

POLITECHNIKA WARSZAWSKA

Wydział
Inżynierii Sanitarnej i Wodnej



ROZPRAWA DOKTORSKA

mgr Bożeny Słomczyńskiej

pt. „Wpływ chromu Cr^{6+} na fizjologię kielża
Gammarus varsoviensis Jażdż. jako
bioindykatora jakości wód powierzchniowych
metodą testu toksyczności chronicznej”

WARSZAWA

1987

628.19 : 043

BOŻENA SŁOMCZYŃSKA

WPLYW CHROMU Cr⁶⁺ NA FIZJOLOGIĘ KIEKŁA

Gammarus varsoviensis Jażdż.

JAKO BIOINDYKATORA JAKOŚCI WOD POWIERZCHNIOWYCH

METODĄ TESTU TOKSYCZNOŚCI CHRONICZNEJ

P R A C A D O K T O R S K A

Promotor: doc.dr hab. ZOFIA KAŃSKA

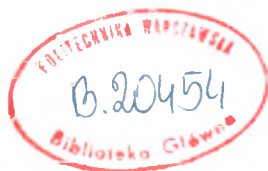
PRACA WYKONANA W ZAKŁADZIE

CHEMII I BIOLOGII WODY

INSTYTUTU METEOROLOGII

I GOSPODARKI WODNEJ

WARSZAWA - 1987 r.



176-3-87d

Pani Doc.dr hab.Zofii Kańskiej - Promotorowi
składam serdeczne podziękowanie za kierowanie
i wnikliwe uwagi podczas wykonywania pracy.

Panu Prof.dr hab.inż. Janowi Dojlido i Pani
dr Anieli Praszkiwicz - Kierownikom Zakładu
Chemii i Biologii Wody IMiGW dziękuję za
umożliwienie zrealizowania pracy.

Panu dr Grzegorzowi Soszce składam
podziękowanie za pomoc organizacyjną
podczas wykonywania niniejszej pracy.

SPIS TREŚCI

	strona
I. W P R O W A D Z E N I E	1
II. C Z Ę Ś Ć T E O R E T Y C Z N A	4
1. METODY OKREŚLANIA TOKSYCZNOŚCI ZANIECZYSZCZEŃ ODPROWADZANYCH DO WOD	4
1.1. Podstawowe zasady prowadzenia badań	5
1.2. Charakterystyka metod wg kryteriów oceny szkodliwości substancji toksycznych	9
1.2.1. Metody rejestrujące porażenie i śmierć organizmów	9
1.2.2. Metody rejestrujące zmiany fizjologiczne u organizmów	11
2. WYZNACZANIE STĘŻEŃ BEZPIECZNYCH	19
2.1. Wyznaczanie stężeń bezpiecznych na podstawie testów ostrych	20
2.2. Wyznaczanie stężeń bezpiecznych na podstawie testów chronicznych	22
3. BADANIA TOKSYKOLOGICZNE W ZASTOSOWANIU DO OCENY ZAGROŻENIA WÓD POWIERZCHNIOWYCH	25
III. C Z Ę Ś Ć D O Ś W I A D C Z A L N A	30
1. CEL I ZAKRES PRACY	30
2. MATERIAŁ I METODY	31
2.1. Hodowla <i>G.varsoviensis</i>	31
2.1.1. Woda stosowana do hodowli	31
2.1.2. Dieta pokarmowa	32
2.1.3. Sposób prowadzenia hodowli	33

SPIS TREŚCI

strona

2.1.4. Zakres obserwacji prowadzonych w czasie hodowli	34
2.2. Testy toksyczności z <i>G.varsoviensis</i>	35
2.2.1. Organizmy testowe	35
2.2.2. Testy ostre	36
2.2.3. Testy chroniczne	37
2.2.4. Metody interpretacji wyników	41
3. WYNIKI BADAŃ	43
3.1. Hodowla <i>G.varsoviensis</i>	43
3.2. Testy ostre z <i>G.varsoviensis</i>	47
3.3. Testy chroniczne z <i>G.varsoviensis</i>	51
3.3.1. Aktywność pokarmowa	51
3.3.2. Reprodukacja	60
3.3.3. Współczynnik stosowalności	71
4. PODSUMOWANIE I DYSKUSJA	72
5. WNIOSKI	91
6. PIŚMIENNICTWO	96
7. SPIS TABEL	111
8. SPIS RYSUNKÓW	113
9. SPIS FOTOGRAFII	115

I. W P R O W A D Z E N I E

Badania toksykologiczne stanowią jeden z podstawowych elementów wielokierunkowych działań w zakresie ochrony wód przed zanieczyszczeniem. Szczególne zainteresowanie tą dziedziną nastąpiło w latach 50-tych co było związane ze znaczym wzrostem ilości zanieczyszczeń odprowadzanych do wód powierzchniowych przez burzliwie rozwijający się przemysł.

Pierwsze prace były o charakterze metodycznym i miały na celu uzyskanie danych niezbędnych do wyznaczania dopuszczalnych stężeń zanieczyszczeń odprowadzanych do wód. Wyniki tych opracowań m.in. dały podstawy do sprecyzowania sposobów oceny jakości wód i ich klasyfikacji odnośnie przydatności do picia i potrzeb gospodarczych.

Analizując metody badań należy podkreślić, że powszechnie są stosowane testy ostre, krótkotrwałe, w wyniku których wyznacza się stężenia śmiertelne substancji oddziaływujących toksycznie na organizmy testowane.

Ostatnio jednak zwrócono uwagę na szkodliwość związków chemicznych występujących w wodach w stężeniach niższych od letalnych, powodujących zakłócenia w procesach fizjologicznych organizmów, obserwowane w długim czasie. Spowodowało to konieczność wprowadzania testów chronicznych. Jako kryterium oceny szkodliwego oddziaływania zanieczyszczeń w tym przypadku przyjmuje się zmiany w procesach fizjologicznych obserwowane podczas pełnego cyklu życiowego organizmu. Uznano więc, że testy chroniczne powinny stanowić podstawę do wyznaczania stężeń bezpiecznych zanieczyszczeń odprowadzanych do wód.

W pracach metodycznych wielu autorów podkreśla konieczność prawidłowego doboru organizmów testowych. Z przeglądu literatury Wolteringa /106/, który obejmuje okres 25 lat wynika, że głównie ryby stosowane są jako testobionty. Także w propozycji US EPA na 165 gatunków ilościowo dominują ryby / 2, 89/.

Istnieje jednak potrzeba wprowadzania metod w których rolę bioindykatorów powinny spełniać także inne organizmy. Do tego celu szczególnie poleca się bezkręgowce, które z jednej strony są często bardziej wrażliwe na działanie trucizn aniżeli ryby, z drugiej zaś są bazą pokarmową ryb. Zwraca się także uwagę na słuszność wprowadzania kilku gatunków testobiontów niezależnie od populacji jednogatunkowych.

Buikema i wsp. /19/ znacznie rozszerzają podejście do tego problemu proponując stosowanie modelowych ekosystemów wodnych, co daje możliwość określania wpływu toksykanta na zbiorowiska organizmów w zależności od warunków abiotycznych.

Podsumowując wyniki prac metodycznych należy podkreślić, że w ostatnich 30 latach powstało szereg opracowań dotyczących ujednoczonych sposobów prowadzenia badań w zakresie toksyczności ostrej i chronicznej. Należy tu wymienić : Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 1975/89/, Annual Book of ASTM Standards 1980 /2/ - w USA, Ausgewählte Methoden der Wasseruntersuchung 1982 /10/ - w NRD oraz Unificirovannyje metody issledovanija kačestva vod 1976/97 /w ramach RWPG.

W roku 1981 w wyniku prac metodycznych RWPG opracowano normę dotyczącą klasyfikacji pestycydów pod względem ich toksyczności na podstawie badań z użyciem zwierząt stałocieplnych /92/.

W latach 1982-1985 podjęto w ramach ISO prace nad normalizacją metod toksyczności ostrej. Opracowano dwie normy międzynarodowe z zastosowaniem skorupiaków /Daphnia magna/ i ryb /Brachydanio rerio / /37, 38/. W 1984 r. zgłoszono trzy inne propozycje norm, w których jako testobionty zaleca się glony słodkowodne i morskie oraz ryby /39, 40, 41/.

W Polsce osiągnięcia pod tym względem prezentują się bardzo skromnie. Dotychczas obowiązują tylko trzy Polskie Normy w zakresie toksyczności ostrej /73, 74, 75/. Brak jest opracowanych metod badań toksyczności chronicznej, jak również sposobów wyznaczania stężeń bezpiecznych związków chemicznych wprowadzanych do wód. Biologiczne jakościowe wskaźniki stosowane do klasyfikacji wód obejmują poza bakteriologicznymi saprobowość oraz tylko próbę biologiczną z rybami jako odpowiednik testu toksyczności.

W nawiązaniu do przedstawionego problemu w niniejszej pracy podjęto badania nad opracowaniem metody testu chronicznego przy zastosowaniu bezkręgowca, kiełża-Gammarus varsoviensis Jażdż. /Crustacea, Amphipoda/. Jako kryteria oceny szkodliwości wytypowano zmiany w aktywności pokarmowej i reprodukcji wynikłe w warunkach intoksykacji chronicznej kiełża chromem Cr^{6+} .

II. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. METODY OKREŚLANIA TOKSYCZNOŚCI ZANIECZYSZCZEŃ ODPROWADZANYCH DO WÓD

Badania toksykologiczne obejmują testy ostre i chroniczne. Testy ostre - krótkotrwałe polegają na obserwacjach zmian w zachowaniu się oraz na rejestracji porażenia i śmierci badanych organizmów. W tym celu stosuje się zakres stężeń toksykantów od powodujących śmierć, do pozwalających na przeżycie organizmów w warunkach doświadczenia.

Na podstawie testów ostrych określić można stężenie śmiertelne /letalne/ tj. LC50 -lethal concentration, stężenie graniczne tj. GC - Grenzkonzentration, stężenie progowe tj. SC - Schwellenkonzentration /10, 80, 85, 89/.

Testy chroniczne - długotrwałe polegają na ocenie wpływu stężeń subletalnych związków chemicznych na organizmy, w ich cyklu życiowym aż do uzyskania następnej generacji. Rejestracji podlegają zakłócenia w procesach fizjologicznych bioindykatorów jak wzrost, odżywianie i reprodukcja. Obserwować można także zmiany w tkankach i organach organizmów poddanych działaniu toksykanta. W tego typu testach określa się maksymalne tolerowane stężenie toksykanta tzw. MATC-Maximum Acceptable Toxic Concentration, znane również jako stężenie nie wywołujące wpływu - no effect concentration lub stężenie bezpieczne - "safe" concentration /89, 101/.

1.1. Podstawowe zasady prowadzenia badań

Wiadomo jest, że efekt toksyczny wynika z wzajemnego oddziaływania toksykanta i organizmu w określonych warunkach środowiska. Stąd też istnieje konieczność wprowadzania stałych, ujednoliconych zasad do badań toksykologicznych dla zabezpieczenia powtarzalności wyników i ich właściwej interpretacji.

Dotyczy to przede wszystkim warunków prowadzenia testu i związanych z nim urządzeń, czasu kontaktu i zakresu stężeń, jak również rodzaju rozcieńczalnika i doboru organizmów.

Testy ostre mogą być wykonywane w warunkach statycznych bez wymiany lub z okresową wymianą roztworów, względnie w warunkach dynamicznych tj. przy ciągłym lub okresowym przepływie toksykanta przez naczynia testowe. W warunkach statycznych określa się najczęściej toksyczność substancji względnie trwałych, w dynamicznych - podatnych na biochemiczny rozkład. Ciągły przepływ eliminuje ze środowiska toksyczne metabolity oraz zapewnia utrzymanie określonego poziomu natlenienia. W tabeli 1 podano zalety i wady testu ostrego prowadzonego w warunkach statycznych i dynamicznych.

W kraju na ogół nie są stosowane testy dynamiczne m.in. z uwagi na brak automatycznych systemów dozująco-rozcieńczających. Jak wynika z danych literaturowych, laboratoryjny system dozująco-rozcieńczający został w Polsce po raz pierwszy użyty w badaniach toksyczności ostrej ścieków petrochemicznych w IM i GW /25/.

Tabela 1

Zalety i wady testu ostrego prowadzonego w warunkach statycznych i dynamicznych wg Buikema i wsp. 1982

Test	ZALETY	WADY
Stacyjny	<ul style="list-style-type: none"> - prosty, tani - wymagający małej przestrzeni laboratoryjnej - szybki do celów porównawczych: toksykantów i organizmów - wymagający małej ilości toksykanta - może być stosowany do mieszanin wielofazowych 	<p>Krótki czas trwania testu</p> <ul style="list-style-type: none"> - powoduje: <ol style="list-style-type: none"> 1. straty toksykanta 2. wyczerpanie tlenu 3. kumulację metabolitów - utrudnia ocenę toksyczności związków: <ol style="list-style-type: none"> 1. lotnych 2. szybko rozkładanych biochemicznie 3. rozkładalnych pod wpływem światła <p>Stosowanie testobiontów typowych dla wód stojących ogranicza jego użyteczność</p>
Stacyjny z wymianą roztworów	<p>j.w.</p> <ul style="list-style-type: none"> - może być stosowany do mieszanin wielofazowych i związków lotnych 	<ul style="list-style-type: none"> - konieczność wymiany roztworów co powoduje stressy u testowanych organizmów - krótki czas ekspozycji <p>Stosowanie testobiontów typowych dla wód stojących ogranicza jego użyteczność</p>
Dynamiczny z ciągłym lub okresowym przepływem toksykanta	<ul style="list-style-type: none"> - najbardziej wiarygodny do oceny toksyczności - daje możliwość kontroli stężenia toksykanta, także związków lotnych - organizmami testowymi mogą być przedstawiciele wód płynących - efektywny w testowaniu związków o wysokim zapotrzebowaniu na tlen - zapewnia utrzymanie odpowiedniego natlenienia - użyteczny do badań długotrwałych, do testów chronicznych 	<ul style="list-style-type: none"> - wymaga: <ol style="list-style-type: none"> 1. kosztownego wyposażenia w tym systemów dozująco-rozcieńczających 2. dużej przestrzeni laboratoryjnej 3. dużej objętości toksykanta - trudny do zastosowania z wielofazowymi mieszaninami

Za granicą natomiast są stosowane systemy automatyczne, które obejmują w swoim składzie dozowniki, pompy dozujące i urządzenia rozcieńczające /43, 55, 60, 95/. Ciągły system pomiarów zapewnia uzyskanie dużej liczby wyników umożliwiając ich analizę statystyczną /29, 102/.

Testy chroniczne przeprowadza się w warunkach dynamicznych w urządzeniach zapewniających organizmom ich specyficzne wymagania związane np. z trybem życia. Williams i wsp./104 / podkreślają konieczność stworzenia biodynamicznych warunków symulujących naturalne środowisko bytowania. Przykładem integracji metodyki i wymagań organizmu były eksperymenty z larwami jętek z rodzaju *Hexagenia*. W badaniach stosowano larwy w określonym wieku zapewniając im odpowiednie oświetlenie i podłoże, w którym miały możliwość zagrzebywania się. W tych warunkach organizmy okazały się odporniejsze na działanie wielu związków toksycznych aniżeli w standardowych komorach testowych.

Dobór zakresu stężeń toksykanta i czasu kontaktu organizmów ze środkiem szkodliwym jest zależny od rodzaju testu i celu badań. W testach, w których kryterium oceny toksyczności związku jest porażenie i śmierć stosuje się szeroki zakres stężeń. W badaniach przyjmujących za podstawę oceny działania substancji zmiany w odruchach czy zachowaniu się lub w czynnościach fizjologicznych stosowane są najczęściej stężenia subletalne. Czas kontaktu zależy od użytych stężeń i szybkości reakcji organizmów.

Jako rozcieńczalnik wykorzystywana jest woda powierzchniowa I klasy czystości, odchlorowana woda wodociągowa, woda akwaryjna lub preparowana syntetycznie. Skład rozcieńczalnika musi być tak dobrany, aby nie wywierał jakiegokolwiek niekorzystnego wpływu na organizmy.

Jedną z najważniejszych zasad prowadzenia testów toksykologicznych jest dobór organizmów.

Wg kryteriów US EPA organizmy powinny reprezentować ekologicznie ważną grupę w środowisku oraz zajmować pozycję w łańcuchu troficznym, prowadzącą poprzez ryby do człowieka. Bioindykatory takie powinny być również genetycznie stałe i łatwo hodowane w warunkach laboratoryjnych. Ważna jest także znajomość ich taksonomii i fizjologii, co US EPA uwzględnia jako czwarte kryterium. Niektórzy autorzy zwracają uwagę na wrażliwość testobiontów oraz na wykazywanie przez nie stałości reakcji /za Buikema i wsp. 19/.

Jak wynika z danych literaturowych niewiele gatunków może spełniać ww.kryteria. Buikema i Benfield /18/ za jedną z głównych przyczyn wpływających na stosunkowo małą liczbę organizmów testowych / w tym głównie bezkręgowców/ uważają brak informacji ekologicznych potrzebnych do prowadzenia hodowli w warunkach laboratoryjnych. Także i niezbędnych urządzeń do tego celu jest niewiele. Wg Williamsa i wsp. /104/ do roku 1985 opisano zaledwie dwa urządzenia do badań toksykologicznych z bezkręgowcami.

W metodykach ujednoczonych - standardowych /10, 89,97/ stosowane są bioindykatory, wśród których wyróżnić można przedstawicieli podstawowych ogniw łańcucha pokarmowego:

producentów /Ankistrodesmus, Rhizoclonium, Scenedesmus, Chlorella, Anacharis/, konsumentów / pierwotniaki - Paramecium, Tetrahymena; skorupiaki - Daphnia, Cyclops, Asellus, Gammarus; mięczaki - Physa; skąposzczety - Tubifex oraz ryby m.in. Lebistes, Pimephales/, destruentów /głównie Escherichia coli, Pseudomonas /. Wg Standard Methods 1975 /89/ najodpowiedniejszymi organizmami do testów są ryby m.in. - Salvelinus fontinalis, Salmo gairdneri, Pime^Rphales promelas, Lepomis macrochirus, a wśród bezkręgowców - skorupiaki m.in. Daphnia, Acartia, Gammarus, Hyalella, Pantoporeia, Palaemonetes, jętki - Hexagenia, Ephemerella, chruściki - Hydropsyche, Brachycentrus; muchówki - Chironomus, Glyptochironomus oraz małże - Ostrea, Mytilus.

Lista organizmów testowych dla potrzeb badań toksykologicznych w Polsce jest dość skromna. Jak już wspomniano stosowane są głównie ryby Lebistes reticulatus, chociaż nie występują one w środowisku naturalnym w kraju, ale są łatwe do hodowli w warunkach laboratoryjnych /74/. Rozwielitka Daphnia magna charakterystyczna dla drobnych zbiorników jest wrażliwa na trucizny lecz trudniejsza do hodowli aniżeli Lebistes /73/. Stosowany jest również przedstawiciel glonów - Chlorella sp. /75 /. W ramach Programu Rządowego PR-7 Solski /83/ wprowadził jako bioindykatory bakterie Pseudomonas fluorescens, glony Scenedesmus quaricauda i rzęśę Lemna minor. Kamiński /47, 48, 49/ stosował oprócz rozwielitek Daphnia magna również ośliczki Asellus aquaticus, ślimaki Planor-

barius corneus, jętki Cloeon dipterum oraz skąposzczety Lumbriculus variegatus i Tubifex sp.

1.2. Charakterystyka metod wg kryteriów oceny szkodliwości substancji toksycznych.

Na podstawie przeglądu piśmiennictwa w zakresie badań toksyczności zanieczyszczeń odprowadzanych do wód można wyróżnić dwie główne grupy metod w zależności od charakteru zmian wywołanych szkodliwym oddziaływaniem związku na organizm :

- porażenie i śmierć organizmów,
- zmiany fizjologiczne u organizmów.

Wymienione grupy objawów działania toksykanta służą za kryteria do oceny jego stężeń szkodliwych, będących następnie podstawą do wyznaczania stężeń bezpiecznych dla środowiska wodnego.

Wartości stężeń bezpiecznych są włączane do systemu oceniającego stan zagrożenia środowiska w tym biomonitoringu i korygowane zgodnie z systemem decyzyjnym / p.p. II.3/.

1.2.1. Metody rejestrujące porażenie i śmierć organizmów

Przy użyciu tych metod określa się stan porażenia i śmierć organizmów testowych w odpowiednich odstępach czasu: zwykle do 96 godzin w przypadku bezkręgowców oraz do 7 dni - w przypadku ryb /14, 91/.

Stany te rejestrowane są także w dłuższych okresach czasu, jeśli trucizna powoli niszczy tkanki i organy doprowadzając do śmierci bioindykatora. Wg Wuhrmana

i Wokera /109/ dogodnym momentem do uchwycenia i rejestracji reakcji organizmu na działanie toksykanta są zaburzenia równowagi i swobodnego poruszania się oraz osłabiona reaktywność na bodźce zewnętrzne. Stan ten został określony przez Kamińskiego /48/ i Solskiego /81/ jako "porażenie" lub reakcja testowa.

W przypadku ryb stan porażenia jest stosunkowo łatwy do określenia, w przeciwieństwie do bezkręgowców np. skorupiaków. Kamiński /48/ opracował charakterystykę stanów porażenia dla skorupiaków *Asellus aquaticus* i *Daphnia magna*.

Wyróżnił on trzy fazy reakcji u:

Asellus aquaticus:

- faza ataksji tj. porażenia lokomotoryki i statyki ciała z zachowaniem ograniczonych ruchów kończyn / reakcja testowa I-RT I/
- faza porażenia tonicznego mięśni międzysegmentowych tułowia i odwłoka /reakcja testowa II-RT II/
- faza śmierci tj. zanik drgawek tonicznych ruchów oddechowych /reakcja letalna - RL /

Daphnia magna:

- faza immobilizacji /znieruchomienia/ tj. ogólny toniczny skurcz mięśni / RT I/
- faza porażenia klonicznego /RT II/
- faza śmierci tj. zanik ruchów klonicznych /RL/.

Interpretację wyników uzyskanych omawianymi metodami przeprowadza się na ogół w oparciu o wartości stężenia powodującego śmierć połowy populacji testowej po czasie t

- LC50- t/ lethal concentration / lub TL_m -t /median tolerance limit/ tj. średniej granicy tolerancji /85/. Stosowane jest również bardziej elastyczne wyrażenie TL - pozwalające na określenie granic tolerancji dowolnej części populacji doświadczalnej np. 50% - TL_{50} ; 10% - TL_{10} itd.

W Polsce, w testach ostrych stosuje się wyrażenie C_{50} tj. stężenie powodujące śmierć 50 % osobników w badanej populacji - dla ściśle zdefiniowanych substancji chemicznych lub ich mieszanin oraz R_{50} tj. rozcieńczenie powodujące śmierć 50 % osobników -dla mieszanin nieokreślonych /np. ścieków // 73, 74/.

Obydwa te wyrażenia są odpowiednikami LC50.

W przypadku obniżania się wartości LC50 w czasie kontaktu organizmów z toksykantem następuje przyrost tzw. reakcji testowej.

1.2.2. Metody rejestrujące zmiany fizjologiczne u organizmów

Metody należące do tej grupy obejmują tzw. testy fizjologiczne. Z uwagi na równorodność i odrębną specyfikę prowadzenia badań można wyróżnić trzy podstawowe metody rejestrujące zmiany zachodzące pod wpływem toksykanta u organizmów:

- w tkankach i organach,
- w zachowaniu się i odruchach,
- w przebiegu procesów fizjologicznych.

- Metody rejestrujące zmiany w tkankach i organach

Niekiedy zachodzi potrzeba określenia zmian w tkankach i organach pod wpływem działania substancji toksycznych kumulujących się w organizmie np. metali, pestycydów. Badania takie dają często cenne informacje o mechanizmach krążenia trucizn w organizmie, jak również o ich powinowactwie do określonych narządów czy tkanek. Najczęściej w tym zakresie, wykorzystuje się ryby, przeprowadzając badania anatomopatologiczne. Zwraca się uwagę także na wygląd skrzel i powłok ciała. Halsband /za Solski 84/ poddawał działaniu różnych związków krew pobraną z żyły grzbietowej ryb, a następnie oceniał mikroskopowo zmiany w obrazie morfologii erytrocytów.

Do oceny zmian w tkankach i narządach ryb pod wpływem toksykantów można stosować metody znane w toksykologii leków, z zastosowaniem zwierząt stałocieplnych. Groba i Trzcńska /30/ określały zawartość hemoglobiny i cukru we krwi oraz aktywność acetylocholinesterazy /AChE/ w mózgu ryb *Salmo gairdneri* poddanych działaniu insektycydów fosforoorganicznych i karbaminianowych. U ryb eksponowanych przez 14 dni w stężeniach subletalnych karbarylu i propoksuru nie stwierdzono zmian w poziomie glukozy i hemoglobiny we krwi w porównaniu do ryb kontrolnych, dlatego autorki wnioskujeją, że powyższe wskaźniki nie mogą być stosowane jako kryteria w ocenie toksyczności karbaminianów. Badania zaś wpływu karbarylu i chlorfenwinfosu na pstrąga w których jako wskaźnik toksycznego działania przyjęto aktywność AChE wykazały, że :

- dla karbarylu i chlorfenwinfosu występuje wyraźna zależność efektu od stężenia;
- stężenie letalne chlorfenwinfosu hamuje aktywność cholinesterazy /AChE/ w ok. 86-91 %;
- hamowanie aktywności AChE w stężeniach subletalnych /1,8 i 0,56 mg/dm³/ karbarylu nie przekracza 50 %.

Arillo i wsp. /5/ wykorzystywali pomiar zawartości kwasu siałowego w skrzelach pstrąga tęczowego jako wskaźnik reakcji stressowej ryb na działanie toksykanta. Autorzy ci stwierdzili, że następstwem wzrostu stężenia niezjonizowanego amoniaku w środowisku wodnym było zwiększenie zawartości kwasu siałowego w skrzelach ryb. Reakcja ta występowała nawet przy niewielkim stężeniu amoniaku. Również zmiany liczby komórek śluzowych w naskórku i błonie śluzowej jelita mogą być wskaźnikami reakcji ryb na działanie związków toksycznych /54, 69/.

W Polsce Prost wraz ze wsp. /76,77/ opracowała metodę umożliwiającą zastosowanie ww. wskaźników tj. zawartości kwasu siałowego oraz liczby komórek śluzowych jako test świadczący o reakcji ryb na skażenie wody.

- Metody rejestrujące zachowanie się i odruchy organizmów
- - - - -

Metody te stosowane są najczęściej do szybkiej oceny stopnia zanieczyszczenia wody w warunkach laboratoryjnych i terenowych. Można je wykorzystywać do wykrywania szkodliwych mieszanin o nieznanym składzie jak i określonych toksykantów.

W badaniach stosowane są głównie ryby, które umieszcza się w odpowiednich urządzeniach przepływowych zaopatrzonych w rejestratory i sygnały alarmowe.

Wielu autorów /31, 32, 36, 78, 88, 93, 96, 100/dokonywało oceny szkodliwości różnych związków chemicznych rejestrując reakcje ryb takie jak - unikanie toksykanta czy gromadzenie się w określonych miejscach urządzenia. Reakcje te rejestrowano za pomocą fotokomórki lub taśmy filmowej.

Aktywność ruchowa ryb wykorzystywana jest jako parametr pomiarowy reakcji testowej w wielu stacjach polowych bioindykacji zanieczyszczeń /51/.

Dopływające do urządzenia zanieczyszczenia wywołują gromadzenie się ryb w części zasilanej wodą czystą, co jest rejestrowane przez fotokomórkę włączającą sygnał alarmowy.

Zdolność ryb do utrzymywania pozycji przeciwprądowej wykorzystano w bioindykacji, w Holenderskim Instytucie Testowania Wody dla Wodociągów. Ryby, które w warunkach naturalnych przeciwstawiają się silnemu prądowi wody, w sytuacji dopływu zanieczyszczeń zmieniały pozycję i płynęły wraz z kierunkiem przepływu wody tj. do tej części zbiornika, w której znajduje się odpływ. Stan ten rejestrowała fotokomórka, uruchamiając jednocześnie system alarmowy.

W Szwecji przyjęto metodę rejestrowania pod wpływem zanieczyszczeń zmian pozycji ryb, przystosowanych do utrzymywania pozycji pionowej w warunkach ruchu wirowego wody w zbiornikach testowych. Przy skażeniu wody następuje osłabienie ryb objawiające się zakłóceniami równowagi, co jest rejestrowane przez fotokomórkę i sygnalizowane.

Wójcik /107/ wykorzystał pomiar aktywności ruchowej organizmów wodnych w skonstruowanym przez siebie aktywo-
metrze. W warunkach intoksykacji mierzył zmiany reakcji
lokomotorycznej zwierząt za pomocą fotokomórki z licznikiem
rejestrującym je w impulsach fotoelektrycznych.
Uzyskał zwiększenie lub zmniejszenie aktywności ruchowej
zwierząt w zależności od charakteru i właściwości badanych
związków /fenol, konsulfonat, lindan i foschlor/.

Wadami ww. metod jest możliwość stosowania stosunkowo
niewielkiej ilości osobników jak również występowanie
pewnych niekorzystnych zjawisk np. chemotaksji u ryb
opisanej przez Sprague i Drury /88/.

- Metody rejestrujące zmiany w procesach fizjologicznych
- - - - -

Metody te mogą być stosowane do oceny szkodliwego wpływu
związków chemicznych na przebieg procesów fizjologicznych
u organizmów zarówno w krótkich jak i długich okresach
czasu. Zmiany w czynnościach fizjologicznych mogą prowadzić
do śmierci organizmów, trwałej deformacji lub do adaptacji
testowanych osobników w przedłużonym czasie kontaktu
z toksykantem. Badania te więc, dają cenne informacje
o zmianach ekologicznych, które mogą nastąpić w środowisku
na skutek przedostawania się zanieczyszczeń.

W testach rejestrujących zakłócenia procesów fizjolo-
gicznych pod wpływem toksykantów ocenia się przebieg
procesów pojedynczo lub kilku równocześnie: oddychania,
odżywiania, wzrostu i reprodukcji. Jako organizmy testowe
stosuje się różnych przedstawicieli łańcucha pokarmowego:
bakterie, rośliny i zwierzęta wodne.

Najczęściej w ww. testach wykorzystuje się pomiary intensywności ODDYCHANIA organizmów w obecności związków szkodliwych przyjmując metody badawcze odpowiednio do stosowanych organizmów. Do oceny przebiegu procesu oddychania u bakterii stosuje się metodę manometryczną Warburga lub aparat "Sapromat". Bringman i Kühn /16/ zastosowali bakterie *Escherichia coli* jako bioindykatory badając szybkość fermentacji glukozy w obecności związków toksycznych. Przy braku oddziaływania toksykantów obserwowano zakwaszenie podłoża i spadek odczynu / pH/. Podobnie można stosować inne gatunki bakterii m.in. *Pseudomonas fluorescens* /za Solski 83/. W teście A-Z wg Knöppa dokonuje się badań mieszanych populacji bakterii i fitoplanktonu, rejestrując zużycie tlenu przez bakterie i ilość wytworzonego tlenu przez glony /97/. Podobne pomiary przeprowadza się także przy użyciu mieszanych hodowli glonów lub pojedynczych ich gatunków /83/.

Kryterium oddechowe stosowane jest często do oceny wpływu toksykantów na fizjologię bezkręgowców i ryb /51, 81, 86/. U skorupiaków mierzona jest intensywność oddychania oraz tzw. "rytm serca" /za Solski 84/. Reakcja ryb na związki toksyczne wyraża się wzrostem lub zmniejszeniem ilości pobieranego tlenu w porównaniu z próbami kontrolnymi /81, 108/. W polowych stacjach bioindykacji zanieczyszczeń dokonuje się pomiarów oddychania i rytmu serca ryb za pomocą elektrod umieszczonych na powierzchni ciała i wszczepionych do śródpiersia. W ten sposób można uzyskać natychmiastowy wynik reakcji testowej.

ROZMNAŻANIE I WZROST organizmów może być także cennym kryterium szkodliwego oddziaływania trucizn, szczególnie na mikroorganizmy o krótkim czasie generacji. Przytoczyć tu można przykładowo test, w którym stosowano nasączone toksykantem krążki bibułowe umieszczone na podłożu zaszczipionym bakteriami. Oceniano wielkość strefy zahamowania wzrostu bakterii wokół krążków.

Bringman i Kuhn /16/ określali wpływ toksykanta na glony na podstawie szybkości rozmnażania i wielkości biomasy *Scenedesmus quadricauda*. Także pomiary zawartości chlorofilu u roślin mogą być czułym wskaźnikiem szkodliwego działania związków chemicznych na proces FOTOSYNTETY /za Solski 83/.

Cytowani wyżej Bringman i Kuhn /17/ zastosowali test z mikroorganizmami w celu oceny intensywności ŻEROWANIA pierwotniaków na bakteriach w obecności toksykantów. Pokarmem dla pierwotniaków *Microregma heterostoma* były bakterie *Escherichia coli*. Autorzy określali zmiany w mętności próbek; spadek mętności świadczył o wzroście intensywności żerowania.

Odrębną grupą metod rejestrujących zmiany w procesach fizjologicznych są testy, w których jako kryteria szkodliwości substancji przyjmuje się AKTYWNOŚĆ POKARMOWĄ, WZROST I REPRODUKCJĘ, mierzone w cyklu życiowym organizmu aż do uzyskania pokolenia F_1 . Są to na ogół testy chroniczne, prowadzone w czasie odpowiednim do szybkości namnażania populacji. Czas trwania tak kompleksowego testu wahać się może od kilku dni dla mikroorganizmów szybko działających



się do kilku - kilkunastu miesięcy dla większych bezkręgowców i ryb. Stężenie toksykanta powinno zawierać się w granicach stężenia subletalnego. Należy także zapewnić warunki symulujące naturalne środowisko bytowania wybranego bioindykatora.

W 1967 r. Mount i Stephan /61/ opisali po raz pierwszy tego typu badania. Jako testem przykładowym można posłużyć się doświadczeniem podanym przez Buikema i wsp. /19/. W badaniach zastosowano ryby w postaci zarodków, które eksponowano w pięciu różnych stężeniach toksykanta w warunkach przepływowych. Po 4-ech tygodniach młode ryby mierzone, a kolejne pomiary wykonywano w odstępach 4-tygodniowych. Po osiągnięciu dojrzałości płciowej umieszczono je w odrębnych akwariach przeznaczonych do tarła. Liczono ilość złożonych jaj, dorosłe ryby mierzone i ważono. Podobnie badano kolejną generację ryb obserwując szybkość wylęgania młodych z jaj. Obserwacje przeżywalności młodych prowadzono w ciągu 4-ech tygodni. Po upływie tego czasu dokonywano pomiarów długości i ciężaru ciała, i likwidowano test. Opisany test trwał od 4 do 6 miesięcy. Sposoby prowadzenia testów chronicznych opisali w swoich pracach Biesinger i Christensen /13/, ponadto przedstawione są w Standard Methods 1975/89 / i Aquatic Invertebrate Bioassays^{a)} /3/.

Jako wynik testów toksyczności chronicznej podaje się stężenie nie wywołujące żadnego wpływu na organizm /no - effects concentration / lub maksymalne tolerowane stężenie toksykanta /Maximum Acceptable Toxic Concentration - MATC/, uznawane jako stężenie bezpieczne. MATC to stężenie

określone empirycznie - najwyższe, które nie oddziałują na organizm w kategoriach jego przeżywalności, wzrostu i reprodukcji. Może być również interpolowane jako średnia geometryczna najniższego stężenia wywierającego wpływ i najwyższego stężenia nie oddziałującego na organizm /58, 62, 70, 71/.

2. WYZNACZANIE STĘŻEŃ BEZPIECZNYCH

Wyniki testów ostrych, a następnie chronicznych dają podstawę do wyznaczania stężeń bezpiecznych związków chemicznych dostających się do środowiska wodnego. Podstawowym warunkiem decydującym o pewności obliczonych wartości jest dobór organizmów testowych. Powinny być one wrażliwe na działanie badanego związku. Dla prawidłowego określenia stężeń bezpiecznych, jest więc konieczne wykonanie dużej ilości różnorodnych testów z użyciem organizmów reprezentujących podstawowe poziomy troficzne.

Do określania stężeń bezpiecznych związków toksycznych w wodach, jako podstawę, stosowano i do tej pory wykorzystuje się w wielu przypadkach metodę testów ostrych, choć budzi to szereg wątpliwości.

Ten rodzaj testów oparty jest na efekcie letalnym ocenianym w krótkim okresie czasu, w przeciwieństwie do testów chronicznych, w których określa się oddziaływanie związków szkodliwych w stężeniach subletalnych w ciągu cyklu życiowego organizmu. Tak więc, do wyznaczania stężeń bezpiecznych powinny być brane pod uwagę wyniki testów chronicznych.

2.1. Wyznaczanie stężeń bezpiecznych na podstawie testów ostrych

Jedną z pierwszych zastosowanych metod wyznaczania stężeń bezpiecznych była metoda Harta i wsp. /33/. Zaadoptowana została wstępnie jako standardowa do badań toksyczności ścieków przemysłowych przez American Society for Testing and Materials. W metodzie przyjęto współczynnik stosowalności równy 0,3, przez który mnożono wartość LC50-96h, uzyskaną dla wrażliwego bioindykatora.

Doudoroff i wsp. /26/ zmodyfikowali tę metodę wprowadzając równanie uwzględniające LC50-24h i LC50-48h :

$$SC = 0,3 \frac{LC50-48h}{\frac{LC50-24h^2}{LC50-48h}}$$

gdzie :

SC - stężenie bezpieczne /"safe" concentration /

LC50-24h i 48h - stężenie letalne przy którym występuje śmiertelność 50% organizmów testowych w czasie 24 i 48 godzin,

0,3 - współczynnik stosowalności.

Aquatic Life Advisory Committee etc. /4/ zalecił stosowanie współczynnika 0,1 dla LC50-48h; wartość tę niektórzy badacze uznali za zbyt rygorystyczną /za Sprague 86/. W dalszym okresie obserwowano tendencje do obniżania współczynnika stosowalności np. w Holandii, RFN i Szwajcarii wartości współczynnika wahały się od 0,1 - 0,05 LC50-20 dni /99/.

W amerykańskim Water Quality Criteria of 1972 /101/ przyjęto trzy uniwersalne współczynniki stosowalności:

dla pojedynczych substancji

- 0,1 - dla substancji nietrwałych /okres półtrwania < 4 dni /i niekumulujących się, przy czym stężenie bezpieczne równe 0,1 LC50-96h nie powinno być przekroczone, a 24 godzinne średnie stężenie nie powinno być wyższe od 0,05 LC50-96h.
- 0,05 - dla substancji trwałych i kumulujących się w środowisku, przy czym stężenie bezpieczne nie powinno przekraczać wartości 0,05 LC50-96h, a 24 godzinne średnie stężenie - 0,01 LC50-96h.

dla mieszanin substancji o n składnikach stężenia

bezpieczne wylicza się ze wzoru :

$$SC = \sum_{i=1}^n \frac{Ci}{Li}$$

gdzie:

SC - stężenie bezpieczne

Ci - znane lub przewidywane stężenie każdego składnika

Li - stężenie bezpieczne każdego składnika określone przy użyciu odpowiedniego współczynnika stosowalności.

Wadą tej metody jest zakładanie efektu sumującego mieszaniny bez uwzględnienia działania synergistycznego i antagonistycznego pomiędzy składnikami.

W Polsce, Solski /83/ zalecił stosowanie współczynników w zakresie od 0,1 do 0,01 w zależności od właściwości toksykodynamicznych trucizn wyrażonych wskaźnikami: trwałość reakcji, kumulacja i trwałość toksycznego działania.

W 1982 r. Buikema i wsp. /19/, dokonując oceny wyznaczania stężeń bezpiecznych na podstawie przyjmowanych arbitralnie wartości współczynników stosowalności stwierdzili, że sposób ten posiada dwie podstawowe wady: wartość LC50 nie określa jednoznacznie efektu działania trucizn szczególnie w przypadku związków kumulujących się oraz wartości przyjętego współczynnika są trudne do weryfikacji na drodze badań naukowych.

2.2. Wyznaczanie stężeń bezpiecznych na podstawie testów chronicznych

Test chroniczny po raz pierwszy przeprowadzony na rybach przez Mounta i Stephana /61/ posłużył do ustalenia stężenia bezpiecznego związku toksycznego.

Autorzy określili maksymalne stężenie toksykanta nie wywierające wpływu na wzrost i reprodukcję ryb oraz wyznaczyli współczynnik stosowalności /AF/. Do obliczeń wzięto pod uwagę stężenie nie oddziałujące na zwierzęta w teście chronicznym do wartości LC50 uzyskanej w teście ostrym :

$$AF = \frac{MATC}{LC50}$$

gdzie :

MATC - maksymalne tolerowane stężenie toksykanta
tj. stężenie bezpieczne

LC50 - stężenie letalne dla połowy populacji testowej określone w czasie 48 do 96 godz.

Autorzy zaproponowali, ażeby wartość uzyskanego współczynnika stosować do ustalania stężeń bezpiecznych dla gatunków nie poddawanych testom chronicznym. Stąd też, stężenie bezpieczne byłoby iloczynem wartości ww. współczynnika i wartości LC50 uzyskanej w teście ostrym na dowolnym gatunku. W Water Quality Criteria of 1972 /101/ podano nieliczne przykłady wartości współczynników stosowalności określonych eksperymentalnie przy użyciu testów chronicznych /tabela 2/. Podkreślić jednak należy, że dla większości związków zostały one ustalone na podstawie testów ostrych zalecanych przez US EPA.

Pomimo, że potwierdzona została zależność pomiędzy wartościami LC50 i maksymalnym tolerowanym stężeniem toksykanta MATC, jednak badania doświadczalne wykazują różnice w wartościach współczynników stosowalności dla toksykantów i organizmów. Mogą się one wahać o dwa rzędy wielkości pomiędzy organizmami dla pojedynczego toksykanta i o cztery rzędy wielkości między toksykantami dla pojedynczego organizmu /50/. Kenega /50/ zaproponował model matematyczny umożliwiający dostosowanie współczynnika stosowalności określonego dla jednego gatunku do innego gatunku. Podobnie inni autorzy /za Buikema i wsp. 19/ stwierdzają, iż współczynniki stosowalności z testów

Tabela 2

Współczynniki stosowalności uzyskane eksperymentalnie
wg Water Quality Criteria of 1972

Związek toksyczny	Organizm testowy	Współczynnik stosowalności / AF /
LAS/detergent/	ryby <i>Pimephales promelas</i>	0,14-0,28-ok.0,21
chlor	ryby <i>Pimephales promelas</i>	0,16
		0,16
siarczki.....	ryby <i>Pimephales promelas</i>	
	<i>Catostomus commersoni</i>	0,1
	ryby <i>Stizostedion vitreum</i>	0,22
miedz.....	kilka gatunków ryb	bliski 0,1
chrom Cr ³⁺	ryby <i>Pimephales promelas</i>	0,037
chrom Cr ⁶⁺	ryby <i>Pimephales promelas</i>	0,03
	ryby <i>Salvelinus fontinalis</i>	0,012
	ryby <i>Salmo gairdneri</i>	0,04
malathion.....	ryby <i>Pimephales promelas</i> i	
	<i>Lepomis macrochirus</i>	0,03
karbaryl.....	różne gatunki ryb	0,02
nikiel.....	ryby <i>Pimephales promelas</i>	0,02
ołów.....	ryby <i>Salmo gairdneri</i>	
	i <i>Salvelinus fontinalis</i>	< 0,02
cynk.....	ryby <i>Pimephales promelas</i>	0,005

chronicznych mogą być wykorzystywane w połączeniu z wartościami LC50 do określania stężenia bezpiecznego dla blisko spokrewnionych gatunków i toksykantów o podobnej strukturze chemicznej.

Z uwagi na pracochłonność przy wykonywaniu testów chronicznych jak i stały wzrost nowoprodukowanych związków chemicznych, w ostatnich latach rozpoczęto poszukiwania metod skróconych do określania stężeń bezpiecznych. Punktem wyjścia do rozwoju tych metod były testy chroniczne. Przyjęto, że organizmy testowe w określonych stadiach rozwojowych wykazują największą wrażliwość na działanie trucizn. Stąd też, testy toksykologiczne z tymi stadiami dają wystarczające informacje o toksykancie i możliwe jest pominięcie badań całego cyklu rozwojowego organizmu. Mc Kim /57/ stwierdził, że dobrym kryterium do określania stężenia bezpiecznego jest wrażliwość embrionalno-larwalnych stadiów życiowych ryb. Podobnie w latach siedemdziesiątych, powszechnie akceptowane testy skrócone opierały się na badaniach wylęgłości larw z jaj, przeżywalności i wzrostu narybku czy wczesnych stadiów młodocianych ryb.

W swojej pracy Buikema i wsp. /19/ podali przykłady testów skróconych, stosowanych przez różnych autorów.

I tak z uwagi na zaburzenia metabolizmu kolagenu u ryb przewidywano przy jakich stężeniach toksykanta nastąpią zakłócenia w ich wzroście. Na podstawie określonego stężenia toksykanta, przy którym ryby wykazywały reakcję unikania można było przewidzieć stężenie powodujące zakłócenia w rozrodzie /za Sprague 87/.

Zdaniem wielu autorów testy ostre i chroniczne oparte na przeżywalności, wzroście i reprodukcji organizmów są najbardziej miarodajne do ustalania stężeń bezpiecznych związków chemicznych w wodach /za Buikema i wsp. 19/. Niezbędne przy ustalaniu stężeń bezpiecznych są także informacje o transformacjach badanych substancji w środowisku, ich właściwości toksykodynamiczne oraz dane charakteryzujące zbiornik do którego mogą się przedostawać.

3. BADANIA TOKSYKOLOGICZNE W ZASTOSOWANIU DO OCENY ZAGROŻENIA WÓD POWIERZCHNIOWYCH

Możliwości wykorzystania wód powierzchniowych do picia i na potrzeby gospodarcze określają odpowiednie rozporządzenia wymagające przeprowadzania oceny pod względem ich jakości i klasyfikacji w zależności od celu przeznaczenia.

Istniejące akta prawne opierają się na wykazach dopuszczalnych stężeń zanieczyszczeń wprowadzanych do wód. Z uwagi jednak na stale zwiększającą się liczbę różnorodnych związków chemicznych występujących w ściekach miejskich i przemysłowych w wielu pracach szczególnie zagranicznych pojawiły się tendencje do opracowania ujednoczonych systemów oceny zagrożenia środowiska wodnego. Ten sposób podejścia ma na uwadze weryfikację metod badawczych jak i przepisów obowiązujących w tym zakresie.

Jedną z prób rozwiązania tego problemu jest zastosowany przez Cairnsa /20/ system decyzyjny, który polega na

kolejno rozszerzanym zakresie badań. Pozwala on na oszacowanie zagrożenia środowiska i umożliwia na tej podstawie podjęcie decyzji co do warunków dopuszczenia badanych związków do wód powierzchniowych /Rys. 1/.

System ten, którego efektem jest stopniowane postępowanie decyzyjne, opiera się na dwóch zasadniczych grupach danych wejściowych, a mianowicie:

- informacjach charakteryzujących związek,
- wynikach testów toksyczności.

Szczegółowy tok postępowania przedstawia się następująco. Wstępną ocenę wartości stężeń toksykanta i jego lokalizacji w środowisku dokonuje się na podstawie:

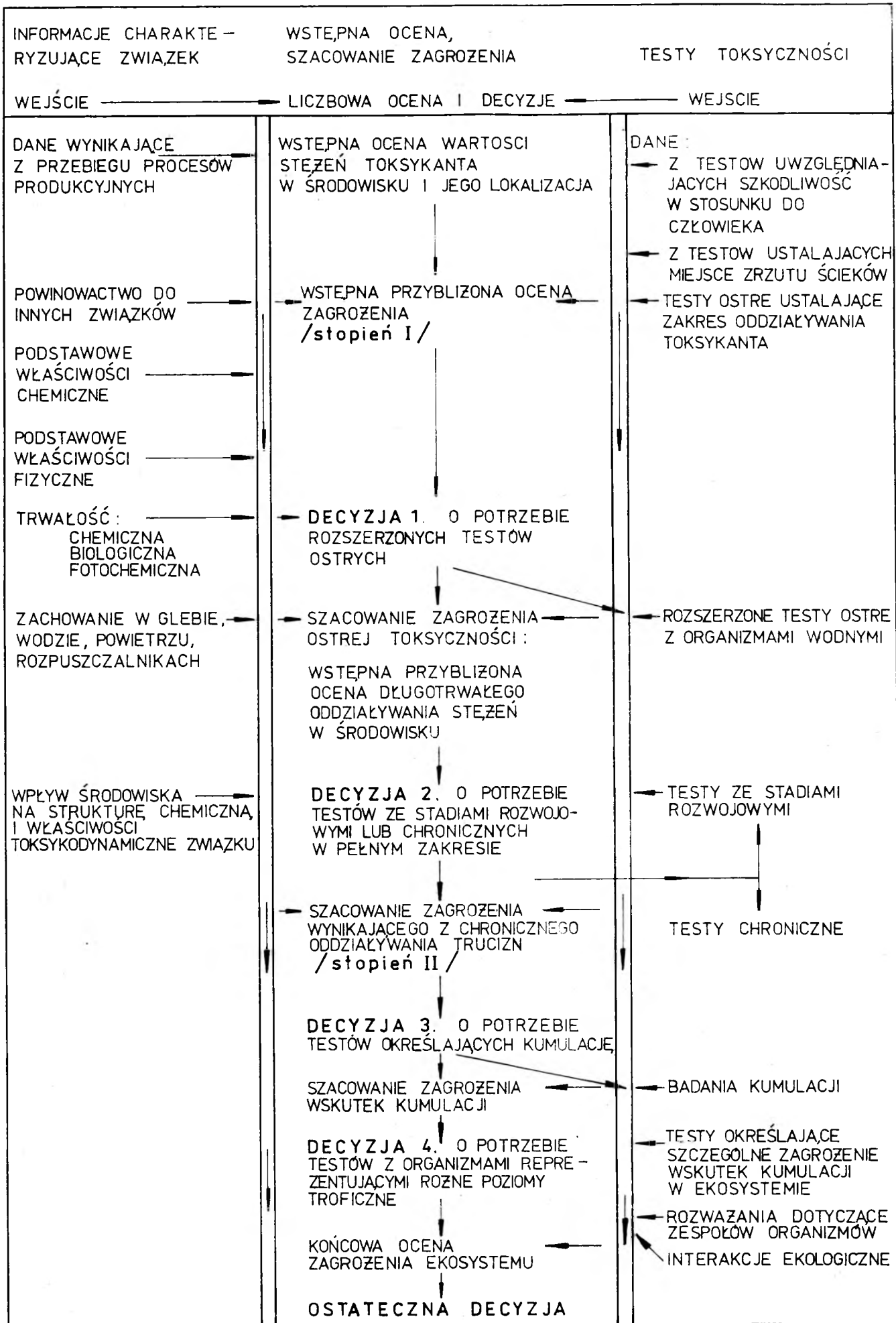
- danych wynikających z przebiegu procesów produkcyjnych,
- testów uwzględniających szkodliwość w stosunku do człowieka,
- testów, których celem jest stwierdzenie miejsca zrzutu ścieków.

Analiza uzyskanych wyników jest podstawą do

I s t o p n i a d z i a ł a n i a, który służy do opracowania przybliżonej oceny zagrożenia środowiska.

Przy formułowaniu tej oceny rozpatruje się dodatkowe informacje zaczerpnięte z banku danych lub z eksperymentów oraz wyniki ostrych testów toksykologicznych. Przewiduje się zebranie danych w zakresie właściwości toksykanta wynikających z jego :

- powinowactwa do innych związków chemicznych o podobnej strukturze chemicznej,



Rys. 1. Schemat systemu decyzyjnego do oceny zagrożenia środowiska wodnego wg Cairnsa 1980

- właściwości fizycznych i chemicznych,
- podatności na rozkład na drodze reakcji chemicznych, fotochemicznych oraz biochemicznych.

Badania podatności związku na rozkład stanowią jeden z elementów wymagających specjalnego potraktowania. W tym celu może być wykorzystany schemat Sterna i Walkera przedstawiony na rys. 2 /za Cairns 20/. Autorzy ci polecają trzy poziomowy układ doświadczeń, a mianowicie :

- różnicowanie związków na trwałe i rozkładalne na podstawie reakcji fotochemicznych i chemicznych,
- określanie stopnia zanikania związku oraz prowadzenie badań biologicznych,
- identyfikacja i oznaczanie ilościowe produktów rozkładu szczególnie wywierających szkodliwy wpływ na człowieka i organizmy wodne.

W wyniku przedstawionego sposobu postępowania badane związki różnicuje się na nierozkładalne i rozkładalne słabo lub w znacznym stopniu.

Równoległe ze zbieraniem informacji o charakterystyce toksykanta uwzględniane są w systemie decyzyjnym dane wejściowe wynikające z badań toksyczności tj.

- testów ostrych wstępnie ustalających zakres oddziaływania toksykanta.

Uzyskane w ten sposób wyniki określają w przybliżeniu zagrożenie środowiska spowodowane obecnością toksykanta. Są więc podstawą do podjęcia PIERWSZEJ DECYZJI o potrzebie wprowadzenia rozszerzonych testów ostrych z organizmami

	REAKCJE FOTOCHEMICZNE		REAKCJE CHEMICZNE			
			UTLENIANIA	REDUKCJI	HYDRO-LITYCZNE	
POZIOM 1 — RÓŻNICOWANIE ZWIĄZKÓW NA TRWAŁE I ROZKŁADALNE	BADANIE AKTYWNOŚCI / 300-400 nm					
	↓ BADANIE CZUŁOŚCI / 254 nm	(+) (-)	(+) (-)	(+) (-)	(+) (-)	
POZIOM 2 — OKREŚLANIE STOPNIA ZANIKANIA ZWIĄZKU / OKRES POŁTRWANIA /						NIE-ROZKŁADALNE
						ROZKŁADALNE
BADANIA AKTYWNOŚCI BIOLOGICZNEJ BADANIA EKOLOGICZNE						SŁABO ROZKŁADALNE
						ROZKŁADALNE W ZNACZNYM STOPNIU
POZIOM 3 — IDENTYFIKACJA I OZNACZANIE IŁOŚCIOWE PRODUKTÓW ROZKŁADU						

Rys.2. Badanie trwałości toksykanta wg Sterna i Walkera 1978

wodnymi. Wyniki tych testów oraz informacje dotyczące właściwości toksykanta, które mają wpływ na środowisko /rozpuszczalność, adsorpcja, desorpcja, wymywanie, lotność/ wykorzystuje się do sformułowania przybliżonej, wstępnej oceny odnośnie długotrwałego oddziaływania jego stężeń na środowisko.

Na tej podstawie podejmuje się DRUGĄ DECYZJĘ o potrzebie wprowadzenia testów ze stadiami rozwojowymi lub chronicznymi w pełnym zakresie.

Dokonuje się tego na podstawie :

- informacji dotyczących wpływu środowiska na strukturę chemiczną i właściwości toksykodynamiczne badanych związków,

i równolegle

- testów, w których ocenia się oddziaływanie toksykanta na stadia rozwojowe bioindykatorów,
- testów chronicznych.

II s t o p i e ń d z i a ń a rozpoczyna się od oszacowania zagrożenia wynikającego z oddziaływania chronicznego toksykanta. Na tej podstawie podejmuje się TRZECIĄ DECYZJĘ o potrzebie wprowadzenia testów określających kumulację. Przeprowadza się badanie kumulacji toksykanta i ocenia się zagrożenie środowiska pod tym względem. Następnie podejmuje się CZWARTĄ DECYZJĘ o potrzebie prowadzenia testów z organizmami reprezentującymi różne poziomy troficzne dla oceny szczególnego zagrożenia ekosystemu wskutek kumulacji związku.

Na podstawie testów oraz badań ekologicznych zespołów organizmów wytypowane zostają te komponenty ekosystemu, które mogą kumulować związek w znacznym stopniu np. małże-filtratory, fauna zasiedlająca osady denne, ryby bentoso-żerne. Na podstawie końcowej oceny zagrożenia spowodowanego wpływem toksykanta na ekosystem, podejmuje się OSTATECZNĄ DECYZJĄ dotyczącą oceny jego szkodliwości.

Z przedstawionego schematu badań wynika, że zapropono-wany system decyzyjny pozwala na kompleksową ocenę stopnia zagrożenia wód przez związki chemiczne, a tym samym daje podstawy do wyznaczania najwyższych dopuszczalnych stężeń zanieczyszczeń odprowadzanych do wód.

Podobne systemy stosowane są w Anglii, Francji, RFN i Japonii /za Cairns 20/. W systemach tych istotne znaczenie mają badania toksykologiczne prowadzone za pomocą testów ostrych i chronicznych.

W Polsce brak jest tego rodzaju ujednoliconych systemów oceny zagrożenia środowiska przez związki chemiczne, szczególnie w odniesieniu do modernizowanych technologii produkcji opartych na nowych surowcach chemicznych. Brak jest także znormalizowanych opracowań metodycznych testów chronicznych, które spełniają podstawową rolę w omawianych systemach decyzyjnych wykorzystywanych w gospodarowaniu wodą.

III. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. CEL I ZAKRES PRACY

Celem pracy było opracowanie metody wyznaczania stężeń bezpiecznych zanieczyszczeń odprowadzanych do wód powierzchniowych na podstawie testu toksyczności chronicznej przy zastosowaniu kielża-*Gammarus varsoviensis* Jażdż./Crustacea, Amphipoda/ jako bioindykatora.

Jako substancję toksyczną wybrano chrom Cr^{6+} , który charakteryzuje się dużą toksycznością i jest częstym składnikiem zanieczyszczeń dostających się do wód powierzchniowych.

Zakres pracy obejmował przeprowadzenie :

- 1/ badań hodowlanych *G.varsoviensis* w warunkach laboratoryjnych celem uzyskania osobników w różnych stadiach wzrostu określonych klasą wielkości;
- 2/ testów ostrych w warunkach statycznych dla określenia zakresu stężeń chromu Cr^{6+} oddziałujących szkodliwie oraz stężenia letalnego LC50-24, 48 i 96h;
- 3/ testów chronicznych w skonstruowanym urządzeniu z ciągłym dopływem toksykanta w celu określenia:
- aktywności pokarmowej osobników *G.varsoviensis* w różnych klasach wielkości i wyznaczenia maksymalnego tolerowanego stężenia chromu Cr^{6+} , nie zakłócającego badanej czynności fizjologicznej u najwrażliwszego stadium wzrostu tzw. MATC₁;

- reprodukcji *G.varsoviensis* aż do uzyskania dwóch kolejnych pokoleń /F₁ i F₂/ oraz wyznaczenia maksymalnego tolerowanego stężenia chromu Cr⁶⁺, nie wywołującego zakłóceń w reprodukcji pokolenia F₁ tzw. MATC₂.

Przedstawiony zakres pracy pozwolił na opracowanie propozycji metodyki testu chronicznego przy użyciu *G.varsoviensis* jako bioindykatora do wyznaczania stężeń bezpiecznych związków szkodliwych odprowadzanych do wód. Umożliwił także wytypowanie odpowiednich parametrów fizjologicznych jako podstawy do wyznaczenia bezpiecznego stężenia chromu Cr⁶⁺ /dopuszczalnego w wodach powierzchniowych/.

2. MATERIAŁ I METODY

2.1. Hodowla *G.varsoviensis*

2.1.1. Woda stosowana do hodowli

Wodę wodociągową do hodowli uzdatniano w biofiltrze. Biofiltr stanowiły dwa zestawy połączonych szeregowo i napowietrzanych akwariów, funkcjonujących w układzie przepływowym. Pojedynczy zestaw stanowiły cztery akwaria, każde o pojemności 45 dm³ zasiedlone roślinami wodnymi, rybami i ślimakami /Fot. 1/. Do pierwszego akwarium w zestawie dozowano wodę wodociągową z szybkością przepływu 540 cm³/godz. przy pomocy pompy dozującej Zalimp typ 315. Uzdatnioną wodę magazynowano w beczkach, dodatkowo napowietrzano i wykorzystywano do hodowli oraz badań toksykologicznych.



Fot. 1 Biofiltr służący do uzdatniania wody
wodociągowej

Okresowo wykonywano badania wody w zakresie :
odczynu pH, zawartości tlenu rozpuszczonego, BZT₅,
twardości ogólnej i obecności wolnego chloru wg
Hermanowicza i wsp. /34/. Z uwagi na wymagania tlenowe
kiełży oraz ich specyficzną gospodarkę wapniową,
związaną z okresowym zrzucaniem i tworzeniem pancerza
chitynowego, ważne jest kontrolowanie zawartości tlenu
rozpuszczonego i twardości wody stosowanej do hodowli.

2.1.2. Dieta pokarmowa

Jako pokarm stosowano namoczone w wodzie wodociągowej
/10-14 dni/ liście wiązu *Ulnus campestris* L. em Huds.
Liście zbierano jesienią, suszono w temperaturze pokojowej
i przechowywano. Jako uzupełnienie diety, zwierzętom
podawano okresowo zielone pędy *Valisneria spiralis* L.
Pokarm podawano w takiej ilości, aby nie był on czynnikiem
limitującym tzn. aby pokrywał zapotrzebowanie organizmów
i nie zalegał w nadmiarze w naczyniach hodowlanych.
Obserwacje pozostałości skonsumowanego pokarmu traktowano
jako pomocniczy wskaźnik do ustalania optymalnej ilości
podawanego pokarmu. Pozostałości pokarmu usuwano, a
świeży pokarm podawany był mniej więcej w odstępach
2-3 dniowych.

W stosowanym pokarmie z preparowanych liści wiązu
wykonywano oznaczenia kontrolne zawartości metali.
W tym celu przeprowadzano mineralizację liści na gorąco
w mieszaninie stężonych kwasów azotowego i nadchlorowego.

Zawartość metali oznaczano spektrofotometrycznie metodą absorpcji atomowej przy użyciu płomienia acetylenowo-powietrznego /cynk, żelazo/, bądź w kuwetach grafitowych metodą elektrotermiczną /chrom, miedź, nikiel, kobalt, kadm, mangan, ołów/wg Unificirovannyje metody 1983 /98/.

2.1.3. Sposób prowadzenia hodowli

Zwierzęta przewożono do laboratorium w pojemnikach z liśćmi oraz wodą pobraną z miejsca ich naturalnego występowania i aklimatyzowano pozostawiając przez okres 24-48 godzin w tych warunkach w temperaturze $18 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Następnie selekcyjując kielże wg wielkości umieszczano je w plastikowych kuwetach, napełnionych wodą z biofiltru /p.p. III. 2.1.1./ napowietrzaną w sposób ciągły. Dla zapewnienia zwierzętom naturalnych warunków bytowania umieszczano w kuwetach liście oraz kamienie różnej wielkości. Zwierzęta karmiono wg p.III. 2.1.2.

Do hodowli dokonywano selekcji kielży następująco : osobniki dorosłe przenoszono do odrębnych kuwet /mateczników/ z których odławiano samice z jajami w komorach lęgowych do osobnych naczyń celem uzyskania młodych. Po uwolnieniu osobników młodych z komór lęgowych, samice wpuszczano do mateczników, a młode hodowano oddzielnie do uzyskania dojrzałości płciowej. W ten sposób otrzymywano nowe mateczniki bazując na materiale wyhodowanym w laboratorium.

Okresowo usuwano nagromadzone odchody zwierząt oraz pozostałości liści po żerowaniu.

Pomieszczenie oświetlano świetlówkami w okresie 16 godzin, zachowując 8 godzinną przerwę nocną w ciągu doby. Natężenie oświetlenia wynosiło ok. 1500 lx. Jednocześnie utrzymywano stałą temperaturę $18 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

2.1.4. Zakres obserwacji prowadzonych w czasie hodowli

Zakres obserwacji prowadzonych w czasie hodowli

G.varsoviesis obejmował określenie :

- 1/ intensywności żerowania zwierząt w zależności od rodzaju pokarmu oraz ich reakcji na podanie nowej porcji pokarmu;
- 2/ przebiegu procesu rozmnażania na podstawie :
 - prekopulacji oraz pojawienia się jaj w komorze lęgowej samicy jako efektu zapłodnienia;
 - czasu rozwoju kielży w komorze lęgowej samicy oznaczonego jako BDT /brood development time/;Jako BDT przyjęto okres czasu upływający od pojawienia się jaj w komorach lęgowych samic do uwolnienia się pierwszych młodych osobników.
- 3/ liczebności osobników młodych w lęgach od samic różnych klas wielkości ;
- 4/ okresu dojścia do dojrzałości płciowej na podstawie pojawienia ^{sie} par w stadium prekopulacji;
- 5/ długości życia kielża.

2.2. Testy toksyczności z *G. varsoviensis*

2.2.1. Organizmy testowe

W badaniach zastosowano kielże uzyskane w hodowli laboratoryjnej. Dla zapewnienia jednolitego materiału testowego pod względem klas wielkości postępowano w sposób następujący :

- z mateczników izolowano samice z obecnością jaj w komorach lęgowych do oddzielnych naczyń;
- młode osobniki po uwolnieniu z komór lęgowych przenoszono do małych kuwet z wodą napowietrzaną /p.p. III. 2.1.1./ i karmiono/wg p. III.2.1.2/;
- po okresie ok. 3 tygodni uzyskiwano najmłodsze stadium wzrostu określone klasą wielkości 2-3 mm;
- dalsze klasy wielkości otrzymywano na drodze dłuższej hodowli;
- uzyskane w ten sposób osobniki selekcjonowano na podstawie długości ciała w mm /mierzonej od wierzchołka głowy do zakończenia odwłoka /oraz kryterium dobrej kondycji uwzględniającej :
 - a/ charakter pancerza nie wskazujący na rozpoczęcie wylinki tj.chitynowa pokrywa ciała opalizująca i błyszcząca oraz widoczny przez nią przewód pokarmowy wypełniony treścią;
 - b/ pływanie na boku ciała, skokowo oraz "przysiadanie" na liściach i kamieniach;
 - c/ natychmiastową reakcję na bodziec mechaniczny.

Na podstawie selekcji wytypowano osobniki z następujących klas wielkości określonych długością ciała w mm :

dorosłe tj. 11-12; 9-10 mm,
będące na granicy dojrzałości płciowej tj. 8-9 mm,
młode tj. 2-3; 3-4; 4-5; 6-7 mm.

2.2.2. Testy ostre

W eksperymentach prowadzonych w warunkach statycznych stosowano dorosłe i młode kielże odpowiednio w klasie wielkości 11-12 mm i 3-4 mm. Jako substancję toksyczną wprowadzono chrom Cr^{6+} w postaci dwuchromianu potasu czd.a. Rozwory testowe sporządzano w szklanych krystalizatorach o objętości 500 i 200 cm^3 , stosując stężenie wyjściowe 44,22 $\text{mg/dm}^3 \text{Cr}^{6+}$ i iloraz postępu geometrycznego rozcieńczeń $q = 1,5$. Do rozcieńczeń wykorzystywano wodę uzyskaną wg p. III. 2.1.1.

Stosowano 3 równoległe powtórzenia, używając po 10 osobników na każde stężenie. Równocześnie wykonywano próbę kontrolną z wodą rozcieńczającą.

W czasie 24 godzin, poprzedzających eksperyment jak również w trakcie jego trwania zwierząt nie karmiono.

Obserwacje zachowania się organizmów prowadzono w czasie 24, 48, 72 i 96 godzin.

Jako kryterium śmierci organizmów przyjęto ich bezruch oraz całkowity brak reakcji na bodziec mechaniczny. Ponadto u organizmów przeżywających określano zespół symptomatologiczny reakcji stosując kryteria zalecane przez Kamińskiego /47/ i Solskiego /82/. Wynik testu

ostrego podawano jako LC50-24, 48 i 96h, co oznacza, że 50 % populacji doświadczalnej wykazywało objawy śmierci w danym czasie. Testy wykonywano zgodnie z metodyką zalecaną w Standard Methods 1975/89/.

2.2.3. Testy chroniczne

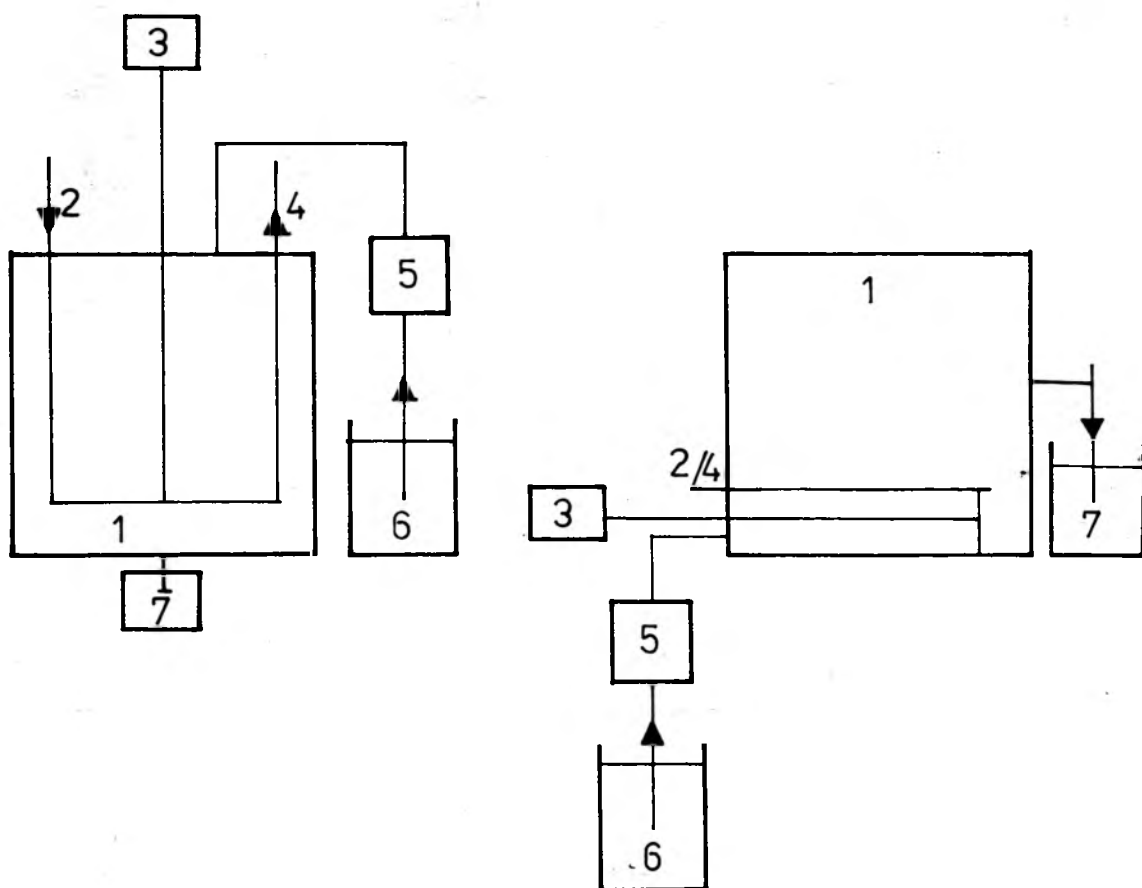
Badania toksyczności chronicznej chromu Cr^{6+} prowadzono w warunkach dynamicznych przy zastosowaniu specjalnie skonstruowanego do tego celu urządzenia.

Urządzenie składało się z szeregu komór testowych wykonanych z plexiglasu, do których doprowadzono w sposób ciągły roztwory toksykanta o określonym stężeniu, tj. chromu Cr^{6+} . Ilość komór zmieniano zależnie od potrzeb eksperymentu.

Schemat budowy pojedynczej komory przedstawia rys. 3. Wymiary ^{komory}wynosiły: 10 cm x 10 cm x 10 cm, objętość - 1 dm³ a objętość robocza - 0,5 dm³. W komorze utrzymywano względnie stałą temperaturę roztworu przez doprowadzenie wody wodociągowej rurką w kształcie litery U umieszczoną na jej dnie. Ponadto zapewniano stały dopływ tlenu tłocząc powietrze za pomocą pompki akwaryjnej typu "Skalar" poprzez krótką perforowaną rurkę.

Roztwory toksykanta dozowano w ilości 90 cm³/godz. przy pomocy pompy dozującej Zalimp typ 315. Każda komora była zaopatrzona w przewód doprowadzający i odprowadzający badane roztwory.

Dwa zestawy komór testowych oraz system dozujący zilustrowano na zdjęciu / Fot. 2/.



rzut z góry

rzut z boku

1. komora testowa
2. dopływ wody do chłodzenia
3. napowietrzacz
4. odpływ wody po chłodzeniu
5. pompa dozująca typ 315
6. zbiornik z roztworem testowym – dopływ
7. zbiornik z roztworem testowym – odpływ

Rys.3. Schemat komory testowej



Fot. 2 Zestaw do badań toksyczności chronicznej
komory testowe w głębi, system dozujący
na pierwszym planie

Testy chroniczne obejmowały badania aktywności pokarmowej i reprodukcji *G. varsoviensis*, osobników dorosłych, będących na granicy dojrzałości płciowej i młodych.

Stężenia chromu Cr^{6+} do badań chronicznych ustalono na podstawie doświadczeń wstępnych, które wykonywano w zakresach stężeń ustalonych w oparciu o wartości $0,1 \text{ LC}_{50-24\text{h}}$ odpowiednio dla dorosłych i młodych osobników /56/. Dla osobników na granicy dojrzałości płciowej przyjęto zakres stężeń jak dla osobników dorosłych. Na podstawie uzyskanych wyników w testach wstępnych, wyznaczono stężenia wyjściowe do dalszych eksperymentów właściwych z osobnikami dorosłymi i będącymi na granicy dojrzałości płciowej oraz młodymi odpowiednio : 210 oraz $180 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$.

Kolejne stężenia ustalano stosując iloraz postępu geometrycznego rozcieńczeń $q = 1,5$.

Okresowo badano ogólną zawartość chromu w dopływie i odpływie z każdej komory.

Przed każdym eksperymentem wyselekcjonowane organizmy odpowiednich klas wielkości przenoszono do komór testowych, napełnionych wodą do rozcieńczeń, na okres 24 godzin i karmiono. Po tym czasie kontrolowano ich kondycję i prawidłowość zachowania się, eliminując osobniki uszkodzone i w razie potrzeby uzupełniając ich ilość. Następnie rozpoczynano eksperymenty właściwe obejmujące badania aktywności pokarmowej i reprodukcji. W czasie testów zwierzęta karmiono podając odpowiednio spreparowane liście wiązu w postaci krążków o średnicy 2 cm/p.p.III.2.1.2. Wymiana pokarmu następowała w odstępach 2-dniowych. Badania wykonywano w dwóch równoległych powtórzeniach.

- Test z aktywnością pokarmową

Badania aktywności pokarmowej przeprowadzono podczas sześciu 32-dniowych eksperymentów.

Stosowano kielże w następujących klasach wielkości :

- dorosłe tj. 11-12; 9-10 mm;
- będące na granicy dojrzałości płciowej tj. 8-9 mm;
- młode tj. 2-3; 4-5; 6-7 mm.

Każdą grupę zwierząt eksperymentalnych w ilości 10 osobników przypadających na jedną komorę, ważono na początku i na końcu doświadczenia. Wyniki podawano w mg. Pokarm ważono przed i po żerowaniu zwierząt, podając wyniki w mg mokrej masy.

Na tej podstawie określano przyrost ciężaru ciała /mg/, ogólną ilość pobranego pokarmu /mg/ oraz współczynnik pokarmowy wyliczony ze stosunku ilości pobranego pokarmu do przyrostu ciężaru ciała jednego osobnika.

Codziennie prowadzono obserwacje przeżywalności i określano ilość osobników przeżywających pod koniec testu.

Dońcowy wynik testów z aktywnością pokarmową prezentowano w postaci $MATC_1$ tj. maksymalnego tolerowanego stężenia chromu Cr^{6+} , które nie powodowało zmian w aktywności pokarmowej kielży określonej klasy wielkości.

- Test z reprodukcją

Badania reprodukcji do uzyskania dwóch kolejnych pokoleń prowadzono z osobnikami dwóch klas wielkości: 8-9 mm tj. będącymi na granicy dojrzałości płciowej i 4-5 mm tj. młodymi, które stanowiły odpowiednio pokolenia rodzicielskie P i P'. Eksperymenty obejmowały badania reprodukcji pokoleń rodzicielskich P i P'

oraz uzyskanych pokoleń F_1 i F'_1 odpowiednio w ciągu 160, a następnie 260 dni. W badaniach stosowano dla pokoleń P i P' oraz F_1 i F'_1 - 20 oraz 15 organizmów w każdej komorze.

Obserwacje rozmnażania pokoleń rodzicielskich P i P' rozpoczynano od pojawienia się par w stadium prekopulacji. Zakres obserwacji obejmował określenie :

- czasu pojawienia się jaj w komorach lęgowych samic,
- liczby samic z obecnością jaj w komorach lęgowych,
- liczby lęgów.

Po stwierdzeniu obecności samic z jajami w komorach lęgowych odławiano je do osobnych naczyń i eksponowano w warunkach statycznych. W 2-dniowych odstępach czasu wymieniano roztwory i karmiono organizmy. Codzienne obserwacje dotyczyły kształtu i wielkości komór lęgowych samic oraz barwy zarodków w miarę postępującego ich rozwoju. W każdym badanym stężeniu chromu Cr^{6+} i w kontroli określano ponadto:

- czas rozwoju kiełży w komorach lęgowych samic tzw. BDT obejmujący okres od pojawienia się jaj do uwolnienia pierwszych młodych osobników / p.p. III. 2.1.4 /
- liczebność osobników młodych w lęgu;
- ogólną liczbę osobników młodych uwolnionych przez samice.

Podczas nieprawidłowego rozwoju kiełży notowano ilość przypadków wcześniejszego lub późniejszego uwolnienia zdegenerowanych zarodków aniżeli wyznaczony czas BDT.

Po uzyskaniu pokoleń F_1 i F'_1 młode osobniki eksponowano w dalszym ciągu w warunkach statycznych, jak uprzednio, a następnie w dynamicznych do otrzymania pokoleń F_2 i F'_2 . Obserwacji reprodukcji pokoleń F_1 i F'_1 dokonywano jak w przypadku pokoleń rodzicielskich P i P'.

Prowadzono również ciągłe obserwacje przeżywalności i określano ilość osobników przeżywających pod koniec testu.

W wyniku testów z reprodukcją określano maksymalne tolerowane stężenia chromu Cr^{6+} , które nie wywoływały zmian w reprodukcji pokoleń F_1 i F'_1 uzyskanych od osobników intoksykowanych od stadium wzrostu określonego klasą wielkości 8-9 mm i 4-5 mm tzw. MATC₂.

2.2.4. Metody interpretacji wyników

Wpływ toksycznego oddziaływania chromu Cr^{6+} w testach ostrych oceniano na podstawie przeżywalności organizmów w stosunku do początkowej liczby osobników stosowanych w doświadczeniu oraz w porównaniu do próby kontrolnej. Wynik toksyczności ostrej wyrażano jako LC50-24, 48 i 96h tj. stężenie letalne dla 50 % organizmów użytych w teście po określonym czasie kontaktu z toksykantem. Stężenie LC50 określano metodą probitową /102/.

W testach chronicznych z aktywnością pokarmową kryteria oceny toksycznego wpływu chromu stanowiły następujące wskaźniki: ilość pokarmu pobranego przez ^{jednego} osobnika w mg w ciągu 32-dniowego eksperymentu, średni przyrost ciężaru jego ciała w mg oraz współczynnik pokarmowy, który wyliczano

ze stosunku ilości pobranego pokarmu do przyrostu ciężaru ciała jednego osobnika.

Zmiany aktywności pokarmowej u zwierząt intoksykowanych chromem Cr^{6+} określano na podstawie spadku lub wzrostu współczynnika pokarmowego w porównaniu do próby kontrolnej. Mniejsza wartość współczynnika pokarmowego w eksperymentach z chromem Cr^{6+} od jego wartości w kontroli oznacza stymulację /-/, zaś większa hamowanie /+/ aktywności pokarmowej. Przyjęto założenie, że wpływ toksykanta stymulujący /-/ lub hamujący /+/ określa procentowa wartość współczynnika w odniesieniu do jego wartości w próbie kontrolnej w wartościach bezwzględnych tj.:

brak wpływu	10,0 - 5,01 %
słaby wpływ	15,0 - 30,01 %
znacznym wpływ	> 30,01 %

W testach chronicznych z reprodukcją kryteriami oceny toksycznego wpływu chromu Cr^{6+} były występowanie lęgów o określonej liczebności osobników młodych oraz przyjęty wskaźnik reprodukcji tj. średnia liczebność osobników młodych w lęgu.

Szkodliwe oddziaływanie chromu Cr^{6+} na reprodukcję kielży określano na podstawie spadku wskaźnika reprodukcji w porównaniu do jego wartości w próbie kontrolnej oraz uzyskania nieprawidłowego rozwoju i eliminacji zdegenerowanych zarodków *G. varsoviensis*.

Wyniki testów chronicznych prezentowano w postaci MATC_1 i MATC_2 tzn. maksymalnych tolerowanych stężeń chromu Cr^{6+} ,

które nie wywoływały zmian przyjętych parametrów tj. aktywności pokarmowej i reprodukcji kielży określonej klasy wielkości. Stężenie bezpieczne chromu Cr^{6+} ustalono w oparciu o wartości tzw. $MATC_1$ i $MATC_2$ uzyskane odpowiednio dla najwrażliwszej klasy wielkości osobników w badaniach aktywności pokarmowej i reprodukcji.

3. WYNIKI BADAŃ

3.1. Hodowla *G. varsoviensis*

Podstawowym warunkiem prowadzenia hodowli laboratoryjnej kielży było zapewnienie im odpowiedniej wody jako środowiska bytowania i pokarmu.

W tym celu przeprowadzono próby porównawcze hodowli przy użyciu wody naturalnej ze zbiornika, z którego pochodziły kielże oraz wody wodociągowej uzdatnionej w filtrze węglowym i biofiltrze. Dokonano również wyboru rodzaju pokarmu.

Najlepsze rezultaty uzyskano z wodą wodociągową uzdatnioną w biofiltrze, co potwierdziły obserwacje przeżywalności, kondycji i zachowania się młodych i dorosłych osobników *G. varsoviensis*. Woda uzdatniona charakteryzowała się właściwościami fizyczno-chemicznymi, które podano poniżej :

Nazwa oznaczenia	Zakres
Odczyn pH	7,1 - 7,8
Tlen rozpuszczony mg/dm ³ O ₂	8,5 - 9,0
BZT ₅ mg/dm ³ O ₂	0,80- 1,50
Twardość ogólna mval/dm ³	3,8 - 5,2
Wapń mg/dm ³ Ca	58,6 -72,6
Chlor	brak

Ilość tlenu rozpuszczonego w wodzie po przejściu przez biofiltr utrzymywała się w granicach 8,5-9,0mg/dm³O₂.

Wartości BZT₅ zmieniały się w niewielkich granicach od 0,80 do 1,50mg/dm³O₂. Twardość ogólna wody w czasie prowadzenia hodowli utrzymywała się na poziomie od 3,8 do 5,2 mvala/dm³. Zawartość wapnia kształtowała się w granicach od 58,6 do 72,6 mg/dm³Ca. Odczyn wody pH wahał się od 7,1 do 7,8.

Analizę wymagań pokarmowych *C.varsoviensis* przeprowadzono stosując początkowo jako pokarm liście topoli *Populus tremula* L., olchy *Alnus glutinosa* /L./Gaertn. i wiązu *Ulnus campestris* L.em.Huds., a następnie uzupełniono go dodatkiem zielonych pędów roślin wodnych: *Potamogeton* sp., *Myriophyllum spicatum* L. i *Valisneria spiralis* L.

Na podstawie obserwacji pozostałości nieskonsumowanego pokarmu stwierdzono, że kielże, spośród trzech gatunków drzew liściastych chętniej konsumowały liście wiązu i olchy preferując liście dłużej moczone w wodzie.

Z podawanych okresowo roślin wodnych kielże najchętniej żerowały na *V. spiralis*. Jako pokarm więc wybrano liście wiązu moczone ok. 14 dni w wodzie wodociągowej. Okresowo dla urozmaicenia diety dodawano zielone pędy *V. spiralis*.

Określano zawartość metali w liściach podawanych zwierzętom jako pokarm. Ilości te wahały się w następujących granicach: Pb 0,5-0,8; Cr 0,7-1,2; Cu 5,2-7,6; Zn 18,3-28,4; Fe 190-212; Mn 32-40; Cd 0,05-0,2; Co 0,4-0,6; Ni 1,5-2,1 mg/kg.s.m. Stwierdzić należy, że zawartości te nie są wysokie. Mieszczą się one w granicach wartości podawanych dla drzew ze stanowisk traktowanych jako kontrolne tj. położonych na terenie parków, z dala od arterii komunikacyjnych / 22,23,24,53/.

Zaobserwowano również reakcję kielży na podawanie nowych porcji pokarmu charakteryzującą^{ca} się natychmiastowym podplynięciem i rozpoczęciem żerowania. Reakcję tę wykazywały osobniki znajdujące się w dobrej kondycji, bez objawów wylinki.

Dokonując obserwacji procesu rozmnażania *G. varsoviensis* stwierdzono, że dojrzałe samce i samice w okresie prekopulacji, obejmującym najczęściej 2-5 dni pływały połączone razem. Po zapłodnieniu w komorach lęgowych pojawiały się jaja. W początkowym okresie komory lęgowe były słabo wysklepione, a poprzez tworzące je blaszkowate oostegity przeświecały ciemne warstwy jaj. W miarę postępującego rozwoju zarodków komory lęgowe powiększały się wskutek rozsuwania się oostegitów. Widoczne poprzez nie zarodki przybierały zabarwienie żółtobrazowe. Około 2-3 dni przed uwolnieniem młodych osobników, komory lęgowe powiększały się znacznie i przybierały kolor jasnopomarańczowy charakterystyczny dla obecności osobników młodych. Uwalnianie

ich z komory lęgowej odbywało się w ciągu 1-3 dni. Zaobserwowano również, że samice mogły być powtórnie zapładniane bezpośrednio po uwolnieniu osobników młodych.

Liczebność osobników młodych w lęgu zależna była od wieku i wielkości ciała samicy. Zależność tę obrazuje poniższa tabela:

Klasa wielkości samic ♀♀ /mm/	Liczebność osobników młodych w lęgach uzyskanych od 5 samic	Średnia liczebność osobników młodych w lęgu
9	5, 9, 8, 7, 10	7,8
10-11	10, 10, 18, 12, 17	13,4
11-12	24, 15, 23, 19, 18	19,8
12-13	42, 30, 27, 25, 29	30,6
13-14	40, 37, 37, 34, 32	36,0
14-15	69, 54, 48, 45, 56	54,4

U kilkudziesięciu zbadanych samic liczebność osobników młodych wahała się od 5 / ♀ 9 mm/ do 69 / ♀ 14-15 mm/.

Liczebność osobników młodych w lęgu samic o długości ciała 9 mm wynosiła średnio 7,8. Dla samic w dalszych klasach wielkości wynosiła odpowiednio : ♀♀ 10-11 mm - 13,4;

♀♀ 11-12 mm - 19,8; ♀♀ 12-13 mm - 30,6; ♀♀ 13-14 mm - 36,0;

♀♀ 14-15 mm - 54,4 osobników.

Na podstawie przeprowadzonych badań hodowlanych *G.varsoviensis* w temperaturze $18 \pm 1^{\circ}\text{C}$ stwierdzono, że :

- czas rozwoju kielży w komorach lęgowych samic /tzw. BDT/ wynosił ok. 16-17 dni;
- okres dojścia do dojrzałości płciowej wynosił ok. 6-7 miesięcy;
- okres życia trwał ok. 1,5 roku, choć może być również dłuższy.

W warunkach naturalnych w okresie zimowym *G.varsoviensis* nie rozmnaża się. Natomiast w warunkach laboratoryjnych przy zachowaniu przyjętej metodyki hodowli /p.p. III.2.1./, kielże rozmnażały się również w okresie zimowym.

Największe okazy kielży w hodowli charakteryzowały się długością ciała przeciętnie w granicach 17-18 mm. Długość ciała największego samca wynosiła 20 mm, zaś samicy - 19 mm. Były to stare osobniki kończące już swą rolę w populacji.

Podsumowując należy podkreślić, że uzyskane wyniki badań hodowlanych *G.varsoviensis* wykorzystano jako punkt odniesienia do oceny reakcji kielża pod wpływem chromu Cr^{6+} jako toksykanta.

3.2. Testy ostre z *G.varsoviensis*

Wykonano badania w zakresie toksyczności ostrej chromu Cr^{6+} w stosunku do osobników dorosłych w klasie wielkości 11-12 mm i młodych w klasie wielkości 3-4 mm. Badania z osobnikami dorosłymi przeprowadzono w zakresie stężeń od 44,22 do 0,15 $\text{mg/dm}^3\text{Cr}^{6+}$, zaś z młodymi - od 44,22 do 0,07 $\text{mg/dm}^3\text{Cr}^{6+}$. Wyniki testów z osobnikami dorosłymi i młodymi przedstawiają tabele 3 i 4.

W początkowej fazie reakcji / tj. kilka minut po wpuszczeniu zwierząt do roztworów / obserwowano w obecności

Tabela 3

Test ostry - śmiertelność osobników dorosłych *G.varsoviensis*
w klasie wielkości 11-12 mm

Stężenie wyjściowe chromu - $44,22 \text{ mg/dm}^3 \text{Cr}^{6+}$; $q=1,5$
Ilość zwierząt w każdym stężeniu - 30

Stężenie mg/dm^3		Czas /godz/			
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Cr^{6+}	24	48	72	96
125,0	44,22	30	30	30	30
83,33	29,48	30	30	30	30
55,55	19,65	30	30	30	30
37,04	13,10	29	29	30	30
24,69	8,73	24	30	30	30
16,46	5,82	17	30	30	30
10,97	3,88	12	30	30	30
7,32	2,59	6	24	30	30
4,88	1,72	0	18	27	30
3,25	1,15	0	10	21	24
2,17	0,77	0	0	16	21
1,44	0,51	0	0	6	12
0,96	0,34	0	0	0	5
0,64	0,23	0	0	0	0
0,43	0,15	0	0	0	0
0,0 kontrola		0	0	0	0

toksykanta wzrost aktywności lokomotorycznej u dorosłych i młodych osobników *G.varsoviensis*.

Doświadczenia z dorosłymi osobnikami kielża wykazały, że w miarę upływu czasu od 24 do 96 godzin, efekt toksyczny chromu, którego kryterium oceny była śmierć organizmów, występował w coraz szerszym zakresie stopniowo malejących stężeń tego toksykanta. Stwierdzono, że po 24 godzinach chrom w stężeniach od 44,22 do 19,65 mg/dm³Cr⁶⁺ powodował 100 % śmiertelność, po upływie 48 godzin efekt ten zaobserwowano przy zmniejszających się jego stężeniach do 3,88 mg/dm³Cr⁶⁺, a po 96 nawet do 1,72 mg/dm³Cr⁶⁺.

Podobnie w czasie kształtował się przyrost reakcji testowej, której objawami była śmiertelność pewnej liczby osobników oraz zespół symptomów obejmujący zaburzenia koordynacji ruchowej, równowagi i zmniejszenie reaktywności na bodziec określany jako porażenie.

W stężeniach od 13,10 do 2,59 mg/dm³Cr⁶⁺ po 24 godzinach zanotowano śmiertelność w granicach od 96,7 do 20,0 %, po 48 godzinach stwierdzono od 80,0 do 33,3 % martwych kielży w próbach o malejących stężeniach do 1,15 mg/dm³Cr⁶⁺, a po 96 godzinach śmiertelność wynosiła od 80,0 do 16,7 % aż do stężenia 0,34 mg/dm³Cr⁶⁺. Wszystkie osobniki pozostałe przy życiu wykazywały objawy porażenia opisane wyżej. Objawy te występowały również przy 100% przeżywalności kielży w mniejszych stężeniach niż opisane wyżej tj. od 1,72 do 0,51; od 0,77 do 0,34 i w stężeniu 0,23 mg/dm³Cr⁶⁺ odpowiednio po 24, 48 i 96 godzinach.

Analiza toksyczności chromu przy najniższych jego stężeniach tj. 0,34; 0,23; 0,15 mg/dm³Cr⁶⁺ po 24 godzinach i 0,23; 0,15 mg/dm³Cr⁶⁺ po 48 godzinach oraz 0,15 mg/dm³Cr⁶⁺ po 96 godzinach intoksykacji wykazała, że zachowanie się zwierząt nie różniło się od zachowania się zwierząt kontrolnych.

Na podstawie eksperymentów z młodymi osobnikami stwierdzono, że reagowały one w szerszym zakresie stężeń niż osobniki dorosłe. Tak więc, 100 % śmiertelność kielży zaobserwowano po 24 i 48 godzinach w stężeniach od 44,22 do 3,88 mg/dm³Cr⁶⁺, a po 96 godzinach w stężeniach jeszcze niższych tj. do 1,15 mg/dm³Cr⁶⁺.

Przyrost reakcji testowej w czasie objawiający się śmiertelnością pewnej liczby osobników młodych oraz ich porażeniem wykazywał podobne tendencje jak u osobników dorosłych tj. zaznaczał się w miarę upływu czasu w coraz szerszym zakresie stopniowo malejących stężeń.

W stężeniach od 2,59 do 0,77 mg/dm³Cr⁶⁺ zaobserwowano po 24 godzinach od 83,3 do 26,7 % śmiertelności młodych kielży, zaś po upływie 48 godzin - odpowiednio od 96,7 do 43,3 %. Po 96 godzinach, w stężeniach malejących do 0,15 mg/dm³Cr⁶⁺ zanotowano od 80,0 do 20,0 % martwych osobników. Pozostałe przy życiu kielże znajdowały się w stanie porażenia. Objawy te wykazywały również niektóre osobniki w jeszcze niższych stężeniach tj. 0,51 i 0,34; 0,34 i 0,23 oraz 0,10 mg/dm³Cr⁶⁺ odpowiednio po 24, 48 i 96 godzinach.

Analizując reakcje młodych kielży przy najniższych stężeniach chromu tj. od 0,23 do 0,07 mg/dm³Cr⁶⁺ po 24 godzinach oraz od 0,15 do 0,07 mg/dm³Cr⁶⁺ po 48 godzinach jak również

Tabela 4

Test ostry - śmiertelność osobników młodych *G. varsoviensis*
w klasie wielkości 3-4 mm

Stężenie wyjściowe chromu - $44,22 \text{ mg/dm}^3 \text{Cr}^{6+}$; $q=1,5$

Ilość zwierząt w każdym stężeniu - 30

Stężenie mg/dm^3		Czas /godz/			
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Cr^{6+}	24	48	72	96
125,0	44,22	30	30	30	30
83,33	29,48	30	30	30	30
55,55	19,65	30	30	30	30
37,04	13,10	30	30	30	30
24,69	8,73	30	30	30	30
16,46	5,82	30	30	30	30
10,97	3,88	30	30	30	30
7,32	2,59	25	29	30	30
4,88	1,72	19	29	30	30
3,25	1,15	14	28	30	30
2,17	0,77	8	13	23	24
1,44	0,51	0	1	10	18
0,96	0,34	0	0	5	16
0,64	0,23	0	0	0	12
0,43	0,15	0	0	0	6
0,28	0,10	0	0	0	0
0,19	0,07	0	0	0	0
0,0	Kontrola	0	0	0	0

w stężeniu $0,07 \text{ mg/dm}^3 \text{Cr}^{6+}$ po 96 godzinach stwierdzono, że zachowanie się ich nie wykazywało różnic w stosunku do zachowania się zwierząt w kontroli.

Na podstawie uzyskanych wyników testów przeprowadzonych z osobnikami dorosłymi i młodymi wyliczono wartości LC50-24, 48 i 96h, które zestawiono poniżej :

Osobniki G.varsoviensis klasa wielkości / mm/	Wartości LC50 [$\text{mg/dm}^3 \text{Cr}^{6+}$] dla przedziałów czasowych		
	24h	48h	96h
dorośle			
11-12	4,74	1,50	0,58
młode			
3-4	1,20	0,89	0,33

Z tabeli widać, że wartości stężenia letalnego chromu LC50 określone dla dorosłych i młodych osobników zmniejszały się w miarę trwania eksperymentu. Świadczy to o tzw. przyroście reakcji testowej. Ponadto widać znaczne różnice w uzyskanych wartościach LC50-24,48, i 96h dla organizmów obu klas wielkości. Osobniki młode reagowały po upływie 24 godzin 50% śmiertelnością w ok. 4-krotnie niższych stężeniach Cr^{6+} niż osobniki dorosłe. Po upływie 48 i 96 godzin śmiertelność połowy populacji testowej osobników młodych wystąpiła w stężeniach ok. 2-krotnie niższych niż osobników dorosłych. Uzyskane dane świadczą o większej wrażliwości na chrom Cr^{6+} młodych osobników G.varsoviensis.

Podkreślić należy, że zarówno dorosłe jak i młode osobniki wykazywały w obecności chromu Cr^{6+} objawy śmiertelne, jak również reakcje symptomatologiczne obejmujące zwiększenie aktywności lokomotorycznej w początkowej fazie kontaktu z chromem Cr^{6+} oraz zespół objawów takich jak zaburzenia koordynacji ruchowej, równowagi i zmniejszona reaktywność na bodziec określony przez Kamińskiego /47/ i Solskiego /82/ jako porażenie.

Uzyskane wartości $\text{LC}_{50-24\text{h}}$ dla dorosłych i młodych osobników stanowiły podstawę do wyznaczenia zakresów stężeń chromu Cr^{6+} stosowanych w badaniach chronicznych. Wartości $\text{LC}_{50-96\text{h}}$ posłużyły do wyliczenia współczynnika stosowalności /AF/, zalecanego do określania stężenia bezpiecznego chromu Cr^{6+} dla innych gatunków *Gammarus*, nie poddawanych badaniom chronicznym.

3.3. Testy chroniczne z *G.varsoviensis*

3.3.1. Aktywność pokarmowa

Wykonano sześć 32-dniowych eksperymentów, w których badano wpływ chromu Cr^{6+} na aktywność pokarmową *G.varsoviensis*, osobników dorosłych, będących na granicy dojrzałości płciowej i młodych. Badania z osobnikami dorosłymi i będącymi na granicy dojrzałości płciowej przeprowadzono w zakresie stężeń od 18 do 210 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$, zaś z młodymi - od 16 do 180 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$.

W liściach podawanych jako pokarm określano zawartość metali. Mieściła się ona w granicach wartości podobnie jak dla pokarmu podawanego kielżom w hodowli /p.p.III.3.1/

Podczas trwania eksperymentów okresowo badana ogólna zawartość chromu nie wykazywała znacznych różnic w dopływie i odpływie z każdej komory.

Interpretację uzyskanych wyników badań aktywności pokarmowej przeprowadzono wg p.III.2.2.4 analizując ogólną ilość pokarmu pobranego przez jednego osobnika w czasie 32-dniowego okresu trwania eksperymentu, średni przyrost ciężaru jego ciała oraz przeżywalność wszystkich testowanych organizmów. Aktywność pokarmową określano na podstawie współczynnika pokarmowego, który wyliczono, ze stosunku ilości pobranego pokarmu do przyrostu ciężaru ciała jednego osobnika. Przyjęto założenie, że wpływ toksykanta stymulujący /-/ lub hamujący /+/ określa procentowa wartość współczynnika w odniesieniu do próby kontrolnej w wartościach bezwzględnych tj.:

brak wpływu	0,0 - 5,0 %
słaby wpływ	5,0 - 30,0 %
znaczny wpływ	> 30,0 % / p.p.III.2.2.4 /

Zakresy stężeń o zbliżonym oddziaływaniu chromu Cr^{6+} omawiano na podstawie wartości minimalnych i maksymalnych badanych parametrów.

Testy z organizmami dorosłymi

W badaniach stosowano osobniki z klas wielkości 11-12 mm i 9-10 mm. Zakres stężeń chromu wynosił od 18 do 210 $\mu g/dm^3 Cr^{6+}$. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabelach 5-9 oraz na rys.4,7.

Analiza wpływu chromu Cr^{6+} podczas intoksykacji organizmów dorosłych obu klas wielkości wykazała, że wartości ogólnej

Tabela 5

Test chroniczny - aktywność pokarmowa osobników dorosłych
G.varsoviensis w klasie wielkości 11-12 mm

Stężenie wyjściowe chromu - $210 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$; $q = 1,5$

Ilość zwierząt w każdym stężeniu - 20

Czas trwania eksperymentu - 32 dni

Stężenie $\mu\text{g}/\text{dm}^3$		Ogólna ilość pobranego pokarmu	Początkowy ciężar ciała	Końcowy ciężar ciała	Przyrost ciężaru ciała w czasie ekspery- mentu	Współ- czynnik pokar- mowy
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Cr^{6+}	/mg/	/mg/	/mg/	/mg/	
595	210	144,77	34,25	36,50	2,25	64,22
397	140	134,16	36,95	39,70	2,75	48,98
265	94	100,46	37,25	38,27	1,02	98,49
176	62	102,27	35,90	36,92	1,02	100,66
118	42	104,27	36,70	36,76	1,06	98,63
78	27	100,77	36,65	37,60	0,95	106,18
52	18	103,02	36,97	37,95	0,98	105,12
0,0						
Kontrola		100,15	35,25	36,22	0,97	102,81

Podano wartości średnie w przeliczeniu na jednego osobnika

Tabela 6

Test chroniczny - przeżywalność osobników dorosłych
G.varsoviensis w klasie wielkości 11-12 mm

Stężenie wyjściowe chromu - $210 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$; $q = 1,5$

Ilość zwierząt w każdym stężeniu - 20

Czas trwania eksperymentu - 32 dni

Stężenie $\mu\text{g}/\text{dm}^3$		Czas / godz., dni /						
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Cr^{6+}	24 h	48 h	96h	8 dni	16 dni	24 dni	32 dni
595	210	20	20	20	14	10	8	6
397	140	20	20	20	16	12	8	8
255	94	20	20	20	16	16	16	16
176	62	20	20	20	20	20	20	20
118	42	20	20	20	20	20	20	20
78	27	20	20	20	20	20	20	20
52	18	20	20	20	20	20	20	20
0,0	Kontrola	20	20	20	20	20	20	20

Tabela 7

Test chroniczny - aktywność pokarmowa osobników dorosłych
G.varsoviensis w klasie wielkości 9-10 mm

Stężenie wyjściowe chromu - $210 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$; $q = 1,5$

Ilość zwierząt w każdym stężeniu - 20

Czas trwania eksperymentu - 32 dni

Stężenie $\mu\text{g}/\text{dm}^3$		Ogólna ilość pobranego pokarmu /mg/	Początkowy ciężar ciała /mg/	Końcowy ciężar ciała /mg/	Przyrost ciężaru ciała w czasie ekspery- mentu /mg/	Współ- czynnik pokarmo- wy
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Cr^{6+}					
595	210	162,40	14,65	17,60	2,95	55,34
397	140	159,44	12,95	16,85	3,90	40,87
265	94	130,51	11,27	12,71	1,44	90,59
176	62	126,23	13,32	14,67	1,35	93,50
118	42	116,77	11,72	13,03	1,31	88,96
78	27	117,30	13,14	14,43	1,29	90,94
52	18	114,49	12,96	14,20	1,27	90,15
0,0 Kontrola		114,62	12,43	13,68	1,25	91,75

Podano wartości średnie w przeliczeniu na jednego osobnika

Tabela 8

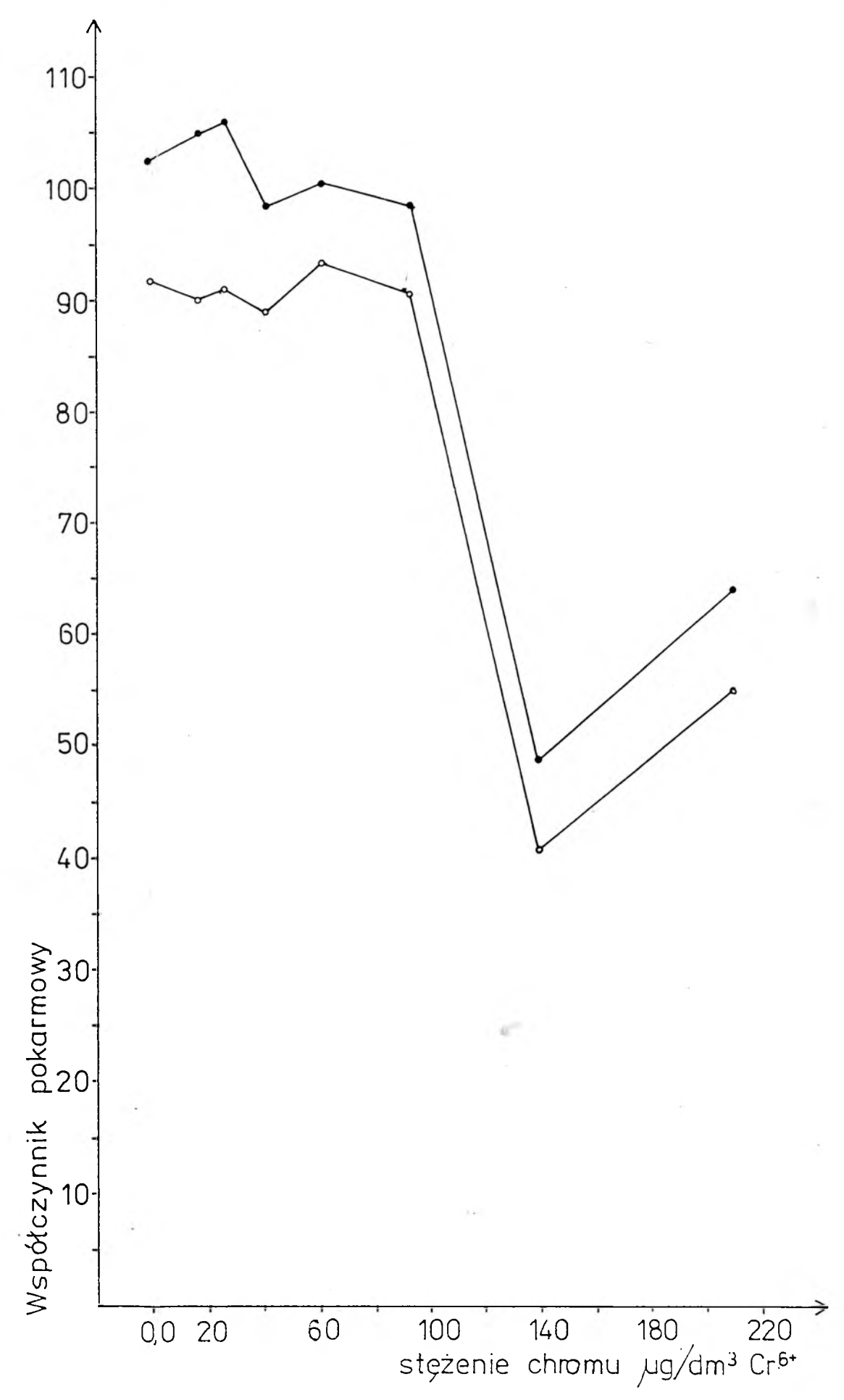
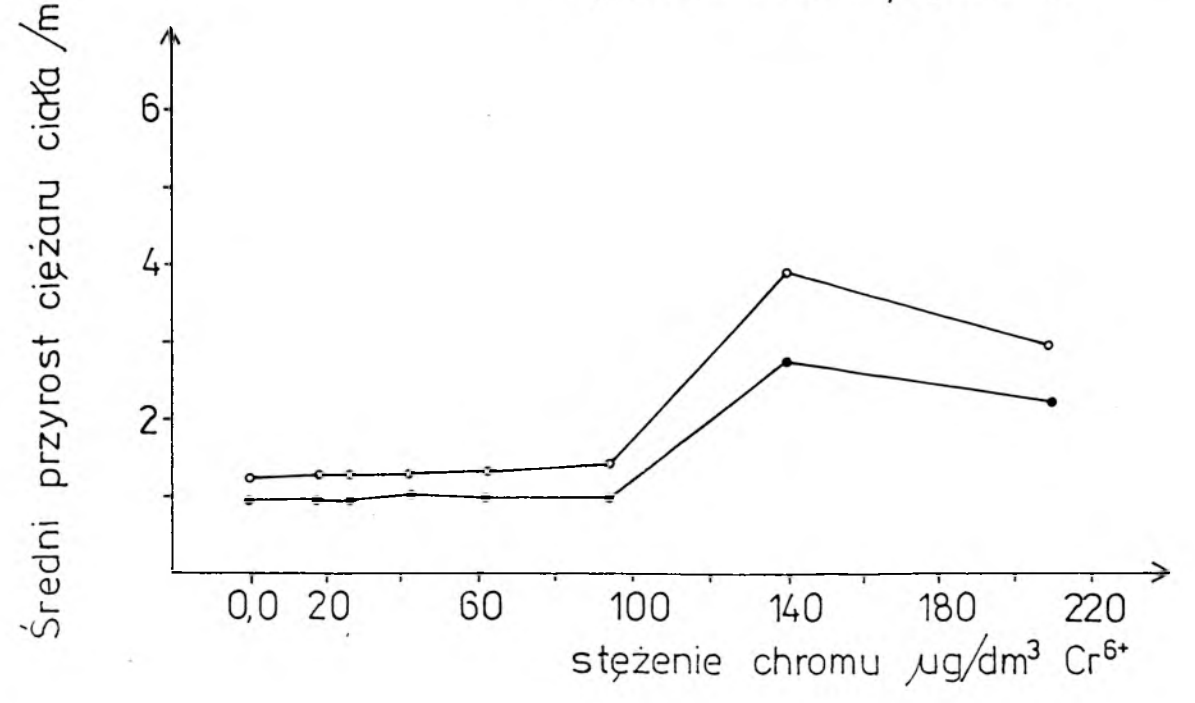
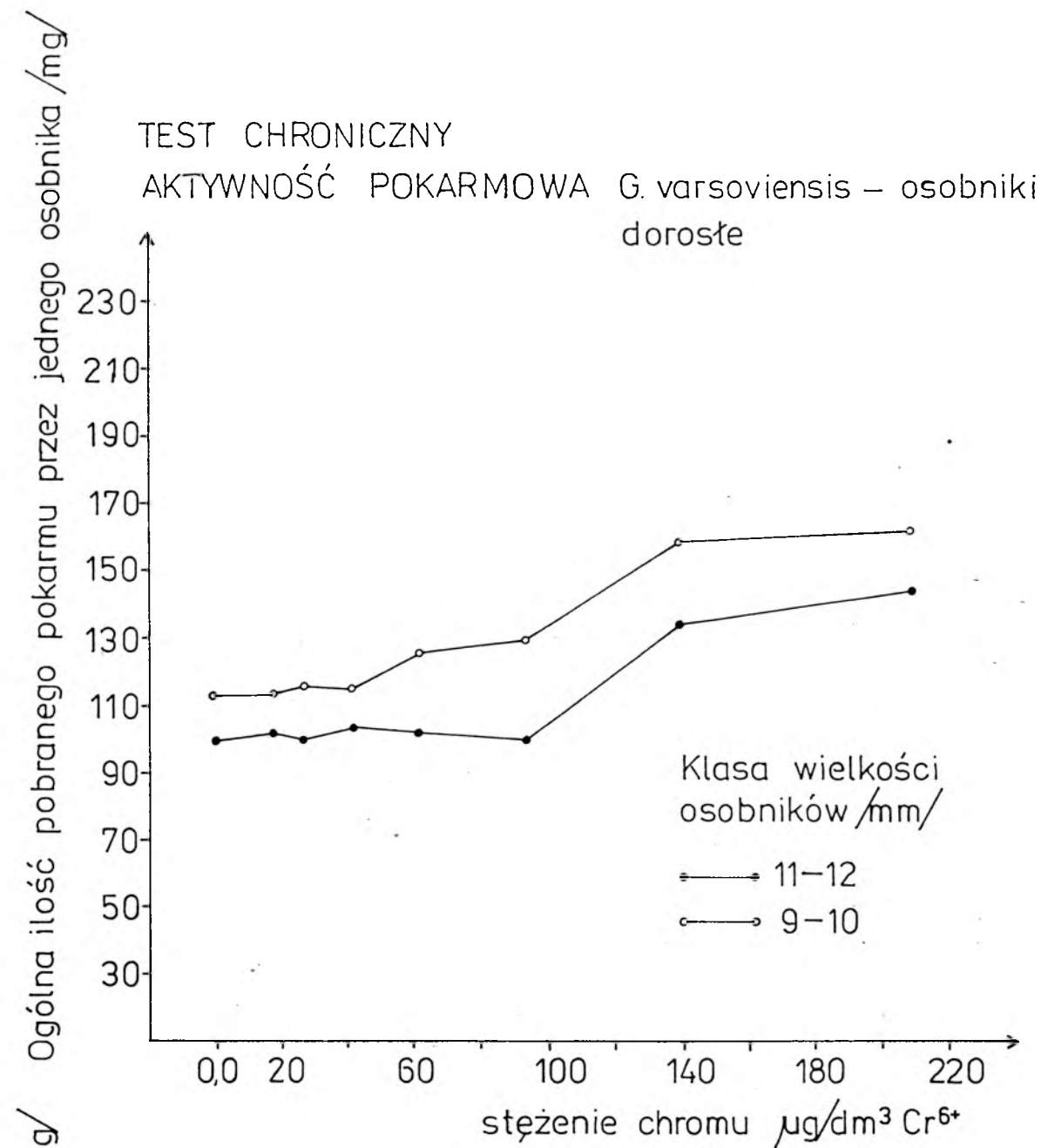
Test chroniczny - przeżywalność osobników dorosłych
G.varsoviensis w klasie wielkości 9-10 mm

Stężenie wyjściowe chromu - $210 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$; $q=1,5$

Ilość zwierząt w każdym stężeniu - 20

Czas trwania eksperymentu - 32 dni

Stężenie $\mu\text{g}/\text{dm}^3$		Czas /godz., dni /						
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Cr^{6+}	24 h	48 h	96 h	8 dni	16 dni	24 dni	32 dni
595	210	20	20	18	14	10	10	8
397	140	20	20	18	14	12	12	10
265	94	20	20	20	20	18	18	18
176	62	20	20	20	20	20	20	20
118	42	20	20	20	20	20	20	20
78	27	20	20	20	20	20	20	20
52	18	20	20	20	20	20	20	20
0,0	Kontrola	20	20	20	20	20	20	20



Rys. 4. Ogólna ilość pobranego pokarmu, średni przyrost ciężaru ciała oraz współczynnik pokarmowy dla *G. varsoviensis* – osobniki dorosłe

ilości pobranego pokarmu i średniego przyrostu ciężaru ciała w stężeniach chromu od 18 do 94 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ w porównaniu z próbami kontrolnymi kształtowały się na zbliżonym poziomie. Wartości tych parametrów mieściły się w granicach odpowiednio do klas wielkości :

100,46- 104,27 mg i 0,95 - 1,06 mg; $K^{x/}$ - 100,15 mg i 0,97 mg

114,49 -130,51 mg i 1,27 - 1,44 mg; $K^{x/}$ - 114,62 mg i 1,25 mg

Stwierdzić należy, że wartości omawianych parametrów charakteryzujących obie klasy wielkości różniły się między sobą w nieznacznym stopniu. Współczynnik pokarmowy charakteryzujący organizmy intoksykowane w omawianych stężeniach również był zbliżony i mieścił się w granicach : 98,49 - 106,18 ; 88,96-93,50 a w próbie kontrolnej wynosił 102,81 i 91,75.

Należy podkreślić, że przeżywalność kiełży obu klas wielkości była 100%, za wyjątkiem najwyższego stężenia tj. 94 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ w którym stwierdzono spadek odpowiednio do 80 i 90 % w porównaniu z próbą kontrolną.

W stężeniu następnym, wyższym tj. 140 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ zaobserwowano odpowiednio w obu klasach wielkości, w porównaniu z organizmami kontrolnymi wzrost o ok. 34 i 39 % ogólnej ilości pobranego pokarmu oraz o ok. 183 i 212 % przyrostu ciężaru ciała. Natomiast współczynnik pokarmowy znacznie się obniżył odpowiednio o ok. 52 i 56 % w porównaniu z wartością charakteryzującą organizmy próby kontrolnej.

Przeżywalność organizmów była znacznie niższa, gdyż wynosiła zaledwie 40 i 50 % w stosunku do kontroli.

$K^{x/}$ - próba kontrolna

W najwyższym stężeniu chromu $210 \mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ ogólna ilość pobranego pokarmu przez osobniki obu klas wielkości była także wyższa w stosunku do próby kontrolnej o ok. 45 i 42 %, a przyrost ciężaru ciała był większy o ok. 132 i 136 %.

Jednak był on niższy w porównaniu do uzyskanego w stężeniu $140 \mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$. Zmiany te wpłynęły również na współczynnik pokarmowy, który odpowiednio dla badanych klas wielkości był niższy od kontroli tylko o ok. 38 i 40 %.

Należy podkreślić, że w porównaniu do jego wartości uzyskanych w stężeniu $140 \mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$, był ok. 15 % wyższy dla obu klas wielkości. W końcowym okresie badań zaobserwowano również znaczny spadek przeżywalności kielży do 30 i 40 % w porównaniu z kontrolą.

Analiza wpływu chromu Cr^{6+} na aktywność pokarmową dorosłych kielży *G. varsoviensis* niezależnie od klasy wielkości wykazała brak istotnego jego wpływu w stężeniach od 18 do $94 \mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$. Procentowa wartość współczynnika pokarmowego w stosunku do kontroli wahała się odpowiednio dla klas wielkości od -4,2 do + 3,3% oraz od - 1,8 do + 1,9 %.

W wyższych stężeniach chromu tj. 140 i $210 \mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ zanotowano znacznie niższe procentowe wartości współczynnika wynoszące odpowiednio -52,4 % i -37,6 % dla klasy wielkości 11-12 mm oraz -55,5% i - 39,7 % dla klasy 9-10 mm. Uzyskane wartości świadczą o znacznej stymulacji aktywności pokarmowej w obecności chromu Cr^{6+} u dorosłych kielży obu klas wielkości, przy jednoczesnej dużej ich śmiertelności.

Tabela 9

Test chroniczny - wartości współczynnika pokarmowego uzyskane dla osobników dorosłych *G.varsoviensis* w dwóch klasach wielkości

Stężenie $\mu\text{g}/\text{dm}^3$		Współczynnik pokarmowy		Wartość współczynnika pokarmowego w stosunku do kontroli %	
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Cr^{6+}	Klasa wielkości /mm/			
		11-12	9-10	11-12	9-10
595	210	64,22	55,34	-37,6	-39,7
397	140	48,98	40,87	-52,4	-55,5
265	94	98,49	90,59	- 4,2	- 1,3
176	62	100,66	93,50	- 2,1	+ 1,9
118	42	98,63	88,96	- 4,1	- 3,1
78	27	106,18	90,94	+ 3,3	- 0,9
52	18	105,12	90,15	+ 2,2	- 1,8
0,0	Kontrola	102,81	91,75	-	-

+ wzrost wartości współczynnika

- spadek wartości współczynnika

Test z organizmami będącymi na granicy dojrzałości płciowej

W doświadczeniu stosowano osobniki z klasy wielkości 8-9mm, które intoksykowano, podobnie jak osobniki dorosłe w zakresie stężeń chromu od 18 do 210 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$.

Wyniki przedstawiono w tabelach 10-12 oraz na rys. 5, 7.

Z analizy uzyskanych wyników można stwierdzić, że w stężeniach chromu od 18 do 94 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ nie zaobserwowano zmian w wartościach badanych parametrów w próbach zawierających chrom w porównaniu z próbą kontrolną.

Wyniki kształtowały się następująco : ogólna ilość pobranego pokarmu i średni przyrost ciężaru ciała w próbach właściwych były odpowiednio w granicach : 212,81 - 215,05 mg i 3,66-3,89mg w kontroli: 214,95 mg i 3,85 mg. Wartość współczynnika pokarmowego wynosiła 55,22 - 58,14 ; w kontroli : 55,86. Na ogół we wszystkich próbach stwierdzono 100% przeżywalności kielży, jedynie w stężeniu 94 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ zaobserwowano jej spadek do 90%.

W wyższych stężeniach chromu tj. 140 i 210 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ odnotowano w porównaniu z próbą kontrolną obniżenie ogólnej ilości pobranego pokarmu odpowiednio o ok. 11 i 20 % oraz spadek przyrostu ciężaru ciała o ok. 35 i 47 %. Zaobserwowano natomiast większe wartości współczynnika pokarmowego tj. odpowiednio o ok. 37 % i 49 % w stosunku do próby kontrolnej. Przeżywalność organizmów w ww. stężeniach spadła do 70 i 50 %.

Dokonując analizy wpływu chromu Cr^{6+} na aktywność pokarmową kielży tej klasy wielkości, zgodnie z przyjętym założeniem, stwierdzono brak jego oddziaływania w stężeniach od 18 do 94 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$. Świadczyła o tym procentowa wartość współczynnika pokarmowego w odniesieniu do kontroli

Tabela 10

Test chroniczny - aktywność pokarmowa osobników *G.varsoviensis* będących na granicy dojrzałości płciowej w klasie wielkości 8-9 mm

Stężenie wyjściowe chromu - $210 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$; $q = 1,5$

Ilość zwierząt w każdym stężeniu - 20

Czas trwania eksperymentu - 32 dni

Stężenie $\mu\text{g}/\text{dm}^3$		Ogólna ilość pobranego pokarmu /mg/	Początkowy ciężar ciała /mg/	Końcowy ciężar ciała /mg/	Przyrost ciężaru ciała w czasie eksperymentu /mg/	Współczynnik pokarmowy
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Cr^{6+}					
595	210	171,20	10,86	12,91	2,05	83,54
397	140	190,65	11,04	13,54	2,49	76,54
265	94	212,81	10,88	14,54	3,66	58,14
176	62	213,25	10,74	14,47	3,73	57,18
118	42	212,95	10,86	14,63	3,77	56,48
78	27	215,05	11,03	14,93	3,89	55,22
52	18	214,03	10,95	14,76	3,81	56,17
0,0	Kontrola	214,95	11,05	14,90	3,85	55,86

Podano wartości średnie w przeliczeniu na jednego osobnika

Tabela 11

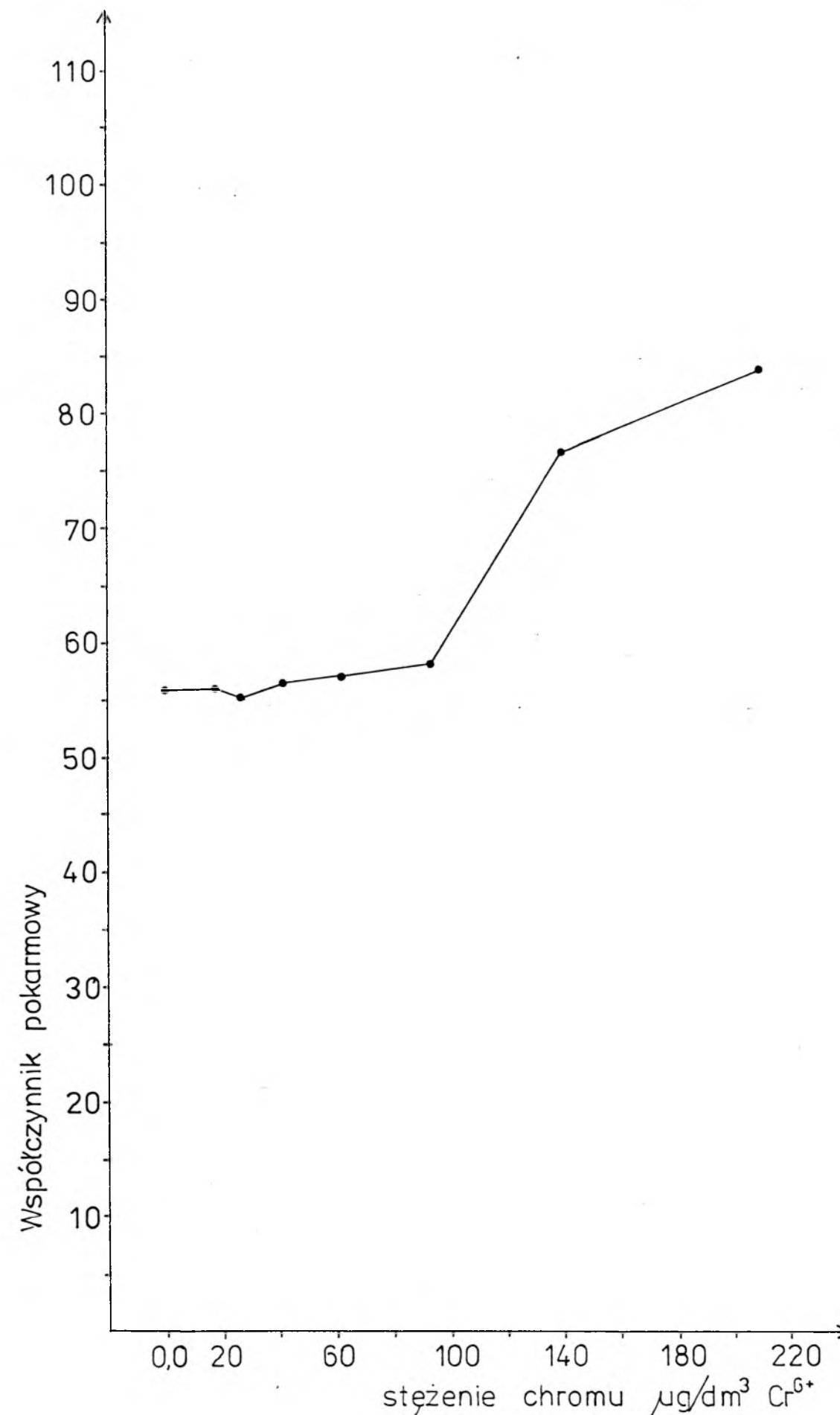
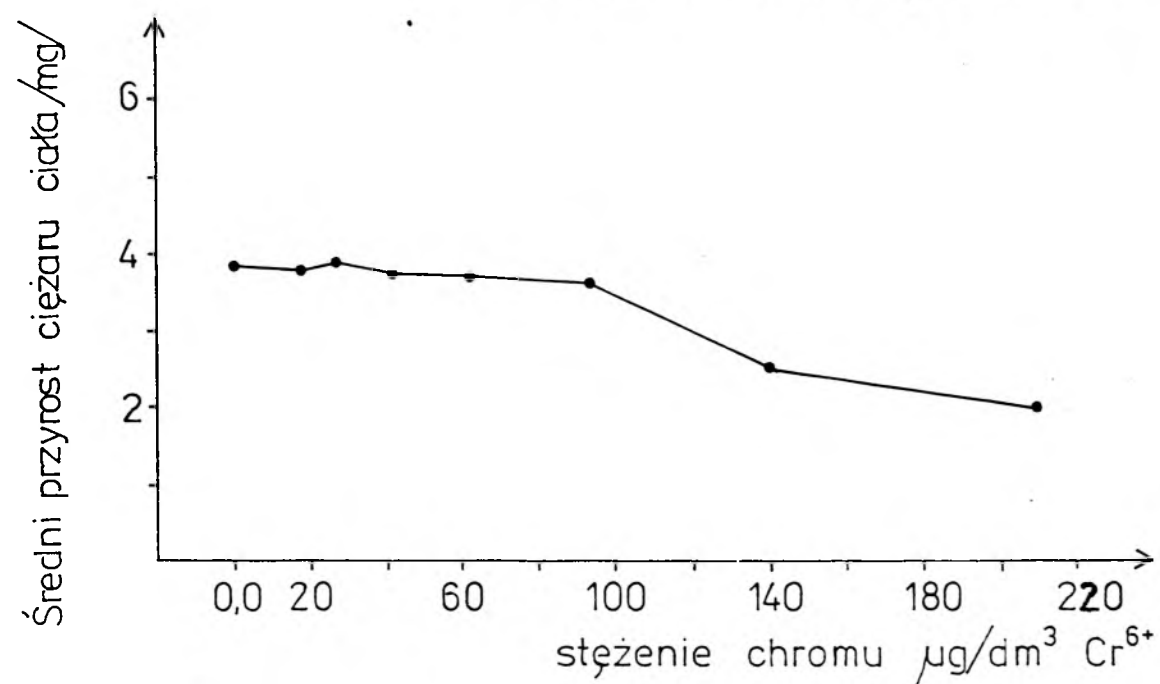
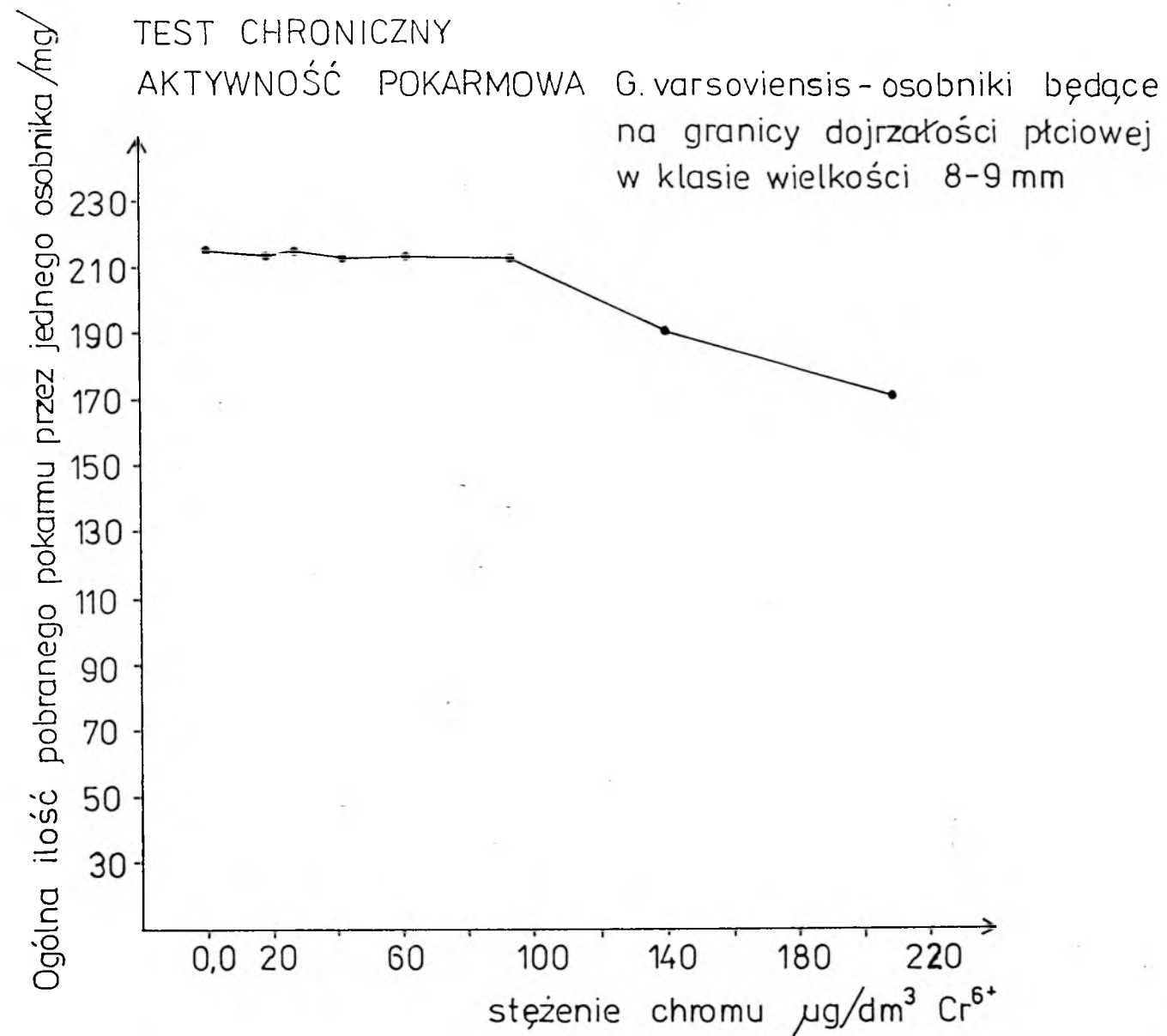
Test chroniczny - przeżywalność osobników *G. varsoviensis*
 będących na granicy dojrzałości płciowej w klasie
 wielkości 8-9 mm

Stężenie wyjściowe chromu - $210 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$; $q = 1,5$

Ilość zwierząt w każdym stężeniu - 20

Czas trwania eksperymentu - 32 dni

Stężenie $\mu\text{g}/\text{dm}^3$		Czas /godz., dni /						
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Cr^{6+}	24 h	48 h	96 h	8 dni	16 dni	24dni	32 dni
595	210	20	20	18	12	10	10	10
397	140	20	20	18	16	14	14	14
265	94	20	20	20	20	18	18	18
176	62	20	20	20	20	20	20	20
118	42	20	20	20	20	20	20	20
78	27	20	20	20	20	20	20	20
52	18	20	20	20	20	20	20	20
0,0	Kontrola	20	20	20	20	20	20	20



Rys.5. Ogólna ilość pobranego pokarmu, średni przyrost ciężaru ciała oraz współczynnik pokarmowy dla *G. varsoviensis* - osobniki będące na granicy dojrzałości płciowej

Tabela 12

Test chroniczny - wartości współczynnika pokarmowego uzyskane dla osobników *G.varsoviensis* będących na granicy dojrzałości płciowej w klasie wielkości 8-9 mm

Stężenie $\mu\text{g}/\text{dm}^3$		Współczynnik pokarmowy	Wartość współczynnika pokarmowego w stosunku do kontroli %
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Cr^{6+}		
		Klasa wielkości /mm/	
		8 - 9	
595	210	83,54	+ 49,5
397	140	76,54	+ 37,0
265	94	58,14	+4,1
176	62	57,18	+2,3
118	42	56,48	+1,1
78	27	55,22	-1,2
52	18	56,17	+0,5
0,0	Kontrola	55,86	-

+ wzrost wartości współczynnika

- spadek wartości współczynnika

mieszcząca się w granicach od -1,2 do + 4,1 %.

W stężeniach wyższych tj. 140 i 210 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ uzyskano znacznie wyższe procentowe wartości współczynnika w stosunku do kontroli tj. wynoszące odpowiednio: + 37,0 % i + 49,5% co oznacza znaczne hamowanie aktywności pokarmowej. Jednocześnie odnotowano dużą śmiertelność organizmów.

Testy z organizmami młodymi

W doświadczeniach użyto osobniki z klas wielkości :

2-3 mm; 4-5 mm i 6-7 mm. Zakres stężeń chromu wynosił od 16 do 180 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$. Wyniki badań przedstawiono w tabelach 13-19 i na rys. 6, 7.

Analiza wpływu chromu Cr^{6+} wykazała różnice w oddziaływaniu stężeń na osobniki najmniejsze tj. z klasy wielkości 2-3 mm w porównaniu z organizmami pozostałych klas. Brak oddziaływania chromu Cr^{6+} na osobniki tej klasy wielkości zaobserwowano tylko w stężeniach od 16 do 35 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$, natomiast dla pozostałych klas wielkości w stężeniach od 16 do 81 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$. W przytoczonych stężeniach chromu Cr^{6+} , wartości poszczególnych parametrów były zbliżone do uzyskanych w próbach kontrolnych. Ogólna ilość pobranego pokarmu oraz przyrost ciężaru ciała kształtowały się u osobników z badanych klas wielkości odpowiednio :

60,10 - 60,65 mg i 6,56 - 6,74 mg; K - 59,51 mg i 6,62 mg
65,62 - 66,35 mg i 5,77 - 5,93 mg; K - 65,25 mg i 5,90 mg
180,56 - 184,43 mg i 5,11 - 5,26 mg; K - 185,56 mg i 5,29 mg

Na podkreślenie zasługuje fakt, że ogólne ilości pobranego pokarmu przez osobniki dwu pierwszych klas wielkości były

Tabela 13

Test chroniczny - aktywność pokarmowa osobników młodych
G.varsoviensis w klasie wielkości 2-3 mm

Stężenie wyjściowe chromu - $180 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$; $q = 1,5$

Ilość zwierząt w każdym stężeniu - 20

Czas trwania eksperymentu - 32 dni

Stężenie $\mu\text{g}/\text{dm}^3$		Ogólna ilość pobranego pokarmu /mg/	Początkowy ciężar ciała /mg/	Końcowy ciężar ciała /mg/	Przyrost ciężaru ciała w czasie ekspery- mentu /mg/	Współ- czynnik pokar- mowy
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Cr^{6+}					
510	180	38,90	0,20	3,82	3,62	10,75
340	120	47,57	0,20	4,92	4,72	10,08
230	81	46,37	0,20	4,81	4,60	10,10
150	53	48,77	0,18	4,93	4,75	10,30
100	35	60,60	0,18	6,75	6,56	9,23
67	24	60,65	0,19	6,80	6,61	9,19
45	16	60,10	0,18	6,92	6,74	8,91
0,0 Kontrola		59,51	0,18	6,80	6,62	9,01

Podano wartości średnie w przeliczeniu na jednego osobnika

Tabela 14

Test chroniczny - przeżywalność osobników młodych
G.varsoviensis w klasie wielkości 2-3 mm

Stężenie wyjściowe chromu - $180 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$; $q=1,5$

Ilość zwierząt w każdym stężeniu - 20

Czas trwania eksperymentu - 32 dni

Stężenie $\mu\text{g}/\text{dm}^3$		Czas /godz., dni/						
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Cr^{6+}	24 h	48 h	96 h	8 dni	16 dni	24 dni	32 dni
510	180	20	20	12	8	8	8	8
340	120	20	20	16	12	12	12	12
230	81	20	20	20	20	16	16	16
150	53	20	20	20	20	20	20	20
100	35	20	20	20	20	20	20	20
67	24	20	20	20	20	20	20	20
45	16	20	20	20	20	20	20	20
0,0	Kontrola	20	20	20	20	20	20	20

Tabela 15

Test chroniczny - aktywność pokarmowa osobników młodych
G.varsoviensis w klasie wielkości 4-5 mm

Stężenie wyjściowe chromu - $180 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$; $q = 1,5$

Ilość zwierząt w każdym stężeniu - 20

Czas trwania eksperymentu - 32 dni

Stężenie $\mu\text{g}/\text{dm}^3$		Ogólna ilość pobranego pokarmu /mg/	Początkowy ciężar ciała /mg/	Końcowy ciężar ciała /mg/	Przyrost ciężaru ciała w czasie ekspery- mentu /mg/	Współ- czynnik pokar- mowy
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Cr^{6+}					
510	180	43,88	1,60	4,41	2,81	15,61
340	120	50,46	1,34	4,87	3,52	14,32
230	81	66,24	1,47	7,13	5,78	11,45
150	53	65,72	1,55	7,42	5,87	11,20
100	35	66,35	1,45	7,23	5,77	11,50
67	24	66,01	1,56	7,39	5,83	11,32
45	16	65,62	1,55	7,49	5,93	11,06
0,0 Kontrola		65,25	1,50	7,40	5,90	11,05

Podano wartości średnie w przeliczeniu na jednego osobnika

Tabela 16

Test chroniczny - przeżywalność osobników młodych
G.varsoviensis w klasie wielkości 4-5 mm

Stężenie wyjściowe chromu - $180 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$; $q=1,5$
Ilość zwierząt w każdym stężeniu - 20
Czas trwania eksperymentu - 32 dni

Stężenie $\mu\text{g}/\text{dm}^3$		Czas /godz., dni/						
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Cr^{6+}	24 h	48 h	96 h	8 dni	16 dni	24 dni	32 dni
510	180	20	20	12	8	8	8	8
340	120	20	20	16	12	12	12	12
230	81	20	20	20	20	18	18	18
150	53	20	20	20	20	20	20	20
100	35	20	20	20	20	20	20	20
67	24	20	20	20	20	20	20	20
45	16	20	20	20	20	20	20	20
0,0	Kontrola	20	20	20	20	20	20	20

Tabela 17

Test chroniczny - aktywność pokarmowa osobników młodych
G. varsoviensis w klasie wielkości 6-7 mm

Stężenie wyjściowe chromu - $180 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$; $q=1,5$

Ilość zwierząt w każdym stężeniu - 20

Czas trwania eksperymentu - 32 dni

Stężenie $\mu\text{g}/\text{dm}^3$		Ogólna ilość pobranego pokarmu /mg/	Początkowy ciężar ciała /mg/	Końcowy ciężar ciała /mg/	Przyrost ciężaru ciała w czasie ekspery- mentu /mg/	Współ- czynnik pokar- mowy
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Cr^{6+}					
510	180	146,45	4,32	7,82	3,49	41,92
340	120	160,04	4,43	4,40	3,96	40,48
230	81	181,02	4,41	9,52	5,11	35,42
150	53	184,43	4,45	9,70	5,25	35,13
100	35	184,06	4,47	9,73	5,26	34,95
67	24	180,56	4,31	9,42	5,11	35,33
45	16	181,13	4,30	9,42	5,12	35,34
0,0 kontrola		185,56	4,46	9,75	5,29	35,07

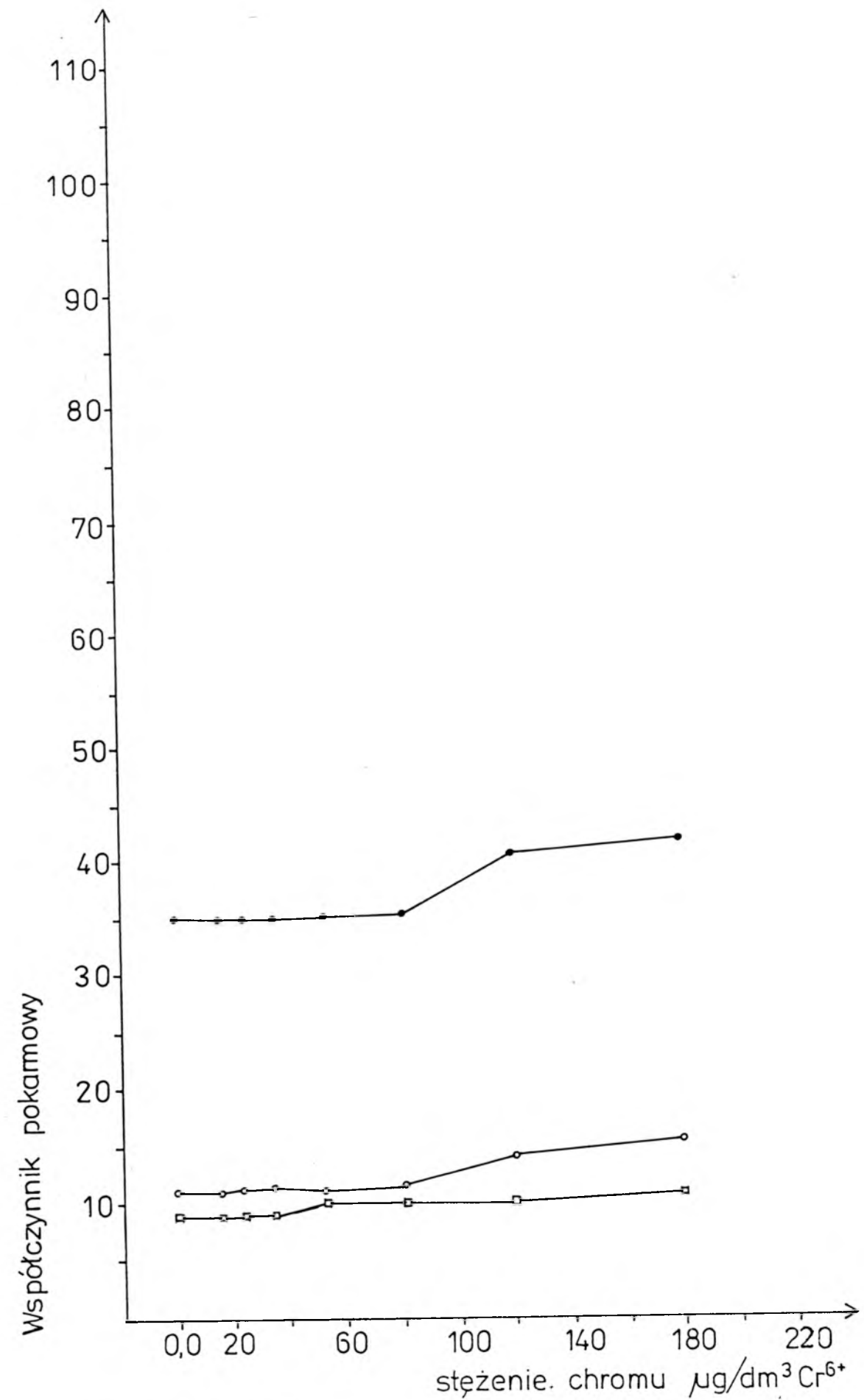
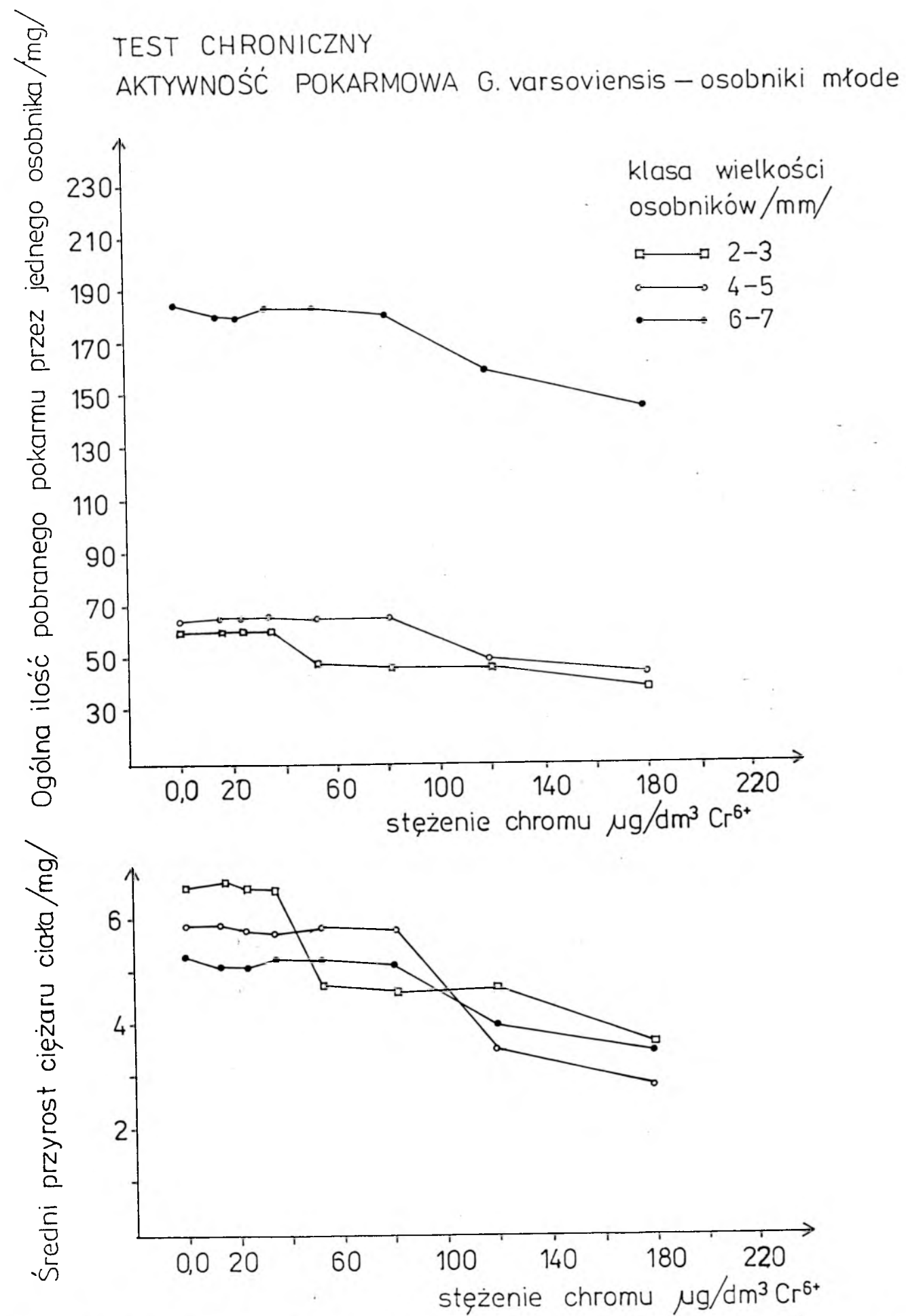
Podano wartości średnie w przeliczeniu na jednego osobnika

Tabela 18

Test chroniczny - przeżywalność osobników młodych
G.varsoviensis w klasie wielkości 6-7 mm

Stężenie wyjściowe chromu - $180 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$; $q=1,5$
 Ilość zwierząt w każdym stężeniu - 20
 Czas trwania eksperymentu - 32 dni

Stężenie $\mu\text{g}/\text{dm}^3$		Czas /godz., dni/						
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Cr^{6+}	24 h	48 h	96 h	8 dni	16 dni	24 dni	32 dni
510	180	20	20	16	14	12	12	12
340	120	20	20	18	18	16	16	16
230	81	20	20	20	20	18	18	18
150	53	20	20	20	20	20	20	20
100	35	20	20	20	20	20	20	20
67	24	20	20	20	20	20	20	20
45	16	20	20	20	20	20	20	20
0,0	Kontrola	20	20	20	20	20	20	20



Rys. 6. Ogólna ilość pobranego pokarmu, średni przyrost ciężaru ciała oraz współczynnik pokarmowy dla *G. varsoviensis* – osobniki młode

zbliżone do siebie. Natomiast organizmy największe, z klasy wielkości 6-7 mm pobierały pokarm w ilościach ok. 3-krotnie większych. Jednocześnie jednak obserwowano przyrost ciężaru ciała zbliżony u wszystkich grup organizmów z pewną tendencją wzrostową pod tym względem u osobników najmniejszych tj. 2-3 mm. Wartości współczynnika pokarmowego były zbliżone do uzyskanych w kontroli i kształtowały się dla odpowiednich klas wielkości następująco :

8,91 - 9,23 ; K - 9,01
11,06 - 11,50 ; K - 11,05
34,95 - 35,42 ; K - 35,07

Wpływ wyższych stężeń chromu tj. od 53 do 180 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ na osobniki najmłodsze / 2-3 mm / oraz 120 i 180 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ na osobniki pozostałych klas wielkości / 4-5 mm i 6-7 mm / zaobserwowano na podstawie zmian badanych parametrów aktywności pokarmowej. Osobniki najmłodsze pobierały mniejsze ilości pokarmu oraz wykazywały mniejszy przyrost ciężaru ciała, wykazując zróżnicowanie pod tym względem odpowiednio do zakresu stężeń od 53 do 120 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ i w stężeniu najwyższym 180 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$. W pierwszym przypadku ilość pobranego pokarmu obniżyła się o ok. 20 %, a przyrost ciężaru ciała o ok. 29%. Natomiast w drugim przypadku zaobserwowano znacznie większy spadek obu parametrów odpowiednio o ok. 35 i 45 % w porównaniu z kontrolą.

Stwierdzono również zróżnicowanie wartości współczynnika pokarmowego odpowiednio do omawianych wyżej stężeń chromu Cr^{6+} .

Wartości współczynnika wykazywały wzrost w stosunku do uzyskanych w kontroli o ok. 13 % w przypadku stężeń od 53 do $120 \mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ i o ok. 19 % w przypadku najwyższego stężenia $180 \mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$.

Przeżywalność kielży tej klasy wielkości była 100 % w stężeniu $53 \mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$, zaś w wyższych stężeniach obniżyła się odpowiednio do 80, 60 i 40 % w porównaniu z kontrolą.

Wpływ chromu w stężeniach wyższych 120 i $180 \mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ na osobniki średnie i największe objawiał się podobnie. Ogólna ilość pobranego pokarmu wykazywała spadek, odpowiednio do klas wielkości, o ok. 23 i 33 % oraz o ok. 14 i 21 % w stosunku do kontroli. Zaś przyrost ciężaru ciała obniżył się odpowiednio o ok. 40 i 52 % oraz o ok. 25 i 34 %. Natomiast wartości współczynnika pokarmowego w stężeniach 120 i $180 \mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ dla osobników obu klas wielkości wzrastały odpowiednio o ok. 30 i 41 % oraz o ok. 15 i 19 %.

Należy podkreślić, że u osobników średnich i największych w stężeniu najwyższym tj. $180 \mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$, spadek wartości obydwu wyżej wymienionych badanych parametrów był większy odpowiednio o ok. 10 i 7 % oraz o ok. 12 i 9 % w porównaniu ze stężeniem $120 \mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$.

Wartość zaś współczynnika pokarmowego wykazywała odpowiednio do tych zmian wzrost o ok. 11 i 4 %. Przeżywalność kielży obu klas wielkości w stężeniach 120 i $180 \mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ zmniejszyła się odpowiednio do 60 i 40 % dla osobników średnich /4-5 mm/ oraz do 80 i 60 % dla osobników największych / 6-7 mm /.

Analiza wpływu chromu Cr^{6+} na aktywność pokarmową młodych kielży wykazała brak istotnego jego oddziaływania w stężeniach:

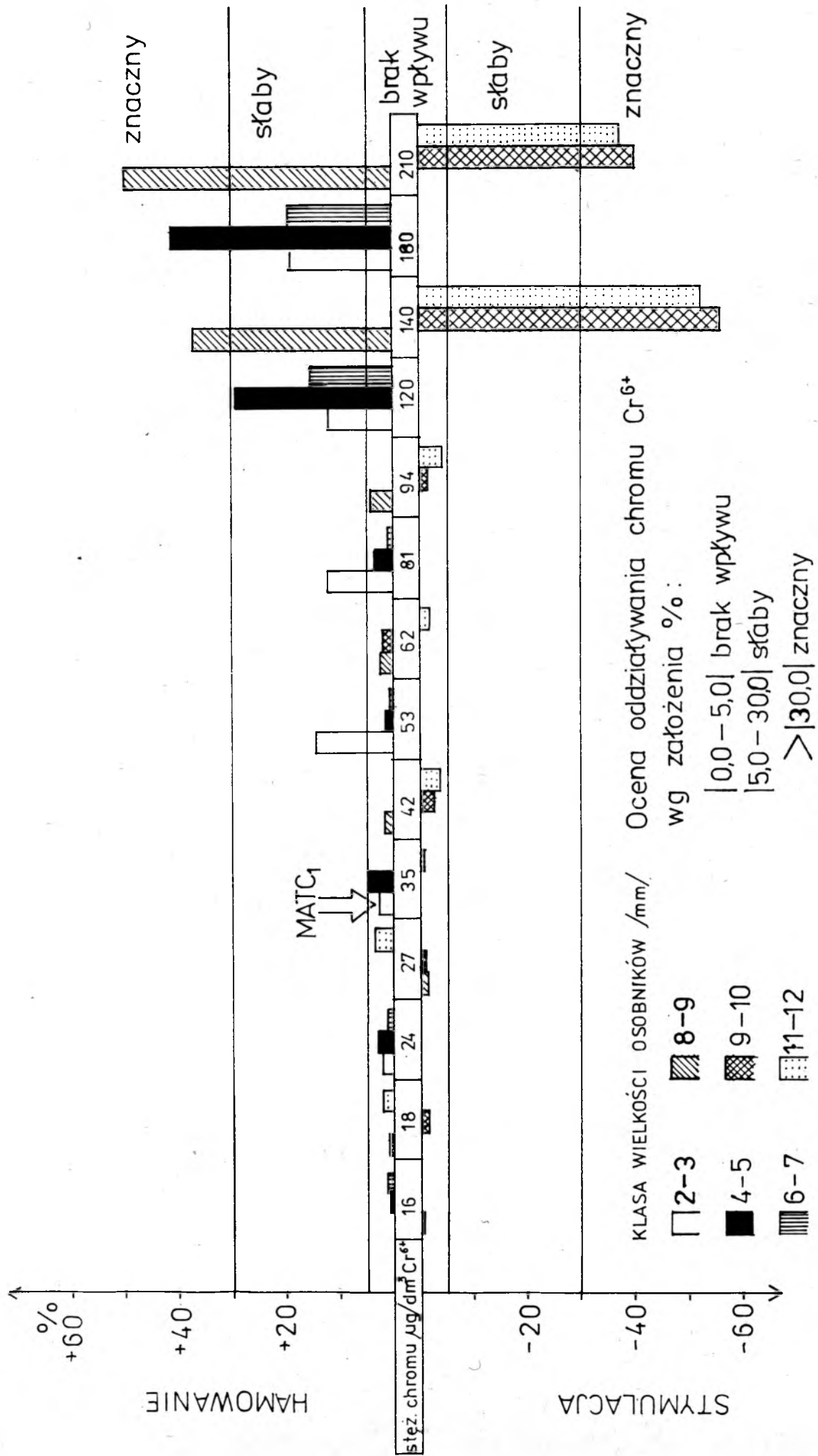
Tabela 19

Test chroniczny - wartości współczynnika pokarmowego uzyskane dla osobników młodych *G.varsoviensis* w trzech klasach wielkości

Stężenie $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Cr^{6+}	Współczynnik pokarmowy			Wartość współczynnika pokarmowego w stosunku do kontroli %		
		Klasa wielkości/mm/					
		2-3	4-5	6-7	2-3	4-5	6-7
510	180	10,75	15,61	41,92	+19,3	+41,2	+19,5
340	120	10,08	14,32	40,48	+11,9	+29,6	+15,4
230	81	10,10	11,45	35,42	+12,1	+ 3,6	+ 1,0
150	53	10,30	11,20	35,13	+14,3	+ 1,3	+ 0,2
100	35	9,23	11,50	34,95	+ 2,4	+ 4,1	- 0,4
67	24	9,19	11,32	35,33	+ 2,0	+ 2,4	+ 0,7
45	16	8,91	11,06	35,34	- 1,2	+ 0,1	+ 0,7
0,0 Kontrola		9,01	11,05	35,07	-	-	-

+ wzrost wartości współczynnika

- spadek wartości współczynnika



Rys.7. Wpływ chromu Cr^{6+} na aktywność pokarmową *G. varsoviensis* na podstawie współczynnika pokarmowego

od 16 do 35 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ dla osobników z klasy wielkości 2-3 mm
od 16 do 81 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ dla osobników z klasy wielkości 4-5i6-7mm

Wskazywały na to procentowe wartości współczynnika pokarmowego w odniesieniu do kontroli mieszczące się w granicach odpowiednio do klas wielkości:

od -1,2 do +2,4; od +0,1 do + 4,1 i od -0,4 do + 1,0 %.

W wyższych stężeniach chromu tj. od 53 do 120 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ i 180 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ dla osobników klasy wielkości 2-3 mm procentowe wartości współczynnika w stosunku do kontroli były wyższe i wynosiły odpowiednio: od +11,9 do +14,3 % i + 19,3 %.

Dla osobników średnich i największych / 4-5 mm i 6-7 mm/ w stężeniach wyższych tj. 120 i 180 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ uzyskane procentowe wartości współczynnika pokarmowego były również wyższe i wynosiły odpowiednio: +29,6 i + 41,2 % oraz + 15,4 i + 19,5%. Przytoczone procentowe wartości współczynnika w wyższych stężeniach chromu Cr^{6+} dla młodych kiełży wszystkich klas wielkości świadczą, zgodnie z przyjętym założeniem, o hamowaniu aktywności pokarmowej w różnym stopniu tj: słabym dla klas wielkości 2-3 mm i 6-7 mm oraz znacznym dla klasy 4-5mm. Podkreślić należy, że hamowaniu aktywności pokarmowej towarzyszyła wysoka śmiertelność organizmów wszystkich klas wielkości.

W podsumowaniu przeprowadzonych doświadczeń z organizmami dorosłymi, będącymi na granicy dojrzałości płciowej i młodymi podkreślić należy, że na podstawie zmian procentowej wartości współczynnika pokarmowego w odniesieniu do kontroli stwierdzono, stymulujący lub hamujący wpływ chromu Cr^{6+} na aktywność pokarmową *G. varsoviensis* zależnie od jego klasy wielkości. Organizmy młode i będące na granicy dojrzałości płciowej reagowały podobnie tj. hamowaniem aktywności pokarmowej

w przeciwieństwie do organizmów dorosłych u których stwierdzono stymulację tego procesu. Maksymalne tolerowane stężenia chromu Cr^{6+} , nie zakłócające aktywności pokarmowej tzw. MATC_1 u wszystkich badanych klas wielkości przedstawiono poniżej :

Osobniki <i>G.varsoviensis</i> klasa wielkości /mm/	MATC_1 [$\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$]
11-12	94
9-10	
8- 9	
6 - 7	81
4 - 5	
2 - 3	35

Przy uwzględnieniu aktywności pokarmowej jako parametru oceny szkodliwości zastosowanego toksykanta ustalono stężenie bezpieczne chromu równe $35 \mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$. Jest to maksymalne tolerowane stężenie chromu Cr^{6+} /tzw. MATC_1 /, NIE ZAKŁÓCAJĄCE AKTYWNOŚCI POKARMOWEJ *G.varsoviensis* z klasy wielkości 2-3 mm tj. osobników najbardziej wrażliwych spośród wszystkich badanych klas wielkości.

3.3.2. Reprodukacja

Badania chroniczne obejmowały eksperymenty z reprodukcją pokoleń rodzicielskich P i P' kielży dwóch klas wielkości tj. 8-9 mm i 4-5 mm oraz uzyskanych odpowiednio

ich pokoleń F_1 i F_1' . Czas trwania tych eksperymentów wynosił odpowiednio 160 oraz 260 dni.

Doświadczenia z reprodukcją pokoleń rodzicielskich P i P' kielży obu klas wielkości przeprowadzono w identycznych zakresach stężeń chromu Cr^{6+} jak testy z aktywnością pokarmową dorosłych i młodych osobników *G. varsoviensis* /p.p. III.3.3.1/.

W badaniach zaś reprodukcji pokoleń F_1 i F_1' stosowano niższe zakresy stężeń tj. odpowiednio od 18 do 62 $\mu g/dm^3 Cr^{6+}$ i od 16 do 53 $\mu g/dm^3 Cr^{6+}$. Wybór niższych zakresów stężeń spowodowany był otrzymaniem wysokiej śmiertelności lub nieprawidłowej reprodukcji w wyższych stężeniach chromu Cr^{6+} .

Okresowo wykonywane analizy ogólnej zawartości chromu nie wykazywały znacznych różnic w dopływie i odpływie z każdej komory.

W liściach podawanych jako pokarm zwierzętom określono zawartość metali. Mieściła się ona w granicach wartości podobnie jak dla pokarmu podawanego zwierzętom w hodowli /p.p. III.3.1./.

Wyniki badań reprodukcji przedstawiono w tabelach 20a, b i 21a, b oraz na rys. 8-15.

Interpretacji wyników badań dokonano analizując w omówionych wyżej zakresach stężeń chromu Cr^{6+} i w próbie kontrolnej:

- występowanie lęgów w określonej liczbie osobników młodych,
- średnią liczebność osobników młodych w lęgu.

Przeprowadzono również obserwacje:

- czasu wystąpienia pierwszego przypadku prekopulacji,

- czasu rozwoju kielży w komorach lęgowych samic tzw. BDT,
- przeżywalności testowanych organizmów.

Ocenę szkodliwego wpływu chromu Cr^{6+} na reprodukcję *G.varsoviensis* przeprowadzono na podstawie średniej liczebności osobników młodych w lęgu, którą uznano za wskaźnik reprodukcji.

Test z osobnikami będącymi na granicy dojrzałości płciowej

w klasie wielkości 8-9 mm

Wyniki eksperymentu, którego celem było uzyskanie pokolenia F_1 od osobników rodzicielskich P eksponowanych na działanie chromu Cr^{6+} od stadium wzrostu określonego klasą wielkości 8-9 mm przedstawiono w tabeli 20a oraz na rys. 8, 9.

Analiza wpływu chromu na organizmy wykazała, że występowanie lęgów o określonej liczebności osobników młodych pokolenia F_1 oraz średnia liczebność osobników w lęgu w najniższych stężeniach tj. 18 i 27 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ w porównaniu z kontrolą były zbliżone. Mianowicie lęgi o liczebności 10-14 osobników stanowiły odpowiednio 75 i 86 % ogólnej liczby lęgów uzyskanych w danym stężeniu, w kontroli zaś - 87 %. Średnia liczebność osobników w lęgu w obu stężeniach i w kontroli wynosiła ok. 11.

W wyższych stężeniach tj. 42 i 62 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ zanotowano 90 i 86 % udział lęgów o liczebności niższej niż w kontroli tj. 7-10 osobników. Średnia liczebność osobników młodych w lęgu była również niższa i wynosiła ok. 9.

W stężeniu 94 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ stwierdzono zmiany w rozwoju *G.varsoviensis*, gdyż nie doszło do uzyskania żywych młodych

Tabela 20a

Test chroniczny - reprodukcja pokolenia rodzicielskiego P
G.varsoviensis

Stężenie wyjściowe chromu - $210 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$; $q=1,5$

Ilość zwierząt w każdym stężeniu - 40

w klasie wielkości 8-9 mm

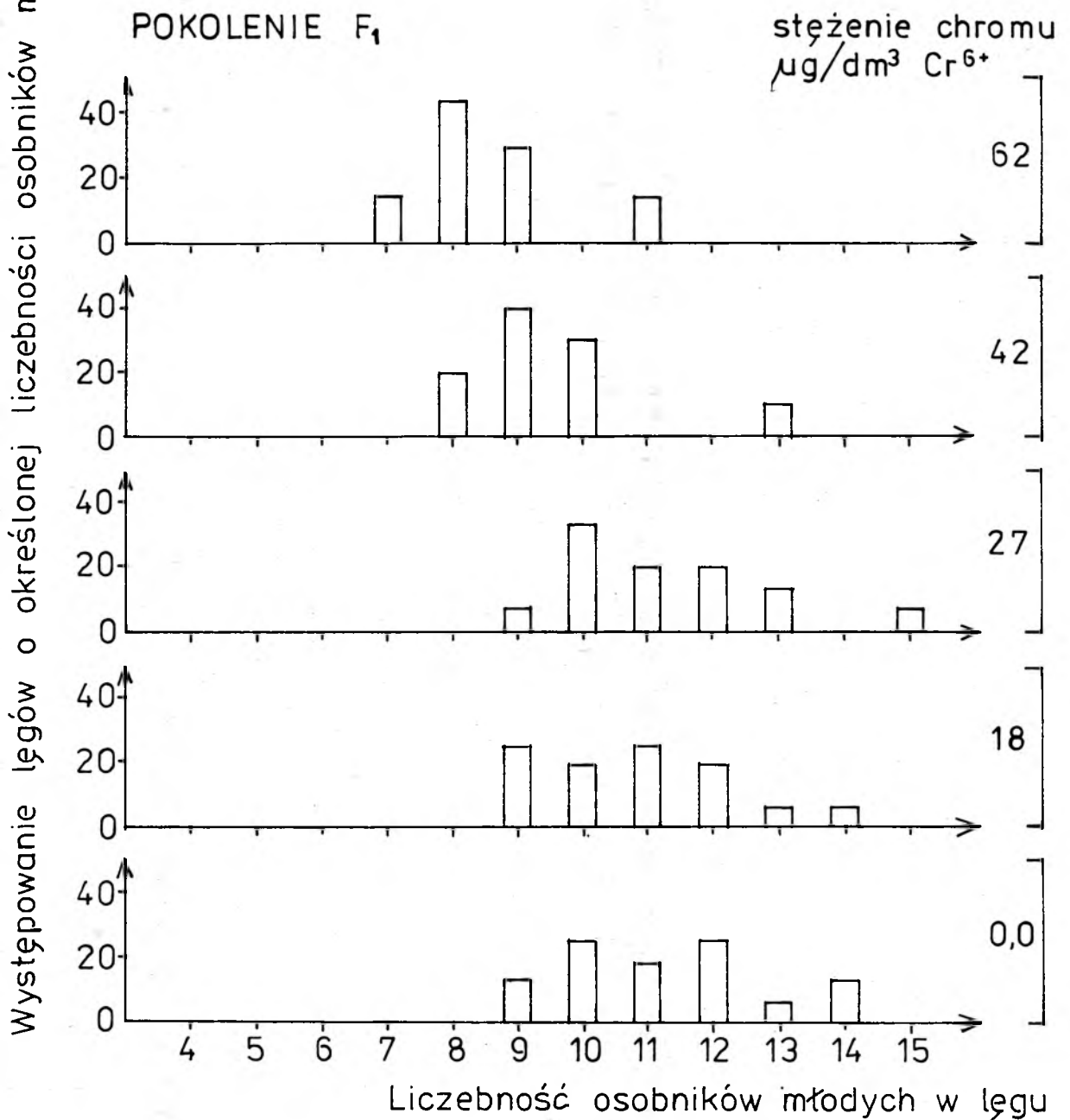
Czas trwania eksperymentu -160 dni

Stężenie $\mu\text{g}/\text{dm}^3$		Dane reprodukcji				Przeżywalność	
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Cr^{6+}	Liczba samic z jajami	Liczba lęgów	Liczebność osobników młodych w lęgu ^{x/} śred- nia min- -max.	Ogólna liczba uzyska- nych osobni- ków x/ młodych	Liczba osobników po zakoń- czeniu testu	%
595	210	wysoka śmiertelność przed osiągnięciem dojrzałości płciowej					
397	140	brak reprodukcji		-	-	10	25,0
265	94	5	zakłócenia reprodukcji, degeneracja zarodków		0	16	40,0
176	62	7	7	8,57 7-11	60	29	72,5
118	42	10	10	9,50 8-13	95	29	72,5
78	27	15	15	11,27 9-15	169	32	80,0
52	18	16	16	10,81 9-14	173	35	87,5
0,0	Kontrola	16	16	11,25 9-13	180	35	87,5

^{x/} pokolenie F₁

TEST CHRONICZNY

REPRODUKCJA *G. varsoviensis* - osobniki rodzicielskie P
na granicy dojrzałości płciowej w
klasie wielkości 8-9 mm



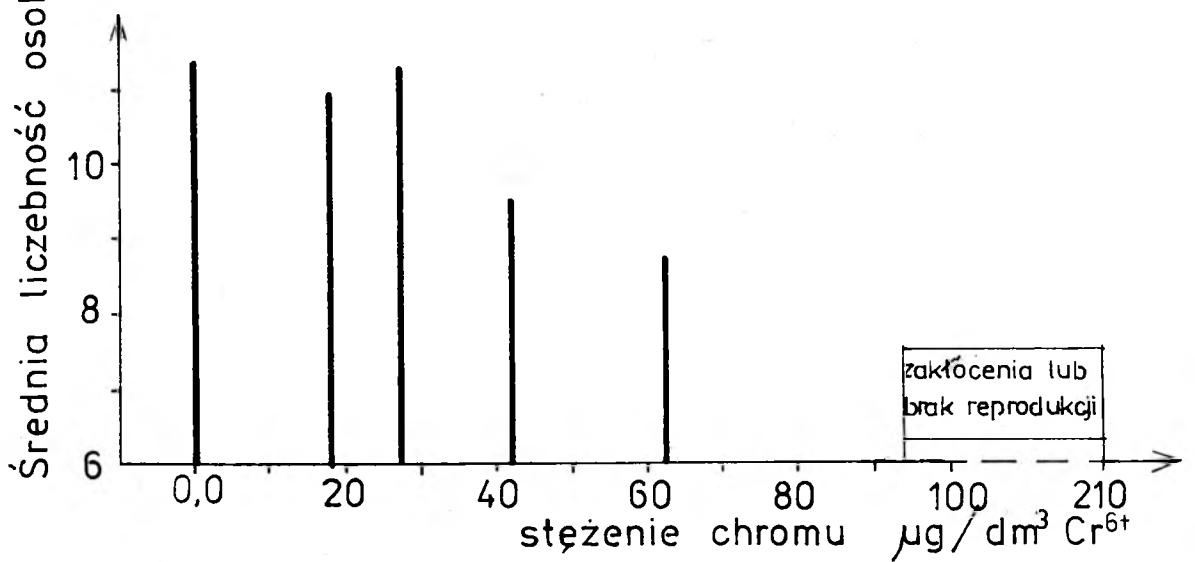
Rys. 8. Występowanie łęgów *G. varsoviensis* o określonej liczebności osobników młodych w badanych stężeniach chromu Cr^{6+}

Średnia liczebność osobników młodych w łęgu

TEST CHRONICZNY

REPRODUKUCJA *G. varsoviensis* - osobniki rodzicielskie P
na granicy dojrzałości płciowej w
klasie wielkości 8-9 mm

POKOLENIE F₁



Rys.9. Średnia liczebność osobników młodych w łęgu
G. varsoviensis w badanych stężeniach chromu Cr^{6+}

osobników pokolenia F_1 . Mianowicie zaobserwowano 5 samic z jajami w komorach lęgowych, z których nie nastąpiło uwolnienie żywych organizmów. Stwierdzono, że zdegenerowane zarodki były usuwane z komór lęgowych po czasie dłuższym lub krótszym niż przewidywany BDT / ok. 16-17 dni/. W czterech przypadkach zanotowano eliminację zarodków dopiero po 20-27 dniach wraz z wynikami samic / Fot. 3 i 4/. Każdorazowo jednak obserwowano nadal niewielką ilość zarodków, które były usuwane jeszcze po dłuższym czasie. W pozostałym piątym przypadku stwierdzono uwolnienie zarodków po 11 dniach.

Pierwszy przypadek prekopulacji stwierdzono po upływie 42-45 dni w stężeniach od 18 do $94 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$. Należy podkreślić, że ten okres czasu był zbliżony do czasu prekopulacji w próbie kontrolnej.

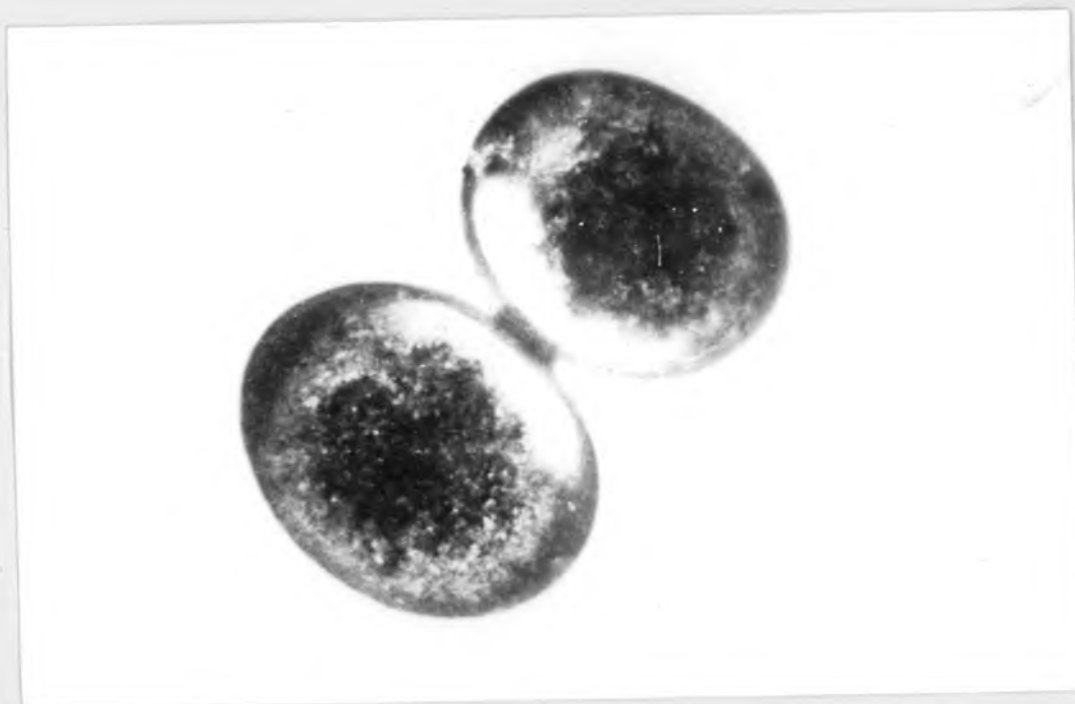
Czas rozwoju kielży w komorach lęgowych samic tzw. BDT w stężeniach od 18 do $62 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$ wynosił podobnie jak w kontroli ok. 16-17 dni.

W stężeniu $140 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$ nie zaobserwowano procesu rozmnażania kielży do końca trwania eksperymentu.

Przeżywalność testowanych organizmów po zakończeniu eksperymentu kształtowała się następująco. W dwóch najniższych stężeniach 18 i $27 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$ utrzymywała się na poziomie zbliżonym do kontroli i wynosiła odpowiednio 87,5 i 80,0 %. W stężeniach wyższych 42 i $62 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$ wykazywała tendencję spadkową i wynosiła 72,5 %. Nadmienić należy, że w tych stężeniach uzyskano dominację lęgów o liczebności osobników mniejszej niż w kontroli tj. 7-10 / odpowiednio 90 i 86 % /.



Fot. 3 Wylinka samicy *G.varsoviensis* wraz z czterema zdegenerowanymi zarodkami - test chroniczny, reprodukcja pokolenia rodzicielskiego P, stężenie $94 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$



Fot. 4 Zdegenerowane zarodki *G.varsoviensis* - test chroniczny, reprodukcja pokolenia rodzicielskiego P stężenie $94 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$

W stężeniu $94 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$ przy 40,0 % przeżywalności organizmów obserwowano nieprawidłowy rozwój i eliminację zdegenerowanych zarodków z komór lęgowych samic.

Podobnie w stężeniu $140 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$, w którym nie stwierdzono rozmnażania kielży, ich przeżywalność kształtowała się na b. niskim poziomie tj. 25,0 %.

W najwyższym stężeniu $210 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$ wystąpiła wysoka śmiertelność testowanych organizmów przed osiągnięciem dojrzałości płciowej.

Dokonując analizy wpływu chromu Cr^{6+} na reprodukcję pokolenia rodzicielskiego *P. G. varsoviensis* z klasy wielkości 8-9mm w oparciu o wskaźnik reprodukcji tj. średnią liczebność osobników młodych w lęgu, wykazano brak jego wpływu w stężeniach 18 i $27 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$. Świadczyła o tym średnia liczebność osobników w lęgu zbliżona do kontroli i wynosząca ok. 11.

W stężeniach wyższych tj. 42 i $62 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$ uzyskano niższe średnie liczebności osobników w lęgu wynoszące ok. 9. Natomiast w następnym, wyższym stężeniu - $94 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$ nie otrzymano żywych młodych osobników pokolenia F_1 , lecz stwierdzono eliminację zdegenerowanych zarodków z komór lęgowych samic. Uzyskane wyniki świadczą o szkodliwym oddziaływaniu chromu Cr^{6+} począwszy od stężenia $42 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$.

W dalszym, wyższym stężeniu tj. $140 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$ nie zaobserwowano rozmnażania *G. varsoviensis* do końca badań.

Podkreślić należy, że w stężeniach chromu Cr^{6+} w których obserwowano zakłócenia procesu reprodukcji lub jego brak występowała również znaczna śmiertelność organizmów.

W celu otrzymania pokolenia F₂ uzyskane żywe młode osobniki pokolenia F₁ *G. varsoviensis* poddano dalszemu oddziaływaniu chromu w zakresie stężeń od 18 do 62 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ w 260-dniowym eksperymencie / tabela 20b, rys. 10, 11/.

Z analizy uzyskanych wyników można stwierdzić, że w najniższym stężeniu 18 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ nie zaobserwowano zmian w wartościach obu badanych parametrów w porównaniu z próbą kontrolną. Otrzymano całkowitą dominację lęgów pokolenia F₂ o liczebnościach 8-11 osobników / 100% / oraz średnią liczebność osobników młodych w lęgu ok. 10.

W wyższych stężeniach tj. 27 i 42 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ nie stwierdzono uwalniania żywych osobników pokolenia F₂, w każdym z zaobserwowanych przypadków miało miejsce wcześniejsze bądź późniejsze wyeliminowanie przez samicę zdegenerowanych zarodków /Fot.5,6/.

Pierwszy przypadek prekopulacji stwierdzono po upływie 203-206 dni w stężeniach chromu od 18 do 42 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$. Należy podkreślić, że był on zbliżony do czasu prekopulacji w próbach kontrolnych.

Czas rozwoju kielży w komorach lęgowych samic tzw. BDT był w przypadku prawidłowego rozwoju zbliżony do próby kontrolnej i wynosił ok. 16-17 dni.

W najwyższym stężeniu 62 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ nie zaobserwowano procesu rozmnażania kielży do końca badań.

Przeżywalność testowanych organizmów pod koniec eksperymentu utrzymywała się na poziomie zbliżonym do kontroli w obecności chromu tylko w stężeniu 18 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$. W pozostałych stężeniach od 27 do 62 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ wykazywała ona tendencje malejące.

Tabela 20b

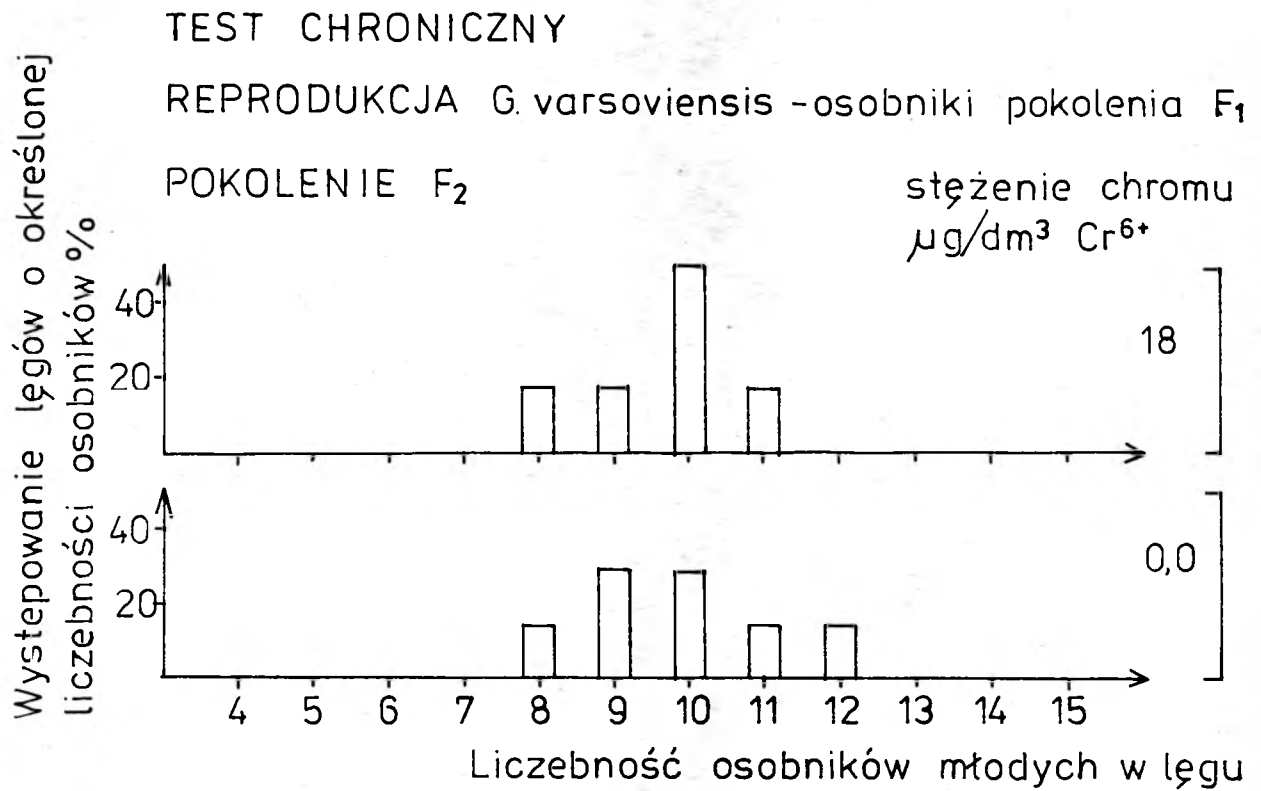
Test chroniczny - reprodukcja pokolenia F₁ G.varsoviensisStężenie wyjściowe chromu - 62 µg/dm³Cr⁶⁺; q=1,5

Ilość zwierząt w każdym stężeniu - 30

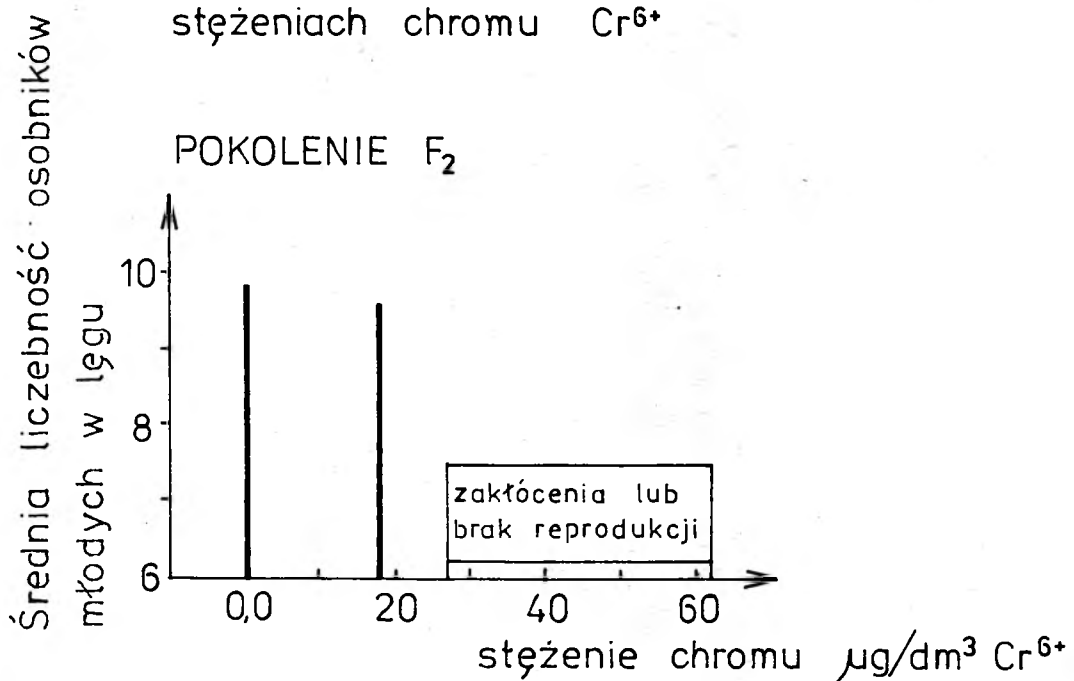
Czas trwania eksperymentu - 260 dni

Stężenie µg/dm ³		Dane reprodukcji				Przeżywalność		
K ₂ Cr ₂ O ₇	Cr ⁶⁺	Liczba samic z jajami	Liczba lęgów	Liczebność osobników młodych w lęgu śred- nia	min- max.	Ogólna liczba uzyskanych osobników młodych	Liczba osobników po zakończeniu testu	%
176	62	brak reprodukcji		-		-	9	30,0
118	42	3	zakłócenia reprodukcji, degeneracja zarodków			0	13	43,3
78	27	4	zakłócenia reprodukcji, degeneracja zarodków			0	19	63,3
52	18	6	6	9,67	8-11	58	24	80,0
0,0	Kontrola	7	7	9,86	8-12	69	25	83,3

x/ pokolenie F₂



Rys. 10. Występowanie węzłów *G. varsoviensis* o określonej liczbie osobników młodych w badanych stężeniach chromu Cr^{6+}



Rys. 11. Średnia liczebność osobników młodych w węzle *G. varsoviensis* w badanych stężeniach chromu Cr^{6+}



Fot. 5 Wylinka samicy *G.varsoviensis* wraz z dwoma zdegenerowanymi zarodkami - test chroniczny, reprodukcja pokolenia F_1 , stężenie $27 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$



Fot. 6 Samica *G.varsoviensis* po wylince z pozostałymi zarodkami w komorze lęgowej - test chroniczny, reprodukcja pokolenia F_1 , stężenie $27 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$

Podkreślić należy, że w stężeniach chromu 27 i 42 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ obserwowano nienormalny rozwój zarodków i ich eliminację z komór łęgowych przy stosunkowo niskiej przeżywalności organizmów tj. odpowiednio 63,3 i 43,3 %. W stężeniu 62 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$, a więc najwyższym w tym eksperymencie, przy 30,0 % ich przeżywalności nie stwierdzono rozmnażania do końca eksperymentu.

Analiza wpływu chromu Cr^{6+} na reprodukcję pokolenia F_1 *G. varsoviensis* na podstawie przyjętego wskaźnika reprodukcji wykazała brak jego wpływu tylko w najniższym stężeniu 18 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$. Świadczyła o tym średnia liczebność osobników młodych w łęgu zbliżona do kontroli i wynosząca ok. 10. W wyższych stężeniach chromu Cr^{6+} stwierdzono zakłócenia w procesie reprodukcji /eliminacja zdegenerowanych zarodków/ lub jego brak.

Test z osobnikami młodymi w klasie wielkości 4-5 mm

Wyniki eksperymentu, którego celem było uzyskanie pokolenia F_1' od osobników rodzicielskich P' eksponowanych na działanie chromu Cr^{6+} od b. wczesnego stadium wzrostu tj. 4-5 mm przedstawiono w tabeli 21a oraz na rys. 12, 13.

Analiza wpływu chromu Cr^{6+} wykazała, że procentowy udział łęgów o określonej liczebności osobników młodych pokolenia F_1' oraz średnia liczebność osobników w łęgu w najniższym stężeniu 16 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ były zbliżone do próby kontrolnej. Otrzymano wyłącznie łęgi o liczebności 8-13 osobników oraz średnią liczebność osobników w łęgu ok. 10.

W wyższych stężeniach tj. 24, 35, 53 i 81 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ uzyskano wysoki, jednak malejący procentowy udział łęgów

Tabela 21a

Test chroniczny - reprodukcja pokolenia rodzicielskiego F_1
G.varsoviensis

Stężenie wyjściowe chromu - $180 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$; $q=1,5$

Ilość zwierząt w każdym stężeniu - 40

w klasie wielkości 4-5 mm

Czas trwania eksperymentu - 160 dni

Stężenie $\mu\text{g}/\text{dm}^3$		Dane reprodukcji					Przeżywalność	
		Liczba samic z jajami	Liczba lęgów	Liczebność osobników młodych w lęgu ^{x/}		Ogólna liczba uzyskanych osobników ^{x/} młodych	Liczba osobników po zakończeniu testu	%
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Cr^{6+}			śred-nia	min.-max.			
510	180	100% śmiertelność przed osiągnięciem dojrzałości płciowej						
340	120	100% śmiertelność przed osiągnięciem dojrzałości płciowej						
230	81	3	3	7,00	5-10	21	15	37,5
150	53	6	6	7,33	6-10	44	25	62,5
100	35	7	7	6,42	4-10	45	28	70,0
67	24	10	10	6,30	4-8	63	33	82,5
45	16	10	10	9,70	8-11	97	37	92,5
0,0								
Kontrola		11	11	9,72	9-12	107	35	87,1

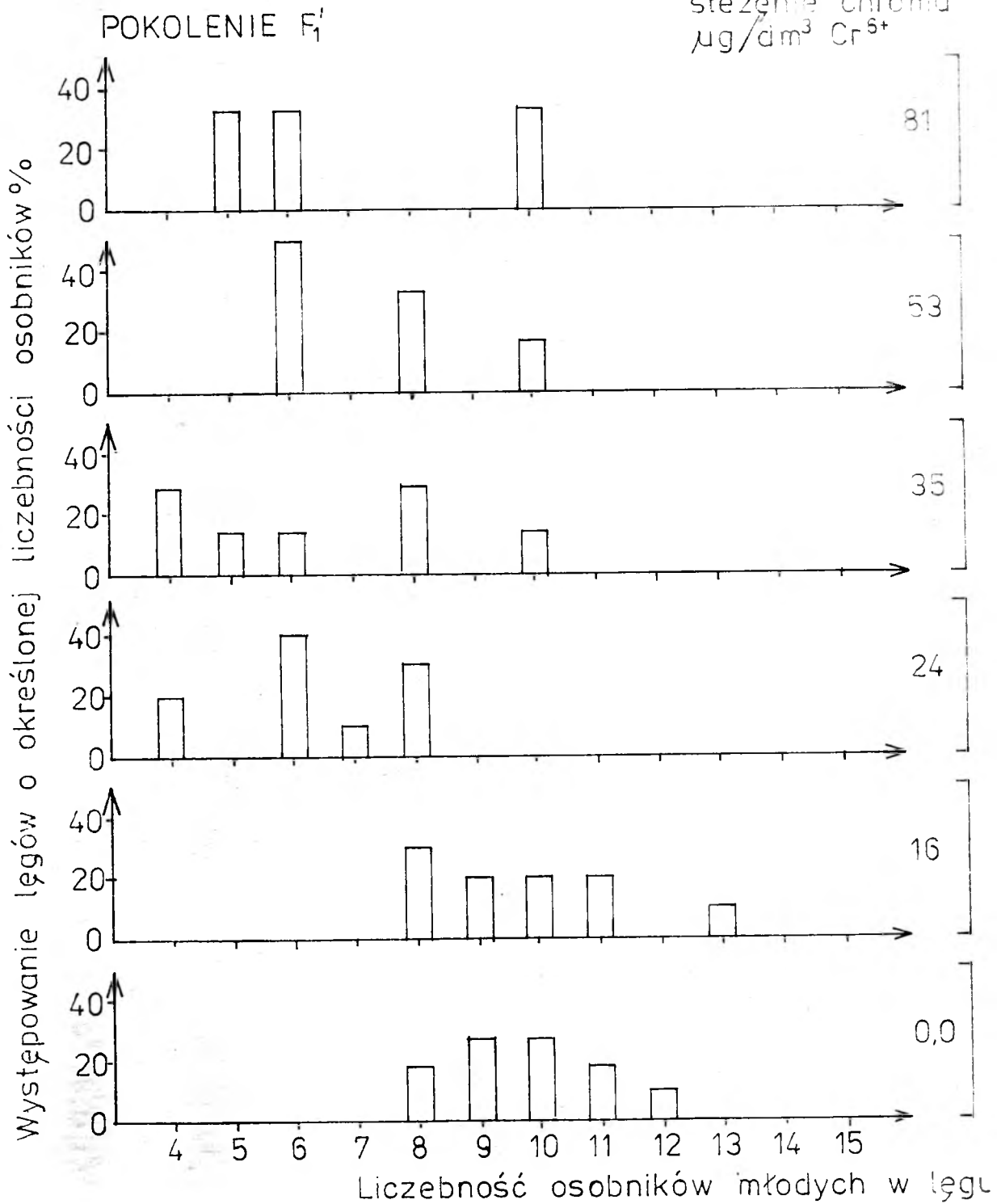
^{x/} pokolenie F_1

TEST CHRONICZNY

REPRODUKCJA *G. varsoviensis* - osobniki rodzicielskie F₁

młode w klasie wielkości 4-5 mm

stężenie chromu
 $\mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$

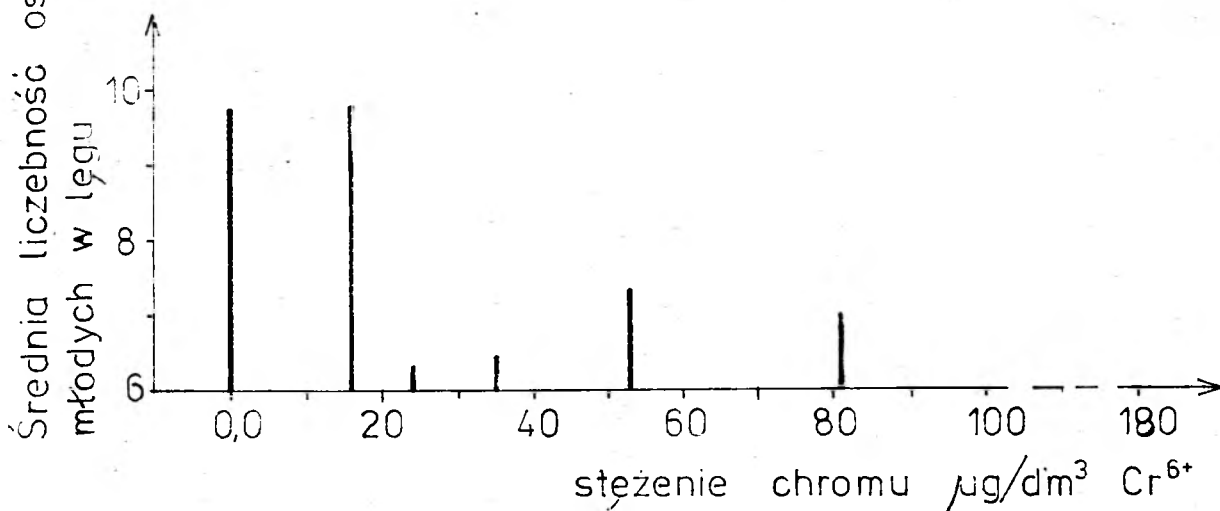


Rys. 12. Występowanie łęgów *G. varsoviensis* o określonej liczebności osobników młodych w badanych stężeniach chromu Cr^{6+}

TEST CHRONICZNY

REPRODUKCJA *G. varsoviensis* - osobniki rodzicielskie P'
młode w klasie wielkości 4-5mm

POKOLENIE F₁



Rys.13. Średnia liczebność osobników młodych w łęgu *G. varsoviensis* w badanych stężeniach chromu Cr^{6+}

o liczebności mniejszej niż w kontroli tj. 4-8 osobników. Wynosił on odpowiednio: 100, 86, 83 i 67 %. Średnia liczebność osobników w lęgu była niższa niż w kontroli i wynosiła odpowiednio : ok. 6,6,7 i 7 osobników.

Na podstawie przeprowadzonych obserwacji pokolenia rodzicielskiego P' stwierdzono, że czas po upływie którego zaobserwowano pierwszy przypadek prekopulacji w próbach z zawartością chromu Cr^{6+} w omawianym zakresie stężeń i w kontroli był zbliżony i wynosił ok. 125 - 129 dni, natomiast czas rozwoju kielży w komorach lęgowych samic / tzw. BDF / ok. 16-17 dni.

Przeżywalność *G.varsoviensis* po zakończeniu eksperymentu kształtowała się następująco. W obu najniższych stężeniach tj. 16 i 24 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ była zbliżona do próby kontrolnej i wynosiła odpowiednio 92,5 i 82,5 %. Odnotować należy, że w stężeniu 24 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ otrzymano 100 % dominację lęgów o zmniejszonej liczebności osobników pokolenia F₁ w stosunku do próby kontrolnej tj. 4-8.

W wyższych stężeniach chromu tj. 35, 53 i 81 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ obserwowano obniżenie przeżywalności testowanych organizmów odpowiednio do 70,0 ; 62,5; i 37,5 %.

W najwyższych stężeniach chromu tj. 120 i 180 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ wystąpiła 100 % śmiertelność kielży przed osiągnięciem dojrzałości płciowej.

Analiza wpływu chromu Cr^{6+} na reprodukcję pokolenia rodzicielskiego P' *G.varsoviensis*, intoksykowanego od stadium wzrostu 4-5 mm, na podstawie przyjętego wskaźnika reprodukcji wykazała brak jego oddziaływania w stężeniu 16 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$. Świadczyła o tym średnia liczebność osobników w lęgu zbliżona

do kontroli i wynosząca ok. 10.

W wyższych stężeniach od 24 do 81 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ zanotowano niższą w porównaniu do próby kontrolnej wartość tego wskaźnika wynoszącą od 6 do 7 osobników, co było oznaką szkodliwego wpływu chromu Cr^{6+} na reprodukcję.

Badania reprodukcji pokolenia F_1 uzyskanego od osobników rodzicielskich F' poddanych oddziaływaniu chromu Cr^{6+} od b. wczesnego stadium wzrostu tj. 4-5 mm przeprowadzono w zakresie stężeń od 16 do 53 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ w 260-dniowym eksperymencie /tabela 21b, rys. 14, 15/. Wykazały one, że tylko w najniższym stężeniu chromu Cr^{6+} otrzymano samice z jajami, a następnie młode osobniki pokolenia F_2 . W pokoleniu tym stwierdzono występowanie wyłącznie lęgów o liczebności 8-12 osobników i średnią liczebność osobników lęgu ok. 10, podobnie jak w kontroli.

W stężeniu 24 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ zaobserwowano 3 przypadki uwolnienia zdegenerowanych zarodków przed przewidywanym czasem rozwoju, zaś w próbach o stężeniu 35 i 53 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ nie stwierdzono procesu rozmnażania do końca trwania eksperymentu.

Pierwszy przypadek prekopulacji stwierdzono w stężeniach 16 i 24 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ i w kontroli w zbliżonym czasie tj. po upływie 205-210 dni.

Czas rozwoju kielży w komorach lęgowych samic w stężeniu 16 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ był zbliżony do kontroli i wynosił ok. 16-17 dni.

Przeżywalność testowanych organizmów po zakończeniu eksperymentu kształtowała się następująco. Już w stężeniu 16 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ była niższa niż w kontroli, co nie wpływało jednak na prawidłowy

Tabela 21b

Test chroniczny - reprodukcja pokolenia F_1 *G.varsoviensis*

Stężenie wyjściowe chromu - $53 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$; $q = 1,5$

Ilość zwierząt w każdym stężeniu - 30

Czas trwania eksperymentu - 260 dni

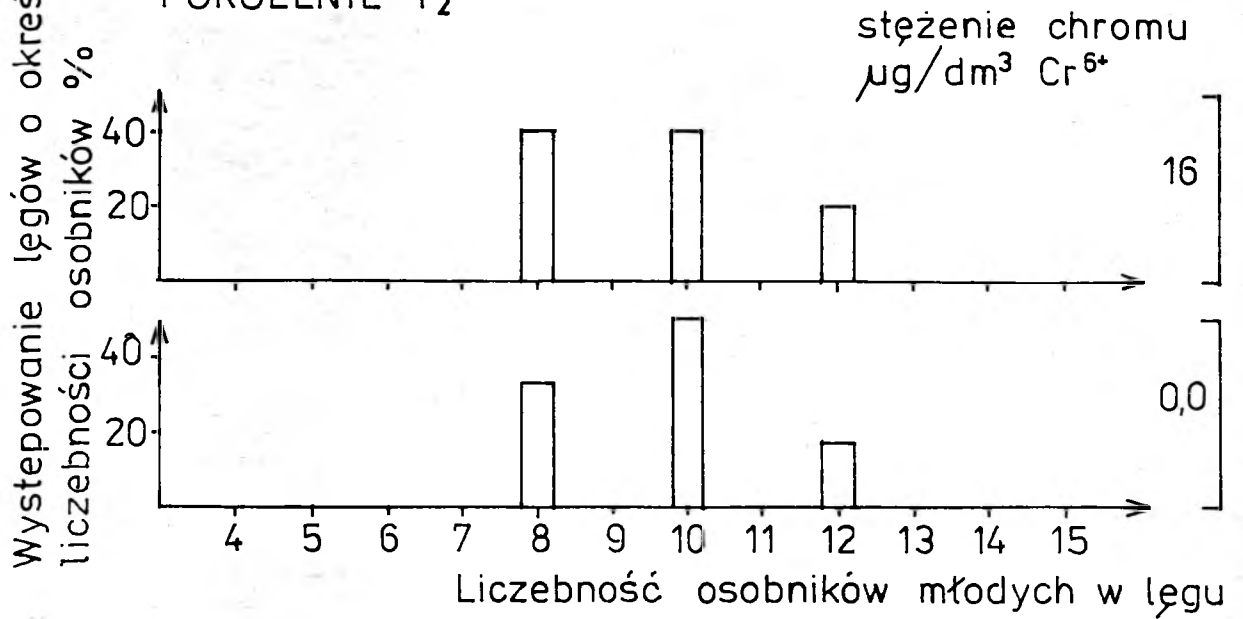
Stężenie $\mu\text{g}/\text{dm}^3$		Dane reprodukcji				Przeżywalność			
		Liczba samic z jajami	Liczba lęgów	Liczebność osobników młodych w lęgu ^{x/}		Ogólna liczba uzyskanych osobników młodych ^{x/}	Liczba osobników po zakończeniu testu	%	
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Cr^{6+}			śred-nia	min.-max.				
150	53	wysoka śmiertelność po ok.100 dniach brak reprodukcji				-	-	7	23,3
100	35	brak reprodukcji		-	-	-	15	50,0	
67	24	3	zakłócenia reprodukcji, degeneracja zarodków		-	0	20	66,5	
45	16	5	5	9,60	8-12	48	21	70,0	
0,0	Kontrola	6	6	9,67	8-12	58	24	80,0	

^{x/} pokolenie F_2

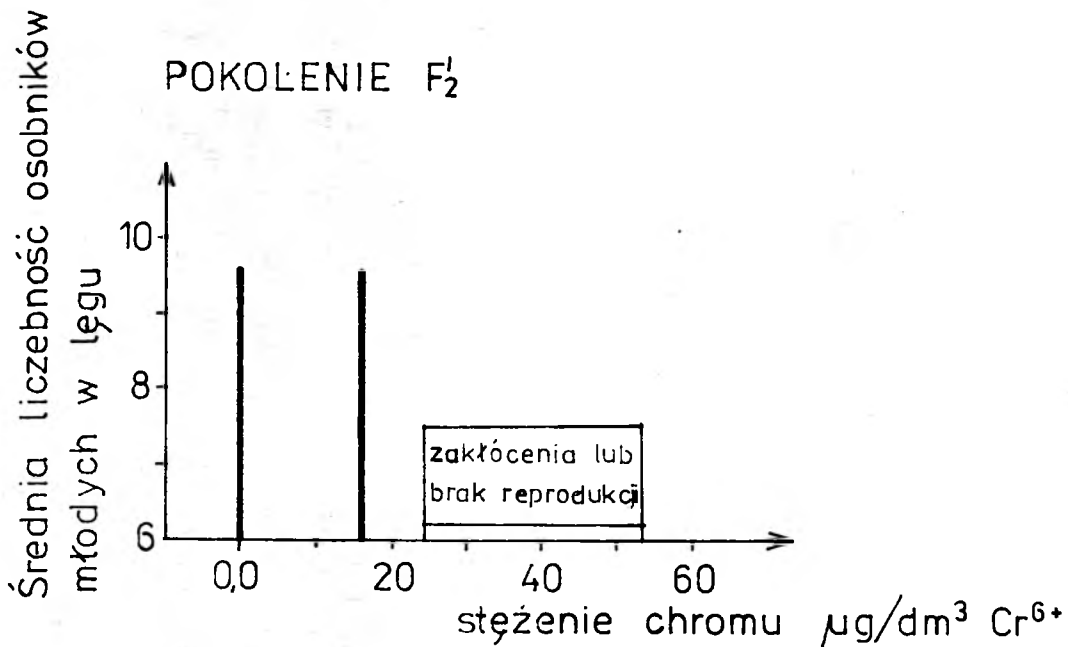
TEST CHRONICZNY

REPRODUKCJA *G. varsoviensis* - osobniki pokolenia F_1

POKOLENIE F_2



Rys. 14. Występowanie guzów *G. varsoviensis* o określonej liczbie guzów młodych w badanych stężeniach chromu Cr^{6+}



Rys. 15. Średnia liczba osobników młodych w łęgu *G. varsoviensis* w badanych stężeniach chromu Cr^{6+}

rozród. W dalszym ciągu w wyższych stężeniach Cr^{6+} obserwowano spadek przeżywalności, przy czym w najwyższym stężeniu $53 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$ wystąpiła znaczna - 76,7 % śmiertelność organizmów w połowie czasu trwania eksperymentu. Wśród pozostałych przy życiu osobników nie zaobserwowano procesu rozmnażania.

Analiza wpływu chromu Cr^{6+} na reprodukcję pokolenia F_1' *G.varsoviensis* na podstawie wskaźnika reprodukcji wykazała brak jego oddziaływania tylko w stężeniu $16 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$. Średnia liczebność osobników w lęgu w tym stężeniu była zbliżona do kontroli i wynosiła ok. 10.

W wyższych stężeniach chromu Cr^{6+} stwierdzono nieprawidłowy rozwój zarodków w komorach lęgowych samic lub brak rozmnażania. Towarzyszyła temu również znaczna śmiertelność testowanych organizmów.

W podsumowaniu przeprowadzonych doświadczeń z osobnikami eksponowanymi na działanie chromu Cr^{6+} od stadium wzrostu określonego klasą wielkości 8-9 mm i 4-5 mm podkreślić należy, że w eksperymentach tych tylko w najniższych stężeniach tj. odpowiednio 18 i $16 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$ uzyskano żywe młode osobniki pokolenia F_2 i F_2' . Średnia liczebność osobników w lęgu w obu stężeniach była zbliżona do próby kontrolnej. Stężenie $16 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$ uznano jako maksymalne tolerowane stężenie chromu Cr^{6+} , NIE ZAKŁÓCAJĄCE REPRODUKCJI pokolenia F_1' uzyskanego od osobników rodzicielskich P' intoksykowanych najdłużej tj. od stadium 4-5 mm.

Z otrzymanych wyników badań nad wpływem chromu Cr^{6+} w podanych zakresach stężeń na reprodukcję *G.varsoviensis*

można wnioskować, że chrom Cr^{6+} wpływa na zmniejszenie liczebności rozwijających się zarodków w komorach łęgowych samic. W przypadku reprodukcji osobników rodzicielskich P intoksykowanych od stadium wzrostu 8-9 mm obserwowano spadek średniej liczebności osobników młodych w lęgu w miarę wzrostu stężeń, począwszy od stężenia $42 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$, natomiast przy wzroście do $94 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$ uzyskano nieprawidłowy rozwój i eliminację zdegenerowanych zarodków kiełży pokolenia F_1 /tabela 20a, rys. 9/. U osobników rodzicielskich P' poddanych oddziaływaniu chromu Cr^{6+} najdłużej tj. od stadium 4-5mm spadek średniej liczebności młodych w lęgu pokolenia F_1' zaznaczył się już od stężenia $24 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$ /tabela 21a, rys. 13/.

Dalsza intoksykacja chromem Cr^{6+} uzyskanych pokoleń F_1 i F_1' wykazała podczas ich reprodukcji występowanie nieprawidłowego rozwoju i eliminację zdegenerowanych zarodków w jeszcze niższych stężeniach niż podczas rozrodu pokoleń rodzicielskich P i P' tj. odpowiednio 27 i $24 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$ / tabela 20b, 21b, rys. 11, 15/.

Mechanizm eliminacji zdegenerowanych zarodków związany był z procesem zrzucania wylinek. Opróżnienie komór łęgowych odbywało się jednorazowo całkowicie podczas linienia w czasie dłuższym lub krótszym niż określony BDT, lub kilkakrotnie partiami po kilka zarodków / Fot. 5,6 /. Stwierdzono także, że wygląd uwolnionych zarodków wskazywał na wewnętrzną deformację i degenerację, że sądzić należy powodowało to pozostanie organizmów na etapie rozwoju równoznacznym z brakiem możliwości podjęcia przez nich funkcji życiowych.

3.3.3. Współczynnik stosowalności

Na podstawie uzyskanych wyników $MACC_2$ / test chroniczny / i LC50-96h /test ostry/ wyznaczono współczynnik stosowalności AF, który wynosi 0,03 i 0,05 odpowiednio dla dorosłych i młodych osobników *G.varsoviensis*.

Współczynnik AF = 0,05 zaleca się do praktycznego stosowania przy określaniu stężenia bezpiecznego chromu Cr^{6+} dla innych gatunków *Gammarus*, nie poddawanych eksperymentom chronicznym. Stężenie bezpieczne w takich przypadkach oblicza się z iloczynu wartości LC50-96 i zalecanego współczynnika.

4. PODSUMOWANIE I DYSKUSJA

Z uwagi na stały wzrost zanieczyszczenia wód powierzchniowych spowodowany odprowadzaniem ścieków przez zakłady przemysłowe niezbędne jest wprowadzanie metod do oceny szkodliwego wpływu związków chemicznych na biocenozy wodne. W Polsce istnieją trzy Polskie Normy metodyczne /73,74,75/. Pozwalają one na ocenę stopnia toksyczności zanieczyszczeń w stosunku do organizmów wodnych tj. ryb *Lebistes reticulatus*, skorupiaków *Daphnia magna* i glonów *Chlorella sp.* na podstawie testów ostrych. Kryterium oceny szkodliwego oddziaływania jest śmierć organizmów w krótkim czasie tj. 96 godzin.

Należy podkreślić, że zalecane organizmy testowe nie odpowiadają w pełni wymaganiom stawianym przez US EPA /za Buikema i wsp. 19/, a ocena szkodliwości zanieczyszczeń na podstawie efektu letalnego nie jest w pełni miarodajna.

W ostatnich latach na świecie obserwuje się szczególny wzrost zainteresowań badaniami toksyczności chronicznej, które znajdują zastosowanie w kompleksowych systemach decyzyjnych wykorzystywanych do ustalania stężeń bezpiecznych związków chemicznych dopuszczalnych do wód. Badania te stanowią ważny element w ocenie stopnia zagrożenia środowiska wodnego. Systemy takie opracowano w USA, RFN, Anglii, Japonii i Francji /za Cairns 20 /.

W kraju brak jest opracowanych metod określania toksyczności chronicznej, które wykorzystują reakcje fizjologiczne organizmów do oceny toksycznego wpływu.

W niniejszej pracy wykonano badania nad wpływem chromu Cr^{6+} na aktywność pokarmową i reprodukcję *Gammarus varsoviensis* Jażdż. Wyniki tych badań wykorzystano do opracowania metody wyznaczania stężeń bezpiecznych zanieczyszczeń odprowadzanych do wód.

Wybór chromu Cr^{6+} został podyktowany jego częstym występowaniem w ściekach przemysłowych, a także dużą toksycznością. Wykorzystywany w wielu gałęziach przemysłu /samochodowy, metalurgiczny, chemiczny, garbarski/ może on występować w ściekach miejskich od części mg do kilku $\text{mg/dm}^3 \text{Cr}^{6+}$ zaś w niektórych ściekach przemysłowych do kilku g /34/. Uważa się, że chrom Cr^{6+} w postaci dwuchromianów wywołuje efekt kancerogeny w układzie oddechowym ludzi narażonych na długotrwały kontakt. Wykazano także mutageny wpływ dwuchromianów na mikroorganizmy. Stwierdzono, że dwuchromian potasu w stężeniu $0,5 \text{ mg/dm}^3$ wywołuje aberracje chromosomalne w komórkach embrionalnych zwierząt stałocieplnych /59/.

Z przeprowadzonych badań w środowisku wodnym wynika, że ścieki zawierające ok. $0,5 \text{ mg/dm}^3 \text{Cr}^{6+}$ wywierają toksyczny wpływ na rośliny i zwierzęta wodne. Nawet obniżenie stężenia do $0,2 \text{ mg/dm}^3 \text{Cr}^{6+}$ nie zmniejszało efektu toksycznego /59/. Wg innych autorów Moore'a i Ramamoorthy'ego /64/ hamowanie wzrostu roślin wodnych następuje w stężeniach od $0,5$ do $5 \text{ mg/dm}^3 \text{Cr}^{6+}$, choć w niektórych przypadkach dwuchromian potasu może stymulować wzrost roślinności wodnej. Dostępne dane odnośnie wielkości stężeń letalnych chromu Cr^{6+} dotyczą głównie różnych gatunków ryb i są określone

po upływie 96 godzin. Wartości te są przeważnie rzędu kilkudziesięciu $\text{mg/dm}^3\text{Cr}^{6+}$ zależnie od gatunku ryb /1,12/. Olson /za Metals in Environment 59/ znacznie wcześniej stwierdził, że stężenie $0,2 \text{ mg/dm}^3\text{Cr}^{6+}$ powodowało 53 % śmiertelność ryb *Oncorhynchus tshawytscha* podczas 12 tygodniowej ekspozycji, a początkowy efekt toksyczny wystąpił po upływie 4-5 tygodni. Stąd nasuwa się wniosek, że toksyczność chromu Cr^{6+} nie może być oceniana na podstawie testów ostrych, dla których przewidziany czas obserwacji wynosi 96 godzin. Uzasadnia to także jego wybór do badań prowadzonych metodą testu chronicznego w niniejszej pracy.

Wg Moore'a i Ramamoorthy'ego /64/ chroniczne oddziaływanie chromu Cr^{6+} związane jest z obniżeniem wzrostu i rozmiarów ciała oraz ze znacznym zmniejszeniem częstotliwości reprodukcji zwierząt.

W Polsce przepisy prawne określają dopuszczalne stężenia chromu Cr^{6+} dla śródlądowych wód powierzchniowych. Stężenia te wynoszą: dla I klasy czystości - $0,05 \text{ mg/dm}^3\text{Cr}^{6+}$, zaś dla II i III klasy - $0,1 \text{ mg/dm}^3\text{Cr}^{6+}$ i poniżej /110/.

Według zaleceń Światowej Organizacji Zdrowia /WHO-1971/ zawartość chromu Cr^{6+} w wodzie do picia nie może być wyższa od $0,05 \text{ mg/dm}^3\text{Cr}^{6+}$ /59/.

Organizm^{em} testowym w niniejszej pracy był przedstawiciel skorupiaków /Crustacea, Amphipoda/ - kielż *Gammarus varsoviensis* Jażdż. Został opisany przez Jażdżewskiego /45/ jako nowy gatunek dla fauny polskiej. Wyboru organizmu dokonano na podstawie kryteriów zalecanych przez US EPA /za Buikema i wsp. 19/. W uzasadnieniu należy podkreślić, że jest on

bezkręgowcem reprezentatywnym dla rzek i jezior, stanowi ważne ogniwo łańcucha troficznego pełniąc rolę destruenta materii organicznej pochodzenia auto- i allochtonicznego /44, 45/. Odnacza się dużą wrażliwością i jest łatwy w hodowli w warunkach laboratoryjnych.

Ponadto możliwość wykorzystania szerokiego zakresu danych dotyczących biologii i fizjologii różnych gatunków *Gammarus* ma także istotne znaczenie dla prowadzenia badań toksykologicznych / 11,35,42,52,63,67,79,90,94,103,105/.

Z przeglądu literatury światowej / 6,7,8,9,15,28,46,65/ wynika, że rodzaj *Gammarus* jest stosowany przez różnych autorów jako organizm testowy w badaniach zarówno toksyczności ostrej jak i chronicznej. Wyniki badań toksyczności ostrej udowodniły, że *Gammarus fasciatus* i *Gammarus pseudolimnaeus* są dobrymi organizmami testowymi, o dużej wrażliwości i specyficznej reakcji na związki toksyczne /15, 28, 46, 65/.

Do realizacji postawionego celu zakres pracy obejmował badania hodowlane *G. varsoviensis* w warunkach laboratoryjnych oraz badania toksyczności ostrej i chronicznej chromu Cr^{6+} .

Badania hodowlane prowadzono starając się zapewnić naturalne warunki bytowania kielży w środowisku wodnym. Do naczyń wprowadzano uzdatnioną wodę w biofiltrze, pokarm w postaci liści oraz kamienie w charakterze podłoża. Utrzymywano temperaturę optymalną dla ich rozwoju tj. $18 \pm 1^{\circ}C$ oraz zapewniano 16 godzinne oświetlenie pomieszczenia świetlówkami o natężeniu 1500 lx w ciągu doby. W czasie hodowli wykonywano obserwacje intensywności żerowania

organizmów, przebiegu procesu rozmnażania z uwzględnieniem BDT /brood development time / tj. czasu rozwoju kielży w komorach lęgowych samic oraz liczebności osobników młodych w lęgach od samic różnych klas wielkości. Ponadto określano okres dojścia do dojrzałości płciowej i długość życia kielża.

Stwierdzono, że dla zapewnienia optymalnych warunków hodowli *G.varsoviensis* tj. utrzymujących wysoką przeżywalność, kondycję i prawidłowy rozwój organizmów niezbędna jest woda wodociągowa uzdatniona w biofiltrze, która charakteryzuje się wartościami wskaźników w granicach: odczynem pH 7,1-7,8 ; zawartością tlenu rozpuszczonego 8,5-9,0 mg/dm³ O₂; BZT₅ 0,80-1,50 mg/dm³ O₂; twardością ogólną 3,8 - 5,2 mvala/dm³; zawartością wapnia 58,6 - 72,6 mg/dm³ Ca i brakiem chloru. Na podkreślenie zasługuje nieskomplikowany sposób uzdatniania wody w biofiltrze, co zapewnia łatwość jej uzyskania w ilościach niezbędnych na potrzeby hodowli i badań doświadczalnych.

Jako pokarm wytypowano liście wiązu *Ulnus campestris* L.em.Huds. moczone około 14 dni w wodzie wodociągowej. Uzupełnienie diety stanowiły okresowo podawane zielone liście *Valisneria spiralis* L..Stwierdzono, że zaproponowany rodzaj pokarmu jest pełnowartościowy dla podtrzymania czynności życiowych kielży, chętnie spożywany przez organizmy, łatwo dostępny w okresie roku oraz sposób jego przygotowania jest prosty.

Dla zapewnienia optymalnych warunków rozwoju *G.varsoviensis* uznano ponadto: temperaturę 18± 1°C, 16-godzinne oświetlenie o natężeniu ok. 1500 lx w ciągu doby z 8-godzinną przerwą

nocną, warunki statyczne z jednoczesnym natlenieniem wody oraz okresowe usuwanie nagromadzonych odchodów zwierząt.

W wyniku przeprowadzonych badań hodowlanych stwierdzono, że *G. varsoviensis* jest dobrym obiektem do badań testowych. W uzasadnieniu jego wyboru należy podkreślić prosty sposób hodowli oraz łatwość uzyskania i przygotowania pokarmu. Stwierdzono, że kielże spośród trzech gatunków podawanych liści chętniej żerowały na liściach wiązu *Ulnus campestris* i olchy *Alnus glutinosa* preferując liście dłużej moczone w wodzie. Dane te są zgodne z wynikami badań Willoughby'ego i Sutcliffe'a /105/ oraz Sutcliffe'a i wsp. /94/.

Nieskomplikowany sposób dokonywania obserwacji organizmu daje możliwość zbierania informacji dotyczących zespołu symptomatologicznego reakcji oraz procesów fizjologicznych głównie odżywiania i rozmnażania. Czas rozwoju *G. varsoviensis* w komorach lęgowych samic tzw. BDT wynoszący w temperaturze $18 \pm 1^{\circ}\text{C}$. ok. 16-17 dni, przedstawiał się podobnie jak dla *G. pulex* /72, 103/. Zaś okres dojścia do dojrzałości płciowej wynosił ok. 6-7 miesięcy i był dłuższy od określonego dla *G. pulex* /35/. Okres życia *G. varsoviensis* wynosił ok. 1,5 roku, choć może być również dłuższy. Liczebność osobników młodych w lęgu zależna była od wieku i wielkości ciała samic i wahała się od 5 /♀ 9 mm/ do 69 /♀ 14-15 mm/ osobników. Przedstawiała się ona średnio dla samic w klasach wielkości w następujący sposób: ♀♀ 9mm - ok. 8; ♀♀ 10-11mm - ok. 13; ♀♀ 11-12 mm - ok. 20; ♀♀ 12-13 mm ok. 31; ♀♀ 13-14 mm ok. 36; ♀♀ 14-15 mm - ok. 54 osobników. Powyższe dane zbliżone są do uzyskanych przez Jażdżewskiego /44/ dla *G. varsoviensis* z rzeki Biebrzy.

Należy stwierdzić, że informacje uzyskane w doświadczeniach hodowlanych były przydatne do oceny szkodliwego wpływu związków chemicznych w badaniach toksyczności ostrej i chronicznej.

Badania toksyczności ostrej wykonywano w warunkach stacyjnych stosując dorosłe i młode osobniki *G. varsoviensis* w klasach wielkości 11-12 mm i 3-4 mm. Zakresy stężeń chromu wynosiły odpowiednio od 44,22 do 0,15 mg/dm³Cr⁶⁺ i od 44,22 do 0,07 mg/dm³Cr⁶⁺. Podczas badań określano zachowanie kielży w początkowej fazie reakcji, zespół objawów symptomatologicznych u osobników przeżywających test oraz objawy śmiertelne. Wyniki testów podano ^(wa) jako LC50-24, 48 i 96h.

W obecności chromu Cr⁶⁺ *G. varsoviensis* zachowywał się w sposób swoisty wykazując wzrost aktywności lokomotorycznej w początkowej fazie reakcji. Podobny efekt obserwowali Arthur i Leonard /8/ prowadząc badania z *Gammarus pseudolimnaeus* w obecności miedzi Cu²⁺. W dalszym przebiegu procesu intoksykacji chromem Cr⁶⁺ obserwowano u *G. varsoviensis* zespół symptomatologiczny objawów obejmujący zaburzenia koordynacji ruchowej, równowagi i zmniejszoną reaktywność na bodziec określany jako porażenie.

Ustalone w wyniku testów ostrych wartości LC50-24,48 i 96h dla *G. varsoviensis* w klasie wielkości 11-12 mm i 3-4 mm wynosiły odpowiednio: 4,74; 1,50; 0,58 mg/dm³Cr⁶⁺ i 1,20; 0,89 i 0,33 mg/dm³Cr⁶⁺.

Z analizy przytoczonych wartości LC50 wynika, że osobniki młode z klasy wielkości 3-4 mm odznaczały się większą

wrażliwością aniżeli dorosłe z klasy wielkości 11-12 mm. Podobne wyniki uzyskał Emery /28/ poddając działaniu krezolu dorosłe i młode osobniki *Gammarus fasciatus*. Znalezione w dostępnej literaturze dane odnośnie wielkości stężeń letalnych chromu Cr^{6+} dotyczą głównie różnych gatunków ryb i są określone po upływie 96 godzin. Wartości te kształtują się różnie w zależności od gatunku ryb i są przeważnie rzędu kilkudziesięciu $\text{mg/dm}^3 \text{Cr}^{6+}$, a więc są wyższe od uzyskanych wartości dla *G. varsoviensis* /1, 12/.

Wartości LC_{50-24h} dla dorosłych i młodych osobników kieźka posłużyły do ustalenia zakresów stężeń chromu Cr^{6+} stosowanych w badaniach chronicznych. Ponadto wartości LC_{50-96h} wykorzystano w dalszym przebiegu badań do wyznaczenia współczynnika stosowalności AF, który pozwoli na określanie stężeń bezpiecznych chromu Cr^{6+} dla innych gatunków *Gammarus* w zakresie długotrwałego oddziaływania, jakkolwiek organizmy te nie będą poddawane badaniom metodą testów chronicznych.

Badania toksyczności chronicznej chromu Cr^{6+} prowadzono w celu określenia jego wpływu na aktywność pokarmową i reprodukcję *G. varsoviensis*. Doświadczenia wykonywano w warunkach dynamicznych przy zastosowaniu specjalnie skonstruowanego urządzenia składającego się z kilkunastu komór odpowiednio do potrzeb eksperymentów. Zapewniano, podobnie jak w hodowli, stały dostęp tlenu, stałą temperaturę oraz pokarm w postaci odpowiednio spreparowanych liści. Do urządzenia doprowadzano system ciągłym roztwory wodne toksykanta

w zakresach stężeń przewidzianych do badania aktywności pokarmowej i reprodukcji.

Eksperymenty w celu oznaczenia aktywności pokarmowej przeprowadzono przy użyciu osobników dorosłych /11-12 mm, 9-10 mm/, będących na granicy dojrzałości płciowej /8-9mm/ i młodych /2-3 mm, 4-5 mm, 6-7 mm/. Zakresy stężeń chromu dla osobników dorosłych i będących na granicy dojrzałości wynosiły od 18 do 210 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$, zaś dla młodych od 16 do 180 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$.

Przeprowadzono sześć 32-dniowych eksperymentów podczas których określano ogólną ilość pobranego pokarmu przez ^{jednego} osobnika, średni przyrost ciężaru jego ciała i na tej podstawie wyznaczano współczynnik pokarmowy. Zmiany aktywności pokarmowej u zwierząt poddanych oddziaływaniu chromu Cr^{6+} określano na podstawie spadku lub wzrostu współczynnika pokarmowego w stosunku do kontroli.

Końcowy wynik testów z aktywnością pokarmową prezentowano w postaci MATC_1 , które nie powodowało zmian aktywności pokarmowej u osobników badanej klasy wielkości.

Na podstawie uzyskanych wyników sześciu eksperymentów chronicznych określono wpływ chromu Cr^{6+} na aktywność pokarmową kielży różnych klas wielkości.

W testach z organizmami dorosłymi wykazano brak istotnego wpływu stężeń chromu od 18 do 94 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$. Procentowe wartości współczynnika pokarmowego w stosunku do kontroli były ujemne lub dodatnie i wynosiły poniżej 5,0 %, co oznacza wg przyjętego założenia brak wpływu chromu Cr^{6+} .

W wyższych stężeniach tj. 140 i 210 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ wykazano, że chrom Cr^{6+} wpływał stymulująco na aktywność pokarmową kielży, ale przy jednoczesnej dużej ich śmiertelności. Procentowe wartości współczynnika pokarmowego w stosunku do kontroli były ujemne i wyższe od 30,0 %. Stymulujący wpływ chromu Cr^{6+} lub brak jego oddziaływania stwierdzono u osobników dorosłych obu badanych klas wielkości.

W badaniach z organizmami będącymi na granicy dojrzałości płciowej nie stwierdzono podobnie jak w przypadku organizmów dorosłych jego wpływu w stężeniach od 18 do 94 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$, na co wskazywały ujemne lub dodatnie procentowe wartości współczynnika pokarmowego w stosunku do kontroli. Były one niższe od 5,0%. W wyższych stężeniach tj. 140 i 210 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ stwierdzono przeciwnie niż u osobników dorosłych hamowanie aktywności pokarmowej oraz dużą śmiertelność testowanych organizmów. Świadczyły o tym dodatnie procentowe wartości współczynnika w stosunku do kontroli, które wynosiły powyżej 30,0 %.

W doświadczeniach z organizmami młodymi, w których użyto kielże trzech klas wielkości, u osobników najmniejszych /2-3 mm/ zaobserwowano brak wpływu na aktywność pokarmową w zakresie stężeń od 16 do 35 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$, natomiast u osobników z klasy wielkości 4-5 i 6-7 mm w zakresie stężeń od 16 do 81 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$. We wszystkich przypadkach procentowe wartości współczynnika pokarmowego były ujemne bądź dodatnie i nie przekraczały 5,0 %. W dalszych stężeniach dochodzących do 180 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ procentowe wartości współczynnika wskazywały na hamowanie aktywności pokarmowej.

Analiza ww. danych w odniesieniu do wszystkich organizmów badanych klas wielkości wykazała stymulujący wpływ chromu w stężeniach 140 i 210 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ wyłącznie u osobników dorosłych. W stężeniach tych stwierdzono hamowanie aktywności pokarmowej u osobników będących na granicy dojrzałości płciowej. Zjawisko to wystąpiło również u osobników młodych niezależnie od klasy wielkości, lecz w stężeniach niższych bowiem w 120 i 180 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$. Ponadto w klasie najmniejszej tj. 2-3 mm zaobserwowano również hamowanie aktywności pokarmowej w znacznie mniejszych stężeniach tj. 53 i 81 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$.

Zakresy stężeń chromu Cr^{6+} , w których nie stwierdzono jego wpływu posłużyły do ustalenia maksymalnego stężenia nie zakłócającego aktywności pokarmowej tzw. MATC_1 w odniesieniu do wszystkich badanych organizmów tj. dorosłych, będących na granicy dojrzałości płciowej oraz młodych. Na podstawie analizy uzyskanych wartości MATC_1 uznano jako stężenie bezpieczne chromu Cr^{6+} , stężenie nie zakłócające aktywności pokarmowej osobników najbardziej wrażliwych ze wszystkich badanych klas wielkości tj. 2-3 mm. Wynosiło ono 35 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$.

Analizując zastosowanie aktywności pokarmowej jako parametru pomiarowego w testach chronicznych należy podkreślić jego przydatność do określania stężeń wywierających hamujący lub stymulujący wpływ na badaną czynność fizjologiczną organizmu. Wydaje się to szczególnie pożyteczne z punktu widzenia zbierania danych do oceny zagrożenia organizmów wodnych wskutek odprowadzania związków toksycznych do wód.

Zaproponowana metoda pomiaru w tym zakresie pozwala na ocenę wpływu toksykanta w stosunku do organizmów różnych klas wielkości. Daje to pogląd na ich wrażliwość w odpowiednich klasach wielkości tj. stadiach wzrostu. Uzyskane wyniki badań były także podstawą do wyboru trzech klas wielkości organizmów zalecanych do stosowania w badaniach aktywności pokarmowej z substancjami o zbliżonych właściwościach do chromu Cr^{6+} . Wytypowane klasy wielkości odpowiednio dla organizmów dorosłych, będących na granicy dojrzałości i młodych są następujące : 11-12 mm, 8-9mm, i 2-3 mm.

W podsumowaniu badań aktywności pokarmowej *G.varsoviensis* należy podkreślić brak danych w literaturze, które posłużyłyby do dyskusji uzyskanych wyników z osiągnięciami innych autorów. Dotyczy to zarówno wytypowanego w niniejszej pracy organizmu testowego - *G.varsoviensis* jak i przyjętego kryterium oceny szkodliwego wpływu toksykanta w badaniach aktywności pokarmowej tj. współczynnika pokarmowego. Współczynnik ten zastosowano po raz pierwszy w niniejszej pracy do oceny efektywności wykorzystywania pokarmu przez *G.varsoviensis* podczas przebiegu procesu jego intoksykacji chromem Cr^{6+} . Należy podkreślić, że jest on stosowany od wielu lat w rybactwie do oceny efektywności wykorzystania pokarmu przez ryby oraz do uzyskania zaplanowanego przyrostu ich biomasy.

W dalszym etapie badań chronicznych wykonano eksperymenty, których celem było określenie wpływu chromu Cr^{6+} na reprodukcję *G.varsoviensis*. Badania prowadzono z osobnikami dwóch

klas wielkości tj. 8-9 mm będącymi na granicy dojrzałości płciowej i 4-5 mm tj. młodymi, które stanowiły pokolenia rodzicielskie P i P'. W wyniku ich reprodukcji uzyskano pokolenia F₁ i F'₁ w 160-dniowych eksperymentach. W dalszym przebiegu doświadczeń tj. w okresie 260 dni otrzymano odpowiednio pokolenia F₂ i F'₂.

Podczas przebiegu eksperymentów z pokoleniami rodzicielskimi P i P' kielży obu klas wielkości oraz pokoleniami F₁ i F'₁, w każdym badanym stężeniu chromu Cr⁶⁺ określano: czas pojawienia się jaj w komorach lęgowych samic, liczbę samic z obecnością jaj w komorach lęgowych i liczbę lęgów. A ponadto oznaczano: czas rozwoju kielży w komorach lęgowych samic obejmujący okres od pojawienia się jaj do uwolnienia pierwszych młodych osobników tzw. BDT, liczebność osobników młodych w lęgu i ogólną liczebność uzyskanych młodych osobników. Podczas nieprawidłowego rozwoju kielży notowano ilość przypadków wcześniejszego lub późniejszego uwolnienia zdegenerowanych zarodków aniżeli wyznaczony czas BDT.

Jako kryterium oceny toksycznego wpływu chromu Cr⁶⁺ przyjęto występowanie lęgów o określonej liczebności osobników młodych oraz wskaźnik reprodukcji tj. średnią liczebność osobników młodych w lęgu. Spadek wartości wskaźnika w porównaniu z próbą kontrolną oraz zakłócenia w rozwoju kielży obejmujące eliminację zdegenerowanych zarodków z komór lęgowych świadczyły o szkodliwym wpływie chromu.

W wyniku testów z reprodukcją określono maksymalne tolerowane stężenia chromu Cr⁶⁺, które nie wywoływały zmian w reprodukcji pokoleń F₁ i F'₁ uzyskanych od osobników

rodzicielskich intoksykowanych od stadium wzrostu określonego klasą wielkości 8-9 mm i 4-5 mm tzw. MATC₂.

Analiza uzyskanych wyników reprodukcji pokolenia rodzicielskiego P tj. w klasie wielkości 8-9 mm doprowadziła do następujących uogólnień. Na podstawie występowania lęgów pokolenia F₁ o liczebności 10-14 osobników nie stwierdzono wpływu chromu w stężeniach 18 i 27 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$. Świadczy również o tym średnia liczebność osobników młodych w lęgu zbliżona do kontroli tj. ok. 11. Wpływ chromu uwidocznił się w stężeniach 42 i 62 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$, przy których zaobserwowano 90 i 86% udział lęgów o liczebności niższej aniżeli w kontroli tj. 7-10 osobników. Średnia liczebność osobników w lęgu była także niższa i wynosiła ok. 9. Natomiast w stężeniach 94 i 140 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ wystąpiły: znaczna-60,0 i 75,0% śmiertelność testowanych organizmów oraz zakłócenia w reprodukcji pozostałych przy życiu tj. eliminacja zdegenerowanych zarodków z komórek lęgowych lub brak rozmnażania. W stężeniu 210 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ zanotowano wysoką śmiertelność kielży przed osiągnięciem dojrzałości płciowej.

W pokoleniu F₂, tylko w najniższym z badanego zakresu stężeń tj. 18 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ nie zaobserwowano wpływu chromu Cr^{6+} . Stwierdzono 100% dominację lęgów o liczebności 8-11 osobników oraz średnią liczebność osobników w lęgu ok. 10. Dane te są zbliżone do próby kontrolnej.

Wyższe stężenia chromu tj. 27, 42 i 62 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ spowodowały eliminację zdegenerowanych zarodków z komórek lęgowych samic lub brak reprodukcji. Towarzyszył temu wzrost śmiertelności testowanych organizmów odpowiednio od 36,7 do 70,0 %.

Wpływ chromu Cr^{6+} zaobserwowano także podczas badań reprodukcji pokolenia rodzicielskiego P' tj. w klasie wielkości 4-5 mm.

Z występowania lęgów pokolenia F_1' o liczebności 8-13 osobników młodych wynika, że tylko w stężeniu $16 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$ nie zaobserwowano oddziaływania chromu Cr^{6+} . Wyższe stężenia tj. 24, 35, 53 i $81 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$ powodowały znaczne zmniejszenie liczebności osobników młodych w lęgach. Udział lęgów o liczebności 4-8 osobników kształtował się odpowiednio od 100 do 67 %. Średnia liczebność osobników w lęgu była także niższa aniżeli w kontroli i wynosiła ok. 6 i 7. Znaczną śmiertelność testowanych organizmów stwierdzono w stężeniach 35, 53, $81 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$ (tj. od 30 do 63 %, natomiast w najwyższym stężeniu - 100% śmiertelność organizmów wystąpiła przed osiągnięciem dojrzałości płciowej.

Oddziaływanie chromu na pokolenie F_2' nie uwidoczniło się tylko w najniższym stężeniu tj. $16 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$. Uzyskano lęgi kielży wyłącznie o liczebności 8-12 osobników. Średnia liczebność osobników młodych w lęgu była jak w kontroli tj. ok. 10.

W wyższych, badanych stężeniach chromu tj. 24, 35, $53 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$ stwierdzono uwalnianie się zdegenerowanych zarodków i brak reprodukcji do końca badań. Przeżywalność testowanych organizmów była niska.

Podsumowując należy podkreślić, że chrom Cr^{6+} oddziaływał szkodliwie na proces reprodukcji pokoleń rodzicielskich P i P' w rozważanych klasach wielkości oraz uzyskanych pokoleń F_1 i F_1' *G. varsoviensis* począwszy od stężeń odpowiednio

42 i 24 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ oraz 27 i 24 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$. W przypadku reprodukcji osobników rodzicielskich P i P' w omawianych wyżej stężeniach wskaźnik reprodukcji /tj. średnia liczebność osobników w lęgu/ obniżył się w stosunku do jego wartości w kontroli odpowiednio o ok. 2 i 4. Ponadto w przypadku pokolenia rodzicielskiego P obserwowano zakłócenia reprodukcji tj. degenerację zarodków i ich eliminację z komór lęgowych samic w stężeniu 94 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$. Natomiast podczas reprodukcji pokoleń F₁ i F'₁ wskaźnik reprodukcji był zbliżony do kontroli tylko w najniższych stężeniach tj. 18 i 16 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$. Zaś w pozostałych badanych stężeniach tj. odpowiednio 27, 42, 62 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ i 24, 35, 53 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ obserwowano zakłócenia^w reprodukcji objawiające się degeneracją zarodków i ich eliminacją z komór lęgowych lub brak rozmnażania. Stwierdzono także wysoką śmiertelność testowanych organizmów. Tak więc, chrom Cr⁶⁺ powodował zmniejszenie liczebności rozwijających się zarodków w komorach lęgowych samic pokoleń rodzicielskich P i P' kiedy obu klas wielkości oraz wywoływał zakłócenia w rozwoju zarodków podczas reprodukcji pokoleń F₁ i F'₁ będąc przyczyną ich degeneracji i eliminacji.

W wyniku badań reprodukcji jako stężenie bezpieczne chromu Cr⁶⁺ uznano 16 $\mu\text{g}/\text{dm}^3\text{Cr}^{6+}$ tj. maksymalne tolerowane stężenie, nie zakłócające reprodukcji pokolenia F'₁ uzyskanego od osobników rodzicielskich P' intoksykowanych najdłużej tj. od b. wczesnego stadium określonego klasą wielkości 4-5 mm.

Porównując wyniki badań własnych z *G.varsoviensis* z wynikami innych autorów z *Gammarus pseudolimnaeus*, należy podkreślić różnice w sposobie oceny toksycznego wpływu związków chemicznych na reprodukcję tych organizmów. Autorzy ci /7,9,66,68/ stosują jako kryterium oceny ogólną liczebność uzyskanych młodych osobników *G.pseudolimnaeus*, natomiast nie uwzględniają liczby lęgów, liczebności osobników w lęgu oraz czasu rozwoju kielży w komorach lęgowych samic tj. BDT. Wydaje się, że ten sposób podejścia nie daje poglądu na mechanizm oddziaływania toksykanta na proces reprodukcji. Określenie ogólnej liczebności uzyskanych młodych osobników nie wyjaśnia z ilu lęgów pochodzą oraz przyczyn zmniejszania się ich liczebności. Jak wynika z niniejszej pracy zmniejszona ogólna liczebność otrzymanych młodych osobników może być spowodowana oddziaływaniem toksykanta na rozwój zarodków jak również mniejszą ilością lęgów. Ponadto liczebność uzyskanych młodych osobników zależy od wielkości samic. Dlatego w badaniach reprodukcji ważny jest dobór samic w zbliżonych klasach wielkości w przypadku stosowania dorosłych osobników. Stwierdzono także, że przyczyną braku żywych młodych organizmów może być destrukcyjny wpływ toksykanta na zarodki, które są uwalniane po czasie dłuższym lub krótszym niż określony czas BDT. Dlatego w ocenie toksycznego wpływu istotne jest określenie czasu rozwoju kielży w komorach lęgowych samic w przypadkach prawidłowej jak i zakłóconej reprodukcji. Jak wykazano w niniejszej pracy przyjęty wskaźnik reprodukcji tj. średnia liczebność osobników młodych w lęgu jest bardziej miarodajny w ocenie toksycznego oddziaływania niż ogólna liczebność uzyskanych młodych osobników.

Z porównania wartości stężenia bezpiecznego chromu Cr^{6+} określonego na podstawie badań aktywności pokarmowej tj. $35 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$ i reprodukcji tj. $16 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ wynika, że proces rozmnażania jest czulszym parametrem fizjologicznym niż aktywność pokarmowa. Prawidłowy rozród pokolenia F_1^1 uzyskanego od osobników rodzicielskich P^1 intoksykowanych najdłużej tj. od b. wczesnego stadium wzrostu 4-5 mm miał miejsce w niższych stężeniach chromu Cr^{6+} niż niezakłócona aktywność pokarmowa osobników najwrażliwszej klasy wielkości tj. 2-3 mm. Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki, celowe jest stosowanie testu z reprodukcją do wyznaczania stężenia bezpiecznego jako czulszego parametru fizjologicznego aniżeli aktywność pokarmowa.

Uznana w niniejszej pracy na podstawie testu z reprodukcją *G. varsoviensis* wartość $16 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$ za stężenie bezpieczne chromu Cr^{6+} jest ok. 3-krotnie i 6-krotnie niższa od wielkości dopuszczalnego zanieczyszczenia chromem Cr^{6+} śródlądowych wód powierzchniowych odpowiednio dla I oraz II i III klasy czystości określonego w Zał. Nr 1 do Rozp. Rady Min. z dn. 29.11.1975 r. poz. 214 /110/. Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują na konieczność uwzględniania parametrów fizjologicznych organizmów przy ustalaniu dopuszczalnych stężeń zanieczyszczeń w wodach powierzchniowych. Wartości ustalone tą drogą powinny służyć do weryfikacji metod badawczych i przepisów obowiązujących w zakresie ochrony wód. Należy podkreślić, że podejście takie jest reprezentowane przez autorów, którzy uznają za konieczne wprowadzenie ujednoczonych systemów oceny zagrożenia środowiska wodnego.

W podsumowaniu niniejszej pracy należy także podkreślić możliwość praktycznego wykorzystania wartości LC50-96h /test ostry / i MATC₂ /test chroniczny/ do wyznaczenia współczynnika stosowalności AF. Współczynnik ten może znaleźć zastosowanie do wyznaczania stężenia bezpiecznego chromu Cr⁶⁺ dla innych gatunków Gammarus nie poddawanych testom chronicznym. W takich przypadkach stężenie bezpieczne wyznacza się wyłącznie na podstawie testu ostrego, z iloczynem wartości LC50-96h i współczynnika stosowalności AF. Zalecana w niniejszej pracy wartość AF = 0,05 jest zbliżona do podawanych przez Water Quality Criteria of 1972 /101/ wartości AF dla ryb *Pimephales promelas* i *Salmo gairdneri* odpowiednio 0,03 i 0,04.

5. WNIOSKI

5.1. *Gammarus varsoviensis* Jażdż. jest przedstawicielem rodziny Gammaridae szczegółowo opracowanej w zakresie biologii i fizjologii. Został wytypowany jako organizm testowy do badań toksyczności ostrej i chronicznej chromu Cr^{6+} ponieważ spełniał większość wymagań stawianych testobiontom przez US EPA w szczególności z uwagi na: reprezentatywność, łatwość w hodowli i wrażliwość. Jest szczególnie przydatny do testów chronicznych ze względu na możliwość obserwacji procesu rozmnażania w przypadkach prawidłowego jak i zakłóconego rozrodu oraz krótki czas rozwoju w komorach lęgowych samic.

5.2. Określono optymalne parametry hodowli laboratoryjnej *G. varsoviensis* w warunkach statycznych: środowisko bytowania - woda wodociągowa po uzdatnieniu w biofiltrze, pokarm - spreparowane liście wiązu *Ulnus campestris* L.em.Huds. oraz okresowo podawane liście *Valisneria spiralis* L., temperatura - $18 \pm 1^{\circ}C$, 16 godzinne oświetlenie pomieszczenia świetlówkami o natężeniu ok. 1500 lx. W tych warunkach rozwój kielża charakteryzował się następująco :

- czas rozwoju w komorach lęgowych samic tzw. BTT wynosił ok. 16-17 dni,
- okres dojścia do dojrzałości płciowej trwał ok.6-7 m-cy,
- długość życia wynosiła ok. 1,5 roku,
- liczebność osobników młodych w lęgu kształtowała się zależnie od wielkości ciała samicy od 5/♀ 9 mm/do 69 /♀ 14-15 mm/ osobników.

- 5.3. *G.varsoviensis* okazał się czułym bioindykatorem do oceny toksyczności ostrej chromu Cr^{6+} . Podczas krótkotrwałej ekspozycji wykazywał wzrost aktywności lokomotorycznej w początkowej fazie reakcji. Osobniki młode były bardziej wrażliwe aniżeli dorosłe. Wartości $\text{LC}_{50-24, 48 \text{ i } 96\text{h}}$ określone dla osobników dorosłych w klasie wielkości 11-12 mm oraz młodych w klasie wielkości 3-4 mm wynosiły odpowiednio: 4,74; 1,50; 0,58 $\text{mg/dm}^3\text{Cr}^{6+}$ oraz 1,20; 0,89; 0,33 $\text{mg/dm}^3\text{Cr}^{6+}$.
- 5.4. Jako kryteria oceny toksyczności chronicznej chromu Cr^{6+} wytypowano parametry fizjologiczne *G.varsoviensis* tj. aktywność pokarmową i reprodukcję.
- 5.4.1. Zmiany aktywności pokarmowej *G.varsoviensis* określano na podstawie spadku lub wzrostu współczynnika pokarmowego w porównaniu z próbą kontrolną. Uzyskane procentowe wartości tego współczynnika wskazywały na zakłócenia aktywności pokarmowej w obecności chromu Cr^{6+} tj. na hamowanie lub stymulację tego procesu zależnie od klasy wielkości organizmów / p.p. III.3.3.1/. Wartości te dla osobników z klasy wielkości 2-3 mm, 8-9 mm i 11-12mm wynosiły odpowiednio: +14,3% w stężeniu 53 $\mu\text{g/dm}^3\text{Cr}^{6+}$, +37,0% - 140 $\mu\text{g/dm}^3\text{Cr}^{6+}$ i -52,4% - 140 $\mu\text{g/dm}^3\text{Cr}^{6+}$. Maksymalne tolerowane stężenia chromu, nie zakłócające aktywności pokarmowej organizmów wyżej wymienionych klas wielkości tzw. MATC_1 kształtowały się odpowiednio: 35,94 i 94 $\mu\text{g/dm}^3\text{Cr}^{6+}$. Stwierdzono, że spośród badanych

organizmów najbardziej wrażliwe na działanie chromu Cr^{6+} były osobniki w klasie wielkości 2-3 mm.

5.4.2. Zmiany w reprodukcji *G. varsoviensis* pod wpływem chromu Cr^{6+} określano na podstawie spadku wskaźnika reprodukcji w porównaniu do jego wartości w próbie kontrolnej oraz stwierdzenia nieprawidłowego rozwoju i eliminacji zdegenerowanych zarodków z komórek lęgowych samic. Chrom oddziaływał szkodliwie począwszy od stężenia $24 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$ na reprodukcję pokolenia rodzicielskiego P^1 w klasie wielkości 4-5 mm tj. intoksykowanego najdłużej oraz jego pokolenia F_1^1 . W tym stężeniu w wyniku reprodukcji pokolenia rodzicielskiego P^1 uzyskano żywe młode osobniki pokolenia F_1^1 , lecz w zmniejszonej ilości o czym świadczył spadek wskaźnika reprodukcji tj. średniej liczebności osobników w lęgu o ok. 4. Natomiast podczas reprodukcji pokolenia F_1^1 obserwowano degenerację zarodków i ich eliminację z komórek lęgowych samic, co nie doprowadziło do uzyskania pokolenia F_2^1 . Stwierdzono, że pokolenie F_1^1 było bardziej wrażliwe od pokolenia rodzicielskiego P^1 . Maksymalne tolerowane stężenie chromu, nie zakłócające procesu reprodukcji pokolenia F_1^1 tzw. MATC_2 wynosiło $16 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$.

5.5. Z porównania wartości maksymalnych tolerowanych stężeń, nie zakłócających aktywności pokarmowej $/\text{MATC}_1/$ i reprodukcji $/\text{MATC}_2/$ odpowiednio 35 i $16 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$ wynika, że proces rozmnażania jest czulszym i bardziej

miarodajnym parametrem fizjologicznym wykorzystywanym do określania stężenia bezpiecznego chromu Cr^{6+} dla wód powierzchniowych.

5.6. Biorąc pod uwagę wpływ chromu Cr^{6+} na reprodukcję *G.varsoviensis* ustalono, że stężenie bezpieczne chromu dla wód powierzchniowych nie powinno przekraczać $16 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$. Wartość ta jest ok. 3-krotnie i 6-krotnie niższa od wielkości dopuszczalnego zanieczyszczenia chromem Cr^{6+} śródlądowych wód powierzchniowych odpowiednio dla I oraz II i III klasy czystości.

5.7. Na podstawie uzyskanych wyników MATC_2 /test chroniczny/ i LC50-96h /test ostry/ wyznaczono współczynnik stosowalności $\text{AF} = 0,05$, który zaleca się do praktycznego stosowania przy określaniu stężenia bezpiecznego chromu Cr^{6+} dla innych gatunków *Gammarus* nie poddawanych badaniom chronicznym. Stężenie bezpieczne w takich przypadkach można wyznaczać na podstawie testu ostrego, z iloczynu wartości LC50-96h i AF .

Najnowsze tendencje na świecie w dziedzinie ochrony wód przed zanieczyszczeniem wskazują na konieczność wprowadzania ujednoczonych systemów oceny zagrożenia środowiska wodnego, w których wiodącą rolę spełniają

badania toksyczności. W tym celu niezbędne są opracowania metodyczne, które pozwoliłyby na zebranie danych upoważniających do podejmowania decyzji dotyczących wyznaczania dopuszczalnych stężeń zanieczyszczeń odprowadzanych do środowiska. W toku badań opracowano metodę testu toksyczności chronicznej i wykazano jej przydatność do oceny szkodliwego wpływu chromu Cr^{6+} na organizmy wodne w przedłużonym czasie działania.



6. PIŚMIENNICTWO

1. Adelman I.R., Smith L.L.: Fathead minnows /*Pimephales promelas*/ and goldfish /*Carassius auratus*/ as standard fish in bioassays and their reaction to potential reference toxicants. J. Fish. Res. Bd Canada 1976, 33, 209
2. Annual Book of ASTM Standards. Conducting acute toxicity test with fishes, macroinvertebrates and amphibians. ASTM, Philadelphia, PA, 1980, E729-780
3. Aquatic Invertebrate Bioassays. eds. A.L. Buikema Jr, J. Cairns Jr, ASTM Philadelphia P.A., 1980
4. Aquatic Life Advisory Committee of The Ohio River Valley Water Sanitation Commission. Aquatic life water quality criteria. First progress report. Sew. Ind. Wastes 1955, 27, 321-331
5. Arillo A., Margiocco C., Melodia F.: The gill sialic acid content as an index of environmental stress in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. J. Fish. Biol. 1979, 15, 405-410
6. Arthur J.W.: Chronic effects of linear alkylate sulfonate detergent on *Gammarus pseudolimnaeus*, *Campeloma decisum* and *Physa integra*. Water Res. 1970, 4, 251-257
7. Arthur J.W., Eaton J.G.: Chloramine toxicity to the amphipod *Gammarus pseudolimnaeus* and the fathead minnow /*Pimephales promelas*/. J. Fish. Res. Bd Canada 1971, 28, 1841-1845
8. Arthur J.W., Leonard E.N.: Effects of copper on *Gammarus pseudolimnaeus*, *Physa integra* and *Campeloma decisum* in soft water. J. Fish. Res. Bd Canada 1970, 27, 1277-1283.

9. Arthur J.W., Lemke A.F., Mattison V.R., Halligan B.J.:
Toxicity of sodium nitrilotriacetate / NTA / to the
fathead minnow and an amphipod in soft water.
Water Res. 1974, 8, 187-193
10. Ausgewählte Methoden der Wasseruntersuchung. Band II.
Biologische, mikrobiologische und toxikologische Methoden.
VEB Gustav Fischer Verlag Jena 1982, 579 pp
11. Bärlocher F., Kendrick B.: Fungi and food preference of
Gammarus pseudolimnaeus. Arch. Hydrobiol. 1973, 72,
501-516
12. Benoit D.A.: Toxic effects of hexavalent chromium on brook
trout /*Salvelinus fontinalis* / and rainbow trout /*Salmo
gairdneri* /. Water Res. 1976, 10, 497
13. Biesinger K.E., Christensen G.M.: Effects of various
metals on survival, growth, reproduction and metabolism
of *Daphnia magna*. J.Fish. Res. Bd Canada 1972, 29,
1691-1700
14. Biological Field and Laboratory Methods for Measuring
the Quality of Surface Water and Effluents.
ed. C.J. Weber, Environmental Monitoring Series, US EPA
Cincinnati, Ohio, Bioassay 1973, 1-31
15. Bluzat R., Seuge J.: Effects of three insecticides
/lindane, fenthion, carbaryl/: acute toxicity for four
species of aquatic invertebrates; chronic toxicity in the
pulmonate *Lymnea*. J. Environ. Pollut. 1979, 18, 51-70
/streszcz.z ASFA 1979, 9, nr 1-22/

16. Bringman G., Kuhn R.: Vergleichende Wassertoxikologische Untersuchungen mit Bakterien, Algen und Kleinkrebsen. Gesundheits Ing. 1959, 4, 115-120
17. Bringman G. Kuhn R.: Wassertoxikologische Untersuchungen mit Protozoen als Testorganismen. Gesundheits Ing. 1959, 8, 239-242
18. Buikema A.L.Jr, Benfield E.F.: Use of macroinvertebrate life history information in toxicity tests. J. Fish. Res. Bd Canada 1979, 36, 321-328
19. Buikema A.L. Jr ,Niederlehner B.R., Cairns J.Jr : Biological Monitoring. Part IV - Toxicity testing. Water Res. 1982, 16, 239-262
20. Cairns J.Jr : Estimating hazard. Bioscience 1980, 30, 101-107
21. Cairns J.Jr : Freshwater biological monitoring : Keynote address. Freshwater biological monitoring. Proceedings of a Specialised Conference held in Cardiff U.K. 12-14 September 1984 ed.D Pascoe, R.W. Edwards, Pergamon Press 1984, 1-14
22. Czarnowska K.: Zmiany zawartości metali ciężkich w glebach i roślinach z terenu Warszawy jako wskaźnik antropogenezacji środowiska. Zeszyty Naukowe SGGW AR w Warszawie, Katedra Gleboznawstwa Rozprawy naukowe 106, Warszawa 1978, 71 pp

23. Czarnowska K., Czerwiński Z., Praczk J., Gworek B., Kusińska A., Zagórski Z.: Właściwości fizykochemiczne gleb m. Łodzi oraz skład chemiczny materiału roślinnego cz.III maszynopis SGGW Akademia Rolnicza, Warszawa 1978
24. Czarnowska K., Gworek B.: Liście lipy - *Tilia euchlora* - jako bio wskaźniki zanieczyszczeń środowiska miejskiego /doniesienie/. Katedra Gleboznawstwa SGGW - AR w Warszawie 1987 /w druku /
25. Dojlido J., Praszkiwicz A., Słomczyńska B.: Acute toxicity of petrochemical wastes from Mazovian Refining and Petrochemical Plant on aquatic organisms. Arch. Ochrony Środowiska 1978, 1, 39-56
26. Doudoroff P., Anderson B.G., Burdick G.E., Galtsoff P.S., Hart W.B., Patrick R., Strong E.R., Suber E.W., Van Horn W.M.: Bio-assay for the evaluation of acute toxicity of industrial wastes to fish. Sew. Ind.Wastes 1951, 23, 1380-1397
27. Eaton J.G.: Chronic malathion toxicity to the bluegill /*Lepomis macrochirus Rafinesque*/. Water Res. 1976, 4, 673-684
28. Emery R.M.: The comparative acute toxicity of cresol to two benthic crustaceans. Water Res. 1970, 4, 485-491
29. Finney D.J.: Statistical method in biological assay. Hafner Publishing Company, New York 1952, 468-490
30. Groba J., Trzcińska B.: Wpływ wybranych insektycydów fosforoorganicznych i karbaminianowych na pstrąga tęczowego *Salmo gairdneri* R. Bromat.Chem.Toksykol. 1979, 12, 1, 33-38

31. Halsband E.: Störungsschwelle und Fluchtreaktion bei Fischen unter der Einwirkung von Abwassergiften. Inf.f. Fischwirt. 1962, 1/2, 23-24
32. Hanssen D.J.: DDT and Malathion: effect on salinity selection by mosquitofish. Trans.Am.Fish.. Society 1972,2, 346-349
33. Hart W.B., Doudoroff P., Greenbank J.: The Evaluation of the Toxicity of Industrial Wastes, Chemicals and Other Substances to Fresh Water Fishes. Waste Control Laboratory, Atlantic Refining Co., Philadelphia, Pa, 1945, 317 pp
34. Hermanowicz W., Dożańska W., Dojlido J., Koziarowski B.: Fizyczno-chemiczne badanie wody i ścieków. Arkady Warszawa 1976, 846 ss
35. Hynes H.N.B.: The reproductive cycle of some British freshwater Gammaridae. J. Anim. Ecol. 1955, 24, 352-387
36. Ishio S.: Behavior of fish exposed to toxic substances. Advances in water pollution research. Proceedings of the 2nd international conference held in Tokyo. ^{ed.} O. Jaag, Pergamon Press Book 1964, 19-40
37. ISO 6341-1982 Water Quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus /Cladocera, Crustacea/

38. ISO /DIS 7346/1,2,3 - 1984 Water Quality -Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh-water fish /Brachydanio rerio/ Hamilton - Buchanan/, Teleostei, Cyprinidae - Part 1: Static method, Part 2: semi-static method, Part 3: flow-through method
39. ISO/TC 147 /SC5/WG5 N 85 - 1984 Draft method. Algal Growth Inhibition Test. Determination of toxic effect/ of chemical compounds /on the growth of a freshwater algae Scenedesmus subspicatus Chodat
40. ISO/TC 147/SC 5/WG5- 1984 Draft method. Determination of toxic effects /of chemical compounds/ on the growth of a marine diatom : Skeletonema costatum
41. ISO/TC 147/SC 5/WG 3 N 33 - 1984 Draft method. Determination of the acute toxicity with Poecilia reticulata
42. Iversen T.M., Jessen J.: Life-cycle, drift and production of Gammarus pulex L./Amphipoda/ in a Danish spring. Freshwat. Biol. 1977, 7, 287-296
43. Jackson H.W., Brungs W.A.: Biomonitoring of industrial effluents. Proc. 21 st. Ind. Conf. Purdue University., Eng. Ext. Bull. 1966, 121, 117 pp
44. Jażdżewski K.: Notatka o skorupiakach rzeki Biebrzy. Zesz. Nauk. UŁ ser. II 1970, 40, 47-55

45. Jażdżewski K.: Morfologia, taksonomia i występowanie w Polsce kielży z rodzajów Gammarus Fabr. i Chaetogammarus Mart./Crustacea, Amphipoda/ Praca habilit. Acta Univ. Lodziensis 1975, 185 ss
46. Judy R.D.Jr: The acute toxicity of copper to Gammarus fasciatus Say, a freshwater amphipod. Bull. Environ. Contam. Toxicol 1979, 21, 219-224
47. Kamiński A.: Wielotestowa charakterystyka toksykodynamiczna trucizn owadobójczych na zwierzętach zimnokrwistych. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln. 1964, 51, 137-140
48. Kamiński A.: Biologiczna analiza testowa śladowych ilości trucizn esterazy cholinowej na hodowanych skorupiakach wodnych. Wojsk. Inst. Hig. Epid. Warszawa 1966, 19-49
49. Kamiński A.: The Use of Biological Tests for the Examination of Pesticides. Pure and Applied Chemistry 1975, 42, 1-2 255-284
50. Kenaga F.F.: Aquatic test organisms and methods useful for assessment of chronic toxicity of chemicals. Analyzing the Hazard Evaluation Process ed. K.L. Dickson, A.W. Maki, J. Cairns Jr, American Fisheries Society, Washington DC 1979, 101-114
51. Kingsbury R.W.S.M., Rees C.P.: Rapid biological methods for continuous water quality monitoring. Effluent and Water Treatment Journal 1978, 7, 319-331

52. Kinne O.: Growth, moulting frequency, heart beat, number of eggs, and incubation time in *Gammarus zaddachi* exposed to different environment. *Crustaceana* 1961, 2, 26-36
53. Konecka-Betley K., Czarnowska K., Czerwiński Z., Janowska E., Kępką M., Pracz J., Russel S.: Uwarunkowania glebowe do projektu zespołu osiedli mieszkaniowych w Białołęce Dworskiej w Warszawie. *Człowiek i Środowisko* 1982, 6/3-4/, 371-402
54. Labat R., Pequignot J., Chatelet A.: Action toxique du cuivre sur les branchies de carpe /*Cyprinus carpio*/. *Annls.Limnol.* 1974, 10, 109-114
55. Lemke A.F., Mount D.I.: Some effects of alkyl benzene sulfonate on the bluegill, *Lepomis macrochirus*. *Frans.Am. Fish. Soc.* 1963, 92, 372-378
56. Łukjanienko W.I.: Toksykologia ryb PWRiL.Warszawa 1974, 315 ss
57. Mc Kim J.M.: Evaluation of tests with early life stages of fish for predicting long term toxicity. *J.Fish.Res. Bd Canada* 1977, 34, 1148-1154
58. Mc Kim J.M., Benoit D.A.: Effects of Long-Term Exposures to Copper on Survival, Growth and Reproduction of Brook Trout /*Salvelinus fontinalis*/. *J.Fish. Res. Bd Canada* 1976, 28, 655-662
59. Metals in the Environment. ed. H.A. Waldron, Academic Press 1980, 111-132

60. Mount D.I., Brungs W.A.: A simplified dosing apparatus for fish toxicology studies. *Water Res.* 1967, 1, 21-29
61. Mount D.I., Stephan C.E.: A Method for Establishing Acceptable Toxicant Limits for Fish - Malathion and Butoxy-ethanol Ester of 2,4-D. *Trans. Am. Fish. Soc.* 1967, 96, 185-193
62. Mount D.I., Stephan C.E.: Chronic toxicity of copper to the fathead minnow /*Pimephales promelas* Rafinesque/ in soft water. *J. Fish. Res. Bd Canada* 1969, 26, 2449-2457
63. Moore J.W.: The role of algae in the diet of *Asellus aquaticus* L. and *Gammarus pulex* L. *J. Anim. Ecol.* 1975, 44, 719-729
64. Moore J.W., Ramamoorthy S.: Heavy Metals in Natural Waters. Applied Monitoring and Impact Assessment. Springer Verlag 1984, 268 pp
65. Muirhead-Thomson R.C.: Lethal and behavioural impact of permethrin /NRDC¹⁴³/ on selected stream macroinvertebrates. *Mosq. News* 1978, 38, 185-190 /*Streszcz. z ASFA* 1979, 9, nr 2/
66. Nebeker A.V., Puglisi F.A.: Effect of polychlorinated biphenyls /PCB's/ on survival and reproduction *Daphnia*, *Gammarus* and *Tanytarsus*. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 1974, 103 722-728
67. Nilsson L.M.: Incubation time, growth and mortality of the amphipod *Gammarus pulex* under laboratory conditions. *Oikos* 1977, 29, 93-98

68. Oseid D.M., Smith L.L.: Chronic toxicity of hydrogen sulfide to *Gammarus pseudolimnaeus*. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 1974, 103, 819-822
69. Pequignot J., Labat R., Chatelet A.: Action du sulfate de cuivre sur les cellules à mucus de l'alevin de truite /*Salmo irrideus*/. *J. Europ. Toxicol.* 1975, 8, 52-56
70. Pickering Q.H.: Chronic toxicity of nickel to the fathead minnow. *J. WPCF.* 1974, 46, 760-765
71. Pickering Q.H., Gast M.H.: Acute and chronic toxicity of cadmium to the fathead minnow /*Pimephales promelas*/. *J. Fish. Res. Bd Canada* 1972, 29, 1099-1106
72. Pinkster S., Smith H., Brandse-de Jong N.: The introduction of the alien amphipod *Gammarus tigrinus* Sexton, 1939, in the Netherlands and its competition with indigenous species. *Crustaceana Suppl.* 1974, 4, 91-105
73. Polska Norma PN-72C-04610 ark. 03. Woda i ścieki. Badania toksyczności zanieczyszczeń dla organizmów wodnych. Oznaczanie toksyczności ostrej na rozwielitce dużej /*Daphnia magna*/. 1972
74. Polska Norma PN-72C-04610 ark. 04. Woda i ścieki. Badania toksyczności zanieczyszczeń dla organizmów wodnych. Oznaczanie toksyczności ostrej na gupiku /*Lebistes reticulatus*/. 1972
75. Polska Norma PN-74C-04610 ark. 05. Woda i ścieki. Badania toksyczności zanieczyszczeń dla organizmów wodnych. Oznaczanie toksyczności ostrej na glonie *Chlorella*. 1974

76. Prost M., Sopińska A.: Reakcja komórek śluzowych karpia /*Cyprinus carpio* L./ na działanie insektycydu jako indykator biologiczny skażenia wody. *Medycyna Wet.* 1984, 40, 264-267
77. Prost.M., Sopińska A., Lutnicka H., Niezgoda J., Janroz M.: Ustalenie indeksu komórek nabłonkowych oraz zmian w skrzelach ryb pod wpływem szkodliwych czynników środowiska wodnego. PR-7.01.07.03., Warszawa 1981, maszynopis, 16ss
78. Scherer R., Nowak S.: Apparatus for recording avoidance movements of fish. *J.Fish. Res. Bd Canada* 1973, 30, 1594-1596
79. Sexton E.W.: On the rearing and breeding of Gammarus in laboratory conditions. *J.Mar.Biol.Ass.U.K.* 1928, 15, 33-55
80. Sladeček V., Fjerdingstad E., Hawkes H.A.: Manual on analysis for water pollution control, chapter 8: Biological examination, WHO, Regional Office for Europe, Long-term Programme in Environmental Pollution Control in Europe 1975, 280pp
81. Solski A.: Ocena herbicydów dla celów rybackich. *Zesz. Nauk.OTFN* 1968, 8, 61-126
82. Solski A.: Niektóre uwagi do metodyki oceny toksyczności herbicydów. *Zesz.Nauk.WSR. Zootechnika Wrocław* 1968, 15, 75, 227-236
83. Solski A.: Metodyka badań biotoksykologicznych w środowisku wodnym IMiGM, Wrocław 1977, maszynopis, 49ss

84. Solski A.: Metody określania toksyczności pestycydów w środowisku wodnym. Materiały sesji naukowej "Wpływ pestycydów na wody powierzchniowe": PAN, Warszawa 1970, 144-139
85. Sprague J.B.: Measurement of pollutant toxicity to fish - I. Bioassay methods for acute toxicity. Water Res. 1969, 3, 793-821
86. Sprague J.B.: Measurement of pollutant toxicity to fish -III. Sublethal effects and "safe" concentration. Water Res. 1971, 5, 245-266
87. Sprague J.B.: Current status of sublethal tests of pollutants on aquatic organisms. J. Fish. Res. Bd. Canada 1976, 33, 1988-1992
88. Sprague J.B.: Drury D.E.: Avoidance reaction of salmonid fish to representative pollutants. Proceedings of the 4th international conference held in Prague 1969. ed. S.H. Jenkins, Pergamon Press, Oxford, New York, 1969, 169-179
89. Standard Methods For the Examination of Water and Waste/water. APHA, AWWA, WPCF 14th ed. 1975, 1193 pp
90. Steele D.H., Steele V.J.: The biology of Gammarus/Crustacea Amphipoda/, in the northwestern Atlantic. VII. The duration of embryonic development in five species at various temperatures. Can. J. Zool. 1973, 51, 995-999

91. Stephan C.F., Mount D.I.: Use of Toxicity Test with Fish in Water Pollution Control. Biological Methods for the Assessment of Water Quality. ASTM 528, 1973, 164-177
92. ST SEV 3077-81 Ochrana prirody. Gidrosfera. Trébovanija k ochraně pověrchnostnych i podzémnych vod ot zagrazněnija pěsticidami 1981
93. Summerfelt R., Lewis W.M.: Repulsion of green sunfish by certain chemicals. J.WPCF 1967, 39, 2030-2038
94. Sutcliffe D.W., Carrick T.R., Willoughby L.G.: Effects of diet, body size, age and temperature on growth rates in the amphipod Gammarus pulex. Freshwat. Biol. 1981, 11 183-214
95. Symons I.M.: Simple continuous flow, low and variable rate pump. J.WPCF 1963, 11, 1480-1485
96. Timmes A.M., Kleerekoper H.: Locomotor response of goldfish and largemouth bass to a copper-polluted mass of water in an open field. Wat. Resour. Res. 1972, 8, 1574-1580.
97. Unificirovannyje metody issledovanija kačestva vod. Čast III. Metody biologičeskogo analiza vod. Izdanie tret'e Sovet Ekonomičeskoi Vzaimpomošči. Soveščanie rukovoditelej vodochozjajstvennyh organov stran -členov SEV. Moskva 1976, 69-154

98. Unificirovannyje metody issledovanija kačestva vod.
Čast' I. Metody chimičeskogo analiza vod. t.2. Metody
atomno-absorbcionnoj spektrofotometrii. Izdanie četvertogo
Sovet Ekonomičeskoi Vzaïmopomošči. Soveščanie rukovoditelej
vodochozjajstvennyh organov stran - členov SEV
Moskva 1983, 126pp
99. Warner R.E.: Bio-assays for microchemical environmental
contaminants: with special reference to water supplies.
Bull. Wld. Hlth.Org. 1967, 36, 191-207
100. Warner R.E., Peterson K.K., Borgman L.: Behavioural
pathology in fish: a quantitative study of sublethal
pesticide toxication. J.App.Ecology 1966, 3, 223-247
101. Water Quality Criteria of 1972. National Academy of
Sciences and National Academy of Engineering. US EPA,
Washington D.C./EPA-R3-73-033/ 1973, 594pp
102. Weber E.: Grundriss der biologischen statistik für
Naturwissenschaftler Landwirte und Mediziner Jena 1961
103. Welton J.S., Clarke R.T.: Laboratory studies on the
reproduction and growth of the amphipod Gammarus pulex /L./
J. Anim.Ecol.1980, 49, 581-592
104. Williams K., Green D., Pascoe D.: Toxicity testing with
freshwater macroinvertebrates: methods and application
in environmental management. Freshwater biological monitoring
Proceedings of a Specialised Conference held in Cardiff U.K.
12-14 September 1984, ed.D.Pascoe, R.W.Edwards, Pergamon
Press 1984, 81-91

105. Willoughby L.G., Sutcliffe D.W.: Experiments on feeding and growth of the amphipod *Gammarus pulex* /L./ related to its distribution in the River Duddon. *Freshwat. Biol.* 1976, 6, 577-586
106. Woltering D.M.: The growth response in fish chronic and early life stage toxicity test: a critical review. *Aquat. Toxicol.* 1984, 5, 1-21
107. Wójcik J.: Zastosowanie aparatu do pomiaru aktywności ruchowej organizmów wodnych w badaniach toksykologicznych *Wiadomości Ekologiczne* 1981, 27, 175-184
108. Wróblewski R.J.: Fizjologiczna i behawioralna charakterystyka wpływu chlorofenvinphosu na ryby/*Lebistes reticulatus* Peters./. Praca doktorska, Instytut Ekologii PAN, Zakład Bioenergetyki Ekologicznej, Dziekanów Leśny k/Warszawy 1977
109. Wuhrman K., Woker H.: Vergiftungen der aquatischen Fauna durch Gewasserverunreinigungen. *Verh. Int. Ver. Limnol.* 1958, 13, 557-583
110. Załącznik nr 1 do Rozporządzenia Rady Ministrów z dnia 29 listopada 1975 r /poz. 214/. Wielkości dopuszczalnych zanieczyszczeń śródlądowych wód powierzchniowych. *Dziennik Ustaw PRL* 1975 nr 41, poz. 214

7. SPIS TABEL

1. Zalety i wady testu ostrego prowadzonego w warunkach statycznych i dynamicznych wg Buikema i wsp. 1982
2. Współczynniki stosowalności uzyskane eksperymentalnie wg Water Quality Criteria of 1972
3. Test ostry - śmiertelność osobników dorosłych *G.varsoviensis* w klasie wielkości 11-12 mm
4. Test ostry - śmiertelność osobników młodych *G.varsoviensis* w klasie wielkości 3-4 mm
5. Test chroniczny - aktywność pokarmowa osobników dorosłych *G.varsoviensis* w klasie wielkości 11-12 mm
6. Test chroniczny - przeżywalność osobników dorosłych *G.varsoviensis* w klasie wielkości 11-12 mm
7. Test chroniczny - aktywność pokarmowa osobników dorosłych *G.varsoviensis* w klasie wielkości 9-10 mm
8. Test chroniczny - przeżywalność osobników dorosłych *G.varsoviensis* w klasie wielkości 9-10 mm
9. Test chroniczny - wartości współczynnika pokarmowego uzyskane dla osobników dorosłych *G.varsoviensis* w dwóch klasach wielkości
10. Test chroniczny - aktywność pokarmowa osobników *G.varsoviensis* będących na granicy dojrzałości płciowej w klasie wielkości 8-9 mm

11. Test chroniczny - przeżywalność osobników *G.varsoviensis* będących na granicy dojrzałości płciowej w klasie wielkości 8-9 mm
12. Test chroniczny - wartości współczynnika pokarmowego uzyskane dla osobników *G.varsoviensis* będących na granicy dojrzałości płciowej w klasie wielkości 8-9 mm
13. Test chroniczny - aktywność pokarmowa osobników młodych *G.varsoviensis* w klasie wielkości 2-3 mm
14. Test chroniczny - przeżywalność osobników młodych *G.varsoviensis* w klasie wielkości 2-3 mm
15. Test chroniczny - aktywność pokarmowa osobników młodych *G.varsoviensis* w klasie wielkości 4-5 mm
16. Test chroniczny - przeżywalność osobników młodych *G.varsoviensis* w klasie wielkości 4-5 mm
17. Test chroniczny - aktywność pokarmowa osobników młodych *G.varsoviensis* w klasie wielkości 6-7 mm
18. Test chroniczny - przeżywalność osobników młodych *G.varsoviensis* w klasie wielkości 6-7 mm
19. Test chroniczny - wartości współczynnika pokarmowego uzyskane dla osobników młodych *G.varsoviensis* w trzech klasach wielkości
- 20a. Test chroniczny -reprodukcja pokolenia rodzicielskiego P *G.varsoviensis*
- 20b. Test chroniczny- reprodukcja pokolenia F_1 *G.varsoviensis*
- 21a. Test chroniczny -reprodukcja pokolenia rodzicielskiego P' *G.varsoviensis*
- 21b. Test chroniczny-reprodukcja pokolenia F_1' *G.varsoviensis*

8. SPIS RYSUNKÓW

1. Schemat systemu decyzyjnego do oceny zagrożenia środowiska wodnego wg Cairnsa 1980
2. Badanie trwałości toksykanta wg Sterna i Walkera 1978
3. Schemat komory testowej
4. Ogólna ilość pobranego pokarmu, średni przyrost ciężaru ciała oraz współczynnik pokarmowy dla *G.varsoviensis*
- osobniki dorosłe
5. Ogólna ilość pobranego pokarmu, średni przyrost ciężaru ciała oraz współczynnik pokarmowy dla *G.varsoviensis*
- osobniki będące na granicy dojrzałości płciowej
6. Ogólna ilość pobranego pokarmu, średni przyrost ciężaru ciała oraz współczynnik pokarmowy dla *G.varsoviensis*
- osobniki młode
7. Wpływ chromu Cr^{6+} na aktywność pokarmową *G.varsoviensis* na podstawie współczynnika pokarmowego
8. Pokolenie F_1 - występowanie lęgów *G.varsoviensis* o określonej liczebności osobników młodych w badanych stężeniach chromu Cr^{6+}
9. Pokolenie F_1 - średnia liczebność osobników młodych w lęgu *G.varsoviensis* w badanych stężeniach chromu Cr^{6+}
10. Pokolenie F_2 - występowanie lęgów *G.varsoviensis* o określonej liczebności osobników młodych w badanych stężeniach chromu Cr^{6+}

11. Pokolenie F_2 - średnia liczebność osobników młodych w lęgu *G.varsoviensis* w badanych stężeniach chromu Cr^{6+}
12. Pokolenie F_1' - występowanie lęgów *G.varsoviensis* o określonej liczebności osobników młodych w badanych stężeniach chromu Cr^{6+}
13. Pokolenie F_1' - średnia liczebność osobników młodych w lęgu *G.varsoviensis* w badanych stężeniach chromu Cr^{6+}
14. Pokolenie F_2' - występowanie lęgów *G.varsoviensis* o określonej liczebności osobników młodych w badanych stężeniach chromu Cr^{6+}
15. Pokolenie F_2' - średnia liczebność osobników młodych w lęgu *G.varsoviensis* w badanych stężeniach chromu Cr^{6+} .

9. SPIS FOTOGRAFII

1. Biofiltr służący do uzdatniania wody wodociągowej
2. Zestaw do badań toksyczności chronicznej - komory testowe w głębi, system dozujący na pierwszym planie
3. Wylinka samicy *G.varsoviensis* wraz z czterema zdegenerowanymi zarodkami - test chroniczny, reprodukcja pokolenia rodzicielskiego P, stężenie $94 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$
4. Zdegenerowane zarodki *G.varsoviensis* - test chroniczny, reprodukcja pokolenia rodzicielskiego P, stężenie $94 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$
5. Wylinka samicy *G.varsoviensis* wraz z dwoma zdegenerowanymi zarodkami - test chroniczny, reprodukcja pokolenia F_1 , stężenie $27 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$
6. Samica *G.varsoviensis* po wylince z pozostałymi zarodkami w komorze lęgowej - test chroniczny, reprodukcja pokolenia F_1 , stężenie $27 \mu\text{g}/\text{dm}^3 \text{Cr}^{6+}$.





B.

20454

Wypożyczalnia
dla Pracowników