

Krystyna Boryń
Elżbieta Jakubowicz
Tadeusz Adam Lewicki

ZASTOSOWANIE METODY BIOINDYKACJI DO CIĄGŁEGO POMIARU TOKSYCZNOŚCI WODY

Żywy organizm narażony na działanie szkodliwych substancji przejawia wielostopniową i wielobjawową reakcję, zależną od rodzaju trucizny, jej stężenia i czasu kontaktu (ekspozycji). Odpowiednio dobrane organizmy mogą służyć do szybkiego wykrywania i oceny stopnia toksyczności skażeń środowiska, a także do oceny skuteczności zabiegów uzdatniania wody i odkażania ścieków [1, 2]. Bioindykacja wykorzystuje objawy przeżyciowe i letalne reakcji organizmów żywych na trucizny, w ilościach zwykle znacznie poniżej progu szkodliwości dla człowieka. Metody bioindykacyjne polegają na użyciu jako swoistego „odczynnika” organizmu żywego, w którym ilościowe i jakościowe pomiary reakcji testowych pomagają w określeniu toksyczności badanej próbki. Ze względu na metodykę, bioindykację można podzielić na: bioindykację terenową i eksperymentalną (laboratoryjną) [3, 4]. Bioindykacja terenowa zajmuje się badaniem stanu i zmian w strukturze gatunków występujących na badanym terenie. W metodzie tej można określać skład i zmiany gatunków, wykonywać pomiary substancji obcych w narządach organizmów pobranych z terenu, wykonywać pomiary parametrów biochemicznych w organizmach pobranych z badanego terenu. Bioindykacja laboratoryjna opiera się na wykorzystaniu hodowanych w laboratorium lub pobranych z nieskażonych środowisk organizmów testowych, do określania toksyczności badanego materiału. Biowskazykami w tej metodzie mogą być wybrane osobniki jednego gatunku, całe populacje lub ekosystemy modelowe [4]. Obiekty biologiczne używane do testów powinny wyróżniać się: możliwością przeżywania w małych naczyniach laboratoryjnych lub klatkach, powszechnością występowania w przyrodzie, dostępnością w dowolnej ilości o każdej porze roku, stałą gatunkową wrażliwością na badane czynniki toksyczne, podobną przeżywalnością wszystkich osobników w tym samym środowisku, łatwością hodowli w warunkach laboratorium oraz szybkim powstawaniem kolejnych pokoleń.

Do najczęściej stosowanych organizmów testowych należą: ryby — *Lebistes reticulatus*, *Salmo gairdneri*, *Brachydanio rerio*, *Gambusia affinis*; ślimaki — *Planorbis*, *Physa integra*; skorupiaki *Daphnia magna*, *Gammarus sp.*, *Asellus aquaticus*; skąposzczety — *Lum-*

briculus viriegatus; pierwotniaki — *Spirostomum ambiguum*; glony — *Scenedesmus sp.*, *Chlorella sp.*, *Skeletonema costatum*; rośliny — *Lemna minor*, *Myriophyllum sp.*, *Ceratophyllum sp.*

Badanie ilościowe z zastosowaniem jednego gatunku, opiera się na pomiarze reakcji testowej, której występowanie jest funkcją czasu i stężenia badanego czynnika. Reakcję testową określa się na podstawie objawów zależnych od gatunku użytego do testu oraz rodzaju i stężenia badanego czynnika. Obserwować można następujące reakcje: zaburzenia lokomotoryki organizmów testowych (unieruchomienie, pobudzenie, zachwianie równowagi), zmiany układu ciała, zmiany pracy narządów wewnętrznych, zmiany anatomiczne nieodwracalne, przebieg procesów fizjologicznych, przebieg procesów biochemicznych, śmierć organizmów.

Miarą toksyczności obciążeń zawartych w badanej próbce jest rozcieńczenie graniczne R_{50t} lub stężenie graniczne C_{50t} , w którym reaguje połowa organizmów testowych.

Na innych zasadach opiera się bioindykacja ekosystemowa. W metodzie tej bioindykatorem jest ekosystem modelowy. Każdy taki układ zawiera wszystkie piętra troficzne, charakterystyczne dla każdego naturalnego ekosystemu (producenci, konsumenci, reducenty), zapewniające przepływ energii i krążenie materii oraz stanów równowagi biologicznej w układzie. Zasada bioindykacji ekosystemowej opiera się na badaniu stopnia zachwiania równowagi biologicznej (homeostazy) ekosystemu modelowego przez badany czynnik toksyczny. Miernikiem toksyczności jest stopień degradacji ekosystemu, ubywanie gatunków wrażliwych, wzrost opornych, aż do jego zniszczenia łącznie.

Metoda bioindykacji stosowana w Zakładzie Wodociągu Centralnego

W Zakładzie Wodociągu Centralnego w Warszawie od 1983 r. prowadzone są prace nad wdrożeniem metody bioindykacji do ciągłego pomiaru toksyczności wody w oparciu o opracowanie wykonane w Wojskowej Akademii Medycznej w Łodzi [2].

Hodowle organizmów testowych prowadzi się w 18 akwariach o pojemności 100 dm³. Podstawowymi organizmami testowymi są: pierwotniak — *Spirostomum ambiguum*, skorupiaki

Mgr K. Boryń, mgr inż. E. Jakubowicz, mgr T. A. Lewicki,
MPWiK w m. st. Warszawie, Zakład Wodociągu Centralnego,
ul. Koszykowa 81, 02-012 Warszawa

Daphnia magna i *Asellus aquaticus*, ryba *Lebistes reticulatus*. Orzések *Spirostomum ambiguum* hodowany jest w małych akwariach o pojemności 7 dm³.

W badaniach próbek wody surowej i uzdatnionej na dwóch ciągach technologicznych ZWC zastosowano analizę testową na *S. ambiguum*, *D. magna*, *L. reticulatus*, *A. aquaticus*; test długotrwałej przeżywalności na *S. ambiguum*; bioindykację ciągłą ekosystemową (tylko dla wody surowej). Analiza testowa polega na określeniu rozcieńczenia (R_{50t}) badanej próbki wody, w którym połowa organizmów użytych do testu reaguje w ściśle określony sposób w określonym czasie. W tym celu wykonuje się szereg rozcieńczeń badanej próbki wody, w postępie geometrycznym o ilorazie postępu 2. Do każdego rozcieńczenia wprowadza się po 20 osobników w przypadku *S. ambiguum*, po 10 w przypadku *D. magna* i *A. aquaticus* oraz po 5 w przypadku *L. reticulatus*. Rozcieńczenia wykonuje się fizjologicznym płynem Tyrode'a (bez glukozy) rozcieńczonym 1:64 dla *S. ambiguum* i 1:8 dla *D. magna*. Rozcieńczenia dla *A. aquaticus* i *L. reticulatus* wykonuje się wodą z hodowli. Po wprowadzeniu organizmów do naczyń, rejestruje się ich reakcję w poszczególnych rozcieńczeniach, odpowiednio dla *S. ambiguum*, *A. aquaticus* i *L. reticulatus* po 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 24; 48; 72 i 96 h, a dla *D. magna* — w odstępach czasu jak poprzednio lecz do 48 h. Rejestruje się następujące reakcje:

- dla *S. ambiguum* osłabiony ruch i deformacje
- dla *A. aquaticus* pobudzenie lub porażenie ruchu
- dla *D. magna* osłabiony ruch i porażony ruch
- dla *L. reticulatus* zaburzenia ruchu
- dla wszystkich reakcję letalną.

Wartość rozcieńczenia granicznego R_{50t} , dla poszczególnych reakcji i czasów odczytu, oblicza się ze wzoru:

$$R_{50t} = \frac{\Sigma d \cdot m}{\Sigma m}$$

gdzie:

d — średnia arytmetyczna mianowników sąsiednich rozcieńczeń

m — różnica między liczbą reagujących organizmów w sąsiednich rozcieńczeniach.

W przypadku gdy zachodzi reakcja części organizmów tylko w próbce nierozcieńczonej, korzysta się ze wzoru uproszczonego na wskaźnik toksyczności:

$$WT = \frac{n - n_0}{1/2 n}$$

gdzie:

$n - n_0$ — liczba reagujących organizmów

n — liczba organizmów wziętych do testu.

Próbki wody charakteryzujące się brakiem toksyczności ostrej (brak reakcji w analizie testowej), bada się testem przeżywalności długotrwałej na *S. ambiguum*. Gatunek ten jest

odporny na długotrwałe warunki głodowe i potrafi zachować normalne funkcje fizjologiczne powyżej czternastu dni w płynie Tyrode'a, rozcieńczonym 1:64. Test przeżywalności polega na określeniu czasu (t_{50}), po którym połowa organizmów wprowadzonych do badanej próbki, reaguje letalnie. W tym celu do badanej wody wprowadza się 20 osobników *S. ambiguum* i prowadzi się obserwację co 48 h. Czas graniczny t_{50} oblicza się ze wzoru:

$$t_{50} = \frac{\Sigma t \cdot m}{\Sigma m}$$

t — średnia arytmetyczna czasów dwóch kolejnych odczytów,

m — różnica między liczbą reagujących organizmów w dwóch kolejnych odczytach.

W testach na *S. ambiguum* istotne jest odpowiednie przygotowanie organizmów testowych i wody redestylowanej do płynu Tyrode'a i płukania organizmów. Wodę odpowiedniej jakości otrzymuje się przez destylację z nad KMnO_4 wody redestylowanej.

Ponieważ hodowla *S. ambiguum* zawiera inne pierwotniaki i dużą ilość bakterii, a woda w niej jest silnie troficzna, organizmy pobrane do testów należy poddać płukaniu. W tym celu pobiera się około 20 cm³ zawiesiny organizmów z hodowli do cylindra o objętości 25 cm³. Po opadnięciu komórek na dno, zlewa się nadmiar wody do objętości około 3 cm³. Następnie uzupełnia się wodą redestylowaną do 25 cm³. Jedną porcję płucze się trzykrotnie, zostawiając po ostatnim płukaniu około 10 cm³ płynu. Płukanie należy wykonać w ciągu 15 min, a wprowadzenie organizmów do testów zakończyć nie później niż 30 min od chwili rozpoczęcia płukania.

Bioindykację ekosystemową wykonano w układzie dynamicznym t.j. w przepływie badanej wody przez układ połączonych lewarowo ekosystemów modelowych. Pojedynczy ekosystem stanowi graniaste akwarium o pojemności 7 dm³. W skład biotopu wchodzi woda po filtracji powolnej I ciągu technologicznego ZWC; warstwa piasku kwarcowego grubości około 3 cm. W skład biocenozy wchodzi: orzések — *S. ambiguum*, *Paramecium* sp.; skorupiaki — *D. magna*, *Asellus aquaticus*, *Gammarus* sp.; ślimaki — *Planorbis* sp.; *Physa* sp.; gatunki skąposzczetów, glonów i bakterii namnożone w hodowlach z osadu, pobranego z naturalnego stanowiska w Puszczy Kampinowskiej; ryby — *L. reticulatus*; rośliny — *Vallisneria* sp., *Myriophyllum* sp., *Ceratophyllum* sp., *Lemna minor*, *Littorella uniflora*, *Isoetes* sp.

Warunkiem użycia ekosystemu do testu jest ustalenie w nim równowagi biologicznej. W tym celu wszystkie nowo założone ekosystemy poddaje się dojrzwaniu przez ok. 3 miesiące, ponieważ wyrazem reakcji ekosystemu na skażenie są zmiany w strukturze biocenozy (ubywanie gatunków wrażliwych, zagęszczanie opornych). Liczba ekosystemów reagujących w układzie i prędkość przepływu badanej wody przez ten układ, świadczy o jej stopniu tok-

syczności. W szeregach lewarowo połączonych ekosystemów, pierwszym jest tzw. ogniwo zerowe. Jest to akwarium wypełnione tylko wodą badaną, w której znajduje się ściśle określona ilość podstawowych organizmów testowych. Ogniwo to daje pierwszy sygnał o pojawieniu się silnego skażenia. System bioindykacji wdrażany w ZWC w Warszawie ma na celu informować o nagłych, silnie toksycznych zanieczyszczeniach, które mogą pojawić się w Wiśle.

LITERATURA

1. A. KAMIŃSKI: The Use of Biological Test for The Examination of Pesticides. *Pure and Applied Chemistry* 1975, 42, 1—2, 255—284.
2. A. KAMIŃSKI: Opracowanie metod i urządzeń do ciągłego pomiaru toksyczności wody. *Wojskowa Akademia Medyczna Łódź* 1974.
3. E. PIECZYŃSKA, J. SPODŃIEWSKA: *Ekologia a ochrona środowiska człowieka*, W. Sz. i P. Warszawa 1979.
4. K. DEMKOWICZ - DOBRZAŃSKI: Bioindykacja chemicznych obciążeń środowiska. *Zakład Badania Środowiska AM w Warszawie* 1981.

K. Boryń, E. Jakubowicz, T.A. Lewicki **Bioindication method as applied to continuous measuring of the toxicity level in water**

The principles to, and the requirements for, the application of the bioindication method to continuous mea-

surement of toxicity levels in water supplied for household needs, are discussed. It has been suggested that a set of test organisms be applied in the laboratory bioindication method. Discussed are the parameters of the bioindication involved in a dynamic system which is being operated by the Central Water Works of Warsaw.