

Anna Czaplicka-Kotas

Badania wpływu jakości wody na wytwarzanie barwników fotosyntetycznych w komórkach glonów *Chlorella vulgaris* na potrzeby biomonitoringu wód powierzchniowych

Do monitorowania jakości wód w krajach Unii Europejskiej i w Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej zalecane jest wykonywanie biotestów z użyciem kilku bioindykatorów [1,2]. Wyniki biotestów nie wskazują na składniki mieszaniny zanieczyszczeń, które są odpowiedzialne za zmianę aktywności biologicznej danego bioindykatora, lecz informują o sumarycznym wpływie toksyczności wszystkich zanieczyszczeń zawartych w badanych wodach na dany organizm wskaźnikowy [3]. Wynik biotestu jest sygnałem, że do wód dostały się zanieczyszczenia, które mogą stanowić potencjalne zagrożenie organizmów wodnych. Zastosowanie tej metody informuje o przedostaniu się do środowiska wodnego substancji toksycznych, mogących niekorzystnie wpływać także na zdrowie człowieka. Uzyskanie szybkiej informacji o zmianie jakości wody pozwala wykorzystać tę informację jako sygnał do prowadzenia dalszych badań (np. chemicznych), ponieważ sam biotest nie wskaże przyczyny zmiany jakości wody.

Asynchroniczne hodowle glonów *Chlorella vulgaris* są powszechnie stosowane i zalecane przez polską normę PN-74/C-04610/05 [4] oraz przez wytyczne OECD [1]. Dane literaturowe wskazują, że synchroniczne hodowle komórek glonów *Chlorella vulgaris*, w których komórki znajdują się w tym samym stadium rozwoju, stwarzają możliwość uzyskania bardziej jednoznacznej reakcji na zmiany jakości (toksyczności) środowiska, niż hodowle asynchroniczne. Hodowle synchroniczne umożliwiają śledzenie procesów przebiegających w poszczególnych etapach cyklu życia komórek pod wpływem testowanych związków [5–13].

Pierwsze próby zastosowania synchronicznej hodowli glonów *Chlorella vulgaris* do badań jakości środowiska podjęto w latach 80. w Katedrze Biologii Molekularnej, Biochemii i Biofarmacji Śląskiej Akademii Medycznej. Badania te dotyczyły zmian absorbancji hodowli i współczynnika podziału komórek glonów *Chlorella vulgaris*, hodowanych synchronicznie na rozcieńczonych wodą ściekach z zakładów przemysłowych leżących w dorzeczu Odry [14]. Pod koniec lat 90. hodowano synchronicznie glony *Chlorella vulgaris* na rozcieńczonych ściekach z garbarni „Skotan” w Skoczowie [15]. W badaniach wody ze Zbiornika Goczałkowickiego przeprowadzonych w ostatnich latach wykazano, że najlepszym kryterium wskazującym na zmianę jakości wody za pomocą biotestu

z użyciem synchronicznej hodowli glonów *Chlorella vulgaris* jest analiza zawartości barwników fotosyntetycznych [16,26]. W badaniach tych zastosowano następujące kryteria zmian zachodzących w glonach pod wpływem testowanych wód:

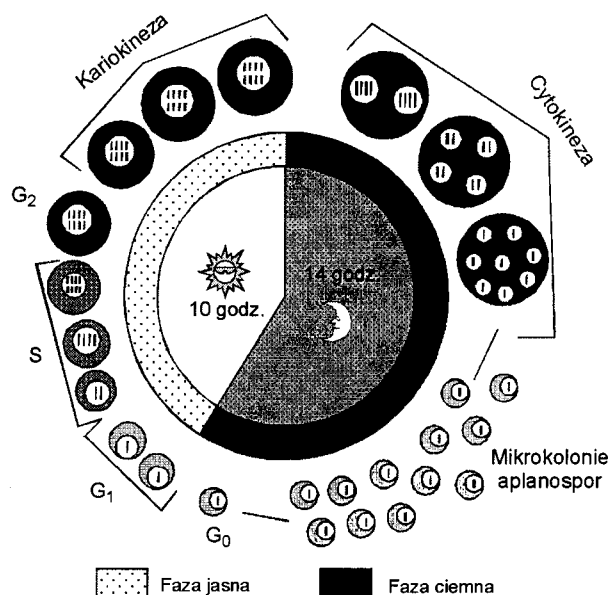
- zmiany absorbancji hodowli, odzwierciedlające aktywność biologiczną komórek glonów,
- współczynnik podziału komórek,
- współczynnik inhibicji wzrostu,
- biosynteza barwników fotosyntetycznych w 24-godz. cyklu życia komórek w hodowli synchronicznej [16,33].

Celem niniejszej pracy jest pokazanie możliwości wykorzystania kryterium biosyntezy barwników fotosyntetycznych pochodzących z 24-godz. cyklu życia hodowanych synchronicznie komórek glonów *Chlorella vulgaris* do kontroli jakości wód powierzchniowych [33].

Materiały i metodyka

Materiał badawczy

W badaniach wykorzystano synchroniczną hodowlę glonów *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890, szczep A-8 (rys. 1).

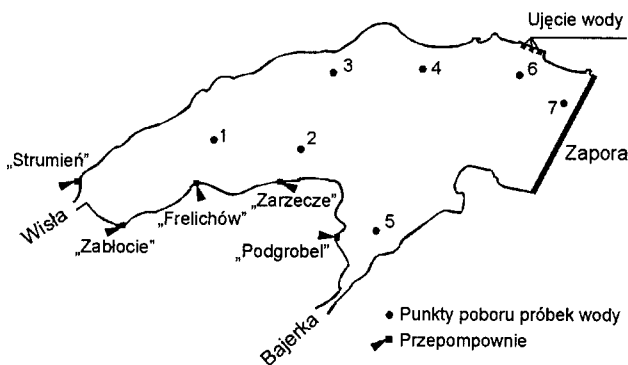


Rys. 1. Schemat cyklu życia komórek *Chlorella vulgaris* [17] (rozwój i wzrost glonów od stadium G₁ do cytokinezy jest ściśle związany z oświetleniem i warunkami hodowli; na początku fazy ciemnej mają miejsce cytokineza i sporulacja)

Do namnożenia glonów zastosowano standardową pożywkę mineralną Kühla i Lorenzena [18], zmodyfikowaną przez Bornsa [19] ($5 \cdot 10^6 \pm 0,5 \cdot 10^6$ kom./cm³). Badania przeprowadzono w dwóch równoległych seriach pomiarowych. W pierwszej serii glony hodowano w pożywce przygotowanej na wodzie destylowanej (hodowla kontrolna), natomiast w drugiej do sporządzenia pożywek mineralnych użyto wodę pochodzącą z punktów pomiarowych usytuowanych w obrębie Zbiornika Goczałkowickiego. Hodowlę przeprowadzono w warunkach standardowych, tj. w temperaturze 30 °C, stosując zmienne oświetlenie (faza jasna – 10 godz., 15000 lux; faza ciemna – 14 godz. w ciemności), przy ciągłym napowietrzaniu (30 dm³/h), przy czym w fazie jasnej zastosowano dodatkowo dwutlenek węgla (2%) .

Teren badań

Zbiornik Goczałkowicki (województwo śląskie) pełni ważną rolę w systemie produkcji wody na Górnym Śląsku, zaopatrując w wodę około 30% jego mieszkańców. Ponadto zbiornik ten pełni funkcje przeciwpowodziowe i wyrównujące poziom wody w Wiśle w czasie suszy. Prowadzona jest na nim także gospodarka rybacka. Zbiornik Goczałkowicki jest zasilany głównie wodami Wisły (82% udziału wnoszonych wód), ale także rzeki Bajerki (4%), wodami przepompowywanymi do zbiornika z terenu położonego w depresji (10%) oraz innymi wodami (4%), w tym opadami atmosferycznymi [20] (rys. 2).



Rys. 2. Zarys Zbiornika Goczałkowickiego (wraz z dopływami i punktami poboru próbek wody)

Wody Wisły są zanieczyszczone ściekami częściowo oczyszczonymi i nieoczyszczonymi. Całkowity stopień skanalizowania zlewni Wisły w dorzeczu Zbiornika Goczałkowickiego jest niski i wynosi około 25% [21]. Przed ujściem Wisły do Zbiornika Goczałkowickiego usytuowanych jest kilka zakładów przemysłowych (garbarnia, zakłady tekstylne i metalowe w Skoczowie, zakłady kuźnicze w Ustroniu, zakłady przetwórstwa mleczarskiego i przetwórstwa produktów rolnych). Prowadzona jest także intensywna hodowla zwierząt. W dolnym i środkowym biegu górnej Wisły znajdują się pola uprawne użyźniane nawozami, których część przedostaje się do zbiornika, bez możliwości samooczyszczenia niosących je wód. Do Zbiornika Goczałkowickiego, poprzez Wisłę, Bajerkę i Potok Zbytkowski, jesienią dostają się także wody spuszczone ze stawów hodowlanych. Z bezpośredniego sąsiedztwa do Zbiornika Goczałkowickiego przedostają się odcieki z pól uprawnych i ścieki miejskie. Ścieki te przepompowywane są w Zarzecz, Frelichowie, Zabłociu i Podgroblu oraz w Strumieniu. Zbiornik położony jest w sąsiedztwie dwóch wielkich okręgów przemysłowych, Ostrawsko-Karwińskiego i Górnośląskiego, z których zanieczyszczenia wraz z opadami przy niesprzyjającym wietrze mogą przedostawać się do Zbiornika

Goczałkowickiego. Próbkę wody ze Zbiornika Goczałkowickiego, w których hodowano glony, pobrano raz w miesiącu (od czerwca do października 1997 r.) w siedmiu punktach poboru (rys. 2). Przed rozpoczęciem badań próbki wody przesączono przez filtry membranowe (0,45 µm) firmy Millipore.

Ekstrakcja barwników fotosyntetycznych

Barwniki fotosyntetyczne wyekstrahowano z komórek glonów *Chlorella vulgaris* pobranych z kolumn reakcyjnych w 24-godz. cyklu życia. Pobrane próbki (20 cm³) wirowano (2400 × g) przez 15 min, po czym zdekantowano, a komórki zawieszono w metanolu. Ekstrakcję przeprowadzono przy użyciu metanolu cz.d.a. (65 ± 2 °C, 10 min) w probówkach o długości 28 cm i średnicy 1,6 cm zaopatrzonych w chłodziące zwrotne, aż do uzyskania białego osadu komórek. Otrzymane ekstrakty doprowadzono do jednakowej objętości (3 cm³) i oddzielono od osadu przez wirowanie (2500 × g, 3 min) [8], a następnie poddano analizie techniką HPLC.

Analiza barwników fotosyntetycznych

Ekstrakty zawierające barwniki fotosyntetyczne przesączono pod zwiększonym ciśnieniem przez sączek Millex GV₁₃ o średnicy porów 0,22 µm firmy Millipore. Skład ekstraktu barwników fotosyntetycznych zbadano wykorzystując wysokosprawną chromatograf cieczeniowy (Hewlett Packard 1050 wyposażony w detektor UV/VIS (440 nm) i automat do poboru próbek). Rozdział barwników przeprowadzono na kolumnie C₁₈ Eurospher 100, Knauer (250 mm × 4 mm), stosując wymywanie gradientowe w układzie metanol:woda (85+100% metanolu po 15 min). Warunki rozdziału chromatograficznego HPLC były kontrolowane (sterowane) przy użyciu oprogramowania ChemStation (Hewlett Packard). Barwniki identyfikowano porównując uzyskane czasy retencji badanych próbek z czasami retencji wzorców i z danymi literaturowymi [22–25]. Zmiany zawartości barwników syntezowanych w glonach *Chlorella vulgaris* oceniono na podstawie zmian powierzchni pod pikami odpowiadającymi wybranym barwnikom fotosyntetycznym w przeliczeniu na 10⁶ komórek.

Analiza wskaźników jakości wody

Wskaźniki fizyczno-chemiczne i bakteriologiczne wody oznaczono w laboratorium Górnośląskiego Przedsiębiorstwa Wodociągów. Zawartość jonów metali (Fe, Mn, Ni, Pb, Cd, Cu, Co, Zn) w badanych wodach oznaczono z użyciem spektrofotometru absorpcji atomowej AAS–3 Carl Zeiss Jena w płomieniu powietrzno-acetylenowym. Analizy wykonano w Katedrze Analizy Instrumentalnej Śląskiej Akademii Medycznej.

Metodyka analizy danych

Celem zbadania wpływu jakości wód Zbiornika Goczałkowickiego w poszczególnych miesiącach na syntezę barwników fotosyntetycznych w glonach *Chlorella vulgaris*, pochodzących z 24-godz. cyklu życiowego komórek, zastosowano wskaźnik względnej zawartości barwników fotosyntetycznych (W_m) [26] wyrażony wzorem:

$$W_m = \sqrt{\frac{L_B}{L_P} \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^m (a_{ij}^m - 1)^2} \quad (1)$$

w którym:

a_{ij}^m – względna (w stosunku do próbki kontrolnej) zawartość i-tego barwnika w j-tym punkcie pomiarowym w m-tym miesiącu

m – miesiąc (VI–X)

L_B – liczba barwników (9)

L_P – liczba punktów pomiarowych (1–7)

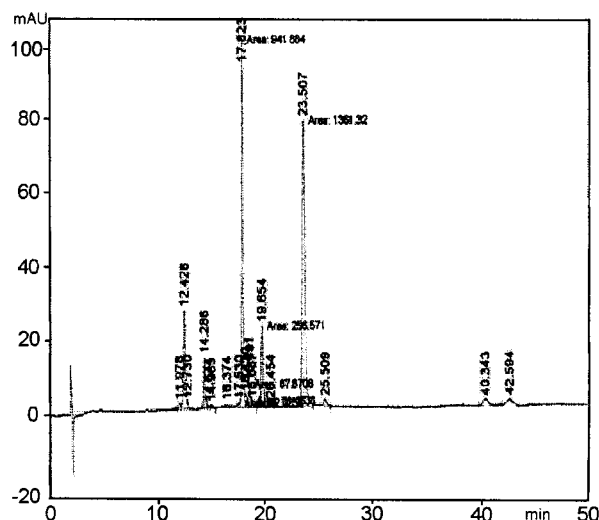
Wskaźnik ten ma charakter całkowity, sumujący efekt pochodzący od dziewięciu zidentyfikowanych barwników fotosyntetycznych we wszystkich punktach pomiarowych w danym miesiącu. Można także rozpatrywać każdy barwnik osobno, co zostało zastosowane w pracy [16].

Badania podobieństwa profili zmian zawartości dziewięciu zidentyfikowanych barwników fotosyntetycznych przeprowadzono z zastosowaniem analizy skupień, wykorzystując jako miarę podobieństwa współczynnik korelacji liniowej Pearsona. Odległość między grupami wyznaczono metodą średnich połączeń (VPGMA) [27]. Wynikiem graficznym przeprowadzonych klasyfikacji były dendrogramy podobieństw rozkładów. Analizę statystyczną wykonano na poziomie istotności $\alpha=0,05$ z zastosowaniem pakietu statystycznego Statistica 5.1.

Obliczono średnie arytmetyczne i odchylenia standardowe wartości wskaźników zanieczyszczenia wody w Zbiorniku Goczałkowickim w okresie badawczym w poszczególnych miesiącach (tab. 1). Jako hipotezę zerową (H_0) przyjęto brak różnic między średnimi arytmetycznymi. Hipotezę zerową zweryfikowano stosując jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). W przypadku odrzucenia hipotezy zerowej na przyjętym poziomie istotności $\alpha=0,05$ możliwe było utworzenie grup jednorodnych. Grupowanie przeprowadzono w wyniku porównań *post hoc* z zastosowaniem testu T Tukey'a RIR (rozsądnych istotnych różnic). Zastosowane metody statystyczne wymagały spełnienia następujących warunków: symetrii rozkładów, jednorodności wariancji oraz w przypadku ANOVA – braku skorelowania wartości średnich i wariancji. Normalność rozkładu sprawdzono testem Shapiro-Wilka (w przypadku niewielkich odchyłeń wzięto pod uwagę współczynnik asymetrii). Jednorodność wariancji przy więcej niż dwu próbkach zbadano testem Levene'a oraz testem Browna-Forsythe'a. W badaniach korelacji wartości średnich i wariancji zastosowano test istotności dla współczynnika korelacji liniowej Pearsona.

Wyniki badań

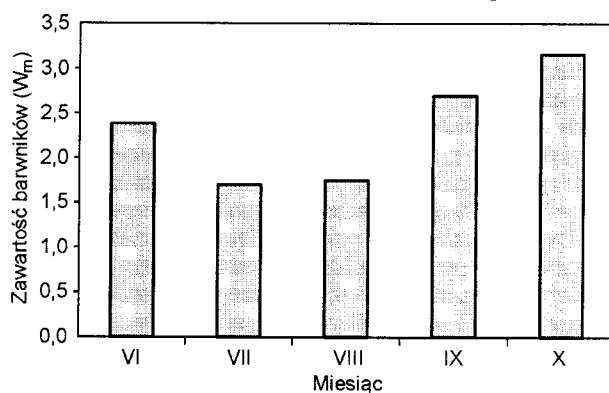
Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że w komórkach badanych glonów występowały następujące barwniki fotosyntetyczne: neoksantyna, wiolaksantyna, anteraksantyna, luteina, zeaksantyna, chlorofile a i b oraz karoteny α i β . Na rysunku 3 przedstawiono przykładowy rozdział chromatograficzny barwników fotosyntetycznych wyekstrahowanych z glonów *Chlorella vulgaris* w 24-godz. cyklu życia hodowli kontrolnej. Zmiany zawartości barwników w komórkach glonów *Chlorella vulgaris* oceniono na podstawie zmian powierzchni pod pikami wybranych barwników fotosyntetycznych w przeliczeniu na 10^6 komórek. Powierzchnie wyznaczone w 24-godz. cyklu życia glonów *Chlorella vulgaris* były największe w przypadku następujących barwników fotosyntetycznych (w przeliczeniu na 10^6 komórek): chlorofilu a (32,8), luteiny (19,8), chlorofilu b (7,0) i wiolaksantyny (6,1). Powierzchnie określone w przypadku karotenu α , karotenu β , zeaksantyny, neoksantyny i anteraksantyny (w przeliczeniu na 10^6 komórek) były mniejsze i wynosiły 0,7–3,5. Podane wartości były średnimi charakteryzującymi hodowlę kontrolną z pięciu cykli eksperymentalnych [16].



Rys. 3. Rozdział chromatograficzny ekstraktu metanolowego barwników fotosyntetycznych glonów *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890, szczep A-8 hodowli kontrolnej ($t=24$ godz. cyklu życia) [16] (czasy retencji: neoksantyna – 11,978 min, wiolaksantyna – 12,428 min, anteraksantyna – 14,286 min, luteina – 17,823 min, zeaksantyna – 18,120 min, chlorofil b – 19,654 min, chlorofil a – 23,507 min, karoten α – 40,343 min; karoten β – 42,594 min)

W celu umożliwienia porównania zmian skuteczności syntezy barwników w różnych hodowlach badanych glonów *Chlorella vulgaris* obliczono względne zawartości (w odniesieniu do hodowli kontrolnej) poszczególnych barwników fotosyntetycznych. Względną zawartość określonego barwnika fotosyntetycznego obliczono jako iloraz zawartości tego barwnika w badanej hodowli (prowadzonej na pożywkę przygotowanej w wodzie destylowanej, prowadzonej w pożywkę przygotowanej na wodzie destylowanej). Względną zawartość danego barwnika w hodowli kontrolnej, przeprowadzonej w pożywkę przygotowanej na wodzie destylowanej, przyjęto jako równą 1.

Aby porównać zmiany skuteczności syntezy wszystkich barwników fotosyntetycznych w komórkach glonów *Chlorella vulgaris* rosnących w wodach z siedmiu punktów pomiarowych usytuowanych w obrębie Zbiornika Goczałkowickiego w poszczególnych miesiącach, obliczono wskaźnik względnej zawartości barwników fotosyntetycznych. Na rysunku 4 pokazano, że wskaźnik względnej zawartości barwników fotosyntetycznych wyekstrahowanych z glonów *Chlorella vulgaris* miał wartości najbardziej zbliżone do hodowli kontrolnej w lipcu i sierpniu, a najbardziej odległe we wrześniu i październiku.



Rys. 4. Wskaźnik względnej zawartości barwników fotosyntetycznych w komórkach glonów [24]

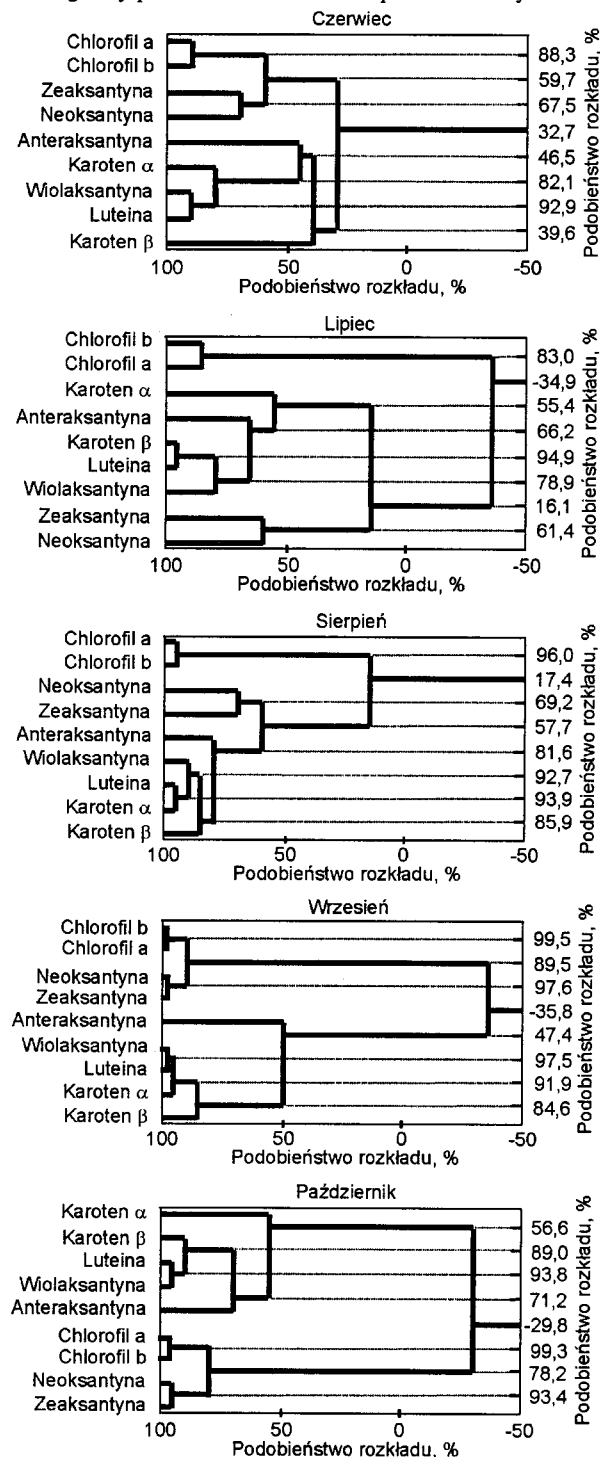
Analizując chromatogramy dotyczące zawartości poszczególnych barwników fotosyntetycznych wyekstrahowanych z glonów *Chlorella vulgaris*, hodowanych w wodach ze

Tabela 1. Statystyki opisowe wskaźników zanieczyszczenia wody w Zbiorniku Goczałkowickim w miesiącach VI–X (analiza statystyczna ANOVA istotności różnic średnich arytmetycznych oraz grupy jednorodnie uzyskane w wyniku porównań *post hoc*) [16]

Wskaźnik, jednostka	x ± σ					ANOVA P*	Grupy jednorodne (test T Tukey'a)			
	VI	VII	VIII	IX	X		I	II	III	IV
Tlen rozpuszczony, gO ₂ /m ³	9,2286 ±0,5823	9,2000 ±0,8083	8,8429 ±0,9554	9,8000 ±0,8485	9,3714 ±0,7181	0,2805 NS	–	–	–	–
Barwa, gPt/m ³	28,8571 ±4,7759	37,2857 ±4,6803	32,8571 ±3,9340	33,4286 ±2,8785	28,8571 ±1,0690	0,0008	VI, VIII, IX, X	VII, VIII, IX	–	–
Wapń, gCa/m ³	25,3000 ±0,9781	25,5000 ±1,4967	28,1143 ±1,9600	26,5000 ±0,2646	27,9429 ±0,6779	0,0002	VI, VII, IX	VIII, IX, X	–	–
Magnez, gMg/m ³	2,5286 ±0,8401	2,0857 ±1,0319	2,3286 ±1,2148	3,4286 ±0,1890	3,2286 ±0,6102	0,0253	VI, VII, VIII, X	VI, VIII, IX, X	–	–
Sód, gNa/m ³	6,5657 ±0,2479	4,5129 ±0,0725	4,7729 ±0,4543	11,3200 ±0,9055	5,9414 ±0,1894	0,0000	VII, VIII	VI, X	IX	–
Potas, gK/m ³	2,5414 ±0,2662	2,8771 ±0,0585	3,0500 ±0,1582	6,1129 ±0,2410	2,8686 ±0,0426	0,0000	VI	VII, VIII, X	IX	–
Chlorki, gCl ⁻ /m ³	12,7857 ±0,9063	9,8571 ±0,3780	10,4286 ±1,2724	10,4286 ±0,5345	10,4286 ±0,4499	0,0000	VII, VIII, IX, X	VI	–	–
Siarczany, gSO ₄ ²⁻ /m ³	38,7857 ±3,0378	31,7571 ±3,2994	29,6714 ±2,1623	30,9286 ±2,9324	33,9143 ±2,7120	0,0000	VII, VIII, IX, X	VI	–	–
Krzemionka, gSiO ₂ /m ³	3,3286 ±0,4348	5,9714 ±0,4536	5,9571 ±0,3359	4,7429 ±0,3505	1,3900 ±0,2082	0,0000	X	VI	IX	VII, VIII
Mangan, gMn/m ³	0,2450 ±0,1025	0,2418 ±0,0737	0,2238 ±0,0630	0,2137 ±0,0500	0,2110 ±0,0392	0,8350 NS	–	–	–	–
Żelazo og., gFe/m ³	0,8929 ±0,1907	0,8660 ±0,2117	0,7262 ±0,2850	0,7357 ±0,2250	0,7347 ±0,2439	0,5056 NS	–	–	–	–
Nikiel, gNi/m ³	0,1037 ±0,0109	0,0988 ±0,0109	0,0983 ±0,0135	0,0987 ±0,0105	0,0957 ±0,0065	0,7196 NS	–	–	–	–
Ołów, gPb/m ³	0,1955 ±0,0188	0,2037 ±0,0090	0,2052 ±0,0208	0,2038 ±0,0138	0,1202 ±0,0525	0,0000	X	VI, VII, VIII, IX	–	–
Kadm, gCd/m ³	0,0306 ±0,0074	0,0310 ±0,0114	0,0299 ±0,0137	0,0209 ±0,0118	0,0206 ±0,0109	0,2006 NS	–	–	–	–
Miedź, gCu/m ³	0,0856 ±0,0324	0,1066 ±0,0159	0,1104 ±0,0188	0,0916 ±0,0109	0,0888 ±0,0136	0,0908 NS	–	–	–	–
Kobalt, gCo/m ³	0,0070 ±0,0037	0,0053 ±0,0021	0,0042 ±0,0030	0,0034 ±0,0021	0,0033 ±0,0014	0,0733 NS	–	–	–	–
Cynk, gZn/m ³	0,1551 ±0,0298	0,1587 ±0,0337	0,1600 ±0,01975	0,1531 ±0,0149	0,1580 ±0,0174	0,9835 NS	–	–	–	–
Chrom, gCr/m ³	0,0002 ±0,0000	0,0003 ±0,0001	0,0003 ±0,0001	0,0002 ±0,0000	0,0003 ±0,0001	0,0146	VI, IX	VII, VIII, X	–	–
Ortofosforany, gPO ₄ ³⁻ /m ³	0,0371 ±0,0054	0,0596 ±0,0277	0,0771 ±0,0295	0,0929 ±0,0198	0,4471 ±0,0867	0,0000	VI, VII, VIII, IX	X	–	–
Fosfor ogólny, gP/m ³	0,0218 ±0,0071	0,0258 ±0,0067	0,0339 ±0,0092	0,1765 ±0,0166	0,2804 ±0,0215	0,0000	VI, VII, VIII	IX	X	–
Azot amonowy, gNH ₄ ⁺ /m ³	0,0267 ±0,0225	0,0114 ±0,0168	0,0150 ±0,0152	0,0081 ±0,0073	0,0663 ±0,0172	0,0000	VI, VII, VIII, IX	X	–	–
Azotyny, gNO ₂ ⁻ /m ³	0,0400 ±0,0041	0,0471 ±0,0027	0,0393 ±0,0073	0,0364 ±0,0111	0,0096 ±0,0021	0,0000	X	VI, VIII, IX	VI, VII, VIII	–
Azotany, gNO ₃ ⁻ /m ³	0,5929 ±0,0974	0,7229 ±0,0787	0,3243 ±0,1315	0,1809 ±0,1165	0,0343 ±0,0113	0,0000	IX, X	VIII, IX	VI, VII	–
Azot organiczny, gN/m ³	0,7744 ±0,1389	0,7437 ±0,2395	0,7793 ±0,3727	1,0689 ±0,3474	0,5937 ±0,0812	0,0327	VI, VII, VIII, X	VI, VII, VIII, IX	–	–
BZT ₅ , gO ₂ /m ³	3,8571 ±0,3599	3,4000 ±1,2754	2,6571 ±1,8609	4,1714 ±2,4791	1,4000 ±0,4397	0,0144	VII, VIII, X	VI, VII, VIII, IX	–	–
Utlenialność, gO ₂ /m ³	5,9857 ±0,7290	5,4429 ±0,4504	6,4429 ±1,0048	6,4857 ±1,2212	5,1857 ±0,2673	0,0162	VI, VII, VIII, X	VI, VII, VIII, IX	–	–
ChZT, gO ₂ /m ³	12,1400 ±3,9183	15,8286 ±2,2013	35,2000 ±27,3981	25,3286 ±7,1381	6,6667 ±1,0328	0,0061	VI, VII, IX, X	VII, VIII, IX	–	–
OWO, gC/m ³	–	4,0286 ±0,2690	4,0667 ±0,2658	4,2714 ±0,2498	4,1143 ±0,1345	0,2610 NS	–	–	–	–
Indeks fenolowy, g/m ³	0,0041 ±0,0009	0,0000	0,0034 ±0,0010	0,0060 ±0,0016	0,0027 ±0,0010	0,0001	VII	VI, VIII, IX	IX	–
Detergenty anionowe, g/m ³	0,0667 ±0,0073	0,0686 ±0,0063	0,0417 ±0,0098	0,0409 ±0,0067	0,0471 ±0,0049	0,0000	VIII, IX, X	VI, VII	–	–
Bakterie mezofilne w 1 cm ³ /37°C po 24 h	95,0000 ±53,463	388,3333 ±107,780	241,4286 ±248,825	172,8571 ±85,9679	125,0000 ±10,4881	0,0042	VI, VIII, IX, X	VII, VIII	–	–
Bakterie psychrofilne w 1 cm ³ /20°C po 72 h	471,4286 ±331,18	725,0000 ±312,65	485,7143 ±282,421	407,1429 ±183,912	512,8571 ±88,4523	0,2547 NS	–	–	–	–
Miano <i>coli</i>	1,3429 ±1,8201	3,8667 ±6,5010	1,4914 ±0,8747	2,9143 ±1,4554	1,4914 ±0,8747	0,4615 NS	–	–	–	–
Miano <i>Escherichia coli</i>	1,3429 ±1,8201	4,3000 ±6,3621	1,5000 ±0,8583	3,4857 ±1,3607	2,1143 ±1,4736	0,3075 NS	–	–	–	–

* dla p>0,05 brak statystycznie istotnych różnic (NS)

Zbiornika Goczałkowickiego w okresie badawczym, zauważono podobieństwa między poszczególnymi barwnikami. Celem ustalenia podobieństwa w grupach barwników (wzięto pod uwagę względną zawartość poszczególnych barwników wyekstrahowanych z glonów hodowanych na wodach pobranych we wszystkich punktach pomiarowych w poszczególnych miesiącach) zastosowano analizę skupień. Jako miarę podobieństwa przyjęto współczynnik korelacji liniowej Pearsona. Odległość między grupami wyznaczono metodą średnich połączeń. Graficznym przedstawieniem przeprowadzonego grupowania są dendrogramy podobieństw rozkładów pokazane na rysunku 5.



Rys. 5. Dendrogramy podobieństw rozkładów barwników fotosyntetycznych wyekstrahowanych z komórek *Chlorella vulgaris* hodowanych synchronicznie w wodzie ze Zbiornika Goczałkowickiego (VI-X 1997 r.) [16]

Na podstawie analizy statystycznej wskaźników jakości wód pokazano podobieństwa i różnice między nimi w poszczególnych miesiącach. Wynik testu wykazał, że spośród 34 analizowanych wskaźników zanieczyszczenia wody 2/3 zmieniało się sezonowo. Statystycznie istotne zmiany zanotowano w przypadku intensywności barwy wody oraz zawartości związków wapnia, magnezu, sodu, potasu, chlorków, siarczanów, krzemionki, ołowiu, chromu ogólnego, ortofosforanów, fosforu ogólnego, azotu amonowego, azotanów, azotu organicznego, BZT₅, utlenialności, ChZT, indeksu fenolowego, detergentów anionowych, a także bakterii mezofilnych.

Dyskusja wyników

W analizowanym okresie na jakość wody w Zbiorniku Goczałkowickim miały wpływ powódź w lipcu 1997 r. [28] oraz jesienne zmiany jakości wody, typowe w jeziorach obciążonych dodatkowo ładunkiem zanieczyszczeń wnoszonych wraz z wodami spuszczanymi ze stawów rybnych. Lipcowa powódź była ważnym wydarzeniem z punktu widzenia oceny przydatności zastosowanego biotestu, ponieważ nastąpiły wówczas znaczące zmiany niektórych wskaźników zanieczyszczenia (tab. 1). Można było zaobserwować, jak wody powodziowe wpłynęły na aktywność metaboliczną hodowanych w nich glonów. W czasie powodzi zaobserwowano podwyższoną zawartość krzemionki w wodach splukiwanych ze skał w zlewni zbiornika. Stwierdzono także wyjątkowo dużą liczebność bakterii mezofilnych, świadczących o zanieczyszczeniu zbiornika fekaliami. W lipcu stwierdzono również największą zawartość azotanów, malejącą istotnie w kolejnych miesiącach. Wzrost zawartości azotanów mógł być spowodowany splukiwaniem nawozów z pól uprawnych. Zmniejszeniu uległa zawartość detergentów anionowych, chlorków i siarczanów. W lipcu badane wody nie zawierały fenoli.

Zgodnie z przebiegiem procesów, typowym w przypadku jezior [29], wody Zbiornika Goczałkowickiego zawierały więcej fosforanów i azotu amonowego w październiku. Dodatkowo od września do października zawartość związków fosforu i azotu amonowego była zwiększona przez ładunek tych zanieczyszczeń wnoszonych przez wody spuszczone ze stawów rybnych, znajdujących się w dorzeczu zbiornika. Ponadto we wrześniu we wszystkich punktach pomiarowych zaznaczyły się istotnie większe ilości związków sodu i potasu (mogące pochodzić z cukrowni w Chybiu) [30]. Również we wrześniu badane wody wykazywały istotnie większe zawartości fenoli niż w pozostałych miesiącach okresu badawczego. Z kolei w październiku zanotowano istotnie mniejszą zawartość ołowiu niż w całym okresie badawczym. Zmian sezonowych nie wykazywały zawartość żelaza, manganu, niklu, kadmu, miedzi, kobaltu, cynku oraz węgla organicznego, a także wskaźniki sanitarne jakości wód – liczba bakterii psychrofilnych, miano *coli* i miano *Escherichia coli*.

Wskaźnik względnej zawartości barwników fotosyntetycznych wyekstrahowanych z glonów rosnących w wodach ze Zbiornika Goczałkowickiego miał wartość najbliższą wartości tego wskaźnika w hodowli kontrolnej w okresie lipcowej powodzi i sierpniowych pomiarów tuż po powodzi. Oczywiście jest, że po powodzi dochodziło do rozcieńczenia zanieczyszczeń wód w zbiorniku na skutek dopływu dużej ilości wody oraz że naniesiony ze zlewni materiał skalny buduje nowe dno. Natomiast jesienią, w efekcie naturalnych zmian zachodzących w jeziorach, dochodzi do zwiększenia w nich

ilości substancji biogennej [29], jest chłodniej i glony ich nie wykorzystują. Zwiększone ilości substancji biogennej w wodach zbiornika były spowodowane także przez wody zasobne w fosforany i azot amonowy spuszczone ze stawów rybnych znajdujących się w dorzeczu Zbiornika Goczałkowickiego (największy w Europie Środkowej kompleks stawów hodowlanych o powierzchni ok. 900 ha) [31,32]. Rosnące w wodach pobranych we wrześniu i październiku glony *Chlorella vulgaris*, hodowane synchronicznie w warunkach laboratoryjnych, syntetyzowały największą zawartość barwników fotosyntetycznych, co objawiało się wartością wskaźnika względnej zawartości barwników fotosyntetycznych najbardziej odbiegającą od wartości tego wskaźnika w hodowli kontrolnej.

Na rysunku 5 przedstawiono dendrogramy ilustrujące podobieństwo rozkładów względnych zawartości wszystkich barwników fotosyntetycznych wyekstrahowanych z komórek glonów *Chlorella vulgaris* hodowanych w wodach pobranych w siedmiu punktach pomiarowych usytuowanych w obrębie Zbiornika Goczałkowickiego w poszczególnych miesiącach 1997 r. W okresie badawczym najbardziej podobne rozkłady miały chlorofile a i b. Najmniejsze podobieństwa rozkładów chlorofili a i b zanotowano w czerwcu i w lipcu – odpowiednio 88,3% i 83%. W pozostałych miesiącach okresu badawczego podobieństwa te mieściły się w zakresie od 96,0% do 99,5%. Odnotowano również, że podczas powodzi chlorofile wydzielali się w osobną grupę, istotnie różniącą się od reszty barwników. W czasie sierpniowych pomiarów, następujących tuż po powodzi, opisywana tendencja utrzymywała się.

Drugą grupę wyróżniającą się podobnymi rozkładami tworzą barwniki neoksantyna i zeaksantyna. Podobieństwo rozkładów między tymi barwnikami wahało się od 61,4% do 97,6%, przy czym podobieństwa w zakresie 60÷70% stwierdzono w czerwcu, lipcu i sierpniu, a powyżej 90% – we wrześniu i październiku. W czerwcu, wrześniu i październiku chlorofile oraz neoksantyna i zeaksantyna wydzielili się w odrębną grupę, a pozostałe barwniki w drugą. W czasie lipcowej powodzi i w sierpniu, odrębną grupę stanowiły chlorofile a i b, a neoksantyna i zeaksantyna grupowały się razem z pozostałymi barwnikami.

Wnioski

♦ Zawartość barwników fotosyntetycznych w synchronicznej hodowli glonów *Chlorella vulgaris* (Beijerinck 1890, szczep A-8) odzwierciedlała zmiany jakości wody w Zbiorniku Goczałkowickim.

♦ Analiza zmian zawartości barwników fotosyntetycznych glonów *Chlorella vulgaris* w hodowli synchronicznej pozwoliła jednoznacznie wyróżnić okresy lipcowej powodzi oraz jesiennych zmian jakości wody.

♦ Na podstawie wskaźnika względnej zawartości barwników fotosyntetycznych w glonach hodowanych w wodach pobranych w lipcu i sierpniu stwierdzono, że zawartość barwników była najbardziej zbliżona do hodowli kontrolnej, a więc woda w tym czasie była najczystsza.

♦ Spośród zidentyfikowanych barwników fotosyntetycznych najlepszymi markerami zmian jakości środowiska wodnego wydają się być chlorofil a, chlorofil b, zeaksantyna i neoksantyna.

*Niniejsza praca powstała na podstawie rozprawy doktorskiej pt. „Hodowla synchroniczna *Chlorella vulgaris* w kontroli jakości wód”, której promotorem była prof. Beata Cwałina. Autorka dziękuje dr. Adamowi Wilczokowi za wykonanie analiz HPLC, mgr Lidii Świątkowskiej za statystyczną analizę danych oraz dr Jolancie Lodowskiej za cenne uwagi i dyskusję.*

LITERATURA

1. Wytyczne OECD do badań substancji chemicznych. Glony, badanie hamowania wzrostu. 1984, nr 201,
2. A. D. EATON, L.S. CLESCERI, E.W. RICE, A.E. GREENBERG [Eds.]: Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater, 21st Edition, Centennial Edition, American Public Health Association, Washington. 2005.
3. M.D. WATERS, S.S. SANDHU: Preface, proc. second symp. "On the Application of Short-Term Bioassays in the Fractionation and Analysis of Complex Environmental Mixtures", Williamsburg 1980; pp. iv–v.
4. PN-74/C-04610/05. Woda i ścieki. Badania toksyczności zanieczyszczeń dla organizmów wodnych. Oznaczanie toksyczności ostrej na glonie *Chlorella*.
5. J. LODOWSKA, U. MAZUREK, S. KURKIEWICZ, A. WILCZOK, G. ŚWIERCZEK, I. TAM, A. PYTEL, T. WILCZOK: Fatty acids in phospholipids of unicellular green alga *Chlorella vulgaris* cultivated synchronously in the presence of propranolol. Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research, 1999, 56(1), pp. 21–27.
6. U. MAZUREK, T. NAGLIK, A. WILCZOK, M. LATOCHA: Effect of cadmium on photosynthetic pigments in synchronously growing *Chlorella* cells. Acta Biochim. Polon., 1990., 37(3), pp 391–394.
7. U. MAZUREK, A. WILCZOK, D. TYRAWSKA, D. ŚWIDERSKA: The development of *Chlorella vulgaris* cells exposed to cadmium at successive stages of their life cycle. Biologia Plantarum, 1992, 34(3–4), pp. 319–323.
8. B. PARFINIEWICZ: Ocena toksyczności Cd(II) w obecności Cu(II), Co(II) i Zn(II) w synchronicznej hodowli glonów *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890, szczep A-8. Praca doktorska, Śląska Akademia Medyczna, Sosnowiec 1998.
9. B. SOSAK-ŚWIDERSKA, D. TYRAWSKA, U. MAZUREK, A. WILCZOK: Morphometric evaluation of cadmium-contaminated *Chlorella vulgaris* Beij. 1890, strain A-8 cells. Pol. Arch. Hydrobiol., 1994, 41(1), pp. 133–147.
10. G. ŚWIERCZEK-ZIĘBA, J. LODOWSKA, U. MAZUREK, S. KURKIEWICZ, T. WILCZOK: Metaprolol effect on fatty acids composition of cell membrane phospholipids. Scientia Pharmaceutica, 2001, 69, pp. 167–178.
11. W. WARDAS: Interakcja egzogennej węglowodórów z glonami *Chlorella* w środowisku wodnym. Prace Naukowe Inst. Inż. Ochr. Środ. Politechniki Wrocławskiej, 1983, Seria Monografie nr 22, ss. 5–107.
12. T. WILCZOK, E. BUSZMAN, U. MAZUREK, A. WILCZOK, K. RACZEK: Influence of colchicine and colchicine on the cell cycle of *Chlorella vulgaris*. Wiss. Hefte d. Pad. Inst. Köthen, 1985, 1(12), pp. 59–61.
13. A. WILCZOK, U. MAZUREK, D. TYRAWSKA, B. SOSAK-ŚWIDERSKA: Effect of cadmium on the cell division of *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890, strain A-8. Pol. Arch. Hydrobiol., 1994, 41(1), pp. 123–131.

14. T. WILCZOK, J. DWORZAŃSKI, T. FARBISZEWSKA, M. GOSS, Z. DZIERŻEWICZ, U. MAZUREK, M. KRYSZEK, K. RACZEK, M. DĘBOWSKI, I. SIMON: Badania toksycznych zanieczyszczeń organicznych w wodach Odry i jej dorzecza. Forum Odrzańskie Opole 1983, Zeszyty Odrzańskie, 1984, Seria Nowa nr 12, ss. 54–71.
15. J. LODOWSKA, A. CZAPLICKA-KOTAS, P. NOGAJ, I. TAM, A. WILCZOK, B. CWALINA: Synchronous culture of *Chlorella vulgaris* as a biotest for quality of wastewater from tannery. Proc. conf. "Trace Elements: Effect on Organisms and Environment", Cieszyn 1998, pp. 103–107.
16. A. CZAPLICKA-KOTAS: Zastosowanie hodowli synchronicznej *Chlorella vulgaris* w kontroli jakości wód. Monografie Komitetu Inżynierii Środowiska PAN, 2004, Vol. 23, ss. 5–89.
17. U. MAZUREK: Changes of C18 fatty acids content in phospholipides of synchronously cultured *Chlorella vulgaris*. Acta Biochim. Polon., 1993, 40(1), pp. 120–122.
18. A. KÜHL, H. LORENZEN: The handling and culturing of *Chlorella*. In: D.M. PRESCOTT [Ed.]: Methods in Cell Physiology. Academic Press. New York, London 1964, pp. 159–187.
19. E. BORNS, H. BOHM, D. SCHULTZE: Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Nährlösungskombinationen auf das Wachstum synchroner Kulturen von *Chlorella vulgaris*. Wiss. Hefte des Pedagog. Institut Köthen, 1973, 2, 55.
20. O. KOSAREWICZ, E. WYSOKLIŃSKA, I. FIRLUS, G. UNIEJEWSKA: Źródła zanieczyszczenia wód Zbiornika Goczałkowice. Mat. konf. „Projekt Mała Wisła”, Bielsko Biała 1993, ss. 8–13.
21. <http://www.katowice.pios.gov.pl>.
22. S.W. WRIGHT, J.D. SHEARER: Rapid extraction and high-performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. J. Chromatogr., 1984, 294, pp. 281–295.
23. S. ROY: High-performance liquid chromatographic analysis of chloropigments. J. Chromatogr., 1987, 3911, pp. 19–34.
24. S.W. WRIGHT, S.W. JEFFREY, R.F.C. MANTOURA, C.A. LLEWELLYN, T. BJORNLAND, D. REPETA, N. WELSCHMEYER: Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. Mag. Ecol. Prog., 1991, Ser. 77, pp. 183–196.
25. B. SKODA: Contributions to the biochemical taxonomy of the genus *Chlorella* Beijerinck sensu lato – pigment composition. I. Cultures growing under optimal conditions. Arch. Hydrobiol., 1992, Suppl. 91, Algological Studies 63, pp. 19–35.
26. A. CZAPLICKA-KOTAS: Changes of the photosynthetic dyes concentration in the synchronous culture of *Chlorella vulgaris* algae in the water quality control. Archives of Environmental Protection (in press).
27. E. LESIŃSKA: Analiza skupień. W: STATISTICA PL dla Windows (t. III): Statystyki II, StatSoft Polska sp. z o.o., 1997, ss. 3159–3188.
28. A. CZAPLICKA-KOTAS, B. CWALINA, A. SZOSTAK, P. NOGAJ, Z. ŚLUSARCZYK: Wpływ powodzi na jakość wód Goczałkowickiego Zbiornika Wodnego, Czasopismo Techniczne, 2004, Wyd. PK, z. 8-Ś, ss. 49–58.
29. J.R. DOJLIDO: Chemia wód powierzchniowych. Wyd. Ekonomia i Środowisko, Białystok 1995.
30. F. TOMICZEK: Mała Wisła i problemy Zbiornika Wodnego Goczałkowice. Mat. konf. „Projekt Mała Wisła”, Bielsko Biała 1993, ss. 4–6.
31. Dane archiwalne. Górnośląskie Przedsiębiorstwo Wodociągów, Katowice 1997 (prace niepublikowane).
32. S. WRÓBEL, J.M. WŁODEK: Gospodarka stawowa w dorzeczu górnej Wisły. W: I. DYNOWSKA, M. MACIEJEWSKI [red.]: Dorzecze górnej Wisły, część II. PWN, Warszawa–Kraków 1991, ss. 97 i 103.
33. A. CZAPLICKA-KOTAS: Hodowla synchroniczna *Chlorella vulgaris* w kontroli jakości wód. Praca doktorska, Politechnika Krakowska, Kraków 2002 (praca niepublikowana).

Czaplicka-Kotas, A. Influence of Water Quality on the Synthesis of Photosynthetic Dyes in the Cells of the Algae *Chlorella vulgaris* for the Purpose of Surface Water Biomonitoring. *Ochrona Środowiska* 2007, Vol. 29, No. 1, pp. 27–33.

Abstract: The study has demonstrated that the biotest involving a synchronous culture of *Chlorella vulgaris* algae is a useful tool for the control of surface water quality. The experiments were carried out with water samples collected from the Goczałkowice Reservoir. The variations observed in the concentrations of the photosynthetic dyes (from 24-hour cell life cycles, analyzed by high performance liquid chromatography) were adopted as the criterion for assessing the variations in the algae cells.

The following photosynthetic dyes were identified in the cells examined: neoxanthin, violaxanthin, antheraxanthin, lutein, zeaxanthin, chlorophyll a, chlorophyll b, α -carotene and β -carotene. The analysis of the changes observed in the cells of the *Chlorella vulgaris* algae enables conclusions to be drawn on the water quality variations in response to flood (to name one example). Of the photosynthetic dyes that have been identified in the algae cells, chlorophyll a, chlorophyll b, neoxanthin and zeaxanthin seem to be the best indicators of water quality variations.

Keywords: *Chlorella vulgaris*, synchronous culture, photosynthetic dyes, water quality control, Goczałkowice Reservoir.