

Piotr Jakubowicz, Teresa Steliga, Dorota Kluk
Instytut Nafty i Gazu, Oddział Krosno

Ocena zmian toksyczności ostrej wód złożowych z wykorzystaniem testów ekotoksykologicznych

Wprowadzenie

Wydobyciu gazu ziemnego i ropy naftowej przeważnie towarzyszy pozyskiwanie pewnych ilości wysoko zmineralizowanych wód złożowych zanieczyszczonych węglowodorami ropopochodnymi. Wprowadzane dodatkowo do wód złożowych w wyniku operacji technologicznych substancje są bardzo różnorodne, zarówno pod względem własności chemicznych, jak i fizycznych, dlatego też określenie zawartości wszystkich składników toksycznych poprzez wykonanie analiz chemicznych jest praktycznie niemożliwe. Niemożliwe jest także określenie rzeczywistej toksyczności wód złożowych czy innych odpadów ciekłych jedynie na podstawie wyników analiz – ze względu na możliwość występowania różnorodnych interakcji nie tylko pomiędzy poszczególnymi toksykantami, ale także składnikami abiotycznymi i biotycznymi środowiska.

Od kilku lat na rynku dostępne są mikrobiotesty, wykorzystujące bioindykatory (żywe mikroorganizmy) do określania toksyczności ścieków i odpadów stałych dla środowiska. Pionierskie prace nad rozwojem mikrobiotestów zostały przeprowadzone przez prof. Guida Persoone'a i współpracowników w Laboratorium Badań Biologicznych nad Zanieczyszczeniami Wodnymi na Uniwersytecie Gent w Belgii, a następnie w firmie MicroBioTest Inc. we współpracy z naukowcami z kilku laboratoriów w różnych krajach Europy [1, 2, 3, 4, 13], w tym Polski. Mikrobiotesty typu toxkit wykorzystują organizmy testowe przechowywane w stadium uśpienia lub unieruchomienia (formy kryptobiotyczne), które po przeprowadzeniu prostej procedury uwolnienia mogą być wykorzystane do wykonania testu. Dzięki temu mikroorganizmy są dostępne na żądanie, bez konieczności posiadania wyspecjalizowanej aparatury, infrastruktury i wiedzy – koniecznych do pro-

wadzenia hodowli organizmów testowych. Żywy organizm jest swoistym odczynnikiem, wewnątrz którego zachodzą procesy biochemiczne, a ich rezultatem są obserwowane symptomy: zmiany morfologiczne ciała, choroby, a w końcu śmierć. Zastosowanie baterii bioindykatorów należących do różnych grup taksonomicznych: bakterii, pierwotniaków, skorupiaków, glonów i roślin wyższych oraz reprezentujących wszystkie poziomy troficzne (producentów, konsumentów i reducentów) pozwala na kompleksową ocenę stanu badanego środowiska [12].

Dziedziny, w których stosowane są mikrobiotesty toxkit, to [13, 14]:

- przesiewowe testy toksyczności ścieków, odcieków, wód powierzchniowych i gruntowych, osadów, zanieczyszczonych gleb, odpadów stałych oraz odcieków z odpadów, odcieków ze składowisk odpadów, związków chemicznych, ekstraktów roślinnych, farb i powłok,
- monitorowanie toksyczności w zanieczyszczonych środowiskach wodnych i lądowych,
- ocena procesu detoksyfikacji po rekultywacji skażonych gleb,
- wykrywanie i obliczanie zawartości biotoksyn w wykwitach cyjanobakterii.

Cały czas prowadzone są prace umożliwiające rozszerzenie zakresu stosowania mikrobiotestów. Powstają także nowe testy toxkit, wykorzystujące kolejne mikroorganizmy jako wskaźniki czystości środowiska, zwiększające możliwości doboru mikrobiotestów do wykonywania konkretnych zadań. W artykule przedstawiono wyniki wstępnych badań nad zastosowaniem testów ekotoksykologicznych do określenia toksyczności wód złożo-

wych oraz wpływu podstawowych procesów oczyszczania na zmiany poziomu toksyczności wód.

System klasyfikacji toksyczności

W trakcie badań nad wykorzystaniem mikrobiotestów toxkit opracowano także dwa systemy oceny/klasyfikacji toksyczności [7]: jeden dla całościowego określenia stopnia skażenia środowiska naturalnego toksynami, określony jako „system klasyfikacji zagrożeń”, drugi dla ilościowej oceny toksyczności odpadów przed ich wprowadzeniem do środowiska wodnego, nazwany „systemem klasyfikacji toksyczności”. Systemy te oparte są na następujących założeniach:

- Ze względu na potrzebę łatwego, praktycznego stosowania, szybkiego uzyskiwania wyników i obniżenia kosztów, oba systemy zostaną oparte na pakietach mikrobiotestów z krótkim czasem inkubacji, reprezentujących różne poziomy w łańcuchu troficznym. W związku z tym systemy oceny będą odpowiadać tylko na zagrożenia „ostre”.
- Podobnie jak w przypadku badania osadów, oznaczenia dla wód naturalnych będą prowadzone na próbkach nierozcieńczonych, a rezultaty będą wyrażone jako procent efektu toksycznego charakterystycznego dla każdego testu.
- Dla odpadów wprowadzonych do środowiska wodnego wstępne testy będą prowadzone na próbkach nierozcieńczonych. Oznaczenia serii rozcieńczeń próbek będą prowadzone w drugiej kolejności i obejmą wszystkie mikrobiotesty, które wykażą efekt wyższy niż 50% w próbce nierozcieńczonej. Na tej podstawie obliczone zostaną wartości $L(E)C_{50}$ i pochodne jednostki toksyczności TU (*toxicity units*).

System klasyfikacji toksyczności dla ścieków może być stosowany do każdego typu ścieków wprowadzanych do środowiska gruntowo-wodnego przed lub po oczyszczeniu (ścieki komunalne, przemysłowe, odcieki ze składowisk oraz wody na obszarach skażonej gleby). System polega na dwuetapowym określeniu ostrej toksyczności ścieków przy użyciu baterii mikrobiotestów: pierwszy etap – określenie toksyczności próbek nierozcieńczonych, drugi etap – testy toksyczności wykonywane z seriami roz-

cieńczeń (tylko dla próbek, które w pierwszym etapie wykazały efekt toksyczności powyżej 50%).

Ocena toksyczności ścieków oparta jest na klasyfikacji w pięciostopniowej skali ostrej toksyczności. Wyniki przedstawiane są jako jednostki toksyczności TU (*toxicity units*): $TU = [1/LC_{50}] \times 100$. Próbkę klasyfikuje się na podstawie najwyższej liczby jednostek toksyczności otrzymanej przynajmniej dla jednego z testów pakietu. Wyróżniono 5 klas toksyczności ostrej:

- Klasa I: *brak ostrej toksyczności* ($TU < 0,4$) – żaden z testów nie wykazał efektu toksycznego (tzn. wartość efektu znacząco wyższa niż w próbkach kontrolnych).
- Klasa II: *mala ostra toksyczność* ($0,4 \leq TU < 1$) – procentowy efekt zaobserwowany w przynajmniej jednym teście toksyczności jest znacząco wyższy niż w teście kontrolnym, lecz jest niższy niż 50% ($< 1 TU$).
Uwaga: Przez analogię do systemu oceny wód naturalnych, 20-procentowy poziom efektu może być uznany za najniższe PE mające istotny wpływ toksyczny (20-procentowy efekt odpowiada 0,4 TU).
- Klasa III: *ostra toksyczność* ($1 \leq TU < 10$) – wartość $L(E)C_{50}$ jest osiągnięta lub przekroczona w przynajmniej jednym teście, ale w 10-krotnym rozcieńczeniu próbki efekt jest mniejszy niż 50%.
- Klasa IV: *wysoka ostra toksyczność* ($10 \leq TU < 100$) – wartość $L(E)C_{50}$ jest osiągnięta w 10-krotnym rozcieńczeniu w przynajmniej jednym teście, ale nie jest osiągnięta w 100-krotnym rozcieńczeniu.
- Klasa V: *bardzo wysoka ostra toksyczność* ($TU \geq 100$) – wartość $L(E)C_{50}$ jest osiągnięta w 100-krotnym rozcieńczeniu w przynajmniej jednym teście.

Opracowany system klasyfikacji był testowany przez uczestników międzynarodowego projektu i obecnie jest coraz szerzej stosowany w laboratoriach zajmujących się różnymi zagadnieniami związanymi z ochroną środowiska [5, 6, 8, 11].

Testy Microtox/DeltaTox oraz Daphtoxkit F magna – pierwszy oparty na pomiarze zahamowania luminescencji bakterii *Vibrio fischeri*, a drugi bazujący na pomiarze unieruchomienia skorupiaków *Daphnia magna* – zostały ujęte w Polskich Normach jako metody oznaczania jakości wody [9, 10].

Metodyka badań

Podstawowym kryterium doboru testów toksykologicznych jest rodzaj lokalnego ekosystemu, który może mieć bezpośredni kontakt z badanym rodzajem ścieków, w tym przypadku z wodami złożowymi. Zarówno kopalnie wy-

tworzające odpady (wody złożowe i ścieki), jak i punkt utylizacji (zatłaczania do złoża) zlokalizowane są na terenach, na których występują użytkowane rolniczo gleby oraz powierzchniowe i podziemne wody słodkie. Z tego

powodu do wykonywania testów toksyczności wybrano organizmy, które żyją w środowisku gruntowo-wodnym i wodach słodkich. Do badań wybrano zestaw testów ekotoksykologicznych, w którego składzie znalazły się:

- DeltaTox – test toksyczności ostrej (pomiar fluorescencji bakterii *Vibrio fischeri* po 5 minutach kontaktu z próbką),
- Daphtoxkit F magna – test toksyczności ostrej (unieruchomienie/śmierć organizmów *Daphnia magna*, pomiar wykonany po 24 i 48 godzinach inkubacji),
- Thamnotoxkit F – test toksyczności ostrej (unieruchomienie/śmierć organizmów *Thamnocephalus platyurus*, pomiar wykonany po 24 godzinach inkubacji),
- Phytotoxkit F – krótkotrwały test toksyczności chronicznej (pomiar kiełkowania i wczesnego wzrostu korzeni roślin *Lepidium sativum*, *Sorghum saccharatum*, *Sinapis alba* wykonany po 3 dniach inkubacji).

Do przeprowadzenia testów wykorzystano procedury zalecane przez producenta, z wyjątkiem testu Phytotoxkit F, który został zmodyfikowany w celu umożliwie-

nia wykonania badań toksyczności wód złożowych. Modyfikacja polegała na wykorzystaniu we wszystkich testach gleby referencyjnej, a efekt testowy wywoływany był poprzez wykorzystanie wody złożowej do zwilżenia gleby. Próbka kontrolna była zwilżana wodą destylowaną – zgodnie z procedurą producenta. Glebę referencyjną stanowiła dostarczana wraz z testami Phytotoxkit przez dystrybutora mieszanina piasku, glinki kaolinowej, torfu i węgla wapnia (dodatek stabilizujący odczyn gleby), która jest analogiczna do referencyjnej gleby rekomendowanej przez OECD w badaniach toksyczności na bezkręgowcach.

Przed wykonaniem testu DeltaTox, w celu ograniczenia wpływu mętności na pomiar luminescencji, próbki mętne i z zawartością dużej ilości zawiesin były filtrowane.

Dokładność wykonywanych analiz chemicznych wynosiła od 0,01% do 0,1%. W celu określenia dokładności wykonywanych oznaczeń toksyczności obliczono odchylenia standardowe dla wszystkich wykonywanych testów toksykologicznych.

Materiał badawczy

Materiał badawczy stanowiły próbki wody złożowej, które charakteryzowały się zróżnicowanym pochodzeniem i właściwościami:

- próbka I – zbiorcza woda złożowa pochodząca z kopalń gazu ziemnego,
- próbka II – zbiorcza woda złożowa z kopalń gazu ziemnego i ropy naftowej,
- próbka III – woda z odwiertu eksploatującego zasiarzoną ropę naftową,
- próbka IV – woda z odwiertu eksploatującego silnie zasiarzony gaz ziemny z wysoką zawartością kondensatu gazolinowego.

W celu prześledzenia zmian toksyczności wody złożowej następujących po przeprowadzeniu procesów oczyszczania (napowietrzanie, koagulacja z flokulacją oraz sedymentacja i filtracja osadów pokoagulacyjnych) pobrano próbki wód:

- próbka I_{zat.} – próbka wody

złożowej nr I po przeprowadzeniu procesów oczyszczania,

- próbka II_{zat.} – próbka wody złożowej nr II po przeprowadzeniu procesów oczyszczania.

W przypadku wszystkich próbek zostały wykonane podstawowe analizy fizykochemiczne, w celu określenia zawartości głównych składników i zanieczyszczeń (tablica 1).

Tablica 1. Zawartość głównych składników badanych wód złożowych

Oznaczenie [mg/dm ³]	Próbka wody złożowej					
	I	I _{zat.}	II	II _{zat.}	III	IV
Odczyn	6,25	6,92	6,11	6,85	5,89	7,94
Ekstrakt eterem naftowym	39	12	253	191	204	95
Cl ⁻	71 358	71 346	38 360	38 295	195 214	55 147
SO ₄ ²⁻	114	126	97	105	143	58,2
CO ₃ ²⁻	–	–	–	–	–	–
HCO ₃ ⁻	155	139	305	278	1 094	893
S ²⁻	–	–	–	–	269	547
Ca ²⁺	3 482	3 477	1 869	1 877	18 569	2 269
Mg ²⁺	598	582	406	412	1369	314
Fe _{og.}	58	1,6	34	0,9	2,9	5,9
Mn ²⁺	17	10,4	5,6	3,8	–	–

Analiza wyników badań toksyczności próbek wód złożowych

Podczas analizy wyników badań należy pamiętać, że w przypadku rozpatrywania EC_{50} im wyższa wartość parametru (wyższe stężenie wywołujące 50-procentowy efekt testowy), tym niższa toksyczność próbki. Natomiast dla obliczanych jednostek toksyczności (TU) wyższa wartość oznacza wyższą toksyczność próbki.

Test DeltaTox

Wyniki oznaczeń toksyczności ostrej próbek wód złożowych wykonane za pomocą testu DeltaTox przedstawiono na rysunku 1 – stężenia wywołujące 50-procentowy efekt testowy (EC_{50}), oraz na rysunku 2 – wartości toksyczności wyrażone w jednostkach toksyczności (TU).

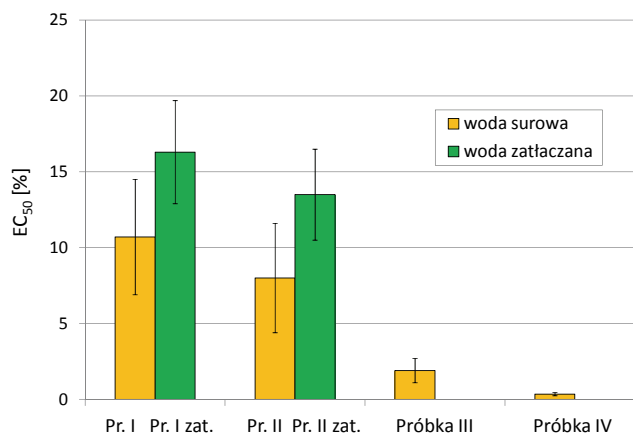
Badania zbiorczej wody złożowej z kopalń gazu ziemnego (próbka nr I) przeprowadzone za pomocą testu toksyczności ostrej DeltaTox wykazały w przypadku wody surowej podwyższoną toksyczność. Efekt 50-procentowego spadku luminescencji bakterii *Vibrio fischeri* uzyskano przy średnim stężeniu próbki wynoszącym $EC_{50} = 10,7\%$, co przekłada się na wartość jednostek toksyczności $TU = 9,4$.

Badanie przeprowadzone dla tej samej wody po przygotowaniu do zatłoczenia, polegającym na napowietrzeniu, przeprowadzeniu koagulacji z flokulacją, a następnie filtracji osadów pokoagulacyjnych (próbka nr I_{zat.}), pozwoliło na stwierdzenie obniżenia toksyczności wody do poziomu $EC_{50} = 16,3\%$, co daje wartość $TU = 6,2$.

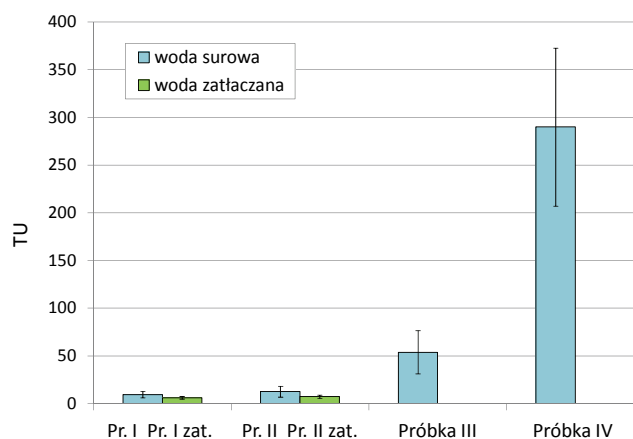
Podobnie przedstawia się zmiana toksyczności próbki II – wody zbiorczej z kopalń ropy naftowej i gazu ziemnego (z podwyższoną zawartością zanieczyszczeń ropopochodnych). Stężenie próbki wody surowej wywołujące efekt 50-procentowego obniżenia luminescencji wynosi 8,0%, natomiast w próbce pobranej po przeprowadzeniu procesu przygotowania do zatłoczenia (próbka nr II_{zat.}) wartość stężenia wzrosła i wynosi $EC_{50} = 13,5\%$. Obliczone wartości TU wyniosły odpowiednio: dla wody surowej 12,6, natomiast dla wody przygotowanej do zatłoczenia – 7,4.

Testy toksyczności ostrej przeprowadzone dla silnie zmineralizowanej wody złożowej (próbka nr III) wydobytej wraz z ropą naftową o wysokiej zawartości siarkowodoru wykazały znacznie niższe średnie stężenie wywołujące 50-procentową inhibicję luminescencji, wynoszące $EC_{50} = 1,9\%$, co w jednostkach toksyczności wynosi $TU = 53,8$.

Najwyższą toksyczność spośród wszystkich przebadanych próbek wód złożowych wykazała próbka IV. Efekt testowy w postaci 50-procentowego zahamowania luminescencji uzyskano średnio już przy stężeniu próbki



Rys. 1. Porównanie wartości EC_{50} oznaczonych dla badanych próbek wód złożowych w teście DeltaTox



Rys. 2. Porównanie wartości TU (jednostek toksyczności) oznaczonych dla badanych próbek wód złożowych w teście DeltaTox

wynoszącym $EC_{50} = 0,35\%$. Średnia toksyczność w przeprowadzonym teście wyrażona w jednostkach toksyczności wynosi $TU = 290$.

Znacznie bardziej toksyczne okazały się dwie próbki wody pobrane z odwiertów eksploatujących ropę naftową i gaz ziemny ze złóż zasiarczonych. Różnicę w toksyczności tych próbek (oznaczoną za pomocą testu DeltaTox) można dobrze zaobserwować na wykresie przedstawiającym wartość jednostek toksyczności (TU) obliczoną dla stężeń wywołujących 50-procentowy efekt testowy (EC_{50}) (rysunek 2). Zwłaszcza próbka IV charakteryzuje się bardzo wysoką toksycznością, którą nie do końca można wytłumaczyć różnicami w zawartości poszczególnych, oznaczonych w analizach, składników. Próbka IV jest kilkadziesiąt razy bardziej toksyczna niż próbka I_{zat.} (charakteryzująca się najniższą toksycznością spośród testowanych próbek).

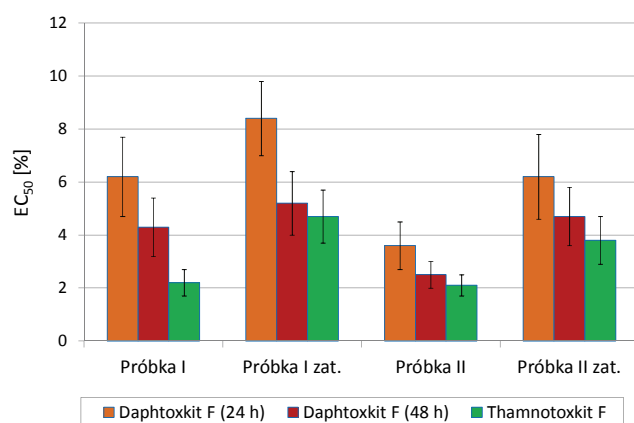
Fakt ten wskazuje, że nie zawsze wykonanie nawet bardzo szerokiego zakresu analiz fizykochemicznych umożliwi prawidłowe określenie zagrożeń stwarzanych dla ekosystemów przez materiały (np. wydobyte wody złożowe) zawierające składniki toksyczne. Cel ten w większym stopniu można osiągnąć stosując testy mikrobiologiczne oparte na obserwacji organizmów testowych w kontakcie z badanymi substancjami.

Wyniki przeprowadzonych badań toksyczności wód złożowych o zróżnicowanej charakterystyce wskazują dobitnie, że wody te stanowią bardzo poważne zagrożenie dla organizmów żywych w przypadku bezpośredniego kontaktu. Stężenia próbek wód wywołujące efekt 50-procentowej reakcji testowej w teście DeltaTox wahają się w granicach od 16,3% (próbka I_{zat.}) aż do 0,35% dla próbki IV (rysunek 1).

Test Daphtoxkit F magna

Dla próbek wód przed i po procesach przygotowania do zatłoczenia wykonano kolejne badania toksyczności z zastosowaniem wybranych testów toksykologicznych. Analiza toksyczności zbiorczej wody złożowej z kopalń gazu ziemnego wykonana z użyciem testu Daphtoxkit F magna po 24 godzinach inkubacji (rysunek 3) wykazała 50-procentowy efekt toksyczny (śmierć 50% organizmów) dla stężenia próbki wynoszącego średnio 6,2%. Wartość TU (rysunek 4) obliczona dla tego stężenia wynosi 16,1. W teście przeprowadzonym dla próbki I_{zat.} odnotowano wzrost stężenia wywołującego efekt toksyczny do poziomu $EC_{50} = 8,4\%$ ($TU = 11,9$), czyli nastąpiło zmniejszenie toksyczności wody po oczyszczaniu w stosunku do organizmów testowych *Daphnia magna*.

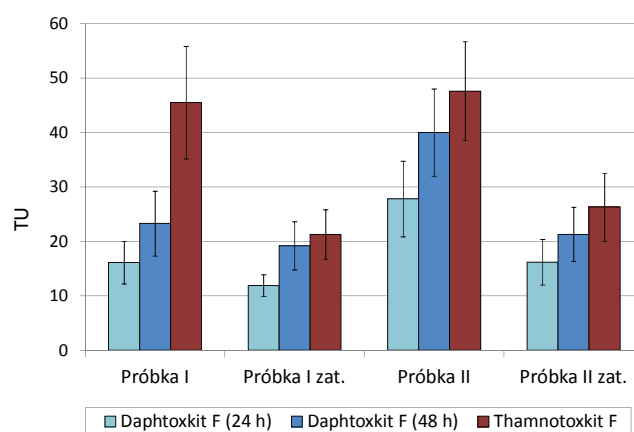
Odczyt wyników testu Daphtoxkit F magna wykonany po 48 godzinach inkubacji (rysunki 3 i 4) wykazał obniżenie



Rys. 3. Porównanie wartości EC_{50} oznaczonych dla badanych próbek wód złożowych w testach Daphtoxkit F (po 24 i 48 godzinach inkubacji) oraz Thamnotoxkit F

stężenia wywołującego 50-procentowy efekt testowy dla próbki I do wartości 4,3% ($TU = 23,3$). Test w przypadku próbki I_{zat.} wykazał stężenie $EC_{50} = 5,2\%$ ($TU = 19,2$).

Dla zbiorczej wody złożowej o podwyższonej zawartości węglowodorów ropopochodnych przed przygotowaniem do zatłoczenia (próbka II) w teście Daphtoxkit F magna po 24 godz. inkubacji (rysunki 3 i 4) odnotowano 50-procentowy efekt testowy przy stężeniu wynoszącym 3,6%, któremu odpowiada wartość $TU = 27,8$. Próbkę wody złożowej po przygotowaniu do zatłoczenia (próbka II_{zat.}) charakteryzowała się nieco mniejszą toksycznością i 50-procentowy efekt testowy uzyskano w jej przypadku przy stężeniu $EC_{50} = 6,2\%$ ($TU = 16,2$).



Rys. 4. Porównanie wartości TU (jednostek toksyczności) oznaczonych dla badanych próbek wód złożowych w testach Daphtoxkit F (po 24 i 48 godzinach inkubacji) oraz Thamnotoxkit F

W przypadku próbek II i II_{zat.} wody złożowej, podobnie jak dla próbek I i I_{zat.}, wynik testu Daphtoxkit F magna po 48 godzinach inkubacji wykazywał wyższe toksyczności (rysunki 3 i 4): próbka II – stężenie $EC_{50} = 2,5\%$, próbka II_{zat.} – stężenie $EC_{50} = 4,7\%$, a obliczone wartości jednostek toksyczności wynosiły odpowiednio: 40,0 (dla próbki II) oraz 21,3 (dla próbki II_{zat.}).

Przeprowadzone badania dowiodły również, że zastosowanie nawet prostych i tanich metod oczyszczania wód złożowych może skutkować zauważalnym obniżeniem ich własności toksycznych. Woda złożowa surowa (próbka I i próbka II) charakteryzuje się znacznie wyższymi własnościami toksycznymi niż próbki wody po przeprowadzeniu procesów przygotowania do zatłoczenia (próbka I_{zat.} i próbka II_{zat.}). Obniżenie własności toksycznych wód wykazane zostało we wszystkich przeprowadzonych testach toksykologicznych (rysunki 1–5). W tym przypadku, opierając się jedynie na wynikach wykonanych podstawowych analiz

chemicznych, nie można byłoby wnioskować o tak wyraźnym obniżeniu toksyczności wód złożowych.

Test Thamnotoxkit F

Test toksyczności ostrej Thamnotoxkit F wykonany został dla próbek wód złożowych przed i po procesie przygotowania do zatłoczenia (próbki I i I_{zat.} oraz próbki II i II_{zat.}) za pośrednictwem odwiertu chłonnego do złoża. W przypadku próbki I wykonanie 24-godzinne testu Thamnotoxkit F pozwoliło na określenie stężenia wywołującego 50-procentową śmiertelność organizmów na poziomie EC₅₀ = 2,2%. Wartość jednostek toksyczności dla tego stężenia wynosi TU = 45,5. W przypadku próbki wody po przygotowaniu do zatłoczenia (próbka I_{zat.}) odnotowano obniżenie toksyczności, które przekłada się na wzrost stężenia wywołującego 50-procentowy efekt toksyczny dla skorupiaków *Thamnocephalus platyurus* do EC₅₀ = 4,7%. Obliczona wartość jednostek toksyczności wynosi TU = 21,3 (rysunki 3 i 4).

W przypadku próbki ścieków surowych z wysoką zawartością węglowodorów ropopochodnych (próbka II) przeprowadzony test wykazał, że stężenie śmiertelne wody złożowej dla połowy organizmów kształtuje się na poziomie EC₅₀ = 2,1%, natomiast wartość stężenia wyrażona w jednostkach toksyczności wynosi 47,6. Próbka nr II_{zat.}, pobrana po przygotowaniu wody do zatłoczenia, charakteryzowała się wyższym stężeniem wywołującym 50-procentowy efekt toksyczny, EC₅₀ = 3,8%, oraz niższymi obliczonymi wartościami jednostek toksyczności, TU = 26,3, w porównaniu z próbką surową (rysunki 3 i 4).

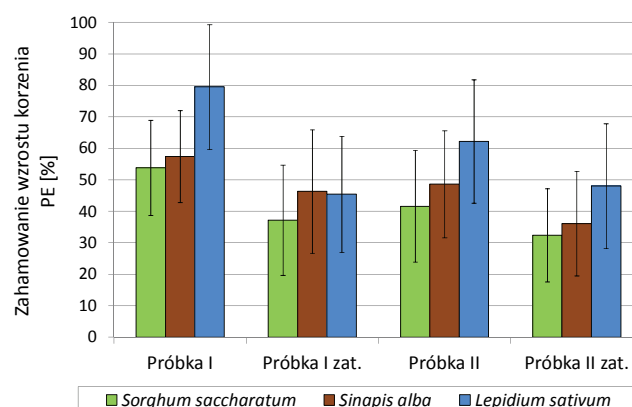
Test Phytotoxkit F

W przypadku próbki nr I najwyższy stopień zahamowania wzrostu korzenia uzyskano dla rzeżuchy (79,5%), przy wykiełkowanych 60% nasion. Nieco niższy efekt testowy uzyskano dla gorczycy: zahamowanie wzrostu korzenia równe 57,4% oraz dla sorgo: 53,8% przy 70% wykiełkowanych nasion w przypadku obu roślin (rysunek 5). Badanie wody złożowej po przygotowaniu do zatłoczenia (próbka I_{zat.}) wykazało niższe działanie toksyczne, czyli mniejszy procent obniżenia długości korzeni, wynoszący dla rzeżuchy: 45,4% (70% wykiełkowanych nasion), dla gorczycy: 46,3% (70% kiełkowania) i dla sorgo: 37,2% (80% kiełkowania).

Próbka II wody złożowej spowodowała ograniczenie wzrostu korzeni na poziomie: dla *Lepidium sativum* 65,2% (70% wykiełkowanych nasion), dla *Sinapis alba* – 48,6% (80% kiełkowania) oraz dla *Sorghum saccharatum* – 41,6% (80% kiełkowania). W przypadku próbki II_{zat.} zahamowanie

wzrostu korzeni wyniosło średnio: dla rzeżuchy 48,0% (kiełkowanie 70%), dla gorczycy 36,1% (kiełkowanie 80%) oraz dla sorgo 32,4% (kiełkowanie 90%). Wyniki zamieszczono na rysunku 5.

Przeprowadzony dla wód złożowych przed i po przygotowaniu do zatłoczenia test Phytotoxkit F potwierdza spostrzeżenia dokonane w poprzednio omawianych testach. Rośliny wyższe w różny sposób reagują na zanieczyszczenia obecne w wodzie lub glebie. Porównując reakcje roślin na kontakt z wodami złożowymi, w przypadku każdego gatunku roślin można zauważyć znaczące obniżenie toksyczności dla próbek po oczyszczeniu (próbki I_{zat.} i II_{zat.}) w porównaniu do próbek surowych (próbki I i II). Najczulszą na zanieczyszczenia zawarte w wodach złożowych okazała się roślina jednoliścienna – rzeżucha (*Lepidium sativum*), wykazująca najwyższy procent zahamowania wzrostu korzenia, chociaż w przypadku próbki I_{zat.} wynik jest porównywalny z gorczycą. Mniej podatne na zanieczyszczenia wód okazały się rośliny dwuliścienne: gorczyca (*Sinapis alba*) i sorgo (*Sorghum saccharatum*).



Rys. 5. Porównanie wartości PE oznaczonych dla badanych próbek wód złożowych w teście Phytotoxkit F

Klasyfikacja toksyczności

Dokonano klasyfikacji badanych próbek wód zgodnie z pięciostopniowym systemem opracowanym przez zespół pod kierunkiem G. Persoone'a w ramach badań nad zastosowaniem mikrobiotestów do oceny toksyczności próbek wód i ścieków.

Wszystkie próbki wód złożowych we wszystkich testach (z wyjątkiem testu Phytotoxkit F) wykazywały maksymalny poziom efektu testowego wynoszący PE = 100%. Testy przeprowadzone z rozcieńczeniami wykazały duże różnice w toksyczności poszczególnych badanych próbek. W celu dokonania klasyfikacji wód złożowych zostały obliczone wartości TU dla testów DeltaTox, Daphtoxkit F magna oraz Thamnotoxkit F. Na tej podstawie

dokonano klasyfikacji badanych próbek zgodnie z pięciostopniowym systemem toksyczności, według którego materiał jest przypisywany do najwyższej klasy toksyczności oznaczonej w przynajmniej jednym teście. Wartości toksyczności (TU) oraz klasyfikacja próbek dla poszczególnych testów zostały zestawione w tablicach 2–4.

Zgodnie z systemem klasyfikacji toksyczności, klasa toksyczności próbek I, I_{zat.} oraz II_{zat.} oznaczona w teście

DeltaTox na poziomie III powinna zostać przyjęta jako IV ze względu na testy wykonane z wykorzystaniem bardziej czułych organizmów Daphtoxkit F magna oraz Thamnotoxkit F (tablica 5).

W przypadku próbek III i IV, dla których zostały wykonane tylko pojedyncze oznaczenia testem DeltaTox, należy spodziewać się potwierdzenia klasyfikacji po wykonaniu dodatkowych testów lub ewentualnego wzrostu klasy

Tablica 2. Wartości TU i klasyfikacja toksyczności badanych próbek wód złożowych w teście DeltaTox

Badana próbka	Wartości TU DeltaTox	Klasa toksyczności	Oznaczenie graficzne
Próbka I	9,4	III – ostra toksyczność	☠
Próbka I _{zat.}	6,1	III – ostra toksyczność	☠
Próbka II	37,8	IV – wysoka ostra toksyczność	☠☠
Próbka II _{zat.}	7,4	III – ostra toksyczność	☠
Próbka III	53,8	IV – wysoka ostra toksyczność	☠☠
Próbka IV	289,7	V – bardzo wysoka ostra toksyczność	☠☠☠

Tablica 3. Wartości TU i klasyfikacja toksyczności badanych próbek wód złożowych w teście Daphtoxkit F magna (24 i 48 godzin)

Badana próbka	Wartości TU Daphtoxkit F magna		Klasa toksyczności	Oznaczenie graficzne
	24 h	48 h		
Próbka I	16,1	40,0	IV – wysoka ostra toksyczność*	☠☠
Próbka I _{zat.}	11,9	21,3	IV – wysoka ostra toksyczność*	☠☠
Próbka II	23,3	41,7	IV – wysoka ostra toksyczność*	☠☠
Próbka II _{zat.}	19,2	24,4	IV – wysoka ostra toksyczność*	☠☠

* Klasa IV toksyczności zarówno dla próbek po 24, jak i po 48 godzinach testu

Tablica 4. Wartości TU i klasyfikacja toksyczności badanych próbek wód złożowych w teście Thamnotoxkit F

Badana próbka	Wartości TU Thamnotoxkit F	Klasa toksyczności	Oznaczenie graficzne
Próbka I	45,5	IV – wysoka ostra toksyczność	☠☠
Próbka I _{zat.}	13,0	IV – wysoka ostra toksyczność	☠☠
Próbka II	47,6	IV – wysoka ostra toksyczność	☠☠
Próbka II _{zat.}	26,3	IV – wysoka ostra toksyczność	☠☠

Tablica 5. Maksymalne wartości TU uzyskane w testach i klasyfikacja toksyczności badanych próbek wód złożowych

Badana próbka	Maksymalne wartości TU uzyskane w testach	Klasa toksyczności	Oznaczenie graficzne
Próbka I	45,5	IV – wysoka ostra toksyczność	☠☠
Próbka I _{zat.}	21,3	IV – wysoka ostra toksyczność	☠☠
Próbka II	47,6	IV – wysoka ostra toksyczność	☠☠
Próbka II _{zat.}	26,3	IV – wysoka ostra toksyczność	☠☠
Próbka III	53,8	IV – wysoka ostra toksyczność	☠☠
Próbka IV	289,7	V – bardzo wysoka ostra toksyczność	☠☠☠

toksyczności dla próbki III, ponieważ większość stosowanych w mikrobiotestach organizmów jest bardziej czuła na zanieczyszczenia niż bakterie *Vibrio fischeri*.

W teście Phytotoxkit F, którego procedura została zmodyfikowana w celu umożliwienia określania wpływu zanieczyszczeń obecnych w wodzie na kiełkowanie i wczesny

wzrost roślin jednoliściennych (*Lepidium sativum*) i dwuliściennych (*Sinapis alba* i *Sorghum saccharatum*), stopień efektu testowego (zahamowanie wzrostu korzeni) wahał się od 32,4% (próbka II_{zat.}, organizm testowy: *Sorghum saccharatum*, kiełkowanie 90%) do 79,46% (próbka I, organizm testowy: *Lepidium sativum*, kiełkowanie 60%).

Podsumowanie

Dzięki opracowaniu mikrobiologicznych testów toksykologicznych, które są stosunkowo tanie i łatwe w stosowaniu, możliwe stało się wykorzystanie bioindykatorów zarówno do oceny stanu środowiska naturalnego, jak i do określenia toksyczności ścieków oraz odpadów dla żywych organizmów. Szeroki wybór organizmów testowych umożliwia właściwe skompletowanie baterii mikrobiotestów i dostosowanie jej do rodzaju badanego środowiska lub rodzaju odpadu. Dodatkowo opracowany system klasyfikacji zagrożeń (dla wód i gleb) oraz klasyfikacji toksyczności (dla ścieków i odpadów) w łatwy i czytelny sposób umożliwia ocenę stopnia stwarzanego zagrożenia.

Wdrożenie w przemyśle wydobywczym ropy naftowej i gazu badań toksykologicznych wykonywanych przy zastosowaniu prostych, wiarygodnych i stosunkowo tanich testów toksykologicznych nowej generacji (mikrobiotestów) stanowi ważne zadanie w dziedzinie ochrony środo-

wiska. Badania mogą być wykonywane podczas wszystkich prac generujących odpady: poszukiwania, udostępniania oraz eksploatacji złóż gazu ziemnego i ropy naftowej, a także w czasie rekultywacji terenów pokopalnianych. Odpowiedni dobór testów umożliwia wykonywanie analiz toksykologicznych płuczek i odpadów wiertniczych, płynów zabiegowych, wód złożowych, różnorodnych płynów technologicznych, wytwarzanych odpadów płynnych i stałych oraz różnorodnych środków chemicznych i materiałów stosowanych w przemyśle wydobywczym. Zastosowanie mikrobiotestów umożliwia określenie rzeczywistych zagrożeń stwarzanych dla poszczególnych ekosystemów, a także określenie stopnia skażenia środowiska gruntowo-wodnego w przypadku przedostania się zanieczyszczeń do wód i gleby. Na podstawie takich badań mogą zostać podjęte właściwe działania mające na celu ochronę środowiska naturalnego.

Literatura

- [1] Centeno M. D., Persoone G., Goyvaerts M.: *Cyst-based toxicity tests: III. Development and standarization of an acute toxicity test with the freshwater anostracan crustacean Streptocephalus proboscideus* [w:] Soares A. M. V. M., Calow P. (Eds.): *Progress in standarization of aquatic toxicity tests*. Boca Raton, CRC Lewis Publishers, 1995, s. 37–55.
- [2] Centeno M. D., Persoone G., Goyvaerts M.: *Cyst-based toxicity tests: IX. The potential of Thamnocephalus platyurus as test species in comparision with Streptocephalus proboscideus (Crustacea, Branchiopoda, Anostraca)*. *Environ Toxicol Water Qual* 1995, vol. 10, s. 275–282.
- [3] Chial B., Persoone G.: *Cyst-based toxicity tests XII. Development of a short-chronic sediment toxicity test with the ostracod crustacean Heterocypris incongruens: Methodology and precision*. *Environ Toxicol* 2002, vol. 17, s. 520–527.
- [4] Chial B., Persoone G.: *Cyst-based toxyty tests: XII. Development of a short-chronic sediment toxyty test with the ostracod crustacean Heterocypris incongruens: Selection of test parameters*. „*Environmental Toxicology*” 2002, vol. 17, s. 520–527.
- [5] Kalka J.: *Landfill Leachate Toxicity Removal in Combined Treatment with Municipal Wastewater*. „*The Scientific World Journal*” 2012, vol. 2012.
- [6] Matejczyk M., Plaza G. A., Nałęcz-Jawecki G., Ulfig K., Markowska-Szczupak A.: *Estimation of the environmental risk posed by landfills using chemical, microbiological and ecotoxicological testing of leachates*. „*Chemosphere*” 2011, vol. 82, issue 7, s. 1017–1023.
- [7] Persoone G., Marsalek B., Blinova I., Törökne A., Zarina D., Manusadzianas L., Nałęcz-Jawecki G., Tofan L., Spananova N., Tothova L., Kolar B.: *A practical and User-Friendly Toxicity Classification System with Microbiotests for Natural Waters and Wastewaters*. „*Environmental Toxicology*” 2003, vol. 18, issue 6, s. 395–402.
- [8] Pignata C., Fea E., Rovere R., Degan R., Lorenzi E., de Ceglie M., Schilirò T., Gilli G.: *Chlorination in a wastewater treatment plant: acute toxicity effects of the effluent and of the recipient water body*. „*Environmental Monitoring and Assessment*” 2012, vol. 184, no. 4, s. 2091–2103.
- [9] PN-EN ISO 11348:2002 *Jakość wody – Oznaczanie inhibicyjnego działania próbek wody na emisję światła przez Vibrio fischeri (badanie na bakteriach luminescencyjnych)*.
- [10] PN-EN ISO 6341:2002 *Jakość wody – Określanie ograniczania ruchliwości Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea) – Test toksyczności ostrej*.
- [11] Ribé V., Nehrenheim E., Odlare M., Lillemor G., Bergilnd R., Forsberg Å.: *Ecotoxicological assessment and evaluation of a pine bark biosorbent treatment of five landfill leachates*. „*Waste Management*” 2012, vol. 32, issue 10, s. 1886–1894.

- [12] Sawicki J.: *Kompleksowa analiza ekotoksykologiczna wód powierzchniowych*. Projekt MNiI nr 2 P05F 056 28, wykonany w latach 2005–2007.
- [13] „Tigret.info” 2006, nr 2 (4).
- [14] Zima G.: *Wykorzystanie metod bioindykacji do oceny toksyczności środków chemicznych stosowanych w składowiskach płuczek wiertniczych*. „Nafta-Gaz” 2012, nr 2, s. 115–122.



Dr hab. inż. Teresa STELIGA – profesor nadzwyczajny INiG, kierownik Zakładu Technologii Eksploatacji Płynów Złożowych. Zajmuje się realizacją prac naukowo-badawczych z zakresu ochrony środowiska w górnictwie nafty i gazu oraz bioremediacją odpadów zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi. Autorka ponad 120 publikacji oraz kilku patentów i wdrożeń.



Mgr Piotr JAKUBOWICZ – absolwent Wydziału Chemii UMCS w Lublinie, specjalność: chemia fizyczna. Pracuje na stanowisku starszego specjalisty badawczo-technicznego w Zakładzie Technologii Eksploatacji Płynów Złożowych. Zajmuje się problematyką ochrony środowiska oraz zagadnieniami eksploatacji mediów złożowych.



Mgr inż. Dorota KLUK – chemik, pracownik Instytutu Nafty i Gazu Oddział Krosno, starszy specjalista badawczo-techniczny w Zakładzie Technologii Eksploatacji Płynów Złożowych. Zajmuje się zagadnieniami związanymi z technologią eksploatacji płynów złożowych.

ZAKŁAD SYMULACJI ZŁÓŻ WĘGLOWODORÓW I PMG

Zakres działania:

- sporządzanie ilościowych charakterystyk złóż naftowych (konstruowanie map cyfrowych dla podstawowych wielkości złożowych);
- analizy geostatystyczne dla potrzeb projektowania modeli złóż naftowych, w tym PMG i obliczeń wolumetrycznych wielowymiarowych i wielofazowych;
- konstruowanie kompletnych symulacyjnych modeli złóż;
- wszechstronne badania symulacyjne dla potrzeb:
 - » weryfikacji zasobów płynów złożowych,
 - » wtórnych metod zwiększania wydobycia (załączanie gazu lub wody, procesy WAG, procesy wypierania mieszającego, oddziaływanie chemiczne),
 - » optymalizacji rozwiercania i udostępniania złóż,
 - » prognozowania złożowych i hydraulicznych (w tym termalnych) charakterystyk odwiertów (w szczególności poziomych) dla celów optymalnego ich projektowania,
 - » sekwestracji CO₂;
- projektowanie, realizacja i wdrażanie systemów baz danych dla potrzeb górnictwa naftowego.

Kierownik: dr Wiesław Szott

Adres: ul. Armii Krajowej 3, 38-400 Krosno

Telefon: 13 436-89-41 w. 104

Faks: 13 436-79-71

E-mail: wieslaw.szott@inig.pl