

IV Krajowa Konferencja Bioindykacyjna

„Praktyczne wykorzystanie systemów bioindykacyjnych do oceny jakości i toksyczności środowiska i substancji chemicznych”

Olsztyn, 28-30 maja 2014

Streszczenia prezentacji

Organizatorzy



Gdański Uniwersytet Medyczny
Zakład Toksykologii Środowiska



Europejskie Regionalne Centrum
Ekohydrologii pod auspicjami UNESCO



Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olszynie
Katedra Toksykologii Środowiska
Katedra Fizjologii, Genetyki i Biotechnologii Roślin



TIGRET Sp. z o.o.

Patronat medialny



Odporność roślin na stresy środowiskowe

M. MARGAS, M. DOBIES, D. RYDZYŃSKI, A. ZIÓŁKOWSKA, A.I. PIOTROWICZ-CIEŚLAK

Katedra Fizjologii, Genetyki i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski
w Olsztynie, ul. Oczapowskiego 1 A, 10-719 Olsztyn

e-mail: acieslak@uwm.edu.pl

Słowa kluczowe: roślina, środowisko, stres abiotyczny

Streszczenie

Celem pracy jest omówienie mechanizmów odporności roślin na stresy środowiskowe. Rośliny w trakcie wzrostu i rozwoju narażone są na różnorodne stresy abiotyczne, wśród których wyróżnić możemy stresy termiczne, wodne, mineralne i wywołane promieniowaniem UW. Dodatkowo, rośliny są narażone na kłęski klimatyczne lub edaficzne tj. późne przymrozki, susza, powódź. Niektóre z tych czynników stresowych mogą znacznie się wahać w intensywności i czasie trwania. Mogą trwać przez kilka godzin, dni, pór roku lub lat, inne mogą zmienić się powoli i stopniowo. W odporności na stresy można wyróżnić wspólne dla wszystkich rodzajów stresu adaptacje roślin obejmujące akumulację białek stresowych (białka szoku termicznego, białka późnej embriogenezy, białka zapobiegające zamarzaniu, dehidryny itp.), akumulację substancji protekcyjnych (kriporrotektanów, osmolitów i antyutleniaczy) i zmiany w gospodarce hormonalnej roślin (ABA, etylen i kwas jasmonowy). Uniwersalnym mechanizmem ochrony tkanek roślinnych przed stresami jest akumulacja antyutleniaczy enzymatycznych i nieenzymatycznych, ponieważ każdemu stresowi działającemu nagle towarzyszy stres oksydacyjny i wybuch tlenowy. Przystosowanie do niekorzystnych warunków środowiska może mieć charakter adaptacji roślin poprzez dostosowanie struktur komórkowych i ich funkcji do przetrwania niekorzystnych czynników środowiska.

Odporność roślin na zanieczyszczenia środowiska wywołane przez człowieka (antropogeniczne) obejmuje przede wszystkim detoksykację SO₂, NO_x, ozonu i metali ciężkich. Mechanizm detoksykacji w roślinach zależy od stężenia metalu w glebie oraz od obecności innych jonów metali. Proces odporności obejmuje detoksykację pobranych metali przez ich usunięcie z miejsc aktywnych do nieaktywnych metabolicznie, zwiększenie syntezy białek wiążących metale (np. z grupami –SH i metalotioneiny) oraz zmianę kierunku procesów metabolicznych zapobiegające włączeniu metali ciężkich do przemian metabolicznych w komórce. Na podstawie właściwości chemicznych i fizycznych wyróżniono trzy mechanizmy molekularne toksyczności metali ciężkich: (a) wytwarzanie reaktywnych form tlenu przez samoutlenianie, (b) blokowanie grup funkcyjnych przez rtęć i kadm, (c) przemieszczenie jonów metali z boczastecek do wnętrza komórki roślinnej.

Toksyczność – a cóż to takiego?

G. NAŁĘCZ-JAWECKI

Zakład Badania Środowiska, Warszawski Uniwersytet Medyczny,
ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

Słowa kluczowe: toksykologia, ekotoksykologia, toksykologia środowiska, mechanizmy działania

Toksyny i substancje toksyczne towarzyszą ludzkości od wieków. Toksykologia (*gr. toxicon – trucizna, logos – nauka*) zajmowała się początkowo tylko działaniem na człowieka trucizn pochodzenia naturalnego: mineralnego, roślinnego i zwierzęcego. Obserwowano objawy zatruc, poznawano dawki konieczne do spowodowania śmierci, opracowywano odtrutki... Pierwsze prace z toksykologii eksperymentalnej (na zwierzętach) były prowadzone w XVIII wieku [1]. Wraz z nastaniem ery przemysłowej zainteresowanie badaczy przesunęło się na zanieczyszczenia przemysłowe, a także substancje syntetyczne. Powstały nowe działy toksykologii: toksykologia przemysłowa, a następnie – środowiskowa. Oprócz toksyczności ostrej zaczęto analizować toksyczność chroniczną ksenobiotyków.

Znacznie później badacze zwrócili uwagę na inne organizmy żywe – ekotoksykologia jako nauka powstała w połowie XX wieku, chociaż już w sto lat wcześniej badano toksyczność substancji chemicznych dla ryb [2]. Termin ekotoksykologia (*gr. oikos – dom, toxicon – trucizna, logos – nauka*) zaproponowany w 1969 roku przez grupę profesora Rene Truhaut integruje badaczy z różnych dyscyplin: chemii, biologii, biochemii, ekologii i in. Powstają pytania ile wiedzy z klasycznej toksykologii można przenieść do ekotoksykologii. Na ile człowiek jest istotą wyjątkową z toksykologicznego punktu widzenia.

Na wykładzie ukazane będą podstawowe mechanizmy działania toksycznego ksenobiotyków, głównie na poziomie komórki i organizmu, ale również populacji i ekosystemu [3]. Przedstawione będą przykłady substancji toksycznych oraz sposoby analizy ich aktywności biologicznej.

Piśmiennictwo

1. Seńczuk W. [red]. Toksykologia współczesna. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2006.
2. Blaise Ch., Ferrard J-F. [eds.]. Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology. Springer, 2014.
3. Rand GM. Fundamentals of Aquatic Toxicology. CRC Press, 1995.

Ekotoksykologiczna charakterystyka gleb narażonych na oddziaływanie zanieczyszczeń węglowodnorodnych z rejonu oddziaływania koksowni

A. KLIMKOWICZ-PAWLAS, B. SMRECIK, B. MALISZEWSKA-KORDYBACH, A. UKALSKA-JARUGA

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Gleboznawstwa Erozji i Ochrony Gruntów
ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy
e-mail: agnes@iung.pulawy.pl

Słowa kluczowe: zagrożenia gleb, zanieczyszczenia chemiczne, WWA, ekotoksyczność

Ochrona środowiska glebowego na obszarze Unii Europejskiej stała się w ostatnich latach zagadnieniem priorytetowym. Podstawowy dokument UE w zakresie ochrony gleb „Strategia tematyczna w dziedzinie ochrony gleby” (COM(2006) 231 final 2006) wskazuje na konieczność zachowania funkcji gleb oraz ich ochrony przed czynnikami powodującymi degradację środowiska glebowego. Wśród głównych zagrożeń dla prawidłowego funkcjonowania gleb zanieczyszczenia odgrywają istotną rolę. Przeważająca część zanieczyszczeń obecnych w środowisku pochodzi ze źródeł antropogenicznych takich jak: emisje przemysłowe, odpady z wydobycia rud metali, transport czy stosowanie osadów ściekowych i środków ochrony roślin w rolnictwie. Zanieczyszczenia emitowane do atmosfery są przenoszone na znaczne odległości i w końcowym etapie większość z nich gromadzi się w glebie, gdzie nawet w niskich stężeniach mogą powodować negatywne skutki nie tylko dla zdrowia człowieka, ale również dla wzrostu i rozwoju wielu grup organizmów żywych. Ocena zagrożeń związanych z zanieczyszczeniem gleb jest często przeprowadzana w oparciu o pomiar całkowitej zawartości związków. Jednak analizy chemiczne nie zawsze dostarczają informacji o szerokiej gamie substancji toksycznych i ich synergistycznych lub antagonistycznych interakcjach. Dlatego też, aby ocenić aktualne ryzyko związane z obecnością zanieczyszczeń analizy chemiczne muszą być uzupełniane o testy ekotoksykologiczne obejmujące organizmy należące do różnych grup troficznych.

Celem badań była ocena ekotoksyczności gleb narażonych na wieloletnie oddziaływanie emisji węglowodnorodnych. Badania przeprowadzono w południowo-zachodniej części Górnośląskiego Okręgu Przemysłowego na terenie zlokalizowanym w pobliżu działającej od 100 lat Koksowni Dębieńsko (woj. śląskie, powiat rybnicki). Na wytypowanym obszarze około 100 ha wyznaczono 25 punktów badawczych z uwzględnieniem zróżnicowania warunków glebowych oraz bezpośredniego wpływu lokalnych i transgranicznych źródeł emisji zanieczyszczeń. W materiale glebowym wykonano oznaczenia podstawowych właściwości fizykochemicznych i biologicznych oraz zawartości wybranych zanieczyszczeń (metale i WWA).

W celu szczegółowej charakterystyki ekotoksykologicznej zastosowano baterię testów: test hamowania emisji światła przez bakterie luminescencyjne (*Vibrio fischeri*) z wykorzystaniem systemu oceny toksyczności Microtox; test fitotoksyczności Phytotestkit pozwalający ocenić bezpośredni efekt oddziaływania związków chemicznych zawartych w roztworze glebowym na wzrost roślin; test Rapidtoxkit z wykorzystaniem skorupiaków *Thamnocephalus platyurus* oraz skriningowy test kiełkowania nasion sałaty (ISO 17126), oznaczanie oddychania indukowanego (ISO 14240-1) i potencjał nitryfikacji (ISO 15685).

Badania wykazały wzrost ekotoksyczności gleb na obszarze bezpośrednio narażonym na oddziaływanie zanieczyszczeń węglowodnorodnych. Obszar o podwyższonym ryzyku ekologicznym określono na podstawie wyznaczonych wskaźników toksyczności w oparciu o wyniki zastosowanych testów.

Badania były realizowane w ramach programu wieloletniego IUNG-PIB zadanie 1.2 „Ocena rolniczych i pozarolniczych zagrożeń dla środowiska glebowego oraz opracowanie sposobów usuwania lub ograniczania skutków degradacji gleb na obszarach wiejskich” oraz tematu statutowego 4.10 „Biodostępność i ekotoksykologiczne skutki oddziaływania trwałych zanieczyszczeń organicznych w glebach użytkowanych rolniczo”

Jakość ścieków oczyszczonych w obrazie parametrów chemicznych i wskaźników bioanalitycznych

W. RATAJCZYK¹, M. CIESZYŃSKA¹, L. WOLSKA^{1,2}

¹ Zakład Toksykologii Środowiska, Wydział Nauk o Zdrowiu z Oddziałem Pielęgniarstwa i Instytutem Medycyny Morskiej i Tropikalnej, Gdański Uniwersytet Medyczny, ul. Dębowa 23, 80-204 Gdańsk, tel. 58 349 19 37

² Katedra Chemii Analitycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, ul. G. Narutowicza 11/12. 80-952 Gdańsk

sinclair@gumed.edu.pl

Słowa kluczowe: ekotoksyczność, ścieki surowe, ścieki oczyszczone, mikrobiotesty

Kontrola jakości ścieków w Polsce opiera się na wskaźnikach fizyczno-chemicznych. Ścieki zrzucane z oczyszczalni stanowią mogą istotne zagrożenie dla środowiska, a zatem pośrednio również dla zdrowia człowieka. Jakość ścieków uwalnianych do środowiska charakteryzuje się dużą zmiennością składu i zróżnicowanym poziomem stężeń zanieczyszczeń. Stąd istnieje potrzeba wprowadzania i rozwijania skutecznych wskaźników pozwalających na oszacowanie całkowitego obciążenia próbki substancjami niebezpiecznymi. Metody te opierają się na badaniu odpowiedzi biologicznej organizmów ekspozowanych na badaną próbkę. W niniejszych badaniach jako miarę toksyczności próbki stosowano głównie wskaźnik wzrostu komórek, śmiertelność oraz spadek bioluminescencji.

W ramach realizowanej pracy badawczej poddano analizie próbki ścieków surowych, po I stopniu oczyszczania (mechanicznym) oraz oczyszczonych, po biologicznym etapie oczyszczania. Próbkę pobierane były w dwóch sezonach ciepłym oraz chłodnym/zimowym z oczyszczalni położonych na terenie Zatoki Gdańskiej. Zgodnie z założeniami pracy badawczej w pobieranych próbkach ścieków badano toksyczność wobec kilku organizmów testowych stosowanych w standardowych, komercyjnie dostępnych testach toksyczności ostrej i chronicznej. Próbkę ścieków surowych pobieranych z oczyszczalni ścieków dawały bardzo zróżnicowaną odpowiedź biologiczną w standardowych testach toksyczności ostrej i chronicznej. W każdym jednak przypadku takie same wyniki uzyskiwano dla ścieków po mechanicznym etapie oczyszczania ścieków. Świadczy to tym, że oczyszczanie mechaniczne nie usuwają związków odpowiedzialnych za toksyczność ścieków. Najsilniejszą odpowiedź biologiczną zaobserwowano w przypadku testów Thamnotoxkit F i Daphtoxkit F. Nierozcieńczone ścieki surowe dawały 100% efekt toksyczny powodując całkowitą śmiertelność organizmów testowych. Rozcieńczenie ścieków surowych o 50 % powodowało 100% śmiertelność skorupiaka *Thamnocephalus platyurus*. Na takie rozcieńczenie ścieków surowych różne reagowały skorupiaki *Daphnia magna* - od całkowitego braku odpowiedzi biologicznej do 100% efektu toksycznego. Przeprowadzone badania z zastosowaniem bakterii *Vibrio fischeri* wykazywały wysoką toksyczność ścieków dopływających do oczyszczalni oraz brak efektu toksycznego względem ścieków oczyszczonych. Zarówno w przypadku testów roślinnych (Phytotoxkit F) jak testów wykorzystujących małżoraczka *Heterocypris incongruens* (Ostracodtoxkit F) zaobserwowana odpowiedź biologiczna jest najniższa. Organizmy te wydają się być najmniej wrażliwe na zanieczyszczenia zawarte w ściekach surowych dostarczanych do oczyszczalni ścieków. Ponadto, zaobserwowano, iż substancje obecne w ściekach stymulują ich wzrost organizmów i ich rozwój. Może to wynikać z odżywczych właściwości ścieków, które dostarczając organizmom substancji biogenicznych są jednocześnie odpowiedzialne za eutrofizację, czyli nadmierny przyrost biomasy organizmów i zubożenie środowiska wodnego w tlen rozpuszczony.

Wszystkie próbki ścieków oczyszczonych, w dowolnych rozcieńczeniach, nie były toksyczne wobec wszystkich zastosowanych organizmów testowych, co wskazuje na to, że proces oczyszczania ścieków w badanych oczyszczalniach prowadzi skutecznie do usunięcia substancji odpowiedzialnych za wysoką toksyczność ścieków dla środowiska i występujących w nim organizmów. Działanie oczyszczalni ścieków prowadzi zatem do całkowitego usunięcia ładunku toksyczności ścieków zrzucanych przez oczyszczalnię do wód powierzchniowych. Jedynie w przypadku testu wykrywania obecności substancji aktywnych hormonalnie YES/YAS uzyskano wynik pozytywny, co wskazuje na obecność tych substancji w ściekach oczyszczonych i niską wydajność ich usuwania w procesie oczyszczania ścieków.

Zastosowanie testów toksyczności ostrej do szybkiej oceny stanu środowiska w praktyce WIOŚ Katowice

WALDEMAR DUDA

Wojewódzki Inspektorat Ochrony Środowiska w Katowicach
Pracownia Analiz Manualnych, Instrumentalnych, Hydrobiologicznych
oraz Pomiarów Terenowych i Pobierania Próbek
ul. Rząsawska 24/28, 42-200 Częstochowa
wduda@katowice.pios.gov.pl

Słowa kluczowe: ochrona środowiska, testy toksyczności, pomiar ATP, Vibrio fischeri, Thamnocephalus platyurus.

Zespół Analiz Hydrobiologicznych Pracowni w Częstochowie (Laboratorium WIOŚ w Katowicach) wykonuje testy toksyczności ostrej w celu oceny stanu środowiska, szczególnie w sytuacjach rozpoznawania zagrożenia podczas wystąpienia zatruć środowiskowych. Takie sytuacje wymagają szybkiego zbadania zagrożonego środowiska, aby w razie potwierdzenia zatrucia móc podjąć działania zaradcze, polegające na przykład na zapobieganiu rozprzestrzeniania się szkodliwych substancji oraz usunięciu ich z miejsca zdarzenia. Badania biologiczne w postaci testów toksyczności są w takich sytuacjach cennym uzupełnieniem metod chemii analitycznej, ponieważ bezpośrednio wskazują na możliwość zagrożenia dla organizmów żywych, w tym również dla ludzi oraz umożliwiają kompleksową ocenę toksyczności wszystkich składników badanego środowiska.

Testy są wykonywane za pomocą gotowych, możliwych do szybkiego użycia zestawów organizmów. Pierwszym, stosowanym już od wielu lat testem jest RAPIDTOXKIT – test na ożywianych z jaj przetrwalnikowych larwach skorupiaka *Thamnocephalus platyurus*. Jest to test na zahamowanie przyjmowania pokarmu, w przypadku wystąpienia substancji szkodliwej w próbce. Jest to test bardzo miarodajny dla oceny toksyczności w stosunku do kręgowców, a więc dla ryb oraz potencjalnie również dla ludzi.

Obecnie stosowany jest dodatkowo zestaw testu bakteryjnego TOXI-SCREENING, przy użyciu bakterii *Vibrio fischeri* (dawna nazwa: *Photobacterium phosphoreum*). Są to tzw. bakterie luminescencyjne, czyli świecące. Światło powstaje podczas procesów przemiany materii w komórkach tych bakterii. Dlatego mierząc za pomocą fotometru intensywność tego świecenia, możemy ocenić ewentualne wystąpienie spadku luminescencji w stosunku do próbki kontrolnej, co wskazuje na wystąpienie w próbce substancji toksycznej.

Dodatkowo, miernik ten umożliwia szybkie oszacowanie ilości biomasy w badanej próbce – test ATP BACTERIAL CONTAMINATION SCREENING. Dzięki temu można stwierdzić, czy ilość biomasy mieści się w zakresach typowych dla środowiska naturalnego, czy jest podwyższona z powodu na przykład przedostania się do badanej wody ścieków wraz z obecnymi w nich mikroorganizmami, lub też przeciwnie – w wypadku stwierdzenia zerowej wartości biomasy w wodzie bądź glebie – stwierdzenie całkowitego zatrucia wszystkich organizmów. Test ten polega na pomiarze ilości charakterystycznych dla każdego żywego organizmu cząsteczek wysokoenergetycznego ATP podczas jego rozpadu, czemu towarzyszy uwalnianie fotonów, a więc świecenie.

Często najlepszy, najbardziej miarodajny wynik daje zastosowanie całego zestawu powyższych testów.

W praktycznej działalności Laboratorium WIOŚ w Katowicach - Pracownia Analiz w Częstochowie, testy te przyczyniły się już do oceny wielu wypadków zatruć środowiskowych. Opierając się na tych doświadczeniach, mogę stwierdzić, że stosowanie biotestów wykorzystujących kryptobiotyczne (przetrwalnikowe) formy organizmów testowych powinno być powszechną praktyką w działalności monitoringowej i ochroniarskiej.

Biotesty na makrofitach

G. NAŁĘCZ-JAWECKI

Zakład Badania Środowiska, Warszawski Uniwersytet Medyczny,
ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

Słowa kluczowe: Lemna, Spirodela, test chroniczny, zalecenia OECD

Rzęsa drobna *Lemna minor* oraz garbata *L. gibba* są od wielu lat stosowane w ekotoksykologii jako przedstawiciele pływających makrofitów. Są zalecane przez organizacje międzynarodowe w badaniach substancji chemicznych, przede wszystkim herbicydów (regulacja Unii Europejskiej Reg EC N 1107/2009). Klasyczny biotest *Lemna* jest 6-dniowym testem chronicznym opartym na obserwacji wzrostu roślin przez 7 dni [1]. Wzrost może być oceniany na podstawie pomiaru różnych parametrów, z których najczęściej stosowanymi są liczba frondów i ich powierzchnia. Pula obserwowanych reakcji testowych może być rozszerzona, ale, zgodnie z zaleceniami OECD oprócz analizy liczby frondów, przynajmniej jeden parametr powinien być mierzony: powierzchnia frondów, ich świeża bądź sucha masa. Test może być prowadzony w formie statycznej (bez wymiany wody) lub w układzie semi-statycznym z okresową wymianą badanych roztworów co 1-2 dni [2].

W ostatnich latach powstało wiele modyfikacji testu *Lemna* dotyczących zarówno warunków prowadzenia testu (naczyni testowych), jak i rozszerzenia puli mierzonych efektów testowych. W naszym laboratorium opracowaliśmy wersję miniaturową testu z zastosowaniem 6-dołkowych mikro płytek [3]. Oprócz morfologicznych parametrów oceny wzrostu roślin, analizujemy parametry biochemiczne – aktywność wybranych enzymów oksydacyjnych (katalazy i peroksydazy).

Z uwagi na wysoką zmienność roślin z rodzaju *Lemna* oraz występowanie wielu fenotypów, zalecane jest okresowe prowadzenie analiz toksyczności substancji standardowych, wg OECD – roztworów KCl oraz 3,5-dichlorofenolu.

Rośliny z rodzaju *Spirodela* są makrofitami charakteryzującymi się szybszym wzrostem od *Lemna*. Są jednak stosowane w ekotoksykologii znacznie rzadziej. Grupa prof. Guido Persoone opracowała i zwalidowała nowy Toxkit oparty na gatunku *S. polyrhiza*. Jak we wszystkich pakietach organizmy sprzedawane są w formie przetrwanej – co umożliwia rezygnację z prowadzenia hodowli organizmów.

W porównaniach międzylaboratoryjnych, które odbyły się na początku 2014 roku wzięło udział 57 laboratoriów z 22 krajów, z czego kilkanaście ośrodków z Polski. Świadczy to o dużym zainteresowaniu nowym biotestem. W prezentacji ukazane zostaną podobieństwa i różnice między testami opartymi na makrofitach *Lemna* i *Spirodela*, a także metody oceny reakcji testowych.

Piśmiennictwo

1. OECD 221. OECD guidelines for the testing of chemicals. *Lemna* sp. Growth Inhibition Test.
2. Brian RA., Johnson DJ., Richards SM., Sanderson H., Sibley PK., Solomon KR. 2004. Effects of 25 pharmaceutical compounds to *Lemna gibba* using a seven-day static-renewal test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(2):371-382.
3. Kaza M., Nałęcz-Jawecki G., Sawicki J. 2007. The toxicity of selected pharmaceutical to the aquatic plant *Lemna minor*. *Fresenius Environmental Bulletin*, 16(5):524-531.

Biegaczowate (Carabidae) jako bioindykatory stanu środowiska na przykładzie lasu świeżego.

BANUL R.¹, KOSEWSKA A.²

¹ Katedra Leśnictwa i Ekologii Lasu, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Pl. Łódzki 2, 10-727 Olsztyn.

E-mail: rafal.banul@uwm.edu.pl

² Katedra Fitopatologii i Entomologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, ul. Prawocheńskiego 17, 10-721 Olsztyn.

E-mail: a.kosewska@uwm.edu.pl

Słowa kluczowe: *zooindykacja, biegaczowate (Carabidae), las świeży*

Wykorzystanie organizmów żywych, podatnych na wszelkie zmiany w środowisku, jest głównym aspektem badań bioindykacyjnych stanu środowiska. Do takich organizmów wykazujących wysoką wrażliwość na działanie czynników zewnętrznych, zakłócających stan ich środowiska życia, należą chrząszcze z rodziny biegaczowatych (Col. Carabidae). Stanowią one nieodzowny element badań przyrodniczych nad wpływem na środowisko czynników abiotycznych, biotycznych, a także antropogenicznych.

Badania prowadzono na terenie Nadleśnictwa Wipsowo (płn-wsch Polska). Wybrano jeden typ siedliskowy lasu – las świeży. Głównym gatunkiem lasotwórczym jest buk (*Fagus sylvatica*) w wieku ok. 100 lat. Wytypowano trzy powierzchnie badawcze, na których założono po 10 pułapek Barbera, do których odławiano biegaczowate. Pułapki były usytuowane co 20 metrów.

W wyniku przeprowadzonych badań odłowiono 3731 osobników należących do 35 gatunków biegaczowatych. Wszystkie trzy obiekty badawcze były podobne do siebie pod względem składu gatunkowego Carabidae. Gatunkami dominującymi w badanym zgrupowaniu były: *Pterostichus niger*, *Carabus hortensis* i *Pterostichus oblongopunctatus*. Analiza ekologiczna odłowionych biegaczowatych wykazała przewagę nad innymi grupami leśnych Carabidae o jesiennym typie rozwoju i umiarkowanych hygropreferencjach, zarówno w aspekcie ilościowym, jak też w jakościowym. Struktura troficzna ukazała dominację dużych zoofagów w aspekcie ilościowym, natomiast w aspekcie jakościowym pojawiło się równie dużo biegaczowatych należących do średnich zoofagów.

Występowanie dużych leśnych biegaczowatych i ich przewaga nad pozostałymi grupami ekologicznymi świadczy o stabilności i dobrej kondycji badanych siedlisk.

Zastosowanie biosensorów komórkowych w ekotoksykologii sinic - badania wstępne

I. GAĞAŁA^a, D. JAROS^b, I. KARWACIAK^b, A. JASKULSKA^{a,c}, M. KOKOCIŃSKI^d, Ł. PUŁASKI^b, J. MANKIEWICZ-BOCZEK^{a,c}

^aEuropejskie Regionalne Centrum Ekohydrologii PAN, ul. Tylna 3, 90-364 Łódź, Polska

^bInstytut Biologii Medycznej PAN, ul. Lodowa 106, 93-232 Łódź, Polska

^cKatedra Ekologii Stosowanej, Wydział Biologii i Środowiska, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź, Polska

^dZakład Hydrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Adama Mickiewicza, ul. Umultowska 89,61 - 614 Poznań, Polska

e-mail: ilonagagala@erce.unesco.lodz.pl

Słowa kluczowe: ekstrakty sinicowe, mikrocystyny, aktywność biologiczna, biosensory komórkowe, geny reporterowe, immunotoksyczność

Toksyczne zakwity wody z udziałem sinic są problemem o zasięgu globalnym, związanym ze wzrostem emisji substancji biogennej do wód oraz antropogeniczną modyfikacją cykli biogeochemicznych. Dotychczas uwaga naukowców koncentrowała się na głównych, dobrze poznanych grupach toksyn sinicowych (hepato-, neuro- oraz cytotoxynach). Jednak nasze dotychczasowe wyniki oraz doniesienia literaturowe wskazują, że z pewnością nie są to jedyne aktywne biologicznie metabolity sinic, które mogą mieć niekorzystne działanie ekotoksykologiczne. Dlatego też głównym celem badań realizowanych m.in. w projekcie *Zastosowanie komórkowych biosensorów reporterowych w ekotoksykologii sinic: nowe „tarcze” dla bioaktywności* (NCN, UMO-2012/07/B/NZ8/03991) jest wykorzystanie innowacyjnego narzędzia analitycznego - biosensorów komórkowych - do identyfikacji na poziomie molekularnym bioaktywnych czynników produkowanych przez różne gatunki sinic tworzące zakwity wody. Hipoteza postawiona w oparciu o pilotażowe badania, zakłada, że w zakwicie sinicowym istnieją czynniki toksyczne, które przy odpowiednich warunkach mogą stwarzać dodatkowe lub nawet większe zagrożenie dla organizmów niż dotychczas znane grupy toksyn sinicowych.

Do wstępnych badań został wykorzystany materiał sinicowy pobrany ze Zbiornika Sulejowskiego oraz z jeziora Pniewskiego w roku 2013. Próbkę różniły się między sobą składem gatunkowym sinic. Łącznie porównywano trzy warianty próbek: 1) zakwit z *Microcystis aeruginosa* (90%) i *Pseudanabaena* sp. (10%); 2) zakwit z *M. aeruginosa* (79%), *Aphanizomenon flos-aque* (12%) i *Pseudanabaena* sp. (9%), oraz 3) zakwit z *Aphanizomenon gracile* (72%), *Cylindrospermopsis raciborskii* (16%) i *Chrysochloris bergii* (12%). Ponadto wykorzystano w badaniach hodowle *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 i *Aphanizomenon flos-aque* NIVA CYA 626 oraz standard mikrocystyny-LR. Jako biosensory komórkowe wykorzystano stabilnie zmodyfikowane genetycznie linie komórkowe, w których geny kodujące łatwe do oznaczenia białka receptorowe (w tym przypadku lucyferazę) znajdują się pod kontrolą regulatorowych sekwencji DNA. Wybrano biosensory komórkowe wrażliwe na aktywację ważnych z toksykologicznego punktu widzenia szlaków przekazywania sygnału związanych z czynnikami transkrypcyjnymi NFκB, Nrf2 oraz AhR. Komórki biosensorów współinkubowane były z w/w materiałem sinicowym lub standardem mikrocystyny-LR. W celu oceny aktywności biosensorów zastosowano odczyt luminometryczny.

Wstępne wyniki badań zmian aktywności transkrypcyjnej wybranych biosensorów komórkowych pokazały zróżnicowaną odpowiedź receptorów na działanie próbek środowiskowych oraz hodowli cyjanobakterii. Wstępne wyniki wskazują na możliwość oraz

potrzebę opracowania właściwego narzędzia, które w łatwy sposób pozwoli na ocenę kompleksowego zagrożenia dla środowiska ze strony złożonych mieszanin jakimi są zakwity sinicowe, bez potrzeby wydzielania z nich poszczególnych metabolitów oraz kompartmentów komórkowych.

Badania finansowane w ramach projektu NCN - UMO-2012/07/B/NZ8/03991 „*Zastosowanie komórkowych biosensorów reporterowych w ekotoksykologii sinic: nowe ‘tarcze’ dla bioaktywności*”

OVA i PDV – systemy do pomiaru i monitoringu metali w wodzie i glebie

A. WHITTAKER¹, G. PIETOWSKI²

¹ Modern Water Monitoring Ltd., Bramley House, The Guildway, Old Portsmouth Road, Guildford, Surrey GU3 1LR, UK

² TIGRET Sp. z o.o., ul. Warszawska 27, 02-495 Warszawa, Tel. 22 8670528

gp@tigret.eu

Słowa kluczowe: monitoring metali, voltametria.

Dopuszczalne poziomy stężenie metali w wodzie do spożycia i ściekach są określone w odpowiednich rozporządzeniach. Stosowane najczęściej metody laboratoryjne (ICP i AA) są kosztowne i nie pozwalają uzyskać wyniku w układzie on-line. Ze względu na koszty, możliwe oszczędności i wyniki w czasie rzeczywistym stosowane są również metody voltametryczne. Dostępne rozwiązania umożliwiają pomiar i monitoring metali w wodzie do spożycia, ściekach i glebie. Wykazują bardzo dużą (>90%) korelację wyników z metodami laboratoryjnymi, przy poziomach oznaczeń znacząco niższych niż limity określone w rozporządzeniach oraz dużą odporność na zakłócenia.

Dostępne są dwa systemy:

OVA

- system on-line 24/7
- niskie poziomy wykrywania (0,5 µg/l) – standardy WHO
- programowany dla różnych metali i próbek
- możliwość wpięcia w zakładowy system kontroli w celu sterowania dozowaniem koagulantów

PDV

- system przenośny i laboratoryjny
- szybkie wyniki na poziomie poniżej µg/l
- dla próbek wody i gleby

Przy zastosowaniu różnego typu elektrod systemy umożliwiają oznaczanie następujących metali: Ag, As, As (III), Au, Bi, Cd, Co, Cr, Cr (VI), Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Pd, Sb (III), Se (IV), Sn, Te, Tl, U, Zn.

Systemy mogą być stosowane w przemysle (korzyści: duże oszczędności w obszarze zużycia preparatów, natychmiast widoczne efekty, zmniejszenie ryzyka przekroczenia dopuszczalnych limitów, brak kar finansowych, ochrona marki, zmniejszenie zatrudnienia), monitoringu środowiska (korzyści: niskie poziomy detekcji – spełnia wymagania rozporządzeń, przenośny, możliwość analizy w odległych lokalizacjach, wykrywanie źródła skażenia i określanie obszaru skażenia, ochrona środowiska, ochrona zdrowia ludzi), badaniach naukowych (korzyści: prawdziwe wyniki na poziomach ppb lub sub-ppb, pełny zakres metali włączając metale rzadko występujące np. uran, niskie koszty, łatwa obsługa i szybkie wyniki, wspomaganie dla oceny ekotoksykologicznej).

Metody voltametryczne do pomiaru metali są ujęte w normach US EPA, DIN oraz metodach referencyjnych EU.

Badania antybakteryjnych bioszkieł z zastosowaniem testu Ames MPF

PIOTR JADCZYK*, BARBARA UMIŃSKA-WASILUK*,
JOANNA KARASŃ**, LIDIA CIOŁEK**

*Instytut Inżynierii Ochrony Środowiska, Politechnika Wrocławska,
ul. Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław

**Instytut Ceramiki i Materiałów Budowlanych,
ul. Postępu 9, 02-676 Warszawa

e-mail autora prezentującego: piotr.jadczyk@pwr.edu.pl

Słowa kluczowe: Salmonella typhimurium, genotoksyczność, mutagenność, test krótkoterminowy bioszkieł, srebro, periodontologia

Biotesty coraz powszechniej stosowane są w monitoringu zanieczyszczeń środowiska. Drugim ważnym kierunkiem badań z ich wykorzystaniem jest określanie niektórych właściwości nowych substancji, które w perspektywie mogą znaleźć zastosowanie w medycynie jako składniki produktów leczniczych albo wyroby medyczne np jako materiały alloplastyczne. Pozwala to uniknąć klinicznego zastosowania preparatów wykazujących np. genotoksyczność, a przez to chronić zdrowie pacjentów oraz zapobiec wprowadzaniu ich pozostałości do środowiska.

Badaniom biologicznym podlegają wszystkie opracowane biomateriały przewidywane do terapeutycznego zastosowania jako wyroby medyczne. Do tej grupy biomateriałów należą opracowane w ICiMB, z przeznaczeniem do zastosowań medycznych, bioszkieł aktywne przeciwbakteryjnie z uwagi na uwalnianie jonów srebra. Powodem podjęcia realizacji prac badawczych była potrzeba wprowadzenia do klinicznego stosowania nowych, bardziej wszechstronnych preparatów dla wypełniania ubytków kostnych z powodu powszechności występowania chorób przyzębia prowadzących do tworzenia kieszonek, recesji dziąsła i utraty kości. Agresywną postać choroby leczy się stosując antybiotykoterapię. W najbardziej zaawansowanej fazie konieczna jest natomiast regeneracja tkanki kostnej metodami chirurgicznymi. Obecnie do wypełniania ubytków kostnych w chorobach przyzębia stosuje się m.in. granule "Biogran" otrzymywane z bioaktywnego szkła opracowanego przez Hencha. "Biogran" wpływa na zwiększoną proliferację osteoblastów, ale nie oddziałuje antybakteryjnie.

Dlatego uznano, że celowe byłoby opracowanie sposobu wytwarzania bioszkieł do wypełniania ubytków kostnych w leczeniu chirurgicznym chorób przyzębia posiadających właściwości przeciwbakteryjne. Do wytworzenia nanoproszków o założonych właściwościach wybrano metodę syntezy zol-żel z uwagi na fakt, że materiały pochodzenia żelowego wykazują większą aktywność biologiczną, niż bioszkieł uzyskane metodą wysokotemperaturową.

W rezultacie przeprowadzonych prac wytworzono szereg bioszkieł aktywnych przeciwbakteryjnie, z których do badań genotoksyczności wytypowano trzy bioszkieł. zawierające w składzie srebro oddziałujące bakteriobójczo, które mogłyby znaleźć zastosowanie w leczeniu zaawansowanych chorób przyzębia i które należało poddać ocenie biologicznej.

Jednym z jej aspektów było określenie potencjalnej genotoksyczności otrzymanych bioszkieł z zastosowaniem mikropłytkowego testu Ames. Do tej fazy badań wytypowane zostały z uwagi na nietoksyczność i najwyższe działanie przeciwbakteryjne dwa bioszkieł glinokrzemianowe o symbolach Z-5 i Z-8 oraz jedno wapniowokrzemianowe o symbolu B-I.

Zgodnie z zaleceniami PN-EN ISO 10933-12 bioszkieł ekstrahowano w dimetylosulfotlenku (DMSO), wytrząsając (250 rpm) przez 72h w temperaturze 37°C.

Genotoksyczność badano mikropłytkowym testem Amesa firmy Xenometrix by Endotell. Próbkę wprowadzano do testu w postaci roztworów w DMSO o stężeniu 0,125-4,8 mg/ml. Organizmami testowymi były szczepy *Salmonella typhimurium* TA98 i TA100 nie posiadające zdolności wytwarzania histydyny. Szczep TA98 pozwala na wykrywanie mutacji zmiany fazy odczytu, szczep TA100 mutacji typu podstawiania par zasad. Wykonanie testu w dwóch wariantach: bez i z aktywacją metaboliczną frakcją S9 pozwoliło na wykrycie aktywności mutagenów bezpośrednich i pośrednich. Stosowana była 30% frakcja otrzymana z wątroby szczurów aktywowana Aroclorem 1254. Wynik uznawano za dodatni, gdy liczba rewertantów była co najmniej trzykrotnie większa niż w kontroli. Statystyczną istotność różnic badano jednostronnym testem t-Studenta przy $p=0,05$, obliczenia wykonywano za pomocą arkusza Excel dostarczonego przez producenta testu.

Bioszkiełko BI wykazywało aktywność mutagenną wobec szczepu TA100 z aktywacją metaboliczną frakcją S9 (liczba rewertantów do 3,9 razy większa niż w kontroli), nie wykazywało aktywności mutagennej wobec szczepu TA100 bez aktywacji metabolicznej ani wobec szczepu TA98 bez i z aktywacją metaboliczną. Pozwala to wnioskować, że bioszkiełko BI zawierało mutageny pośrednie powodujące powstawanie mutacji podstawiania par zasad na wykrywanie których pozwala szczep TA100. Nie zawierało ono mutagenów bezpośrednich powodujących powstawanie mutacji podstawiania par zasad ani mutagenów bezpośrednich i pośrednich powodujących powstawanie mutacji zmiany fazy odczytu, na wykrywanie których pozwala szczep TA98.

Z-5 i Z-8 nie wykazywały aktywności mutagennej wobec obu zastosowanych szczepów testowych *Salmonella typhimurium* bez i z aktywacją metaboliczną frakcją S9 w badanym zakresie stężeń. Pozwala to wnioskować, że bioszkiełka Z-5 i Z-8 nie zawierały mutagenów bezpośrednich ani pośrednich powodujących powstawanie mutacji zmiany fazy odczytu i podstawiania par zasad na wykrywanie których pozwalają szczepy *Salmonella typhimurium* TA 98 i TA 100. Uzyskane wyniki pozwoliły na rekomendowanie bioszkiełek Z-5 i Z-8 do dalszych badań poprzedzających ich kliniczne zastosowanie. Wyniki prezentowanych badań wraz z wynikami pozostałych badań biologicznych stanowią podstawę do przeprowadzenia badań klinicznych po uzyskaniu środków finansowych i zgody Komisji Bioetycznej.

Ocena genotoksyczności próbek pyłowych zanieczyszczeń powietrza przy pomocy testu *Salmonella* oraz Ames II

M.K. BEŁCIK, A. TRUSZ-ZDYBEK, K. PIEKARSKA
Instytut Inżynierii Ochrony Środowiska Politechniki Wrocławskiej,
pl. Grunwaldzki 9, 50-377 Wrocław
katarzyna.piekarska@pwr.edu.pl

Słowa kluczowe: genotoksyczność, test Ames II, test Salmonella, zanieczyszczenia pyłowe powietrza atmosferycznego, frakcja PM 2,5.

Wraz z rozwojem nowych technologii i działaniem człowieka, grupą społeczną narażoną na pyłowe zanieczyszczenia powietrza są już nie tylko osoby pracujące w zawodach ryzyka takich jak zakłady przemysłowe czy kopalnie gdzie występuje duże zapylenie powietrza. Coraz większym zagrożeniem staje się życie w regionach uprzemysłowionych ze względu na pył emitowany do atmosfery przez zakłady przemysłowe oraz transport samochodowy. Ponadto, dużym problemem, ze względu na brak kontroli, są nieorganizowane źródła emisji pyłów takie jak indywidualne piece węglowe w częściach miast niepodłączonych miejskiej sieci ciepłowniczej.

Wśród chorób wywoływanych przez narażenie na pyłowe zanieczyszczenia powietrza najczęściej wymienia się takie jak: alergie, problemy z układem oddechowym, w tym astmę, niedobór odporności, a w dalszej perspektywie także nowotwory. To z tego względu stężenie pyłów zawartych w powietrzu w wielu krajach jest stale monitorowane, a regulacje prawne określają dopuszczalne ich stężenie w powietrzu. W Polskim ustawodawstwie dokumentem, który określa dopuszczalne normy pyłu zawieszonego jest dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady Europy 2008/50/WE z dnia 21 maja 2008 roku w sprawie jakości powietrza i czystszej powietrza dla Europy. Obecnie pod kątem wpływu na nasze zdrowie ocenie podlega pył zawieszony PM 10, a więc taki, o cząstkach pyłu mniejszych bądź równych 10 μm oraz pył zawieszony frakcji PM 2,5 – o cząstkach pyłu mniejszych bądź równych 2,5 μm . Dyrektywa określa poziomy dopuszczalne dla pyłu frakcji PM 10 na 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ w okresie 24 godzinnym oraz 40 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ w roku. Dla frakcji PM 2,5 poziomy dopuszczalne zostały ustalone na 25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ rocznie do osiągnięcia do roku 2015 oraz 20 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ do roku 2020. Wartości te są jednak wyższe niż na przykład w Stanach Zjednoczonych, gdzie już od roku 2012 bezwzględnie wymagany jest poziom poniżej 15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ przy zaleceniu 15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$.

Obecnie standardowe metody badania jakości powietrza obejmują głównie pomiary stężenia pyłów. Ocenę stopnia zanieczyszczenia bada się także określając stężenie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych znajdujących się na liście U.S. EPA oraz porównanie ich wartości do wartości dopuszczalnych przepisami prawa. Działania te pozwalają jedynie na chwilową ocenę stanu środowiska. Analizy fizykochemiczne nie pozwalają bowiem na prognozowanie skutków jakie zaadsorbowane na poszczególnych frakcjach pyłu zawieszonego zanieczyszczenia wywołają u organizmów żywych stale narażonych na ich działanie. Do tej pory nie stosuje się standardowo żadnego typu badań mających na celu poznanie oddziaływania zanieczyszczeń zaadsorbowanych na pyłe zawieszonym na organizmy żywe.

Często stosowaną metodą w badaniach oceny mutagenności pyłów zawieszonych jest bakteryjny test *Salmonella*, zwany inaczej od nazwiska jego twórcy testem Ames. Inną alternatywą metodą w stosunku do klasycznej procedury testu *Salmonella* może być mikropłytkowy test Ames II assay. W teście tym wykorzystuje się zbiór sześciu szczepów TA7001-TA7006 (TA700x), powstałych na bazie szczepu testowego TA100, przydatnych w

badaniach nitro-WWA, często obecnych w pyłowych zanieczyszczeniach powietrza. Ponadto, zastosowanie mikrobiotestu w monitoringu zanieczyszczeń powietrza wiązałoby się z wieloma korzyściami takimi jak: zużycie mniejszej ilości badanej próbki, zmniejszenie pracochłonności wykonania, zmniejszenie ilości sterylnego szkła laboratoryjnego i skrócenia czasu trwania testu.

W pracy przedstawione zostaną wyniki badań oceny genotoksyczności pyłowych zanieczyszczeń powietrza frakcji PM 2,5 pobranych na terenie aglomeracji wrocławskiej w różnych sezonach roku 2012. Badania wykonywano w oparciu o standardowy test *Salmonella* oraz mikropłytkowy test Ames II przeprowadzany według standardowej procedury opisanej w Xenometrix AG, Switzerland zgodnej z wytycznymi OECD.

Praca wykonana w ramach grantu MNiSW Nr. N N523 612939 (2010-2013)

Wpływ lotnych związków organicznych na aktywność mitochondriów komórek płuc z linii A549

M. CHRANIUK^a, D. RITTER^b, J. KNEBEL^b, L. WOLSKA^a

a- Zakład Toksykologii Środowiska Wydział Nauk o Zdrowiu z Oddziałem Pielęgniarstwa i Instytutem Medycyny Morskiej i Tropikalnej, Gdański Uniwersytet Medyczny, ul. Dębowa 23, 80-204 Gdańsk, Polska

b- Fraunhofer Institut Toxikologie und Experimentelle Medizin, In vitro und Mechanistische Toxikologie, Nikolai-Fuchs-Str. 1, D-30625 Hanover, Niemcy
e-mail: milenachraniuk@gumed.edu.pl

Wstęp

Lotne związki organiczne (LZO) emitowane przez przemysł, transport oraz materiały budowlane i wyposażeniowe mogą znacząco wpływać na płuca człowieka. By określić niekorzystny wpływ tych związków na układ oddechowy coraz częściej wykonuje się eksperymenty z wykorzystaniem komórkowych modeli płuc. By model jak najbardziej odzwierciedlał warunki panujące w układzie oddechowym konieczne jest zastosowanie odpowiedniej linii komórkowej oraz przeprowadzenie ekspozycji na związek w układzie ALI (Air-Liquid-Interface). Układy tego typu zapewniają narażanym komórkom dostęp do pożywki od strony bazalnej oraz kontakt z badanym związkiem od strony apikalnej. Celem pracy jest opisanie toksycznego wpływu lotnych związków organicznych na mitochondria komórek z linii A549.

Metody

Komórki z linii A549 narażano na LZO: formaldehyd, styren lub toluen w systemie ALI PRIT[®]. Po zakończeniu ekspozycji przeprowadzony został test kolorymetryczny WST-1 mający na celu określenie aktywności mitochondriów komórek A549. Na bazie uzyskanych wyników wyznaczono krzywe dawka-odpowiedź.

Wyniki

Ekspozycja komórek A549 na formaldehyd powoduje spadek aktywności mitochondriów przy niskich dawkach związku. W przypadku styrenu i toluenu spadek aktywności mitochondriów można zaobserwować jedynie po narażeniu na stężenia znacznie wyższe od formaldehydu. Mieszanina formaldehydu i toluenu obniża aktywność mitochondriów komórek A549 przy stężeniach składników, które osobno nie wywołują efektów toksycznych.

Wnioski

Obniżenie aktywności mitochondriów jest jednym z objawów toksycznego wpływu LZO na komórki płuc. Dodatkowo ekspozycja na tego typu związki może skutkować innymi zmianami w funkcjonowaniu komórki np. podwyższoną ekspresją genów kodujących białka HSP. By dokładniej ocenić wpływ LZO na układ oddechowy człowieka konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań z oceną innych parametrów aktywności biologicznej po ekspozycji. Dodatkowo należy wziąć pod uwagę przeprowadzenie eksperymentów z udziałem linii komórek zdrowych np. NHBE lub BEAS-2B, które są lepszym modelem płuc niż nowotworowe komórki A549.