

Ocena toksyczności oczyszczonych ścieków i zasolonych wód odprowadzonych do Zatoki Puckiej przy użyciu biotestów

Ilona Waszak i Weronika Podlesińska



ZAKRES BADAŃ

Badania toksyczności

```
graph TD; A[Badania toksyczności] --> B[Ścieki oczyszczone]; A --> C["Wody zasolone  
(ścieki oczyszczone + sól)"]
```

Ścieki oczyszczone

- Odprowadzane kolektorem do wód Zatoki Puckiej z Grupowej Oczyszczalni Ścieków „Dębogórze”.

Wody zasolone

(ścieki oczyszczone + sól)

- Powstałe w wyniku ługowania złóż soli za pomocą ścieków oczyszczonych;
- Odprowadzane oddzielnym kolektorem do wód Zatoki Puckiej.

POBÓR PRÓBEK

- Próbki pobierane były w czterech okresach 2020 r. (od czerwca do listopada).
- Próbki pobierane były z kolektorów technologicznych hali pomp zakładu ługowniczego KPMG „Kosakowo”.



Miejsce poboru prób.

POBÓR PRÓBEK

Charakterystyka próbek i rodzaj biotesów użytych w ich badaniach:

Sezon	Data poboru prób	Ścieki oczyszczone		Wody zasolone			Rodzaj użytego w badaniach biotestu
		Zasolenie	pH	Gęstość (kg/m ³)	Zasolenie	pH	
I	22.06.2020	0,500	7	1150	233,79	6	<i>Microtox, Rotoxkit M</i>
	29.06.2020	0,368	7	1149	242,16	6	<i>Marine Algaltokit</i>
II	17.08.2020	0,482	7	1151	235,43	6	<i>Microtox, Rotoxkit M</i>
	24.08.2020	0,361	6	1147	228,88	5	<i>Marine Algaltokit</i>
III	12.10.2020	0,350	7	1087	132,71*	6	<i>Microtox, Rotoxkit M</i>
	19.10.2020	0,342	6	1084	128,02*	6	<i>Marine Algaltokit</i>
IV	09.11.2020	0,341	6	1075	114,00*	5	<i>Microtox, Rotoxkit M</i>
	09.11.2020	0,341	6	1075	114,00*	5	<i>Marine Algaltokit</i>

*Spadek zasolenia wód spowodowany wyłączeniem jednej komory ługowniczej.

TESTY TOKSYCZNOŚCI

- Celem stosowania organizmów wskaźnikowych jest zmierzenie wpływu jakie substancje szkodliwe zawarte w testowanych mieszaninach mają na te organizmy .
- Badania prowadzono na organizmach reprezentujących trzy poziomy troficzne:
 - **destruenci** - bakterie (*Aliivibrio fischeri*);
 - **producenci** - algi (*Phaeodactylum tricornutum*);
 - **konsumenci** - wrotki (*Brachionus plicatilis*).



Parametry określające efekt toksyczny badanych próbek :

LC50 (ang. *lethal concentration*) - stężenie toksykanta powodujące śmierć 50% badanych organizmów w porównaniu z kontrolą w czasie trwania badania.

EC50 (ang. *effective concentration*) - stężenie toksykanta powodujące zahamowanie obserwowanego efektu u 50% badanych organizmów w porównaniu z kontrolą w czasie trwania eksperymentu.

1. MICROTOX

- Test toksyczności ostrej (krótkotrwałej).
- Wykonany według standardowej procedury producenta przy użyciu analizatora *Microtox LX* firmy *Modern Water Inc.*



Analizator *Microtox LX* firmy *Modern Water Inc.*

1. MICROTOX

Charakterystyka testu:

- System *Microtox* wykorzystuje morskie bakterie luminescencyjne z gatunku *Aliivibrio fischeri*, u których produkcja światła jest efektem procesów metabolicznych.
- U bakterii *A. fischeri* w obecności toksyn następuje zaburzenie procesów metabolizmu, czego efektem jest zmniejszenie intensywności emitowanego światła.
- Podstawą działania testu jest pomiar bioluminescencji bakterii ekspozowanych na działanie próbki i porównanie jej z bioluminescencją w próbce kontrolnej.



1. MICROTOX

Przeprowadzenie testu:

- 2 etapy przeprowadzenia testu:
 - **test przesiewowy (Screening Test 81,9 %)** – wytypowanie próbek toksycznych;
 - **test podstawowy (Basic Test 81,9 %)** – pomiar toksyczności próbek.
- W teście przesiewowym nie stwierdzono toksyczności próbek, więc nie wykonywano testu podstawowego.
- Pomiary bioluminescencji bakterii w czasie 5 i 15 minut.

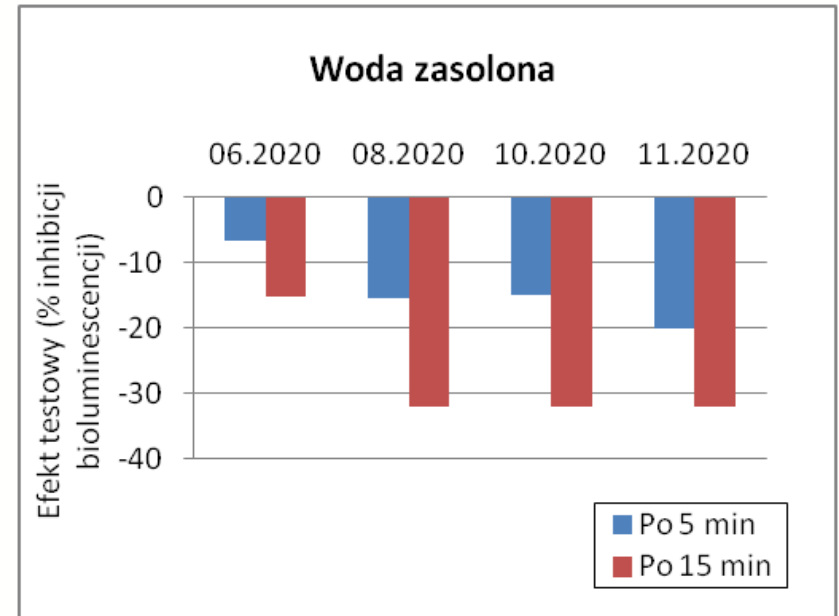
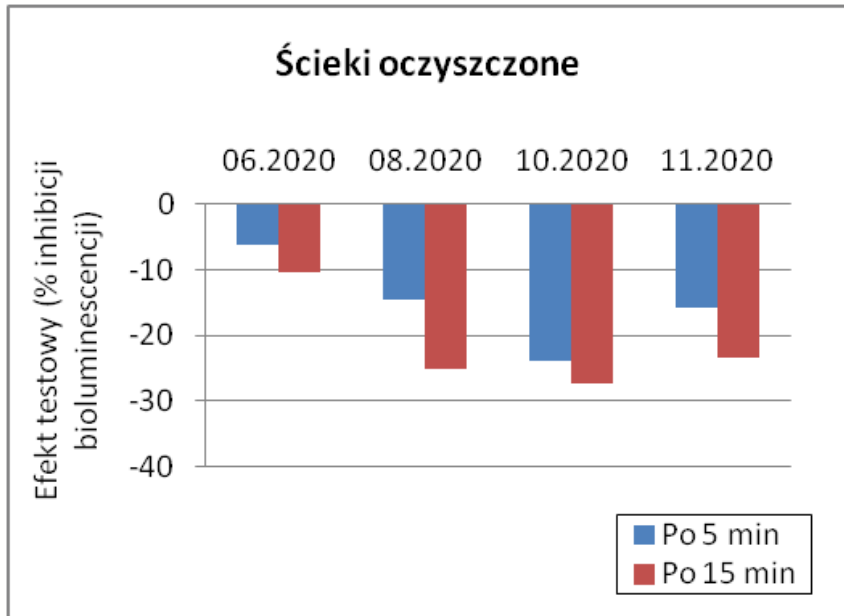
Test referencyjny:

- W celu sprawdzenia prawidłowości wykonania procedury testowej został wykonany, test referencyjny z toksycznym związkiem (siedmiowodnym siarczanem cynku), którego wynik był zgodny z wartością podaną dla tego testu przez producenta (EC50 (15 min) = 5,5 mg/l).



1. MICROTOX

Wyniki testu:



- brak inhibicji bioluminescencji bakterii względem kontroli;
- występowanie efektu odwrotnego - **stymulacja świecenia** (wartości ujemne).

1. MICROTOX

Wniosek:

- Stymulacja bioluminescencji na skutek ekspozycji bakterii na działanie badanych próbek, jest wynikiem zjawiska hormezy. Jest to powszechnie występujące zjawisko, w którym produkcja światła jest uwarunkowana obecnością soli.
- Przez wielu badaczy zjawisko to **nie jest rozpatrywane w kategoriach toksyczności próbki**¹⁻³.

¹Cook i in., *Environ. Toxicol. Chem.*, 2000, 16, 10, 2474-2477.

²Dizer i in., *Chemosphere*, 2002, 46, 225-233.

³Zgórska i in., *Inżynieria Ekologiczna*, 2019, 20, 2, 15-23.



1. MICROTOX

Porównanie z danymi literaturowymi:

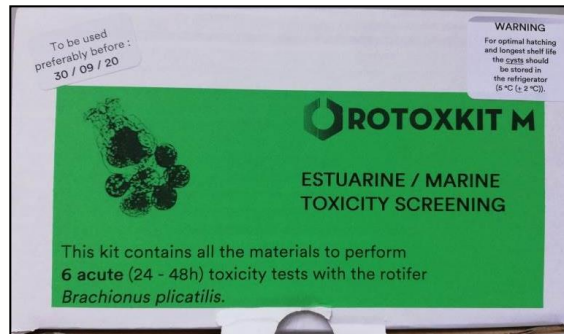
Badania **ścieków bytowo-przemysłowych** odprowadzanych w latach 2011-2012 do Zatoki Puckiej z oczyszczalni ścieków „Dębogórze”¹ również nie wykazały działania toksycznego (stymulacja bioluminescencji bakterii wynosiła średnio 33%).

¹Ratajczyk i in., Ochrona Środowiska, 2014, 36, 51-55.



2. ROTOXKIT M

- Test toksyczności ostrej (krótkotrwałej).
- Został wykonany według standardowej procedury producenta.
- Oparty jest na wrotkach *Brachionus plicatilis*.

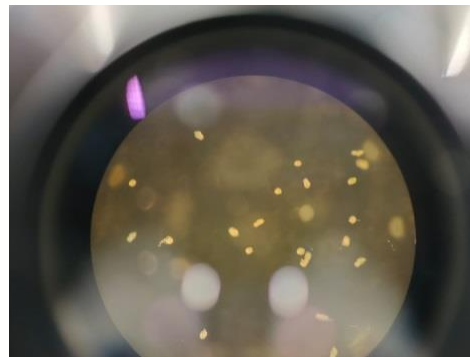


Zestaw Rotoxkit M.

2. ROTOXKIT M

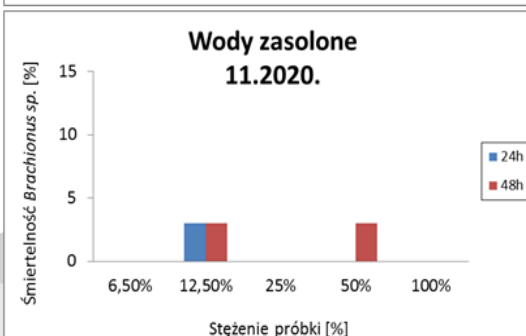
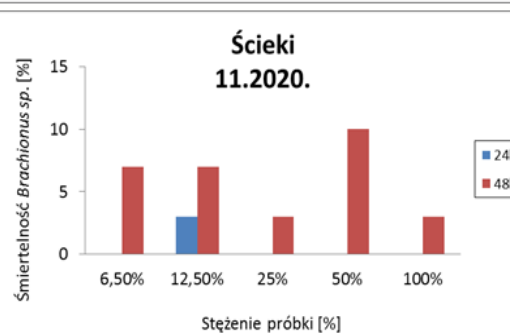
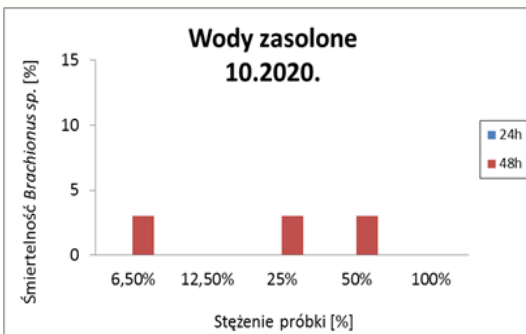
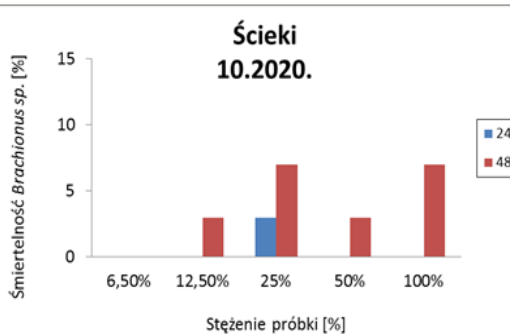
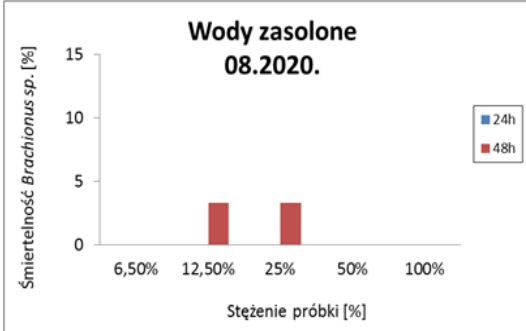
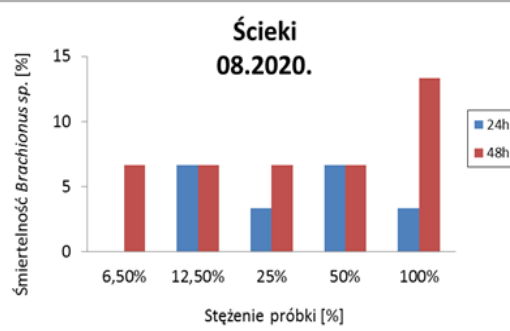
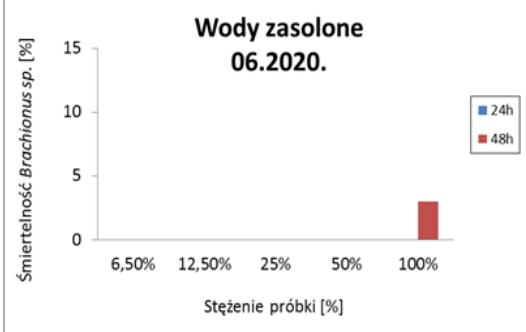
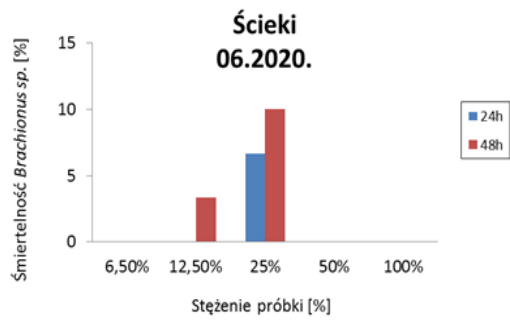
Etapy biotestu:

- inkubacja wrotków (24-26 h; 25°C i oświetlenie boczne o natężeniu 3000-4000 lux);
- po wylęgu, przeniesienie 5 organizmów do każdego dołka testowego z próbką;
- umieszczenie próbek z organizmami w cieplarni;
- zliczanie martwych organizmów po 24 i 48 godzinach inkubacji.
- każdorazowe sprawdzanie kryteriów testu;
- sprawdzenie prawidłowości wykonania całej procedury testowej - test referencyjny z toksycznym związkiem (dwuchromian potasu), którego wyniki były zgodne z wartościami podanymi dla tego testu przez producenta (24h-LC50 = 323-346 mg/l i 48h-LC50 = 188-220 mg/l).



Inkubacja w cieplarni, obserwacje mikroskopowe wrotków.

2. ROTOXKIT M



Wyniki testu:

- Niska śmiertelność wrotków wystawionych na działanie wszystkich badanych próbek (0-13 %, tj. 0-4 z 30 organizmów);
- **Żadna z próbek nie wykazała działania toksycznego na testowane organizmy.**

Śmiertelność *B. plicatilis* w zależności od stężenia ścieków i wód zasolonych (po 24 i 48 godzinach inkubacji) w teście Rotoxkit M.

2. ROTOXKIT M

Porównanie z danymi literaturowymi:

Brak danych na temat badań toksyczności ścieków z zastosowaniem morskich *B. plicatilis*; badania dotyczą głównie użycia organizmów słodkowodnych (*Brachionus calyciflorus*, test *Rotoxkit F*):

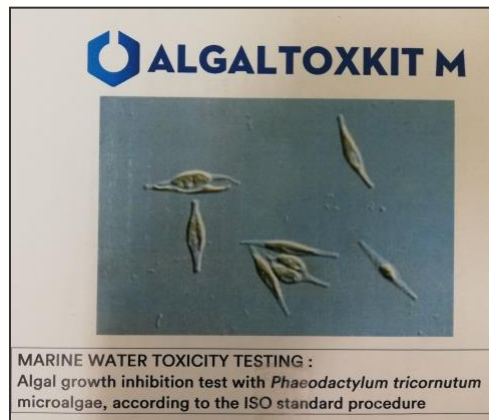
Ścieki oczyszczone odprowadzane do Zatoki Puckiej z oczyszczalni „Wschód” nie wykazywały działania toksycznego wobec *B. calyciflorus* (śmiertelność organizmów < 10%)¹.

¹Ratajczyk W. Zagrożenia środowiskowe wynikające z odprowadzania ścieków oczyszczonych do wód morskich. Rozprawa doktorska. Gdański Uniwersytet Medyczny, Wydział nauk o Zdrowiu z Oddziałem Pielęgniarstwa i Instytutem Medycyny Morskiej i Tropikalnej, Zakład Toksykologii Środowiska, Gdańsk, 2017.



3. MARINE ALGALTOXKIT

- Test toksyczności chronicznej (długotrwałej).
- Został wykonany według standardowej procedury producenta.
- Oparty jest na morskim gatunku okrzemek *Phaeodactylum tricornutum*.

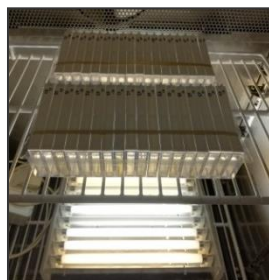
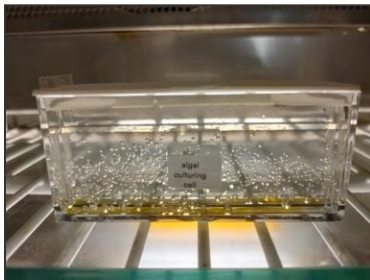


Zestaw *Marine Algaltoxkit*.

3. MARINE ALGALTOXKIT

Etapy biotestu:

- inkubacja okrzemek (20°C, oświetlenie 3000-4000 lux) przez okres 3 dni;
- przenoszenie organizmów do badanych próbek;
- inkubacja próbek z okrzemkami;
- spektrofotometryczne pomiary gęstości optycznej zawiesiny glonów i obliczenie hamowania ich wzrostu w stosunku do kontroli w każdym z 3 dni trwania testu (po 24, 48 i 72 h);
- obliczenie końcowego 72h-EC50 (%)
- każdorazowe sprawdzanie kryteriów testu;
- sprawdzenie prawidłowości wykonania procedury testowej - test referencyjny z toksycznym związkiem (dwuchromian potasu), którego wyniki były zgodne z wartościami podanymi dla tego testu przez producenta (24h-EC50 = 323-346 mg/l i 48h-EC50 = 188-220 mg/l).



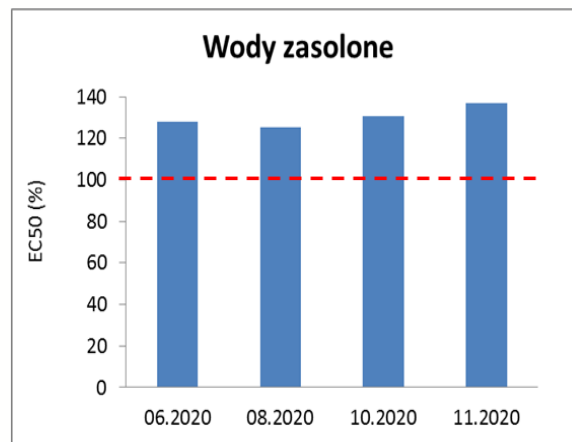
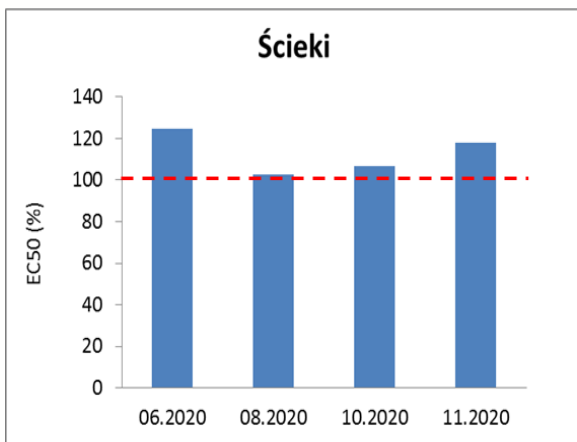
Inkubacja kuwet z okrzemkami, zawiesina „glony-roztwór toksyczny” i pomiary spektrofotometryczne.

3. MARINE ALGALTOXKIT

Wyniki testu:

Klasyfikacja ścieków według Persoone'a¹ (dla EC50 w testach biologicznych):

- gdy $EC50 < 1\%$ - ścieki są ekstremalnie toksyczne;
- gdy $1\% < EC50 < 10\%$ - ścieki są bardzo toksyczne;
- gdy $10\% < EC50 < 100\%$ - ścieki są toksyczne;
- gdy $EC50 > 100\%$ - ścieki są nietoksyczne.



- EC50 (teoretyczne wartości) $> 100\%$ we wszystkich badanych próbach;
- **Ścieki oczyszczone i wody zasolone, badane za pomocą Marine Algaltoxkit, są nietoksyczne wobec okrzemek.**

Wyniki testu *Marine Algaltoxkit* (EC50) i ocena toksyczności próbek.

¹Persoone i in., Final Report. Commission of the European Communities Contract ACE 89/BE 2/03, 1993, 600 str.

3. ALGALTOXKIT M

Porównanie z danymi literaturowymi:

Z przeglądu dostępnej literatury wynika, że badania toksyczności ścieków, odprowadzanych do południowego Bałtyku, za pomocą testu *Marine Algaltoxkit*, lub *Algaltoxkit F* (słodkowodne okrzemki *Selenastrum capricornutum*) nie były jak dotąd prowadzone. Nie ma więc możliwości porównania wyników toksyczności uzyskanych w niniejszych badaniach z danymi literaturowymi.



Wnioski z przeprowadzonych badań:

Przeprowadzone za pomocą biotestów *Microtox*, *Rotoxkit M* i *Marine Algaltoxkit* badania ekotoksykologiczne wykazały, że zarówno ścieki oczyszczone, jak i wody zasolone odprowadzane do wód Zatoki Puckiej, nie wykazują toksyczności względem badanych organizmów wskaźnikowych.

