

COHIBA

CONTROL OF HAZARDOUS SUBSTANCES
IN THE BALTIC SEA REGION



PART FINANCED BY THE EUROPEAN UNION
(EUROPEAN REGIONAL DEVELOPMENT FUND)



Baltic Sea Region
Programme 2007-2013



BIOTESTY wykonane w projekcie COHIBA

Dr hab. Danuta Mielżyńska-Švach

COHIBA



PART FINANCED BY THE EUROPEAN UNION
(EUROPEAN REGIONAL DEVELOPMENT FUND)



Baltic Sea Region
Programme 2007-2013

BIOTESTY vs ANALIZY CHEMICZNE

Analiza chemiczna nie pozwala na wykrycie wszystkich substancji działających szkodliwie na organizmy żywe oraz tych, które występujących w minimalnych stężeniach.

Metody analityczne charakteryzujące się niską granicą oznaczalności rzędu pg/l czy ng/l są bardzo kosztowne.

Niektóre substancje chemiczne mogą reagować ze sobą, dając w wyniku substancje bardziej lub mniej toksyczne od substratów.

Czynniki fizyczne takie, jak np.: pH, temperatura, promieniowanie itp. mogą wpływać na toksyczność mieszaniny substancji chemicznych.



METODY BIOLOGICZNE W OCENIE ŚRODOWISKA

Bioindykacja (analiza wpływu zanieczyszczeń na materiał biologiczny):
bioczujniki (bakterie, wirusy, przeciwciała itp. stanowią aktywną część czujnika),
biotesty z zastosowaniem odpowiednich organizmów testowych.

Biomonitoring (obserwacje w środowisku):
obserwacja zmian flory i fauny w badanych obszarze (indeks sparobowy, indeks biotyczny),
organizmy monitorowe pełniące rolę:
wskaźników wrażliwości (ryby, małże),
wskaźników kumulacji (glony, skorupiaki, rośliny wyższe, ryby).

BIOTESTY

Organizmy stosowane do biotestów:

- muszą być wrażliwe na szerokie spektrum toksyn,
- dostępne przez cały rok,
- łatwe do utrzymania w laboratorium,
- niezmiennie genetycznie,
- wolne od chorób i pasożytów.

Tylko nieliczne zyskały akceptację międzynarodową (normy ISO lub PN).

Stosuje się baterie testów organizmów z różnych poziomów troficznych).

BADANIA Z WYKORZYSTANIEM BIOTESTÓW

Testy laboratoryjne

- sztuczne wprowadzenie substancji szkodliwych,
- badania próbek rzeczywistych (woda, gleba, osady).

Testy prowadzone *in situ* – wykorzystują populacje organizmów żyjących w naturalnych warunkach.

Testy statyczne - badane próbki nie podlegają wymianie.

Testy półstatyczne – wymiana badanej próbki w określonych odstępach czasu.

Testy dynamiczne – stały przepływ czyli badania *in situ* w tzw. mezosystemach.

Testy letalne – śmiertelność organizmów.

Testy fizjologiczne – zmiany fizjologiczne i morfologiczne.



Ocena toksyczności



Toksyczność ostra – szkodliwe zmiany zachodzące w organizmach testowych obserwowane po krótkim czasie ekspozycji głównie 24h do 96 h, powodujące najczęściej śmierć.

Toksyczność chroniczna – szkodliwe zmiany zachodzące w organizmach testowych obserwowane po dłuższym czasie ekspozycji jako zaburzenia w funkcjonowaniu układu pokarmowego, rozrodczego lub innych narządów.

MIARY TOKSYCZNOŚCI

LC_t (ang. **L**ethal **C**oncentration) – stężenie wywołujące śmierć określonej liczby organizmów w populacji (wyrażone w %) w określonych warunkach, np. LC₅₀

EC_t (ang. **E**ffect **C**oncentration) – stężenie efektywne powodujące powstawanie określonych zmian fizjologicznych w organizmach testowych np. unieruchomienie (wyrażone w %), np. EC₅₀, EC₂₀

TU (ang. **T**oxic **U**nit) – jednostka toksyczności obliczana w oparciu o L(E)C według wzoru $TU=1/L(E)C_{50}$

WYKORZYSTANIE BIOTESTÓW

Ocena toksyczności

wód powierzchniowych i gruntowych,
wody oczyszczonej,
ścieków,
osadów ściekowych,
odcieków.



ORGANIZMY WYKORZYSTYWANE W BIOTESTACH

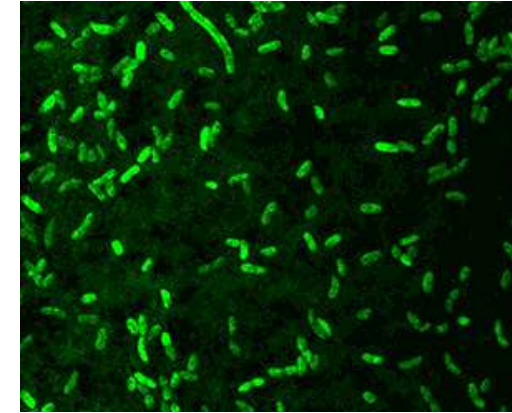
- BAKTERIE
- ROŚLINY
- ZWIERZĘTA



Rzęsa drobna (*Lemna minor*)



Rozwielitka (*Daphnia magna*)

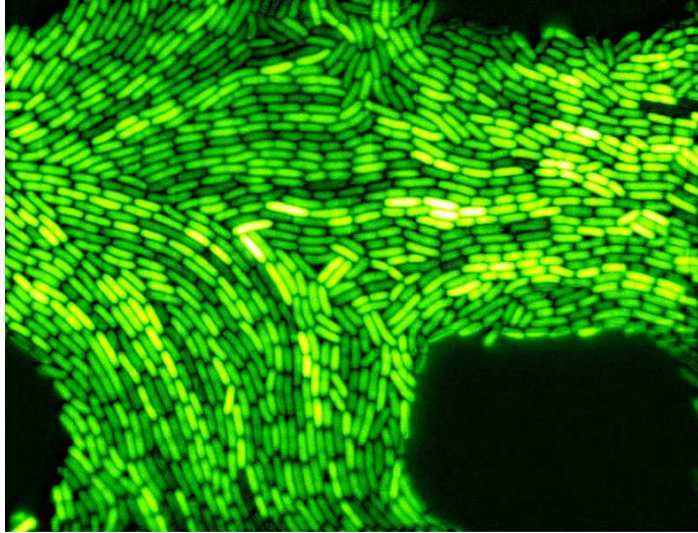


Bakterie - *Vibrio fischeri*



Danio pręgowany (*Danio rerio*)

TEST BAKTERYJNY *Vibrio fischeri*



Naturalnym środowiskiem życia bakterii *Vibrio fischeri* są oceany i morza.

Posiada naturalne właściwości do emitowania światła czyli **BIOLUMINESCENCJĘ**.

W teście dokonuje się pomiaru luminescencji przed i po inkubacji zawiesiny bakteryjnej z badaną próbką po 15 i 30 min.

Miara toksyczności

EC₅₀ – stężenie efektywne, powodując redukcję 50% emisji światła przez bakterie.

TEST *Pseudokirchneriella subcapitata*

Mikroalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (syn. *Selenastrum capricornutum*, *Raphidocelis subcapitata*) to składnik fitoplanktonu.

W teście ocenia się **tempo wzrostu mikroalg** przez pomiar gęstości optycznej po 24, 48 i 72 h.



Miara toksyczności

EC₅₀ – stężenie efektywne, powodujące 50% obniżenie przyrostu biomasy lub liczby komórek



COHIBA

TEST *Daphnia magna*

Daphnia magna - szeroko rozpowszechniony skorupiak, żyjący w wodach słodkich. Stanowi ważny składnik planktonu słodkowodnego będąc pokarmem ryb i innych zwierząt wodnych.



W teście ocenia się **immobilizację** (unieruchomienie) lub **śmiertelność** rozwielitek po 24 lub 48 h

Miary toksyczności

EC₅₀ – stężenie efektywne, powodujące unieruchomienie 50% badanych organizmów

LC₅₀ – stężenie śmiertelne, powodujące śmierć 50% badanych organizmów

TEST embriotoksyczności *Danio reiro*

Danio reiro to słodkowodna ryba z rodziny karpowatych. Popularna w hodowlach akwariowych.

Test jest prowadzony na wczesnych stadiach rozwojowych:

- stadium zarodka (embrion),
- stadium larwalne (larwa).

Miara toksyczności

Ocena **przeżywalności** badanych organizmów.



2-dniowe embriony *Danio reiro*



EMBRIONY I LARWY RYB WYKAZUJĄ **WIĘKSZĄ**
WRAŻLIWOŚĆ NIŻ OSOBNIKI DOROSŁE

COHIBA

TEST *Lemna minor*

Lemna minor jedna z najmniejszych na świecie roślin naczyniowych. W Polsce jest rośliną pospolitą, występującą na powierzchni zbiorników wodnych.

Test bada **zahamowanie wzrostu czyli** liczby roślin, liczby i powierzchni frondy, liczby i długości korzeni, suchej lub świeżej biomasy oraz zawartości chlorofilu rzęsy drobnej w okresie 5 lub 7 dni.

Miara toksyczności

EC₅₀ – stężenie efektywne, powodujące 50% zahamowanie w/w parametrów



COHIBA

TEST NA HEPATOCYTACH *Salmo trutta m. lacustris*

Salmo trutta m. lacustris to ryba z rodziny łososiowatych. Żyje w czystych, dobrze natlenionych i zimnych jeziorach oraz zbiornikach zaporowych.

Test pozwala wykryć **obecność estrogenów** w próbkach wody lub ścieków poprzez pomiar ilości produkowanej **witelogeniny**.

Prowadzony jest na **komórkach wątrobowych** (hepatocytach) pochodzących od męskich osobników.



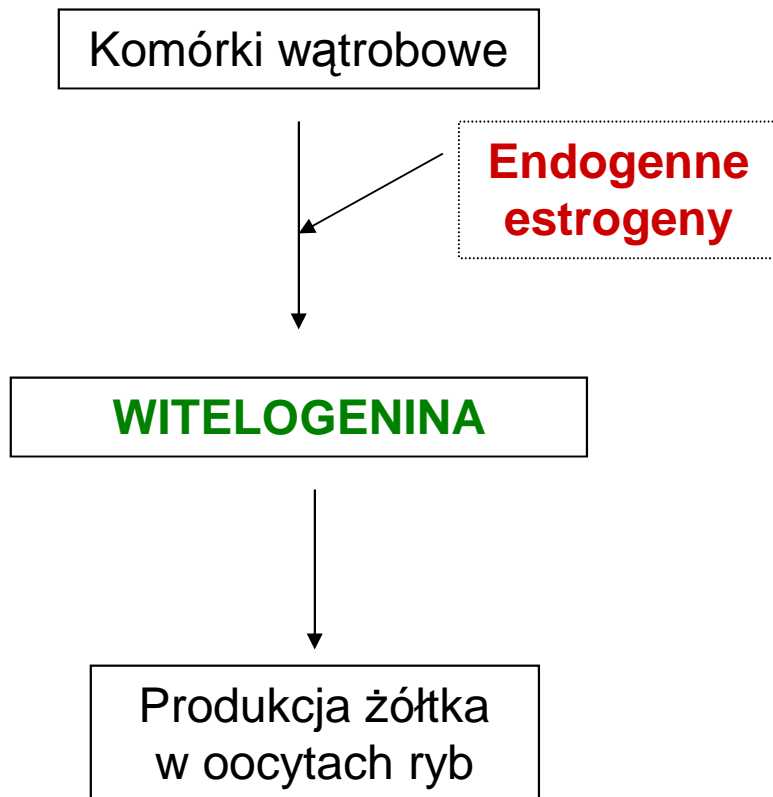
WITELOGENINA – białko prekursorowe biorące udział w produkcji żółtka w oocytach ryb.

Produkcja witelogeniny zachodzi pod wpływem estrogenów

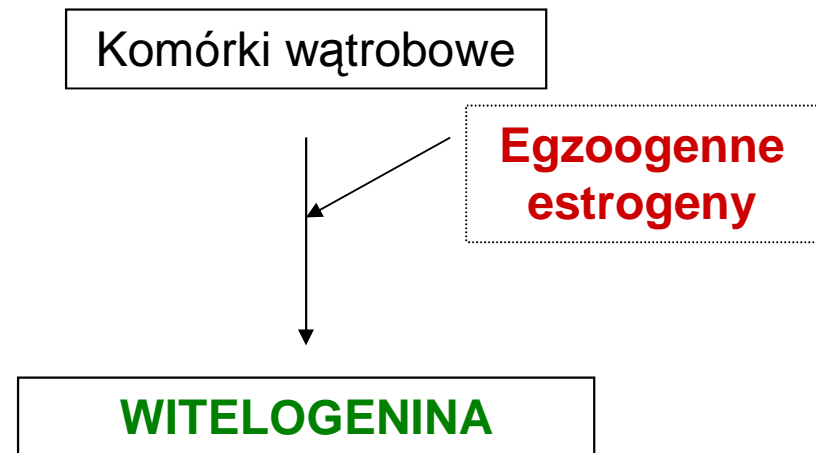
COHIBA

TEST NA HEPATOCYTACH *Salmo trutta m. lacustris*

SAMICA



SAMIEC

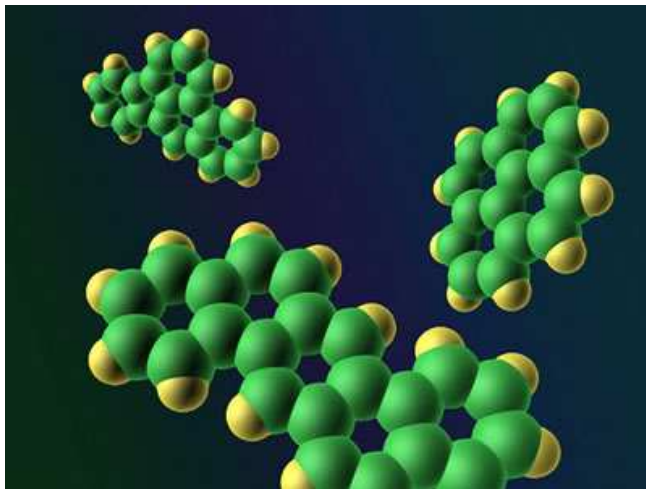


TEST EROD

Aktywność enzymatyczna O-deetylazy etoksyrezorufiny (**EROD**) w hepatocytach ryb pozwalana na ocenę aktywności cytochromu P450.

Enzymy kodowane przez cytochrom P450 biorą udział w procesach biotransformacji i detoksyfikacji substancji toksycznych.

Spadek aktywności EROD w komórkach wątrobowych jest wskaźnikiem cytotoksyczności danej próby.



Biomarker narażenia na:

- polichlorowane bifenyle (PCB)
- wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA)
- dioksyny

TEST *Salmonella* (Amesa)



Krótkoterminowy **test bakteryjny**, służy do określenia właściwości mutagennych (związków, mieszanin, ekstraktów) z wykorzystaniem specjalnie skonstruowanych mutantach szczepu *Salmonella* Typhimurium LT2.

Zmutowane szczepy są pozbawione zdolności do syntezy aminokwasu (histydyna), którą posiadają szczepy niezmutowane.

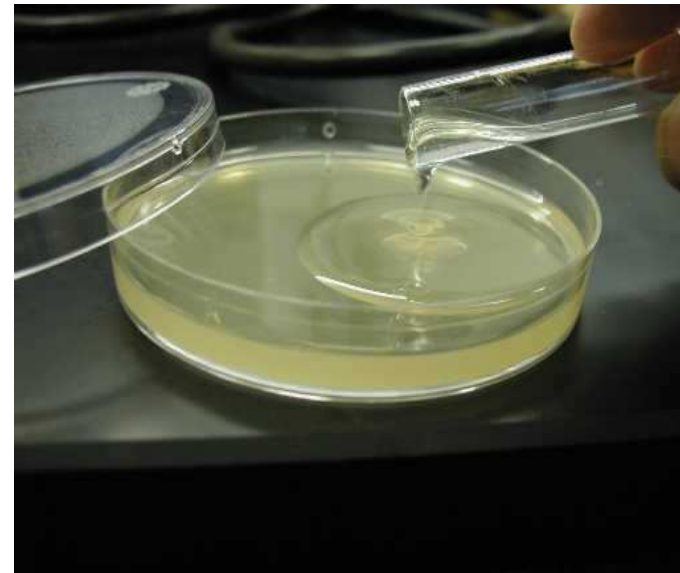
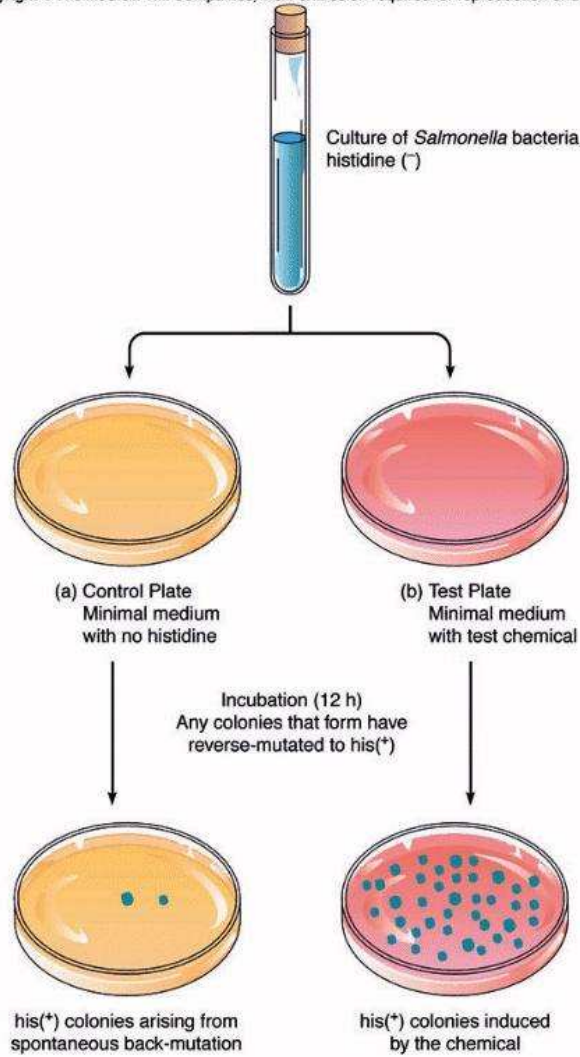
Pod wpływem czynnika mutagennego bakterie ulegają mutacji powrotnej, która przywraca im pierwotną zdolność do syntezy aminokwasu i umożliwia wzrost na podłożu bez tego związku.

Zastosowanie egzogennych enzymów wątrobowych (wariant z aktywacją metaboliczną tj. S9) pozwala ekstrapolację wyników na organizmy ssaków.

Początkowo zalecano stosowanie pięciu szczepów: TA1535, TA1537, TA1538, TA98 i TA 100.

TEST *Salmonella* (Amesa) - SCHEMAT

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



Obiekty badań

- Ścieki z trzech oczyszczalni komunalnych (6 poborów).
- Ścieki z jednej oczyszczalni przemysłowej (6 poborów).
- Wody burzowe (2 pobory).
- Odcieki ze składowiska (2 pobory)

Wykonane biotesty

- PN-EN ISO 11348:2008 Oznaczanie inhibicyjnego działania próbek wody na emisję światła przez *Vibrio fischeri*
- PN-EN ISO 8692:2008 Test hamowania wzrostu glonów słodkowodnych z wykorzystaniem jednokomórkowych zielenic
- PN-EN ISO 6341:2002 Określanie ograniczania ruchliwości *Daphnia magna* Straus (Cladocera: Crustacea)
- ISO 16240:2005 Determination of the genotoxicity of water and waste water – Salmonella/microsome test (Ames test).

System klasyfikacji toksyczności ścieków

TU		Toksyczność	Symbol
$<0,4$	Klasa I	Brak ostrej toksyczności	
$0,4 < TU < 1$	Klasa II	Mała ostra toksyczność	
$1 < TU < 10$	Klasa III	Ostra toksyczność	
$10 < TU < 100$	Klasa IV	Wysoka ostra toksyczność	
$TU > 100$	Klasa V	Bardzo wysoka ostra toksyczność	

Obliczanie istotności wyniku

Każdej wartości TU otrzymaj dla danego testu nadaje się wartość liczbowa WP (waga toksyczności) równą:

0 – dla próbek nietoksycznych

1 – dla $0,4 < TU \leq 1$

2 – dla $1 < TU \leq 10$

3 – dla $10 < TU \leq 100$

4 – dla $TU > 100$

Obliczono wagę czyli istotność wyniku w klasie (**IW**)

$$\mathbf{WAGA = \Sigma WP / n}$$

ΣWP – suma wartości WP wszystkich zastosowanych testów

n – liczba zastosowanych testów

Obliczono istotność wyniku w klasie w układzie procentowym (**%IW**)

$$\mathbf{\% WAGA = WAGA / WP_{\max} * 100}$$



Toksyczność ścieków w MWWTP1

Miesiąc	Waga toksyczności			Klasa	IW	%IW	<i>S.Typhimurium</i>
	<i>V.fischeri</i>	<i>D.magna</i>	<i>P.subcapitata</i>				
06.2009	0	0	0	I	0	0	+
07.2009	2	0	0	III	2	32	-
09.2009	0	1	0	II	1	34	-
11.2009	0	1	0	II	1	34	-
01.2010	0	0	0	I	0	0	-
04.2010	0	0	0	I	0	0	-

Toksyczność ścieków w MWWTP2

Miesiąc	Waga toksyczności			Klasa	IW	%IW	<i>S.Typhimurium</i>
	<i>V.fischeri</i>	<i>D.magna</i>	<i>P.subcapitata</i>				
06.2009	0	0	0	I	0	0	+
07.2009	0	0	0	I	0	0	-
09.2009	0	1	0	II	1	34	-
11.2009	0	1	0	II	1	34	-
01.2010	0	0	0	I	0	0	-
04.2010	0	1	0	II	1	34	-

Toksyczność ścieków w MWWTP3

Miesiąc	Waga toksyczności			Klasa	IW	%IW	<i>S. Typhimurium</i>
	<i>V.fischeri</i>	<i>D.magna</i>	<i>P.subcapitata</i>				
06.2009	0	0	0	I	0	0	-
07.2009	0	0	0	I	0	0	++
09.2009	0	1	0	II	1	34	-
11.2009	0	1	0	II	1	34	-
01.2010	0	0	0	I	0	0	-
04.2010	0	0	0	I	0	0	-

Toksyczność ścieków w IWWTP1

Miesiąc	Waga toksyczności			Klasa	IW	%IW	<i>S.Typhimurium</i>
	<i>V. fischer</i>	<i>D.magna</i>	<i>P.subcapitata</i>				
06.2009	0	0	0	I	0	0	-
07.2009	0	0	0	I	0	0	-
09.2009	0	2	0	III	2	33,5	-
11.2009	0	2	0	III	2	33,5	-
01.2010	0	1	0	II	1	34	-
04.2010	0	2	0	III	2	33,5	-

Toksyczność wód burzowych

Miesiąc	Waga toksyczności			Klasa	IW	%IW	<i>S.Typhimurium</i>
	<i>V. fischer</i>	<i>D.magna</i>	<i>P.subcapitata</i>				
12.2009	0	2	3	IV	3	56	-
10.2010	0	2	0	III	2	33,5	-

Toksyczność odcieków

Miesiąc	Waga toksyczności			Klasa	IW	%IW	<i>S.Typhimurium</i>
	<i>V. fischer</i>	<i>D.magna</i>	<i>P.subcapitata</i>				
12.2009	2	3	2	IV	3	78	-
10.2010	2	3	3	IV	3	89	-

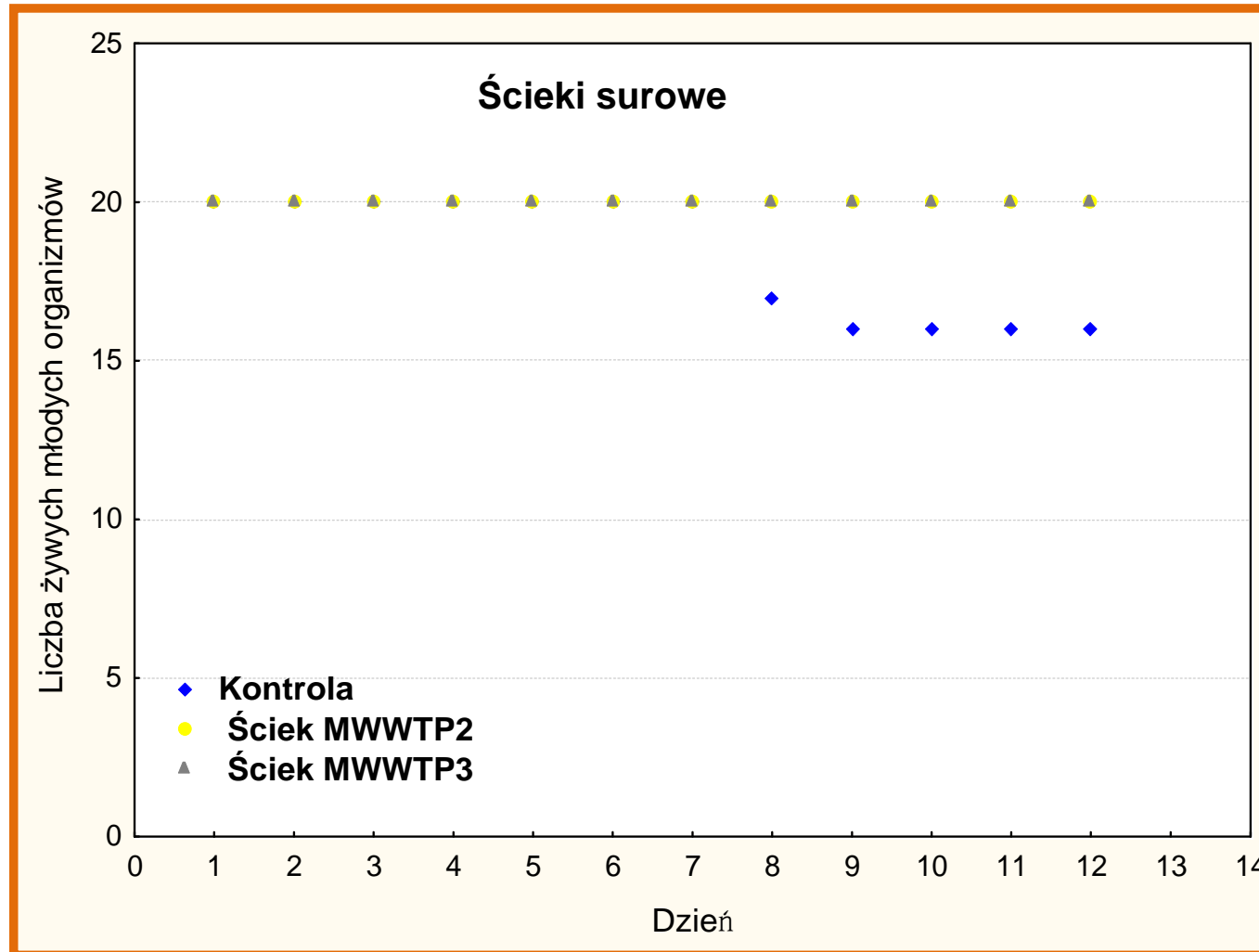
Obiekty badań

- Ścieki z dwóch oczyszczalni komunalnych (1 pobór).

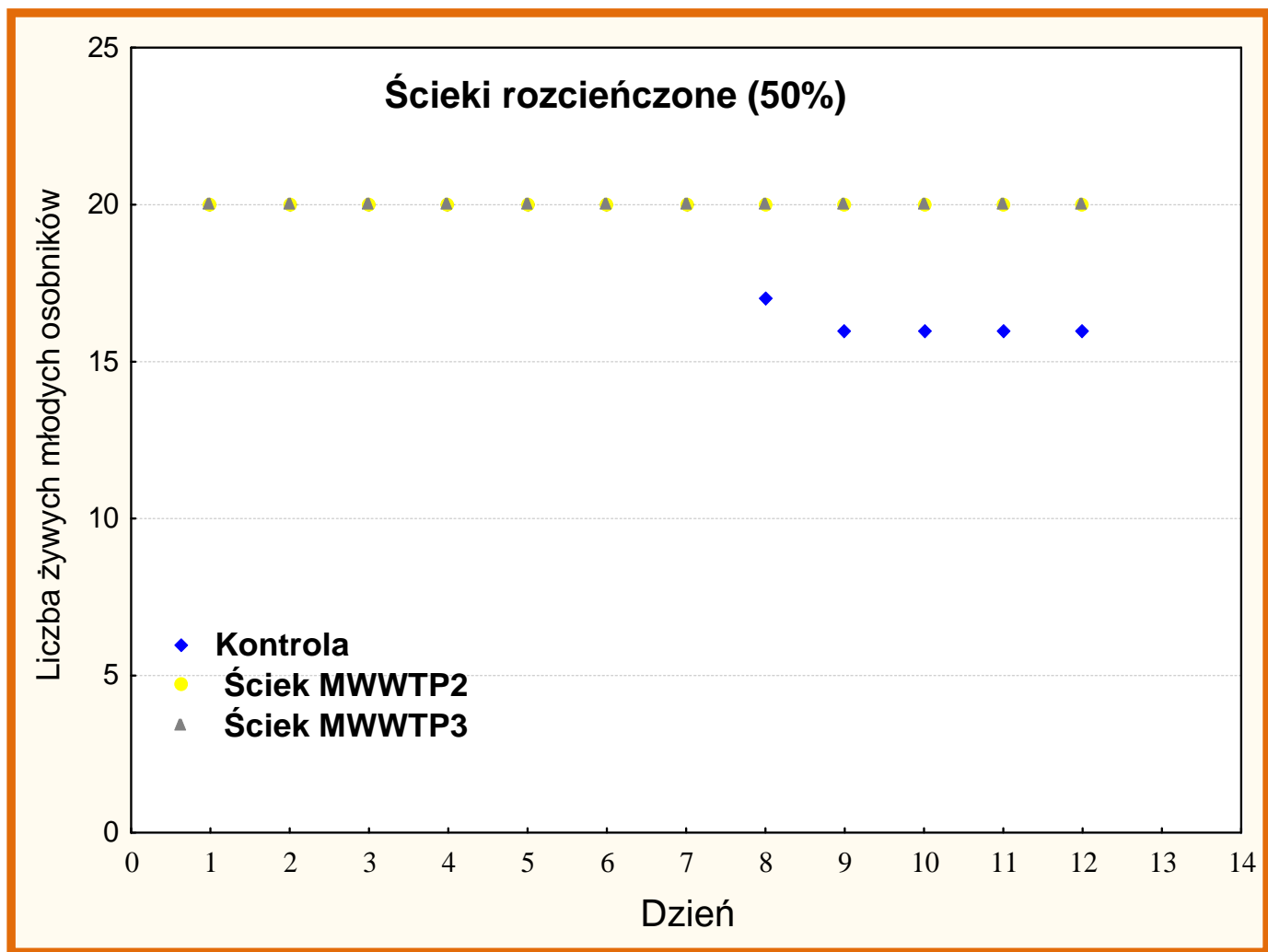
Wykonane biotesty

- ISO 12890:1999 Determination of toxicity to embryos and larvae of freshwater fish
- PN-EN ISO 20079:2006 Oznaczanie toksycznego wpływu składników wodnych i ścieków na rzęsę wodną (*Lemna minor*) - Test hamowania wzrostu rzęsy wodnej
- Indukcja witelogeniny w hepatocytach *Salmo trutta m. lacustris*
- Badanie aktywności EROD w hepatocytach *Salmo trutta m. lacustris*

Test embriotoksyczności *Danio reiro*



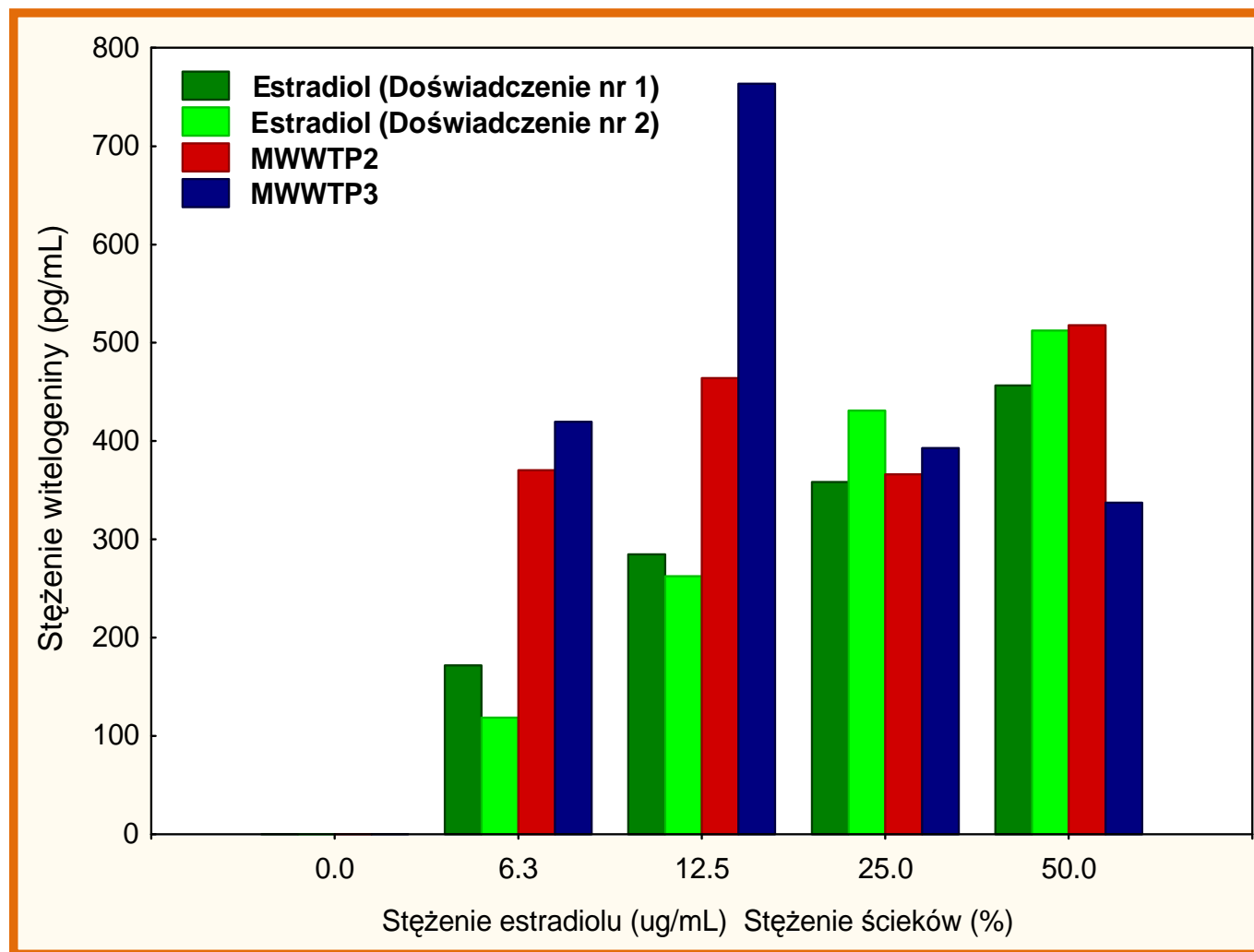
Test embriotoksyczności *Danio reiro*



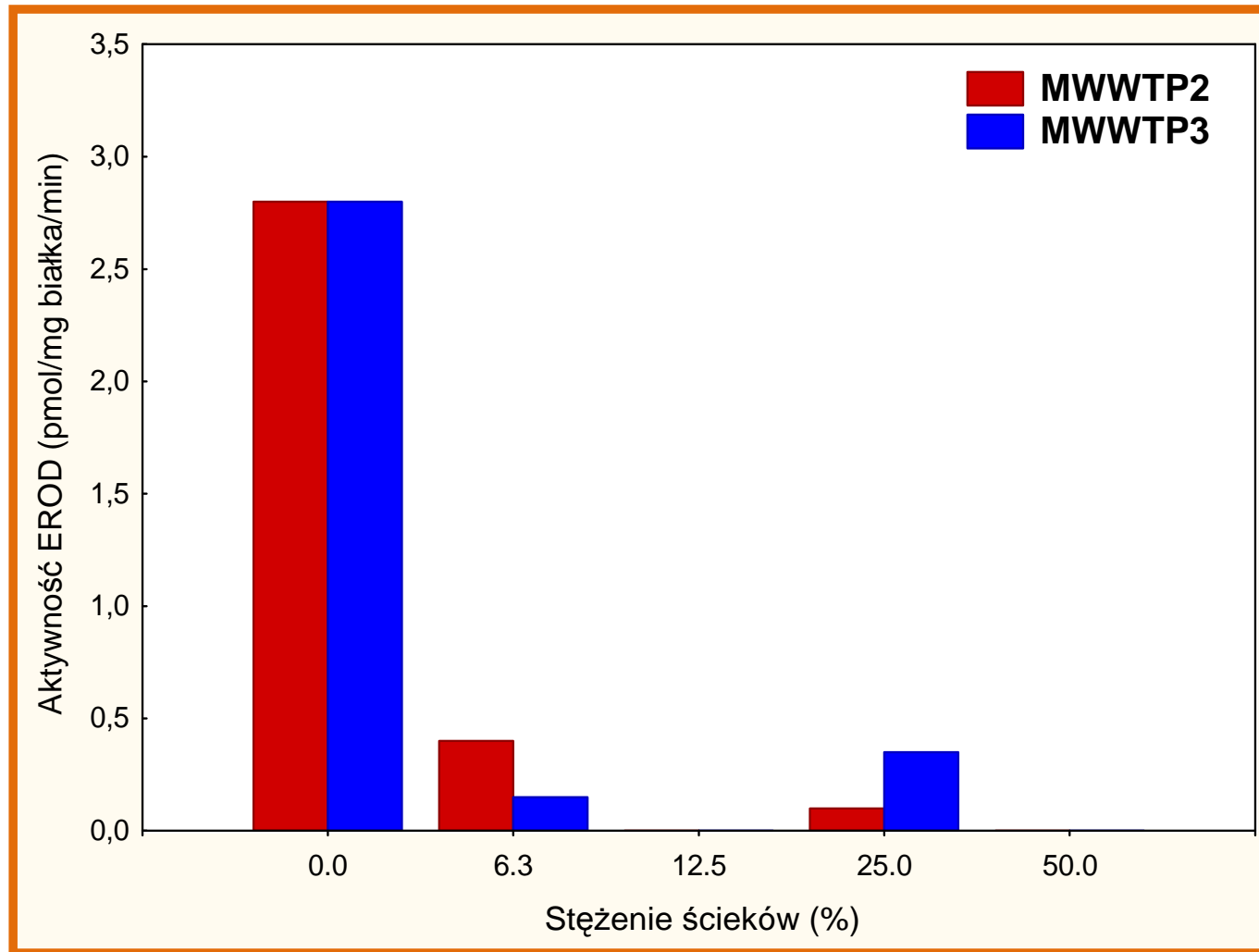
Test *Lemna minor*

Obiekt	% zahamowania (liczba frondów)		% zahamowania (powierzchnia fronów)	
	5 dni	7 dni	5 dni	7 dni
Czas obserwacji				
MWWTP2	-1,7	1,8	-6,8	-14,4
MWWTP3	0,7	3,9	1,3	-3,2

Test na hepatocytach *Salmo trutta m. lacustris*



Test EROD



WNIOSKI

- ❑ Ścieki z badanych oczyszczalni komunalnych były nietoksyczne lub słabo toksyczne w odniesieniu do wybranych organizmów testowych. Właściwości mutagenne zaobserwowano jedynie w próbach pobranych w lecie.
- ❑ Ścieki z oczyszczalni przemysłowej wykazały słabą lub ostrą toksyczność tylko w odniesieniu do *Daphni magna*.
- ❑ Wody burzowe wykazały ostrą toksyczność.
- ❑ Odcieki wykazały wysoką bardzo ostrą toksyczność.
- ❑ W wodach burzowych i odciekach nie stwierdzono substancji mutagennych.
- ❑ Ścieki z dwóch oczyszczalni komunalnych nie były toksyczne w odniesieniu do młodych osobników *Danio rerio* oraz nie hamowały wzrostu *Lemna minor*.
- ❑ Ścieki z dwóch oczyszczalni komunalnych w sposób istotny wpływały na wzrost produkcji witelogeniny oraz obniżały poziom aktywności enzymu EROD.

DZIEKUJE ZA UWAGE



COHIBA