna liczba bakterii ( $\cdot 10^4$ )	43	44,15	5,06	0,64	1,45	1,49	1,02
	Ogólna liczba grzybów ( $\cdot 10^2$ )	184,5	121,67	38,5	27,4	72	44,97	171
Próbka kontrolna	Ogólna liczba bakterii ( $\cdot 10^4$ )	43	44,15	3,83	4,91	3,07	7,3	0,87
	Ogólna liczba grzybów ( $\cdot 10^2$ )	184,5	121,67	0,2	7,05	51	8,1	10,5

Tabela 7. Przyrost *Elodea canadensis* oraz *Lemna minor* w wielogatunkowym teście toksykologicznym typu mikrokosm (%)  
 Table 7. Increment in the length and mass of *Elodea canadensis*, as well as in the surface area and number of fronds of *Lemna minor*, established in the multi-species toxicity test of microcosm type (%)

WWA	Wskaźnik	Czas, d						
		1	7	14	21	28	35	42
Antracen	Przyrost masy <i>Elodea canadensis</i>	4,00	21,25	55,38	44,36	53,04	21,95	-25,69
	Przyrost długości <i>Elodea canadensis</i>	-20,80	20,46	22,89	28,20	62,33	27,06	-46,96
	Przyrost liczby listków <i>Lemna minor</i>	122,22	292,00	221,74	417,65	183,33	366,67	420,00
	Przyrost powierzchni listków <i>Lemna minor</i>	13,36	284,06	138,74	200,06	154,29	662,69	275,10
Fenantren	Przyrost masy <i>Elodea canadensis</i>	4,00	21,25	77,17	69,67	104,10	35,92	0,85
	Przyrost długości <i>Elodea canadensis</i>	-20,80	20,46	59,63	97,14	59,28	86,03	-24,21
	Przyrost liczby listków <i>Lemna minor</i>	122,22	292,00	285,00	336,36	374,07	779,17	2938,10
	Przyrost powierzchni listków <i>Lemna minor</i>	13,36	284,06	238,33	320,75	908,53	1403,46	4450,39
Naftalen	Przyrost masy <i>Elodea canadensis</i>	4,00	21,25	55,05	63,64	59,84	4,82	99,30
	Przyrost długości <i>Elodea canadensis</i>	-20,80	20,46	81,15	91,63	106,05	0,23	117,99
	Przyrost liczby listków <i>Lemna minor</i>	122,22	292,00	296,88	433,33	468,75	731,58	7852,00
	Przyrost powierzchni listków <i>Lemna minor</i>	13,36	284,06	310,20	363,75	634,79	1299,91	8474,78
Piren	Przyrost masy <i>Elodea canadensis</i>	4,00	21,25	27,06	46,15	63,22	19,40	137,74
	Przyrost długości <i>Elodea canadensis</i>	-20,80	20,46	38,14	61,08	48,92	56,66	35,71
	Przyrost liczby listków <i>Lemna minor</i>	122,22	292,00	256,52	306,25	520,83	800,00	3169,23
	Przyrost powierzchni listków <i>Lemna minor</i>	13,36	284,06	252,21	271,28	465,21	718,14	2331,37
Próbka kontrolna	Przyrost masy <i>Elodea canadensis</i>	4,00	21,25	44,19	20,00	2,22	44,25	11,29
	Przyrost długości <i>Elodea canadensis</i>	-20,80	20,46	37,58	-19,23	-18,31	20,49	34,64
	Przyrost liczby listków <i>Lemna minor</i>	122,22	292,00	428,57	408,33	513,33	1835,00	4554,55
	Przyrost powierzchni listków <i>Lemna minor</i>	13,36	284,06	319,40	271,88	405,28	2111,89	2991,72

Tabela 8. Liczebność fitoplanktonu w wielogatunkowym teście toksykologicznym typu mikrokosm (org./cm<sup>3</sup>)  
 Table 8. Phytoplankton count established in the multi-species toxicity test of microcosm type (org/cm<sup>3</sup>)

WWA	Organizm	Czas, d						
		1	7	14	21	28	35	42
Antracen	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	8640	36855	90450	7250	20510	17200	2390
	<i>Selenastrum capricornutum</i>	9420	375160	270870	15190	23180	48380	15280
	<i>Chlorella vulgaris</i>	7380	35520	17640	6960	6070	9480	1200
	<i>Navicula</i> sp.	420	630	880	290	490	1200	1680
Fenantren	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	8640	36855	49130	43150	40200	11500	6630
	<i>Selenastrum capricornutum</i>	9420	375160	269870	1840	14810	153270	12700
	<i>Chlorella vulgaris</i>	7380	35520	28490	26310	19040	6620	800
	<i>Navicula</i> sp.	420	630	430	190	370	820	290
Naftalen	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	8640	36855	276000	46190	128810	24490	33320
	<i>Selenastrum capricornutum</i>	9420	375160	473490	23000	47230	2740	11760
	<i>Chlorella vulgaris</i>	7380	35520	7820	6160	13280	10380	90160
	<i>Navicula</i> sp.	420	630	660	840	720	390	560
Piren	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	8640	36855	651050	73500	91140	91140	78400
	<i>Selenastrum capricornutum</i>	9420	375160	1225000	62720	11760	32340	11760
	<i>Chlorella vulgaris</i>	7380	35520	93100	73500	54880	475300	178360
	<i>Navicula</i> sp.	420	630	620	860	480	490	360
Próbka kontrolna	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	8640	36855	35600	25300	42070	22940	33980
	<i>Selenastrum capricornutum</i>	9420	375160	132970	9710	4150	62000	40090
	<i>Chlorella vulgaris</i>	7380	35520	61420	13860	68720	24730	2660
	<i>Navicula</i> sp.	420	630	660	820	540	780	1000

Tabela 9. Liczebność organizmów zwierzęcych w wielogatunkowym teście toksykologicznym typu mikrokosm (org./cm<sup>3</sup>)  
 Table 9. Number of animal organisms established in the multi-species toxicity test of microcosm type (org/cm<sup>3</sup>)

WWA	Organizm	Czas, d						
		1	7	14	21	28	35	42
Antracen	<i>Daphnia magna</i>	2	4	4	5	6	78	195
	<i>Thamnocephalus platyurus</i>	6	0	0	0	0	0	0
	<i>Heterocypris inconguretus</i>	85	120	48	182	27	70	306
	<i>Brachionus calyciflorus</i>	28	1000	59	104	601	351	549
	<i>Physa acuta</i>	0	0	0	2	1	0	0
Fenantren	<i>Daphnia magna</i>	2	4	5	26	28	31	1493
	<i>Thamnocephalus platyurus</i>	6	0	0	0	0	0	0
	<i>Heterocypris inconguretus</i>	85	120	56	61	81	91	272
	<i>Brachionus calyciflorus</i>	28	1000	39	179	994	156	248
	<i>Physa acuta</i>	0	0	0	10	7	0	0
Naftalen	<i>Daphnia magna</i>	2	4	8	7	9	202	476
	<i>Thamnocephalus platyurus</i>	6	0	0	0	0	0	0
	<i>Heterocypris inconguretus</i>	85	120	70	47	51	85	61
	<i>Brachionus calyciflorus</i>	28	1000	28	25	96	35	11
	<i>Physa acuta</i>	0	0	0	0	1	11	4
Piren	<i>Daphnia magna</i>	2	4	6	9	22	52	67
	<i>Thamnocephalus platyurus</i>	6	0	0	0	0	0	0
	<i>Heterocypris inconguretus</i>	85	120	128	501	369	265	248
	<i>Brachionus calyciflorus</i>	28	1000	48	148	61	32	184
	<i>Physa acuta</i>	0	0	0	0	1	1	0
Próbka kontrolna	<i>Daphnia magna</i>	2	4	7	14	35	23	21
	<i>Thamnocephalus platyurus</i>	6	0	0	0	0	0	0
	<i>Heterocypris inconguretus</i>	85	120	139	1145	602	4100	250
	<i>Brachionus calyciflorus</i>	28	1000	89	32	72	60	91
	<i>Physa acuta</i>	0	0	0	0	0	0	0



dla mikroorganizmów. We wszystkich próbkach osadu dennego wykazano obecność licznych pierwotniaków, głównie z rodzajów *Arcella* i *Coleps*. Liczebność bakterii w wodzie, w próbkach z WWA oraz w próbkach kontrolnych zmniejszyła się w czasie o rząd wielkości w porównaniu z ich liczbą w pierwszym tygodniu badań. Liczebność grzybów w większości próbek także uległa znacznemu zmniejszeniu, co świadczy o niewielkiej dostępności substratów pokarmowych dla mikroorganizmów. We wszystkich próbkach stwierdzono intensywny rozwój rzęsy drobnej oraz przrystość masy i długości moczarki. Nie zaobserwowano hamowania rozwoju glonów w obecności WWA. W warunkach doświadczeń licznie rozwijały się skorupiaki i wrotki; wystąpił efekt letalny u ryb.

Reasumując wyniki badań uzyskane w 42-dobowym eksperymencie badawczym przeprowadzonym w modelowym ekosystemie wodnym należy stwierdzić, że wyznaczone na podstawie jednogatunkowych testów toksykologicznych tzw. stężenia bezpieczne naftalenu, antracenu, fenantrenu i pirenu nie wpłynęły negatywnie na strukturę i funkcjonowanie biocenozy mikrokosmów wodnych.

#### LITERATURA

1. A. AKSMANN, Z. TUKAJ: The effect of anthracene and phenanthrene on the growth, photosynthesis, and SOD activity of the green algae *Scenedesmus armatus* depends on the PAR irradiance and CO<sub>2</sub> level. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 2004, 47, pp. 177–184.
2. J.L. BONNET, P. GUIRAUD, M. DUSSE, M. KADRI, J. LAFOSSE, R. STEIMAN, J. BOHATIER: Assessment of anthracene toxicity toward environmental eukaryotic microorganisms: *Tetrahymena pyriformis* and selected micromycetes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2005, 60, pp. 87–100.
3. J. BRANDYS: Toksykologia. Wybrane zagadnienia. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 1999.
4. Y.S. EL-ALAWI, B.J. MCCONKEY, D.G. DIXON, B.M. GREENBERG: Measurement of short and long-term toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons using luminescent bacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2002, 51, pp. 12–21.
5. U.S. Environmental Protection Agency ECOTOX Database. <http://www.epa.gov/ecotox/>.
6. V.E. FORBES, T.L. FORBES: *Ecotoxicology in Theory and Practice*. Chapman & Hall, Cambridge 1994.
7. A. GRABIŃSKA-ŁONIEWSKA: Ćwiczenia laboratoryjne z mikrobiologii ogólnej. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 1999.
8. D.F. KALF, T. CROMMENTUIJN, E.J. VAN DE PLASSCHE: Environmental quality objectives for 10 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 1997, 36, pp. 89–97.
9. K. KERSTIG: Functional endpoints in field testing. In: *Freshwater Field Tests for Hazard Assessment of Chemicals* [Eds. I.R. HILL, F. HEIMBACH, P. LEEUWANGH, P. MITTHIESSEN]. Lewis Publishers, CRC Press Inc., 1994.
10. R. LASKOWSKI, P. MIGUŁA: *Ekotoksykologia. Od komórki do ekosystemu*. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa 2004.
11. H.J. LEE, J. VILLAUME, D.C. CULLEN, B.C. KIM, M.B. GU: Monitoring and classification of PAH toxicity using an immobilized bioluminescent bacteria. *Biosensors and Bioelectronics* 2003, 18, pp. 571–577.
12. J.M. NEFF, S.A. STOUT, D.G. GUNSTERT: Ecological risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments: Identifying sources and ecological hazard. *Integrated Environmental Assessment and Management* 2005, 1, 1, pp. 22–33.
13. PN-C-04537-02:1973. Woda i ścieki. Badania zawartości związków fosforu. Oznaczanie rozpuszczalnych ortofosforanów. Metoda kolorymetryczna przy użyciu molibdenianu amonowego i chlorku cynowego jako czynnika redukującego.
14. PN-C-04576-06:1973. Woda i ścieki. Badania zawartości związków azotu. Oznaczanie azotu azotynowego metodą kolorymetryczną z kwasem sulfanilowym i 1-naftyloaminą.
15. PN-C-04576-08:1973. Woda i ścieki. Badania zawartości związków azotu. Oznaczanie azotu azotanowego. Metoda kolorymetryczna z kwasem fenolodwusulfonowym.
16. PN-C-04576-4:1994. Woda i ścieki. Badania zawartości związków azotu. Oznaczanie azotu amonowego w wodzie metodą bezpośredniej nessleryzacji.
17. PN-C-04578-03:1974. Woda i ścieki. Badania zapotrzebowania tlenu i zawartości węgla organicznego. Oznaczanie chemicznego zapotrzebowania tlenu (ChZT) metodą dwuchromianową.
18. PN-C-04616-08:1982. Woda i ścieki. Badania specjalne osadów. Oznaczenie aktywności dehydrogenaz w osadzie czynnym metodą spektrofotometryczną z TTC.
19. PN-EN ISO 17993:2005. Jakość wody. Oznaczanie 15 wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) w wodzie metodą HPLC z detekcją fluorescencyjną po ekstrakcji ciecz–ciecz.
20. PN-ISO 9297:1994. Jakość wody. Oznaczanie chlorków. Metoda miareczkowania azotanem srebra w obecności chromianu jako wskaźnika (metoda Mohra).
21. A.Y. RENOUX, D. MILLETTE, R.D. TYAGI, R. SAMSON: Detoxification of fluorine, phenanthrene, carbazole and p-cresol in columns of aquifer sand as studied by the Microtox assay. *Water Research* 1999, 33, 9, pp. 2045–2052.
22. M. STRELOKE: Objectives and design of aquatic field microcosm studies for pesticide registration. Notes from technical workshop: Regulatory evaluation of aquatic microcosm studies with pesticides, Brighton 2002.
23. TOC Instruction Manual. Total Organic Carbon Analyzer Model TOC-5000. Shimadzu Corporation, Environmental Analyzers Plant, Analytical Instruments Division.
24. UTHSCSA ImageTool, Version 3.0 Final. <http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>.
25. R.P.A. VAN WIJNGAARDEN, T.C.M. BROCK, P.J. VAN DEN BRINK: Threshold levels of effects of insecticides in freshwater ecosystems: A review. *Ecotoxicology* 2005, 14, pp. 355–380.
26. G. VERRHIEST, B. CLEMENT, G. BLAKE: Single and combined effects of sediment-associated PAHs on three species of freshwater macroinvertebrates. *Ecotoxicology* 2001, 10, pp. 363–372.
27. M. ZAŁĘSKA-RADZIWIŁŁ: Wyznaczanie bezpiecznych stężeń zanieczyszczeń w wodach powierzchniowych na podstawie testów toksykologicznych. *Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych* 1999, 18, ss. 491–501.
28. M. ZAŁĘSKA-RADZIWIŁŁ, R. KALINOWSKI: Badanie toksyczności wybranych WWA. Praca statutowa nr 504G/1112/0014/06, Politechnika Warszawska, Warszawa 2006 (praca niepublikowana).

Załęska-Radziwiłł, M., Łebkowska, M., Kalinowski, R. Assessing the Effects of the Safety Concentrations of Some PAHs on the Aquatic Biocoenosis. *Ochrona Środowiska* 2008, Vol. 30, No. 4, pp. 19–28.

**Abstract:** The effects of the so-called safety concentrations on the aquatic biocoenosis in a model laboratory microcosm ecosystem were verified for the following PAHs of choice: naphthalene, phenanthrene, anthracene and pyrene. The safety concentrations were calculated using the results of laboratory single species toxicity tests. Structural and functional changes in the aquatic ecosystem were assessed by quantitative and qualitative analysis of the phyto- and zooplankton, bottom sediment, vascular plant growth, enzymatic reactions, as well as microbiological and physicochemical parameters. During the final period of the experiments algae growth was observed, primarily of the chlorophyta *Scenedesmus quadricauda* and *Selenastrum capricornutum*, and in some samples also *Chlorella vulgaris*. The experimental conditions applied favored a high growth of *Heterocypris inconguretus* and *Brachionus calyciflorus*.

No PAH-influenced deaths were found to occur in the fish species *Lebistes reticulatus*. Microscopic examinations of the bottom sediment have revealed the presence of numerous protozoa both in the controls and in the PAH containing samples. Enzymatic activity of the bottom sediment fluctuated in the course of the experiments, according to the inflow of the food substrate coming from the atrophy of the organisms. Microbiological examinations make it clear that between the 14th and 42nd day of the test the number of bacteria in the water decreased by an order of magnitude in all the samples as compared to the number determined within the first 7 days. Summing up, the results obtained from a 42-day experiment conducted in a model aquatic ecosystem have demonstrated that the safety concentrations of the PAHs chosen, which were established in the course of single species toxicity tests, exert no adverse effect either on the structure or on the functionality of the aquatic biocoenosis.

**Keywords:** PAH, naphthalene, phenanthrene, anthracene, pyrene, safety concentration, aquatic biocoenosis, microcosm.