

PAWEŁ WILK*, EWA SZALIŃSKA**

MICROTOX JAKO NARZĘDZIE
DO OCENY TOKSYCZNOŚCI OSADÓW DENNYCHMICROTOX AS A TOOL TO EVALUATE
SEDIMENTS TOXICITY

Streszczenie

Artykuł przedstawia wyniki oceny toksyczności osadów dennych rzeki Detroit przeprowadzonej z wykorzystaniem biotestu Microtox. Artykuł podejmuje też próbę odpowiedzi na pytanie, czy opisywany biotest jest miarodajnym narzędziem do oceny tej toksyczności przy dużej liczbie współwystępujących w osadach zanieczyszczeń. Wyniki przeprowadzonych badań nad stopniem zanieczyszczenia pobranych osadów wykazały, że osady te są zanieczyszczone zarówno metalami (kadm, miedź, ołów, rtęć i nikiel), jak i zanieczyszczeniami organicznymi (PCB, benzo(a)antracem, fluaranten, piren, PAH). Dystrybucja stężeń tych zanieczyszczeń wykazała dużą zmienność przestrzenną i silną zależność od lokalizacji źródeł zanieczyszczenia. Przeprowadzone testy Microtox nie potwierdziły natomiast toksyczności osadów wykazujących najwyższe stężenia zanieczyszczeń, jak również nie wykazały korelacji pomiędzy wynikami biotestu i badań laboratoryjnych.

Słowa kluczowe: Microtox, toksyczność, osady denne, rzeka Detroit

Abstract

The paper presents results of the Detroit River sediment toxicity assessments performed with a Microtox bioassay. The study also aims to answer the question whether the described bioassay is a reliable tool for assessing sediment toxicity with a large number of co-occurring contaminants. Results of the laboratory analyses showed that the sediments are contaminated with heavy metals (cadmium, copper, lead, mercury, and nickel), and also organic pollutants (PCBs, benzo(a)anthracene, fluaranten, pyrene, and PAHs). Contaminant distributions showed large spatial variability and strong dependence on the localization of pollution sources. The tests did not confirm toxicity of sediments exhibiting the highest level of contamination for metals and organic compounds, and did not show any correlation between the Microtox results and contaminant concentrations.

Keywords: Microtox, toxicity, sediments, Detroit River

* Mgr inż. Paweł Wilk, Ośrodek Gospodarki Wodnej, Instytut Meteorologii i Gospodarki Wodnej w Warszawie.

** Dr inż. Ewa Szalińska, Instytut Zaopatrzenia w Wodę i Ochrony Środowiska, Wydział Inżynierii Środowiska, Politechnika Krakowska.

1. Wstęp

Biotesty stanowią ważny element bioanalitiky i biomonitoringu, czyli gałęzi analitiky środowiskowej, przeżywających obecnie okres gwałtownego rozwoju. Bioluminescencja morskich bakterii *Vibrio fischeri* znalazła szerokie zastosowanie w testach toksyczności. Biotesty te stanowią użyteczne narzędzie wykorzystywane do oceny stopnia zanieczyszczenia wód, osadów dennych i gleb. Mechanizmy toksycznego działania poszczególnych związków chemicznych są różnorodne i niezwykle złożone. Zgodnie z dostępnymi informacjami [1–4] toksyczność może wynikać z:

- oddziaływania toksyny z receptorami komórkowymi,
- przerwania funkcji membrany komórkowej,
- reakcji chemicznych z elementami składowymi komórki,
- hamowania/współzawodnictwa systemów enzymatycznych.

Dodatkowo wzajemne interakcje zachodzące między substancjami chemicznymi mogą istotnie wpływać na wynik testu. Również stosowanie odczynników w celu poprawy rozpuszczalności związków trudno rozpuszczalnych może zmienić rzeczywistą toksyczność próbki. Z przeprowadzonych badań wynika, że dane o toksyczności dla tych samych związków, przy użyciu różnych komercyjnie dostępnych testów wykazują spore rozbieżności [1].

Biotest Microtox został rozwinięty w późnych latach siedemdziesiątych przez Beckmana, jako szybki test toksyczności, stanowiący alternatywę dla testów na wyższych organizmach wodnych takich jak ryby czy bezkręgowce [2]. Biotest ten zaczął być używany na większą skalę w badaniach toksyczności na początku lat osiemdziesiątych. Został wtedy przyjęty, jako kryterium oceny toksyczności w wielu krajach takich jak: Australia, USA, Kanada, Hiszpania, Wielka Brytania, Niemcy, Szwecja, Holandia, Polska do oceny toksyczności wód powierzchniowych, ścieków i osadów dennych [4].

Microtox ma wiele zalet w stosunku do innych badań toksyczności. Względnie niski koszt oraz szybkość uzyskania wyników pozwala na użycie go do stałego (rutynowego) monitoringu. Za pomocą testu Microtox dokonuje się pomiaru toksyczności ostrej. Jako toksyczność ostrą należy rozumieć silne działanie toksyczne, występujące w krótkim czasie po podaniu jednorazowej dawki ksenobiotyku, lub kilku dawek w ciągu 24 godzin. Dla omawianego testu Microtox czas kontaktu wynosił ok. 5 min. Toksyczność ostrą oznacza się za pomocą symboli LD50 (medialna dawka śmiertelna). W przypadku bakterii *Vibrio fischeri* rozpatrujemy 50% spadek intensywności bioluminescencji, co oznaczane jest za pomocą symboli EC50 (stężenie wywołujące 50% efekt). Należy pamiętać, że wyliczane wartości LD50 i EC50 są obarczone błędem, dlatego też podaje się dla nich przedział ufności, z prawdopodobieństwem 95% [2, 5, 6].

Przeprowadzone badania mają na celu wykazanie przydatności omawianego biotestu do oznaczania toksyczności osadów dennych w sytuacji, gdy są one równocześnie zanieczyszczone wieloma substancjami, należącymi do różnych grup związków chemicznych (metale, pestycydy, polichlorowane bifenyly, węglowodory).

2. Test Microtox

Microtox System Testów Ostrych jest całkowicie biologicznym systemem, działającym według standardowych metod ASTM (American Society for Testing and Materials). Jako odczynników pomiarowych używa się suchych zamrożonych bakterii o właściwościach luminescencyjnych. Po nawodnieniu bakterie te są natychmiast gotowe do użycia jako biosensory pomiarowe, działając jako krótkotrwałe test ostry. System ten łączy zalety testów biologicznych z szybkością i łatwością użycia instrumentów laboratoryjnych. Zdolność Systemu do natychmiastowego działania połączona z wiarygodnością danych w czasie sprawia, że jest to idealny system do testów środowiskowych, monitoringu procesów przemysłowych i innych podobnych zastosowań.

Microtox System Testów Ostrych składa się z Analizatora Microtox Model 500, komputera PC, oprogramowania zbierającego i przetwarzającego dane, odczynników Microtox, roztworów testowych oraz wyposażenia dodatkowego.

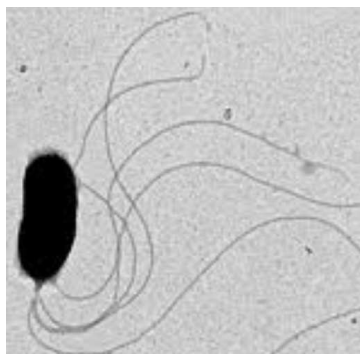
Analizator Microtox Model 500 jest fotometrem z funkcją kontroli temperatury, pozwalającą na obniżenie temperatury odczynników, bakterii luminescencyjnych i próbek do wymaganej temperatury i dokonania pomiaru światła emitowanego przez bakterie w warunkach stałej kontroli procesu pomiarowego. Model ten posiada funkcje samokalibracji, a obsługa jest wyjątkowo prosta. Komputer PC wraz z oprogramowaniem umożliwia bezpośrednią komunikację z analizatorem w zakresie zbierania i przetwarzania danych, jak również tworzenia raportów z badań. System jest specjalnie zaprojektowany do współpracy z odczynnikami Microtox [2–3].

Odczynniki te to dokładnie wyselekcjonowane luminescencyjne bakterie morskie (*Vibrio fischeri*, dawniej znane, jako *Photobacterium fischeri*), wybrane pod kątem czułości na szerokie spektrum skażeń i toksyn. Bakterie luminescencyjne produkują światło w zakresie widzialnym jako efekt swoich normalnych procesów metabolicznych. Jakakolwiek zmiana w tych procesach wywołana kontaktem z próbką powoduje zmiany emisji światła tychże organizmów. Zmiany te, są wprost proporcjonalne do względnej bioaktywności próbki. Najbardziej rozpowszechniony punkt końcowy testu to EC50: oznacza 50% redukcje światła [2–4].

3. Bakterie *Vibrio fischeri*

Test Microtox oparty jest na wykorzystaniu bakterii luminescencyjnych *Vibrio fischeri*, których świecenie jest naturalnym efektem przebiegu ich procesów metabolicznych. Bakterie te występują w siedliskach wodnych, o znacznym zakresie zasolenia. Znane są przypadki symbiozy bakterii z innymi organizmami wodnymi np. niewielką kałamarnicą *Euprymna scolopes*, która wykorzystuje świecenie bakterii w komunikacji z innymi osobnikami gatunku oraz w celach obronnych [4–5].

Przedstawiciele rodzaju *Vibrio* mają kształt pałeczek, o średnicy 0,5–0,8 μm i długości 1,4–2,6 μm (rys. 1). Są to bakterie gram-ujemne, swoją budową i fizjologią przypominające bakterie znajdujące się we florze jelitowej. Na podłożu stałym tworzą kolonie powstające przez wielokrotne podziały komórek bakteryjnych [2, 6, 8]. Bioluminescencja bakterii *Vibrio fischeri* zachodzi dzięki reakcjom chemicznym, którym towarzyszy świecenie. Są to zwykle reakcje utleniania lucyferyny (łac. *lucifer* – niosący światło)



Rys. 1. Bakteria *Vibrio fischeri* widziana pod mikroskopem [7]
 Fig. 1. Bacterium *Vibrio fischeri* as seen under the microscope [7]

w obecności tlenu i enzymów [9]. Bakterie świecące zawierają lucyferynę bakteryjną składającą się z długiego, oligomerycznego łańcucha aldehydowego i zredukowanej formy fosforanu ryboflawiny. Intensywność świecenia bakterii zależy od ilości tlenu [10–15].

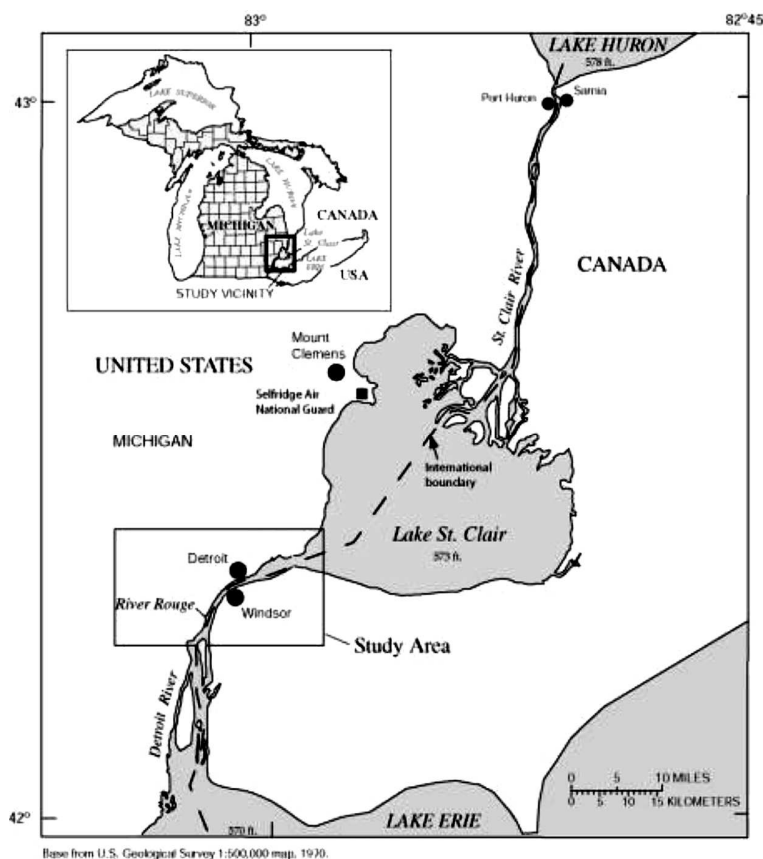
4. Charakterystyka badanej rzeki

Miejszem poboru prób osadów do badań była rzeka Detroit o długości 51 km wypływająca z jeziora St. Clair i wpadająca do jeziora Erie (Wielkie Jeziora, Ameryka Północna). Wraz z rzeką St. Clair i jeziorem St. Clair tworzy ona korytarz łączący górne jeziora (Superior, Michigan, Huron) z jeziorami Erie i Ontario [16]. Rzeka ta tworzy również granicę między Stanami Zjednoczonymi i Kanadą i jest jednocześnie częścią Drogi Wodnej Świętego Wawrzyńca (St. Lawrence Seaway). Na jej lewym brzegu położone jest amerykańskie miasto Detroit, a na prawym kanadyjskie miasto Windsor. Z geograficznego punktu widzenia traktuje się ją jednocześnie jako rzekę i cieśninę (wąskie przejście między dwoma dużymi zbiornikami) [16]. Jej szerokość waha się pomiędzy 0,8 a 4 km, a przepływ wynosi około 5300m³/s [15]. W najgłębszej części rzeka ma 16 m (sztucznie pogłębiony kanał żeglowny), a w pozostałych częściach jej głębokość nie przekracza 8 m. Rzeka Detroit ma niewiele dopływów, z których najważniejszym jest rzeka Rouge w stanie Michigan, która jest faktycznie cztery razy dłuższa niż sama rzeka Detroit.

Obszar, przez który przepływa omawiana rzeka, należy do najbardziej uprzemysłowionych regionów Ameryki Północnej. Detroit stanowi jeden z najważniejszych w świecie ośrodków produkcji samochodów, w którym znajdują się siedziby trzech koncernów: *Ford Motor Company* (1903), *General Motors* (1916) i *Chrysler* (1925) [18]. Dodatkowo miasto to stanowi wielki ośrodek przemysłu chemicznego, maszynowego, zbrojeniowego i hutnictwa żelaza. Aglomeracja Detroit/Ann Arbor/Flint/Windsor jest największym regionem metropolitalnym świata, liczącym 5,5 mln mieszkańców. Miasto Detroit jest także wielkim węzłem komunikacji drogowej i kolejowej, i jednym z głównych portów Wielkich Jezior [19–20].

W granicach Krainy Wielkich Jezior znajduje się 95% czystej wody Stanów Zjednoczonych i zarazem 20% wód światowych. Biorąc pod uwagę jej rozległe rozmiary, przez

dziesięciolecie uważano ten obszar za odporny na skażenia. Ścieki komunalne z nadbrzeżnych miejscowości oraz ścieki przemysłowe były do niej zrzucane bez zastanowienia. W ciągu kilku zaledwie lat jezioro Erie wraz z rzeką Detroit doznało olbrzymiej redukcji wielu handlowo wartościowych gatunków ryb. Wody przywracano stopniowo do stanu niezanieczyszczonego, wprowadzając w 1972 roku porozumienie pomiędzy Stanami Zjednoczonymi i Kanadą, które ograniczało zrzucanie nawozów mineralnych oraz ścieków do Wielkich Jezior. Skażenie postępowało jednak w sposób niezauważony do momentu odkrycia, że ryby z wielu łowisk (w tym szczególnie z rzeki Detroit i jeziora Erie) okazały się skażone toksycznymi substancjami chemicznymi, takimi jak PCB i metale ciężkie oraz pestycydami, takimi jak mirex. W odpowiedzi na te odkrycia Stany Zjednoczone i Kanada podpisały w 1978 roku nowe porozumienie, a następnie w 1987 roku uzupełniły je poprawkami. Dokument ten określił nowy cel – wstrzymanie zrzutów toksycznych substancji chemicznych. Zgodnie z tym porozumieniem zabroniono wpuszczać do Wielkich Jezior około 350 niebezpiecznych substancji chemicznych. Za najbardziej szkodliwe uznano PCB, PAH, TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioksyna), TCDF (tetrachlorodibenzofuran), a także cztery pestycydy: mirex, DDT, dieldrin, toxafen [18, 22].



Rys. 2. Mapa okolic rzeki Detroit [21]
Fig. 2. Map of the Detroit River area [21]

Duży problem na tym obszarze stanowią także zanieczyszczenia pochodzące z niewłaściwie działających oczyszczalni ścieków i przepełnionych kanalizacji. W ciągu ostatnich 30 lat ilość toksyn, takich jak PCB, dioksyny czy rtęć znacznie spadła, a mimo to w dalszym ciągu ich stężenie jest alarmująco wysokie, co doprowadziło do wyginięcia wielu organizmów wcześniej występujących w rzece. W dalszym ciągu brak jest kontroli nad ściekami z instalacji przetwarzania odpadów, spływów powierzchniowych doprowadzanych do systemów drenażu oraz strumieni odpadów z koncernów przemysłowych. Dużym problemem są także przypadki składowania odpadów w kanałach burzowych [19]. W ostatnich latach znacznie zmniejszone zostały środki pochodzące z budżetu federalnego przeznaczone na monitoring zanieczyszczeń, co jeszcze pogorszyło sprawę. Zanieczyszczenie osadów tej rzeki zarówno metalami, jak i zanieczyszczeniami organicznymi zostało potwierdzone badaniami, wskazując na wysokie stężenia tych zanieczyszczeń w rejonach bezpośrednich zrzutów zanieczyszczeń [23].

Prezentowane w artykule badania osadów rzeki Detroit stanowią część projektu mającego na celu ustalenie związków pomiędzy stopniem zanieczyszczenia osadów a stanem całego środowiska wodnego systemu rzeki Detroit, prowadzonych w Great Lakes Institute for Environmental Research University of Windsor. Jednym z zadań tego projektu były badania zmierzające do określenia stopnia toksyczności osadów za pomocą testu Microtox. Badania te zostały przeprowadzone w laboratorium Instytutu Zaopatrzenia w Wodę i Ochrony Środowiska Politechniki Krakowskiej.

5. Pobór i analiza próbek

Punkty poboru próbek zostały zlokalizowane na podstawie strefowo-losowego schematu, w celu zapewnienia reprezentatywnego opisu jakości osadów w całej rzece Detroit. Rzeka została podzielona na 3 strefy: górną, środkową i dolną, co zostało zdeterminowane zmianami prędkości przepływu w rzece (rys. 3):

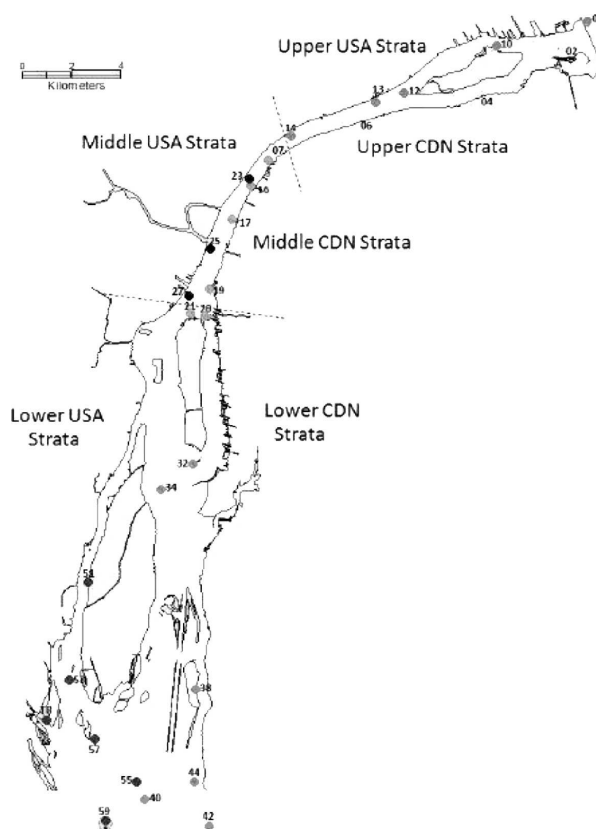
- Odcinek górny – Stany Zjednoczone (Upper USA),
- Odcinek górny – Kanada (Upper CDN),
- Odcinek środkowy – Stany Zjednoczone (Middle USA),
- Odcinek środkowy – Kanada (Middle CDN),
- Odcinek dolny – Stany Zjednoczone (Lower USA),
- Odcinek dolny – Kanada (Lower CDN).

Punkty zostały wyznaczone w jednakowej liczbie dla obu stron rzeki (kanadyjskiej i amerykańskiej), a z uwagi na niewielką akumulację osadów w sztucznie pogłębionym kanale żeglownym, biegnącym przez środek rzeki, wybór punktów poboru był dodatkowo ograniczony głębokością punktu (< 5,5 m). Dodatkowo, aby zapobiec grupowaniu się punktów, wprowadzono ograniczenie polegające na wyznaczeniu minimalnej odległości pomiędzy punktami, wynoszącej 300 m. Dokładna lokalizacja punktów została wyznaczona w oparciu o mapę rzeki, a następnie wyznaczone współrzędne zostały odnalezione podczas poboru próbek w terenie za pomocą systemu pozycjonowania GPS.

Próbki zostały pobrane pomiędzy lipcem a wrześniem 2009 roku z powierzchniowej warstwy osadów dennych (do 15 cm) rzeki Detroit w 34 losowo wybranych punktach [24]. Osad denny był pobierany za pomocą czerpacza osadów Ponar z głębokości 3–8 m. Część osadu z każdej (ważącej około 2 kg) próbki, po przesianiu przez sito

o średnicy oczek 2 mm, została przeznaczona do analiz laboratoryjnych, przeprowadzonych w laboratorium Great Lakes Institute for Environmental Research. W próbkach tych oznaczono stężenia zanieczyszczeń organicznych oraz metali ciężkich. Analizy te zostały przeprowadzone w ciągu 2 miesięcy od czasu poboru próbek i do czasu ich przeprowadzenia próbki przechowywano w temperaturze 4°C. Biotest Microtox został przeprowadzony w laboratorium Instytutu Zaopatrzenia w Wodę i Ochrony Środowiska w ciągu 6 miesięcy od momentu poboru próbek. W okresie tym próbki osadu były przetrzymywane w temperaturze -18°C.

Dodatkowo dwie spośród 34 próbek zostały pobrane, jako próbki referencyjne: pozytywna i negatywna. Próbka referencyjna pozytywna, oznaczona, jako TRCH Ref., została pobrana w punkcie o potwierdzonym uprzednio znacznym stopniu zanieczyszczenia. Punkt ten był zlokalizowany w dolnym odcinku rzeki (Trenton Chanel, USA). Próbka referencyjna negatywna, oznaczona jako Peche Ref., została pobrana w punkcie zlokalizowanym w górnym odcinku kanadyjskim. Próbkę tą pobrano w rejonie Peche Island, w którym w trakcie poprzednich badań nie odnotowano występowania zanieczyszczeń organicznych oraz metali ciężkich.



Rys. 3. Rzeka Detroit z podziałem na odcinki oraz z zaznaczonymi punktami poboru prób osadów

Fig. 3. Localization of the strata and sampling sites in the Detroit River

6. Przebieg testu Microtox

Do badań użyto siedmiogramowych próbek osadów w stanie wilgotnym. Całość testu przeprowadzono zgodnie z procedurą SPT (Solid Phase Protocol) [2, 4, 13]. Poszczególne etapy przygotowania próbek (kolejne rozcieńczenia) były przygotowywane z wykorzystaniem 2% roztworu NaCl. W celu kontroli jakości prowadzonych pomiarów wykonano serie powtórzeń (dla 18% ogólnej liczby próbek), oraz przeprowadzono testy na próbkach kontrolnych, nie zawierających żadnych zanieczyszczeń.

W efekcie przeprowadzonego biotestu Microtox otrzymano wyniki w wartościach EC50. Wskaźnik ten oznacza stężenie lub dawkę, która powoduje 50% inhibicję bioluminescencji bakterii *Vibrio fischeri* w badanej próbce. Należy pamiętać, że im wyższa wartość EC50 tym mniejsza jest toksyczność próby [13].

7. Wyznaczenie stężenia metali ciężkich i zanieczyszczeń organicznych w badanych próbkach osadów

Przed wykonaniem testu toksyczności w badanych próbkach osadów oznaczono stężenia metali (kadm, miedź, ołów, rtęć, i nikiel) oraz zanieczyszczeń organicznych (suma PCB, benzo(a)antracen, fluoranten, piren, i suma PAH) [23].

Stężenia metali były analizowane po przeprowadzeniu ekstrakcji z użyciem mieszaniny stężonych kwasów w trzygramowych próbkach wilgotnego osadu. Oznaczenia metali prowadzono za pomocą spektrofotometrii absorpcji atomowej (AAS-300, Varian). Stężenia rtęci analizowane były za pomocą automatycznego analizatora rtęci (AMA 254). Ekstrakcję zanieczyszczeń organicznych prowadzono przy użyciu dwudziestogramowej próbki wilgotnego osadu i 100 g bezwodnego siarczanu sodu. Próbę ekstrahowano w aparacie Soxhleta przy użyciu 300 ml acetonu przez 24 godziny. W oznaczeniu PAH, PCB, oraz pozostałych zanieczyszczeń organicznych zastosowano chromatografię gazową (GC-ECD).

8. Określenie jakości osadów metodą wskaźników numerycznych TEL oraz LEL

W celu wyznaczenia poziomu zanieczyszczenia pobranych osadów metalami i zanieczyszczeniami organicznymi posłużono się metodą wskaźników numerycznych jakości osadów: TEC i PEC. Wskaźniki te wyznaczają wartości określone, jako wartość progowa (TEC – Treshold Effect Concentration) oraz wartość prawdopodobna (PEC – Probable Effect Concentration) [25]. Wskaźniki na poziomie wartości progowych służą do identyfikacji stężeń zanieczyszczeń, poniżej których szkodliwe oddziaływanie na organizmy bentosowe nie jest oczekiwane. Przeznaczeniem wskaźników na poziomie wartości prawdopodobnych jest natomiast wyróżnienie stężeń przy przekroczeniu, których spodziewane są częste negatywne oddziaływania dla organizmów bentosowych.

W przypadku badanych próbek, spośród metali na szczególną uwagę zasługuje kadm, którego stężenie przekroczyło znacząco wartości progowe w 33 próbkach (97% całkowitej ilości próbek), co oznacza, że znaczne stężenia tego pierwiastka występują w osadach na całej długości rzeki. W analogicznej ilości prób osadów wartości progowe przekro-

czyły również miedź, rtęć oraz nikiel. W przypadku zanieczyszczeń organicznych na szczególną uwagę zasługuje piren, który przekroczył dopuszczalne wartości stężeń we wszystkich próbach, pozostałe istotne zanieczyszczenia organiczne to fluoranten i benzo(a)antracen, które dla wskaźnika TEC przekroczyły normę w odpowiednio 82% i 88% prób.

Średnie stężenia badanych metali ciężkich oraz zanieczyszczeń organicznych, wraz z wartościami odchylenia standardowego przedstawiono w tabelach 1 i 2.

Tabela 1

Wartości średnie i odchylenia standardowe stężeń metali w wodach rzeki Detroit dla poszczególnych odcinków pomiarowych (mg/kg)

	kadm	miedź	ołów	rtęć	nikiel
TEC/PEC	0,99/4,98	31,6/149	35,8/128	0,18/1,06	22,7/48,6
G CAN	2,61±1,53	19,12±8,77	13,86±12,42	0,13±0,08	11,1±2,60
G USA	2,04±0,49	43±20,92	29,47±26,31	0,12±0,06	21,6±10,72
S CAN	1,4±0,28	22,7±1,96	12,7±2,04	0,25±0,28	13,12±3,28
S USA	2,2±0,75	109,3±57,65	101,46±84,42	0,09±0,06	62,05±50,88
D CAN	1,9±0,96	38,5±12,48	16,9±6,80	0,21±0,08	24,6±8,48
D USA	2,6±1,91	41,07±40,04	25,22±24,20	0,23±0,27	21,71±13,85

Tabela 2

Wartości średnie i odchylenia standardowe stężeń zanieczyszczeń organicznych w wodach rzeki Detroit dla poszczególnych odcinków pomiarowych (ng/kg)

	suma PCB	benzo(a) antracen	fluoranten	piren	suma PAH
TEC/PEC	59,8/676	108/1050	423/2230	195/1520	1610/22800
G CAN	11,3±11,6	370,5±629,0	802,7±1332,1	664,5±1095,7	3904,4±6650,3
G USA	258,6±424,8	267,9±329,1	267,9±1436,1	1070,1±1362,8	4248,8±4994,1
S CAN	41,7±28,5	222,7±220,8	679,7±571,0	563,0±488,4	2418,6±1745,2
S USA	802,9±1002,8	1404,0±1144,0	2688,4±2087,0	2419,1±1908,5	14 571,4±11 225,4
D CAN	30,4±36,3	535,7±640,8	897,8±862,8	819,5±856,6	3893,7±4316,2
D USA	170,2±166,1	1312,6±958,3	2440,2±1557,4	2224,9±1346,5	10 908,6±7390,2

Zestawienie tych wartości dla poszczególnych odcinków rzeki wskazuje, że największe zanieczyszczenie metalami ciężkimi występuje w odcinku środkowym po stronie amerykańskiej (S USA – tabela 1). Również w przypadku zanieczyszczeń organicznych największe stężenia występują w odcinku środkowym po tej samej stronie (S USA – tabela 2). Fakt ten jest zapewne związany z dużą koncentracją źródeł przemysłowych w tym rejonie, a zwłaszcza przemysłu samochodowego.

9. Wyniki testu Microtox

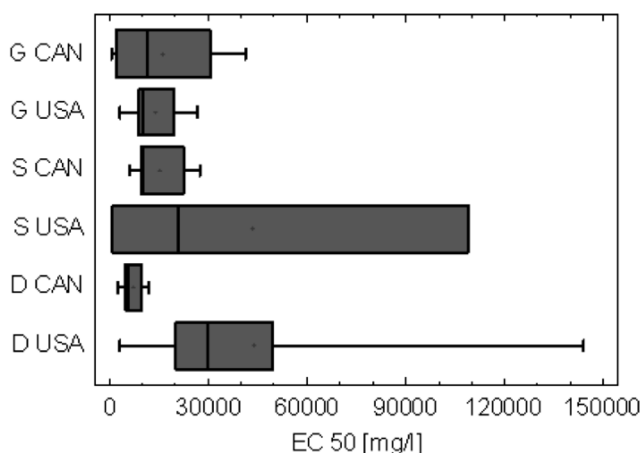
Otrzymane średnie wartości EC50 dla poszczególnych odcinków rzeki mieściły się dla wszystkich punktów w zakresie 8180 do 43 437 mg/l. Najwyższą wartość EC50 osiągnęły osady w próbce pobranej z punktu zlokalizowanego w dolnym odcinku po stronie amerykańskiej (D USA – 048) wynoszącą 144 200 mg/l, a najniższą w próbce pobranej w punkcie zlokalizowanym w środkowym odcinku rzeki po tej samej stronie (S USA – 025) w wysokości 622 mg/l.

Średnia wartość EC50 była najniższa dla odcinka dolnego kanadyjskiego 8180 mg/l, a najwyższa dla odcinka dolnego USA 43 437 mg/l (tabela 3). Zaobserwowane duże wartości odchylenia standardowego dla obliczonych średnich EC50 świadczą o dużej niejednorodności toksyczności badanych próbek osadów. Na rysunku 4 przedstawiono rozrzut wartości EC50 dla poszczególnych w obrębie poszczególnych odcinków rzeki Detroit.

Tabela 3

Wartości średnie i odchylenia standardowe EC50 dla poszczególnych odcinków rzeki Detroit (mg/l)

Odcinek	G CAN	G USA	S CAN	S USA	D CAN	D USA
EC50±std	16241±16213	13957±8118	14374±8180	43437±47078	8180±4652	40871±43221



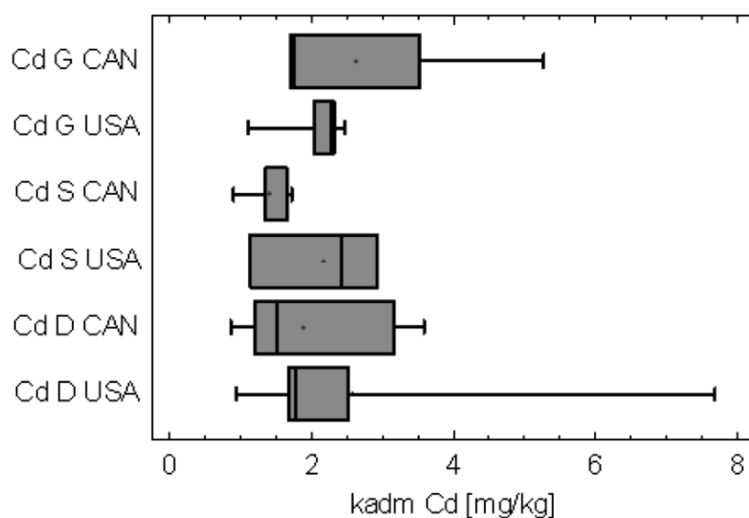
Rys. 4. Wartości EC50 dla poszczególnych odcinków rzeki Detroit

Fig. 4. EC50 values for the particular sections of the Detroit River

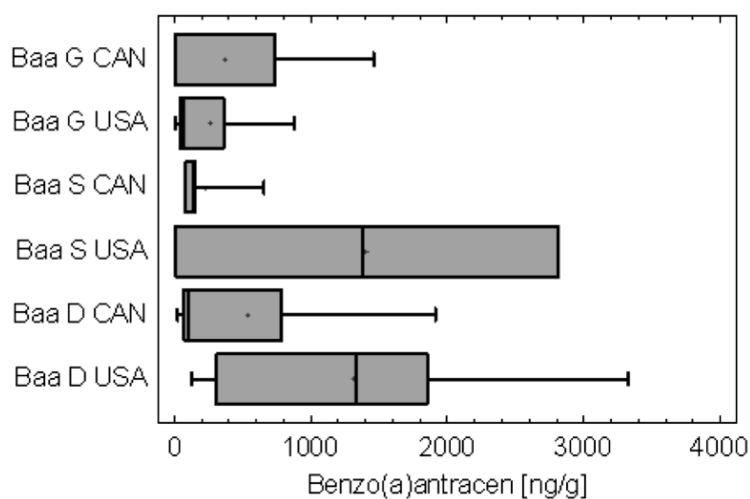
Na taki rozrzut wyników biotestu niewątpliwie wpływ ma duża rozbieżność wyników dla mierzonych zanieczyszczeń w obrębie poszczególnych odcinków. Na rysunkach 5 i 6 przedstawiono rozkład stężeń kadmu i benzo(a)antracenu, na których istotnie można zaobserwować wspomnianą dużą niejednorodność zanieczyszczenia osadów rzeki Detroit, co ma bezpośredni związek z występowaniem lokalnych źródeł zanieczyszczenia, zwłaszcza związanych z przemysłem ciężkim.

W celu sprawdzenia wiarygodności prezentowanych wyników dla losowo wybranych próbek wykonano również powtórzenia procedury (18% całkowitej ilości pobranych

próbek). Rozbieżności w wynikach powtórzeń nie przekroczyły 30% otrzymanych oryginalnie wartości, co w przypadku biotestu *Microtox* świadczy o poprawnie wykonanych badaniach i powtarzalności wyników. Dodatkowo dla sprawdzenia poprawności metodyki przebadano również próbki kontrolne, które nie zawierały żadnych zanieczyszczeń. Próbki te nie wykazały żadnej toksyczności.



Rys. 5. Stężenia kadmu w poszczególnych odcinkach rzeki Detroit
Fig. 5. Cadmium concentrations in the particular sections of the Detroit River



Rys. 6. Stężenia benzo(a)antracenu w poszczególnych odcinkach rzeki Detroit
Fig. 6. Concentrations of benzo(a)anthracene in the particular sections of the Detroit River

Dla otrzymanych wyników analiz laboratoryjnych i przeprowadzonych biotestów dokonano analizy statystycznej, mającej na celu określenie występowania korelacji pomiędzy stężeniami poszczególnych zanieczyszczeń a wynikami toksyczności (tabela 4). Obliczone wartości ujemne współczynników korelacji wskazują, że im wyższe stężenie danego zanieczyszczenia tym większa jest toksyczność próby, czyli wraz ze wzrostem stężenia maleje wartość EC50. Wartości dodatnie oznaczają, że wzrost stężenia zanieczyszczeń nie ma wpływu na wzrost toksyczności próby. Otrzymane wyniki wskazują, że jedynie 38 na 108 próbek (35% całkowitej liczby) potwierdza omawianą zależność. Najwięcej z nich odnotowano w odcinku górnym i dolnym po stronie kanadyjskiej. Przedstawione wyniki, nie dają więc dowodu na to, że zachodzi związek pomiędzy toksycznością prób wyznaczoną przy pomocy testu Microtox, a stężeniami zanieczyszczeń obecnych w próbach.

Tabela 4

Wartości współczynników korelacji liniowej (r) dla poszczególnych odcinków pomiarowych

	G CAN	G USA	S CAN	S USA	D CAN	D USA
kadm	0,42	0,11	0,95	0,99	0,17	< 0,1
miedź	-0,71	0,63	0,35	0,81	-0,50	< 0,1
ołów	-0,89	0,75	< 0,1	0,85	-0,35	0,17
rtęć	-0,99	0,30	0,38	0,89	-0,53	0,31
nikiel	-0,63	0,21	0,29	0,14	-0,47	< 0,1
suma PCB	< 0,1	0,88	0,54	0,75	-0,36	0,32
benzo(a)antracen	-0,89	0,56	0,00	0,90	-0,82	< 0,1
fluranten	-0,85	0,68	0,33	0,91	-0,84	< 0,1
piren	-0,87	0,68	0,27	0,90	-0,82	< 0,1
suma PAH	-0,84	0,62	0,39	0,91	-0,81	< 0,1

O braku bezpośredniej korelacji pomiędzy stężeniami poszczególnych zanieczyszczeń, a wynikami biotestu świadczą również rezultaty otrzymane dla próbek referencyjnych. Dla próbki referencyjnej pozytywnej (TRCH Ref), która została pobrana z miejsca o dużym stopniu zanieczyszczenia otrzymano wyniki świadczące o niskiej toksyczności (EC50 = 87 250 mg/l). Dla próbki referencyjnej negatywnej (Peche Ref.) pobranej z miejsca o nieznacznym stopniu zanieczyszczenia wyniki biotestu świadczą o wysokiej toksyczności (EC50 = 3137 mg/l).

10. Dyskusja

Wyniki przeprowadzonych badań na obecność metali ciężkich i zanieczyszczeń organicznych w próbkach osadów rzeki Detroit wykazały znaczne stężenia tych zanieczyszczeń. Ich rozkład przestrzenny nie jest równomierny ze względu na topografię terenu i charakterystykę rzeki oraz lokalizację miejsc zrzutu zanieczyszczeń. Aby lepiej scha-

rakteryzować miejsca szczególnie zanieczyszczone, dokonano podziału rzeki na odcinki, dla których wykonano ocenę stopnia zanieczyszczenia, wykorzystując metodę wskaźników numerycznych TEC i PEC. Na uwagę wśród metali zasługują szczególnie kadm, miedź, rtęć oraz nikiel. Wszystkie one w większości analizowanych próbek przekroczyły znacznie wartości progowe. Największy procent zanieczyszczonych omawianymi metalami próbek został pobrany w odcinkach środkowych i dolnych rzeki. Porównanie wartości średnich stężeń kadmu dla poszczególnych odcinków przedstawiono na rysunku 5. Rysunek ten obrazuje duży rozrzut wyników zwłaszcza w odcinku dolnym po stronie amerykańskiej. Bardzo podobnie wygląda również takie porównanie dotyczące benzo(a)antracenu, gdzie również w odcinku dolnym USA wystąpił duży rozrzut wyników (rys. 6). Świadczy to o tym, że poszczególne odcinki rzeki nie są zanieczyszczone w jednakowym stopniu, co zostało potwierdzone wcześniejszymi badaniami [26].

Powodów takiego stanu rzeczy może być kilka. Należy pamiętać, że największe zagęszczenie przemysłu (rafineryjnego, motoryzacyjnego, stalowego) zlokalizowane jest właśnie w tych odcinkach rzeki. Dodatkowo jej szerokość znacznie wzrasta w dolnej części, co powoduje spadek prędkości przepływu, a w konsekwencji sprzyjające warunki do sedymentacji zanieczyszczeń. Wpływ na rozmieszczenie zanieczyszczeń ma także topografia rzeki i jej warunki hydrologiczne. Przez środek na całej jej długości przebiega kanał żeglowny, który powstał poprzez sztuczne obniżenie dna (do ok. 16 m), co znacznie ogranicza przemieszczanie się zanieczyszczeń z jednego brzegu na drugi, ze względu na silne prądy. Ponadto należy uwzględnić tu warunki gospodarczo-ekonomiczne państw, które użytkują ten szlak wodny. W Kanadzie i Stanach Zjednoczonych transport drogą wodną jest najtańszym rozwiązaniem, co czyni rzekę Detroit jedną z najruchliwszych na świecie, a tym samym najbardziej narażoną na zanieczyszczenia spowodowane różnorodnymi awariami. Stan ten potwierdza analiza wartości stężeń zanieczyszczeń organicznych. W tym przypadku szczególną uwagę należy zwrócić na cztery z nich, a mianowicie benzo(a)antracen, fluoranten, piren i PAH. Stężenia tych substancji przekraczały wartości wskaźników progowych w większości prób (dla PAH w 100%). W przypadku zanieczyszczeń organicznych, podobnie jak w analizie metali, najbardziej zanieczyszczone były dolne odcinki rzeki, jednak tu nie ma już tak zasadniczej różnicy między zanieczyszczeniem odcinków górnych i dolnych. Istotne są tu również wysokie wartości odchyłeń standardowych wyznaczonych dla średnich wartości stężeń zanieczyszczeń organicznych (tabela 2). Przyczyną takiego stanu rzeczy jest nierównomierny rozkład zanieczyszczeń w osadach dennych w obrębie poszczególnych odcinków, co spowodowane jest przede wszystkim lokalizacją źródeł zrzutów. Wpływ na to ma także wiele czynników związanych z dystrybucją zanieczyszczeń na skutek czynników naturalnych, takich jak przepływ w rzece, zmienny skład granulometryczny osadów [26].

Porównanie wyników stężeń poszczególnych zanieczyszczeń z wynikami toksyczności otrzymanych w efekcie testu Microtox prowadzi do ciekawych wniosków. Brak bezpośredniej korelacji pomiędzy oboma grupami wyników może wskazywać na małą dokładność testu Microtox w przypadku obecności tak licznej grupy zanieczyszczeń w próbkach osadów. Może również świadczyć o faktycznym braku związku pomiędzy stężeniami zanieczyszczeń w próbce, a efektem toksycznym wskazywanym przez test Microtox. Rozważając ten problem, należy wziąć pod uwagę specyfikę omawianego testu. W Microtoxie badaną próbkę roztwarza się w wodnym roztworze soli, do której podczas mieszania powinny przeniknąć zanieczyszczenia z badanego osadu. Większość jednak

zanieczyszczeń organicznych, szczególnie należących do grupy PAH, jest hydrofobowa, a zatem nierozpuszczalna w wodzie. Może to stanowić poważne ograniczenie dla stosowania testu Microtox. Przytoczone wnioski pokrywają się również z wynikami otrzymanymi przez inne zespoły badawcze wykorzystujące test Microtox. Badania toksyczności ścieków z południa Polski (region krakowski) za pomocą testu Microtox i testu na stułbi *Hydra attenuata* dały wyraźną przewagę temu drugiemu, szczególnie w przypadku metali ciężkich. Taki wynik został uzasadniony niską czułością testu Microtox [27]. Z kolei badania przeprowadzone w latach 1998 i 2002 dla rzeki Odry, dolnej Wisły, jezior kaszubskich oraz Zatoki Gdańskiej wykazały, że test Microtox sprawdził się jedynie w ocenie toksyczności osadów dennych, które okazały się być silnie toksyczne ($EC_{50} < 2\%$). Zdecydowanie mniej skuteczne było zastosowanie testu Microtox do oceny toksyczności wód słodkich i morskich [20]. Także badania prowadzonych na silnie zanieczyszczonych osadach portowych Kopenhagi wykazały brak korelacji pomiędzy toksycznością określoną na podstawie biotestów a wynikami analiz chemicznych [28].

Dodatkowym powodem otrzymania takich wyników może być sposób prowadzenia ekstrakcji próbek osadów. Należy podkreślić, że otrzymane stężenia zanieczyszczeń dokumentują całkowitych stężeń poszczególnych zanieczyszczeń w osadach. Pamiętać należy jednak o tym, że tylko pewna część metali i zanieczyszczeń organicznych zakumulowanych w osadach jest dostępna dla organizmów żywych i tym samym może być dla nich toksyczna. Stopień udziału tej frakcji jest zależny od wielu czynników, w tym od temperatury, odczynu wody oraz współwystępowania innych zanieczyszczeń. Zatem porównywanie wyników stężeń otrzymywanych w efekcie ekstrakcji całkowitej oraz wyników biotestu Microtox, podczas którego jedynie część zanieczyszczeń ma kontakt z bakteriami *Vibrio fischeri*, może być nieuzasadnione.

Obecnie wiele instytucji zajmujących się monitoringiem środowiska uznaje biotest Microtox za przydatny do oceny toksyczności osadów dennych ze względu na jego łatwość w użytkowaniu, zwłaszcza jako pierwszy wskaźnik pojawienie się toksycznych zanieczyszczeń [29]. Jednakże w większości badań dotyczących zanieczyszczeń organicznych do potwierdzenia wyników stosuje się testy uzupełniające, takie jak: Toxkit, Spirotox, Daphnia, ToxAlert [30–31]. Testy te stanowią dodatkowe potwierdzenie poprawności otrzymanych wyników. Takie działania zastosowano np. przy badaniu toksyczności odpływających ścieków z oczyszczalni oraz zrzutów ścieków włókienniczych w Hiszpanii i Portugalii gdzie większą wrażliwością wykazał się ToxAlert [32]. Należy również pamiętać, że bakterie *Vibrio fischeri* są bardziej odporne na substancje toksyczne (np.: herbicydy) co może prowadzić do zaniżonych wyników testu Microtox. Przykładem takiej substancji jest herbicyd o nazwie molinat, wykazujący umiarkowaną toksyczność zgodnie z amerykańską oceną toksyczności (US EPA) w stosunku do gatunków nie roślinnych np. *Daphnia carinata*, w przeciwieństwie do badań ukazujących molinat, jako związek silnie toksyczny dla alg morskich i umiarkowanie toksyczny dla *Vibrio fischeri* [34]. Należy również zaznaczyć, że do tej pory większość badań z wykorzystaniem testu Microtox była przeprowadzana dla obszarów zanieczyszczonych nieznaczną ilością zanieczyszczeń [22]. W nielicznych przypadkach, w których próbki zawierały również dużą liczbę współwystępujących zanieczyszczeń, wyniki były analogiczne i wykazywały brak korelacji pomiędzy wynikami Microtox i badań laboratoryjnych [28, 32–35].

11. Wnioski

Dla 34 prób pobranych z rzeki Detroit, zlokalizowanej w Krainie Wielkich Jezior w Ameryce Północnej, przeprowadzono biotest Microtox w celu określenia toksyczności osadów dennych. Celem tego badania była próba odpowiedzi na pytanie, czy test ten jest faktycznie odpowiednim narzędziem w ocenie toksyczności osadów, w których współwystępuje wiele różnorodnych zanieczyszczeń. Otrzymane wyniki wskazują jednoznacznie, że nie we wszystkich przypadkach Microtox spełnia całkowicie swoje zadanie.

Wyniki przeprowadzonych badań laboratoryjnym nad stopniem zanieczyszczenia pobranych próbek osadów wykazały, że osady te są zanieczyszczone zarówno metalami (kadm, miedzią, ołowiem, rtęcią oraz niklem), jak i zanieczyszczeniami organicznymi (PCB, benzo(a)antracem, fluorantem, pirenem, PAH). Dystrybucja stężeń tych zanieczyszczeń wykazała dużą zmienność przestrzenną i silną zależność od lokalizacji źródeł zanieczyszczenia. Przeprowadzone testy Microtox nie potwierdziły natomiast toksyczności osadów wykazujących najwyższe stężenia zanieczyszczeń, jak również nie wykazały korelacji pomiędzy wynikami biotestu i badań laboratoryjnych. Sytuacja ta może być spowodowana zarówno procedurą prowadzenia testu Microtox, jak i pozyskiwania wyników stężeń poszczególnych zanieczyszczeń na drodze analiz chemicznych.

Podsumowując, test Microtox nie powinien być jedynym biotestem podczas oceny toksyczności wody czy osadów dennych, zwłaszcza zawierających duże ilości różnego typu zanieczyszczeń. Nie zmienia to jednak faktu, że test Microtox jest dobrym, szybkim i tanim narzędziem, który ciągle znajduje swoje zastosowanie w biomonitoringu środowiska.

Przeprowadzone badania zostały sfinansowane w ramach projektu Cause Effect Linkages of Sediment Contamination and Delisting Criteria in the Detroit River AOC realizowanego przez Great Lakes Institute for Environmental Research University of Windsor.

Literatura

- [1] Kuczyńska A., Wolska L., Namieśnik J., *Zastosowanie biotestów w badaniach środowiskowych*, Politechnika Gdańska, nr 32, 2007, 669-695.
- [2] Rosińska A., *Podstawy i zastosowanie testu Microtox*, Manuskrypt, Politechnika Krakowska, Kraków 1998.
- [3] Rosińska A., Cwalina B., Ślusarczyk Z., *Biotest microtox w analizie interakcji substancji toksycznych*, VIII Ogólnopolskie Sympozjum Naukowo-Techniczne „Biotechnologia Środowiskowa”, Wisła-Jarzębata, 6–9 grudnia 2005.
- [4] *Microtox® System Testów Ostrych* – profil produktu, 2010 (www.tigret.pl).
- [5] Bartnicki F., *Geny markerowe i reporterowe*, Zakład Biofizyki Obliczeniowej i Bioinformatyki, Uniwersytet Jagielloński, Kraków 2011 (www.bioinfo.mol.uj.edu.pl).
- [6] Walker C., *Podstawy ekotoksykologii*, PWN, Warszawa 2002.
- [7] Nyholm S., Stabb E., Communicated by Steven E. Lindow, University of California Berkeley, CA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 2010, (www.pnas.org).
- [8] Stavropoulos B., *Leeder consulting – Microtox*, Toxicity Testing, Queensland, Australia 2010 (www.leederconsulting.com).

- [9] Wood J., *Euprymna scolopes*, Hawaiian bobtail squid, 2010 (www.thecephalopodpage.org).
- [10] Yikong Y., Lee P., *Luminescent bacteria*, Department of Bacteriology, University of Wisconsin 2004 (www.bact.wisc.edu).
- [11] Lucyferaza – Molecule of the Month, 2006 (www.biotechnolog.pl).
- [12] Czernik A., *Biochemia i ewolucja kompleksu lucyferyno-lucyferazowego. Kolory bioluminescencji*, 2006 (www.efendi.ch.pwr.wroc.pl).
- [13] Pszczółkowski M., *Biochemia luminescencji*, wyd. Wiedza i Życie, nr 3, 1996.
- [14] Motulsky H., *What is the EC50*, Oxford University Press Graphpad Software – Contents, Oxford 2010 (www.graphpad.com/reg_the_ec50.htm).
- [15] Sitevek K., *Toksyczność ostra*, Państwowa Inspekcja Sanitarna, 2004.
- [16] Burns R., *Bringing Back Belle Isle*, 2010 (www.detroit.gov).
- [17] Starek A., *Polichlorowane bifenyle – toksykologia – ryzyko zdrowotne*, Katedra Toksykologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 2006 (www.pcb.pl).
- [18] US EPA, United States Environmental Protection Agency, *The Michigan Department of Environmental Quality Biennial Remedial Action Plan Update for the Detroit River Area of Concern*, 2008 (www.epa.gov).
- [19] Johnson J., *Michigan's Strategic Framework for the 2010 Great Lakes Restoration Initiative*, 2010 (www.michigan.gov).
- [20] Niemrycz E., Nichthauser J., Staniszevska M., Jawecki G., Bolałek J., *The Microtox biological test: Application in toxicity evaluation of surface waters and sediments in Poland*, International Journal of Oceanography and Hydrobiology, nr 4, 2007, 151-163.
- [21] Holtschlag D.J., Aichele S.A., *Visualization of Drifting Buoy Deployments on Upper Detroit River within the Great Lakes Waterway from August 28–30*, Water Resources of Michigan, 2001.
- [22] Hartig H., *Detroit River International Wildlife Refuge*, 2010 (www.detroitriver.com).
- [23] Szalińska E., Drouillard K.G., Fryer B., Haffner G.D., *Distribution of heavy metals in sediments of the Detroit River*, Journal of Great Lakes Research, nr 32, 2006, 442-454.
- [24] Brus D.J., Gruijter J.J., *Random sampling or geostatistical modelling? Choosing between design-based and model-based sampling strategies for soil*, Geoderma, nr 80, 1998, 76-82.
- [25] MacDonald D., Ingersoll G., Berger A., *Development and Evaluation of Consensus – Based Sediment Quality Guidelines for Freshwater Ecosystems*, Environmental Contamination and Toxicology, nr 39, 2000, 20-31.
- [26] Szalińska E., Drouillard K.G., Anderson E., Haffner G.D., *Factors influencing contaminant distribution in the Huron-Erie Corridor sediments*, Journal of Great Lakes Research, nr 37(1), 2011, 132-139.
- [27] Pardos M., Benninghoff C., Gueguen C., Thomas R., Dobrowolski J., Dominik J., *Acute toxicity assessment of Polish (waste)water with a microplate – based Hydra attenuata assay: a comparison with the Microtox test*, The Science of the Total Environment, nr 243/244, 1999, 141-148.

- [28] Pedersen F., Bjornestad E., Andersen H.V., Kjolholt J., Poll C., *Characterization of sediments from Copenhagen Harbour by use of biotests*, Water Science and Technology, nr 37, 1998, 233-240.
- [29] Cwalina B., Wiącek-Rosińska A., *Testy toksyczności ostrej wykorzystujące bioluminescencję bakterii w ocenie efektów skażenia i remediacji środowiska*, Archiwum Ochrony Środowiska, nr 29, 2003, 107-114.
- [30] Główny Inspektorat Ochrony Środowiska, 2010 (www.gios.gov.pl).
- [31] Kuszyńska A., Wolska L., Namieśnik J., *Zastosowanie biotestów w badaniach środowiskowych*, Politechnika Gdańska, Gdańsk 2006.
- [32] Jesus Garcia M., Tirapu L., Ginebreda A., Barcelo D., *Wastewater toxicity screening of non – ionic surfactants by Toxalert and Microtox bioluminescence inhibition assays*, Analytica Chimica Acta, nr 427, 2000, 181-189.
- [33] Meng-Hsiun T., Ryan K., Pancorbo O., *Toxicity of the 13 priority pollutant metals to Vibrio fischeri in the Microtox chronic toxicity test*, The Science of the Total Environment, nr 320, 2004, 37-50.
- [34] Boluda R., Quintanilla F., Bonilla A., Saez E., Gamon M., *Application of the Microtox test and pollution indices to the study of water toxicity in the Albufera Natural Park*, Chemosphere, nr 46, 2001, 355-369.
- [35] Warne L.R., Latt Phyu M.Y., *Effect of river water, sediment and time on the toxicity and bioavailability of molinate to the marine bacterium Vibrio fischeri (Microtox)*, Water Research, nr 39, 2005, 2738-2746.