

PRZEGLĄD WYBRANYCH BIOLOGICZNYCH METOD OCENY STANU ŚRODOWISKA NATURALNEGO

Monika Beata Jakubus¹, Natalia Tatuśko¹

¹ Katedra Gleboznawstwa i Ochrony Gruntów, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Szydlowska 50, 60-656 Poznań, e-mail: monja@up.poznan.pl; tatusko.natalia@wp.pl

STRESZCZENIE

Efektom działalności człowieka są między innymi trafiające do środowiska ksenobiotyki. Szczególnie zanieczyszczenie gleb prowadzi do ich degradacji, co ostatecznie może wiązać się z zachwianiem równowagi biologicznej danego ekosystemu. Standardowo do oceny stanu środowiska glebowego wykorzystuje się chemiczne metody, które nie zawsze są szybkie i tanie. W związku z tym, praktyka oraz nauka przy monitoringu środowiska coraz częściej sięga po metody biologiczne, które w większości spełniają takie warunki, stając się uzupełnieniem rutynowej praktyki laboratoryjnej. Niniejsza praca prezentuje przegląd powszechnie wykorzystywanych, wybranych metod biologicznych służących do oszacowania jakości środowiska glebowego. W pierwszej części artykułu omówiono biomonitoring jako pierwszy etap kontroli polegający na obserwacji organizmów wskaźnikowych. W kolejnej części skupiono się na biotestach, wskazując ich większe bądź mniejsze zastosowanie potwierdzone literaturą przedmiotu. Szczególna uwaga auterek pracy została zwrócona na fitotesty oraz testy wykorzystujące bezkręgowce.

Słowa kluczowe: metody biologiczne, biomonitoring, biotesty, organizmy wskaźnikowe.

REVIEW OF SELECTED BIOLOGICAL METHODS OF ASSESSING THE QUALITY OF NATURAL ENVIRONMENT

Abstract

The xenobiotics introduced into the environment are the effect of human activities. It is especially soil contamination that leads to degradation of soils, which may finally be referred to the biological imbalance of the ecosystem. Normally chemical methods are used for the assessment of soil's quality. Unfortunately, they are not always quick and inexpensive. Therefore, the practice and the science at environmental monitoring more frequently employ biological methods. Most of them meet the above mentioned conditions and become a supplement of routine laboratory practices. This publication shows an overview of selected common biological methods used to estimate the quality of the environment. The first part of the paper presents biomonitoring as a first step of environmental control which relies on the observation of indicator organisms. The next section was dedicated to the bioassays, indicating the greater or lesser practical applications confirmed by literature on the subject. Particular attention has been focused on phytotests and the tests based on the invertebrates.

Keywords: biological methods, biomonitoring, biotests, indicator organisms.

WPROWADZENIE

Intensywny rozwój przemysłu, chemizacja rolnictwa oraz wzrost liczby ludności na świecie wywierają coraz większe, negatywne oddziaływanie na środowisko przyrodnicze, czego efektem jest między innymi zwiększona koncentracja ksenobiotyków. Należy to uznać za dalece niekorzystne zjawisko, ponieważ przekroczenie

progu dopuszczalnej granicy skażenia środowiska i zachwianie homeostazy może doprowadzić do nieodwracalnych zmian prowadzących do degradacji ekosystemów i zagrożeń dla zdrowia ludzi i zwierząt. W tym kontekście szczególną rolę odgrywa gleba, będąca otwartym systemem, współuczestniczącym w aktywnej wymianie energii i materii z otaczającymi ją atmosferą, biosferą, hydrosferą oraz litosferą. Następujący przepływ

między wymienionymi elementami otaczającego nas świata dotyczy wszystkich substancji, zarówno tych potrzebnych do życia, jak i szkodliwie na nie działających. Gleba z uwagi na swoje wyjątkowe właściwości sorpcyjne i buforowe stanowi swoisty filtr, który w zależności od dostarczonego ładunku zanieczyszczeń może w mniejszym zakresie spełniać swoje ochronne zadanie. W związku z tym, niezbędna jest systematyczna kontrola stanu środowiska glebowego, co w praktyce rutynowo wykonuje się stosując bogatą gamę mniej lub bardziej wyrafinowanych metod chemicznych. Pomimo, że wykorzystywane współcześnie techniki laboratoryjne umożliwiają określenie aktualnego stanu skażenia, to jednak nie pozwalają na uzyskanie informacji dotyczących skutków oddziaływania zanieczyszczeń na organizmy żywe. W tym przypadku, jak podają Augustynowicz i in. [2014] dodatkową barierę stanowi brak wiedzy na temat ewentualnych przemian wprowadzonej do środowiska substancji i oddziaływania nowo powstałych produktów na różne elementy biotopu. Wobec tego Jakubus [2012] uważa, że metody biologiczne wykorzystujące biotesty są cennym i pomocnym uzupełnieniem chemicznych technik oceny jakości środowiska. Tym bardziej, że metody biologiczne należą do czułych, stosunkowo niedrogich i szybkich metod oceny stanu danego ekosystemu. Według Traczewskiej [2011] biologiczne techniki mogą być podzielone na dwie grupy obejmujące biomonitoring oraz biotesty.

Biomonitoring polega na mierzeniu odpowiedzi organizmów na zmiany zachodzące w środowisku. Organizmy te zwane bioindykatorami (biowskaźnikami) stanowią materiał badawczy w oparciu, o który prowadzone są obserwacje. Na podstawie zgromadzonych danych dokonuje się ilościowej i jakościowej syntezy, która pozwala na ocenę stanu środowiska wraz z jego komponentami. Zdaniem Kruszyka i Wojciechowskiego [2014] monitoring ma za zadanie zebrać informacje na temat stanu zanieczyszczenia poszczególnych elementów przyrody oraz przewidywać prawdopodobieństwo wystąpienia negatywnych następstw.

Reakcja bioindykatorów na pojawienie się zanieczyszczenia w środowisku może być skrajnie różna. Dlatego podzielono je na dwie grupy. Do pierwszej grupy zaliczane są organizmy, które pojawiają się w siedlisku skażonym daną substancją i są charakterystyczne dla tego zanieczyszczenia. Drugą grupę stanowią gatunki wrażliwe na określony czynnik, które naturalnie występują na

określonym terenie, jednak przy obecności danej substancji toksycznej znikają z siedliska.

Ważną rolę w biomonitoringu pełnią także organizmy, które kumulują w swoich tkankach substancje toksyczne. Reakcją na taki czynnik środowiska jest różny stopień uszkodzenia organów. Jak podaje Matwiejuk [2014] zmiany na poziomie biochemicznym, immunologicznym oraz genetycznym można określić przy pomocy biomarkerów. Z uwagi na podstawową rolę w ocenie stanu środowiska, biowskaźniki muszą spełniać szereg kryteriów. Przede wszystkim powinny charakteryzować się rzadkim występowaniem w przyrodzie, określonym zakresem tolerancji na bodźce i wysoką wrażliwością na mały stopień zanieczyszczenia. Ponadto należy dążyć do tego, aby wybrany gatunek w stosunkowo krótkim czasie wyraźnie informował o zanieczyszczeniu. Łatwość hodowli oraz obróbki analitycznej przemawia za wyborem takich organizmów, choć jak dodają Piontek i in. [2012] znajomość rozwoju osobniczego oraz dynamika populacji jest dodatkowym atutem przy ich wyborze do celów biomonitoringu.

Biowskaźniki są przydatne zarówno podczas aktywnego bądź pasywnego monitoringu. Aktywny sposób polega na wyhodowaniu i wystandaryzowaniu bioindykatorów w laboratorium i umieszczeniu ich na określony czas w warunkach terenowych. Po zakończeniu ekspozycji ocenia się objawy reakcji lub mierzy poziom ksenobiotyków w organizmie. Z kolei biomonitoring pasywny odnosi się do badania reakcji na zanieczyszczenie organizmów żyjących w naturalnych warunkach danego ekosystemu.

Jak wcześniej wspomniano, ocenę stanu środowiska naturalnego można też prowadzić wykorzystując testy toksykologiczne, czyli biotesty, które według Klimkowicz-Pawlas i in. [2013] stanowią ważny element bioanalizy i biomonitoringu aktywnego. Poza wykazaniem obecności substancji toksycznej w środowisku, biotesty służą również do oceny poziomu ich szkodliwego oddziaływania na organizmy żywe. Ponadto pozwalają określić czas ekspozycji niezbędny do wywołania oddziaływania danej substancji chemicznej w badanym organizmie. Inną zaletą tego typu narzędzia jest ocena ryzyka wystąpienia negatywnego oddziaływania ksenobiotyków w danym organizmie. Ponadto jak dodaje Traczewska [2011] biotesty dają możliwość określenia poziomu dawki wywołującej efekt toksyczny oraz oszacowania wielkości skutków ekspozycji organizmu na daną substancję toksyczną.

Wśród biotestów wyróżnia się testy toksyczności ostrej (letalne) i chronicznej (subletalne). Za pomocą testów toksyczności ostrej można określić między innymi inhibicję wzrostu u glonów, śmiertelność u bezkręgowców, śmiertelność i utratę równowagi u ryb. W tym przypadku skutki śmiertelne w organizmach, poddanych działaniu substancji szkodliwej, zachodzą w krótkim czasie ekspozycji, zaledwie po 24 h do 96 h. W przypadku braku efektu letalnego dla 50% osobników testowych (EC_{50} , LC_{50} i LD_{50}), należy zastosować tzw. długotrwałe (chroniczne) testy toksyczności. Testy toksyczności chronicznej służą do oceny zmian aktywności fizjologicznej organizmów i całych populacji następujących pod wpływem niekorzystnych oddziaływań związków toksycznych. Badanie tego typu przeprowadza się w warunkach przedłużonej ekspozycji na mniejsze, niż śmiertelne dawki (LOEC(D), NOEC(D)) [Piontek i in. 2012]. Na podstawie uzyskanej zależności: dawka – odpowiedź możliwe jest wyznaczenie podstawowych wskaźników określających poziom toksyczności badanej substancji na organizmy.

Jak wynika z powyższego, biotesty mają za zadanie w krótkim czasie określić liczbę osobników w których stwierdzono reakcję na daną substancję bądź zareagowały na zakłócenie w środowisku. Aby dany organizm mógł być wykorzystany jako efektywny biotest musi spełniać szereg wymagań. Traczewska [2011] wyróżnia między innymi takie warunki jak:

- mało skomplikowana hodowla w warunkach laboratoryjnych, umożliwiająca pozyskanie odpowiedniej liczby osobników o właściwej jakości,
- duża łatwość pozyskania organizmów ze środowiska,
- powszechna wiedza o strukturze genetycznej organizmu i jego wrażliwości na różne klasy substancji toksycznych,
- wytypowany organizm o wysokiej wrażliwości powinien reprezentować dany gatunek lub gromadę, do której jest zaliczany, a ponadto musi być gatunkiem rodzimym, charakterystycznym dla badanego ekosystemu,
- organizmy testowe powinny podobnie reagować na dawkę bądź stężenie toksyny w różnych miejscach i przy określonym stopniu ekspozycji na zanieczyszczenia.

Jak podaje literatura [Kuczyńska i in. 2005, Jensen, Mesman 2006, Traczewska 2011] dobór metody zależy głównie od wyboru gatunku orga-

nizmu testowego. Ten z kolei określany jest na podstawie elementu środowiska, który ma podlegać ocenie. Zdaniem Krzyżaka [2013], aby przeprowadzić kompleksową ocenę jakości środowiska należy dokonać jej uwzględniając wszystkie elementy łańcucha pokarmowego. Przyjmując powyższe stwierdzenie za podstawową wykładnię, praktycznego znaczenia nabiera grupa biotestów. Wśród nich na szczególną uwagę zasługują te wykorzystujące rośliny, bakterie, pierwotniaki i skorupiaki.

TESTY WYKORZYSTUJĄCE BIOLUMINESCENCJĘ BAKTERII

Podstawą bioluminescencji jest emisja światła przez żywe organizmy. Proces ten zachodzi dzięki reakcji utleniania związku zwanego lucyferyną przez enzym – lucyferazę. W wyniku tej reakcji bakterie luminescencyjne wytwarzają światło, jako produkt uboczny swoich normalnych procesów metabolicznych. Z kolei w obecności związków wysoce szkodliwych, ich luminescencja zanika, co wiąże się z zaburzeniami procesów fizjologicznych bakterii. Wysoki stopień toksyczności determinuje zmniejszenie ilości światła emitowanego przez mikroorganizmy. Zdolność bakterii do luminescencji jest wykorzystywana do wykrywania w wodzie, glebie lub osadach dennych związków toksycznych i mutagennych. Najczęściej stosowanymi w tym celu gatunkami, są *Vibrio* i *Photorhabdus*, a w szczególności *Vibrio fischeri* i *Vibrio harveyi* [Pogorzelec, Piekarska 2013].

Obecnie wprowadzone zostały gotowe testy, które poza możliwością oceny toksyczności w krótkim czasie, zawierają bioindykatory pochodzące ze standardowych hodowli. Organizmy te mogą być długo przechowywane, a w razie potrzeby w krótkim czasie przygotowane do testu. Nałęcz-Jawecki i in. [2010] wśród najczęściej stosowanych testów opartych na zjawisku bioluminescencji bakterii wymieniają między innymi niemieckie – LUMISTox[®], ToxAlert i BioFixLumi, holenderski – ToxTracer, fiński – BioTox[™] oraz amerykańskie Microtox[®] i DeltaTox, z czego najbardziej powszechnym jest system Microtox[®].

Microtox[®] został wprowadzony na rynek w latach 70 i zawiera bakterie w postaci liofilizowanej. Jest to całkowicie biologiczna metoda służąca do pomiaru toksyczności ostrej, czyli silnego działania toksycznego występującego w krótkim

czasie od podania jednorazowej dawki ksenobiotyku. Umieszczone w płynie bakterie *Vibrio Fischeri* świecą ze stałą intensywnością przez okres 1–1,5 godzin. Średnie stężenie hamujące (EC50) określa się po 5, 15 lub 30 minutach, w stosunku do próby kontrolnej, a do pomiaru służy analizator w postaci fotometru Microtox [Wilk, Szalińska 2011]. Zdaniem Jensen i Mesman [2006] test ten znajduje również zastosowanie w ocenie toksyczności chronicznej. W tym przypadku czas ekspozycji bakterii na zanieczyszczenie wydłużony jest do 24 godzin. Zaletami stosowania tego typu biotestu, poza możliwością przechowywania bakterii przez rok jest łatwa obsługa systemu testowego, co nie wymaga przechodzenia specjalistycznego przeszkolenia ani posiadania doświadczenia w pracy z bioindykatorami. Ponadto Microtox® wykrywa przeszło 1300 związków chemicznych, a jego wrażliwość w większości przypadków jest porównywalna do wrażliwości organizmów wyższych, takich jak skorupiaki i ryby [Zima 2012]. Jak podaje literatura przedmiotu [Zima 2012, Baran, Tarnawski 2013, Jho i in. 2015, Oh i in. 2015] test Microtox® stosowany jest w szeroko rozumianej diagnostyce stanu środowiska dotyczącej oceny stopnia negatywnego wpływu zanieczyszczeń reprezentowanych przez bardzo bogatą gamę związków począwszy od WWA, PCB, substancji aktywnych herbicydów, pestycydów, środków wybuchowych, związków stosowanych w płuczkach wiertniczych, a skończywszy na metalach ciężkich. Na ogół cytowani autorzy pozytywnie oceniają wykorzystanie Microtox® w praktyce, choć jak twierdzą Wilk i Szalińska [2011] istnieją pewne ograniczenia przy stosowaniu omawianego testu, które mogą istotnie wpływać na jego wynik obarczony błędem. Zdaniem wspomnianych autorów związane jest to z hydrofobowym charakterem większości zanieczyszczeń organicznych, który utrudnia prawidłową procedurę analityczną. Niezależnie od tego Wilk i Szalińska [2011] uznają, że ze względu na łatwość użytkowania Microtox® jest

on przydatny do oceny toksyczności środowiska, szczególnie jako pierwszy wskaźnik informujący o obecności ksenobiotyków w badanym ekosystemie. Wobec pewnych, wykazanych powyżej, ograniczeń testu cytowani autorzy podkreślają zasadność zastosowania testów uzupełniających na innych organizmach, tak aby potwierdzić poprawność otrzymanych wyników.

TESTY TOKSYCZNOŚCI WYKORZYSTUJĄCE BEZKRĘGOWCE

Innym, dostępnym na rynku biotestem jest test toksyczności ostrej lub chronicznej Ostracodtoxkit z wykorzystaniem skorupiaków. Małżozorczki (młode skorupiaki) *Heterocypris incongruens* wystawione zostają na 6-dniowe działanie potencjalnie skażonych próbek gleby, osadów dennych lub wody. Następnie określa się zahamowanie ich wzrostu lub śmiertelność. Równoległe w ten sam sposób przeprowadza się próbę kontrolną z glebą niezanieczyszczoną. [Chodkowska, Chrzanowska 2010]. Jensen i Mesman [2006] w swojej publikacji, jako zalety stosowania tego biotestu wymieniają niską cenę, prostotę oraz krótki czas wykonania, przy jednocześnie satysfakcjonującej sprawdzalności. Potwierdzeniem skuteczności tej metody są badania przeprowadzone między innymi przez Steliga i in. [2009]. Autorzy wykorzystując *Heterocypris incongruens* stwierdzili znaczną toksyczność środowiska glebowego, czego efektem był 42–62% efekt letalny badanych organizmów. Jak wynika z tabeli 1, biotesty wykorzystujące bezkręgowce zostały dobrze opracowane i rozwinięte, a ich przydatność w praktyce jest porównywalna, co w szczególności dotyczy Ceriodaphtoxkit oraz Thamnotoxkit.

Są to 24-godzinne testy toksyczności ostrej, których istotą jest określenie wpływu zanieczyszczenia na przeżywalność skorupiaków. Testy te stanowią dla siebie alternatywę. Tham-

Tabela 1. Wybrane testy toksyczności wykorzystujące bezkręgowce [opracowanie własne na podstawie Jensen, Mesman 2006]

Table 1. Selected toxicity tests applying the invertebrates [own study based on Jensen, Mesman 2006]

Rodzaj testu	Organizm testowy	Typ testu	Czas	Reakcja testowa
Ceriodaphtoxkit	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	toksyczność ostra	po 24 h	śmiertelność
Thamnotoxkit	<i>Thamnocephalus platyurus</i>	toksyczność ostra	po 24 h	śmiertelność
Rotoxkit	<i>Brachionus calyciflorus</i>	toksyczność chroniczna	po 24 i 48 h	śmiertelność i reprodukcja
Protokkit	<i>Tetrahymena thermophila</i>	toksyczność chroniczna	po 24 h	zahamowanie wzrostu (pomiar biomasy)

notoxkit jest tańszą wersją testu Ceriodaphtoxkit [Arendarczyk i in. 2011]. Do mniej popularnych w zastosowaniu praktycznym należą testy wykorzystujące wrotki *Brachionus calyciflorus*, czyli Rotoxkit F. Oceniając stopień zahamowania wzrostu populacji testowej narażonej na działanie substancji przez 48 godzin inkubacji, można określić toksyczne działanie środowiska [Szczęsny 2012]. Ostatnim, najmniej poznanym testem zamieszczonym w tabeli 1 jest Protoxkit oparty o populację pierwotniaka *Tetrahymena thermophila*. Reakcją organizmów na toksyczność środowiska jest inhibicja wzrostu i pobierania pokarmu przez pierwotniaki, a jej miarą jest stopień mętności badanej próby mierzony spektrofotometrycznie. Jest to test chroniczny, który pozwala w ciągu 24 godzin ocenić wpływ badanej próbki na kilka pokoleń pierwotniaków [Sierosławska i in. 2008].

Wśród organizmów stanowiących pedofaunę, istotną rolę w ocenie skażenia środowiska stanowią dżdżownice głównie ze względu na ich powszechne występowanie w glebach, łatwość hodowli, stosunkowo krótki cykl reprodukcji oraz wysokie tempo życiowe. Z uwagi na te zalety dżdżownice mogą być wykorzystane w testach ekotoksykologicznych stanowiąc kolejny z poziomów łańcucha troficznego. Gatunkami reprezentatywnymi w badaniach są *Eisenia fetida* i *Eisenia Andrei* [Artuso i in. 2011]. Zgodnie z procedurami OECD oraz ISO, na dżdżownicach dopuszcza się przeprowadzanie testów toksyczności w trzech postaciach: badanie toksyczności ostrej [OECD 1984, PN-ISO 11268-1:1997], badanie rozmnażania dżdżownic [OECD 2004, PN-ISO 11268-2:2001] oraz wpływ zanieczyszczeń na dżdżownice w warunkach polowych [PN-ISO 11268-3:2003].

Do określenia toksyczności ostrej najczęściej wykorzystuje się dorosłe osobniki *Eisenia fetida* z dobrze rozwiniętym siodełkiem. Eksperyment prowadzony jest w szklanych pojemnikach w temperaturze 20 ± 2 °C i przy stałym natężeniu światła. Jako podłoże, do badań stosuje się sztucznie przygotowaną glebę o wilgotności w granicach 40–60% PPW oraz określonych parametrach (10% torfu, 20% glinki kaolinowej, 70% powietrznie suchego piasku kwarcowego oraz około 1% węgla wapnia) i zawierającą różne stężenia badanej substancji zanieczyszczającej. Aplikacji zanieczyszczenia dokonuje się jednorazowo, na początku doświadczenia. Badanie polega na oznaczeniu śmiertelności oraz stopnia

zahamowania przyrostu masy dorosłych dżdżownic po 7 i 14 dniach od założenia doświadczenia. Po tym czasie zawartość pojemników wysypuje się na tacę i dla każdego stężenia oblicza się liczbę żywych osobników. Otrzymane wyniki odnosi się do tych, uzyskanych dla kontroli prowadzonej w warunkach niezanieczyszczonych. Na tej podstawie określana jest toksyczność ostra związków pobieranych przez skórę oraz przewód pokarmowy organizmów doświadczalnych, a ich śmiertelność (LD_{50}/LC_{50}) podaje się w procentach. Jako wadę tego testu Traczewska [2011] podaje, że podczas eksperymentu organizmom nie podaje się pokarmu, co skutkuje zmniejszeniem ich masy ciała. Potwierdzeniem tego są wyniki doświadczenia przeprowadzonego przez Guziąłowską-Tic [2014], w którym autorka stwierdziła spadek masy ciała dżdżownic zarówno w badanym materiale (12,7% do 18,4%) jak i próbie kontrolnej (14,8%). Jednocześnie, nowsze wersje metody OECD, dopuszczają niewielkie dokarmianie dżdżownic, dostarczane do gleby w postaci krowiego lub końskiego obornika.

Inną metodą oceny wpływu skażenia gleby na organizmy, wykorzystującą *Eisenia fetida* i *Eisenia Andrei*, jest ta oparta o analizę rozmnażania dżdżownic. Eksperyment prowadzony jest w szklanych pojemnikach i przy utrzymaniu stałych parametrów doświadczenia, takich jak temperatura, natężenie światła oraz skład gleby. Do podłoża jednorazowo, na początku doświadczenia aplikuje się różne stężenia badanej substancji. W wyniku eksperymentu poza określeniem śmiertelności oraz stopnia zahamowania przyrostu masy dorosłych osobników ocenia się również stopień ich reprodukcji. Organizmy w trakcie trwania testu mogą otrzymywać pokarm w postaci płatów owsianych lub krowiego bądź końskiego obornika. Po pierwszych 4 tygodniach ocenia się ilość wytworzonych przez dżdżownice kokonów. Jednocześnie dokonuje się określenia śmiertelności i biomasy dorosłych osobników. Po kolejnych czterech tygodniach oblicza się ilość młodych osobników, które w tym czasie wylęgły się z kokonów a wyniki przedstawiane są jako LOEC i NOEC [Małachowska-Jutsz i in. 2012].

Gatunkiem równie często wykorzystywanym w testach toksyczności gleby jest skoczogonek *Folsomia Candida* lub *Folsomia fimetaria*. Organizmy te na zanieczyszczenie środowiska reagują obniżonym tempem reprodukcji, co ocenia się po ekspozycji na ksenobiotyk przez okres 3–4 tygodni.

TESTY TOKSYCZNOŚCI WYKORZYSTUJĄCE ROŚLINY LĄDOWE

Rośliny, przede wszystkim nasienne, powszechnie wykorzystywane są do określenia stopnia zanieczyszczenia gleb metalami ciężkimi, pestycydami czy WWA. Traczewska [2011] w szczegółowy sposób wymienia gatunki, wśród których najczęściej w praktyce wykorzystuje się rajgras, ryż, owies, pszenicę, rzepak, sałatę oraz pieprznicę siewną zwaną potocznie rzeżuchą. Ostatecznie wyróżnia się 11 różnych testów opartych na analizie toksycznego oddziaływania substancji na organizmy roślinne. Cytowana autorka uważa je za tanie i proste w użyciu. Do oceny zanieczyszczeń zalicza się kiełkowanie nasion, wzrost siewek oraz hamowanie wzrostu korzeni. Wzrost siewek polega na analizie fitotoksycznego działania zanieczyszczeń na rośliny będące w fazie kiełkowania nasion i rozwoju sadzonek [ASTM 1997, OECD 2003]. Obserwacji dokonuje się najczęściej przez pierwsze 28 dni od wystawienia próbek na działanie zanieczyszczeń. Następnie dokonuje się porównania badanych próbek z próbkami kontrolnymi, określa się ilość biomasy oraz pojawiające się negatywne objawy takie jak chloroza, śmiertelność, nienormalny rozwój i tym podobne.

Test wykorzystujący hamowanie wzrostu korzeni dotyczy porównania tempa wzrostu w próbce kontrolnej i potencjalnie zanieczyszczonej [PN-ISO 11269-1:1998]. W przypadku tego testu, według zaleceń ISO, najbardziej adekwatną rośliną jest jęczmień (*Hordeum vulgare* L.) [Traczewska 2011]. Testy te w badaniach naukowych wykorzystywane są do oceny wpływu toksycznych substancji organicznych oraz metali ciężkich na rośliny, jednak autorzy wskazują na ich przydatność jedynie w odniesieniu do największych stężeń [Skrzypik i in. 2009, Studzińska i Buszewski 2009, Arendarczyk i in. 2012, Pawłowska i in. 2013].

Wśród wymienionych powyżej fitotestów, test kiełkowania nasion i wydłużania korzeni ma ugruntowaną pozycję w badaniach naukowych, jak i praktyce. Zdaniem wielu autorów [Ko i in. 2008, Miaomiao i in. 2009, Gao i in. 2010] przemawia za tym wysoka czułość i szybkość wykonania tej metody. Zwyczajowo w tym celu wykorzystuje się nasiona pieprznicy siewnej (*Lepidium sativum*), które wysiewa się w ilości 10 sztuk na bibułę filtracyjną nasączoną badanym wyciągiem. Hodowlę prowadzi się przez 48 godzin w

ciemności w temperaturze 25 °C na płytkach Petriego. Po tym czasie dokonuje się obliczeń ilości skielkowanych nasion oraz mierzy się długość ich korzeni. Równolegle przeprowadza się kontrolę. Uzyskane dane pozwalają na obliczenie indeksu kiełkowania. Wskaźnik ten stanowi jeden z parametrów oceny dojrzałości kompostów [Gao i in. 2010, Jakubus 2012, Hase, Kawamura 2014]. Wraz z upływem czasu kompostowania substancji organicznych wartość indeksu wzrasta osiągając 90–210%, przy czym 110% jest wartością satysfakcjonującą [Ko i in. 2008, Miaomiao i in. 2009, Jakubus 2012]. Zmiany wartości indeksu kiełkowania są efektem rozkładu substancji hamujących kiełkowanie nasion rzeżuchy takich jak amoniak, niskocząsteczkowe kwasy organiczne czy sole metali. W badaniach gleboznawczych, w oparciu o uzyskane z fitotestów wyniki oblicza się wskaźniki wrażliwości roślin na metale ciężkie takie jak: tolerancji, bioakumulacji i translokacji. Dane te pozwalają określić zakres i stopień mobilności metali w środowisku glebowym, a co za tym idzie ich potencjalną szybkość włączania się do łańcuch pokarmowego.

Jak podaje Van der Vliet i in [2012] opisane wyżej – standardowe fitotesty są często czasochłonne. Dlatego też większą popularnością wśród badaczy cieszą się szybkie i zminiaturyzowane – mikrobiotesty takie jak Phytotoxkit™. W skład tego testu wchodzi dwie przezroczyste płytki testowe, między którymi umieszcza się nawilżoną do 100% PPW glebę. Na jej powierzchni, na sączku lokuje się nasiona. Kiełkowanie roślin odbywa się w ciemności przy temperaturze 25 °C. Następnie, po 3 dniach, wykonuje się rejestrację obrazu w formie cyfrowej. Na tej podstawie, dokonywana jest ilościowa ocena skielkowanych nasion i określana długość korzeni. Analizę przeprowadza się za pomocą specjalnego oprogramowania, które pozwala na określenie zahamowania kiełkowania i wzrostu korzeni roślin w badanej próbce gleby. Następnie porównuje się uzyskane wyniki dla badanej próby w stosunku do otrzymanych dla kontroli, którą stanowi gleba o wysokiej zawartości substancji organicznej. Gatunkami zalecanymi do wykonania tego testu są jednoliścienne sorgo (*Sorghum saccharatum*), dwuliścienne pieprznica siewna (*Lepidium sativum*) oraz gorczyca (*Sinapis alba*) [Suszek i in. 2012]. Według Van der Vliet'a i in. [2012] główną zaletą Phytotoxkit™, poza krótkim czasem i małymi kosztami wykonania, jest możliwość cyfrowej rejestracji wyników, a tym samym możli-

wość odsunięcia w czasie wykonania pomiarów. Dodatkowym atutem tego testu jest rejestracja obrazu w różnych okresach czasu trwania testu. Steliga i in. [2009] wykorzystali Phytotoxkit™ w swoich badaniach do określenia efektywności przeprowadzonych zabiegów bioremediacyjnych wykonanych na terenach zanieczyszczonych związkami ropopochodnymi. Pozytywną opinię na temat praktycznej przydatności omawianego testu prezentują wyniki badań Kalinowskiego i in. [2012] oraz Chrzanowskiej i in. [2013]. Cytowani autorzy oceniając fitotoksyczność bojowych środków trujących oraz odkażalników wojskowych poza standardowymi testami kiełkowania nasion i wydłużania korzeni w pracach posiłkowali się testem Phytotoxkit™, który został przez nich pozytywnie oceniony. Także praca Baran i Tarnawskiego [2013] dostarcza szeregu pozytywnych opinii na temat możliwości praktycznego wykorzystania Phytotoxkit™ oraz Microtox® w ocenie toksyczności osadów dennych.

Mnogość testów toksyczności wykorzystujących biologiczne matryce generuje różne na ich temat opinie. Jednak coraz częściej przeważa twierdzenie, że w celu uzyskania pełnego profilu fitotoksyczności substancji należy wykonać zarówno krótkie testy takie jak Phytotoxkit™ czy test kiełkowania nasion, jak i te dłuższe odnoszące się do wzrostu siewek [Obidoska, Hadam 2008]. Ponadto jak podają Arendarczyk i in. [2012] ocena ekotoksykologiczna danego elementu środowiska powinna obejmować badania z wykorzystaniem organizmów z różnych poziomów troficznych i grup systematycznych.

PODSUMOWANIE

Silne oddziaływanie człowieka na środowisko prowadzi do kumulacji zanieczyszczeń we wszystkich jego komponentach. Spośród nich eksponowane miejsce zajmuje gleba, stanowiąca ważny element łańcucha troficznego, z którego zanieczyszczenia łatwo ulegają włączeniu do łańcucha pokarmowego. W nawiązaniu do tego faktu, coraz częściej wskazuje się, że rutynowa kontrola ekosystemu, w tym także glebowego prowadzona metodami chemicznymi powinna być wspomagana i uzupełniana testami biologicznymi. Biotesty oraz biomonitoring stanowiące podstawowe techniki w bardziej czuły sposób reagują na zmiany w środowisku, ujawniając często długofalowe skutki takiego wpływu nie-

korzystnych czynników. W celu uzyskania pełnej i wiarygodnej odpowiedzi, biomonitoring powinien być pierwszym etapem kontroli, która polega na obserwacji wystąpienia potencjalnego skażenia substancją toksyczną w danym ekosystemie. Na podstawie obserwacji bioindykatorów można określić rodzaj substancji zanieczyszczającej. Z kolei biotesty pozwalają ocenić poziom skutków oddziaływania danego czynnika na organizmy żywe. Mając na uwadze złożoność problematyki należy prowadzić kompleksową analizę ekotoksykologiczną wykorzystującą organizmy wrażliwe na daną substancję, charakterystyczne dla różnych poziomów troficznych i grup systematycznych. Z uwagi na szeroką gamę substancji toksycznych wprowadzanych do środowiska oraz mnogość organizmów reagujących na tego typu niekorzystne zmiany, w ostatnich latach nastąpił gwałtowny rozwój różnych testów oferowanych w postaci gotowych, komercyjnych zestawów. Pomimo zasadności i celowości wprowadzania biologicznych metod do rutynowej analizy stanu środowiska naturalnego nie należy w bezkrytyczny sposób przyjmować uzyskanych na ich podstawie wyników. Pewien margines braku zaufania do nich związany jest z faktem, że większość, co szczególnie tyczy się fitotestów, nie ma standaryzacji, rośliny odznaczają się różnym tempem pobrania ksenobiotyków, natomiast w fazie siewki głównie pobierają składniki z nasion, a nie z testowanej matrycy środowiska. Te elementy, jak i prawdopodobieństwo zmian w bioróżnorodności badanej populacji organizmów wykorzystanych do testów mogą obniżyć jego czułość rezultatem czego jest niedoszacowanie ilości faktycznie przyswajalnej przez dany organizm. Prowadzi to do spekulacji, że biotesty nie odzwierciedlają realnych warunków, a jedynie te, w których były prowadzone badania. Biorąc te zastrzeżenia pod uwagę należy prace badawcze zogniskować nad dopracowaniem biotestów, tak aby wyniki uzyskane z ich pomocą stanowiły wiarygodne źródło informacji o analizowanej matrycy środowiska.

PIŚMIENNICTWO

1. Augustynowicz J., Tokarz K., Baran A., Płachno B.J. 2014. Phytoremediation of water polluted by thallium, cadmium, zinc, and lead with the use of macrophyte *Callitriche cophocarpa*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 66(4), 572–581.
2. Arendarczyk A., Zgórska A., Grabińska-Sota E. 2011. Toksyczność chlorku 1-heksylo-3-metylo-

- imidazoliowego względem wybranych organizmów wodnych. Inż. Ochr. Środow. 14, 137–143.
3. Arendarczyk A., Grabińska-Sota E., Zgórska A. 2012. Ocena toksycznego oddziaływania wybranej cieczy jonowej względem przedstawicieli flory i fauny. Inż. Ochr. Środow. 15(3), 225–236.
 4. Artuso N., Kennedy T.F., Connery J., Grant J., Schmidt O. 2011. Assessment of biosolids in earthworm choice tests with different species and soils. *Global Nest J.* 13 (3), 255.
 5. ASTM 1997. Standard Practice for Conducting Early Seedling Growth Tests. ASTM E 1598–94,
 6. Baran A., Tarnawski M. 2013. Phytotoxkit/Phytotest-kit and Microtox® as tools for toxicity assessment of sediments. *Ecotox. Environ. Safe.*, 98, 19–27.
 7. Chodkowska A., Chrzanowska A. 2010. Ocena ekotoksykologiczna gleb w sąsiedztwie składowiska odpadów w Łubnej. Warszawa 2010. *Rocz. Glebozn.*, LXI, nr 4, 105–112.
 8. Chrzanowska E., Kalinowski R., Brytan M. 2013. Determination of PNEC for selected decontaminants based on seed germination and vigor indexes of terrestrial plants. *Ochr. Środ. i Zasob. Natur.* 24, 1(55), 27–31.
 9. Gao M., Liang F., Yu A., Li B., Yang L. 2010. Evaluation of stability and maturity during forced-aeration composting of chicken manure and sawdust at different C/N ratio. *Chemosphere* 78, 614–619.
 10. Guziałowska-Tic J. 2014. Wybrane własności toksykologiczne i ekotoksykologiczne dodatku do spalania paliw ciekłych. *Chemik* 68(10), 831–836.
 11. Hase T., Kawamura, K. 2012. Germination test on Komatsuna (*Brassica rapa* var. *peruviridis*) seed using water extract from compost for evaluating compost maturity: evaluating criteria for germination and effects of cultivars on germination rate. *J. Mater. Cycles Waste Manage.* 14(4), 334–340.
 12. Jakubus M. 2012. Evaluation of compost by selected chemical and biological methods. *Fresen. Environ. Bull.* 21, 11a, 3464–3472.
 13. Jensen J., Mesman M. 2006. Ecological risk assessment of contaminated land. Decision support for site specific investigations. RIVM Report 711701047, 138.
 14. Jho E.H., Im J., Yang K., Kim Y.J., Nam K. 2015. Changes in soil toxicity by phosphate-aided soil washing: Effect of soil characteristics, chemical forms of arsenic, and cations in washing solutions. *Chemosphere* 119, 1399–1405.
 15. Kalinowski R., Chrzanowska E., Brytan M. 2011. Oddziaływanie bojowych środków trujących na rośliny wyższe w teście Phytotoxkit, Inż. Ochr. Środow. 14, 3, 245–255.
 16. Klimkowicz-Pawlas A., Maliszewska-Kordybach B., Smreczak B. 2013. Metody oceny ryzyka ekologicznego terenów narażonych na oddziaływanie zanieczyszczeń organicznych, *Studia i Raporty IUNG – BIP, Zeszyt* 35(9), 155–179.
 17. Ko H., Kim K., Kim H., Kim Ch., Umeda M. 2008. Evaluation of compost parameters and heavy metals contents in composts made from Animals manure. *Waste. Manage.* 28, 813–820.
 18. Kruszyk R., Wojciechowski M. 2014. System informatyczny Zintegrowanego Monitoringu Środowiska Przyrodniczego – architektura i funkcje systemu. *Monitoring Środowiska Przyrodniczego* 16, 11–20.
 19. Krzyżak J. 2013. Wspomagana fitostabilizacja metali ciężkich w glebach. Praca doktorska, Instytut Inżynierii Ochrony Środowiska, Politechnika Wroclawska 2013.
 20. Kuczyńska A., Wolska L., Namieśnik J. 2005. Application of biotests in environmental research. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 35(2), 135–154.
 21. Małachowska-Jutcz A., Janosz W., Rudek J. 2012. Toksyczność gleby zanieczyszczonej olejem silnikowym poddanej samooczyszczaniu oraz fitoremediacji. *Ochr. Śr.* 34(1), 15–20.
 22. Matwiejuk A. 2014. Monitoring środowiska z wykorzystaniem porostów. *EiŚ* 2(49), 271–287.
 23. Miaomiao H., Wenhong L., Xinqiang L., Donglei W., Guangming T. 2009. Effect of composting process on phytotoxicity and speciation of copper, zinc and lead in sewage sludge and swine manure. *Waste Manage.* 29, 590–597.
 24. Nałęcz-Jawecki G., Baran S., Mankiewicz-Boczek J., Niemirycz E., Wolska L., Knapik J., Piekarska K., Bartosiewicz M. 2010. The first Polish inter-laboratory comparison of the luminescent bacteria bioassay with three standard toxicants. *Environ. Prot. Eng.* 36(3), 95–102.
 25. Obidowska G., Hadam A. 2008. Phytotoxicity of composts produced from various urban wastes. *Ann. Warsaw Univ. Life Sci. – SGGW, Horticult. Landsc. Architect.* 29, 65–70.
 26. OECD. 1984. *Test No. 207: Earthworm, Acute Toxicity Tests*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris. DOI: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264070042-en>.
 27. OECD. 2003. Guideline for the testing of chemicals: Proposal for a new Guideline 227. Terrestrial Plant Test: Vegetative Vigour Test. DOI: http://www.biotechnologiebt.it/pdf_our_services/OECD227.pdf.
 28. OECD. 2004. *Test No. 222: Earthworm Reproduction Test (Eisenia fetida/Eisenia andrei)*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris. DOI: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264070325-en>.
 29. Oh S.Y., Yoon H.S., Jeong T.Y., Kim S.D. 2015. Evaluation of remediation processes for explo-

- sive-contaminated soils: kinetics and Microtox® bioassay. *J Chem Technol Biot.*, DOI: 10.1002/jctb.4658.
30. Pawłowska B., Biczak R., Bałczewski P. 2013. Fitotoksyczność kwasu 2, 2'-tiodioctowego w stosunku do wybranych roślin wyższych. *Inż. Ochr. Środow.* 16(4), 487–498.
 31. Piontek M., Walczak B., Czyżewska W., Lechów H. 2012. Miedź, kadm i cynk w pyłe drogowym miast oraz określenie toksyczności związków tych metali metodą biologiczną. *Kosmos* 61(3), 409–415.
 32. PN-ISO 11268-1: 1997, Jakość gleby. Wpływ zanieczyszczeń na dżdżownice (*Eisenia fetida*). Oznaczanie ostrej toksyczności z zastosowaniem sztucznego podłoża glebowego. DOI: <http://pzn.pkn.pl/kt/info/published/9000128854>
 33. PN-ISO 11269-1: 1998, Jakość gleby. Oznaczanie wpływu zanieczyszczeń na florę glebową. Metoda pomiaru hamowania wzrostu korzeni. DOI: <http://pzn.pkn.pl/kt/info/published/9000128854>
 34. PN-ISO 11268-2: 2001, Jakość gleby. Wpływ zanieczyszczeń na dżdżownice (*Eisenia fetida*). Oznaczanie wpływu na rozmnażanie. DOI: <http://pzn.pkn.pl/kt/info/published/9000128854>
 35. PN-ISO 11268-3: 2003, Jakość gleby. Wpływ zanieczyszczeń na dżdżownice. Część 3: Zasady oznaczania wpływu w warunkach polowych. DOI: <http://pzn.pkn.pl/kt/info/published/9000128854>
 36. Pogorzelec M., Piekarska K. 2013. Wykorzystanie bakterii bioluminescencyjnych do wykrywania substancji toksycznych i mutagennych w środowisku. *Interdyscyplinarne zagadnienia w inżynierii i ochronie środowiska*. Wrocław 2013. Tom 3, 524–528.
 37. Sierosławska A., Rymuszka A., Adamczyk A., Bownik A., Skowroński T. 2008. Ekotoksykologia w Ochronie Środowiska: Ocena toksyczności zakwitów sinic w zbiorniku hodowlanym w pobliżu Lublina, 361–366.
 38. Skrzypik A., Prażak R., Chrząstek M. 2009. Evaluation of seedling tolerance to aluminum in BC1 hybrids of (*Avena sativa* L. × *Avena fatua* L.) × *Avena sativa* L. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin* 252, 255–261.
 39. Steliga T., Kapusta P., Jakubowicz P. 2009. Ocena efektywności procesów bioremediacyjnych na podstawie testów toksykologicznych. *Wiertnictwo, Nafta, Gaz* 26, 555–566.
 40. Studzińska S., Buszewski B. 2009. Study of toxicity of imidazolium ionic liquids to watercress (*Lepidium sativum* L.), *Anal. Bioanal. Chem.* 393, 983–990.
 41. Suszek B., Klimkowicz-Pawlas A., Maliszewska-Kordybach B. 2012. Badania ekotoksykologiczne w zakresie stresu łączonego – wady i zalety metody PHYTOTOKKIT™. *Instytut Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa – PIB. Puławy 2012*, 16–18.
 42. Szczęśny Ł. 2012. Ocena toksyczności substancji promieniochronnych z wykorzystaniem testów na *Brachionus calyciflorus* (wrotki). *Rozprawa doktorska, Zakład Badania Środowiska, WUM*.
 43. Traczewska T.M. 2011. *Biologiczne metody oceny skażenia środowiska*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 2011.
 44. Van der Vliet L., Velicogna J., Princz J., Scroggins R. 2012. Phytotoxkit: a critical look at a rapid assessment tool. *Environ. Toxicol. Chem.* 31(2), 316–323.
 45. Wilk P., Szalińska E. 2011. Microtox jako narzędzie do oceny toksyczności osadów dennych. *Czasopismo Techniczne. Środowisko* 108, 247–263.
 46. Zima G. 2012. Wykorzystanie metod bioindykacji do oceny toksyczności środków chemicznych stosowanych w składach płuczek wiertniczych. *Nafta – Gaz* 2, 115–122.