

# Zastosowanie biotestów w ocenie zagrożeń – projekt COHIBA



Dr hab. Danuta Mielżyńska-Švach

**COHIBA**



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



Baltic Sea Region  
Programme 2007–2013

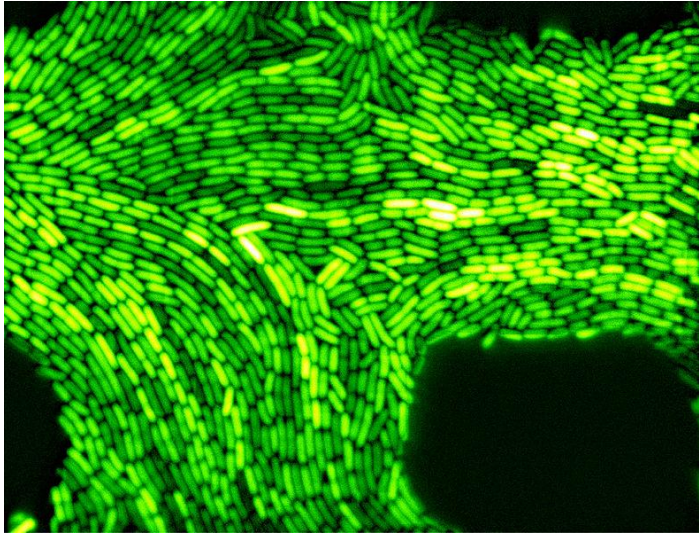
## Obiekty badań

- Ścieki z trzech oczyszczalni komunalnych MWWTP (6 poborów).
- Ścieki z jednej oczyszczalni przemysłowej IWWTP (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).

# 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

**EC<sub>50</sub>** – stężenie powodując redukcję 50% emisji światła przez bakterie.

# Badanie ścieków – test *V.fischeri*

## Organizm testowy

***Vibrio fischeri*** (Microtox, Tigret) otrzymywane w formie liofilizowanej i przechowywano w -20°C.

## Badane rozcieńczenia

W badaniach zastosowano rozcieńczenia: 90, 60, 40 and 26,67 %, dwa powtórzenia.

## Doświadczenia

Ocena intensywności luminescencji badanych próbek przeprowadzono po 15 i 30 min w porównaniu do próbek kontrolnych.

## Związek referencyjny

3,5-dichlorofenol (3,5-DCP)

## Wyniki badań ścieków dla *Vibrio fischeri*

Miesiąc	MWWTP1	MWWTP2	MWWTP3	IWWTP1
	EC <sub>50</sub> (%)	EC <sub>50</sub> (%)	EC <sub>50</sub> (%)	EC <sub>50</sub> (%)
<b>06.2009</b>	NT	NT	NT	NT
<b>07.2009</b>	89.6	NT	NT	NT
<b>09.2009</b>	NT	NT	NT	NT
<b>11.2009</b>	NT	NT	NT	NT
<b>01.2010</b>	NT	NT	NT	NT
<b>04.2010</b>	NT	NT*	NT	NT

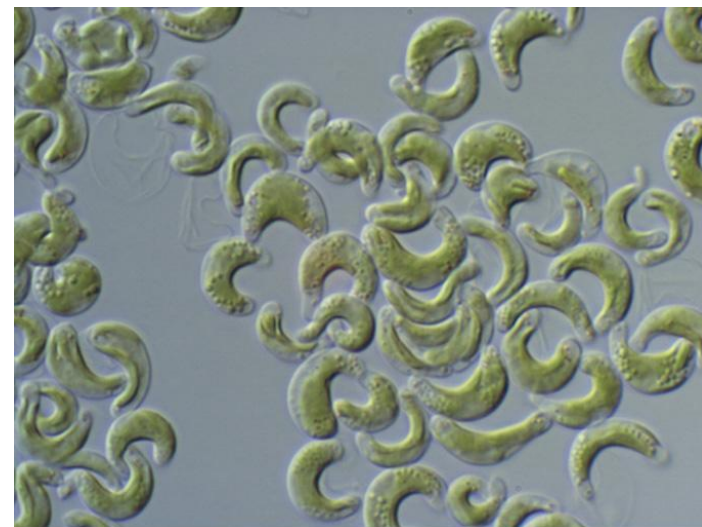
NT: EC<sub>50</sub> nie mogło zostać obliczone

\* Obliczono EC<sub>20</sub>

# TEST *Pseudokirchneriella subcapitata*

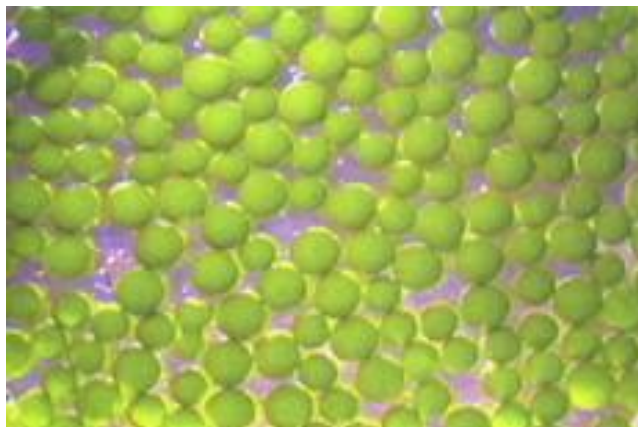
Mikroalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (syn. *Selenastrum capricornutum*, *Raphidocelis subcapitata*) to składnik fitoplanktonu.

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



Miara toksyczności

**EC<sub>50</sub>** – stężenie powodujące 50% obniżenie przyrostu biomasy lub liczby komórek



# Badanie ścieków – test *P.subcapitata*

## Organizm testowy

***Pseudokirchneriella subcapitata*** (SAG 61.81) uzyskiwana z Gottingen Algae Collection (Germany) oraz hodowana zgodnie z normą ISO.

## Badane rozcieńczenia

W badaniach zastosowano rozcieńczenia: 100, 75, 50 i 25 %, trzy powtórzenia. Kontrola w sześciu powtórzeniach.

## Doświadczenia

Ocena tempa wzrostu mikroalg przez pomiar gęstości optycznej po 24, 48 i 72 h (metoda spektrofotometryczna).

## Związek referencyjny

3,5-dichlorofenol (3,5-DCP)

## *Wyniki badań ścieków dla Pseudokirchneriella subcapitata*

Miesiąc	MWWTP1	MWWTP2	MWWTP3	IWWTP1
	EC <sub>50</sub> (%)	EC <sub>50</sub> (%)	EC <sub>50</sub> (%)	EC <sub>50</sub> (%)
<b>06.2009</b>	NT	NT	NT	NT
<b>07.2009</b>	NT	NT	NT	NT
<b>09.2009</b>	NT	NT	NT	NT
<b>11.2009</b>	NT	NT	NT	NT
<b>01.2010</b>	NT	NT	NT	NT
<b>04.2010</b>	NT	NT	NT	NT

NT: EC<sub>50</sub> nie mogło zostać obliczone

# 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

**EC<sub>50</sub>** – stężenie powodujące unieruchomienie 50% badanych organizmów

# Badanie ścieków – *D.magna*

## Organizm testowy

***Daphnia magna*** (Daphtokit, Tigret). Organizmy dostarczane w postaci jajeczek, które przechowywano w ciemności, w temp. 4-8°C. Przed testem jajeczka były umieszczone w wodzie wraz z pożywką. Młode osobniki były odżywiane mikroglonami.

## Badane rozcieńczenia

W badaniach zastosowano rozcieńczenia 100, 75, 50 i 25 %, cztery powtórzenia.

## Doświadczenia

W teście oceniano **immobilizację** (unieruchomienie) lub **śmiertelność** rozwielitek po 24 lub 48 h.

## Związek referencyjny

Dwuchromian potasu ( $K_2Cr_2O_7$ )



# *Wyniki badań ścieków dla Daphnia magna*

Miesiąc	MWWTP1	MWWTP2	MWWTP3	IWWTP1
	EC <sub>50</sub> (%)	EC <sub>50</sub> (%)	EC <sub>50</sub> (%)	EC <sub>50</sub> (%)
<b>06.2009</b>	NT	NT	NT	NT
<b>07.2009</b>	NT	NT	NT	NT
<b>09.2009</b>	NT*	NT*	NT*	85,0
<b>11.2009</b>	NT*	NT*	NT*	89,0
<b>01.2010</b>	NT	NT	NT	NT*
<b>04.2010</b>	NT	NT*	NT	40,0

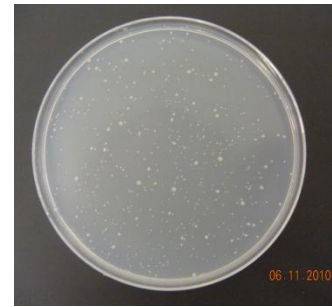
NT: EC<sub>50</sub> nie mogło zostać obliczone

\* Obliczono EC<sub>20</sub>

Wody burzowe	<i>V.fisheri</i> EC <sub>50</sub> (%)	<i>P.subcapitata</i> EC <sub>50</sub> (%)	<i>D.magna</i> EC <sub>50</sub> (%)
12.2009	NT	3.48	50.1
10.2010	NT	NT	50,0

Odcieki	<i>V.fisheri</i> EC <sub>50</sub> (%)	<i>P.subcapitata</i> EC <sub>50</sub> (%)	<i>D.magna</i> EC <sub>50</sub> (%)
12.2009	16,5	56,6	1,2
10.2010	23,3	2,49	4,0

# TEST *Salmonella* (Amesa)



Krótkoterminowy **test bakteryjny**, służy do określenia właściwości mutagennych (związków, mieszanin, ekstraktów) z wykorzystaniem specjalnie skonstruowanych mutantów 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.

# Badanie ścieków - testem *Salmonella*

## Organizm testowy

***Salmonella Typhimurium***: otrzymywano w formie liofilizowanej (TRINOVA).  
Przechowywane w temp. -20°C. Szczepy: TA98 i TA100.

## Badane rozcieńczenia

W badaniach zastosowano rozcieńczenia : 100, 75, 50 i 25 %, trzy powtórzenia.

## Doświadczenie

Po 48 godzinach inkubacji w 37°C, liczono liczbę rewertantów spontanicznych, indukowanych oraz w kontrolach negatywnych i pozytywnych. Zastosowano wariant, bez i po aktywacji metabolicznej ( $\pm$ S9).

## Związki referencyjne

Mutagen bezpośredni:

TA98 - 4-nitro-1,2-fenylendiamina (NPDA)

TA100 - nitrofurantion (NF)

Mutagen pośredni:

2-aminoantracen (2-AA) dla obu szczepów



# Efekt mutageny ścieków dla szczepu TA98

Miesiąc	MWWTP1		MWWTP2		MWWTP3		IWWTP1	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
<b>06.2009</b>	0	<b>63*</b>	<b>21</b>	<b>53*</b>	3	<b>32</b>	4	<b>22</b>
<b>07.2009</b>	-1	-6	3	-1	<b>49*</b>	14	5	-1
<b>09.2009</b>	-6	-7	-7	-1	-4	<b>26</b>	-6	-4
<b>11.2009</b>	1	1	3	-1	0	-1	0	1
<b>01.2010</b>	2	-8	-2	-12	-3	-5	0	-14
<b>04.2010</b>	-2.3	9.0	-15	-3.6	-8.6	9.3	-2.3	-2.3

Kryterium oceny

Różnica między liczbą rewertantów próbie i kontroli: **20**



# Efekt mutageny ścieków dla szczepu TA100

Miesiąc	MWWTP1		MWWTP2		MWWTP3		IWWTP1	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
<b>06.2009</b>	-38	1	-20	<b>81</b>	18	-34	-21	18
<b>07.2009</b>	1	16	11	-1	68	<b>125*</b>	11	-6
<b>09.2009</b>	5	-10	5	-6	4	-1	1	-6
<b>11.2009</b>	-28	2	5	-12	-23	9	2	12
<b>01.2010</b>	-26	-7	-31	-3	4	-5	-6	4
<b>04.2010</b>	-9.4	16.7	-28.4	0.4	3.7	-20	0	-27

Kryterium oceny

Różnica między liczbą rewertantów próbie i kontroli: **80**



# Ocena toksyczności








## MIARY TOKSYCZNOŚCI

**LC<sub>t</sub>** (ang. **L**ethal **C**oncentration) – stężenie śmiertelne wywołujące śmierć określonej liczby organizmów w populacji (wyrażone w %) w określonych warunkach, np. LC<sub>50</sub>

**EC<sub>t</sub>** (ang. **E**ffect **C**oncentration) – stężenie efektywne powodujące powstawanie określonych zmian fizjologicznych w organizmach testowych np. unieruchomienie (wyrażone w %), np. EC<sub>50</sub>, EC<sub>20</sub>

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

# System klasyfikacji toksyczności ścieków

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

## Ocena istotności wyniku

Każdej wartości **TU** otrzymanej dla danego testu nadano wartość liczbowa **WP** (waga toksyczności)

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**)

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

$\Sigma \mathbf{WP}$  – suma wartości WP wszystkich zastosowanych testów

n – liczba zastosowanych testów

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

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

# 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 MWWTP 2 i 3 (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 rzęśę 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*

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

Test jest prowadzony na wczesnych stadiach rozwojowych:

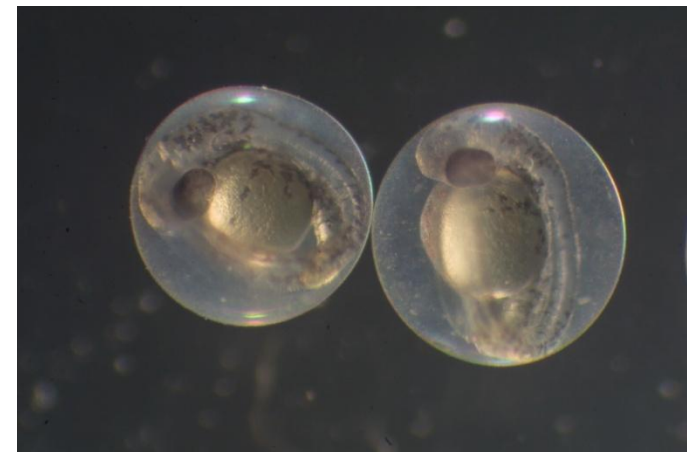
- stadium zarodka (embrion),
- stadium larwalne (larwa).

Miara toksyczności

Ocena **przeżywalności** badanych organizmów.



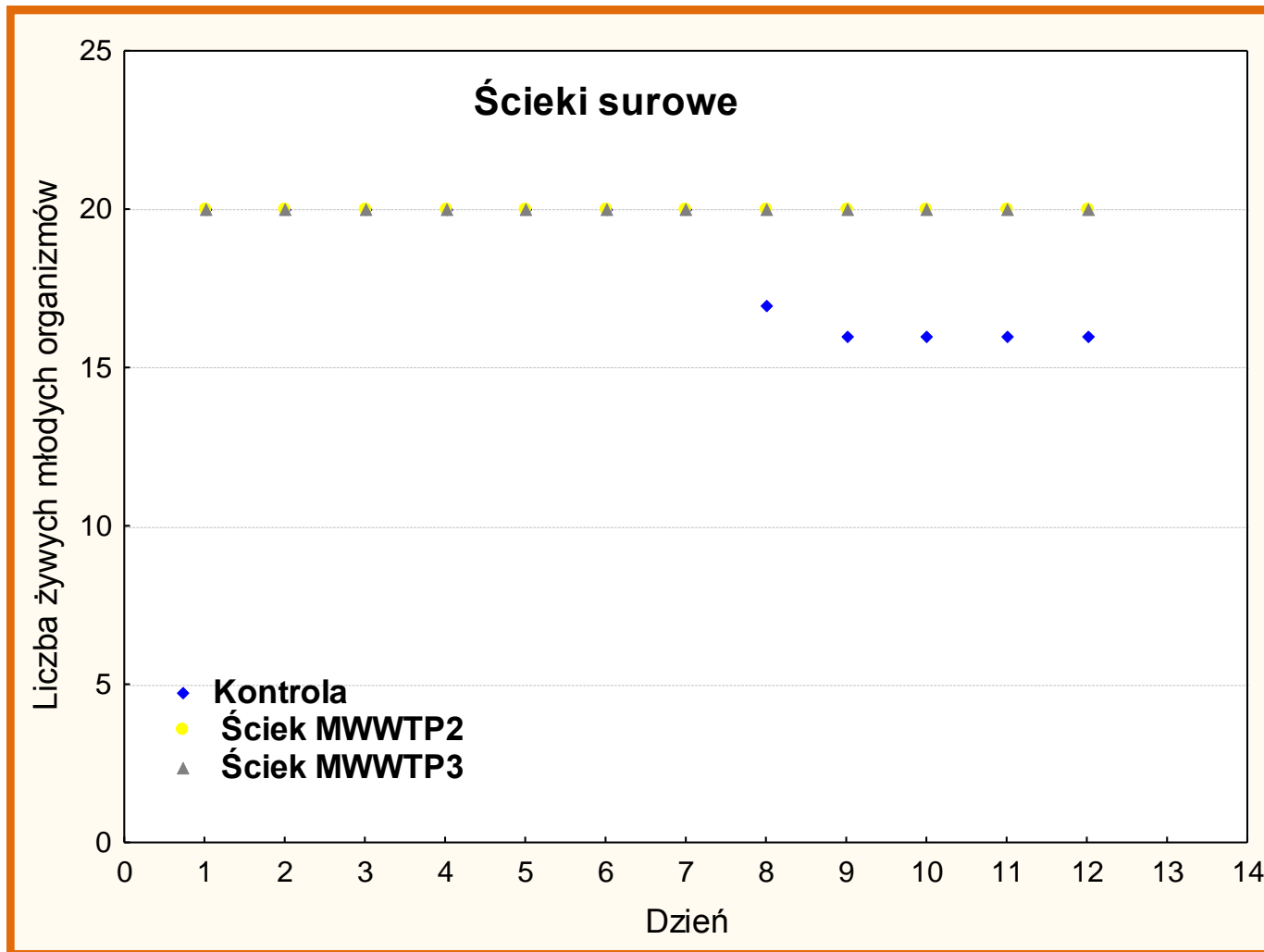
2-dniowe embriony *Danio reiro*



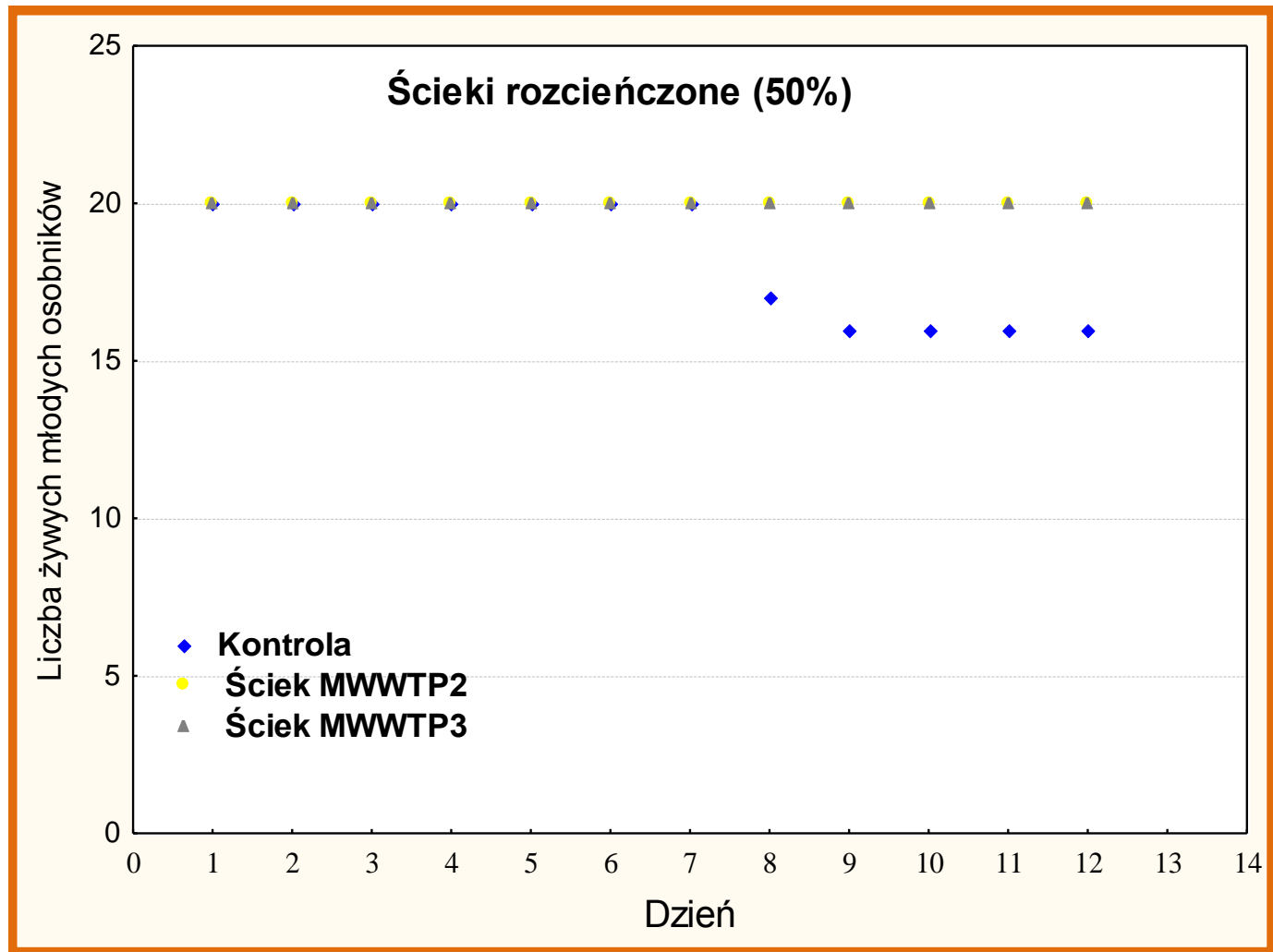
EMBRIONY I LARWY RYB WYKAZUJĄ **WIĘKSZĄ**  
**WRAŻLIWOŚĆ** NIŻ OSOBNIKI DOROSŁE



# Test embriotoksyczności *Danio reiro*



# Test embriotoksyczności *Danio reiro*



# 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 w okresie 5 lub 7 dni.

Miara toksyczności

**EC<sub>50</sub>** – stężenie efektywne, powodujące 50% zahamowanie w/w parametrów



## Test *Lemna minor*

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

# 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 wykrywa **obecność estrogenów** w próbkach poprzez pomiar ilości produkowanej **witelogeniny**.

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



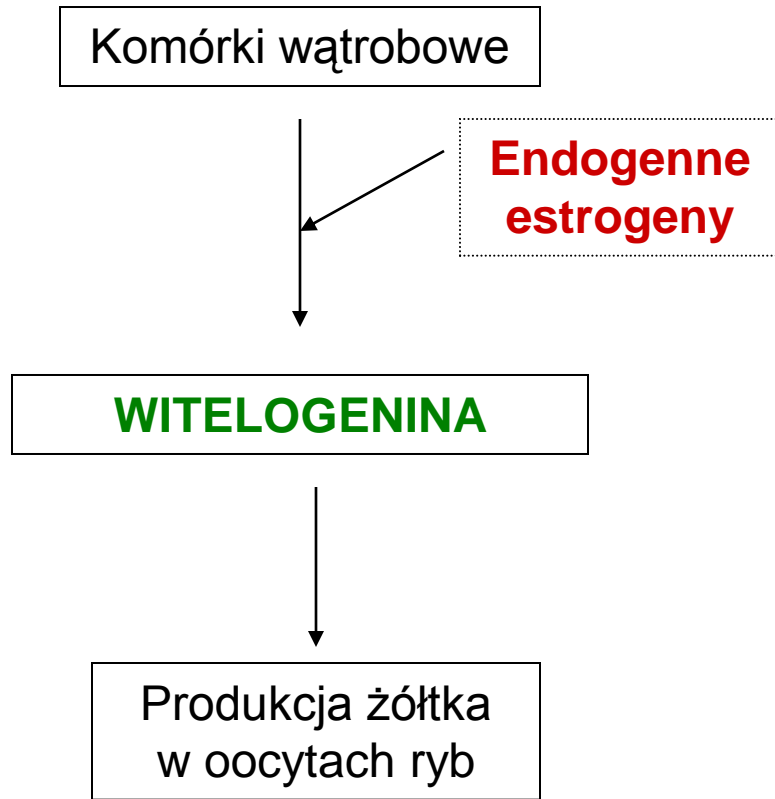
**WITELOGENINA – białko prekursorowe biorące udział w produkcji żółtka w oocytach ryb.**

**Produkcja witelogeniny zachodzi pod wpływem estrogenów.**

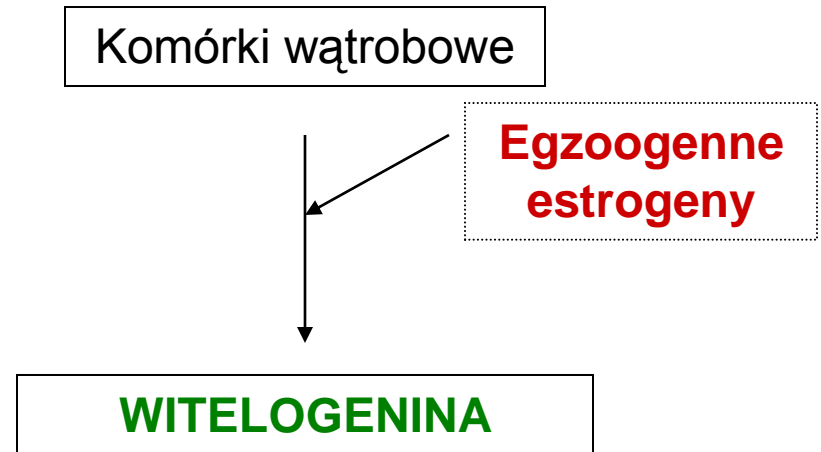
**COHIBA**

# TEST NA HEPATOCYTACH *Salmo trutta m. lacustris*

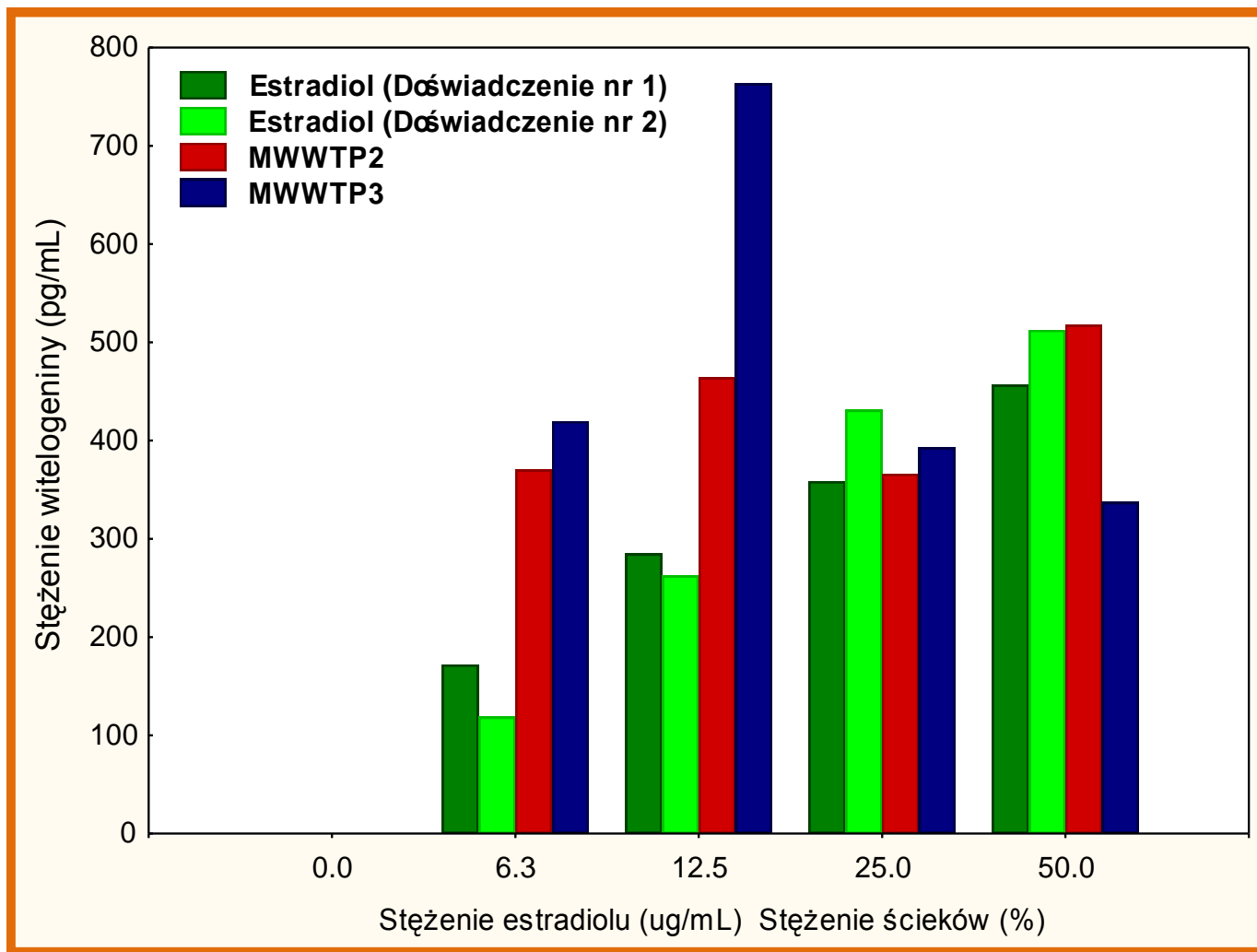
## SAMICA



## SAMIEC



# Test na hepatocytach *Salmo trutta m. lacustris*

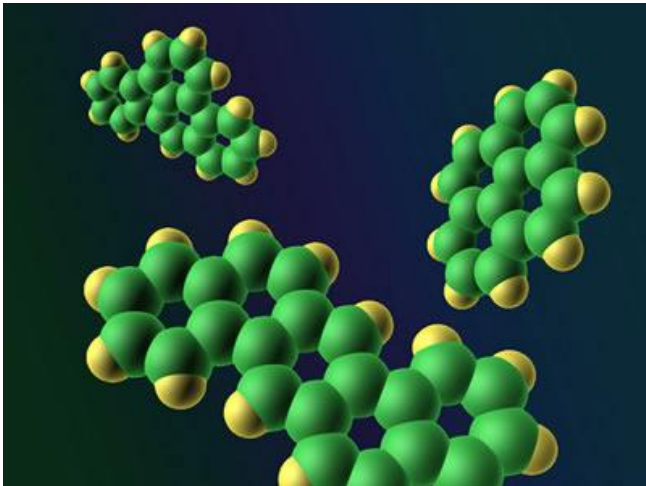


# TEST EROD

**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.

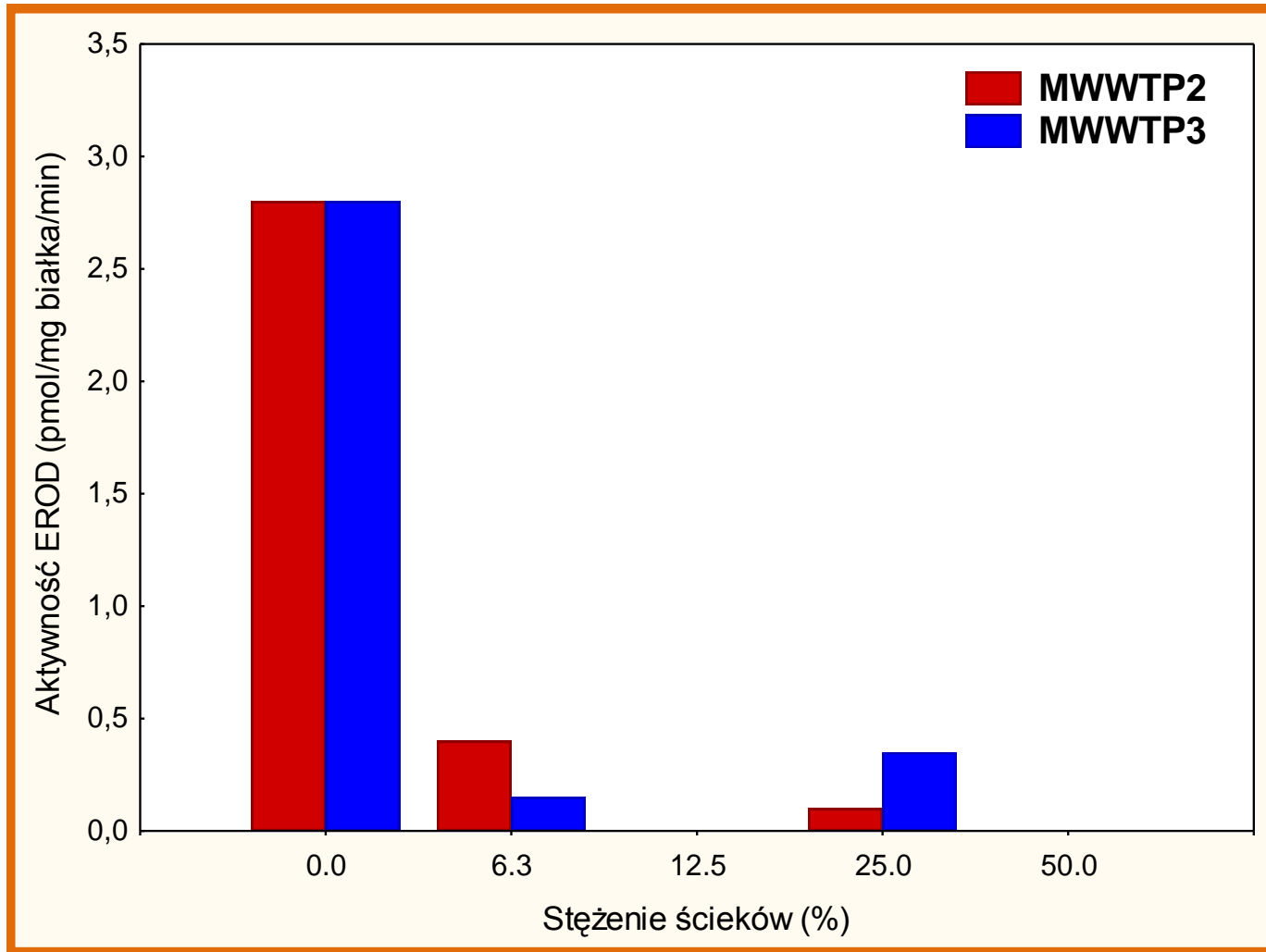
**Spadek aktywności EROD w komórkach wątrobowych jest wskaźnikiem cytotoksyczności danej próby.**



## Biomarker narażenia na

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

# Test EROD



# WNIOSKI

- Próby ścieków z oczyszczalni komunalnych były nietoksyczne lub mało toksyczne. Właściwości mutagenne zaobserwowano jedynie w próbach pobranych w lecie.
- Próby ścieków z oczyszczalni przemysłowej były mało toksyczne lub toksyczne.
- Próby wód burzowych były toksyczne oraz wysoko toksyczne.
- Próby odcieków były bardzo wysoko toksyczne.
- W próbach wód burzowych i odciekach nie stwierdzono substancji mutagennych.

# WNIOSKI

- Próby ścieków z dwóch oczyszczalni komunalnych nie były toksyczne w odniesieniu do młodych osobników *Dario rerio* oraz nie hamowały wzrostu *Lemna minor*.
- Próby ścieków z dwóch oczyszczalni komunalnych w sposób istotny wpływały na wzrost produkcji witelogeniny oraz obniżały poziom aktywności enzymu EROD.

# WYKONAWCY

## **Instytut Ekologii Terenów Uprzemysłowionych, Katowice**

Dr hab. D. Mielżyńska-Švach

Dr hab. G. Płaza

## **Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa**

Dr hab. G. Nałęcz-Jawecki

## **Instytut Przemysłu Chemicznego, Pszczyna**

Dr P. Fochtman

## **Finnish Environment Institute (SYKE), Helsinki**

Dr T. Nakari

Dr P. Munne