

Joanna KALKA, Elżbieta GRABIŃSKA-SOTA, Korneliusz MIKSCH

Katedra Biotechnologii Środowiskowej

Politechnika Śląska

ul. Akademicka 2, 44-100 Gliwice

e-mail: jkalka@polsl.gliwice.pl, eggsota@polsl.gliwice.pl

SZACOWANIE ZAGROŻENIA ŚRODOWISKOWEGO

Streszczenie. *W pracy przedstawiono podstawowe pojęcia z zakresu ekotoksykologii. Omówiono znaczenie wskaźników określanych podczas badań toksykologicznych jak LC₅₀, EC₅₀, NOEC itp. Przedstawiono także ogólny algorytm procedury szacowania zagrożenia środowiskowego oraz metody określania stężenia nie wywołującego szkodliwych efektów w środowisku (PNEC). Wśród prezentowanych metod na szczególną uwagę zasługuje metoda Aldenberga i Sloba ze względu na najniższe prawdopodobieństwo przeszacowania wartości PNEC.*

ENVIRONMENTAL RISK ASSESSMENT

Summary. *Ecotoxicology is a relatively young science, and has a truly applied and interdisciplinary character. Its origin can be considered unique as compared to classical natural sciences. The motivation to undertake ecotoxicological research was based on the recognition that anthropogenic chemicals may affect nontarget organisms, populations and communities in unexpected, extended and in particular hazardous ways. As a result ecotoxicology has been developed. In the paper basic vocabulary within the domain of ecotoxicology was presented. It contains also accounts of current test strategies, test organisms as well as perspectives for an environmental risk assessment. It reviews also current methods to characterize and predict adverse effect on organisms.*

1. Wprowadzenie

Ocena ryzyka obecności ksenobiotyków w środowisku powiązana jest z toksykologią środowiska, czyli ekotoksykologią. Termin „ekotoksykologia” został wprowadzony w 1969 roku przez Truhautta i powstał ze złożenia słów „ekologia” i „toksykologia”. Wprowadzenie tego terminu odzwierciedlało rosnące zainteresowanie skutkami obecnymi w środowisku związków chemicznych dla organizmów innych niż człowiek (*Walker i in., 2002*). Ekotoksykologia zajmuje się badaniem toksycznego działania skażeń chemicznych i fizycznych na populacje występujące w ekosystemach oraz dróg przenoszenia tych skażeń, wzajemnych ich interakcji między sobą i środowiskiem (*Bezák-Mazur, 1999; Brandys, 1999*).

W ostatnich latach na świecie nastąpił znaczny rozwój tej dziedziny nauki, na co wskazuje istnienie wielu instytucji i placówek naukowych, prowadzących badania w tym

zakresie. Instytucje te określają i zalecają metodyki badawcze wraz z opracowaniem statystycznym wyników, a także ustalają kryteria oceny szkodliwości związków chemicznych w stosunku do organizmów bytujących w środowisku (Heger i in., 1995; Kańska i Łebkowska, 1994)

2. Bioindykatory – organizmy testowe

Do testowania stanu środowiska wykorzystuje się wiele wskaźników fizycznych i chemicznych. Najlepszą metodą badania jest stosowanie biologicznych wskaźników stopnia zanieczyszczenia środowiska, tzw. bioindykatorów.

Bioindykatorem może być układ żywy na różnym poziomie organizacji:

- układ enzymatyczny,
- hodowla komórkowa,
- pojedynczy organizm,
- populacja,
- czynniki biotyczne w ekosystemie,

jednak w ponad 90 % testów wykorzystuje się jako bioindykatory populację jednego gatunku organizmu testowego (Nałęcz-Jawecki i Sawicki, 1997).

Organizmy testowe powinny być:

- szeroko rozpowszechnione i pospolite,
- zdolne do szybkiej reprodukcji,
- wrażliwe na szerokie spektrum substancji biologicznie czynnych,
- łatwe do utrzymania w warunkach testowych,
- dostępne przez cały rok,
- wykazywać łatwe do oceny i interpretacji reakcje toksyczne (Nałęcz-Jawecki i Sawicki, 1997).

Różne organizmy żywe odmiennie reagują na działanie środków chemicznych, dlatego w testach toksyczności stosuje się organizmy należące do różnych gatunków, będące przedstawicielami łańcucha pokarmowego. Testy prowadzone są na populacjach roślinnych i zwierzęcych, a także populacjach mieszanych, najczęściej bakteryjnych (Łebkowska, 1998).

Jako bioindykatory w testach toksyczności najczęściej stosuje się (Kańska i Łebkowska, 1994; Łebkowska 1992; Łebkowska, 2001; Wiśniewski i Kowalewski; 2000):

- | | |
|--------------|---|
| bakterie | – z rodzaju <i>Pseudomonas</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Bacillus</i> , |
| grzyby | – z rodzaju <i>Candida</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> , |
| glony | – <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Raphidocelis subcapitata</i> , <i>Scenedesmus acutus</i> , |
| pierwotniaki | – <i>Spirostomum ambiquum</i> , <i>Vorticella microstoma</i> , <i>Paramecium caudatum</i> , |
| robaki | – wrotki <i>Brachionus calyciflorus</i> , |
| skorupiaki | – <i>Daphnia magna</i> , <i>Ceriodaphnia</i> sp., <i>Gammarus</i> sp., <i>Mysis</i> sp., <i>Asellus aquaticus</i> , <i>Hyaieia</i> sp., |
| owady | – <i>Ephemerella</i> sp., <i>Hydropsyche</i> sp., <i>Chironomus</i> sp., |
| mięczaki | – <i>Physa acuta</i> , <i>Dreissena polymorpha</i> , |
| ryby | – <i>Lebistes reticulatus</i> , <i>Brachydanio rerio</i> oraz ok. 150 gatunków, głównie łososiowatych. |

3. Wskaźniki toksyczności

Za miarę toksyczności związków przyjmuje się najczęściej następujące wskaźniki:

- LC_{50} (*Lethal Concentration*) – stężenie substancji toksycznej powodujące śmierć 50% organizmów danej populacji po ściśle określonym czasie ekspozycji.
- EC_{50} (*Effect Concentration*) – stężenie substancji toksycznej wywołujące określone efekty (np. unieruchomienie) u 50% organizmów danej populacji.
- IC_{50} (*Inhibition Concentration*) – stężenie substancji toksycznej powodujące 50 % hamowanie procesów fizjologicznych, np. wzrostu u organizmów danej populacji po ściśle określonym czasie ekspozycji.
- LD_{50} (*Lethal Dose*) – dawka, wyrażana w mg substancji toksycznej na kg masy ciała, określana w odniesieniu do organizmów stałocieplnych (ssaków), która po jednorazowym podaniu powoduje śmierć 50% osobników badanej grupy zwierząt laboratoryjnych.

Wyznacza się także najwyższe stężenie, nie powodujące zmian u organizmów – NOEC oraz najniższe, wywołujące efekty szkodliwe – LOEC (Rejmer, 1997; Brandys, 1999; Kooijman S., 1998; Łebkowska, 1992).

Badania toksykologiczne należy oceniać, biorąc pod uwagę trzy główne kryteria: koszt prowadzenia doświadczenia, czasochłonność i powtarzalność, czyli wiarygodność uzyskanych wyników. Dużą powtarzalność wyników dają testy ostre, ale często nie odzwierciedlają rzeczywistych oddziaływań związku na środowisko. Wierny obraz oddziaływań dają testy chroniczne, które jednak ze względu na wysokie koszty są rzadko stosowane (Łebkowska, 1998).

W ostatnich latach nastąpił rozwój tanich, szybkich testów typu Toxkit, Microtox, Lumistox, SOS Chromostest Kit, Fluotox, co spowodowało skrócenie i uproszczenie procedur badawczych z zachowaniem precyzji pomiarów i powtarzalności wyników badań. Dla potrzeb ekotoksykologii stosuje się także coraz częściej tzw. baterie testów, składające się z testów krótko czasowych i badań konwencjonalnych toksyczności ostrej (Kańska i Łebkowska, 1994; Łebkowska, 2001; Natęcz-Jawecki i Sawicki, 1997; Wiśniowska i in. 1999).

Metoda biotestów pozwala na:

- Ocenę zabójczego działania badanego związku na organizmy testowe. Są to tzw. testy letalne (testy toksyczności ostrej), informują one o ostrym oddziaływaniu substancji na organizmy na podstawie śmiertelności bioindykatorów po określonym czasie ekspozycji.
- Ocenę zaburzeń w podstawowych procesach metabolicznych u organizmów testowych, po określonym czasie kontaktu z trucizną. Są to tzw. testy fizjologiczne:
 - ✓ Testy toksyczności chronicznej, informujące o oddziaływaniu subletalnych stężeń substancji na zmiany w procesach fizjologicznych, metabolizm, reprodukcję i kumulację w tkankach i organach.
 - ✓ Testy wzrostowe, w których określa się hamowanie wzrostu bakterii, glonów, roślin wyższych, na podłożach z dodatkiem substancji toksycznej.

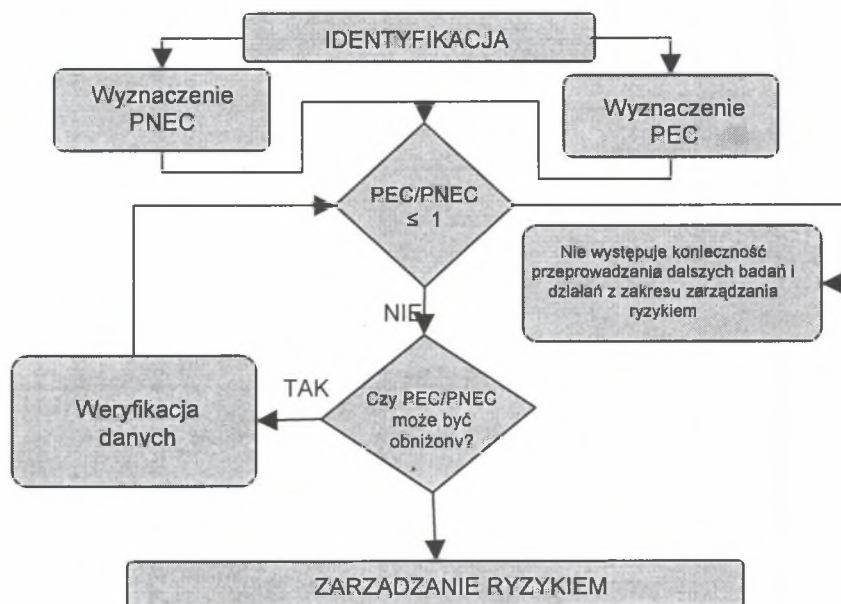
- ✓ Testy enzymatyczne, w których dokonuje się oceny hamowania aktywności określonego enzymu podczas zachodzącej reakcji biochemicznej u bioindykatorów.
- Ocenę genotoksycznego działania badanego związku na organizmy testowe; ocenia się oddziaływanie związków chemicznych na zmiany w kwasach nukleinowych.

4. Ocena ryzyka środowiskowego

Ocena zwana szacowaniem ryzyka jest procesem zmierzającym do określenia prawdopodobieństwa wystąpienia negatywnych skutków narażenia na daną substancję szkodliwą dla środowiska na podstawie danych o jej występowaniu i stosowaniu. Zarządzanie lub sterowanie ryzykiem jest procesem podejmowania decyzji, łączącym aspekty polityczne, socjalne, ekonomiczne oraz uwarunkowania techniczne z wynikami oceny ryzyka w celu wyboru optymalnych rozwiązań w przypadku występowania określonych zagrożeń (*Brandys, 1999*).

Na ocenę ryzyka środowiskowego składa się:

- szacowanie narażenia – określenie przewidywanego stężenia substancji w poszczególnych elementach środowiska (PEC – predicted environment concentration), które może wystąpić ze względu na jej produkcję, przetwarzanie, użycie i przechowywanie. PEC może być wyznaczone na podstawie stężeń oznaczanych w środowisku bądź w wyniku modelowania matematycznego;
- ocena efektu – w wyniku ekstrapolacji wartości uzyskanych w ostrych lub długoterminowych testach toksyczności otrzymuje się przewidywaną wartość stężenia, nie powodującą szkodliwych efektów w ekosystemie (PNEC – predicted no effect concentration);
- charakterystyka ryzyka – dla wszystkich elementów środowiska – wody, osadów, gleby i atmosfery porównuje się wartości PEC i PNEC. W wypadku, gdy $PEC > PNEC$, powinny zostać podjęte odpowiednie działania z zakresu zarządzania ryzykiem, które miałyby na celu zmniejszenie zagrożenia (*Ashlers i Diderich, 1998; Calow, 1998*).



Rys. 1. Algorytm procedury szacowania zagrożenia środowiskowego
 Fig. 1. Procedure of environmental risk assessment

Amerykańska Agencja Ochrony Środowiska (EPA) jako pierwsza wprowadziła obligatoryjne badania toksykologiczne do wyznaczania nowych lub zmiany istniejących standardów jakości wody, do oceny szkodliwości nowo produkowanych związków chemicznych, a w osobnych aktach pestycydów oraz leków i kosmetyków. Prowadzona jest także kontrola toksykologiczna jakości ścieków odprowadzanych do wód. W Unii Europejskiej i w Polsce przeprowadzanie jednogatunkowych testów toksykologicznych jest obowiązkowe podczas certyfikacji niektórych wyrobów przemysłowych (Załęska-Radziwiłł i Lebkowska, 2002).

Tablica 1

Współczynniki bezpieczeństwa wg. US EPA (Lebkowska i in., 1999)

Wartość współczynnika	Kryteria
1	znana wartość NOEC z testu chronicznego prowadzonego w warunkach polowych
10	znane wartości LC/EC ₅₀ ośmiu testów ostrych i NOEC trzech testów chronicznych prowadzonych w warunkach laboratoryjnych
100	znane wartości LC/EC ₅₀ przynajmniej z 3 testów prowadzonych w warunkach laboratoryjnych
1000	znana jest wartość LC/EC ₅₀ z jednego testu prowadzonego w warunkach laboratoryjnych

W metodzie obligatoryjnych współczynników bezpieczeństwa według EPA i OECD przyjmuje się zakres wartości współczynników odpowiednio 1-1000 i 10-1000 w zależności od liczby i rodzaju wykonanych testów. Do obliczenia stężenia bezpiecznego dla

biocenozy bierze się pod uwagę najniższe uzyskane wartości LC/EC₅₀ i NOEC, które są dzielone przez określony współczynnik bezpieczeństwa.

Tablica 2

Współczynniki bezpieczeństwa wg. OECD (*Roman i in.*, 1999)

Wartość współczynnika	Kryteria
10	znane wartości NOEC przynajmniej dla ryb, skorupiaków i glonów
100	znane wartości LC/EC ₅₀ przynajmniej dla ryb, skorupiaków i glonów
1000	znana jest wartość LC/EC ₅₀ z jednego testu prowadzonego w warunkach laboratoryjnych

Wszystkie modele statystyczne, na podstawie których wyznacza się wartości PNEC, oparte są na tych samych założeniach, iż rozkład wyników testów toksykologicznych jest zgodny z określonymi założeniami. Określone są parametry tego rozkładu, a następnie oszacowana zostaje wartość stężenia, przy której 95% gatunków jest chroniona. Pośród metod statystycznych najbardziej znana jest metoda Kooijmana i jej modyfikacja van Straalena i Dennemana oraz metoda Aldenberga i Sloba (1993).

Metoda Kooijmana zakłada, że wartości lnLC₅₀ są niezależnymi zmiennymi losowymi o rozkładzie logistycznym. Stężenie ryzykowne dla wrażliwych gatunków (HCS – hazardous concentration for sensitive species) wyznaczane jest następująco:

$$HCS = \frac{1}{T} \exp(\mu), \quad (1)$$

gdzie:

$$T = \exp\left[\frac{3d_m S_m C_n}{\pi^2}\right], \quad (2)$$

$$C_n = \ln \frac{(1 - \delta)^{1/n}}{1 - (1 - \delta)^{1/n}}, \quad (3)$$

μ – średnia arytmetyczna liczb x_i ,

x_i – ln(LC₅₀) dla gatunku i ,

T – współczynnik ekstrapolacji,

S_m – próbkowe odchylenie standardowe wartości x_i dla m testowanych gatunków,

C_n – stężenie niebezpieczne dla δ frakcji i gatunków,

m – liczba testowanych gatunków,

n – liczba gatunków zamieszkujących środowisko (np. 100, 1000),

δ – prawdopodobieństwo, że LC₅₀ najbardziej wrażliwego gatunku będzie niższe niż HCS, (zwykle przyjmuje się $\delta = 0,05$)

d_m – kwantyl rzędu $1 - \delta$ rozkładu zmiennej losowej S_m (taka liczba, że

prawdopodobieństwo, iż $S_m > d_m$ jest równe δ ; wartości odczytywane z tabel).

W metodzie van Straalena i Dennemana również zakłada się rozkład logistyczny, ale do obliczeń stosuje się wartość NOEC, a także nie jest określona liczba wrażliwych gatunków.

Wartość stężenia ryzykownego (HC_p – hazardous concentration) wyznacza się następująco:

$$HC_p = \frac{1}{T} \exp(\mu), \quad (4)$$

gdzie:

$$T = \exp\left[\frac{3d_m S_m}{\pi^2} \cdot \ln \frac{1-\delta}{\delta}\right] \quad (5)$$

p – procent gatunków nie chronionych przez HC_p ,

μ – średnia arytmetyczna wartości x_i ,

x_i – $\ln(\text{NOEC})$ dla gatunku i ,

T – współczynnik ekstrapolacji,

m – liczba testowanych gatunków,

S_m – próbkowe odchylenie standardowe wartości x_i dla m testowanych gatunków,

δ – prawdopodobieństwo przeszacowania wartości HC_p (zwykle przyjmuje się 0,05),

d_m – kwantyl rzędu $1-\delta$ rozkładu zmiennej losowej S_m (taka liczba, że prawdopodobieństwo, iż $S_m > d_m$ jest równe δ).

Metoda Aldenberga i Sloba zakłada logarytmiczny rozkład wartości NOEC. Zaproponowali oni wyznaczenie stężenia niebezpiecznego dla 5% gatunków (HC_5)

$$\log(HC_{5p\%}) = \text{średnia}(\log \text{NOEC}) - k_{p\%} \cdot \text{SD}(\log \text{NOEC}), \quad (6)$$

gdzie SD- odchylenie standardowe.

Wartości $k_{p\%}$ odczytuje się z tabel w zależności od ilości użytych w badaniach gatunków i poziomu istotności (Łebkowska i in., 1999).

Ekstrapolacja danych zawsze łączy się z niebezpieczeństwem „przeszacowania” wartości. Autorzy poszczególnych metod ekstrapolacji próbują się przed tym bronić dopasowując odpowiednie współczynniki. Rozwiązaniem tego problemu mają być metody probabilistyczne, za pomocą których możliwe będzie kompleksowe rozwiązywanie zagadnień z zakresu szacowania i zarządzania ryzykiem (Jager i in., 2001). Niemniej jednak nawet niedoskonałe metody i próby oceny zagrożenia środowiska stwarzają możliwości przeciwdziałania zagrożeniom.

Bibliografia

1. Aldenberg T., Slob W.: Confidence limits for hazardous concentrations based on logistically distributed NOEC toxicity data. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 25, 1993, 48-63.

2. Ashlars J., Diderich R.: Legislative perspective in ecological risk assessment. 841-868. W: Schüürmann G., Markert B. *Ecotoxicology: ecological fundamentals, chemical exposure and biological effects*. Wiley, New York 1998
3. Bezak-Mazur E.: *Elementy toksykologii środowiska*. Wydawnictwo Politechniki Świętokrzyskiej, Kielce 1999
4. Brandys J. (red.): *Toksykologia wybrane zagadnienia*. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Wyd. I, Kraków 1999
5. Calow P.: Ecological risk assessment: risk for what? how do we decide? *Ecotoxicology and Environmental Safety* 40, 1998, 15-18.
6. Heger W., Jung S-J., Martin S., Peter H.: Acute and prolonged toxicity to aquatic organisms of new and existing chemicals and pesticides. *Chemosphere* 31 (2), 1995, 2707-2726.
7. Jager T., Vermeire T.G., Rikken M.G.J., van der Poel P.: Opportunities for a probabilistic risk assessment of chemicals in the European Union. *Chemosphere* 43, 2001, 257-264
8. Kańska M., Łebkowska M. 1994. Badania toksykologiczne dla kontroli jakości wód. *Biotechnologia* 2 (25): 98-113.
9. Kooijman S. 1998. Process-oriented descriptions of toxic effects. 483-520. W: Schüürmann G., Markert B. *Ecotoxicology: ecological fundamentals, chemical exposure and biological effects*. Wiley, New York.
10. Łebkowska M.: Stan i perspektywy rozwoju metod badań toksyczności i biodegradacji. *Biotechnologia* 1 (16), 1992, 39-46.
11. Łebkowska M.: Toksykologia środowiska w ochronie wód powierzchniowych. Materiały IV Międzynarodowego Sympozjum „Forum Chemiczne”, Warszawa 1998
12. Łebkowska M., Załęska-Radziwiłł M., Słomczyńska B.: *Toksykologia środowiska*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 1999
13. Łebkowska M.: Ekotoksykologia w Polsce – stan i perspektywy. Materiały Sympozjum „Mikrobiotesty i ekotoksykologia”, Pszczyna 2001
14. Nałęcz-Jawecki G., Sawicki J.: Metody bioindykacyjne z wykorzystaniem kryptobiotycznych form organizmów. *Pestycydy* 3(4), 1997, 77-83.
15. Rejmer P.: *Podstawy ekotoksykologii*. Wydawnictwo Ekoinżynieria, Lublin 1997
16. Roman G., Isnard P., Jouany J.-M.: Critical analysis of methods for assessment of predicted no-effect concentration. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 43, 1999, 117-125.
17. Walter C.H., Hopkin S.P., Sibly R.M., Peakall D.B.: *Podstawy ekotoksykologii*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2002
18. Wiśniewski H., Kowalewski G.: *Ekologia z ochroną i kształtowaniem środowiska*. Wydawnictwo Agmen, Warszawa 2002
19. Wiśniowska E., Grabińska-Sota E., Kalka J.: Toksyczność kwasów fenoksyoctowych MCPA i 2,4-D oraz ich pochodnych dla różnych organizmów, *Inżynieria i Ochrona Środowiska* 2 (1), 1999, 83-98.
20. Załęska-Radziwiłł M., Łebkowska M.: Systemy zagrożenia środowiska wodnego. Materiały Konferencji „Mikrozanieczyszczenia w środowisku człowieka”. Wydawnictwo Politechniki Częstochowskiej, Seria Konferencje, 48,2002, 20-27.