

**AKADEMIA GÓRNICZO - HUTNICZA**  
**im. Stanisława Staszica w Krakowie**

**Wydział Geodezji Górniczej i Inżynierii Środowiska**  
**Katedra: Geoinformacji, Fotogrametrii i Teledetekcji Środowiska**



**Rozprawa doktorska**

***Monitoring wybranych zanieczyszczeń wód przy zastosowaniu  
nowych kryteriów ekotoksykologicznych.***

**Robert Mazur**

*Promotor:*  
***Prof. dr hab. dr h.c. Jan W. Dobrowolski***

Kraków 2007

**Spis treści**

<b>1. Wprowadzenie</b>	<b>6</b>
1.1. Cele i teza pracy	7
1.2. Zakres pracy	8
<b>2. Wiadomości dotyczące wody</b>	<b>8</b>
2.1. Właściwości fizyko chemiczne i znaczenie wody dla życia	9
2.2. Woda na kuli ziemskiej	10
2.3. Woda środowiskiem życia	10
2.4. Zanieczyszczenia wód lądowych	12
2.5. Monitoring wód w Polsce, regulacje prawne	15
2.6. Wskaźniki jakości wody	18
<b>3. Wprowadzenie do ekotoksykologii</b>	<b>21</b>
3.1. Struktura	21
3.2. Ekotoksykologia – podstawowe wiadomości	21
<b>4. Biologiczny monitoring środowiska (BMS)</b>	<b>23</b>
4.1. Definicja monitoringu środowiskowego	23
4.2. Metody biomonitoringu	23
4.3. Terminy toksykologiczne	25
4.4. Testy toksykologiczne oraz bioindykatory	26
4.5. Testy toksyczności z udziałem organizmów wodnych	28
4.6. Przegląd wybranych metod biomonitoringu oraz biotestów	29
A. Metody ekologiczne	29
B. Metody fizjologiczne i biochemiczne	31
C. Badania organizmów w środowisku kontrolnym	32
D. Metody wzrostu stężeń ekotoksyn w organizmach (bioakumulacji)	32
E. Metody histologiczne i morfologiczne	33
F. Biosensory; sondy biologiczne do pomiarów ciągłych <i>in situ</i> sensory enzymowe	34
G. Biomarkery	35
4.7. Metody Mikrotoks – (Toxkits)	36
4.8. Biomonitoring według Dyrektywy Wodnej	38
<b>5. Wybór problematyki i materiału do biotestów zanieczyszczeń wód</b>	<b>40</b>

<b>5.1. Uzasadnienie wyboru tematyki badań</b>	<b>41</b>
<b>5.2. Wybór organizmów do badań i metod biomonitoringu</b>	<b>43</b>
<b>5.3. Wybór substancji testowanych</b>	<b>45</b>
A. Substancje powierzchniowo czynne (SPC)	45
B. Silne kwasy:	53
C. Amoniak:	56
D. Chlorki:	57
<b>5.4. Wykaz maksymalnych dopuszczalnych wartości dla wybranych wskaźników jakości wód</b>	<b>60</b>
<b>5.5. Wpływ zanieczyszczeń bytowo-komunalnych na wody rzeki Trzemeśnianki</b>	<b>61</b>
<b>5.6. Jakość wód powierzchniowych w województwie małopolskim z raportu WIOŚ z 2006 r.</b>	<b>63</b>
<b>5.7. Plan hodowli organizmów wskaźnikowych do badań testowych</b>	<b>64</b>
<b>5.8. Organizmy wyselekcjonowane do badań</b>	<b>64</b>
<b>6. Metodyka badań</b>	<b>71</b>
6.1. Testy toksyczności ostrej z zastosowaniem skorupiaków <i>Daphnia Magna</i> .	71
6.2. Testy toksyczności ostrej z zastosowaniem form juwenilnych i embrionalnych <i>Lymnaea stagnalis L.</i>	73
6.3. Testy toksyczności ostrej z zastosowaniem <i>Tubifex tubifex Müllerl.</i>	76
6.4. Metody obliczeniowe w wyznaczaniu współczynnika LC50 mg/l	78
6.5. Ocena związków chemicznych w odniesieniu do kryteriów ich szkodliwości dla biocenoz wodnych.	80
<b>7. Wyniki badań</b>	<b>81</b>
I. Badanie wpływu detergentów niejonowych Brij na śmiertelność <i>Daphnia magna</i> .	82
II. Badanie wpływu detergentu Ludwik na śmiertelność <i>Daphnia magna</i> .	99
III: Badanie wpływu soli – chlorków: sodu, potasu, wapnia i magnezu na śmiertelność <i>Daphnia magna</i> .	102
IV: Badanie wpływu kwasów siarkowego (VI) i azotowego (V) oraz amoniaku na śmiertelność form młodocianych <i>Daphnia magna</i> Straus.	113
V: Badanie wpływu detergentów niejonowy Brij na śmiertelność zarodków <i>Lymnaea stagnalis L.</i>	122
VI: Badanie wpływu detergentu Ludwik na śmiertelność zarodków <i>Lymnaea stagnalis</i> .	137

VII: Badanie wpływu kwasów siarkowego (VI) i azotowego (V) oraz amoniaku na śmiertelność zarodków <i>Lymnaea stagnalis</i> L.	140
VIII: Badanie wpływu chlorku sodu, chlorku potasu, chlorku wapnia, chlorku magnezu na śmiertelność zarodków <i>Lymnaea stagnalis</i> L.	149
IX: Badanie wpływu detergentów niejonowych Brij na śmiertelność form młodocianych, po wylęgu <i>Lymnaea stagnalis</i> L.	157
X. Badanie wpływu detergentu Ludwik na śmiertelność form młodocianych, po wylęgu <i>Lymnaea stagnalis</i> L.	172
XI: Badanie wpływu kwasów siarkowego (VI) i azotowego (V) oraz amoniaku na śmiertelność form młodocianych, po wylęgu <i>Lymnaea stagnalis</i> L.	175
XII: Badanie wpływu soli – chlorków: sodu, potasu, wapnia i magnezu na śmiertelność form młodocianych, po wylęgu <i>Lymnaea stagnalis</i> L.	183
XIII. Badanie wpływu detergentów niejonowych Brij na śmiertelność <i>Tubifex tubifex</i> .	191
XIV. Badanie wpływu detergentów anionowego Ludwik na śmiertelność <i>Tubifex tubifex</i> .	204
8. Statystyczna ocena wyników badań:	207
I. Zestawienie wyników testów LC50/24 toksyczności ostrej dla <i>Daphnia magna</i> Strauss:	207
II. Zestawienie wyników testów LC50/24 toksyczności ostrej dla <i>Lymnaea stagnalis</i> (hatching)	209
III. Zestawienie wyników testów LC50/24 toksyczności ostrej dla <i>Lymnaea stagnalis</i> (zarodki)	212
IV. Zestawienie wyników testów LC50/24 toksyczności ostrej dla <i>Tubifex tubifex</i>	214
V. Porównanie stopnia toksyczności poszczególnych grup związków chemicznych w stosunku do badanych organizmów i ich stadiów rozwojowych	216
1. Detergenty	216
2. Kwasy i amoniak	221
3. Chlorki	226
VI. Skumulowane wykresy toksyczności dla badanych związków osobno dla każdego organizmu.	230
1. <i>Daphnia magna</i> Strauss	230
2. <i>Lymnaea stagnalis</i> (badane stadia)	233
3. Porównawcza ocena stopnia wrażliwości pomiędzy tymi dwoma stadiami rozwojowymi dla <i>Lymnaea stagnalis</i>	236

---



4. <i>Tubifex tubifex</i>	240
9. Dyskusja wyników i wnioski z badań	242
I. Testy toksyczności ostrej dla detergentów Brij oraz Ludwik	242
II. Testy toksyczności ostrej dla kwasów i amoniaku	246
III. Testy toksyczności ostrej dla jonów chlorków	248
IV. Teoria stresu	251
V: Efekt solubilizacji błony komórkowej przez detergenty	252
VI. Mechanizm oddziaływania roztworów kwasów oraz silnych zasad na organizmy wodne	255
VII. Efekt działania teratogennego – substancji chemicznych	256
10. Podsumowanie	257
11. Literatura	260

## 1. Wprowadzenie:

Zanieczyszczenie środowiska wodnego niesie za sobą wiele istotnych zmian, bardzo niekorzystnych, dla ekosystemów wodnych a także dla gospodarki i zdrowia człowieka, który, w różnych celach korzysta z zasobów wód śródlądowych. Dlatego też ważne jest zapewnienie ciągłej kontroli jakości wód, tak aby można było w porę zauważyć zmiany w tym środowisku oraz podjąć odpowiednie działania prewencyjne bądź naprawcze. [49, 51, 52].

Tradycyjne formy monitoringu wód powierzchniowych można podzielić na dwie podstawowe grupy:

### 1. Monitoring fizyko – chemiczny.

### 2. Monitoring mikrobiologiczny.

W oparciu o ich wyniki ocenia się podstawowe parametry wody, zanieczyszczenia chemiczne, organiczne jak również zagrożenia związane z występowaniem mikroorganizmów mogących stanowić potencjalne zagrożenie epidemiologiczne.

W ostatnich latach tradycyjny monitoring wód uzupełniono o trzeci rodzaj:

### 3. Monitoring Biologiczny.

Prężny rozwój metod monitoringu środowiska - w tym biomonitoringu – zwiększył rangę monitoringu biologicznego. Nowa Ramowa Dyrektywa Wodna (RDW) – Dyrektywa Nr 2000/60/WE wskazuje na konieczność uzupełnienia oceny stanu jakości wód powierzchniowych o wyniki biomonitoringu, jako ważnego kryterium oceny ekotoksykologicznej [48].

Monitoring biologiczny stanowi bardzo istotny element monitoringu środowiska.

Uwzględnia on;

- toksyczne oddziaływania zanieczyszczeń na organizmy żyjące w ekosystemach wodnych,
- bioakumulację oraz biomagnifikację np. ksenobiotyków w poszczególnych ogniwach w łańcuch pokarmowym,
- zaburzenia w funkcjonowaniu biocenoz wodnych, w wyniku eliminacji przez zanieczyszczenia organizmów wrażliwych, zwłaszcza tych, które stanowią ważne ogniwa funkcjonalne,

- przekształcenia zanieczyszczeń w organizmach żywych, w wyniku reakcji metabolicznych, związki po przekształceniach są nieraz bardziej toksyczne niż substancje wyjściowe,
- synergistyczne lub addytywne oddziaływania mieszanin substancji zanieczyszczających, [15, 17].

Monitoring biologiczny stanowi więc niezwykle ważne kryterium w kompleksowej ocenie stanu środowiska wodnego.

Intensywny rozwój dziedzin naukowych z zakresu nauk o środowisku przekłada się na rozwój nowych bardziej skutecznych metod badawczych, dzięki którym możemy opracowywać czułe i skuteczne narzędzia mające zastosowanie w biomonitoringu i będące niezwykle pomocne w ocenie jakości składników środowiska wodnego [17, 79].

## **1.2 Cele i teza pracy:**

Celem pracy było opracowanie nowych, bardziej czułych metod monitoringu biologicznego zanieczyszczeń wód powierzchniowych z zastosowaniem wybranych kryteriów ekotoksykologicznych (w tym embriologicznych) z wykorzystaniem powszechnie występujących bezkręgowców wodnych *Tubifex tubifex* Müller., *Lymnaea stagnalis* L., oraz *Daphnia magna* Straus (norma, nr – ISO 341: 1996 Water quality, EN ISO 6341: 1996 Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus).

Propozycja uwzględnienia kryteriów embriologicznych wynika z przesłanek naukowych wskazujących na to, że wczesne stadia rozwojowe rozmaitych gatunków zwierząt wodnych są szczególnie wrażliwe na różne rodzaje zanieczyszczeń wód [15, 16]. Dlatego też sformułowano następującą tezę pracy,

***„Wprowadzenie nowych kryteriów ekotoksykologicznych (z uwzględnieniem wpływu testowanych zanieczyszczeń na embriogenezę) pozwoli na zwiększenie czułości monitoringu biologicznego a pośrednio skuteczności ochrony ekosystemów i różnorodności biologicznej (zgodnie z zaleceniami ONZ i UE).”***

Potrzeba uwzględnienia kryterium embriologicznego wynika ze stwierdzenia szczególnej wrażliwości na rozmaite rodzaje zanieczyszczeń wód różnych gatunków zwierząt, których rozród przebiega w wodzie.

Zastosowanie nowych w/w metod biomonitoringu będzie przydatne dla inżynierii środowiska, m.in. pod kątem wyboru takich biotechnologii oczyszczania ścieków, które zapewnią odpowiedni stan wód dla prawidłowego przebiegu wczesnego rozwoju; dotyczy to w szczególności gatunków wrażliwych na te zanieczyszczenia. W ten sposób przy pomocy nowoczesnych metod naukowych i technicznych realizowany będzie postulat prof. W. Goetla o „potrzebie zabezpieczania warunków dla prawidłowej reprodukcji organizmów żywych, a tym samym zapewnienia trwałości użytkowania zasobów biologicznych” [16, 17].

Autor podjął próbę udowodnienia tej tezy na drodze doświadczeń laboratoryjnych dotyczących porównawczej oceny wpływu powszechnie występujących zanieczyszczeń wód (zasolenia poprzez chlorki: sodu, potasu wapnia i magnezu, detergentów na przykładzie Brij, oraz detergentu anionowego Ludwik, zakwaszenia wód wywołanego powszechnie występującymi anionami kwasów siarkowego (VI) i azotowego (V) oraz problemu rosnącego skażenia środowiska wodnego wywołanego przez kationy amonowe). Wybór testowanych w doświadczeniach substancji nie jest przypadkowy, ponieważ stanowią one częste zanieczyszczenia wód [1, 10, 99].

### **1.3 Zakres pracy**

Badania te prowadzone były w oparciu o interdyscyplinarną współpracę, w celu zwiększenia czułości i skuteczności metod monitoringu wód. Wiążą się one z zastosowaniem nowych metod biotechnologicznych dla potrzeb inżynierii środowiska. .

## **2. Wiadomości dotyczące wody:**

### **Ochrona wód lądowych:**

#### **2.1 Właściwości fizyko chemiczne i znaczenie wody dla życia:**

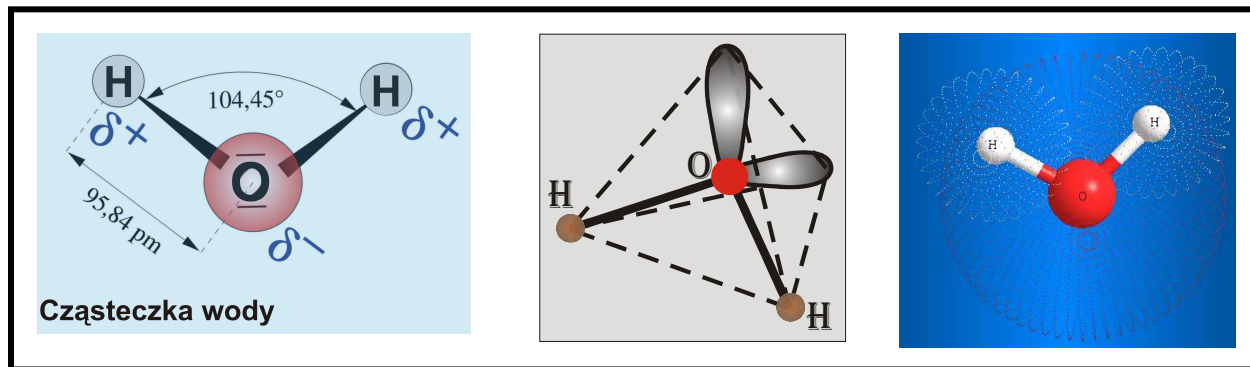
Woda jako substancja chemiczna (związek  $H_2O$  w nomenklaturze UPAC oksydan).

Przyrodzie możemy spotkać ją w trzech stanach:

- W temperaturze poniżej  $0^{\circ}C$  ( $273,15^{\circ}K$ ) w postaci (krystalicznej – ciała stałego) lodu.
- W temperaturze pokojowej w postaci cieczy.
- Stanie gazowym – para wodna.

Jako związek chemiczny charakteryzuje się niezwykle ciekawymi właściwościami – dzięki specyficznej budowie cząsteczki, posiada cząstkowe ładunki dodatnie na jednym biegunie a na drugim ujemne, jest cząsteczką dipolową (biegunowo-polarną) [18, 27].

## Budowa cząsteczki wody

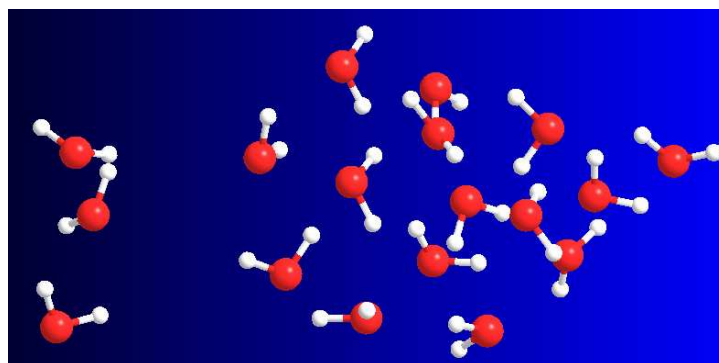


Ryc. 1. Schemat budowy cząsteczki wody .

Właściwości fizyko – chemiczne:

- Temperatura topnienia pod ciśnieniem 1 atm:  $0^{\circ}\text{C} = 273,15\text{ K}$
- Temperatura wrzenia pod ciśnieniem 1 atm:  $100^{\circ}\text{C} = 373,15\text{ K}$
- Gęstość w temperaturze  $4^{\circ}\text{C} = 1\text{ kg/l}$ .
- Temperatura krytyczna:  $374^{\circ}\text{C} = 647,15\text{ K}$
- Ciśnienie krytyczne:  $220,6\text{ atm.} = 22.35\text{ MPa}$
- Ciepło właściwe:  $4187\text{ J}/(\text{kg}\cdot\text{K}) = 1\text{ kcal}$

Dipole cząsteczek wody przyciągają się i tworzą większe struktury (asocjacje) poprzez tzw. wiązania wodorowe. Asocjacje te mogą osiągać w temp. pokojowej do 100 cząsteczek dzięki ich biegunowej budowie (moment dipolowy  $2\delta^{+}$  i  $\delta^{-}$ ). Dlatego też w temperaturze pokojowej substancja ta, mimo że jej masa molowa wynosi ok. 18g, występuje w stanie ciekłym. Dla porównania inne związki, np.  $\text{CO}_2$  (masa molowa 44g) są w tych warunkach gazami. Niezrównoważone ładunki wypadkowe tworzące momenty dipolowe wymuszają takie ustawianie się cząsteczek w cieczy w stosunku do siebie, że stanowią one zgrupowania (wytwarzają oddziaływania słabe wodorowe, które utrzymują ją w tej postaci) [18, 27, 57].



Ryc. 2. Przestrzenny model asocjacji cząsteczek wody ( ChemOffice 2006 – z modelu 3D).

W nieznacznym stopniu ulega ona dysocjacji zgodnie z równaniem  $2\text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_3\text{O}^+ + \text{OH}^-$ . Jony rozpuszczone w wodzie są hydratowane. Jej cząsteczki mogą spełniać rolę ligandu w związkach kompleksowych. Łatwo wchodzi w reakcje chemiczne z wieloma substancjami chemicznymi [5, 18, 27]. Woda jest jedną z nielicznych substancji, która krzepnąc zwiększa swoją objętość. W konsekwencji lód ma gęstość mniejszą ( $0,917\text{g/cm}^3$ ) od wody i unosi się w warstwie powierzchniowej, przy czym 87% bryły jest pod wodą. Ma to ważne konsekwencje dla życia w wodzie gdyż utrzymujący się na powierzchni lód stanowi ochronę dla organizmów wodnych, które będąc w wodzie nie zamarzają wraz z pokrywą lądową i mogą przetrwać niekorzystny okres zimy [5, 57].

## **2.2 Woda na kuli ziemskiej:**

Woda na kuli ziemskiej tworzy hydrosferę, znajduje się ona w ciągłym obiegu – ciągłe krążenie wody w przyrodzie opisuje cykl hydrologiczny.

### **Źródła wody na Ziemi:**

- w oceanach - 97,24%
- w lodowcach, górach lodowych i wiecznych zmarzlinach - 2,14%
- woda gruntowa - 0,61%
- w jeziorach - 0,009%
- w morzach wewnątrz lądowych - 0,008%
- w postaci pary wodnej 0,005%
- w rzekach 0,0001%

Szacuje się, że wszystkie rodzaje wód łącznie mają objętość  $1360\text{mln. km}^3$ , z czego 97,24% to wody oceanów. Jest ona zatem najbardziej rozpowszechnionym rozpuszczalnikiem na kuli ziemskiej i odgrywa najważniejszą rolę w powstaniu i utrzymywaniu życia na Ziemi [12, 18, 94].

Jest bardzo dobrym rozpuszczalnikiem dla substancji polarnych, ok. 97,24% wody w przyrodzie stanowi woda słona, która zawiera rozpuszczony chlorek sodu i inne domieszki. Woda w przyrodzie nie występuje w postaci czystej, stanowi roztwór wielu rozpuszczonych w niej substancji zawiesin i koloidów [3, 5, 12, 67].

### 2.3 Woda środowiskiem życia:

Środowiska wodne stanowią środowisko życia organizmów (wodnych bądź i ziemnowodnych). Przyjmuje się, że życie powstało właśnie w środowisku wodnym i drogą ewolucji opanowało środowisko lądowe. W ekologii wyróżniamy ekosystemy wodne, w skład których wchodzi układy biocenoz wodnych w różnorodnych wzajemnych powiązaniach troficznych i interakcjach między- oraz wewnątrzgatunkowych [3].

Woda jest także najważniejszym ze składników żywej komórki, a co za tym idzie, całego organizmu. Organizmy żywe zawierają w swoim ciele od 99% - 50% wody. Stanowi ona środowisko dla prawie wszystkich reakcji metabolicznych mających miejsce w komórce. Wszelkie procesy katabolizmu i anabolizmu komórkowego przebiegają w środowisku wodnym, enzymy przeprowadzające reakcje biochemiczne należą do grupy związków wymagających do przeprowadzenia reakcji obecności środowiska wodnego. W organizmie żywego człowieka zawartość wody szacuje się na ok. 65% masy ciała. Oprócz udziału we wszelkich procesach biochemicznych i fizjologicznych w ustroju człowieka, woda reguluje także temperaturę, bierze udział w wymianie i usuwaniu zbędnych produktów przemiany materii, warunkuje prawidłowy transport substancji odżywczych. Zdrowy człowiek przyjmuje ok. średnio 2,5 – 2,65l wody dziennie i tyle samo jej wydalą. Odwodnienie organizmu w skali utraty 1/5 masy wody jest śmiertelne dla organizmu człowieka [57, 68, 71].

Woda odgrywa również ważną rolę we wszystkich dziedzinach życia człowieka. Używana jest do celów bytowo komunalnych, gospodarczo produkcyjnych (w przetwórstwie chemicznym, jak i produkcji żywności), w hodowlach zwierzęcych, roślinnych, jak również dla celów rekreacyjnych itd.

Wraz z wykorzystaniem zasobów wody ludzie zużywają ją i zanieczyszczają, największą ilość wody pobiera przemysł. Ciekłe wodne stanowią często rezerwuar dla usuwania ubocznych produktów w przemyśle, wszelakich zanieczyszczeń i ścieków bytowo komunalnych. Wszystkie te procesy mają destruktywny wpływ na prawidłowe funkcjonowanie ekosystemów wodnych, a zanieczyszczenie środowiska wodnego przyczynia się często do wyłączenia ogromnych jej zasobów z użyteczności.

## 2.4 Zanieczyszczenia wód lądowych.

Woda często zawiera substancje nie występujące w niej w warunkach naturalnych, są to substancje skażające, pochodzenia najczęściej antropogenicznego.

Wyróżnia się skażenia wody:

1. Chemiczne
2. Termiczne
3. Bakteriologiczne
4. Biologiczne

W przypadku gdy proces skażenia jest dalece zaawansowany może dojść do efektu zatrucia wody. Oznacza to, że stopień skażenia radykalnie pogarsza jej zdolności do podtrzymywania życia organicznego właściwego danemu ekosystemowi [3].

*Zanieczyszczenia wód lądowych możemy podzielić ze względu na źródła powstawania i rodzaj. Do źródeł zanieczyszczeń zaliczamy:*

- I. Źródła punktowe: należą tu ścieki z systemów kanalizacyjnych (przemysłowych i komunalnych), wśród których wyróżniamy:
  - źródła komunalne, do których należą miejskie i wiejskie systemy kanalizacyjne odprowadzające ścieki z gospodarstw domowych oraz instytucji i zakładów przemysłowych podłączonych do kanalizacji miejskich czy wiejskich,
  - źródła przemysłowe, tj. zakłady przemysłowe odprowadzające ścieki bezpośrednio do wód powierzchniowych poprzez własne systemy kanalizacyjne.
- II. Źródła liniowe – zalicza się do nich zanieczyszczenia pasmowe:
  - Wzdłuż szlaków komunikacyjnych. Są one związane z emisją spalin samochodowych, zanieczyszczeń motoryzacyjnych. Zawierają one związki ołowiu, mogące przedostać się do wód gruntowych. Liniowo rozchodzące się związki zanieczyszczające wzdłuż traktów komunikacyjnych.
  - Wzdłuż rzek i kanałów: które to cieką stanowią drogi dla szybko przemieszczających się zanieczyszczeń różnorodnego rodzaju [94].
- III. Źródła obszarowe – zanieczyszczenia obszarowe są wprowadzane nieregularnie, w różny sposób i w różnych miejscach zbiornika wodnego. W. Chełmicki do źródeł obszarowych [12] zalicza zespół rozproszony źródeł liniowych i punktowych, jak



również postuluje wprowadzenie określenia „rozproszony” w zamian za „obszarowy”.

Do tego rodzaju źródeł wchodzi:

- Zanieczyszczenia z opadów atmosferycznych i powietrza: które przedostają się do wód z atmosfery wraz z opadem (deszczu bądź śniegu). W zjawisko kwaśnych deszczy, czy z immisji pyłów zawieszonych zalegających nad określonym terenem a wraz z opadem przenikających do gleby i cieków wodnych oraz dyfuzji z gazów stanowiących zanieczyszczenia powietrza.
- Odpływy z obszarów rolnych i leśnych: będące efektem działalności człowieka – nawozy sztucznych oraz środki ochrony roślin z grupy pestycydów, bardzo często ekwiwalenty tych związków chemicznych infiltrują wraz z wodami podziemnymi dostając się do rezerwuarów wód lądowych, bądź spływają do zlewni wypłukane przez opady i wraz z wodą opadową dostają się do rzek i jezior. Związki te stanowią bardzo duże obciążenie dla ekosystemów wodnych, i są bezwzględnie szkodliwe dla ich funkcjonowania.
- Rozproszone odpływy z obszarów przemysłowych bez kanalizacji ściekowej.
- Odpływy ze składowisk śmieci i odpadów komunalnych. Szczególnie niebezpieczne ze względu na wyjątkową toksyczność substancji chemicznych będących głównie ubocznym produktem poprodukcyjnym. W przypadku wysypisk i składowisk odpadów toksyczność odcieków ściśle zależy od charakteru składowanych materiałów, śmieci, bądź związków chemicznych (np. w mogiłnikach). Bardzo często dodatkowym czynnikiem zwiększającym ryzyko niebezpiecznego oddziaływania na środowisko jest tu brak odpowiednich izolacji zabezpieczających przed wyciekami do gleby i wód gruntowych, lub stosowanie niewłaściwych materiałów izolacyjnych, korodujących z upływem czasu i powodujących rozszczelnienie tego typu obiektów.
- Odpływy z obszarów zurbanizowanych podobnie jak w przypadku obszarów rolnych i leśnych, także obszary miejskie stanowią źródło obszarowego zanieczyszczenia wody [12]. Zjawisko to może mieć wiele przyczyn, między innymi,
  - Wietrzenie i niszczenie dróg.
  - Pyły i spaliny w powietrzu miejskim (wraz z opadem infiltrujące do wód gruntowych).
  - Niszczenie obiektów budowlanych.

- Obszary zieleni miejskiej, która często również jest poddana nawożeniu, bądź zabiegom ochronnym przy użyciu pestycydów itp.
- Korodujące instalacje, kanalizacje z zakładów przemysłowych (wraz z wyciekami).
- Składowiska miejskie odpadów i śmieci.

[94].

**Ścieki i ich rodzaje:** *Ściekiem nazywamy wodę zużytą w gospodarstwach domowych lub zakładach produkcyjno przemysłowych.* W obszarach, gdzie nadal występują braki w systemie kanalizacji i kolektorów ścieków, często dochodzi do ich zrzutu do rzek i wód powierzchniowych. Dzielimy je na trzy podstawowe grupy:[ 26, 28, 70, 94]

1. Ścieki bytowo – gospodarcze: zawierające zanieczyszczenia typu: fekalia, związki organiczne, detergenty, i inne środki czyszczące i piorące, dodatkowo mogą zawierać substancje dezynfekujące, antyseptyczne. Charakteryzują się bardzo bogatą florą bakteryjną – bakterie gnilne jak również chorobotwórcze. Odnotowuje się również w ich składzie obecność wirusów oraz pasożytów wewnętrznych człowieka lub ich form larwalnych, jak również grzybów chorobotwórczych.
2. Ścieki miejskie: mieszanina ścieków bytowo gospodarczych ze ściekami przemysłowymi, w różnych proporcjach.
3. Ścieki przemysłowe: najbardziej obciążające i zanieczyszczające zasoby wód, ich skład charakterystyczny jest dla profilu produkcji i stosowanej technologii.

M. Pawalczyk Szpilowa [70] podaje:

- Ścieki z zakładów przemysłu wydobywczego – silnie zasolone z dużym ładunkiem minerałów.
- Ścieki z przemysłu rolno – spożywczego: (mleczarnie, ubojnie, zakłady przetwórstwa mięsnego, cukrownie, browary, zakłady przetwórstwa owocowego), zawierają dużą ilość substancji organicznych, jak również bogatą mikroflorę bakteryjną, grzybową.
- Ścieki z przemysłu metalurgicznego – wysoka zawartość metali ciężkich i innych substancji toksycznych, np.: ścieki pochodzące z galwanizowania zawierają wysoce toksyczne cyjanki i chromiany.
- Ścieki przemysłu chemicznego – tu różnorodności substancji chemicznych w ściekach wynika ściśle z profilu i procesu

technologicznego, zakładu. Bardzo często substancje zanieczyszczające stanowią związki syntetyczne, substancje nieorganiczne kwasy, zasady, organiczne różnego rodzaju nierzadko mutagenne, karcinogenne, teratogenne. Są to ścieki trudne do oczyszczenia, a procesy ich neutralizacji często są skomplikowane i wymagają sporych nakładów finansowych.

- Ścieki z przemysłu włókienniczego – o wysokim pH, mętnością, dużą zawartością detergentów, barwników i wybielaczy oraz związków organicznych trudno biodegradowalnych.
- Ścieki garbarskie – mają wysokie zasolenie, dużą zawartość barwników, zawiesin, garbników, w przypadku garbarni wykorzystujących proces chromowania – ścieki bogate są w związki chromu.
- Ścieki z produkcji papieru – bogate w wybielacze, związki chlorowe, barwniki i utrwalacze. Ścieki uciążliwe dla środowiska wodnego i trudne do oczyszczenia.
- Ścieki z produkcji farmaceutyków – zawierają podobnie jak ścieki chemiczne dużą ilość zanieczyszczeń chemicznych, organicznych głównie z grupy, pochodnych antybiotyków, amin, witamin wytwarzanych w procesach chemicznych czy biochemicznych.
- Ścieki z produkcji i rozlewni detergentów i surfaktantów, zawierają ekwiwalenty detergentów i związki powierzchniowo czynne, bogate w fosfor oraz w wiele związków towarzyszących, o które uzupełnia się detergenty do użytku codziennego [28, 30, 70].

## **2.5 Monitoring wód w Polsce, regulacje prawne:**

Zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Środowiska z dnia 11 lutego 2004 r. w sprawie klasyfikacji dla oceny stanu wód powierzchniowych i podziemnych, sposobu prowadzenia monitoringu oraz sposobu interpretacji wyników i prezentacji stanu tych wód (Dz. U. z dnia 1 marca 2004 r.) w Polsce na podstawie §2.1. powyższego Rozporządzenia stosujemy, pięciostopniową klasyfikację wód powierzchniowych: [84, 94]

Fragment w/w rozporządzenia:

§ 2. 1. Wprowadza się klasyfikację dla prezentowania stanu wód powierzchniowych obejmującą pięć klas jakości tych wód, z uwzględnieniem kategorii jakości wody A1, A2 i

A3, określonych w przepisach w sprawie wymagań, jakim powinny odpowiadać wody powierzchniowe wykorzystywane do zaopatrzenia ludności w wodę przeznaczoną do spożycia:

**1) klasa I - wody o bardzo dobrej jakości:**

a) spełniają wymagania określone dla wód powierzchniowych wykorzystywanych do zaopatrzenia ludności w wodę przeznaczoną do spożycia, w przypadku ich uzdatniania sposobem właściwym dla kategorii A1,

b) wartości wskaźników jakości wody nie wskazują na żadne oddziaływania antropogeniczne;

**2) klasa II - wody dobrej jakości:**

a) spełniają w odniesieniu do większości wskaźników jakości wody wymagania określone dla wód powierzchniowych wykorzystywanych do zaopatrzenia ludności w wodę przeznaczoną do spożycia, w przypadku ich uzdatniania sposobem właściwym dla kategorii A2,

b) wartości biologicznych wskaźników jakości wody wykazują niewielki wpływ oddziaływań antropogenicznych;

**3) klasa III - wody zadowalającej jakości:**

a) spełniają wymagania określone dla wód powierzchniowych wykorzystywanych do zaopatrzenia ludności w wodę przeznaczoną do spożycia, w przypadku ich uzdatniania sposobem właściwym dla kategorii A2,

b) wartości biologicznych wskaźników jakości wody wykazują umiarkowany wpływ oddziaływań antropogenicznych;

**4) klasa IV - wody niezadowalającej jakości:**

a) spełniają wymagania określone dla wód powierzchniowych wykorzystywanych do zaopatrzenia ludności w wodę przeznaczoną do spożycia, w przypadku ich uzdatniania sposobem właściwym dla kategorii A3,

b) wartości biologicznych wskaźników jakości wody wykazują, na skutek oddziaływań antropogenicznych, zmiany ilościowe i jakościowe w populacjach biologicznych;

**5) klasa V - wody złej jakości:**

a) nie spełniają wymagań dla wód powierzchniowych wykorzystywanych do zaopatrzenia ludności w wodę przeznaczoną do spożycia,

b) wartości biologicznych wskaźników jakości wody wykazują, na skutek oddziaływań antropogenicznych, zmiany polegające na zaniku występowania znacznej części populacji biologicznych.

2. Podstawę określenia klas jakości wód powierzchniowych, o których mowa w ust. 1, stanowią wartości graniczne wskaźników jakości wody w klasach jakości wód powierzchniowych określone w załączniku nr 1 do rozporządzenia.

§ 3. 1. Wprowadza się trzy kategorie hydromorfologicznego stanu wód powierzchniowych: stan bardzo dobry, stan dobry, stan umiarkowany.

Pełny tekst rozporządzenia [**Załącznik nr 2.**]

*Dla porównania do 2004 – obowiązywała 3 stopniowa klasyfikacja wód w Polsce:*

**Klasa I wody nadające się do:**

- Zaopatrzenia ludności w wodę do picia,
- Zaopatrzenia zakładów wymagających wody o jakości wody do picia,
- Hodowli ryb łososiowatych.

**Klasa II - wody nadające się do:**

- Hodowli innych ryb niż łososiowate,
- Chowu i hodowli zwierząt gospodarskich,
- Celów rekreacyjnych, uprawiania sportów wodnych oraz do urządzania zorganizowanych kąpielisk.

**Klasa III - wody nadające się do:**

- Zaopatrzenia zakładów innych niż zakłady wymagające wody o jakości wody do picia,
- Nawadnianie terenów rolniczych, wykorzystywanych do upraw ogrodniczych oraz upraw pod szkłem i pod osłonami z innych materiałów.

**Wody poza klasowe NON:** nie mieszczące się w skali – należały tu wody silnie zdegradowane i zanieczyszczone, których zasoby zostały wyłączone z użyteczności dla człowieka i gospodarki.

[84, 86, 94]

## 2.6 Wskaźniki jakości wody.

Klasę czystości wody określa się na podstawie analiz fizyczno-biochemicznych, w trakcie których dokonuje się pomiaru wartości wskaźników charakteryzujących jakość wody. Ważne jest przytoczenie rodzaju wskaźników na bazie których dokonywana jest jej klasyfikacja: W załączniku znajduje się opis wypunktowanych wskaźników:

### Wskaźniki fizyczne

- 1 Temperatura wody [°C]
- 2 Zapach [krotność]
- 3 Barwa [mg Pt/l]
- 4 Zawiesiny ogólne [mg/l]
- 5 Odczyn [pH]

### Wskaźniki tlenowe

- 6 Tlen rozpuszczony [mg O<sub>2</sub>/l]
- 7 BZT<sub>5</sub> [mg O<sub>2</sub>/l] (Biologiczne Zapotrzebowanie na Tlenowe – 5 dni)
- 8 ChZT-Mn [mg O<sub>2</sub>/l] (Chemiczne Zapotrzebowanie na Tlen)
- 9 ChZT-Cr [mg O<sub>2</sub>/l]
- 10 Ogólny węgiel organiczny [mg C/l]

### Wskaźniki biogenne

- 11 Amoniak [mg NH<sub>4</sub>/l]
- 12 Azot Kjeldahla [mg]
- 13 Azotany [mg NO<sub>3</sub>/l 5]
- 14 Azotyny [mg NO<sub>2</sub>/l]
- 15 Azot ogólny [mg N/l]
- 16 Fosforany [mg PO<sub>4</sub>/l]
- 17 Fosfor ogólny [mg P/l]

### Wskaźniki zasolenia

- 18 Przewodność w 20°C [μS/cm]
- 19 Substancje rozpuszczone [mg/l]
- 20 Zasadowość ogólna [mg CaCO<sub>3</sub>/l]
- 21 Siarczany [mg SO<sub>4</sub>/l]

- 22 Chlorki [mg Cl/l]
- 23 Wapń mg [Ca/l 50]
- 24 Magnez [mg Mg/l ]
- 25 Fluorki [mg F/l 0,5]

**Metale, w tym metale ciężkie**

- 26 Arsen [mg As/l]
- 27 Bar [mg Ba/l]
- 28 Bor [mg B/l]
- 29 Chrom ogólny [mg Cr/l]
- 30 Chrom (VI)[mg Cr/l]
- 31 Cynk [mg Zn/l]
- 32 Glin [mg Al/l]
- 33 Kadm [mg Cd/l]
- 34 Mangan [mg Mn/l]
- 35 Miedź [mg Cu/l]
- 36 Nikiel [mg Ni/l]
- 37 Ołów mg Pb/l
- 38 Rtęć mg Hg/l
- 39 Selen mg Se/l
- 40 Żelazo mg Fe/l

**Wskaźniki zanieczyszczeń przemysłowych**

- 41 Cyjanki wolne [mg CN/l]
- 42 Fenole (indeks fenolowy) [mg/l]
- 43 Pestycydy [µg/l]
- 44 Substancje powierzchniowo czynne anionowe [mg/l]
- 45 Substancje powierzchniowo czynne niejonowe [mg/l]
- 46 Oleje mineralne (indeks oleju mineralnego) [mg/l]
- 47 Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne<sup>3</sup>) [µg/l]

**Wskaźniki biologiczne**

- 48 Saprobowość fitoplanktonu Indeks
- 49 Saprobowość peryfitonu saprobowości

50 Makrobezkręgowce bentosowe, indeksy: indeks bioróżnorodności, indeks biotyczny

51 Chlorofil "a" [ $\mu\text{g/l}$ ]

### Wskaźniki mikrobiologiczne

52 Liczba bakterii grupy coli typu kałowego w 100 ml

53 Liczba bakterii grupy coli w 100 ml

[na podstawie wskaźników jakości wody w klasach wód I–V; załącznik nr 1 do rozporządzenia MŚ z dnia 11 lutego 2004 roku] [84, 86].

### Regulacje prawne w sprawie jakości wód powierzchniowych:

#### Polska:

1. *Rozporządzenie Ministra Ochrony Środowiska, Zasobów Naturalnych i Leśnictwa z dnia 5 listopada 1991r., Dz. Ust. Nr 116 poz. 503, w sprawie klasyfikacji wód oraz warunków, jakim powinny odpowiadać ścieki wprowadzane do wód lub do ziemi.*
2. *Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 4 września 2000r., w sprawie warunków jakie powinna spełniać woda do picia, Dz. Ust. Nr 87 poz. 937.*
3. *Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 11 lutego 2004 r. w sprawie klasyfikacji dla oceny stanu wód powierzchniowych i podziemnych, sposobu prowadzenia monitoringu oraz sposobu interpretacji wyników i prezentacji stanu tych wód (Dz. U. z dnia 1 marca 2004 r.)*

[83, 83, 87].

### Pozostałe akty prawne dotyczące wody w załączniku nr 3.

Porównawcza ocena wpływu powszechnie występujących zanieczyszczeń wód z uwzględnieniem kryteriów ekotoksykologicznych stanowi obecnie normę w procesie kontroli jakości wód powierzchniowych. Wymogi nałożone przez ONZ oraz UE w/w kwestii są zaostrzone i wywierają nacisk na jednostki badające jakość wód w celu uzupełnienia metod monitoringu o metody monitoringu biologicznego. Opis badań i oceny ekotoksykologicznych wymagają wprowadzenia w tematykę dziedziny naukowej Ekotoksykologii.



### 3. Wprowadzenie do Ekotoksykologii:

#### 3.1 Struktura:

*Ekotoksykologia należy do obszaru użytkowego współczesnej Toksykologii – mianowicie Toksykologii Środowiskowej.*

#### Podział TOKSYKOLOGII

1. Toksykologia użytkowa:
2. Toksykologia środowiskowa
  - Toksykologia przemysłowa
  - Toksykologia pozaprzemysłowa środowiskowa.
  - **Ekotoksykologia**
3. Toksykologia kliniczna
4. Toksykologia sądowa

[74]

#### 3.2 Ekotoksykologia – podstawowe wiadomości:

Termin EKOTOKSYKOLOGIA (ekologia + toksykologia) zaproponowany przez R. Truhautę w 1969 r. Przyjął się w terminologii fachowej i bardzo trafnie odzwierciedlał stan wiedzy dotyczący badań nad wpływem obecnych związków chemicznych w środowisku na stan ekosystemów, jak również na poszczególne gatunki roślin i zwierząt [91].

„Ekotoksykologia jest dyscypliną w ramach szerszego pola toksykologii środowiska” [74, 91].

Intensywny rozwój gospodarczy państw, a wraz z nim rozwój technologii – przyniósł ze sobą również chemizację wszelkiej działalności gospodarczej człowieka. A tym samym pojawienie się w środowisku przyrodniczym wielu nowych produktów chemicznych będących wytworem ludzkiej działalności. Wiele z tych substancji jest produktem ubocznym. Jakkolwiek ponad 50% zanieczyszczeń w środowisku przyrodniczym wynika z działalności człowieka i postępu technologii. Rocznie ponad 2 tys. nowych substancji jest wytwarzanych i ok. 60 tys. różnych związków chemicznych jest stosowanych na co dzień [79].

Ekotoksykologia jest nauką o oddziaływaniu antropogenicznych zanieczyszczeń na różne ekosystemy oraz skażenia łańcucha pokarmowego (ze szczególnym uwzględnieniem łańcucha troficznego człowieka). Zadaniem ekotoksykologów jest wykrycie i przebadanie zmian jakościowych określonych związków chemicznych (np. przekształceń związków

nieorganicznych w organiczne), oraz zmian ilościowych (stężenia tych związków), które zachodzą w wyniku oddziaływania substancji toksycznych na ekosystemy. Ocena ryzyka środowiskowego – i podjęcie decyzji co dalszych losów substancji używanych przez człowieka a nie będących bez znaczenia dla środowiska przyrodniczego [79]. Tradycyjne metody monitoringu środowiska (ograniczające się tylko do oceny pewnych parametrów fizyko-chemicznych środowiska) są niewystarczające do wykrycia zagrożenia równowagi ekologicznej oraz zdrowia konsumentów w tym człowieka [Dobrowolski – praca przyjęta do druku w Przegląd Lekarski 2007].

Do naturalnych zanieczyszczeń środowiska zaliczamy wyziewy wulkanów, wielkie pożary, zanieczyszczenia organiczne. Środowisko przyrodnicze radziło sobie z różnymi substancjami, gdyż w drodze ewolucji gatunki roślin oraz zwierząt wytworzyły mechanizmy obronne pozwalające na przetrwanie oraz dostosowanie się do zmiennych czynników środowiskowych. Prawidłowy przebieg cykli biogeochemicznych pierwiastków warunkował zachowanie równowagi ekologicznej [35].

Większość zanieczyszczeń antropogenicznych, stanowią związki o budowie niespecyficznej nie występujące wcześniej w środowisku naturalnych. Substancje te wprowadzone do ekosystemów przenikają do ustrojów roślin oraz zwierząt. Ponieważ są to substancje nowe niespecyficzne, natura nie wytworzyła mechanizmów obronnych przed niespecyficznym, często destrukcyjnym działaniem tych związków na organizmy żywe [79, 107].

Związki te nazywamy ksenobiotykami (obce naturze) – są one wytworem działalności człowieka, i stanowią często bardzo istotny czynnik ryzyka środowiskowego, oraz realne zagrożenia dla organizmów tworzących ekosystemy (lądowe oraz wodne).

Znakomita większość tych związków chemicznych wywiera toksyczny wpływ na środowisko, oraz jego komponenty [79, 91].

Ocena ryzyka środowiskowego, wpływu w/w substancji na środowisko jest realizowana na drodze **biologicznego monitoringu środowiska** [107].

#### 4. Biologiczny monitoring środowiska (BMS).

*Biomonitoring stanowi trzeci bardzo ważny element monitoringu środowiska.*

**4.1 Definicja Monitoringu Środowiskowego:** Wytyczne dotyczące metodyki monitoringu stanu środowiska wyznacza Światowe Centrum Monitoringu Środowiska (GEMC) w Uniwersytecie Londyńskim, które współpracuje z Programem Środowiskowym ONZ (UNEP). Międzynarodowa Organizacja do spraw Standaryzacji (ISO) definiuje monitoring wód jako zaplanowany proces pobierania próbek, dokonywania pomiarów i następującego później odnotowywania lub sygnalizowania różnych cech wody, często mający na celu badanie zgodności z poszczególnymi normami.

Bertram i Ballance [6] wydziela dodatkowo:

- monitoring – długoterminowe, wystandaryzowane pomiary i obserwacje środowiska wodnego, których celem jest określenie sytuacji oraz prognoza zmian wywołanych przez określone czynniki zanieczyszczające.
- badania szczegółowe (ang. *surveys*) – w określonym czasie z zintensyfikowanymi działaniami, oparte również na pomiarach i obserwacjach parametrów wody, przewidziane dla określonych celów.
- nadzór – monitoring ciągły w celu kontroli oraz utrzymania wymaganej jakości wody. Kontroli podlega tu również sposób użytkowania i uzdatniania wody stałe, specyficzne pomiary i obserwacje mające na celu utrzymywanie pożądanej jakości wody, połączone z kontrolą sposobu użytkowania czy uzdatniania wody. Mierzone są parametry fizykochemiczne oraz prowadzony jest monitoring mikrobiologiczny.

W przypadku Biomonitoringu – jako wskaźniki zmian stosuje się organizmy żywe tzw. bioindykatory.

#### **MONITORING ŚRODOWISKA:**

- Monitoring fizyko-chemiczny.
- Monitoring mikrobiologiczny.
- **Monitoring biologiczny (biomonitoring).**

#### **4.2 Metody biomonitoringu:**

Metody badań oddziaływania substancji toksycznych – zanieczyszczających są proste i łatwe do wykonania. Wraz z rozwojem badań w tej dziedzinie metody te stale się udoskonala,

modyfikuje. Wzrasta ich czułość i poprawia się powtarzalność w skali laboratoryjnej. Rozwijają się również metody ekstrapolacji danych, umożliwiając przełożenie wyników na ich oddziaływanie na środowisko, a tym samym możliwe jest lepsze wyznaczenie stężeń bezpiecznych dla związków chemicznych lub ścieków w stosunku do biocenoz w środowisku wodnym [46].

W ostatnim trzydziestoleciu miał miejsce intensywny rozwój badań nad metodami monitoringu biologicznego, w badaniach uwzględniano szerokie możliwości zastosowania różnych oddziaływań związków chemicznych na organizmy [15, 79].  
Oddziaływania na;

- ich procesy metaboliczne i parametry fizjologiczne,
- śmiertelność i przeżywalność,
- zachowanie,
- rozwój,
- rozród,
- zmiany w dynamice populacji,
- zmiany makroskopowe i na poziomie molekularnym,
- badaniom podlegały całe organizmy bądź pewne reakcje enzymatyczne...
- badano pojedyncze osobniki, bądź populacje w biocenozach,
- badania *in situ*, *ex situ*,
- w badaniach coraz częściej uwzględnia się powiązania oddziaływań substancji chemicznych pojedynczych w porównaniu do oddziaływań w mieszaninach, uwzględnia się oddziaływania synergistyczne itp.,
- analizuje się losy ksenobiotyków, w układach pokarmowych (ich zdolność do bioakumulacji i biomagnifikacji),
- istnieją laboratoria, które modelują warunki badań laboratoryjnych aby jak najlepiej odpowiadały warunkom w środowisku wodnym (jezior, rzek, stawów itp.) [15].

Podając za Dominikiem i wsp., możemy wyróżnić następujące grupy metod monitoringu biologicznego;

1. Metody ekologiczne
2. Metody fizjologiczne i biochemiczne - Testy wzrostowe. dotyczące oceny hamowania wzrostu badanych organizmów.
3. Badania organizmów w środowisku kontrolnym.

4. Metoda badań wzrostu ektotoksyn w organizmach (bioakumulację)
5. Metody histologiczne i morfologiczne
6. Biosensory; sondy biologiczne do pomiarów ciągłych *in situ* sensory enzymowe; (min. Testy mutagenności – genotoksyczności.) [15]

Podział ten należy uzupełnić o:

8. Biomarkery.

Łebkowska [46] dodatkowo dzieli testy przeżywalności na:

- Testy przeżywalności – przy oznaczaniu toksyczności ostrej (według standardowych procedur dla LC50)
- Testy przeżywalności typu Toxkit – handlowe wersje do oznaczania toksyczności ostrej – zawierają utrwalone młodociane formy bezkręgowców wodnych [46].

Należy wyróżnić testy toksyczności ostrej – do 96 godzin (ocenie poddawane są efekty krótkotrwałe przeżywalność, immobilizacja, efekt podtrucia) i chroniczne długotrwałe (można ocenie poddać efekty subtelne – niemożliwe do oceny w krótkim czasie, tj: aktywność pokarmową, rozrodczą, oraz zmiany morfologiczne i anatomiczne o charakterze histopatologicznym wywołane w długim okresie ekspozycji przy obniżonej koncentracji toksykanta).

#### 4.3 Terminy toksykologiczne:

Zastosowanie metod i testów biomonitoringu wymaga znajomości terminologii używanej w Toksykologii Środowiska, która to wymagana jest powszechnie w opisywaniu procesów i zjawisk jakie zachodzą w trakcie prowadzenia testów i badań toksykologicznych.

Szczególnie należy przybliżyć kilka z nich:

1. Toksyczność ostra to szkodliwe zmiany zachodzące w organizmach testowych, wywołane działaniem związku chemicznego bądź ścieku w krótkim okresie ekspozycji głównie 24h do 96h. Mogą one prowadzić do zaburzeń czynności fizjologicznych i śmierci. Wynik podaje się najczęściej jako wartość oznaczenia LC(EC)50 – t.
2. Toksyczność chroniczna to szkodliwe zmiany zachodzące w organizmach testowych, wywołane działaniem związku chemicznego bądź ścieku w długim okresie ekspozycji – na ogół 1/10 cyklu życiowego do uzyskania pierwszego potomstwa. Stosowane dawki są niższe niż na ogół śmiertelne (tzw. subletalne).

Obserwacji podlegają zmiany aktywności fizjologiczne (pokarmowej, rozrodczej, zaburzeń genetycznych, i zakłóceń w funkcjonowaniu narządów). Jako wynik oznaczenia podaje się nałóg wartości: LOEC – t, NOEC – t, IC – t, EC – t.

3. LC (*lethal concentration*) – stężenie śmiertelne – stężenie substancji toksycznej, które wywołują śmierć określonej liczby organizmów w populacji (wyrażone w %) w odniesieniu do czasu trwania ekspozycji LC50% – t, LC100% – t.
4. EC (*effect concentration*) – stężenie efektywne – stężenie toksykanta powodujące powstawanie jakichkolwiek zmian w organizmach testowych, (np. immobilizację, hamowanie procesów biochemicznych i wzrostu, itp.). Jako wynik podawane jest stężenie hamujące w 50% dany proces fizjologiczny, w odniesieniu do czasu trwania eksperymentu EC50 – t (efekt inny niż śmierć).
5. NOEC (*no observed effect concentration*) – najwyższe stężenie toksykanta, które w określonym czasie doświadczenia nie powoduje żadnych spostrzegalnych zmian w organizmach testowych.
6. LOEC (*low observed effect concentration*) – najniższe stężenie toksykanta, które w określonym czasie trwania badań toksyczności chronicznej lub subchronicznej, wywołują zmiany w organizmach testowych
7. IC (*inhibition concentration*) – stężenie inhibicyjne – powodujące obniżenie o określony procent aktywności fizjologicznej organizmów testowych w badaniach subletalnych [39].

#### 4.4 Testy toksykologiczne oraz bioindykatory:

**Istnieją dwa podstawowe rodzaje biotestów:**

- **Test przesiewowy (*screen*)** odpowiadający na pytanie - czy próbka jest toksyczna? Możemy ocenić dużą liczbę pobranych próbek wody z różnych źródeł (woda z różnych cieków wodnych, ścieków, itd.).
- **Test główny** odpowiadający na pytanie - jaka jest toksyczność próbki? Możemy ocenić stopień toksyczności, a także przeprowadzić porównanie pomiędzy próbkami i stopniem rozcieńczenia próbek. Badamy przy, którym stopniu rozcieńczenia próbka przestaje być toksyczna [58, 79, 88].

Wśród organizmów wskaźnikowych wykorzystywanych w testach toksykologicznych – najczęściej stosowane to:

- Bakterie: *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Vibrio*;
- Grzyby: *Candida*, *Saccharomyces*, *Penicillium*, *Aspergillus*;
- Glony: *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Selenastrum*,
- Pierwotniaki: *Spirostomum*, *Vorticella*, *Paramecium*;
- Wrotki: gł. *Brachionus*;
- Pierścienice: *Tubifex*;
- Skorupiaki: *Daphnia*, *Ceriodaphnia*, *Gammarus*, *Thamnocephalus*, *Artemia*, *Mysis*, *Asellus*, *Hyaella*;
- Owady: *Ephemerella*, *Chironomus*, *Hydropsyche*,
- Mięczaki: *Physa Acuta*, *Planorbarius corneus*, *Dreissena polymorpha*;
- Ryby: *Lebistes reticulatus*, *Brachydanio rerio*, i inne;
- Płazy: aksolotl – *Ambystoma mexicanum*, *Xenopus laevis*, [15]
- Rośliny wodne: *Lemna minor*, *Spirodela polyrhiza*,
- Rośliny lądowe: (testy korzeniowe) jednoliścienne: *Sorghum saccharatum*, dwuliścienne: *Lepidium sativum*, *Lepidium sativum*

Podział za Klimiuk i wsp. [39] modyfikacja Mazur.

**Ogólne założenia co do wyboru organizmów wskaźnikowych – stosowanych w ekologicznych metodach monitoringu środowiska.**

**Kryterium 5P – (ang: 5R).**

1. **Podstawowy (relevant)** – organizmy wykorzystywane powinny odgrywać istotną rolę w funkcjonowaniu ekosystemów.
2. **Powszechny (reliable)** – gatunek o szerokim rozpowszechnieniu w naturze, i łatwy do zebrania, pospolity.
3. **Przeżywający (robust)** – organizmy wskaźnikowe nie powinny ginąć w przypadku bardzo niskich stężeń zanieczyszczeń (za paroma wyjątkami w przypadku określania stopnia czułości w układach zamkniętych).
4. **Podatny (responsive)** – organizmy powinny się wykazywać mierzalnymi efektami, będącymi odpowiedzią na czynniki skażające, obniżenie płodności, śmiertelność, zmiany anatomiczne, behawioralne, morfologiczne itd. Dzięki tym efektom można monitorować niekorzystne oddziaływania czynników toksycznych w środowisku wodnym. symptomatologia reakcji na toksynę musi być wyraźna i powtarzalna.

5. **Powtarzalny (reproducible)** – ten sam gatunek w różnych miejscach przy określonym stopniu ekspozycji na zanieczyszczenia taką samą toksyną powinien wykazywać podobne reakcje.

[107]

**Podział ten należy uzupełnić o dodatkowe istotne kryteria, które powinny spełniać bioindykatory:**

- Organizmy te powinny być w dobrej kondycji, bez pasożytów, oraz objawów chorobotwórczych.
- Preferowane są szczególnie bioindykatory charakteryzujące się szerokim spektrum wrażliwości na wiele różnych substancji.
- Rand i WSP. również podaje małe zróżnicowanie genetyczne, w obrębie populacji gatunku wziętego do biotestów [44].
- APHA stawia wymagania ekonomiczności prowadzenia hodowli i zastosowania w biotestach – co ma czynić określony biotest bardziej powszechnym i wygodnym w szerokim zastosowaniu [4].

#### **4.5 Testy toksyczności z udziałem organizmów wodnych:**

W przypadku organizmów wodnych zasadniczą rolę odgrywa wnikanie trucizn bezpośrednio z wody do ustroju organizmów wodnych (przenikanie przez skrzelą, powłoki skórne), lub drogą pokarmową. W testach z organizmami wodnymi problem stanowi utrzymanie stałej koncentracji toksykanta w roztworze wodnym, gdyż procesy parowania, rozkładu itd. powodują zmianę stężenia tego związku w roztworze wodnym. W przypadku badania toksyczności ostrej zmiany koncentracji są tak małe, że możemy je pominąć, natomiast w przypadku badania toksyczności chronicznej musimy zadbać o utrzymanie stałej koncentracji związku toksycznego, żeby nie zmieniać warunków prowadzenia testu. W pierwszej fazie badań preferuje się wykonanie testów pilotażowych w celu ustalenia wstępnego zgrubnego oszacowania zakresu stężeń toksyczności określonej substancji na badanych organizmach, przy nie dużej ilości testowanych organizmów [107]. Kolejny etap dotyczy wykonania szeregu rozcieńczeń roztworu z testowanym związkiem, dla dużej grupy statystycznej badanych organizmów 30 lub > 30, w powtórzeniach od 4 – 8. W czasie trwania testu notujemy efekt toksyczny np. śmiertelność [43, 46].

Uzyskane wyniki posłużą do wyznaczenia LC50 dla różnych czasów ekspozycji. Wyniki możemy przedstawić graficznie. Poza LC50 możemy również wyznaczać inne parametry EC50%, NOEC, LOEC [44, 46]. Czas ekspozycji organizmów – czyli tak zwany czas



narażenia na substancję toksyczną zależy od wybranego gatunku bioindykatora, dla *Daphnia magna* to od 24h – 48h, dla ryb ten czas ulega wydłużeniu. Dotychczas rozważaliśmy badania toksyczności wód, jednak należy również rozszerzyć zakres badań o toksyczność osadów dennych [107]. Toksyczność osadów dennych jest kwestią dosyć istotną, bardzo często część związków stanowiących potencjalne zagrożenia kumuluje się w osadach dennych odciażając toń wodną od ich ładunku. W trakcie wezbrań stanu wód i ruchu osadów może dojść do wtórnej intoksykacji zbiornika, i zatrucia ekosystemu wodnego. Badania toksyczności osadów dennych koncentrują się wokół organizmów żyjących w tych osadach dotyczy to głównie skąposzczetów m. in *Tubifex tubifex*, drogi dostawania się toksyny do ciała tych organizmów w tym wypadku dotyczą układu pokarmowego wraz z treścią pokarmową. Organizmy te przerabiają pokaźne pokłady osadów podobnie jak dżdżownice *Eisenia fetida* [107] żyjące w środowisku glebowym żywią się martwą materią organiczną, która deponowana jest w osadach. Skumulowane w osadach dennych toksyny, drogą pokarmową przedostają się do ustroju tych pierścienic i przy zwiększonej koncentracji mogą wywoływać określony efekt toksyczny, który możemy zanotować i zmierzyć. Efekt ten będzie charakterystyczny dla stopnia skażenia osadów, metodyka testu podobna jest do biotestu na dżdżownicy glebowej [107].

Dokładna metodyka zastosowanych w ramach pracy doktorskiej testów toksykologicznych przedstawiona jest w rozdziale „Metodyka badań”.

#### **4.6 Przegląd wybranych metod biomonitoringu oraz biotestów:**

##### **A. Metody ekologiczne:**

Należą tu badania prowadzone w środowisku naturalnym, np.:

Opracowane przez British Ecological Society 1990r.

- **Oceny biotyczne** – dotyczą zróżnicowanej wrażliwości różnych gatunków na określone grupy zanieczyszczeń.
- **Oceny różnorodności** – monitorowane są zmiany w zróżnicowaniu zespołów.
- **System RIVPACS** – (*river invertebrates prediction and classification*) – monitoringowi podlegają rodzaje występujących gatunków bezkręgowców i ich względnej liczebności rodzin.[ 14, 48, 89, 107].

W ocenie biotycznej stosowane są: wskaźnik biotyczny Trenta – (TBI – Trent Biotic Index), punktacja biotyczna Chandlera (CBS – Chandler Biotic Score) oraz brytyjski indeks biotyczny BMWP (Biological Monitoring Working Party). TBI i CBS – opierają się na

oznaczaniu gatunków natomiast BMWP – ogranicza się do oznaczania rodzin. Do słabych punktów wyżej przedstawionych indeksów należy teoretyczne określenie czułości dla określonych substancji toksycznych, nawet gdy eksperymenty laboratoryjne nie potwierdzają tych założeń.

**Oceny różnorodności** – bazują głównie na ocenie różnorodności Shannona – Weinera. Oceny te mają też wady dosyć istotnie wpływające na oznaczenie.

- Na strukturę wpływa wiele czynników a wskaźniki różnorodności nie biorą pod uwagę obecności gatunków – w przypadku wody miara z zastosowaniem tych wskaźników staje się wątpliwa.
- Brak informacji w odniesieniu, do której grupy taksonomicznej i jak należy go stosować w co do konkretnej grupy taksonomicznej.
- Brak dokładnych danych jak cała bioróżnorodność (rozumiana jako wielkość) reaguje na zanieczyszczenia [14, 48, 107].

**System RIVPACS** – stosowany do prognozowania składu fauny danego miejsca z zastosowaniem zmiennych środowiskowych. System ten również nie należy do doskonałych sposobów oceny co do stopnia szkód jakie wyrządziły substancje toksyczne w środowisku wodnym [14, 107].

#### **Polski system Biomonitoringu;**

**Polski indeks biotyczny (BMWP-PL)** – zaadoptowany z brytyjskiego indeksu biotycznego. Metoda ta poddaje ocenie zespoły organizmów wodnych tj.: fitoplankton, makrofity, fitobentos, makrozoobentos, ryby. Są one według Dyrektywy biologicznymi wyznacznikami jakości wód śródlądowych. Podobnie jak i w systemie brytyjskim pojawiają się tu niedoskonałości tego samego charakteru [107, 108]. Indeks biotyczny został wprowadzony jako ujednolicony system biomonitoringu stosowany w Unii Europejskiej.

**Indeks saprobów:** wykorzystuje w ocenie stopnia czystości wód obecność określonych zespołów organizmów wskaźnikowych mniej lub bardziej tolerancyjnych na różny stopień deficytu tlenowego charakterystyczny dla wód o określonym stopniu zanieczyszczenia i rozkładzie substancji organicznych oraz na występowanie substancji trujących powstających w procesach rozkładu: amoniak, siarkowodór, niektóre kwasy organiczne, alkaloidy i in.

## Polisaprobionty

### Organizmy wskaźnikowe:

- larwy gnojki trutniowatej (*Eristalis tenax*),
- czerwono zabarwiony rurecznik mułowy (*Tubifex rivulorum*, *Tubifex tubifex*)
- larwy ochotkowatych z grupy *Chironomus plumosus*.

## $\alpha$ -mezosaprobionty

### Organizmy wskaźnikowe:

- larwa zmrózka kameleona (*Stratiomys chamaeleon*)
- pijawka erpobdella (*Erpobdella octoculata*)
- małż gałeczka (*Sphaerium corneum*)

## $\beta$ -mezosaprobionty

### Organizmy wskaźnikowe:

- larwy jętki *Cloëon dipterum*
- wirek *Polycelis felina*
- skąposzczet *Stylaria lacustris*

## Oligosaprobionty

### Organizmy wskaźnikowe:

- wirek *Dugesia gonocephala*
- larwa widelnicy *Perla bipunctata*
- larwa jętki *Ecdyonurus venosus* , [14, 41, 47, 53, 70, 108, 110].

## B. Metody fizjologiczne i biochemiczne:

- Ocenie podlegają parametry fizjologiczne badanych organizmów – eksponowanych na określone czynniki toksyczne, min – oddychanie, tempo wzrostu, pobieranie pokarmu...
- Badanie wzrostu osobników młodych.
- W przypadku metod biochemicznych ocenie podlegają min aktywność wybranych enzymów biorących udział w procesach biochemicznych.

Jako przykład testów toksykologicznych podać można tu:

- Rozmnażanie rozwielitki (*Daphnia magna*).
- Test na hamowanie wzrostu glonów – zielenice *Scenedesmus subspicatus* lub *Selenastrum capricornutum*.
- Badanie wzrostu narybku.
- Toksyczność chroniczna na rybach

[8, 15, 39, 46, 77, 82, 90].

### C. Badania organizmów w środowisku kontrolnym:

Badania obejmują biotesty prowadzone w laboratorium, przy ekspozycji na określone związki chemiczne (nieorganiczne lub organiczne) i inne. Badanie efektów toksycznych substancji pojedynczych i w mieszaninach.

Ocena *in situ* zmian wywołanych przez zidentyfikowane substancje zanieczyszczające w zespołach naturalnych, podobnie jak w przypadku metod ekologicznych.

- Testy toksyczności ostrej, m. in. Na *Daphnia magna* [39, 41, 46, 61, 104], danio pręgowany *Brachydanio rerio* [32, 62, 90] gupik – *Poecilia reticulata* i inne [39],
- Testy toksyczności na bakteriach: *Vibrio fischeri* [46].

### D. Metoda wzrostu stężeń ektotoksyn w organizmach (bioakumulacja).

Wyznaczenie stopnia bioakumulacji w określonego związku m. in metali ciężkich, ekwiwalentów pestycydów i innych, na poszczególnych stopniach układzie troficznym.

Można tu wydzielić obserwację bierną – przy poborze organizmów ze środowiska wodnego z akwenu o określonym skażeniu wody.

Obserwacja czynna wyznaczenie stopnia bioakumulacji w układzie eksperymentalnym dla wybranego czynnika chemicznego.

Testy wymagają ustalenia małych dawek substancji chemicznej, która nie powoduje ostrego efektu toksycznego. Ekspozycji poddaje się cały układ troficzny. W prostych łańcuch pokarmowym wydzielamy ok. 2 – 3 poziomów troficznych ze względu na uproszczenie w badaniach laboratoryjnych. Badania obejmują dłuższy okres, kilkupokoleniowy dla badanych organizmów (w kontroli i układzie eksperymentalnym). Prowadzimy stałą kontrolę stężenia podanej toksyny, poniżej progu efektywnego działania toksycznego. Końcowy wynik badania stanowi zebranie organizmów testowanych, ich utrwalenie i pomierzenie zawartości badanego związku chemicznego określoną metodą chemiczną w porównaniu z kontrolą. Są to badania w fazie eksperymentalnej. Znane są procedury testów na biokoncentrację bez uwzględnienia łańcuch pokarmowego [15, 17].

Znane są efekty oddziaływania pierwiastków śladowych [35] tj. efekty synergistyczne, sumaryczne lub rzadziej wykluczających jednak przy dużej ilości oddziałujących czynników na organizmy czy populacje bardzo ciężko jest przewidzieć precyzyjnie efekt końcowy. Nawet zaawansowane badania chemiczne przy zastosowaniu zaawansowanej aparatury badawczej nie są w stanie dać nam odpowiedzi na temat toksyczności wykrytych związków.

➤ Biokoncentracja. Badanie Przepływowo Na Rybach.

Zalecany gatunek	Zalecany zakres temperatur w czasie badania (°C)	Zalecane wymiary ryb (cm)
Danio pręgowany <i>Brachydanio rerio</i> ( <i>Teleostei, Cyprinidae</i> ) (Hamilton-Buchanan)	20-24	3,0±0,5
<i>Pimephales promelas</i> ( <i>Teleostei, Cyprinidae</i> ) (Rafineque)	20-25	5,0±2,0
<b>Ryżanka</b> <i>Oryzias latipes</i> ( <i>Teleostei, Poeciliidae</i> ) (Temminck i Schlegel)	20-25	4,0±1,0
Gupik <i>Poecilia reticulata</i> ( <i>Teleostei, Poeciliidae</i> ) (Peters 1859)	20-25	3,0±1,0
Okoniopstrąg <i>Lepomis macrochirus</i> ( <i>Teleostei, Centrarchidae</i> ) (Rafinesque Linnaeus 1758)	20-25	5,0±2,0
Pstrąg tęczy <i>Onchorhynchus mykiss</i> ( <i>Teleostei, Salmonidae</i> ) (Walbaum 1988)	13-17	6,0±2,0
<b>Ciernik</b> <i>Gasterosteus aculeatus</i> ( <i>Teleostei, Gasterosteidae</i> ) (Linnaeus)	18-20	3,0±1,0

Tab. 1. Meyer A., Orti G. (1993) Proc. Royal Society of London, Series B, Vol. 252, p. 231. [82, 90].

Tendencja do rozwoju metod bioindykacyjnych przy oznaczaniu bioakumulacji pierwiastków śladowych, w tym metali ciężkich dotyczy zwłaszcza badań gleb oraz roślinności lądowej, mającej szczególne predyspozycje do akumulowania określonych pierwiastków [35, 65]. Jako przykład można tu podać prace badawcze E. Panek przy oznaczaniu metali śladowych tj. Zn, Cu, Cd i Pb, u mchu *Polytrichum formosum* Hedw., w pędach zielonych i liściach borówki czernicy *Vaccinium myrtillus* L., czy pędach i igłach świerku *Picea abies* L. Prace biomonitoringowe w obszarze Polskiej części Karpat [65].

### E. Metody histologiczne i morfologiczne:

Ocenię poddane są zmiany morfologiczne oraz patologiczne zwyrodnienia wywołane efektem toksycznym w tkankach (zmiany histologiczne).

Badanie zmian w rozwoju embriologicznym oraz juvenilnym w testach z osobnikami młodocianymi. W testach embriologicznych oprócz takich efektów jak hamowanie wzrostu, opóźniony rozwój, mogą pojawić się efekty teratogenne lub zmiany mutagenne w zależności od charakteru toksyczności badanego związku chemicznego.

Bardzo często są to zmiany subtelne przy bardzo niskiej koncentracji toksykanta.

Do metod kwalifikowanych w obrębie w/w metod należą;

- Badanie zmian patologicznych w skrzelach ryb narażonych na określone czynniki toksyczne [81].
- Testy embriologiczne (embriotesty) – wykorzystujące różne gatunki organizmów;
  - Testy embriotoksyczności dla Danio przegowany *Brachydanio rerio* (*Teleostei, Cyprinidae*) (Hamilton- Buchanan) [8].
  - Testy embriotoksyczności dla *Tubifex tubifex* (badanie rozwoju embrionów, jak również, efektu hatching).
  - Testy embriotoksyczności *Lymnaea stagnalis* [15, 50, 51, 52].

#### F. Biosensory; sondy biologiczne do pomiarów ciągłych *in situ* sensory enzymowe.

Część testów należy do nowoczesnych metod wymagających zaawansowanego wyposażenia laboratoryjnego, oparte o badanie molekularne i cytologiczne, wykorzystujące metody badania zmian w DNA, w tym efektów toksycznych, zmian aktywności ekspresji genetycznej (aktywności określonych enzymów). Część tych testów zaliczana jest do metod alternatywnych gdyż zastępują badania na zwierzętach badaniami na sztucznie hodowlanych liniach komórkowych (min. limfocytach).

Inna grupa wykorzystuje mikroorganizmy – bada się tu stopień spontanicznych mutacji wywołanych określonymi substancjami chemicznymi (***mutacje genowe, chromosomowe, uszkodzenia lub zaburzenia naprawy DNA***). Aktywność enzymatyczną z wykorzystaniem określonych fluorogenów lub innych związków np. barwnych [81].

Czy wreszcie metody z organizmami eukariotycznymi – z zastosowaniem odpowiednich biosensorów do pomiaru aktywności metabolicznej (głównie enzymatycznej), itp. [39, 88].

- Testy cytogenetyczne (różne grupy organizmów najczęściej organizmy wyższe kręgowce (od ryb do ssaków);
  - Test nieplanowanej syntezy DNA (dla Bakterii i drożdży).
  - Test na hepatocyty wątroby szczura.
  - Test kometowy; przeprowadzany dla hodowanych w układzie *in vitro* lini limfocytów. Krew pobierana jest od różnych grup organizmów wyższych (kręgowców), najczęściej od ssaków [88].
  - Test mikrojądrowy (można stosować dowolną populację hodowlanych *in vivo* lub *in vitro* dzielących się lini komórkowych, ale najczęściej są to

mikrojądra w erytrocytach szpiku kostnego lub śledziony. Najczęściej pobierane są erytrocyty od chomików, myszy, szczurów ...) [88].

- Testy mutagenności;
  - Testy wyrywające mutacje genowe
    - Test Amesa z bakterią *Salmonella typhimurium*
    - Test z wykorzystaniem grzybów (drożdże)
    - SOS – Chromotest; *Escherichia coli*.
    - Test na mutacje barwnika u glonu *Chlorella*.
  - Testy wykrywające aberracje chromosomowe;
    - Wykrywanie i opisywanie aberracji chromosomowych (CA)
  - Testy wykrywające uszkodzenia lub zaburzenia naprawy DNA
    - Test na wykrywanie wymiany siostrzanych chromatyd (SCE) [39,88].
- Testy enzymatyczne;
  - Test z zastosowaniem bakterii luminescencyjnych (*Vibrio fischeri*).
  - Test fluotox – z *Daphnia magna*, *Artemia salina*, *Thamnocephalus platyurus* [46, 82].
  -

### G. Biomarkery;

Są wyznacznikami zróżnicowań występujących w obrębie składników komórkowych lub fizjologicznych płynów ustrojowych. Najczęściej są to określone związki biochemiczne, których tempo biosyntezy zależy od wystąpienia odpowiedniego czynnika (przykład może być np. protoporfiryna erytrocytarna będąca biomarkerem dla występowania ołowiu w zaadsorbowanego do ustroju). Ogólnie można powiedzieć, że oznaczanie biomarkerów przeprowadza się w wydzielinach ludzkich (mocz, ślina, kał), płynach ustrojowych (krew, limfa), w komórkach (w cytoplazmie), w tkankach na drodze różnych metod pomiarowych. Są one często odpowiedzią na określony czynnik toksyczny.

Za pomocą biomarkerów możemy wyznaczyć;

- Ilość zaadsorbowanej substancji chemicznej – **Biomarkery ekspozycji (dawki)**.
- Rodzaj odpowiedzi organizmu na dany efekt toksyczny **Biomarkery efektu (odpowiedzi)** – może to być skutek zdrowotny.
- Podatność (wrażliwość) organizmu na określony czynnik chemiczny – **Biomarkery wrażliwości (podatności)** [88].

#### 4.7 Metody Mikrotoks – (Toxikits).

**Testy drugiej generacji;** komercyjne formy testów toksykologicznych oparte o bezkręgowce wodne, i mikroorganizmy, przygotowane i utrwalone do bezpośredniego szybkiego zastosowania. Są one przeznaczone do oznaczenia toksyczności dużej liczby pobranych próbek w szybkim czasie. Są to zestawy zawierające formy kryptobiotyczne bioindykatorów (pochodzące ze standardowej hodowli), preferowaną cechą jest możliwość ich długiego przechowywania i szybkiego przygotowania i przeprowadzenia testu. Ich zastosowanie jest szerokie od standardowych procedur wyznaczania toksyczności do substancji chemicznych, do wykorzystania w sytuacjach alarmowych przy skażeniu środowiska wodnego, dla oznaczenia toksyczności ścieków itd. Do pierwszych tego typu mikrobiotestów zaliczamy System Microtox® opracowany w USA 1979r. zawierający bakterie luminescencyjne *Vibrio fischeri*. Do obecnego czasu powstało szereg jego modyfikacji, ale wszystkie opierają się o tą samą cechę i zasadę oznaczania.

Do innych cech przemawiających na korzyść metod Toxikits – przemawiają;

- Możliwość ich zakupu (są w miarę tanie).
- Eliminacja prowadzenia hodowli.
- Mała objętość badanej próbki.
- Nie wymagają dużej przestrzeni dla przygotowania warsztatu badawczego.
- Istnieje możliwość ich zastosowania w terenie, dzięki czemu nie wszystkie próbki muszą być utrwalane na okres przewiezienia.
- Mają normy ISO.

Pomysł i opracowanie metodyki dla większości metod toxikits należy do zespołu badawczego z Uniwersytetu Ghent w Belgii pod kierownictwem G. Persoone [72, 73].

Formy przetrwalnikowe (cysty) utrwalonych skorupiaków przed testem muszą być umieszczone w wodzie. Pod wpływem silnego światła następuje rozwój form przetrwalnych i po okresie od 18 do 96 godzin następuje wylęg młodych osobników gotowych do testu. Ogólnie reprezentują one różne metody biomonitoringu w zależności od charakteru testu.

[39, 43, 59, 72, 73].

#### **Pakiety testów – zestawów mikrobiotestów *Toxkit*;**

1. **Algaltokit F**, 72 h test określający hamowanie wzrostu glonów (algi) z *Selenastrum capricornutum* (zwanym też *Raphidocelis subcapitata* lub *Pseudokirchneriella subcapitata*).
  - Test zgodny z normami OECD i ISO



- przesiewowy mikrobiotest dla substancji chemicznych czystych, ścieków, wód powierzchniowych i głębinowych [43, 72].
- 2. **Marine Algaltoxkit**; zawiera okrzemki morskie *Phaeodactylum tricornutum*.
  - Zgodny z normą ISO
  - 72 h przesiewowy mikrobiotest skażonych wód słonych i słonawych, czystych substancji, ścieków uwalnianych do morza [41, 43, 72, 77].
- 3. **Protoxkit F**; 24 h test określający hamowanie wzrostu pierwotniaków z *Tetrahymena thermophila*,
  - Stosowane są pierwotniaki z grupy orzęsków *Tetrahymena thermophila*.
  - Posiada normę OECD [72, 96].
- 4. **Rotoxkit F**; 24 h test określający śmiertelność skorupiaków; wrotek z *Brachionus calyciflorus*,
  - 24 godzinny lub 48 godzinny test toksyczności ostrej czystych substancji, wód morskich, ujścia rzek i wód przybrzeżnych.
  - Zgodny z normą ASTM [43, 71].
- 5. **Thamnotoxkit F**; 24 h test określający śmiertelność skorupiaków z *Thamnocephalus platyurus*,
  - przesiewowy mikrobiotest czystych substancji, ścieków, wód powierzchniowych i głębinowych, biotoksyn [72, 97].
- 6. **Daphtoxkit F**; 24 h lub 48 h test określający ostre unieruchomienie skorupiaków z *Daphnia magna* lub *Daphnia pulex*.
  - przesiewowy mikrobiotest czystych substancji, ścieków, wód powierzchniowych i głębinowych.
  - Zgodny z normą ISO i OECD [43, 72].
- 7. **Ostracodtoxkit F<sup>TM</sup> Mikrobiotest toksyczności chronicznej osadów** Wykorzystuje skorupiaki *Heterocypris incongruens*.
  - 6 dniowy test toksyczności chronicznej osadów słodkowodnych Stosowany również do gleb i odpadów stałych [72].
- 8. **Artoxkit M<sup>TM</sup> Mikrobiotest toksyczności ostrej wód słonych**, wykorzystuje skorupiaki morskie *Artemia salina*.
  - 24 h test toksyczności ostrej czystych substancji, wód morskich, ujścia rzek i wód przybrzeżnych [43].

9. **Rapidtoxkit** <sup>TM</sup> *Mikrobiotest toksyczności ostrej* wykorzystuje skorupiaki *Thamnocephalus platyurus*.

- Bardzo szybki test przesiewowy 30-60 minutowy mikrobiotest do oceny skażenia wody [72].

10. **Phytotoxkit** *Mikrobiotest fitotoksyczności*; Test kiełkowania nasion i wczesnego wzrostu roślin.

- Test fitotoksyczności – pomiar długości z wykorzystaniem analizy obrazu.
- 3 dniowy mikrobiotest fitotoksyczności gleby, osadów ściekowych, kompostu, ścieków używanych do nawadniania, substancji chemicznych i biocydów.
- Rośliny użyte w teście; jednoliścienne; *Sorghum saccharatum* (sorgo) i dwuliścienne: *Lepidium sativum* (rzeżucha drobnolistna) i *Sinapis alba* (gorczyca).

[43, 72].

*Ocenę toksyczności wód, ścieków, substancji czystych, itd., powinno się dokonywać w oparciu o zastosowanie baterii biotestów i po wyznaczeniu współczynnika korelacji między poszczególnymi rodzajami testów dla otrzymanych wyników [46].*

#### 4.8 Biomonitoring według Dyrektywy Wodnej:

Wzrost zapotrzebowania na wodę dobrej jakości, wykorzystywaną w różnych celach, obserwuje się od dłuższego czasu zarówno na obszarze Polski jak i innych krajów UE. W tym celu podjęto niezbędne działania dla ochrony wód w zakresie ilościowym jak również jakościowym. Wypracowany został akt prawny regulujący zakres tych działań i obowiązków państw członkowskich w zakresie ochrony wód w randze Dyrektywy Nr 2000/60/WE Parlamentu Europejskiego z dnia 23 października 2000r, znana jako. „Ramowa Dyrektywa Wodna - RDW”. Ustanawia ona ramy wspólnotowego działania w dziedzinie polityki wodnej [46, 99]. Zawiera innowacyjne podejście w tej kwestii, wprowadzając zasadę spójności i całości.

Podejście łączone zgodne jest z zasadami:

- zasadą przezorności lub przeciwdziałania,
- zasadą, szybkiego i skutecznego programu naprawczego szkód wyrządzonych w środowisku, z uwzględnieniem i wyeliminowaniem ich źródeł
- zasadą, że należy uwzględnić zmienność warunków środowiskowych w różnych regionach i dostosować do nich programy przeciwdziałania określonymi w Traktacie Komisji Wspólnot Europejskich.

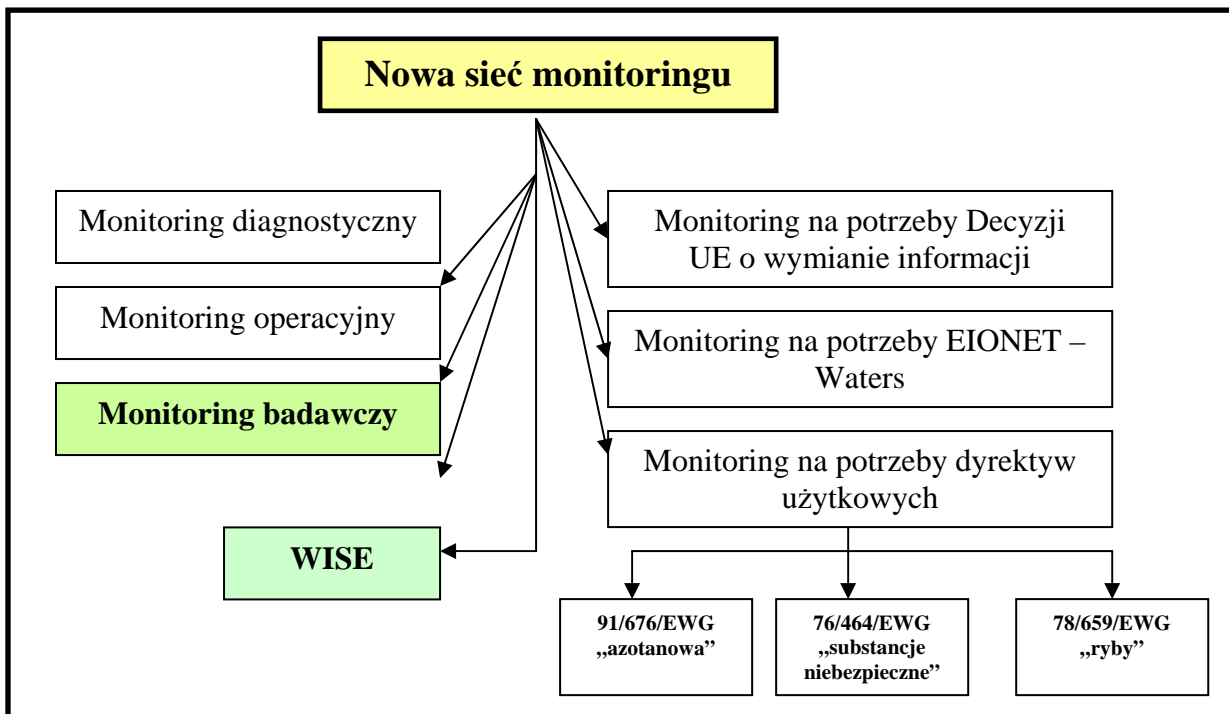
**Główne cele RDW:**

- Ochrona i przeciwdziałanie zanieczyszczeniu wszystkich rodzajów wód.
- Wprowadzanie odpowiednich planów gospodarowania, bądź w razie konieczności programów naprawczych (dobrego stanu wód w 2015 roku).
- Międzynarodowa współpraca państw dzielących wspólne dorzecza.
- Aktywowanie społeczeństwa w działaniach związanych z zarządzaniem gospodarką wodną.
- Zaostrzenie kar i zwiększenie nakładów finansowych dla instytucji mających negatywny wpływ na zanieczyszczenia wód na zasadzie „zanieczyszczający płaci”.
- **Stała i kompleksowa kontrola jakości wód.**

Głównym narzędziem służącym do osiągnięcia celów RDW jest kompleksowy monitoring zasobów wód powierzchniowych. W Polsce realizowany jest m.in. on w ramach Państwowego Monitoringu Środowiska (PMS), utworzonego na podstawie ustawy Prawo Ochrony Środowiska oraz ustawy o Inspekcji Ochrony Środowiska [29].

Innowacyjne podejście RDW w kwestii monitoringu wód – szczególnie preferuje oparcie oceny stanu wód na wskaźnikach biologicznych, jak również modyfikuje tradycyjne podejście monitoringu fizyko chemicznego oraz mikrobiologicznego.

Metody kontroli jakości wód do niedawna oparte głównie na ocenie parametrów fizykochemicznych oraz mikrobiologicznych zostały rozszerzone o **monitoring biologiczny**.



Ryc. 3. Kategorie monitoringu [PMS] [29]

*Szczególnie istotne znaczenie z punktu prezentowanej pracy doktorskiej ma kategoria monitoringu badawczego.*

**Monitoring badawczy (MB):**

- Identyfikacja skali przyczyn zanieczyszczenia środowiska.
- Ocena wpływu awarii.
- Wyjaśnienie związków przyczynowo-skutkowych i zdarzeń wywołujących nieoczekiwane stany jakościowe środowiska wodnego
- Program badawczy i lokalizacja punktów uzależniona od konkretnego zapotrzebowania.

***Dodatkowo:***

- *Wypracowanie nowych czułych metod biomonitoringu środowiska.*
- *Wprowadzenie nowych kryteriów ekotoksykologicznych dla szerszej oceny jakościowej i ilościowej składników środowiska wodnego.*
- *Kompleksowa ocena parametrów wód powierzchniowych.*

*Art.155a ust. 2 ustawy z dnia 18 lipca 2001r. – Prawo Wodne (Dz. U. Nr 115, poz.1229 z póź. zm.), ustanawia obowiązek badania i oceny jakości wód powierzchniowych [34].*

## **5. Wybór problematyki i materiału do biotestów zanieczyszczeń wód:**

W ramach pracy ocenie poddane zostały zastosowania nowych kryteriów (embriologicznych) w relacji do testów na organizmach dorosłych tych samych gatunków. Odnośne prace związane są z doskonaleniem metod biologicznej kontroli środowiska określonej jako biomonitoring.

Badania doświadczalne dotyczyły określenia wpływu zanieczyszczeń chemicznych (problemu zasolenia, zakwaszenia wód powierzchniowych jak również zagrożeń związanych z powszechnym wykorzystaniem surfaktantów oraz ich wpływem na środowisko wodne). Badania na materiale biologicznym, który stanowią w/w organizmy wskaźnikowe oraz ich wczesne formy rozwojowe – mają na celu wykazanie zwiększenia czułości biotestów przy zastosowaniu nowych kryteriów rozwojowych.

Ekotoksykologiczna ocena z zastosowaniem kryteriów embriologicznych stwarza przesłanki do opracowania skuteczniejszych metod monitoringu środowiska w celu lepszej ochrony i zapewnienia właściwej reprodukcji zasobów biologicznych środowiska wodnego oraz zdrowia człowieka [17].

## 5.1 Uzasadnienie wyboru tematyki badań.

Chemiczne i fizyczne metody monitoringu wód powierzchniowych nie umożliwiają oceny rzeczywistego stanu ekosystemu, czyli wpływu ekotoksyn na organizmy żywe. Pomijają kumulację toksyn w łańcuchach pokarmowych, zmiany ich charakteru chemicznego w wyniku procesów metabolicznych oraz skutki synergistycznych oddziaływań trucizn, a także ich interakcje w środowisku przyrodniczym i w organizmach żywych. W testach biologicznych wykorzystano organizmy wskaźnikowe (bioindykatory), które charakteryzują się małą tolerancją na wpływ czynników stresowych oraz są reprezentatywne dla danego ekosystemu. Rozwój biotechnologii środowiskowej umożliwia modyfikację metod biomonitoringu w celu podniesienia ich czułości i efektywności oraz stworzenie systemów wczesnej oceny zagrożenia środowiska wodnego toksynami [15, 17, 43, 58].

W badaniach nad opracowywaniem nowych skutecznych, czułych i ekonomicznych metod monitoringu środowiska szczególną uwagę zwraca się na metody monitoringu biologicznego. Wypracowano szereg biotestów, które wykazują się szczególną skutecznością i czułością – w procesie monitorowania stanu jakości wód i pozostałych składników środowiska przyrodniczego. Postęp nauki, jaki ma miejsce w ostatnim czasie w zakresie takich dyscyplin naukowych jak biotechnologia środowiska, ekotoksykologia i ekologia dają realne przesłanki do rozwoju nowych efektywnych metod biomonitoringu [17, 89].

Szczególne szanse stwarza na tym polu rozwój badań nad embriologią doświadczalną i wykorzystaniem jej dla potrzeb biotechnologii środowiska w celu ekologicznej profilaktyki oraz Zrównoważonego Rozwoju i skutecznej Ochrony Środowiska Przyrodniczego i Zdrowia Człowieka (traktowanymi jako cele priorytetowe a aktualnych programach międzynarodowych np. w ramach Programu Ramowego UE). Metody te oparte na kryteriach embriologicznych, wykazują się zwiększoną wrażliwością na niskie dawki czynników toksycznych [8, 52, 49, 50, 51, 82].

Zjawisko to tłumaczy się na gruncie teorii informacji [100], czyli wpływu szumu informacyjnego (środowiskowego) na zmiany w materiale genetycznym i wpływ tych zmian na ekspresję fenotypową organizmów rozwijających się.

W trakcie rozwoju zarodków organizmów zwierzęcych do najbardziej krytycznego stadium nie należy forma najwcześniejsza (gdyż w tym stadium występuje nadmiar materiału genetycznego w stosunku do aktualnych potrzeb rozwijającego się zarodka), ale stadia różnicujących i intensywnie dzielących się komórek – gdyż ma wtedy miejsce intensywny proces syntezy i przekazywania materiału genetycznego do komórek potomnych. Różnorodne

zanieczyszczenia wprowadzone do środowiska wodnego mogą implikować zmiany patologiczne w ekspresji fenotypowej we wczesnym rozwoju różnych gatunków [17].

Zaznaczyć należy że, powyższe kryterium embriologiczne wprowadzone zostało do literatury światowej, jako szczególnie wrażliwe. Z tego też powodu kryterium to jest niezbędne dla interpretacji wpływu m.in. skażeń chemicznych, oraz czynników fizycznych i toksyn pochodzenia biologicznego na zaburzenie procesów reprodukcji organizmów, oraz zmiany populacyjne różnych gatunków [16, 17].

**Metody oparte na kryteriach embriologicznych zaczynają odgrywać coraz większą rolę w metodach bioindykacji:**

- umożliwiając ocenę zmian (biochemicznych, morfologicznych, fizjologicznych, itp.) zachodzących w organizmach we wczesnych stadiach rozwoju osobniczego,
- obniżając progi czułości zwiększamy efektywność biotestów i uzyskujemy bardziej skuteczne narzędzia do wczesnej detekcji zagrożeń spowodowanych czynnikami toksycznymi w zbiornikach wodnych Ich kumulatywne i synergistyczne efekty są niejednokrotnie niebezpieczne dla ekosystemów jak i dla zdrowia potencjalnych konsumentów,
- jako jedne z niewielu metod są w stanie wykryć działanie teratogenne lub mutagenne, wielu związków chemicznych, które stosowane na co dzień nie wykazują doraźnych skutków toksycznych.

[8, 15, 16, 43, 49, 50, 51, 52, 58, 82]

Przydatne mogą być one zarówno dla bardziej skutecznej ochrony przyrody, jak też dla zapewnienia odnawialności zasobów biologicznych (zabezpieczenie trwałości zasobów biologicznych), jako podstawy zrównoważonego rozwoju.

Niezbędne staje się skojarzenie badań nad zawartością określonych czynników ryzyka środowiskowego z ich wpływem na ekosystemy wodne z uwzględnieniem oceny ryzyka zagrożenia zdrowia człowieka związanego z intoksykacją łańcuchów pokarmowych [15, 17, 52].

Dla wstępnej i szybkiej oceny zagrożenia środowiska przyrodniczego przez związki toksyczne należy wdrażać biotesty wrażliwe na te zanieczyszczenia. Tam gdzie wyniki testów sygnalizują podwyższoną toksyczność, należy zastosować chemiczne analizy umożliwiające oznaczenie danych związków i określenie ich stężeń oraz bardziej złożone biologiczne

metody oceny zagrożenia badanego ekosystemu. Takie postępowanie powinno prowadzić do podjęcia działań prewencyjnych mających na celu zmniejszenie lub wyeliminowanie w przyszłości negatywnych oddziaływań na środowisko przyrodnicze.

**Wykorzystując testy biologiczne możemy:**

- obniżyć koszty monitoringu środowiskowego a jednocześnie wprowadzić system wczesnej detekcji czynników niebezpiecznych dla środowiska i człowieka). W przypadku, gdy system nie wykaże zagrożenia – nie musimy za każdym razem przeprowadzać kontroli fizykochemicznej i bakteriologicznej, – co się wiąże z oszczędnościami,
- wykorzystując kryteria embriologiczne zwiększamy czułość biotestu w odniesieniu do zmian chemicznych i fizycznych parametrów stanu środowiska przyrodniczego,
- dążymy do opracowania rozwiązań – wiarygodnych, czułych, ekonomicznych, które można będzie w przyszłości opatentować i wdrożyć do użytku na skalę przemysłową.

[17, 49, 51, 52]

**5.2 Wybór organizmów do badań i metod Biomonitoringu:**

Test na *Daphnia magna* – jest testem wystandardyzowanym i znormalizowanym dlatego ma on szerokie zastosowanie w badaniach uzupełniających przy ocenie jakości wody, stopnia wydajności danej oczyszczalni, stopnia toksyczności ścieków.( nr normy – ISO 341: 1996 Water quality, EN ISO 6341: 1996 Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus) – Test toksyczności ostrej. W trakcie badania przy użyciu powyższego biotestu – określa się strukturę wiekową populacji, liczebność populacji, przeżywalność w czasie w obrębie testowanej grupy osobników [19, 31, 33, 39, 60, 82].

**W standardowej procedurze testu stosuje się osobniki młode odławiane z populacji hodowanej zgodnie z normą OECD [64, 66, 76, 93], umieszczając je w krystalizatorach z roztworami ścieku lub roztworu badanej substancji o różnych stężeniach. Po 24 i 48 godzinach zlicza się ilość rozwielitek wykazujących efekt testowy, w tym wypadku unieruchomienie osobników. Dane te pozwalają na określenie toksyczności testowanej próbki, np. ścieków lub określonego związku chemicznego.**

Wykorzystanie *ślizniarki stawowej* – w ocenie stanu czystości środowiska wodnego – dotyczy wpływu substancji toksycznych na formy juwenilne i kształtujące się zarodki w osłonkach jajowych w kokonach tych mięczaków. Proces testowania stanu jakości wody przebiega w podobny sposób jak w przypadku metody na rureczniku *Tubifex tubifex* i może być stosowany zamiennie.

Do testu wybieramy kokony z jajami, które znajdują się w stadiach wczesnego rozwoju embrionalnego:

- bruzdkowanie – gastrulacja,
- zaawansowana embriogeneza (łącznie w stadium przed wykluciem)
- okres wykluwania (hatching) i wczesny okres po wykluciu.

**Wybór badanych zwierząt bezkręgowych dokonano w oparciu o ich powszechne występowanie w środowisku wodnym oraz o dane literaturowe dotyczące ich wrażliwości na zanieczyszczenia toksynami chemicznymi, podobne parametry bada się w przypadku testu na ślimaku wodnym *Physca acuta* Drap. [46, 106]**

***Tubifex tubifex*: rurecznik mułowy należy do pierścienic z grupy skąposzczetów, których środowiskiem życia są osady denne (muł) w zbiornikach o zwiększonej zawartości substancji organicznej. Formy dorosłe charakteryzują się dużą tolerancją na zwiększony wpływ zanieczyszczeń organicznych w zbiorniku wodnym, ale nie tolerują zawartości substancji toksycznych – pochodzenia chemicznego (przemysłowego) czy toksyn sinicowych [33]. Osobniki młode i zarodki kształtujące się jeszcze w osłonkach jajowych są o wiele bardziej wrażliwsze w stosunku do form dorosłych i mogą stanowić materiał do badania toksyczności subtelnej i ostrej. Zmiany teratogenne, jakie mają miejsce w procesie rozwoju embrionalnego jak i w trakcie wzrostu w okresie juwenilnym można łatwo zarejestrować i charakteryzować oraz zebrać statystycznie – gdyż są one adekwatne do stopnia skażenia środowiska wodnego określoną toksyną jak i występowania ekwiwalentów tej toksyny w osadach dennych przy zmniejszonej zawartości jej w toni wodnej. Na bazie testów pilotażowych zastosowano w/w bezkręgowca jako indykatora dla detergentów, w przypadku testów dla pozostałych związków wykazał się on dużą tolerancją i opornością na wpływ badanych substancji.**



### 5.3 Wybór substancji testowanych:

W badaniom poddano substancje chemiczne, których ekwiwalenty odnotowano w środowiskach wodnych, stanowią one realne zagrożenie dla ekosystemów wodnych. I należą do czynników zanieczyszczających wody powierzchniowe, czyniąc je niezdatne dla prawidłowego funkcjonowania ekosystemów wodnych jak również wyłączają jej zasoby z użyteczności dla człowieka i gospodarki.

#### **Badane substancje;**

##### **A. Substancje powierzchniowo czynne (SPC).**

- Brij 36
- Brij 58
- Brij 72
- Brij 76
- Brij 78

##### **B. Kwasy;**

- Kwas siarkowy (VI)  $H_2SO_4$
- Kwas azotowy (V)  $HNO_3$

##### **C. Wodorotlenki;**

- Amoniak  $NH_3$ aqua

##### **D. Chlorki:**

- Chlorek sodu  $NaCl$
- Chlorek potasu  $KCl$
- Chlorek wapnia  $Ca(Cl)_2$
- Chlorek magnezu  $Mg(Cl)_2$

**A. Substancje Powierzchniowo Czynne (SPC)** – grupa organicznych związków chemicznych wykazujących specyficzne właściwości. Mają szerokie zastosowanie w rolnictwie, przemyśle, gospodarstwie domowym oraz preparatyce farmaceutycznej – jako środki piorące, emulgujące, pieniące, zwilżające, flotujące, itd. Ze względu na sposób gromadzenia się przy powierzchni w roztworach wodnych obniżają napięcie powierzchniowe roztworu. Budowa cząsteczki SPC jest asymetryczna (amfifilowa = biegunowa) możemy wyszczególnić w niej dwie części łańcucha - jedna zawiera niepolarne związki organiczne i wykazuje charakter hydrofobowy, druga zawiera polarne grupy funkcyjne przejawiające właściwości hydrofilowe. Dzięki takiej budowie substancje są rozpuszczalne zarówno w związkach niepolarnych jak i polarnych.

Natomiast w rozworach wodnych, zawierających drobiny tłuszczów potrafią utrzymywać się w obu fazach częściowo w fazie organicznej a częściowo w wodnej [18, 23, 40].

Dlatego znalazły tak szeroki zastosowanie – są wykorzystywane głównie jako;

- środki piorące, czyszczące, emulgujące, pieniące, zwilżające w gospodarstwach domowych i pralniach (2/3) (około 40% globalnej produkcji):
  - Mydła (sodowe lub potasowe sole wyższych kwasów tłuszczowych , głównie stearynowego, palmitynowego i oleinowego).
  - Detergenty lub tenzydy (detergeo – oczyszczam) – syntetyczne SPS, wprowadzone jako substytut mydła [18, 40].
- Flotujące – stosowane w oczyszczalniach ścieków, w niektórych procesach technologiczno wytwórczych itd., ogólnie z zastosowaniem w przemyśle; np. w produkcji papieru, wytwórstwie farb, w przemyśle gumowym, szklarskim, skórzanym, metali nieżelaznych, włókienniczym, w budownictwie (1/3) itd. [18].

**Mydła:** pomimo szerokiego zastosowania jako środki czyszczące i piorące, mają szereg wad, ograniczających w pewnych warunkach ich zastosowanie.

- Sole słabych kwasów i wodorotlenku ulegają hydrolizie w wodzie, a wodorotlenek sodu może wykazywać negatywny wpływ na tkaniny.
- W twardej wodzie mają do 25% strat, przez co notuje się obniżone działanie czyszczące.
- W kwaśnych roztworach słabe kwasy organiczne ulegają wymianie i mogą się odkładać na tkaninach.
- W wodach słonych – morskich są ciężko rozpuszczalne, ich zastosowanie w takich roztworach jest bardzo słabe [18].

**Detergenty** – nie mają tych wad a zatem ich wykorzystanie jest dominujące, jako środki piorące (proszki, płyny, kostki), czyszczące – (płyny, proszki), oraz jako środki czyszczące do higieny osobistej. Są dobrymi związkami dezynfekującymi, niszczącymi wybiórczo pewne grupy bakterii i wirusów [41]. Bardzo duży obszar zastosowania mają obecnie w przemyśle wydobywczym ropy naftowej. Dzięki zdolnością obniżania napięcia powierzchniowego zwiększają stopień wydobyć kolejnych partii ropy naftowej w porównaniu z metodą klasyczną [42]. Do innych dziedzin, w których zastosowanie SPC jest znaczne należy również farmacja. Duże znaczenie w produkcji wszelkich maści, kremów a także leków mają szczególnie detergenty niepolarne. Polepszają zdolności rozsmarowywania, wchłaniania i nawilżania dla maści oraz kremów. W produkcji leków stosuje się je w procesie wytwarzania

specjalnych powłok w tabletkach. Powłoki te tworzone są przez specyficzne mikroemulsje będące nośnikiem dla hydrofobowych i hydrofilowych leków w kontakcie z barierą, którą stanowią błony komórkowe umożliwiają lepsze przenikanie składników leków do ustroju, tym samym polepszają efektywność leków bez modyfikacji jego właściwości leczniczych [59]. W rolnictwie surfaktanty wprowadzane są jako dodatki do pestycydów – gdyż dzięki swoim właściwościom gwarantują lepszą skuteczność działania biologicznego przy zmniejszonym ryzyku stosowania [42, 40]. Niektóre detergenty stosowane są jako emulgatory w celu zwiększenia stopnia biodegradacji ropopochodnych w glebach oraz wodach zanieczyszczonych tymi związkami (przy udziale mikroorganizmów) [95].

**Pod względem budowy możemy podzielić detergenty na klasy:**

1. Jonowe (dysocjujące), do których należą:

- a) anionowo czynne - część powierzchniowo czynną stanowi grupa anionowa cząsteczki;
- b) kationowe czynne - część powierzchniowo czynną stanowi grupa kationowa cząsteczki;
- c) amfoteryczne - w zależności od pH część powierzchniowo czynna może stanowić grupa kationowa lub anionowa [18].

2. Niejonowe (niedysocjujące).

- spany,
- tweeny,
- brije,
- myje,
- pluroniki (synperomki, poloxamery) – rokpole,
- rokanole,
- rokacety, [59].

Stopień zastosowania;

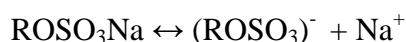
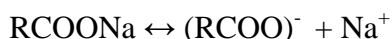
- Detergenty anionowe (60%)
- Detergenty kationowe
- Detergenty amfoteryczne } (10%)
- Detergenty niejonowe (30%)

Podkreślić należy, iż stosowane wersje handlowe detergentów przeznaczonych jako środki czyszczące zawierają ok. 30% – 40%, detergentów, natomiast 60% – 70% stanowią wypełniacze, są to głównie związki z grupy fosforanów, krzemianów, NTA, substancje

antyseptyczne, i inne. Ich zadaniem jest polepszenie efektu prania, wiązanie jonów dwuwartościowych, podniesienie pH, związki antyseptyczne mają działanie dezynfekcyjne, itp.

Dodatkowo handlowe detergenty zawierają substancje z grupy chlorowych wybielaczy, rozjaśniacze optyczne, środki zapachowe, zmiękczacze, enzymy, których zadaniem jest wywabianie plam organicznych z barwników, krwi, soków, moczu, itd. [18, 23, 40].

**Anionowe surfaktanty** – stanowią grupę, zawierającą mydła i detergenty. W budowie cząsteczek wyróżniamy kwasową grupę hydrofilową, która stanowi aktywną część cząsteczki.



Jako przykład najczęściej stosowanych SPC z tej grupy są (ABS – alkilobenzenosulfonian sodu) bardzo ciężko biodegradowalny w wodzie stanowił on w latach 1970 – 1996 duże obciążenie dla cieków wodnych, do których się do stawał, dlatego zaczęto stosować inny detergent (LAS – alkilobenzenosulfonian. Jest on według informacji technologicznych o wiele lepiej biodegradowalny, nie mniej jednak również stanowi obciążenie do wód powierzchniowych do których wraz ze ściekami się dostaje [18].

**Kationowe surfaktanty** – grupa hydrofilowa w tej grupie detergentów ma ładunek dodatni (jest kationem) i ma charakter zasadowy.

Tą grupę najczęściej stanowi czwartorzędowy jon amonowy, mający dobre powinowactwo do cząsteczek wody, zatem jest łatwo rozpuszczalny w wodzie. Ogólnie szacuje się je na ok. 5% wszystkich detergentów, mają zastosowanie jako środki antyseptyczne, w produkcji kosmetyków i medycynie. Niektóre stosuje się również jako zmiękczacze, jako środki antyelektrostatyczne, inhibitory korozji, flotujące. Są słabymi środkami czyszczącymi, głównie stanowią część wypełniaczy [18].

**Amfoteryczne surfaktanty** – bieguny hydrofilowe zawierają grupy funkcyjne anionowe i kationowe. W zależności od pH mają działają jak SPC anionowe lub kationowe. Zastosowanie głównie w kosmetologii [18, 23].

**Niejonowe surfaktanty** – charakter bieguna hydrofilowego przejmuje łańcuch polietoksylowy. Najczęściej stosowane jako środki piorące, czyszczące, emulgujące, itd. Są ciężko biodegradowalne więc stanowią duże obciążenie dla środowiska wodnego jeżeli się w nim znajdują (np. wraz ze ściekami – gospodarczo bytowymi).

Należy podkreślić, iż wciąż istnieje zapotrzebowanie na SPC, za czym przemawia zwiększająca się ich produkcja oraz zużycie. Społeczeństwo zarazem oczekuje

zminimalizowania oddziaływań ubocznych tych substancji na środowisko przyrodnicze, oraz dążenia do tego żeby procesy z wykorzystaniem surfaktantów były przyjazne dla środowiska człowieka i jego zdrowia [18, 59].

**Surfaktanty w środowisku wodnym** do lat 80-tych stanowiły duże obciążenie dla wód powierzchniowych. Bardzo często widocznym efektem ich obecności były piany, nie ustępujące, wyglądające jak szare kozuchy na powierzchni. Zawartość detergentów w ściekach przemysłowych do kilku  $\text{g/dm}^3$  i komunalnych dochodziła do  $20 \text{ mg/dm}^3$ , średnia zawartość w wodach powierzchniowych dochodziła do ok.  $0,1 \text{ mg/dm}^3$  [18, 55, 40].

W ściekach miejskich notuje się zawartość od kilku do kilkunastu  $\text{m/dm}^3$  detergentów, w ściekach wielkich miast o dużym natężeniu przemysłu ta koncentracja SPC może dochodzić do kilkudziesięciu  $\text{mg/dm}^3$ . W zrzutach oczyszczonych do rzek z oczyszczalni miejskich stężenie surfaktantów waha się w granicach  $1 - 6 \text{ mg/dm}^3$  [36].

Poważne zagrożenie dla wód powierzchniowych mogą stanowić wysypiska odpadów komunalnych z których odcieki mogą zanieczyszczać wody rzek. W rzekach zlokalizowanych w pobliżu wysypisk stężenie detergentów sięgało  $7,7 \text{ m/dm}^3$ , [18, 24, 36] a wodach podziemnych przy tych samych obiektach koncentracja SPC wynosiła  $0,25 \text{ m/dm}^3$  [77]. Infiltrujące odcieki zawierające środki powierzchniowo czynne mogą być groźne dla zdrowia ludzi pijących wodę ze studni, do których te substancje się dostają [20, 36].

**Wpływ surfaktantów na środowisko wodne jest negatywny**, o czym świadczą następujące fakty:

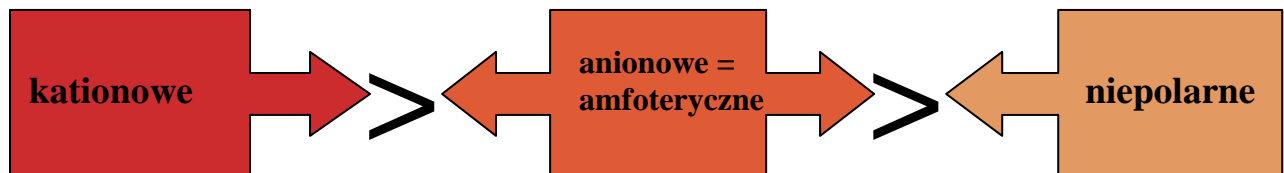
- Właściwości pieniące (wytwarzanie piany) – powoduje ograniczenie intensywności natleniania wód rzecznych, doprowadza do znacznego deficytu tlenowego w wodach. Obniża to możliwości rozwoju dla organizmów wodnych, zaburza proces samooczyszczania się wód na drodze biodegradacji (tlenowy proces rozkładu – w obecności bakterii tlenowych) [12, 18, 36].
- Wywołują efekt emulgujący dla występujących związków niepolarnych w wodach powierzchniowych, zwiększając czas utrzymywania się i rozpuszczalność dla olejów, pestycydów, wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) i innych związków organicznych (często toksycznych) w wodach (w formie bardziej rozproszonej emulsji). Zwiększają stopień akumulacji tych związków w organizmach wodnych [36, 53].

- Duży ładunek fosforanów ma wpływ na zwiększenie natężenia eutrofizacji zbiorników wodnych (fosfor należy do limitujących pierwiastków biogennych). Zaburzają przez to równowagę ekologiczną [12].
- Inne związki występujące w wypełniaczach SPC, np. NTA, ma wpływ teratogeny na rozwijające się embriony ryb, płazów, jak również bezkręgowców wodnych.
- Negatywne oddziaływania na organizmy wodne były notowane już wcześniej, dotyczyły one głównie zahamowania reprodukcji i rozwoju (np. narybku), jak również innych organizmów gł. bezkręgowców, wchodzących w skład biocenoz stanowiących ekosystemy wodne [104].
- Obecnie stosowane detergenty należą do tzw. surfaktantów miękkich – cechujących się szybką degradacją. Pomimo doświadczalnie wyznaczonego stopnia biodegradacji, oznaczenia niektórych form detergentów w wodach rzek Odry, Warty czy Oki wykazały podwyższony w stosunku do oczekiwanego, stopień ich stężenia w wodach [konsultacja naukowa z prof. dr hab. inż. Zenonem Łukaszewskim].
- Degradacja alkilofenoli polioksyetylenowych (SPC niejonowe) często prowadzi do zwiększenia alkilofenoli (nonylofenoli), zaburzających gospodarkę hormonalną u ryb (a także u człowieka), co wpływa na obniżenie stopnia reprodukcji, nietypowe zachowania i zwiększenie feminizacji w populacji [45, 107].
- Toksyczny efekt działania surfaktantów na ryby wywołany jest ich właściwościami adsorpcyjnymi. Nie są one wchłaniane przez przewód pokarmowy, natomiast ulegają adsorpcji na powierzchni blaszek skrzelowych. Tworzący się na skrzelach kompleks surfaktanta z białkami powoduje zaburzenia w procesie oddychania ryb, doprowadzając do deficytu tlenowego w organizmie i skrajnego wycieńczenia oraz ostatecznie śmierci osobników narażonych na działanie tych związków [53].
- Badania na ssakach (szczurach) wykazały uszkodzenia ścian naczyń krwionośnych, oraz komórek przez zniszczenie błon komórkowych. W błonach komórkowych główny kompleks budujący błony stanowi dwuwarstwa lipidowa. Częsteczki surfaktantów wbudowały się w frakcje lipidową zaburzając właściwości błon, m. in. transport różnych składników przez błony, przekaz informacji związanych z białkami receptorowymi w błonach, receptorami hormonalnymi itp. Przy większych stężeniach SPC powodują wypłukiwanie lipidów z błon niszcząc barierę którą stanowi błona cytoplazmatyczna, a tym samym niszcząc komórki [53].
- Niszczenie błon komórkowych (w procesie solubilizacji) [38] prowadzi do zmian chorobotwórczych, zahamowania rozwoju zwierząt eksponowanych na ciągłe dawki

surfaktantów. Ich organizmy wydatkują energię na obronę przed skutkami działania tych substancji, ostatecznie nie wystarcza już energii na optymalny rozwój i reprodukcję a tym samym zagrożone jest zapewnienie przetrwania gatunków szczególnie wrażliwych [38, 44].

- Zostały przeprowadzone obserwacje wpływu detergentu na niektóre rośliny wodne *Elodea canadensis* Michx. i *Elodea argentinensis* wyniki obserwacji jednoznacznie wskazują na szybkie odbarwienie i rozpad rośliny do formy zawiesiny tkankowo – komórkowej, okres rozpadu to ok. 4 – 6 dni. Natomiast w przypadku testu na *Lemna minor* – w przeciągu 7 dni, już po okresie 3 dni pojawiają się nekrozy, po 7 dniach testu rośliny eksponowane zamierają częściowo lub całkowicie odbarwione.
- Ze względu na zdolności bioakumulacji w tkankach narządów wewnętrznych, oraz zdolności do zmian struktury białek mogą u człowieka i zwierząt wywoływać reakcje alergiczne i zmiany skórne (testy na królikach), oraz zmiany histopatologiczne w strukturze tkanek, i organów wewnętrznych [36].
- Drobnoustroje m. in bakterie reagują na obniżenie napięcia powierzchniowego, poprzez zmianę kształtu komórki. Błony komórkowe ulegają destrukcji, procesy życiowe zostają zahamowane, ostatecznie komórki obumierają [41].

**Stopień toksyczności pomiędzy poszczególnymi grupami detergentów:**



*Szereg niekorzystnych efektów jakie wywołują SPC na ekosystemy wodne zalicza je do substancji szczególnie uciążliwych, dla środowiska i wymagających ciągłej kontroli, jak również wyznaczenia efektów toksycznych dla organizmów wodnych [18].*

**W badaniach wykorzystano detergenty:**

**Tenzydy niejonowe z serii Brij:** etery glikoli polioksyetylenowanych i alkoholi tłuszczowych: Wytwarzane na bazie kondensacji alkoholi lipidowych: laurylowego, cetylowego, stearynowego i olejowego z tlenkiem etylenu.

Mają zastosowanie jako emulgatory emulsji typu o/w i jako stabilizatory dla emulsji typu o/w i w/o. W farmacji stanowią dodatki do maści – zwiększając rozsmarowywalność

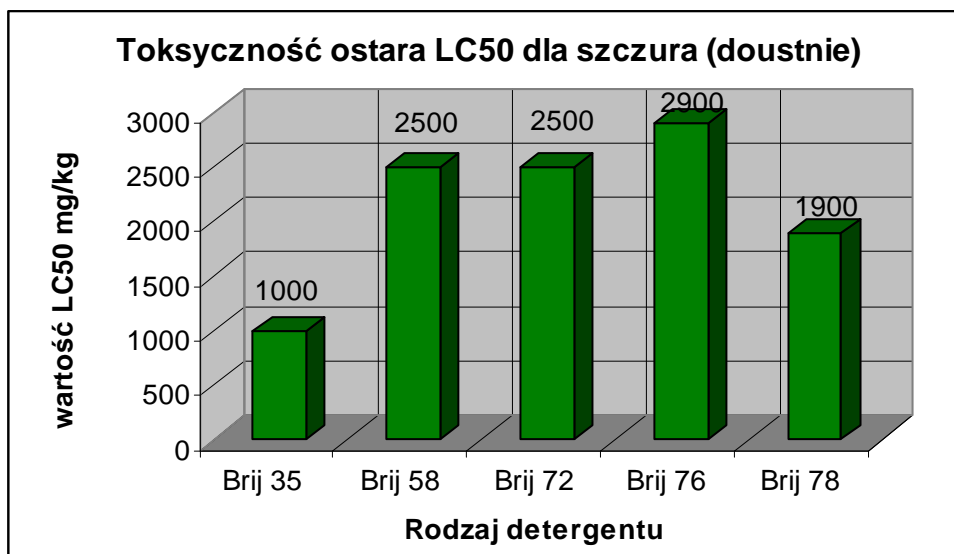
oraz wchłanianie się. Dodatkowo są stosowane jako pośredniki rozpuszczalności np. dla olejków eterycznych i w substancjach żelujących. Są składnikami detergentów przemysłowych z serii środków czyszczących i notuje się ich składniki w ściekach bytowo komunalnych oraz wodach powierzchniowych [59].

Brij 35 – jest składnikiem w produkcji stałych doustnych postaci leku. Np. znacznie przyspiesza proces rozpuszczania się oksazepamu w makroglu 6000 [59].

Toksyczność tych detergentów dla organizmów wyższych jest wyznaczona głównie na szczurach i uznana przez technologów za stosunkowo niską, **brak natomiast szczegółowych badań ekotoksykologicznych, oraz informacji o możliwych efektach wpływu na składniki ekosystemów wodnych [59].**

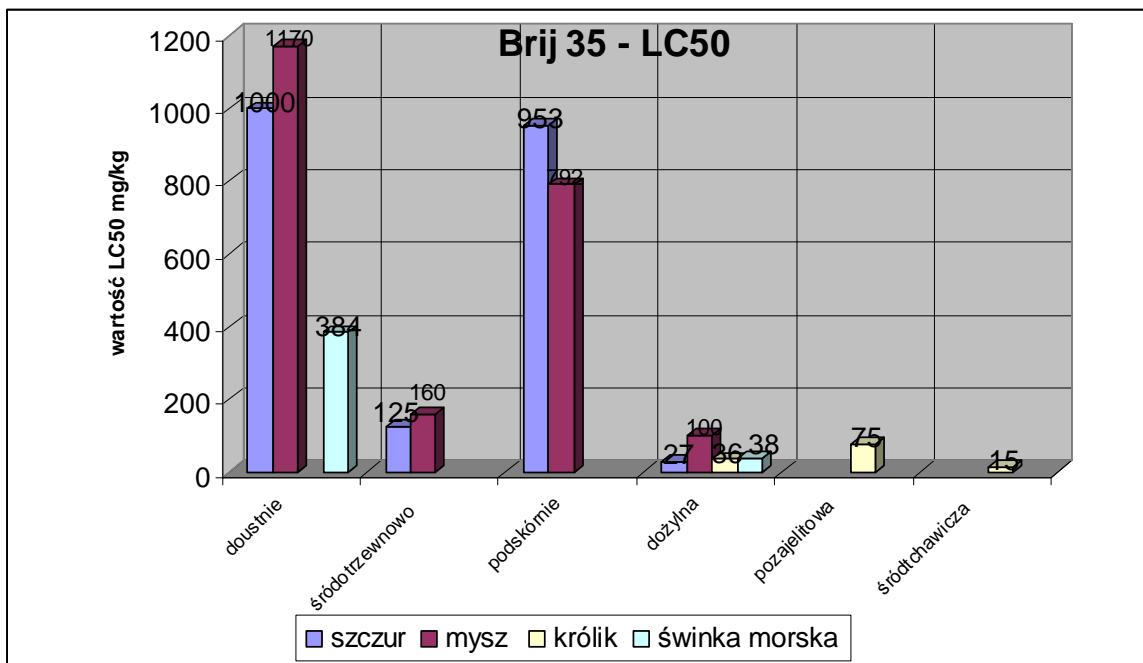
#### Przykład wyników testów toksyczności ostrej dla ssaków:

- Brij 35 – LC50 – Dla szczura: doustnie – 1000 mg/kg, śródtrzewnowo 125 mg/kg, podskórnice – 953 mg/kg, dożylna – 27 mg/kg. Dla myszy: doustnie – 1170 mg/kg, śródtrzewnowo 160 mg/kg, podskórnice – 792 mg/kg, dożylna – 100 mg/kg. Dla królika: dożylna – 36 mg/kg, pozajelitowa – > 75 mg/kg, śródtrzewnowa > 15 mg/kg. Dla świnki morskiej: doustnie – 384 mg/kg, dożylna – 38 mg/kg.
- Brij 58 – LC50 – 2602 mg/kg dla myszy i 2500 mg/kg dla szczura.
- Brij 72 – LC50 – 2500 mg/kg dla szczura.
- Brij 76 – LC 50 – 2900 mg/kg dla szczura.
- Brij 78 – LC50 – 1900 mg/kg dla szczurów. (karta charakterystyk substancji)



Ryc. 4: wykres wartości LC50 w badaniach na szczurze – test toksyczności ostrej dla poszczególnych Brij.





Ryc. 5. Wykres wartości LC50 w badaniach na ssakach – test toksyczności ostrej dla Brij35 w relacji do różnych dróg wprowadzania toksyny do ciała badanych ssaków.

[37]

*Dopuszczalne normy dla zawartości detergentów w wodach powierzchniowych [Tab. 2, 3].*

### B. Silne kwasy:

Kwas siarkowy (VI) -  $H_2SO_4$ , oraz Kwas azotowy (V)  $HNO_3$  są jednymi z najszerszej stosowanych substancji. Najszersze z zastosowanie mają w przemyśle i przetwórstwie chemicznym. Należą do mocnych kwasów a ich reszty kwasowe są stabilne w roztworach wodnych, charakteryzują się wysoką dysocjacją i dużą reaktywnością.

**Kwas siarkowy** – należy do jednych z najważniejszych produktów stosowanym w przemyśle chemicznym i innych branżach, miesza się z wodą we wszystkich stosunkach. Stężony powoduje zwęglenie materii organicznej szczególnie białek. Należy również do silnych kwasów.

Ma zastosowanie przy produkcji innych kwasów, w produkcji barwników, leków, sztucznych włókien, materiałów wybuchowych, nawozów sztucznych. Wykorzystywany do oczyszczania olejów, nafty, ropy, przy osuszaniu gazów, używany jako odczynnik w laboratoriach chemicznych [7, 13, 69, 92].

**Kwas azotowy** – także jest silnym kwasem, reaguje z kationami metali, miesza się z wodą nieograniczenie. Przy kontakcie stężonego kwasu ze skórą dochodzi do silnych trudno gojących się poparzeń, ma właściwości żrące.

Stosuje się go przy produkcji; związków nitro, leków, nawozów sztucznych, tworzyw sztucznych, barwników, lakierów, przy oczyszczaniu powierzchni metali. W laboratoriach chemicznych stosowany jako odczynnik do wielu reakcji, m. in reakcji ksantoproteinowej (przy oznaczaniu białka) itd. [7, 13, 69, 92].

### **Siarczany w wodach powierzchniowych:**

Naturalne źródła siarczanów w skorupie ziemskiej to pokłady gipsu, anhydrytu, epsomitu, mirabilitu, pirytu ... [12].

- Dostają się one do wód powierzchniowym na drodze rozpuszczania anhydrytów lub gipsów jak również innych ewaporatów oraz z gleb (ze źródeł naturalnych).
- Z opadów atmosferycznych (kwaśne deszcze), wraz z ściekami (przemysłowymi) lub z utleniania ścieków organicznych w drodze przekształceń biochemicznych. Z rozkładu martwej materii organicznej [109].
- W przypadku ścieków – zawartość w ściekach miejskich (najmniej), w ściekach po produkcji nawozów sztucznych oraz ściekach z przemysłu koksowniczego (największe obciążenie).
- Duży udział w odprowadzaniu kwaśnych wód mają odpływy kopalniane [94].
- Spływy z gruntów ornych obficie nawożonych również niosą ze sobą duży ładunek dla anionów siarczanowych [94].

W wodach występują jako swobodne jony  $\text{SO}_4^{2-}$  i w tej formie są bardzo stabilne. Mogą również tworzyć kompleksy z  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ .

W warunkach beztlenowych na drodze biochemicznej mogą podlegać redukcji do siarkowodoru.

[3, 5, 18, 22].

**Działanie na ekosystemy wodne:** w formie wolnych kationów  $\text{SO}_4^{2-}$  obniżają pH, wykazują toksyczny efekt na organizmy wodne, głównie ryby jak również zwierzęta z grupy bezkręgowców. Stopień toksyczności ściśle jest uwarunkowany rodzajem kationu w związku chemicznym (np. mała toksyczność dla  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  – 12000 mg/dm<sup>3</sup> i wysoka dla  $\text{ZnSO}_4$  300 mg/dm<sup>3</sup>, w stosunku do ryb łososiowatych) [12, 18].

Azotany  $\text{NO}_3^{2-}$  w zbiorkach wodnych - aniony kwasu azotowego (V) – są bardzo częstym rodzajem zanieczyszczeń wód powierzchniowych. Dostają się do wód wraz z ściekami miejskimi i przemysłowymi, oraz ze spływami powierzchniowymi i opadami atmosferycznymi [94].

W przypadku opadów atmosferycznych zawierających azotany wyróżniamy *cztery źródła ich pochodzenia*,

- Azot występujące w atmosferze w trakcie wyładowań powstaje tlenek  $N_2O_5$ , który w reakcji z wodą tworzy kwas azotowy (V).
- Tlenki azotów ( $NO_3^-$ ), występujące w pyłach zawieszonych, pochodzących z emisji w zakładach produkcji azotowej – w trakcie opadu wchodzi w reakcję z wodą i dostają się do cieków wodnych.
- Są również wydzielane do atmosfery w procesie spalania, w ciepłarniach, kotłowniach w trakcie spalania węgla, biomasy.
- Z produkcji i zastosowania nawozów sztucznych oraz ze ścieków przemysłowych, w technologiach wymagających zastosowania kwasu azotowego lub jego soli.

$NO_x$  są jednym z czynników stanowiącym przyczynę kwaśnych deszczów.

Największe zagrożenie niosą spływy powierzchniowe z pól uprawnych, bardzo często obficie nawożone pola zawierają dużo form nieorganicznych azotu [109].

Azot wraz z fosforem należą do makroelementów budujących struktury biochemiczne żywych organizmów, i są zarazem pierwiastkami limitującymi. Dlatego ich główne zastosowanie jest jako nawozy sztuczne stanowiące bazę makroelementów dla wzrostu roślin. Nadmiar nawozów wraz opadami i spływem powierzchniowym trafia do wód rzecznych i zbiorników wodnych i jest poważnym obciążeniem dla środowiska wodnego. Wpływa na zachwianie równowagi ekologicznej takich zbiorników w wyniku zmiany trofii wód. Dodatkowym źródłem azotanów w wodach jest rozkład martwej materii organicznej (szczególnie zasobne w azot są białka) [5, 12, 18].

*Zagrożenie jakie niesie ze sobą występowanie azotanów w środowisku wodnym ma różne formy.*

- Duży ładunek azotanów – może istotnie wpływać na obniżenie pH – co w rezultacie jest bardzo niekorzystnym efektem, gdyż nie pozostaje bez znaczenia na dynamikę rozwoju populacji, oraz reprodukcję żywych składników ekosystemów wodnych. Wiele gatunków ryb przy obniżonych wartościach pH przestaje się

rozmnażać, lub składana ikra (w przypadku bezkręgowców kokony z jajami) nie jest w stanie przetrwać w takich warunkach. Rozwój osobniczy również jest zaburzony. Rozwój juvenilny stanowi najbardziej krytyczne stadium i na tym etapie ma miejsce największa śmiertelność w trakcie działania niekorzystnych warunków m. in. takich jak obniżenie pH itp. [12, 18, 102].

- W przypadku niskiej koncentracji jonów azotanów, pH nie ulega zmianom, natomiast wpływają one na wzmożenie eutrofizacji wód. Rośliny wodne podobnie jak lądowe do wzrostu – wymagają dostarczenia mineralnych form azotu. Tym samym jony azotanowe wraz z innymi formami azotu i z fosforanami powodują zwiększenie trofii wód. Przy wysokiej trofii dochodzi do procesu zwanego eutrofizacją. Jej następstwa w okresie długofalowym są bardzo negatywne dla zbiorników wodnych. Powodują wypływanie, oraz wtórną detoksykację jezior, stawów, zbiorników zaporowych itp. [5, 12, 18, 22].
- Obecność azotanów stanowi bardzo poważny problem dla wód śródlądowych i podziemnych. Podwyższone zawartości w wodzie pitnej mają ujemny wpływ na zdrowie konsumentów wody. W przypadku niemowląt, w ich przewodach pokarmowych często dochodzi do przekształcenia azotanów w azotyny, co może powodować zmianę formy hemoglobiny w methemoglobinę. Jest to przyczyną choroby błękitnych dzieci – jej skutki to niedotlenienie organizmu, osłabienie, biegunka [107].
- W wyniku przekształceń biochemicznych  $\text{NO}_3^{2-}$  przy małym udziale tlenu mogą powstawać nitrozoaminy – silnie rakotwórcze związki.

C. **Amoniak** należy do silnych zasad. W wysokim stężeniu jest bardzo toksyczny, a jego efekty działania na organizmy żywe pojawiają się w krótkim czasie. Zastosowanie

amoniaku jest szerokie. Stosuje się go w analizach laboratoryjnych, w wielu procesach technologicznych w przemyśle, a w małym stężeniu stosowany jako sól trzeźwiąca.

***Źródła pochodzenia jonów amonowych w wodzie:***

- Z produkcji rolnej, z nawozów sztucznych wraz ze spływami powierzchniowych.
- Ze ściekami komunalnymi i przemysłowymi.
- Z beztlenowego rozkładu martwej materii organicznej [7, 13, 68, 92, 94].

***Jony amonowe i azotany (V) oraz (III) są indykatorami stopnia zanieczyszczenia zasobów wód powierzchniowych [12].***

- Obecność jonów amonowych w wodach bez występowania azotanów (III), jest wskaźnikiem świeżych zanieczyszczeń dopływających do zbiornika.
- Przy równoczesnej obecności jonów amonowych i azotanów (III) w wodach – może to świadczyć o zanieczyszczeniu utrzymującym się od jakiego czasu.
- Przy występowaniu azotanów (V) bez wykrycia jonów amonowych w środowisku wodnych, jest to oznaka długo utrzymującego się stanu zanieczyszczeń w zbiorniku wodnym.

Amoniak jest silnie toksyczny dla organizmów wodnych, przy zwiększonych koncentracjach hamuje rozwój oraz rozmnażanie różnych gatunków. Wykazuje silnie drażniące działanie na narządy wewnętrzne. Przy niskich koncentracjach jonów amonowych – zwiększa trofię wód i jest źródłem azotu dla glonów, dlatego może przyczynić się do wzmożenia procesu eutrofizacji [5, 12, 18, 22].

D. **Chlorki:** stanowią jedne z szeroko rozpowszechnionych w przyrodzie związków, chlorki sodu i potasu występują w bardzo bogatych pokładach, w warstwach skalnych, w dnie oceanów i mórz. Charakteryzują się dużą rozpuszczalnością, a tym samym ich wmywanie ze pokładów skalnych jest wysokie.

Chlorek sodu (nazwa zwyczajowa „sól kuchenna”) jest bardzo powszechnym związkiem. Ma zastosowanie w produkcji i konserwacji żywności, np. w przetwórstwie mięsnym itp. Jest dodatkiem wpływającym na walory smakowe potraw. W przemyśle jest stosowany na szeroką

skalę przy produkcji chloru, podchlorynu i sodu. Proces konserwacji skór – w pierwszym etapie przygotowującym je do procesów garbarskich wymaga dużego nakładu soli. Chlorki sodu, wapnia i magnezu w dużych ilościach są używane do usuwania śniegu, lodu z dróg i obiektów budowlanych. W medycynie zastosowanie ma 0,9% roztwór chlorku sodu – płyn fizjologiczny podawany wraz z kroplówką, przeciwdziała odwodnieniu i oczyszcza organizm człowieka lub zwierząt w przypadku placówek weterynaryjnych [7, 13, 57, 69, 92]

**Chlorki w wodach powierzchniowych:** największa zawartość chlorków jest oczywiście w słonych wodach morskich. Słony smak wody zależy od rodzaju soli występujących w wodzie.

Chlorki mogą przenikać do wód powierzchniowych z:

- gleby
- pokładów naturalnych soli (z warstw skalnych)
- ze ściekami przemysłowymi i komunalnymi
- z odpadów pochodzenia zwierzęcego
- z wód zrzutowych z kopalni węgla i soli kamiennej.

[12, 18, 94]

Aż 97,24% zasobów wód na kuli ziemskiej jest obciążona chlorkami w bardzo wysokim stężeniu (wody słone). Na drodze ewolucji ukształtowały się ekosystemy słonowodne (morskie), których organizmy żywe przystosowały się do takiego środowiska.

Wody śródlądowe (za wyjątkiem mórz śródlądowych) należą do kategorii słodkowodnych, a znaczne zwiększenie koncentracji chlorków niesie za sobą szereg niepożądanych skutków dla ekosystemów słodkowodnych. [54, 94]

Wysoka koncentracja chlorków w wodach słodkich wykazuje efekt toksyczny w stosunku do wielu gatunków organizmów wodnych;

[5, 12, 18, 22].

- Przy dużych stężeniach chlorku sodu w wodach słodkich, następuje groźna dla organizmów słodkowodnych zmiana charakteru roztworu z hipo do hiperosmotycznego. Powoduje ona odwodnienie komórek (plazmoliza) [41] oraz organizmów różnych gatunków zwierząt wodnych, a szczególnie wrażliwych młodocianych form rozwojowych oraz embrionów rozwijających się w jajach.

- Następują zaburzenia w przepływie kationów niezbędne dla prawidłowego przeprowadzenia procesów fizjologicznych. Dotyczy to w szczególności odpowiednich proporcji  $\text{Na}^+$  do  $\text{K}^+$ . Proporcje te warunkują prawidłowy przebieg procesów neurofizjologicznych (polaryzacja błony komórek nerwowych i przewodzenie impulsów nerwowych). Stąd też nadmiar  $\text{Na}^+$  w wodach słodkich wywołuje też zaburzenia neurofizjologiczne, objawiające się nieprawidłowymi zmianami ruchu zwierząt. Ostateczny efekt to unieruchomienie i śmierć tych organizmów [9].
- Zasolenie słodkowodnych zbiorników wiąże się z wymarciem biocenoz wodnych, przetrwać mogą tylko najbardziej tolerancyjne organizmy, w ostateczności dochodzi do zmniejszenia bioróżnorodności i całkowitego zachwiania równowagi ekologicznej, w wyniku toksycznego działania nadmiernej koncentracji chlorków [94].
- Odpowiednie proporcje  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$ , warunkują też prawidłowy przebieg innych procesów fizjologicznych m. in. ekspresji informacji genetycznej. W przypadku organizmów wyższych może dojść do uruchomienia nieplanowanych syntezy materiału genetycznego i zaburzeń procesu apoptozy oraz aktywacji onkogenów [9, 38]
- Przy nadmiarze  $\text{Na}^+$  dochodzi do upośledzenia funkcjonowania pompy  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$ , co zaburza homeostazę komórkową, oraz prawidłowy metabolizm komórki np. obniżone uwalnianie energii w wyniku zmiany funkcjonowania ATP-azy [38, 101].
- Przez zasolenia w wielu zbiornikach wodnych nastąpiło wycofanie się populacji płazów, ryb oraz wielu bezkręgowców słodkowodnych [94].
- Ma również miejsce proces wyłączenia wielkich zasobów wód z użyteczności dla człowieka. Wody zasolone nie nadają się do spożycia jak również nie można nimi podlewać plantacji i poić zwierząt hodowlanych [54].

- W przemyśle wody takie stanowią zagrożenie dla urządzeń pracujących w wodach, pomp, konstrukcji metalowych itp. Wysokie stężenie jonów chlorkowych zwiększa korozyjność wody [18, 54, 94].
- Niezwykle ciężkim, długotrwałym i wymagającym dużych nakładów finansowych jest proces odsalania, rewitalizacji zasobów naturalnych w zdegradowanych na wskutek zasolenia zbiornikach wodnych.

Kontrola jakości wód pod kątem zasolenia w ostatnich latach jest bardziej wzmożona. Zaostrzeniu uległy normy dla wód zasolonych. Zrzuty wód zasolonych również podlegają surowej kontroli jakości. Podniesiono kary dla jednostek generujących zwiększenie zasolenia.

**5.4 Wykaz maksymalnych dopuszczalnych wartości dla wybranych wskaźników jakości wód:**

Jony	JEDNOSTKI	KLASY CZYSTOŚCI		
		I	II	III
Azotany (V)	mg/dm <sup>3</sup>	1,5	5,01 – 7,0	7,01 – 15,0
Siarczany	mg/dm <sup>3</sup>	150	200	250
Amonowe	mg/dm <sup>3</sup>	1,0	3,0	6,0
pH wody	pH	6,5-8,06	6,0-9,0	6,0-9,0
SPC anionowe	mg/dm <sup>3</sup>	0,2	0,5	1,0
SPC niejonowe	mg/dm <sup>3</sup>	0,5	1,0	2,0
Chlorki	mg/dm <sup>3</sup>	250	300	400

Tab: 2. dopuszczalne wartości wybranych wskaźników dla poszczególnych klas czystości wód powierzchniowych w starej 3 stopniowej klasyfikacji czystości wód powierzchniowych [86].



Lp.	Wskaźniki jakości wody	Jednostki Mg/dm <sup>3</sup>	Wartości graniczne wskaźników jakości wody* <sup>1</sup>					
			A1		A2		A3	
			Zalecane	dopuszczalne	zalecane	dopuszczalne	zalecane	dopuszczalne
1	pH		6,5 - 8,5	6,5 - 8,5	5,5 - 9	5,5 - 9,0	5,5 - 9	5,5 - 9,0
2	Azotany	Mg/dm <sup>3</sup>	25	50* <sup>2)</sup>		50* <sup>2)</sup>		50* <sup>2)</sup>
3	Siarczany	Mg/dm <sup>3</sup>	150	250*	150	250*	150	250*
4	Chlorki	Mg/dm <sup>3</sup>	200	250	200	250	200	250
5	SPC anionowe	Mg/dm <sup>3</sup>	0,2	0,2	0,2	0,2	0,5	0,5
6	SPC niejonowe	Mg/dm <sup>3</sup>		0,5		1		2
7	Amoniak	Mg/dm <sup>3</sup>	0,05	0,5	1,5	1,5*	2	2* <sup>2)</sup>

Tab. 3. Wymagania, jakim powinny odpowiadać kategorie jakości wody pitnej A1 – A3, dla wybranych wskaźników (pięciostopniowa skala) (na podstawie; Załącznika do rozporządzenia Ministra Środowiska z dnia 27 listopada 2002 r. (poz.1728)

Legenda:

1) Wartości graniczne wskaźników jakości wody oznaczają:

- najniższą wartość w przypadku wskaźnika o Lp. 35 (nasylenie tlenem),
- najniższą i najwyższą wartość w przypadku wskaźnika o Lp. 1 (odczyn),
- najwyższe wartości w pozostałych przypadkach.

2) Odstępstwa dopuszczalne z powodu wyjątkowych warunków, określonych w § 4 ust. 2 rozporządzenia [86].

### 5.5 Wpływ zanieczyszczeń bytowo – komunalnych na wody rzeki Trzemeśnianki: (eutrofizacja)



Ryc. 6. Proces eutrofizacji (1 faza zakwit 29.06.2007r), na zdjęciu widoczna jest również utrzymująca się piana, która świadczy o obecności detergentów w wodach rzeki (potok Trzemeśnianka), fot. R. Mazur.



Do prezentowanej na zdjęciu rzeki w wielu miejscach wpływają nie oczyszczone ścieki bytowo gospodarcze. Miejscowości, przez które przepływa rzeka nie posiadają w pełni funkcjonalnej sieci kanalizacji i kolektorów odprowadzających ścieki. Duże ilości ścieków, bytowo gospodarczych, poprodukcyjnych (z drobnych zakładów przemysłowych) bezpośrednio zrzuca ścieki do wód rzeki. Od wielu lat zachodzą procesy eutrofizacji w tym cieku. Trzemeśnianka jest dopływem Raby i wpływa bezpośrednio cofką w Osieczanach do zbiornika zapory Dobczyckiej. Zbiornik ten jest rezerwuarem wody pitnej dla Krakowa (ok. 55% wody pitnej w Krakowie pochodzi z tego zbiornika zaporowego) [98].

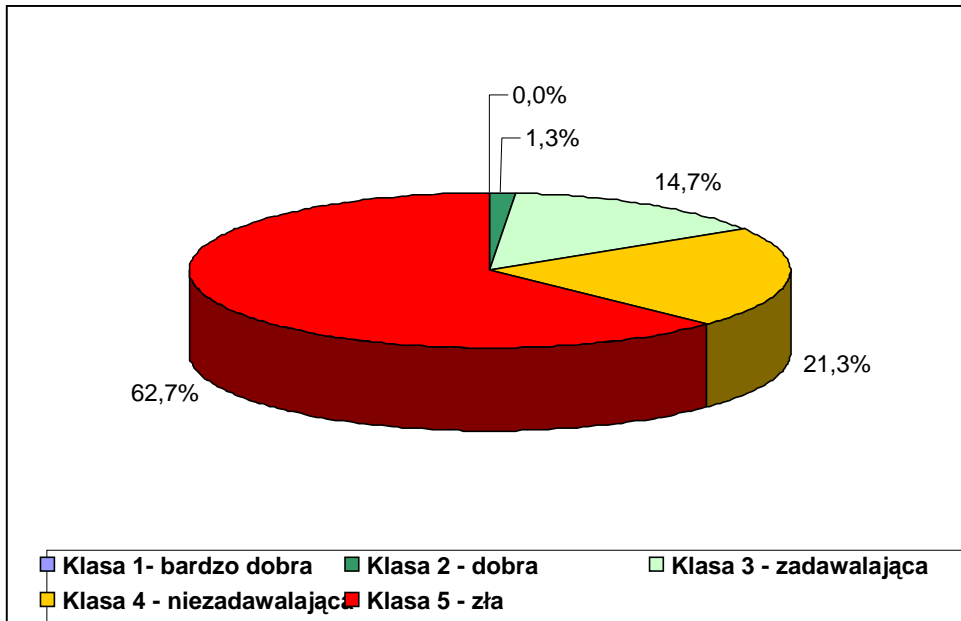


**Ryc. 7. Zarastanie koryta rzeczno Trzemeśnianki – widoczny jest także proces eutrofizacji, fot. R. Mazur.**

Proces degradacji i zarastania rzeki jest daleko zaawansowany, wody potoku są bardzo żyzne, proces eutrofizacji zachodzi tu dwu fazowo w okresie wiosennym i letnim. Wody Trzemeśnianki dostarczają duży ładunek związków biogenych do zbiornika zaporowego, w którym od wielu lat również proces eutrofizacji bardzo jest bardzo wzmożony i wpływa na pogorszenie parametrów wód. Kontrola w stacji wodociągowej nie jest wystarczająca, brak jest ciągłego monitoringu potoków dopływowych [98].

5.6 Jakość wód powierzchniowych w województwie małopolskim z raportu WIOŚ z 2006

r.



Ryc. 8. Jakość wód powierzchniowych w województwie małopolskim w 2006 roku [99]

Lp.	Wskaźniki jakości wody	Jednostka	Wartości graniczne w klasach I – V				
			I	II	III	IV	V
1	2	3	4	5	6	7	8
Wybrane wskaźniki							
1	pH		6,5-8,5	6,0-8,5	6,0-9,0	5,5-9,0	<5,5 lub >9,0
2	Azotany	mg NO <sub>3</sub> /l	5	15	25	50	>50
3	Siarczany	mg SO <sub>4</sub> /l	100	150	250	300	>300
4	Chlorki	mg Cl/l	100	200	300	400	>400
5	SPC anionowe	mg/l	0,1	0,2	0,5	1,0	>1,0
6	Amoniak	mg NH <sub>4</sub> /l	0,5	1	2	4	>4

Tab. 4. Wartości graniczne wybranych wskaźników jakości wód powierzchniowych w klasach wód I -V [84, 85].

Raport przygotowany na podstawie pomiarów jakości wód powierzchniowych; oceniono min według pięciu klas jakości (dla 75 punktów monitoringu diagnostycznego zlokalizowanych na 38 rzekach i 1 zbiorniku zaporowym (Dobczyckim) oraz pozostałych tj. 12 niediagnostycznych p.p.k.) [99].

## 5.7 Plan hodowli organizmów wskaźnikowych do badań testowych:

Plan badań zakładał dwa etapy.

1. Etap – badania pilotażowe:
2. Etap – badania właściwe w oparciu o wyznaczone zakresy stężeń i wybrane organizmy wskaźnikowe.

## 5.8 Organizmy wyselekcjonowane do badań:

### 1. *Daphnia magna* Straus. (Rozwielitka)

#### Systematyka gatunku;

Domena: *Eukaryota*

Królestwo: Zwierzęta (*Animalia*)

Podkrólestwo: Wielokomórkowce (*Metazoa*)

**Bezkręgowce:** (*Invertebrata*)

**Trójwarstwowe:** (*Triblastica*)

**Wtórnojamowce:** (*Celomata*)

**Typ:** *Arthropoda* (stawonogi)

Podtyp: *Crustacea* (skorupiaki)

Dział: *Entomostraca* (skorupiaki niższe)

Grom: *Branchiopoda* (skrzelonogi)

Podgrom: *Branchiata*

**Rząd:** *Cladocera* (wioślarki)

Podrząd: *Eucladocera* (wioślarki właściwe)

#### **Gatunek: *Daphnia magna* Straus. (Rozwielitka) [33]**

Opis: ciało dwubocznie spłaszczone, okryte karapaksem, nie obejmującym głowy. Pancierz liniejący – dwubocznie zagięty po stronie brzusznej (nie dwuklapowy), przezroczysty. Po stronie tylnej terminalnie usytuowany kolec. Dwie pary odnóży głowowych, z czego druga para stanowi narząd ruchu, oraz pięć par odnóży tułowiowych – filtrujących oraz stanowiących narządy oddechow. Na głowie ruchliwe oko na słupku, pochodzące z pary oczu złożonych oraz szczątkowe oko naupliusowe. Długość ciała od 1mm do 6mm.

Pływają skowo;

- 1 faza: uderzenie czułków – posuwają się do góry i do przodu
- 2 faza: opadanie.
- Powtórzenie cyklu.

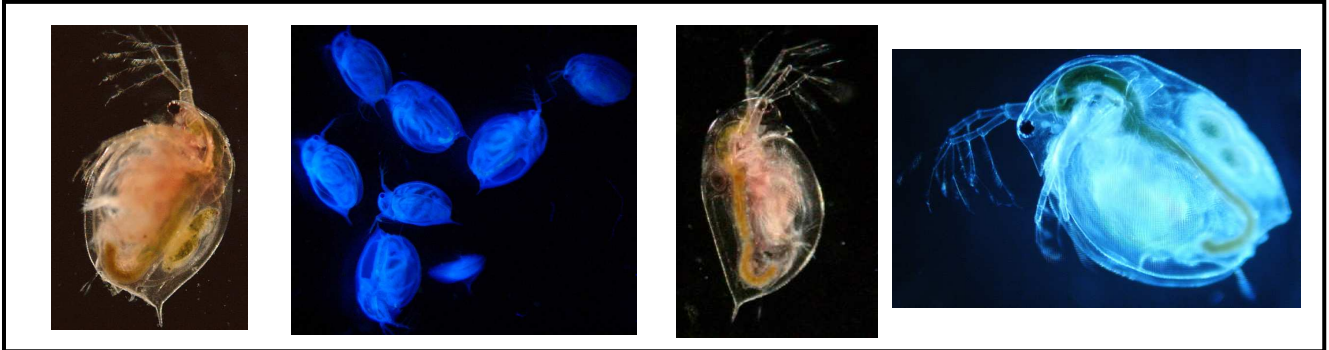
Charakterystyczny jest brak wyróżnienia tułowia i odwłoku – te części uległy integracji przez zlanie się w jednolitą całość. W części grzbietowej widoczna jest komora lęgową, do której uchodzą jajniki. Do komory składane są jaja.

Cykl życiowy – rozwój prosty bez przeobrażenia – zjawisko heterogamii. W okresie sezonu rozmnażanie i rozwój na drodze partogenezy (dzieworództwa), na tej drodze powstają pokolenia haploidalnych samic rozwijające się z niezapłodnionych jaj i dające pokolenia następnych haploidalnych samic. W okresie korzystnych warunków środowiskowych – samice produkują dużą liczbę niezapłodnionych jaj, z końcem sezonu w okresie pogorszenia się warunków sprzyjających rozwojowi (przegęszczenie populacji lub obniżenie się temperatury) z niezapłodnionych jaj wylęgają się haploidalne samce i samice. Samice składają zapłodnione jaja przetrwalnikowe (zimowe), przechodząc przez okres obligatoryjnego spoczynku, nie rozwijają się w komorze lęgowej lecz uwalniane są w chitynowym *ephippium* – (siopełku) do środowiska, mają zdolność przezimowania w niekorzystnych warunkach. Okres spoczynku może trwać do kilkudziesięciu lat – tzw. formy kryptobiotyczne. W okresie wiosennym w sprzyjających warunkach z jaj zapłodnionych wylęgają się diploidalne samice – produkujące kolejne pokolenia samic haploidalnych i cykl się powtarza.

Rozwielitki stanowią składnik planktonu słodkowodnego, są m. in. pokarmem dla ryb i innych zwierząt wodnych żywiących się planktonem. Same żywią się zawiesiną glonów planktonowych oraz zawiesiną organiczną odfiltrowaną z wody. Są czułe i wrażliwe na zmiany w środowisku wodnym – a szczególnie na zmiany związane z chemizmem wód – dlatego też są bardzo dobrymi indykatorami dla wielu związków chemicznych mogących potencjalnie występować w wodach słodkich jako zanieczyszczenia [33].

Do badań skorupiaki pozyskano z laboratorium Politechniki Warszawskiej (Wydz. Inżynierii Środowiska). Prowadzono hodowlę skojarzoną wraz z *Lymnaea stagnalis* – w akwariach dotlenianych z zapewnieniem odpowiedniego czasu światła dziennego ok. 12 – 14 h na dobę. Temperatura wody w akwariach to  $21^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Woda do hodowli jak również do testów stanowiła mieszanekę wody wodociągowej pół na pół z wodą z bioreaktora (uprzednio biologizowaną). W trakcie hodowli prowadzono ciągłą obserwację i ocenę witalności populacji jak również stopnia rozrodu. Do testów wybierano osobniki

młodociane (w okresie przedprodukcyjnym), [63, 75], testy trwały 24h ocenie poddawano stopień unieruchomienia = śmiertelności określonej liczby osobników testowych w stosunku do stężenia toksyny.



Ryc. 9. *Daphnia magna* Straus. (Fot. Robert Mazur)

## 2. *Lymnaea stagnalis* L. (Błotniarka stawowa)

### Systematyka gatunku;

Domena: *Eukaryota*

Królestwo: Zwierzęta (*Animalia*)

Podkrólestwo: Wielokomórkowce (*Metazoa*)

**Bezkręgowce:** (*Invertebrata*)

**Trójwarstwowe:** (*Triblastica*)

**Wtórnojamowce:** (*Celomata*)

**Typ: Mięczaki:** (*Mollusca*)

**Gromada: Brzuchonogi** (*Gastropoda*) (Ślimaki).

**Podgromada: Płucodyszne** (*Pulmonata*)

**Rząd: Nasadooczne** (*Basommatophora*)

**Rodzina: Lymnaeidae**

### Gatunek *Lymnaea stagnalis* – Błotniarka stawowa [33].

Jest to gatunek kosmopolityczny, bardzo licznie reprezentowany we wszelkich typach zbiorników słodkowodnych. Żywi się pokarmem roślinnym oraz martwą materią organiczną (czasem padliną zwierząt).

Opis:

Ciało składa się z głowy, worka trzewiowego oraz nogi (główny narząd ruchu) brak symetrii ciała.



Głowa jest wyraźnie oddzielona w przedniej części od nogi, na górnej części głowy usytuowane są trójkątne czułki stanowiące narząd zmysłu ślimaka. U nasady czułek znajdują się parzyste oczy. Otwór gębowy w dolnej stronie, posiada tarkę – narząd gębowy, biorący udział w pobieraniu pokarmu.

Worek trzewiowy okryty jest płaszczem. Płaszcz pokryty muszlą odzwierciedlającą kształt worka trzewiowego. W obrębie płaszcza zlokalizowana jest jama płaszczowa zwana też jamą płucną usytuowana przed sercem. Do jamy uchodzą narządy wydalnicze, otwór odbytowy oraz narządy rozrodcze. Otwór płciowy przed jamą płaszczową. Brzegi jamy są cewkowato wydłużone tworzą rurkę oddechową (syfon).

Muszla błotniarki jest wydłużona i skręcona prawoskrętnie. Kolor ciała i muszli osobników dorosłych od barwy brązowej do czarnej, osobniki młode mają muszle żółte. Zbudowana jest z trzech warstw:

- Na zewnątrz: periostrakum – złożone z konchioliny.
- Środkowa warstwa: strakum – zbudowana z kryształków węgla wapnia, wykazujących strukturę pryzm.
- Warstwa wewnętrzna: hipostrakum – również składa się z węgla wapnia ale w postaci cienkich blaszek załamujących światło tworzące warstwę perłową.

Muszla ma znaczenie ochronne, a wewnętrzna warstwa jest miejscem zaczepu mięśni wciągających nogę do wewnątrz. Błotniarki nie posiadają wieczka, które u wielu ślimaków stanowi element ochronny zamykając muszlę po wciągnięciu ciała ślimaka do wewnątrz. U młodych ślimaków muszla jest przezroczysta widoczne są przez nią narządy wewnętrzne, sprawiające wrażenie jakby muszlę pokrywały nieregularne plamy.

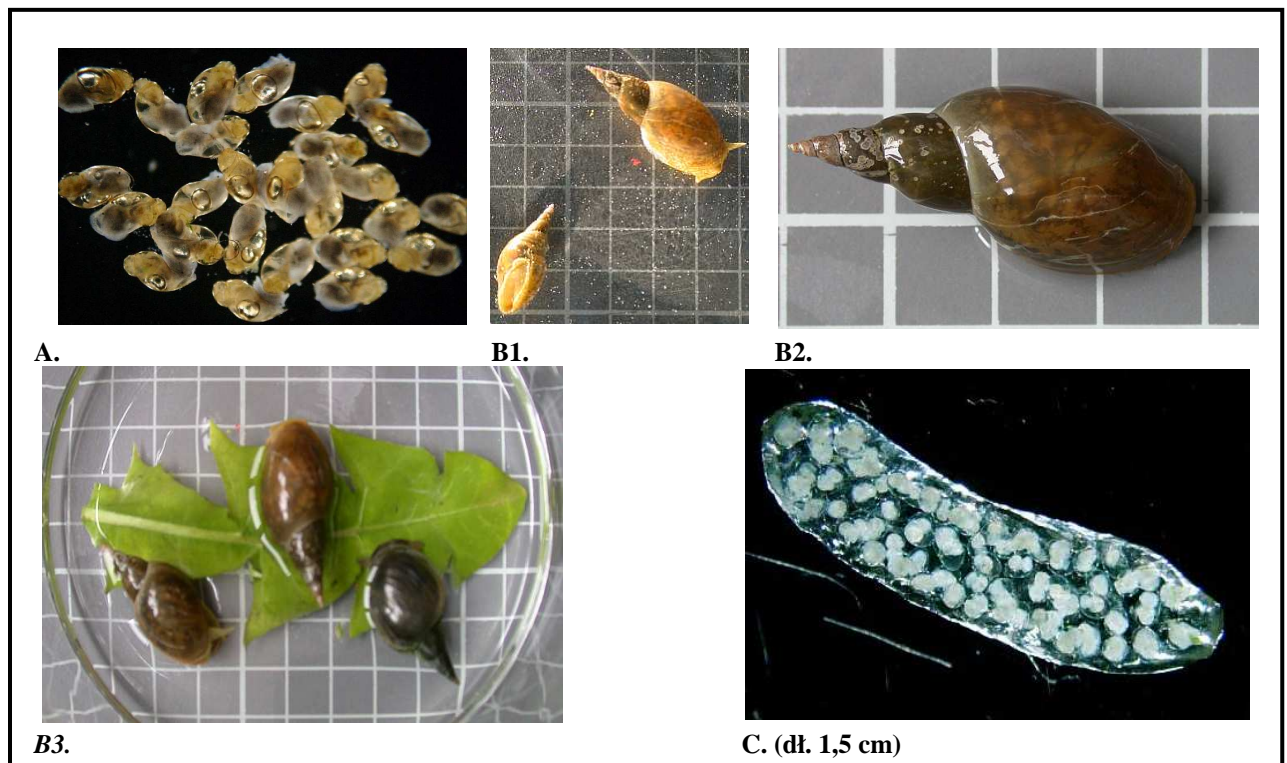
Noga jest spłaszczona, podeszwowata, mięsista – służy do pełzania (w pełni wykształcona). Posiada narządy śluzowe wydzielające śluz warunkujący sprawniejsze poruszanie się ślimaka.

Błotniarka jest gatunkiem hemafordytnym – posiada narządy rozrodcze męskie i żeńskie, najczęstszy typ zapłodnienia to zapłodnienie krzyżowe, samozapłodnienie jest rzadkie. Jest gatunkiem jajorodnym. Pełny rozwój zarodkowy zachodzi w jajach składanych w kokonach na zewnątrz. Składa kokony zawierające od 36 – 200 czasem więcej jaj, każdy kokon (kapsuła) składa się z gęstego płynu otaczającego jaja i mukopeptydowej – galaretowatej otoczki stanowiącej osłonę i barierę chroniącą jaja przed niekorzystnymi warunkami zewnętrznymi oraz będącej buforem dla stabilnego rozwoju embrionów. Kokony przytwierdzone są do podłoża; najczęściej do pędów roślin wodnych, kamieni i części stałych w zbiornikach wodnych. Rozwój prosty – brak form larwalnych.

Rozwój zarodkowy: jaja bruzdkują całkowicie – spiralnie, rozwój jest zdeterminowany.

Błotniarka stawowa jest wrażliwa na zmiany chemizmu wód, szczególnie wrażliwe kryterium stanowi rozwój embrionalny oraz okres adaptacji form juvenilnych w okresie wykluwania. Dlatego jest dobrym bioindykatorem dla wielu substancji chemicznych [33].

Ślimaki pozyskano z wersji hodowlanej do oczek wodnych. W naturalnych warunkach występują w stawach i jeziorach – są w naszej strefie klimatycznej bardzo powszechnym gatunkiem mięczaków wodnych. W pierwszym okresie zaadaptowano okazy do warunków laboratoryjnych, aż do uzyskania trzeciego pokolenia. Po okresie adaptacji przeprowadzono testy pilotażowe dla określonej grupy toksyn. Hodowlę ślimaków prowadzono w warunkach opisanych dla *Daphnia magna* jako skojarzona. W takich warunkach populacja ślimaków wykazywała najbardziej optymalny stopień rozwoju i rozrodu. Pokarm stanowiły w okresie letnim liście mniszka lekarskiego w okresie zimowym sałata. Do badań testowych pobierano kokony z embrionami lub osobniki młodociane w okresie wylęgu [25, 33, 80].



A. Młode po wylęgu (dł. 2-3mm) B1, B2, B3 – Osobniki dorosłe (dł. 3 – 5cm) C – Kokon z rozwijającymi się w jajach zarodkami (dł. Kokonu – 1 – 4cm) (średnica jaja – ok. 1mm)

Ryc. 10. *Lymnaea stagnalis* (Fot. R. Mazur).



3. *Tubifex tubifex* L. (Rurecznik mułowy)

Domena: *Eukaryota*

Królestwo: Zwierzęta (*Animalia*)

Podkrólestwo: Wielokomórkowce (*Metazoa*)

**Bezkręgowce:** (*Invertebrata*)

**Trójwarstwowe:** (*Triblastica*)

**Wtórnojamowce:** (*Celomata*)

**Typ: Pierścienice:** (*Annelida*)

**Gromada: Skąposzczety:** (*Oligochaeta*)

**Rząd:** *Haplotaxida*

**Rodzina:** Rureczniki (*Tubificidae*)

**Gatunek:** Rurecznik mułowy (*Tubifex tubifex*) [33].

Żyje w osadach dennych. Buduje specyficzne rurkowate domki z mułu i śluzowatych wydzielin naskórka, w których są pogrążone przednią częścią ciała. Wysoce tolerancyjne na deficyt tlenowy i zanieczyszczenia organiczne wód. Wykazują wyraźne perystaltyczne ruchy pełzające. Przez układ pokarmowy filtrują ogromne ilości wody, jelito tylne stanowi główny narząd oddechowy. Występuje w zbiornikach wodnych typu: jeziora, stawy lub zanieczyszczonych przez ścieki bytowo gospodarcze ciekach wodnych.

Opis: Ciało charakteryzuje dwuboczna symetria oraz segmentacja. Pokryte jest worem powłokowym z oskórkiem, metamerycznie rozmieszczone szczeci. Oskórek składa się ze skleroprotein i mukopolisacharydów. Pod oskórkiem położony jest cylindryczny, jednowarstwowy, komórkowy naskórek z licznymi gruczołami śluzowymi – wydzielającymi przez kanały w oskórku śluz na zewnątrz.

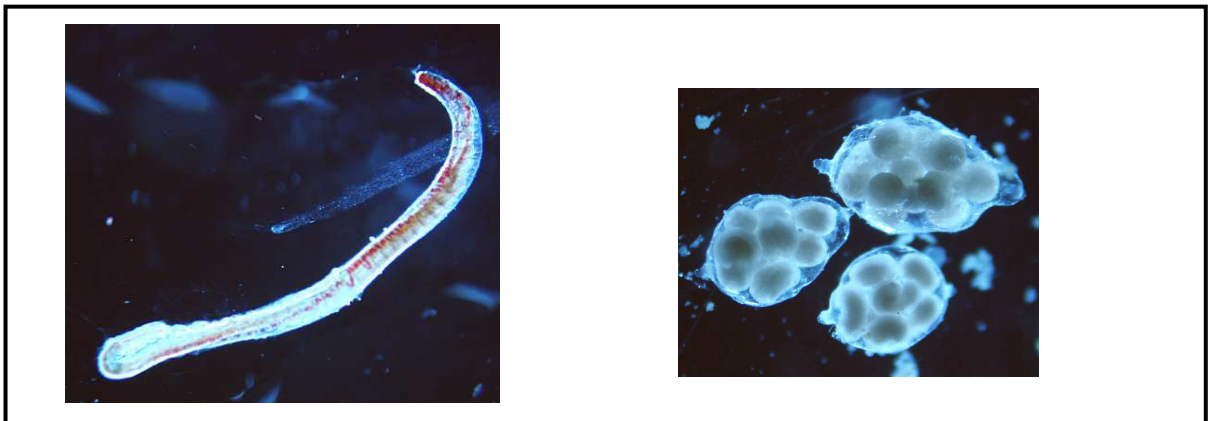
Ciało przezroczyste – o delikatnym czerwonym zabarwieniu, podzielone na odcinek głowowy oraz tułów. Metameryzacja zawiązuje się już rozwoju embrionalnym, i jest widoczna w fazie rozwoju postprenatalnym. Zaznacza się cefalizacja natomiast brak jest przydatków gębowych w odcinku głowowym, głowa jednak jest słabo wyodrębniona. Zamiast oczu występują komórki światłoczułe. Część segmentów tułowia zróżnicowana jest w siodełko stanowiące narząd rozrodczy. Produkujący jaja zebrane w kokonach zawierających substancje odżywcze oraz ochronne dla zdeponowanych w nich jaj. Pozostałe segmenty są homonomiczne. Są hermafrodytami – w rozwoju brak larwy.

Rozwój embrionalny; jaja bruzdkują spiralnie i zdeterminowanie. Gastrulacja przez epibolię. Celoma tworzy się na drodze schizocelii. Jaja są składane w kokonach zawierających płyn

odżywiający i ochraniający zanurzone w nim jaja, oraz otoczkę stanowiącą barierę chroniącą przez wpływem niekorzystnych warunków zewnętrznych [25, 33, 80].

Mają zdolności regeneracji. Są dobrymi bioindykatorami dla wąskiej grupy specyficznych substancji chemicznych m. in. detergenty.

Osobniki wzięte do badań zostały zakupione w punkcie sprzedaży, pozyskane z odłowu na starorzeczu Wisły w okolicach Krakowa. Populacje adoptowano do warunków laboratoryjnych – podłoże denne dla rozwoju rurecznika stanowił piasek wraz z osadami dennymi z hodowli rozwielitki i ślimaka, jako dodatek pokarmowy stosowano zmiksowaną sałatę lodową wraz z płatkami rybnymi [2]. Do badań pobrano osobniki po miesięcznym okresie adaptacyjnym – oraz kokony z rozwijającymi się embrionami. Stosowano ciągłe dotlenianie i system przepływowy wody w zbiorniku z hodowlą rurecznika mułowego. Alternatywnie prowadzono hodowlę w *Tubifex tubifex* w osadach dennych w wyszczególnionych akwariach w skojarzeniu z rozwielitką i błotniarką stawową.



Ryc. 11. *Tubifex tubifex* (Fot. Robert Mazur)

4. W pierwszej fazie badań testowano również pochodzące z handlu pokarmi akwarystycznymi larwy ochotki piórkowej *Chironomus plumosus* L. i komara *Chaoborus flavicans* (komar wodzień lub szklarka). Larwy pochodziły ze punktu sprzedaży żywych pokarmów dla ryb, okres przechowywania do 48h po odłowieniu. Osobniki wykazujące największy wigor życiowy poddano testom na wybrane toksyny. Oba gatunki charakteryzowały się wysoką tolerancją i opornością na wszystkie badane związki toksyczne, dlatego też odrzucono te gatunki i nie przeszły do drugiego etapu badań. Nie spełniały warunków dla bioindykatorów dla żadnej z badanych substancji chemicznych.

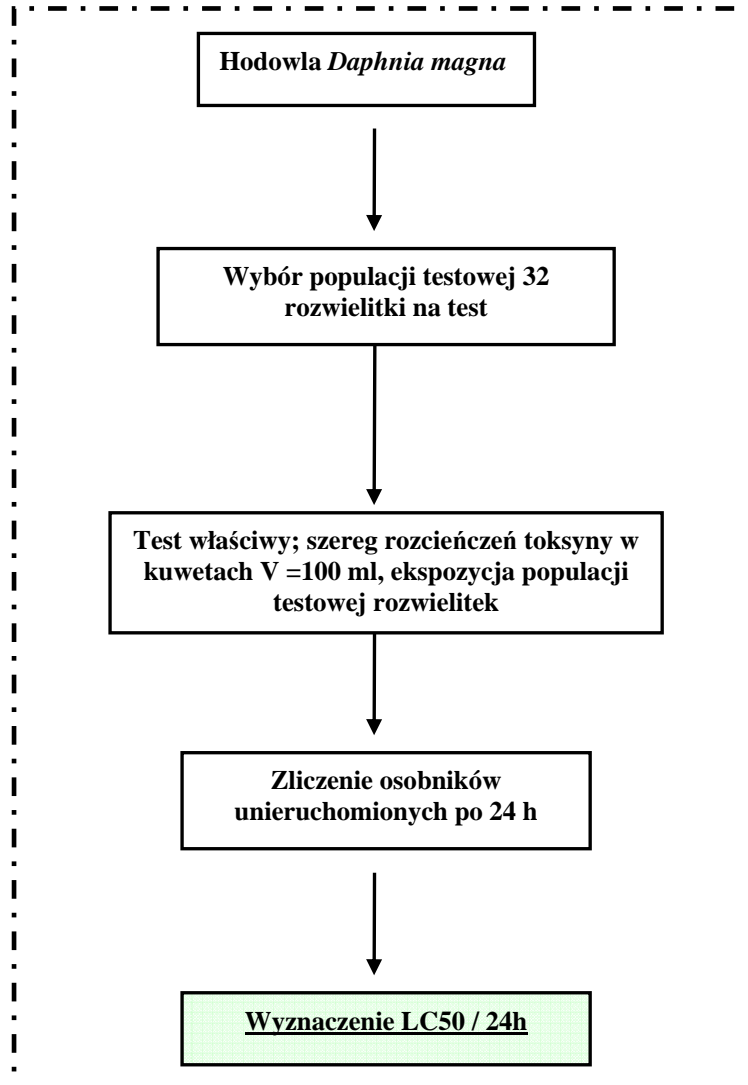
## 6. Metodyka badań:

### 6.1 Testy toksyczności ostrej z zastosowaniem skorupiaków *Daphnia magna* Strauss

1. Woda do rozcieńczeń; stanowi ją woda uzdatniona w biofiltrze [Załącznik nr 1.], [46]
2. Substancje chemiczne – wymienione w części: „Wybór substancji testowanych:”. Szczegółowo opisane i wyróżnione w części doświadczalnej.
3. Hodowla skorupiaków: zgodnie z normą nr PN-90 C-04610/03, alternatywnie hodowla w akwariach skojarzona z hodowlą ślimaków *Lymnaea stagnalis* L. Przed testem zapewniona odpowiednia długość okresu światła, temp 21 - 23°C oraz natlenianie akwariów. pH – 7 ( $\pm 0,5$ ). [75].
4. Aparatura:
  - Kropplomierze
  - Kuwety o pojemności 100 ml
  - Sita o dużej gęstości.
  - Mikroskop stereoskopowy (Lupa binokularna) – Hund Wetzlar (S/Ns214551), o powiększaniu (1- 4)x200. – do obserwacji szczegółowej.
  - Oświetlacz światłowodowy, Hund Wetzlar (FLQ150).
  - Kamera Nikon DMX 1200 z kartą dedykowaną i oprogramowaniem ACT1 ver.2 do rejestracji obrazu w komputerze lub aparat Nikon Coolpix 1200, (w przypadku robienia dokumentacji fotograficznej).
  - Szkło powiększające z oświetlaczem sześciennym dla oceny stopnia immobilizacji rozwielitek w teście populacji.
  - Podstawowe szkło laboratoryjne – cylindry miarowe, zlewki, pipety kapilarne szklane lub automatyczne, szalki, szkła zegarowe, akwaria, kolby Erlenmayera.
  - Przewietrzacze akwariowe.
5. Przygotowanie szeregu rozcieńczeń roztworów badanych substancji w szeregu geometrycznym o postępie  $q = 1,25$  lub arytmetycznym  $q = 1$ . w zależności od wyników testów pilotażowych. Roztwory są rozlewane do kuwet o pojemności 100 ml na każde stężenie roztworu w 10 powtórzeniach. Temp. 20°C  $\pm$  2°C. Do przygotowania roztworu wykorzystano wodę uzdatnioną w biofiltrze. Próbę kontrolną stanowi woda uzdatniona bez dodatku substancji testowanej. [46]
6. Do testów odławiane są osobniki w wieku (24 – 48h) w dobrej kondycji i charakteryzujące się dużą ruchliwością. Na każdą kuwetę odławianych było 30 – 32 rozwielitek,

7. Testy przeżywalności prowadzone w okresie 24h., wyniki obserwacji śmiertelności zostały zestawione w tabeli. Zapisano notatki z własnych obserwacji wyglądu osobników testowanych.

*Schemat algorytmu działania:*



Wyniki zapisano w tabelach śmiertelności – współczynniki LC50/24 wyznaczono metodą probitową alternatywnie metodą interpolacji na wykresie śmiertelności.

## 6.2 Testy toksyczności ostrej z zastosowaniem form juwenilnych i embrionalnych

### *Lymnaea stagnalis* L.

W teście badaniom podano 2 stadia rozwoju; embrionalnego i juwenilnego,

1. Stadium embrionalne obejmuje okres:

- Bruzdkowanie i gastrulacja – do okresu organogenezy (bez muszli).
- Wytworzenie zaczątku muszli i zaawansowana organogeneza.
- Formy z ukształtowaną muszlą w pełni ukształtowanie gotowe do wylęgu.

W czasie rozwoju embrionalnego wszystkie etapy embriogenezy wykazują taki sam efekt wpływu toksyny, zatem niezależnie od okresu są one oceniane według jednego kryterium embriologicznego bez rozróżnienia stopnia zaawansowania rozwoju.

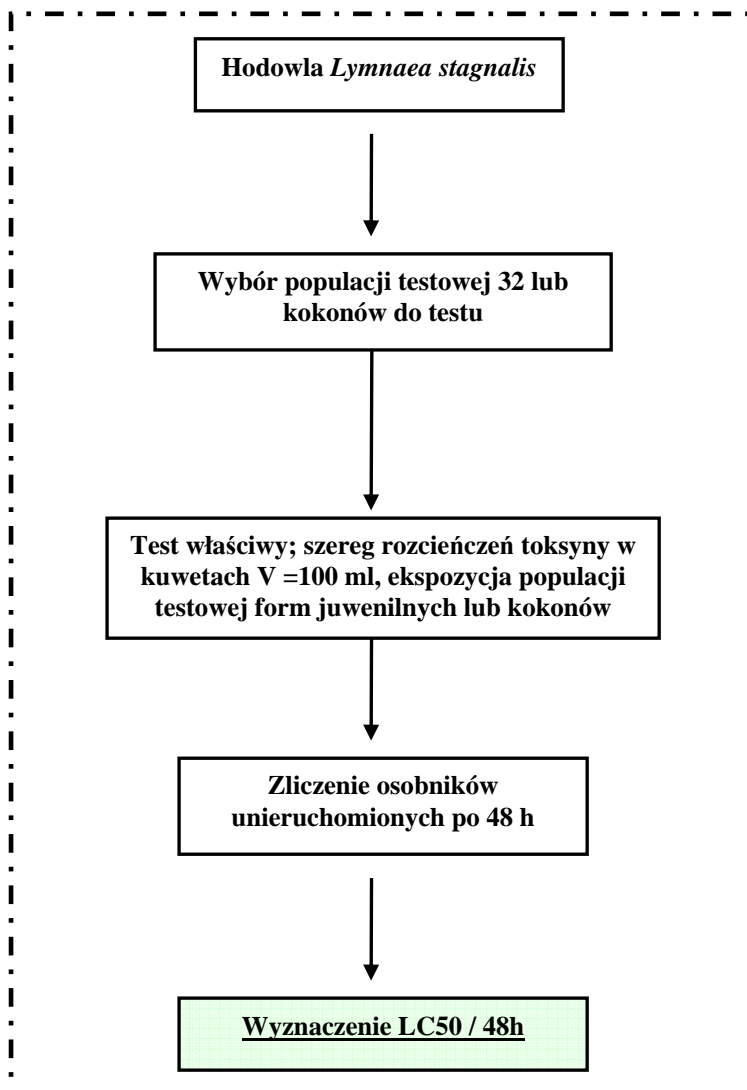
Od wczesnego bruzdkowania do okresu wczesnej organogenezy kształt embrionów zbiega do postaci kulistej. Widoczne są ruchy obrotowe – wirujące form kulistych. Od okresu zaawansowanej embriogenezy widoczne stają się puls serca oraz ruchy pełzające. To właśnie dzięki widocznej dynamice embrionów (wykazujących określony typ ruchu biernych i aktywnych) możemy ocenić wpływ badanego związku. Embriony wykazujące efekt immobilizacji klasyfikowane są jako martwe. Stadia rozwoju zarodkowego wykazują wysoką wrażliwość na czynniki stresu środowiskowego m. in. na efekt toksyczny badanych związków chemicznych. Przy agresywnym oddziaływaniu związku chemicznego mogą być widoczne zmiany i uszkodzenia ciała zarodków. [21]

2. Stadium po wylęgu (24 – 48h) – jest również bardzo wrażliwe na efekt działania określonych toksyn. Jest to okres adaptowania się do nowych warunków środowiska zewnętrznego. Opuszczenie stabilnego środowiska chronionego przez osłony jaja i kokonu oraz substancje galaretowane będące swoistym buforem sprzyjającym optymalnemu rozwojowi zarodków i przejście do warunków środowiska zewnętrznego. W tym okresie wszystkie zanieczyszczenia oraz związki chemiczne wywołują zintensyfikowany efekt toksyczny. Mogą być przy niskich stężeniach śmiertelne dla form juwenilnych. Ocenie podlega unieruchomienie młodych błotniarek równoznaczne z obumarciem. Obserwacji podlegają również stopień uszkodzeń ciała ślimaków pod wpływem działania badanego związku.

Rozwój zarodkowy od złożenia jaj w kokonie do wylęgu w zależności do temperatury wody 6 – 8 dni. Rozwój postnatalny od wylęgu do postaci dorosłej przy zapewnieniu optymalnych warunków hodowli oraz pożywienia to ok. 3 – 5 tygodni.

3. Hodowla w akwariach w wodzie uzdatnionej w biofiltrze, skojarzona z hodowlą rozwielitek, pokarm stanowią liście sałaty lodowej w okresie zimowym a w sezonie wegetacyjnym podawane są liście mniszka lekarskiego. Temp. wody , temp 21 - 23°C oraz natlenianie akwariów.
4. Aparatura: taka sama, jak stosowana do testu z rozwielitkami za wyjątkiem sit, odławianie kokonów za pomocą plastikowych zakraplaczy.
5. Przygotowanie szeregu rozcieńczeń roztworów badanych substancji w szeregu geometrycznym o postępie  $q = 1,25$  lub arytmetycznym  $q = 1$ . w zależności od wyników testów pilotażowych. Roztwory są rozlewane do kuwet o pojemności 100 ml na każde stężenie roztworu w 10 powtórzeniach. Temp. 20°C  $\pm$ 2°C. Do przygotowania roztworu wykorzystano wodę uzdatnioną w biofiltrze. Próbę kontrolną stanowi woda uzdatniona bez dodatku substancji testowanej.
6. Do testów wybierane są:  
Stadium embrionalne:
  - kokony z zarodkami w dobrej kondycji i charakteryzujące się dynamiką (widoczne są intensywne ruchy embrionów). Liczba jaj w kokonie ok. 32 – 240 rzadziej więcej. Na jedno rozcieńczenie badano 5 kokonów = 5 powtórzeń.Stadium po wylęgu:
  - Formy młodociane do 48h po wylęgu odławiane są do testu na jedno powtórzenie populacja 32 osobniki. Do 8 powtórzeń na kolejne rozcieńczenie.
7. Testy przeżywalności prowadzono w okresie 48h., wyniki obserwacji śmiertelności zostały zestawione w tabeli. W przypadku oceny stopnia śmiertelności zarodków – wyniki przeliczono na procent śmiertelności. Należy zanotować ewentualne zmiany i uszkodzenia w ciele zarodków wywołane wpływem badanej substancji oraz charakter tych zmian.

*Schemat algorytmu działania:*



### 6.3 Testy toksyczności ostrej z zastosowaniem *Tubifex tubifex* Müll.

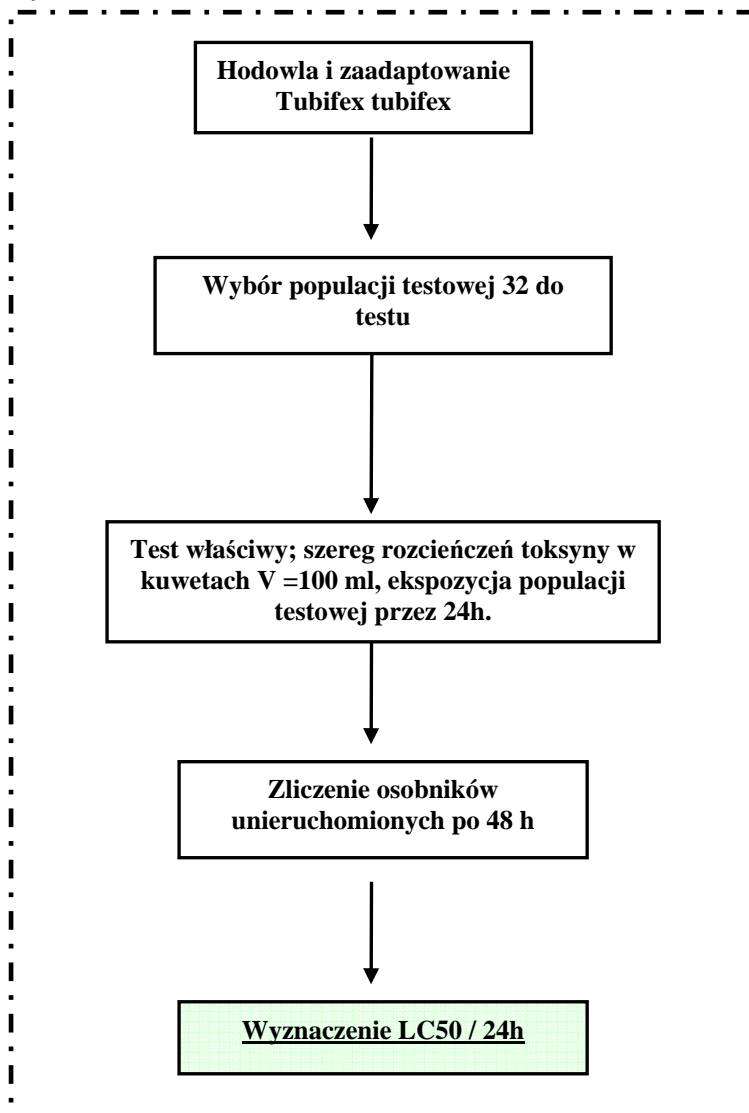
Badaniom na toksyczność ostrą poddano formy młodociane oraz dorosłe. Zarodki w trakcie badań pilotażowych nie wykazały zwiększonej wrażliwości na wpływ żadnej z badanych substancji. Także ze względu na słaby stopień rozmnażania oraz trudności z pozyskiwaniem kokonów do badań testom poddano w/w formy dorosłe. Testy dotyczyły oceny wpływu detergentów na przeżywalność rurecznika mułowego.

1. Hodowla: zakupioną populację *Tubifex tubifex* adaptowano przez okres 3 – 4 tygodnie do warunków laboratoryjnych. Hodowano je w kuwecie plastikowej (Curver – pojemniki do konserwacji i przenoszenia żywności). Dno pojemnika zostało pokryte warstwą ok. 2 – 3cm wyjałowionego drobnoziarnistego piasku. Pojemnik został osadzony na podwyższeniu w akwariium. Stworzono mechanizm przepływowy dla wody z akwariium do kuwety z wykorzystaniem pompki wodnej z filtrem na gąbce. Pojemnik był dotleniany, wprowadzona populacja była dokarmiana – pokarm stanowiły zmiksowane liście sałaty lodowej z płatkami rybnymi firmy Tropical – Ichthio-vit (pokarm witaminizowany dla ryb akwariowych). Temp wody . 20°C ±2°C.
2. Aparatura: taka sama, jak stosowana do testu z rozwielitkami za wyjątkiem sit, odławianie pierścienic za pomocą pincety.
3. Przygotowanie szeregu rozcieńczeń roztworów badanych substancji w szeregu arytmetycznym o postępie  $q = 1$  w zależności od wyników testów pilotażowych. Roztwory są rozlewane do kuwet o pojemności 100 ml na każde stężenie roztworu w 10 powtórzeniach. Temp. 20°C ±2°C. Do przygotowania roztworu wykorzystano wodę uzdatnioną w biofiltrze. Próbę kontrolną stanowi woda uzdatniona bez dodatku substancji testowanej.
4. Odławiano populację testową 32 osobniki – (odłów przy pomocy pincety z wydłużonym końcem). populację testową (w 10 powtórzeniach na każde rozcieńczenie roztworu testowanego detergentu) eksponowano przez 24 h na działanie detergentu. Wynik śmiertelności notowano w tabelach po upływie wymaganego okresu.
5. Wyznaczono wartość LC50/24h oraz odnotowano ewentualne uszkodzenia i zmiany wywołane wpływem detergentu na rureczniki.
6. Należy pamiętać, iż rureczniki należą do organizmów mułowych i poza podłożem, w które mogą wnikać wykazują tendencje do skupiania się w większą bryłę. Więc przed dokonaniem oceny należy ruchem wirującym rozdzielić skupione osobniki. Zalecane jest również w trakcie testu co pewien okres ok. 2 – 3 godziny również rozdzielać się



w podobny sposób skupiające się osobniki testowane. Zapobiegnie to możliwości ochrony osobników wewnątrz bryły przed działaniem substancji testowanej.

*Schemat algorytmu działania:*



#### 6.4 Metoda obliczeniowa w wyznaczaniu współczynnika LC 50:

➤ *Metoda probitowa dla obliczeń stężenia letalnego LC50:[46]*

obliczenia współczynnika regresji b:

$$b = \frac{\sum_{i=1}^k x_i y_i - \bar{x} \sum_{i=1}^k y_i}{\sum_{i=1}^k x_i^2 - \bar{x} \sum_{i=1}^k x_i}$$

Legenda:

k – liczba stężeń uwzględnionych w obliczeniach;

$x_i$  – wartość logarytmu i – tego stężenia;

$y_i$  – probit odpowiadający procentowi śmiertelności dla i – tego stężenia;

$\bar{x}$  - wartość średnia logarytmów poszczególnych stężeń obliczona jako

$$\frac{1}{k} \sum_{i=1}^k x_i$$

Obliczenie stężenia letalnego LC50:

Wartość stężenia LC50 dla związku chemicznego określa się w mg/l dla wód i ścieków w procentach:

$$LC50 = N \lg \frac{5 - \bar{y} + b\bar{x}}{b}$$

Legenda:

$\bar{y}$  - wartość średnia probitów odpowiadających procentom śmiertelności dla poszczególnych stężeń obliczona jako

$$\frac{1}{k} \sum_{i=1}^k y_i$$

5 – wartość stała probitu odpowiadająca 50% śmiertelności,

b – współczynnik regresji,

$\bar{x}$  - średnia wartość logarytmów poszczególnych stężeń obliczona z wzoru:

$$\frac{1}{k} \sum_{i=1}^k x_i$$

W obliczeniach stosuje się stężenie dla którego probit y należy do przedziału  $3,5 \leq y \leq 6,5$

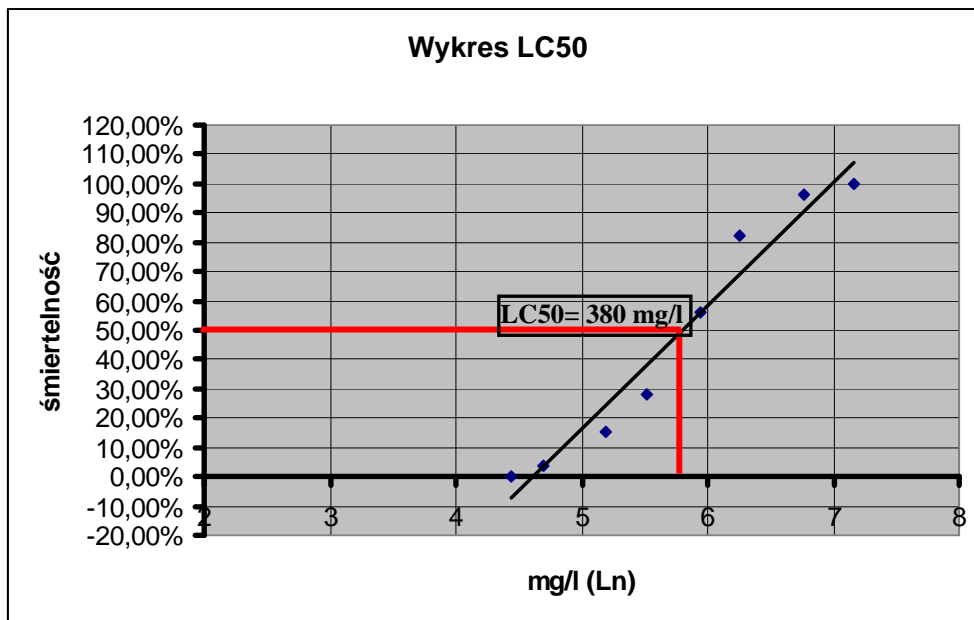
➤ **Metoda graficznej interpolacji do wyznaczania stężenia śmiertelnego LC50 (wg skali liniowej):**

Oś rzędnych procent śmiertelności organizmów w poszczególnych stężeniach toksykanta dla określonego czasu ekspozycji na osi odciętych stężenia wyrażone w mg/l [Ryc. 12]. Oczywiście LC50 – stanowi odcięta punktu przecięcia się krzywej z prostą odpowiadającą 50% śmiertelności organizmów. Podobnie możemy zrobić w skali logarytmicznej lub w skali prawdopodobieństwa [46].

Przykład: Interpolacji graficznej (LC50) dla przykładowej substancji toksycznej.

Stęż (mg/l)	Śmiertelność (%)	Log (n) (stęż)
85	0,00%	4,442651
110	4,00%	4,70048
180	15,00%	5,192957
250	28,00%	5,521461
380	56,00%	5,940171
520	82,00%	6,253829
865	96,00%	6,76273
1300	100,00%	7,17012

Tab. 5. Przykładowe dane dla śmiertelności teoretycznego organizmu narażonego na substancje tok. x.



Ryc. 12. Przykład interpolacji graficznej LC50.

## 6.5 Ocena związków chemicznych w odniesieniu do kryteriów ich szkodliwości dla biocenoz wodnych.

### 1. Według Dockal i Solda:

LC 50 [mg/l]	Ocena toksyczności związku
< 0,1	Niezwykłe toksyczny
>0,1 – 1	Mocno toksyczny
> 1 – 10	Silnie toksyczny
> 10 – 100	Średnio toksyczny
> 100 – 1000	Słabo toksyczny
> 1000 – 10 000	Zaledwie toksyczny
> 10000	nietoksyczny

Tab. 6. - Ocena związków chemicznych według ich szkodliwości dla biocenoz wodnych.

### 2. Według Unii Europejskiej (European Community Environmental Legislation).

LC 50 [mg/l]	Ocena toksyczności związku
<1	Silnie toksyczny
> 1 – 10	Toksyczny
> 10 – 100	Szkodliwy

Tab. 7. - Ocena związków chemicznych według ich szkodliwości dla biocenoz wodnych.

### 3. Według US EPA (Environmental Protection Agency - USA)

LC 50 [mg/l]	Ocena toksyczności związku
$\leq 1$	Silnie toksyczny
> 1 – 100	Umiarkowanie toksyczny
> 100	Słabo toksyczny

Tab. 8. - Ocena związków chemicznych według ich szkodliwości dla biocenoz wodnych.

Po wyznaczeniu wartości LC50 możemy przyporządkować tę wartość do poszczególnej pozycji w tabelach i określić stopień toksyczności związku w stosunku do badanego bioindykatora. [46]

## **7. Wyniki badań:**

## I. Badanie wpływu detergentów niejonowych Brij na śmiertelność *Daphnia magna*.

**Cel badania:** określenie toksyczności ostrej wpływu w/w związków chemicznych dla form młodocianych *Daphnia magna* w okresie 24h, wyznaczenie zakresu stężeń bezpiecznych oraz współczynnika LC50.

*Do testów wytypowano formy młodociane Daphnia magna do 24h będące w dobrej formie, nie wykazujące oznak chorobotwórczych oraz zaburzeń rozwojowych.*

**Określenie wartości stałych dla testów:**

- Iloraz postępu arytmetycznego rozcieńczeń  $q = 1$  (wyznaczony w testach screen).
- Liczba powtórzeń 10,
- Temp. otoczenia; 22,5°C – 23°C.
- Temp. wody w badanych próbach; 21,5°C
- Okres testu 24h
- Długość światła/nocy – 16/8h

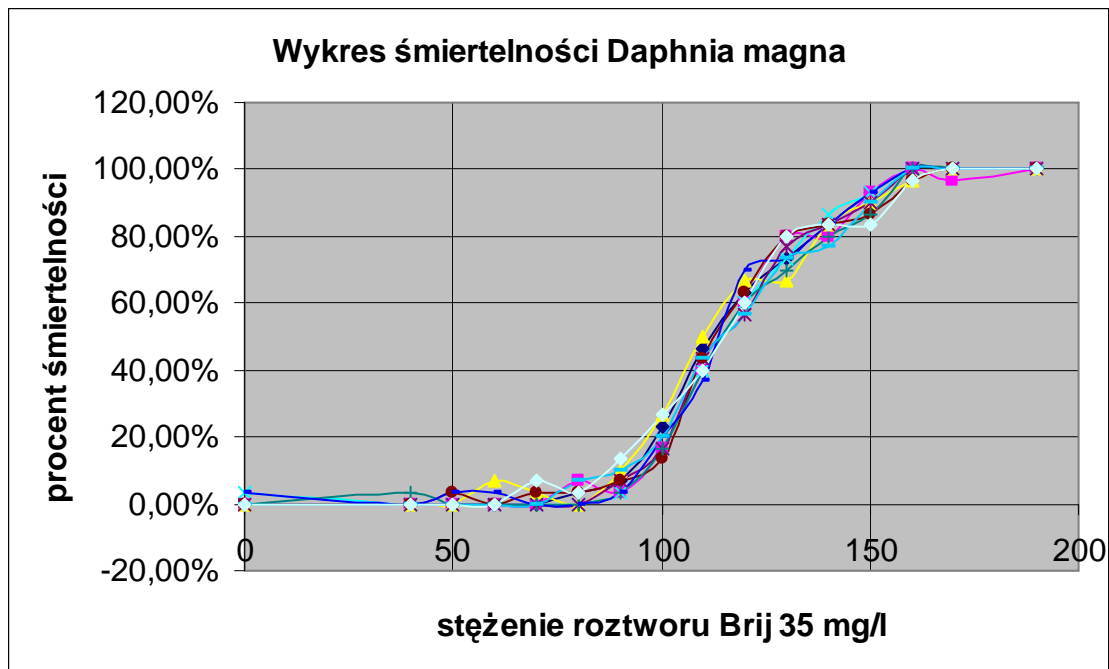
### 1. Wyniki testów toksyczności dla Brij 35.

<b>(<i>Daphnia magna</i>) Brij 35</b>										
<b>STĘŻENIE mg/l</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>190</b>	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
<b>170</b>	30	29	30	30	30	30	30	30	30	30
<b>160</b>	30	30	29	30	30	29	30	30	30	29
<b>150</b>	28	28	27	28	27	26	26	28	27	25
<b>140</b>	25	24	25	26	25	25	24	25	23	25
<b>130</b>	22	24	20	22	23	24	21	22	22	24
<b>120</b>	19	18	20	18	17	19	18	21	17	18
<b>110</b>	14	12	15	12	13	13	12	11	13	12
<b>100</b>	7	5	8	5	5	4	5	6	6	8
<b>90</b>	2	1	3	1	2	2	1	1	3	4
<b>80</b>	1	2	0	0	0	1	0	0	2	1
<b>70</b>	0	0	1	0	0	1	0	0	0	2
<b>60</b>	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0
<b>50</b>	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
<b>40</b>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<b>Kontrola</b>	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0

**Tab. 9. Śmiertelność *Daphnia magna* dla różnych stężeń Brij 35 po okresie 24h.**

Stężenie mg/l	Próba 1	Próba 2	Próba 3	Próba 4	Próba 5	Próba 6	Próba 7	Próba 8	Próba 9	Próba 10
190	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
170	100,00%	96,67%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
160	100,00%	100,00%	96,67%	100,00%	100,00%	96,67%	100,00%	100,00%	100,00%	96,67%
150	93,33%	93,33%	90,00%	93,33%	90,00%	86,67%	86,67%	93,33%	90,00%	83,33%
140	83,33%	80,00%	83,33%	86,67%	83,33%	83,33%	80,00%	83,33%	76,67%	83,33%
130	73,33%	80,00%	66,67%	73,33%	76,67%	80,00%	70,00%	73,33%	73,33%	80,00%
120	63,33%	60,00%	66,67%	60,00%	56,67%	63,33%	60,00%	70,00%	56,67%	60,00%
110	46,67%	40,00%	50,00%	40,00%	43,33%	43,33%	40,00%	36,67%	43,33%	40,00%
100	23,33%	16,67%	26,67%	16,67%	16,67%	13,33%	16,67%	20,00%	20,00%	26,67%
90	6,67%	3,33%	10,00%	3,33%	6,67%	6,67%	3,33%	3,33%	10,00%	13,33%
80	3,33%	6,67%	0,00%	0,00%	0,00%	3,33%	0,00%	0,00%	6,67%	3,33%
70	0,00%	0,00%	3,33%	0,00%	0,00%	3,33%	0,00%	0,00%	0,00%	6,67%
60	0,00%	0,00%	6,67%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,33%	0,00%	0,00%
50	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,33%	0,00%	3,33%	0,00%	0,00%
40	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,33%	0,00%	0,00%	0,00%
0	0,00%	0,00%	0,00%	3,33%	0,00%	0,00%	0,00%	3,33%	0,00%	0,00%

Tab. 10. Procent śmiertelności *Daphnia magna* dla różnych stężeń Brij 35 po okresie 24h.



Ryc. 13. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności *Daphnia magna* dla poszczególnych stężeń Brij 35 w okresie 24h.

**Wyznaczenie współczynnika LC 50/24h:**

*Metoda probitowa dla obliczeń stężenia letalnego LC50:*

Obliczenie stężenia letalnego LC50:

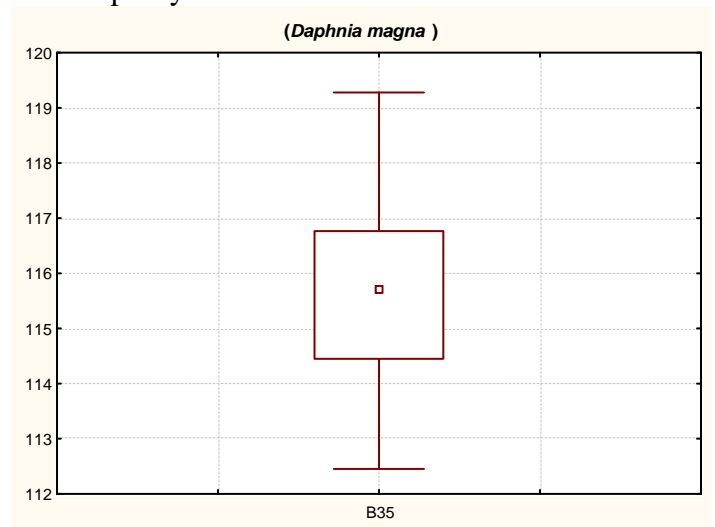
*Wartość stężenia LC50 dla związku chemicznego określa się w mg/l dla wód i ścieków w procentach:*

$$LC50 = N \lg \frac{5 - \bar{y} + b\bar{x}}{b}$$

Stężenie	Śmiertelność % M1	y <sub>1</sub> = probit M <sub>1</sub>	x <sub>1</sub> = lg C <sub>1</sub> stężenie	Kwadrat lg stężenia x <sub>1</sub> <sup>2</sup>	iloczyn lg stężenia i probitu x <sub>1</sub> i y <sub>1</sub>
190	100%	-	2,278754	5,192718	-
170	97%	6,83391464	2,230449	4,974902	15,2427
160	100%	-	2,20412	4,858145	-
150	93%	6,50108595	2,1761	4,7354	14,147
140	80%	5,84162123	2,1461	4,6059	12,537
130	80%	5,84162123	2,1139	4,4688	12,349
120	60%	5,2533471	2,0792	4,323	10,923
110	40%	4,7466529	2,0414	4,1673	9,6898
100	17%	4,03257843	2	4	8,0652
90	3%	3,16608536	1,9542	3,8191	6,1873
80	7%	3,49891405	1,9031	3,6218	6,6587
70	0%	-	1,8451	3,4044	-
60	0%	-	1,7782	3,1618	-
50	0%	-	1,699	2,8865	-
40	0%	-	1,6021	2,5666	-
0	0%	-	-	-	-
<b>Suma</b>		38,8819063	16,41407	33,74109	80,55633
<b>średnie</b>		4,86023828	2,051759		
<b>współ reg – b = 12,3071</b>					
<b>LC50 = 115,6418 mg/l</b>					

Tab. 11. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr2.

Obliczone współczynniki LC50		
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50
1	114,55	<b>115,65 mg/l</b>
2	114,45	
3	115,64	
4	119,28	
5	113,85	
6	116,68	Odch. Stand.
7	117,16	<b>SD = 3,81</b>
8	112,45	
9	116,77	
10	115,77	



Tab 12. Wyznaczone wartości LC 50 – B35. Ryc. 14. Wykres ramka wąsy dla LC50 – B35.



Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Daphnia magna</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
Brij 35	115,65 mg/l	słaba toksyczny	-	słabo toksyczny

Tab. 13. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Daphnia magna*.

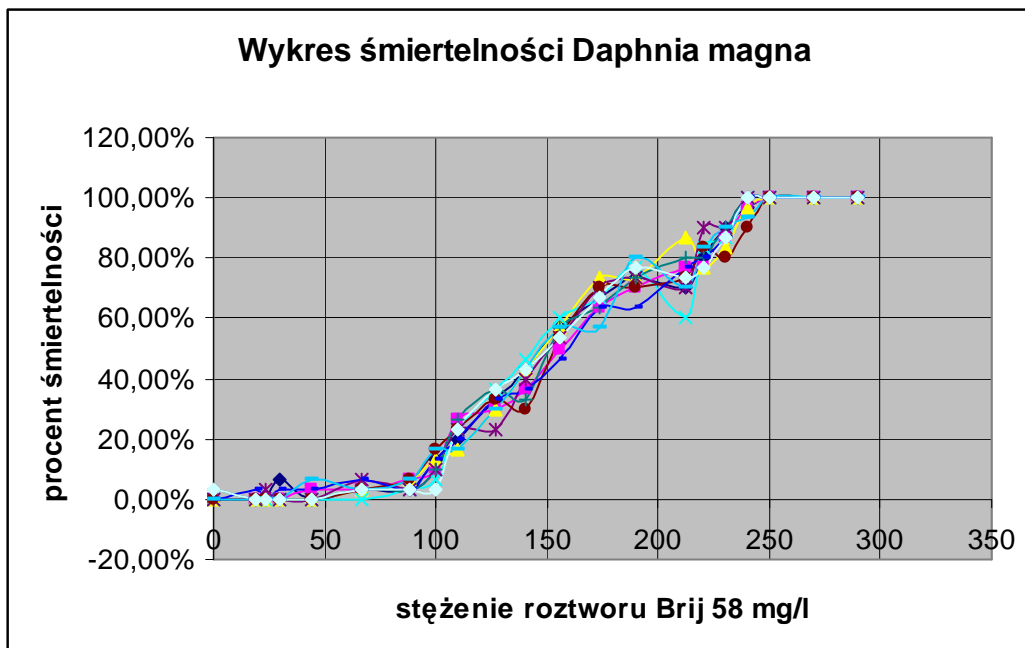
2. Wyniki testów toksyczności dla Brij 58.

<b>(<i>Daphnia magna</i>) Brij 58</b>										
STĘŻENIE Mg/l	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
290	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
270	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
250	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
240	29	29	29	30	30	27	30	30	28	30
230	27	26	25	26	27	24	27	26	27	26
220	24	23	23	25	27	25	24	24	25	23
212	21	23	26	18	21	22	24	23	21	22
190	22	21	22	23	22	21	22	19	24	23
174	20	19	22	20	21	21	19	19	17	20
156	17	15	17	18	16	16	17	14	17	16
140	13	11	13	14	12	9	10	11	13	13
127	10	9	9	11	7	10	11	10	9	11
110	6	8	5	7	7	7	8	6	5	7
100	4	3	4	2	3	5	3	4	5	1
88	1	2	2	1	1	2	1	1	2	1
67	1	1	1	0	2	1	1	2	1	1
44	0	1	0	0	0	0	0	1	2	0
30	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0
23,6	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Kontrola	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1

Tab. 14. Śmiertelność *Daphnia magna* dla różnych stężeń Brij 58 po okresie 24h.

Stężenie mg/l	Próba 1	Próba 2	Próba 3	Próba 4	Próba 5	Próba 6	Próba 7	Próba 8	Próba 9	Próba 10
290	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
270	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
250	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
240	96,67%	96,67%	96,67%	100,00%	100,00%	90,00%	100,00%	100,00%	93,33%	100,00%
230	90,00%	86,67%	83,33%	86,67%	90,00%	80,00%	90,00%	86,67%	90,00%	86,67%
220	80,00%	76,67%	76,67%	83,33%	90,00%	83,33%	80,00%	80,00%	83,33%	76,67%
212	70,00%	76,67%	86,67%	60,00%	70,00%	73,33%	80,00%	76,67%	70,00%	73,33%
190	73,33%	70,00%	73,33%	76,67%	73,33%	70,00%	73,33%	63,33%	80,00%	76,67%
174	66,67%	63,33%	73,33%	66,67%	70,00%	70,00%	63,33%	63,33%	56,67%	66,67%
156	56,67%	50,00%	56,67%	60,00%	53,33%	53,33%	56,67%	46,67%	56,67%	53,33%
140	43,33%	36,67%	43,33%	46,67%	40,00%	30,00%	33,33%	36,67%	43,33%	43,33%
127	33,33%	30,00%	30,00%	36,67%	23,33%	33,33%	36,67%	33,33%	30,00%	36,67%
110	20,00%	26,67%	16,67%	23,33%	23,33%	23,33%	26,67%	20,00%	16,67%	23,33%
100	13,33%	10,00%	13,33%	6,67%	10,00%	16,67%	10,00%	13,33%	16,67%	3,33%
88	3,33%	6,67%	6,67%	3,33%	3,33%	6,67%	3,33%	3,33%	6,67%	3,33%
67	3,33%	3,33%	3,33%	0,00%	6,67%	3,33%	3,33%	6,67%	3,33%	3,33%
44	0,00%	3,33%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,33%	6,67%	0,00%
30	6,67%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,33%	0,00%	0,00%
23,6	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,33%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
19	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,33%	0,00%	0,00%
0	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,33%	0,00%	0,00%	3,33%

Tab. 15. Procent śmiertelności *Daphnia magna* dla różnych stężeń Brij 58 po okresie 24h.



Ryc. 15. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności *Daphnia magna* dla poszczególnych stężeń Brij 58 w okresie 24h.

**Wyznaczenie współczynnika LC 50/24h:**

*Metoda probitowa dla obliczeń stężenia letalnego LC50:*

Obliczenie stężenia letalnego LC50:

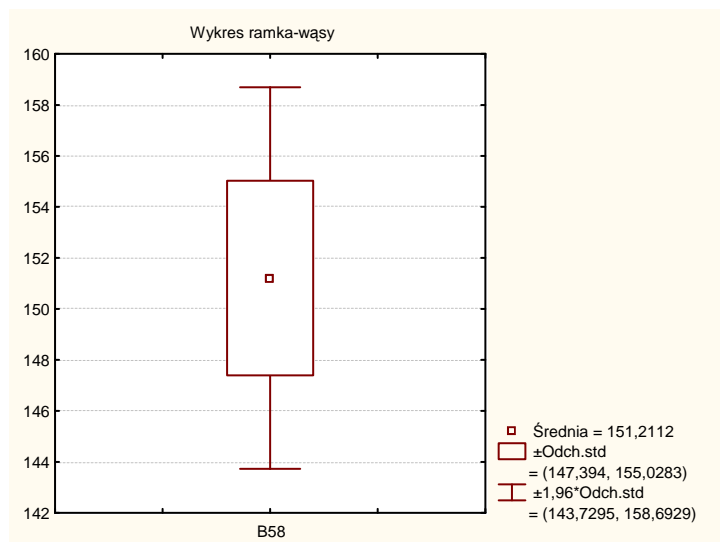
*Wartość stężenia LC50 dla związku chemicznego określa się w mg/l dla wód i ścieków w procentach:*

$$LC50 = N \lg \frac{5 - \bar{y} + b\bar{x}}{b}$$

Stężenie mg/l	Śmiertelność % M1	y <sub>1</sub> = probit M <sub>1</sub>	x <sub>1</sub> = lg C <sub>1</sub> stężenie	Kwadrat lg stężenia x <sub>1</sub> <sup>2</sup>	iloczyn lg stężenia i probitu x <sub>1</sub> i y <sub>1</sub>
290	100%	-	2,462398	6,063404	-
270	100%	-	2,431364	5,91153	-
250	100%	-	2,39794	5,750116	-
240	100%	-	<b>2,3802</b>	<b>5,6654</b>	-
230	87%	6,11077162	2,3617	5,5778	14,432
220	83%	5,96742157	2,3424	5,4869	13,978
212	60%	5,2533471	2,3263	5,4118	12,221
190	77%	5,72791329	2,2788	5,1927	13,053
174	67%	5,4307273	2,2405	5,0201	12,168
156	60%	5,2533471	2,1931	4,8098	11,521
140	47%	4,91634827	2,1461	4,6059	10,551
127	37%	4,65930517	2,1038	4,426	9,8023
110	23%	4,27208671	2,0414	4,1673	8,721
100	7%	3,49891405	2	4	6,9978
88	3%	3,16608536	1,9445	3,781	6,1564
67	0%	-	1,8261	3,3345	-
44	0%	-	1,6435	2,7009	-
30	0%	-	1,4771	2,1819	-
23,6	0%	-	1,3729	1,8849	-
19	0%	-	1,2788	1,6352	-
0	0%	-	-	-	-
<b>suma</b>		<b>54,2562675</b>	<b>23,97872</b>	<b>52,47927</b>	<b>119,6014</b>
<b>średnie</b>		<b>4,93238796</b>	<b>2,179884</b>		
<b>współ regresji – b = 6,3761212</b>					
<b>LC50 = 155,0557 mg/l</b>					

Tab. 16. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr3.

Obliczone współczynniki LC50		
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50
1	149,42	155,21 mg/l
2	152,73	
3	147,7	
4	151,86	
5	147,48	
6	156,35	Odch. Stand.
7	155,06	SD = 1,94
8	145,02	
9	150,9	
10	155,6	



Tab: 17. Wyznaczone wartości LC50 – B58. Ryc. 16. Wykres ramka wąsy LC 50 – B58.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Daphnia magna</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
Brij 58	155,59 mg/l	słabo toksyczny	-	słabo toksyczny

Tab: 18. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Daphnia magna*.

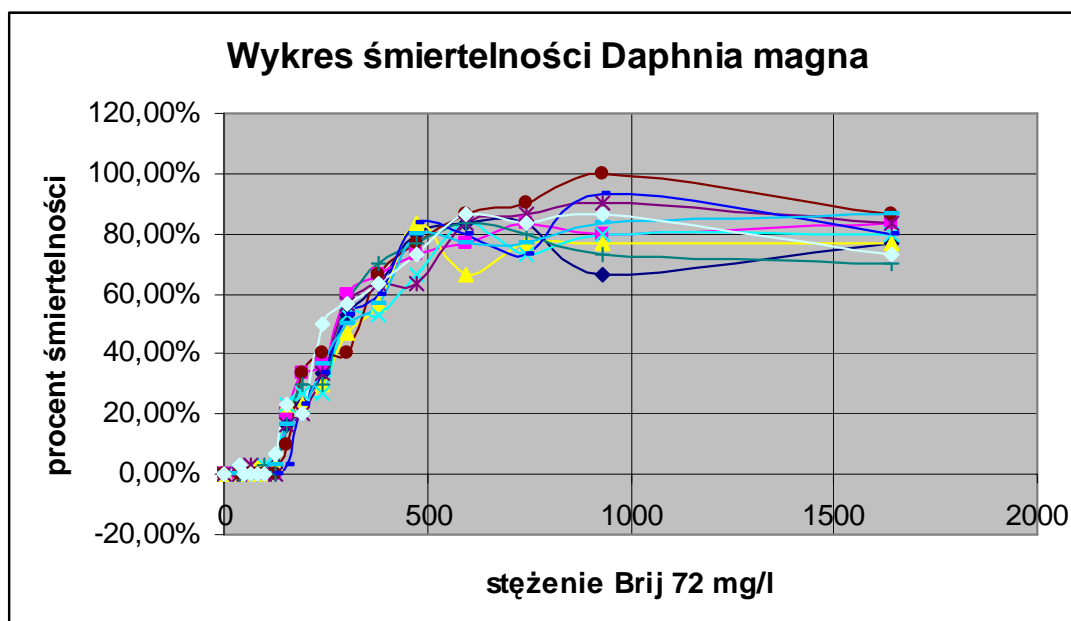
3. Wyniki testów toksyczności dla Brij 72.

<b>(Daphnia magna) Brij 72</b>										
<b>STĘŻENIE Mg/l</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>1641,53</b>	23	25	23	24	25	26	21	24	26	22
<b>931</b>	20	24	23	24	27	30	22	28	25	26
<b>745</b>	25	25	23	22	26	27	24	22	23	25
<b>596</b>	25	23	20	25	25	26	25	24	23	26
<b>476</b>	24	22	25	20	19	23	23	25	24	22
<b>381</b>	19	20	17	16	19	20	21	18	17	19
<b>305</b>	16	18	14	16	17	12	17	16	15	17
<b>244</b>	10	11	9	8	10	12	9	10	11	15
<b>195</b>	7	10	7	8	6	10	9	7	6	6
<b>156</b>	5	6	7	7	5	3	5	1	5	7
<b>125</b>	1	0	1	0	0	0	0	0	1	2
<b>100</b>	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
<b>80</b>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<b>64</b>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<b>51,2</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>41</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<b>Kontrola</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 19. Śmiertelność *Daphnia magna* dla różnych stężeń Brij 72 po okresie 24h.

Stężenie mg/l	Próba 1	Próba 2	Próba 3	Próba 4	Próba 5	Próba 6	Próba 7	Próba 8	Próba 9	Próba 10
1641,5	76,67%	83,33%	76,67%	80,00%	83,33%	86,67%	70,00%	80,00%	86,67%	73,33%
931	66,67%	80,00%	76,67%	80,00%	90,00%	100,00%	73,33%	93,33%	83,33%	86,67%
745	83,33%	83,33%	76,67%	73,33%	86,67%	90,00%	80,00%	73,33%	76,67%	83,33%
596	83,33%	76,67%	66,67%	83,33%	83,33%	86,67%	83,33%	80,00%	76,67%	86,67%
476	80,00%	73,33%	83,33%	66,67%	63,33%	76,67%	76,67%	83,33%	80,00%	73,33%
381	63,33%	66,67%	56,67%	53,33%	63,33%	66,67%	70,00%	60,00%	56,67%	63,33%
305	53,33%	60,00%	46,67%	53,33%	56,67%	40,00%	56,67%	53,33%	50,00%	56,67%
244	33,33%	36,67%	30,00%	26,67%	33,33%	40,00%	30,00%	33,33%	36,67%	50,00%
195	23,33%	33,33%	23,33%	26,67%	20,00%	33,33%	30,00%	23,33%	20,00%	20,00%
156	16,67%	20,00%	23,33%	23,33%	16,67%	10,00%	16,67%	3,33%	16,67%	23,33%
125	3,33%	0,00%	3,33%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,33%	6,67%
100	0,00%	0,00%	0,00%	3,33%	0,00%	0,00%	3,33%	0,00%	0,00%	0,00%
80	0,00%	0,00%	3,33%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
64	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,33%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
51,2	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
41	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,33%
0	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Tab. 20. Procent śmiertelności *Daphnia magna* dla różnych stężeń Brij 72 po okresie 24h.



Ryc. 17. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności *Daphnia magna* dla poszczególnych stężeń Brij 72 w okresie 24h.

**Wyznaczenie współczynnika LC 50% /24h:**

Metoda probitowa dla obliczeń stężenia letalnego LC50:

Obliczenie stężenia letalnego LC50:

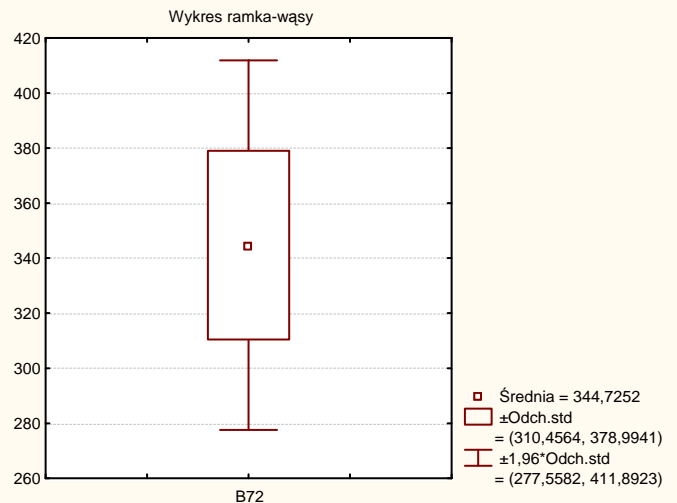
Wartość stężenia LC50 dla związku chemicznego określa się w mg/l dla wód i ścieków w procentach:

$$LC50 = N \lg \frac{5 - \bar{y} + b\bar{x}}{b}$$

Stężenie	Śmiertelność % M1	y <sub>1</sub> = probit M <sub>1</sub>	x <sub>1</sub> = lg C <sub>1</sub> stężenie	Kwadrat lg stężenia x <sub>1</sub> <sup>2</sup>	Iloczyn lg stężenia i probitu x <sub>1</sub> i y <sub>1</sub>
1641,53	80%	5,84162123	3,2152488	10,337825	18,78227
931	80%	5,84162123	2,9689497	8,8146622	17,34348
745	73%	5,62292572	2,8721563	8,2492817	16,14992
596	83%	5,96742157	2,77525	7,70199	16,561
476	67%	5,4307273	2,67761	7,16958	14,541
381	53%	5,08365173	2,58092	6,66117	13,121
305	53%	5,08365173	2,4843	6,17175	12,629
244	27%	4,37707428	2,38739	5,69963	10,45
195	27%	4,37707428	2,29003	5,24426	10,024
156	23%	4,27208671	2,19312	4,8098	9,3692
125	0%	-	2,09691	4,39703	-
100	3%	3,16608536	2	4	6,3322
80	0%	-	1,90309	3,62175	-
64	0%	-	1,80618	3,26229	-
51,2	0%	-	1,70927	2,9216	-
41	0%	-	1,61278	2,60107	-
0	0%	-	-	-	-
<b>suma</b>		<b>51,8978558</b>	<b>26,444982</b>	<b>70,859943</b>	<b>138,9706</b>
<b>średnie</b>		<b>5,18978558</b>	<b>2,6444982</b>		
		<b>współ reg – b = 1,86430765</b>			
		<b>LC50 = 348,8982 mg/l</b>			

Tab. 21. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr2.

Obliczone współczynniki LC50		
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50
1	379,085	344,72 mg/l
2	306,384	
3	296,215	
4	318,129	
5	398,895	
6	365,876	Odch. Stand.
7	348,898	SD - 34,26
8	375,76	
9	329,855	
10	328,157	



Tab: 22. Wyznaczone wartości LC 50 – B72. Ryc. 18. Wykres ramka – wąsy LC 50 – B72.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Daphnia magna</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
Brij 72	344,72 mg/l	słaba toksyczny	-	słabo toksyczny

Tab. 23. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Daphnia magna*.

4. Wyniki testów toksyczności dla Brij 76.

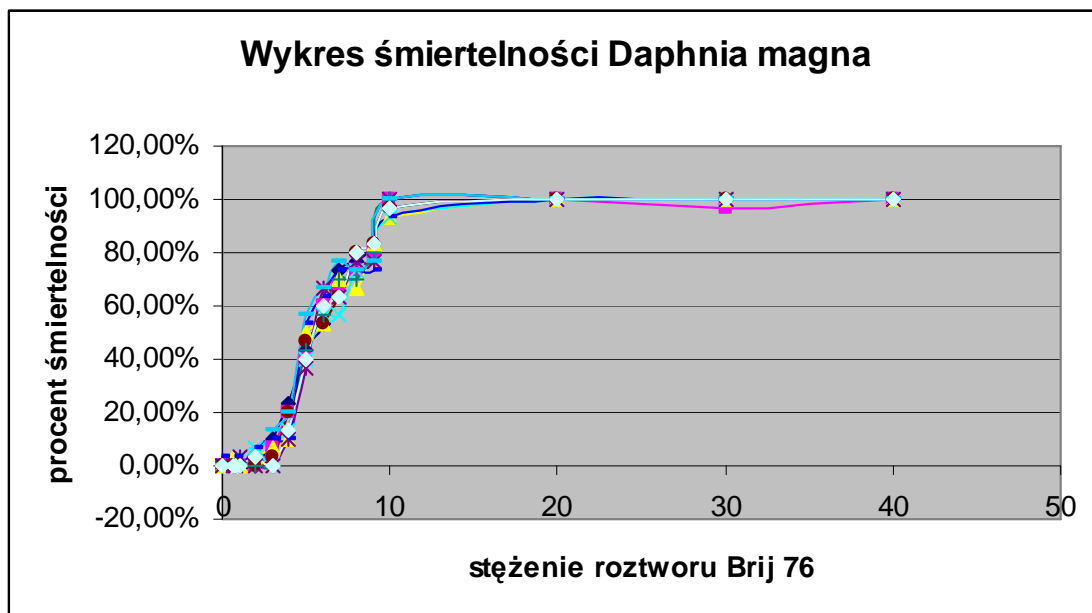
<i>(Daphnia magna) Brij 76</i>										
STĘŻENIE Mg/l	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
100	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
90	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
80	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
70	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
60	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
50	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
40	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
30	30	29	30	30	30	30	30	30	30	30
20	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
10	29	30	28	28	30	29	30	28	30	29
9	25	24	25	23	23	25	24	22	23	25
8	23	22	20	22	23	24	21	22	22	24
7	22	20	21	17	19	19	21	22	23	19
6	16	18	16	17	20	16	17	19	20	18
5	13	12	15	12	11	14	13	16	17	12
4	7	6	3	4	3	6	4	3	6	4
3	3	2	2	0	0	1	0	3	4	0
2	0	0	1	2	0	0	0	2	1	1
1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
0,8	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
0,6	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Kontrola	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0

Tab. 24. Śmiertelność *Daphnia magna* dla różnych stężeń Brij 76 po okresie 24h.



Stężenie mg/l	Próba 1	Próba 2	Próba 3	Próba 4	Próba 5	Próba 6	Próba 7	Próba 8	Próba 9	Próba 10
100	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
90	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
80	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
70	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
60	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
50	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
40	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
30	100,00%	96,67%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
20	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
10	96,67%	100,00%	93,33%	93,33%	100,00%	96,67%	100,00%	93,33%	100,00%	96,67%
9	83,33%	80,00%	83,33%	76,67%	76,67%	83,33%	80,00%	73,33%	76,67%	83,33%
8	76,67%	73,33%	66,67%	73,33%	76,67%	80,00%	70,00%	73,33%	73,33%	80,00%
7	73,33%	66,67%	70,00%	56,67%	63,33%	63,33%	70,00%	73,33%	76,67%	63,33%
6	53,33%	60,00%	53,33%	56,67%	66,67%	53,33%	56,67%	63,33%	66,67%	60,00%
5	43,33%	40,00%	50,00%	40,00%	36,67%	46,67%	43,33%	53,33%	56,67%	40,00%
4	23,33%	20,00%	10,00%	13,33%	10,00%	20,00%	13,33%	10,00%	20,00%	13,33%
3	10,00%	6,67%	6,67%	0,00%	0,00%	3,33%	0,00%	10,00%	13,33%	0,00%
2	0,00%	0,00%	3,33%	6,67%	0,00%	0,00%	0,00%	6,67%	3,33%	3,33%
1	0,00%	0,00%	0,00%	3,33%	3,33%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
0,8	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,33%	0,00%	0,00%
0,6	0,00%	0,00%	3,33%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
0	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,33%	0,00%	0,00%

Tab. 25. Procent śmiertelności *Daphnia magna* dla różnych stężeń Brij 76 po okresie 24h.



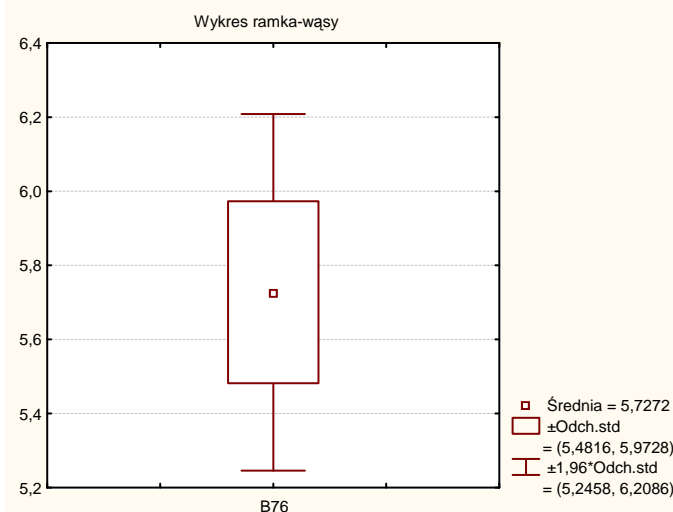
Ryc. 19. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności *Daphnia magna* dla poszczególnych stężeń Brij 76 w okresie 24h.

Stężenie	Śmiertelność % M1	$y_1 = \text{probit } M_1$	$x_1 = \lg C_1$ stężenie	Kwadrat lg stężenia $x_1^2$	Iloczyn lg stężenia i probitu $x_1 \text{ i } y_1$
100	100%	-	2	4	-
90	100%	-	1,954243	3,819064	-
80	100%	-	1,90309	3,621751	-
70	100%	-	1,8451	3,4044	-
60	100%	-	1,7782	3,1618	-
50	100%	-	1,699	2,8865	-
40	100%	-	1,6021	2,5666	-
30	100%	-	1,4771	2,1819	-
20	100%	-	1,301	1,6927	-
10	93%	6,50108595	1	1	6,5011
9	83%	5,96742157	0,9542	0,9106	5,6944
8	67%	5,4307273	0,9031	0,8156	4,9044
7	70%	5,52440051	0,8451	0,7142	4,6687
6	53%	5,08365173	0,7782	0,6055	3,9558
5	50%	5	0,699	0,4886	3,4949
4	10%	3,71844843	0,6021	0,3625	2,2387
3	7%	3,49891405	0,4771	0,2276	1,6694
2	3%	3,16608536	0,301	0,0906	0,9531
1	0%	-	0	0	-
0,8	0%	-	-0,097	0,0094	-
0,6	3%	3,16608536	-0,222	0,0492	-0,702
0	0%	-	-	-	-
suma		40,7246495	6,258733	5,12454	33,12738
średnie		5,09058119	0,782342		
współ reg – b = 5,55434291					
LC50 = 5,834901mg/l					

Tab. 26. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr2.

Obliczone współczynniki LC50		
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50
1	5,4271	5,72 mg/l
2	5,6994	
3	5,8094	
4	5,9107	
5	5,8349	Odch. Stand.
6	5,4428	SD - 0,25
7	6,0155	
8	5,3369	
9	6,0108	
10	5,7843	

Tab: 27. Wyznaczone wartości LC 50 – B76.



Ryc. 20. Wykres ramka – wąsy LC50 – B76.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Daphnia magna</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
Brij 76	5,72 mg/l	Silnie toksyczny	Toksyczny	Umiarkowanie toksyczny

 Tab. 28. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Daphnia magna*.

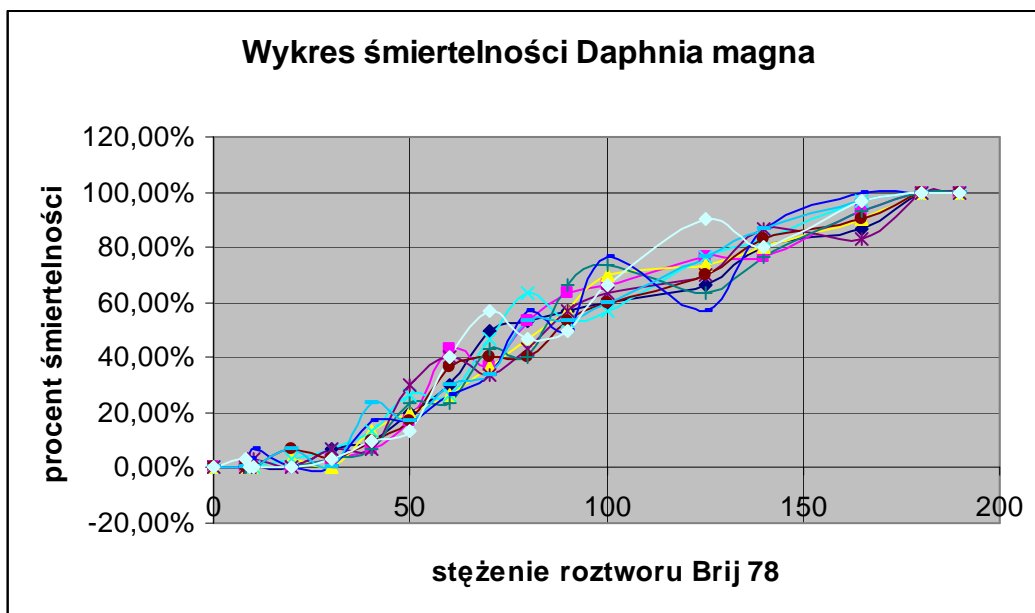
5. Wyniki testów toksyczności dla Brij 78.

<b>(Daphnia magna) Brij 78</b>										
<b>STĘŻENIE mg/l</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>180</b>	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
<b>165</b>	26	28	27	29	25	27	28	30	29	29
<b>140</b>	24	23	24	25	26	25	23	26	26	24
<b>125</b>	20	23	22	23	21	21	19	17	23	27
<b>100</b>	18	20	21	17	19	18	22	23	18	20
<b>90</b>	17	19	17	16	17	16	20	15	16	15
<b>80</b>	16	16	14	19	13	12	12	17	16	14
<b>70</b>	15	11	11	14	10	12	13	10	10	17
<b>60</b>	9	13	8	8	12	11	7	8	9	12
<b>50</b>	6	5	6	8	9	5	7	5	5	4
<b>40</b>	3	2	4	4	2	3	2	5	7	3
<b>30</b>	2	1	0	2	2	1	1	0	0	1
<b>20</b>	0	0	1	1	0	2	0	0	2	0
<b>10</b>	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0
<b>9</b>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<b>8</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<b>Kontrola</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 29. Śmiertelność *Daphnia magna* dla różnych stężeń Brij 78 po okresie 24h.

Stężenie mg/l	Próba 1	Próba 2	Próba 3	Próba 4	Próba 5	Próba 6	Próba 7	Próba 8	Próba 9	Próba 10
1641,5	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
931	86,67%	93,33%	90,00%	96,67%	83,33%	90,00%	93,33%	100,00%	96,67%	96,67%
745	80,00%	76,67%	80,00%	83,33%	86,67%	83,33%	76,67%	86,67%	86,67%	80,00%
596	66,67%	76,67%	73,33%	76,67%	70,00%	70,00%	63,33%	56,67%	76,67%	90,00%
476	60,00%	66,67%	70,00%	56,67%	63,33%	60,00%	73,33%	76,67%	60,00%	66,67%
381	56,67%	63,33%	56,67%	53,33%	56,67%	53,33%	66,67%	50,00%	53,33%	50,00%
305	53,33%	53,33%	46,67%	63,33%	43,33%	40,00%	40,00%	56,67%	53,33%	46,67%
244	50,00%	36,67%	36,67%	46,67%	33,33%	40,00%	43,33%	33,33%	33,33%	56,67%
195	30,00%	43,33%	26,67%	26,67%	40,00%	36,67%	23,33%	26,67%	30,00%	40,00%
156	20,00%	16,67%	20,00%	26,67%	30,00%	16,67%	23,33%	16,67%	16,67%	13,33%
125	10,00%	6,67%	13,33%	13,33%	6,67%	10,00%	6,67%	16,67%	23,33%	10,00%
100	6,67%	3,33%	0,00%	6,67%	6,67%	3,33%	3,33%	0,00%	0,00%	3,33%
80	0,00%	0,00%	3,33%	3,33%	0,00%	6,67%	0,00%	0,00%	6,67%	0,00%
64	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,33%	0,00%	0,00%	6,67%	0,00%	0,00%
51,2	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,33%	0,00%	0,00%
41	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,33%
0	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Tab. 30. Procent śmiertelności *Daphnia magna* dla różnych stężeń Brij 78 po okresie 24h.



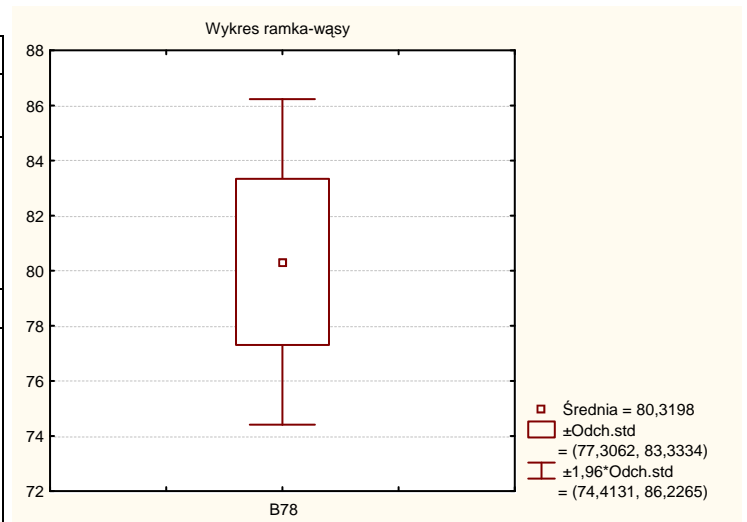
Ryc. 21. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności *Daphnia magna* dla poszczególnych stężeń Brij 78 w okresie 24h.

Stężenie	Śmiertelność % M1	$y_1 = \text{probit } M_1$	$x_1 = \lg C_1$ stężenie	Kwadrat $\lg$ stężenia $x_1^2$	iloczyn $\lg$ stężenia i probitu $x_1$ i $y_1$
180	100%	-	2,255273	5,086254	-
165	93%	6,50108595	2,217484	4,917235	14,41605
140	77%	5,72791329	2,146128	4,605866	12,29284
125	77%	5,72791329	2,0969	4,397	12,011
100	67%	5,4307273	2	4	10,861
90	63%	5,34069483	1,9542	3,8191	10,437
80	53%	5,08365173	1,9031	3,6218	9,6746
70	37%	4,65930517	1,8451	3,4044	8,5969
60	43%	4,832106	1,7782	3,1618	8,5922
50	17%	4,03257843	1,699	2,8865	6,8512
40	7%	3,49891405	1,6021	2,5666	5,6055
30	3%	3,16608536	1,4771	2,1819	4,6767
20	0%	-	1,301	1,6927	-
10	0%	-	1	1	-
9	0%	-	0,9542	0,9106	-
8	0%	-	0,9031	0,8156	-
0	0%	-	-	-	-
<b>suma</b>		<b>54,0009754</b>	<b>20,71926</b>	<b>39,56214</b>	<b>104,0154</b>
<b>średnie</b>		<b>4,90917958</b>	<b>1,883569</b>		
<b>współ reg – b</b>		<b>4,29265293</b>			
<b>LC50 =</b>		<b>80,3019 m/l</b>			

Tab. 31. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr2.

Obliczone współczynniki LC50		
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50
1	82,368	80,31 mg/l
2	82,559	
3	80,302	
4	82,438	
5	81,84	
6	82,794	
7	74,491	
8	77,621	
9	82,277	
10	76,51	
		Odch. Stand. <b>SD - 3,01</b>

Tab. 32. Wyznaczone wartości LC 50 – B78.



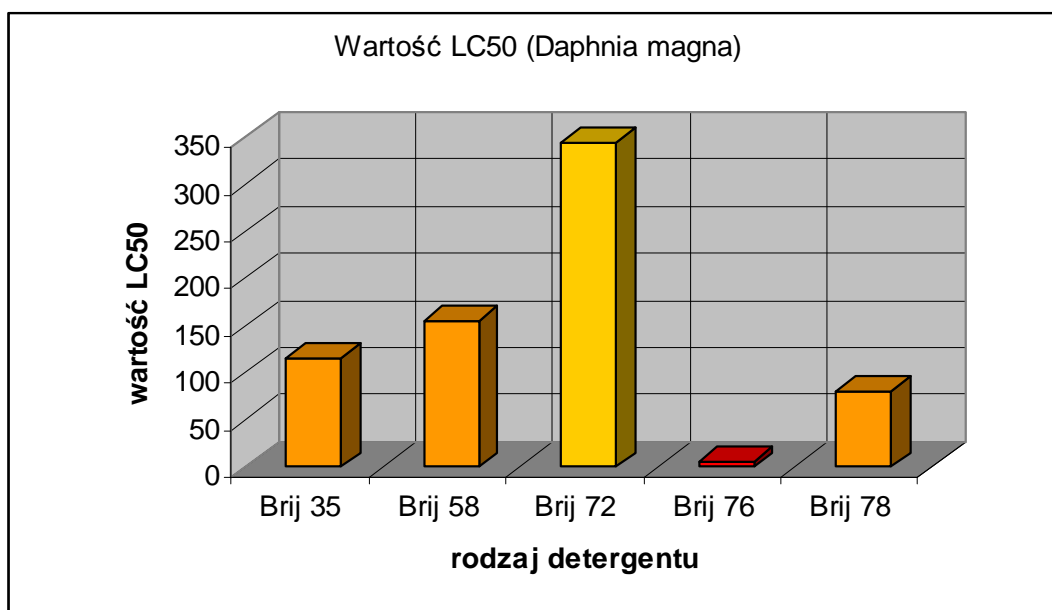
Ryc. 22. Wykres ramka – wąsy LC50 – B78.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Daphnia magna</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
Brij 78	80,31 mg/l	Średnio toksyczny	Szkodliwy	Umiarkowanie toksyczny

Tab. 33. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Daphnia magna*.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Daphnia magna</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
Brij 35	115,65 mg/l	słaba toksyczny	-	słabo toksyczny
Brij 58	155,59 mg/l	słaba toksyczny	-	słabo toksyczny
Brij 72	344,72 mg/l	słaba toksyczny	-	słabo toksyczny
Brij 76	5,72 mg/l	Silnie toksyczny	Toksyczny	Umiarkowanie toksyczny
Brij 78	80,31 mg/l	Średnio toksyczny	Szkodliwy	Umiarkowanie toksyczny

Tab. 34. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Daphnia magna*.



Ryc. 23. Wykres wartości współczynników dla testowanych detergentów.

## II. Badanie wpływu detergentu Ludwik na śmiertelność *Daphnia magna* Straus.

**Cel badania:** określenie toksyczności ostrej wpływu detergentu ludwik (mieszanina anionowo czynnych SPC) dla *Daphnia magna* Strauss w okresie 24h, wyznaczenie zakresu stężeń bezpiecznych oraz współczynnika LC50.

Wynik doświadczenia:

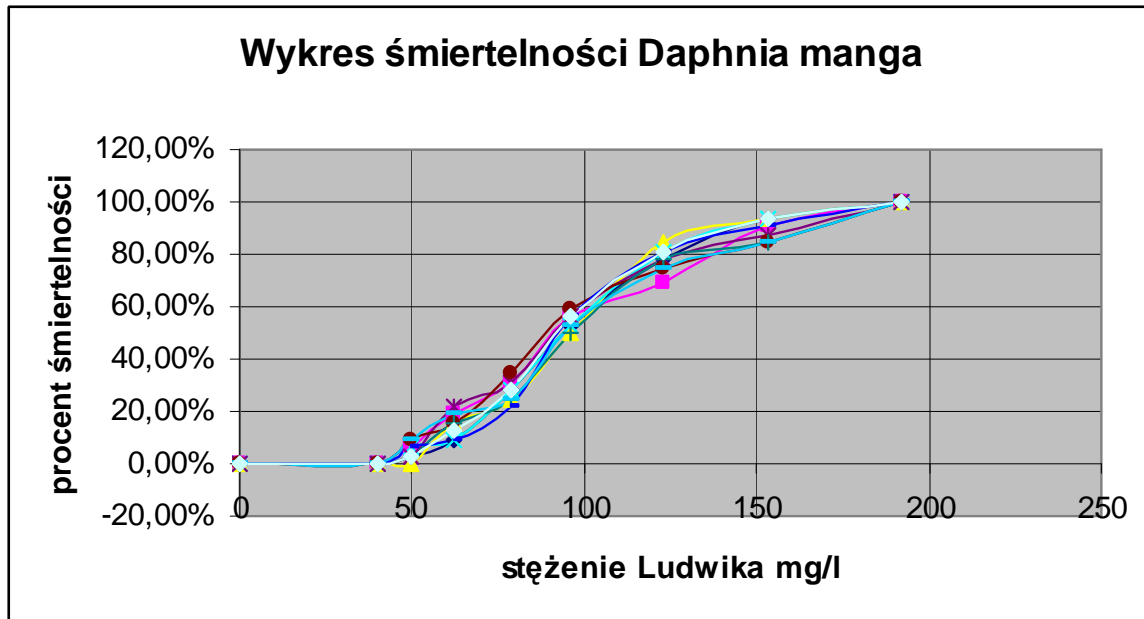
Test śmiertelności 24h

Ludwik stężenie	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
192 mg/l	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
153,6 mg/l	30	29	30	30	28	27	20	29	27	30
122,8 mg/l	25	22	27	26	25	24	25	26	24	26
96 mg/l	17	18	16	17	18	19	16	18	17	18
78,72 mg/l	9	10	8	9	10	11	8	7	8	9
62,4 mg/l	3	6	5	3	7	5	5	3	6	4
49,9 mg/l	1	2	0	2	1	3	1	2	3	1
40,3 mg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrola	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Śmiertelność próby</b>										

Tab. 35. Śmiertelność *Daphnia magna* dla różnych stężeń detergentu ludwik po okresie 24h.

Stężenie mg/l	Próba 1	Próba 2	Próba 3	Próba 4	Próba 5	Próba 6	Próba 7	Próba 8	Próba 9	Próba 10
192	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
153,6	93,75%	90,63%	93,75%	93,75%	87,50%	84,38%	62,50%	90,63%	84,38%	93,75%
122,8	78,13%	68,75%	84,38%	81,25%	78,13%	75,00%	78,13%	81,25%	75,00%	81,25%
96	53,13%	56,25%	50,00%	53,13%	56,25%	59,38%	50,00%	56,25%	53,13%	56,25%
78,72	28,13%	31,25%	25,00%	28,13%	31,25%	34,38%	25,00%	21,88%	25,00%	28,13%
62,4	9,38%	18,75%	15,63%	9,38%	21,88%	15,63%	15,63%	9,38%	18,75%	12,50%
49,9	3,13%	6,25%	0,00%	6,25%	3,13%	9,38%	3,13%	6,25%	9,38%	3,13%
40,3	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
0	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Tab. 36. Procent śmiertelności *Daphnia magna* dla różnych stężeń detergentu ludwik po okresie 24h.



Ryc. 24. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności *Daphnia magna* dla poszczególnych stężeń detergentu w okresie 24h.

**Określenie wartości stałych:**

- Iloraz postępu geometrycznego rozcieńczeń  $q = 1,25$  (wytypowany w testach *screen*).
- Liczba powtórzeń 5,
- Temp. otoczenia;  $22,5^{\circ}\text{C} - 23^{\circ}\text{C}$ .
- Temp. wody w badanych próbach;  $21,5^{\circ}\text{C}$
- Okres testu 24h
- Wartość pH roztworów =  $7 \pm 0,5$
- Długość światło/nocy – 15/9h

**Wyznaczenie współczynnika LC 50% /24h:**

*Metoda probitowa dla obliczeń stężenia letalnego LC50:*

Obliczenie stężenia letalnego LC50:

*Wartość stężenia LC50 dla związku chemicznego określa się w mg/l dla wód i ścieków w procentach:*

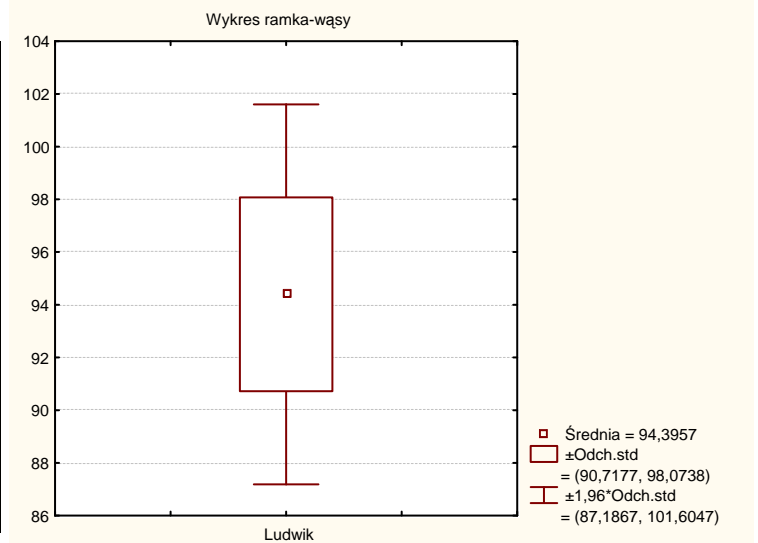
$$LC50 = N \lg \frac{5 - \bar{y} + b\bar{x}}{b}$$



Stężenie	Śmiertelność % M1	$y_1 = \text{probit } M_1$	$x_1 = \lg C_1$ stężenie	Kwadrat lg stężenia $x_1^2$	iloczyn lg stężenia i probitu $x_1$ i $y_1$
192	100%	-	2,283301	5,213465	-
153,6	91%	6,3180109	2,186391	4,780307	13,81364
122,8	69%	5,48877641	2,089198	4,36475	11,46714
96	56%	5,15731068	1,9823	3,9294	10,223
78,72	31%	4,51122359	1,8961	3,5951	8,5537
62,4	19%	4,11285344	1,7952	3,2227	7,3833
49,9	6%	3,46587946	1,6981	2,8835	5,8854
40,3	0%	-	1,6053	2,577	-
0	%	-	-	-	-
<b>suma</b>		29,0540545	11,64723	22,77583	57,32638
<b>średnie</b>		4,84234241	1,941205		
<b>współ reg – b = 5,57587799</b>					
<b>LC50 = 93,21378 mg/l</b>					

Tab. 37. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr3.

Obliczone współczynniki LC50		
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50
1	94,6	94,39 mg/l
2	92,8	
3	93,2	
4	104,2	
5	92,2	Odch. Stand.
6	94,2	SD - 3,67
7	94,0	
8	95,1	
9	90,9	
10	92,3	



Tab: 38. Wyznaczone wartości LC50: Ludwik. Ryc. 25. Wykres ramka wąsy LC50: Ludwik.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Daphnia magna</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
Ludwik	94,39 mg/l	Średnio toksyczny	Szkodliwy	Umiarkowanie toksyczny

Tab. 39. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Daphnia magna*.

### III: Badanie wpływu soli – chlorków: sodu, potasu, wapnia i magnezu na śmiertelność

#### *Daphnia magna.*

**Cel badania:** określenie toksyczności ostrej wpływu w/w związków chemicznych dla form młodocianych *Lymnaea stagnalis* L. w okresie 24h, wyznaczenie zakresu stężeń bezpiecznych oraz współczynnika LC50.

*Do testów wytypowano stadia młodociane Daphnia magna będące w dobrej formie, nie wykazujące oznak chorobotwórczych oraz zaburzeń rozwojowych.*

#### Określenie wartości stałych dla testów:

- **Iloraz postępu geometrycznego rozcieńczeń  $q = 1,25$**  (wyznaczony w testach screen).
- **Liczba powtórzeń 10,**
- **Temp. otoczenia; 22,5°C – 23°C.**
- **Temp. wody w badanych próbach; 21,5°C**
- **Okres testu 24h**
- **Długość światła/nocy – 16/8h**

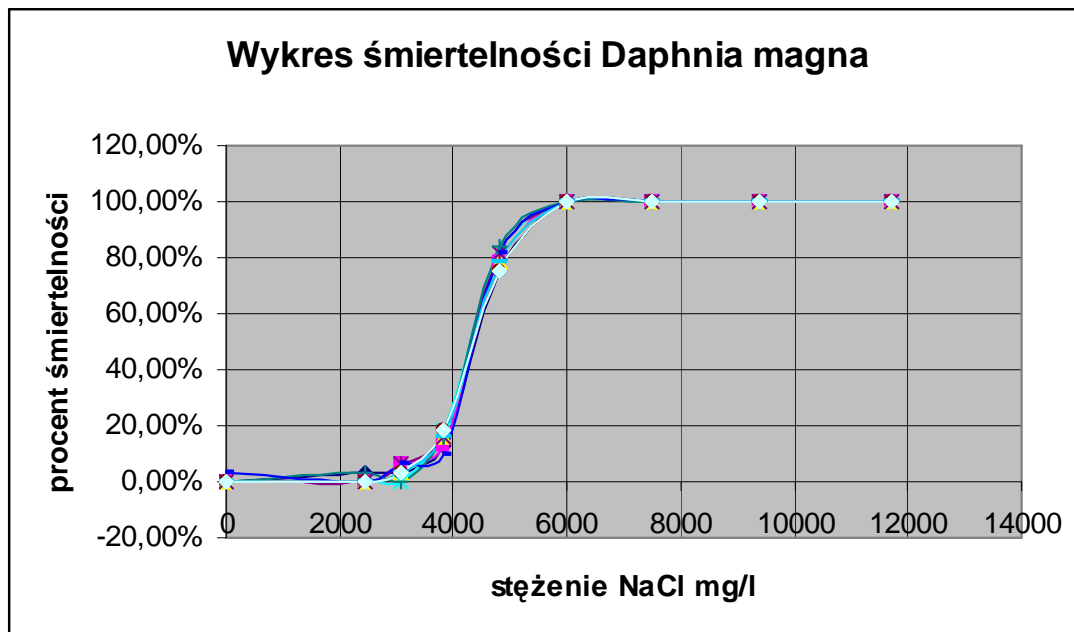
#### 1. Wyniki dla NaCl

NaCl nr. próby	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Stężenie										
11718,75 mg/l	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
9375 mg/l	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
7500 mg/l	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
6000 mg/l	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
4008 mg/l	24	25	25	26	26	24	27	26	25	24
3840 mg/l	4	4	5	6	5	6	5	3	5	6
3072 mg/l	1	2	1	0	2	1	0	2	1	1
2457 mg/l	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
KONTROLA	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	<b>Śmiertelność próby</b>									

Tab. 40. Śmiertelność *Daphnia magna* dla różnych stężeń Chlorku sodu po okresie 24h.

Stężenie mg/l	Próba 1	Próba 2	Próba 3	Próba 4	Próba 5	Próba 6	Próba 7	Próba 8	Próba 9	Próba 10
11718	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
9375	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
7500	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
6000	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
4800	75,00%	78,13%	78,13%	81,25%	81,25%	75,00%	84,38%	81,25%	78,13%	75,00%
3840	12,50%	12,50%	15,63%	18,75%	15,63%	18,75%	15,63%	9,38%	15,63%	18,75%
3072	3,13%	6,25%	3,13%	0,00%	6,25%	3,13%	0,00%	6,25%	3,13%	3,13%
2457,6	3,13%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%	0,00%	0,00%
0	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%	0,00%

Tab. 41. Procent śmiertelności embrionów dla różnych stężeń NaCl po okresie 24h.



Ryc. 26. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności Daphnia magna dla poszczególnych stężeń NaCl w okresie 24h.

**Wyznaczenie współczynnika LC 50% /24h:**

*Metoda probitowa dla obliczeń stężenia letalnego LC50:*

Obliczenie stężenia letalnego LC50:

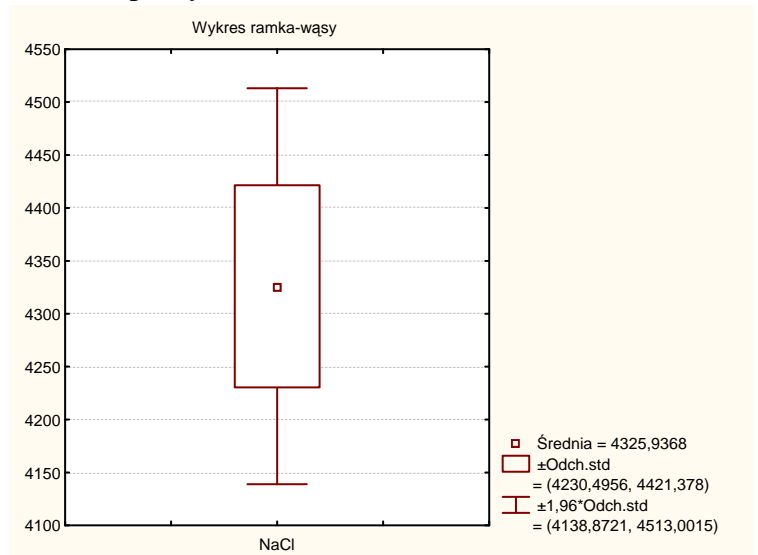
*Wartość stężenia LC50 dla związku chemicznego określa się w mg/l dla wód i ścieków w procentach:*

$$LC50 = N \lg \frac{5 - \bar{y} + b\bar{x}}{b}$$

Stężenie mg/l	Śmiertelność próby	Śmiertelność % M1	$y_1 = \text{probit } M_1$	$x_1 = \lg C_1$ stężenie	Kwadrat $\lg$ stężenia $x_1^2$	iloczyn $\lg$ stężenia i probitu $x_1$ i $y_1$
11718,75	32	100,00%	-	4,068881	16,55579495	-
9375	32	100,00%	-	3,971971	15,77655582	-
7500	32	100,00%	-	3,875061	15,0160998	-
6000	32	100,00%	-	3,7782	14,274427	-
4800	25	78,13%	5,77642176	3,6812	13,551537	21,264402
3840	4	12,50%	3,84965062	3,5843	12,84743	13,798423
3072	2	6,25%	3,46587946	3,4874	12,162107	12,086982
2457,6	0	0,00%	-	3,3905	11,495566	-
0	0	0,00%	-	-	-	-
<b>Suma</b>			<b>13,0919518</b>	<b>10,75299</b>	<b>38,56107408</b>	<b>47,14980644</b>
<b>Średnie</b>			<b>4,36398395</b>	<b>3,584331</b>		
			<b>współ reg – b = 11,9210711</b>			
			<b>LC50 = 4341,937 mg/l</b>			

Tab. 42. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr2.

Obliczone współczynniki LC50			
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50	
1	4551,5	4325,9 mg/l	
2	4341,9		
3	4321,6		
4	4293,3		
5	4251,5		Odch. Stand.
6	4336,9		SD - 95,44
7	4171,3		
8	4332,7		
9	4321,6		
10	4336,9		



Tab. 43. Wyznaczone wartości LC50 – NaCl. Ryc. 27. Wykres ramka – wąsy LC50 –NaCl.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Daphnia magna</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
NaCl	4325,9 mg/l	Zaledwie toksyczny	-	słabo toksyczny

Tab. 44. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Daphnia magna*.

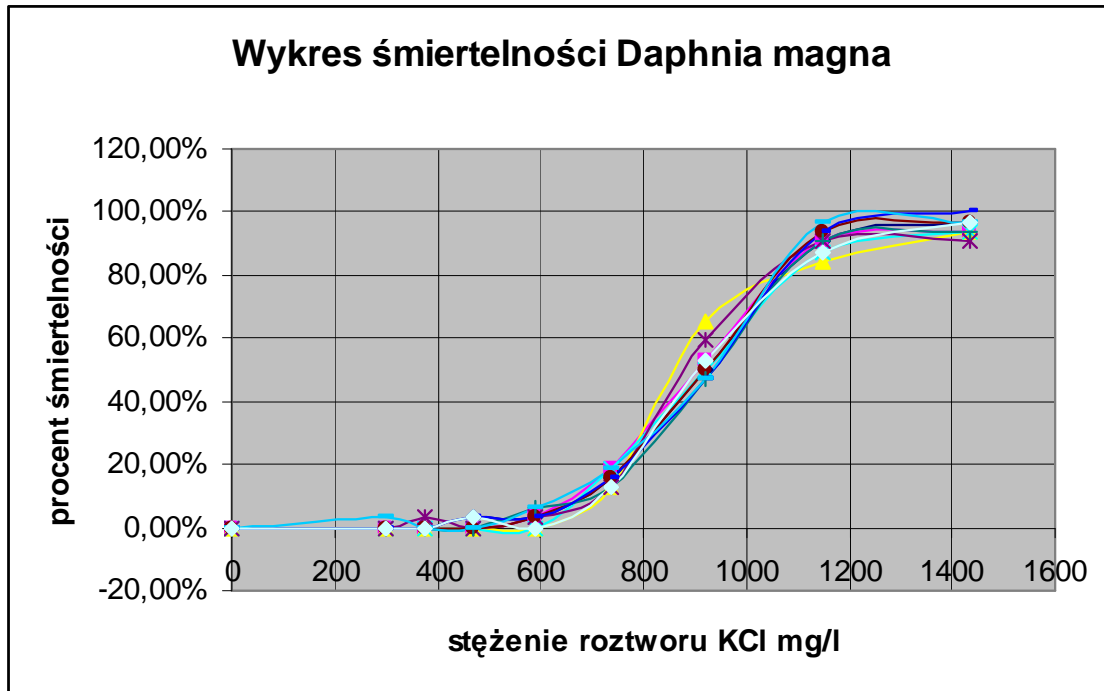
2. Wyniki dla KCl

KCl nr. próby	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Stężenie										
1433,6 mg/l	31	30	30	30	29	31	30	32	31	31
1150 mg/l	29	29	27	28	29	30	29	30	31	28
920 mg/l	16	17	21	16	19	16	15	15	15	17
736 mg/l	5	6	4	6	4	5	4	5	6	4
588,8 mg/l	1	1	0	0	1	1	2	1	2	0
471,04 mg/l	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1
376,832 mg/l	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
301,46 mg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
KONTROLA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Śmiertelność próby</b>										

Tab. 45. Śmiertelność *Daphnia magna* dla różnych stężeń Chlorku potasu po okresie 24h.

Stężenie mg/l	Próba 1	Próba 2	Próba 3	Próba 4	Próba 5	Próba 6	Próba 7	Próba 8	Próba 9	Próba 10
1433,6	96,88%	93,75%	93,75%	93,75%	90,63%	96,88%	93,75%	100,00%	96,88%	96,88%
1150	90,63%	90,63%	84,38%	87,50%	90,63%	93,75%	90,63%	93,75%	96,88%	87,50%
920	50,00%	53,13%	65,63%	50,00%	59,38%	50,00%	46,88%	46,88%	46,88%	53,13%
736	15,63%	18,75%	12,50%	18,75%	12,50%	15,63%	12,50%	15,63%	18,75%	12,50%
588,8	3,13%	3,13%	0,00%	0,00%	3,13%	3,13%	6,25%	3,13%	6,25%	0,00%
471	3,13%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%	3,13%
376,8	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
301,4	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%
0	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Tab. 46. Procent śmiertelności embrionów dla różnych stężeń KCl po okresie 24h.



Ryc. 28. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności Daphnia magna dla poszczególnych stężeń KCl w okresie 24h.

**Wyznaczenie współczynnika LC 50% /24h:**

*Metoda probitowa dla obliczeń stężenia letalnego LC50:*

Obliczenie stężenia letalnego LC50:

*Wartość stężenia LC50 dla związku chemicznego określa się w mg/l dla wód i ścieków w procentach:*

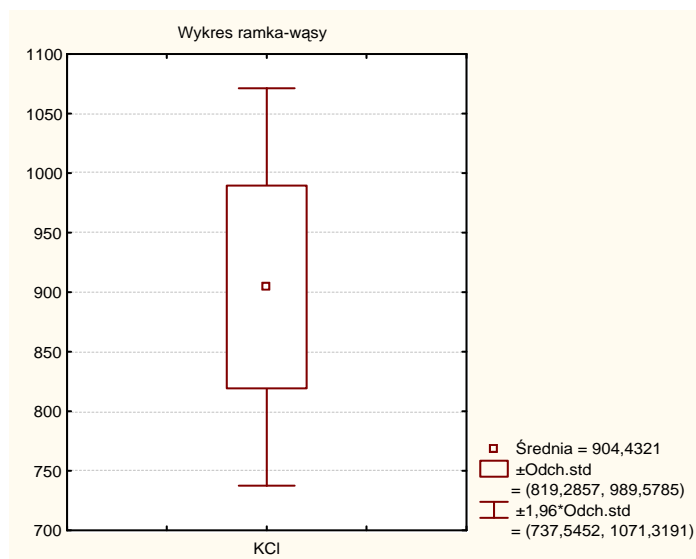
$$LC50 = N \lg \frac{5 - \bar{y} + b\bar{x}}{b}$$

Lp	Stężenie mg/l	Śmiertelność próby	Śmiertelność % M1	y <sub>1</sub> = probit M <sub>1</sub>	x <sub>1</sub> = lg C <sub>1</sub> stężenie	Kwadrat lg stężenia x <sub>1</sub> <sup>2</sup>	iloczyn lg stężenia i probitu x <sub>1</sub> i y <sub>1</sub>
1	1433,6	30	93,75%	6,53412054	3,156428	9,963038	20,62448
2	1150	29	90,63%	6,3180109	3,060698	9,367871	19,33752
3	920	17	53,13%	5,07841241	2,963788	8,784038	15,05134
4	736	6	18,75%	4,11285344	2,8669	8,219	11,791
5	588,8	1	3,13%	3,13726813	2,77	7,6727	8,6901
6	471,04	0	0,00%	-	2,6731	7,1452	-
7	376,832	0	0,00%	-	2,5761	6,6365	-
8	301,466	0	0,00%	-	2,4792	6,1466	-
9	0	0	0,00%	-	-	-	-
Suma				25,1806654	14,81776	44,00666	75,49452
Średnie				5,03613309	2,963552		
				współ Reg - b = 9,31221216			
				LC50 = 911,3216 mg/l			

Tab. 47. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr4.

Obliczone współczynniki LC50		
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50
1	823,64	904 mg/l
2	911,32	
3	1106,5	
4	911,32	
5	916,06	
6	912,87	Odch. Stand.
7	776,15	SD - 85,15
8	898,29	
9	915,27	
10	872,94	

Tab. 48. Wyznaczone wartości LC50: KCl.



Ryc. 29. Wykres ramka wąsy LC50 – KCl.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Daphnia magna</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
KCl	904 mg/l	Słabo toksyczny	-	Słabo toksyczny

Tab. 49. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Daphnia magna*.

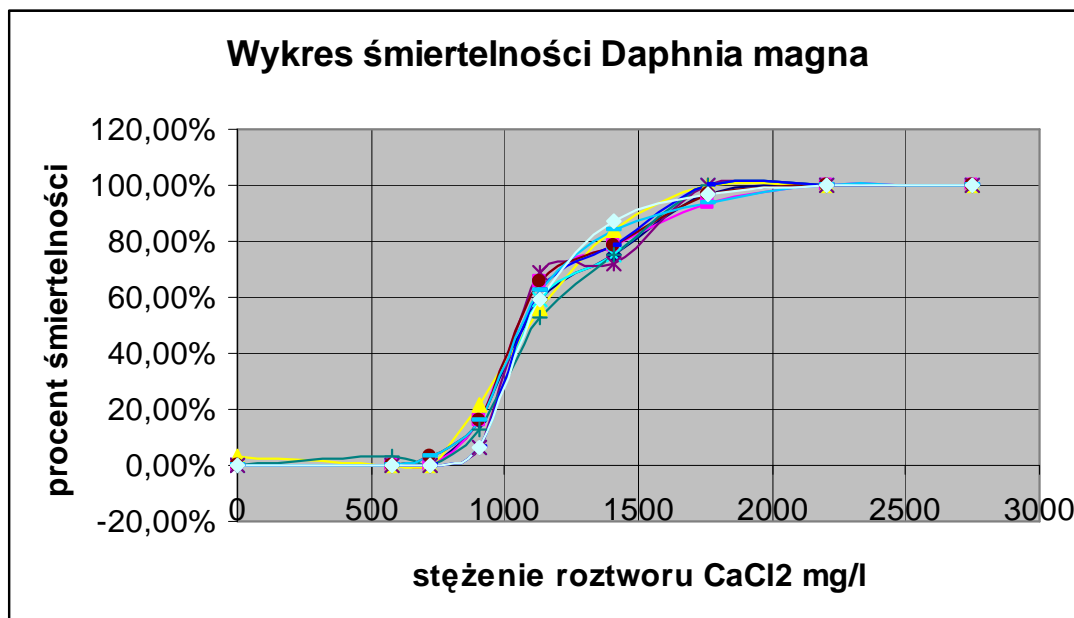
### 3. Wyniki dla CaCl<sub>2</sub>

CaCl <sub>2</sub> nr. próby	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
stężenie										
2752,5 mg/l	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
2202 mg/l	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
1761 mg/l	31	30	32	32	32	31	32	32	30	31
1409 mg/l	24	25	27	24	23	25	24	25	27	28
1127 mg/l	19	21	18	19	22	21	17	20	20	19
901,9 mg/l	5	5	7	2	2	5	4	2	5	2
721,5 mg/l	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
577,2 mg/l	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
KONTROLA	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Śmiertelność próby										

Tab. 50. Śmiertelność *Daphnia magna* dla różnych stężeń chlorku wapnia po okresie 24h.

Stężenie mg/l	Próba 1	Próba 2	Próba 3	Próba 4	Próba 5	Próba 6	Próba 7	Próba 8	Próba 9	Próba 10
2752	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
2202	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
1761	96,88%	93,75%	100,00%	100,00%	100,00%	96,88%	100,00%	100,00%	93,75%	96,88%
1409	75,00%	78,13%	84,38%	75,00%	71,88%	78,13%	75,00%	78,13%	84,38%	87,50%
1127	59,38%	65,63%	56,25%	59,38%	68,75%	65,63%	53,13%	62,50%	62,50%	59,38%
901	15,63%	15,63%	21,88%	6,25%	6,25%	15,63%	12,50%	6,25%	15,63%	6,25%
721	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%
577	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%	0,00%	0,00%
0	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Tab. 51. Procent śmiertelności embrionów dla różnych stężeń CaCl<sub>2</sub> po okresie 24h.



Ryc. 30. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności Daphnia magna dla poszczególnych stężeń CaCl<sub>2</sub> w okresie 24h.

Wyznaczenie współczynnika LC 50% /24h:

*Metoda probitowa dla obliczeń stężenia letalnego LC50:*

Obliczenie stężenia letalnego LC50:

*Wartość stężenia LC50 dla związku chemicznego określa się w mg/l dla wód i ścieków w procentach:*

$$LC50 = N \lg \frac{5 - \bar{y} + b\bar{x}}{b}$$

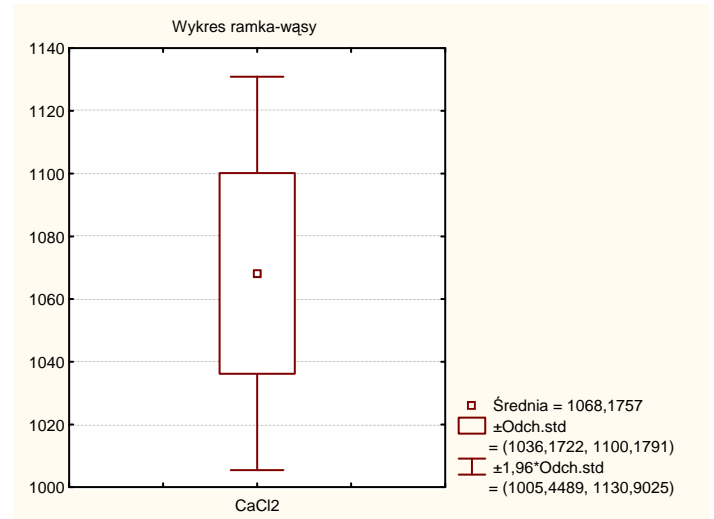


Lp	Stężenie mg/l	Śmiertelność próby	Śmiertelność % M1	$y_1 = \text{probit } M_1$	$x_1 = \lg C_1$ stężenie	Kwadrat $\lg$ stężenia $x_1^2$	Iloczyn $\lg$ stężenia i probitu $x_1$ i $y_1$
1	2752,5	32	100,00%	-	3,439727328	11,83172409	-
2	2202,01	32	100,00%	-	3,342819218	11,17444032	-
3	1761,608	31	96,88%	6,86273187	3,245909195	10,5359265	22,27580447
4	1409,286	24	75,00%	5,67448975	3,148999	9,916196	17,868964
5	1127,429	19	59,38%	5,23720211	3,052089	9,315248	15,984408
6	901,9431	5	15,63%	3,99000983	2,955179	8,733084	11,791194
7	721,5546	0	0,00%	-	2,858269	8,169703	-
8	5772	0	0,00%	-	3,761326	14,14758	-
9	0	0	0,00%	-	-	-	-
<b>Suma</b>				21,7644336	12,4021767	38,50045449	67,92036977
<b>Średnie</b>				5,44110839	3,100544175		
<b>współ Reg - b = 9,34418794</b>							
<b>LC50 = 1130,674 mg/l</b>							

Tab. 52. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr1.

Obliczone współczynniki LC50		
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50
1	1130,7	<b>1141 mg/l</b>
2	1119,5	
3	1091,3	
4	1175,7	
5	1165	
6	1118,3	Odch. Stand.
7	1164,6	<b>SD - 32,00</b>
8	1159,8	
9	1129,7	
10	1156,4	

Tab. 53. Wyznaczone wartości LC50 CaCl.



Ryc. 31. Wykres ramka wąsy LC50 – CaCl.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Daphnia magna</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
CaCl <sub>2</sub>	1141 mg/l	zaledwie toksyczny	-	Słabo toksyczny

Tab. 54. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Daphnia magna*.

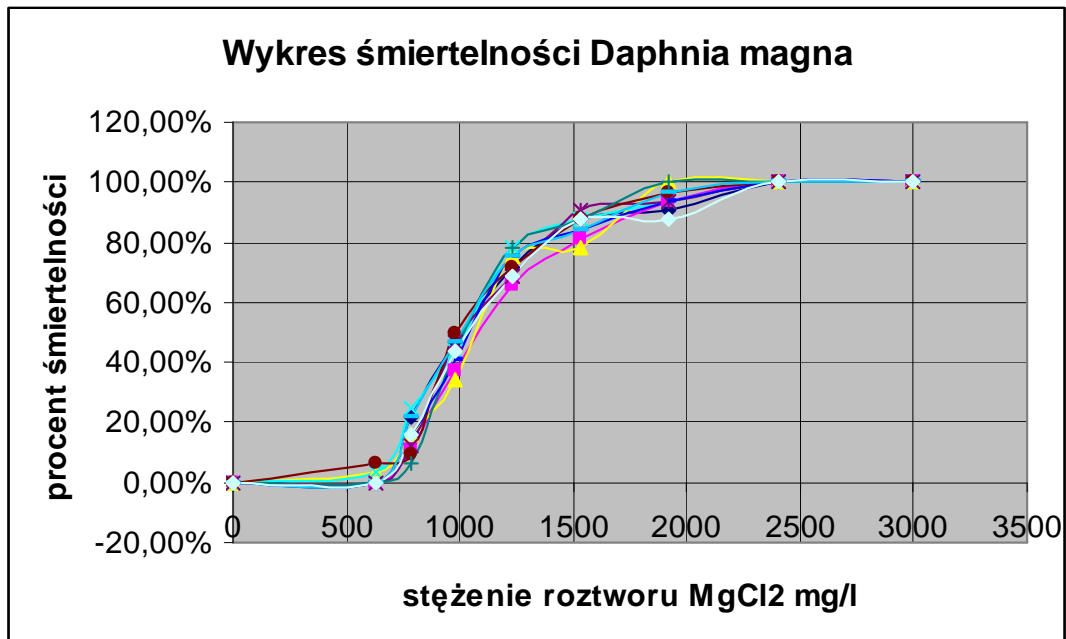
4. Wyniki dla MgCl<sub>2</sub>

MgCl <sub>2</sub> nr. próby	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
stężenie										
4687,5 mg/l	0	32	32	32	32	32	32	32	32	32
3750 mg/l	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
3000 mg/l	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
2400 mg/l	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
1920 mg/l	29	30	32	30	30	31	32	30	31	28
1536 mg/l	28	26	25	28	29	28	28	27	27	28
1228,8 mg/l	23	21	24	25	22	23	25	24	24	22
983,04 mg/l	15	12	11	14	15	16	14	13	15	14
786 mg/l	7	4	5	8	4	3	2	5	7	5
629mg/l	0	0	1	1	0	2	0	0	0	0
KONTROLA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 55. Śmiertelność *Daphnia magna* dla różnych stężeń chlorku magnezu po okresie 24h.

Stężenie mg/l	Próba 1	Próba 2	Próba 3	Próba 4	Próba 5	Próba 6	Próba 7	Próba 8	Próba 9	Próba 10
4687,5	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
3750	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
3000	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
2400	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
1920	90,63%	93,75%	100,00%	93,75%	93,75%	96,88%	100,00%	93,75%	96,88%	87,50%
1536	87,50%	81,25%	78,13%	87,50%	90,63%	87,50%	87,50%	84,38%	84,38%	87,50%
1228	71,88%	65,63%	75,00%	78,13%	68,75%	71,88%	78,13%	75,00%	75,00%	68,75%
983	46,88%	37,50%	34,38%	43,75%	46,88%	50,00%	43,75%	40,63%	46,88%	43,75%
786	21,88%	12,50%	15,63%	25,00%	12,50%	9,38%	6,25%	15,63%	21,88%	15,63%
629	0,00%	0,00%	3,13%	3,13%	0,00%	6,25%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
0	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Tab. 56. Procent śmiertelności embrionów dla różnych stężeń MgCl<sub>2</sub> po okresie 24h.

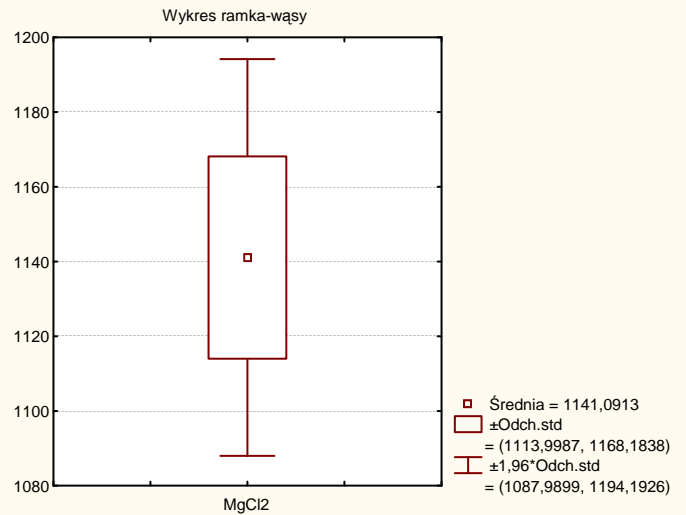


Ryc. 32. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności *Daphnia magna* dla poszczególnych stężeń  $MgCl_2$  w okresie 24h.

Lp	Stężenie mg/l wartość średnia	Śmiertelność próby	Śmiertelność % M1	$y_1 = \text{probit}$ $M_1$	$x_1 = \lg C_1$ stężenie	Kwadrat $\lg$ stężenia $x_1^2$	iloczyn $\lg$ stężenia i probitu $x_1$ i $y_1$
1	4687,5	32	100,00%	-	3,670941	13,47580989	-
2	3750	32	100,00%	-	3,574031	12,7736995	-
3	3000	32	100,00%	-	3,477121	12,09037222	-
4	2400	32	100,00%	-	3,380211	11,42582804	-
5	1920	30	93,75%	6,53412054	3,283301	10,78006696	21,45348601
6	1536	27	84,38%	6,00999017	3,186391	10,15308898	19,15017988
7	1228,8	24	75,00%	5,67448975	3,089481	9,544894102	17,53122942
8	983,04	13	40,63%	4,76279789	2,992571	8,955482325	14,25301175
9	786,432	5	15,63%	3,99000983	2,895661	8,38485365	11,55371656
10	629,1456	0	0,00%	-	2,798751	7,833008076	-
11	0	0	0,00%	-	-	-	-
Suma				26,9714082	15,44741	47,81838602	83,94162362
Średnie				5,39428164	3,089481		
współ reg - b =				6,53741911			
LC50 =				1069,473 mg/l			

Tab. 57. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr1.

Obliczone współczynniki LC50		
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50
1	1025,7	1068 mg/l
2	1120,9	
3	1105	
4	1053,2	
5	1069	
6	1057,5	Odch. Stand.
7	1083,1	SD - 27,09
8	1069,5	
9	1017,5	
10	1080,5	



Tab. 58. Wyznaczone wartości LC50 MgCl. Ryc. 33. Wykres ramka wąsy LC50 – MgCl.

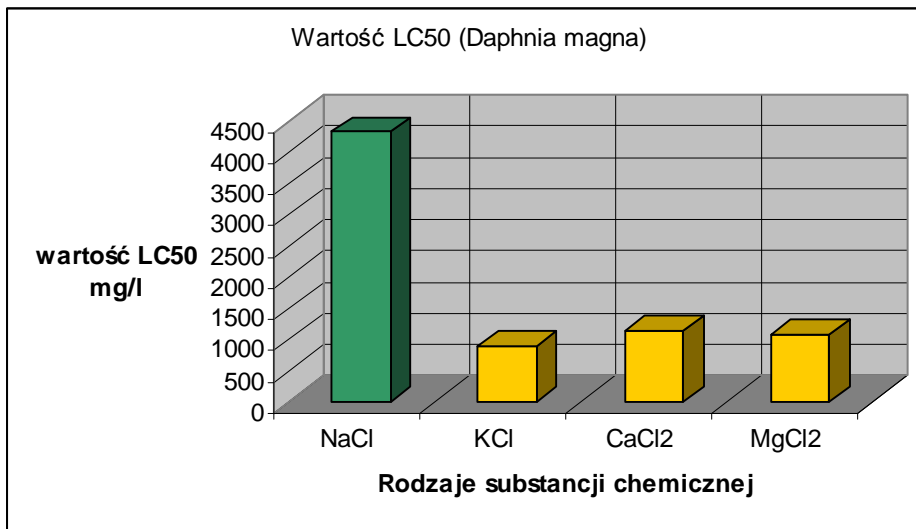
Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Daphnia magna</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
MgCl <sub>2</sub>	1068 mg/l	zaledwie toksyczny	-	Słabo toksyczny

Tab. 59. ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Daphnia magna*.

Porównanie współczynników LC50.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Daphnia magna</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
NaCl	4325,9 mg/l	Zaledwie toksyczny	-	słabo toksyczny
KCl	904 mg/l	Słabo toksyczny	-	Słabo toksyczny
CaCl <sub>2</sub>	1141 mg/l	zaledwie toksyczny	-	Słabo toksyczny
MgCl <sub>2</sub>	1068 mg/l	zaledwie toksyczny	-	Słabo toksyczny

Tab. 60. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Daphnia magna*.



Ryc. 34. Wykres wartości LC50/24 dla chlorków.

**IV: Badanie wpływu kwasów siarkowego (VI) i azotowego (V) oraz amoniaku na śmiertelność form młodocianych *Daphnia magna* Straus.**

**Cel badania:** określenie toksyczności ostrej wpływu w/w związków chemicznych dla form młodocianych *Daphnia magna* w okresie 24h, wyznaczenie zakresu stężeń bezpiecznych oraz współczynnika LC50.

*Do testów wytypowano formy młodociane *Daphnia magna* do 24h będące w dobrej formie, nie wykazujące oznak chorobotwórczych oraz zaburzeń rozwojowych.*

**Określenie wartości stałych dla testów:**

- **Poraz postępu geometrycznego rozcieńczeń  $q = 1,25$**  (wyznaczony w testach screen).
- **Liczba powtórzeń 10,**
- **Liczba osobników w teście 32**
- **Temp. otoczenia; 22,5°C – 23°C.**
- **Temp. wody w badanych próbach; 21,5°C**
- **Okres testu 24h**
- **Długość światło/nocy – 16/8h**

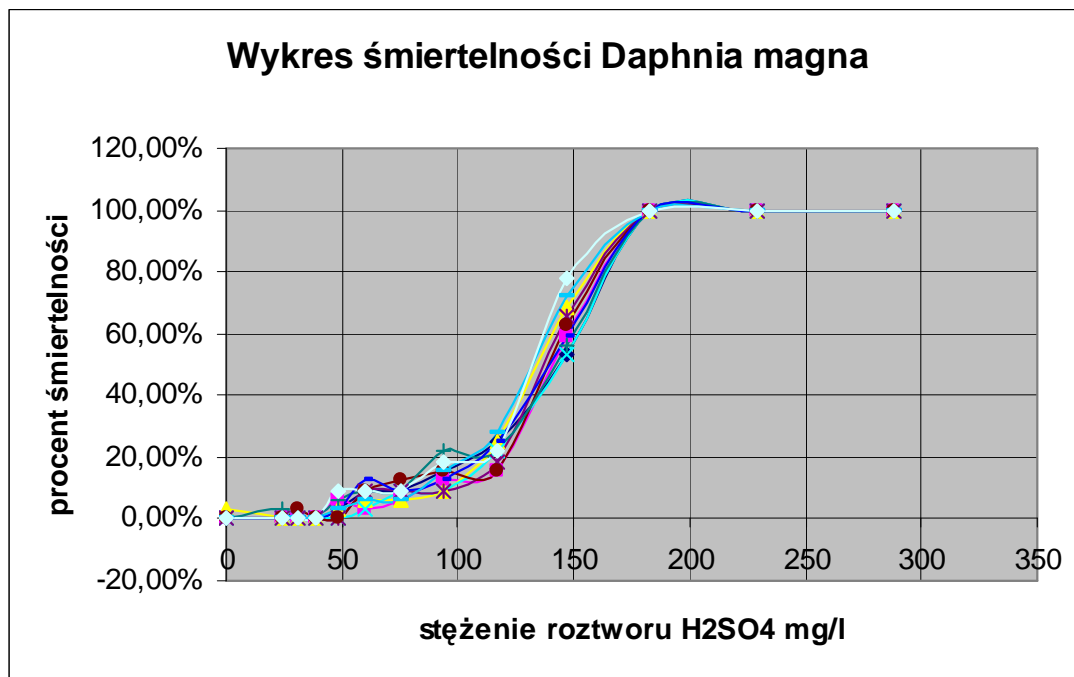
**6. Wyniki testów toksyczności dla H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.**

H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> nr. próby stężenie	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
288,10 mg/l	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
228,88mg/l	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
183,10mg/l	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
146,48mg/l	17	19	22	17	21	20	18	19	23	25
117,18g/l	8	5	8	7	6	5	7	8	9	7
93,75 mg/l	5	4	3	3	3	5	7	4	5	6
75 mg/l	3	2	2	3	3	4	3	3	2	3
60 mg/l	3	1	2	1	3	3	3	4	2	3
48 mg/l	1	2	1	0	0	0	2	1	1	3
38,4 mg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30,72 mg/l	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
24,57 mg/l	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
KONTROLA	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

**Tab. 61. Śmiertelność *Daphnia magna* dla różnych stężeń H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> po okresie 24h.**

Stężenie mg/l	Próba 1	Próba 2	Próba 3	Próba 4	Próba 5	Próba 6	Próba 7	Próba 8	Próba 9	Próba 10
288,10	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
228,88	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
183,10	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
146,48	53,13%	59,38%	68,75%	53,13%	65,63%	62,50%	56,25%	59,38%	71,88%	78,13%
117,18	25,00%	15,63%	25,00%	21,88%	18,75%	15,63%	21,88%	25,00%	28,13%	21,88%
93,75	15,63%	12,50%	9,38%	9,38%	9,38%	15,63%	21,88%	12,50%	15,63%	18,75%
75	9,38%	6,25%	6,25%	9,38%	9,38%	12,50%	9,38%	9,38%	6,25%	9,38%
60	9,38%	3,13%	6,25%	3,13%	9,38%	9,38%	9,38%	12,50%	6,25%	9,38%
48	3,13%	6,25%	3,13%	0,00%	0,00%	0,00%	6,25%	3,13%	3,13%	9,38%
38,4	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
30,72	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
24,57	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%	0,00%	0,00%
288,10	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Tab. 62. Procent śmiertelności *Daphnia magna* dla różnych stężeń H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> po okresie 24h.



Ryc. 35. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności *Daphnia magna* dla poszczególnych stężeń H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> w okresie 24h.

**Wyznaczenie współczynnika LC 50% /24h:**

Metoda probitowa dla obliczeń stężenia letalnego LC50:

Obliczenie stężenia letalnego LC50:

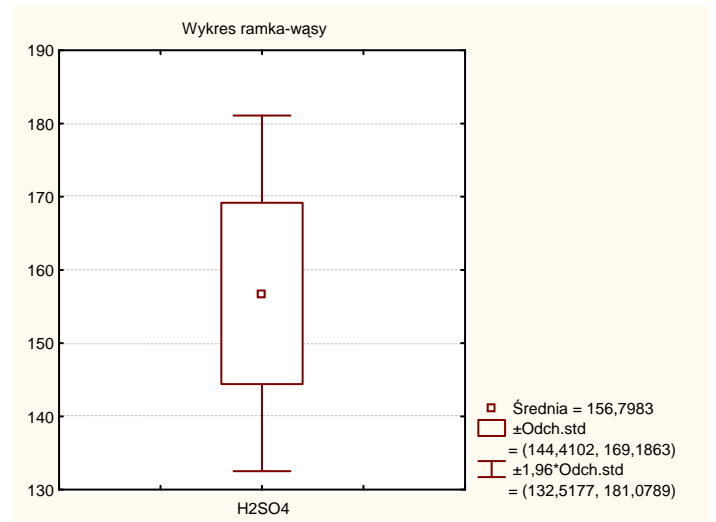
Wartość stężenia LC50 dla związku chemicznego określa się w mg/l dla wód i ścieków w procentach:

$$LC50 = N \lg \frac{5 - \bar{y} + b\bar{x}}{b}$$

Lp	Stężenie mg/l	Śmiertelność próby	Śmiertelność % M1	$y_1 = \text{probit } M_1$	$x_1 = \lg C_1$ stężenie	Kwadrat $\lg$ stężenia $x_1^2$	iloczyn $\lg$ stężenia i probitu $x_1$ i $y_1$
1	288,102	32	100,00%	-	2,45954672	6,04937005	-
2	228,882	32	100,00%	-	2,35961133	5,56776561	-
3	183,105	32	100,00%	-	2,26270131	5,11981723	-
4	146,484	17	53,13%	5,07841241	2,165791	4,690652	10,99878
5	117,188	7	21,88%	4,22357824	2,068881	4,28027	8,738082
6	93,75	3	9,38%	3,6819891	1,971971	3,888671	7,260777
7	75	3	9,38%	3,6819891	1,875061	3,515855	6,903955
8	60	1	3,13%	3,13726813	1,778151	3,161822	5,578537
9	48	0	0,00%	-	1,681241	2,826572	-
10	38,4	0	0,00%	-	1,584331	2,510105	-
11	30,72	0	0,00%	-	1,487421	2,212422	-
12	24,576	0	0,00%	-	1,3905112	1,93352139	-
Kontrola	0	0	0,00%	-	-	-	-
<b>Suma</b>				<b>19,803237</b>	<b>9,85985638</b>	<b>19,5372691</b>	<b>39,4801326</b>
<b>Średnie</b>				<b>3,9606474</b>	<b>1,97197128</b>		
<b>współ reg – b = 4,56493355</b>							
<b>LC50 = 158,3628 mg/l</b>							

Tab. 63. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr2.

Obliczone współczynniki LC50		
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50
1	178,62	156,09 mg/l
2	149,1	
3	158,36	
4	156,39	
5	161,7	
6	165,84	
7	158,55	
8	137,67	
9	138,67	
10	178,62	
		Odch. Stand.
		SD - 12,39



Tab. 64. Wyznaczone wartości LC50 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Ryc. 36. Wykres ramka wąsy LC50 – H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Daphnia magna</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	156,09 mg/l	słaba toksyczny	-	słabo toksyczny

Tab. 65. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Daphnia magna*.

7. Wyniki testów toksyczności dla HNO<sub>3</sub>.

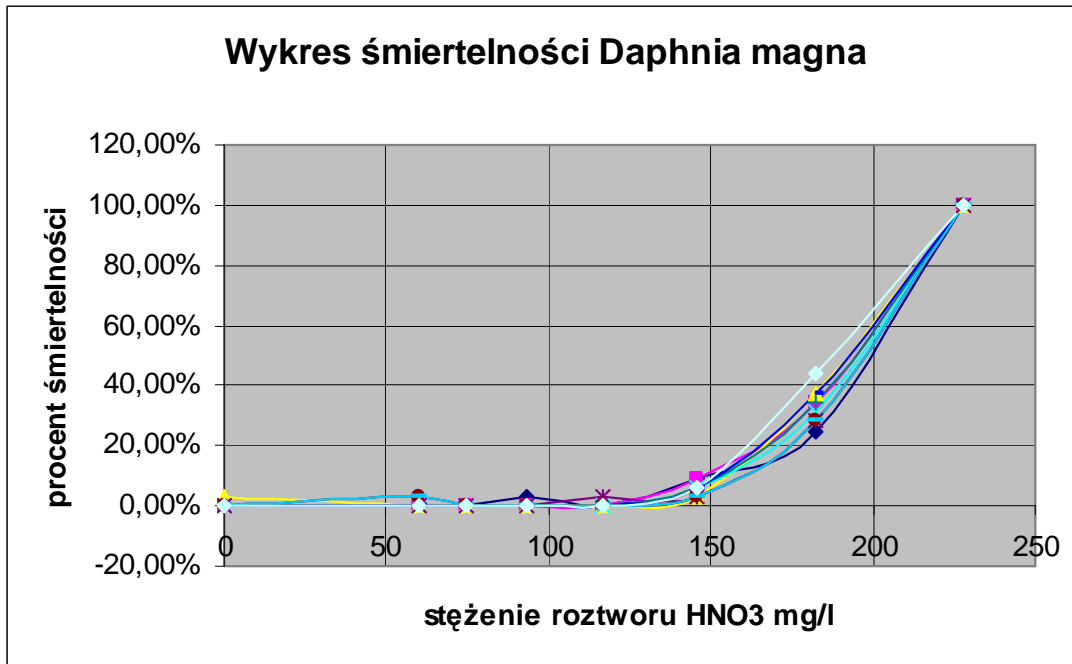
HNO <sub>3</sub> nr. próby	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
stężenie										
228 mg/l	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
182,4 mg/l	8	11	12	10	9	9	11	12	9	14
145,92 mg/l	0	0	1	2	1	0	0	0	1	2
116,73 mg/l	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
93,38mg/l	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
74,71 mg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
59,76 mg/l	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
KONTROLA	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Śmiertelność próby										

Tab. 66. Śmiertelność *Daphnia magna* dla różnych stężeń HNO<sub>3</sub> po okresie 24h.

Stężenie mg/l	Próba 1	Próba 2	Próba 3	Próba 4	Próba 5	Próba 6	Próba 7	Próba 8	Próba 9	Próba 10
228	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
182,4	25,00%	34,38%	37,50%	31,25%	28,13%	28,13%	34,38%	37,50%	28,13%	43,75%
145,92	9,38%	9,38%	3,13%	6,25%	3,13%	3,13%	6,25%	6,25%	3,13%	6,25%
116,73	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
93,38	3,13%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
74,71	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
59,76	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%
0	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Tab. 67. Procent śmiertelności *Daphnia magna* dla różnych stężeń HNO<sub>3</sub> po okresie 24h.





Ryc. 37. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności Daphnia magna dla poszczególnych stężeń HNO<sub>3</sub> w okresie 24h.

**Wyznaczenie współczynnika LC 50% /24h:**

*Metoda probitowa dla obliczeń stężenia letalnego LC50:*

Obliczenie stężenia letalnego LC50:

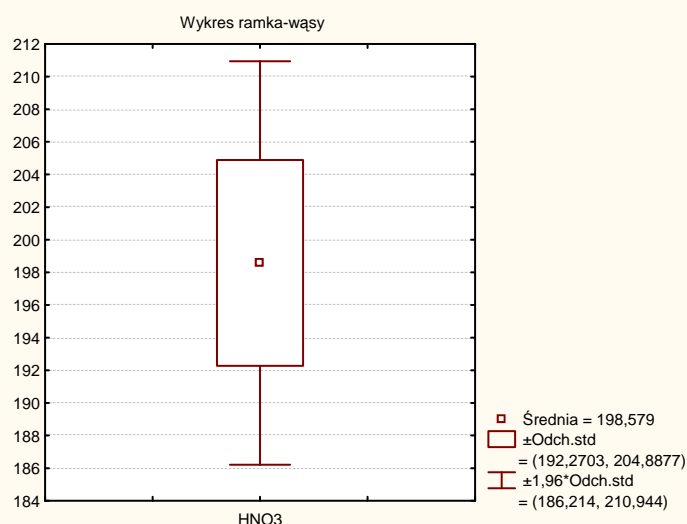
*Wartość stężenia LC50 dla związku chemicznego określa się w mg/l dla wód i ścieków w procentach:*

$$LC50 = N \lg \frac{5 - \bar{y} + b\bar{x}}{b}$$

Lp	Stężenie mg/l	Śmiertelność próby	Śmiertelność % M1	y <sub>1</sub> = probit M <sub>1</sub>	x <sub>1</sub> = lg C <sub>1</sub> stężenie	Kwadrat lg stężenia x <sub>1</sub> <sup>2</sup>	iloczyn lg stężenia i probitu x <sub>1</sub> i y <sub>1</sub>
1	228	32	100,00%	-	2,35793485	5,55985674	-
2	182,4	11	34,38%	4,59774993	2,26102483	5,1122333	10,3956268
3	145,92	3	9,38%	3,6819891	2,16411482	4,68339296	7,96824719
4	116,73	0	0,00%	-	2,067205	4,273336	-
5	93,38	0	0,00%	-	1,970291	3,882047	-
6	74,71	0	0,00%	-	1,873385	3,509571	-
7	59,76	0	0,00%	-	1,776475	3,155863	-
8	0	0	0,00%	-	-	-	-
Suma				8,27973904	4,42513965	9,79562626	18,363874
średnie				4,13986952	2,21256983		
				współ reg – b = 9,44959972			
				LC50 = 201,1837 mg/l			

Tab. 68. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr2.

Obliczone współczynniki LC50			
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50	
1	230,46	200,82 mg/l	
2	201,18		
3	191		
4	202,46		
5	201,72		
6	201,72		Odch. Stand.
7	197,45		SD - 6,31
8	193,39		
9	201,72		
10	187,11		

 Tab. 69. Wyznaczone wartości LC50 HNO<sub>3</sub>.

 Ryc. 38. Wykres ramka wąsy LC50 – HNO<sub>3</sub>.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Daphnia magna</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
HNO <sub>3</sub>	200,82 mg/l	słabo toksyczny	-	słabo toksyczny

 Tab. 70. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Daphnia magna*.

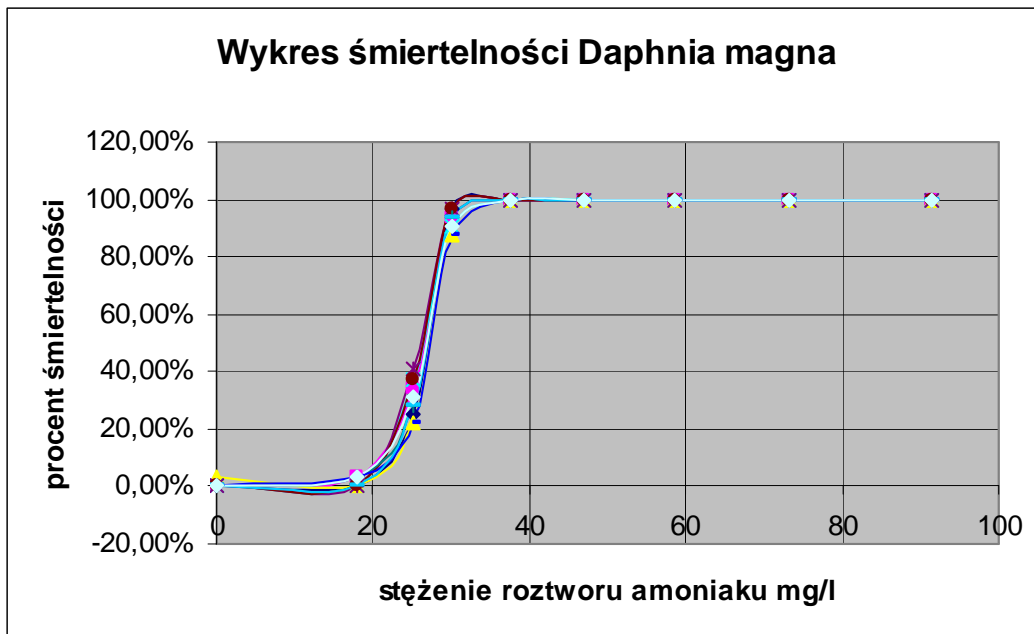
 8. Wyniki testów toksyczności dla NH<sub>4</sub>OH

NH <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O nr próby	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
stężenie										
91,55 mg/l	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
73,24 mg/l	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
58,59 mg/l	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
46,87 mg/l	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
37,5 mg/l	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
30 mg/l	31	30	28	29	31	31	30	28	27	29
25 mg/l	8	11	7	12	13	12	9	7	9	10
18 mg/l	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1
KONTROLA	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	Śmiertelność próby									

 Tab. 71. Śmiertelność *Daphnia magna* dla różnych stężeń NH<sub>4</sub>OH po okresie 24h.

Stężenie mg/l	Próba 1	Próba 2	Próba 3	Próba 4	Próba 5	Próba 6	Próba 7	Próba 8	Próba 9	Próba 10
91,55	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
73,24	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
58,59	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
46,87	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
37,5	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
30	96,88%	93,75%	87,50%	90,63%	96,88%	96,88%	93,75%	87,50%	93,75%	90,63%
25	25,00%	34,38%	21,88%	37,50%	40,63%	37,50%	28,13%	21,88%	28,13%	31,25%
18	0,00%	3,13%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,13%	3,13%	0,00%	3,13%
0	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Tab. 72. Procent śmiertelności *Daphnia magna* dla różnych stężeń NH<sub>4</sub>OH po okresie 24h.



Ryc. 39. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności *Daphnia magna* dla poszczególnych stężeń NH<sub>4</sub>OH w okresie 24h.

**Wyznaczenie współczynnika LC 50% /24h:**

*Metoda probitowa dla obliczeń stężenia letalnego LC50:*

Obliczenie stężenia letalnego LC50:

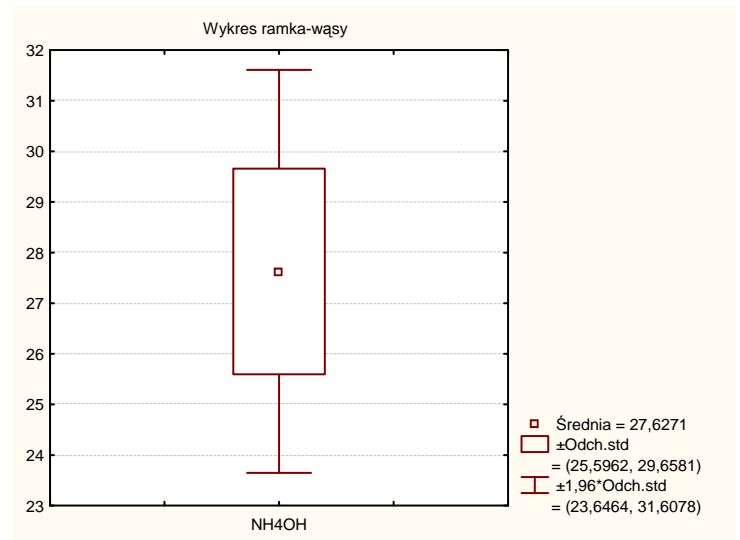
*Wartość stężenia LC50 dla związku chemicznego określa się w mg/l dla wód i ścieków w procentach:*

$$LC50 = N \lg \frac{5 - \bar{y} + b\bar{x}}{b}$$

Lp	Stężenie mg/l	Śmiertelność próby	Śmiertelność % M1	$y_1 = \text{probit } M_1$	$x_1 = \lg C_1$ stężenie	Kwadrat $\lg$ stężenia $x_1^2$	Iloczyn $\lg$ stężenia i probitu $x_1$ i $y_1$
1	37,5	32	100,00%	-	1,574031268	2,477574432	-
2	30	31	96,88%	6,862731867	1,477121255	2,181887201	10,13708711
3	25	8	25,00%	4,32551025	1,397940009	1,954236268	6,046803836
4	18	0	0,00%	-	1,25527251	1,57570906	-
5	0	0	0,00%	-	-	-	-
<b>Suma</b>				<b>11,18824212</b>	<b>2,875061263</b>	<b>4,136123469</b>	<b>16,18389094</b>
<b>Średnie</b>				<b>5,594121059</b>	<b>1,437530632</b>		
<b>współ reg – b = 32,04321407</b>							
<b>LC50 = 26,24154 mg/l</b>							

Tab. 73. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr2.

Obliczone współczynniki LC50		
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50
1	26,242	27,62 mg/l
2	27,367	
3	26,906	
4	25,903	
5	25,52	
6	25,675	Odch. Stand.
7	28,994	SD - 2,03
8	31,616	
9	29,949	
10	28,099	



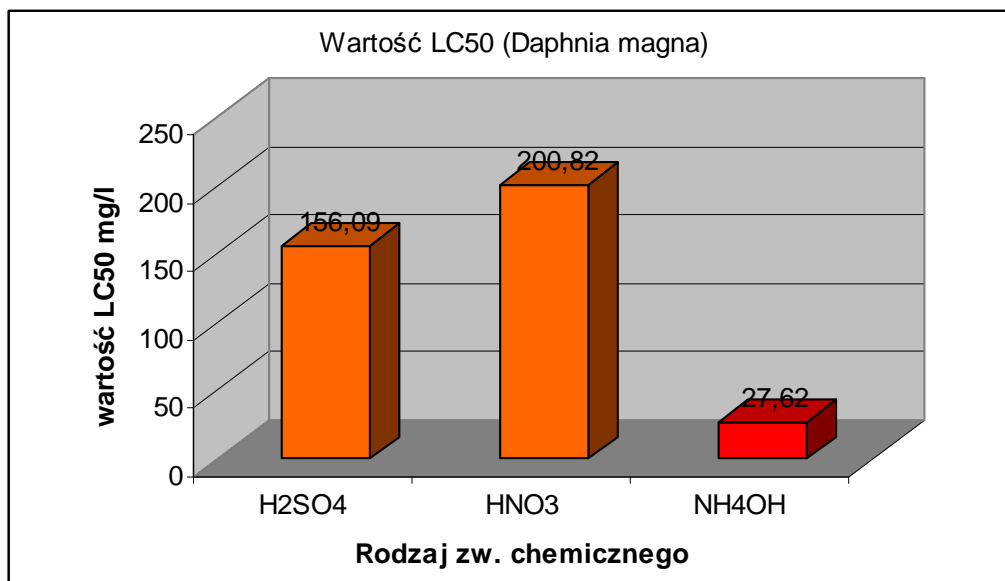
Tab. 74. Wyznaczone wartości LC50 NH<sub>4</sub>OH Ryc. 40. Wykres ramka – wąsy LC50 NH<sub>4</sub>OH.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Daphnia magna</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
NH <sub>4</sub> OH	27,62 mg/l	Średnio toksyczny	szkodliwy	umiarkowanie toksyczny

Tab. 75. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Daphnia magna*.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Daphnia magna</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	156,09 mg/l	słaba toksyczny	-	słabo toksyczny
HNO <sub>3</sub>	200,82 mg/l	słaba toksyczny	-	słabo toksyczny
NH <sub>4</sub> OH	27,62 mg/l	Średnio toksyczny	szkodliwy	umiarkowanie toksyczny

Tab. 76. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Daphnia magna*.



Ryc. 41. Wykres wartości współczynników dla testowanych związków chemicznych.

**V: Badanie wpływu detergentów niejonowy Brij na śmiertelność zarodków *Lymnaea stagnalis* L.**

**Cel badania:** określenie toksyczności ostrej wpływu w/w detergentów niejonowych dla embrionów *Lymnaea stagnalis* L. w okresie 48h, wyznaczenie zakresu stężeń bezpiecznych oraz współczynnika LC50.

*Do testów wytypowano kokony zawierające najbardziej żywotne kokony z rozwijającymi się embrionami Błotniarki stawowej, nie wykazujące oznak chorobotwórczych oraz zaburzeń rozwojowych.*

**Określenie wartości stałych dla testów:**

- **Iloraz postępu ciągu arytmetycznego rozcieńczeń  $q = 1$**  (wyznaczony w testach screen).
- **Liczba powtórzeń 5,**
- **Temp. otoczenia; 22,5°C – 23°C.**
- **Temp. wody w badanych próbach; 21,5°C**
- **Okres testu 24h**
- **Wartość pH roztworów = 6,5**
- **Długość światła/nocy – 16/8h**

**Wyniki testu dla Brij 35:**

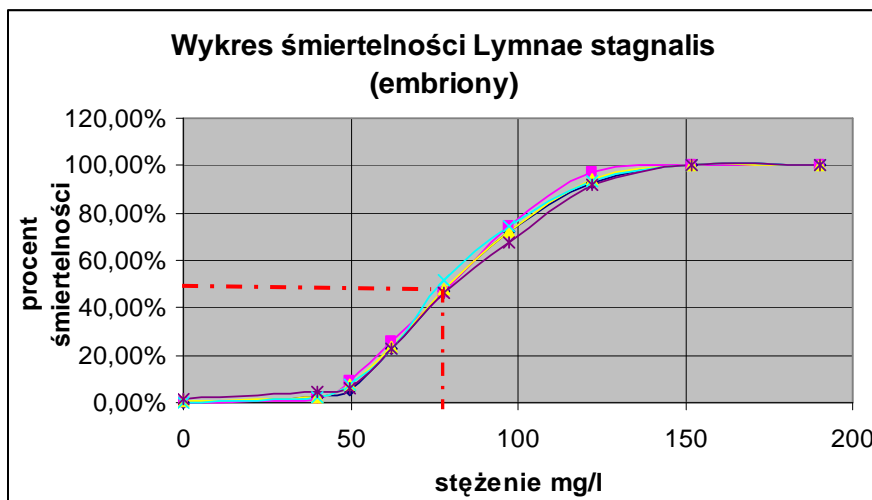
**Brij 35.**

Kokony stęż.-mg/l		Liczba jaj	śmiertelność	Kokony stęż.-mg/l		Liczba jaj	śmiertelność	Kokony stęż mg/l		Liczba jaj	Śmiertelność
A1	190	77	77	A2	190	41	41	A3	190	68	68
B1	152	39	39	B2	152	55	55	B3	152	93	93
C1	122	56	52	C2	122	80	78	C3	122	73	69
D1	97,2	89	64	D2	97,2	91	68	D3	97,2	77	54
E1	77,8	51	24	E2	77,8	60	28	E3	77,8	84	41
F1	62,2	98	22	F2	62,2	65	17	F3	62,2	143	36
G1	49,8	54	3	G2	49,8	89	8	G3	49,8	45	4
H1	39,9	101	2	H2	39,9	53	1	H3	39,9	113	2
Kont.	0	32	0	Kont.	0	47	0	Kont.	0	58	2
A4	190	109	109	A4	190	47	47				
B4	152	72	72	B4	152	115	115				
C	122	62	58	C	122	98	90				
D	97,2	66	49	D	97,2	56	38				
E	77,8	68	35	E	77,8	97	45				
F	62,2	89	20	F	62,2	57	13				
G	49,8	96	7	G	49,8	82	5				
H	39,9	44	1	H	39,9	63	3				
Kont.	0	48	0	Kont.	0	83	1				

Tab. 77. Śmiertelność embrionów dla różnych stężeń detergentu Brij 35 po okresie 48h.

Stężenie mg/l	próba 1	próba 2	próba 3	próba 4	próba 5
190	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
152	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
122	92,86%	97,50%	94,04%	93,55%	91,84%
97,2	71,91%	74,73%	72,03%	74,24%	67,86%
77,8	47,06%	46,67%	48,06%	51,47%	46,39%
62,2	22,45%	26,15%	23,89%	22,47%	22,81%
49,8	5,56%	8,99%	7,38%	7,29%	6,10%
39,9	1,98%	1,89%	2,41%	2,27%	4,76%
0	0,00%	0,00%	1,12%	0,00%	1,20%

Tab. 78. Procent śmiertelności embrionów dla różnych stężeń detergentu Brij 35 po okresie 48h.



Ryc. 42. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności embrionów dla poszczególnych stężeń detergentu w okresie 48h.

**Wyznaczenie współczynnika LC 50% /24h:**

*Metoda probitowa dla obliczeń stężenia letalnego LC50:*

Obliczenie stężenia letalnego LC50:

*Wartość stężenia LC50 dla związku chemicznego określa się w mg/l dla wód i ścieków w procentach:*

$$LC50 = N \lg \frac{5 - \bar{y} + b\bar{x}}{b}$$

Lp	Stężenie mg/l	Śmiertelność % M1	$y_1 = \text{probit } M_1$	$x_1 = \lg C_1$ stężenie	Kwadrat $\lg$ stężenia $x_1^2$	iloczyn $\lg$ stężenia i probitu $x_1$ i $y_1$
1	190	100%	-	2,278754	5,192718	-
2	152	100%	-	2,181844	4,760441	-
3	122	93%	6,46523379	2,08636	4,352897	13,4888
4	97,2	72%	5,58017331	1,9877	3,9508	11,092
5	77,8	47%	4,92620873	1,891	3,5758	9,3154
6	62,2	22%	4,2428827	1,7938	3,2177	7,6108
7	49,8	6%	3,40678118	1,6972	2,8806	5,7821
8	39,9	2%	2,94214402	1,601	2,5631	4,7103
9	0	0%	-	-	-	-
Suma			27,5634237	11,057	20,5409	51,99891
Średnie			4,59390395	1,842833		
współ reg – b =			7,31091442			
LC50 =			79,137 mg/l			

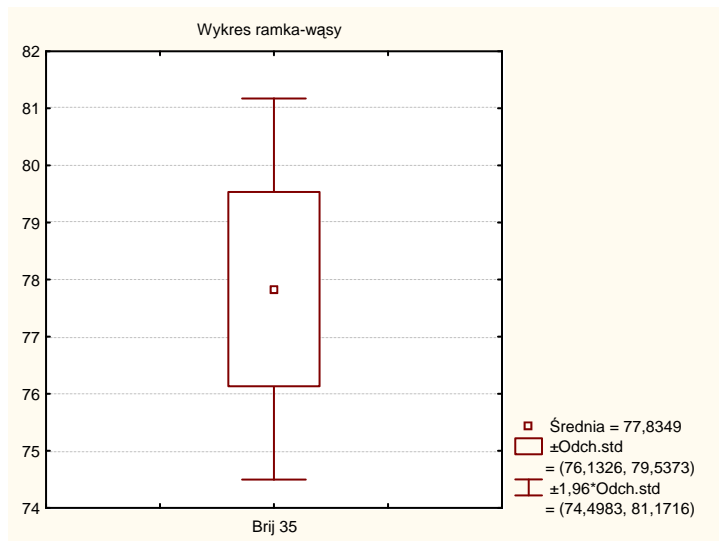
Tab. 79. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr3.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
Brij 35	77,64 mg/l	średnio toksyczny	szkodliwy	Umiarkowanie toksyczny

Tab. 80. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Lymnaea stagnalis*.

Obliczone współczynniki LC50		
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50
1	79,63	77,83 mg/l
2	75,40	
3	77,44	Odch. Stand.
4	77,40	SD - 1,70
5	79,29	

Tab. 81. Wyznaczone wartości LC50 Brij 35.



Ryc. 43. Wykres ramka wąsy LC50 – Brij 35.



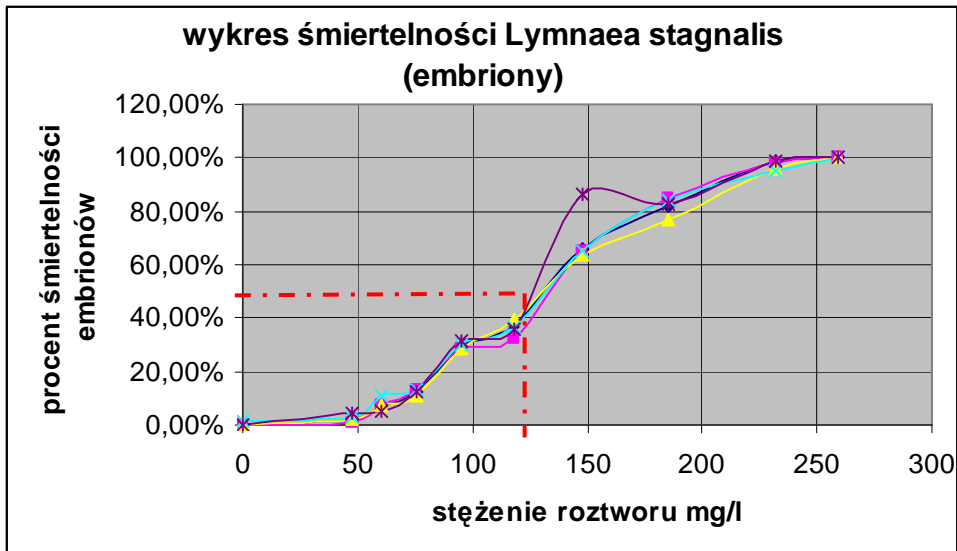
Wynik testu dla Brij 58:

Kokony stęż.-mg/l	Liczba jaj	śmiertelność	Kokony stęż.-mg/l	Liczba jaj	śmiertelność	Kokony stęż.-mg/l	Liczba jaj	śmiertelność
A1	259	53	A2	259	64	A3	259	82
B1	232	87	B2	232	92	B3	232	103
C1	185	113	C2	185	39	C3	185	73
D1	148	132	D2	148	43	D3	148	99
E1	118	77	E2	118	135	E3	118	116
F1	95	68	F2	95	53	F3	95	92
G1	76	91	G2	76	98	G3	76	53
H1	60	71	H2	60	67	H3	60	79
I1	48	99	I2	48	107	I3	48	52
Kont	0	38	Kont	0	59	Kont	0	93
A4	259	127	A	259	44			
B4	232	109	B	232	67			
C4	185	70	C	185	142			
D4	148	84	D	148	51			
E4	118	114	E	118	75			
F4	95	136	F	95	108			
G4	76	97	G	76	66			
H4	60	36	H	60	75			
I4	48	109	I	48	48			
Kont	0	62	Kont	0	53			

Tab. 82. Śmiertelność embrionów dla różnych stężeń detergentu Brij 58 po okresie 48h.

Stężenie mg/l	próba1	próba2	Próba3	próba4	próba5
259	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
232	98,85%	97,83%	96,12%	95,41%	98,51%
185	82,30%	84,62%	76,71%	84,29%	82,39%
148	65,91%	65,12%	63,64%	65,48%	86,27%
118	37,66%	31,85%	39,66%	36,84%	36,00%
95	29,41%	28,30%	28,26%	30,15%	31,48%
76	12,09%	13,27%	11,32%	13,40%	12,12%
60	7,04%	7,46%	7,59%	11,11%	5,33%
48	2,02%	0,93%	1,92%	2,75%	4,17%
0	0,00%	0,00%	0,00%	1,61%	0,00%

Tab. 83. Procent śmiertelności embrionów dla różnych stężeń detergentu Brij 58 po okresie 48h.



Ryc. 44. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności embrionów dla poszczególnych stężeń detergentu w okresie 48h.

**Wyznaczenie współczynnika LC 50% /24h:**

Metoda probitowa dla obliczeń stężenia letalnego LC50:

Obliczenie stężenia letalnego LC50:

Wartość stężenia LC50 dla związku chemicznego określa się w mg/l dla wód i ścieków w procentach:

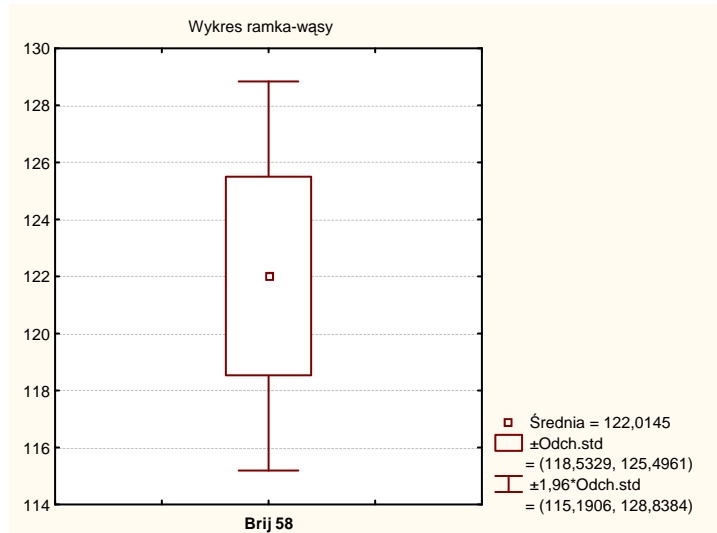
$$LC50 = N \lg \frac{5 - \bar{y} + b\bar{x}}{b}$$

Lp	Stężenie mg/l	Śmiertelność % M1	$y_1 = \text{probit } M_1$	$x_1 = \lg C_1$ stężenie	Kwadrat $\lg$ stężenia $x_1^2$	iloczyn $\lg$ stężenia i probitu $x_1$ i $y_1$
1	259	100%	-	2,4133	5,824016	-
2	232	96%	6,76436883	2,365488	5,595533	16,00103
3	185	77%	5,72940588	2,267172	5,140068	12,98955
4	148	64%	5,3487557	2,1703	4,71	11,608
5	118	40%	4,73771723	2,0719	4,2927	9,816
6	95	28%	4,42489072	1,9777	3,9114	8,7512
7	76	11%	3,79035487	1,8808	3,5375	7,129
8	60	8%	3,56714309	1,7782	3,1618	6,3429
9	48	2%	2,93009817	1,6812	2,8266	4,9262
10	0	0%	-	-	-	-
Suma			37,2927345	16,19273	33,17558	77,56405
Średnie			4,66159181	2,024092		
współczynnik reg – b = 5,20034755						
LC50 = 122,7908 mg/l						

Tab. 84. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr3.

Obliczone współczynniki LC50		
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50
1	124,9493	<b>122,0145</b>
2	123,1196	
3	119,043	Odch. Stand.
4	117,656	SD = 3,48
5	125,3046	

Tab. 85. Wyznaczone wartości LC50 Brij 58.



Ryc. 45. Wykres ramka wąsy LC50 – Brij 58.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
Brij 58	117,95 mg/l	średnio toksyczny	szkodliwy	Umiarkowanie toksyczny

Tab. 86. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Lymnaea stagnalis*.

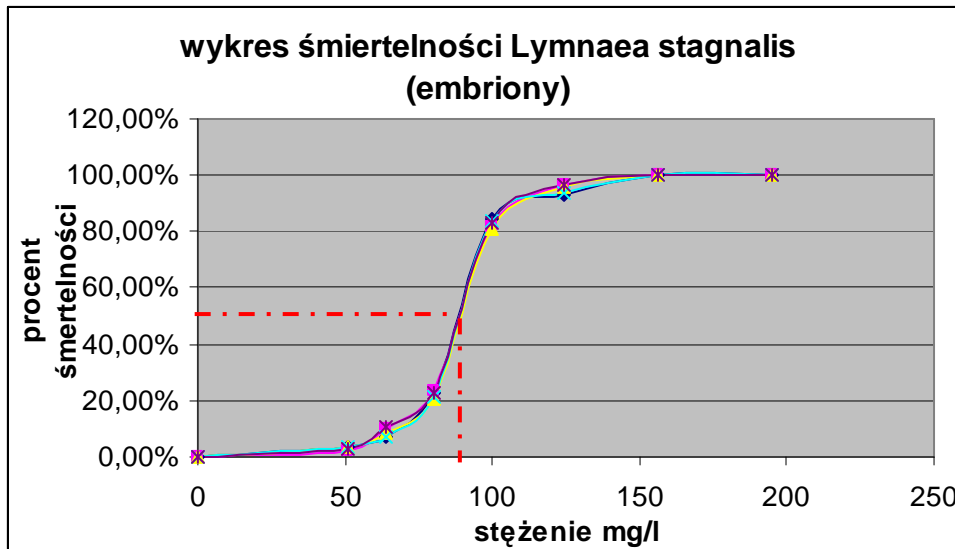
**Wyniki testu dla Brij 72.**

Kokony stęż.-mg/l		Liczba jaj	śmiertelność	Kokony stęż.-mg/l		Liczba jaj	śmiertelność	Kokony stęż.-mg/l		Liczba jaj	śmiertelność
A1	195	<b>51</b>	<b>51</b>	A2	195	<b>80</b>	<b>80</b>	A3	195	<b>103</b>	<b>103</b>
B1	156	<b>89</b>	<b>89</b>	B2	156	<b>75</b>	<b>75</b>	B3	156	<b>125</b>	<b>125</b>
C1	124	<b>129</b>	<b>120</b>	C2	124	<b>81</b>	<b>78</b>	C3	124	<b>73</b>	<b>70</b>
D1	100	<b>98</b>	<b>83</b>	D2	100	<b>137</b>	<b>112</b>	D3	100	<b>115</b>	<b>93</b>
E1	80	<b>49</b>	<b>11</b>	E2	80	<b>59</b>	<b>14</b>	E3	80	<b>39</b>	<b>8</b>
F1	64	<b>42</b>	<b>3</b>	F2	64	<b>40</b>	<b>4</b>	F3	64	<b>57</b>	<b>5</b>
G1	51,2	<b>58</b>	<b>2</b>	G2	51,2	<b>84</b>	<b>2</b>	G3	51,2	<b>83</b>	<b>3</b>
Kont.	0	<b>102</b>	<b>0</b>	Kont.	0	<b>62</b>	<b>0</b>	Kont	0	<b>91</b>	<b>0</b>
A4	195	<b>122</b>	<b>122</b>	A5	195	<b>117</b>	<b>117</b>				
B4	156	<b>68</b>	<b>68</b>	B5	156	<b>91</b>	<b>91</b>				
C4	124	<b>111</b>	<b>104</b>	C5	124	<b>94</b>	<b>91</b>				
D4	100	<b>55</b>	<b>46</b>	D5	100	<b>65</b>	<b>54</b>				
E4	80	<b>119</b>	<b>25</b>	E5	80	<b>57</b>	<b>13</b>				
F4	64	<b>74</b>	<b>5</b>	F5	64	<b>77</b>	<b>8</b>				
G4	51,2	<b>59</b>	<b>2</b>	G5	51,2	<b>114</b>	<b>3</b>				
Kont	0	<b>37</b>	<b>0</b>	Kont	0	<b>49</b>	<b>0</b>				

Tab. 87. Śmiertelność embrionów dla różnych stężeń detergentu Brij 72 po okresie 48h.

Stężenie mg/l	próba 1	próba 2	próba 3	próba 4	próba 5
195	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
156	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
124	93,02%	96,30%	95,89%	93,69%	96,81%
100	84,69%	81,75%	80,87%	83,64%	83,08%
80	22,45%	23,73%	20,51%	21,01%	22,81%
64	7,14%	10,00%	8,77%	6,76%	10,39%
51,2	3,45%	2,38%	3,61%	3,39%	2,63%
0	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Tab. 88. Procent śmiertelności embrionów dla różnych stężeń detergentu Brij 72 po okresie 48h.



Ryc. 46. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności embrionów dla poszczególnych stężeń detergentu w okresie 48h.

**Wyznaczenie współczynnika LC 50% /24h:**

Metoda probitowa dla obliczeń stężenia letalnego LC50:

Obliczenie stężenia letalnego LC50:

Wartość stężenia LC50 dla związku chemicznego określa się w mg/l dla wód i ścieków w procentach:

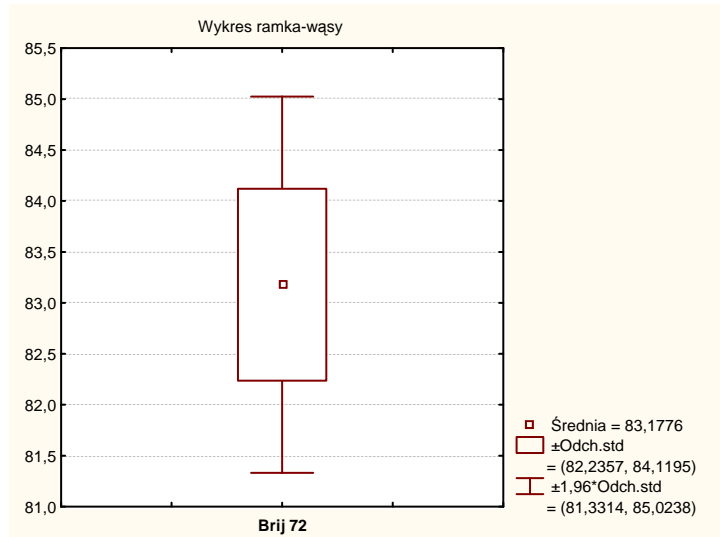
$$LC50 = N \lg \frac{5 - \bar{y} + b\bar{x}}{b}$$

Lp	Stężenie mg/l	Śmiertelność % M1	$y_1 = \text{probit } M_1$	$x_1 = \lg C_1$ stężenie	Kwadrat lg stężenia $x_1^2$	iloczyn lg stężenia i probitu $x_1$ i $y_1$
1	190	100%	-	2,278754	5,192718	-
2	152	100%	-	2,181844	4,760441	-
3	122	94%	6,5295582	2,08636	4,352897	13,62301
4	97,2	84%	5,979622	1,9877	3,9508	11,885
5	77,8	21%	4,1938703	1,891	3,5758	7,9305
6	62,2	7%	3,5058451	1,7938	3,2177	6,2888
7	49,8	3%	3,1736437	1,6972	2,8806	5,3864
8	39,9	0%	-	1,601	2,5631	-
Suma			23,382539	9,456025	17,97779	45,11418
Średnie			4,6765079	1,891205		
współ reg - b = 9,4490881						
LC50 = 84,2249 mg/l						

Tab. 89. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr4.

Obliczone współczynniki LC50		
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50
1	83,981	83,177 mg/l
2	82,586	
3	83,124	Odch. Stand. SD - 0,94
4	84,225	
5	81,972	

Tab. 90. Wyznaczone wartości LC50 Brij 72.



Ryc. 47. Wykres ramka wąsy LC50 – Brij 72.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
Brij 72	83,4566 mg/l	średnio toksyczny	szkodliwy	Umiarkowanie toksyczny

Tab. 91. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Lymnaea stagnalis*.

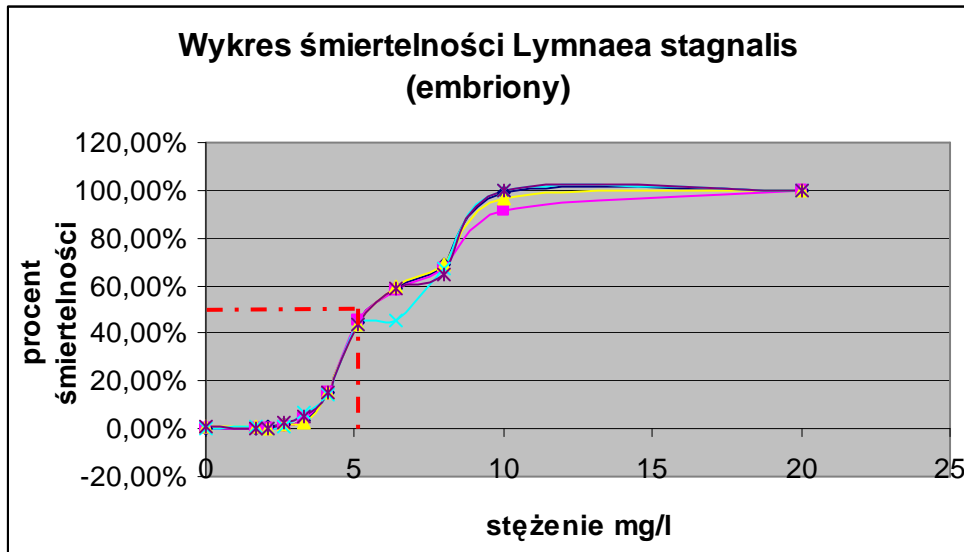
**Brij 76**

Kokony stęż.-mg/l		Liczba jaj	śmiertelność	Kokony stęż.-mg/l		Liczba jaj	śmiertelność	Kokony stęż.-mg/l		Liczba jaj	śmiertelność
A1	100	163	163	A2	100	53	53	A3	100	92	92
B1	90	85	85	B2	90	107	107	B3	90	39	39
C1	80	94	94	C2	80	82	82	C3	80	57	57
D1	70	113	113	D2	70	71	71	D3	70	129	129
E1	60	119	119	E2	60	44	44	E3	60	156	156
F1	50	127	127	F2	50	105	105	F3	50	107	107
G1	40	155	155	G2	40	61	61	G3	40	67	67
H1	30	158	158	H2	30	108	108	H3	30	49	49
I1	20	98	98	I2	20	81	81	I3	20	70	70
J1	10	77	76	J2	10	104	95	J3	10	52	50
K1	8	74	51	K2	8	121	81	K3	8	103	71
L1	6,4	143	84	L2	6,4	126	73	L3	6,4	59	35
M1	5,12	89	40	M2	5,12	142	64	M3	5,12	93	41
N1	4,09	111	17	N2	4,09	106	16	N3	4,09	117	18
O1	3,28	54	2	O2	3,28	68	3	O3	3,28	137	4
P1	2,62	62	1	P2	2,62	146	2	P3	2,62	92	2
R1	2,1	87	1	R2	2,1	139	0	R3	2,1	66	0
S1	1,66	135	0	S2	1,66	73	0	S3	1,66	85	1
Kont	0	154	0	Kont	0	67	0	Kont	0	83	1
K4	8	108	73	K5	8	68	44				
L4	6,4	90	41	L5	6,4	143	84				
M4	5,12	89	39	M5	5,12	107	47				
N4	4,09	132	19	N5	4,09	94	14				
O4	3,28	42	3	O5	3,28	81	4				
P4	2,62	95	1	P5	2,62	73	2				
R4	2,1	123	0	R5	2,1	64	0				
S4	1,66	138	1	S5	1,66	87	0				
Kont	0	119	0	Kont	0	145	1				

Tab. 92. Śmiertelność embrionów dla różnych stężeń detergentu Brij 76 po okresie 48h.

Stężenie mg/l	Próba 1	Próba 2	Próba 3	Próba 4	Próba 5
20	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
10	98,70%	91,35%	96,15%	100,00%	100,00%
8	68,92%	66,94%	68,93%	67,59%	64,71%
6,4	58,74%	57,94%	59,32%	45,56%	58,74%
5,12	44,94%	45,07%	44,09%	43,82%	43,93%
4,09	15,32%	15,09%	15,38%	14,39%	14,89%
3,28	3,70%	4,41%	2,92%	7,14%	4,94%
2,62	1,61%	1,37%	2,17%	1,05%	2,74%
2,1	1,15%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
1,66	0,00%	0,00%	1,18%	0,72%	0,00%
0	0,00%	0,00%	1,20%	0,00%	0,69%

Tab. 93. Procent śmiertelności embrionów dla różnych stężeń detergentu Brij 76 po okresie 48h.



Ryc. 48. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności embrionów dla poszczególnych stężeń detergentu w okresie 48h.

**Wyznaczenie współczynnika LC 50% /24h:**

Metoda probitowa dla obliczeń stężenia letalnego LC50:

Obliczenie stężenia letalnego LC50:

Wartość stężenia LC50 dla związku chemicznego określa się w mg/l dla wód i ścieków w procentach:

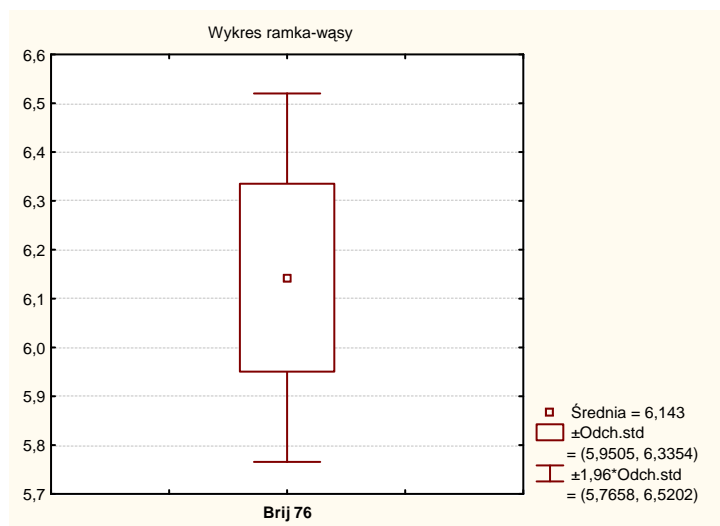
$$LC50 = N \lg \frac{5 - \bar{y} + b\bar{x}}{b}$$

Lp	Stężenie mg/l	Śmiertelność % M1	y <sub>1</sub> = probit M <sub>1</sub>	x <sub>1</sub> = lg C <sub>1</sub> stężenie	Kwadrat lg stężenia x <sub>1</sub> <sup>2</sup>	iloczyn lg stężenia i probitu x <sub>1</sub> i y <sub>1</sub>
1	30	100%	-	1,47712125	2,1818872	-
2	20	100%	-	1,30103	1,69267905	-
3	10	94,85%	6,63048042	1	1	6,63048042
4	8	67,51%	5,45404005	0,90309	0,815572	4,925489
5	6,4	56,51%	5,16391253	0,80618	0,649926	4,163043
6	5,12	44,42%	4,85967093	0,70927	0,503064	3,446819
7	4,09	15%	3,96356661	0,611723	0,374205	2,424606
8	3,28	4,19%	3,27094918	0,515874	0,266126	1,687397
9	2,62	1,71%	2,8822943	0,418301	0,174976	1,205667
10	2,1	0,21%	2,13726374	0,322219	0,103825	0,688668
11	1,66	0,39%	2,33939326	0,220108	0,048448	0,514919
12	0	0,35%	2,30315574	-	-	-
suma			36,701571	5,50676575	3,9361416	25,6870885
średnie			4,07795234	0,61186286		
współ reg – b =			5,70044143			
LC50 =			5,937629 mg/l			

Tab. 94. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr1.



Obliczone współczynniki LC50		
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50
1	6,073314	<b>6,05</b>
2	6,052189	
3	6,364277	Odch. Stand.
4	5,90729	<b>SD - 0,19</b>
5	6,317699	



Tab. 95. Wyznaczone wartości LC50 Brij 76. Ryc. 49. Wykres ramka wąsy LC 50 – Brij 76.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
Brij 76	6,05 mg/l	Silnie toksyczny	Toksyczny	Umiarkowanie toksyczny

Tab. 96. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Lymnaea stagnalis*.

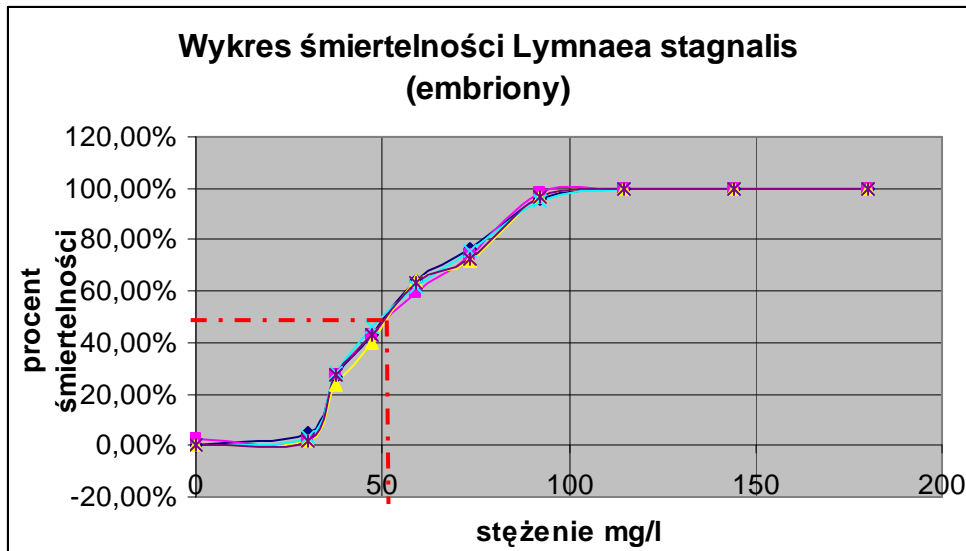
**Brij 78**

Kokony stęż.-mg/l		Liczba jaj	śmiertelność	Kokony stęż.-mg/l		Liczba jaj	śmiertelność	Kokony stęż.-mg/l		Liczba jaj	śmiertelność
A1	180	<b>143</b>	<b>143</b>	A2	180	<b>56</b>	<b>56</b>	A3	180	<b>58</b>	<b>58</b>
B1	144	<b>95</b>	<b>95</b>	B2	144	<b>32</b>	<b>32</b>	B3	144	<b>55</b>	<b>55</b>
C1	115	<b>61</b>	<b>61</b>	C2	115	<b>52</b>	<b>52</b>	C3	115	<b>44</b>	<b>44</b>
D1	92,1	<b>92</b>	<b>88</b>	D2	92,1	<b>48</b>	<b>47</b>	D3	92,1	<b>61</b>	<b>59</b>
E1	73,7	<b>97</b>	<b>74</b>	E2	73,7	<b>43</b>	<b>32</b>	E3	73,7	<b>67</b>	<b>48</b>
F1	58,9	<b>114</b>	<b>73</b>	F2	58,9	<b>54</b>	<b>32</b>	F3	58,9	<b>72</b>	<b>46</b>
G1	47,1	<b>88</b>	<b>38</b>	G2	47,1	<b>65</b>	<b>28</b>	G3	47,1	<b>45</b>	<b>18</b>
H1	37,7	<b>37</b>	<b>10</b>	H2	37,7	<b>72</b>	<b>20</b>	H3	37,7	<b>46</b>	<b>11</b>
I1	30,1	<b>43</b>	<b>2</b>	I2	30,1	<b>121</b>	<b>2</b>	I3	30,1	<b>69</b>	<b>1</b>
Kont	0	<b>79</b>	<b>0</b>	Kont	0	<b>38</b>	<b>1</b>	Kont	0	<b>52</b>	<b>0</b>
A4	180	<b>83</b>	<b>83</b>	A	180	<b>59</b>	<b>59</b>				
B4	144	<b>97</b>	<b>97</b>	B	144	<b>47</b>	<b>47</b>				
C4	115	<b>62</b>	<b>62</b>	C	115	<b>85</b>	<b>85</b>				
D4	92,1	<b>107</b>	<b>102</b>	D	92,1	<b>58</b>	<b>56</b>				
E4	73,7	<b>73</b>	<b>55</b>	E	73,7	<b>48</b>	<b>35</b>				
F4	58,9	<b>68</b>	<b>42</b>	F	58,9	<b>90</b>	<b>57</b>				
G4	47,1	<b>129</b>	<b>59</b>	G	47,1	<b>117</b>	<b>50</b>				
H4	37,7	<b>42</b>	<b>12</b>	H	37,7	<b>134</b>	<b>37</b>				
I4	30,1	<b>57</b>	<b>2</b>	I	30,1	<b>60</b>	<b>1</b>				
Kont	0	<b>81</b>	<b>0</b>	Kont	0	<b>118</b>	<b>0</b>				

Tab. 97. Śmiertelność embrionów dla różnych stężeń detergentu Brij 78 po okresie 48h.

Stężenie mg/l	Próba 1	Próba 2	Próba 3	Próba 4	Próba 5
180	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
144	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
115	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
92,1	95,65%	97,92%	96,72%	95,33%	96,55%
73,7	76,29%	74,42%	71,64%	75,34%	72,92%
58,9	64,04%	59,26%	63,89%	61,76%	63,33%
47,1	43,18%	43,08%	40,00%	45,74%	42,74%
37,7	27,03%	27,78%	23,91%	28,57%	27,61%
30,1	4,65%	1,65%	1,45%	3,51%	1,67%
0	0,00%	2,63%	0,00%	0,00%	0,00%

Tab. 98. Procent śmiertelności embrionów dla różnych stężeń detergentu Brij 78 po okresie 48h.



Ryc. 50. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności embrionów dla poszczególnych stężeń detergentu w okresie 48h.

**Wyznaczenie współczynnika LC 50% /24h:**

Metoda probitowa dla obliczeń stężenia letalnego LC50:

Obliczenie stężenia letalnego LC50:

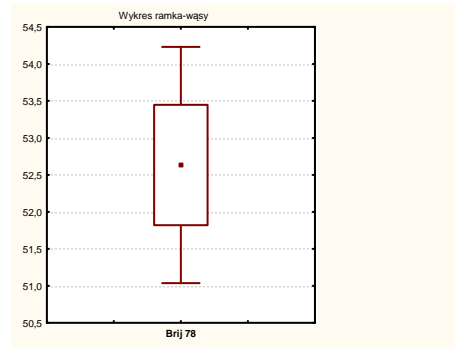
Wartość stężenia LC50 dla związku chemicznego określa się w mg/l dla wód i ścieków w procentach:

$$LC50 = N \lg \frac{5 - \bar{y} + b\bar{x}}{b}$$

Lp	Stężenie mg/l	Śmiertelność % M1	y <sub>1</sub> = probit M <sub>1</sub>	x <sub>1</sub> = lg C <sub>1</sub> stężenie	Kwadrat lg stężenia x <sub>1</sub> <sup>2</sup>	iloczyn lg stężenia i probitu x <sub>1</sub> i y <sub>1</sub>
1	180	100%	-	2,25527251	5,08625407	-
2	144	100%	-	2,15836249	4,65852865	-
3	115	100%	-	2,06069784	4,24647559	-
4	92,1	97%	6,8413262	1,96426	3,858316	13,43814
5	73,7	72%	5,57223293	1,867467	3,487435	10,40596
6	58,9	64%	5,35549042	1,770115	3,133308	9,479835
7	47,1	40%	4,7466529	1,673021	2,798999	7,94125
8	37,7	24%	4,2908975	1,576341	2,484852	6,763919
9	30,1	1%	2,81631642	1,478566	2,186159	4,164111
10	0	0%	-	-	-	-
suma			29,6229164	10,3297712	17,9490688	52,19322
średnie			4,93715273	1,72162853		
współ reg – b =			,23195495			
LC50 =			53,74261 mg/l			

Tab. 99. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr1.

Obliczone współczynniki LC50			
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50	
1	51,653	52,63409 mg/l	
2	52,59		
3	53,743		Odch. Stand.
4	52,114		SD - 0,81
5	53,071		

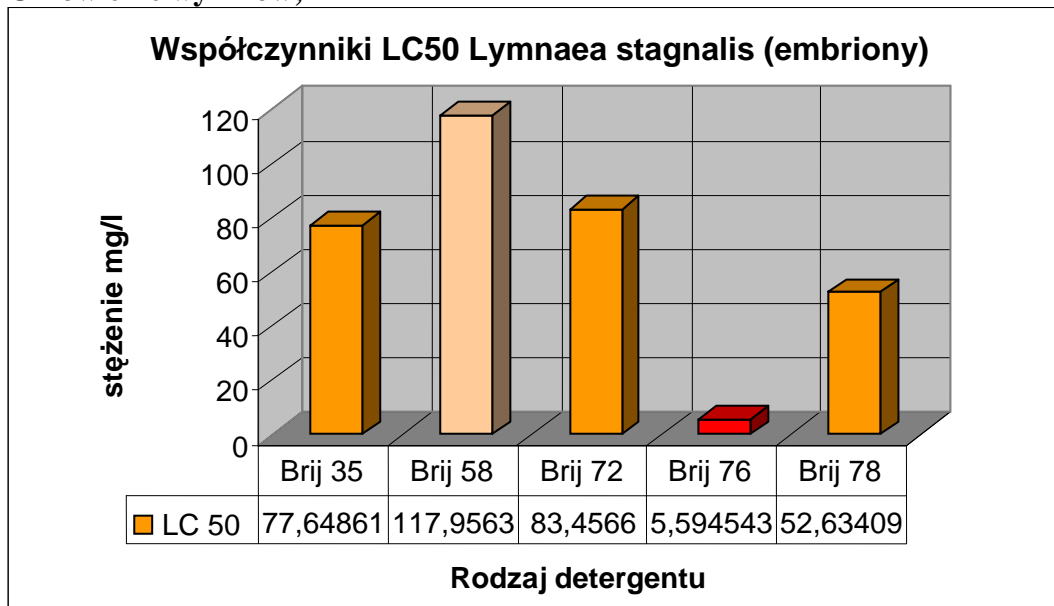


Tab. 100. Wyznaczone wartości LC50 Brij 78. Ryc. 51. Wykres ramka wąsy LC 50 Brij 78.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
Brij 78	52,63409	toksyczny	szkodliwy	Umiarkowanie toksyczny

Tab. 101. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Lymnaea stagnalis*.

Omówienie wyników;



Ryc. 52. Wykres wartości współczynników dla poszczególnych detergentów Brij.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
Brij 35	77,64 mg/l	Średnio toksyczny	Szkodliwy	Umiarkowanie toksyczny
Brij 58	117,95 mg/l	Słabo toksyczny	Szkodliwy	Słabo toksyczny
Brij 72	83,45 mg/l	Średnio toksyczny	Szkodliwy	Umiarkowanie toksyczny
Brij 76	5,59 mg/l	Silnie toksyczny	Toksyczny	Umiarkowanie toksyczny
Brij 78	52,63 mg/l	Średnio toksyczny	Szkodliwy	Umiarkowanie toksyczny

Tab. 102. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Lymnaea stagnalis*.

**VI: Badanie wpływu detergentu Ludwik na śmiertelność zarodków *Lymnaea stagnalis*.**

**Cel badania:** określenie toksyczności ostrej wpływu detergentu ludwik (mieszanina anionowo czynnych SPC) dla embrionów *Lymnaea stagnalis* L. w okresie 24h, wyznaczenie zakresu stężeń bezpiecznych oraz współczynnika LC50.

Wynik doświadczenia:

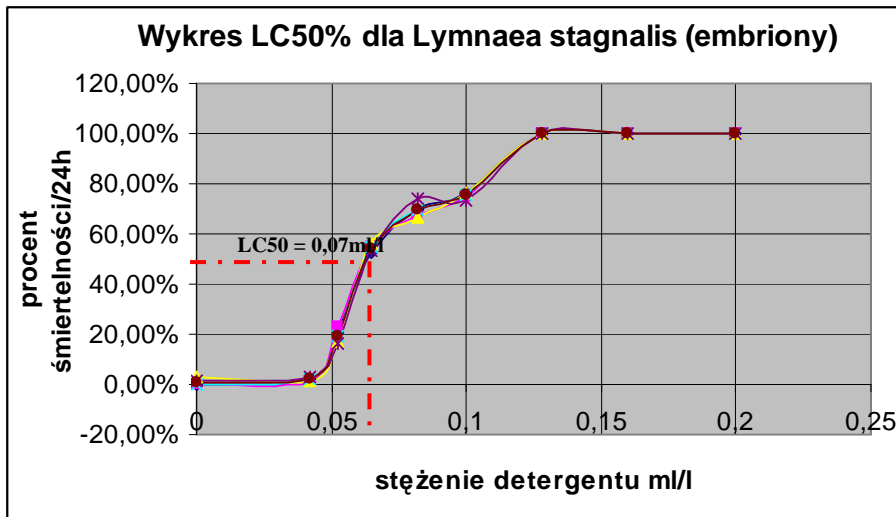
Test śmiertelności 24h

Kokony stęż.-ml/l		Liczba jaj	śmiertelność	Kokony stęż.-mg/l		Liczba jaj	śmiertelność	Kokony stęż.-mg/l		Liczba jaj	śmiertelność
A1	0,2	135	<b>135</b>	A2	0,2	52	<b>52</b>	A3	0,2	58	<b>58</b>
B1	0,16	152	<b>152</b>	B2	0,16	74	<b>74</b>	B3	0,16	95	<b>95</b>
C1	0,128	141	<b>141</b>	C2	0,128	79	<b>79</b>	C3	0,128	55	<b>55</b>
D1	0,1	119	<b>91</b>	D2	0,1	64	<b>48</b>	D3	0,1	89	<b>68</b>
E1	0,082	93	<b>65</b>	E2	0,082	89	<b>60</b>	E3	0,082	101	<b>67</b>
F1	<b>0,065</b>	55	<b>29</b>	F2	<b>0,065</b>	97	<b>53</b>	F3	<b>0,065</b>	103	<b>58</b>
G1	0,052	53	<b>11</b>	G2	0,052	121	<b>28</b>	G3	0,052	268	<b>45</b>
H1	0,042	44	<b>1</b>	H2	0,042	123	<b>2</b>	H3	0,042	65	<b>1</b>
Kont	<b>0</b>	<b>53</b>	<b>0</b>	Kont	<b>0</b>	<b>79</b>	<b>0</b>	Kont	<b>0</b>	<b>68</b>	<b>2</b>
A4	0,2	108	<b>108</b>	A5	0,2	51	<b>51</b>				
B4	0,16	62	<b>62</b>	B5	0,16	146	<b>146</b>				
C4	0,128	97	<b>97</b>	C5	0,128	43	<b>43</b>				
D4	0,1	77	<b>58</b>	D5	0,1	83	<b>61</b>				
E4	0,082	113	<b>79</b>	E5	0,082	184	<b>136</b>				
F4	<b>0,065</b>	<b>172</b>	<b>94</b>	F5	<b>0,065</b>	<b>118</b>	<b>63</b>				
G4	0,052	105	<b>20</b>	G5	0,052	73	<b>12</b>				
H4	0,042	141	<b>3</b>	H5	0,042	77	<b>2</b>				
Kont	<b>0</b>	<b>95</b>	<b>0</b>	Kont	<b>0</b>	<b>117</b>	<b>2</b>				

Tab. 103. Śmiertelność embrionów dla różnych stężeń detergentu ludwik po okresie 24h.

Stężenie ml/l	próba1	próba2	próba3	próba4	próba5	średni%
0,2	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
0,16	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
0,128	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
0,1	76,47%	75,00%	76,40%	75,32%	73,49%	75,34%
0,082	69,89%	67,42%	66,34%	69,91%	73,91%	69,49%
<b>0,065</b>	52,73%	54,64%	56,31%	54,65%	53,39%	54,34%
0,052	20,75%	23,14%	16,79%	19,05%	16,44%	19,23%
0,042	2,27%	1,63%	1,54%	2,13%	2,60%	2,03%
<b>0</b>	0,00%	0,00%	2,94%	0,00%	1,71%	0,93%

Tab. 104. Procent śmiertelności embrionów dla różnych stężeń detergentu ludwik po okresie 24h.



Ryc. 53. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności embrionów dla poszczególnych stężeń detergentu w okresie 24h.

**Określenie wartości stałych:**

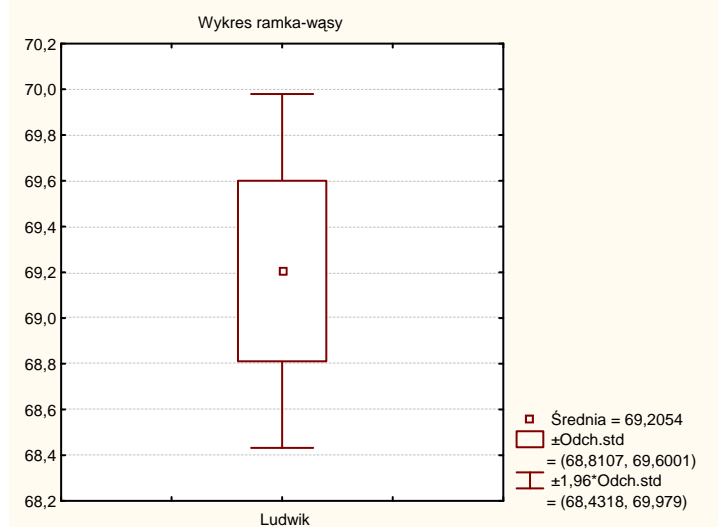
- Iloraz postępu geometrycznego rozcieńczeń  $q = 1,25$  (wytypowany w testach *screen*).
- Liczba powtórzeń 5,
- Temp. otoczenia;  $22,5^{\circ}\text{C} - 23^{\circ}\text{C}$ .
- Temp. wody w badanych próbach;  $21,5^{\circ}\text{C}$
- Okres testu 24h
- Wartość pH roztworów = 6,5
- Długość światło/noc – 15/9h

przykład obliczeń:

Stężenie ml/l	Śmiertelność % $M_1$	$y_1 = \text{probit } M_1$	$x_1 = \lg C_1$ stężenie	Kwadrat $\lg^2$ stężenia $x_1^2$	iloczyn $\lg$ stężenia i probitu $x_1$ i $y_1$
0,2	100%	-	-0,69897	0,488559	-
0,16	100%	-	-0,79588	0,633425	-
0,128	100%	-	-0,89279	0,797074	-
0,1	76%	5,72152228	-1	1	-5,722
0,082	70%	5,52131043	-1,086	1,1798	-5,997
0,065	53%	5,06841592	-1,187	1,4092	-6,017
0,052	21%	4,18503849	-1,284	1,6486	-5,374
0,042	2%	2,99957643	-1,377	1,8954	-4,13
0	0%	-	-	-	-
suma		23,4958636	-5,93402	7,133065	-27,2386
średnie		4,69917271	-1,1868		
współ reg – b = 7,13890882					
<b>LC50 = 0,07167 ml/l</b>					

Tab. 105. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr1.

Obliczone współczynniki LC50		
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50
1	68,707	69,205 ml/l
2	69,312	
3	69,792	Odch. Stand.
4	69,096	SD - 0,39
5	69,12	



Tab. 106. Wyznaczone wartości LC50 Ludwik. Ryc. 54 Wykres ramka wąsy LC50 Ludwik.

Gęstość płynu = 0,96 g/cm<sup>3</sup> ↔ 1cm<sup>3</sup> = 0,96g, zatem stężenia badane to 0,2 ml = 0,192g. itd.

Wartość średnia LC5024h – 69,2 mg/l

Do testu wytypowano kokony zawierające najbardziej żywotne kokony z rozwijającymi się embrionami Błotniarki stawowej, nie wykazujące oznak chorobotwórczych oraz zaburzeń rozwojowych.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
Ludwik	69,2 mg/l	Średnio Toksyczny	Szkodliwy	Umiarkowanie Toksyczny

Tab. 107. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Lymnaea stagnalis*.

**VII: Badanie wpływu Kwasów Siarkowego (VI) i Azotowego (V) oraz Amoniak na śmiertelność zarodków *Lymnaea stagnalis* L.**

**Cel badania:** określenie toksyczności ostrej wpływu w/w związków chemicznych dla embrionów *Lymnaea stagnalis* L. w okresie 24h, wyznaczenie zakresu stężeń bezpiecznych oraz współczynnika LC50.

*Do testów wytypowano kokony zawierające najbardziej żywotne kokony z rozwijającymi się embrionami Błotniarki stawowej, nie wykazujące oznak chorobotwórczych oraz zaburzeń rozwojowych.*

**Określenie wartości stałych dla testów:**

- **Poraz postępu ciągu arytmetycznego rozcieńczeń  $q = 1$**  (wyznaczony w testach screen).
- **Liczba powtórzeń 5,**
- **Temp. otoczenia; 22,5°C – 23°C.**
- **Temp. wody w badanych próbach; 21,5°C**
- **Okres testu 24h**
- **Długość światła/nocy – 16/8h**

**Wyniki testu dla Kwasu siarkowego (VI):**

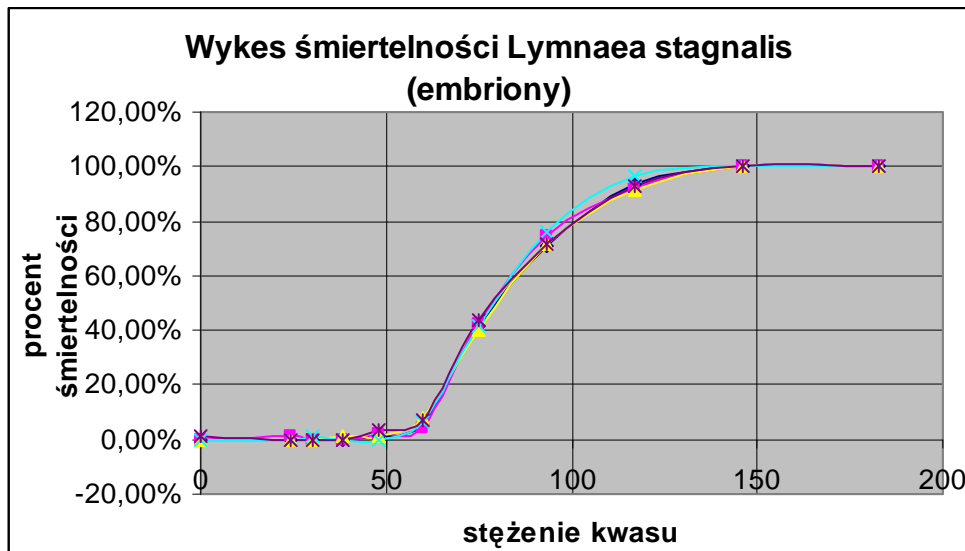
Kokony stęż.-mg/l	Liczba jaj	śmiertelność	Kokony stęż.-mg/l	Liczba jaj	śmiertelność	Kokony stęż.-mg/l	Liczba jaj	śmiertelność
A1 183	104	104	A2 183	54	54	A3 183	72	72
B1 146	97	97	B2 146	36	36	B3 146	48	48
C1 117	64	60	C2 117	75	69	C3 117	93	85
D1 93	38	27	D2 93	83	62	D3 93	49	35
E1 75	55	23	E2 75	95	40	E3 75	57	23
F1 60	51	3	F2 60	45	2	F3 60	92	7
G1 48	74	1	G2 48	97	2	G3 48	66	1
H1 38,4	83	0	H2 H2	105	0	H3 H2	91	1
I1 30	72	0	I2 I2	35	0	I3 I2	118	0
J1 24	117	0	J2 J2	84	1	J3 J2	37	0
Kont 0	46	0	Kont 0	37	0	Kont 0	91	0
A4 183	75	75	A5 183	95	95			
B4 146	89	89	B5 146	36	36			
C4 117	63	61	C5 117	59	55			
D4 93	83	63	D5 93	39	28			
E4 75	93	39	E5 75	92	40			
F4 60	46	3	F5 60	59	4			
G4 48	39	0	G5 48	63	2			
H4 38,4	64	0	H5 38,4	85	0			
I4 30	107	1	I5 30	105	0			
J4 24	129	0	J5 24	37	0			
Kont 0	89	0	Kont 0	69	1			

Tab. 108. Śmiertelność embrionów dla różnych stężeń Kwasu siarkowego (VI) po okresie 24h.



Stężenie mg/l	Próba 1	Próba 2	Próba 3	Próba 4	Próba 5
183	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
146	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
117	93,75%	92,00%	91,40%	96,83%	93,22%
93	71,05%	74,70%	71,43%	75,90%	71,79%
75	41,82%	42,11%	40,35%	41,94%	43,48%
60	5,88%	4,44%	7,61%	6,52%	6,78%
48	1,35%	2,06%	1,52%	0,00%	3,17%
38,4	0,00%	0,00%	1,10%	0,00%	0,00%
30	0,00%	0,00%	0,00%	0,93%	0,00%
24	0,00%	1,19%	0,00%	0,00%	0,00%
0	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	1,45%

Tab. 109. Procent śmiertelności embrionów dla różnych stężeń Kwasu siarkowego (VI) po okresie 24h.



Ryc. 55. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności embrionów dla poszczególnych stężeń H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> w okresie 24h.

**Wyznaczenie współczynnika LC 50% /24h:**

*Metoda probitowa dla obliczeń stężenia letalnego LC50:*

Obliczenie stężenia letalnego LC50:

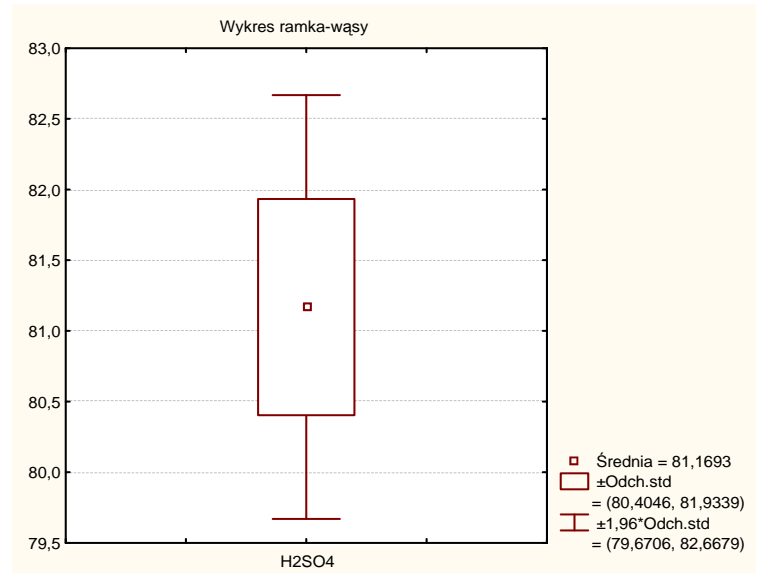
*Wartość stężenia LC50 dla związku chemicznego określa się w mg/l dla wód i ścieków w procentach:*

$$LC50 = N \lg \frac{5 - \bar{y} + b\bar{x}}{b}$$

Lp.	Stężenie	Śmiertelność % M1	$y_1 = \text{probit } M_1$	$x_1 = \lg C_1$ stężenie	Kwadrat lg stężenia $x_1^2$	iloczyn lg stężenia i probitu $x_1$ i $y_1$
1	183	100%	-	2,262451	5,118685	-
2	146	100%	-	2,164353	4,684423	-
3	117	94%	6,53412054	2,068186	4,277393	13,51378
4	93	71%	5,55492294	1,9685	3,8749	10,935
5	75	42%	4,79345298	1,8751	3,5159	8,988
6	60	6%	3,43527353	1,7782	3,1618	6,1084
7	48	1%	2,78887276	1,6812	2,8266	4,6888
8	38,4	0%	-	1,5843	2,5101	-
9	30	0%	-	1,4771	2,1819	-
10	24	0%	-	1,3802	1,905	-
11	0	0%	-	-	-	-
suma			23,1066428	9,371123	17,65657	44,23377
średnie			4,62132855	1,874225		
współ reg - b = 9,96711776						
LC50 = 81,69 mg/l						

Tab. 110. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr1.

Obliczone współczynniki LC50		
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50
1	81,69	81,17
2	80,17	
3	81,88	Odch. Stand.
4	80,53	SD - 0,76
5	81,55	



Tab. 111. Wyznaczone wartości LC50 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Ryc. 56. Wykres ramka wąsy LC 50 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	77,64 mg/l	średnio toksyczny	szkodliwy	Umiarkowanie toksyczny

Tab. 112. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Lymnaea stagnalis*.

**Wyniki testu dla Kwasu azotowego (V):**

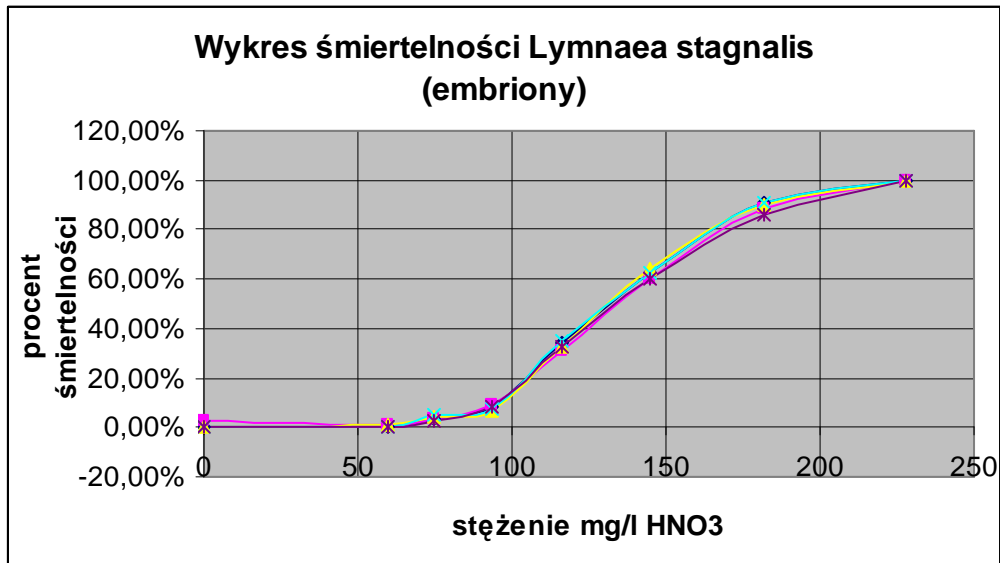
Kwas azotowy (V)

Kokony stęż.-mg/l	Liczba jaj	śmiertelność	Kokony stęż.-mg/l	Liczba jaj	śmiertelność	Kokony stęż.-mg/l	Liczba jaj	śmiertelność
A1 228	54	54	A2 228	94	94	A3 228	86	86
B1 182	64	58	B2 182	102	90	B3 182	62	56
C1 145	72	45	C2 145	43	26	C3 145	69	44
D1 116	105	36	D2 116	137	42	D3 116	59	19
E1 93,3	128	11	E2 93,3	101	9	E3 93,3	43	3
F1 74,7	109	4	F2 74,7	56	2	F3 74,7	107	5
G1 59,7	114	0	G2 59,7	86	1	G3 59,7	95	1
Kont 0	46	0	Kont 0	37	1	Kont 0	83	0
A4 228	96	96	A5 228	111	111			
B4 182	66	60	B5 182	51	44			
C4 145	82	51	C5 145	72	43			
D4 116	129	45	D5 116	97	32			
E4 93,3	84	6	E5 93,3	46	4			
F4 74,7	73	4	F5 74,7	36	1			
G4 59,7	48	0	G5 75	135	0			
Kont 0	58	0	Kont 0	105	0			

Tab. 113. Śmiertelność embrionów dla różnych stężeń Kwasu azotowego (V) po okresie 24h.

Stężenie mg/l	Próba 1	Próba 2	Próba 3	Próba 4	Próba 5
228	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
182	90,63%	88,24%	90,32%	90,91%	86,27%
145	62,50%	60,47%	63,77%	62,20%	59,72%
116	34,29%	30,66%	32,20%	34,88%	32,99%
93,3	8,59%	8,91%	6,98%	7,14%	8,70%
74,7	3,67%	3,57%	4,67%	5,48%	2,78%
59,7	0,00%	1,16%	1,05%	0,00%	0,00%
0	0,00%	2,70%	0,00%	0,00%	0,00%

Tab. 114. Procent śmiertelności embrionów dla różnych stężeń Kwasu azotowego (V) po okresie 24h.



Ryc. 57. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności embrionów dla poszczególnych stężeń HNO<sub>3</sub> w okresie 24h.

**Wyznaczenie współczynnika LC 50% /24h:**

*Metoda probitowa dla obliczeń stężenia letalnego LC50:*

Obliczenie stężenia letalnego LC50:

*Wartość stężenia LC50 dla związku chemicznego określa się w mg/l dla wód i ścieków w procentach:*

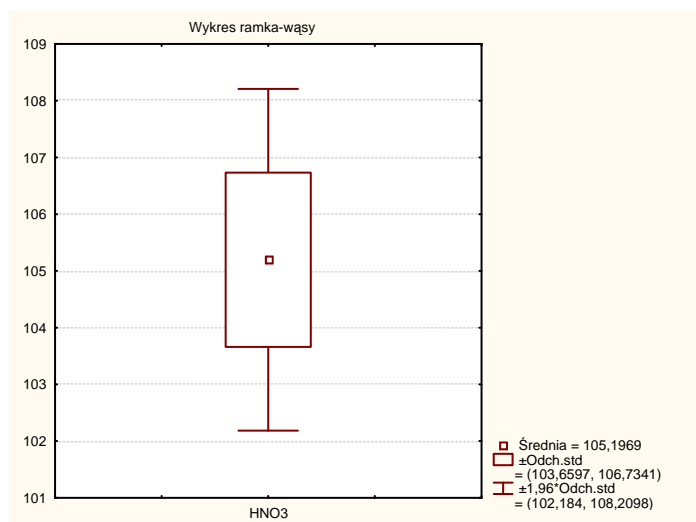
$$LC50 = N \lg \frac{5 - \bar{y} + b\bar{x}}{b}$$

Lp	Stężenie	Śmiertelność % M1	y <sub>1</sub> = probit M <sub>1</sub>	x <sub>1</sub> = lg C <sub>1</sub> stężenie	Kwadrat lg stężenia x <sub>1</sub> <sup>2</sup>	iloczyn lg stężenia i probitu x <sub>1</sub> i y <sub>1</sub>
1	183	100%	-	2,262451	5,118685	-
2	146	88%	6,18683143	2,164353	4,684423	13,39049
3	117	60%	5,26540475	2,068186	4,277393	10,88984
4	93	31%	4,49440172	1,9685	3,8749	8,8472
5	75	9%	3,65373733	1,8751	3,5159	6,851
6	60	4%	3,19725691	1,7782	3,1618	5,6852
7	48	1%	2,7307942	1,6812	2,8266	4,5911
8	38,4	3%	3,07359685	1,5843	2,5101	4,8696
suma			25,5284263	11,53548	22,34099	50,25479
średnie			4,25473772	1,922579		
współ reg – b =			7,199196			
LC50 =			106,1939 mg/l			

Tab. 115. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr1.

Obliczone współczynniki LC50		
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50
1	104,2	105,19 mg/l
2	103,88	
3	106,19	Odch. Stand. SD - 1,54
4	107,41	
5	104,3	

Tab. 116. Wyznaczone wartości LC50 HNO<sub>3</sub>.



Ryc. 58. Wykres ramka wąsy LC50 HNO<sub>3</sub>.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
HNO <sub>3</sub>	105,19 mg/l	Słabo toksyczny	szkodliwy	Słabo toksyczny

Tab. 117. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Lymnaea stagnalis*.

## Wyniki testu dla Amoniak:

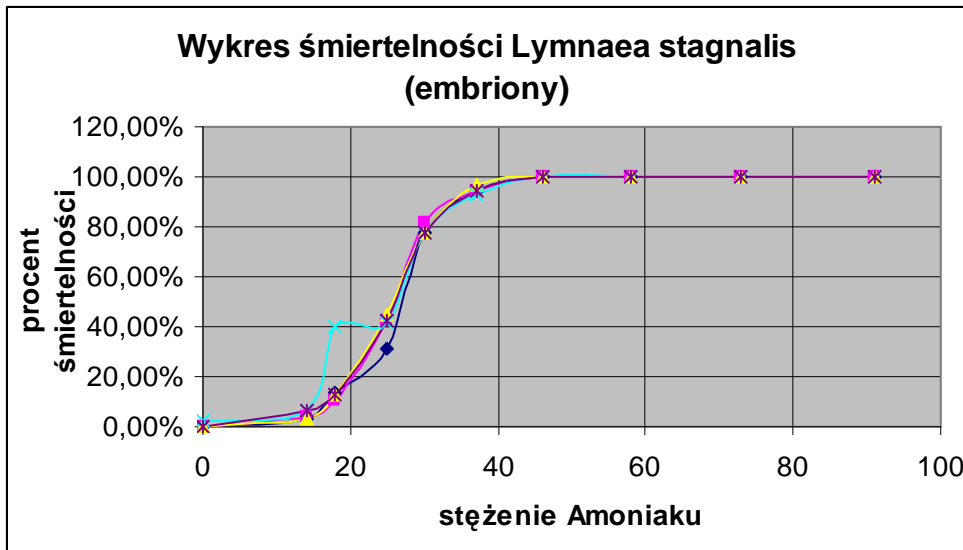
## Amoniak

Kokony stęż.-mg/l		Liczba jaj	śmiertelność	Kokony stęż.-mg/l		Liczba jaj	śmiertelność	Kokony stęż.-mg/l		Liczba jaj	śmiertelność
A1	91,5	57	57	A2	91,5	69	69	A3	91,5	119	119
B1	73,21	43	43	B2	73,21	37	37	B3	73,21	105	105
C1	58,5	103	103	C2	58,5	140	140	C3	58,5	44	44
D1	46,8	99	99	D2	46,8	37	37	D3	46,8	76	76
E1	37,5	101	95	E2	37,5	87	82	E3	37,5	115	111
F1	30	36	28	F2	30	99	81	F3	30	75	58
G1	25	35	11	G2	25	57	24	G3	25	89	40
H1	18	60	8	H2	18	66	7	H3	18	91	12
I1	14,4	63	2	I2	14,4	48	2	I3	14,4	85	3
Kont	0	86	0	Kont	0	95	0	Kont	0	44	0
A4	91,5	135	135	A5	91,5	59	59				
B4	73,21	58	58	B5	73,21	61	61				
C4	58,5	128	128	C5	58,5	42	42				
D4	46,8	108	108	D5	46,8	103	103				
E4	37,5	93	86	E5	37,5	71	67				
F4	30	68	53	F5	30	85	66				
G4	25	106	44	G5	25	113	48				
H4	18	77	31	H5	18	38	5				
I4	14,4	82	5	I5	14,4	96	6				
Kont	0	39	1	Kont	0	109	0				

Tab. 118. Śmiertelność embrionów dla różnych stężeń Amoniak po okresie 24h.

Stężenie mg/l	Próba 1	Próba 2	Próba 3	Próba 4	Próba 5
91	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
73	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
58	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
46	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
37	94,06%	94,25%	96,52%	92,47%	94,37%
30	77,78%	81,82%	77,33%	77,94%	77,65%
25	31,43%	42,11%	44,94%	41,51%	42,48%
18	13,33%	10,61%	13,19%	40,26%	13,16%
14	3,17%	4,17%	3,53%	6,10%	6,25%
0	0,00%	0,00%	0,00%	2,56%	0,00%

Tab. 119. Procent śmiertelności embrionów dla różnych stężeń Amoniak po okresie 24h.



Ryc. 59. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności embrionów dla poszczególnych stężeń NH<sub>4</sub>OH w okresie 24h.

**Wyznaczenie współczynnika LC 50% /24h:**

*Metoda probitowa dla obliczeń stężenia letalnego LC50:*

Obliczenie stężenia letalnego LC50:

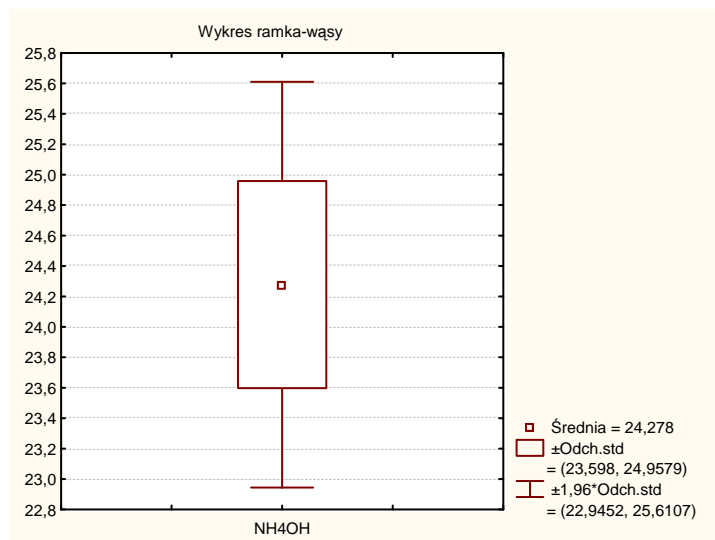
*Wartość stężenia LC50 dla związku chemicznego określa się w mg/l dla wód i ścieków w procentach:*

$$LC50 = N \lg \frac{5 - \bar{y} + b\bar{x}}{b}$$

Stężenie	Śmiertelność % M1	y <sub>1</sub> = probit M <sub>1</sub>	x <sub>1</sub> = log C <sub>1</sub> stężenie	Kwadrat lg stężenia x <sub>1</sub> <sup>2</sup>	iloczyn lg stężenia i probitu x <sub>1</sub> i y <sub>1</sub>
91,5	100%	-	1,961421	3,847173	-
73,21	100%	-	-	-	-
58,5	100%	-	1,767156	3,12284	-
46,8	100%	-	1,6702	2,7897	-
37,5	94%	6,55977999	1,574	2,4776	10,325
30	78%	5,76470967	1,4771	2,1819	8,5152
25	31%	4,51626145	1,3979	1,9542	6,3135
18	13%	3,88922838	1,2553	1,5757	4,882
14,4	3%	3,14427008	1,1584	1,3418	3,6422
0	0%	-	-	-	-
suma		23,8742496	6,862728	9,531211	33,67818
średnie		4,77484991	1,372546		
współ reg - b = 8,13640015					
LC50 = 25,13144 mg/l					

Tab. 120. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr1.

Obliczone współczynniki LC50		
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50
1	25,131	24,27 mg/l
2	23,247	
3	24,509	Odch. Stand. SD - 0,68
4	24,296	
5	24,206	



Tab. 121. Wyznaczone wartości LC50  $\text{HNO}_3$ . Ryc. 60. Wykres ramka wąsy LC50 –

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
$\text{NH}_3\text{OH}$	24,27 mg/l	Średnio toksyczny	szkodliwy	Średnio toksyczny

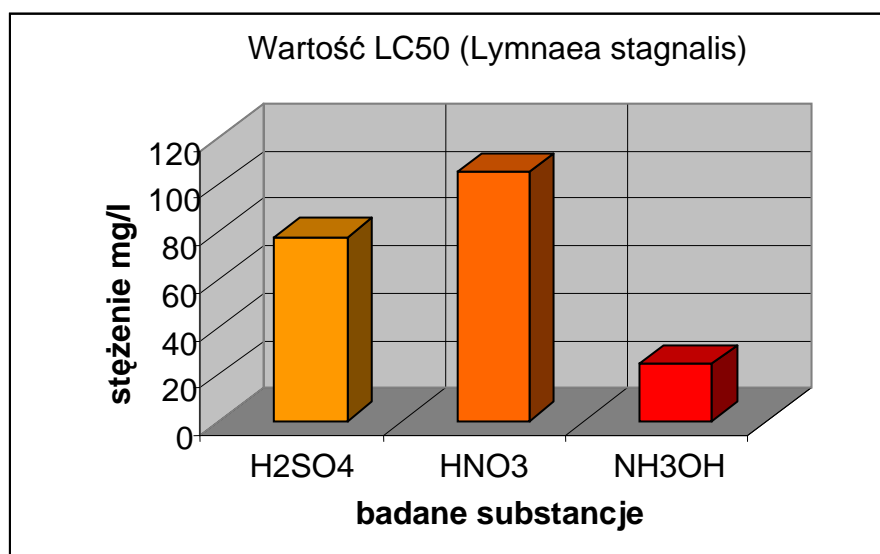
$\text{HNO}_3$ .

Tab. 122. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Lymnaea stagnalis*.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
$\text{H}_2\text{SO}_4$	77,64 mg/l	Średnio toksyczny	szkodliwy	Umiarkowanie toksyczny
$\text{HNO}_3$	105,19 mg/l	Słabo toksyczny	szkodliwy	Słabo toksyczny
$\text{NH}_3\text{OH}$	24,27 mg/l	Średnio toksyczny	szkodliwy	Średnio toksyczny

Zebranie i podsumowanie wyników dla kwasów i amoniaku.

Tab. 123. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Lymnaea stagnalis*.



Ryc. 61. Wykres wartości współczynników dla poszczególnych badanych związków chemicznych.



**VIII: Badanie wpływu Chlorku sodu, chlorku potasu, chlorku wapnia, chlorku magnezu na śmiertelność zarodków *Lymnaea stagnalis* L.**

**Cel badania:** określenie toksyczności ostrej wpływu w/w związków chemicznych dla embrionów *Lymnaea stagnalis* L. w okresie 24h, wyznaczenie zakresu stężeń bezpiecznych oraz współczynnika LC50.

*Do testów wytypowano kokony zawierające najbardziej żywotne kokony z rozwijającymi się embrionami Błotniarki stawowej, nie wykazujące oznak chorobotwórczych oraz zaburzeń rozwojowych.*

**Określenie wartości stałych dla testów:**

- Iloraz postępu geometrycznego rozcieńczeń  $q = 1,25$  (wyznaczony w testach screen).
- Liczba powtórzeń 5,
- Temp. otoczenia; 22,5°C – 23°C.
- Temp. wody w badanych próbach; 21,5°C
- Okres testu 24h
- Długość światło/noc – 16/8h

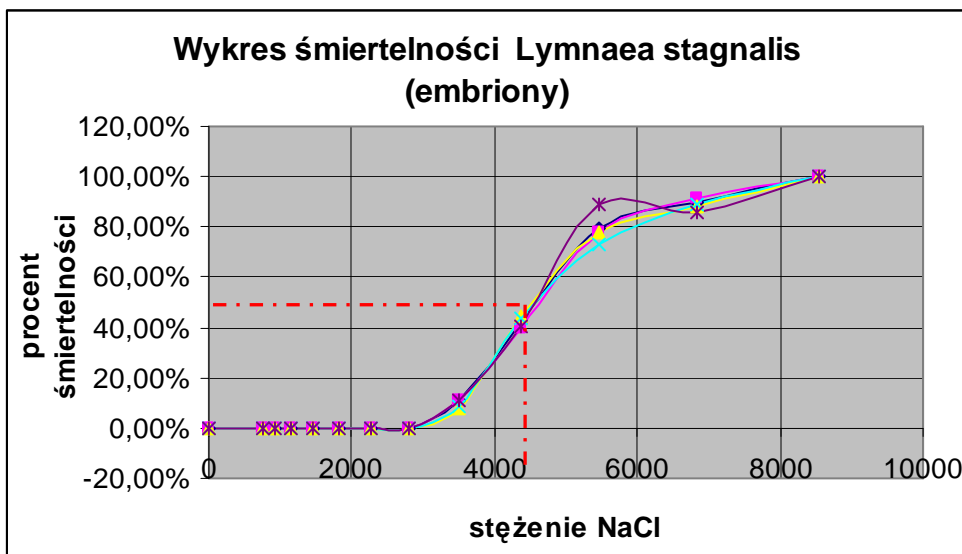
**Wyniki testu dla Chlorku sodu;**

Kokony stęż.- mg/l		Liczba jaj	śmiertelność	Kokony stęż.- mg/l		Liczba jaj	śmiertelność	Kokony stęż.- mg/l		Liczba jaj	śmiertelność
A1	8545	38	38	A2	8545	117	117	A3	8545	52	52
B1	6835	79	71	B2	6835	48	44	B3	6835	135	119
C1	5468	74	59	C2	5468	91	71	C3	5468	103	80
D1	4375	52	22	D2	4375	78	31	D3	4375	97	43
E1	3500	84	9	E2	3500	73	8	E3	3500	65	5
F1	2800	63	0	F2	2800	85	0	F3	2800	112	0
G1	2280	55	0	G2	2280	93	0	G3	2280	66	0
Kont	0	92	0	Kont	0	37	0	Kont	0	48	0
A4	8545	38	38	A5	8545	127	127				
B4	6835	84	75	B5	6835	104	89				
C4	5468	92	67	C5	5468	83	74				
D4	4375	117	51	D5	4375	49	20				
E4	3500	45	4	E5	3500	99	11				
F4	2800	69	0	F5	8545	75	0				
G4	2280	61	0	G5	2280	127	0				
Kont	0	57	0	Kont	0	41	0				

Tab. 124. Śmiertelność embrionów dla różnych stężeń Chlorku sodu po okresie 72h.

Stężenie mg/l	Próba 1	Próba 2	Próba 3	Próba 4	Próba 5
8545	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
6835	89,87%	91,67%	88,15%	89,29%	85,58%
5468	79,73%	78,02%	77,67%	72,83%	89,16%
4375	42,31%	39,74%	44,33%	43,59%	40,82%
3500	10,71%	10,96%	7,69%	8,89%	11,11%
2800	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
2280	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
1830	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
1460	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
1160	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
930	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
750	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
0	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Tab. 125. Procent śmiertelności embrionów dla różnych stężeń chlorku sodu po okresie 72h.

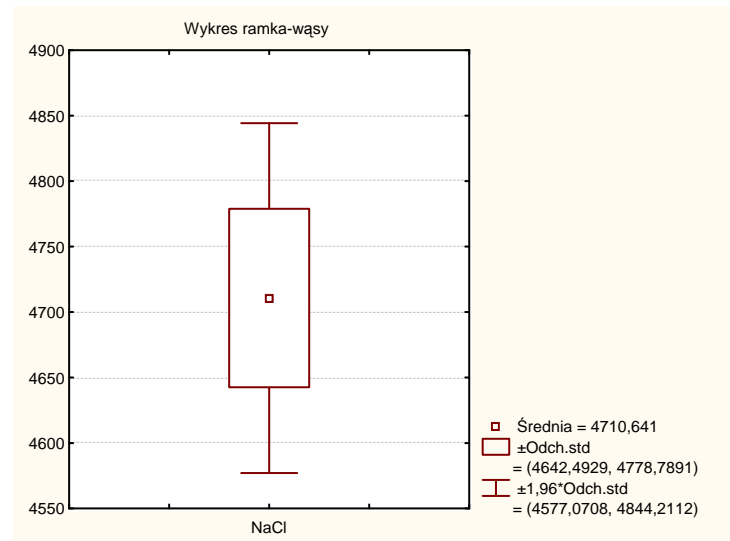


Ryc. 62. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności embrionów dla poszczególnych stężeń NaCl w okresie 72h.

Stężenie	Śmiertelność % M1	$y_1 = \text{probit } M_1$	$x_1 = \lg C_1$ stężenie	Kwadrat $\lg$ stężenia $x_1^2$	iloczyn $\lg$ stężenia i probitu $x_1$ i $y_1$
8545	100,00%	-	3,931712	15,45836	-
6835	89,87%	<b>6,2743719</b>	3,834739	14,70522	24,06058
5468	79,73%	<b>5,83200627</b>	3,737829	13,97136	21,79904
4375	42,31%	<b>4,80597186</b>	<b>3,641</b>	<b>13,257</b>	<b>17,498</b>
3500	10,71%	<b>3,75813321</b>	<b>3,5441</b>	<b>12,56</b>	<b>13,319</b>
<b>2800</b>	0,00%	-	<b>3,4472</b>	<b>11,883</b>	-
<b>2280</b>	0,00%	-	<b>3,3579</b>	<b>11,276</b>	-
<b>0</b>	0,00%	-	-	-	-
suma		20,6704832	14,75761	54,49372	76,67713
średnie		5,16762081	3,689403		
współ regresji – b = 8,85026186					
LC50 = 4682,347 mg/l					

Tab. 126. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr2.

Obliczone współczynniki LC50		
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50
1	4682,3	<b>4710,64 mg/l</b>
2	4622	
3	4775,3	
4	4690,1	
5	4783,5	



Tab. 127. Wyznaczone wartości LC50 NaCl. Ryc. 63. Wykres ramka wąsy LC 50 NaCl.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
NaCl	4710,64 mg/l	Zaledwie toksyczny	-	Słabo toksyczny

Tab. 128. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Lymnaea stagnalis*.

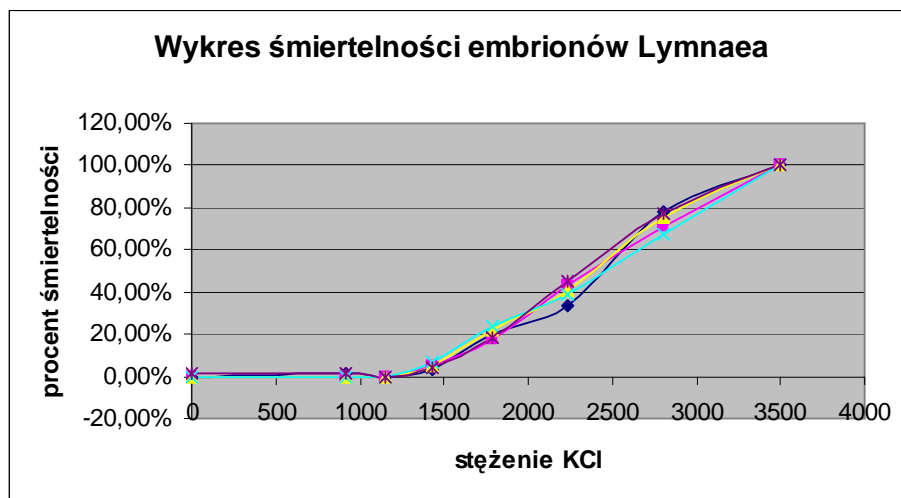
**Wyniki testu dla Chlorku potasu**

Kokony stęż.- mg/l			Liczba jaj	śmiertelność ć	Kokony stęż.- mg/l			Liczba jaj	śmiertelność ć	Kokony stęż.- mg/l			Liczba jaj	śmiertelność ć
A1	3500,00		38	38	A2	3500,00	74	74	A3	3500,00	85	85		
B1	2800,00		63	49	B2	2800,00	147	104	B3	2800,00	93	70		
C1	2240,00		65	22	C2	2240,00	85	37	C3	2240,00	84	34		
D1	1792,00		83	17	D2	1792,00	35	6	D3	1792,00	138	30		
E1	1433,60		126	4	E2	1433,60	63	3	E3	1433,60	74	4		
F1	1146,88		115	0	F2	1146,88	73	0	F3	1146,88	184	0		
G1	917,50		58	1	G2	917,50	136	0	G3	917,50	163	0		
Kont	0		43	0	Kont	0	47	0	Kont	0	72	0		
A4	3500,00		54	54	A5	3500,00	49	49						
B4	2800,00		117	79	B5	2800,00	39	30						
C4	2240,00		85	33	C5	2240,00	75	34						
D4	1792,00		131	31	D5	1792,00	119	22						
E4	1433,60		59	4	E5	1433,60	94	4						
F4	1146,88		95	0	F5	1146,88	49	0						
G4	917,50		59	0	G5	917,50	73	1						
Kont	0		76	0	Kont	0	113	2						

Tab. 129. Śmiertelność embrionów dla różnych stężeń Chlorku potasu po okresie 72h.

Stężenie mg/l	Próba 1	Próba 2	Próba 3	Próba 4	Próba 5
3500,00	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
2800,00	77,78%	70,75%	75,27%	67,52%	76,92%
2240,00	33,85%	43,53%	40,48%	38,82%	45,33%
1792,00	20,48%	17,14%	21,74%	23,66%	18,49%
1433,60	3,17%	4,76%	5,41%	6,78%	4,26%
1146,88	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
917,50	1,72%	0,00%	0,00%	0,00%	1,37%
0	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	1,77%

Tab. 130. Procent śmiertelności embrionów dla różnych stężeń chlorku potasu po okresie 72h.



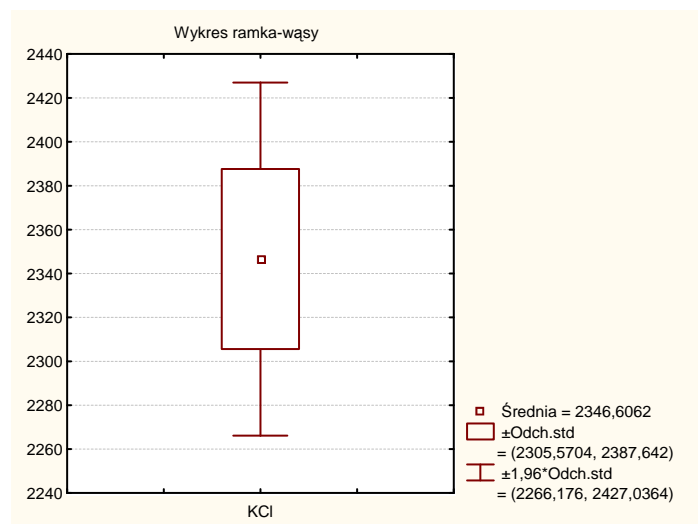
Ryc. 64. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności embrionów dla poszczególnych stężeń KCl w okresie 72h.

Stężenie	Śmiertelność % M1	$y_1 = \text{probit } M_1$	$x_1 = \lg C_1$ stężenie	Kwadrat lg stężenia $x_1^2$	iloczyn lg stężenia i probitu $x_1$ i $y_1$
3500,00	100%	-	3,544068	12,56042	-
2800,00	71%	5,546046	3,447158	11,8829	19,1181
2240,00	44%	4,837089	3,350248	11,22416	16,20545
1792,00	17%	4,051465	3,253338	10,58421	13,18078
1433,60	5%	3,331609	3,156428	9,963038	10,51598
1146,88	0%	-	3,059518	9,36065	-
917,50	0%	-	2,962608	8,777046	-
0	0%	-	-	-	-
<b>suma</b>		<b>17,76621</b>	<b>13,20717</b>	<b>43,65431</b>	<b>59,02031</b>
<b>średnie</b>		<b>4,441552</b>	<b>3,301793</b>		
<b>współ regresji – b = 7,665809</b>					
<b>LC50/72h = 2369,4 mg/l</b>					

Tab. 131. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr3.

Obliczone współczynniki LC50		
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50
1	2344,9	2346,6 mg/l Odch. Stand. SD - 41,04
2	2369,4	
3	2319,6	
4	2401,8	
5	2297,2	

Tab. 132. Wyznaczone wartości LC50 KCl.



Ryc. 65. Wykres ramka wąsy LC 50 – KCl.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
KCl	2346,6 mg/l	Zaledwie toksyczny	-	Słabo toksyczny

Tab. 133. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Lymnaea stagnalis*.

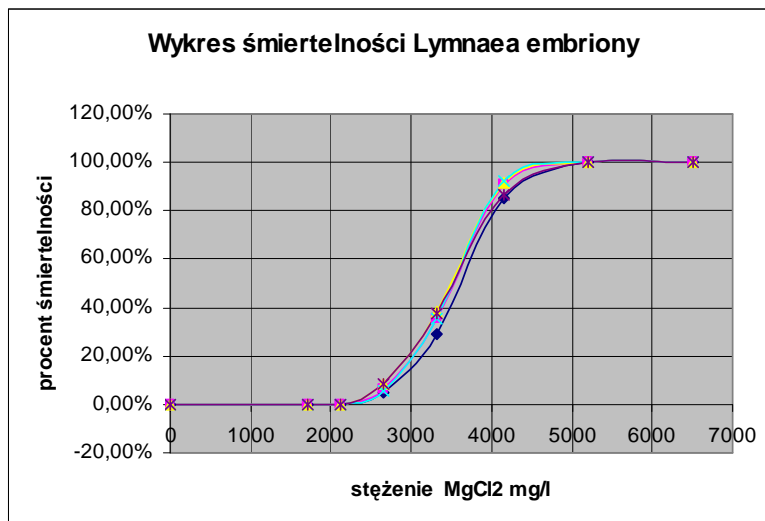
**Wyniki testu dla Chlorku magnezu.**

Kokony stęż.- mg/l	Liczba jaj	śmiertelność	Kokony stęż.- mg/l	Liczba jaj	śmiertelność	Kokony stęż.- mg/l	Liczba jaj	śmiertelność
A1	6500,00	87	A2	6500,00	57	A3	6500,00	92
B1	5200,00	50	B2	5200,00	78	B3	5200,00	82
C1	4160,00	95	C2	4160,00	65	C3	4160,00	49
D1	3328,00	117	D2	3328,00	94	D3	3328,00	118
E1	2662,40	43	E2	2662,40	76	E3	2662,40	128
F1	2129,92	128	F2	2129,92	113	F3	2129,92	120
G1	1703,94	54	G2	1703,94	143	G3	1703,94	65
Kont	0	37	Kont	0	84	Kont	0	47
A4	6500,00	40	A5	6500,00	53			
B4	5200,00	85	B5	5200,00	48			
C4	4160,00	93	C5	4160,00	147			
D4	3328,00	137	D5	3328,00	37			
E4	2662,40	68	E5	2662,40	69			
F4	2129,92	84	F5	2129,92	54			
G4	1703,94	59	G5	1703,94	59			
Kont	0	97	Kont	0	52			

Tab. 134. Śmiertelność embrionów dla różnych stężeń Chlorku magnezu po okresie 72h.

Stężenie mg/l	Próba 1	Próba 2	Próba 3	Próba 4	Próba 5
6500,00	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
5200,00	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
4160,00	85,26%	90,77%	91,84%	92,47%	86,39%
3328,00	29,06%	35,11%	38,14%	35,77%	37,84%
2662,40	4,65%	6,58%	8,59%	5,88%	8,70%
2129,92	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
1703,94	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
0	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Tab. 135. Procent śmiertelności embrionów dla różnych stężeń chlorku magnezu po okresie 72h.



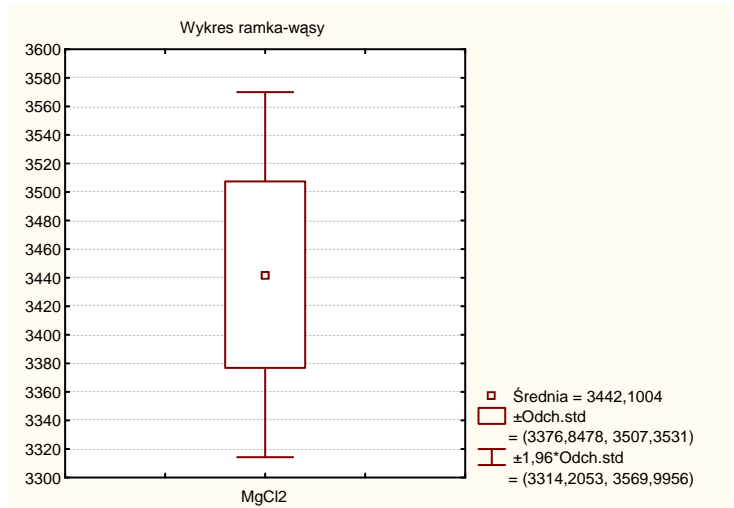
Ryc. 66. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności embrionów dla poszczególnych stężeń MgCl<sub>2</sub> w okresie 72h.

Stężenie	Śmiertelność % M1	$y_1 = \text{probit } M_1$	$x_1 = \lg C_1$ stężenie	Kwadrat $\lg$ stężenia $x_1^2$	iloczyn $\lg$ stężenia i probitu $x_1$ i $y_1$
6500,00	100%	-	3,812913	14,53831	-
5200,00	100%	-	3,716003	13,80868	-
4160,00	91%	6,326677507	3,619093	13,09784	22,89684
3328,00	35%	4,617550068	3,522183	12,40578	16,26386
2662,40	7%	3,492095409	3,425273	11,7325	11,96138
2129,92	0%	-	3,328363	11,078	-
1703,94	0%	-	3,231453	10,44229	-
0	0%	-	-	-	-
suma		14,43632298	10,56655	37,23611	51,12208
średnie		4,812107661	3,522183		
współ regresji – b =		14,62481539			
LC50 =		3427,9211 mg/l			

Tab. 136. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr1.

Obliczone współczynniki LC50		
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50
1	3549,9	3442,1 mg/l
2	3427,9	
3	3377,5	
4	3410,1	
5	3445,1	

Tab. 137. Wyznaczone wartości LC50 MgCl<sub>2</sub>.



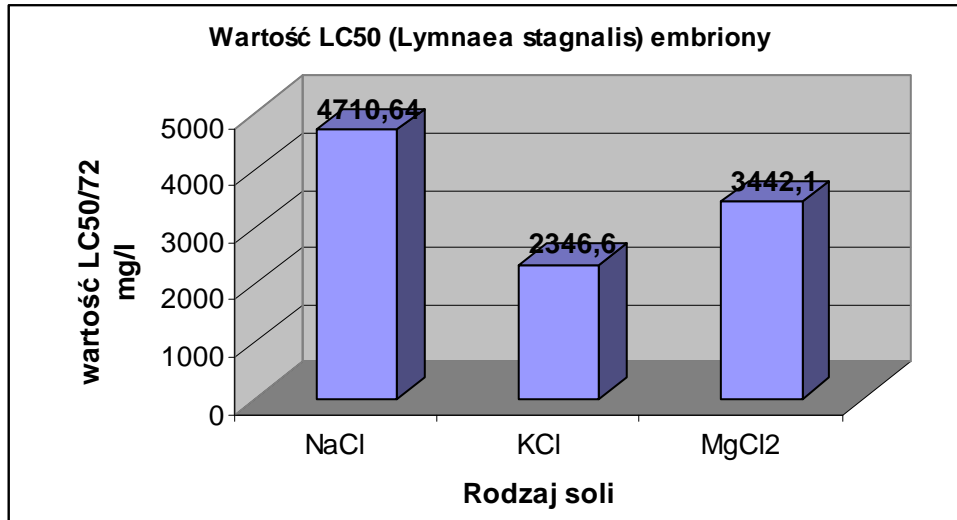
Ryc. 67. Wykres ramka wąsy LC50 MgCl<sub>2</sub>.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
MgCl <sub>2</sub>	3442,1 mg/l	Zaledwie toksyczny	-	Słabo toksyczny

Tab. 138. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Lymnaea stagnalis*.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
NaCl	4710,64 mg/l	Zaledwie toksyczny	-	Słabo toksyczny
KCl	2346,6 mg/l	Zaledwie toksyczny	-	Słabo toksyczny
MgCl <sub>2</sub>	3442,1 mg/l	Zaledwie toksyczny	-	Słabo toksyczny

Tab. 139. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Lymnaea stagnalis*.



Ryc. 68. Wartości LC50/72h dla poszczególnych soli chlorków.



**IX: Badanie wpływu detergentów niejonowych Brij na śmiertelność form młodocianych (po wylęgu) *Lymnaea stagnalis* L.**

**Cel badania:** określenie toksyczności ostrej wpływu w/w związków chemicznych dla form młodocianych *Lymnaea stagnalis* L. w okresie 24h, wyznaczenie zakresu stężeń bezpiecznych oraz współczynnika LC50.

*Do testów wytypowano formy juwenilne Błotniarki stawowej do 24h po wylęgu wykazujące wigor życiowy i będące w dobrej formie, nie wykazujące oznak chorobotwórczych oraz zaburzeń rozwojowych.*

**Określenie wartości stałych dla testów:**

- **Iloraz postępu geometrycznego rozcieńczeń  $q = 1,25$**  (wyznaczony w testach screen).
- **Liczba powtórzeń 10,**
- **Temp. otoczenia; 22,5°C – 23°C.**
- **Temp. wody w badanych próbach; 21,5°C**
- **Okres testu 24h**
- **Długość światło/noc – 16/8h**

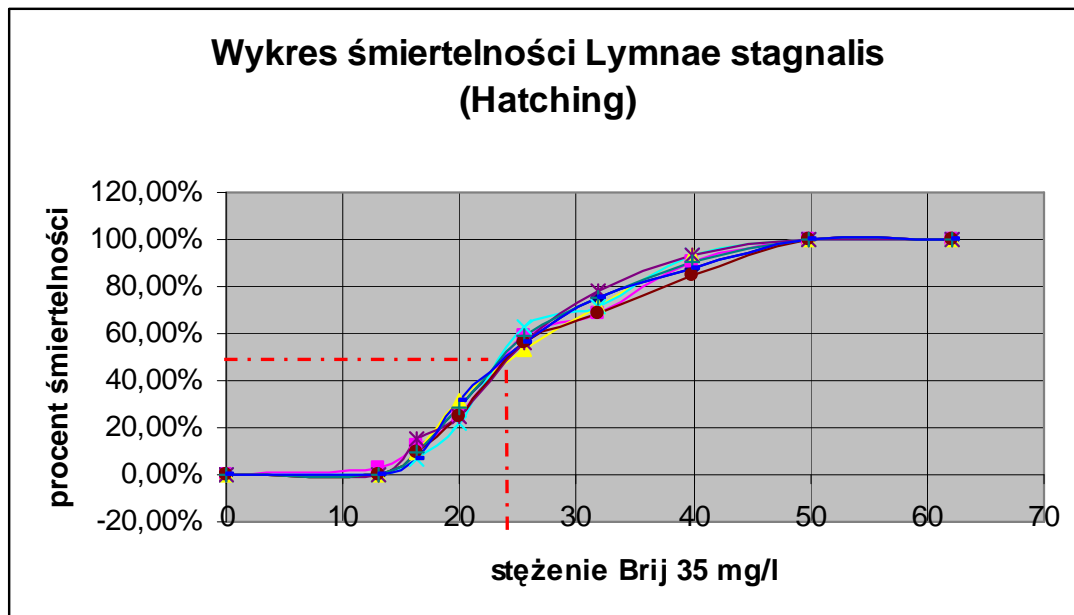
9. Wyniki testów toksyczności dla Brij 35.

<i>(Lymnaea stagnalis hatching) Brij35</i>								
STĘŻENIE mg/l	1	2	3	4	5	6	7	8
62,2	32	32	32	32	32	32	32	32
49,8	32	32	32	32	32	32	32	32
39,9	28	29	30	30	30	27	29	28
31,9	24	22	23	23	25	22	24	24
25,5	18	19	17	20	18	18	19	18
20	9	8	10	7	8	8	9	10
16,3	3	4	3	2	5	3	3	2
13	0	1	0	0	0	0	0	0
<b>Kontrola</b>	0	0	0	1	0	0	0	0

Tab. 140. Śmiertelność form młodocianych (po wylęgu) dla różnych stężeń Brij 35 po okresie 24h.

Stężenie mg/l	Próba 1	Próba 2	Próba 3	Próba 4	Próba 5	Próba 6	Próba 7	Próba 8
62,2	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
49,8	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
39,9	87,50%	90,63%	93,75%	93,75%	93,75%	84,38%	90,63%	87,50%
31,9	75,00%	68,75%	71,88%	71,88%	78,13%	68,75%	75,00%	75,00%
25,5	56,25%	59,38%	53,13%	62,50%	56,25%	56,25%	59,38%	56,25%
20	28,13%	25,00%	31,25%	21,88%	25,00%	25,00%	28,13%	31,25%
16,3	9,38%	12,50%	9,38%	6,25%	15,63%	9,38%	9,38%	6,25%
13	0,00%	3,13%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
0	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Tab. 141. Procent śmiertelności embrionów dla różnych stężeń Brij 35 po okresie 24h.



Ryc. 69. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności embrionów dla poszczególnych stężeń Brij 35 w okresie 24h.

**Wyznaczenie współczynnika LC 50% /24h:**

*Metoda probitowa dla obliczeń stężenia letalnego LC50:*

Obliczenie stężenia letalnego LC50:

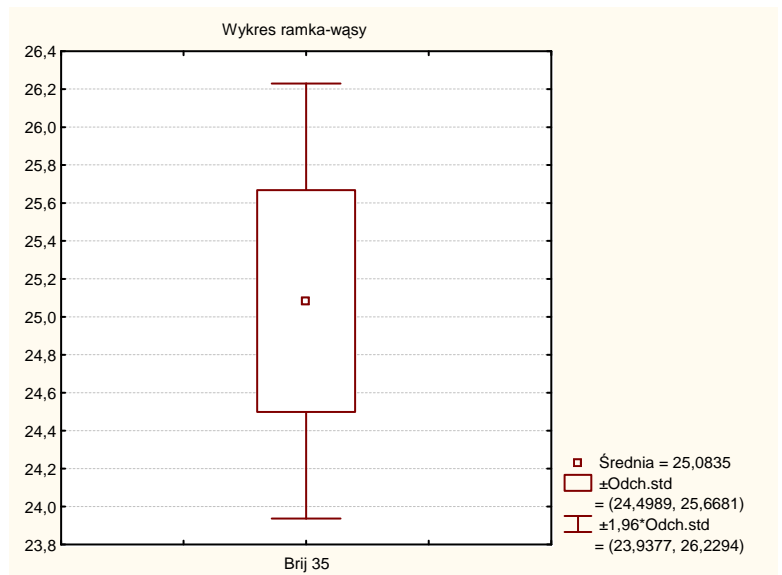
*Wartość stężenia LC50 dla związku chemicznego określa się w mg/l dla wód i ścieków w procentach:*

$$LC50 = N \lg \frac{5 - \bar{y} + b\bar{x}}{b}$$

Stężenie	Śmiertelność % M1	$y_1 = \text{probit } M_1$	$x_1 = \lg C_1$ stężenie	Kwadrat lg stężenia $x_1^2$	iloczyn lg stężenia i probitu $x_1$ i $y_1$
62,2	100%	-	1,79379	3,21768394	-
49,8	100%	-	1,697229	2,88058744	-
39,9	88%	6,150349	1,600973	2,56311421	9,846543
31,9	75%	5,67449	1,5038	2,261386	8,5332
25,5	56%	5,157311	1,4065	1,978355	7,254
20	28%	4,420868	1,301	1,692679	5,7517
16,3	9%	3,681989	1,2122	1,469399	4,4633
13	0%	-	1,1139	1,24087	-
0	0%	-	-	-	-
suma		25,08501	7,024521	9,96493375	35,8487
średnie		5,017001	1,404904		
współ reg - b = 6,309298					
LC50 = 25,247 mg/l					

Tab. 142. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr2.

Obliczone współczynniki LC50		
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50
1	25,247	25,07 mg/l
2	25,219	
3	24,826	
4	24,996	Odch. Stand.
5	24,069	SD - 0,58
6	25,476	
7	24,759	
8	26,076	



Tab. 143. Wyznaczone wartości LC50 Brij 35. Ryc. 70. Wykres ramka wąsy LC50 Brij 35.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
Brij 35	25,07mg/l	Średnio toksyczny	szkodliwy	umiarkowanie toksyczny

Tab. 144. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Lymnaea stagnalis*.

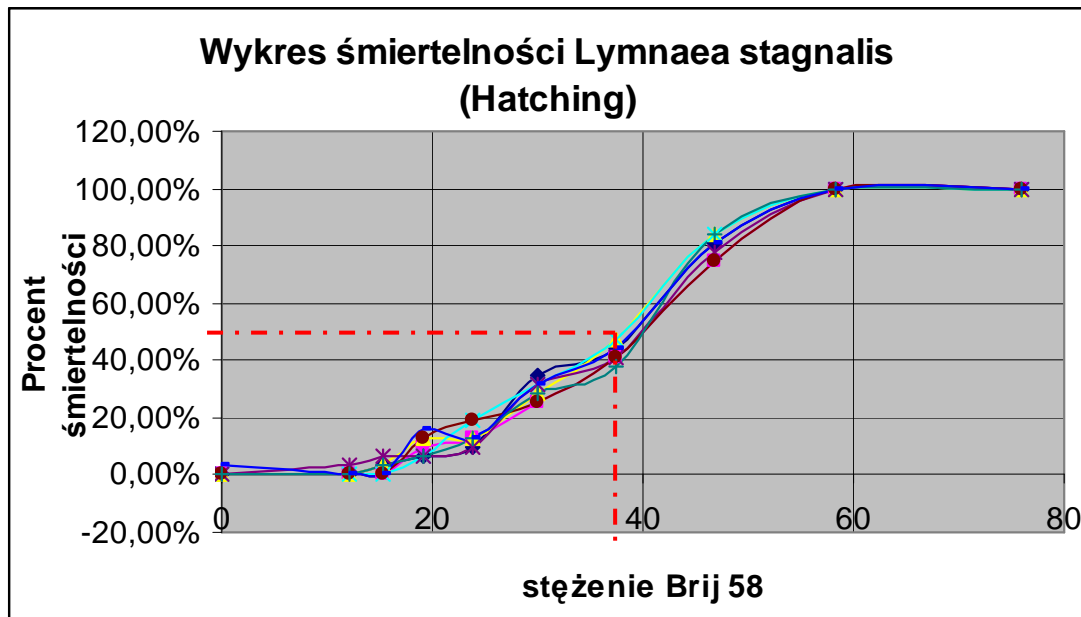
10. Wyniki testów toksyczności dla Brij 58

<b>(<i>Lymnaea stagnalis</i> hatching) Brij 58</b>								
<b>STĘŻENIE mg/l</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
76	32	32	32	32	32	32	32	32
58,4	32	32	32	32	32	32	32	32
46,72	26	24	27	27	25	24	27	26
37,38	14	13	15	15	13	13	12	14
29,9	11	8	9	10	10	8	9	10
23,9	3	4	4	6	3	6	4	4
19,1	2	3	4	2	2	4	2	5
15,3	1	0	1	0	2	0	1	0
12,2	0	0	0	0	1	0	0	0
<b>Kontrola</b>	0	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 145. Śmiertelność form młodocianych (po wylęgu) dla różnych stężeń Brij 35 po okresie 24h.

<b>Stężenie mg/l</b>	<b>Próba 1</b>	<b>Próba 2</b>	<b>Próba 3</b>	<b>Próba 4</b>	<b>Próba 5</b>	<b>Próba 6</b>	<b>Próba 7</b>	<b>Próba 8</b>
76	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
58,4	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
46,72	81,25%	75,00%	84,38%	84,38%	78,13%	75,00%	84,38%	81,25%
37,38	43,75%	40,63%	46,88%	46,88%	40,63%	40,63%	37,50%	43,75%
29,9	34,38%	25,00%	28,13%	31,25%	31,25%	25,00%	28,13%	31,25%
23,9	9,38%	12,50%	12,50%	18,75%	9,38%	18,75%	12,50%	12,50%
19,1	6,25%	9,38%	12,50%	6,25%	6,25%	12,50%	6,25%	15,63%
15,3	3,13%	0,00%	3,13%	0,00%	6,25%	0,00%	3,13%	0,00%
12,2	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%	0,00%	0,00%
<b>0</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,00%</b>	<b>3,13%</b>

Tab. 146. Procent śmiertelności embrionów dla różnych stężeń Brij 58 po okresie 24h.



Ryc. 71. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności embrionów dla poszczególnych stężeń Brij 58 w okresie 24h.

**Wyznaczenie współczynnika LC 50% /24h:**

*Metoda probitowa dla obliczeń stężenia letalnego LC50:*

Obliczenie stężenia letalnego LC50:

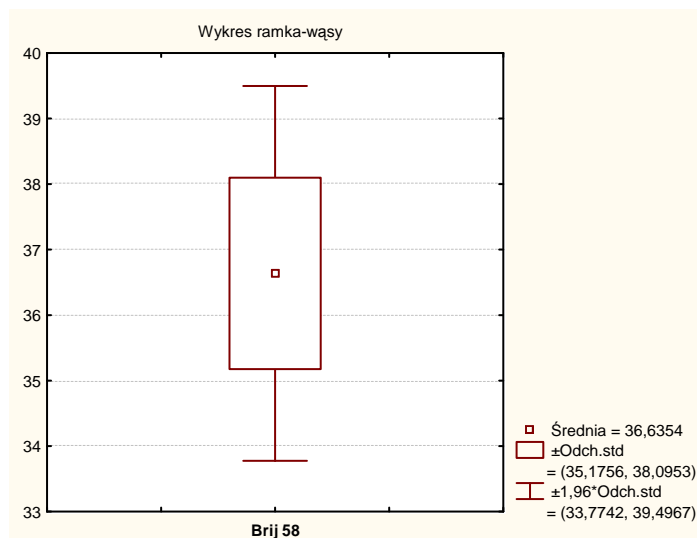
*Wartość stężenia LC50 dla związku chemicznego określa się w mg/l dla wód i ścieków w procentach:*

$$LC50 = N \lg \frac{5 - \bar{y} + b\bar{x}}{b}$$

Stężenie	Śmiertelność % M1	y <sub>1</sub> = probit M <sub>1</sub>	x <sub>1</sub> = lg C <sub>1</sub> stężenie	Kwadrat lg stężenia x <sub>1</sub> <sup>2</sup>	iloczyn lg stężenia i probitu x <sub>1</sub> i y <sub>1</sub>
76	100%	-	1,880814	3,53746	-
58,4	100%	-	1,766413	3,120214	-
46,72	81%	5,88714656	1,669503	2,78724	9,828608
37,38	44%	4,84268932	1,5726	2,4732	7,6158
29,9	34%	4,59774993	1,4757	2,1776	6,7848
23,9	9%	3,6819891	1,3784	1,9	5,0752
19,1	6%	3,46587946	1,281	1,641	4,4399
15,3	3%	3,13726813	1,1847	1,4035	3,7167
12,2	0%	-	1,0864	1,1802	-
0	0%	-	-	-	-
suma		25,6127225	8,561936	12,38256	37,46103
średnie		4,26878708	1,426989		
współ reg – b = 5,53467934					
LC50 = 36,23298 mg/l					

Tab. 147. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr2.

Obliczone współczynniki LC50		
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50
1	36,233	<b>36,63 mg/l</b>
2	34,724	
3	36,483	
4	38,262	
5	38,616	
6	35,756	
7	35,144	
8	37,866	



Tab. 148. Wyznaczone wartości LC50 Brij 58. Ryc. 72. Wykres ramka wąsy LC50 Brij 58.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
Brij 58	36,63mg/l	Średnio toksyczny	szkodliwy	umiarkowanie toksyczny

Tab. 149. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Lymnaea stagnalis*.

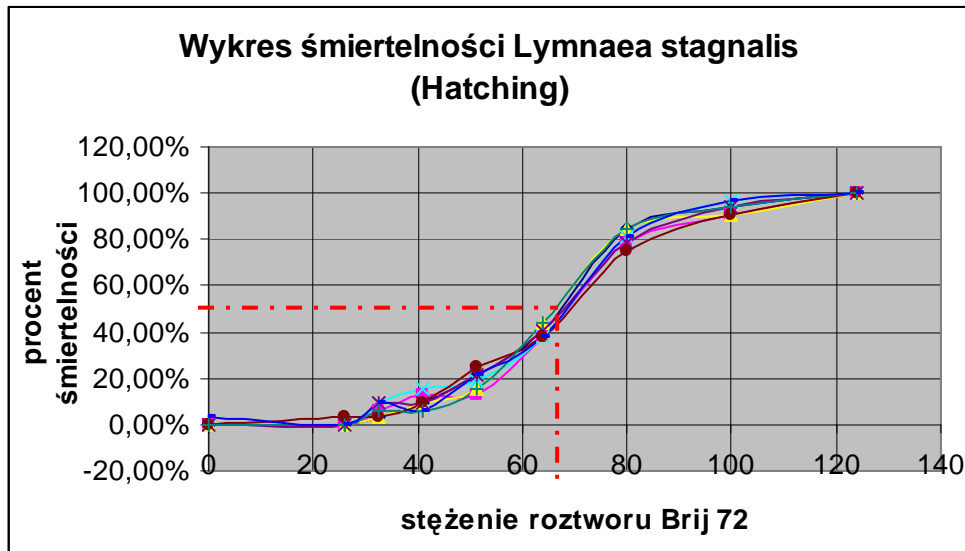
11. Wyniki testów toksyczności dla Brij 72

<i>(Lymnaea stagnalis hatching) Brij 72</i>								
STĘŻENIE mg/l	1	2	3	4	5	6	7	8
124	32	32	32	32	32	32	32	32
100	30	29	29	31	30	29	30	31
80	27	25	27	26	25	24	27	26
64	13	12	14	12	13	12	14	12
51,2	7	4	5	6	7	8	5	7
40,9	3	4	3	5	3	3	2	2
32,7	1	2	1	3	3	1	2	3
26,2	0	0	0	0	0	1	0	0
<b>Kontrola</b>	0	0	0	0	0	0	0	1

Tab. 150. Śmiertelność form po wylęgu dla różnych stężeń Brij 72 po okresie 24h.

Stężenie mg/l	Próba 1	Próba 2	Próba 3	Próba 4	Próba 5	Próba 6	Próba 7	Próba 8
124	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
100	93,75%	90,63%	90,63%	96,88%	93,75%	90,63%	93,75%	96,88%
80	84,38%	78,13%	84,38%	81,25%	78,13%	75,00%	84,38%	81,25%
64	40,63%	37,50%	43,75%	37,50%	40,63%	37,50%	43,75%	37,50%
51,2	21,88%	12,50%	15,63%	18,75%	21,88%	25,00%	15,63%	21,88%
40,9	9,38%	12,50%	9,38%	15,63%	9,38%	9,38%	6,25%	6,25%
32,7	3,13%	6,25%	3,13%	9,38%	9,38%	3,13%	6,25%	9,38%
26,2	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%	0,00%
0	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,13%

Tab. 151. Procent śmiertelności embrionów dla różnych stężeń Brij 72 po okresie 24h.



Ryc. 73. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności embrionów dla poszczególnych stężeń Brij 72 w okresie 24h.

**Wyznaczenie współczynnika LC 50% /24h:**

*Metoda probitowa dla obliczeń stężenia letalnego LC50:*

Obliczenie stężenia letalnego LC50:

*Wartość stężenia LC50 dla związku chemicznego określa się w mg/l dla wód i ścieków w procentach:*

$$LC50 = N \lg \frac{5 - \bar{y} + b\bar{x}}{b}$$

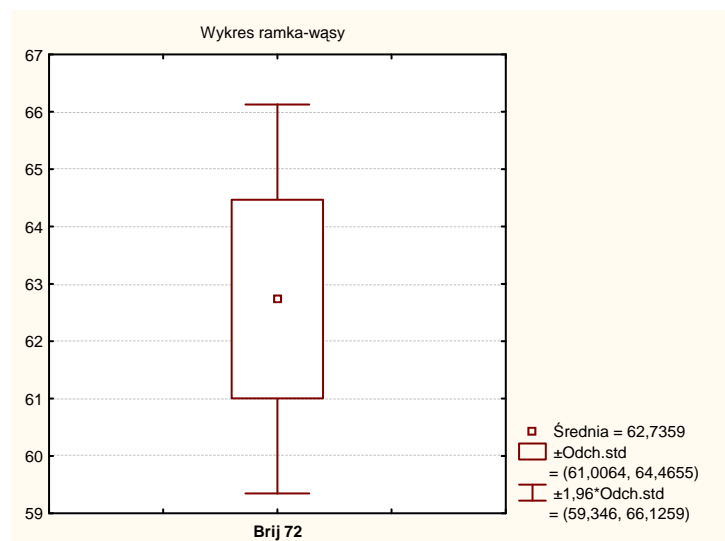
Stężenie	Śmiertelność % M1	$y_1 = \text{probit } M_1$	$x_1 = \lg C_1$ stężenie	Kwadrat $\lg$ stężenia $x_1^2$	iloczyn $\lg$ stężenia i probitu $x_1$ i $y_1$
124	100%	-	2,093422	4,382414	-
100	94%	<b>6,53412054</b>	2	4	13,06824
80	84%	<b>6,00999017</b>	1,90309	3,621751	11,43755
64	41%	<b>4,76279789</b>	<b>1,8062</b>	<b>3,2623</b>	<b>8,6025</b>
51,2	22%	<b>4,22357824</b>	<b>1,7093</b>	<b>2,9216</b>	<b>7,2192</b>
40,9	9%	<b>3,6819891</b>	<b>1,6117</b>	<b>2,5977</b>	<b>5,9343</b>
32,7	3%	<b>3,13726813</b>	<b>1,5145</b>	<b>2,2939</b>	<b>4,7515</b>
26,2	0%	-	<b>1,4183</b>	<b>2,0116</b>	-
<b>0</b>	0%	-	-	-	-
<b>0</b>	0%	-	-	-	-
<b>suma</b>		<b>28,3497441</b>	<b>10,54481</b>	<b>18,69715</b>	<b>51,01339</b>
<b>średnie</b>		<b>4,72495735</b>	<b>1,757468</b>		
<b>współ reg – b = 7,21082137</b>					
<b>LC50 = 62,46137 mg/l</b>					

Tab. 152. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr2.



Obliczone współczynniki LC50		
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50
1	62,46137	<b>62,73 mg/l</b>
2	65,06659	
3	63,92466	
4	64,49245	
5	62,15141	Odch. Stand.
6	59,91124	<b>SD - 1,73</b>
7	62,76029	
8	61,11952	

Tab. 153. Wyznaczone wartości LC50 Brij 72.



Ryc. 74. Wykres ramka wąsy LC50 Brij 72.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
Brij 72	62,73 mg/l	Średnio toksyczny	szkodliwy	umiarkowanie toksyczny

Tab. 154. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Lymnaea stagnalis*.

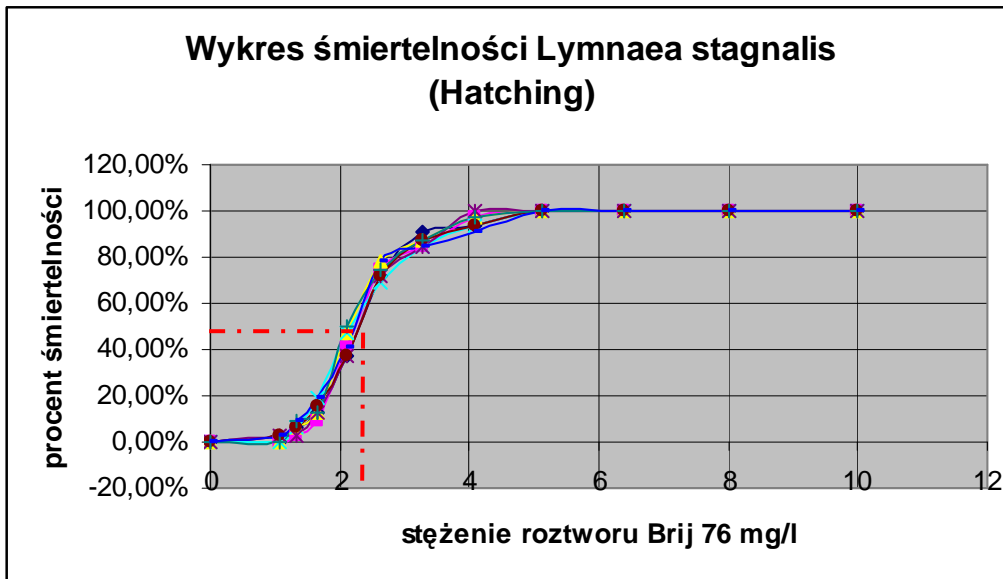
12. Wyniki testów toksyczności dla Brij 76

<i>(Lymnaea stagnalis hatching) Brij 76</i>								
STĘŻENIE mg/l	1	2	3	4	5	6	7	8
10	32	32	32	32	32	32	32	32
8	32	32	32	32	32	32	32	32
6,4	32	32	32	32	32	32	32	32
5,12	32	32	32	32	32	32	32	32
4,09	30	31	31	30	32	30	31	29
3,28	29	27	28	27	27	28	28	27
2,62	23	24	25	22	23	23	24	25
2,1	12	13	15	15	12	12	16	13
1,66	4	3	4	6	4	5	4	6
1,32	2	1	2	2	1	2	3	3
1,06	0	0	0	0	1	1	0	1
Kontrola	0	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 155. Śmiertelność form po wylęgu dla różnych stężeń Brij 76 po okresie 24h.

Stężenie mg/l	Próba 1	Próba 2	Próba 3	Próba 4	Próba 5	Próba 6	Próba 7	Próba 8
10	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
8	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
6,4	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
5,12	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
4,09	93,75%	96,88%	96,88%	93,75%	100,00%	93,75%	96,88%	90,63%
3,28	90,63%	84,38%	87,50%	84,38%	84,38%	87,50%	87,50%	84,38%
2,62	71,88%	75,00%	78,13%	68,75%	71,88%	71,88%	75,00%	78,13%
2,1	37,50%	40,63%	46,88%	46,88%	37,50%	37,50%	50,00%	40,63%
1,66	12,50%	9,38%	12,50%	18,75%	12,50%	15,63%	12,50%	18,75%
1,32	6,25%	3,13%	6,25%	6,25%	3,13%	6,25%	9,38%	9,38%
1,06	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,13%	3,13%	0,00%	3,13%
0	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Tab. 156. Procent śmiertelności embrionów dla różnych stężeń Brij 76 po okresie 24h.



Ryc. 75. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności embrionów dla poszczególnych stężeń Brij 76 w okresie 24h.

**Wyznaczenie współczynnika LC 50% /24h:**

*Metoda probitowa dla obliczeń stężenia letalnego LC50:*

Obliczenie stężenia letalnego LC50:

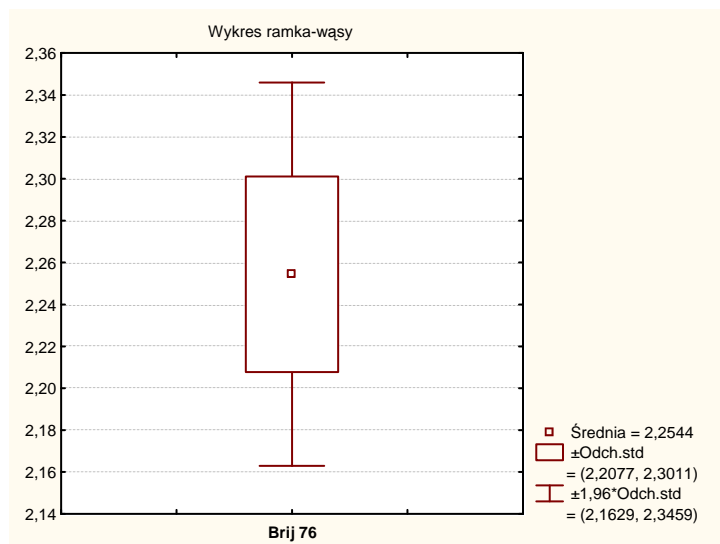
*Wartość stężenia LC50 dla związku chemicznego określa się w mg/l dla wód i ścieków w procentach:*

$$LC50 = N \lg \frac{5 - \bar{y} + b\bar{x}}{b}$$

Stężenie	Śmiertelność % M1	$y_1 = \text{probit } M_1$	$x_1 = \lg C_1$ stężenie	Kwadrat lg stężenia $x_1^2$	iloczyn lg stężenia i probitu $x_1$ i $y_1$
6,4	100%	-	0,80618	0,649926	-
5,12	100%	-	0,70927	0,503064	-
4,09	94%	6,53412054	0,611723	0,374205	3,997074
3,28	91%	6,3180109	0,5159	0,2661	3,2593
2,62	72%	5,57913216	0,4183	0,175	2,3338
2,1	38%	4,68136064	0,3222	0,1038	1,5084
1,66	13%	3,84965062	0,2201	0,0484	0,8473
1,32	6%	3,46587946	0,1206	0,0145	0,4179
1,06	0%	-	0,0253	0,0006	-
0	0%	-	-	-	-
suma		30,4281543	2,2088	0,982118	12,36379
średnie		5,07135905	0,368133		
współ reg – b = 6,87734384					
LC50 = 2,279068 mg/l					

Tab. 157. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr1.

Obliczone współczynniki LC50		
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50
1	2,2791	2,25 mg/l
2	2,2594	
3	2,1796	
4	2,3192	
5	2,3031	Odch. Stand.
6	2,2329	SD - 0,046
7	2,2098	
8	2,2522	



Tab. 158. Wyznaczone wartości LC50 Brij 76. Ryc. 76. Wykres ramka wąsy LC50 Brij 76.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
Brij 76	2,25 mg/l	Silnie toksyczny	Toksyczny	Umiarkowanie toksyczny

Tab. 159. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Lymnaea stagnalis*.

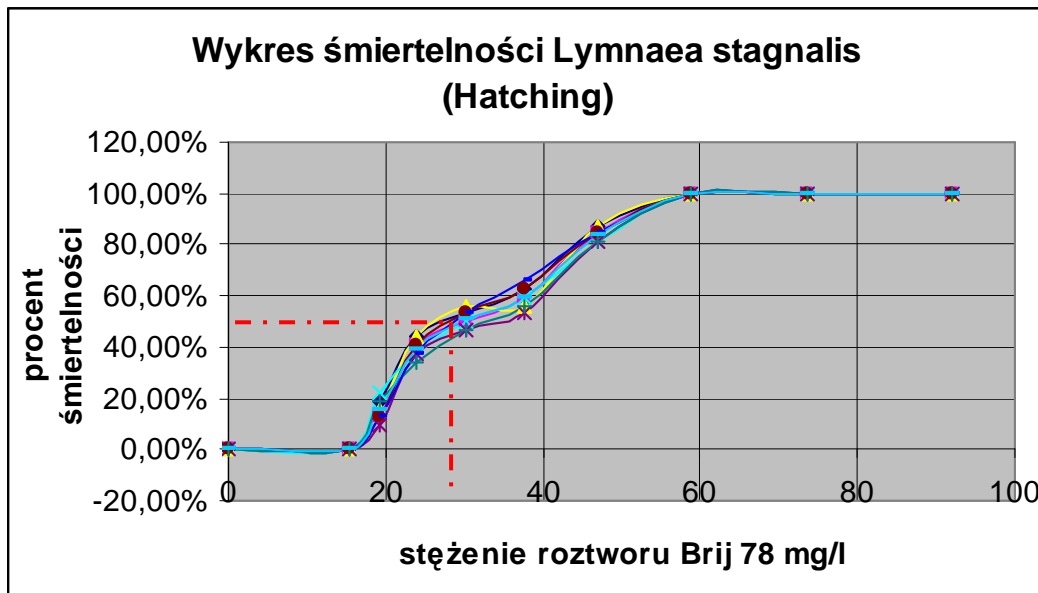
13. Wyniki testów toksyczności dla Brij 78.

(Lymnaea stagnalis hatching) Brij 78								
STĘŻENIE mg/l	1	2	3	4	5	6	7	8
92,1	32	32	32	32	32	32	32	32
73,7	32	32	32	32	32	32	32	32
58,9	32	32	32	32	32	32	32	32
47,1	28	27	28	26	26	27	26	27
37,7	20	19	18	19	17	20	18	21
30,1	17	16	18	16	15	17	15	17
24	14	13	14	12	12	13	11	12
19,2	6	4	5	7	3	4	6	4
15,4	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrola	0	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 160. Śmiertelność form po wylęgu dla różnych stężeń Brij 78 po okresie 24h.

Stężenie mg/l	Próba 1	Próba 2	Próba 3	Próba 4	Próba 5	Próba 6	Próba 7	Próba 8
92,1	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
73,7	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
58,9	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
47,1	87,50%	84,38%	87,50%	81,25%	81,25%	84,38%	81,25%	84,38%
37,7	62,50%	59,38%	56,25%	59,38%	53,13%	62,50%	56,25%	65,63%
30,1	53,13%	50,00%	56,25%	50,00%	46,88%	53,13%	46,88%	53,13%
24	43,75%	40,63%	43,75%	37,50%	37,50%	40,63%	34,38%	37,50%
19,2	18,75%	12,50%	15,63%	21,88%	9,38%	12,50%	18,75%	12,50%
15,4	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
0	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Tab. 161. Procent śmiertelności embrionów dla różnych stężeń Brij 78 po okresie 24h.



Ryc. 77. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności embrionów dla poszczególnych stężeń Brij 78 w okresie 24h.

**Wyznaczenie współczynnika LC 50% /24h:**

*Metoda probitowa dla obliczeń stężenia letalnego LC50:*

Obliczenie stężenia letalnego LC50:

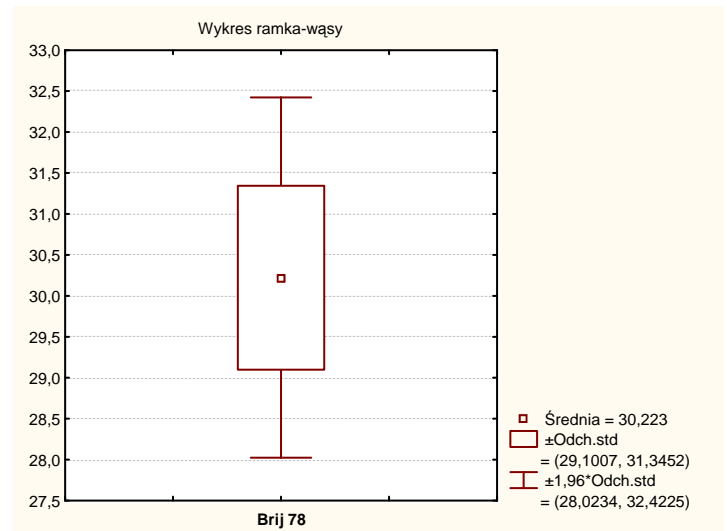
*Wartość stężenia LC50 dla związku chemicznego określa się w mg/l dla wód i ścieków w procentach:*

$$LC50 = N \lg \frac{5 - \bar{y} + b\bar{x}}{b}$$

Stężenie	Śmiertelność % M1	$y_1 = \text{probit } M_1$	$x_1 = \lg C_1$ stężenie	Kwadrat $\lg$ stężenia $x_1^2$	iloczyn $\lg$ stężenia i probitu $x_1$ i $y_1$
92,1	100%	-	1,96426	3,858316	-
73,7	100%	-	1,867467	3,487435	-
58,9	100%	-	1,770115	3,133308	-
47,1	84%	6,00999017	1,673	2,799	10,055
37,7	59%	5,23720211	1,5763	2,4849	8,2556
30,1	50%	5	1,4786	2,1862	7,3928
24	41%	4,76279789	1,3802	1,905	6,5737
19,2	13%	3,84965062	1,2833	1,6469	4,9403
15,4	0%	-	1,1875	1,4102	-
0	0%	-	-	-	-
suma		24,8596408	7,391441	11,02186	37,21722
średnie		4,97192816	1,478288		
współ reg – b = 4,91207792					
<b>LC50 = 30,47917 mg/l</b>					

Tab. 162. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr2.

Obliczone współczynniki LC50			
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50	
1	29,225	30,2 mg/l	
2	30,479		
3	28,623		
4	29,979		
5	32,265		Odch. Stand.
6	30,027		SD - 1,12
7	30,023		
8	31,164		



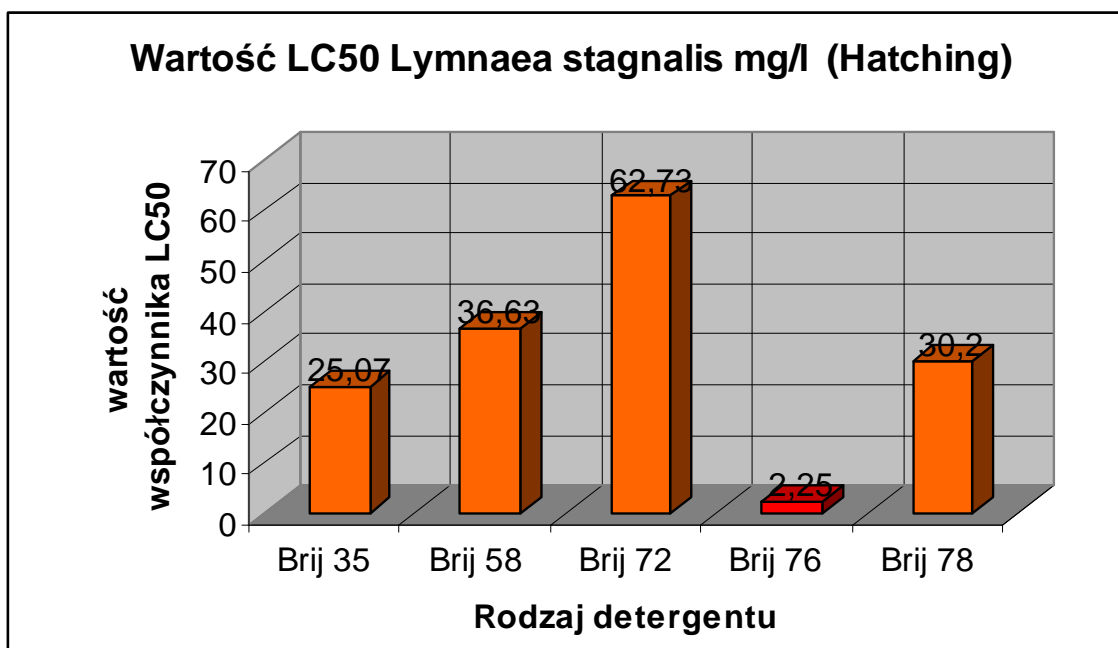
Tab. 163. Wyznaczone wartości LC50 Brij 78. Ryc. 78. Wykres ramka wąsy LC50 Brij 78.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
Brij 78	30,2 mg/l	Średnio toksyczny	szkodliwy	umiarkowanie toksyczny

Tab. 164. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Lymnaea stagnalis*.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
Brij 35	25,07mg/l	Średnio toksyczny	szkodliwy	umiarkowanie toksyczny
Brij 58	36,63mg/l	Średnio toksyczny	szkodliwy	umiarkowanie toksyczny
Brij 72	62,73 mg/l	Średnio toksyczny	szkodliwy	umiarkowanie toksyczny
Brij 76	2,25 mg/l	Silnie toksyczny	Toksyczny	Umiarkowanie toksyczny
Brij 78	30,2 mg/l	Średnio toksyczny	szkodliwy	umiarkowanie toksyczny

Tab. 165. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Lymnaea stagnalis*.



Ryc. 79. Wykres wartości współczynnika dla testowanych detergentów.

**X. Badanie wpływu detergentu Ludwik na śmiertelność *Lymnaea stagnalis* (Hatching).**

**Cel badania:** określenie toksyczności ostrej wpływu detergentu ludwik (mieszanina anionowo czynnych SPC) dla embrionów *Lymnaea stagnalis* L. w okresie 24h, wyznaczenie zakresu stężeń bezpiecznych oraz współczynnika LC50.

Wynik doświadczenia:

**Określenie wartości stałych:**

- Iloraz postępu geometrycznego rozcieńczeń  $q = 1,25$  (wytypowany w testach *screen*).
- Liczba powtórzeń 5,
- Temp. otoczenia; 22,5°C – 23°C.
- Temp. wody w badanych próbach; 21,5°C
- Okres testu 24h
- Wartość pH roztworów = 6,5
- Długość światła/nocy – 15/9h

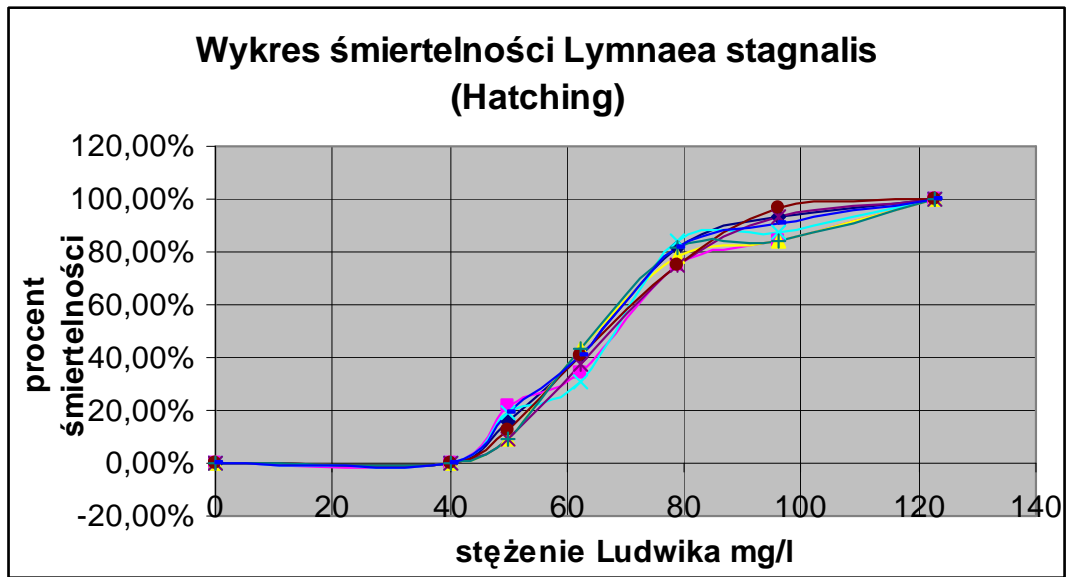
Ludwik	1	2	3	4	5	6	7	8
stężenie								
122,8 mg/l	32	32	32	32	32	32	32	32
96 mg/l	30	27	27	28	30	31	27	29
78,72 mg/l	26	24	25	27	24	24	26	26
62,4 mg/l	13	11	14	10	12	13	14	13
49,9 mg/l	5	7	3	6	3	4	3	6
40,3 mg/l	0	0	0	0	0	0	0	0
0 mg/l	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Śmiertelność próby</b>								

**Tab. 166. Śmiertelność form młodocianych dla różnych stężeń detergentu ludwik po okresie 24h.**

Stężenie mg/l	Próba 1	Próba 2	Próba 3	Próba 4	Próba 5	Próba 6	Próba 7	Próba 8
192	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
153,6	93,75%	84,38%	84,38%	87,50%	93,75%	96,88%	84,38%	90,63%
122,8	81,25%	75,00%	78,13%	84,38%	75,00%	75,00%	81,25%	81,25%
96	40,63%	34,38%	43,75%	31,25%	37,50%	40,63%	43,75%	40,63%
78,72	15,63%	21,88%	9,38%	18,75%	9,38%	12,50%	9,38%	18,75%
62,4	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
49,9	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
40,3	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
0	93,75%	84,38%	84,38%	87,50%	93,75%	96,88%	84,38%	90,63%

**Tab. 167. Procent śmiertelności form młodocianych dla różnych stężeń detergentu ludwik po okresie 24h.**





Ryc. 80. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności *Lymnaea stagnalis* (hatching) dla poszczególnych stężeń detergentu w okresie 24h.

**Wyznaczenie współczynnika LC 50% /24h:**

*Metoda probitowa dla obliczeń stężenia letalnego LC50:*

Obliczenie stężenia letalnego LC50:

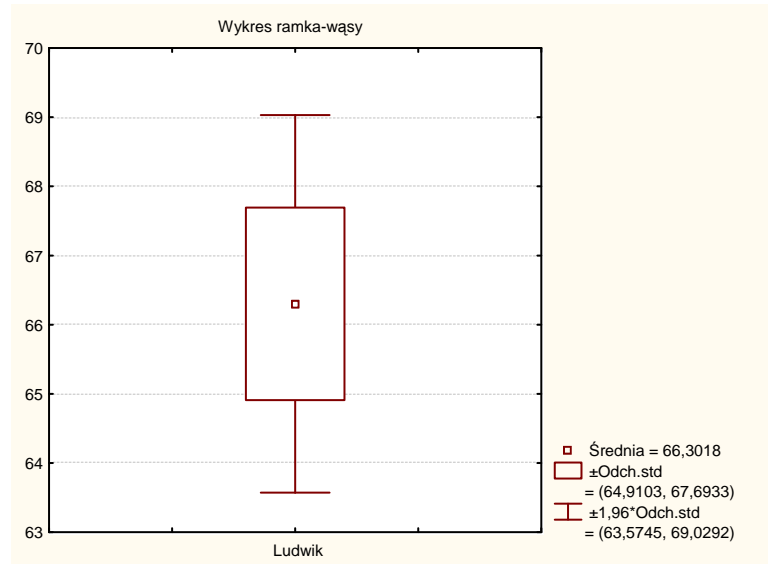
*Wartość stężenia LC50 dla związku chemicznego określa się w mg/l dla wód i ścieków w procentach:*

$$LC50 = N \lg \frac{5 - \bar{y} + b\bar{x}}{b}$$

Stężenie	Śmiertelność % M1	y <sub>1</sub> = probit M <sub>1</sub>	x <sub>1</sub> = lg C <sub>1</sub> stężenie	Kwadrat lg stężenia x <sub>1</sub> <sup>2</sup>	iloczyn lg stężenia i probitu x <sub>1</sub> i y <sub>1</sub>
122,8	100%	-	2,089198	4,36475	-
96	94%	6,53412054	1,982271	3,929399	12,9524
78,72	81%	5,88714656	1,896085	3,595139	11,16253
62,4	41%	4,76279789	1,7952	3,2227	8,5501
49,9	16%	3,99000983	1,6981	2,8835	6,7754
40,3	0%	-	1,6053	2,577	-
0	0%	-	-	-	-
suma		21,1740748	7,371641	13,63077	39,44047
średnie		5,29351871	1,84291		
współ reg – b = 9,19952176					
LC50 = 64,71493 mg/l					

Tab. 168. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr3.

Obliczone współczynniki LC50		
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50
1	64,7	66,3 mg/l
2	67,4	
3	66,7	
4	65,3	
5	68,2	Odch. Stand.
6	67,7	SD - 1,39
7	65,8	
8	64,5	
9	64,7	
10	67,4	



Tab. 169. Wyznaczone wartości LC50 Ludwik. Ryc. 81. Wykres ramka wąsy LC50 – Ludwik

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> <i>hatching</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
Ludwik	66,3 mg/l	Średnio toksyczny	Szkodliwy	Umiarkowanie toksyczny

Tab. 170. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Lymnaea stagnalis* (*hatching*).

Obserwacje i wnioski:

- Formy młodociane *Lymnaea stagnalis* są wyjątkowo wrażliwe na działanie mieszaniny detergentów, które wchodzi w skład handlowej wersji płynu do mycia Ludwik.
- Efekt ten wynika z okresu adaptacji, któremu poddane są młode osobniki po opuszczeniu stabilnych warunków jaj i przejścia do nowych warunków środowiska zewnętrznego.
- Obserwowane zmiany to wysoka śmiertelność przy niskiej koncentracji toksykanta, próbki pozostawione na dłuższy okres testu wykazują szybki stopień rozpadu tkanek ślimaków – w wyniku działania detergentu.

**XI: Badanie wpływu Kwasów Siarkowego (VI) i Azotowego (V) oraz Amoniak na śmiertelność form młodocianych po wylęgu *Lymnaea stagnalis* L.**

**Cel badania:** określenie toksyczności ostrej wpływu w/w związków chemicznych dla form młodocianych *Lymnaea stagnalis* L. w okresie 24h, wyznaczenie zakresu stężeń bezpiecznych oraz współczynnika LC50.

*Do testów wytypowano formy juwenilne Błotniarki stawowej do 24h po wylęgu wykazujące wigor życiowy i będące w dobrej formie nie wykazujące oznak chorobotwórczych oraz zaburzeń rozwojowych.*

**Określenie wartości stałych dla testów:**

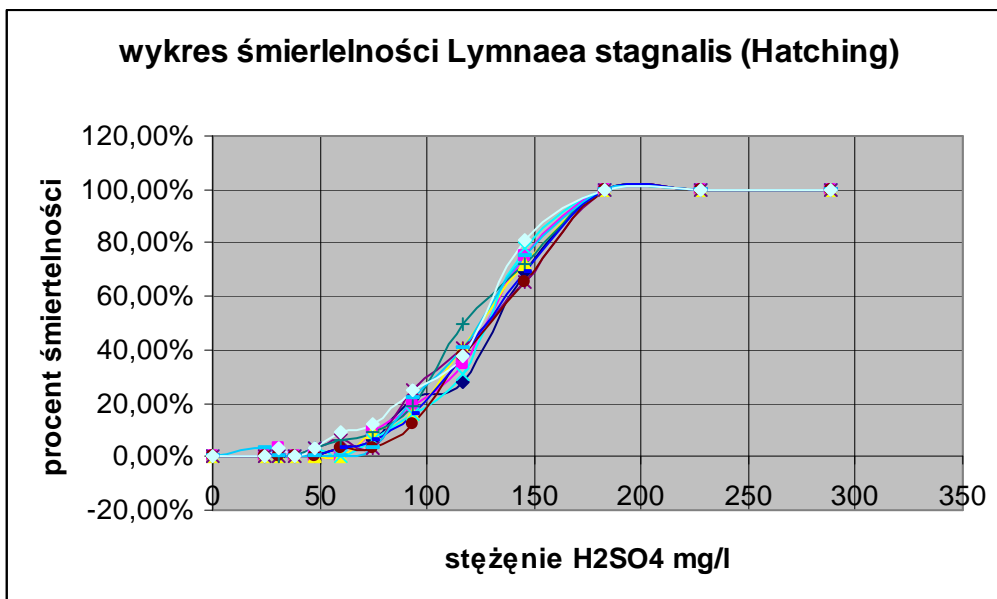
- **Poraz postępu geometrycznego rozcieńczeń  $q = 1,25$**  (wyznaczony w testach screen).
- **Liczba powtórzeń 10,**
- **Temp. otoczenia; 22,5°C – 23°C.**
- **Temp. wody w badanych próbach; 21,5°C**
- **Okres testu 24h**
- **Długość światła/nocy – 16/8h**

H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> nr. próby	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
stężenie										
288,10 mg/l	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
228,88mg/l	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
183,10mg/l	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
146,48mg/l	22	27	26	25	21	21	23	22	24	26
117,18mg/l	9	11	13	10	13	12	16	12	13	12
93,75 mg/l	7	6	5	5	8	4	6	5	7	8
75 mg/l	2	3	3	2	1	1	3	2	1	4
60 mg/l	1	0	0	0	2	1	2	1	0	3
48 mg/l	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1
38,4 mg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30,72 mg/l	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
24,57 mg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
KONTROLA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Śmiertelność próby</b>										

Tab. 171. Śmiertelność form młodocianych dla różnych stężeń Chlorku sodu po okresie 24h.

Stężenie mg/l	Próba 1	Próba 2	Próba 3	Próba 4	Próba 5	Próba 6	Próba 7	Próba 8	Próba 9	Próba 10
288	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
228	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
183	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
146	68,75%	84,38%	81,25%	78,13%	65,63%	65,63%	71,88%	68,75%	75,00%	81,25%
117	28,13%	34,38%	40,63%	31,25%	40,63%	37,50%	50,00%	37,50%	40,63%	37,50%
93	21,88%	18,75%	15,63%	15,63%	25,00%	12,50%	18,75%	15,63%	21,88%	25,00%
75	6,25%	9,38%	9,38%	6,25%	3,13%	3,13%	9,38%	6,25%	3,13%	12,50%
60	3,13%	0,00%	0,00%	0,00%	6,25%	3,13%	6,25%	3,13%	0,00%	9,38%
48	0,00%	0,00%	0,00%	3,13%	3,13%	0,00%	3,13%	0,00%	0,00%	3,13%
38,4	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
30,72	0,00%	3,13%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,13%
24,5	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%
0	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Tab. 172. Procent śmiertelności embrionów dla różnych stężeń Kwasu siarkowego (VI) po okresie 24h.



Ryc. 82. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności embrionów dla poszczególnych stężeń H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> w okresie 24h.

**Wyznaczenie współczynnika LC 50% /24h:**

*Metoda probitowa dla obliczeń stężenia letalnego LC50:*

Obliczenie stężenia letalnego LC50:

*Wartość stężenia LC50 dla związku chemicznego określa się w mg/l dla wód i ścieków w procentach:*

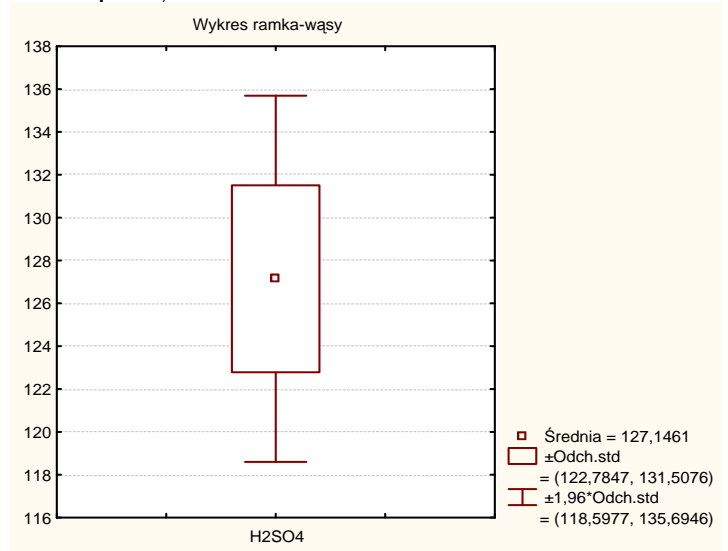
$$LC50 = N \lg \frac{5 - \bar{y} + b\bar{x}}{b}$$

Lp	Stężenie	Śmiertelność % M1	$y_1 = \text{probit } M_1$	$x_1 = \lg C_1$ stężenie	Kwadrat $\lg$ stężenia $x_1^2$	iloczyn $\lg$ stężenia i probitu $x_1$ i $y_1$
1	288	100%		2,459392	6,048611	
2	228	100%		2,357935	5,559857	
3	183	100%		2,262451	5,118685	
4	146	75%	5,67448975	2,1644	4,6844	12,282
5	117	34%	4,59774993	2,0682	4,2774	9,509
6	93	19%	4,11285344	1,9685	3,8749	8,0961
7	75	9%	3,6819891	1,8751	3,5159	6,904
8	60	0%		1,7782	3,1618	
9	48	0%		1,6812	2,8266	
10	38,4	0%		1,5843	2,5101	
11	30,72	3%	3,13726813	1,4874	2,2124	4,6664
12	24,5	0%		1,3892	1,9298	
13	0	0%				
suma			18,0670822	8,076083	16,3526	36,79064
średnie			4,51677056	2,019021		
współ regresji – b =			6,68181867			
LC50 =			123,4073 mg/l			

Tab. 173. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr2.

Obliczone współczynniki LC50		
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50
1	130,76	126,49 mg/l
2	123,41	
3	123,94	
4	123,66	
5	132,06	Odch. Stand.
6	132,77	SD - 4,36
7	122,04	
8	128,53	
9	121,47	
10	126,28	

Tab. 174. Wyznaczone wartości LC50 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.



Ryc. 83. Wykres ramka wąsy LC50 – H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	126,49 mg/l	słaba toksyczny	szkodliwy	słabo toksyczny

Tab. 175. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Lymnaea stagnalis*.

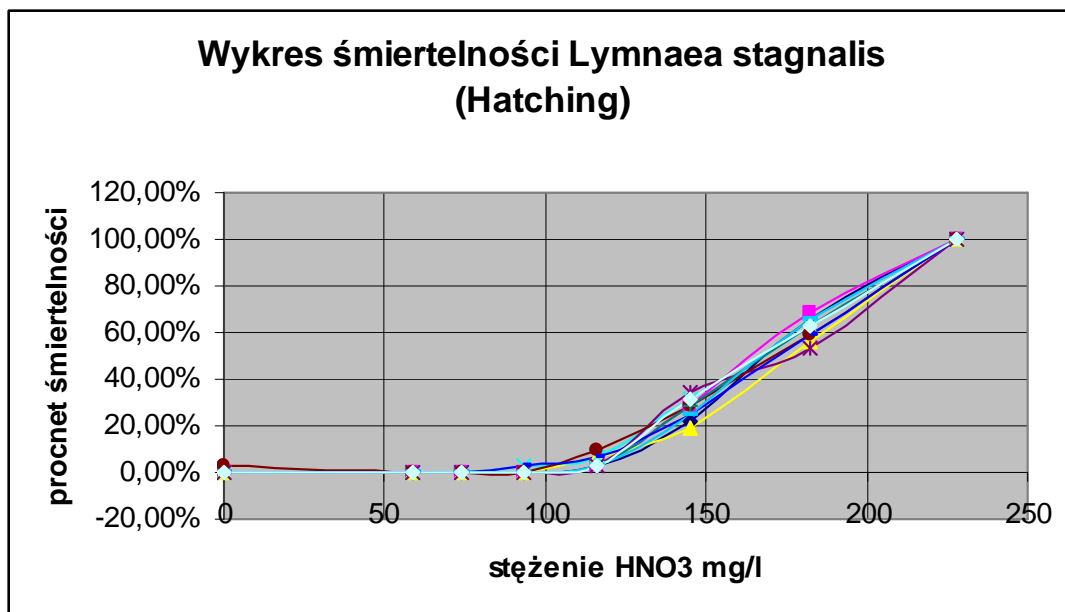
Wyniki dla kwasu azotowego (V)

HNO <sub>3</sub> nr. próby	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
stężenie										
228 mg/l	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
182,4 mg/l	10	15	13	13	17	12	13	15	11	17
145,92 mg/l	2	2	2	3	2	4	3	3	2	3
116,73 mg/l	1	1	2	2	1	3	1	2	1	1
93,38mg/l	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
74,71 mg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
59,76 mg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
KONTROLA	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<b>Śmiertelność próby</b>										

Tab. 176. Śmiertelność embrionów dla różnych stężeń Chlorku sodu po okresie 24h.

Stężenie mg/l	Próba 1	Próba 2	Próba 3	Próba 4	Próba 5	Próba 6	Próba 7	Próba 8	Próba 9	Próba 10
228	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
182,4	65,63%	68,75%	56,25%	62,50%	53,13%	59,38%	62,50%	59,38%	65,63%	62,50%
145	21,88%	28,13%	18,75%	31,25%	34,38%	28,13%	28,13%	25,00%	25,00%	31,25%
116	3,13%	3,13%	6,25%	6,25%	3,13%	9,38%	3,13%	6,25%	3,13%	3,13%
93	0,00%	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%	0,00%
74	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
59	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
0	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Tab. 177. Procent śmiertelności embrionów dla różnych stężeń roztworu kwasu azotowego (V) po okresie 24h.



Ryc. 84. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności embrionów dla poszczególnych stężeń H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> w okresie 24h.

Lp	Stężenie	Śmiertelność % M1	$y_1 = \text{probit } M_1$	$x_1 = \lg C_1$ stężenie	Kwadrat $\lg$ stężenia $x_1^2$	iloczyn $\lg$ stężenia i probitu $x_1$ i $y_1$
1	228	100%	-	2,357935	5,559857	-
2	182,4	59%	5,23720211	2,261025	5,112233	11,84144
3	145	28%	4,42086784	2,161368	4,671512	9,555122
4	116	9%	3,6819891	2,0645	4,262	7,6013
5	93	0%	-	1,9685	3,8749	-
6	74	0%	-	1,8692	3,494	-
7	59	0%	-	1,7709	3,1359	-
8	0	3%	3,13726813	-	-	-
suma			13,340059	6,486851	14,04573	28,99788
średnie			4,44668635	2,162284		
współ regresji – b =			7,91319894			
LC50 =			170,6894 mg/l			

Tab. 178. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr6

**Wyznaczenie współczynnika LC 50% /24h:**

*Metoda probitowa dla obliczeń stężenia letalnego LC50:*

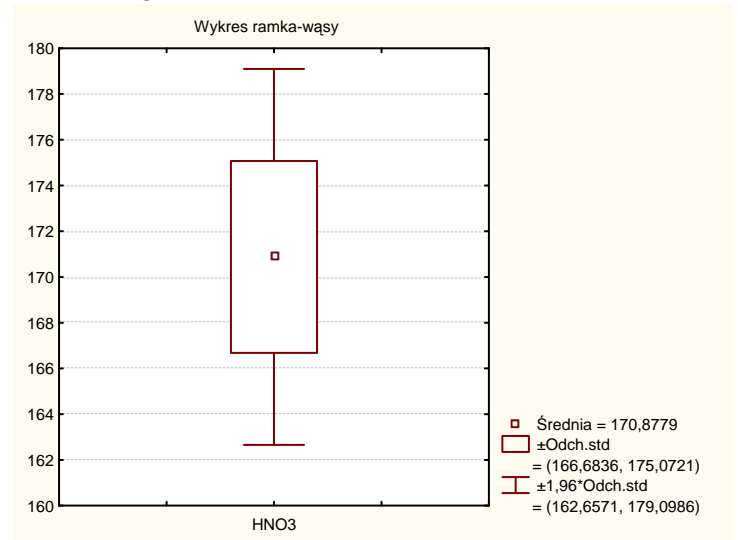
Obliczenie stężenia letalnego LC50:

*Wartość stężenia LC50 dla związku chemicznego określa się w mg/l dla wód i ścieków w procentach:*

$$LC50 = N \lg \frac{5 - \bar{y} + b\bar{x}}{b}$$

Obliczone współczynniki LC50		
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50
1	168,6497	170,47 mg/l
2	164,7142	
3	177,7846	
4	169,137	
5	172,2935	Odch. Stand.
6	170,6894	SD - 4,19
7	168,3124	
8	175,4421	
9	167,272	
10	168,6497	

Tab. 179. Wyznaczone wartości LC50 HNO<sub>3</sub>.



Ryc. 85. Wykres ramka wąsy LC50 – HNO<sub>3</sub>

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
HNO <sub>3</sub>	170,47mg/l	słaba toksyczny	szkodliwy	słabo toksyczny

Tab. 180. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Lymnaea stagnalis*.

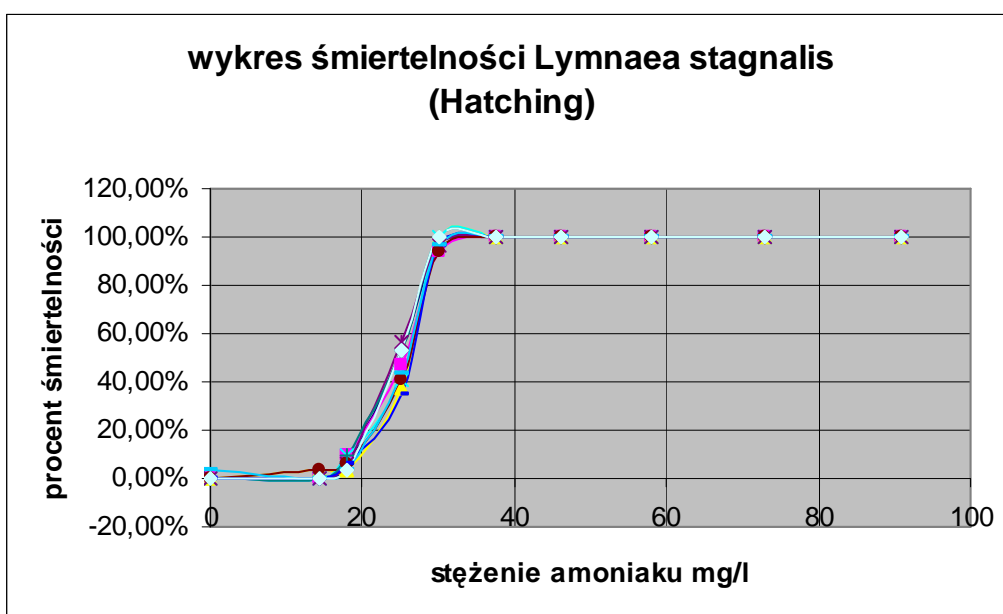
Wyniki dla roztworu amoniaku;

NH <sub>4</sub> OH nr próby	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
stężenie										
91,55 mg/l	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
73,24 mg/l	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
58,59 mg/l	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
46,87 mg/l	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
37,5 mg/l	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
30 mg/l	31	30	32	32	31	30	32	31	31	32
25 mg/l	17	15	12	13	18	13	17	11	14	17
18 mg/l	2	3	1	3	2	2	3	2	1	1
14,4 mg/l	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
KONTROLA	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<b>Śmiertelność próby</b>										

Tab. 181. Wyniki dla roztworów amoniaku.

Stężenie mg/l	Próba 1	Próba 2	Próba 3	Próba 4	Próba 5	Próba 6	Próba 7	Próba 8	Próba 9	Próba 10
91	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
73	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
58	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
46	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
37,5	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
30	96,88%	93,75%	100,00%	100,00%	96,88%	93,75%	100,00%	96,88%	96,88%	100,00%
25	53,13%	46,88%	37,50%	40,63%	56,25%	40,63%	53,13%	34,38%	43,75%	53,13%
18	6,25%	9,38%	3,13%	9,38%	6,25%	6,25%	9,38%	6,25%	3,13%	3,13%
14,4	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
0	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%

Tab. 182. Procent śmiertelności embrionów dla różnych stężeń roztworu amoniaku po okresie 24h.



Ryc. 86. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności embrionów dla poszczególnych stężeń amoniaku w okresie 24h.



Lp	Stężenie	Śmiertelność % M1	$y_1 = \text{probit } M_1$	$x_1 = \lg C_1$ stężenie	Kwadrat $\lg$ stężenia $x_1^2$	iloczyn $\lg$ stężenia i probitu $x_1$ i $y_1$
1	91	100%	-	1,959041	3,837843	-
2	73	100%	-	1,863323	3,471972	-
3	58	100%	-	1,763428	3,109678	-
4	46	100%	-	1,6628	2,7648	-
5	37,5	100%	-	1,574	2,4776	-
6	30	94%	6,53412054	1,4771	2,1819	9,6517
7	25	47%	4,92158759	1,3979	1,9542	6,8801
8	18	9%	3,6819891	1,2553	1,5757	4,6219
9	14,4	0%		1,1584	1,3418	
10	0	0%	-	-	-	-
suma			15,1376972	4,130334	5,711833	21,15367
średnie			5,04589908	1,376778		
współ reg – b = 12,3584881						
LC50 = 23,60826 mg/l						

Tab. 183. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr6

**Wyznaczenie współczynnika LC 50% /24h:**

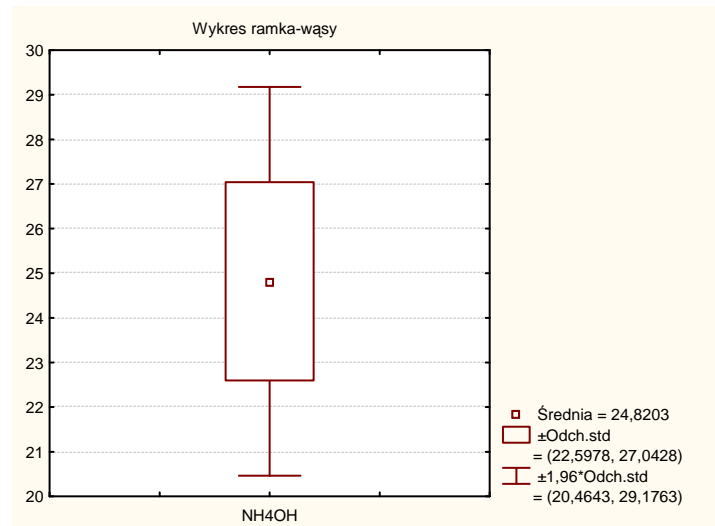
*Metoda probitowa dla obliczeń stężenia letalnego LC50:*

Obliczenie stężenia letalnego LC50:

*Wartość stężenia LC50 dla związku chemicznego określa się w mg/l dla wód i ścieków w procentach:*

$$LC50 = N \lg \frac{5 - \bar{y} + b\bar{x}}{b}$$

Obliczone współczynniki LC50		
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50
1	23,31	24,72 mg/l
2	26,86	
3	24,54	
4	23,60	
5	23,22	
6	23,90	
7	29,48	
8	23,61	
9	23,98	
10	24,67	



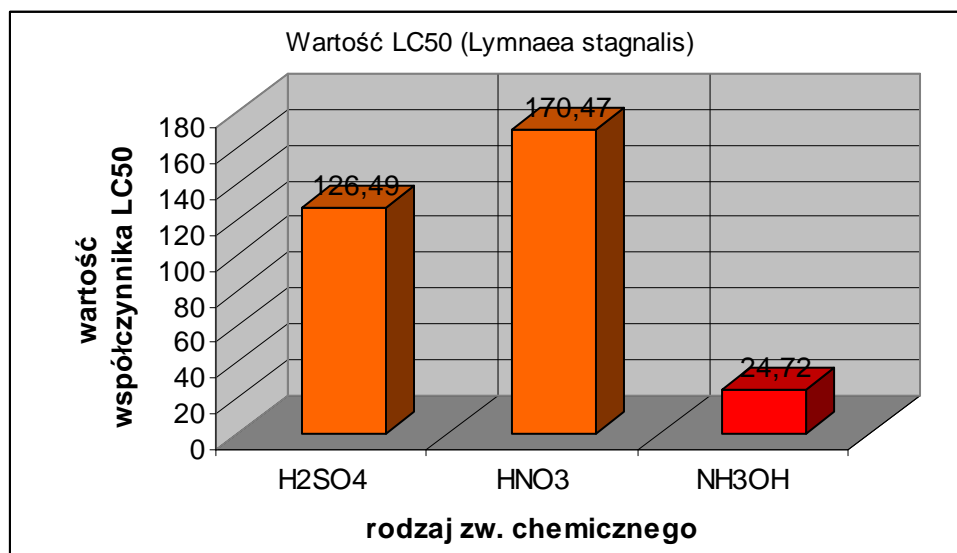
Tab. 184. Wyznaczone wartości LC50 NH<sub>4</sub>OH. Ryc. 87. Wykres ramka wąsy LC50 NH<sub>4</sub>OH

		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
NH <sub>4</sub> OH	24,72 mg/l	Średnio toksyczny	szkodliwy	Silnie toksyczny

Tab. 185. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Lymnaea stagnalis*.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	126,49 mg/l	Średnio toksyczny	szkodliwy	Umiarkowanie toksyczny
HNO <sub>3</sub>	170,47mg/l	Słabo toksyczny	szkodliwy	Słabo toksyczny
NH <sub>3</sub> OH	24,72mg/l	Średnio toksyczny	szkodliwy	Średnio toksyczny

Tab. 186. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Lymnaea stagnalis*.



Ryc. 88. Wykres wartości współczynników dla poszczególnych badanych związków chemicznych.

**XII: Badanie wpływu soli – chlorków: sodu, potasu, wapnia i magnezu na śmiertelność form młodocianych po wylęgu *Lymnaea stagnalis* L.**

**Cel badania:** określenie toksyczności ostrej wpływu w/w związków chemicznych dla form młodocianych *Lymnaea stagnalis* L. w okresie 24h, wyznaczenie zakresu stężeń bezpiecznych oraz współczynnika LC50.

*Do testów wytypowano formy juwenilne Błotniarki stawowej do 24h po wylęgu wykazujące wigor życiowy i będące w dobrej formie, nie wykazujące oznak chorobotwórczych oraz zaburzeń rozwojowych.*

**Określenie wartości stałych dla testów:**

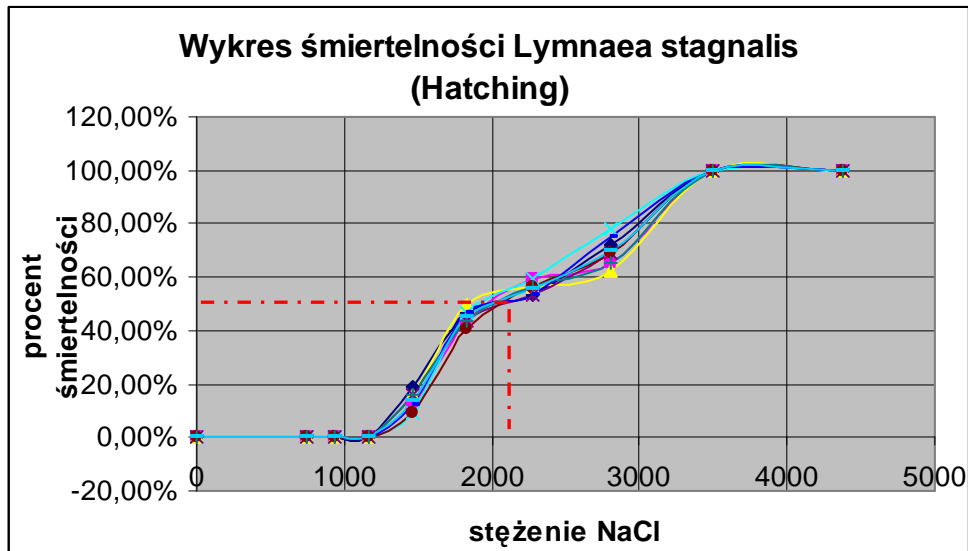
- **Iloraz postępu geometrycznego rozcieńczeń  $q = 1,25$**  (wyznaczony w testach screen).
  - **Liczba powtórzeń 10,**
  - **Temp. otoczenia; 22,5°C – 23°C.**
  - **Temp. wody w badanych próbach; 21,5°C**
  - **Okres testu 24h**
  - **Ciśnienie 360 HPa**
  - **Długość światła/nocy – 16/8h**
5. Wyniki dla NaCl

<b>(<i>Lymnaea stagnalis</i> hatching) NaCl</b>								
Stężenie mg/l	1	2	3	4	5	6	7	8
3500	32	32	32	32	32	32	32	32
2800	23	21	20	25	22	22	21	24
2280	17	19	18	19	17	18	18	17
1830	15	14	16	15	14	13	14	15
1460	6	4	5	3	5	3	5	4
1160	0	0	0	0	0	0	0	0
930	0	0	0	0	0	0	0	0
750	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 187. Śmiertelność form młodocianych dla różnych stężeń Chlorku sodu po okresie 24h.

Stężenie mg/l	Próba 1	Próba 2	Próba 3	Próba 4	Próba 5	Próba 6	Próba 7	Próba 8
3500	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
2800	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
2280	71,88%	65,63%	62,50%	78,13%	68,75%	68,75%	65,63%	75,00%
1830	53,13%	59,38%	56,25%	59,38%	53,13%	56,25%	56,25%	53,13%
1460	46,88%	43,75%	50,00%	46,88%	43,75%	40,63%	43,75%	46,88%
1160	18,75%	12,50%	15,63%	9,38%	15,63%	9,38%	15,63%	12,50%
930	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
750	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
0	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Tab. 188. Procent śmiertelności form młodocianych dla różnych stężeń chlorku sodu po okresie 24h.



Ryc. 89. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności form młodocianych dla poszczególnych stężeń NaCl w okresie 24h.

**Wyznaczenie współczynnika LC 50% /24h:**

*Metoda probitowa dla obliczeń stężenia letalnego LC50:*

Obliczenie stężenia letalnego LC50:

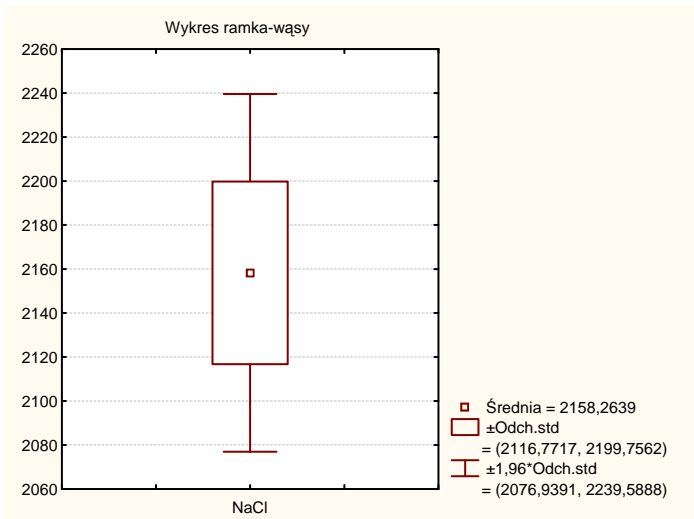
*Wartość stężenia LC50 dla związku chemicznego określa się w mg/l dla wód i ścieków w procentach:*

$$LC50 = N \lg \frac{5 - \bar{y} + b\bar{x}}{b}$$

Stężenie	Śmiertelność % M1	y <sub>1</sub> = probit M <sub>1</sub>	x <sub>1</sub> = lg C <sub>1</sub> stężenie	Kwadrat lg stężenia x <sub>1</sub> <sup>2</sup>	iloczyn lg stężenia i probitu x <sub>1</sub> i y <sub>1</sub>
3500	100%	-	3,544068	12,56042	-
2800	66%	5,40225007	3,447158	11,8829	18,62241
2280	59%	5,23720211	3,357935	11,27573	17,58618
1830	44%	4,84268932	3,2625	10,644	15,799
1460	13%	3,84965062	3,1644	10,013	12,182
1160	0%	-	3,0645	9,3909	-
930	0%	-	2,9685	8,8119	-
750	0%	-	2,8751	8,266	-
0	0%	-	-	-	-
suma		19,3317921	13,2319	43,81534	64,18928
średnie		4,83294803	3,307974		
współ regresji – b = 5,38986193					
LC50 = 2182,569 mg/l					

Tab. 189. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr2.

Obliczone współczynniki LC50		
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50
1	2108,1	2158,26 mg/l
2	2182,6	
3	2178,4	
4	2211,5	Odch. Stand.
5	2176,7	SD - 41,49
6	2097,1	
7	2184,3	
8	2127,5	



Tab. 190. Wyznaczone wartości LC50 NaCl. Ryc. 90. Wykres ramka wąsy LC50 – NaCl

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
NaCl	2158,26 mg/l	słabo toksyczny	-	słabo toksyczny

Tab. 191. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Lymnaea stagnalis*.

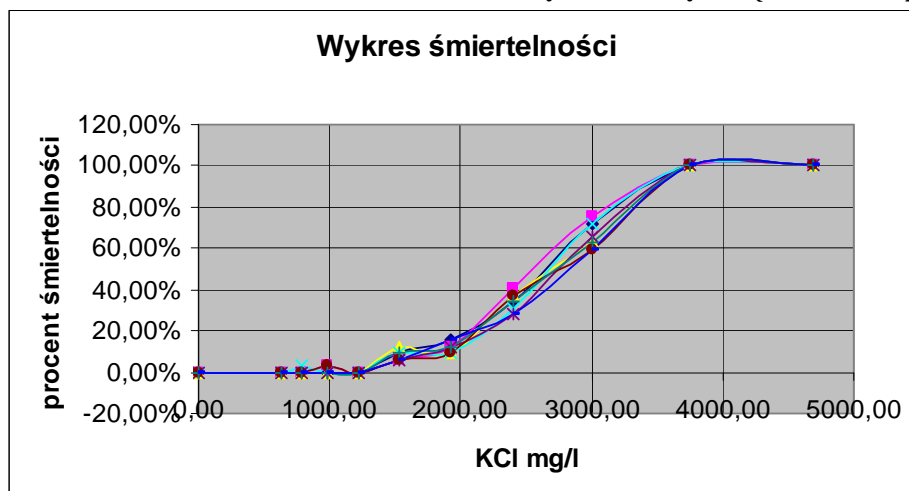
6. Wyniki dla KCl

<i>(Lymnaea stagnalis hatching)</i> KCl								
Stężenie mg/l	1	2	3	4	5	6	7	8
4687,50	32	32	32	32	32	32	32	32
3750,00	32	32	32	32	32	32	32	32
3000,00	23	24	20	23	21	19	20	19
2400,00	11	13	12	10	9	12	11	9
1920,00	5	4	3	3	4	3	4	5
1536,00	3	2	4	3	2	2	3	2
1228,80	0	0	0	0	0	0	0	0
983,04	0	1	0	0	0	1	0	0
786,43	0	0	0	1	0	0	0	0
629,15	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrola	0	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 192. Śmiertelność form młodocianych dla różnych stężeń chlorku potasu po okresie 24h.

Stężenie mg/l	Próba 1	Próba 2	Próba 3	Próba 4	Próba 5	Próba 6	Próba 7	Próba 8
4687,50	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
3750,00	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
3000,00	71,88%	75,00%	62,50%	71,88%	65,63%	59,38%	62,50%	59,38%
2400,00	34,38%	40,63%	37,50%	31,25%	28,13%	37,50%	34,38%	28,13%
1920,00	15,63%	12,50%	9,38%	9,38%	12,50%	9,38%	12,50%	15,63%
1536,00	9,38%	6,25%	12,50%	9,38%	6,25%	6,25%	9,38%	6,25%
1228,80	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
983,04	0,00%	3,13%	0,00%	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%	0,00%
786,43	0,00%	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
629,15	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Kontrola	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Tab. 193. Procent śmiertelności form młodocianych dla różnych stężeń chlorku potasu po okresie 24h.



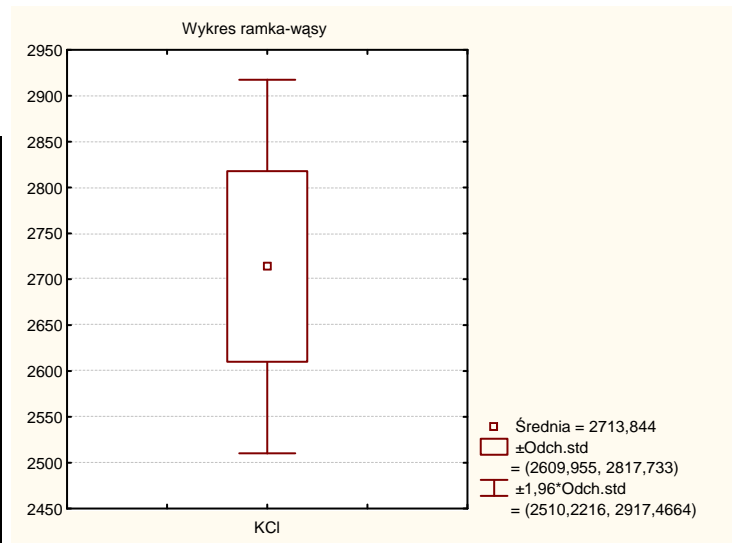
Ryc. 91. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności form młodocianych dla poszczególnych stężeń KCl w okresie 24h.

Stężenie	Śmiertelność % M1	$y_1 = \text{probit } M_1$	$x_1 = \lg C_1$ stężenie	Kwadrat $\lg$ stężenia $x_1^2$	iloczyn $\lg$ stężenia i probitu $x_1$ i $y_1$
4687,50	100%	-	3,670941	13,47581	-
3750,00	100%	-	3,574031	12,7737	-
3000,00	72%	5,57913216	3,477121	12,09037	19,39932
2400,00	34%	4,59774993	3,380211	11,42583	15,54137
1920,00	16%	3,99000983	3,283301	10,78007	13,1004
1536,00	9%	3,6819891	3,186391	10,15309	11,73226
1228,80	0%	-	3,089481	9,544894	-
983,04	0%	-	2,992571	8,955482	-
786,43	0%	-	2,895661	8,384854	-
629,15	0%	-	2,798751	7,833008	-
0	0%	-	-	-	-
suma		17,848881	13,32702	44,44936	59,77335
średnie		4,46222026	3,331756		
współ regresji – $b = 6,50001902$					
LC50 = 2597,116 mg/l					

Tab. 194. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr2.

Obliczone współczynniki LC50		
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50
1	2597,11	2713,84 mg/l Odch. Stand. SD - 103,89
2	2756,81	
3	2534,96	
4	2781,84	
5	2769,30	
6	2760,77	
7	2668,94	
8	2840,98	

Tab. 195. Wyznaczone wartości LC50 KCl.



Ryc. 92. Wykres ramka – wąsy LC 50 – KCl

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
KCl	2713,84 mg/l	słaba toksyczny	-	słabo toksyczny

Tab. 196. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Lymnaea stagnalis*.

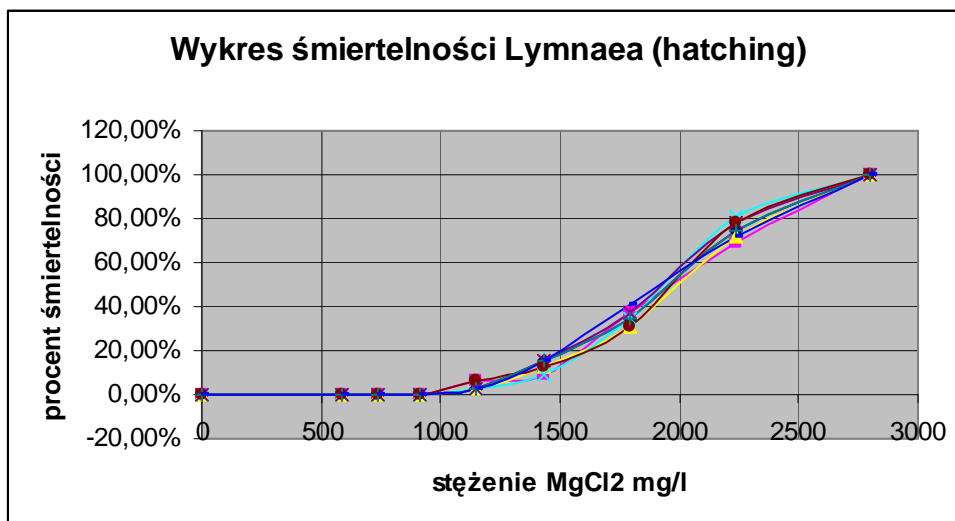
7. Wyniki dla  $MgCl_2$

<i>(Lymnaea stagnalis hatching)</i> $MgCl_2$								
Stężenie mg/l	1	2	3	4	5	6	7	8
2800,00	32	32	32	32	32	32	32	32
2240,00	24	22	23	26	25	25	24	23
1792,00	11	12	10	11	12	10	11	13
1433,60	5	3	4	3	5	4	5	5
1146,88	1	2	1	1	1	2	1	1
917,50	0	0	0	0	0	0	0	0
734,00	0	0	0	0	0	0	0	0
587,20	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrola	0	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 197. Śmiertelność form młodocianych dla różnych stężeń chlorku magnezu po okresie 24h.

Stężenie mg/l	Próba 1	Próba 2	Próba 3	Próba 4	Próba 5	Próba 6	Próba 7	Próba 8
2800,00	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
2240,00	75,00%	68,75%	71,88%	81,25%	78,13%	78,13%	75,00%	71,88%
1792,00	34,38%	37,50%	31,25%	34,38%	37,50%	31,25%	34,38%	40,63%
1433,60	15,63%	9,38%	12,50%	9,38%	15,63%	12,50%	15,63%	15,63%
1146,88	3,13%	6,25%	3,13%	3,13%	3,13%	6,25%	3,13%	3,13%
917,50	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
734,00	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
587,20	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Kontrola	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Tab. 198. Procent śmiertelności form młodocianych dla różnych stężeń chlorku magnezu po okresie 24h.



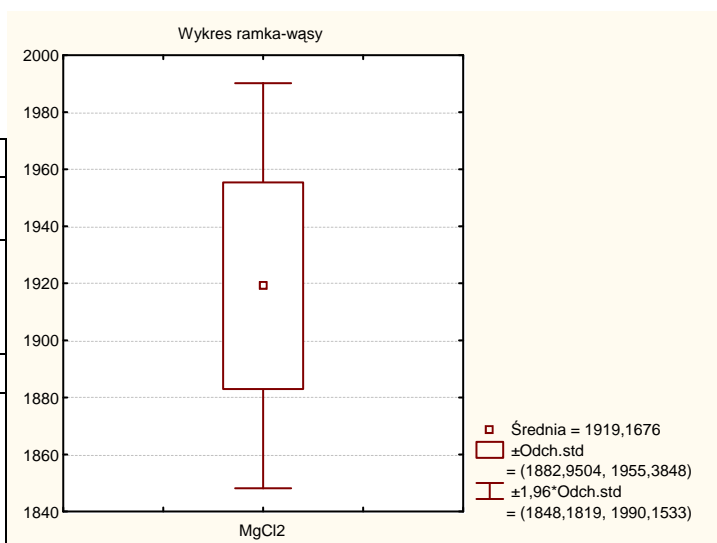
Ryc. 93. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności form młodocianych dla poszczególnych stężeń  $MgCl_2$  w okresie 24h.



Stężenie mg/l	Śmiertelność % M1	$y_1 = \text{probit } M_1$	$x_1 = \lg C_1$ stężenie	Kwadrat lg stężenia $x_1^2$	Iloczyn lg stężenia i probitu $x_1$ i $y_1$
2800,00	100%	-	3,447158	11,8829	-
2240,00	75%	5,67448975	3,350248	11,22416	19,01095
1792,00	34%	4,59774993	3,253338	10,58421	14,95803
1433,60	16%	3,99000983	3,156428	9,963038	12,59418
1146,88	3%	3,13726813	3,059518	9,36065	9,598528
917,50	0%	-	2,962608	8,777046	-
734,00	0%	-	2,865698	8,212225	-
587,20	0%	-	2,768788	7,666187	-
0	0%	-	-	-	-
suma		17,3995176	12,81953	41,13206	56,16169
średnie		4,34987941	3,204883		
współ regresji – $b = 8,48148164$					
<b>LC50 = 1912,206 mg/l</b>					

Tab. 199. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr2.

Obliczone współczynniki LC50		
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50
1	1912,20	1919,16 mg/l
2	1874,32	
3	1980,68	
4	1911,42	Odch. Stand.
5	1965,79	SD - 36,22
6	1912,20	
7	1888,61	
8	1908,07	

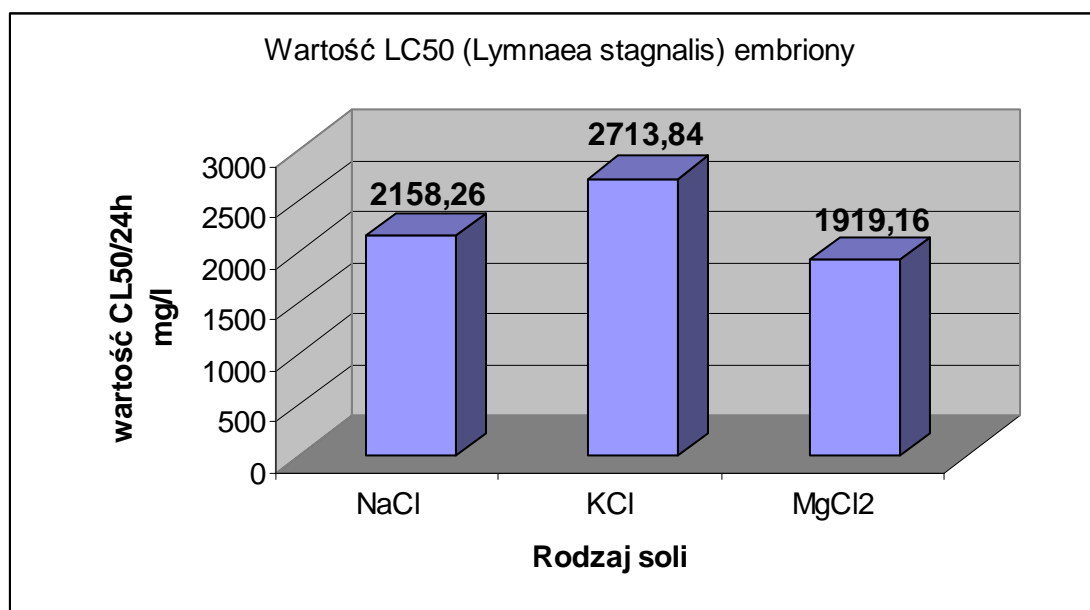

 Tab. 200. Wyznaczone wartości LC50 MgCl<sub>2</sub>. Ryc. 94. Wykres ramka wąsy LC 50 – MgCl<sub>2</sub>

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
MgCl <sub>2</sub>	1919,16 mg/l	słaba toksyczny	-	słabo toksyczny

 Tab. 201. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Lymnaea stagnalis*.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
NaCl	2158,26 mg/l	Zaledwie toksyczny	-	Słabo toksyczny
KCl	2713,84 mg/l	Zaledwie toksyczny	-	Słabo toksyczny
MgCl <sub>2</sub>	1919,16 mg/l	Zaledwie toksyczny	-	Słabo toksyczny

Tab. 202. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Lymnaea stagnalis*.



Ryc. 95. Wykres wartości LC50/72h dla embryonów w testach toksyczności dla poszczególnych soli chlorków.

### XIII. Badanie wpływu detergentów niejonowych Brij na śmiertelność *Tubifex tubifex*.

**Cel badania:** określenie toksyczności ostrej wpływu detergentu ludwik (mieszanina anionowo czynnych SPC) dla form dorosłych *Tubifex tubifex*. w okresie 24h, wyznaczenie zakresu stężeń bezpiecznych oraz współczynnika LC50.

Wynik doświadczenia:

**Określenie wartości stałych:**

- Iloraz postępu geometrycznego rozcieńczeń  $q = 1,25$  (wytypowany w testach *screen*).
- Liczba powtórzeń 5,
- Temp. otoczenia; 22,5°C – 23°C.
- Temp. wody w badanych próbach; 21,5°C
- Okres testu 24h
- Wartość pH roztworów = 6,5

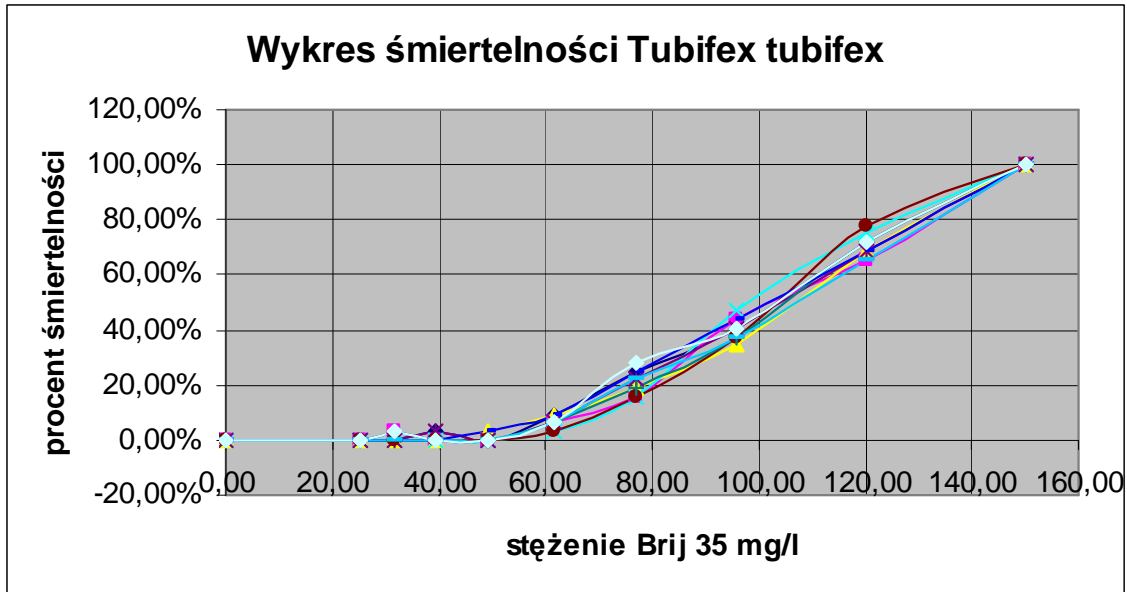
Wyniki dla Brij 35

Ludwik	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Stężenie mg/l										
150,00	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
120,00	23	21	22	24	22	25	23	22	21	23
96,00	13	14	11	15	13	12	12	14	12	13
76,80	8	5	6	5	7	5	6	8	7	9
61,44	3	2	3	1	2	1	2	3	2	2
49,15	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
39,32	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
31,46	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1
25,17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrola	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Śmiertelność próby</b>										

Tab. 203. Śmiertelność *Tubifex tubifex* dla różnych stężeń detergentu Brij 35 po okresie 24h.

Stężenie mg/l	Próba 1	Próba 2	Próba 3	Próba 4	Próba 5	Próba 6	Próba 7	Próba 8	Próba 9	Próba 10
150,00	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
120,00	71,88%	65,63%	68,75%	75,00%	68,75%	78,13%	71,88%	68,75%	65,63%	71,88%
96,00	40,63%	43,75%	34,38%	46,88%	40,63%	37,50%	37,50%	43,75%	37,50%	40,63%
76,80	25,00%	15,63%	18,75%	15,63%	21,88%	15,63%	18,75%	25,00%	21,88%	28,13%
61,44	9,38%	6,25%	9,38%	3,13%	6,25%	3,13%	6,25%	9,38%	6,25%	6,25%
49,15	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%	0,00%
39,32	3,13%	0,00%	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
31,46	0,00%	3,13%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%	0,00%	3,13%
25,17	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Kontrola	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Tab. 204. Procent śmiertelności *Tubifex tubifex* dla różnych stężeń detergentu Brij 35 po okresie 24h.



Ryc. 96. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności *Tubifex tubifex* dla poszczególnych stężeń detergentu Brij 35 w okresie 24h.

**Wyznaczenie współczynnika LC 50% /24h:**

*Metoda probitowa dla obliczeń stężenia letalnego LC50:*

Obliczenie stężenia letalnego LC50:

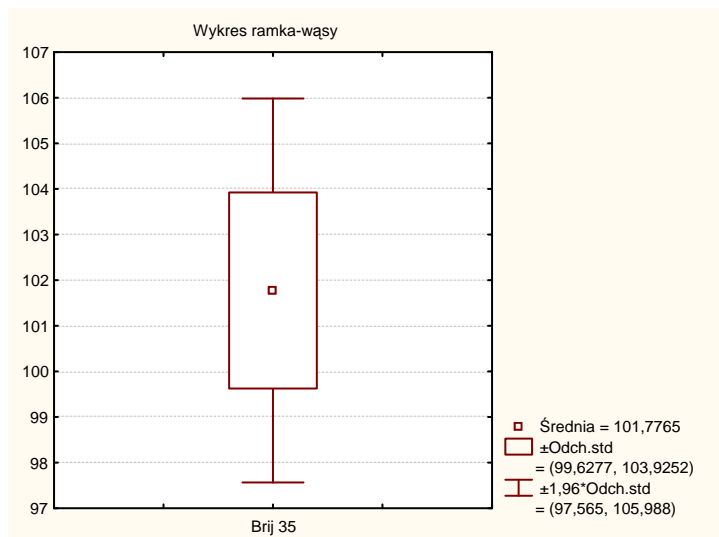
*Wartość stężenia LC50 dla związku chemicznego określa się w mg/l dla wód i ścieków w procentach:*

$$LC50 = N \lg \frac{5 - \bar{y} + b\bar{x}}{b}$$

Stężenie	Śmiertelność % M1	y <sub>1</sub> = probit M <sub>1</sub>	x <sub>1</sub> = lg C <sub>1</sub> stężenie	Kwadrat lg stężenia x <sub>1</sub> <sup>2</sup>	iloczyn lg stężenia i probitu x <sub>1</sub> i y <sub>1</sub>
150,00	100%	-	2,176091	4,735373	-
120,00	78%	5,77642176	2,079181	4,322995	12,01023
96,00	38%	4,68136064	1,982271	3,929399	9,279727
76,80	16%	3,99000983	1,885361	3,554587	7,52261
61,44	3%	3,13726813	1,788451	3,198558	5,610851
49,15	0%	-	1,691541	2,861312	-
39,32	0%	-	1,594631	2,542849	-
31,46	0%	-	1,497721	2,243169	-
25,17	0%	-	1,400811	1,962272	-
0,00	0%	-	-	-	-
suma		17,5850604	7,735265	15,00554	34,42342
średnie		4,39626509	1,933816		
współ reg – b = 8,88330465					
<b>LC50 = 100,4105 mg/l</b>					

Tab. 205. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr1.

Obliczone współczynniki LC50		
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50
1	99,787	101,77 mg/l
2	100,41	
3	104,09	
4	102,23	
5	104,89	Odch. Stand.
6	100,36	SD - 2,15
7	99,57	
8	104,69	
9	102,16	
10	99,55	



Tab. 206. Wyznaczone wartości LC50 Brij 35. Ryc. 97. Wykres ramka wąsy LC 50 Brij 35

Tab. 207. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Tubifex Tubifex*.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Tubifex tubifex</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
Brij 35	101,77 mg/l	Średnio toksyczny	Szkodliwy	Umiarkowanie toksyczny

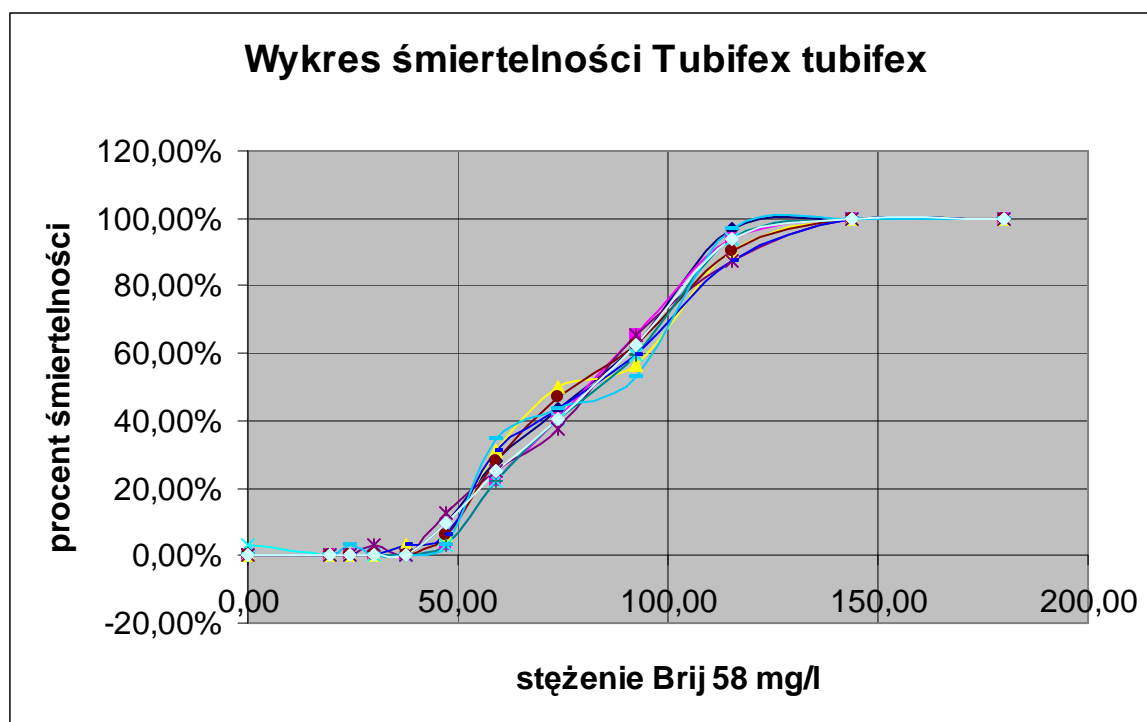
Wyniki dla Brij 58

Tab. 208. Śmiertelność *Tubifex tubifex* dla różnych stężeń detergentu Brij 58 po okresie 24h.

Ludwik	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Stężenie mg/l										
180,00	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
144,00	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
115,20	31	30	29	30	28	29	30	28	31	30
92,16	20	21	18	19	21	20	19	19	17	20
73,73	14	13	16	13	12	15	13	14	14	13
58,98	9	7	10	7	8	9	7	10	11	8
47,19	3	1	2	1	4	2	1	2	1	3
37,75	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
30,20	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
24,16	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
19,33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrola	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Śmiertelność próby										

Stężenie mg/l	Próba 1	Próba 2	Próba 3	Próba 4	Próba 5	Próba 6	Próba 7	Próba 8	Próba 9	Próba 10
180,00	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
144,00	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
115,20	96,88%	93,75%	90,63%	93,75%	87,50%	90,63%	93,75%	87,50%	96,88%	93,75%
92,16	62,50%	65,63%	56,25%	59,38%	65,63%	62,50%	59,38%	59,38%	53,13%	62,50%
73,73	43,75%	40,63%	50,00%	40,63%	37,50%	46,88%	40,63%	43,75%	43,75%	40,63%
58,98	28,13%	21,88%	31,25%	21,88%	25,00%	28,13%	21,88%	31,25%	34,38%	25,00%
47,19	9,38%	3,13%	6,25%	3,13%	12,50%	6,25%	3,13%	6,25%	3,13%	9,38%
37,75	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%	0,00%
30,20	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
24,16	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%
19,33	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<b>Kontrola</b>	0,00%	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Tab. 209. Procent śmiertelności *Tubifex tubifex* dla różnych stężeń detergentu Brij 58 po okresie 24h.



Ryc. 98. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności *Tubifex tubifex* dla poszczególnych stężeń detergentu Brij 35 w okresie 24h.

**Wyznaczenie współczynnika LC 50% /24h:**

*Metoda probitowa dla obliczeń stężenia letalnego LC50:*

Obliczenie stężenia letalnego LC50:

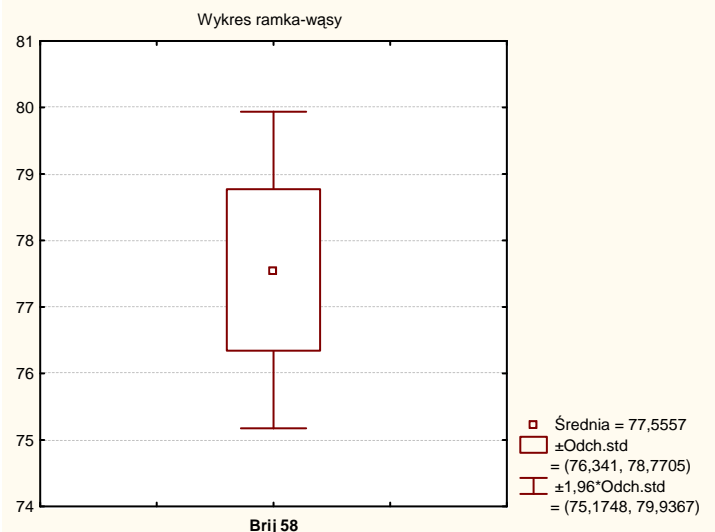
Wartość stężenia LC50 dla związku chemicznego określa się w mg/l dla wód i ścieków w procentach:

$$LC50 = N \lg \frac{5 - \bar{y} + b\bar{x}}{b}$$

Stężenie	Śmiertelność % M1	y <sub>1</sub> = probit M <sub>1</sub>	x <sub>1</sub> = lg C <sub>1</sub> stężenie	Kwadrat lg stężenia x <sub>1</sub> <sup>2</sup>	Iloczyn lg stężenia i probitu x <sub>1</sub> i y <sub>1</sub>
180,00	100%	-	2,255273	5,086254	-
144,00	100%	-	2,158362	4,658529	-
115,20	97%	6,86273187	2,061452	4,249586	14,1472
92,16	63%	5,31863936	1,964542	3,859427	10,44869
73,73	44%	4,84268932	1,867632	3,488051	9,044364
58,98	28%	4,42086784	1,770722	3,135458	7,82813
47,19	9%	3,6819891	1,673812	2,801648	6,162959
37,75	0%	-	1,576902	2,486621	-
30,20	0%	-	1,479992	2,190378	-
24,16	0%	-	1,383082	1,912917	-
19,33	0%	-	1,286172	1,654239	-
0	0%	-	-	-	-
suma		18,2641856	7,27671	13,28458	33,48415
średnie		4,5660464	1,819177		
współ regresji – b = 5,50177644					
LC50 = 79,07744 mg/l					

Tab. 210. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr1.

Obliczone współczynniki LC50		
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50
1	79,07	77,5 mg/l
2	78,35	
3	77,71	
4	78,53	
5	76,62	Odch. Stand.
6	78,13	SD - 1,21
7	78,53	
8	75,75	
9	77,23	
10	75,60	



Tab. 211. Wyznaczone wartości LC50 Brij 58. Ryc. 99. Wykres ramka wąsy LC50 – Brij 58

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Tubifex tubifex</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
Brij 58	77,5 mg/l	Średnio toksyczny	Szkodliwy	Umiarkowanie toksyczny

 Tab. 212. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Tubifex tubifex*.

Wyniki dla Brij 72

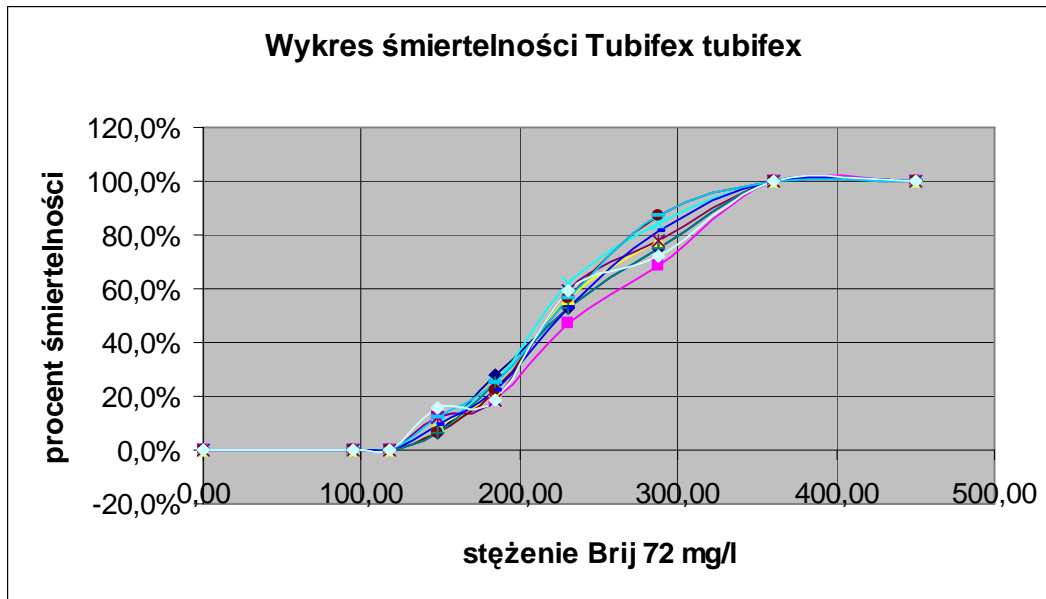
Ludwik	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Stężenie mg/l										
450,00	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
360,00	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
288,00	24	22	25	27	25	28	24	26	28	23
230,40	17	15	18	20	19	18	17	17	18	19
184,32	9	6	7	8	6	7	8	7	8	6
147,46	2	4	3	3	4	2	2	3	4	5
117,96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
94,37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Śmiertelność próby										

 Tab. 213. Śmiertelność *Tubifex tubifex* dla różnych stężeń detergentu Brij 72 po okresie 24h.

Stężenie mg/l	Próba 1	Próba 2	Próba 3	Próba 4	Próba 5	Próba 6	Próba 7	Próba 8	Próba 9	Próba 10
450,00	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
360,00	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
288,00	75,00%	68,75%	78,13%	84,38%	78,13%	87,50%	75,00%	81,25%	87,50%	71,88%
230,40	53,13%	46,88%	56,25%	62,50%	59,38%	56,25%	53,13%	53,13%	56,25%	59,38%
184,32	28,13%	18,75%	21,88%	25,00%	18,75%	21,88%	25,00%	21,88%	25,00%	18,75%
147,46	6,25%	12,50%	9,38%	9,38%	12,50%	6,25%	6,25%	9,38%	12,50%	15,63%
117,96	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
94,37	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Kontrola	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

 Tab. 214. Procent śmiertelności *Tubifex tubifex* dla różnych stężeń detergentu Brij 72 po okresie 24h.





Ryc. 100. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności *Tubifex tubifex* dla poszczególnych stężeń detergentu Brij 72 w okresie 24h.

**Wyznaczenie współczynnika LC 50% /24h:**

*Metoda probitowa dla obliczeń stężenia letalnego LC50:*

Obliczenie stężenia letalnego LC50:

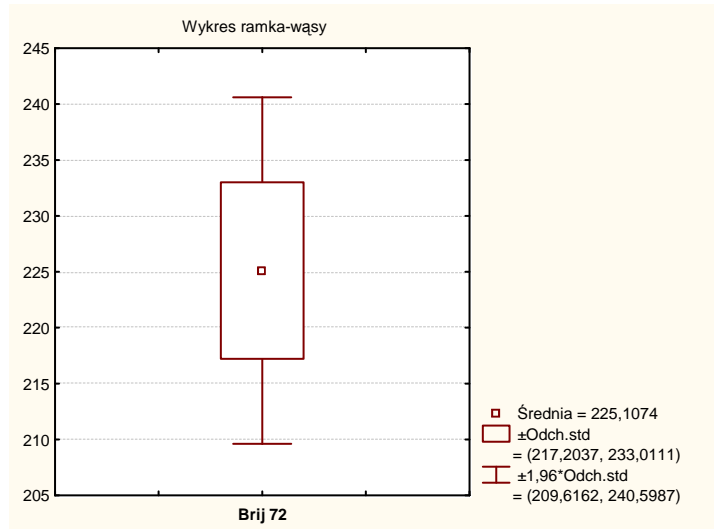
*Wartość stężenia LC50 dla związku chemicznego określa się w mg/l dla wód i ścieków w procentach:*

$$LC50 = N \lg \frac{5 - \bar{y} + b\bar{x}}{b}$$

Stężenie	Śmiertelność % M1	y <sub>1</sub> = probit M <sub>1</sub>	x <sub>1</sub> = lg C <sub>1</sub> stężenie	Kwadrat lg stężenia x <sub>1</sub> <sup>2</sup>	iloczyn lg stężenia i probitu x <sub>1</sub> i y <sub>1</sub>
450,00	100%	-	2,653213	7,039537	-
360,00	100%	-	2,556303	6,534682	-
288,00	75%	5,67448975	2,459392	6,048611	13,9558
230,40	53%	5,07841241	2,362482	5,581323	11,99766
184,32	28%	4,42086784	2,265572	5,132819	10,0158
147,46	6%	3,46587946	2,168662	4,703097	7,516323
117,96	0%	-	2,071752	4,292158	-
94,37	0%	-	1,974842	3,900003	-
0,00	0%	-	-	-	-
suma		18,6396495	9,25611	21,46585	43,48558
średnie		4,65991236	2,314027		
współ regresja – b = 7,51560673					
LC50 = 228,7064 mg/l					

Tab. 215. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr1.

Obliczone współczynniki LC50		
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50
1	228,70	225,12 mg/l
2	219,31	
3	241,47	
4	230,05	
5	225,41	Odch. Stand.
6	224,20	SD - 7,90
7	215,86	
8	213,90	
9	223,84	
10	228,28	



Tab. 216. Wyznaczone wartości LC50 Brij 72. Ryc. 101. Wykres ramka wąsy LC50 Brij 72.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Tubifex tubifex</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
Brij 72	225,12 mg/l	Słabo toksyczny	-	Słabo toksyczny

Tab. 217. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Tubifex tubifex*.

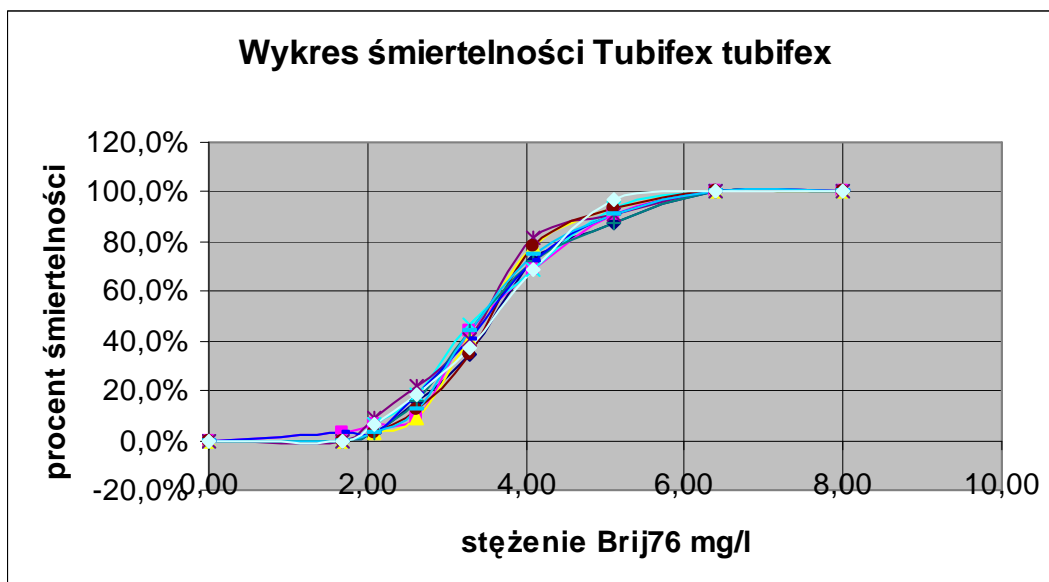
Wyniki dla Brij 76

Ludwik	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Stężenie mg/l										
8,00	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
6,40	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
5,12	28	29	30	30	29	30	28	29	29	31
4,10	23	22	25	22	26	25	23	23	24	22
3,28	11	14	13	15	13	11	14	13	14	12
2,62	5	3	3	6	7	4	5	6	4	6
2,10	1	2	1	2	3	1	1	1	1	2
1,68	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
Kontrola	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Śmiertelność próby									

Tab. 218. Śmiertelność *Tubifex tubifex* dla różnych stężeń detergentu Brij 76 po okresie 24h.

Stężenie mg/l	Próba 1	Próba 2	Próba 3	Próba 4	Próba 5	Próba 6	Próba 7	Próba 8	Próba 9	Próba 10
8,00	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
6,40	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
5,12	87,50%	90,63%	93,75%	93,75%	90,63%	93,75%	87,50%	90,63%	90,63%	96,88%
4,10	71,88%	68,75%	78,13%	68,75%	81,25%	78,13%	71,88%	71,88%	75,00%	68,75%
3,28	34,38%	43,75%	40,63%	46,88%	40,63%	34,38%	43,75%	40,63%	43,75%	37,50%
2,62	15,63%	9,38%	9,38%	18,75%	21,88%	12,50%	15,63%	18,75%	12,50%	18,75%
2,10	3,13%	6,25%	3,13%	6,25%	9,38%	3,13%	3,13%	3,13%	3,13%	6,25%
1,68	0,00%	3,13%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%	0,00%
Kontrola	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Tab. 219. Procent śmiertelności *Tubifex tubifex* dla różnych stężeń detergentu Brij 76 po okresie 24h.



Ryc. 102. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności *Tubifex tubifex* dla poszczególnych stężeń detergentu Brij 76 w okresie 24h.

**Wyznaczenie współczynnika LC 50% /24h:**

*Metoda probitowa dla obliczeń stężenia letalnego LC50:*

Obliczenie stężenia letalnego LC50:

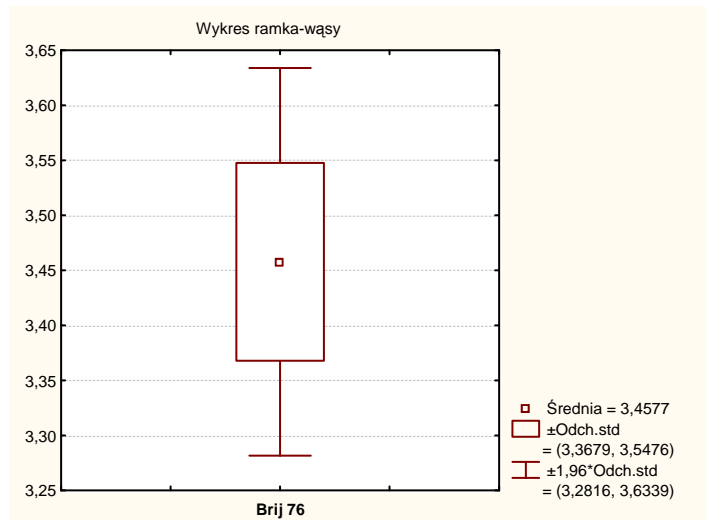
*Wartość stężenia LC50 dla związku chemicznego określa się w mg/l dla wód i ścieków w procentach:*

$$LC50 = N \lg \frac{5 - \bar{y} + b\bar{x}}{b}$$

Stężenie	Śmiertelność % M1	$y_1 = \text{probit } M_1$	$x_1 = \lg C_1$ stężenie	Kwadrat $\lg^2$ stężenia $x_1^2$	iloczyn $\lg$ stężenia i probitu $x_1$ i $y_1$
8,00	100%	-	0,90309	0,815572	-
6,40	100%	-	0,80618	0,649926	-
5,12	88%	6,15034938	0,70927	0,503064	4,362258
4,10	72%	5,57913216	0,61236	0,374985	3,416437
3,28	34%	4,59774993	0,51545	0,265689	2,36991
2,62	16%	3,99000983	0,41854	0,175176	1,669978
2,10	3%	3,13726813	0,32163	0,103446	1,009039
1,68	0%	-	0,22472	0,050499	-
0,00	0%	-	-	-	-
suma		23,4545094	2,57725	1,422359	12,82762
średnie		4,69090189	0,51545		
współ regresja - b =		7,85809907			
LC50 =		3,587442 mg/l			

Tab. 220. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr1.

Obliczone współczynniki LC50		
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50
1	3,58	3,45 mg/l
2	3,46	
3	3,51	
4	3,53	
5	3,46	Odch. Stand.
6	3,48	SD - 0,089
7	3,37	
8	3,49	
9	3,30	
10	3,34	



Tab: 221. Wyznaczone wartości LC50 Brij 76. Ryc. 103. Wykres ramka wąsy LC50 Brij 76.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Tubifex tubifex</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
Brij 76	3,45 mg/l	Silnie toksyczny	Toksyczny	Umiarkowanie toksyczny

Tab. 222. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Tubifex tubifex*.

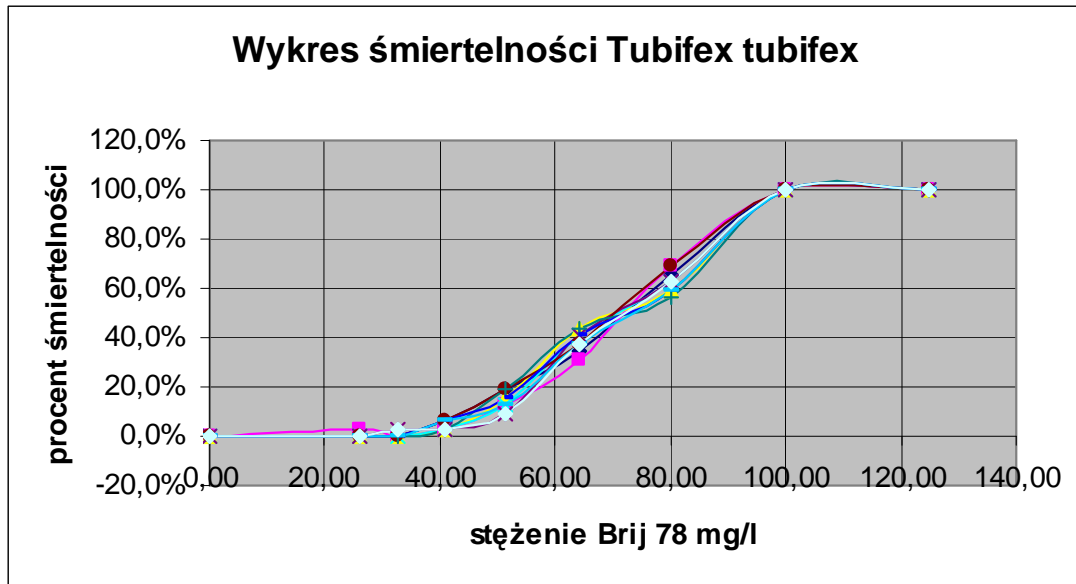
Wyniki Brij 78

Ludwik	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Stężenie mg/l										
125,00	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
100,00	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
80,00	21	22	19	20	20	22	18	19	19	20
64,00	11	10	14	13	13	12	14	13	12	12
51,20	6	4	5	4	3	6	6	5	4	3
40,96	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
32,77	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
26,21	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrola	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Śmiertelność próby										

Tab. 223. Śmiertelność *Tubifex tubifex* dla różnych stężeń detergentu Brij 78 po okresie 24h.

Stężenie mg/l	Próba 1	Próba 2	Próba 3	Próba 4	Próba 5	Próba 6	Próba 7	Próba 8	Próba 9	Próba 10
125,00	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
100,00	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
80,00	65,63%	68,75%	59,38%	62,50%	62,50%	68,75%	56,25%	59,38%	59,38%	62,50%
64,00	34,38%	31,25%	43,75%	40,63%	40,63%	37,50%	43,75%	40,63%	37,50%	37,50%
51,20	18,75%	12,50%	15,63%	12,50%	9,38%	18,75%	18,75%	15,63%	12,50%	9,38%
40,96	6,25%	3,13%	3,13%	3,13%	3,13%	6,25%	3,13%	6,25%	6,25%	3,13%
32,77	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,13%
26,21	0,00%	3,13%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Kontrola	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Tab. 224. Procent śmiertelności *Tubifex tubifex* dla różnych stężeń detergentu Brij 78 po okresie 24h.



Ryc. 104. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności *Tubifex tubifex* dla poszczególnych stężeń detergentu Brij 78 w okresie 24h.

**Wyznaczenie współczynnika LC 50 /24h:**

*Metoda probitowa dla obliczeń stężenia letalnego LC50:*

Obliczenie stężenia letalnego LC50:

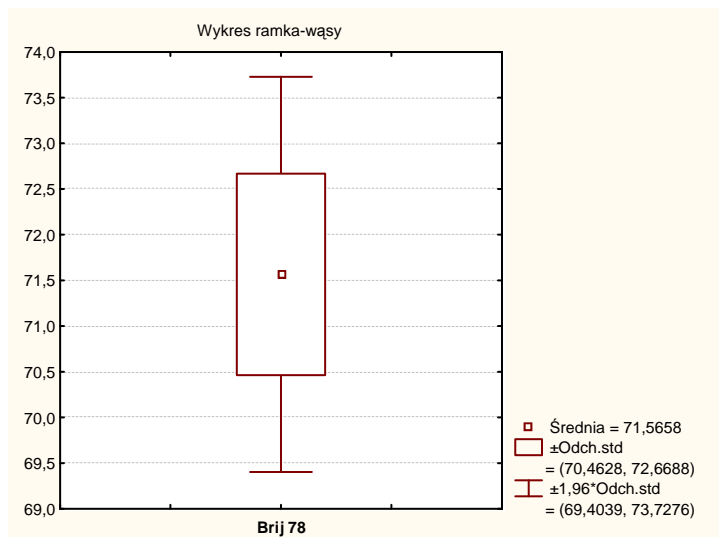
*Wartość stężenia LC50 dla związku chemicznego określa się w mg/l dla wód i ścieków w procentach:*

$$LC50 = N \lg \frac{5 - \bar{y} + b\bar{x}}{b}$$

Stężenie	Śmiertelność % M1	y <sub>1</sub> = probit M <sub>1</sub>	x <sub>1</sub> = lg C <sub>1</sub> stężenie	Kwadrat lg stężenia x <sub>1</sub> <sup>2</sup>	iloczyn lg stężenia i probitu x <sub>1</sub> i y <sub>1</sub>
125,00	100%	-	2,09691	4,397032	-
100,00	100%	-	2	4	-
80,00	66%	5,40225007	1,90309	3,621751	10,28097
64,00	34%	4,59774993	1,80618	3,262286	8,304364
51,20	19%	4,11285344	1,70927	2,921604	7,029977
40,96	6%	3,46587946	1,61236	2,599705	5,588245
32,77	0%	-	1,51545	2,296589	-
26,21	0%	-	1,41854	2,012256	-
0,00	0%	-	-	-	-
suma		17,5787329	7,0309	12,40535	31,20355
średnie		4,39468322	1,757725		
współ regresji – b = 6,49469351					
LC50 = 70,9458 mg/l					

Tab. 225. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr1.

Obliczone współczynniki LC50		
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50
1	70,94	71,56 mg/l
2	69,15	
3	71,17	
4	72,61	
5	71,17	Odch. Stand.
6	72,19	SD - 1,10
7	71,31	
8	73,03	
9	71,61	
10	72,42	



Tab. 226. Wyznaczone wartości LC50 Brij 78. Ryc. 105. Wykres ramka wąsy LC50 Brij 78.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Tubifex tubifex</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
Brij 78	71,56 mg/l	Średnio toksyczny	Szkodliwy	Umiarkowanie toksyczny

Tab. 227. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Tubifex tubifex*.

Zebrane wyniki:

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Tubifex tubifex</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
Brij 35	101,77 mg/l	Średnio toksyczny	Szkodliwy	Umiarkowanie toksyczny
Brij 58	77,5 mg/l	Średnio toksyczny	Szkodliwy	Umiarkowanie toksyczny
Brij 72	225,12 mg/l	Słabo toksyczny	-	Słabo toksyczny
Brij 76	3,45 mg/l	Silnie toksyczny	Toksyczny	Umiarkowanie toksyczny
Brij 78	71,56 mg/l	Średnio toksyczny	Szkodliwy	Umiarkowanie toksyczny

Tab. 228. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Tubifex tubifex*.

**XIV. Badanie wpływu detergentów anionowego Ludwik na śmiertelność *Tubifex tubifex*.**

**Cel badania:** określenie toksyczności ostrej wpływu detergentu ludwik (mieszanina anionowo czynnych SPC) dla form dorosłych *Tubifex tubifex*. w okresie 24h, wyznaczenie zakresu stężeń bezpiecznych oraz współczynnika LC50.

Wynik doświadczenia:

**Określenie wartości stałych:**

- Iloraz postępu geometrycznego rozcieńczeń  $q = 1,25$  (wytypowany w testach *screen*).
- Liczba powtórzeń 5,
- Temp. otoczenia; 22,5°C – 23°C.
- Temp. wody w badanych próbach; 21,5°C
- Okres testu 24h
- Wartość pH roztworów = 6,5

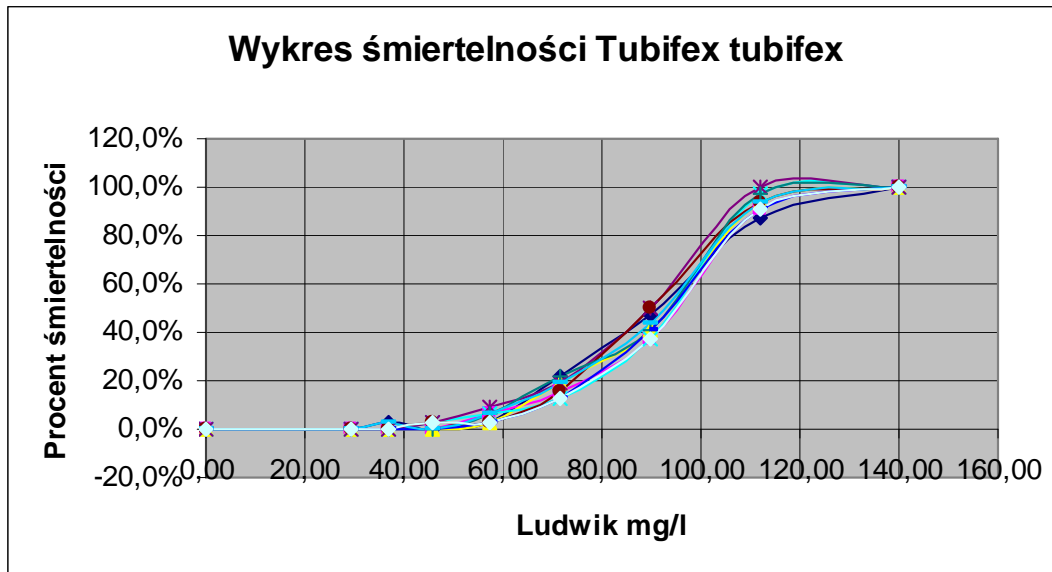
Ludwik	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Stężenie mg/l										
140,00	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
112,00	28	29	30	31	32	30	31	29	30	29
89,60	15	12	13	12	16	16	13	13	14	12
71,68	7	5	6	4	6	5	7	4	6	4
57,34	1	2	1	2	3	1	2	1	2	1
45,88	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1
36,70	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
29,36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrola	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Śmiertelność próby</b>										

Tab. 229. Śmiertelność *Tubifex tubifex* dla różnych stężeń detergentu Ludwik po okresie 24h.

Stężenie mg/l	Próba 1	Próba 2	Próba 3	Próba 4	Próba 5	Próba 6	Próba 7	Próba 8	Próba 9	Próba 10
140,00	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
112,00	87,5%	90,6%	93,8%	96,9%	100,0%	93,8%	96,9%	90,6%	93,8%	90,6%
89,60	46,88%	37,50%	40,63%	37,50%	50,00%	50,00%	40,63%	40,63%	43,75%	37,50%
71,68	21,88%	15,63%	18,75%	12,50%	18,75%	15,63%	21,88%	12,50%	18,75%	12,50%
57,34	3,13%	6,25%	3,13%	6,25%	9,38%	3,13%	6,25%	3,13%	6,25%	3,13%
45,88	0,00%	0,00%	0,00%	3,13%	3,13%	3,13%	0,00%	0,00%	0,00%	3,13%
36,70	3,13%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%
29,36	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Kontrola	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Tab. 230. Procent śmiertelności *Tubifex tubifex* dla różnych stężeń detergentu Ludwik po okresie 24h.





Ryc. 106. Wykres skumulowanych wartości procentu śmiertelności *Tubifex tubifex* dla poszczególnych stężeń detergentu Ludwik w okresie 24h.

**Wyznaczenie współczynnika LC 50 /24h:**

*Metoda probitowa dla obliczeń stężenia letalnego LC50:*

Obliczenie stężenia letalnego LC50:

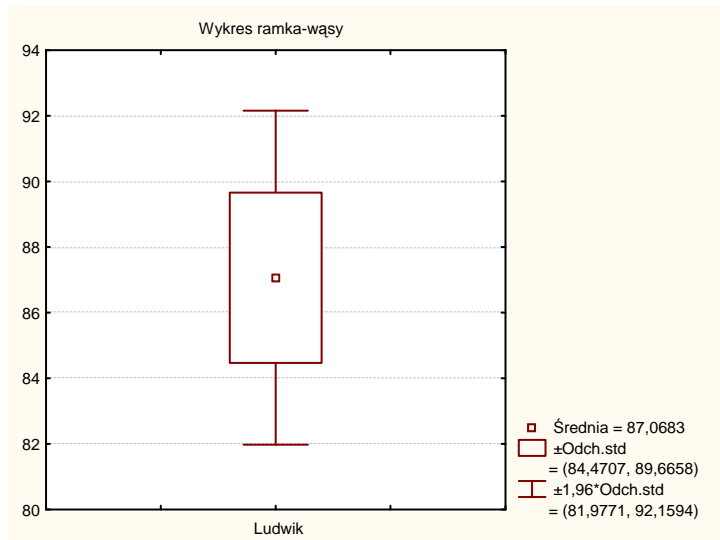
*Wartość stężenia LC50 dla związku chemicznego określa się w mg/l dla wód i ścieków w procentach:*

$$LC50 = N \lg \frac{5 - \bar{y} + b\bar{x}}{b}$$

Stężenie	Śmiertelność % M1	y <sub>1</sub> = probit M <sub>1</sub>	x <sub>1</sub> = lg C <sub>1</sub> stężenie	Kwadrat lg stężenia x <sub>1</sub> <sup>2</sup>	iloczyn lg stężenia i probitu x <sub>1</sub> i y <sub>1</sub>
140,00	100%	-	2,146128	4,605866	-
112,00	88%	6,15034938	2,049218	4,199295	12,60341
89,60	47%	4,92158759	1,952308	3,811507	9,608455
71,68	22%	4,22357824	1,855398	3,442502	7,836419
57,34	3%	3,13726813	1,758488	3,09228	5,516848
45,88	0%	-	1,661578	2,760841	-
36,70	3%	3,13726813	1,564668	2,448186	4,908783
29,36	0%	-	1,467758	2,154313	-
0,00	0%	-	-	-	-
suma		18,4327833	7,615412	14,54558	35,56513
średnie		4,60819583	1,903853		
współ regresji – b = 10,0477265					
LC50 = 87,66925 mg/l					

Tab. 231. Dane do obliczenia współczynnika LC50 dla próby nr1.

Obliczone współczynniki LC50		
Nr próby:	Wartość LC50	Wartość Średnia LC50
1	87,66	87,06 mg/l
2	85,66	
3	87,96	
4	83,04	
5	86,36	Odch. Stand.
6	88,84	SD - 2,59
7	84,90	
8	84,98	
9	91,93	
10	89,30	



Tab: 232. Wyznaczone wartości LC50 **Ludwik**. Ryc.107. Wykres ramka wąsy LC50 **Ludwik**.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> <i>hatching</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
Ludwik	87,06 mg/l	Średnio toksyczny	Szkodliwy	Umiarkowanie toksyczny

Tab. 233. Ocena stopnia toksyczności detergentu Ludwik dla *Tubifex tubifex*.

## 8. Statystyczna ocena wyników badań:

 I. Zestawienie wyników testów LC50/24 toksyczności ostrej dla *Daphnia magna* Strauss:

Rodzaj Sub. Chem.	Wartości LC50/24h mg/l										
	średnia	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Brij 35	115,65	114,55	114,45	115,64	119,28	113,85	116,68	117,16	112,45	116,77	115,77
Brij 58	155,59	149,42	152,73	147,70	151,86	147,48	156,35	155,06	145,02	150,90	155,60
Brij 72	344,72	379,08	306,38	296,21	318,13	398,89	365,88	348,90	375,76	329,86	328,16
Brij 76	5,72	5,43	5,70	5,81	5,91	5,83	5,44	6,02	5,34	6,01	5,78
Brij 78	80,31	82,37	82,56	80,30	82,44	81,84	82,79	74,49	77,62	82,28	76,51
Ludwik	94,39	94,67	92,85	93,21	104,21	92,27	94,24	94,07	95,15	90,90	92,38
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	156,09	163,10	178,62	149,10	158,36	156,39	161,70	165,84	158,55	137,67	138,67
HNO <sub>3</sub>	198,83	208,04	201,18	191,00	202,46	201,72	201,72	197,45	193,39	201,72	187,11
NH <sub>4</sub> OH	27,62	26,24	27,37	26,91	25,90	25,52	25,67	28,99	31,62	29,95	28,10
NaCl	4325,90	4551,53	4341,94	4321,64	4293,25	4251,52	4336,89	4171,33	4332,74	4321,64	4336,89
KCl	904,00	823,64	911,32	1106,46	911,32	916,06	912,87	776,15	898,29	915,27	872,94
MgCl <sub>2</sub>	1141,00	1130,67	1119,48	1091,32	1175,70	1165,04	1118,28	1164,56	1159,75	1129,73	1156,38
CaCl <sub>2</sub>	1068,00	1025,74	1120,86	1104,96	1053,19	1068,98	1057,47	1083,13	1069,47	1017,46	1080,49

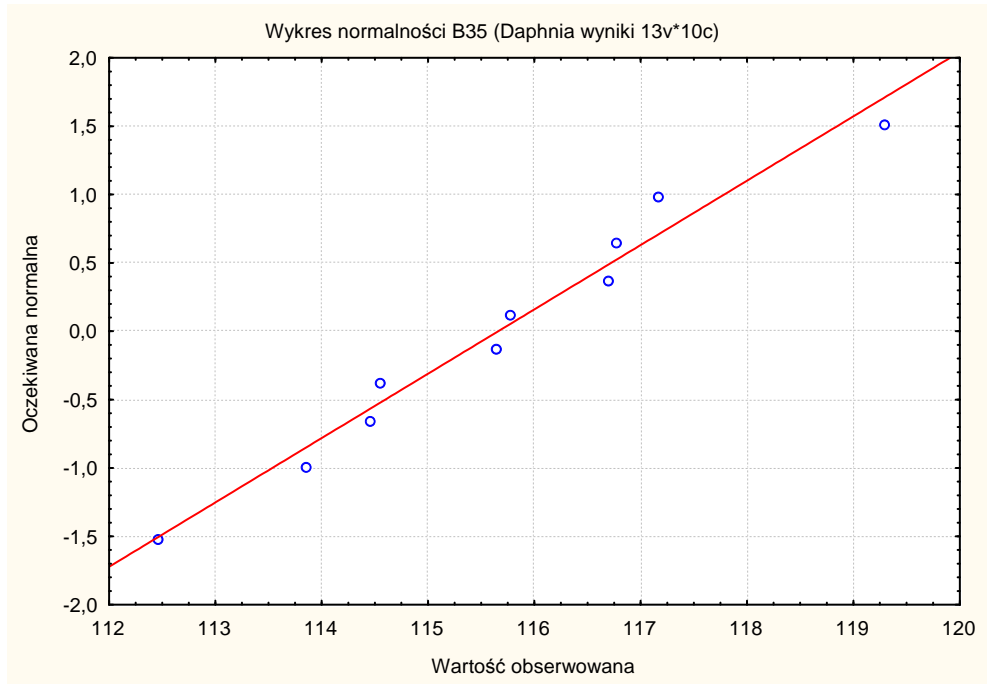
 Tab. 234. Zestawienie wartości LC50/24h dla *Daphnia magna* dla badanych toksykantów oraz wartość średnia.

Opracowanie statystyczne:

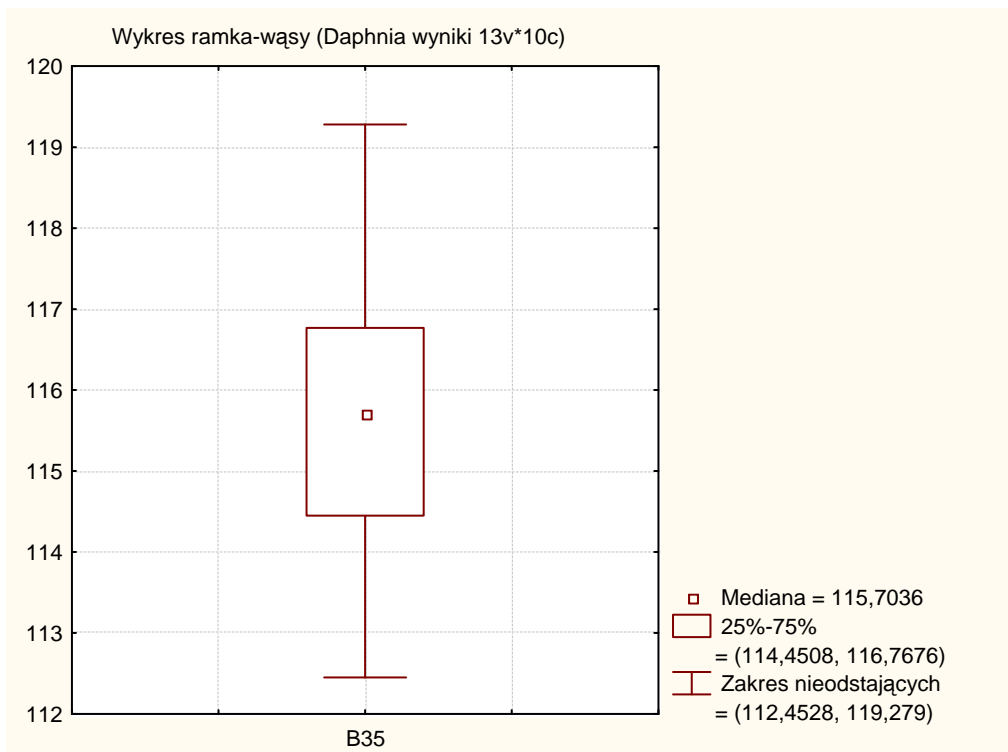
Dla każdej serii wyników możemy przedstawić (skumulowany) histogram rozkładu oraz zbadać z jakiej populacji pochodzi badana próbka. Dobrymi testami statystycznymi badającym zgodność rozkładu empirycznego (próbkowego) z rozkładami teoretycznymi (w szczególności z rozkładem normalnym dla małych prób jest test Shapiro-Wilka, oraz test Test Kołmogorowa – Smirnova. Teoretyczny opis testów zamieszczony w Załączniku nr 4.

Opracowanie wyników testów w programie Statistica (StatSoft) – wykresy oraz wyliczone współczynniki zastosowanych w/w testów. Wykresy dla każdej próby wyników z tabeli nr. w załączniku nr 5.

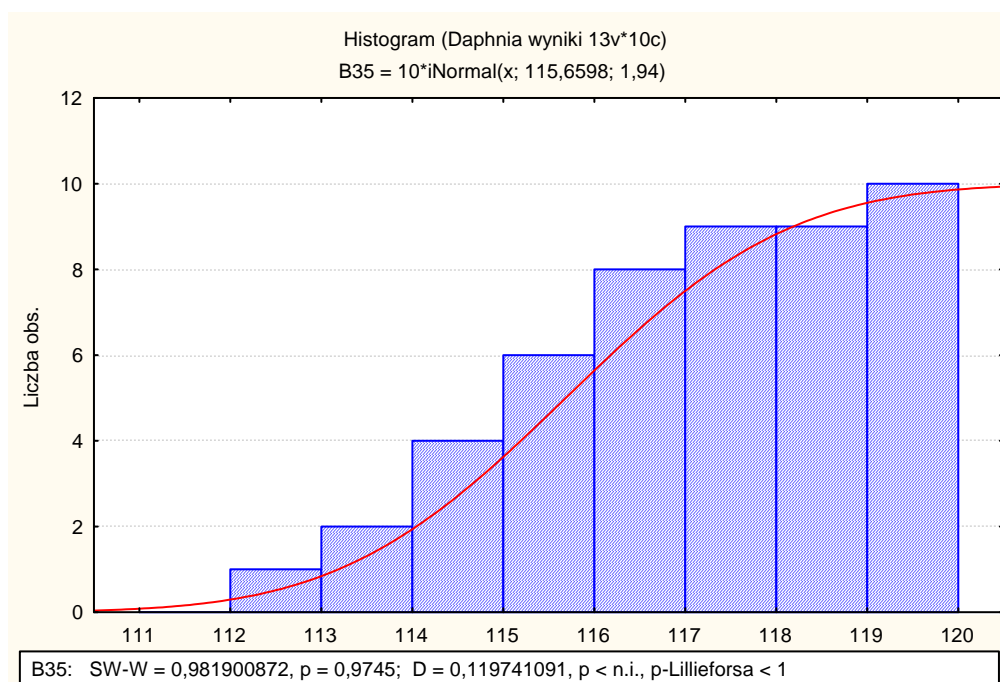
Przykład graficznego opracowania statystycznego (w programie Statistica – moduł statystyki opisowe) dla wyników z *Daphnia magna*.



Ryc. 108. wykres normalności dla próby Brij 35 (LC50/24 – dla *Daphnia magna*).



Ryc. 109. Wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla Brij 35 (dla *Daphnia magna*).



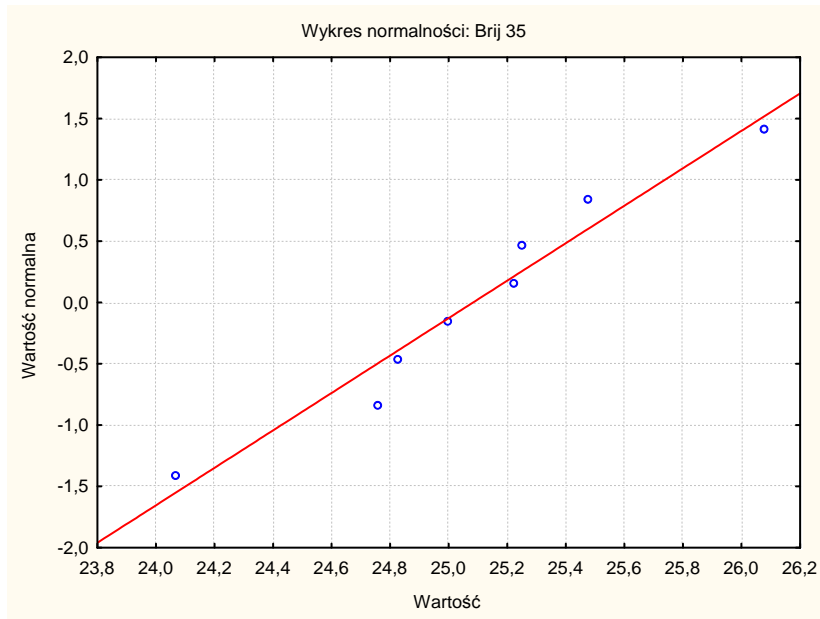
Ryc. 110. Skumulowany histogram dla wartości LC50/24 dla *Daphnia magna* dla Brij 35, z wynikami testu Shapiro – Wilka oraz Kołmogorowa – Smirnowa z poprawką Lillieforsa.

## II. Zestawienie wyników testów LC50/24 toksyczności ostrej dla *Lymnaea stagnalis* (hatching)

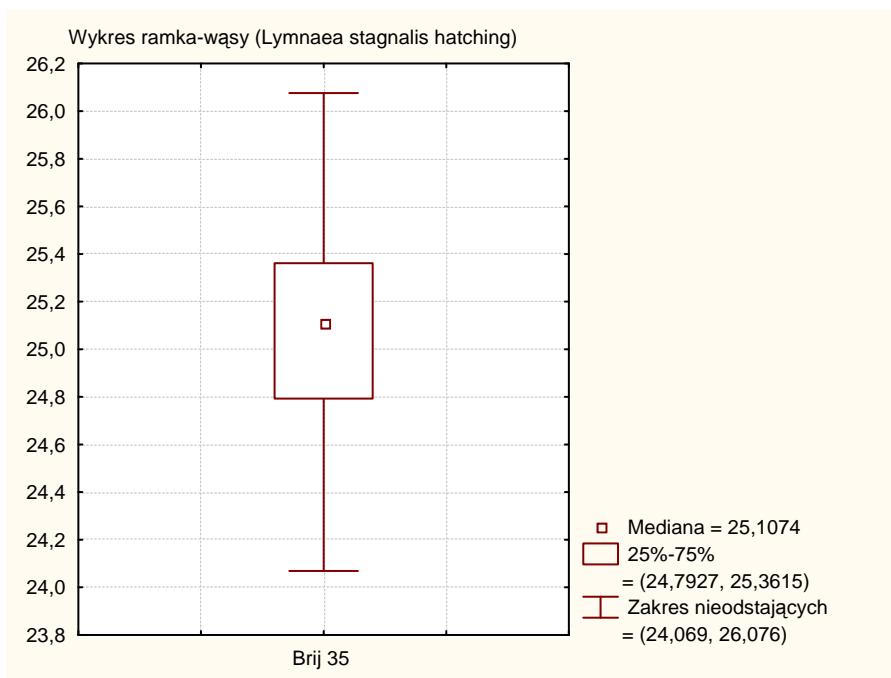
Rodzaj Sub. Chem.	Wartości LC50/24h mg/l								
	średnia	1	2	3	4	5	6	7	8
Brij 35	25,08	25,25	25,22	24,83	25,00	24,07	25,48	24,76	26,08
Brij 58	36,64	36,23	34,72	36,48	38,26	38,62	35,76	35,14	37,87
Brij 72	62,74	62,46	65,07	63,92	64,49	62,15	59,91	62,76	61,12
Brij 76	2,25	2,28	2,26	2,18	2,32	2,30	2,23	2,21	2,25
Brij 78	30,22	29,22	30,48	28,62	29,98	32,26	30,03	30,02	31,16
Ludwik	66,30	64,71	67,40	66,72	65,36	68,17	67,68	65,84	64,53
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	127,15	130,76	123,41	123,94	123,66	132,06	132,77	122,04	128,53
HNO <sub>3</sub>	170,88	168,65	164,71	177,78	169,14	172,29	170,69	168,31	175,44
NH <sub>4</sub> OH	24,82	23,31	26,87	24,54	23,61	23,22	23,90	29,48	23,62
NaCl	2158,26	2108,14	2182,57	2178,40	2211,45	2176,72	2097,06	2184,31	2127,47
KCl	2713,84	2597,12	2756,82	2534,97	2781,84	2769,31	2760,77	2668,95	2840,98
MgCl <sub>2</sub>	1919,17	1912,21	1874,33	1980,68	1911,43	1965,79	1912,21	1888,62	1908,07
CaCl <sub>2</sub>	1068,00	1025,74	1120,86	1104,96	1053,19	1068,98	1057,47	1083,13	1069,47

Tab. 235. Zestawienie wartości LC50/24h dla *Lymnaea stagnalis* (hatching) dla badanych toksykantów oraz wartość średnia.

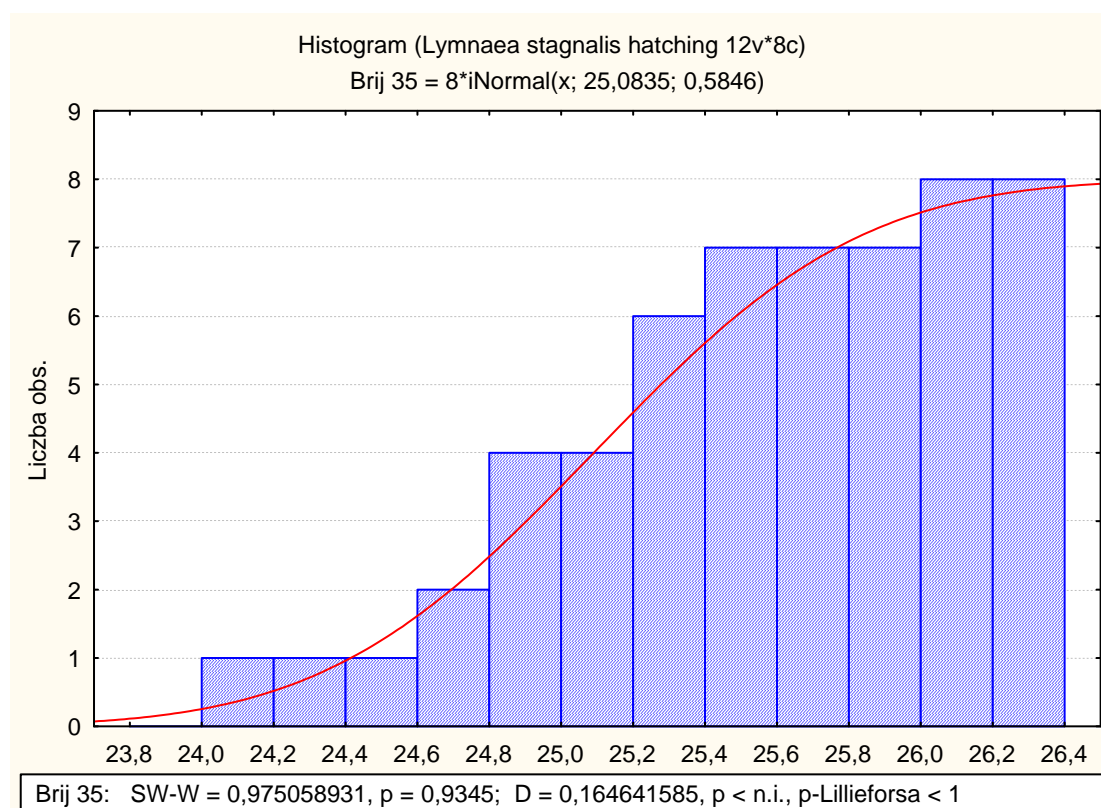
Przykład graficznego opracowania statystycznego (w programie Statistica – moduł statystyki opisowe) dla *Lymnaea stagnalis* (po wylęgu).



Ryc. 111. wykres normalności dla próby Brij 35 (LC50/24 – dla *Lymnaea stagnalis* hatching).



Ryc. 112. wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla Brij 35 (dla *Lymnaea stagnalis* hatching).



Ryc. 113. Skumulowany histogram dla wartości LC50/24 dla *Lymnaea stagnalis* (hatching) dla Brij 35, z wynikami testu Shapiro – Wilka oraz Kołmogorowa – Smirnowa.

$p = 0,9345$  – pozwala przyjąć Hipotezę zerową – iż badana próba pochodzi z populacji o rozkładzie normalnym.

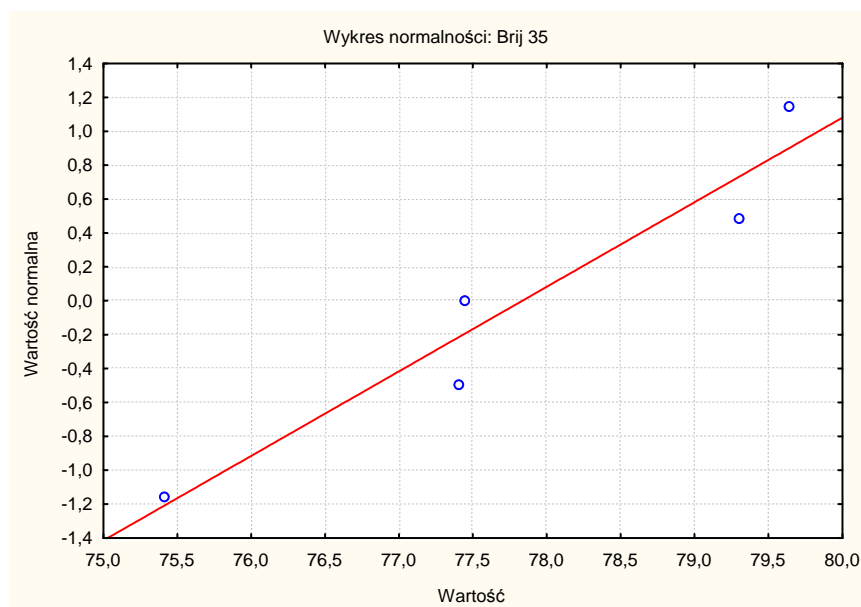
Opracowania statystyczne dla pozostałych prób w Załączniku nr.6.

III. Zestawienie wyników testów LC50/24 toksyczności ostrej dla *Lymnaea stagnalis* (zarodki).

Rodzaj Sub. Chem.	Wartości LC50/48h mg/l					
	średnia	1	2	3	4	5
Brij 35	77,83	79,63	75,40	77,44	77,41	79,29
Brij 58	122,01	124,95	123,12	119,04	117,66	125,30
Brij 72	83,18	83,98	82,59	83,12	84,23	81,97
Brij 76	6,14	6,07	6,05	6,36	5,91	6,32
Brij 78	52,63	51,65	52,59	53,74	52,11	53,07
Ludwik	69,20	68,71	69,31	69,79	69,10	69,12
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	81,17	81,70	80,17	81,89	80,53	81,55
HNO <sub>3</sub>	105,19	104,20	103,88	106,19	107,41	104,30
NH <sub>4</sub> OH	24,27	25,13	23,25	24,51	24,30	24,21
NaCl	4710,64	4682,35	4690,07	4775,32	4783,49	4621,97
KCl	2346,60	2344,90	2369,42	2319,64	2401,82	2297,25
MgCl <sub>2</sub>	3442,10	3549,91	3427,92	3377,50	3410,09	3445,08
CaCl <sub>2</sub>	77,83	79,63	75,40	77,44	77,41	79,29

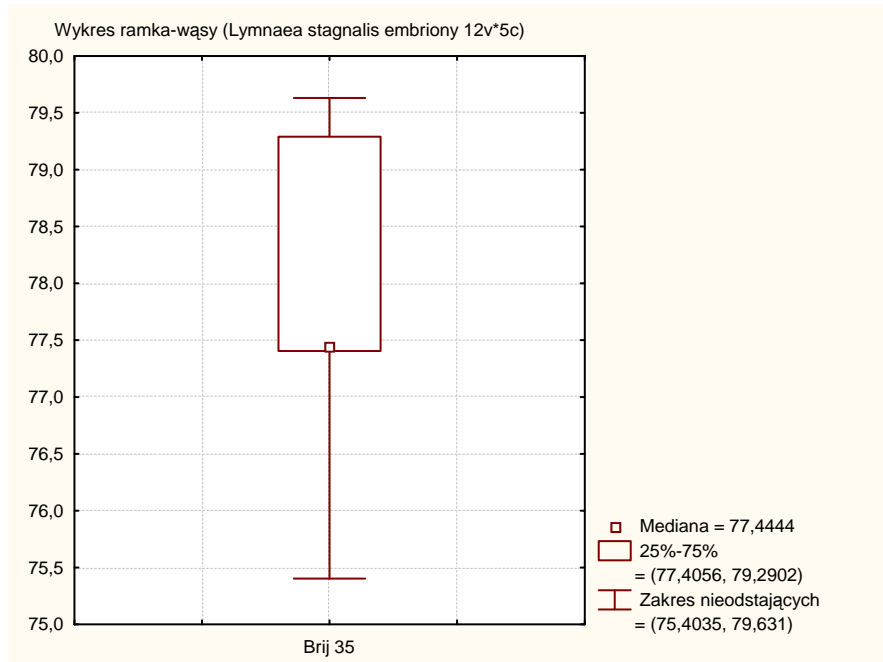
Tab. 236. Zestawienie wartości LC50/24h dla *Lymnaea stagnalis* (embrion) dla badanych toksykantów oraz wartość średnia.

Przykład graficznego opracowania statystycznego (w programie Statistica – moduł statystyki opisowe) dla *Lymnaea stagnalis* (po wylęgu).

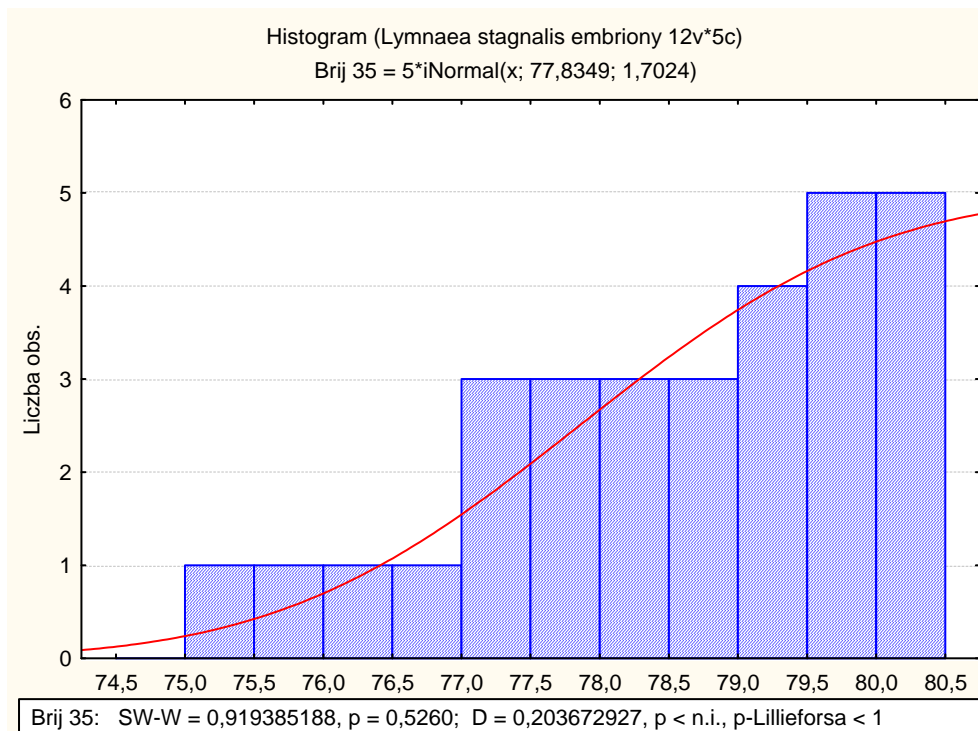


Ryc. 114. wykres normalności dla próby Brij 35 (LC50/24 – dla *Lymnaea stagnalis* embriony).





Ryc. 115. wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla Brij 35 (dla *Lymnaea stagnalis* embriony).



Ryc. 116. Skumulowany histogram dla wartości LC50/24 dla *Lymnaea stagnalis* (embriony) dla Brij 35, z wynikami testu Shapiro – Wilka oraz Kołmogorowa – Smirnowa.

$p = 0,5260$  – pozwala przyjąć Hipotezę zerową – iż badana próba pochodzi z populacji o rozkładzie normalnym.

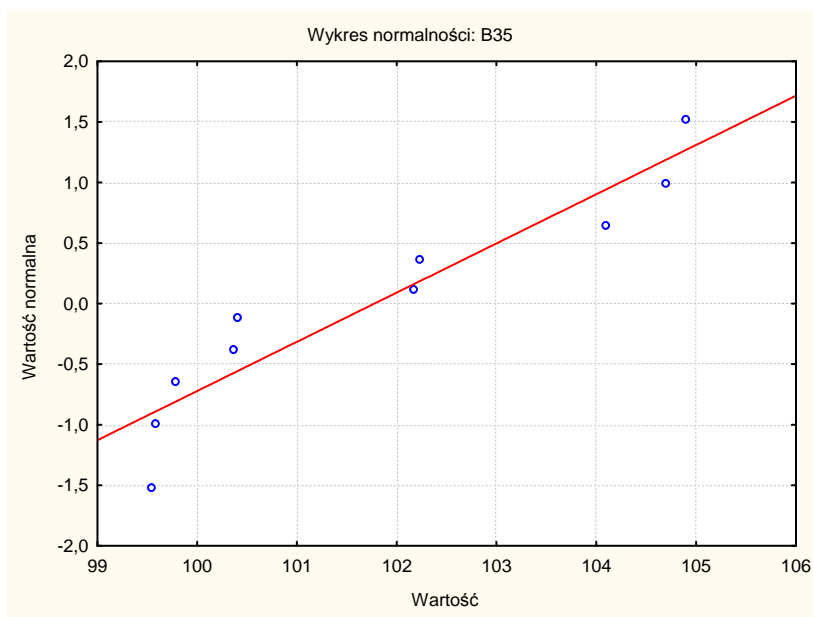
Opracowania statystyczne dla pozostałych prób w Załączniku nr.7.

IV. Zestawienie wyników testów LC50/24 toksyczności ostrej dla *Tubifex tubifex*.

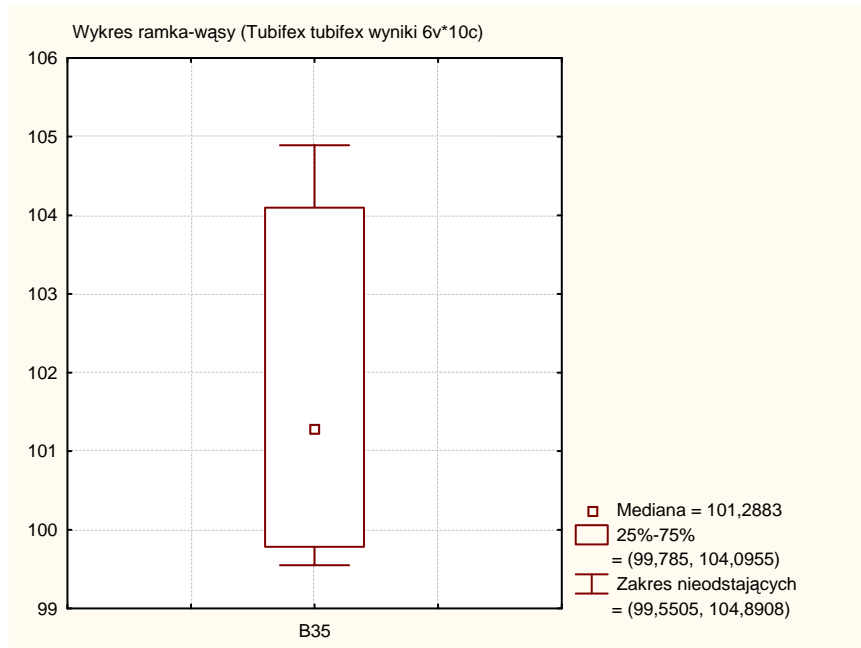
Rodzaj Sub. Chem.	Wartości LC50/24h mg/l										
	średnia	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Brij 35	101,77	99,785	100,41	104,1	102,23	104,89	100,37	99,574	104,69	102,17	99,551
Brij 58	77,5	79,077	78,356	77,711	78,535	76,621	78,134	78,535	75,751	77,233	75,603
Brij 72	225,12	228,71	219,31	241,48	230,05	225,42	224,2	215,87	213,91	223,85	228,28
Brij 76	3,45	3,5874	3,4674	3,5195	3,5363	3,4642	3,4869	3,3709	3,4941	3,3036	3,3471
Brij 78	71,56	70,946	69,159	71,176	72,62	71,175	72,194	71,317	73,035	71,613	72,424
Ludwik	87,06	87,669	85,666	87,968	83,046	86,363	88,844	84,902	84,981	91,937	89,306

Tab. 237. Zestawienie wartości LC50/24h dla *Tubifex tubifex* dla badanych toksykantów oraz wartość średnia.

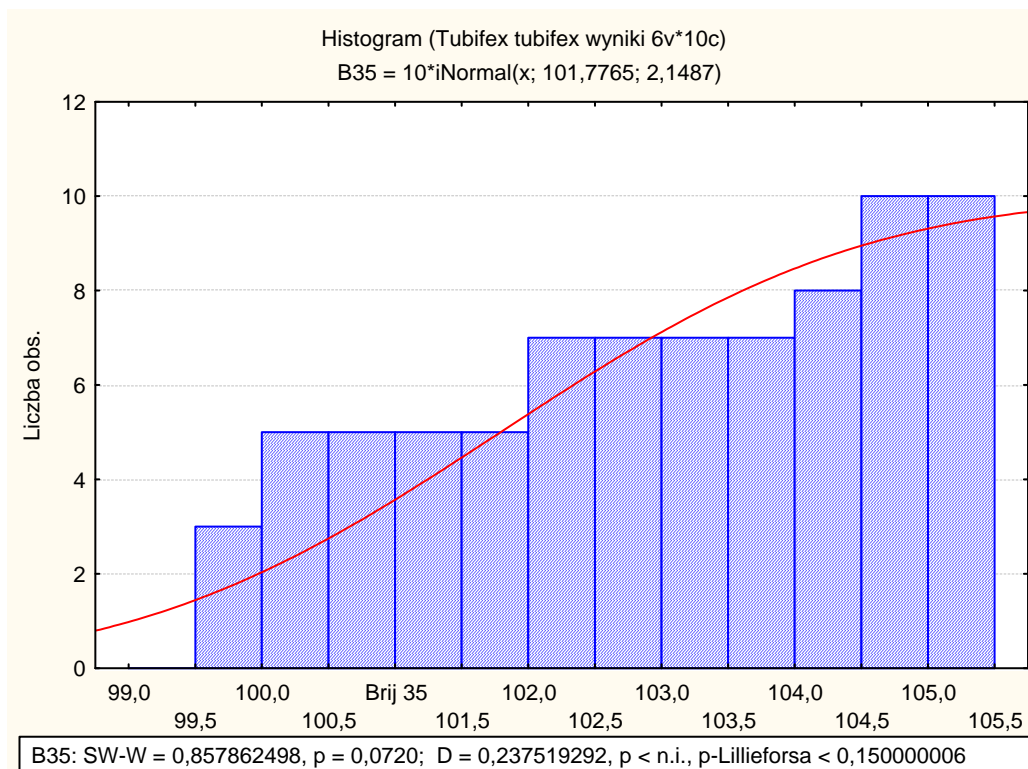
Przykład graficznego opracowania statystycznego (w programie Statistica – moduł statystyki opisowe) dla *Tubifex tubifex*.



Ryc. 117. wykres normalności dla próby Brij 35 (LC50/24 – dla *Tubifex tubifex*).



Ryc. 118. Wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla Brij 35 (dla *Tubifex tubifex*).



Ryc. 119 Skumulowany histogram dla wartości LC50/24 dla *Tubifex tubifex* dla Brij 35, z wynikami testu Shapiro – Wilka oraz Kołmogorowa – Smirnowa.

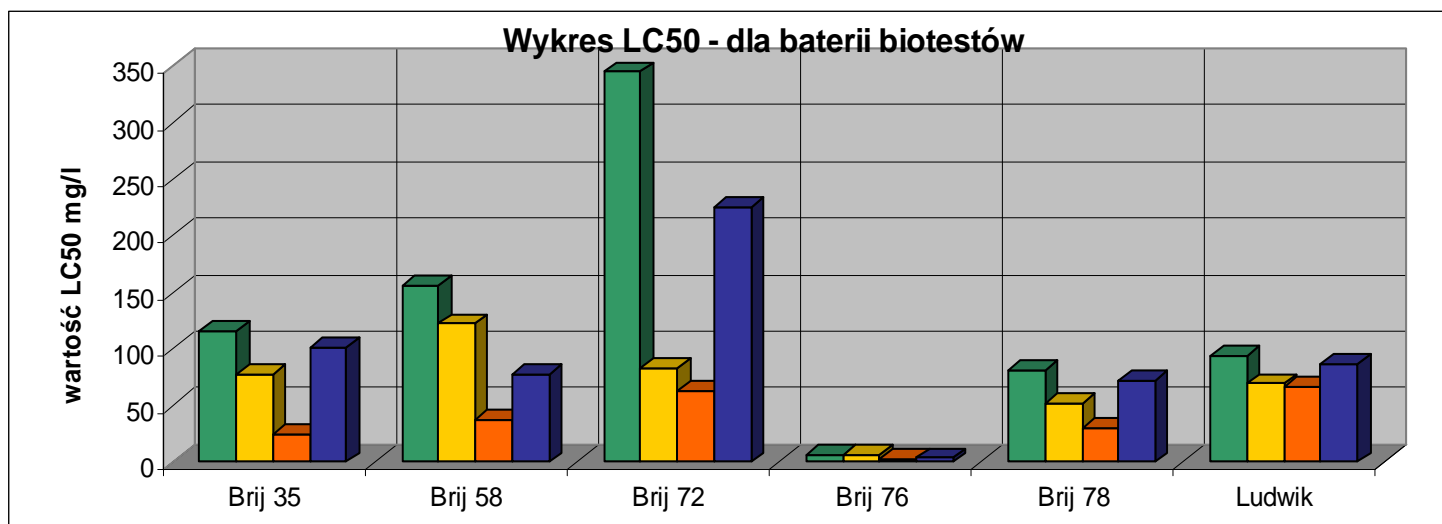
$p = 0,0720$  – pozwala przyjąć Hipotezę zerową – iż badana próba pochodzi z populacji o rozkładzie normalnym. Opracowania statystyczne dla pozostałych prób w Załączniku nr.8.

V. Porównanie stopnia toksyczności poszczególnych grup związków chemicznych w stosunku do badanych organizmów i ich stadiów rozwojowych.





1. Detergenty:

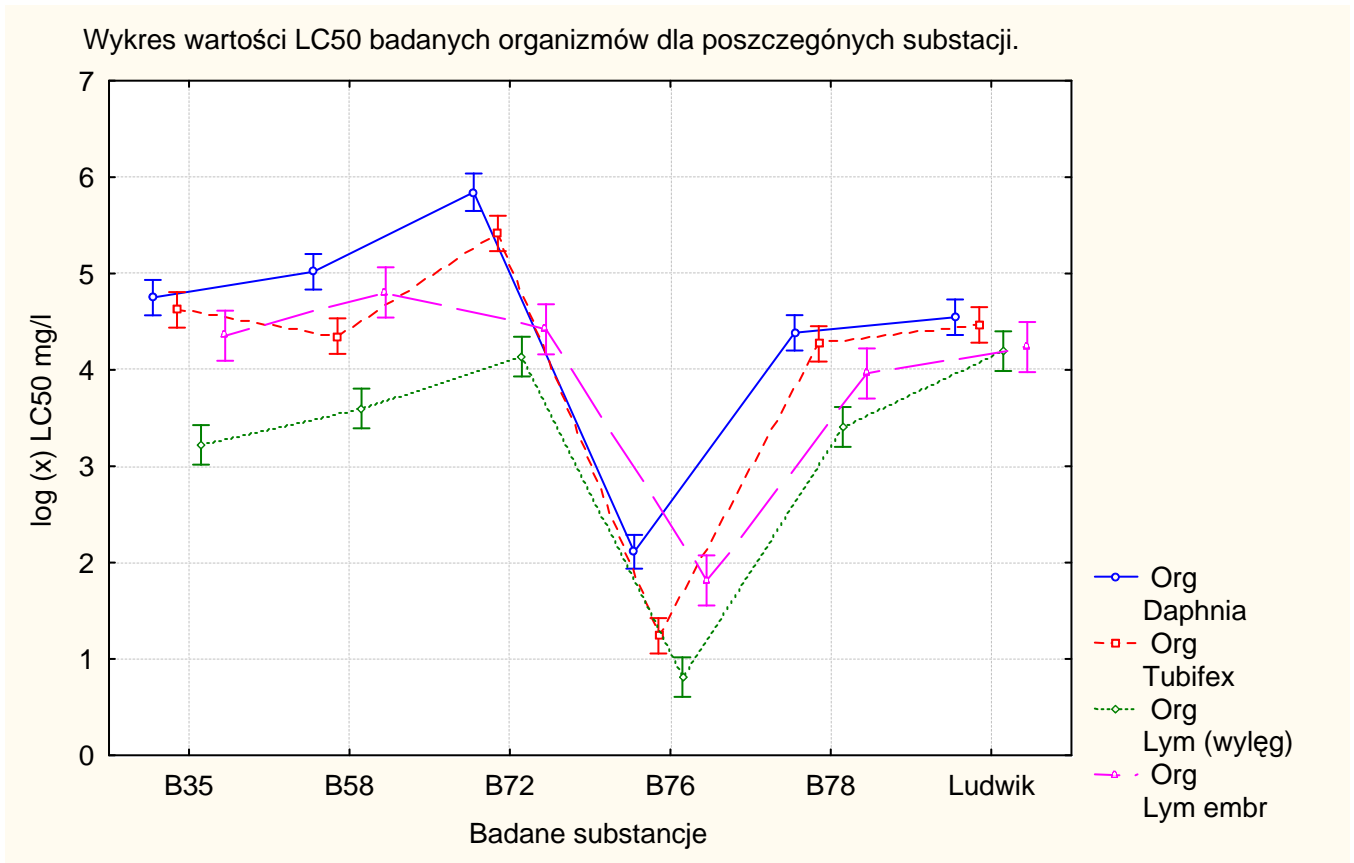
Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Daphnia magna</i> )	Wartość LC50 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> <i>embriony</i> )	Wartość LC50 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> <i>hatching</i> )	Wartość LC50 ( <i>Tubifex tubifex</i> )
Brij 35	115,65	77,83	25,07	101,77
Brij 58	155,59	122,01	36,63	77,5
Brij 72	344,72	83,18	62,73	225,12
Brij 76	5,72	6,14	2,25	3,45
Brij 78	80,31	52,63	30,2	71,56
Ludwik	94,39	69,2	66,3	87,06

Tab. 238. Wartości LC50/24h detergentów dla badanych organizmów i ich stadiów rozwojowych.

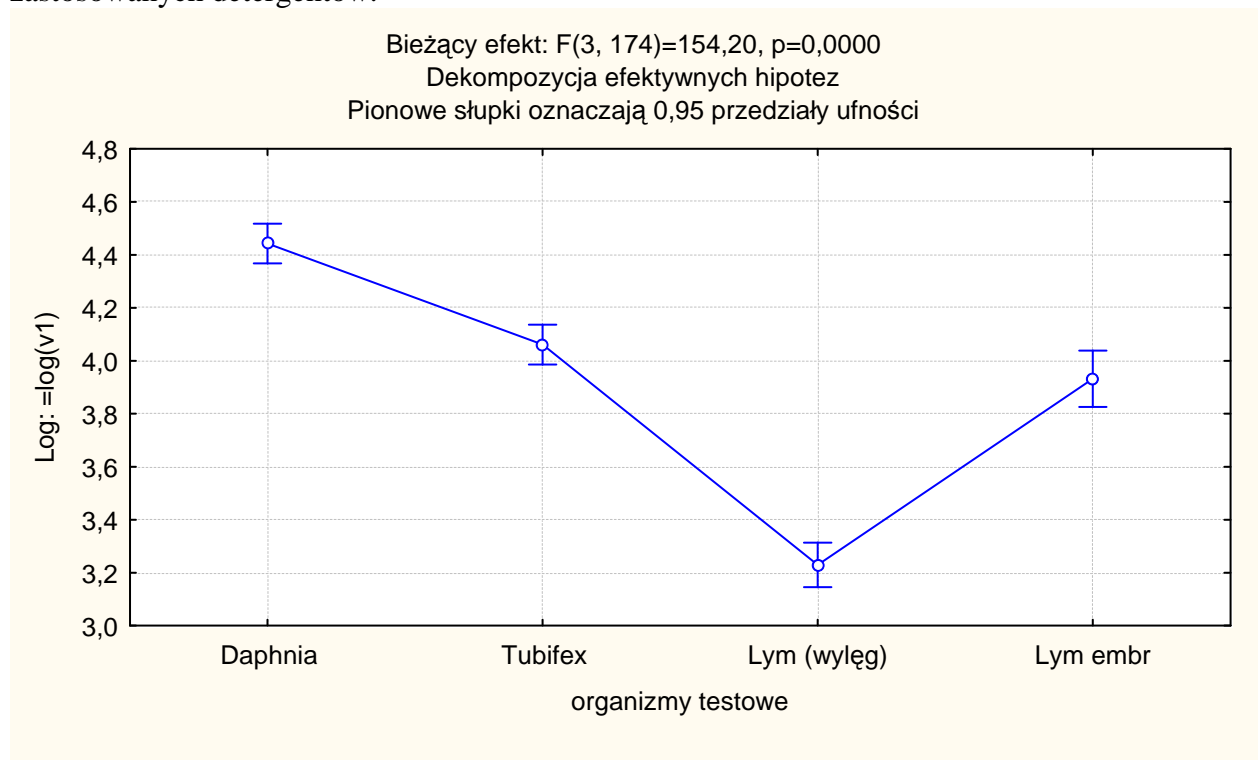


Ryc. 120. Wykres LC50/24h dla detergentów;

Legenda;	
<i>Daphnia magna</i>	
<i>Lymnaea stagnalis</i> (embriony)	
<i>Lymnaea stagnalis</i> (hatching)	
<i>Tubifex tubifex</i>	



Ryc. 121. Skumulowany wykres (log) wartości LC50 dla badanych organizmów w relacji do zastosowanych detergentów.



Ryc. 122. Wykres (log) porównanie stopnia wrażliwości badanych organizmów względem zastosowanych detergentów.

Oceny stopnia wrażliwości poszczególnych organizmów względem użytych detergentów (na bazie wyników testów LC50) dokonano przy zastosowaniu analizy dwuczynnikowej wariancji. Początkowo pojawił się problem z brakiem jednorodności wariancji ale transformacja log pozwoliła ustabilizować jednorodność wariancji. Badanie jednorodności wariancji przeprowadzono za pomocą Testu Levene'a jednorodności wariancji (dla prezentowanych wyników LC50)

	MS	MS	F	p
log	0,416843	0,748985	0,556544	0,644349

Tab. 239. Wyniki Testu Levene'a jednorodności wariancji dla log LC50 dla detergentów.

Wynik testu  $p = 0,644349$  [Tab. 239] pozwala przyjąć hipotezę o jednorodności wariancji między testowanymi organizmami w stosunku do badanych detergentów. Opis Testu Levene'a jednorodności wariancji w załączniku nr. 9. Dlatego też możemy zastosować techniki analizy wariancji w stosunku do badanego zakresu danych.

	SS	Stopnie	MS	F	p
Wyraz wolny	2802,867	1	2802,867	32249,86	0,000000
Toxykant	231,868	5	46,374	533,58	0,000000
Organizmy	40,205	3	13,402	154,20	0,000000
Toxykant*Organizmy	12,375	15	0,825	9,49	0,000000
Błąd	15,123	174	0,087		

Tab. 240. (ANOVA) Jednowymiarowe testy istotności dla log (LC50) dla detergentów względem organizmów testowych.

*W przypadku porównania wyników LC50 do toksykanta oraz w skojarzeniu toksykant - organizmy nie udało się ustabilizować jednorodności wariancji dlatego nie można stosować testów parametrycznych.*

Możemy zatem zastosować analizę dwuczynnikową (ANOVA) tylko względem badania wpływu substancji pomiędzy organizmami (test Levene'a potwierdza jednorodność wariancji) a wyniki testów istotności [Tab. 240] potwierdzają różny efekt testowy pomiędzy organizmami – pozwala nam to odrzucić hipotezę o braku różnic między działaniem poszczególnych substancji na badane organizmy. Te różnice wyjaśnić możemy różnym stopniem wrażliwości badanych organizmów oraz ich stadiów rozwojowych w stosunku do tych samych substancji toksycznych. Dlatego jesteśmy w stanie sklasyfikować badane

organizmy testowe pod względem wrażliwości w stosunku do wszystkich substancji badanych.

Dobrym testem dla wykazania stopnia istotności różnicy po zastosowaniu analizy wariancji jest Test *post hoc* Tukeya (metoda T) (opis testu załącznik 10).

	Organizmy	Lym hatch.	Daphnia	Lym emb	Tubifex
1	Lym hatch		0,000008	0,000008	0,000008
2	Daphnia	0,000008		0,000008	0,000008
3	Lym emb	0,000008	0,000008		0,206130
4	Tubifex	0,000008	0,000008	0,206130	

Tab. 241. Wyniki testu Tukeya dla istotności różnic między badanymi organizmami.

Wyniki testu [Tab. 241] jasno wykazują, że w dwóch przypadkach *Lymnaea stagnalis* (**embriony**) oraz *Tubifex tubifex* brak jest istotnych różnic – zatem stopień wrażliwości względem badanych jest porównywalny. Dla pozostałych par notuje się istotne różnice. Analizując wykres [Ryc.122] największą wrażliwością charakteryzuje się stadium rozwojowe *Lymnaea stagnalis* w okresie wylęgu natomiast najmniejszą *Daphnia magna*. Pozostałe pary *Tubifex tubifex* oraz stadium rozwojowe *Lymnaea stagnalis* (embriony). Wykazują większą wrażliwość niż *Daphnia magna* i nieco mniejszą niż *Lymnaea stagnalis* po wylęgu.

Wykorzystując statystyki nieparametryczne możemy porównać ogólny stopień toksyczności między poszczególnymi toksykantami względem badanych organizmów. Test ANOVA przy braku jednorodności wariancji: Test ANOVA rang Kruskala-Wallisa dla oceny zróżnicowania efektów toksycznych (jest to test nie czuły na brak jednorodności wariancji i zmianę liczebności w grupach) następnie Testem *post hoc* dla Kruskala – Waliza (teoretyczny opis testu w Załączniku nr 11.) możemy ocenić stopień istotności wykazanych różnic między sobą.

	Kod	N	Suma
B35	102	33	3883,000
B58	103	33	4022,000
B72	104	33	4906,000
B76	105	33	561,000
B78	106	33	2653,000
Ludwik	111	33	3676,000

Tab. 242. ANOVA rang Kruskala-Wallisa; LC50 (ocena stopnia toksyczności badanych związków względem organizmów testowych).

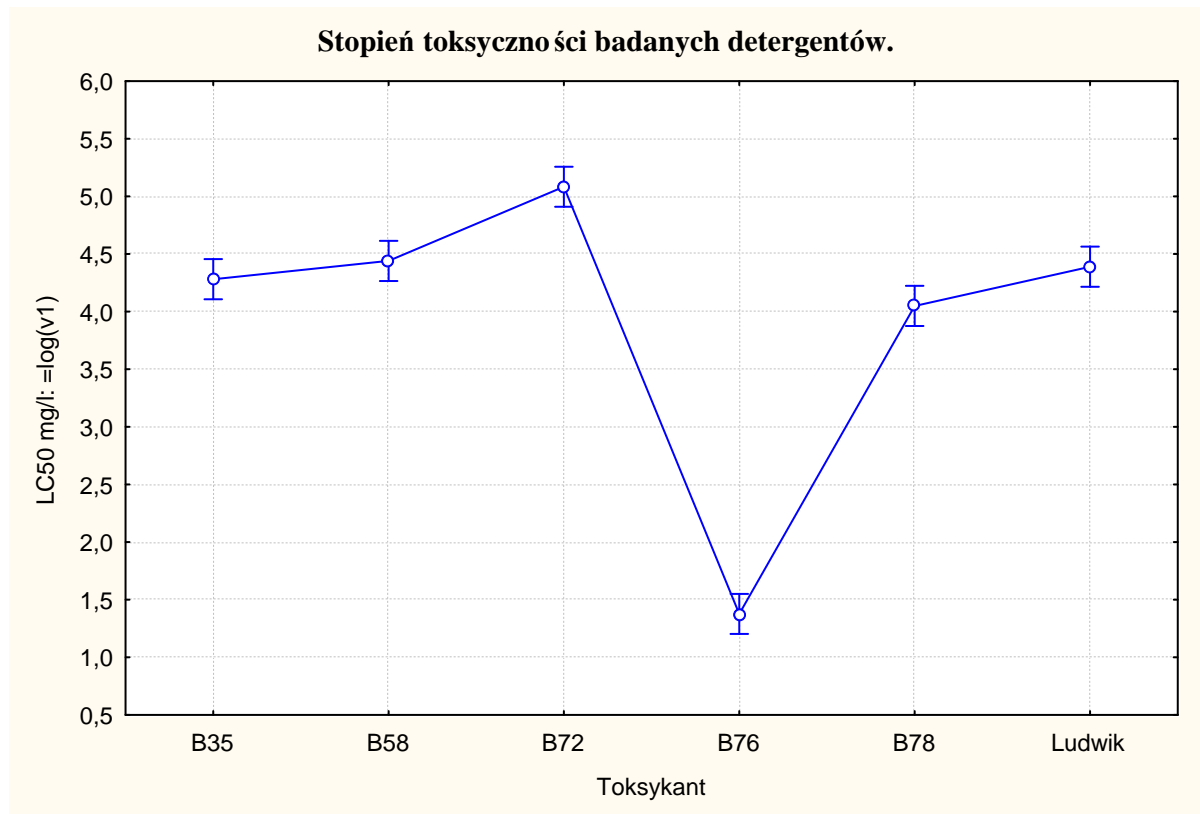
**Wynik testu:** [Tab. 242] **Zmienna niezależna (grupująca): Toksykant, Test Kruskala-Wallisa:  $H(5, N=198) = 106,1403$   $p = 0,000$ .**

Wynik  $p = 0,000$  informuje nas, o różnicach w stopniu toksyczności badanych związków (odrzucaamy hipotezę o braku różnic).

	B35	B58	B72	B76	B78	Ludwik
B35	---	4,21212121	31	100,666667	37,2727273	6,27272727
B58	4,21212121	---	26,7878788	104,878788	41,4848485	10,4848485
B72	31	26,7878788	---	131,666667	68,2727273	37,2727273
B76	100,666667	104,878788	131,666667	---	63,3939394	94,3939394
B78	37,2727273	41,4848485	68,2727273	63,3939394	---	31
Ludwik	6,27272727	10,4848485	37,2727273	94,3939394	31	---

Tab. 243. Wyniki Testu *post hoc* dla Kruskala – Wallisa;

Wyniki testu [Tab. 243] wykazują istotne różnice w stopniu toksyczności względem siebie dla większości detergentów, natomiast w dwóch przypadkach zakres toksyczności jest zbliżony w przypadku detergentów **Ludwik i Brij 35** oraz **Brij 58 i Brij 35**. Pomiedzy pozostałymi detergentami jest istotna różnica w porównywanym stopniu toksyczności względem badanych organizmów. Już pomiedzy detergentem Ludwik a Brij 58 różnica jest istotnie znacząca. Graficzna zobrazowanie stopnia toksyczności dla poszczególnych detergentów [Ryc. 123].



Ryc. 123. Stopień toksyczności poszczególnych detergentów.

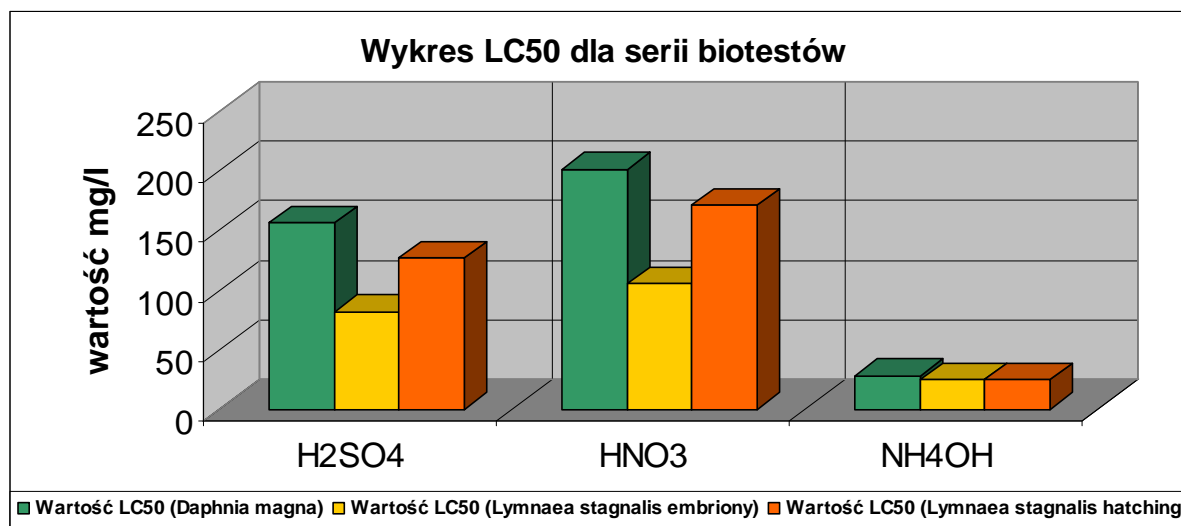


Najwyższy stopień toksyczny wykazuje detergent Brij 76 najmniejszą Brij 72. W przypadku Brij 72 dużą rolę odgrywa ograniczony stopień rozpuszczalności pozostałe detergenty pomimo istotnych różnic wykazują również efekt toksyczny w zakresie stężeń o zbliżonych wartościach. Wysoki stopień toksyczności Brij 76 znacznie odbiega od stopnia toksyczności pozostałych detergentów. Tak wysoki efekt toksyczny możemy wytłumaczyć właściwościami chemicznymi wynikającymi z budowy charakteru chemicznego cząsteczek Brij 76.

## 2. Kwasy i amoniak:

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Daphnia magna</i> )	Wartość LC50 ( <i>Lymnaea stagnalis embriony</i> )	Wartość LC50 ( <i>Lymnaea stagnalis hatching</i> )
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	156,09	81,17	126,49
HNO <sub>3</sub>	200,82	105,19	170,47
NH <sub>4</sub> OH	27,62	24,27	24,72

Tab. 244. Wartości LC50/24h zw. chemicznych dla badanych organizmów i ich stadiów rozwojowych



Ryc. 124. Wykres LC50/24h dla kwasów i amoniaku;

W opracowaniu statystycznym pod uwagę wzięto ocenę stopnia różnic reakcji organizmów testowych między sobą oraz różnic stopnia toksyczności badanych substancji między sobą i względem osobników testowych.

W badaniu zastosowano analizę wariancji (ANOVA – jednoczynnikową) jednorodność wariancji udało się uzyskać jedynie w przypadku badania różnic między

organizmami testowymi. W pozostałych przypadkach nawet transformacja Log na grupie wartości wyników LC50 nie przyniosła pożądanego efektu więc w ocenie zastosowano metody statystyk nieparametrycznych w analizie wariancji.

Wyniki badań.

- Test Levene'a jednorodności wariancji (Porównanie kwasów i amoniaku). Stopnie swobody dla każdego F : 2, 66

	SS	Stopnie	MS	F	p
<b>Wyraz wolny</b>	1198,740	1	1198,740	1688,303	0,000000
<b>organizmy</b>	2,234	2	1,117	1,573	0,215130
<b>Błąd</b>	46,862	66	0,710		

Tab. 245. wyniki Testu Levene'a jednorodności wariancji dla badanych organizmów.

Wartość prawdopodobieństwa **p = 0,215130** [Tab. 245] pozwala na przyjęcie hipotezy o jednorodności wariancji w tym przypadku.

- Jednoczynnikowa analiza wariancji (testy istotności dla Log) (Porównanie kwasu i amoniak) – wynik testu nie pozwala na odrzucenie hipotezy o braku różnic między organizmami w oddziaływaniu na substancje testowe. Wszystkie z testowanych organizmów wykazują podobny stopień wrażliwości na badane substancje - możemy zatem stosować je wymiennie w testach toksyczności dla tych substancji.

	SS	Stopnie	MS	F	P
<b>Wyraz wolny</b>	1198,740	1	1198,740	1688,303	0,000000
<b>organizmy</b>	2,234	2	1,117	1,573	0,215130
<b>Błąd</b>	46,862	66	0,710		

Tab. 246. Wyniki testu (ANOVA – jednoczynnikowej).

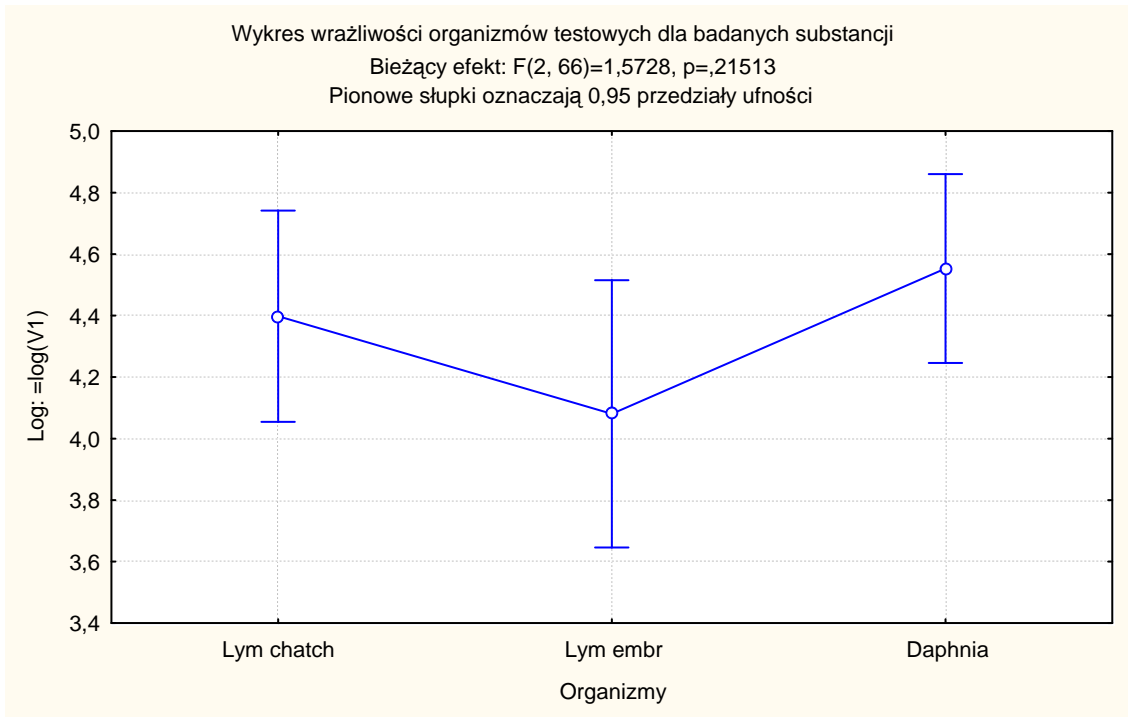
- Testem *post hoc* - HSD Tukeya; oceniono stopień istotności różnic między organizmami testowymi [Tab. 246].

Prawdopodobieństwa dla testów *post hoc*. Błąd: MS międzygrupowe = 0,71003, df = 66,000

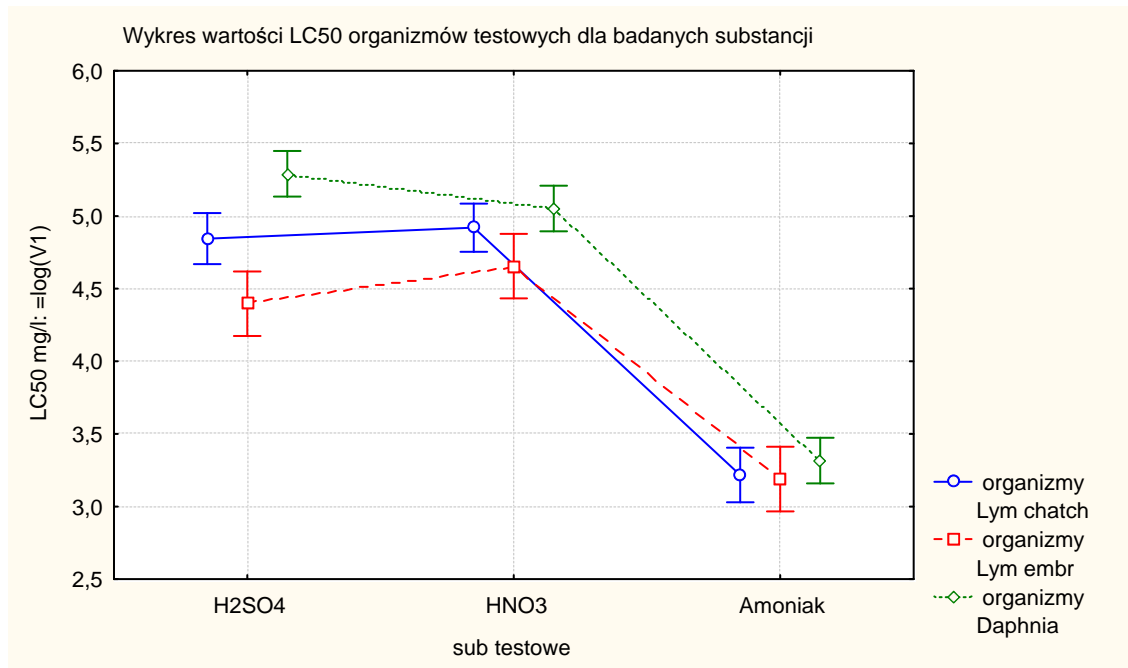
	organizmy	Lym chatch	Lym embr	Daphnia
<b>1</b>	<b>Lym hatch</b>		0,490428	0,780470
<b>2</b>	<b>Lym embr</b>	0,490428		0,186473
<b>3</b>	<b>Daphnia</b>	0,780470	0,186473	

Tab. 247. Wyniki testu HSD Tukeya dla istotności różnic między badanymi organizmami.

Wynik testu [Tab. 247] wskazują na brak istotnych różnic między oddziaływaniem organizmów testowych względem badanych substancji, największym podobieństwem w oddziaływaniu wykazuje *Daphnia magna* oraz *Lymnaea stagnalis* w stadium embrionalnym następnie w obydwu stadiach *Lymnaea stagnalis* najmniejsze podobieństwo wykazują *Daphnia magna* oraz *Lymnaea stagnalis* w okresie młodocianym po wylęgu [Tab.247].



Ryc. 125. Wykres wrażliwości organizmów testowych dla badanych substancji.



Ryc. 126. Skumulowany wykres (log) wartości LC50 dla badanych organizmów w relacji do zastosowanych kwasów i amoniaku.

Statystyczna ocena stopnia toksyczności badanych związków między sobą. Problem braku jednorodności wariancji wymagał zastosowania testów nieparametrycznych w analizie zastosowano test nieparametryczny ANOVA rang Kruskala – Wallisa;

- **Zmienna niezależna (grupująca): Badane substancje (Kwasy i amoniak). Test Kruskala-Wallisa:  $H ( 2, N= 69) = 45,35271$   $p = 0,0000$ . Wartość „p” - prawdopodobieństwa wskazuje na różnice między efektem toksycznym dla badanych substancji.**

	Kod	N	Suma
<b>H2SO4</b>	112	23	1075,000
<b>HNO3</b>	113	23	1064,000
<b>Amoniak</b>	114	23	276,000

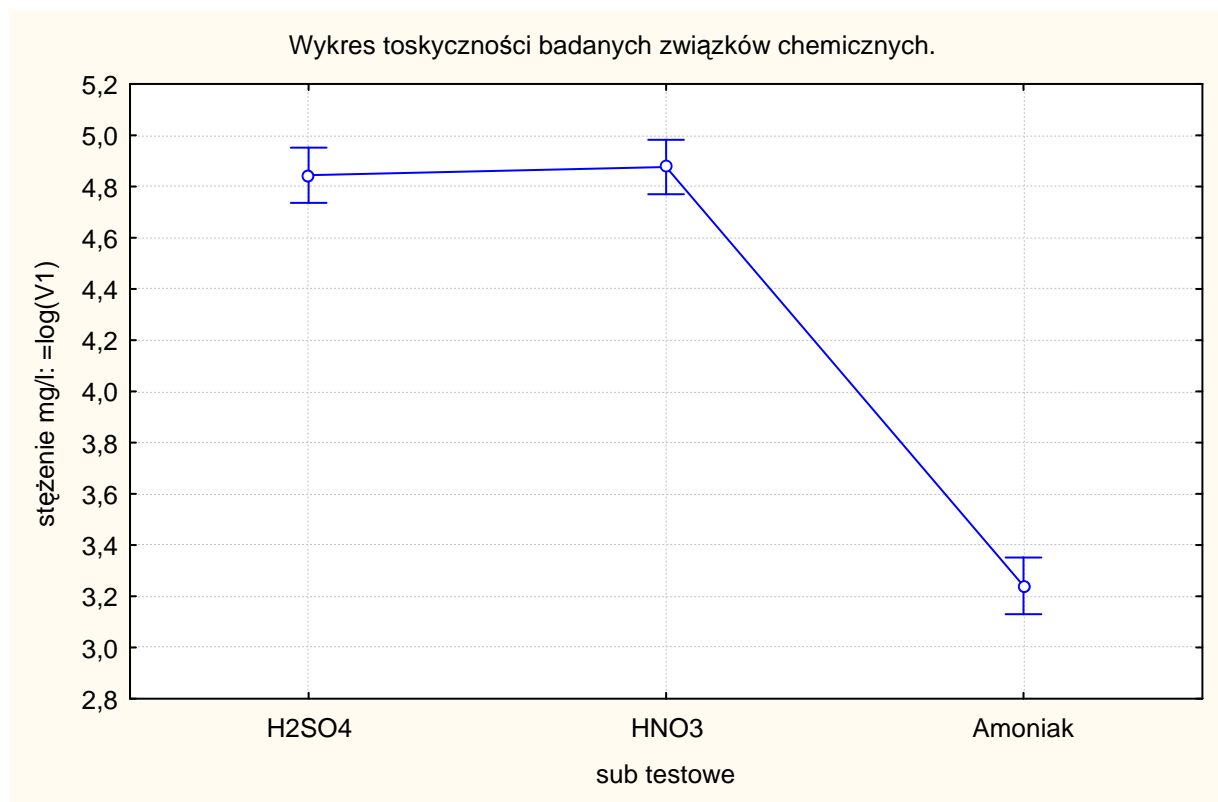
Tab. 248. ANOVA rang Kruskala-Wallisa;

Testem *post hoc* dla Kruskala – Walisa możemy porównać stopień różnic między efektami toksycznymi dla poszczególnych substancji toksycznych.

	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	HNO <sub>3</sub>	Amoniak
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	---	2,2807971	34,3300395
<b>HNO<sub>3</sub></b>	2,2807971	---	32,0492424
<b>Amoniak</b>	34,3300395	32,0492424	---

Tab. 249. Wyniki testu *post hoc* dla Kruskala – Walissa

Wyniki testu [Tab. 249] wskazują na wielkość różnic między wykazywanym efektem toksycznym przez poszczególne związki chemiczne. W przypadku kwasów siarkowego i azotowego efekty toksyczne są na podobnym poziomie i brak jest istotnych różnic. Dla amoniaku te różnice w porównaniu do oddziaływania kwasów są znaczne. Analizując wykres [Ryc. 127] amoniak wykazuje najbardziej toksyczny efekt w porównaniu do pozostałych.

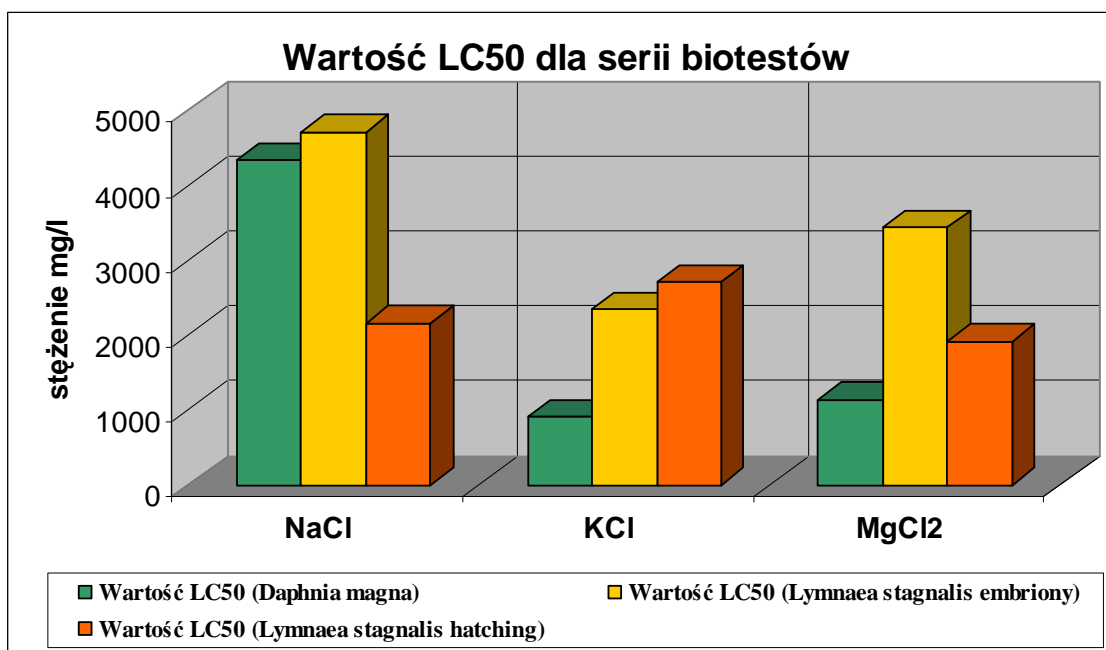


Ryc. 127. Stopień toksyczności poszczególnych związków chemicznych.

3. Chlorki:

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Daphnia magna</i> )	Wartość LC50 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> embriony)	Wartość LC50 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> hatching)
NaCl	4325,9	4710,641	2158,26
KCl	904	2346,6	2713,84
MgCl <sub>2</sub>	1141	3442,1	1919,16

Tab. 250. Wartości LC50/24h chlorków dla badanych organizmów i ich stadiów rozwojowych



Ryc. 128. Wykres LC50/24h dla kwasów i amoniaku;

Ocena statystyczna podobnie jak w przypadku oceny statystycznej efektów toksycznych dla detergentów oraz kwasów i amoniaku zakłada zastosowanie analizy wariancji.

Analiza wariancji dla efektów oddziaływań soli na badane organizmy – napotyka na problem związany z brakiem jednorodności wariancji w badanych populacjach testowych. Dotyczy to zarówno porównania organizmów jak również badanych substancji [Tab. 251].

		MS	MS	F	p
LC50	Sole	780308,1	169024,4	4,616541	0,013288
LC50	Organizmy	9202178	200204,7	45,96385	0,000000

Tab. 251. Wyniki Test Levene'a jednorodności wariancji (między organizmami i solami).

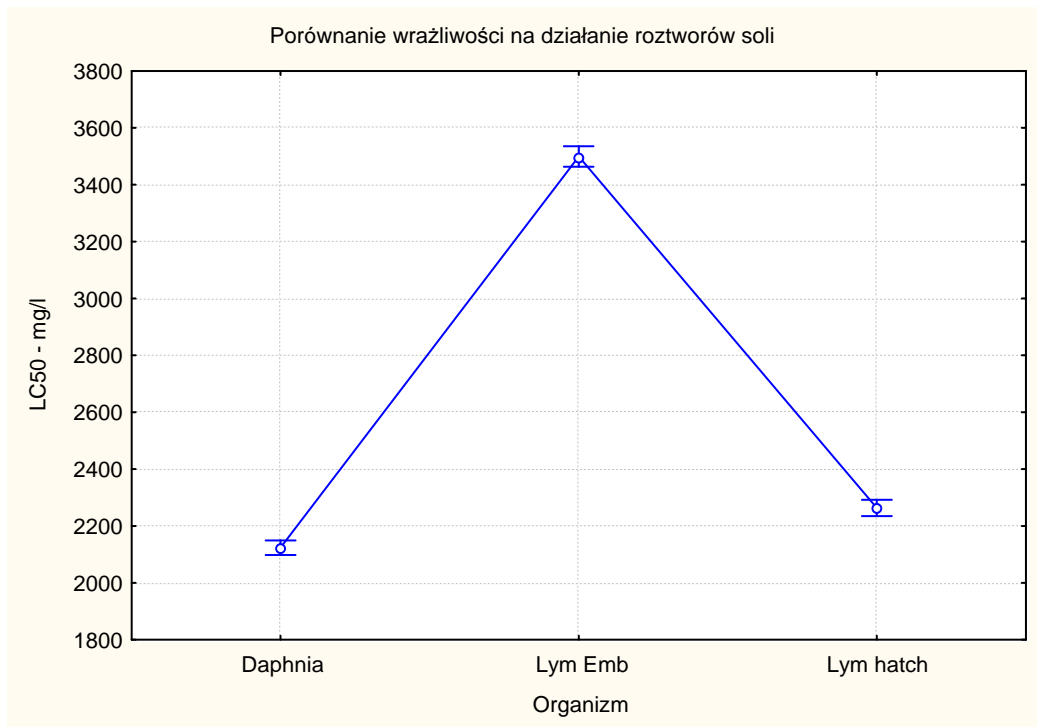
Wyniki w obu przypadkach [Tab. 251] wykazują brak jednorodności wariancji dlatego też do oceny różnic między parami należy zastosować testy nieparametryczne (ANOVA) Test Kruskala – Walissa. Zmienna niezależna (grupująca): Badane organizmy testowe i ich stadia rozwojowe. Wynik testu:  $H(2, N=69) = 16,64511$   **$p = 0,0002$**  – wskazuje na istotne różnice między stopniem wrażliwości dla poszczególnych organizmów na badane substancje.

**Badanie stopnia wrażliwości organizmów testowych na działanie badanych soli.**

	Daphnia	Lym emb	Lym hatch
Daphnia	---	25,83333333	7,333333333
Lym emb	25,83333333	---	18,5
Lym hatch	7,333333333	18,5	---

Tab. 252. Wyniki testu nieparametrycznego *post hoc* dla Testu Kruskala – Walissa (wrażliwość organizmów).

Wyniki testu wykazują [Tab. 252], że należy odrzucić hipotezę o braku różnic. Różnice między wrażliwością organizmów są istotne w stosunku do siebie. Analizując wykres [Ryc. 129] najmniejszą wrażliwość wykazują formy embrionalne *Lymnaea stagnalis*, najwrażliwsze na działanie roztworów soli są skorupiaki *Daphnia magna* w przypadku *Lymnaea stagnalis* (w stadium młodocianym po wylęgu) – wrażliwość plasuje to stadium pomiędzy stadium embrjonalnym a rozwielitką.



Ryc. 129. wykres wrażliwości organizmów testowych dla badanych soli.

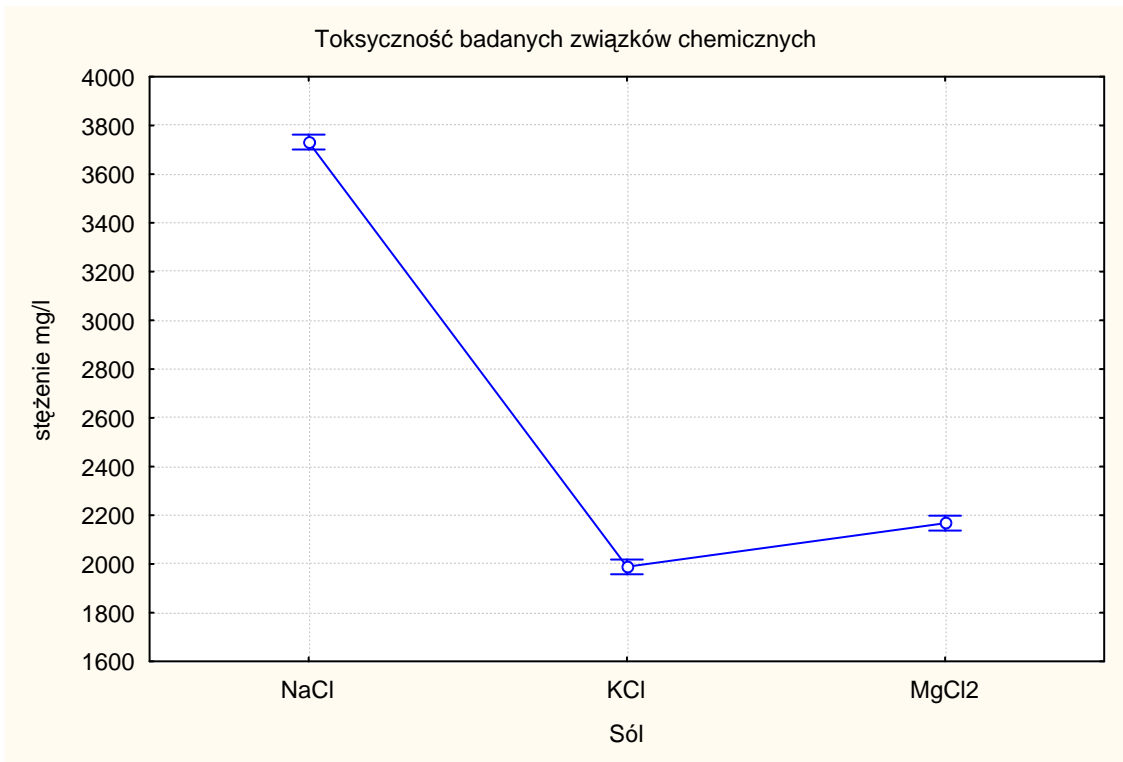
**Porównanie stopnia toksyczności badanych soli;**

Wynik testu Kruskala – Walissa (Zmienna niezależna - grupująca: badane sole):  $H(2, N=69) = 24,02012$   $p = 0,0000$  – stwierdza się różnice między efektem toksycznym dla badanych soli.

	NaCl	KCl	MgCl <sub>2</sub>
NaCl	---	25	25,2173913
KCl	25	---	0,217391304
MgCl <sub>2</sub>	25,2173913	0,217391304	---

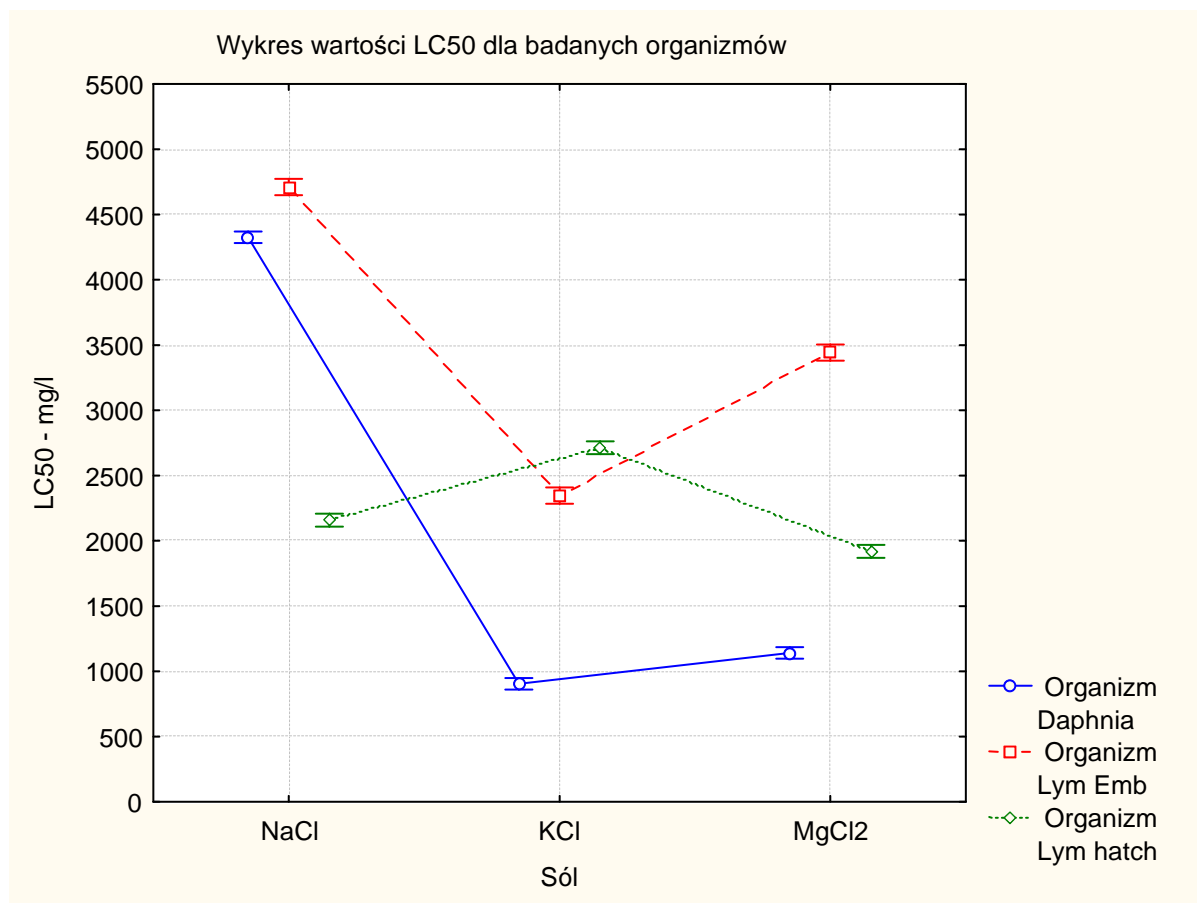
Tab. 253. Wyniki testu *post hoc* dla Kruskala – Walissa (toksyczność soli).

Wyniki testu *post hoc* [Tab. 253] wskazują na porównywalny efekt toksyczny w przypadku KCl i MgCl<sub>2</sub> natomiast efekt działania NaCl jest o wiele niższy stąd tak znaczne różnice między NaCl a pozostałymi solami. Należy zaznaczyć iż badane sole nie należą do związków toksycznych zatem przy porównywaniu efektu toksyczności mamy na myśli efekt oddziaływania przy określonej koncentracji w przypadku tych substancji (wartością tą jest LC50).



Ryc. 130. Stopień toksyczności poszczególnych soli.





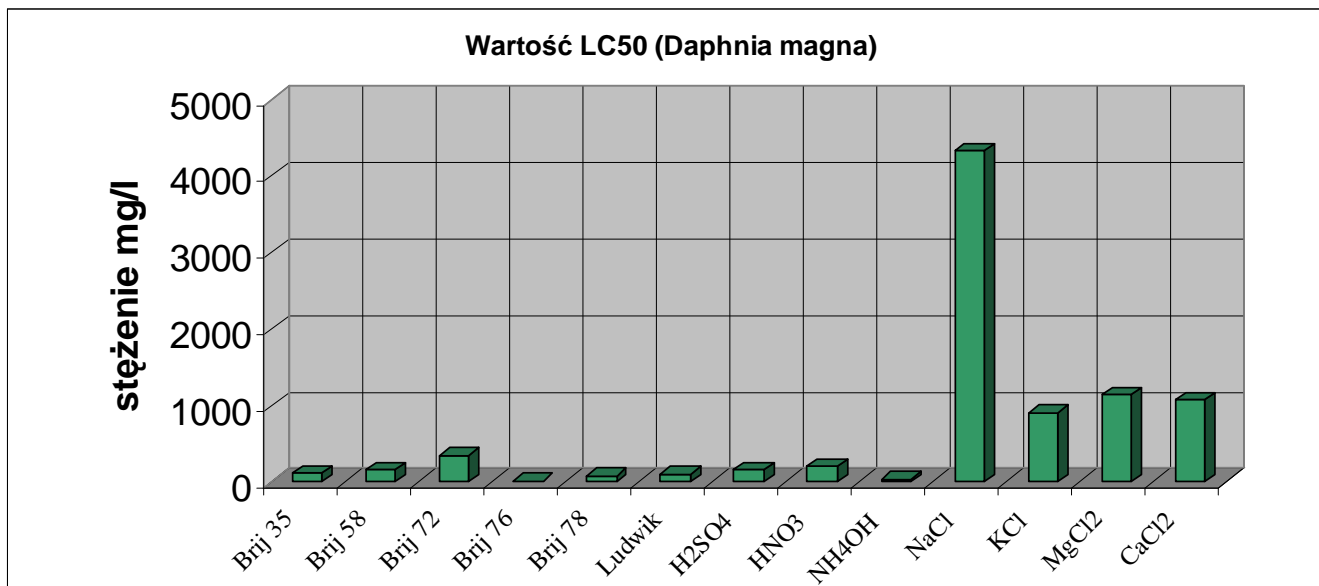
Ryc. 131. Skumulowany wykres (log) wartości LC50 dla badanych organizmów w relacji do testowanych soli.

VI. Skumulowane wykresy toksyczności dla badanych związków osobno dla każdego organizmu.

1. *Daphnia magna* Strauss

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Daphnia magna</i> ) mg/l
Brij 35	115,65
Brij 58	155,59
Brij 72	344,72
Brij 76	5,72
Brij 78	80,31
Ludwik	94,39
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	156,09
HNO <sub>3</sub>	200,82
NH <sub>4</sub> OH	27,62
NaCl	4325,9
KCl	904
MgCl <sub>2</sub>	1141
CaCl <sub>2</sub>	1068

Tab. 254. Wartości LC50/24h *Daphnia magna* dla badanych związków.



Ryc. 132. wykres wartości LC50/24h *Daphnia magna* dla badanych substancji – test toksyczności ostrej.

Oceny różnic między efektem działania dla poszczególnych związków na badane organizmy dokonano w oparciu o jednoczynnikową analizę wariancji – (test Levene’a)

wykazał brak jednorodności wariancji dlatego do oceny porównawczej zastosowano statystyki nieparametryczne test *post hoc* Kruskala – Wallisa.

	MS	MS	F	p
Zmn1	3768,155	906,1920	4,158230	0,000041

Tab. 255. Wyniki testu Levene'a jednorodności wariancji dla *Daphnia*.

Wyniki testu Levene'a [Tab. 255] odrzucają hipotezę o jednorodności wariancji – wymagane jest zastosowanie w dalszej analizie testów nieparametrycznych.

Wyniki testu Kruskala – Wallisa: (zmienna niezależna - grupująca: Badane substancje):  $H(2, N=69) = 24,02012$   $p = 0,0000$ : wynik wskazuje na różnice w działaniu toksycznym dla badanych związków względem organizmu testowego *Daphnia magna*.

	B35	B58	B72	B76	B78	Ludwik	H2SO4	HNO3	Amoniak	NaCl	KCl	MgCl2
B35	---	12,7	40	40	20	10	30	17,3	30	70	50,1	59,9
B58	12,7	---	27,3	52,7	32,7	22,7	17,3	4,6	42,7	57,3	37,4	47,2
B72	40	27,3	---	80	60	50	10	22,7	70	30	10,1	19,9
B76	40	52,7	80	---	20	30	70	57,3	10	110	90,1	99,9
B78	20	32,7	60	20	---	10	50	37,3	10	90	70,1	79,9
Ludwik	10	22,7	50	30	10	---	40	27,3	20	80	60,1	69,9
H2SO4	30	17,3	10	70	50	40	---	12,7	60	40	20,1	29,9
HNO3	17,3	4,6	22,7	57,3	37,3	27,3	12,7	---	47,3	52,7	32,8	42,6
Amoniak	30	42,7	70	10	10	20	60	47,3	---	100	80,1	89,9
NaCl	70	57,3	30	110	90	80	40	52,7	100	---	19,9	10,1
KCl	50,1	37,4	10,1	90,1	70,1	60,1	20,1	32,8	80,1	19,9	---	9,8
MgCl2	59,9	47,2	19,9	99,9	79,9	69,9	29,9	42,6	89,9	10,1	9,8	---

Tab. 256. Wyniki testu *post hoc* Kruskala – Wallisa.

Wyniki testu [Tab. 256] wskazują na istotne różnice między efektami toksycznymi poszczególnych związków dla skorupiaków *Daphnia magna*.

Ocena stopnia toksyczności badanych substancji dla *Daphnia magna* (testy toksyczności ostrej):

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Daphnia magna</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
Brij 35	115,65 mg/l	Słaba Toksyczny	-	Słabo Toksyczny
Brij 58	155,59 mg/l	Słaba Toksyczny	-	Słabo Toksyczny
Brij 72	344,72 mg/l	Słaba Toksyczny	-	Słabo Toksyczny
Brij 76	5,72 mg/l	Silnie Toksyczny	Toksyczny	Umiarkowanie Toksyczny
Brij 78	80,31 mg/l	Średnio Toksyczny	Szkodliwy	Umiarkowanie Toksyczny
Ludwik	94,39 mg/l	Średnio Toksyczny	Szkodliwy	Umiarkowanie Toksyczny

Tab. 257. Ocena stopnia toksyczności detergentów dla *Daphnia magna* Strauss test LC50/24h.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Daphnia magna</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	156,09 mg/l	Słaba Toksyczny	-	Słabo Toksyczny
HNO <sub>3</sub>	200,82 mg/l	Słaba Toksyczny	-	Słabo Toksyczny
NH <sub>4</sub> OH	27,62 mg/l	Średnio Toksyczny	Szkodliwy	Umiarkowanie Toksyczny

Tab. 258. Ocena stopnia toksyczności badanych związków dla *Daphnia magna* Strauss test LC50/24h.

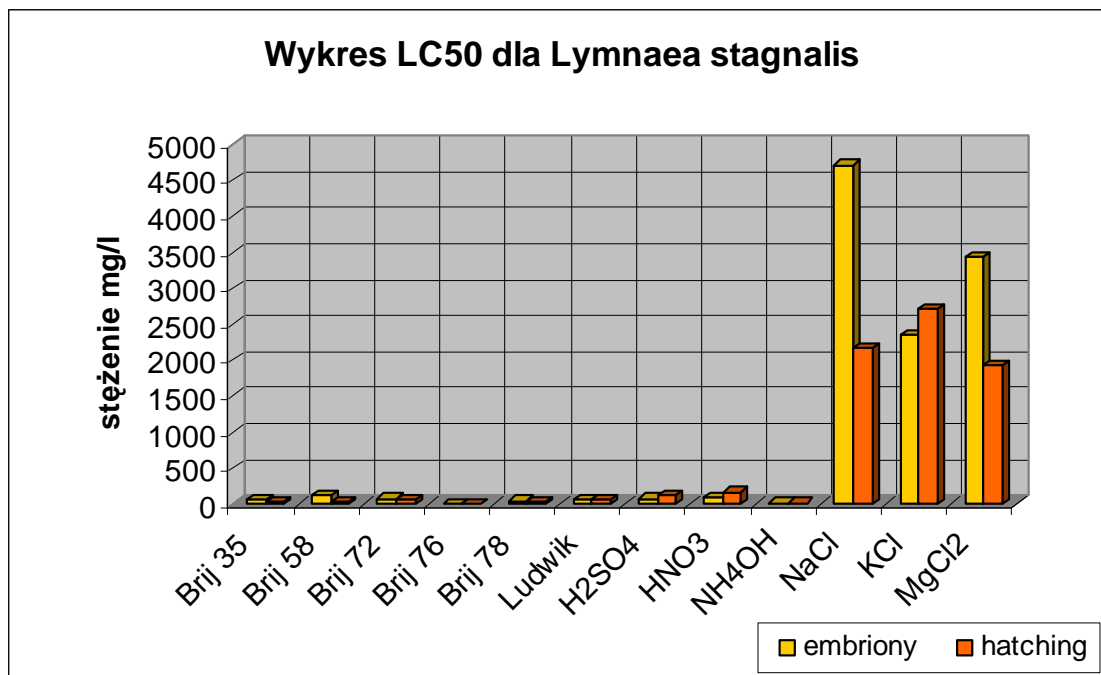
Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Daphnia magna</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
NaCl	4325,9 mg/l	Zaledwie Toksyczny	-	Słabo Toksyczny
KCl	904 mg/l	Słabo Toksyczny	-	Słabo Toksyczny
CaCl <sub>2</sub>	1141 mg/l	Zaledwie Toksyczny	-	Słabo Toksyczny
MgCl <sub>2</sub>	1068 mg/l	Zaledwie Toksyczny	-	Słabo Toksyczny

Tab. 259. Ocena stopnia toksyczności chlorków dla *Daphnia magna* Strauss test LC50/24h.

2. *Lymnaea stagnalis* (badane stadia).

Rodzaj	Wartości LC50/48h i 24h	
	embriony	hatching
Brij 35	77,83	25,07
Brij 58	122,01	36,63
Brij 72	83,18	62,73
Brij 76	6,14	2,25
Brij 78	52,63	30,2
Ludwik	69,2	66,3
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	81,17	126,49
HNO <sub>3</sub>	105,19	170,47
NH <sub>4</sub> OH	24,27	24,72
NaCl	4710,64	2158,26
KCl	2346,6	2713,84
MgCl <sub>2</sub>	3442,1	1919,16

Tab. 260. Wartości LC50/24h *Lymnaea stagnalis* dla badanych związków.



Ryc. 133. wykres wartości LC50/48h i 24h *Lymnaea stagnalis* dla badanych substancji – test toksyczności ostrej.

**Ocena porównawcza dotyczy dwóch etapów.**

- *Porównanie wpływu substancji chemicznej dla poszczególnych stadiów.*
- *Porównawcza ocena stopnia wrażliwości pomiędzy tymi dwoma stadiami rozwojowymi dla ślimaka.*

**Porównanie wpływu substancji chemicznej dla stadium embrionalnego.**

Zastosowana metoda – jednoczynnikowa analiza wariancji:

- Test Levene’a wykazał brak jednorodności wariancji w populacjach testowych.

	MS	MS	F	p
Log	0,000201	0,000097	2,075104	0,041002

Tab. 261. Wyniki dla testu Levene’a dla embrionów.

Ze względu na brak jednorodności [Tab. 260] wariancji należy zastosować test nieparametryczny Kruskala – Wallisa.

Wyniki testu: (Zmienna niezależna – grupująca: Badane substancje):  $H(11, N=60) = 58,60656$   **$p = 0,0000$** : odrzucamy hipotezę o braku różnic w działaniu toksycznym wśród badanych substancji.

	B35	B58	B72	B76	B78	Ludwik	H2SO4	HNO3	Amoniak	NaCl	KCl	MgCl2
B35	---	20	10	20	10	5	5	15	15	35	25	30
B58	20	---	10	40	30	25	15	5	35	15	5	10
B72	10	10	---	30	20	15	5	5	25	25	15	20
B76	20	40	30	---	10	15	25	35	5	55	45	50
B78	10	30	20	10	---	5	15	25	5	45	35	40
Ludwik	5	25	15	15	5	---	10	20	10	40	30	35
H2SO4	5	15	5	25	15	10	---	10	20	30	20	25
HNO3	15	5	5	35	25	20	10	---	30	20	10	15
Amoniak	15	35	25	5	5	10	20	30	---	50	40	45
NaCl	35	15	25	55	45	40	30	20	50	---	10	5
KCl	25	5	15	45	35	30	20	10	40	10	---	5
MgCl2	30	10	20	50	40	35	25	15	45	5	5	---

Tab. 262. Wyniki testu *post hoc* Kruskala – Wallisa.

Wyniki testu *post hoc* [Tab. 262] wskazują na istotne różnice między efektem toksycznym poszczególnych związków chemicznych na formy embrionalne *Lymnaea stagnalis*. Wykres [Ryc. 134] przedstawia stopień toksyczności dla poszczególnych substancji.

**Porównanie wpływu substancji chemicznej dla stadium młodocianego po wylęgu.**

Sposób postępowania w ocenie statystycznej podobny był jak dla stadium embrionalnego.

Test Levene'a – wynik testu [Tab. 263] każe odrzucić hipotezę o jednorodności wariancji. I w dalszej analizie wymagane jest zastosowanie testów nieparametrycznych.

	MS	MS	F	p
<b>LC50</b>	5222,531	413,5355	12,62898	<b>0,000000</b>
<b>Log</b>	0,101614	0,025788	3,940406	<b>0,000197</b>

Tab. 263. Wyniki dla testu Levene'a dla hatching.

Wyniki testu Kruskala – Wallisa: (Zmienna niezależna - grupująca: Badane substancje): H (11, N= 96) =93,98356 **p =0,0000**: odrzucamy hipotezę o braku różnic między efektem działania toksycznego badanych substancji.

Zastosowano test *post hoc* (nieparametryczny) Kruskala – Wallisa .

	B35	B58	B72	B76	B78	Ludwik	H2SO4	HNO3	Amoniak	NaCl	KCl	MgCl2
<b>B35</b>	---	18,125	26,375	13,875	9,875	33,875	42,125	50,125	3,5	66,125	74,125	58,125
<b>B58</b>	18,125	---	8,25	32	8,25	15,75	24	32	21,625	48	56	40
<b>B72</b>	26,375	8,25	---	40,25	16,5	7,5	15,75	23,75	29,875	39,75	47,75	31,75
<b>B76</b>	13,875	32	40,25	---	23,75	47,75	56	64	10,375	80	88	72
<b>B78</b>	9,875	8,25	16,5	23,75	---	24	32,25	40,25	13,375	56,25	64,25	48,25
<b>Ludwik</b>	33,875	15,75	7,5	47,75	24	---	8,25	16,25	37,375	32,25	40,25	24,25
<b>H2SO4</b>	42,125	24	15,75	56	32,25	8,25	---	8	45,625	24	32	16
<b>HNO3</b>	50,125	32	23,75	64	40,25	16,25	8	---	53,625	16	24	8
<b>Amoniak</b>	<b>3,5</b>	21,625	29,875	10,375	13,375	37,375	45,625	53,625	---	69,625	77,625	61,625
<b>NaCl</b>	66,125	48	39,75	80	56,25	32,25	24	16	69,625	---	8	8
<b>KCl</b>	74,125	56	47,75	88	64,25	40,25	32	24	77,625	8	---	16
<b>MgCl2</b>	58,125	40	31,75	72	48,25	24,25	16	8	61,625	8	16	---

Tab. 264. Wyniki testu *post hoc* Kruskala – Wallisa.

Wyniki testu [Tab. 264] wskazują generalnie na istotne różnice między średnimi wartościami LC50 pomiędzy poszczególnymi substancjami. Jedynie wyniki dla Amoniak oraz Brij 35 wykazują przy porównywalnej koncentracji podobny efekt śmiertelny. Jest to efekt jednak całkowicie przypadkowy ze względu na odmienny charakter chemiczny oraz budowę chemiczną obu związków

### 3. Porównawcza ocena stopnia wrażliwości pomiędzy tymi dwoma stadiami rozwojowymi dla *Lymnaea stagnalis*.

Ocenię poddano stopień wrażliwości obydwu stadiów dla badanych substancji. Wykonano analizę wariancji w ocenie porównawczej średnich wartości LC50 dla poszczególnych związków chemicznych w odniesieniu dla stadiów rozwojowych ślimaka. Transformacja logarytmem naturalnym pozwoliła na ustabilizowanie jednorodności wariancji populacji testowej i można było zastosować analizę ANOVA dla testów parametrycznych.

	MS	MS	F	p
Log	0,371681	1,468950	0,253025	0,615672

Tab. 265. Wyniki testu Levene'a dla obydwóch stadiów rozwojowych.

Wynik testu Levene'a [Tab. 265] pozwala na zastosowanie technik parametrycznych w jednoczynnikowej analizie wariancji.

	SS	Stopnie	MS	F	p
Wyraz wolny	3444,821	1	3444,821	838,2420	0,000000
Stadia rozw.	5,161	1	5,161	1,2558	0,264186
Błąd	632,875	154	4,110		

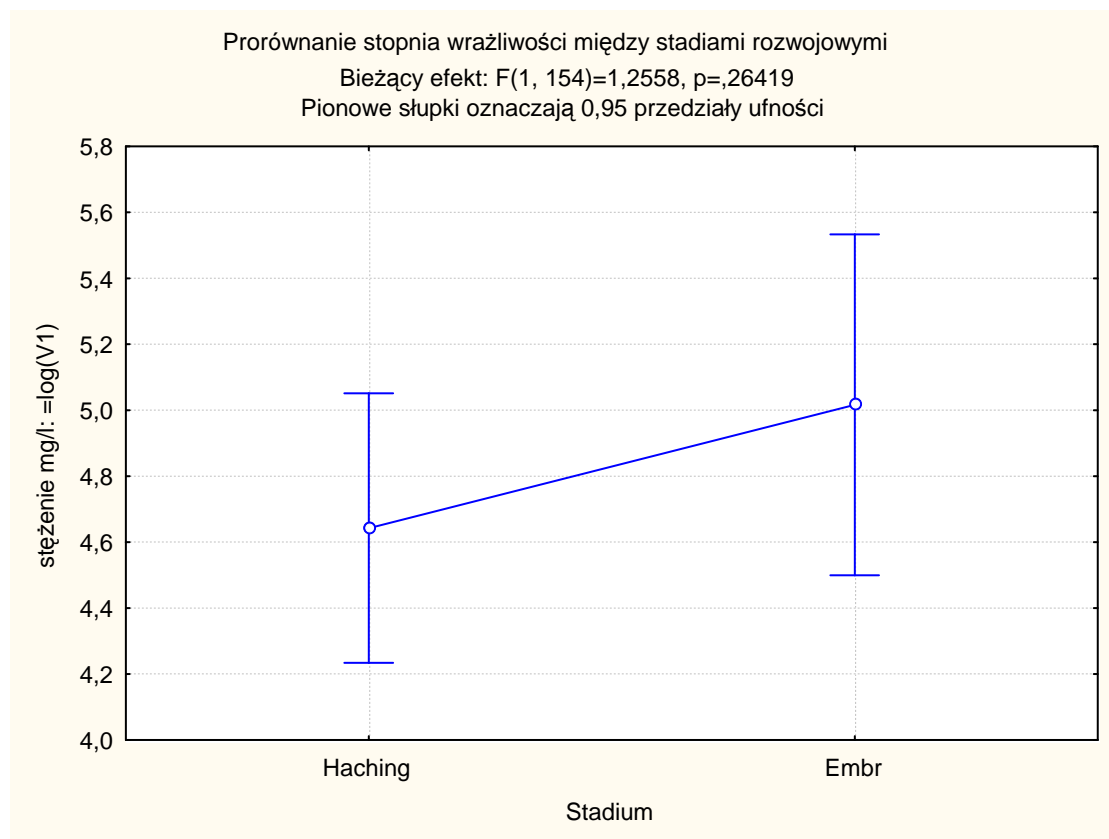
Tab. 266. Wyniki dla jednowymiarowego testu istotności (po transformacji log). Porównanie stadium embrionalnego i hatching.

Badanie różnic między wrażliwością poszczególnych stadiów rozwojowych u *Lymnaea stagnalis* z wykorzystaniem jednoczynnikowej analizy wariancji nie wykazało istotnych różnic [Tab. 266] między średnimi stopniem wrażliwości poszczególnych stadiów rozwojowych w stosunku do badanych substancji. Możemy zatem stosować zamiennie obydwie stadia w badaniu toksyczności ostrej dla tych substancji. Dla części związków chemicznych stadium embrionalne wykazało się większą wrażliwością natomiast w przypadku pozostałych substancji bardziej wrażliwe na działanie toksyczne było stadium młodociane *Lymnaea stagnalis* (po wylęgu). Generalnie ogólny stopień wrażliwości jest bardzo zbliżony w dla obydwu faz [Tab. 267].



	Stadium	Hatching	Embriony
1	Hatching		0,262445
2	Embriony	0,262445	

Tab. 267. Wyniki testu Tukeya w badaniu stopnia wrażliwości obydwu stadiów rozwojowych.



Ryc. 134. Porównanie stopnia wrażliwości poszczególnych stadiów rozwojowych.

*Lymnaea stagnalis* embriony:

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
Brij 35	77,64 mg/l	Średnio toksyczny	Szkodliwy	Umiarkowanie toksyczny
Brij 58	117,95 mg/l	Słabo toksyczny	Szkodliwy	Słabo toksyczny
Brij 72	83,45 mg/l	Średnio toksyczny	Szkodliwy	Umiarkowanie toksyczny
Brij 76	5,59 mg/l	Silnie toksyczny	Toksyczny	Umiarkowanie toksyczny
Brij 78	52,63 mg/l	Średnio toksyczny	Szkodliwy	Umiarkowanie toksyczny
Ludwik	69,2 mg/l	średnio toksyczny	szkodliwy	Umiarkowanie toksyczny

Tab. 268. Ocena stopnia toksyczności detergentów dla *Lymnaea stagnalis* (embriony) test LC50/48h.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	77,64 mg/l	Średnio toksyczny	szkodliwy	Umiarkowanie toksyczny
HNO <sub>3</sub>	105,19 mg/l	Słabo toksyczny	szkodliwy	Słabo toksyczny
NH <sub>3</sub> OH	24,27 mg/l	Średnio toksyczny	szkodliwy	Średnio toksyczny

Tab. 269. Ocena stopnia toksyczności kwasów i amoniaku dla *Lymnaea stagnalis* (embriony) test LC50/48h.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
NaCl	4710,64 mg/l	Zaledwie toksyczny	-	Słabo toksyczny
KCl	2346,6 mg/l	Zaledwie toksyczny	-	Słabo toksyczny
MgCl <sub>2</sub>	3442,1 mg/l	Zaledwie toksyczny	-	Słabo toksyczny

Tab. 270. Ocena stopnia toksyczności chlorków dla *Lymnaea stagnalis* (embriony) test LC50/48h.

*Lymnaea stagnalis* (po wylęgu).

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> <i>hatching</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
Brij 35	25,07mg/l	Średnio Toksyczny	Szkodliwy	Umiarkowanie Toksyczny
Brij 58	36,63mg/l	Średnio Toksyczny	Szkodliwy	Umiarkowanie Toksyczny
Brij 72	62,73 mg/l	Średnio Toksyczny	Szkodliwy	Umiarkowanie Toksyczny
Brij 76	2,25 mg/l	Silnie Toksyczny	Toksyczny	Umiarkowanie Toksyczny
Brij 78	30,2 mg/l	Średnio Toksyczny	Szkodliwy	Umiarkowanie Toksyczny
Ludwik	66,3 mg/l	Średnio Toksyczny	Szkodliwy	Umiarkowanie Toksyczny

Tab. 271. Ocena stopnia toksyczności detergentów dla *Lymnaea stagnalis* (po wylęgu) test LC50/24h.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	126,49 mg/l	Średnio Toksyczny	Szkodliwy	Umiarkowanie Toksyczny
HNO <sub>3</sub>	170,47mg/l	Słabo Toksyczny	Szkodliwy	Słabo Toksyczny
NH <sub>3</sub> OH	24,72mg/l	Średnio Toksyczny	Szkodliwy	Średnio Toksyczny

Tab. 272. Ocena stopnia toksyczności kwasów i amoniaku dla *Lymnaea stagnalis* (po wylęgu) test LC50/24h.

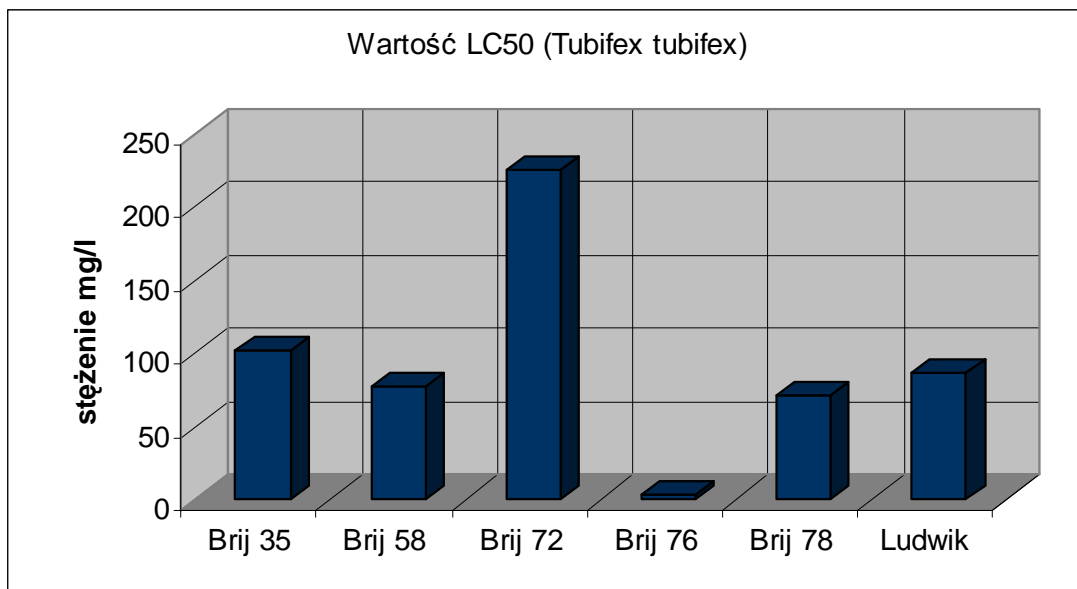
Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
NaCl	2158,26 mg/l	Zaledwie Toksyczny	-	Słabo Toksyczny
KCl	2713,84 mg/l	Zaledwie Toksyczny	-	Słabo Toksyczny
MgCl <sub>2</sub>	1919,16 mg/l	Zaledwie Toksyczny	-	Słabo Toksyczny

Tab. 273. Ocena stopnia toksyczności chlorków dla *Lymnaea stagnalis* (po wylęgu) test LC50/24h.

4. *Tubifex tubifex*.

Rodzaj	Wartość LC50/24h ( <i>Tubifex tubifex</i> )
Brij 35	101,77
Brij 58	77,5
Brij 72	225,12
Brij 76	3,45
Brij 78	71,56
Ludwik	87,06

Tab. 274. Wartości LC50/24h *Lymnaea stagnalis* dla badanych związków.



Ryc. 135. wykres wartości LC50/24h *Tubifex tubifex* dla badanych substancji – test toksyczności ostrej

➤ Ocena jednorodności wariancji Test Levene'a

	MS	MS	F	p
Log	0,000317	0,000203	1,565962	0,185365

Tab: 275. Wyniki testu Levene'a dla *Tubifex tubifex*.

Wynik testu [Tab. 275.] Levene'a pozwala na zastosowanie technik parametrycznych w jednoczynnikowej analizie wariancji.

	SS	Stopnie	MS	F	p
<b>Wyraz wolny</b>	989,5530	1	989,5530	1599446	0,00
<b>Toksykant</b>	103,9997	5	20,7999	33620	0,00
<b>Błąd</b>	0,0334	54	0,0006		

Tab. 276. Wyniki dla jednowymiarowego testu istotności dla Log (LC50 detergentów dla *Tubifex tubifex*).

Wyniki testu [Tab. 276] wykazują różnice między średnimi wartościami LC50 poszczególnych detergentów w stosunku do badanych organizmów testowych.

	Toksykant	Brij 35	Brij 58	Brij 72	Brij 76	Brij 78	Ludwik
1	Brij 35		0,000138	0,000138	0,000138	0,000138	0,000138
2	Brij 58	0,000138		0,000138	0,000138	0,000138	0,000138
3	Brij 72	0,000138	0,000138		0,000138	0,000138	0,000138
4	Brij 76	0,000138	0,000138	0,000138		0,000138	0,000138
5	Brij 78	0,000138	0,000138	0,000138	0,000138		0,000138
6	Ludwik	0,000138	0,000138	0,000138	0,000138	0,000138	

Tab. 277. Wyniki testu Tukeya dla oceny różnic między średnimi wartościami LC50 dla poszczególnych substancji chemicznych.

Wyniki testu [Tab. 277] informują nas o istotnych różnicach między poszczególnymi wartościami LC50 dla badanych detergentów.

Rodzaj	Wartość LC50 ( <i>Tubifex tubifex</i> )	Klasa toksyczności według:		
		Dockal i Solda	Uni Europejskiej	US EPA
Brij 35	101,77 mg/l	Średnio toksyczny	Szkodliwy	Umiarkowanie toksyczny
Brij 58	77,5 mg/l	Średnio toksyczny	Szkodliwy	Umiarkowanie toksyczny
Brij 72	225,12 mg/l	Słabo toksyczny	-	Słabo toksyczny
Brij 76	3,45 mg/l	Silnie toksyczny	Toksyczny	Umiarkowanie toksyczny
Brij 78	71,56 mg/l	Średnio toksyczny	Szkodliwy	Umiarkowanie toksyczny
Ludwik	87,06 mg/l	Średnio toksyczny	Szkodliwy	Umiarkowanie toksyczny

Tab. 278. Ocena stopnia toksyczności detergentów dla *Tubifex tubifex* test LC50/24h.

## 9. Dyskusja wyników i wnioski z badań:

W badaniach zastosowano metody oparte na wyznaczaniu toksyczności ostrej – testy krótkoterminowe. W biotestach wykorzystano bioindykatory – *Daphnia magna* Strauss oraz *Lymnaea stagnalis* L. i *Tubifex tubifex* Müller.

W nawiązaniu do wprowadzonych przez Dobrowolskiego do literatury światowej szczególnie czułych kryteriów biologicznych oceny stanu środowiska wodnego, oraz w oparciu o badanie wpływu zanieczyszczeń na najbardziej wrażliwe wczesne stadia rozwoju różnych gatunków zwierząt [16] zwrócono w pracach doświadczalnych szczególną uwagę na testowanie oddziaływania badanych substancji z grupy detergentów niejonowy oraz anionowych, kwasów i zasad, oraz chlorków na stadia juwenilne *Lymnaea stagnalis*.

Dobrowolski badał wpływ czynnika fizycznego promieniowania X, na różne stadia rozwoju *Tubifex tubifex* [16]. Natomiast zastosowanie tego łatwo dostępnego w ciągu całego roku skąposzczetu do testowania wpływu wybranych zanieczyszczeń wód jest nowe w literaturze fachowej [50].

Testy toksyczności ostrej z użyciem *Daphnia magna* należą do standardowych procedur w ocenie toksyczności wód. Zastosowanie *Lymnaea stagnalis* oraz *Tubifex tubifex* w ocenie laboratoryjnej stanowiło próbę wypracowania nowych narzędzi w bioindykacji zanieczyszczeń wód i oceny toksyczności wybranych substancji.

Obydwa gatunki zostały zakwalifikowane na podstawie wyników testów pilotażowych do kolejnej serii prowadzonych na szerszą skalę testów właściwych.

Wyniki toksyczności ostrej wykonano w powtórzeniach od 5 – 10 w zależności do realnych możliwości pozyskania wymienionych materiałów biologicznych do badań.

### I. Testy toksyczności ostrej dla detergentów Brij oraz Ludwik.

#### ➤ Omówienie wyników toksyczności ostrej *Daphnia magna* Strauss.

Testom poddano wszystkie badane detergenty niejonowe z serii Brij oraz mieszaninę detergentów anionowych Ludwik, w 10 powtórzeniach dla każdego, procedury standardowe wymagają od 3 – 10 powtórzeń, zwykle zaleca się jako optymalnie (5 – 10) [43].

Na bazie wyników testów toksyczności ostrej – wyliczono współczynniki LC50/24 dla każdej grupy badanej oraz średni współczynnik LC50/24, który posłużył do określenia stopnia toksyczności testowanego związku chemicznego dla *Daphnia magna* [Tab. 257].

Wnioski i obserwacje:

- Największą wartość toksyczną wykazał Brij 76 (LC50 – 5,72 mg/l) jest on wyraźnie toksyczny dla eksponowanych skorupiaków i najszybciej można było zaobserwować pierwsze efekty toksyczne w populacjach testowych rozwielitek (po 30 min pierwsze osobniki wykazały efekt toksyczny – silnego zatrucia a w szczególności obniżenie aktywności ruchowej).
- Brij 72 okazał się najmniej toksyczny wśród badanych detergentów (LC50 – 344,72 mg/l).
- Brije 35, 58 i 78 oraz Ludwik wykazują podobny stopień toksyczności (LC50 od 80,31 do 155 mg/l).
- Należy podkreślić, iż w przypadku badania toksyczności ostrej dla *Daphnia magna* metodą standardową trudno jest stwierdzić dodatkowe efekty oraz postęp objawów intoksykacji w organizmach rozwielitek eksponowanych na w/w toksykanty.
- W porównaniu z obserwacją reakcji na inne związki chemiczne na w/w organizmy trudno określić jest wyraźne różnice oddziaływania badanych związków.
- Dlatego jako najlepszy wskaźnik i podstawowy symptom toksyczności wybrano unieruchomienie równoznaczne w tym wypadku z śmiertelnością osobników.
- Określenie innych symptomów obarczone jest błędem subiektywnej oceny obserwatora. Ocena immobilizacji jest wolna od popełnienia tego rodzaju błędu.
  
- **Omówienie wyników toksyczności ostrej *Lymnaea stagnalis* (w stadium zarodków).**

Badaniom poddano wszystkie badane detergent niejonowy z serii Brij oraz mieszaninę detergentów anionowych Ludwik, w 5 powtórzeniach dla każdego z testowanych detergentów.

W oparciu p wyniki badań toksyczności ostrej – wyliczono współczynniki LC50/48 dla każdej grupy badanej oraz średni współczynnik LC50/48, który posłużył do określenia stopnia toksyczności każdego związku dla *Lymnaea stagnalis*. [Tab. 268]. Należy pamiętać, że jaja składane przez badane ślimaki wodne są dodatkowe deponowane w kokonach mających galaretowatą otoczkę. Próba wydobycia jaj mogłaby spowodować mechaniczne uszkodzenia ich oraz byłaby czynnością niezwykle czasochłonną. Dlatego też jako grupę testową wybierano całe kokony z rozwijającymi się w środku embrionami. Przed zastosowaniem do doświadczenia, każdy kokon podlegał ocenie pod kątem aktywności życiowej zarodków. Eliminowano kokony, które zawierały martwe zarodki lub

niezapłodnione jaja. Najkorzystniej w schemacie postępowania było wykonanie testów w szeregu rozcieńczeń dla pięciu powtórzeń. Wyniki śmiertelności zarodków zawarto w tabeli [Tab. 234] w stosunku do liczby jaj w kokonie i przeliczono na procent śmiertelności.

- Zakres toksyczności wśród badanych detergentów niejonowych jest dość szeroki od 5,59 mg/l dla Brij 76 (wykazuje on najwyższy stopień toksyczności ostrej) do 117,95 mg/l dla Brij 58 (cechuje go najniższy stopień toksyczności ostrej), pozostałe detergenty Brij 35, 72 i 78 wykazują zbliżony stopień toksyczności
- Badane detergenty należą do grupy niejonowych – ogólnie określane jako mało toksyczne. Interesująca jest zbieżność tego stwierdzenia z wynikami badań prof. E. Kocwy i WSP., że tego rodzaju detergenty łatwiej niż inne podlegają biodegradacji i z tego powodu ich stosowanie jest korzystniejsze dla ochrony ekosystemu wodnych niż używanie innych detergentów [41].
- Nie mniej jednak ich bezpośredni wpływ przy zwiększonej koncentracji na testowane organizmy wodne jest wyraźny.
- Pod mikroskopem widoczne są uszkodzenia ciał zarodków. Pozostawienie ich na okres ok. 5 dni w roztworach badanych detergentów powoduje rozpad powłok ciał zarodków (wyniki testów pilotażowych).
- Dodatkowo wśród zarodków testowych, które przeżyły widoczne są takie efekty jak wyraźny asynchronizm stopnia rozwoju względem siebie. Podobny efekt zaobserwowała i opisała A. Wagner w badaniu toksyczności ścieków z zastosowaniem kokonów z zarodkami *Lymnaea stagnalis* [106].
- Stopień rozwoju osobników eksponowanych, które przeżyły w porównaniu z kontrolą wykazuje znaczne opóźnienie.
- Przy wartościach stężenia powodującego 100% efekt letalny notuje się rozpad na kłaczkowatą zawiesinę zarodków po okresie 48 godzin.
- Testy toksyczności ostrej dla badanych detergentów Brij nie wykazują efektów teratogennych wśród przeżywających embrionów.
- Można w bardziej obiektywny i jednoznaczny sposób określić zmiany wywołane wpływem badanych detergentów w porównaniu z testem z zastosowaniem *Daphnia magna*, a tym samym łatwiej wyznaczyć EC.
- **W przypadku płynu Ludwik; LC50 = 0,072089 ml/l = 68,8 mg/dm<sup>3</sup>**, wartość ta klasyfikuje ten detergent jako substancję średnio toksyczną w stosunku do badanych organizmów zgodnie z skalą **Dockal i Solda** i jako szkodliwą zgodnie z skalą toksyczności obowiązującej w UE. Zgodnie z skalą obowiązującą w USA (US EPA)



badany detergent należy do substancji umiarkowanie toksycznych dla eksponowanych embrionów ślimaka.

- Zakres stężeń bezpiecznych dla badanego detergentu kształtuje się w granicach (68,8 mg/l). Powyżej tego stężenia zaczyna się obszar stężeń efektywnych kończący się w granicach LC100% przy: 122,9mg/dm<sup>3</sup>.
- Wartość LC50 dla *Daphnia magna* kształtuje się na poziomie 90mg/l.
- Rozwijające się embriony wykazują wysoką wrażliwość na zawartość badanego detergentu w wodzie.
- Powyższe efekty dotyczą toksyczności ostrej.
- Natomiast w przypadku badania toksyczność chronicznej, efekt toksyczny będzie można zaobserwować już przy o wiele niższych koncentracjach badanych związków w stosunku do LC50/24h.
- Badane zarodki są bardzo czułymi wskaźnikami dla zanieczyszczeń detergentami wód. Wykazały to testy toksyczności ostrej dla czystych detergentów niejonowych z serii Brij i potwierdziły badania dla detergentów handlowych min Ludwik (zawierający mieszaniny detergentów gł. anionowych oraz niejonowych).

➤ **Omówienie wyników testów toksyczności ostrej *Lymnaea stagnalis* (po wylęgu).**

Testom poddano wszystkie badane detergent niejonowy z serii Brij oraz mieszaninę detergentów anionowych Ludwik, w 10 powtórzeniach dla każdego.

Na bazie wyników testów toksyczności ostrej – wyliczono współczynniki LC50/24 dla każdej grupy badanej oraz średni współczynnik LC50/24, który posłużył do określenia stopnia toksyczności każdego związku dla *Lymnaea stagnalis* w wczesnej fazie rozwoju juvenilnego po wylęgu [Tab. 271].

- Najbardziej agresywne działanie wykazuje Brij 76 jest zarazem najbardziej toksyczny, wśród badanych detergentów LC50/48h – 2,25mg/l.
- Wszystkie badane detergenty mają silnie toksyczny wpływ na młodociane formy Błotniarki stawowej w okresie do 48 h po wylęgu.
- Jest to okres adoptowania się do nowych warunków środowiska zewnętrznego. Ślimaki po wylęgu są bardzo wrażliwe na wszelkie stresy środowiskowe dlatego też wpływ badanych substancji jest bardzo silnie negatywny przy niskich koncentracjach badanych związków.

- Głównym efektem toksycznym jest wysoka śmiertelność przy małych stężeniach detergentów dodatkowo notowano także takie efekty jak rozpad tkanek miękkich widocznych pod mikroskopem po okresie 48h wśród martwych ślimaków.

Osobniki, które przeżyły wykazują opóźniony rozwój w porównaniu z kontrolą.

Porównując dwie fazy rozwoju juwenilnego ślimaka przy uwzględnieniu kryterium embrionalnego z wczesnym rozwojem po wylęgu, widoczna jest nieznacznie zwiększona wrażliwość osobników po wylęgu w stosunku osobników w okresie rozwoju zarodkowego. Potwierdza ogólną tendencję, iż w okresie adaptacji do nowych warunków przy przejściu ze stabilnego środowiska, które zapewniało jajo oraz otoczka kokonu do środowiska zewnętrznego, młodociane formy są szczególnie wrażliwe na czynniki stresu środowiskowego [50, 51].

- **Omówienie wyników testów toksyczności ostrej *Tubifex tubifex*.**

Testom poddano wszystkie badane detergent niejonowy z serii Brij oraz mieszaninę detergentów anionowych Ludwik, w 10 powtórzeniach dla każdego.

Na bazie wyników testów toksyczności ostrej – wyliczono współczynniki LC50/24 dla każdej grupy badanej oraz średni współczynnik LC50/24, który posłużył do określenia stopnia toksyczności każdego związku dla *Tubifex tubifex* dla form dorosłych [Tab. 278].

- Podobnie jak w przypadku testów toksyczności dla *Daphnia magna* oraz *Lymnaea stagnalis* największą toksycznością odznacza się Brij 76 natomiast Brij 72 wykazywał najmniejszą toksyczność [Tab. 237].
- Wartości LC50/24h – dla pozostałych Brij oraz płynu Ludwik kształtowały się na podobnym poziomie [Tab. 237].
- Rurecznik mułowy pomimo swojej wysokiej tolerancji na zanieczyszczenia wód w przypadku badania toksyczności detergentów wykazuje znaczną wrażliwość na badane substancje.
- Próba wytłumaczenia tego zjawiska wynika z fizjologicznych cech organizmu rurecznika.
- Wydłużona forma osobników dorosłych stwarza duże pole powierzchni dla ekspozycji na detergenty. Ponieważ detergenty należą do substancji powierzchniowo czynnych więc zwiększone pole powierzchni badanych pierścieni powoduje zwiększenie działania toksycznego tych substancji.

- Dowodem są efekty toksyczne jakie w trakcie testów na tym skąposzczecie dały się zaobserwować. Przy granicy stężeń wywołujących 100% śmiertelność testowe grupy wykazały największy stopień uszkodzeń.
- W okresie od 15 – 30 minut w w/w stężeniach następował rozpad ciała badanych osobników do postaci zawiesiny [Ryc. 140].
- W tym okresie widoczne były wyraźne efekty rozpuszczania się ciała, w pierwszej fazie w rozproszonych punktach i szybko rozprzestrzeniające się aż do momentu całkowitego rozpadu ciała. Taki proces szybkiej dezintegracji powłok ciała świadczy iż badane związki wykazują w określonych stężeniach agresywny charakter dla badanego obiektu.
- Dlatego też można uznać, iż *Tubifex tubifex* jest dobrym bioindykatorem dla badania zanieczyszczeń związanym z detergentami.

## II. Testy toksyczności ostrej dla Kwasów i Amoniak.

- **Omówienie wyników toksyczności ostrej *Daphnia magna* Straus.**

Procedura testu tj. w przypadku badania detergentów. Wyniki LC50/24h w [Tab. 258].

### Wnioski i obserwacje:

- Największą toksyczność wykazuje amoniak LC50/24h – 27,6 mg/l, natomiast toksyczność kwasów jest zbliżona do siebie LC50/24h od 156 – 200 mg/l.
- Toksyczność wywoływana jest przez zmianę pH oraz agresywny charakter badanych substancji.
- Pod mikroskopem widoczne są zmiany o charakterze uszkodzeń tj. rozpad ciał skorupiaków w stopniu zdecydowanie większym niż pod wpływem innych badanych toksyn.
- Przy zakresie stężeń (anionów reszt kwasowych oraz kationów amonowych) wywołujących 100% śmiertelność. Proces immobilizacji jest bardzo szybki 10 – 45minut giną osobniki testowe. Po okresie 24h obserwujemy bardzo zaawansowany rozpad i zniszczenia w organizmach tych skorupiaków.
- **Omówienie wyników toksyczności ostrej *Lymnaea stagnalis* (rozwój zarodkowy).**

Procedura testu tj. w przypadku testów toksyczności ostrej *Lymnaea stagnalis* (zarodki) z detergentami. Wyniki LC50/48h zestawiono w tabeli [Tab. 269].

Omówienie wyników:

- Szkodliwy wpływ badanych związków na rozwój zarodków *Lymnaea stagnalis* jest silny, ponieważ bardzo niskie koncentracje powodują efekt letalny w okresie 24h.
- Związki te stosunkowo łatwo migrują przez osłony kokonów i modyfikują środowisko wewnętrzne jaj, w których rozwijają się zarodki.
- Znaczne obniżenie pH powoduje również zahamowanie rozmnażania u osobników dojrzałych.
- Wszystkie w/w substancje mają agresywny charakter działania, manifestujący się silnymi uszkodzeniami już po 24 godzinach w postaci postępującej dezintegracji tkanek i rozpadu ciał zarodków.
- Obserwacje mikroskopowe jaj w kokonach wykazują zmniejszenie przezroczystości ich powłok. Jest to skutek rozpadu i denaturacji białek oraz innych związków organicznych.
- Kokony pozostawione na dłuższy okres po zakończeniu testów (ok. 5 – 7 dni), wykazują rozpad do postaci zawiesiny – pozornie przypominający supernatant, jaki otrzymywany jest ze zmiksowanych i odwirowanych tkanek.
- Podkreślić należy, że testy te dotyczą toksyczności ostrej. Nie uwzględniono w nich toksyczności chronicznej, która występuje przy znacznie niższych wartościach stężenia roztworu substancji toksycznych badanych w testach 24 godzinnych.
- Stężenia nie wykazujące efektu toksycznego w okresie 48h kształtują się następująco dla:
  - Kwasu siarkowego (VI) – 35 mg/l>
  - Kwasu azotowego (V) – 58 mg/l >
  - Amoniak - 10 mg/l>
- Stężenia powodujące całkowity efekt letalny (LC100) wynoszą dla:
  - Kwasu siarkowego (VI) – 145 mg/l<
  - Kwasu azotowego (V) – 210 mg/l <
  - Amoniak - 40 mg/l<

- **Omówienie wyników toksyczności ostrej *Lymnaea stagnalis* (rozwój po wylęgu).**

Procedura testu tj. w przypadku testów toksyczności ostrej *Lymnaea stagnalis* (w okresie wylęgu określanego angielskim terminem „hatching”) z detergentami. Wyniki LC50/24h zestawiono w tabeli [Tab. 272].

Omówienie wyników:

- Badania wykazują zdecydowanie większą toksyczność amoniaku w porównaniu z pozostałymi substancjami testowanymi, ponieważ LC50/24h występuje, już przy 24,7 mg/l. natomiast testowane kwasy wywołują LC50/24 przy ich stężeniach w zakresie od 126,5 do 170,5 mg/l.
- Zwiększona wrażliwość osobników w krótkim czasie po wylęgu znajduje wyraz w wysokiej śmiertelności młodocianych ślimaków już przy niskich stężeniach badanych substancji.

### III. Testy toksyczności ostrej dla jonów Chlorków.

- **Omówienie wyników toksyczności ostrej *Daphnia magna* Straus.**

Procedura testu tj. w przypadku badania detergentów. Wyniki LC50/24h w [Tab. 259].

**Wnioski i obserwacje:**

- Testowane chlorki wykazują bardzo słaby stopień toksyczności W odniesieniu do *Daphnia magna* co znajduje wyraz w wartości współczynnika LC50 wynoszącego aż **4325,9 mg/l** dla NaCl,
- Pozostałe sole należą również do substancji mało toksycznych, ponieważ KCl, MgCl<sub>2</sub> oraz MgCl<sub>2</sub> mają zbliżoną wartość LC50/24h, która wynosi od 904 mg/l do 1141 mg/l .
- Podkreślić należy, że badane sole występują naturalnie w środowisku i drogą ewolucji organizmy słodkowodne również zaadoptowały się do określonych niskich koncentracji tych związków w wodach a nawet wymagają ich obecności w odpowiednich koncentracjach dla prawidłowego rozwoju i funkcjonowania.

Ważne jest również, iż badane substancje należą do najczęstszych związków zanieczyszczających zasoby wód powierzchniowych (np. zawarte są w wodach dołowych szczyrpywanych z kopalń szybowych w górnych dopływach Wisły i Odry). Stężenie

chlorków w wodach tych rzek przekracza dopuszczalne normy w wielu miejscach, stanowiąc zagrożenie dla niektórych składników ekosystemów wodnych [54].

- **Omówienie wyników toksyczności ostrej *Lymnaea stagnalis* (stadium zarodków).**

Procedura testu była analogiczna jak przy biotestach w odniesieniu do kwasów i amoniaku. Wyniki LC50/24h podano w załączonym zestawieniu [Tab. 270].

#### **Wnioski i obserwacje:**

- Wartości LC50/48h są nieco wyższe niż w porównaniu z testem na *Daphnia magna* oraz w porównaniu do stadium rozwojowego po wylęgu tego samego gatunku.
- Zakres stężeń dla LC50/48h jest raczej wysoki [Fig. 133]. dowodzi to niskiego stopnia toksyczności tych związków dla rozwijających się zarodków *Lymnaea stagnalis*.
- Podobny wniosek dotyczy rozwielitki. Wydaje się to wiązać z przystosowaniem tych skorupiaków do relatywnie wysokich stężeń testowanych związków. Drogą ewolucji zaadoptowały się te organizmy do stężeń chlorków, mogących wystąpić w ich środowisku bytowania w stężeniach podobnych do testowanych.
- Podkreślić należy, że sole chlorków stanowią wraz z węglanami jedne z niezbędnych substancji, potrzebnych do prawidłowego funkcjonowania tych bezkręgowców w odpowiednim, optymalnym zakresie.
- Obniżona toksyczność *Lymnaea stagnalis* w porównaniu z osobnikami po wylęgu czy w stosunku do *Daphnia magna* wynika również z faktu, iż embriony chronione są przez bariery jaja oraz osłony galaretowatej kokonu. Wspomniane naturalne zabezpieczenia obniżają efekt działania roztworu hiperosmotycznego środowiska związany ze zwiększoną koncentracją soli chlorków sodu, potasu i magnezu.
- Związki te nie należą do substancji toksycznych, również w odniesieniu do innych gatunków zwierząt słodkowodnych, a więc w testowanych stężeniach nie stanowią zagrożenia dla ekosystemów słodkowodnych.

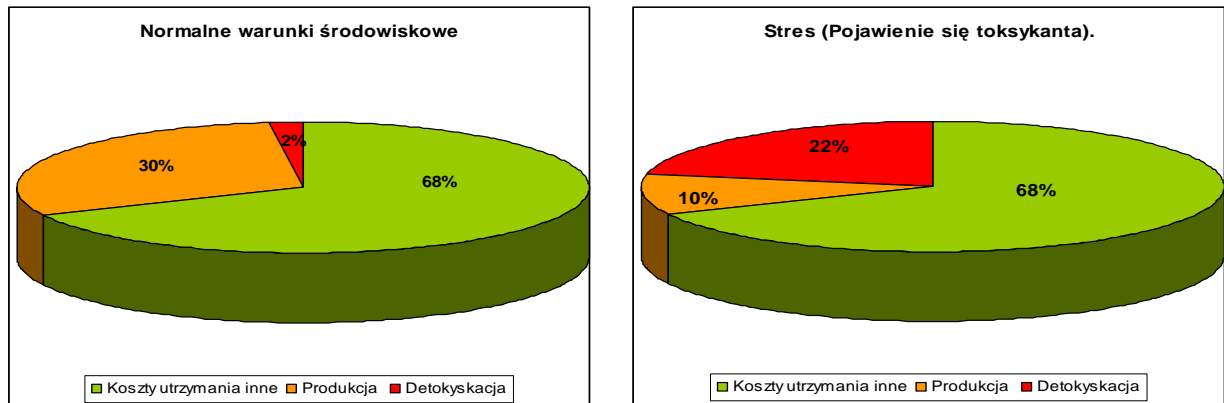
- **Omówienie wyników toksyczności ostrej *Lymnaea stagnalis* (rozwój po wylęgu).**
- Procedura testu tj. w przypadku badania kwasów i amoniaku. Wyniki LC50/24h w [Tab. 273].

**Wnioski i obserwacje:**

- Wrażliwość osobników młodocianych w okresie wczesnego rozwoju po wylęgu jest podwyższona w stosunku do chronionych barierą jaja i kokonu embrionów ale w odniesieniu do chlorków potasu i magnezu wrażliwość ta jest mniejsza niż wrażliwość eksponowanych na podobne stężenia osobników *Daphnia magna*.
- Roztwór soli chlorków nawet po przekroczeniu bezpiecznej koncentracji nie powoduje w ciałach osobników testowych tak drastycznych szkód jak substancje z grupy detergentów czy silne kwasy oraz roztwór amoniaku.
- Śmierć osobników młodocianych po przekroczeniu bezpiecznych stężeń chlorków wynika z różnicy wartości osmotycznej roztworów wodnych wewnątrz ciała do środowiska zewnętrznego. W środowisku zewnętrznym roztwór wodny wykazuje właściwości roztworu hiperosmotycznego w stosunku do stężenia jonów w środowisku wewnętrznym organizmów. Ta różnica wartości osmotycznej wymusza ucieczkę wody na zewnątrz i na drodze odwodnienia (w przypadku komórek deplazmolizy), organizmy tracą niezbędny zasób wody potrzebny do utrzymania właściwego stężenia elektrolitów oraz uwodnienia niezbędnego dla prawidłowego przebiegu procesów fizjologicznych.
- Zaznaczyć trzeba, że są gatunki ślimaków przystosowanych do środowiska słonowodnego. Posiadają specyficzne mechanizmy umożliwiające zatrzymanie oraz pobór wody z środowiska zewnętrznego do organizmu oraz wydalanie nadmiaru jonów soli. Wytrzymują one znacznie większe stężenia roztworów soli. Gatunki słodkowodne nie wykształciły takich mechanizmów i nie tolerują zwiększonych wartości chlorków. Podobne efekty możemy zaobserwować u ryb słonowodnych w stosunku do słodkowodnych.

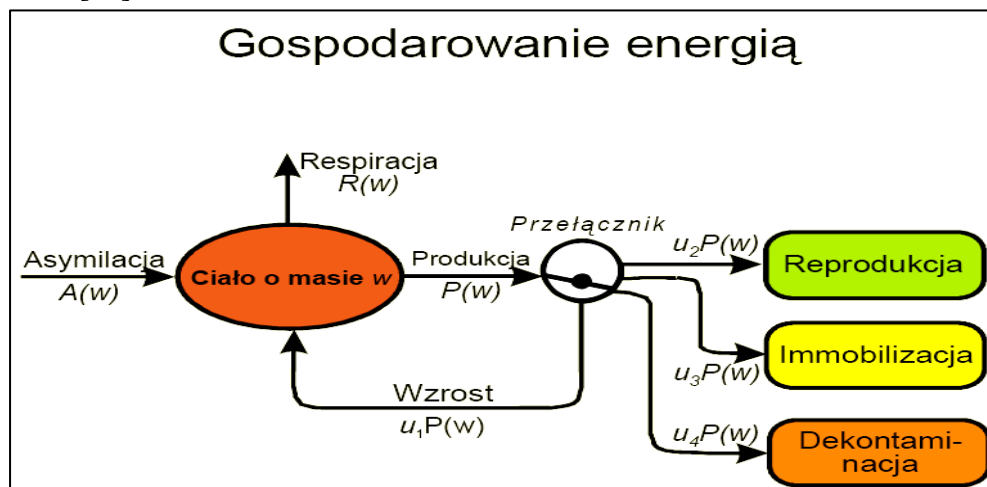
#### IV. Teoria stresu:

Najważniejszymi objawami toksyczności badanych zanieczyszczeń wody było opóźnienie rozwoju. We wszystkich przypadkach przy wprowadzeniu badanego związku chemicznego w zakresie stężeń efektywnych – głównym symptomem poza śmiertelnością był opóźniony rozwój w porównaniu do kontroli [106]. Proces ten można wytłumaczyć teorią stresu [44]. Wywołany zanieczyszczeniami środowiska stres powoduje obniżenie budżetu energetycznego organizmu, ponieważ organizm przeznaczając względnie dużą część swoich zasobów energii na próbę adaptacji do tych zanieczyszczeń. Efektem tego stanu jest zmniejszenie ilości energii którą w tej sytuacji może użytkować na swój wzrost i rozwój.



Ryc. 136. Budżet energetyczny organizmu w warunkach normalnych i przy pojawieniu się stresu środowiskowego [44].

Gdy w środowisku pojawi się toksykant wywołujący stres – organizmy będą wydatkowały energię na dekontaminację oraz obronę przed wpływem toksycznym określonych zanieczyszczeń. Te procesy obrony odbywają się kosztem energii przeznaczonej w normalnym nie zanieczyszczonym środowisku na optymalny rozwój i funkcjonowanie, zatem tempo rozwoju znacznie się obniża również reprodukcja jest zaburzona [44].



Ryc. 137. Schemat wydatkowania energii na procesy życiowe [44].

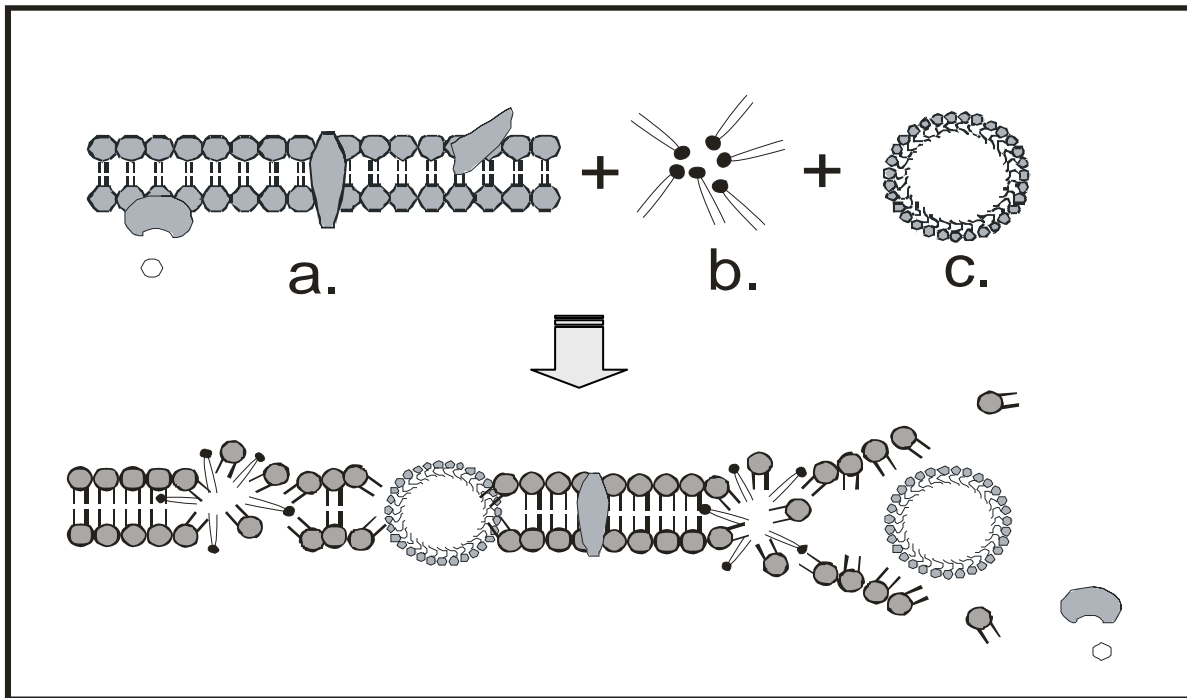


Interesujące są wyniki obserwacji rozwoju zarodków *Lymnaea stagnalis* w okresie dłuższym niż 48h, w odniesieniu do wpływu szeregu stężeń nie wywołujących 100% śmiertelności. U zarodków rozwijających się w roztworach z badanymi toksykantami, przy koncentracji związku w zakresie stężeń subletalnych zaznaczył się asynchronizm stopnia rozwoju w porównaniu z kontrolą. W kontroli można było zaobserwować synchronizację rozwoju wszystkich zarodków. Efekt ten można przypisać podobnie jak opóźniony rozwój w przypadku wpływu promieniowania X na zarodki *Tubifex tubifex* (badania Dobrowolskiego) [16] – procesowi wydatkowania energii na obronę przed stresem, oraz zmienności osobniczej spowodowanej przez czynniki genetyczne (genotypy poszczególnych zarodków). Wynikiem tej zmienności jest różna odporność na stres poszczególnych osobników [16, 44]. Przejawia się ona w zróżnicowaniu stopnia rozwoju wśród populacji rozwijających się w zanieczyszczonym środowisku. W ewolucji takie czynniki aktywowały mechanizm doboru naturalnego, preferującego genotypy najbardziej dostosowane i szybciej adoptujące się do stresów środowiskowych. Takie genotypy lepiej adoptowały się do nowych warunków lecz pula genetyczna populacji w wyniku selekcji uległa zubożeniu [44].

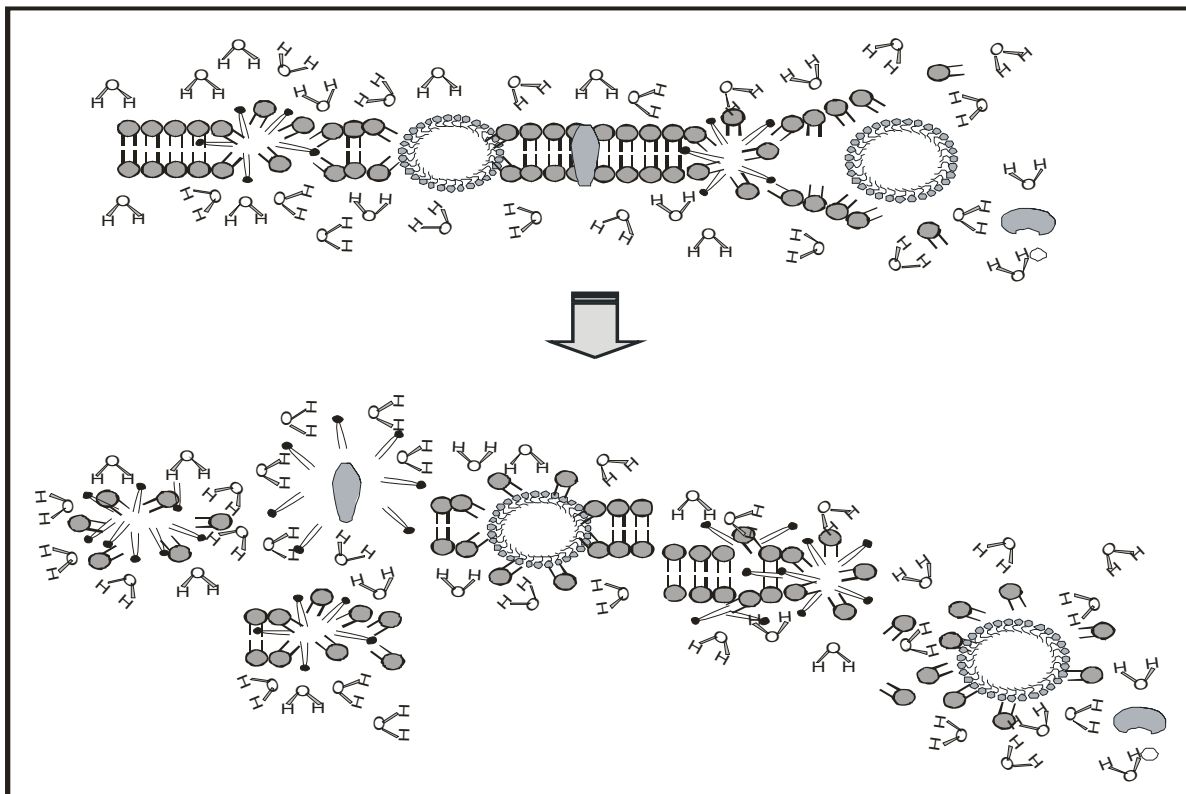
#### **V: Efekt solubilizacji błony komórkowej przez detergenty.**

Zmiany wywołane agresywnym działaniem badanych substancji wynikają z mechanizmu oraz aktywności chemicznej badanych substancji. Dotyczy to głównie działania detergentów oraz roztworów kwasów i amoniaku. Mechanizm działania detergentów na struktury biochemiczne wynika z właściwości biochemicznych detergentów jako środków powierzchniowo czynnych. W pewnych procedurach wymagających zniszczenia błon komórkowych wykorzystuje się detergent [38]. Cząsteczki detergentów wnikają w błonę białkowo – lipidową (dwuwarstwę błony komórkowej). Wchodzą w reakcję z cząsteczkami lipidów w procesie solubilizacji. Cząstki detergentów migrują między cząsteczkami lipidów i podobnie jak w roztworach zawierających hydrofobowe cząsteczki lipidowe tworzą micelle rozproszone i utrzymujące się na granicy faz wody i lipidów. W przypadku błony komórkowej tworzą się micelle wewnątrz błonowe. Micelle te zaburzają integralność błony, oraz jej właściwości. Plazmalemma traci właściwości błony półprzepuszczalnej, jej charakter ciągły jest przerwany, ulega fragmentacji pod wpływem oddziaływania środowiska wodnego. Ostatecznym efektem jest zanik bariery ograniczającej protoplast komórek oraz rozpad komórek. Finalny efekt makroskopowy widoczny jest jako dezintegracja tkanek, narządów stanowiących powłoki ciała organizmów eksponowanych na zwiększone stężenie detergentów. Proces ten zobrazowany jest na autorskim modelu solubilizacji błony wzorowanym na modelu solubilizacji białka błonowego [38].

Na modelu widoczne są błona komórkowa (u góry) wykazująca integralny charakter oraz cząsteczki detergentów. Cząsteczki SPC w procesie solubilizacji są przyczyną postępującego rozpadu błony (po niżej).



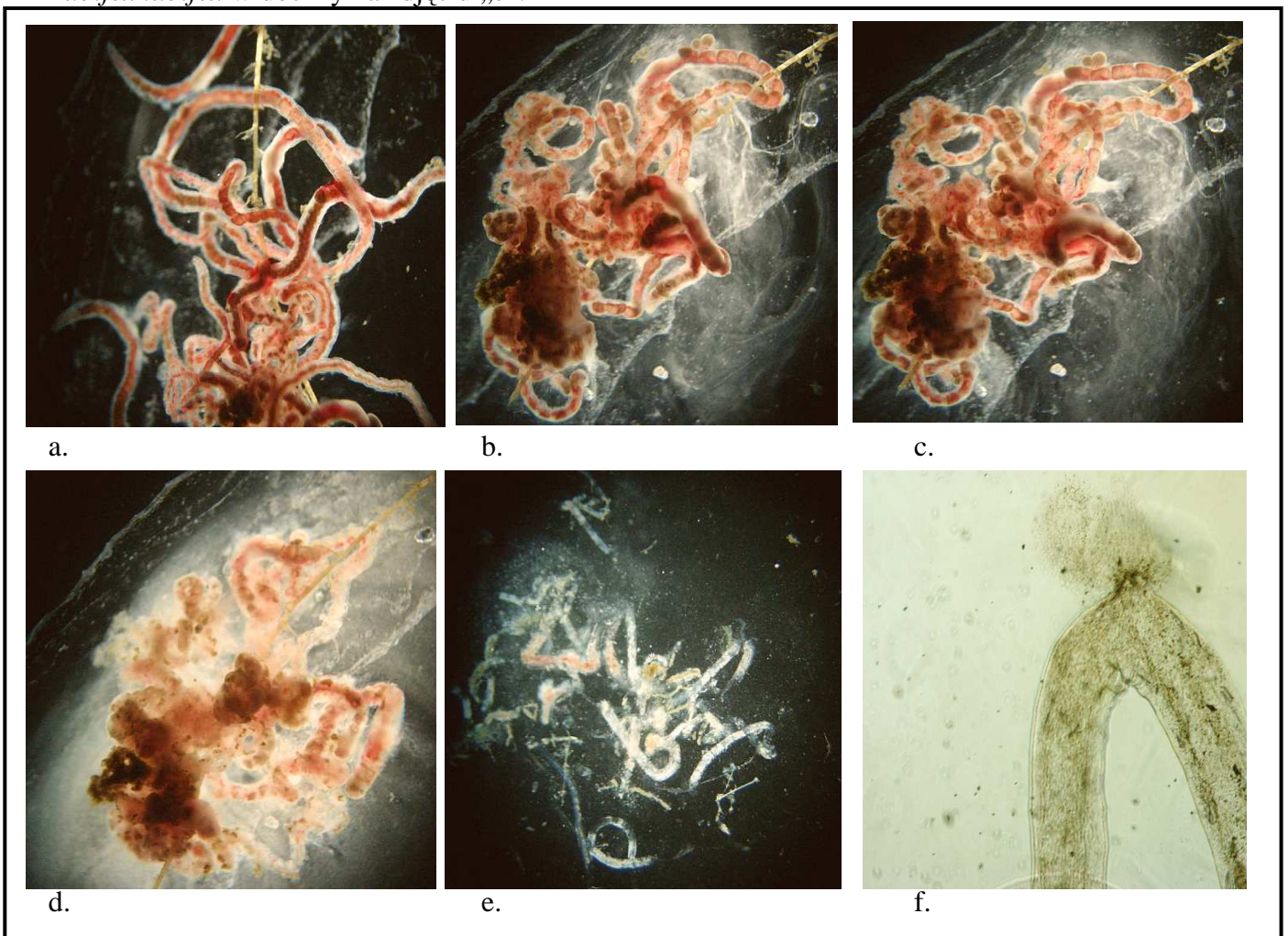
Ryc. 138. Autorski model solubilizacji błony komórkowej A. przez różne rodzaje cząsteczek detergentów B. i C.



Ryc.139. Autorski model solubilizacji błony komórkowej w środowisku wodnym końcowy efekt rozpadu błony do postaci miceli zewnętrznych (rozpad do wodnej zawiesiny).

Należy jednak pamiętać, iż efekt taki wywołany jest przy odpowiednio dużym stężeniu detergentu dla danego organizmu. Małe stężenia detergentów są stosowane w produkcji leków w celu polepszenia wchłaniania się substancji polarnych przez błony do ustroju i nie wywołują zmian patologicznych przy kontakcie z tkanką układu pokarmowego [59].

Efekt końcowy wpływu podwyższonej koncentracji (w zakresie stężenia śmiertelnego) na *Tubifex tubifex* widoczny na zdjęciu „e”.



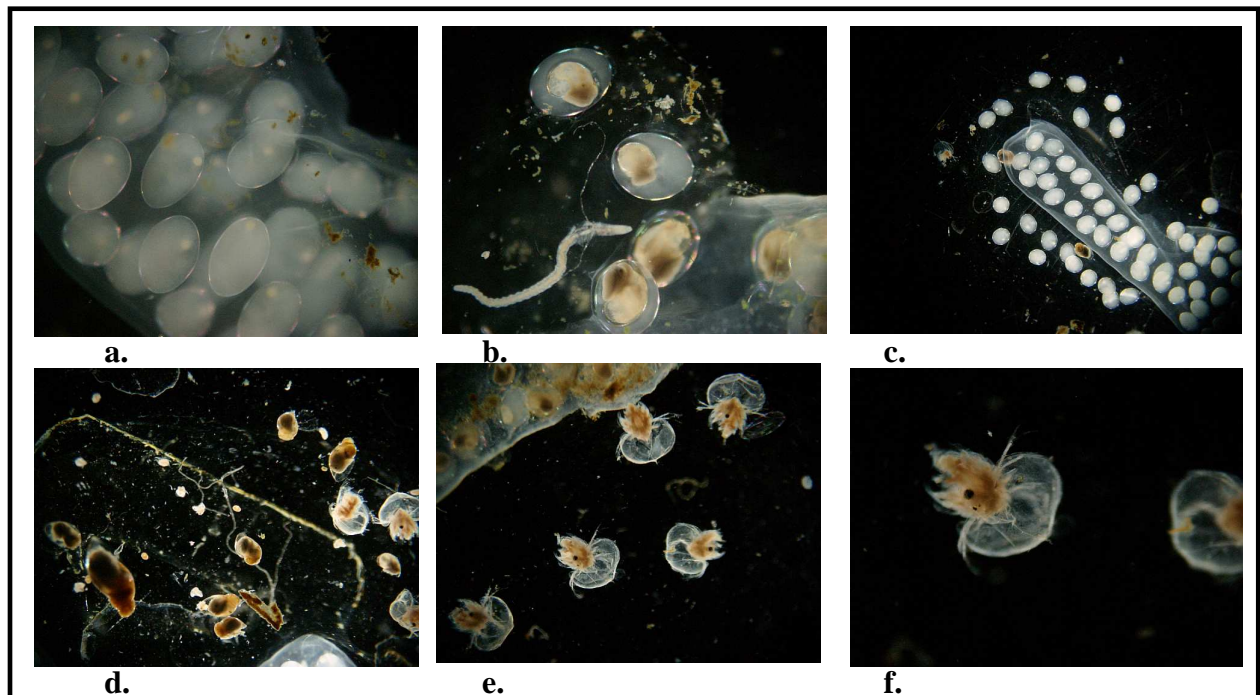
Ryc. 140. Wpływ detergentu Ludwik na proces rozpadu tkanek organizmów *Tubifex tubifex* a. – wczesny etap wpływu detergentu (miejscowe pęknięcia), b. – d. postępujący rozkład (widoczne jest zwiększenie stopnia dyfuzji cząstek rozproszonych). e. końcowy efekt rozpadu ciał skąposzczetu po 24h. e. punktowe przerwanie powłok ciała (widoczna dyfuzja cząstek zawiesiny – miceli detergent – lipidy i inne związki organiczne).

Proces rozpadu widoczny na zdjęciach od a. – d. miał miejsce w okresie 45 min, e. efekt końcowy zanotowany po 24h w tym samym stężeniu. Zaproponowany model stanowi próbę wyjaśnienia – mechanizmu molekularnego działania detergentów na struktury biochemiczne

komórek, którego efektem końcowym jest uszkodzenie i rozpad tkanek miękkich badanych organizmów.

**VI. Mechanizm oddziaływania roztworów kwasów oraz silnych zasad na organizmy wodne:** ma zasadniczo inny charakter. Agresywny charakter silnych kwasów i wodorotlenków na struktury biochemiczne to między innymi – proces denaturacji białek. Zmiany właściwości błon komórkowych, a przy wysokiej koncentracji tych substancji dochodzi do rozpadu plazmalemmy. Mechanizm bardziej skomplikowany niż w przypadku działania substancji powierzchniowo czynnych. W przeprowadzonych badaniach proces dezintegracji tkanek organizmów następował dopiero po okresie 4 – 7 dni w zakresie stężeń przy 100% śmiertelności (LC100/24h). Po okresie 24h najbardziej agresywny charakter działania tych substancji manifestował się widocznymi zmianami o charakterze denaturacji. Symptomaticz tych zmian było białe zmatowienie jaj *Lymnaea stagnalis* w kokonach, w przypadku form młodocianych tego samego gatunku oraz osobników testowych *Daphnia magna*, postępujący rozpad ciał badanych mięczaków oraz skorupiaków i proces denaturacji białka. Zmiana pH wywołała silny stres w organizmach testowanych organizmów wodnych. Finalnym efektem stresu jest wycieńczenie organizmów oraz ich śmierć.

W przypadku człowieka wpływ zmiany pH modyfikuje koncentrację elektrolitów oraz charakter jonowy środowiska wewnętrznego komórek, są to niekorzystne zmiany zaburzające procesy fizjologiczne oraz metabolizm [57].

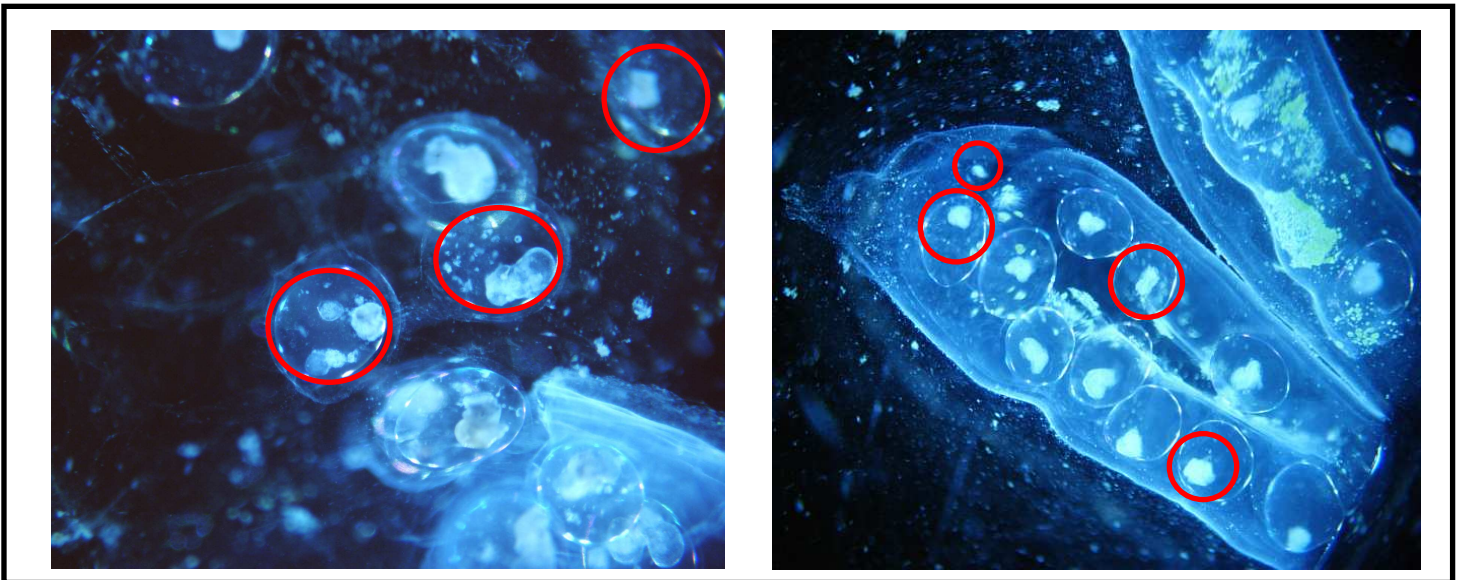


Ryc. 141. Widoczne zmiany wywołane wpływem kwasów na badane organizmy, a. – c. embriony *Lymnaea stagnalis*, d. – formy po wylęgu *Lymnaea stagnalis*, e. – f. *Daphnia magna*.



## VII. Efekt działania teratogenego – substancji chemicznych.

W trakcie badań pilotażowych z wykorzystaniem kryteriów embriologicznych *Lymnaea stagnalis* zaobserwowano w przypadku badania detergentu Lucek (firmy Veritas) efekt działania teratogenego. Jest to rzadki efekt i może mieć bardzo negatywne oddziaływanie na reprodukcję oraz rozwój osobniczy organizmów narażonych na substancje wykazujące takie działanie. Dodatkowo niepokojącym jest fakt, iż badany detergent jest w szerokim wykorzystaniu przez ludzi jako środek czyszczący (płyn do mycia naczyń) i może dojść do przenikania tej substancji do organizmu człowieka. Nie stwierdzono efektu teratogenego przy badaniu pozostałych substancji. Proces teratogenego oddziaływania może mieć podłoże zmian mutacyjnych. Efekt teratogeny przejawia się nieprawidłowym rozwojem (niedorozwojem) zarodka w trakcie rozwoju embrionalnego. Proces ten może być letalny dla zarodka na etapie rozwoju prenatalnego lub rodzące się osobniki młodociane są dalece upośledzone. Jako przykład działania teratogenego można podać działania środka przeciwbólowego Talidomidu (w latach osiemdziesiątych XX wieku). W wiele nowonarodzonych dzieci, których matki brały ten lek w okresie ciąży miały daleko posunięty niedorozwój kończyn górnych i dolnych. [104]. W trakcie badania toksyczności ostrej na embrionach ślimaka w okresie 5 dni (testy pilotażowe) zostały zaobserwowane w przypadku niektórych rozwijających się embrionów nieprawidłowe zmiany rozwojowe, deformacje i daleko odchyłone od normy anomalie rozwojowe.



Ryc. 142. Teratogenne zmiany wywołane toksycznym działaniem detergentu Lucek. (testy pilotażowe).

Możliwość wykrycia oddziaływania teratogenego jest niezwykle ważna ze względu na możliwość oddziaływań różnych substancji i zanieczyszczeń na człowieka i jego zdrowie.

## 10. Podsumowanie:

Metody biotestów toksyczności ostrej stanowią bardzo ważny element monitoringu środowiska. Różni autorzy podejmowali próby oceny toksyczności ostrej stosując różnorakie metody bioindykacji. Powstało wiele wersji handlowych biotestów z przeznaczeniem do szybkiej i łatwiej oceny toksyczności próbek wody, ścieków oraz substancji chemicznych. **Prezentowana praca wnosi w dziedzinie bioindykacji oryginalne nowe narzędzia do szybkiej oceny toksyczności zanieczyszczeń chemicznych wód z wykorzystaniem;**

- **Kryteriów embriologicznych i wczesnego rozwoju osobników młodocianych od momentu wylęgu na przykładzie biotestu toksyczności ostrej z *Lymnaea stagnalis***, (biotest z możliwością zastosowania w szerokim spektrum oceny toksyczności różnych substancji).
- **Kryteriów ekotoksykologicznych na przykładzie toksyczności biotestu toksyczności ostrej z *Tubifex tubifex*** (biotest do zastosowania w ramach oceny toksyczności roztworów detergentów).

Narzędzia te umożliwiają badanie toksyczności ostrej substancji chemicznych oraz zanieczyszczeń wód, w przypadku zastosowania kryteriów embriologicznych – dodatkowo możemy ocenić możliwość wywołania **efektów teratogennych** przez różne substancje chemiczne. Powoduje to, że ten biotest jest niezwykle przydatnym narzędziem umożliwiających identyfikację substancji z tendencją do tego rodzaju oddziaływań. Pozwala on zatem na podjęcie bardzo ważnych decyzji w ramach polityki dotyczącej dopuszczenia lub zakazania produkcji danych substancji, mogących stanowić zagrożenie dla ekosystemów oraz człowieka. Inne biotesty takiej możliwości nie posiadają.

Inne cechy:

- Badane organizmy testowe spełniają warunki wymagane dla indykatorów są wrażliwe na zastosowane toksykanty.
- Są składnikami ekosystemów wodnych i występują w nich pospolicie.
- Można łatwo je pozyskać.
- Hodowla jest prosta i charakteryzuje ją duży stopień reprodukcji.
- W trakcie ekspozycji na toksykant wykazują widoczne zmiany o charakterze symptomów działania toksycznego badanych substancji.
- Opracowane biotesty należą do biotestów tanich i łatwych do przeprowadzenia z możliwością zastosowania na szeroką skalę w przemyśle i w ocenie jakości wód oraz ścieków.

- Stanowią przydatne narzędzia dla Inżynierii Środowiska w kwestii oceny i kontroli jakości składników środowiska przyrodniczego oraz bioindykacyjnej oceny oddziaływania określonych obiektów na środowisko.
- Mogą być ważnymi składnikami przy projektowaniu systemów wczesnego ostrzegania przed związkami niebezpiecznymi pojawiającymi się w środowisku z różnych źródeł w wyniku awarii w przemyśle, emisji zanieczyszczeń z fabryk i hal produkcyjnych lub w planowanych akcjach terrorystycznych mających na celu zatrucia zasobów wód przeznaczonych jako źródła wody pitnej dla aglomeracji ludzkich.

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że mogą te biotesty być użyte zamiennie z biotestem *Daphnia magna* Strauss (w przypadku grupy substancji – badanych).

Tym samym zweryfikowano z pozytywnym wynikiem postawioną we wstępie tezę iż, **„wprowadzenie nowych kryteriów ekotoksykologicznych (z uwzględnieniem wpływu testowanych zanieczyszczeń na embriogenezę) pozwoli na zwiększenie czułości monitoringu biologicznego a pośrednio skuteczności ochrony ekosystemów i różnorodności biologicznej”**

Autor dostrzega również nowe kierunki dalszego doskonalenia opracowanych biotestów. Można do nich zaliczyć rozszerzenie zastosowań tych biotestów do oceny toksyczności chronicznej, oraz ich automatyzację z zastosowaniem metod komputerowej analizy obrazu. Równoległe z badaniami związanymi z empiryczną weryfikacją tezy pracy doktorskiej; autor podjął dodatkowe interdyscyplinarne doświadczenia wraz z naukowcami Politechniki Krakowskiej nad zautomatyzowaniem biotestów w oparciu o metodę analizy obrazu. Jako kryteria w tych eksperymentach uwzględniono zmiany kinetyczne dotyczące sposobu i szybkości poruszania się osobników w populacjach testowanych gatunków przy ocenie toksyczności ostrej. Wstępne wyniki tych badań wskazują na perspektywę wcześniejszego – niż przy pomocy obecnie używanych metod – wykrywania efektów potencjalnie toksycznych [49]. Są to bowiem zmiany poprzedzające efekty śmiertelne. Opracowywane modele matematyczne będą mogły umożliwić obiektywizację ocen rejestrowanych zaburzeń kinetycznych.

Podjęto też badania nad rozszerzeniem możliwości wypracowanych metod po przez próby zastosowania biomarkerów – w celu wykrywania wczesnych zmian molekularnych wywołanych przez ksenobiotyki, w organizmach badanych bioindykatorów. Są to prace na etapie testów pilotażowych. Po przez opracowanie i przetestowanie nowych biotestów spełniono założenia pracy. Zastosowanie innowacyjnych metod monitoringu biologicznego w

inżynierii środowiska umożliwi wcześniejsze wykrywanie bezpośrednich zagrożeń dla ekosystemów, a pośrednich dla ludzi.

Metody te bowiem dostarczają przesłanek naukowych dla *wyboru takich biotechnologii oczyszczania ścieków, które zabezpieczą odpowiedni stan wód dla prawidłowego przebiegu wczesnego rozwoju, w szczególności gatunków wrażliwych na testowane zanieczyszczenia. W ten sposób przy pomocy nowoczesnych metod naukowych i technicznych realizowany będzie postulat prekursora oszczędnej gospodarki zasobami przyrody i zrównoważonego – ekologicznie rozwoju gospodarczego prof. W. Goetla o „potrzebie zabezpieczenia warunków dla prawidłowej reprodukcji organizmów żywych, a tym samym zapewnienia trwałości użytkowania zasobów biologicznych”*.



**Literatura:**

1. Albinia B., Brodowska M., Dygas i WSP.; Stan środowiska w Polsce na tle celów i priorytetów Unii Europejskiej – Raport wskaźnikowy 2004: biblioteka monitoringu środowiska warszawa 2006.
2. Alethea T. Bowen, Jason M. Conder and Thomas W. La Point; Efficient method for culturing sludgeworms (*Tubifex tubifex*) for use in sediment toxicity tests, University of North Texas, <http://www.geocities.com/jasonmconder>, 2002.
3. Allan J. D.; Ekologia wód płynących, PWN – Warszawa 1998.
4. APHA "Standard methods for the examination of water and wastewater". 17th ed. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation - Washington DC. Rozdz. 8. 1989r.
5. Apolinary L. Kowal, Maria Świdorska – Bróz; Oczyszczanie Wody: PWN – Warszawa 2005.
6. Bartram J., Ballance R. (ed.), Water Quality Monitoring. A practical guide to the design and implementation of freshwater quality studies and monitoring programmes. E & FN SPON. London, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras. 1996.
7. Bielański A. Podstawy chemii nieorganicznej, tom 1 – 2 (wyd. 5) PWN Warszawa 2004.
8. Biological Test Method: Toxicity Tests Using Early Life Stages Of Salmonid Fish (*Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon*). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, 81 p. Environment Canada. 1992.
9. Bryszewska M., Leyko W. Biofizyka dla biologów, PWN – Warszawa 1997.
10. Budna E., Dubienicka H., Dziejowski S., Dziel D., Kęłowska A., Kobiałka K., Pawłowska T., Wardak K., Wrzosek A., Żak J.; Ochrona środowiska 2006, GUS, Wyd. Zakład Wydawnictw Statystycznych, Warszawa 2006.
11. Buikema A.L.Jr., Niederlehner B.R., Cairns J. Jr. Biological Monitoring. Part IV. Toxicity testing. Water Res. 16, 1982.
12. Chełmicki W.; Woda – zasoby, degradacja, ochrona: PWN, Warszawa 2001.
13. Cox P.A.; Krótkie wykłady – Chemia nieorganiczna, PWN, Warszawa 2006.
14. De Pauw N., Gabriels W., Goethals P. L. M.; River Monitoring And Assessment Methods Based On Macroinvertebrates: Biological Monitoring of Rivers: Application and Perspectives, Editor Wiley, West Sussex, England 2006.
15. Dobrowolski J., Dominik J., W., Wgner A., Pardos M., Benninghoff Ch., Testy Biologiczne I Badania Chemiczne W Monitoringu Ekologicznym Środowiska

- Wodnego, Chemia Środowiskowa ćwiczenia i seminary, Szczepaniec-Cięciak E., Kościelniak P., cz.2 Wyd. U. J. 1999.
16. Dobrowolski J.W., Embryological aspects of environmental toxicology Environmental quality and safety New York, Academic Press vol.5 s.78-81; 1976,
  17. Dobrowolski W., Biotechnologia proekologiczna kluczem do unowocześnienia inżynierii środowiska – J. Inżynieria Środowiska. Tom 6. Zeszyt 2. 2001.
  18. Dojlido J. R.; Chemia wód powierzchniowych: Wyd: Ekonomia I Środowisko, Białystok 1995.
  19. EC-C2; Methods for the determination of ecotoxicity. “Acute toxicity for Daphnia”. Official Journal of the European Communities. L 383 A/172. 1992.
  20. Galassis S., Guzzella L., Mingazzini M., Vigano L., Capri S., Sora S.; Topical and chemical characterization of organic micropollutants in river Po waters (Italy). Wat.,Res.. nr 1. s. 19-27. 1992.
  21. Gilbert S. F.; Development Biology, Chap. - The Early Development of Snails, 6 Edit., Part 2, © by Sinauer Associates, Inc. 2000 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?indexed=google&rid=dbio.section.1734>
  22. Gomółka E. Szaynok A.; Chemia wody i powietrza, Wyd. PWr., Wrocław 1982.
  23. Grabas K., Kołwzan B., Pawełczyk A.; Chemia gospodarcza a środowisko, Ochrona Środowiska Wybrane Zagadnienia, VII: 1 – 16, Łódź 2001.
  24. Greinert H., Jędrzak A., Drab M.: Wpływ wysypiska odpadów komunalnych Zielonej Góry na wybrane elementy środowiska. Architektura ochrony środowiska. nr 3-4. s. 155-173. 1988.
  25. Grodziński Z., Jura. Cz., Krzanowska H., Szarski H.; Embriologia, PWN, Warszawa 1970.
  26. GUS Rocznik statystyczny – 2004.
  27. Haberer K.; Physikalische und chemische Eigenschaften des Wassers. W: Handbuch der Lebensmittelchemie. 8, 15-50, Berlin – New York 1970.
  28. Henze M., Harremoes P., Jansen Jes la Cour, Arvin E.; Oczyszczanie ścieków – procesy biologiczne i chemiczne: Wyd: Politechniki Świętokrzyskiej, Kielce 2002r.
  29. Inspekcja Ochrony Środowi; Program monitoringu wód powierzchniowych w Polsce wg. Ramowej Dyrektywy Wodnej. Aura – Ochrona Środowiska, PMŚ 2006.
  30. Inspekcja Ochrony Środowiska: Raport stan środowiska w Polsce w latach 1996–2001: Biblioteka Monitoringu Środowiska Warszawa 2003.

31. ISO 6341-1996. Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea).
32. ISO 7346-1996. Water quality - Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)).
33. Jura C: Bezkręgowce – Podstawy morfologii funkcjonalnej, systematyki i filogenezy, PWN, Warszawa 1996.
34. Jurkiewicz E.: Doświadczenia wojewódzkiego inspektoratu ochrony środowiska w procesie wdrażania ramowej dyrektywy wodnej, materiały konferencyjne (Wdrażanie Ramowej Dyrektywy Wodnej – ocena stanu ekologicznego wód w Polsce), Ecstatus – GIOŚ, Łódź 2006.
35. Kabata Pendias A, Pendias H., Biogeochemia pierwiastków śladowych PWN Warszawa 1999
36. Kaleta J. Niebezpieczne zanieczyszczenia organiczne w środowisku wodnym, Zeszyty Naukowe, Zeszyt 9, Rzeszów 2007
37. Karty charakterystyk; Brij 35, 58, 72, 76, 78, - informacje toksykologiczne, Sigma Aldrich, 2005.
38. Kawiak J., Marecki J., Olszewska M., Warchoła j.; Podstawy cytofizjologii, Wydanie IV, Cz. 1. PWN – Warszawa 1998.
39. Klimiuk E., Łebkowska M.: Biotechnologia w ochronie środowiska: PWN – Warszawa 2003
40. Knepper T.; Analysis & Fate of Surfactants in the Aquatic Environment, Wyd: Elsevier Science Publishers 2003.
41. Kocwa E., Biologia w ochronie zdrowia i środowiska; PWN, Warszawa 1977.
42. Kurczewski B., Ekstrakcja fenoli w obecności wybranych Surfaktantów, Praca Doktorska, Wrocław 2006.
43. Laskowski R.; Podstawy ekotoksykologii Testy ekotoksykologiczne, plastyczność genotypowa i adaptacje, *Biokoncentracja i biomagnifikacja, Ekotoksykologia zespołów*. <http://www.eko.uj.edu.pl/laskowski>.
44. Laskowski R.; Podstawy ekotoksykologii; Miary toksyczności biomarkery, ogólna teoria stresu, *Wpływ substancji toksycznych na populacje*. <http://www.eko.uj.edu.pl/laskowski>.
45. Ledakowicz S. Biotechnologia w ochronie środowiska – ochrona środowiska, wybrane zagadnienia, VII: 1 – 16, Łódź 2001.

46. Łebkowska M., Załęska – Radziwił M., Słomczyńska B., Toksykologia środowiska, ćwiczenia laboratoryjne, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2004.
47. Maciejewska I. Wybrane biologiczne wskaźniki czystości wód, Chemia środowiskowa ćwiczenia i seminaria, Szczepaniec-Cięciak E., Kościelniak P. cz.1 Wyd. U. J. 1999.
48. Mancini L.; Organization of Biological Monitoring in the European Union: Biological Monitoring of Rivers: Application and Perspectives, Editor Wiley, West Sussex, England, 2006
49. Mazur R., Kawa R., Lewicki P.; The monitoring of selected pollutants of waters with the application of the selected eco-toxicological criteria; Polish Journal of Environmental Studies, Vol. 16, No. 3B, s. 334 – 338, Olsztyn 2007,
50. Mazur R.: Monitoring wybranych zanieczyszczeń wód przy zastosowaniu nowych kryteriów ekotoksykologicznych. Materiały Konferencyjne (Ogólnopolskie Seminarium Studentów i Doktorantów – Biotechnologia Środowiskowa). Wisła 2006.
51. Mazur R.; Embryo-Tests, Polish Journal of Environmental Studies, Vol 15, No. 5C, Olsztyn 2006,
52. Mazur R.; The application of embryological and ecotoxicological criteria in new methods of environmental biomonitoring, Polish Journal of Environmental Studies, Vol 13, Supplement I, Olsztyn 2004,
53. Mądrycka K.; Detergenty a środowisko naturalne: Pismo Pracowników i Studentów – Politechniki Gdańskiej. Nr 4 2001.
54. Miller P.; Zasolenie wód w Polsce, Przyroda Polska, Nr. 10. 2004.
55. Moczulska A. Korzeniewski K.; Wstępne badania nad występowaniem niektórych substancji toksycznych w ujściach rzek Przymorza Zachodniego. Studia i materiały oceanograficzne nr 14, Chemia Morza 2, 257, 1976.
56. Muley E. V. ; Embryology and development of a freshwater prosobranch, *Melania scabra*, Hydrobiologia Pub. Springer Netherlands, Vol. 58, Number 1, March, 1978.
57. Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W.; Biochemia Harpera, Wyd: Lekarskie PZWL 2000.
58. Nałęcz – Jawecki G.; Badanie toksyczności środowiska wodnego metodą bioindykacji, Biuletyn Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Warszawie, AMW, 2003.

59. Nowiczewski E.: Równowagowa solubilizacja wybranych sulfonamidów przez wodne roztwory polietero-mono-oli. Praca magisterska, Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Łodzi 2005.
60. OECD 202. Wytyczna OECD do badań substancji chemicznych. "Daphnia, ostry test unieruchomiania i badanie rozmnażania". Instytut Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego. Sosnowiec 1997.
61. OECD 202; Wytyczna OECD do badań substancji chemicznych. "Daphnia, ostry test unieruchomiania i badanie rozmnażania". Instytut Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego. Sosnowiec 1997.
62. OECD 203. Wytyczna OECD do badań substancji chemicznych. "Ryby, badanie toksyczności ostrej". Instytut Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego. Sosnowiec 1997.
63. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 6. Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test. Paris 1997.
64. OECD Test Guidelines Program. Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, U.K., 20-21 March 1993.
65. Panek E., Metale śladowe w glebach i wybranych gatunkach roślin obszaru Polskiej części Karpat, Studia Rozprawy Monografie, 79, Wyd: IGSMiE – PAN, 2000.
66. Parkhurst, B.R.; Forte, J.L. and Wright, G.P. (1981) Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphniamagna*. Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26: 1-8.
67. Pascoe, D., Karntanut, W., and Muller, C. T., Do Pharmaceuticals Affect Freshwater Invertebrates? A Study With the Cnidarian Hydra Vulgaris: Chemosphere, v. 51, p. 521-528. 2003.
68. Pasternak K., Stomach K, Wróbel S. Hydrobiologia. PWN Warszawa 1976.
69. Pauling L., Pauling P.; Chemia, Wyd. IV. PWN – Warszawa 1998.
70. Pawlaczyk – Szpilowa M.; Biologia i ekologia: Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 1997.
71. Pazdro Z., Kozerski B., Hydrogeologia ogólna, Wydanie IV uzupełnione, Wydawnictwo Geologiczne, Warszawa 1990.
72. Persoone G. et al.: A Practical And User-Friendly Toxicity Classification System With Microbiotests For Natural Waters And Wastewaters. Environ Toxicology. Dec;18(6): 395 – 402. 2003.

73. Persoone G., Marsalek B., Blinova I., Törökne A., Zarina D., Manusadzianas L., Nałęcz-Jawecki G., Tofan L., Stepanova N., Tothova1 L., Kolar B.; Praktyczna i prosta klasyfikacja poziomu toksyczności wód pitnych i ścieków przy użyciu systemów Microbiotest. Publikacja w internecie w Wiley InterScience www.interscience.wiley.com. DOI 10.1002/tox.10141, Wiley Periodicals Inc. © 2003.
74. Piotrowski J. K.: Podstawy toksykologii: Praca zbiorowa: Wyd: Naukowo – Techniczne, Warszawa 2006.
75. PN-EN ISO 6341; Jakość wody; Określenie ograniczenia ruchliwości *Daphnia Magna* Stratus (Cladocera, Crustacea), Test toksyczności ostrej. PKN – Warszawa 2002.
76. Projekt załącznika do rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 28 lipca 2003 r. (Dz. U. Nr 232, poz. 2342 i 2343), Metody Przeprowadzania Badań Właściwości Fizykochemicznych, Toksyczności I Ekotoksyczności Substancji I Preparatów Chemicznych C.20. Rozmnażanie Rozwielitki (*Daphnia Magna Sp.*), Warszawa 2003.
77. Prygiel J., Haury J., Monitoring Methods Based in Algae and Macrophytes: Biological Monitoring of Rivers: Application and Perspectives, Editor Wiley, West Sussex, England, 2006.
78. Przymus-Wicherkiewicz M., Górski J.: Migracja zanieczyszczeń w obrębie odkrytego sandrowego zbiornika wodonośnego. Zesz. Nauk. AGH. Sozologia i Sozotechnika. Kraków. nr 31. s. 209-214. 1991.
79. Rejmer P.; Podstawy ekotoksykologii, Wyd: Ekoinżynieria, Lublin 1997.
80. Rodkiewicz B.; Biologia rozwoju w zarysie, PWN, Warszawa 1998.
81. Rogers K. R.; Biosensors for Environmental applications; USEPA, Environmental Monitoring System Laboratory, Biosensors & Bioelectronics 533-541, Las Vegas 1995.
82. Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 28 lipca 2003 r. (Dz. U. Nr 232, poz. 2342 i 2343), Metody przeprowadzania badań właściwości fizykochemicznych, toksyczności i ekotoksyczności substancji i preparatów chemicznych. (Biuro Specjacji i Preparatów). Warszawa 2003.
83. Rozporządzenie Ministra Ochrony Środowiska, Zasobów Naturalnych i Leśnictwa z dnia 5 listopada, Dz. Ust. Nr 116 poz. 503, w sprawie klasyfikacji wód oraz warunków, jakim powinny odpowiadać ścieki wprowadzane do wód 1991.
84. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 11 lutego 2004 r. W sprawie klasyfikacji dla prezentowania stanu wód powierzchniowych i podziemnych, sposobu prowadzenia

- monitoringu oraz sposobu interpretacji wyników i prezentacji stanu tych wód (Dz. U. z dnia 1 marca 2004 .
85. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 11 lutego 2004 r. w sprawie klasyfikacji dla oceny stanu wód powierzchniowych i podziemnych, sposobu prowadzenia monitoringu oraz sposobu interpretacji wyników i prezentacji stanu tych wód (Dz. U. z dnia 1 marca 2004.
86. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 27 listopada w sprawie wymagań, jakim powinny odpowiadać wody powierzchniowe wykorzystywane do zaopatrzenia ludności w wodę przeznaczoną do spożycia (Dz. U.Nr 204/2002 poz.1728). 2002.
87. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 4 września, w sprawie warunków jakie powinna spełniać woda do picia, Dz. Ust. Nr 87 poz. 937. 2000.
88. Sadowska A., Obidowska G., Rumowska M.; Ekotoksykologia – toksyczne czynniki środowiskowe i metody ich wykrywania. Wyd: SGGW, Warszawa 2000.
89. Saniullah Y.; Biological Monitoring Animals, A Technical Report (Prepared by: GEMS-Monitoring and Assessment Research Center – King’s College London, University of London). Marc Report Number 37. 1990.
90. Scardi M., Tancioni L., Cataudella S.; Monitoring Methods Based on Fish: Biological Monitoring of Rivers; Editor Wiley, West Sussex, England, 2006.
91. Siegmund S. Zakrzewski; Podstawy toksykologii środowiska: PWN: Warszawa 1995.
92. Sienko J. Michell, Plane A. Robert; Chemia podstawy i zastosowania, Wyd. Naukowo Techniczne, Warszawa 2002.
93. Sims, I.R., Watson, S. and Holmes, D., Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environ. Toxicol. and Chem., 12, 2053-2058. 1993.
94. Skrzypski J. – Hydrosfera – źródła i rodzaje zanieczyszczeń, sposoby jej ochrony, str. 30 – 50, Ekologia jej związki z różnymi dziedzinami wiedzy, pod redakcją Kurnatowskiej A., PWN Warszawa 1997.
95. Sozański M., Olszanowski A., Kaczorek E., Dziadura E., Cebulski Z., Biodegradacja węglowodorów alifatycznych w obecności emulgatora AT 7.; Technologie odolejania gruntów, odpadów, ścieków; Konferencja Naukowo – Techniczna (PTIE), str. 81 – 90. Wyd. Ekoinżynieria – Gorlice 1997.
96. Specyfikacja biotestu; *Mikrobiotest toksyczności chronicznej* PROTOXKIT<sup>FTM</sup>; <http://www.tigret.pl>, *MicroBioTests Inc., Nazareth, Belgium*, Tigret Warszawa 2002.
97. Specyfikacja biotestu; *Mikrobiotest toksyczności chronicznej* THAMNOTOXKIT<sup>FTM</sup>, <http://www.tigret.pl>, *MicroBioTests Inc., Nazareth, Belgium*, Tigret Warszawa 2002.
-

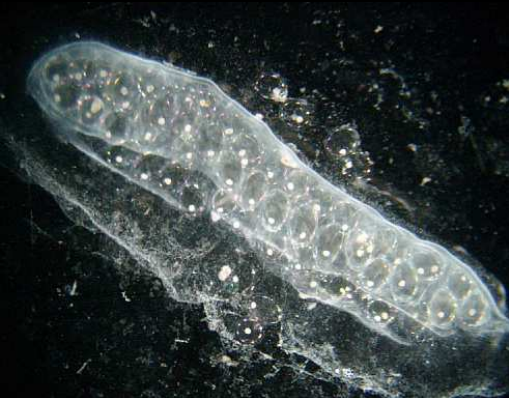







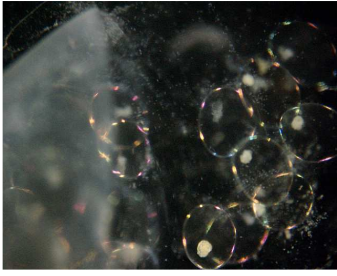

98. Starmach J., Mazurkiewicz – Boroń G.; Zbiornik dobczycki, ekologia – eutrofizacja – ochrona, Wyd: PAN, Kraków 2000.
99. Synowiec K., Głowska A., Cieśla G., Reczek T.; Ocena jakości wód Powierzchniowych w województwie małopolskim w roku 2006; Wyd: Wojewódzki Inspektorat Ochrony Środowiska w Krakowie, Kraków 2007.
100. Tadeusiewicz R., Dobrowolski J. W., Współczesne poglądy na kancerogenezę; Ginekologia Polska T. LVII, Nr. 12, ss.: 771 – 777, 1986.
101. Treder W.; jakość wody do nawadniania i filtrowanie, Szkółkarstwo, nr. 4, (<http://www.szkolkarstwo.pl/article.php?id=617>). 2004.
102. Umiński T. Ekologia środowiska przyrodniczego - Jeziora umierają od skażeń, WSiP, Warszawa 1995.
103. Vaidya D. P., Nagabhushanam R., Observations on the hatching process and salt and water regulation in the embryos of the freshwater snail *Indoplanorbis exustus*, Hydrobiologia Pub. Springer Netherlands, P. 241 – 244, Volume 65, Number 3/ August, 1979.
104. Villee A. C., Solomon E. P., Berg L. R., Martin D.W.; Biology, Saunders College Publishing, USA 1998.
105. Villegas – Navarro A., Romero Gonzalez M. C., Rosas Lopez E., Dominguez Aguilar R., Sachetin Marcal W.; Evaluation of *Daphnia magna* as an indicator of toxicity and treatment efficacy of textile wastewaters, Environment International, Vol. 25, No. 5, pp. 619-624, Elsevier Science Ltd USA 1999.
106. Wagner A. - Influence of sewage from different water treatment plants in the Cracow Region (Poland) on early developmental stages of water snails; Lakes & Reservoirs: Research and Management, Volume 5, Number 2, June, pp. 83-88(6), Publisher: Blackwell Publishing. 2000.
107. Walker C. H., Hopkin S. P., Sibly R. M., Peakall D. B.; Podstawy ekotoksykologii, PWN – Warszawa 2002.
108. Wójcik M.; Biologiczna analiza wód: Przyroda, Warszawa 2004.
109. Zarzycki Roman – Aerosfera – źródła i rodzaje zanieczyszczeń, sposoby jej ochrony, str. 12 – 29, Ekologia jej związki z różnymi dziedzinami wiedzy, pod redakcją Kurnatowskiej A., PWN Warszawa 1997.
110. Zimny H.; Ekologiczna ocena stanu środowiska, bioindykacji i biomonitoring, Wyd: A. R.-W. A.G, Warszawa 2006.





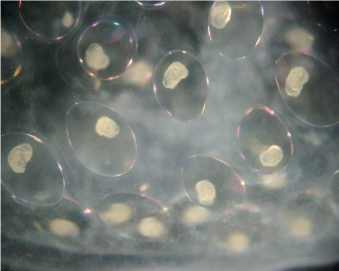
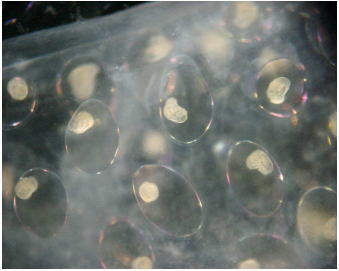


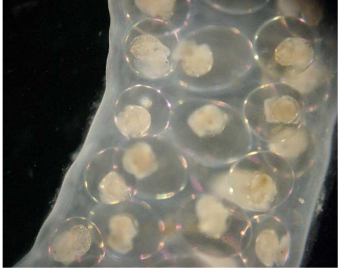


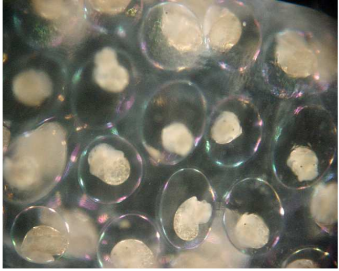

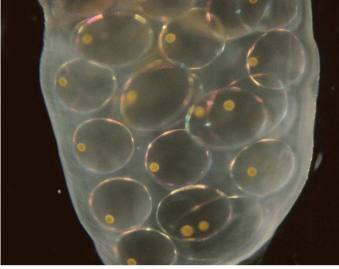
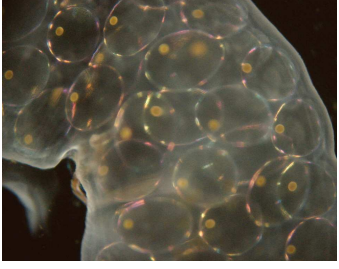
*Dokumentacja fotograficzna (przykładowa zdjęcia dla testów toksyczności ostrej - Brije)*

*Lymnaea stagnalis* (rozwój zarodkowy)

**Brij 35 - Kokony stęż.-mg/l**

A1	190			
B1	152			
C1	122			
D1	97,2			

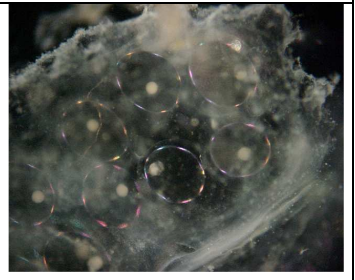
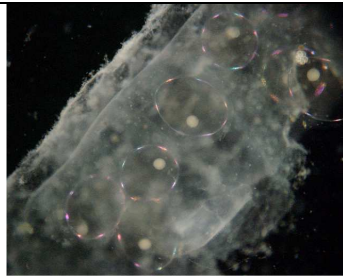


E1	77,8			
F1	62,2			
G1	49,8			
H1	39,9			
Kont	0			

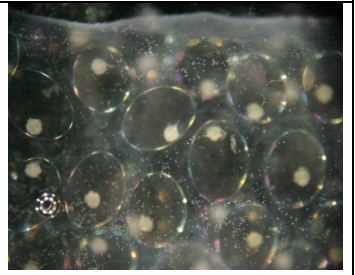
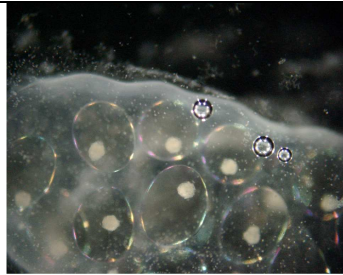


**Brij 58 - Kokony stež.-mg/l**

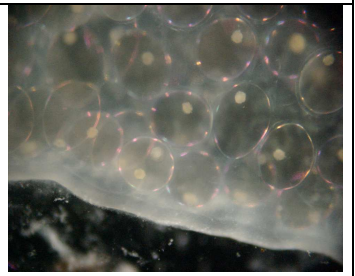
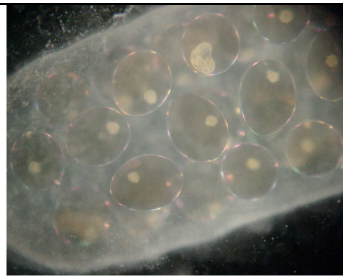
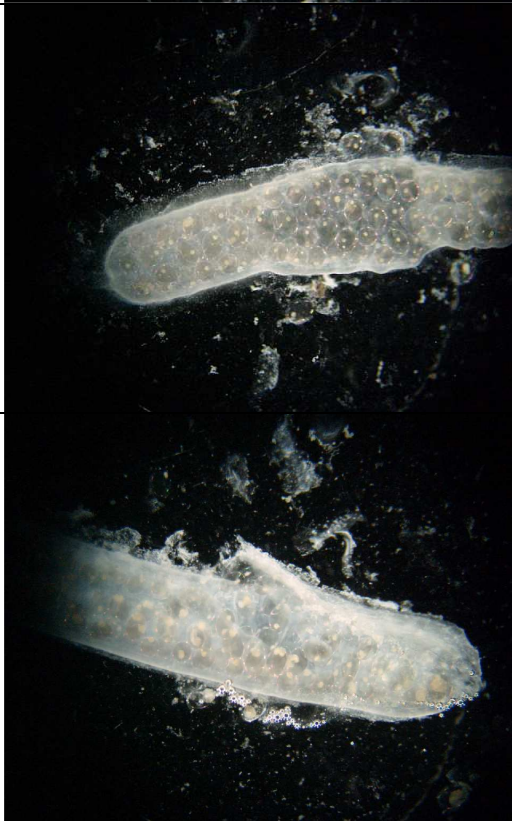
A1 259



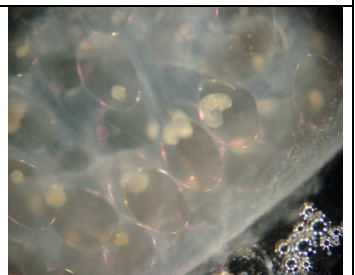
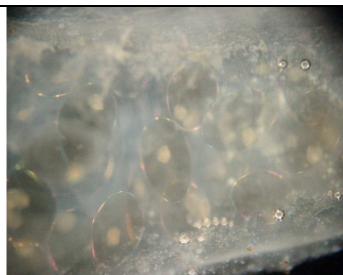
B1 232



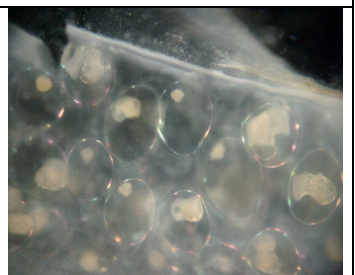
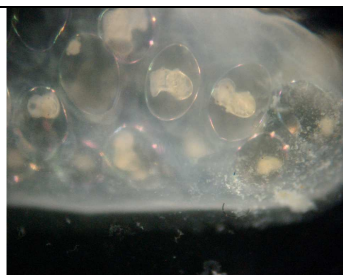
C1 185




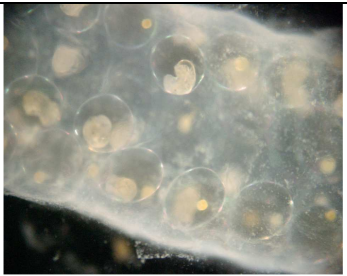
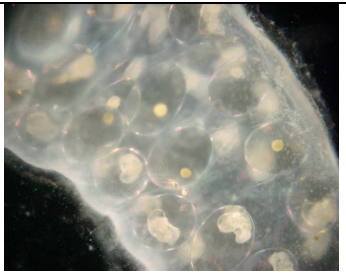

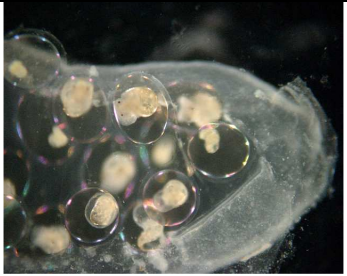


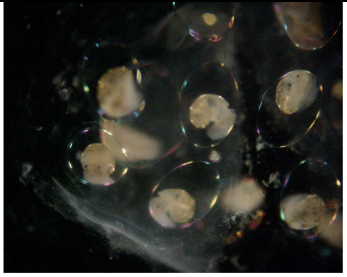
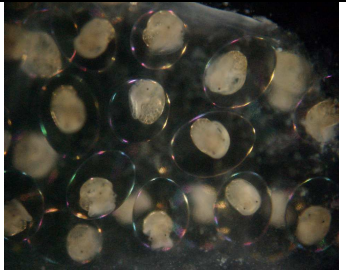

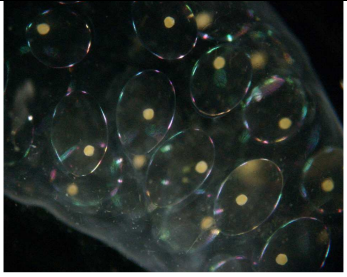


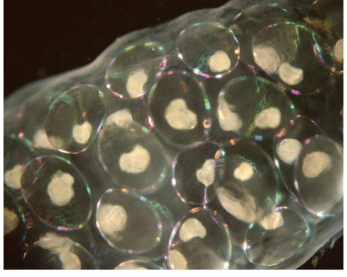
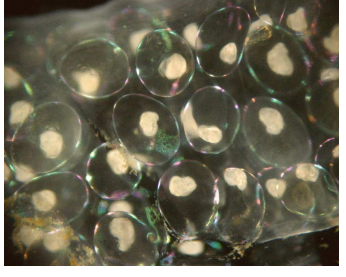
D1 148



E1 118





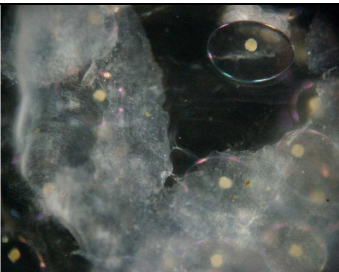





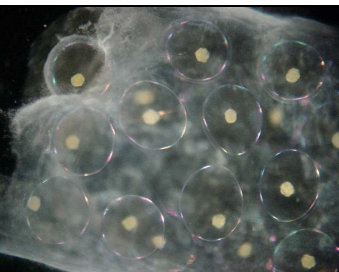
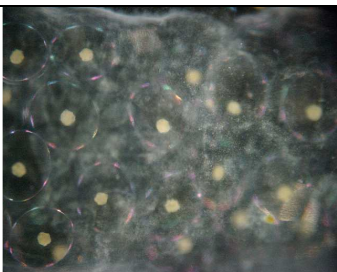

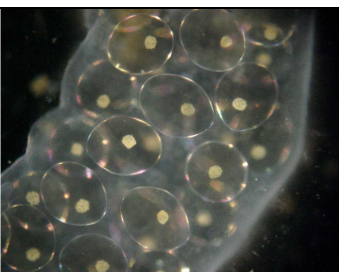







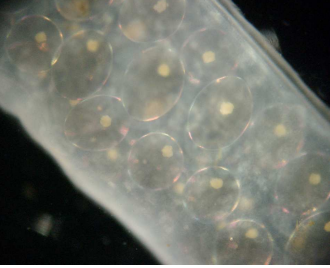

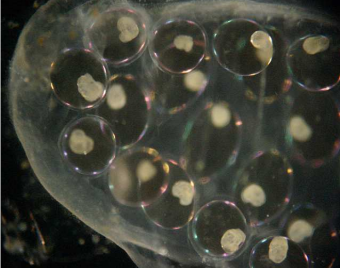
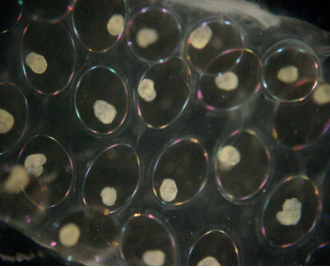

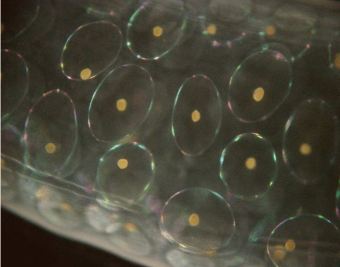
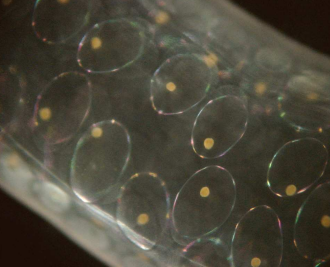

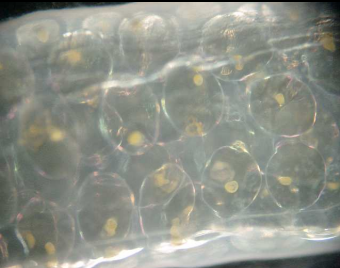

F1	95			
G1	76			
H1	60			
II	48			
Kont	0			

**Brij 72 - Kokony stęż.-mg/l**


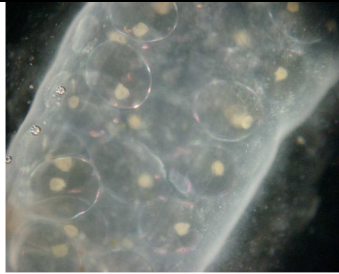
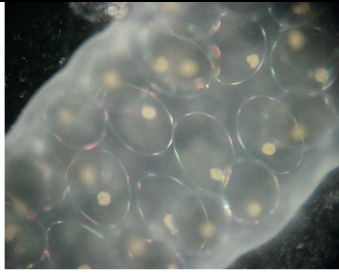


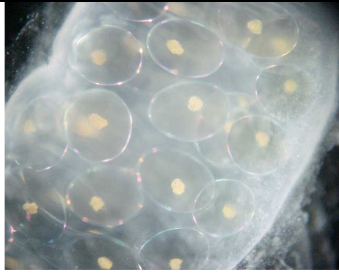

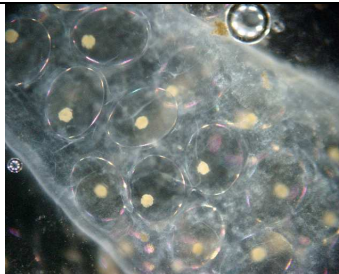
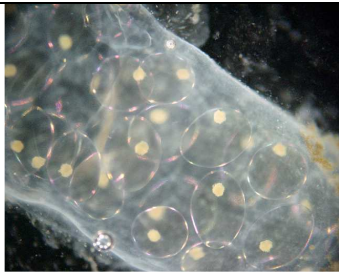
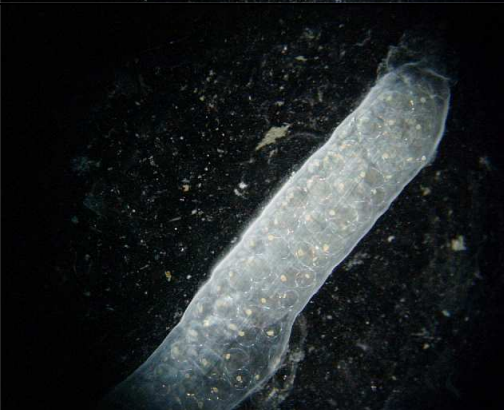
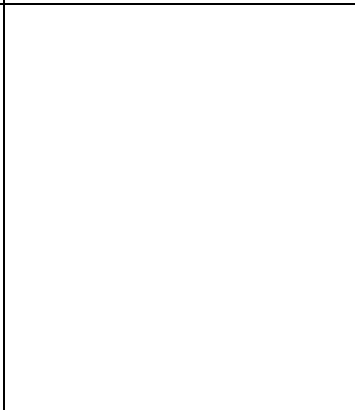


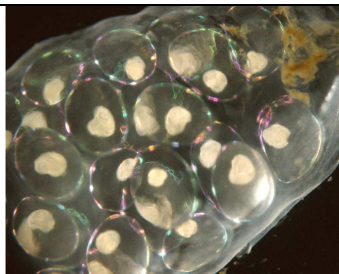
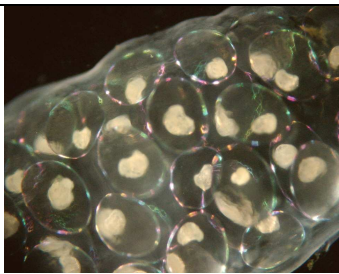


A1	195			
B1	156			
C1	124			
D1	100			
E1	80			

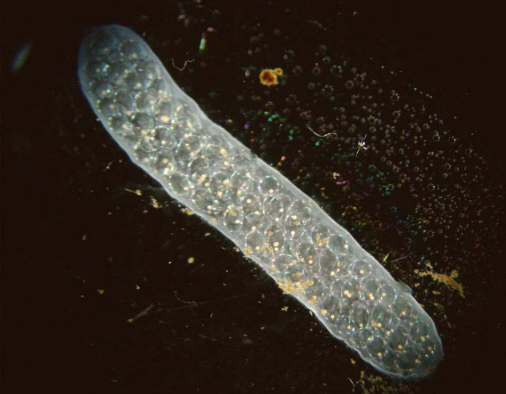

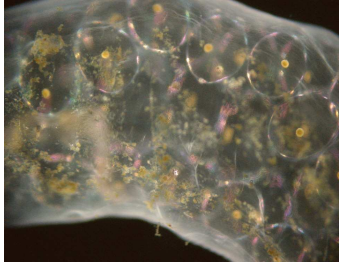

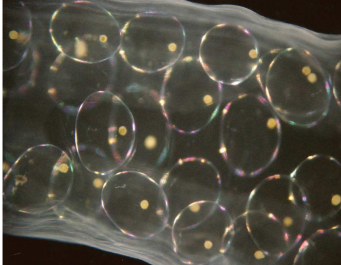
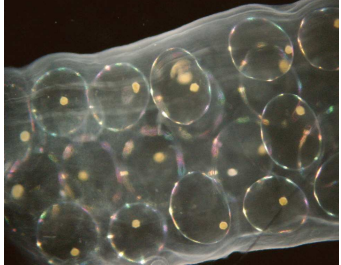
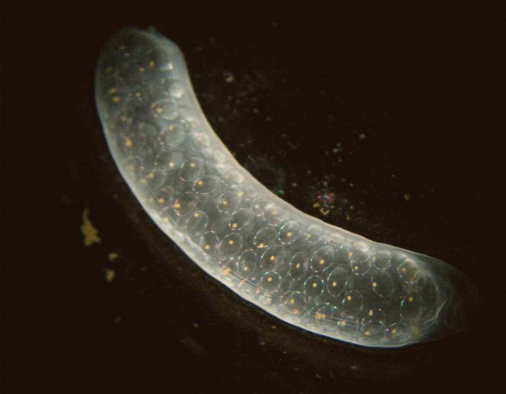
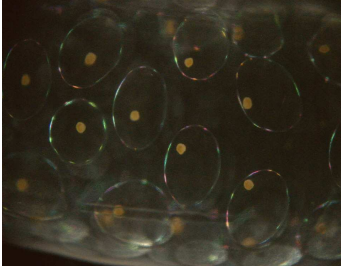
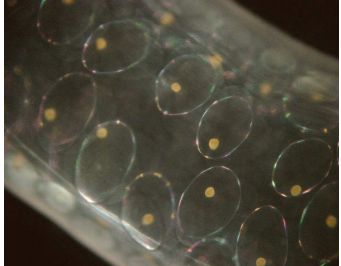
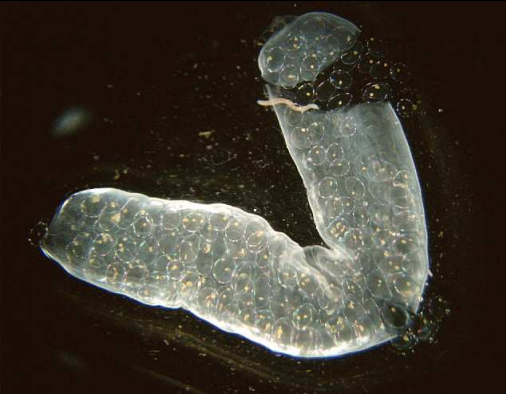




F1	64			
G1	51,2			
Kont	0			
<b>Brij 76 - Kokony stęż.-mg/l</b>				
I4	180			





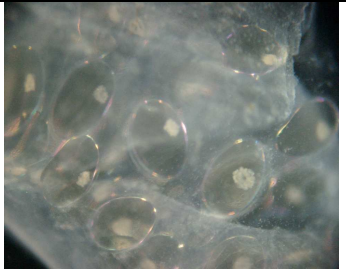





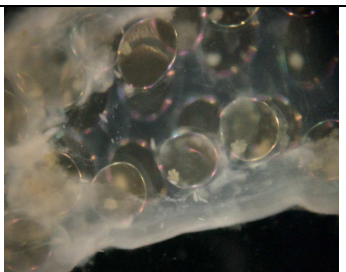


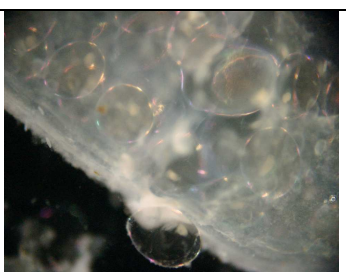

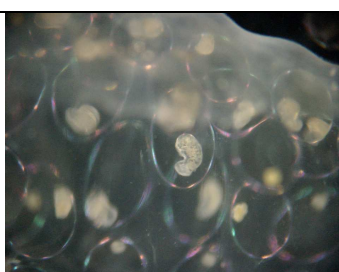
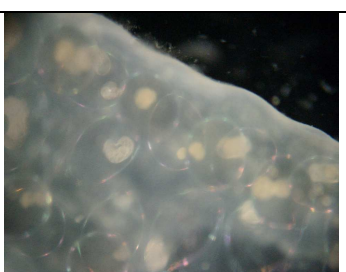
K4	8			
L4	6,4			
M4	5,12			
N4	4,09			
O4	3,28			




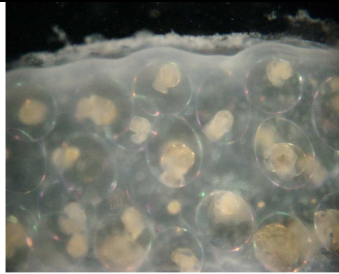


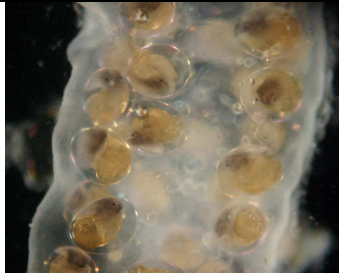
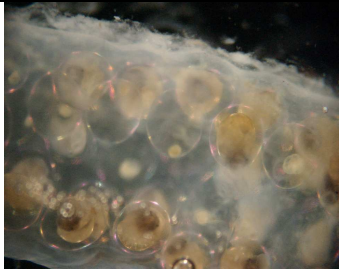

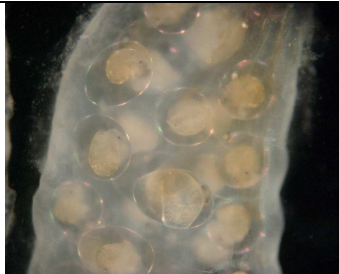
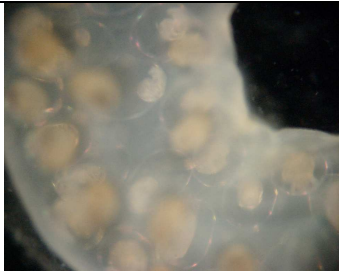


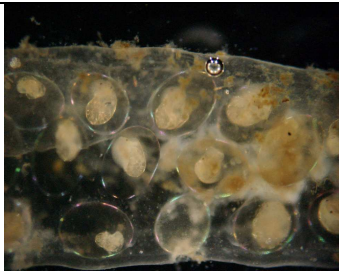

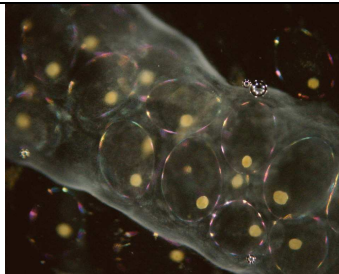
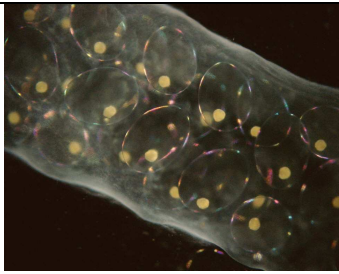
P4	2,62			
R4	2,1			
S4	1,66			
Kont	0			

**Brij 78 - Kokony stež.-mg/l**



A1	180			
B1	144			
C1	115			
D1	92,1			
E1	73,7			



F1	58,9			
G1	47,1			
H1	37,7			
II	30,1			
Kont	0			

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

A



B





C



D



E



F





G



H



I

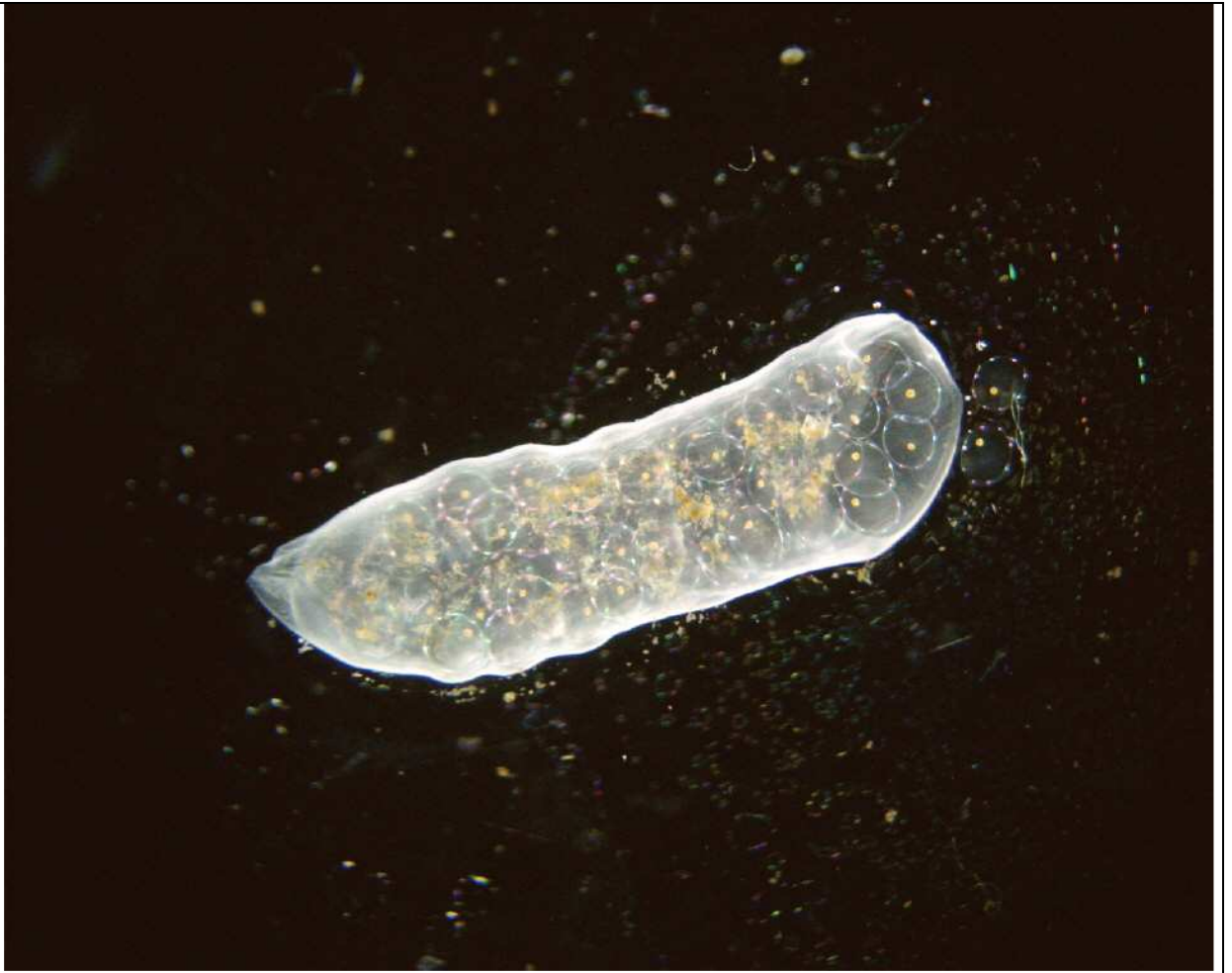


J





Kont



HNO<sub>3</sub>

A





B



C



D



E





F



G



Kont



Amoniak

A





B



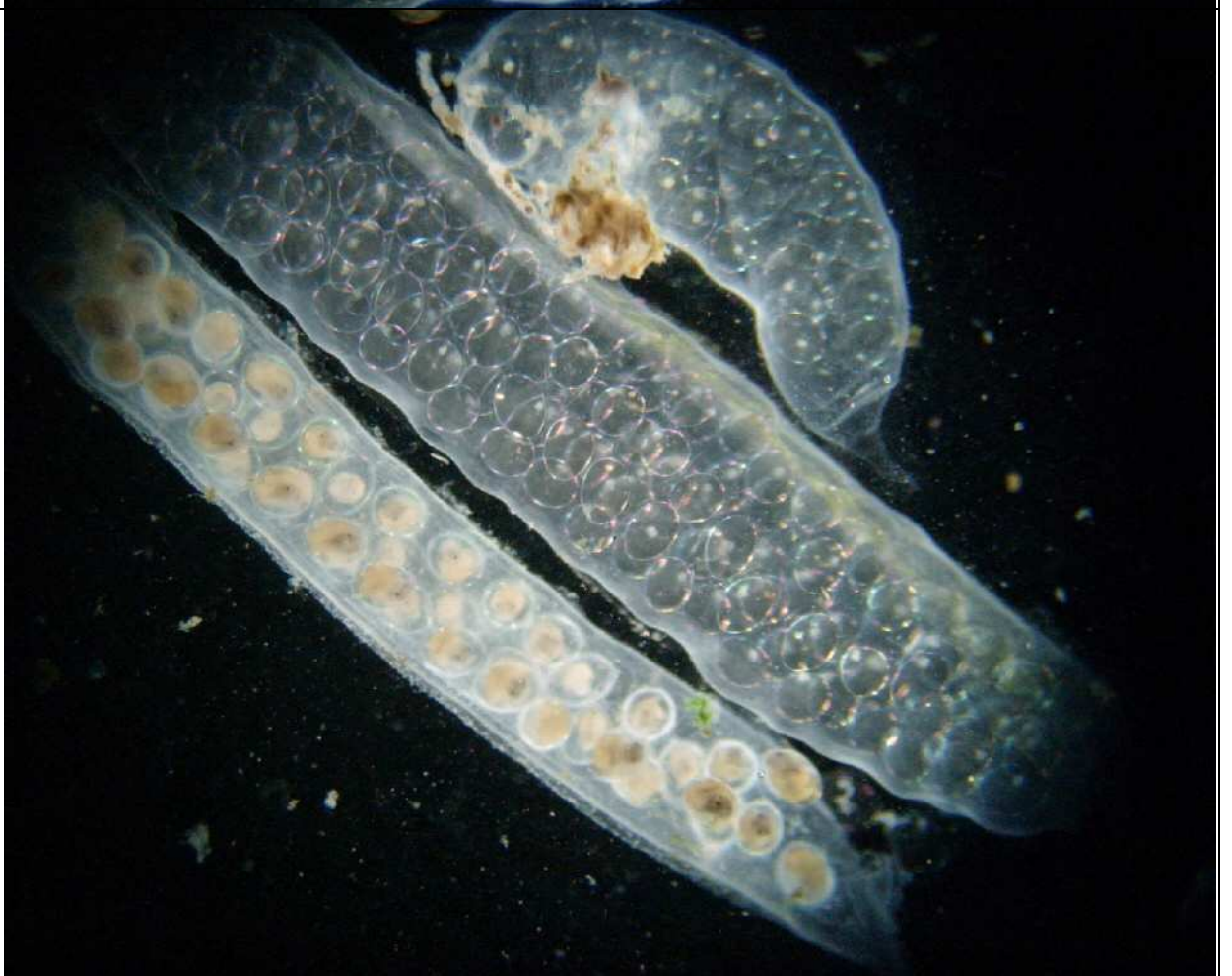
C



D



E





F



G





H



Kont





Ludwik

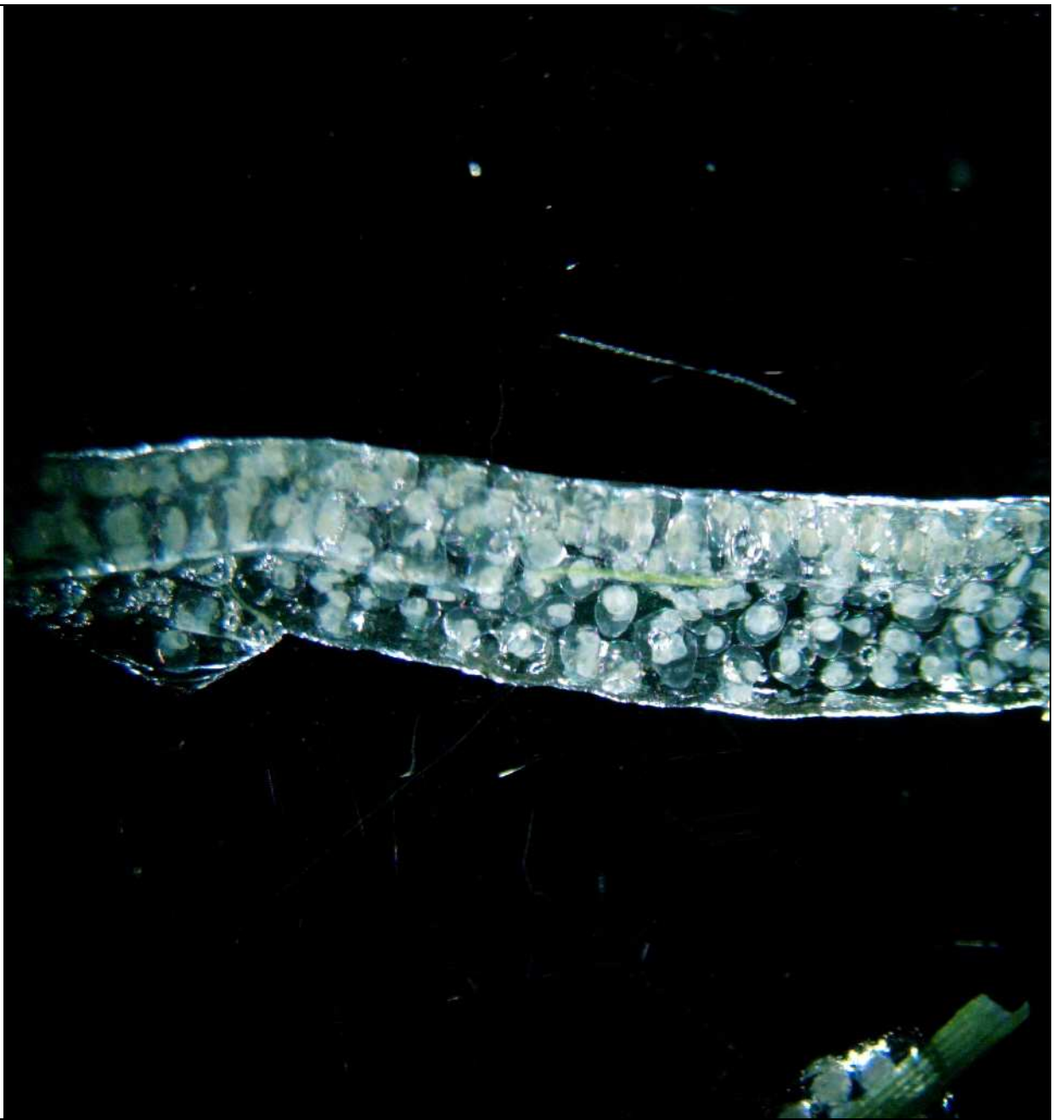
A



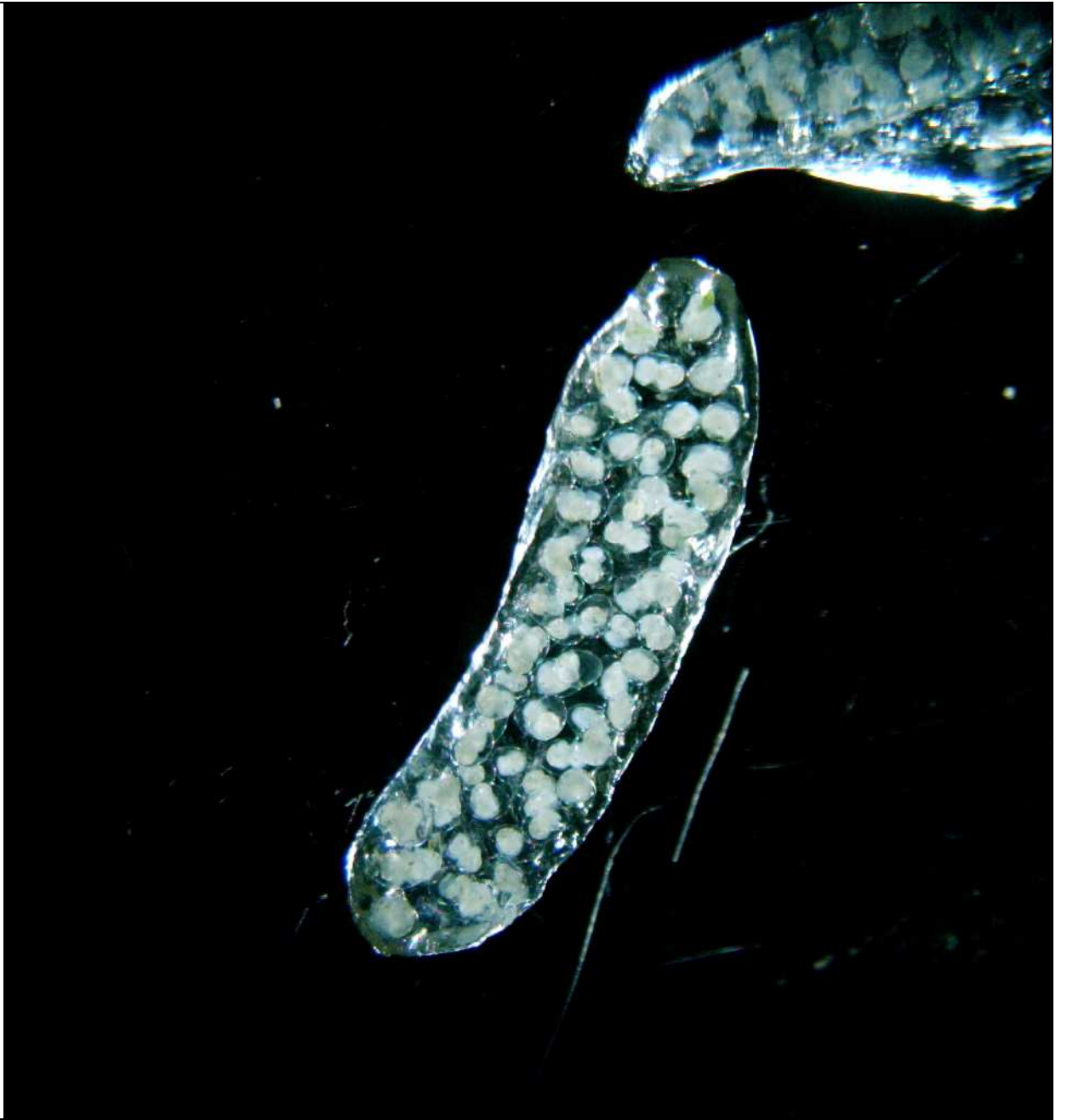
B



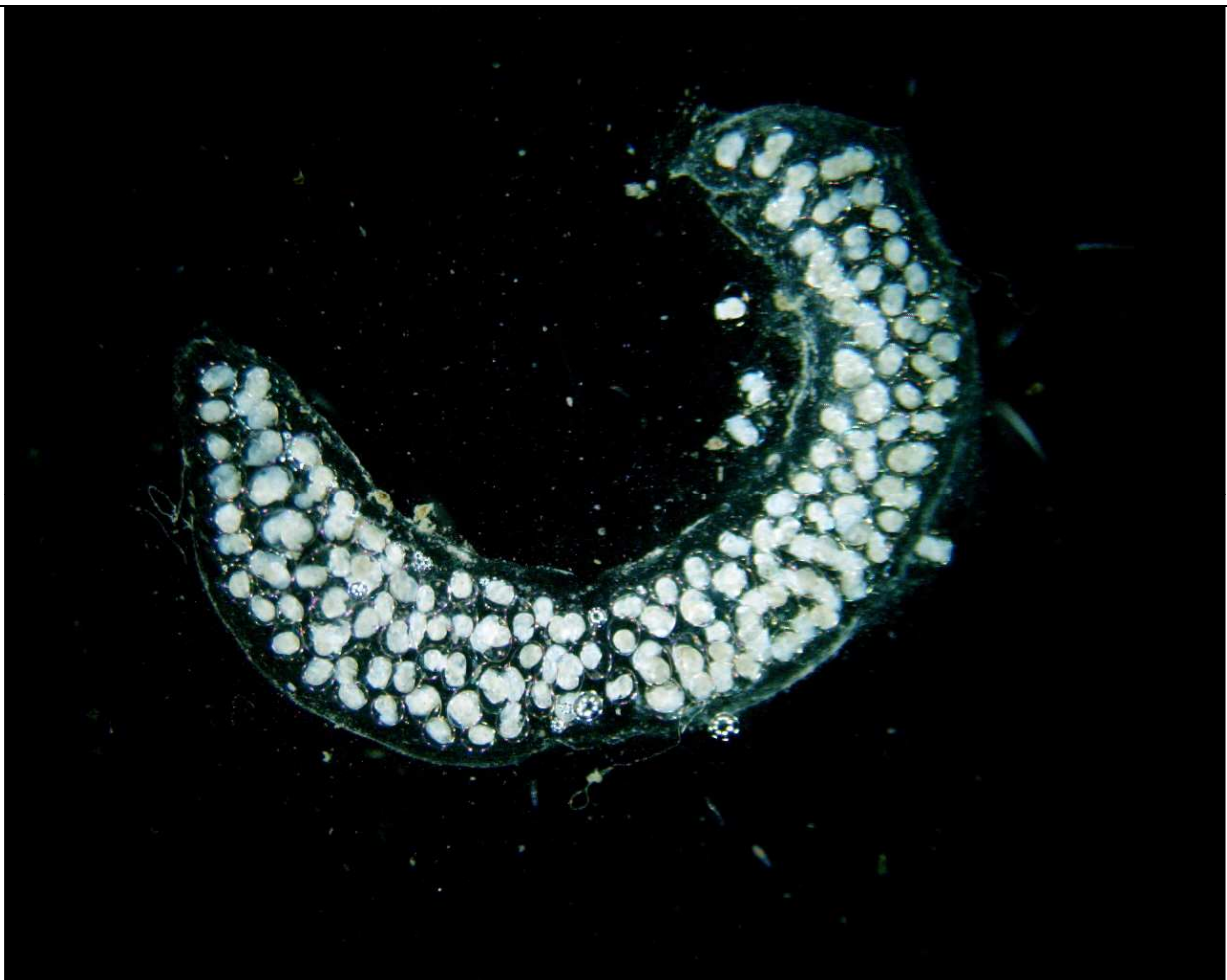
C



D



E



F





G



H



Kont

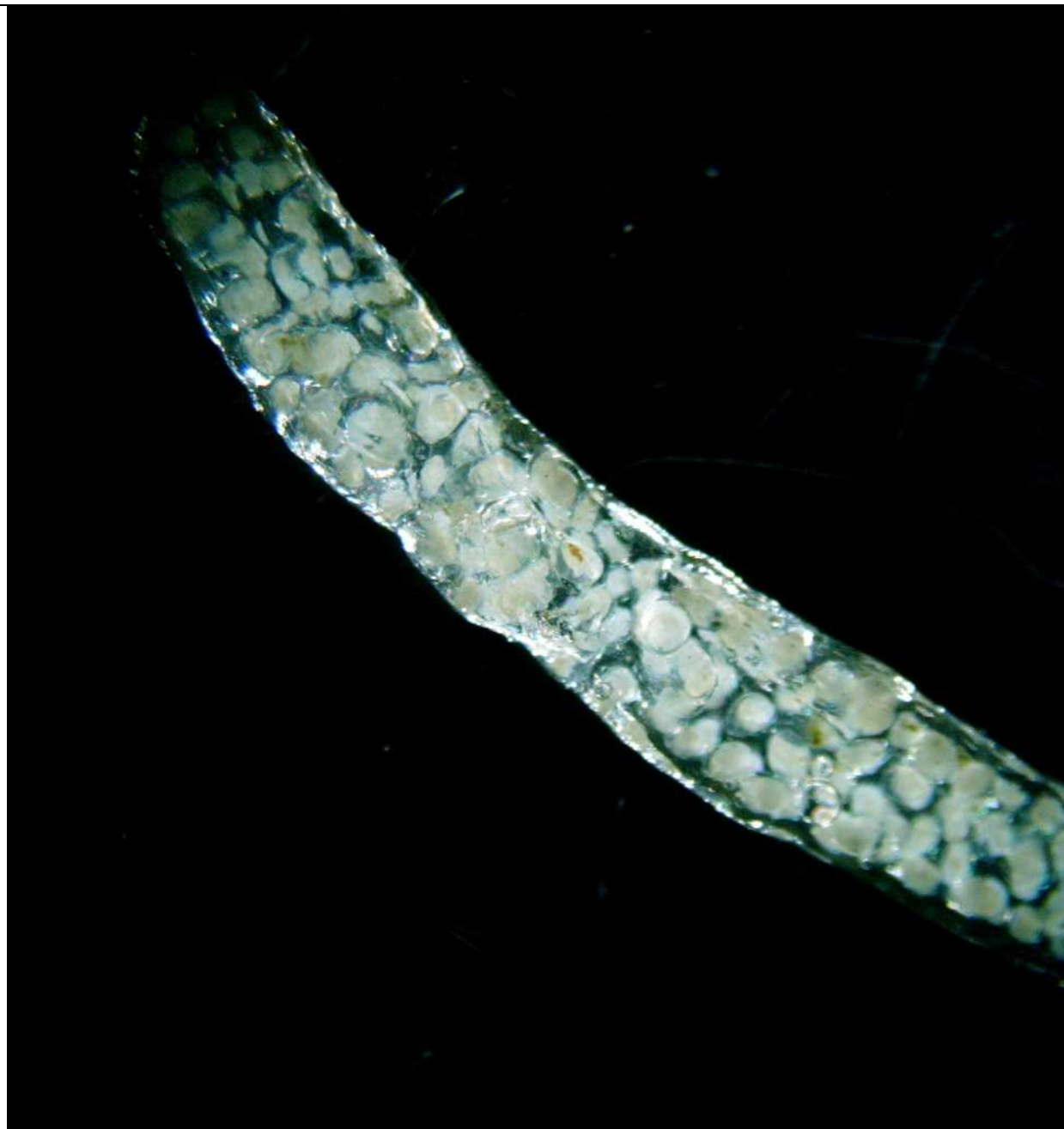


NaCl

A



B





C



D



E



F





G



Kont



KCl

A



B





C



D



E



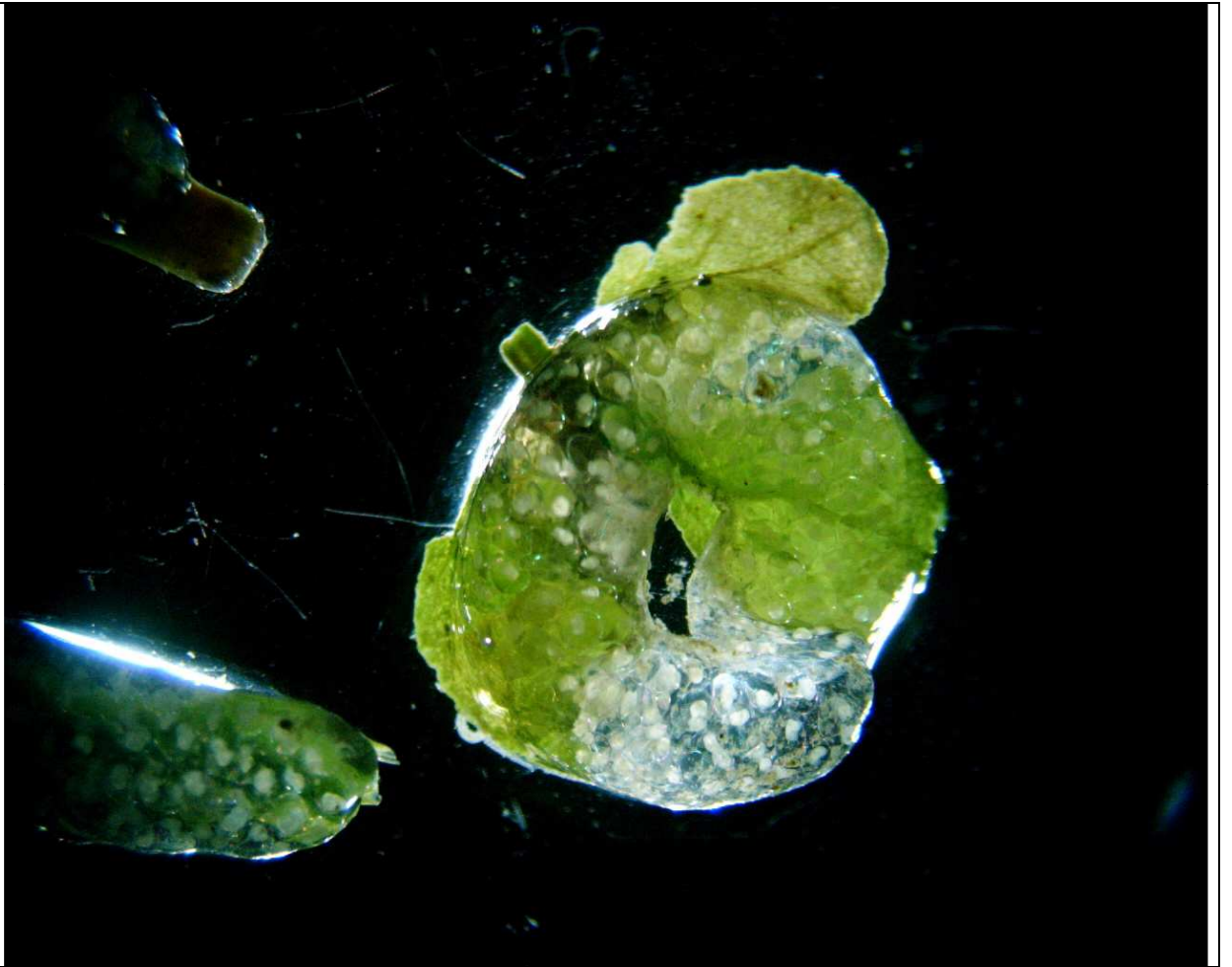
F



G



Kont



### Woda uzdatniona w bioreaktorze:

Bioreaktor stanowią akwaria napowietrzane z podłożem na żwirze oraz bioróżnorodnością (rośliny, rybki, ślimaki). Woda jest biologizowana i bardzo dobrze nadaje się do przygotowywania roztworów badanych substancji oraz ich rozcieńczania. Dodatkowy filtr wewnętrzny utrzymuje dobre parametry dla optymalnego rozwoju organizmów wodnych.



Fig: Akwaria będące zarazem bioreaktorem dającym możliwość pozyskiwania wody do testów toksyczności ostrej.

Wyznacznikiem jakości wody w bioreaktorze zaadaptowanym na bazie akwariowej hodowli jest ocena stopnia aktywności życiowej i reprodukcji organizmów akwariowych.

W badaniach pilotażowych to właśnie woda z bioreaktora dawała lepsze efekty w przygotowywaniu testów toksyczności ostrej niż woda przygotowana zgodnie z procedurą Normy ISO 6341-1996. Kontrola w wodzie uprzednio biologizowanej wykazywała okresie testu wysoką żywotność (100 – 96%). Efekty toksyczne ściśle zależały od charakteru użytego toksykanta.





Fig; Bioróżnorodność wyznacznikiem jakości wody.

Bioróżnorodność oraz intensywny prężny rozwój organizmów akwariowych są wyznacznikiem jakości wody w zbiorniku. Woda uzdatniona i biologizowana w dłuższym okresie przynajmniej 1,5 miesiąca ma najbardziej optymalne parametry do utrzymania i rozwoju życia organizmów akwariowych, jest to woda o bardzo dobrej jakości w kategorii parametrów biologicznych.

Ilość wody pobranej nie jest wysoka ale wystarczająca dla wykonania 3 serii biotestów, uzupełnienie pobranej ilości wody nie wymaga już 1,5 miesięcznego uzdatniania wystarczy ok. 1 tydzień. Dla laboratoriów wykonujących analizy ciągłe i wymagających stałego poboru wody do testów zaleca się wykonania systemu bioreaktorów połączonych z odbiornikiem oraz stałym źródłem uzupełniania. [44].

Wymagane parametry wody uzdatnionej:

- Odczyn wody powinien utrzymywać się w granicach (pH) 7 – 8.
- Przeżywalność skorupiaków *Daphnia magna* 96h.
- Twardość ogólna 2,5 – 5,0 mval/l (w przypadku przekroczenia twardości powyżej normy można zastosować żywicę jonowymienną „Aquafix” wymienniacz jonowy TwW – woreczek przepływowy. Gwarantuje utrzymanie pożądanej twardości przez okres 3 miesięcy).
- Natlenianie zapewnia utrzymanie optymalnego nasycenia O<sub>2</sub> – przynajmniej 8mg/l.
- Temp. ok. 20°C.

**ROZPORZĄDZENIE MINISTRA ŚRODOWISKA**

**z dnia 11 lutego 2004 r.**

**w sprawie klasyfikacji dla prezentowania stanu wód powierzchniowych i podziemnych,  
sposobu prowadzenia monitoringu oraz sposobu interpretacji wyników i prezentacji  
stanu tych wód**

**(Dz. U. Nr 32, poz. 284)**

Na podstawie art. 49 ust. 4 pkt 1 i 2 lit. a-c i lit. e-g oraz pkt 3 ustawy z dnia 18 lipca 2001 r. - Prawo wodne (Dz. U. Nr 115, poz. 1229, z późn. zm.) zarządza się, co następuje:

§ 1. 1. Rozporządzenie określa:

1) klasyfikację dla prezentowania stanu:

- a) wód powierzchniowych,
- b) wód podziemnych;

2) sposób prowadzenia monitoringu stanu wód powierzchniowych i podziemnych, uwzględniający:

- a) kryteria wyznaczania punktów poboru próbek do badań,
- b) zakres i częstotliwość badań,
- c) wybór elementów jakości,
- d) metodyki referencyjne badań oraz warunki zapewnienia jakości danych,
- e) sposób oceny wyników badań,
- f) zakres badań jakości wód powierzchniowych i podziemnych wykonywanych przez Głównego Inspektora Ochrony Środowiska;

3) sposób interpretacji wyników i prezentacji stanu wód powierzchniowych i podziemnych.

§ 2. 1. Wprowadza się klasyfikację dla prezentowania stanu wód powierzchniowych obejmującą pięć klas jakości tych wód, z uwzględnieniem kategorii jakości wody A1, A2 i A3, określonych w przepisach w sprawie wymagań, jakim powinny odpowiadać wody powierzchniowe wykorzystywane do zaopatrzenia ludności w wodę przeznaczoną do spożycia:

1) klasa I - wody o bardzo dobrej jakości:

a) spełniają wymagania określone dla wód powierzchniowych wykorzystywanych do zaopatrzenia ludności w wodę przeznaczoną do spożycia, w przypadku ich uzdatniania sposobem właściwym dla kategorii A1,

b) wartości wskaźników jakości wody nie wskazują na żadne oddziaływania antropogeniczne;

2) klasa II - wody dobrej jakości:

a) spełniają w odniesieniu do większości wskaźników jakości wody wymagania określone dla wód powierzchniowych wykorzystywanych do zaopatrzenia ludności w wodę przeznaczoną do spożycia, w przypadku ich uzdatniania sposobem właściwym dla kategorii A2,

b) wartości biologicznych wskaźników jakości wody wykazują niewielki wpływ oddziaływań antropogenicznych;

3) klasa III - wody zadowalającej jakości:

a) spełniają wymagania określone dla wód powierzchniowych wykorzystywanych do zaopatrzenia ludności w wodę przeznaczoną do spożycia, w przypadku ich uzdatniania sposobem właściwym dla kategorii A2,

b) wartości biologicznych wskaźników jakości wody wykazują umiarkowany wpływ oddziaływań antropogenicznych;

4) klasa IV - wody niezadowalającej jakości:

a) spełniają wymagania określone dla wód powierzchniowych wykorzystywanych do zaopatrzenia ludności w wodę przeznaczoną do spożycia, w przypadku ich uzdatniania sposobem właściwym dla kategorii A3,

b) wartości biologicznych wskaźników jakości wody wykazują, na skutek oddziaływań antropogenicznych, zmiany ilościowe i jakościowe w populacjach biologicznych;

5) klasa V - wody złej jakości:



a) nie spełniają wymagań dla wód powierzchniowych wykorzystywanych do zaopatrzenia ludności w wodę przeznaczoną do spożycia,

b) wartości biologicznych wskaźników jakości wody wykazują, na skutek oddziaływań antropogenicznych, zmiany polegające na zaniku występowania znacznej części populacji biologicznych.

2. Podstawę określenia klas jakości wód powierzchniowych, o których mowa w ust. 1, stanowią wartości graniczne wskaźników jakości wody w klasach jakości wód powierzchniowych określone w załączniku nr 1 do rozporządzenia.

§ 3. 1. Wprowadza się trzy kategorie hydromorfologicznego stanu wód powierzchniowych: stan bardzo dobry, stan dobry, stan umiarkowany.

2. Sposób określania hydromorfologicznego stanu wód powierzchniowych oraz charakterystykę poszczególnych kategorii, o których mowa w ust. 1, określa załącznik nr 2 do rozporządzenia.

§ 4. 1. Wprowadza się klasyfikację dla prezentowania stanu wód podziemnych obejmującą pięć klas jakości tych wód, z uwzględnieniem przepisów w sprawie wymagań dotyczących jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi:

1) klasa I - wody o bardzo dobrej jakości:

a) wartości wskaźników jakości wody są kształtowane jedynie w efekcie naturalnych procesów zachodzących w warstwie wodonośnej,

b) żaden ze wskaźników jakości wody nie przekracza wartości dopuszczalnych jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi;

2) klasa II - wody dobrej jakości:

a) wartości wskaźników jakości wody nie wskazują na oddziaływania antropogeniczne,

b) wskaźniki jakości wody, z wyjątkiem żelaza i manganu, nie przekraczają wartości dopuszczalnych jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi;

3) klasa III - wody zadowalającej jakości:

a) wartości wskaźników jakości wody są podwyższone w wyniku naturalnych procesów lub słabego oddziaływania antropogenicznego,

b) mniejsza część wskaźników jakości wody przekracza wartości dopuszczalne jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi;

4) klasa IV - wody niezadowolającej jakości:

a) wartości wskaźników jakości wody są podwyższone w wyniku naturalnych procesów oraz słabego oddziaływania antropogenicznego,

b) większość wskaźników jakości wody przekracza wartości dopuszczalne jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi;

5) klasa V - wody złej jakości:

a) wartości wskaźników jakości wody potwierdzają oddziaływania antropogeniczne,

b) woda nie spełnia wymagań określonych dla wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi.

2. Podstawę określania klas jakości wód podziemnych, o których mowa w ust. 1, stanowią wartości graniczne wskaźników jakości wody w klasach jakości wód podziemnych określone w załączniku nr 3 do rozporządzenia.

§ 5. 1. Stan ilościowy wód podziemnych określa wielkość rezerw zasobów wodnych, w granicach regionu wodnego.

2. Stan ilościowy wód podziemnych ustala się, porównując wielkość ustalonych zasobów dyspozycyjnych wód podziemnych wyrażonych w  $m^3/d$  z:

1) wielkością rzeczywistego średniego poboru wody w danym roku wyrażonego w  $m^3/d$  albo

2) wielkością poboru wody w danym roku wynikającego z pozwoleń wodnoprawnych wyrażonego w  $m^3/d$ .

3. Stan ilościowy wód podziemnych uznaje się:

1) za słaby, gdy średni pobór w roku jest równy lub wyższy od zasobów dyspozycyjnych;

2) za dobry, gdy zasoby dyspozycyjne są wyższe od średniego poboru w roku.

§ 6. 1. Monitoring stanu wód powierzchniowych prowadzi się w następujących zakresach:

1) diagnostycznym - monitoring diagnostyczny;

2) operacyjnym - monitoring operacyjny;

3) badawczym - monitoring badawczy.

2. Zakres badań prowadzonych w monitoringu diagnostycznym obejmuje określenie w wodach powierzchniowych wartości wszystkich wskaźników jakości wody określonych w załączniku nr 1 do rozporządzenia.

3. W monitoringu diagnostycznym badania wskaźników jakości wody, o których mowa w ust. 2, prowadzi się z częstotliwością:

1) jeden raz na miesiąc - w odniesieniu do wskaźników fizycznych, wskaźników tlenowych, wskaźników biogennych, wskaźników zasolenia i wskaźników mikrobiologicznych;

2) jeden raz na kwartał - w odniesieniu do wskaźników biologicznych oraz metali, w tym metali ciężkich;

3) jeden raz na rok - w odniesieniu do wskaźników zanieczyszczeń przemysłowych oraz wskaźników biologicznych - makrobezkręgowców bentosowych.

4. W przypadku stwierdzenia na podstawie rozpoznania oddziaływań antropogenicznych obecności w wodach substancji szczególnie szkodliwych dla środowiska wodnego lub prawdopodobieństwa ich obecności, zakres badań prowadzonych w monitoringu diagnostycznym rozszerza się o te substancje; w przypadku stwierdzenia ich obecności, badania, z wyjątkiem kadmu i rtęci, należy prowadzić z częstotliwością jeden raz na miesiąc, aż do stwierdzenia braku obecności tych substancji na poziomie przekraczającym próg oznaczalności.

5. Zakres i częstotliwość badań prowadzonych w monitoringu operacyjnym określa się, uwzględniając wyniki badań uzyskane w ramach monitoringu diagnostycznego.

6. Zakres i częstotliwość badań prowadzonych w monitoringu badawczym określa się każdorazowo w razie konieczności zidentyfikowania zanieczyszczeń przypadkowych lub spowodowanych awarią.

§ 7. 1. Przy wyznaczaniu punktów poboru próbek do badań wód powierzchniowych uwzględnia się kryteria obejmujące warunki wyboru oraz lokalizację i ilość punktów w obrębie badanego ciek naturalnego, jeziora lub sztucznego zbiornika wodnego.

2. Monitorowaniem obejmuje się wody powierzchniowe, które spełniają co najmniej jeden z następujących warunków:

1) posiadają zlewnie o powierzchni większej niż 2.500 km<sup>2</sup>;

2) posiadają zlewnie o powierzchni mniejszej niż 2.500 km<sup>2</sup>, lecz są ważne ze względu na dynamikę przepływu wody;

3) przekraczają lub stanowią granice państwa;

4) stanowią podstawę oszacowania wielkości ładunków zanieczyszczeń przekraczających granice państwa lub wprowadzanych do środowiska morskiego Bałtyku.

3. Lokalizacja i liczba punktów poboru próbek do badań wód w obrębie badanego ciek, jeziora lub sztucznego zbiornika wodnego ma zapewnić:

- 1) reprezentatywność wpływu zagrożeń wywołanych przez punktowe i rozproszone źródła zanieczyszczeń;
- 2) przeprowadzenie oceny wpływu oddziaływań punktowego źródła zanieczyszczeń;
- 3) przeprowadzenie oceny wpływu oddziaływań wielu punktowych źródeł zanieczyszczeń;
- 4) przeprowadzenie oceny wpływu oddziaływań wywieranych przez obszarowe źródła zanieczyszczeń.

4. Pobieranie próbek do badań wód powierzchniowych prowadzi się zgodnie z odpowiednimi Polskimi Normami.

§ 8. 1. Monitoring stanu wód podziemnych prowadzi się w następujących zakresach:

- 1) diagnostycznym - monitoring diagnostyczny;
- 2) operacyjnym - monitoring operacyjny;
- 3) badawczym - monitoring badawczy.

2. Zakres badań prowadzonych w monitoringu diagnostycznym obejmuje określenie w wodach podziemnych wartości wskaźników jakości wody, określonych w załączniku nr 3 do rozporządzenia.

3. Zakres badań prowadzonych w monitoringu diagnostycznym prowadzący monitoring może rozszerzyć o inne wskaźniki jakości wody charakteryzujące rodzaj oddziaływań antropogenicznych mających bezpośredni wpływ na badany zbiornik wód podziemnych.

4. Badania wskaźników jakości wody w monitoringu diagnostycznym prowadzi się z częstotliwością:

- 1) co 3 lata - badania wód podziemnych swobodnych;
- 2) co 6 lat - badania wód podziemnych naporowych.

5. Zakres badań prowadzonych w monitoringu operacyjnym obejmuje określenie w wodach podziemnych wartości następujących wskaźników jakości wody: temperatury, przewodności, odczynu, tlenu rozpuszczonego, amoniaku, azotanów, azotynów, chlorków, siarczanów, fosforanów, wodorowęglanów, sodu, potasu, wapnia, magnezu, manganu i żelaza.

6. Prowadzący monitoring może rozszerzyć zakres badań o inne wskaźniki jakości wody, których wartości stwierdzone na podstawie monitoringu diagnostycznego mieszczą się w IV lub V klasie jakości wód podziemnych, oraz o inne wskaźniki jakości wody charakteryzujące rodzaj oddziaływań antropogenicznych mających bezpośredni wpływ na wodę w badanym zbiorniku wód podziemnych.

7. Badania wskaźników jakości wody w monitoringu operacyjnym prowadzi się z następującą częstotliwością:

- 1) corocznie, z wyłączeniem roku, w którym jest prowadzony monitoring diagnostyczny - badania wód podziemnych swobodnych;
- 2) co 3 lata po monitoringu diagnostycznym - badania wód podziemnych naporowych.

8. Zakres i częstotliwość badań prowadzonych w monitoringu badawczym określa się każdorazowo w razie konieczności zidentyfikowania zanieczyszczeń przypadkowych lub spowodowanych awarią.

§ 9. 1. Przy wyznaczaniu punktów poboru próbek do badań wód podziemnych uwzględnia się kryteria obejmujące warunki wyboru monitorowanego zbiornika wód podziemnych, lokalizację punktów w obrębie badanego zbiornika wód podziemnych, warunki techniczne punktów oraz ich liczbę.

2. Monitorowaniem obejmuje się zbiorniki wód podziemnych narażone na oddziaływania antropogeniczne, które spełniają co najmniej jeden z następujących warunków:

- 1) zasoby dyspozycyjne są większe od 10.000 m<sup>3</sup>/d;
- 2) stanowią jedyne źródło zaopatrzenia w wodę;
- 3) parametry hydrogeologiczne przynajmniej jednej z warstw wodonośnych zbiornika wód podziemnych spełniają warunki: miąższość powyżej 5 m, przewodność ponad 50 m<sup>2</sup>/d, wydajność potencjalna studni powyżej 5 m<sup>3</sup>/h;
- 4) są zlokalizowane w obrębie obszarów chronionych, na których o rozwoju biosfery decydują warunki hydrogeologiczne;
- 5) są zlokalizowane w obszarach przygranicznych, gdzie występują lub mogą występować przepływy transgraniczne wód.

3. Lokalizacja punktów poboru próbek do badań w obrębie badanego zbiornika wód podziemnych ma:

- 1) zapewnić reprezentatywność dla struktur hydrogeologicznych;
- 2) umożliwić przeprowadzenie oceny jakości wód poziomów wodonośnych objętych eksploatacją;
- 3) uniemożliwić wpływ oddziaływań lokalnych źródeł zanieczyszczeń.

4. Liczba punktów poboru próbek do badań w obrębie danego zbiornika wód podziemnych zależy od:

- 1) jego wielkości (powierzchni);
- 2) komplikacji warunków hydrogeologicznych;
- 3) intensywności oddziaływań antropogenicznych;
- 4) podatności na wpływ oddziaływań antropogenicznych.

5. Punktami poboru próbek do badań mogą być otwory studzienne, piezometry, obudowane źródła, które spełniają następujące warunki techniczne:

- 1) umożliwiają selektywne ujmowanie wody z badanego poziomu wodonośnego;
- 2) są sprawne hydraulicznie i umożliwiają prawidłowe pobieranie próbek wody;
- 3) zostały wykonane z materiałów niezmieniających składu chemicznego wody.

6. Pobieranie próbek do badań wód podziemnych prowadzi się zgodnie z odpowiednimi Polskimi Normami.

§ 10. Planowanie i realizacja monitoringu wód powierzchniowych i podziemnych ma uwzględniać rozpoznanie jakości wód i dostarczenie informacji na potrzeby gospodarowania wodami.

§ 11. Metodyki referencyjne badań wskaźników jakości wód powierzchniowych i podziemnych oraz warunki zapewnienia jakości danych uwzględniające granice oznaczalności, precyzję i dokładność metodyk referencyjnych są określone w załączniku nr 4 do rozporządzenia.

§ 12. Ocenę wyników badań prowadzi się zgodnie z wymaganiami normy PN-EN ISO/IEC 17025:2001.

§ 13. 1. Określenia jakości wód powierzchniowych dokonuje się na podstawie badań prowadzonych w jednym punkcie pomiarowym.

2. W punkcie pomiarowym dopuszcza się określenie jakości wód powierzchniowych w zakresie spełniania wymagań określonych dla różnych sposobów użytkowania wód.

3. Dla każdego wskaźnika jakości wody zmierzonego z częstotliwością jeden raz na miesiąc wyznacza się wartość stężenia odpowiadającą percentylowi 90, a w przypadku mniejszej częstotliwości badań przyjmuje się najmniej korzystną wartość stężenia.

4. Określenia klasy jakości wód powierzchniowych dokonuje się, porównując wyznaczone wartości stężeń poszczególnych wskaźników jakości wody, z wyłączeniem wskaźników

jakości wód występujących w warunkach naturalnych w podwyższonych stężeniach, z wartościami granicznymi określonymi w załączniku nr 1 do rozporządzenia, przyjmując klasę obejmującą 90% wartości.

§ 14. 1. Prezentacji stanu wód powierzchniowych dokonuje się w formie graficznej, tabelarycznej i opisowej.

2. Rodzaje ocen badań monitoringowych wód powierzchniowych oraz sposób przedstawienia wyników klasyfikacji wód powierzchniowych są określone w załączniku nr 5 do rozporządzenia.

§ 15. 1. Określenia jakości wód podziemnych dokonuje się na podstawie badań prowadzonych w jednym punkcie pomiarowym.

2. Określenia klasy jakości wód podziemnych dokonuje się, porównując wartości stężeń poszczególnych wskaźników jakości wody z wartościami granicznymi określonymi w załączniku nr 3 do rozporządzenia.

3. Ustalając klasy jakości wód podziemnych, dopuszcza się przekroczenie wartości granicznych trzech wskaźników jakości wody; przekroczenie wartości granicznych wskaźników jakości wody mieści się w granicach przyjętych dla bezpośrednio niższej klasy jakości wody.

4. Niedopuszczalne jest przekroczenie wartości granicznych następujących wskaźników jakości wody: arsenu, amoniaku, azotanów, azotynów, fluorków, chromu, kadmu, miedzi, niklu, ołowiu, rtęci, cyjanków, fenoli, pestycydów, wielopierścieniowych węglowodorów, olejów mineralnych, substancji powierzchniowo czynnych anionowych.

§ 16. 1. Prezentacji stanu wód podziemnych dokonuje się w formie graficznej, tabelarycznej i opisowej.

2. Rodzaje ocen badań monitoringowych wód podziemnych oraz sposób przedstawienia wyników klasyfikacji wód podziemnych są określone w załączniku nr 6 do rozporządzenia.

§ 17. Oceny jakości wód powierzchniowych i wód podziemnych dokonuje się na podstawie badań prowadzonych w ramach monitoringu diagnostycznego, operacyjnego i badawczego.

§ 18. Główny Inspektor Ochrony Środowiska wykonuje badania w zakresie:

- 1) jakości wód powierzchniowych w wybranych zlewniach posiadających wieloletni zbiór danych pomiarowych;
- 2) jakości wód podziemnych w wybranych zbiornikach wód podziemnych;
- 3) programów rozpoznawczych monitoringu wód powierzchniowych i wód podziemnych;
- 4) programów rozpoznawczych na potrzeby wstępnej oceny sposobu wykorzystania wód zlewni.

§ 19. Rozporządzenie traci moc z dniem 1 stycznia 2005 r.

§ 20. Rozporządzenie wchodzi w życie po upływie 14 dni od dnia ogłoszenia.

Minister Środowiska: w z. *K. Szamałek*



**WARTOŚCI GRANICZNE WSKAŹNIKÓW JAKOŚCI WODY W KLASACH  
JAKOŚCI WÓD POWIERZCHNIOWYCH**

Lp.	Wskaźnik jakości wody	Jednostka	Wartości graniczne w klasach I-V				
			I	II	III	IV	V
1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Wskaźniki fizyczne</b>							
1	Temperatura wody	°C	22	24	26	28	>28
2	Zapach	krotność	1	3	10	20	>20
3	Barwa	mg Pt/l	5	10	20	50	>50
4	Zawiesiny ogólne	mg/l	15	25	50	100	>100
5	Odczyn	pH	6,5- 8,5	6,0- 8,5	6,0- 9,0	5,5- 9,0	<5,5 lub >9,0
<b>Wskaźniki tlenowe</b>							
6	Tlen rozpuszczony	mg O <sub>2</sub> /l	7	6	5	4	<4
7	BZT <sub>5</sub>	mg O <sub>2</sub> /l	2	3	6	12	>12
8	ChZT-Mn	mg O <sub>2</sub> /l	3	6	12	24	>24
9	ChZT-Cr	mg O <sub>2</sub> /l	10	20	30	60	>60
10	Ogólny węgiel organiczny	mg C/l	5	10	15	20	>20
<b>Wskaźniki biogenne</b>							
11	Amoniak	mg NH <sub>4</sub> /l	0,5	1	2	4	>4
12	Azot Kjeldahla	mg N/l	0,5	1	2	4	>4
13	Azotany	mg NO <sub>3</sub> /l	5	15	25	50	>50
14	Azotyny	mg NO <sub>2</sub> /l	0,03	0,1	0,5	1,0	>1,0
15	Azot ogólny	mg N/l	2,5	5	10	20	>20
16	Fosforany	mg PO <sub>4</sub> /l	0,2	0,4	0,7	1,0	>1,0
17	Fosfor ogólny	mg P/l	0,2	0,4	0,7	1,0	>1,0
<b>Wskaźniki zasolenia</b>							
18	Przewodność w 20 °C	μS/cm	500	1.000	1.500	2.000	>2.000
19	Substancje rozpuszczone	mg/l	300	500	800	1.200	>1.200
20	Zasadowość ogólna	mg CaCO <sub>3</sub> /l	>200	100	20	10	<10
21	Siarczany	mg SO <sub>4</sub> /l	100	150	250	300	>300

22	Chlorki	mg Cl/l	100	200	300	400	>400
23	Wapń	mg Ca/l	50	100	200	400	>400
24	Magnez	mg Mg/l	25	50	100	200	>200
25	Fluorki	mg F/l	0,5	1,0	1,5	1,7	>1,7
Metale, w tym metale ciężkie <sup>1)</sup>							
26	Arsen	mg As/l	0,01	0,01	0,05	0,100	>0,100
27	Bar	mg Ba/l	0,1	0,1	0,5	1,0	>1,0
28	Bor	mg B/l	0,5	1,0	2,0	4,0	>4,0
29	Chrom ogólny	mg Cr/l	0,05	0,05	0,05	0,10	>0,10
30	Chrom (VI)	mg Cr/l	0,02	0,02	0,02	0,04	>0,04
31	Cynk	mg Zn/l	0,3	0,5	1	2	>2
32	Glin	mg Al/l	0,1	0,2	0,4	0,8	>0,8
33	Kadm	mg Cd/l	0,0005	0,001	0,001	0,005	>0,005
34	Mangan	mg Mn/l	0,05	0,1	0,5	1,0	>1,0
35	Miedź	mg Cu/l	0,02	0,04	0,06	0,100	>0,100
36	Nikiel	mg Ni/l	0,01	0,02	0,05	0,2	>0,2
37	Ołów	mg Pb/l	0,01	0,01	0,02	0,05	>0,05
38	Rtęć	mg Hg/l	0,0005	0,001	0,001	0,005	>0,005
39	Selen	mg Se/l	0,01	0,01	0,02	0,04	>0,04
40	Żelazo	mg Fe/l	0,1	0,3	1,0	2,0	>2,0
Wskaźniki zanieczyszczeń przemysłowych							
41	Cyjanki wolne	mg CN/l	0,02	0,02	0,05	0,05	>0,05
42	Fenole (indeks fenolowy)	mg/l	0,001	0,005	0,01	0,05	>0,05
43	Pestycydy <sup>2)</sup>	µg/l	0,1	1,0	2,5	5,0	>5
44	Substancje powierzchniowo czynne anionowe	mg/l	0,1	0,2	0,5	1,0	>1,0
45	Oleje mineralne (indeks oleju mineralnego)	mg/l	0,01	0,05	0,20	0,5	>0,5
46	Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne <sup>3)</sup>	µg/l	0,01	0,05	0,2	1,0	>1,0

Wskaźniki biologiczne							
47	Saprobowość fitoplanktonu	Indeks saprobowości	1,0	1,5	2,5	3,5	>3,5
48	Saprobowość peryfitonu		1,0	1,5	2,5	3,5	>3,5
49	Makrobezkręgowce bentosowe, indeksy	Indeks bioróżnorodności	5,5	4,0	2,5	1,0	<1,0
		Indeks biotyczny	100	70	40	10	<10
50	Chlorofil "a"	µg/l	10	25	50	100	>100
Wskaźniki mikrobiologiczne							
51	Liczba bakterii grupy coli typu kałowego	w 100 ml	20	200	2.000	20.000	>20.000
52	Liczba bakterii grupy coli	w 100 ml	50	500	5.000	50.000	>50.000

<sup>1)</sup> Podane wartości graniczne odnoszą się do formy rozpuszczonej metali.

<sup>2)</sup> Pestycydy obejmują sumę: lindanu, dieldryny.

<sup>3)</sup> Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne obejmują sumę: benzo(b)fluorantenu, benzo(k)fluorantenu, benzo(a)pirenu, dibenzo(a,h)antracenu, benzo(g,h,i)perylenu, indeno(1,2,3-cd)pirenu.

## SPOSÓB OKREŚLANIA HYDROMORFOLOGICZNEGO STANU WÓD POWIERZCHNIOWYCH ORAZ CHARAKTERYSTYKA POSZCZEGÓLNYCH KATEGORII HYDROMORFOLOGICZNEGO STANU WÓD POWIERZCHNIOWYCH

### 1. Sposób określania hydromorfologicznego stanu wód powierzchniowych

Elementy i parametry hydromorfologiczne		Rodzaj wód			Częstotliwość badań
		rzeki	jeziora	sztuczne zbiorniki wodne	
<b>I. Typ wód</b>					
1	Położenie	n.p.m.	X	X	1 raz na 10 lat
2	Wielkość zlewni	km <sup>2</sup>	X	X	
3	Budowa geologiczna	opisowo	X	X	
4	Głębokość średnia	m	-	X	
5	Powierzchnia zwierciadła wody	km <sup>2</sup>	-	X	
<b>II. Reżim hydrologiczny</b>					
6	Natężenie przepływu	m <sup>3</sup> /s	X		1 raz w

7	Wahania stanów wody	m	X	X*	X*	miesiącu
8	Powiązanie z wodami podziemnymi	opisowo	X*	X*	X*	
9	Możliwość niezakłóconego przepływu - ciągłość rzeki	opisowo	X*	-	-	
<b>III. Morfologia</b>						
10	Kształt koryta	opisowo	X	-	-	1 raz na 6 lat
11	Wahania głębokości	m	X	-	-	
12	Zmienność szerokości	m	X	-	-	
13	Zmienność morfometrii	-		X	X	
14	Prędkość przepływu wody	m/s	X			
15	Struktura strefy przybrzeżnej	opisowo	X	X	X	

\* raz w roku

## 2. Ocena poszczególnych kategorii hydromorfologicznego stanu wód powierzchniowych

Kategoria	Opis stanu czynników hydromorfologicznych
Stan bardzo dobry	<p>Gospodarka wodna - wielkość przepływu i jego dynamika oraz powiązania z wodami podziemnymi odpowiadają w pełni lub prawie w pełni warunkom, w których brak oddziaływań antropogenicznych.</p> <p>Ciągłość rzeki - nie została przez człowieka zmieniona i umożliwia niezakłócony transport rumowiska i migrację organizmów wodnych.</p> <p>Morfologia koryta - trasa rzeki, zmienność szerokości, głębokości, prędkości przepływu wody, substratu, struktury i stref przybrzeżnych odpowiadają warunkom naturalnym</p>
Stan dobry	Występujące zmiany reżimu hydrologicznego, ciągłości rzeki, warunków morfologicznych odzwierciedlają stan, który wskazuje na oddziaływanie antropogeniczne
Stan umiarkowany	Występujące zmiany reżimu hydrologicznego, ciągłości rzeki, warunków morfologicznych odzwierciedlają stan, który wskazuje na silne oddziaływanie antropogeniczne; dochodzi do nadmiernych zakwitów glonów, rozwoju niepożądanych bakterii oraz zaniku populacji wrażliwych gatunków roślin i ryb

**WARTOŚCI GRANICZNE WSKAŹNIKÓW JAKOŚCI WODY W KLASACH  
JAKOŚCI WÓD PODZIEMNYCH<sup>1)</sup>**

Lp.	Wskaźnik jakości wody	Jednostka	Wartości graniczne w klasach I-V				
			I	II	III	IV	V
1	Temperatura	°C	6-10	12	16	25	>25
2	Przewodność w 20 °C	µS/cm	400	2.500	2.500	3.000	>3.000
3	Odczyn	pH	6,5-9,5			<6,5 lub >9,5	
4	Tlen rozpuszczony	mg O <sub>2</sub> /l	1	0,5	0,5	0,1	<0,1
5	Ogólny węgiel organiczny	mg C/l	2	10	10	20	>20
6	Amoniak	mg NH <sub>4</sub> /l	0,1	0,5	0,65	3	>3
7	Azotany	mg NO <sub>3</sub> /l	10	25	50	100	>100
8	Azotyny	mg NO <sub>2</sub> /l	0,01	0,05	0,10	0,25	>0,25
9	Fosforany	mg PO <sub>4</sub> /l	0,05	0,2	1	5	>5
10	Fluorki	mg F/l	0,5	1	1,5	2	>2
11	Chlorki	mg Cl/l	25	250	300	500	>500
12	Cyjanki wolne	mg CN/l	0,01	0,02	0,02	0,02	>0,02
13	Wodorowęglany	mg HCO <sub>3</sub> /l	100-300	75-100	50-75	25-50	<25
				300-350	350-400	>400	>400
14	Siarczany	mg SO <sub>4</sub> /l	25	250	250	500	>500
15	Krzemionka	mg SiO <sub>2</sub> /l	15	30	50	100	>100
16	Sód	mg Na/l	60	200	200	300	>300
17	Potas	mg K/l	10	10	15	20	>20
18	Wapń	mg Ca/l	50	100	200	300	>300
19	Magnez	mg Mg/l	30	50	100	150	>150
20	Żelazo	mg Fe/l	0,1	0,3	0,5	5	>5
21	Arsen	mg As/l	0,01	0,01	0,1	0,2	>0,2
22	Bor	mg B/l	0,5	1	1	2	>2
23	Chrom	mg Cr/l	0,01	0,05	0,05	0,1	>0,1
24	Cynk	mg Zn/l	0,5	3	5	10	>10

25	Glin	mg Al/l	0,1	0,2	0,5	1	>1
26	Kadm	mg Cd/l	0,001	0,003	0,005	0,01	>0,01
27	Mangan	mg Mn/l	0,05	0,2	1	1	>1
28	Miedź	mg Cu/l	0,01	0,03	0,05	0,1	>0,1
29	Nikiel	mg Ni/l	0,01	0,02	0,05	0,1	>0,1
30	Rtęć	mg Hg/l	0,001	0,001	0,001	0,005	>0,005
31	Ołów	mg Pb/l	0,01	0,05	0,05	>0,05	>0,05
32	Fenole (indeks fenolowy)	mg/l	0,001	0,005	0,01	0,05	>0,05
33	Pestycydy <sup>2)</sup>	μg/l	0,1	1	2,5	5	>5
34	Substancje powierzchniowo czynne anionowe	mg/l	0,1	0,2	0,5	1	>1
35	Oleje mineralne (indeks oleju mineralnego)	mg/l	0,01	0,01	0,03	0,05	>0,05
36	Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne <sup>3)</sup>	μg/l	0,01	0,02	0,03	0,05	>0,05

<sup>1)</sup> W przypadku metali podane wartości graniczne odnoszą się do ich formy rozpuszczonej.

<sup>2)</sup> Pestycydy obejmują sumę: lindanu, dieldryny.

<sup>3)</sup> Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne obejmują sumę: benzo(b)fluorantenu, benzo(k)fluorantenu, benzo(a)pirenu, dibenzo(a,h)antracenu, benzo(g,h,i)perylenu, indeno(1,2,3-cd)pirenu.

**METODYKI REFERENCYJNE BADAŃ WSKAŹNIKÓW JAKOŚCI WÓD  
POWIERZCHNIOWYCH I PODZIEMNYCH ORAZ WARUNKI ZAPEWNIENIA  
JAKOŚCI DANYCH**

Lp.	Wskaźniki jakości wody	Jednostka	Granica oznaczalności <sup>1)</sup>	Precyzja <sup>2)</sup> ρ	Dokładność <sup>3)</sup> ρ	Zalecane metody analiz i pomiarów
1	2	3	4	5	6	7
1	Temperatura	°C	-	0,5°C	1°C	Termometria, pomiar in situ podczas pobierania próbki
2	Zapach, współczynnik rozcieńczenia	krotność				Organoleptycznie, wg kolejnych rozcieńczeń do zaniku zapachu
3	Zawiesiny ogólne	mg/l	5,0	5%	10%	Wagowo, po filtracji przez sączi z włókna szklanego
4	Odczyn	jednostka pH	0,2 jednostki	0,1 jednostki	0,2 jednostki	Elektrochemia, pomiar in situ podczas pobierania próbki
5	Barwa	mg Pt /l	5	10%	20%	Spektrometria z zastosowaniem skali Pt/Co, po filtracji przez sączi z włókna szklanego
6	Tlen rozpuszczony	mg O <sub>2</sub> /l	0,5	10%	10%	Elektrochemia
7	BZT <sub>5</sub>	mg O <sub>2</sub> /l	0,5	1,5	2	Elektrochemia lub metoda Winklera
8	ChZT-Mn	mg O <sub>2</sub> /l	1,0	20%	20%	Miareczkowanie po gotowaniu z KMnO <sub>4</sub>
9	ChZT-Cr	mg O <sub>2</sub> /l	5	20%	20%	Miareczkowanie po gotowaniu z K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>
10	Ogólny węgiel	mg C/l	1	10%	20%	Spektrometria IR;

	organiczny					kulometria
11	Amoniak	mg NH <sub>4</sub> /l	0,05	10%	20%	Spektrometria UV-VIS; chromatografia jonowa
12	Azot Kjeldahla	mg N/l	0,2	10%	20%	Mineralizacja i destylacja, spektrometria UV-VIS
13	Azotany	mg NO <sub>3</sub> /l	1	20%	20%	Spektrometria UV-VIS
14	Azotyny	mg NO <sub>2</sub> /l	0,01	20%	20%	Chromatografia jonowa ; spektrometria UV-VIS
15	Fosforany	mg PO <sub>4</sub> /l	0,5	10%	20%	- Chromatografia jonowa
			0,05			- Spektrometria UV-VIS
16	Fosfor ogólny	mg P/l	0,05	15 %	20%	Mineralizacja, spektrometria UV-VIS; atomowa spektrometria emisyjna z plazmą wzbudzoną indukcyjnie
17	Substancje rozpuszczone	mg/l	10	10%	10%	Wagowa
18	Zasadowość ogólna	mg CaCO <sub>3</sub> /l	10	15 %	20%	Miareczkowanie; spektrometria UV-VIS
19	Przewodność w 20°C	μS/cm	10	5 %	10%	Elektrochemia
20	Siarczany	mg SO <sub>4</sub> /l	10	10%	15 %	Wagowa; chromatografia jonowa
21	Chlorki	mg Cl/l	10	10%	15 %	Chromatografia jonowa; miareczkowanie
22	Fluorki	mg F/l	0,1	10%	20%	Chromatografia



						jonowa; elektrody jonoselektywne
23	Krzemionka	mg SiO <sub>2</sub> /l	1	15 %	20%	Absorpcyjna spektrometria atomowa
24	Sód	mg Na/l	1	10%	15 %	Absorpcyjna spektrometria
25	Potas	mg K/l	1	10%	15 %	atomowa; atomowa spektrometria
26	Wapń	mg Ca/l	5	10%	15 %	emisyjna z plazmą wzbudzoną indukcyjnie; emisyjna spektrometria płomieniowa
27	Arsen	mg As/l	0,01	15 %	25 %	Absorpcyjna spektrometria atomowa z generowaniem wodorków; atomowa spektrometria emisyjna z plazmą wzbudzoną indukcyjnie
28	Bar	mg Ba/l	0,05	10%	20%	Atomowa spektrometria emisyjna z plazmą wzbudzoną indukcyjnie; absorpcyjna spektrometria atomowa
29	Bor	mg B/l	0,1	10%	20%	Atomowa spektrometria emisyjna z plazmą wzbudzoną indukcyjnie
30	Chrom ogólny	mg Cr/l	0,01	20%	30%	Atomowa

31	Chrom (VI)	mg Cr/l	0,02	20%	30%	spektrometria emisyjna z plazmą wzbudzoną indukcyjnie.  Absorpcyjna spektrometria atomowa
32	Cynk	mg Zn/l	0,05	10%	20%	
33	Glin	mg Al/l	0,01	10%	20%	
34	Mangan	mg Mn/l	0,02	10%	20%	
35	Żelazo	mg Fe/l	0,02	10%	20%	
36	Magnez	mg Mg/l	5	10%	15 %	
37	Miedź	mg Cu/l	0,002	10%	20%	
38	Kadm	mg Cd/l	0,0005	20%	30%	
39	Nikiel	mg Ni/l	0,005	10%	20%	
40	Ołów	mg Pb/l	0,005	20%	30%	
41	Rtęć	mgHg/l	0,0005	20%	30%	Absorpcyjna spektrometria atomowa
42	Selen	mg Se/l	0,01	15 %	25 %	Atomowa emisyjna spektrometria z plazmą wzbudzoną indukcyjnie; absorpcyjna spektrometria atomowa z generowaniem wodorków
43	Cyjanki	mg CN/l	0,01	20%	30%	Spektrometria UV-VIS
44	Substancje powierzchniowo czynne anionowe	mg/l (siarczan laurylu)	0,1	20%	30%	
45	Fenole (indeks fenolowy)	mg/l	0,005	20%	30%	Spektrometria UV-VIS
46	Oleje mineralne (indeks oleju mineralnego)	mg/l	0,01	20%	30%	Ekstrakcja, chromatografia gazowa
47	Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne <sup>4)</sup>	µg/l	0,01	15 %	25 %	Chromatografia gazowa, chromatografia cieczowa
48	Pestycydy <sup>5)</sup>	mg/l	0,001	50%	50%	Chromatografia gazowa

49	Chlorofil "a"	µg/l				Spektrometria UV-VIS
50	Saprobowość fitoplanktonu	Indeks saprobowości				Analiza mikroskopowa. Ocena wg Pantla-Bucka
51	Saprobowość peryfitonu					
52	Makrobezkręgowce bentosowe	Indeks bioróżnorodności				Ilościowe i jakościowe badania makrofauny bezkręgowej. Obliczenia indeksu bioróżnorodności.
		Indeks biotyczny				Przy jednokrotnym poborze prób w okresie późnowiosennym
53	Liczba bakterii grupy coli	w 100 ml	5			Hodowla w 37 ρ 0,5 ° C na odpowiedniej pożywce na filtrach i liczenie kolonii. Próby należy zagęścić lub rozcieńczyć, aby zawierały 10 - 100 kolonii
54	Liczba bakterii grupy coli typu kałowego	w 100 ml	2			Hodowla w 44 ρ 0,5 °C na odpowiedniej pożywce i liczenie kolonii. Próby należy zagęścić lub rozcieńczyć, aby zawierały 10-100 kolonii

**1) Granica oznaczalności oznacza minimalną ilość badanego wskaźnika, którą można wykryć stosowaną dowolną metodą, która zapewnia uzyskanie wyników pomiarów z podaną w załączniku precyzją i dokładnością.**

**2) Precyzja oznacza zakres, w obrębie którego znajduje się 95 % wyników pomiarów dokonanych w jednej próbce, przy zastosowaniu tej samej metody.**

<sup>3)</sup> Dokładność oznacza różnicę pomiędzy rzeczywistą wartością badanego wskaźnika a średnią wartością uzyskanych wyników pomiarów.

<sup>4)</sup> Pestycydy obejmują oznaczanie sumy: lindanu, dieldryny.

<sup>5)</sup> Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne obejmują oznaczanie sumy: benzo(b)fluorantenu, benzo(k)fluorantenu, benzo(a)pirenu, dibenzo(a,h)antracenu, benzo(g,h,i)perylenu, indeno(1,2,3-cd)pirenu.

## RODZAJE OCEN BADAŃ MONITORINGOWYCH WÓD POWIERZCHNIOWYCH ORAZ SPOSÓB PRZEDSTAWIENIA WYNIKÓW KLASYFIKACJI WÓD POWIERZCHNIOWYCH

### 1. Rodzaje ocen badań monitoringowych wód powierzchniowych

Rodzaj	Przeznaczenie
Sposób wykorzystania	- zaopatrzenie ludności w wodę przeznaczoną do spożycia, - środowisko życia ryb w warunkach naturalnych, - środowisko bytowania skorupiaków i mięczaków w warunkach naturalnych
Skala procesów	- eutrofizacja wód, - narażenie wód na zanieczyszczenia związkami azotu ze źródeł rolniczych
Realizacja planu gospodarowania wodami	- ocena stanu jakości wód w zlewni, - ocena efektywności realizacji planu w zakresie jakości wód

### 2. Sposób przedstawienia wyników klasyfikacji wód powierzchniowych

Klasy wód	Charakterystyka	Kolor
Klasa I	bardzo dobra	niebieski
Klasa II	dobra	zielony
Klasa III	zadowalająca	żółty
Klasa IV	niezadowalająca	pomarańczowy
Klasa V	zła	czerwony

## **RODZAJE OCEN BADAŃ MONITORINGOWYCH WÓD PODZIEMNYCH ORAZ SPOSÓB PRZEDSTAWIENIA WYNIKÓW KLASYFIKACJI WÓD PODZIEMNYCH**

### **1. Rodzaje ocen badań monitoringowych wód podziemnych**

Rodzaj	Przeznaczenie/częstotliwość
Kompleksowa ocena jakości wód	opracowywana na podstawie monitoringu diagnostycznego, co 3 lata dla wód swobodnych i co 6 lat dla wód naporowych
Ocena ogólna	opracowywana na podstawie monitoringu operacyjnego co rocznie dla wód swobodnych i co 3 lata dla wód naporowych
Ocena stanu wód	przeprowadzona dla poszczególnych dorzeczy lub zlewni, z uwzględnieniem w ich obrębie poziomów i pięter wodonośnych
Ocena skali procesu	narażenie wód na zanieczyszczenia związkami azotu ze źródeł rolniczych

### **2. Sposób przedstawienia wyników klasyfikacji wód podziemnych**

Klasy wód	Charakterystyka	Kolor
Klasa I	bardzo dobra	niebieski
Klasa II	dobra	zielony
Klasa III	zadowalająca	żółty
Klasa IV	niezadowalająca	pomarańczowy
Klasa V	zła	czerwony

**Ważniejsze krajowe akty prawne istotne dla gospodarki wodnej:**

- ustawa z dnia 18 lipca 2001 r. Prawo wodne (Dz.U. Nr 115, poz.1229, z późn. zm.),  
ustawa z dnia 27 kwietnia 2001 r. Prawo ochrony środowiska (Dz.U. Nr 62, poz. 627,  
z późn. zm.),
- ustawa z dnia 4 lutego 1994 r. Prawo geologiczne i górnicze (Dz.U. Nr 27, poz. 96, z  
późn. zm.),
- ustawa z dnia 16 kwietnia 2004 r. o ochronie przyrody (Dz.U. Nr 92, poz. 880, z późn.  
zm.),
- ustawa z dnia 6 lipca 2001 r. o zachowaniu narodowego charakteru strategicznych  
zasobów naturalnych kraju (Dz.U. Nr 97, poz. 1051, z późn. zm.),
- ustawa z dnia 21 grudnia 2000 r. o żegludze śródlądowej (Dz.U. z 2001 r. Nr 5, poz.  
43, z późn. zm.),
- ustawa z dnia 18 kwietnia 1985 r. o rybactwie śródlądowym (Dz.U. z 1999 r. Nr 66,  
poz. 750, z późn. zm.),
- ustawa z dnia 4 marca 2005 r. o ustanowieniu programu wieloletniego "Program  
budowy Zbiornika Wodnego Świnna Poręba w latach 2006-2010" (Dz.U. Nr 94, poz.  
784),
- ustawa z dnia 6 lipca 2001 r. o ustanowieniu programu wieloletniego "Program dla  
Odry - 2006" (Dz.U. Nr 98, poz. 1067, z późn. zm.),
- ustawa z dnia 7 czerwca 2001 r. o zbiorowym zaopatrzeniu w wodę i zbiorowym  
odprowadzaniu ścieków (Dz.U. Nr 72, poz. 747, z późn. zm.),
- ustawa z dnia 26 lipca 2000 r. o nawozach i nawożeniu (Dz.U. Nr 89, poz. 991, z  
późn. zm.),
- ustawa z dnia 4 września 1997 r. o działach administracji rządowej (Dz.U. z 2003 r.  
Nr 159, poz. 1548, z późn. zm.),
- ustawa z dnia 20 kwietnia 2004 r. o Narodowym Planie Rozwoju (Dz.U. Nr 116,  
poz.1206 oraz z 2005 r. Nr 90, poz. 759),
- ustawa z dnia 27 marca 2003 r. o planowaniu i zagospodarowaniu przestrzennym  
(Dz.U. Nr 80, poz. 717, z późn. zm.),
- ustawa z dnia 7 lipca 1994 roku - Prawo budowlane (Dz.U. z 2003 r. Nr 207 poz.  
2016, z późn. zm.).

## Wykaz dyrektyw Wspólnoty Europejskiej wdrożone do ustawy Prawo wodne

- dyrektywa 2000/60/WE z dnia 23 października 2000 r. ustanawiającej ramy wspólnotowego działania w dziedzinie polityki wodnej (Dz. Urz. WE L 327, z 22. 12. 2000).
- dyrektywa 75/440/EWG z dnia 16 czerwca 1975 r. dotyczącej wymaganej jakości wód powierzchniowych przeznaczonych do poboru wody pitnej w Państwach Członkowskich (Dz. Urz. WE L 194, z 25.07.1975),
- dyrektywa 91/271/EWG z dnia 21 maja 1991 r. dotyczącej oczyszczania ścieków komunalnych (Dz. Urz. WE L 135, z 30.05.1991),
- dyrektywa 76/160/EWG z dnia 8 grudnia 1975 r. dotyczącej jakości wody w kąpieliskach (Dz. Urz. WE L 31, z 05.02.1976),
- dyrektywa 76/464/EWG z dnia 4 maja 1976 r. w sprawie zanieczyszczenia spowodowanego przez niektóre substancje niebezpieczne odprowadzane do środowiska wodnego Wspólnoty (Dz. Urz. WE L 129, z 18.05.1976),
- dyrektywa 78/659/EWG z dnia 18 lipca 1978 r. w sprawie jakości słodkich wód wymagających ochrony lub poprawy w celu zachowania życia ryb (Dz. Urz. WE L 222, z 14.08.1978),
- dyrektywa 79/869/EWG z dnia 9 października 1979 r. dotyczącej metod pomiaru i częstotliwości pobierania próbek oraz analizy wód powierzchniowych przeznaczonych do poboru wody pitnej w Państwach Członkowskich (Dz. Urz. WE L 271, z 29.10.1979),
- dyrektywa 79/923/EWG z dnia 30 października 1979 r. w sprawie wymaganej jakości wód, w których żyją skorupiaki (Dz. Urz. WE L 281, z 10.11.1979),
- dyrektywa 80/68/EWG z dnia 17 grudnia 1979 r. w sprawie ochrony wód podziemnych przed zanieczyszczeniem spowodowanym przez niektóre substancje niebezpieczne (Dz. Urz. WE L 20, z 26.01.1980),
- dyrektywa 82/176/EWG z dnia 22 marca 1982 r. w sprawie wartości dopuszczalnych dla ścieków i wskaźników jakości wód w odniesieniu do zrzutów rtęci z przemysłu elektrolizy chlorków metali alkalicznych (Dz. Urz. WE L 81, z 27.03.1982),
- dyrektywa 84/491/EWG z dnia 9 października 1982 r. w sprawie wartości dopuszczalnych dla ścieków i wskaźników jakości wód w odniesieniu do zrzutów heksachlorocycloheksanu (Dz. Urz. WE L 274, z 17.10.1984),

- dyrektywa 83/513/EWG z dnia 26 września 1983 r. w sprawie wartości dopuszczalnych dla ścieków i wskaźników jakości wód w odniesieniu do zrzutów kadmu (Dz. Urz. WE L 291, z 24.10.1983),
- dyrektywa 84/156/EWG z dnia 8 marca 1984 r. w sprawie wartości dopuszczalnych dla ścieków i wskaźników jakości wód w odniesieniu do zrzutów rtęci z sektorów innych niż przemysł elektrolizy chlorków metali alkalicznych (Dz. Urz. WE L 74, z 17.03.1984),
- dyrektywa 86/280/EWG z dnia 12 czerwca 1986 r. w sprawie wartości dopuszczalnych dla ścieków i wskaźników jakości wód w odniesieniu do zrzutów niektórych substancji niebezpiecznych zawartych w wykazie I Załącznika do dyrektywy 76/464/EWG (Dz. Urz. WE L 181, z 04.07.1986),
- dyrektywy 91/676/EWG z dnia 12 grudnia 1991 r. dotyczącej ochrony wód przed zanieczyszczeniami powodowanym przez azotany pochodzenia rolniczego (Dz. Urz. WE L 375, z 31.12.1991).

#### **Inne dyrektywy Wspólnoty Europejskiej istotne dla gospodarki wodnej**

- dyrektywa Rady 80/778/EWG z dnia 15 lipca 1980 r. odnosząca się do jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi zmieniona Dyrektywą Rady 98/83/WE, z dnia 3 listopada 1998 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi (Dz.Urz. WE L 229, z 30.08.1980),
- dyrektywa Rady 79/409/EWG z dnia 2 kwietnia 1979 r. w sprawie ochrony dzikiego ptactwa (Dz.Urz. WE L 103, z 25.04.1979),
- dyrektywa Rady 92/43/EWG z dnia 21 maja 1992 r. w sprawie ochrony siedlisk przyrodniczych oraz dzikiej fauny i flory (Dz.Urz. WE L 206, z 22.07.1992),
- dyrektywa Rady 96/82/WE z dnia 9 grudnia 1996 r. w sprawie kontroli niebezpieczeństwa poważnych awarii związanych z substancjami niebezpiecznymi (Dz.Urz. WE L 10, z 14.01.1997),
- dyrektywa Rady 85/337/EWG z dnia 27 czerwca 1985 r. w sprawie oceny wpływu wywieranego przez niektóre przedsięwzięcia publiczne i prywatne na środowisko (Dz.Urz. WE L 175, z 5.07.1985),
- dyrektywa Rady 86/278/EWG z dnia 12 czerwca 1986 r. w sprawie ochrony środowiska, w szczególności gleby, w przypadku wykorzystywania osadów ściekowych w rolnictwie (Dz.Urz. WE L 181, z 4.07.1986).



## **Ważniejsze Konwencje międzynarodowe, umowy i porozumienia dwustronne istotne dla gospodarki wodnej**

- Konwencja o obszarach wodno-błotnych mających znaczenie międzynarodowe, zwłaszcza jako środowisko życiowe ptactwa wodnego, sporządzona w Ramsar dnia 2 lutego 1971 r. (Dz. U. z 1978 r. Nr 7, poz. 24 i 25, z późn. zm.),
- Konwencja o ochronie środowiska morskiego obszaru morza Bałtyckiego, sporządzona w Helsinkach 9 kwietnia 1992 r. (Dz. U. z 2000 r. Nr 28, poz. 346)
- Konwencja o różnorodności biologicznej, sporządzona w Rio de Janeiro dnia 5 czerwca 1992 r. (Dz. U. z 2002 r. Nr 184, poz. 1532),
- Konwencja o ochronie gatunków dzikiej flory i fauny europejskiej oraz ich siedlisk, sporządzona w Bernie dnia 19 września 1979 r. (Dz. U. z 1996 r. Nr 58, poz. 263 i 264),
- Konwencja o dostępie do informacji, udziale społeczeństwa w podejmowaniu decyzji oraz dostępie do sprawiedliwości w sprawach dotyczących środowiska, sporządzona w Aarhus dnia 25 czerwca 1998 r. (Dz.U. z 2003 r. Nr 78, poz. 706),
- Konwencja o ochronie i użytkowaniu cieków transgranicznych i jezior międzynarodowych, sporządzona w Helsinkach dnia 17 marca 1992 r. (Dz. U. z 2003 r. nr 78, poz. 702),
- Umowa w sprawie Międzynarodowej Komisji Ochrony Odry przed Zanieczyszczeniem, sporządzona we Wrocławiu dnia 11 kwietnia 1996 r. (Dz. U. z 1999 r. Nr 79, poz. 886),
- Umowa między Rzeczpospolitą Polską a Europejską Organizacją Eksploatacji Satelitów Meteorologicznych (EUMETSAT) o współpracy, sporządzona w Warszawie dnia 15 grudnia 1999 r. (Dz.U. z 2002 r. Nr 202, poz. 1706),
- Umowa z dnia 8 listopada 1991 r. między Rządem Rzeczypospolitej Polskiej a Rządem Republiki Federalnej Niemiec o żegludze śródlądowej,
- Umowa z dnia 19 maja 1992 r. między Rzeczpospolitą Polską a Republiką Federalną Niemiec o współpracy w dziedzinie gospodarki wodnej na wodach granicznych,
- Umowa z dnia 15 stycznia 1998 r. między Rządem Rzeczypospolitej Polskiej a Rządem Republiki Czeskiej o współpracy w dziedzinie ochrony środowiska,
- Porozumienie z dnia 8 września 1994 r. między Rządem Rzeczypospolitej Polskiej a Rządem Republiki Czeskiej o współpracy transgranicznej,

- Umowa między Rządem Rzeczypospolitej Polskiej a Rządem Republiki Słowackiej o współpracy w dziedzinie ochrony środowiska 18 sierpnia 1994 r.
- Umowa z dnia 14 maja 1997 r. między Rządem Rzeczypospolitej Polskiej a Rządem Republiki Słowackiej o gospodarce wodnej na wodach granicznych,
- Porozumienie z dnia 18 sierpnia 1994 r. między Rządem Rzeczypospolitej Polskiej a Rządem Republiki Słowackiej o współpracy transgranicznej,
- Umowa z dnia 10 października 1996 r. między Rządem Rzeczypospolitej Polskiej a Rządem Ukrainy o współpracy w dziedzinie gospodarki wodnej na wodach granicznych,
- Umowa z dnia 7 czerwca 2005 r. między Rządem Rzeczypospolitej Polskiej a Rządem Republiki Litewskiej o współpracy w dziedzinie użytkowania i ochrony wód granicznych.

**Testy normalności rozkładu dla małych próbek – dwa testy:**

- **Test Shapiro – Wilka**; najbardziej polecany, ale może dawać błędne wyniki dla próbek większych niż 2 tys.

**Test Shapiro – Wilka****1. Sposób.**

Test Shapiro – Wilka sprawdza hipotezę zerową że próba  $x_1, \dots, x_n$  pochodzi z populacji o rozkładzie normalnym. Statystyka testowa obliczana jest następująco:

$$\text{gdzie: } W = \frac{\left(\sum_{i=1}^n a_i x_{(i)}\right)^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

$x_{(i)}$  (z indeksem  $i$  w nawiasach) jest  $i$ -tą najmniejszą wartością w próbie;

- $\bar{x} = \frac{(x_1 + \dots + x_n)}{n}$  jest średnią z próby;
- stałe  $a_i$  są określone następująco

$$(a_1, \dots, a_n) = \frac{m^T V^{-1}}{m^T V^{-1} V^{-1} m}$$

gdzie  $m = (m_1, \dots, m_n)^T$

i  $m_1, \dots, m_n$  są wartościami oczekiwanymi próby pobranej z rozkładu normalnego i  $V$  jest macierzą kowariancji tych statystyk.

**Mała wartość statystyki testowej  $W$  pozwala odrzucić hipotezę zerową.**

**2. Sposób.**

Próbę  $x_1, \dots, x_n$  szeregujemy nie malejąco

$$X_{(1)} \leq X_{(2)} \leq \dots \leq X_{(n)}$$

Tak uporządkowane obserwacje nazywamy statystykami pozycyjnymi

Statystyka testowa:

$$W = \frac{\left( \sum_{i=1}^{\lfloor n/2 \rfloor} a_{i:n} (X_{(n-i+1)} - X_{(i)}) \right)^2}{\text{var}X}$$

$a_{i:n}$  są stałymi współczynnikami:

$$\left[ \frac{n}{2} \right] = \begin{cases} \frac{n}{2} & \text{- dla } n \text{ parzystych} \\ \frac{(n-1)}{2} & \text{- dla } n \text{ nieparzystych} \end{cases}$$

3. Wartość krytyczna testu Shapiro–Wilka  $W_n(\alpha)$ .
4. Jeżeli  $W \leq W_n(\alpha)$ , to hipotezę  $H_0$  odrzucamy.

**Test Kołmogorowa – Smirnowa z poprawką Lilleforsa, która jest obliczana, gdy nie znamy średniej lub odchylenia standardowego całej populacji.**

Za pomocą tego testu możemy zbadać zgodność rozkładu empirycznego z rozkładem teoretycznym (normalnym). Jest wadą polegającą na braku możliwości jego zastosowania w przypadku badania populacji cechujących się rozkładami dyskretnymi (skokowymi).

Jest bardzo dobrym testem do zastosowania w przypadku badania prób małych liczebności.

W/w test wykorzystuje statystykę  $\lambda$ , która opiera się na porównaniu dystrybuanty empirycznej (kumulanty) ze stałą dystrybuantą teoretyczną, wynikającą z weryfikowanej hipotezy zerowej  $H_0$ .

Stawiamy hipotezę zerową ( $H_0$ ):

$H_0$ :  $F(x_i) = K(x_i)$  (w przypadku odmiany testu dotyczącej populacji małych liczebności),

lub:

$H_0$ :  $F(a_i) = K(a_i)$  (w przypadku odmiany testu dotyczącej populacji dużych liczebności),

W następnym kroku analizy należy wypełnić tabelę:

1. Dla populacji małych liczb:

$i$	$x_i$	$x_i'$	$K(x_i')$	$F(x_i')$	$ K(x_i')-F(x_i') $
1					
2					
...					
n					

Gdzie:

$i$  - numer kolejny próby w szeregu pozycyjnym,

$x_i$  - wartość próby z uporządkowanego rosnąco szeregu pozycyjnego,

$x_i'$  - wartość próby, które zostały zestandaryzowane do postaci rozkładu normalnego o parametrach:  $N(0,1)$

$K(x_i')$  - dystrybuanta zestandaryzowanego rozkładu empirycznego wg. wzoru:

$$K(x_i) = \frac{i}{n}$$

gdzie:

$i$  - numer próby w szeregu pozycyjnym,

$n$  - ilość elementów w całej populacji próby,

$F(x_i')$  - wartość dystrybuanty teoretycznej rozkładu  $N(0,1)$ , odczytane z tablic statystycznych

$|K(x_i')-F(x_i')|$  - wartości bezwzględne różnic pomiędzy dystrybuantami empirycznymi, a teoretycznymi.

W następnym kroku obliczamy statystykę:

$$D_n = \max_{1 \leq i \leq n} |K(x_i) - F(x_i)|$$

(dla zbiorów małych liczb),

Statystyka w warunkach prawdziwości hipotezy zerowej ( $H_0$ ) ma znany, stabilizowany rozkład. Hipotezę zerową odrzucamy, gdy obliczona wartość  $D_n$  będzie większa lub równa stabilizowanej wartości krytycznej na obranym wcześniej poziomie istotności.

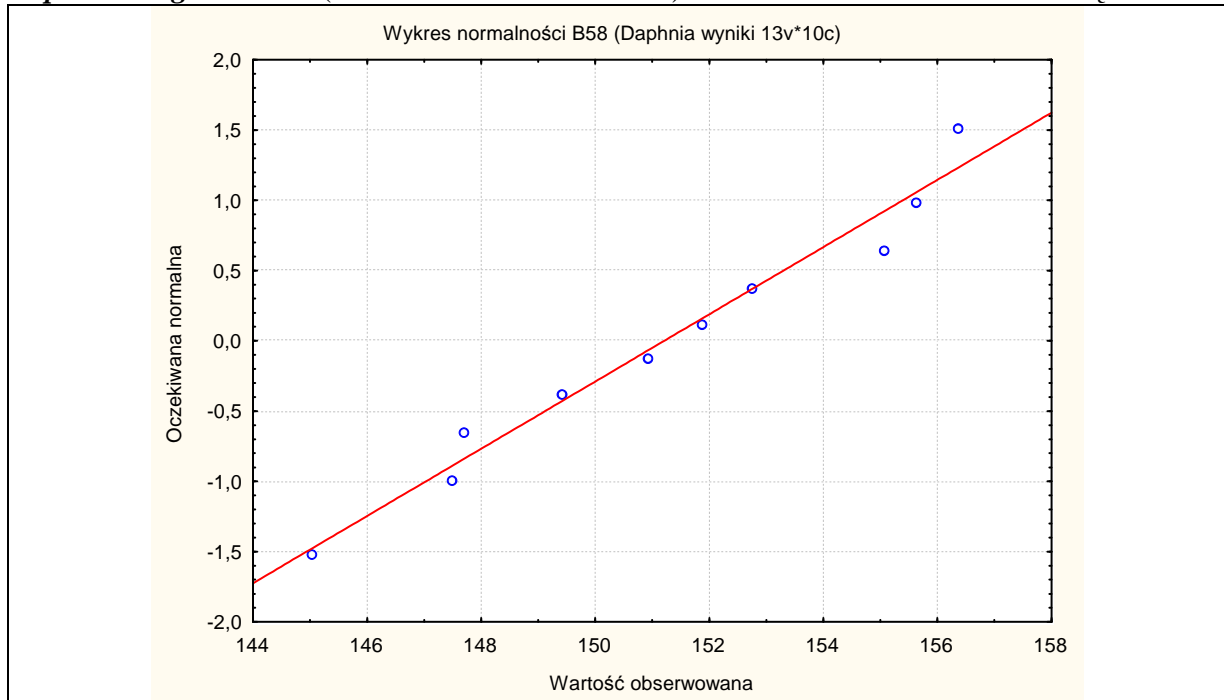


Fig. 142. wykres normalności dla próby Brij 58 (LC50/24 – dla *Daphnia magna*).

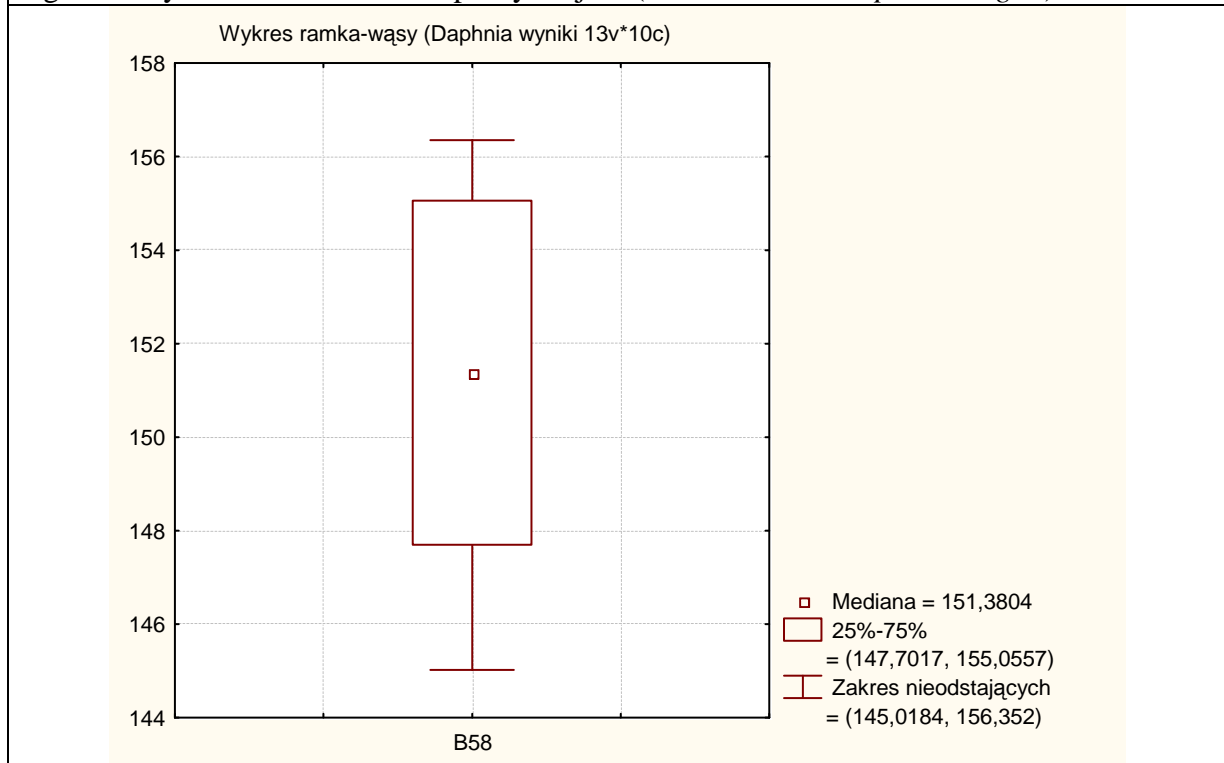


Fig. 143. Wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla Brij 58 (dla *Daphnia magna*).

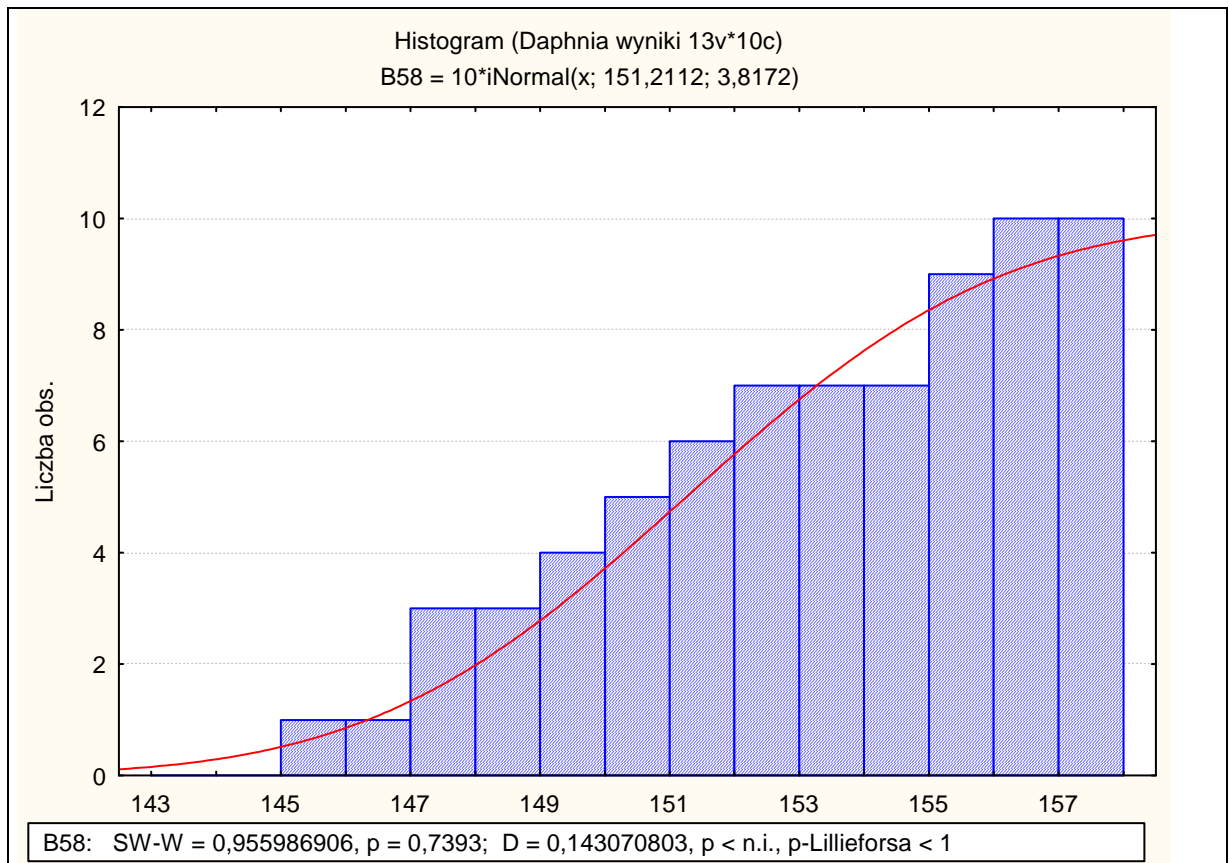


Fig. 144. Skumulowany histogram dla wartości LC50/24 dla *Daphnia magna* dla Brij 58, z wynikami testu Shapiro – Wilka oraz Kołmogorowa – Smirnowa z poprawką Lillieforsa.

Brij 72:

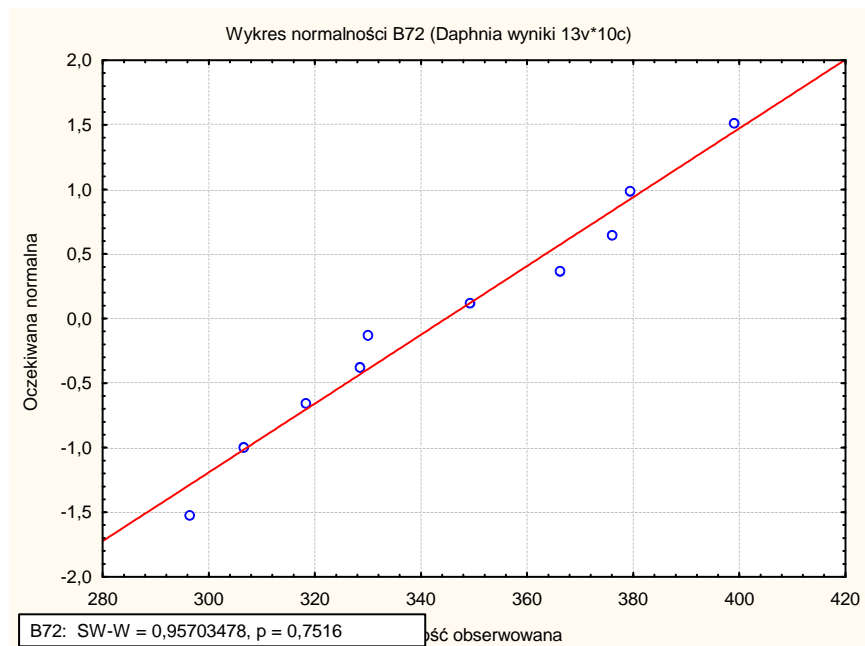


Fig. 145. wykres normalności dla próby Brij 72 (LC50/24 – dla *Daphnia magna*).

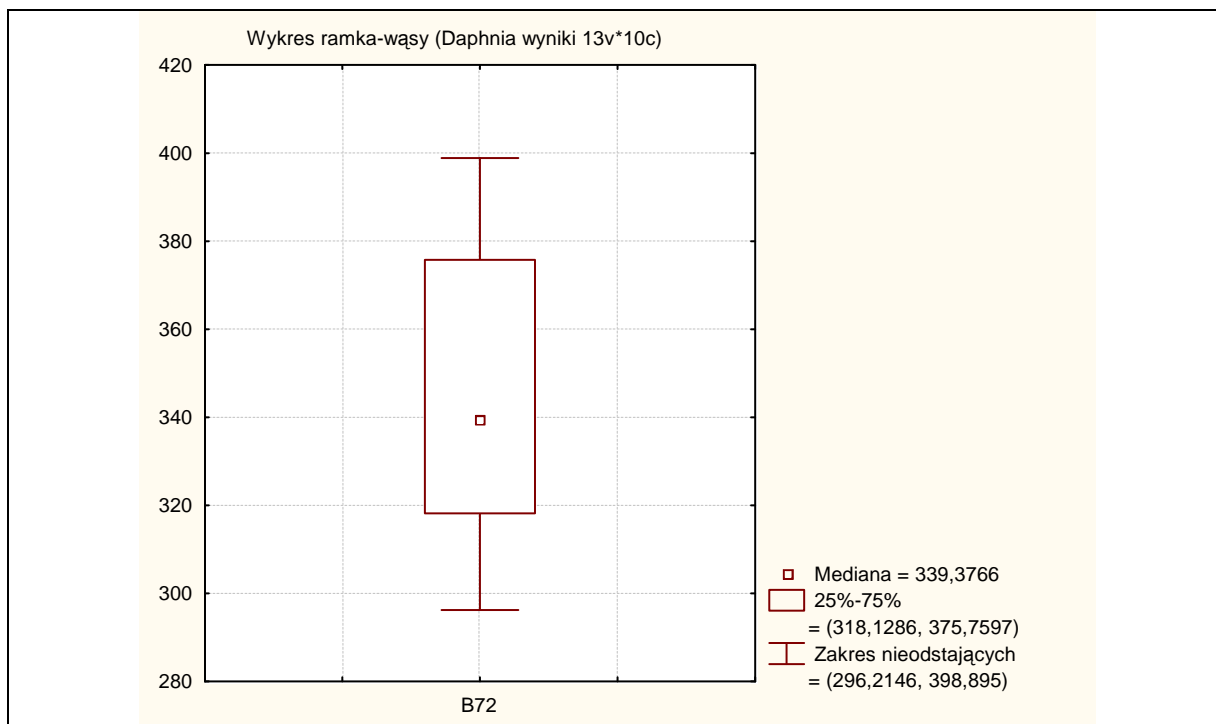
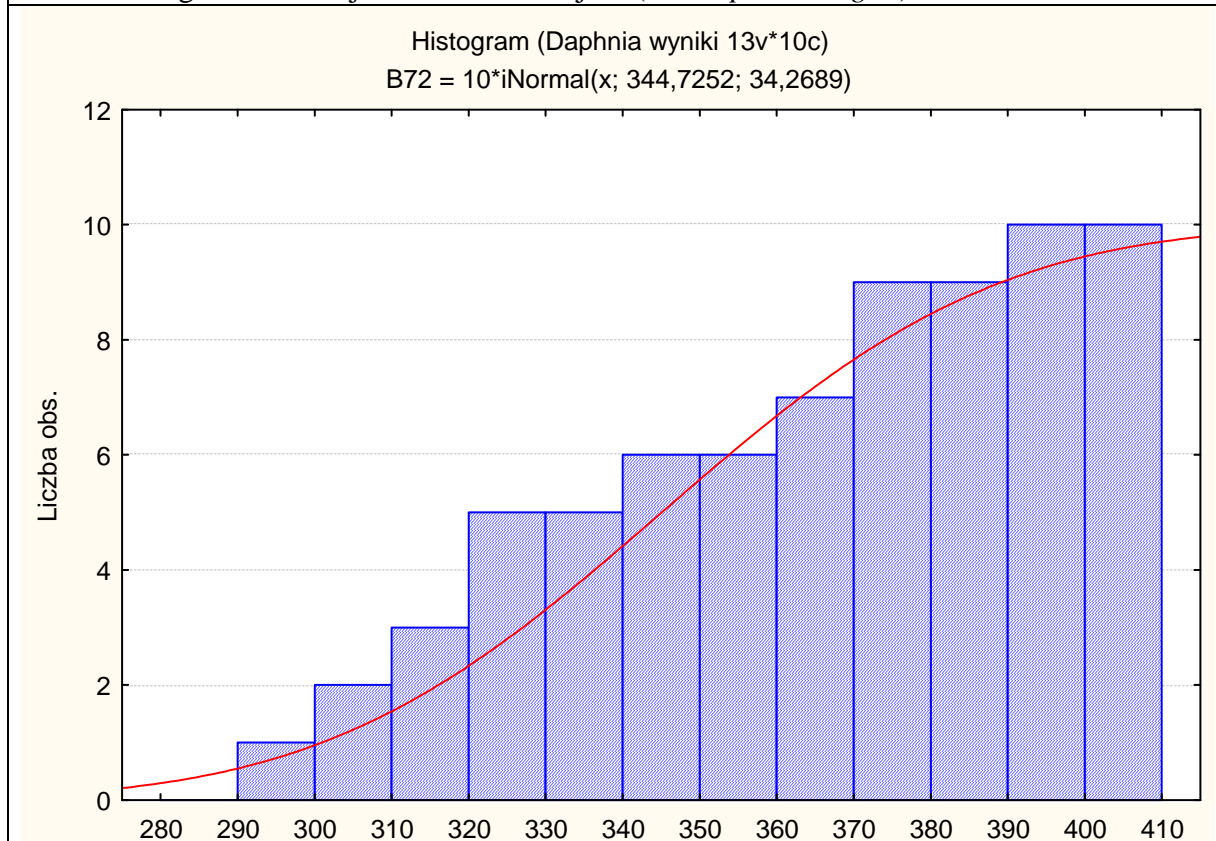


Fig. 146. Wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla Brij 72 (dla *Daphnia magna*).



B72: SW-W = 0,95703478, p = 0,7516; D = 0,167829501, p < n.i., p-Lillieforsa < 1

Fig. 147. Skumulowany histogram dla wartości LC50/24 dla *Daphnia magna* dla Brij 72, z wynikami testu Shapiro – Wilka oraz Kołmogorowa – Smirnowa z poprawką Lilieforsa.



Brij 76.

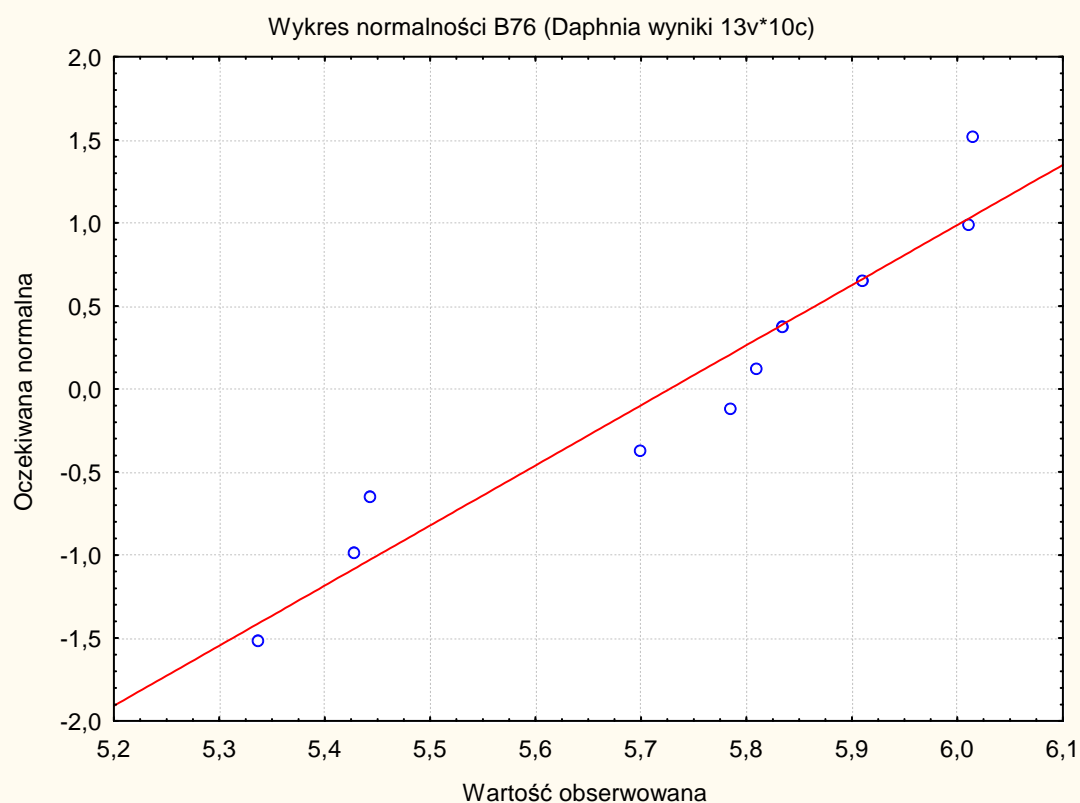


Fig. 148. wykres normalności dla próby Brij 76 (LC50/24 – dla *Daphnia magna*).

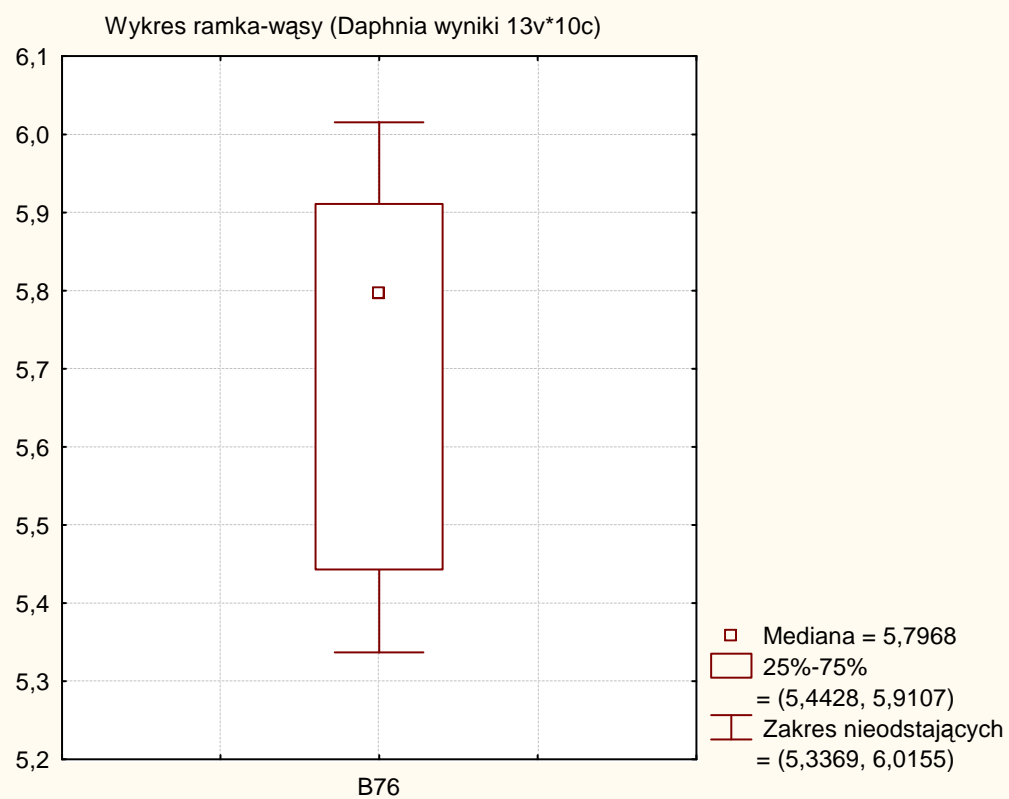


Fig. 149. Wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla Brij 76 (dla *Daphnia magna*).

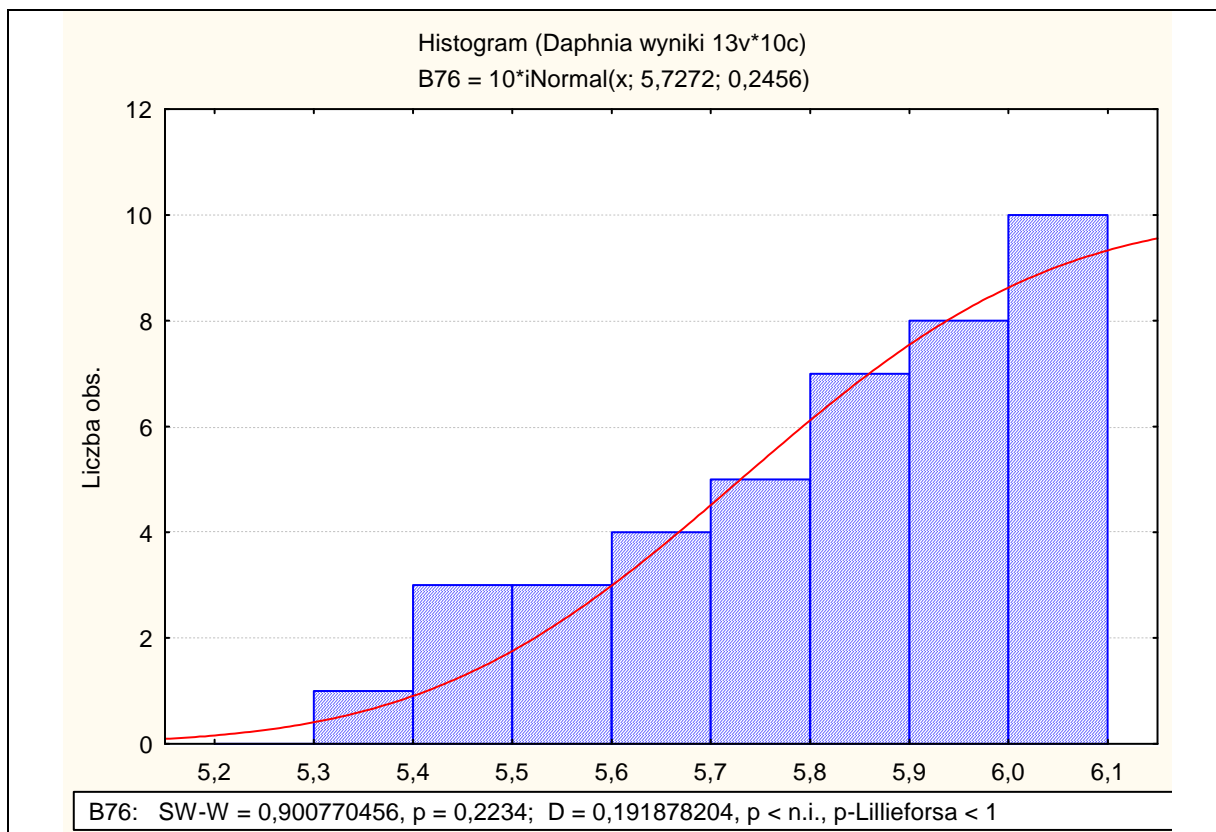


Fig. 150. Skumulowany histogram dla wartości LC50/24 dla *Daphnia magna* dla Brij 76, z wynikami testu Shapiro – Wilka oraz Kołmogorowa – Smirnowa z poprawką Lillieforsa.

Brij 78

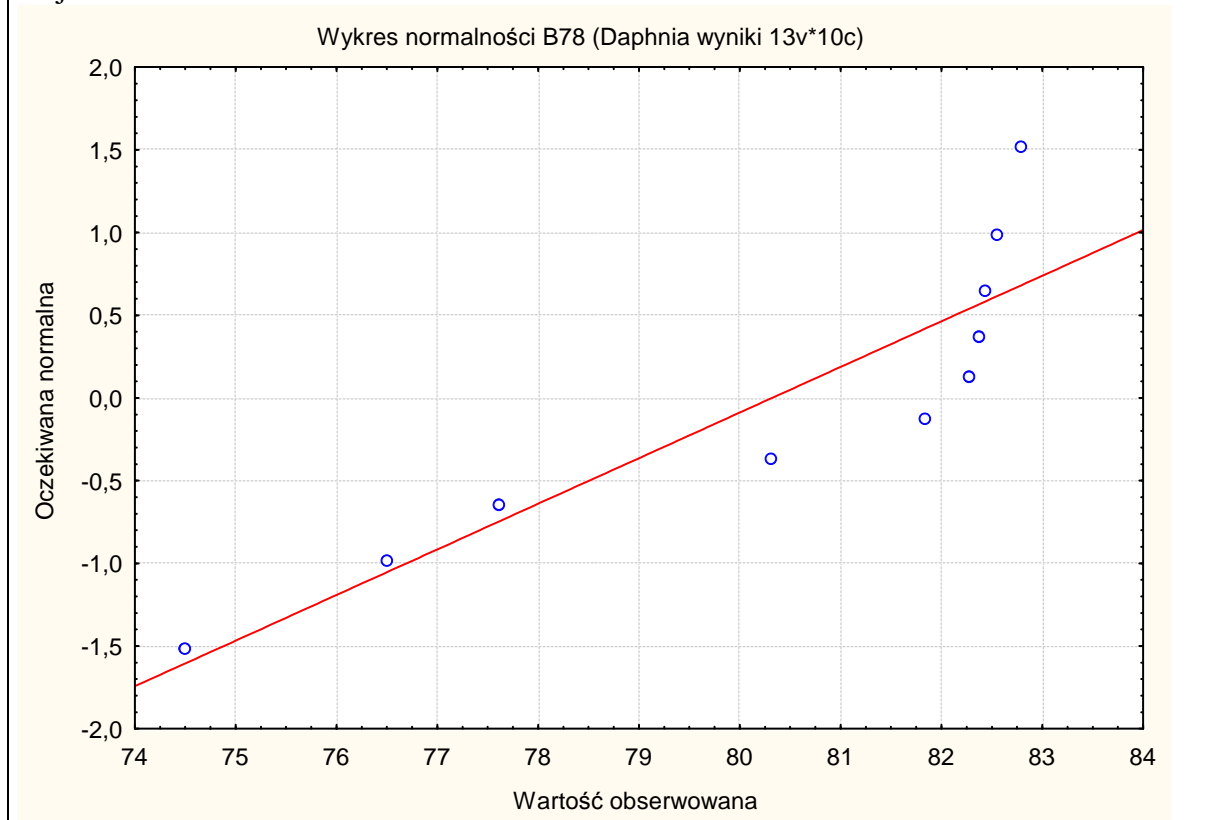


Fig. 151. wykres normalności dla próby Brij 78 (LC50/24 – dla *Daphnia magna*).

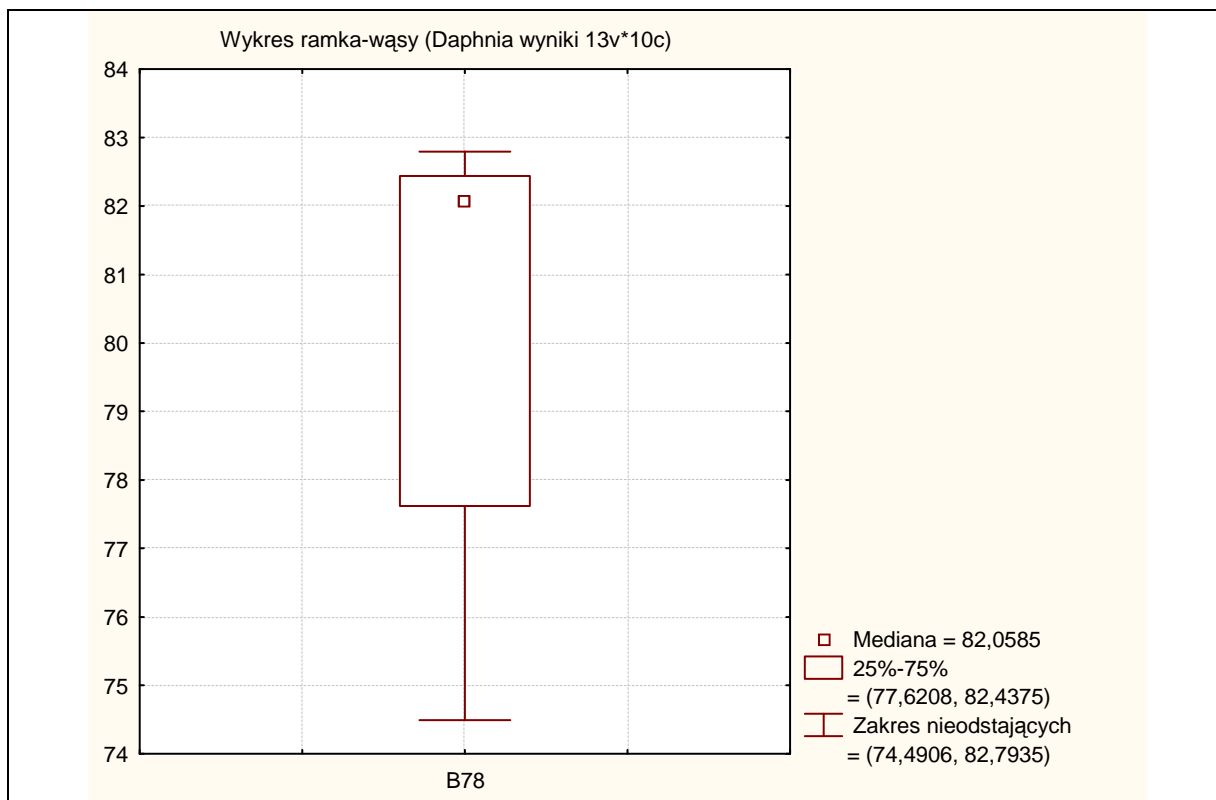


Fig. 152. Wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla Brij 78 (dla *Daphnia magna*).

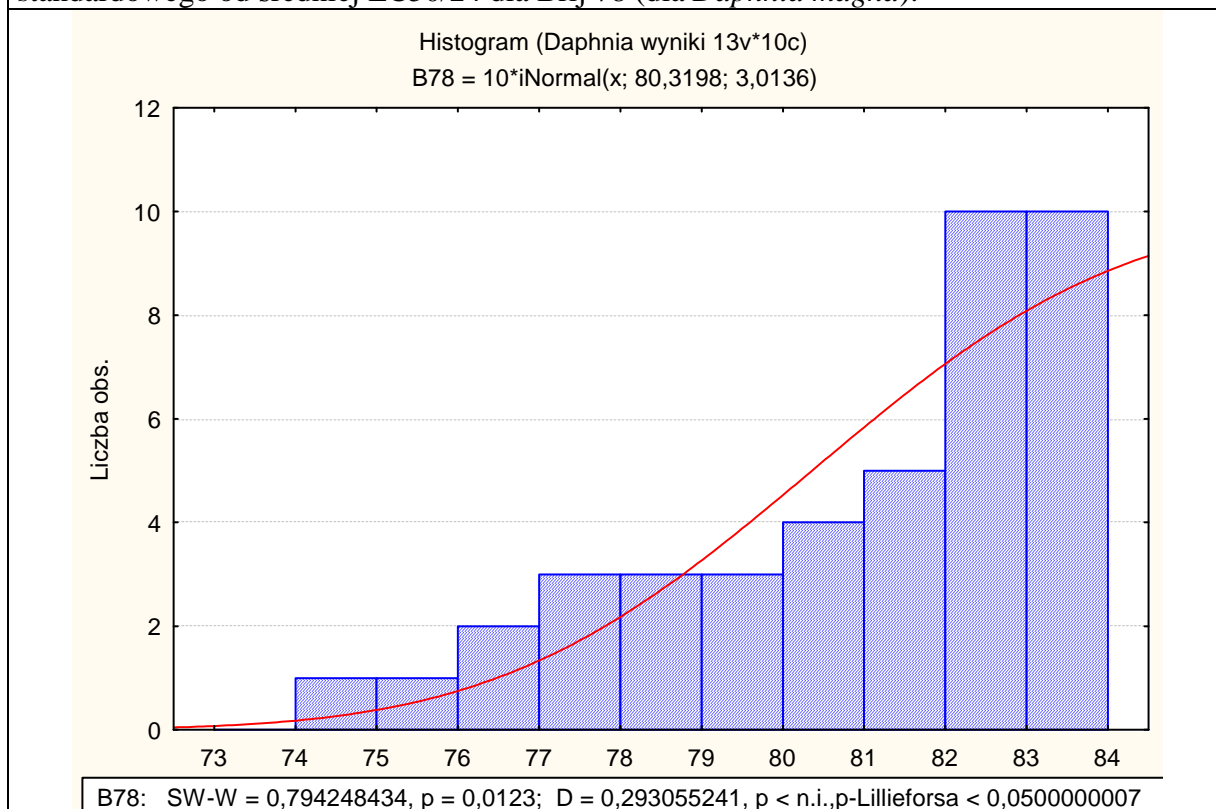


Fig. 153. Skumulowany histogram dla wartości LC50/24 dla *Daphnia magna* dla Brij 76, z wynikami testu Shapiro – Wilka oraz Kołmogorowa – Smirnowa z poprawką Lillieforsa.

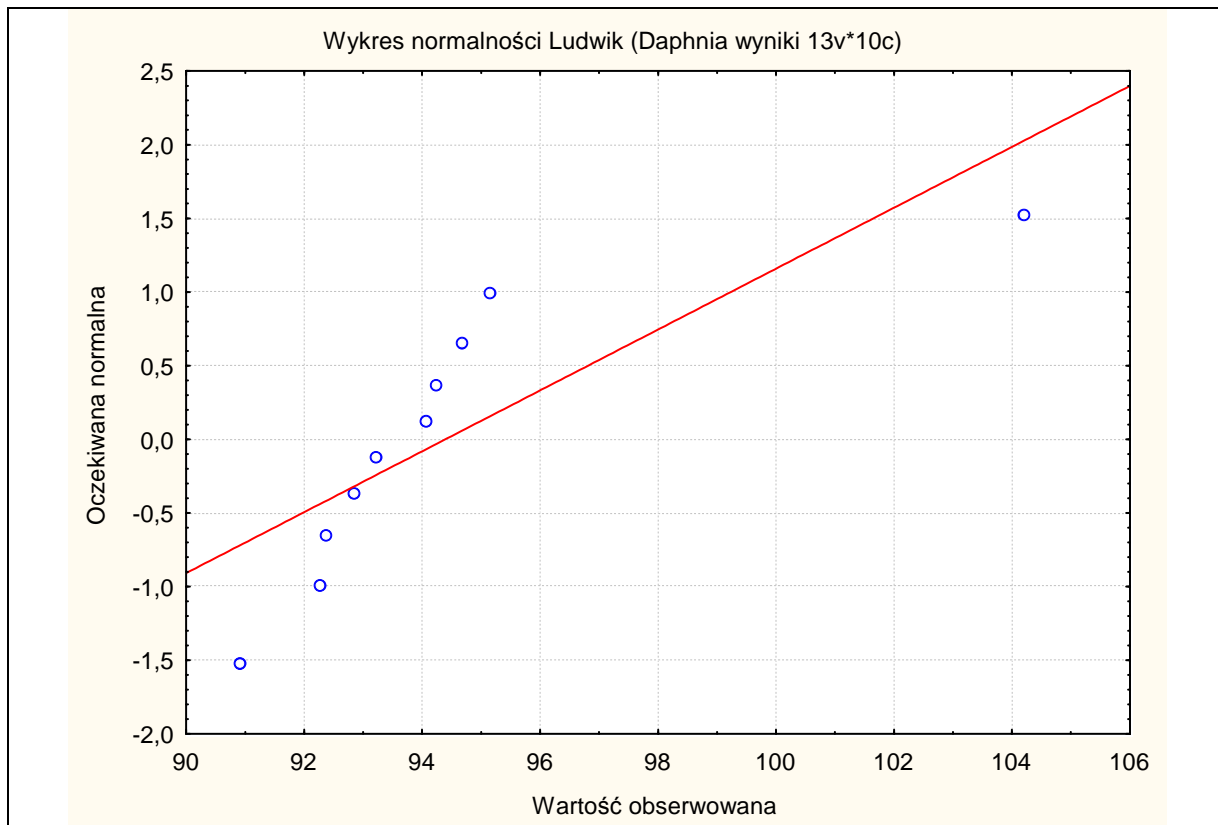


Fig. 154. wykres normalności dla próby Ludwik (LC50/24 – dla *Daphnia magna*).

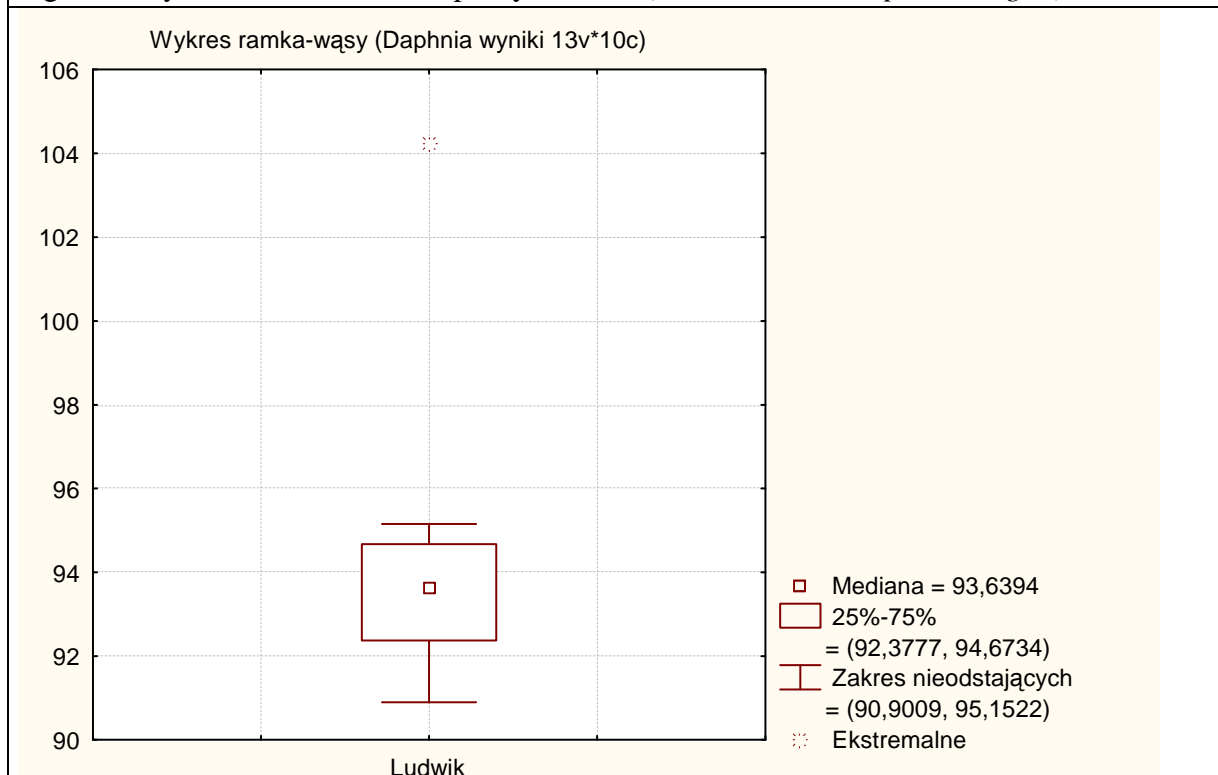
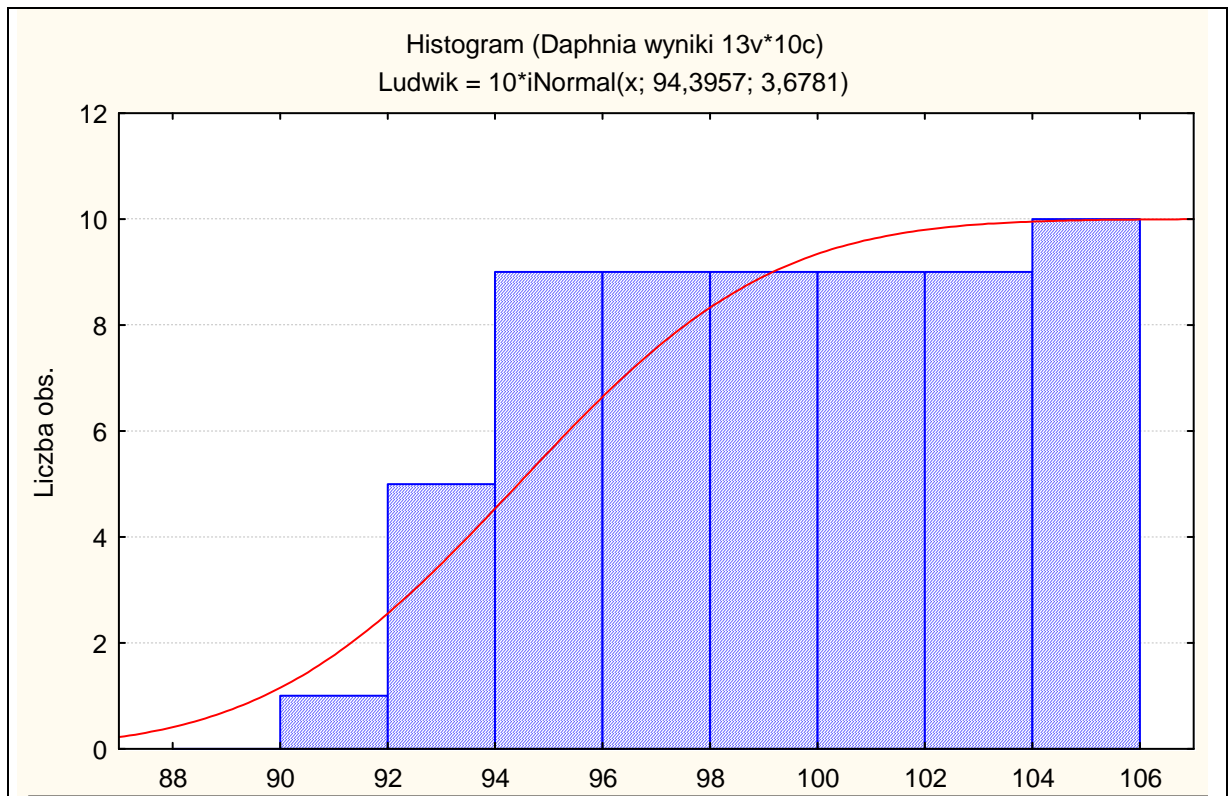


Fig. 155. Wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla Ludwik (dla *Daphnia magna*).



Ludwik: SW-W = 0,707598794, p = 0,0011; D = 0,318520824, p < n.i., p-Lillieforsa < 0,0099999997

Fig. 156. Skumulowany histogram dla wartości LC50/24 dla *Daphnia magna* dla Brij 76, z wynikami testu Shapiro – Wilka oraz Kołmogorowa – Smirnowa z poprawką Lillieforsa.

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

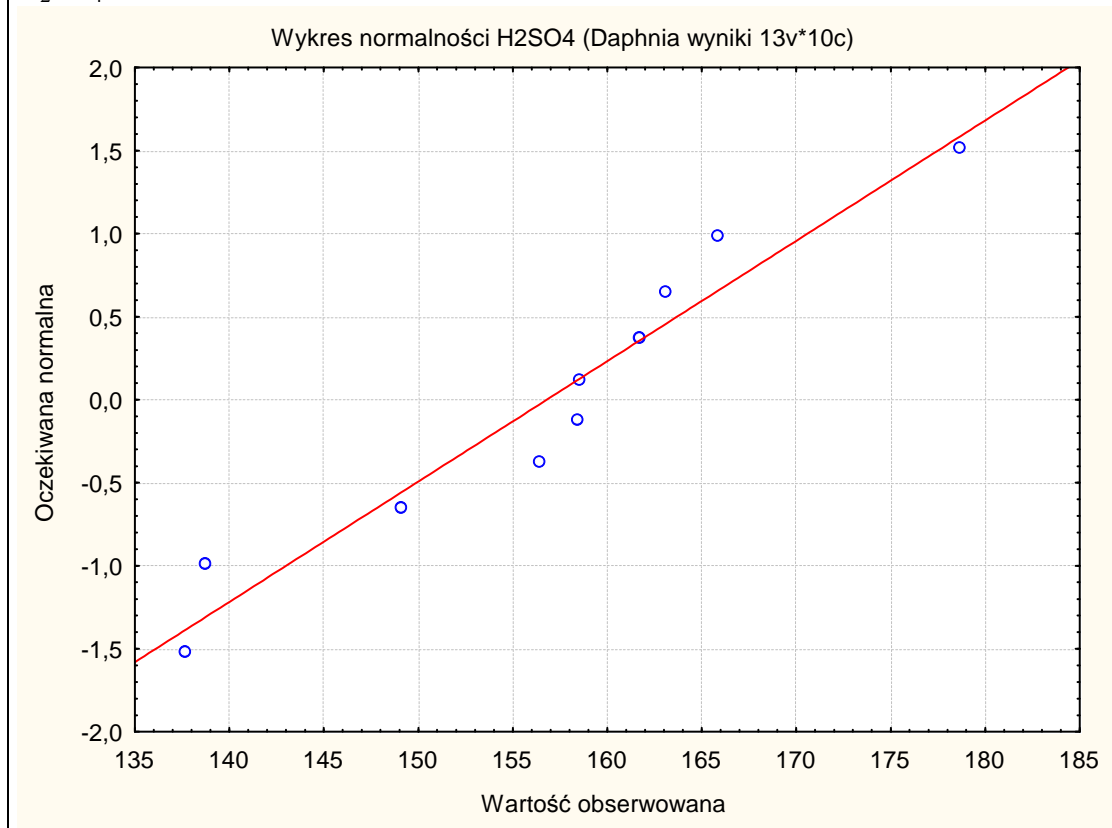


Fig. 157. wykres normalności dla próby H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (LC50/24 – dla *Daphnia magna*).

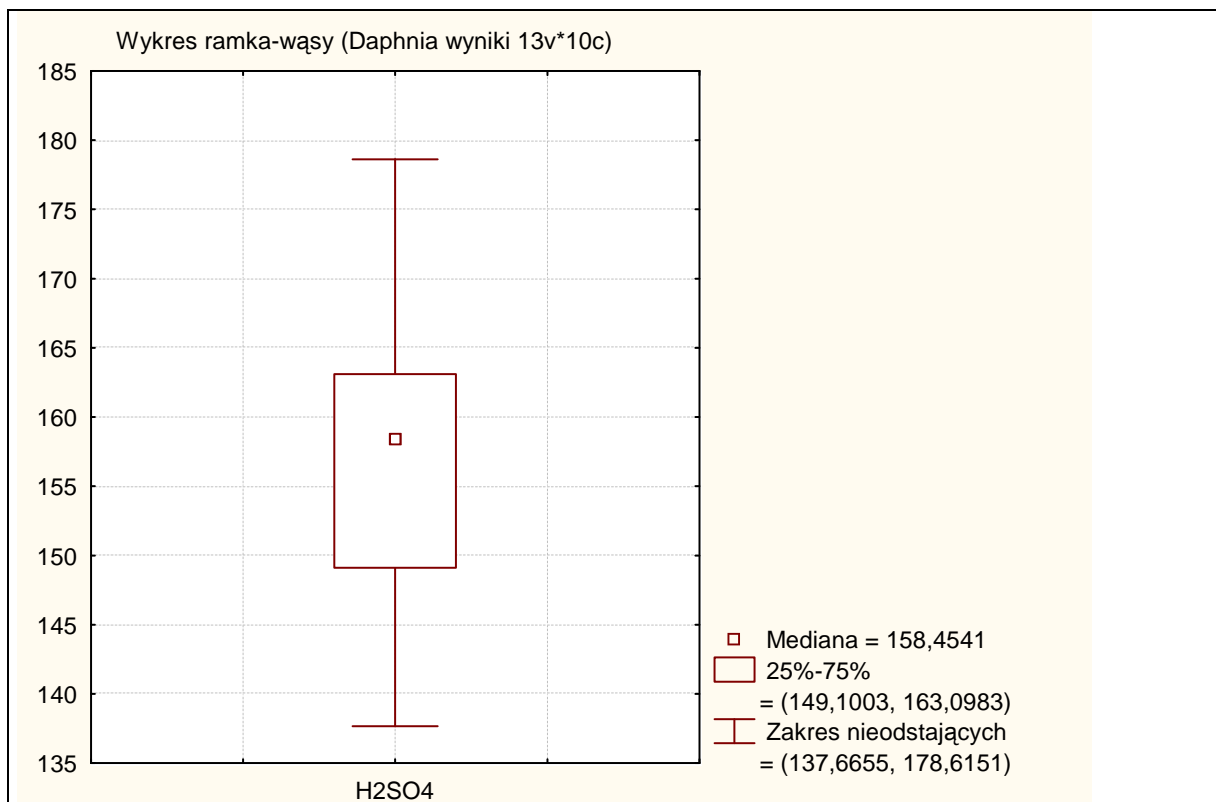


Fig. 158. Wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (dla *Daphnia magna*).

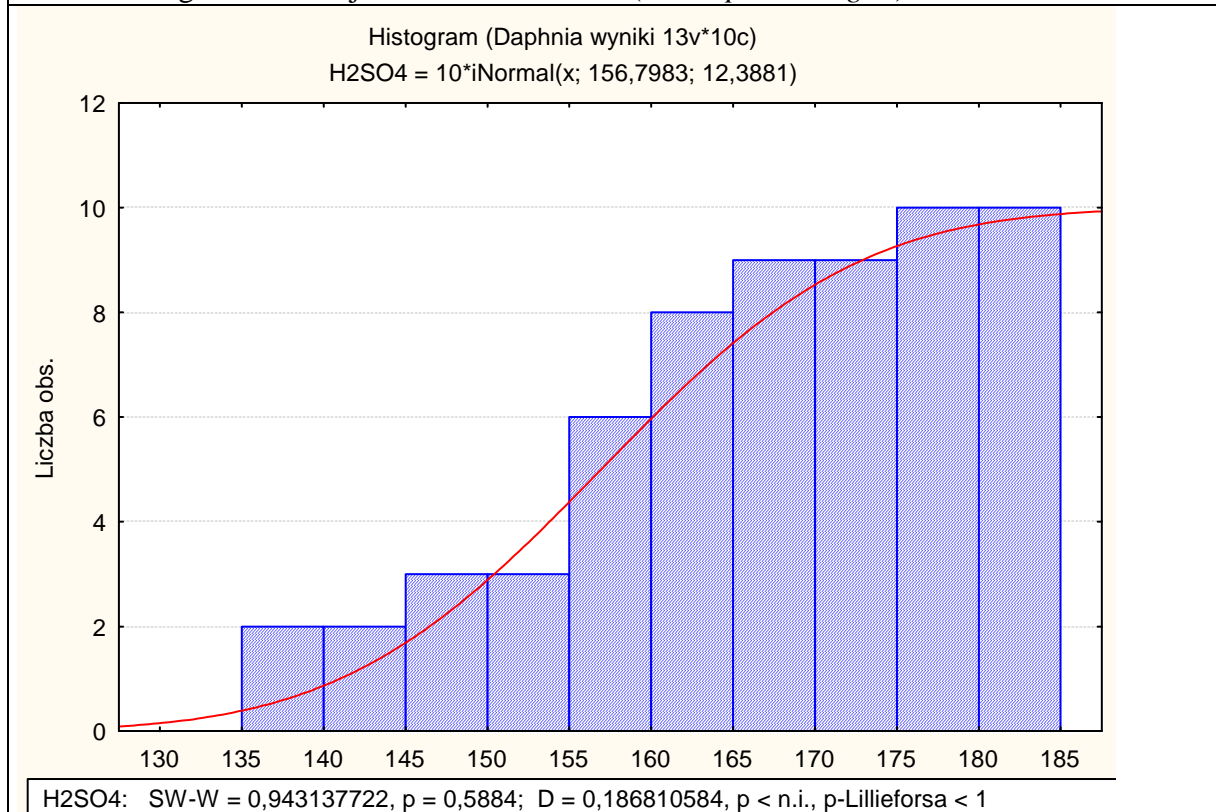


Fig. 159. Skumulowany histogram dla wartości LC50/24 dla *Daphnia magna* dla H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, z wynikami testu Shapiro – Wilka oraz Kołmogorowa – Smirnowa z poprawką Lilieforsa.

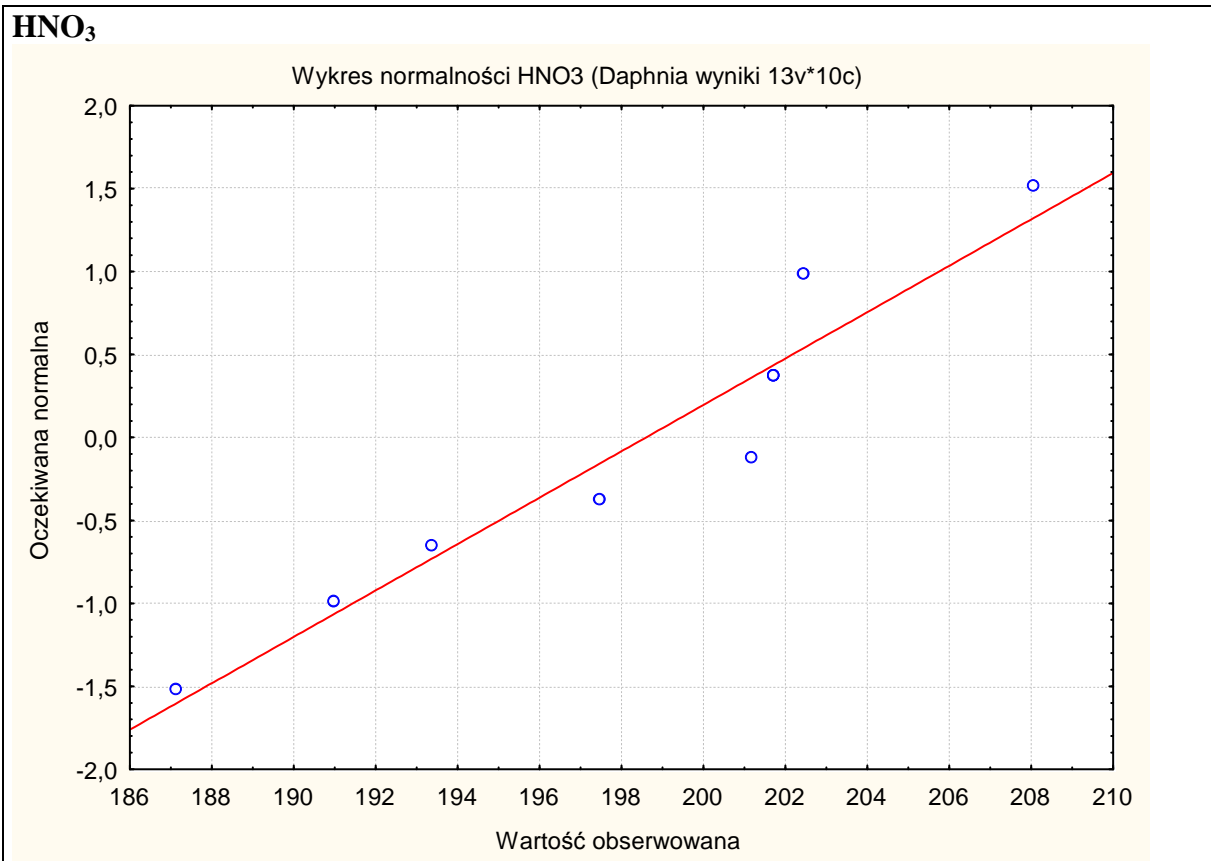


Fig. 160. wykres normalności dla próby HNO<sub>3</sub> (LC50/24 – dla *Daphnia magna*).



Fig. 161. Wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla HNO<sub>3</sub> (dla *Daphnia magna*).

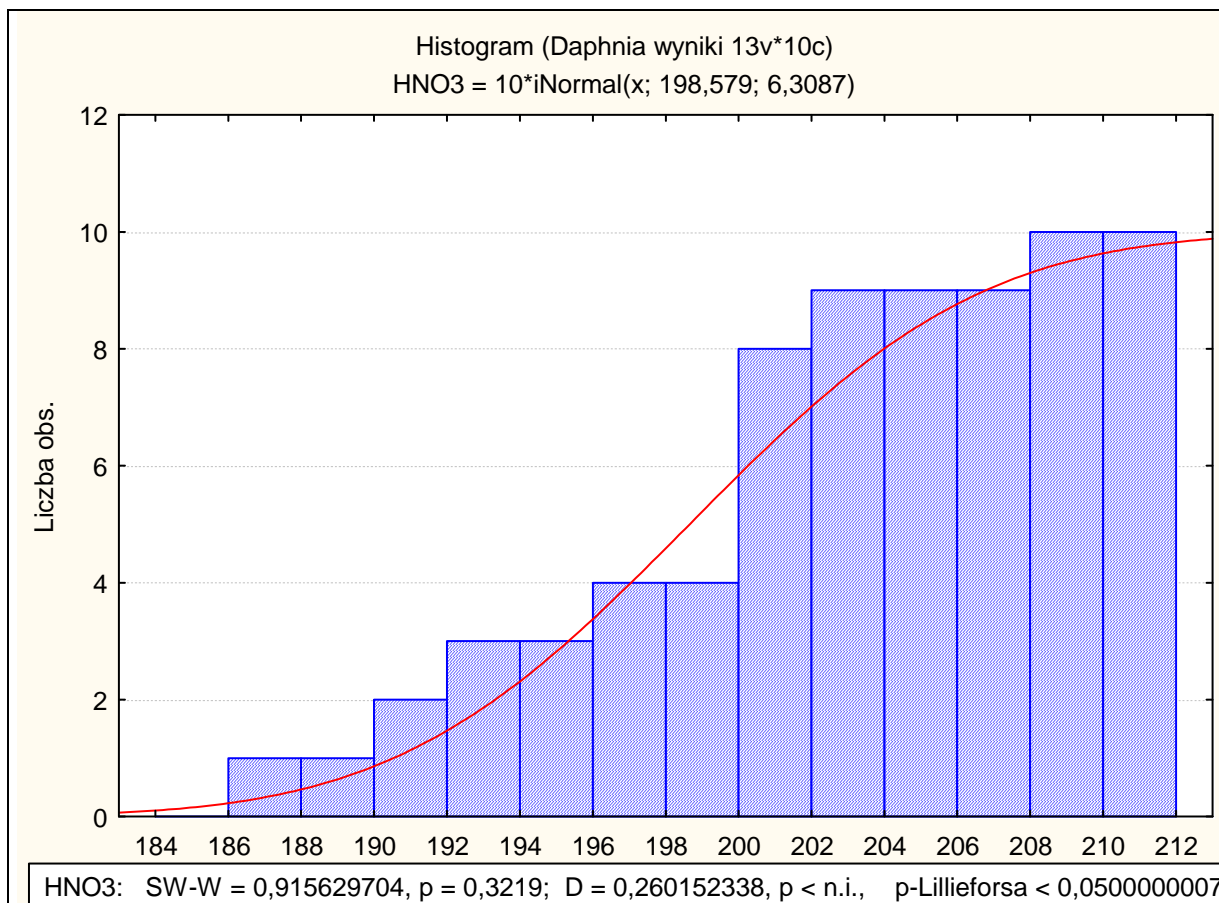


Fig. 162. Skumulowany histogram dla wartości LC50/24 dla *Daphnia magna* dla  $HNO_3$ , z wynikami testu Shapiro – Wilka oraz Kołmogorowa – Smirnowa z poprawką Lilieforsa.

Amoniak:

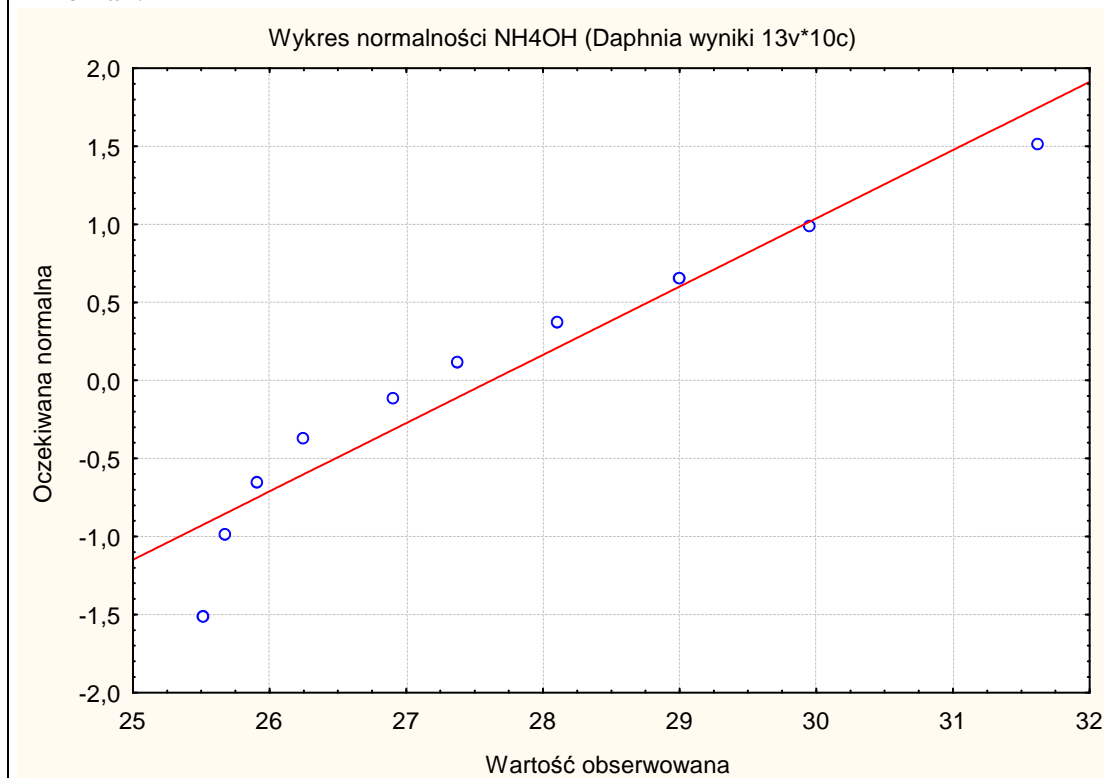


Fig. 163. wykres normalności dla próby  $NH_4OH$  (LC50/24 – dla *Daphnia magna*).



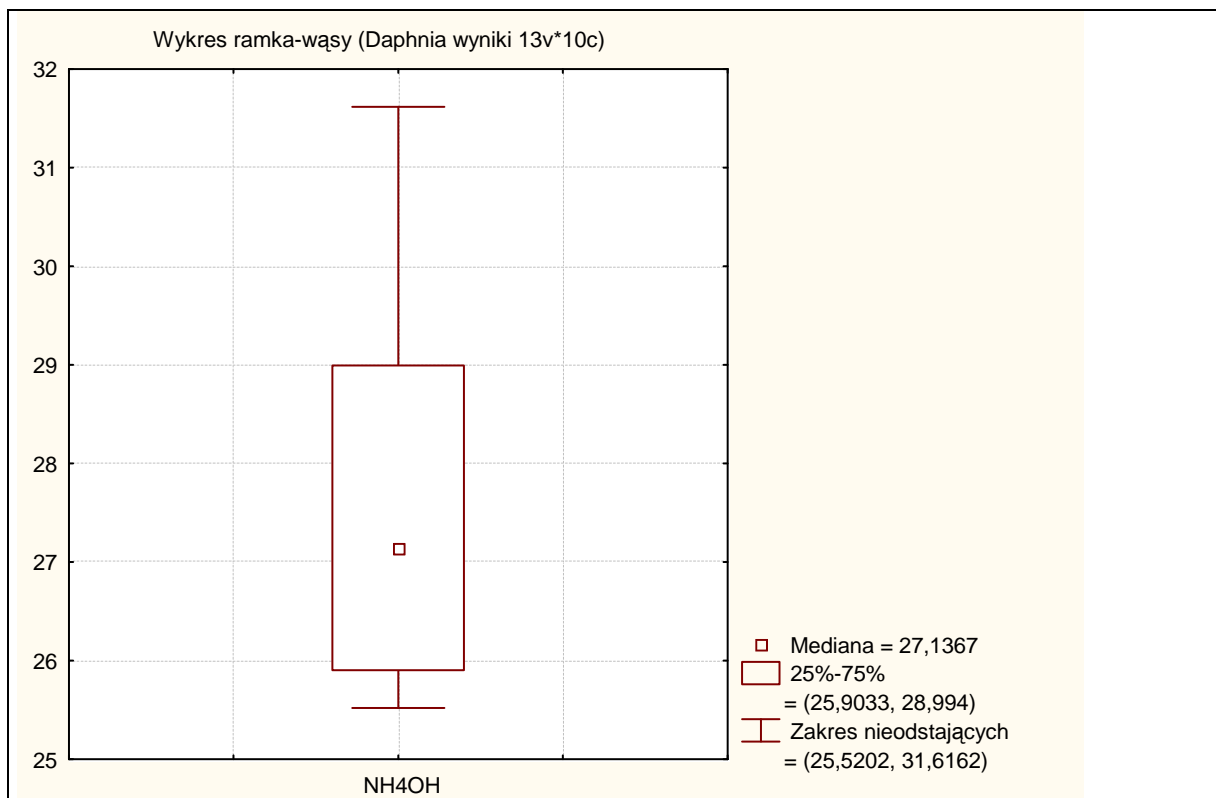


Fig. 164. Wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla NH<sub>4</sub>OH (dla *Daphnia magna*).

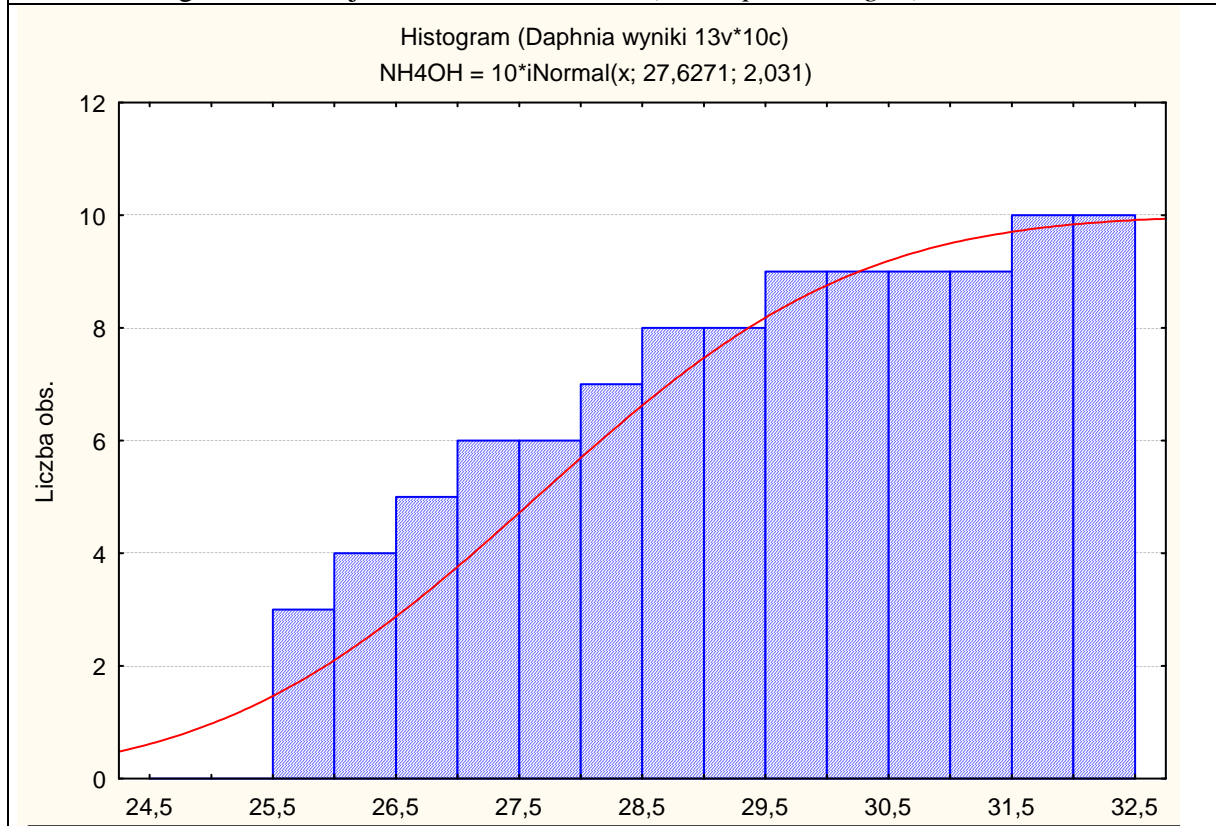


Fig. 165. Skumulowany histogram dla wartości LC50/24 dla *Daphnia magna* dla H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, z wynikami testu Shapiro – Wilka oraz Kołmogorowa – Smirnowa z poprawką Lillieforsa.

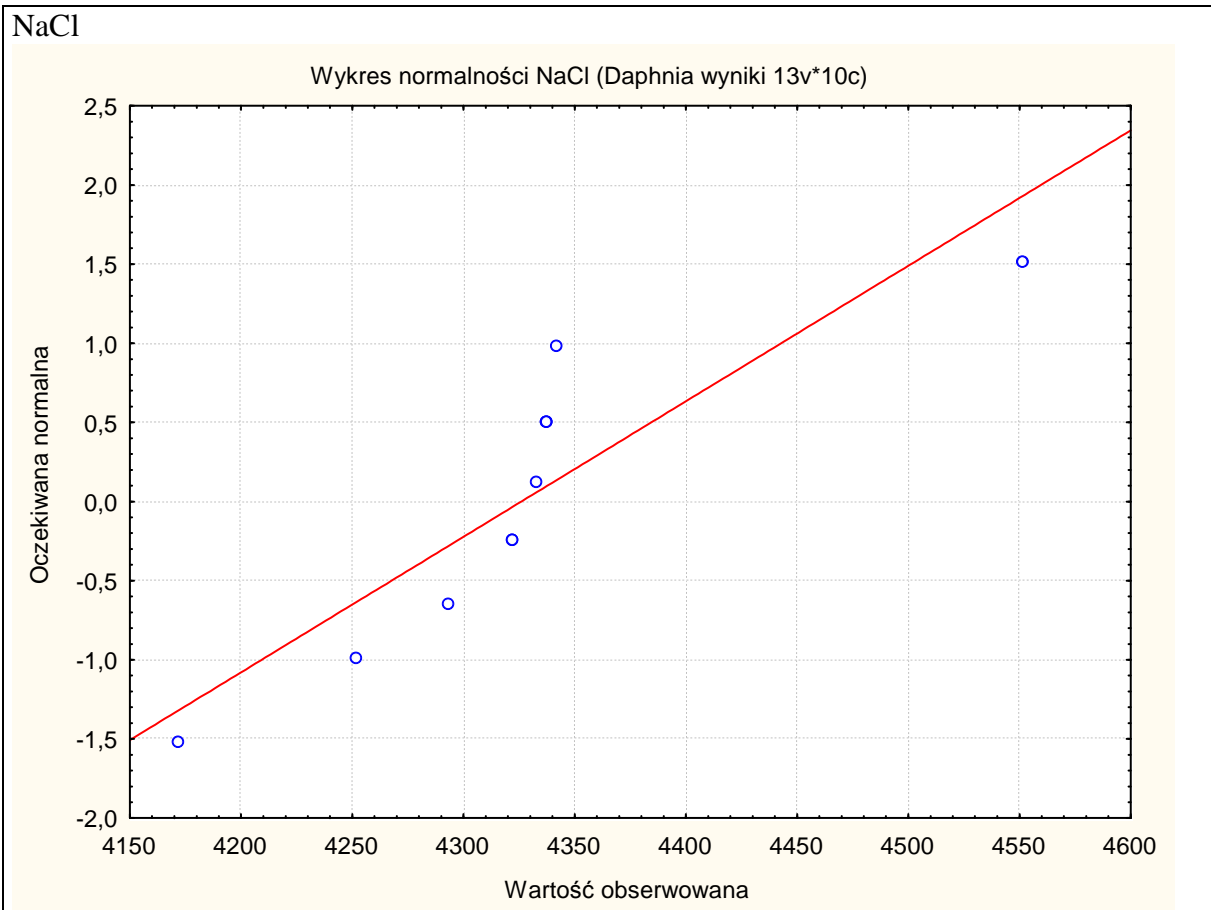


Fig. 166. wykres normalności dla próby NaCl (LC50/24 – dla *Daphnia magna*).

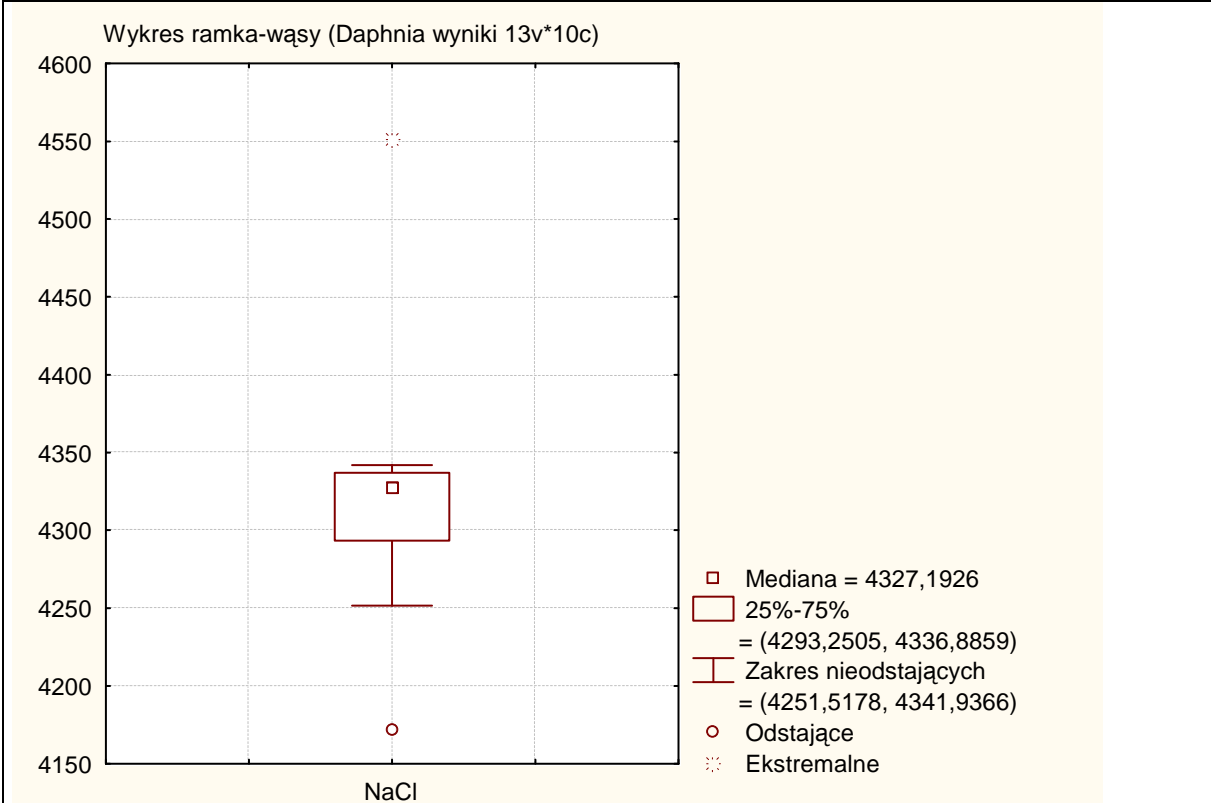


Fig. 167. Wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla NaCl (dla *Daphnia magna*).

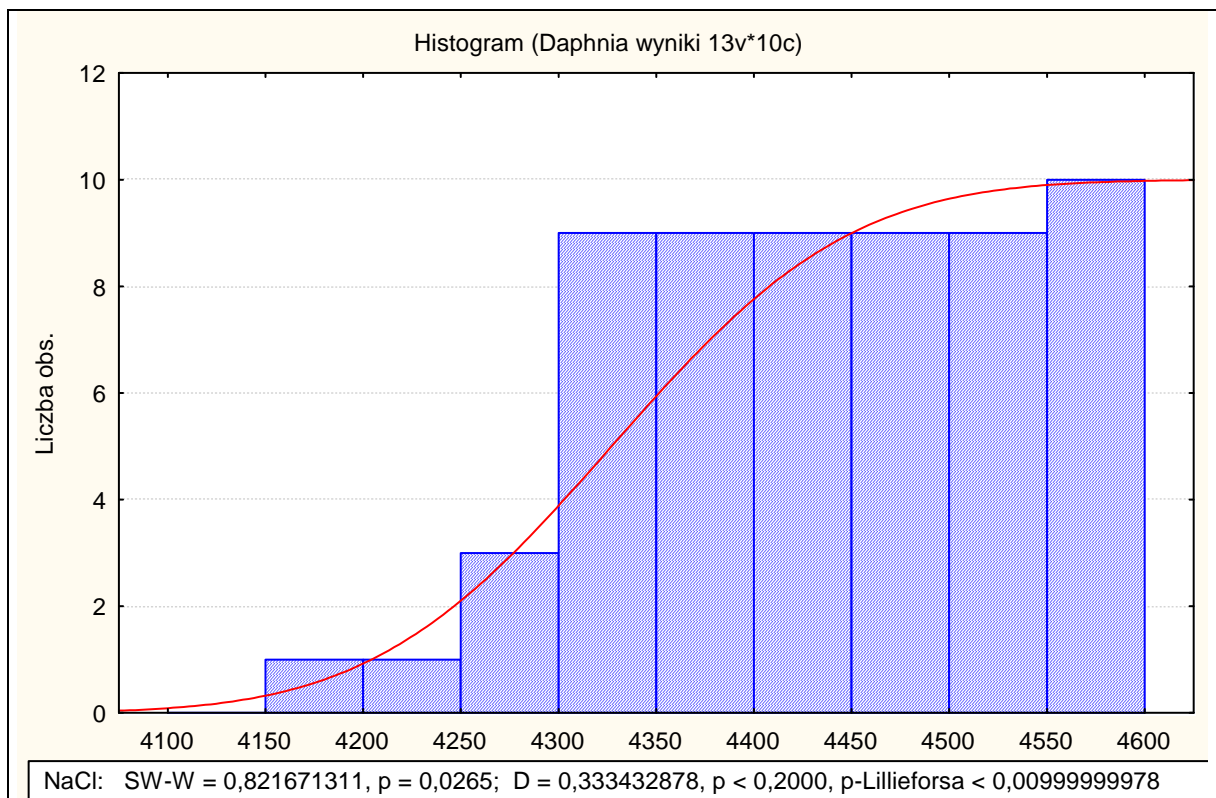


Fig. 168. Skumulowany histogram dla wartości LC50/24 dla *Daphnia magna* dla NaCl, z wynikami testu Shapiro – Wilka oraz Kołmogorowa – Smirnowa z poprawką Lillieforsa.

KCl

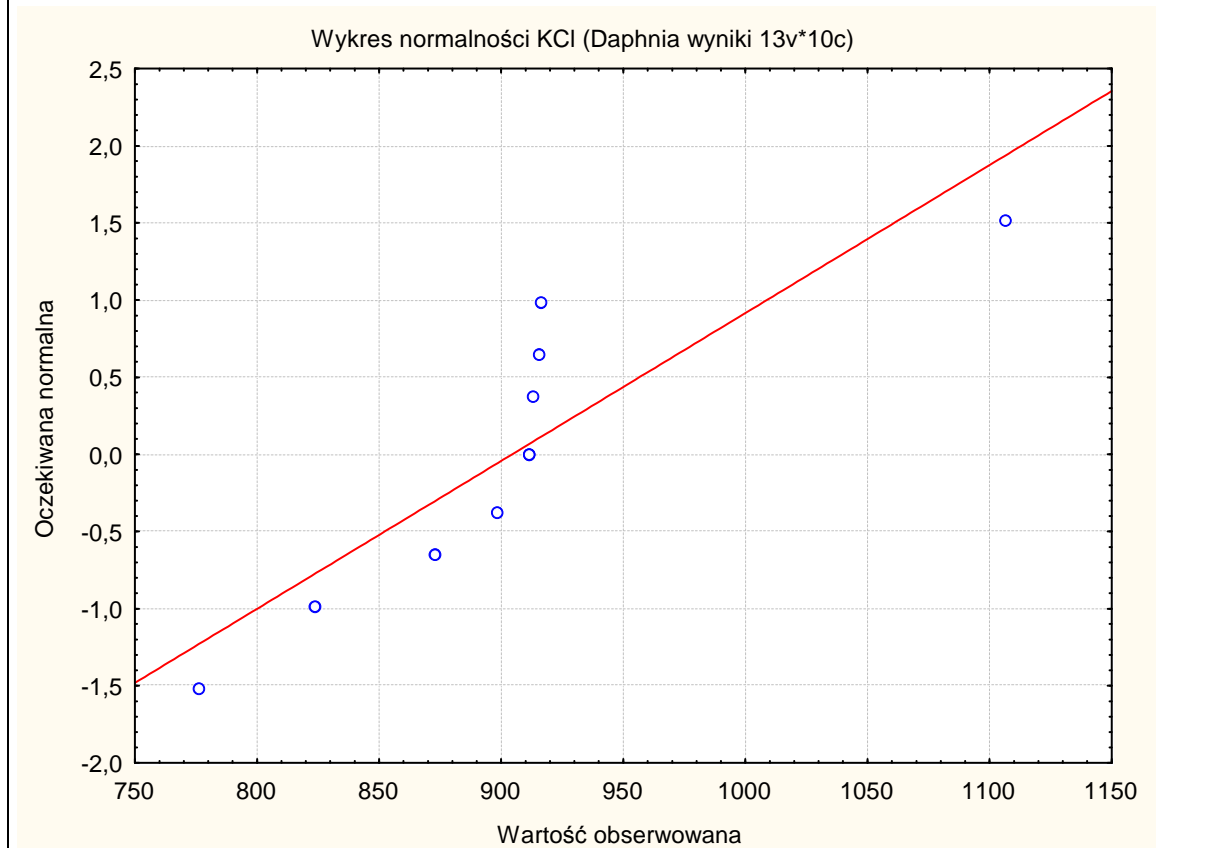


Fig. 169. wykres normalności dla próby KCl (LC50/24 – dla *Daphnia magna*).

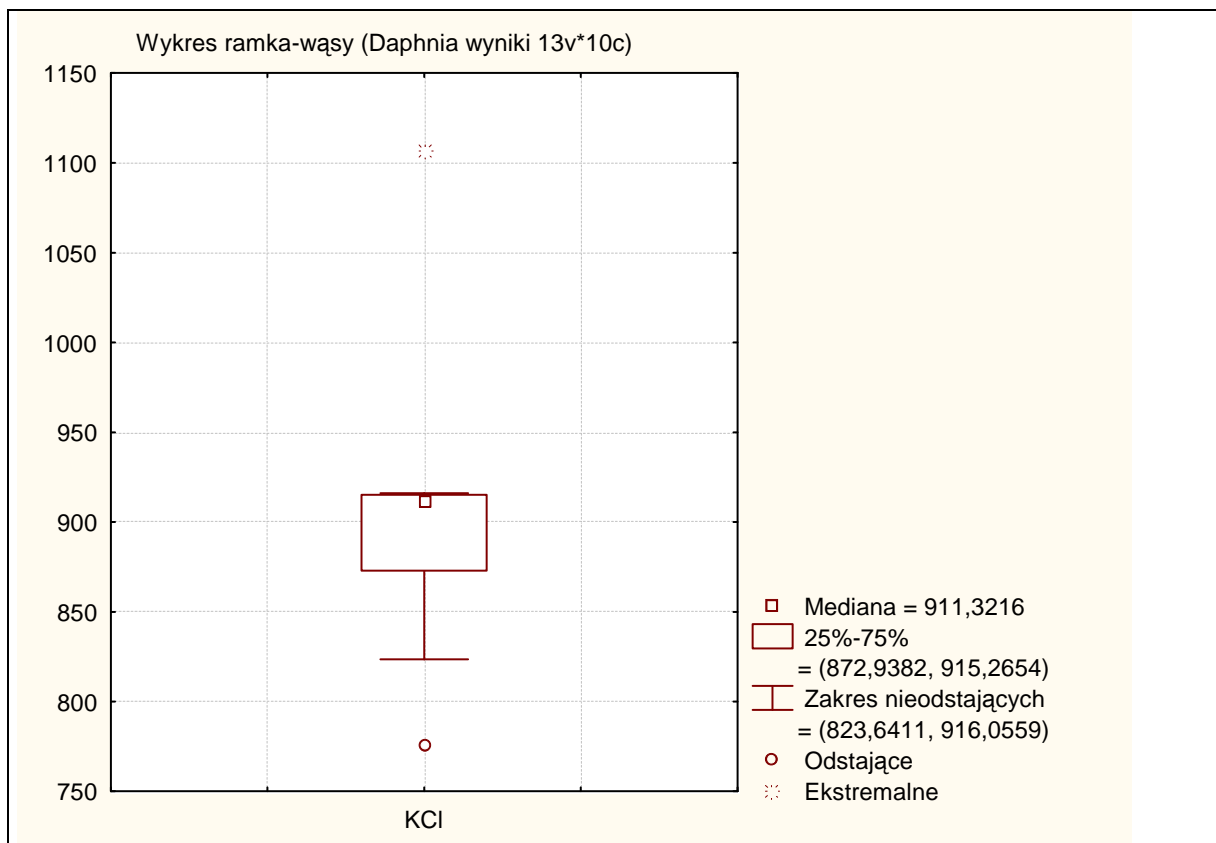


Fig. 170. Wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla KCl (dla *Daphnia magna*).

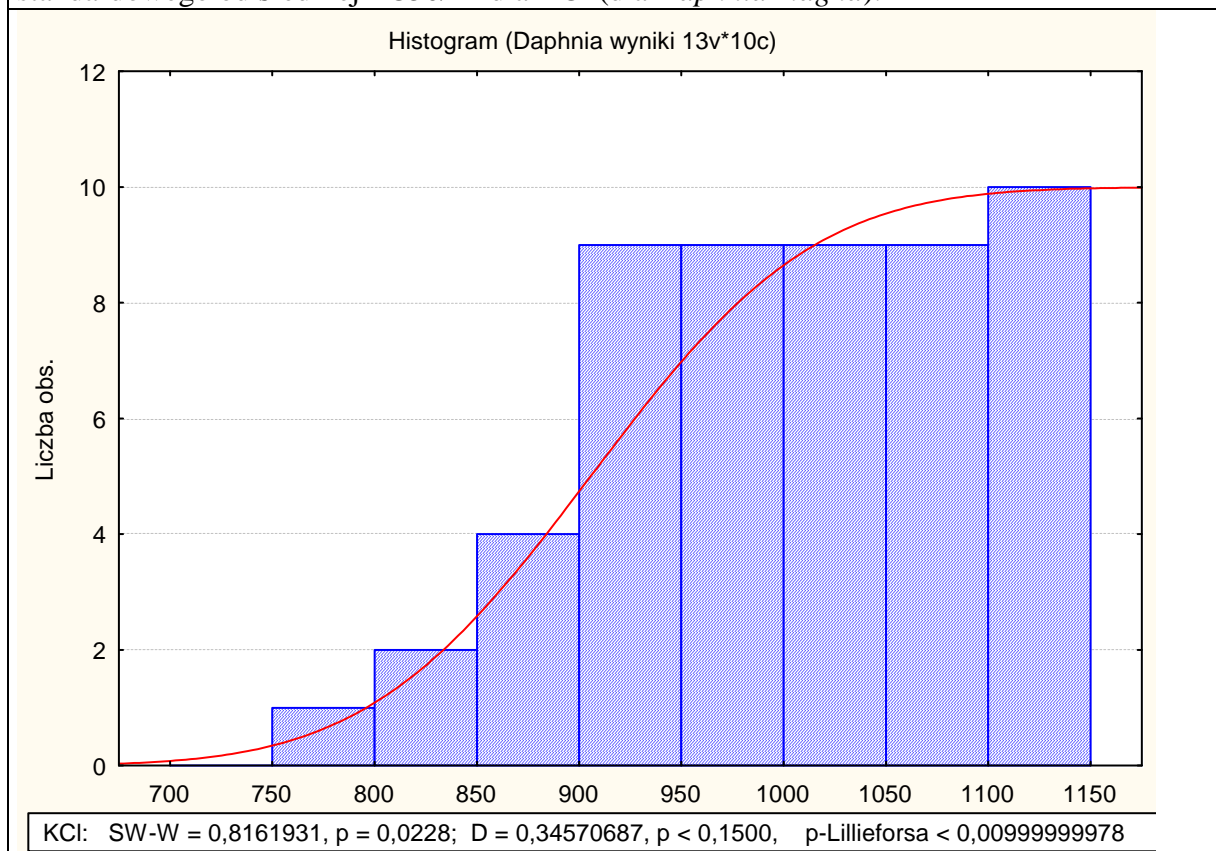


Fig. 171. Skumulowany histogram dla wartości LC50/24 dla *Daphnia magna* dla KCl, z wynikami testu Shapiro – Wilka oraz Kołmogorowa – Smirnowa z poprawką Lillieforsa.

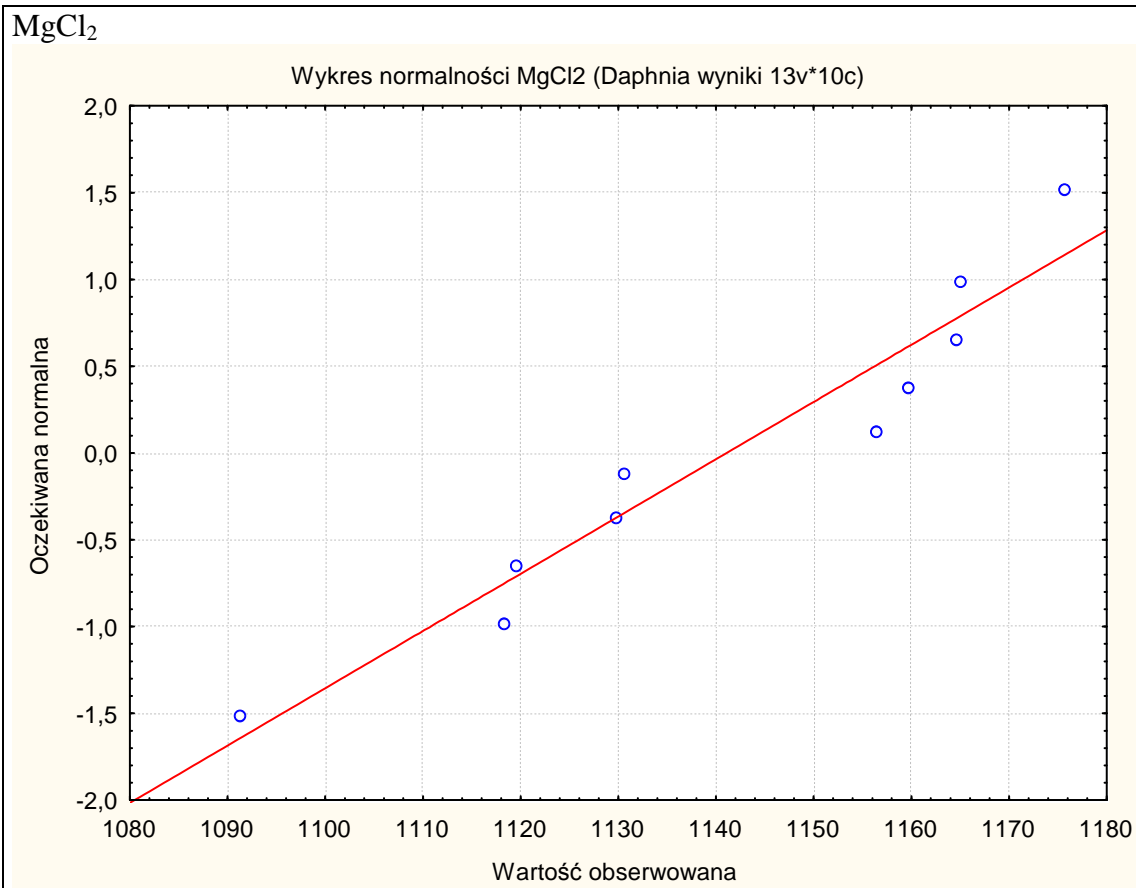


Fig. 172. wykres normalności dla próby MgCl<sub>2</sub> (LC50/24 – dla *Daphnia magna*).

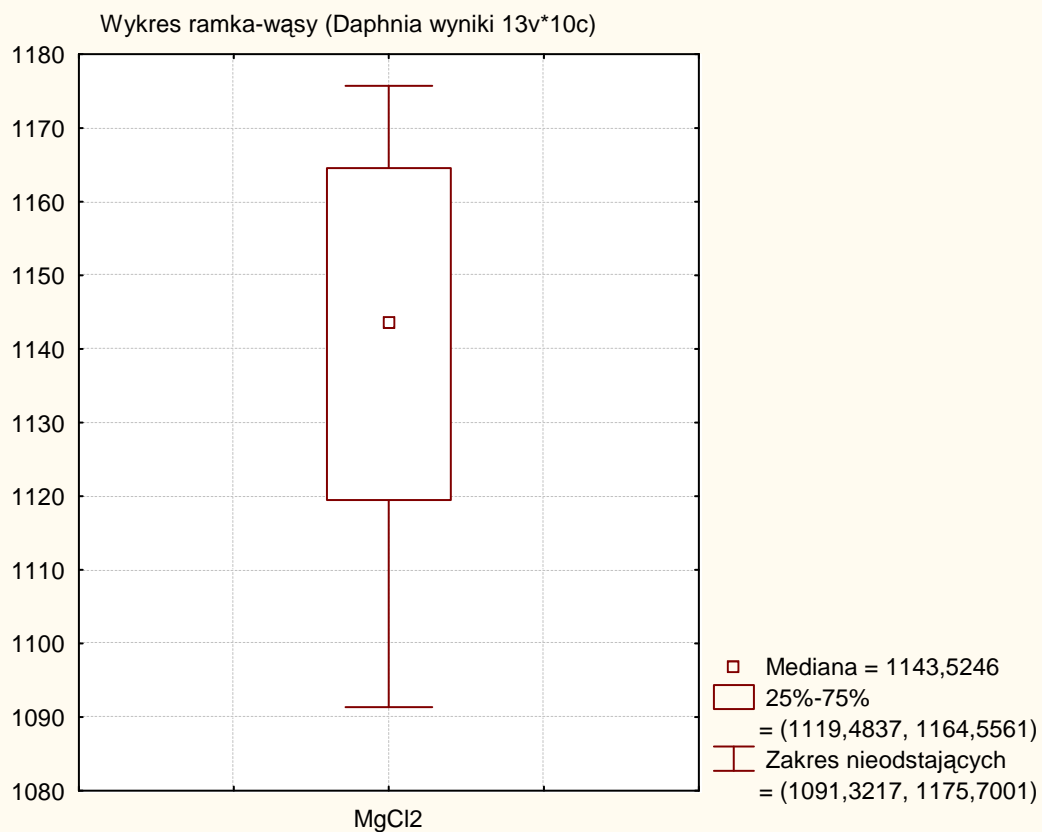


Fig. 173. Wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla MgCl<sub>2</sub> (dla *Daphnia magna*).

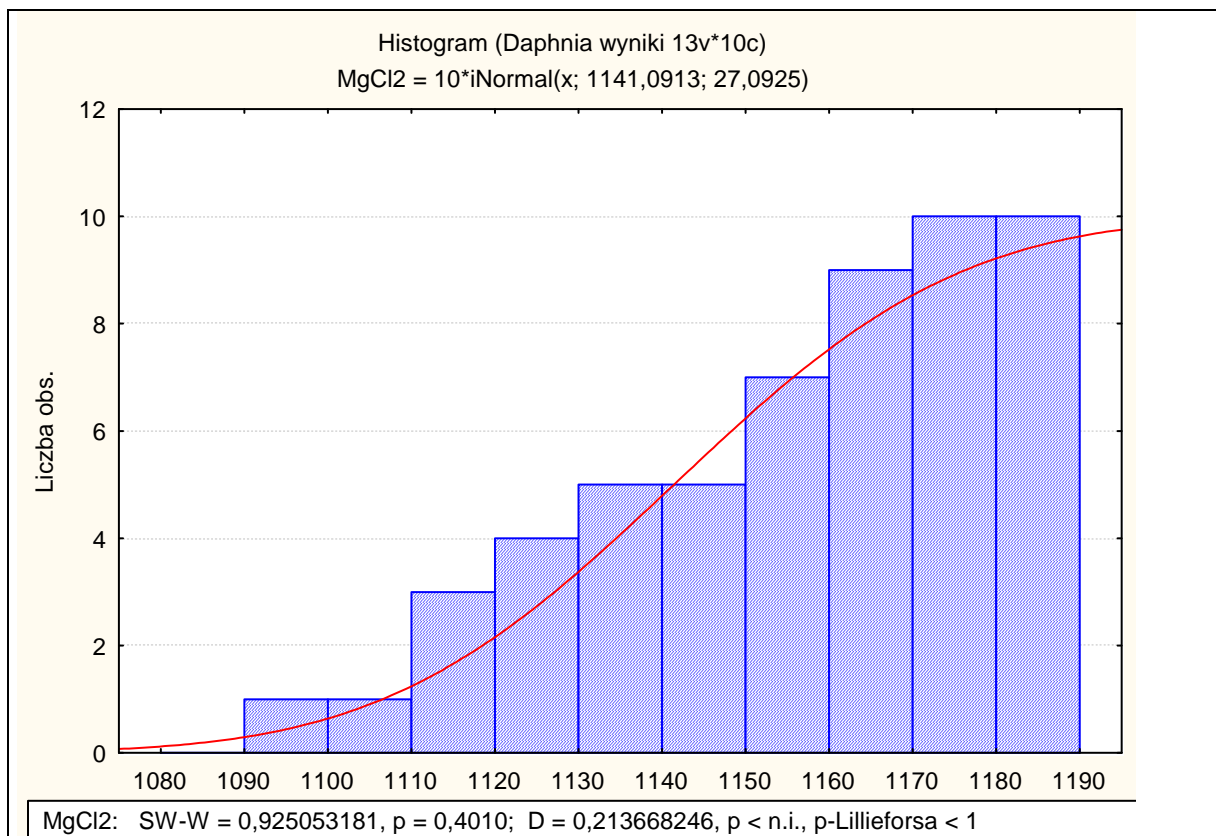


Fig. 174. Skumulowany histogram dla wartości LC50/24 dla *Daphnia magna* dla MgCl<sub>2</sub>, z wynikami testu Shapiro – Wilka oraz Kołmogorowa – Smirnowa z poprawką Lillieforsa.

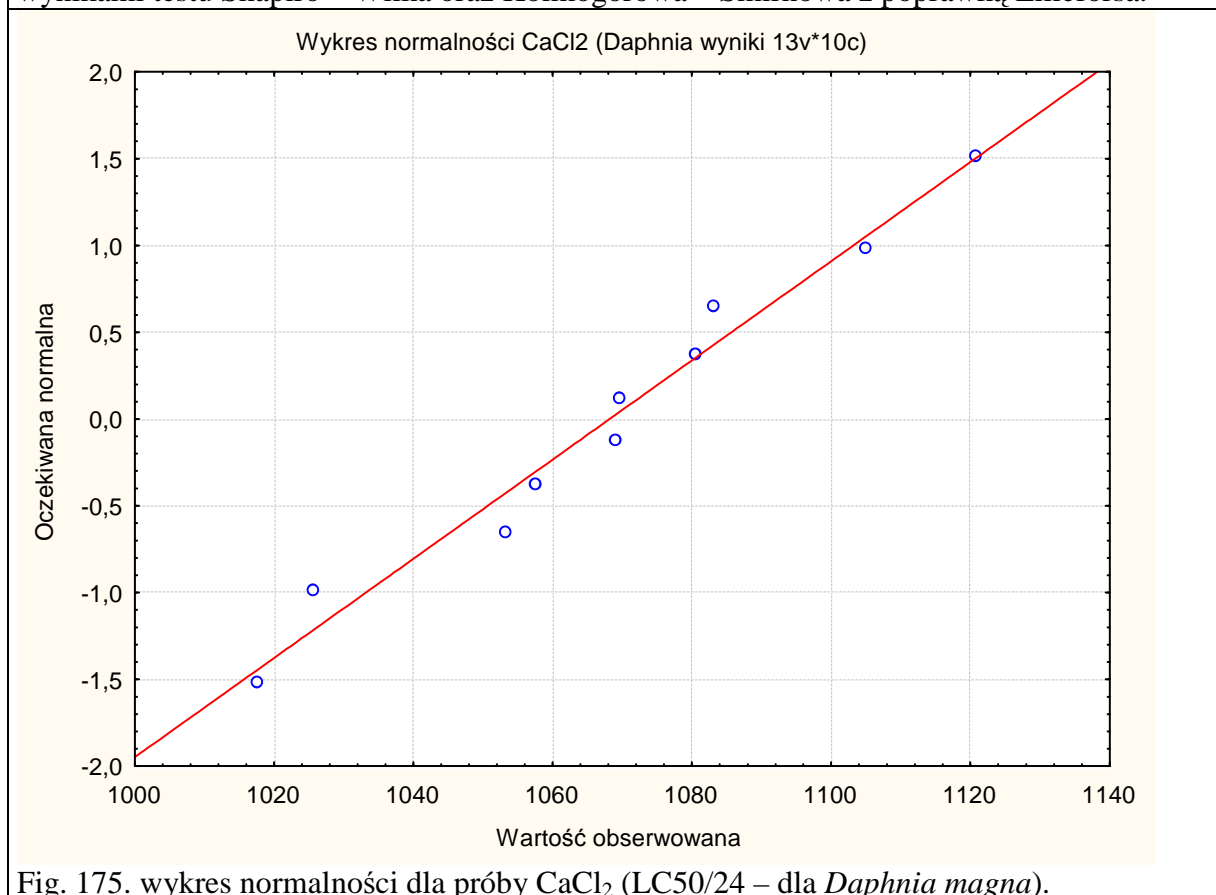


Fig. 175. wykres normalności dla próby CaCl<sub>2</sub> (LC50/24 – dla *Daphnia magna*).

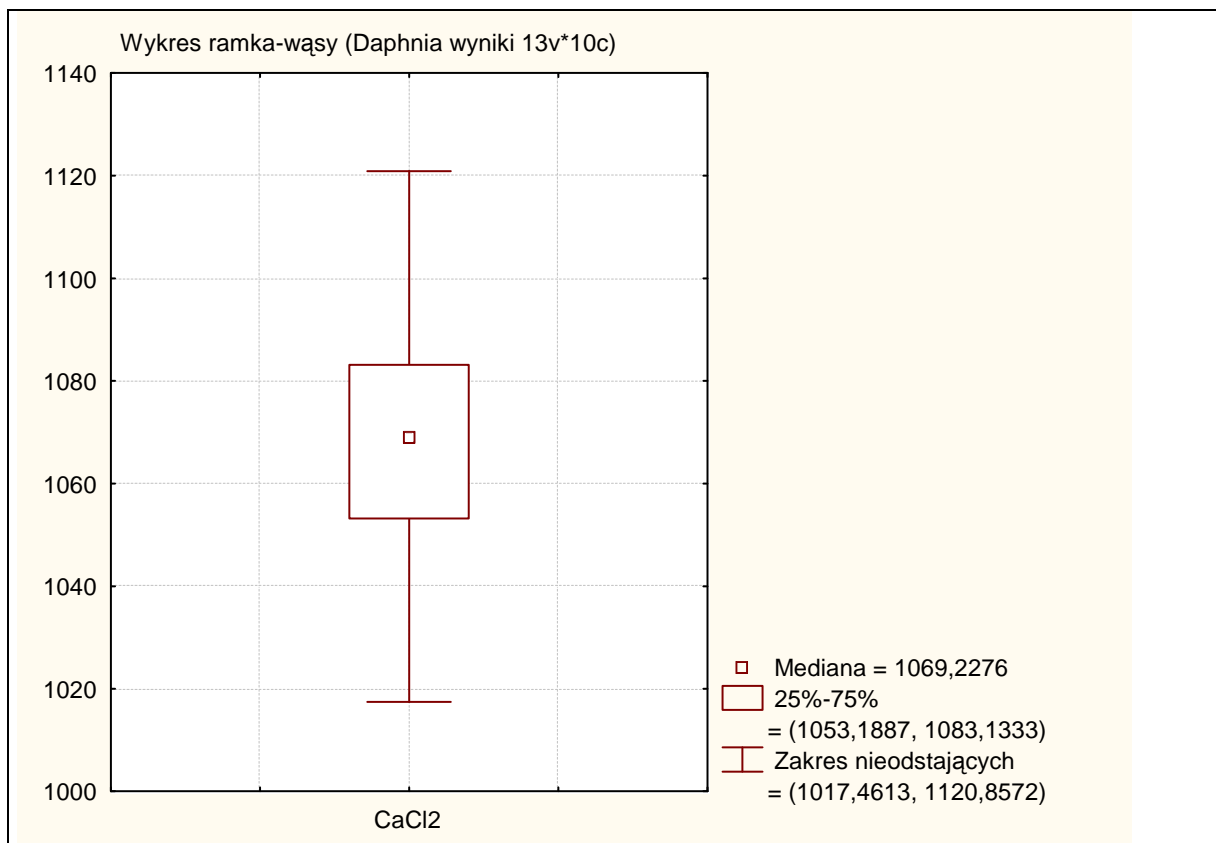


Fig. 176. Wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla CaCl<sub>2</sub> (dla *Daphnia magna*).

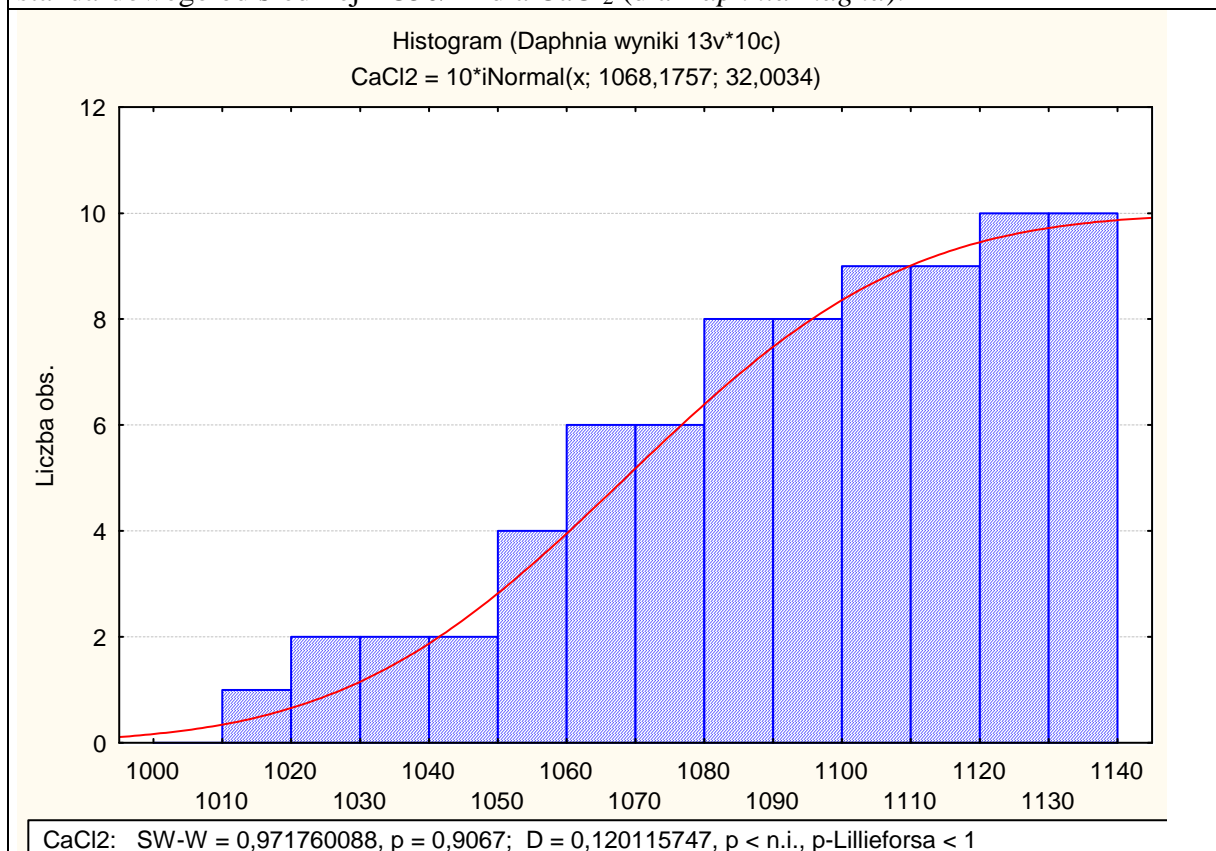


Fig. 177. Skumulowany histogram dla wartości LC50/24 dla *Daphnia magna* dla CaCl<sub>2</sub>, z wynikami testu Shapiro – Wilka oraz Kołmogorowa – Smirnowa z poprawką Lilieforsa.

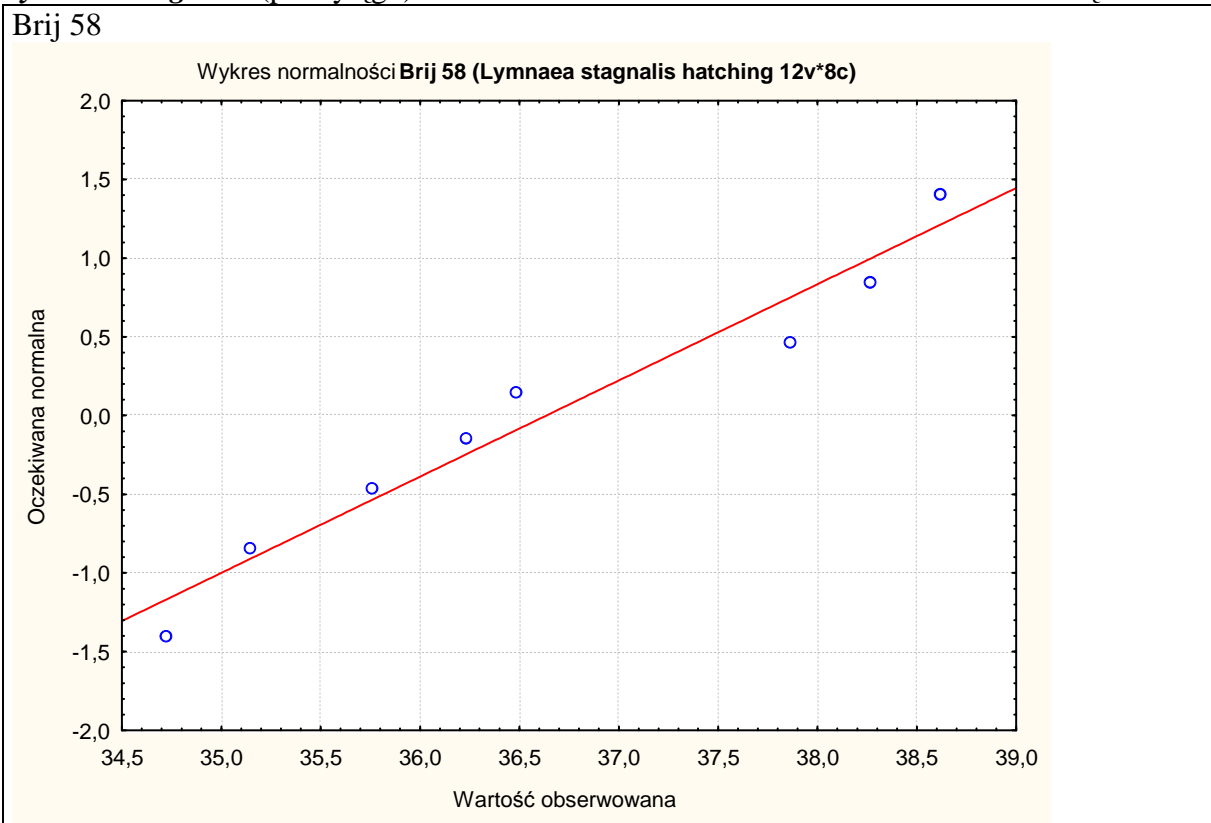


Fig. 211. wykres normalności dla próby Brij 58 (LC50/24 – dla *Lymnaea stagnalis* Hatch.).

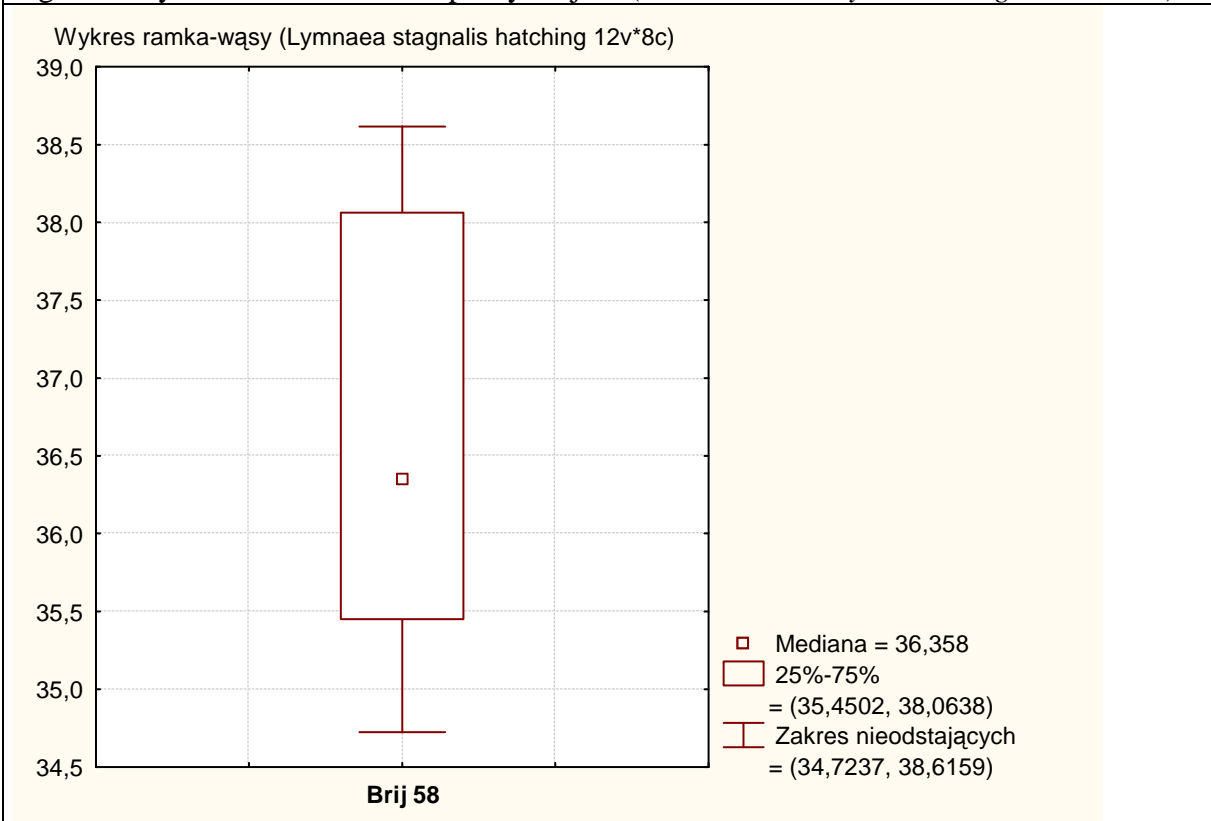


Fig. 212. Wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla Brij 58 (dla *Lymnaea stagnalis* Hatch.).



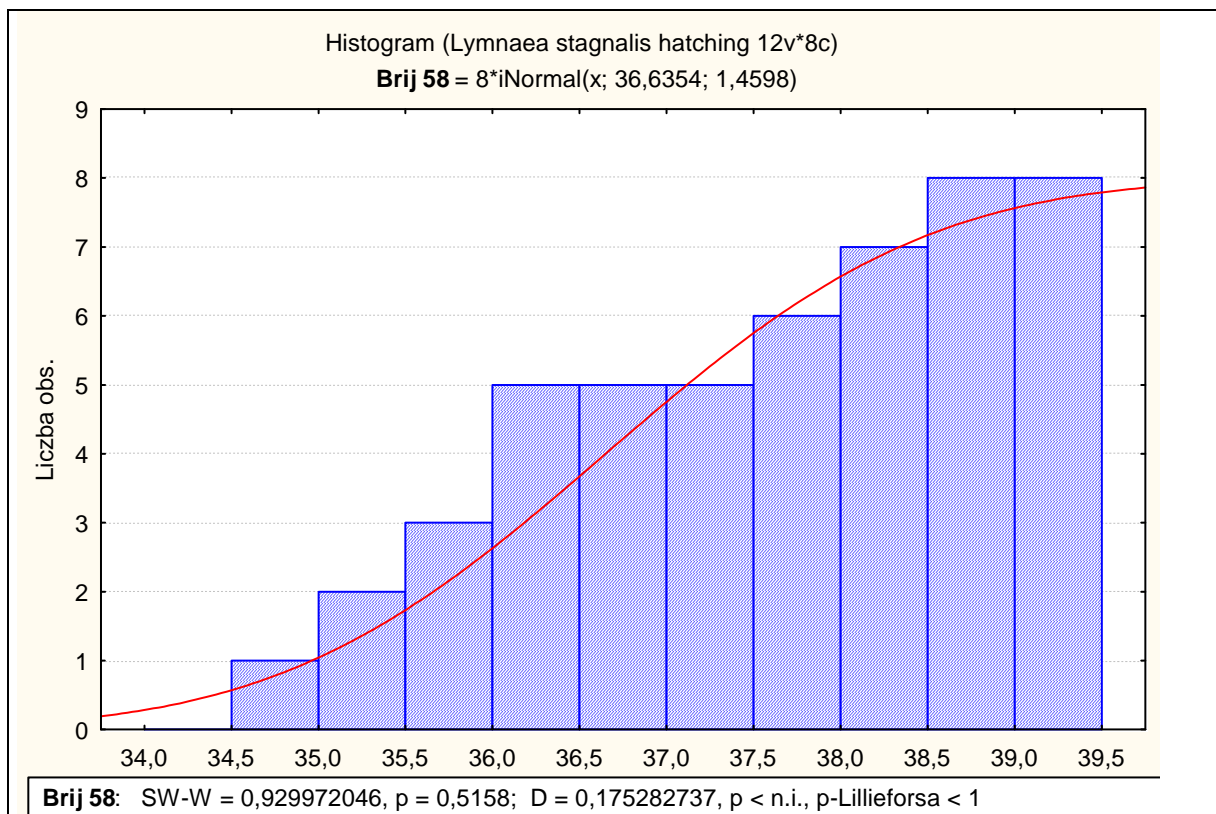


Fig. 213. Skumulowany histogram dla wartości LC50/24 dla *Lymnaea stagnalis* Hatch.dla Brij 58, z wynikami testu Shapiro – Wilka oraz Kolmogorowa – Smirnowa.

Brij 72

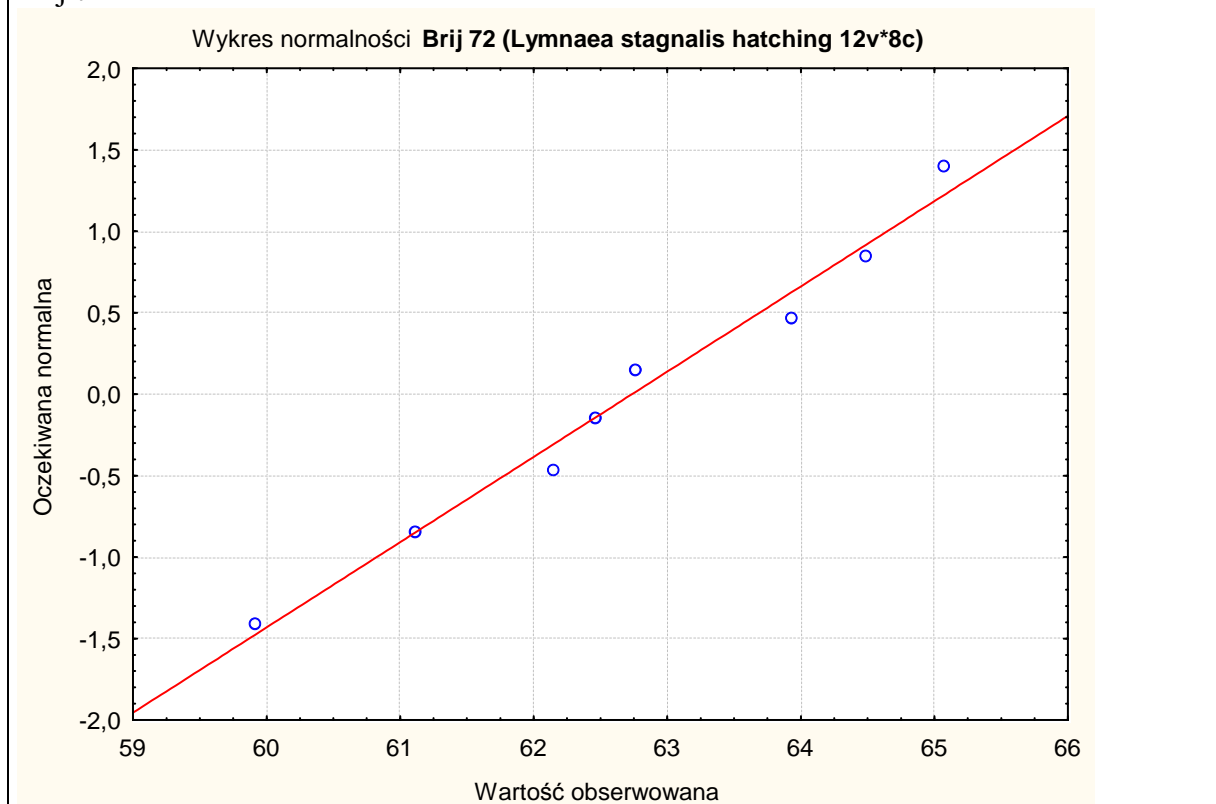


Fig. 214. wykres normalności dla próby Brij 72 (LC50/24 – dla *Lymnaea stagnalis* Hatch.).

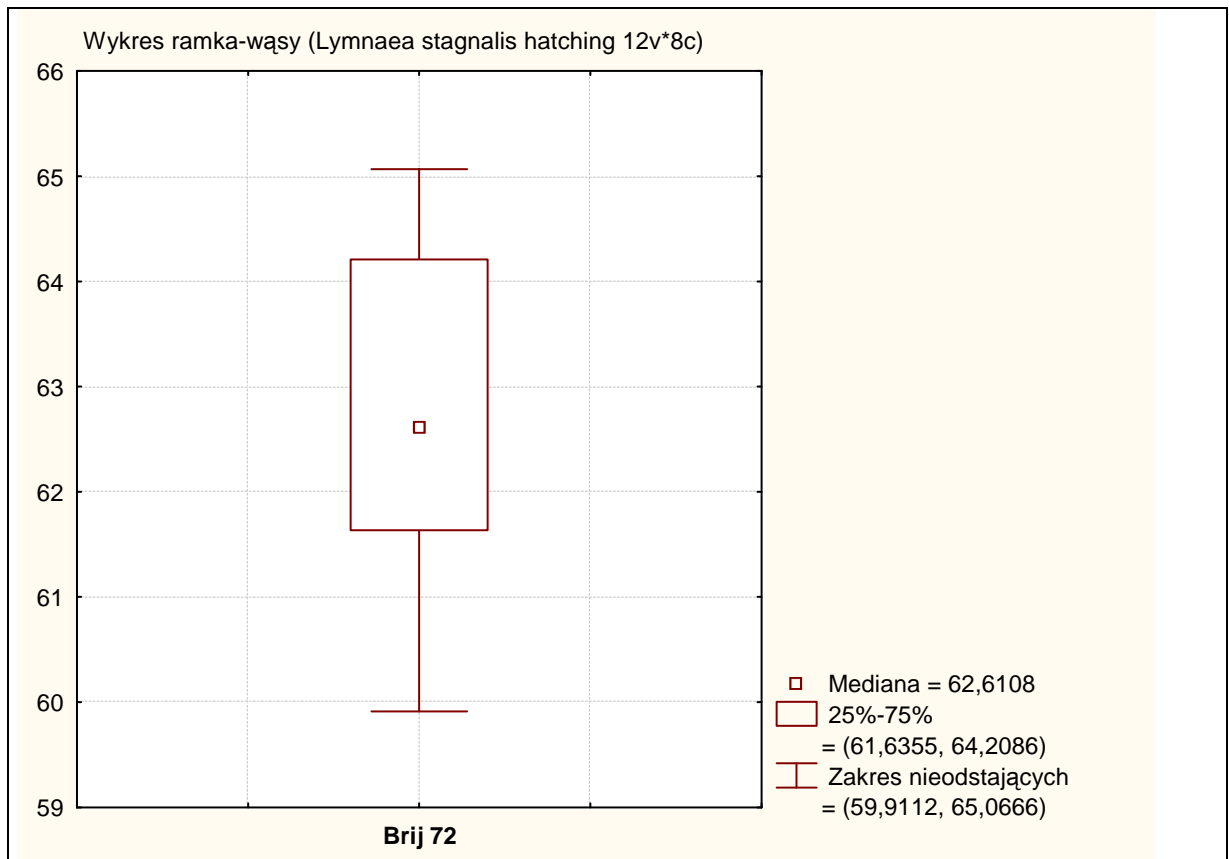


Fig. 215. Wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla Brij 72 (dla *Lymnaea stagnalis* Hatch.).

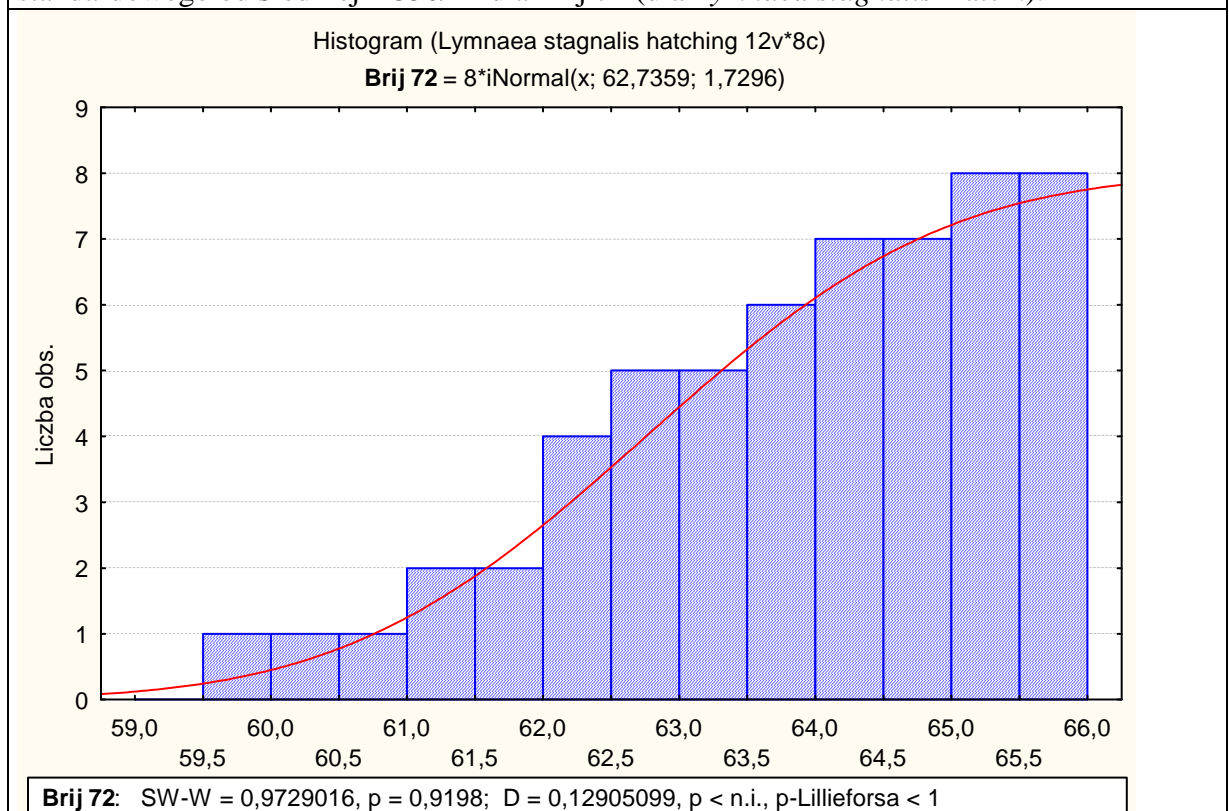


Fig. 216. Skumulowany histogram dla wartości LC50/24 dla *Lymnaea stagnalis* Hatch.dla Brij 72, z wynikami testu Shapiro – Wilka oraz Kołmogorowa – Smirnowa.

## Brij 76

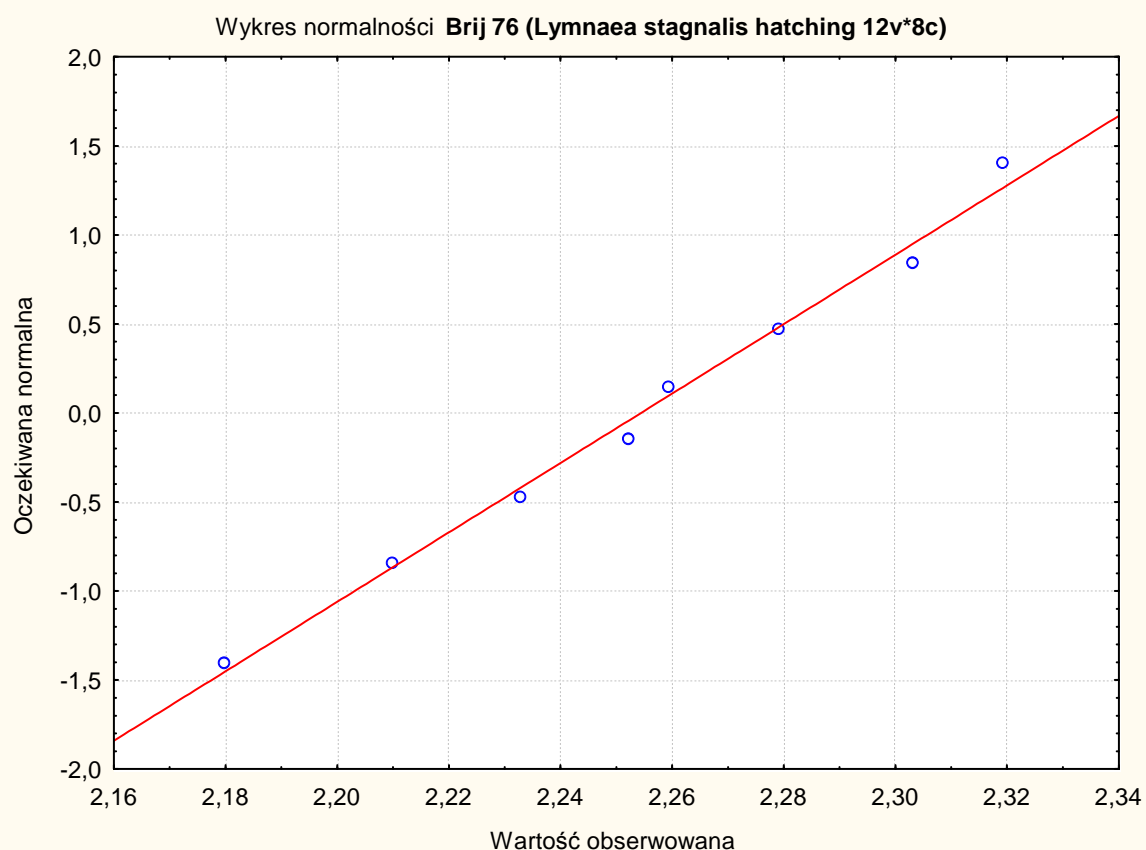


Fig. 217. wykres normalności dla próby Brij 76 (LC50/24 – dla *Lymnaea stagnalis* Hatch.).

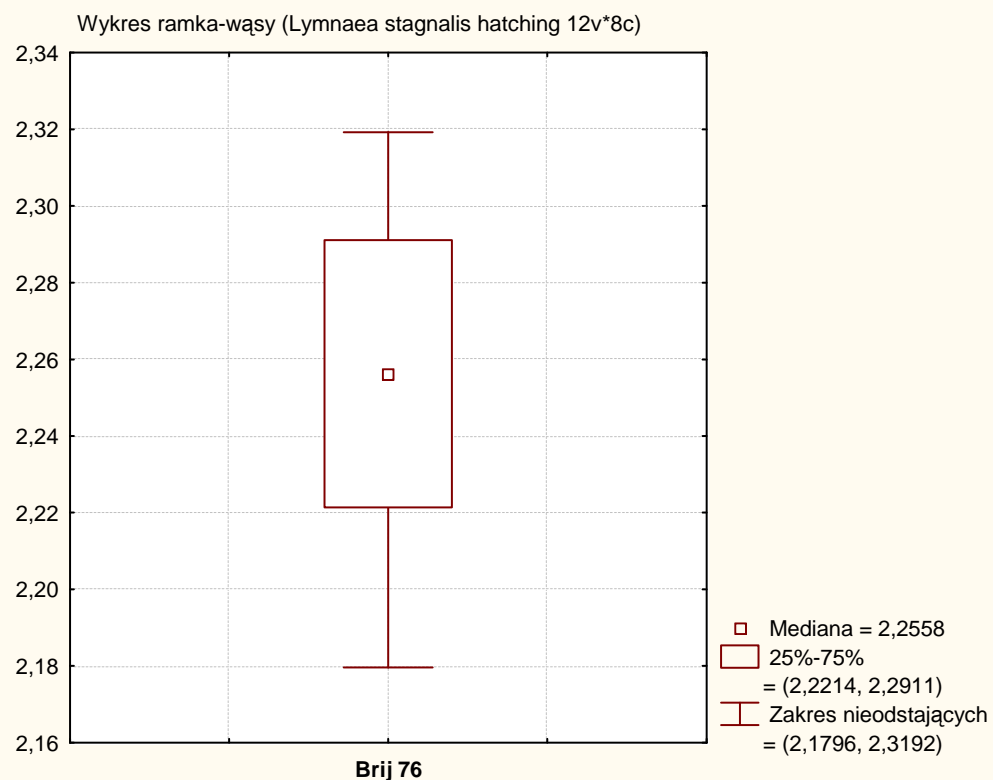


Fig. 218. Wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla Brij 76 (dla *Lymnaea stagnalis* Hatch.).

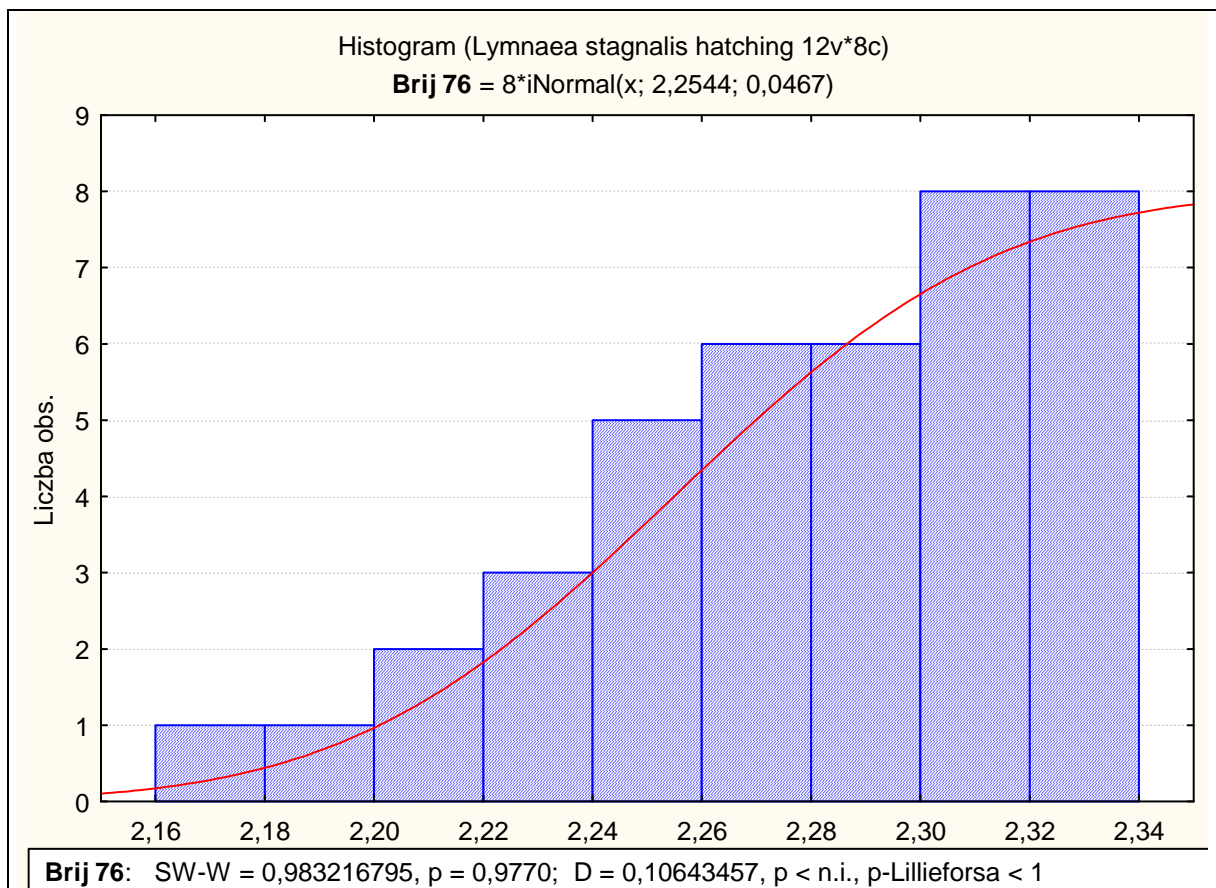


Fig. 219. Skumulowany histogram dla wartości LC50/24 dla *Lymnaea stagnalis* Hatch.dla Brij 76, z wynikami testu Shapiro – Wilka oraz Kołmogorowa – Smirnowa.

Brij 78

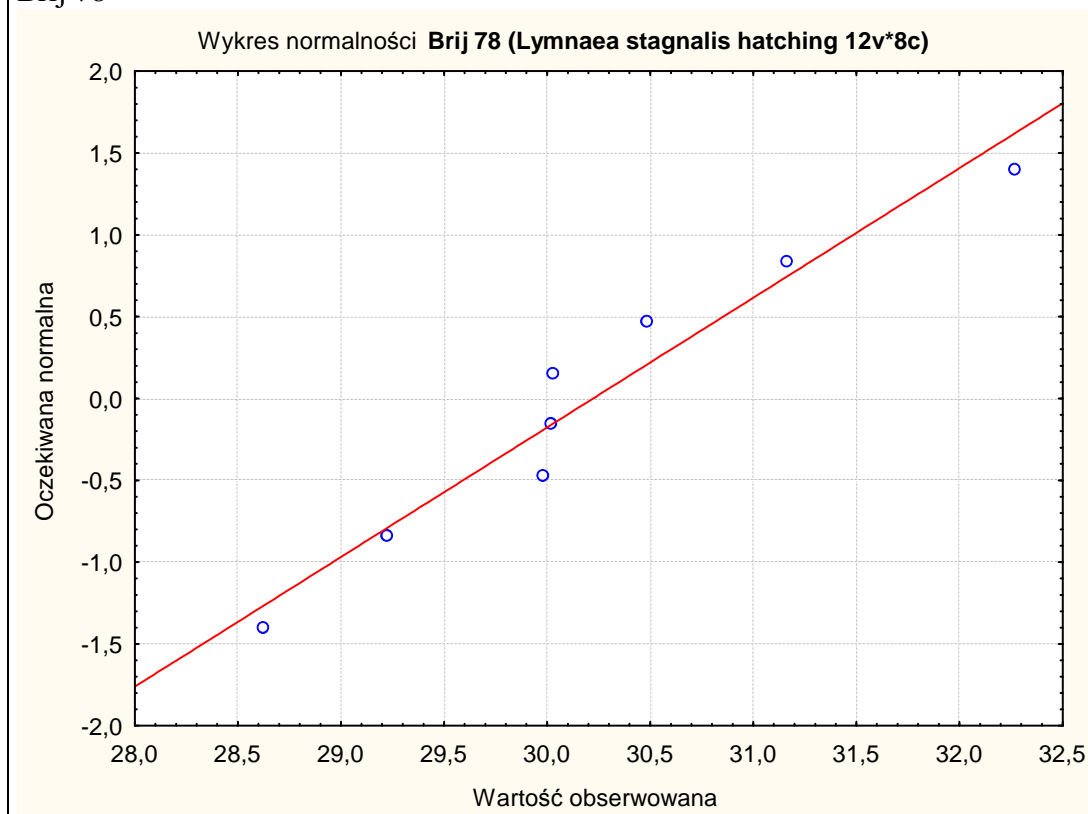


Fig. 220. wykres normalności dla próby Brij 78 (LC50/24 – dla *Lymnaea stagnalis* Hatch.).

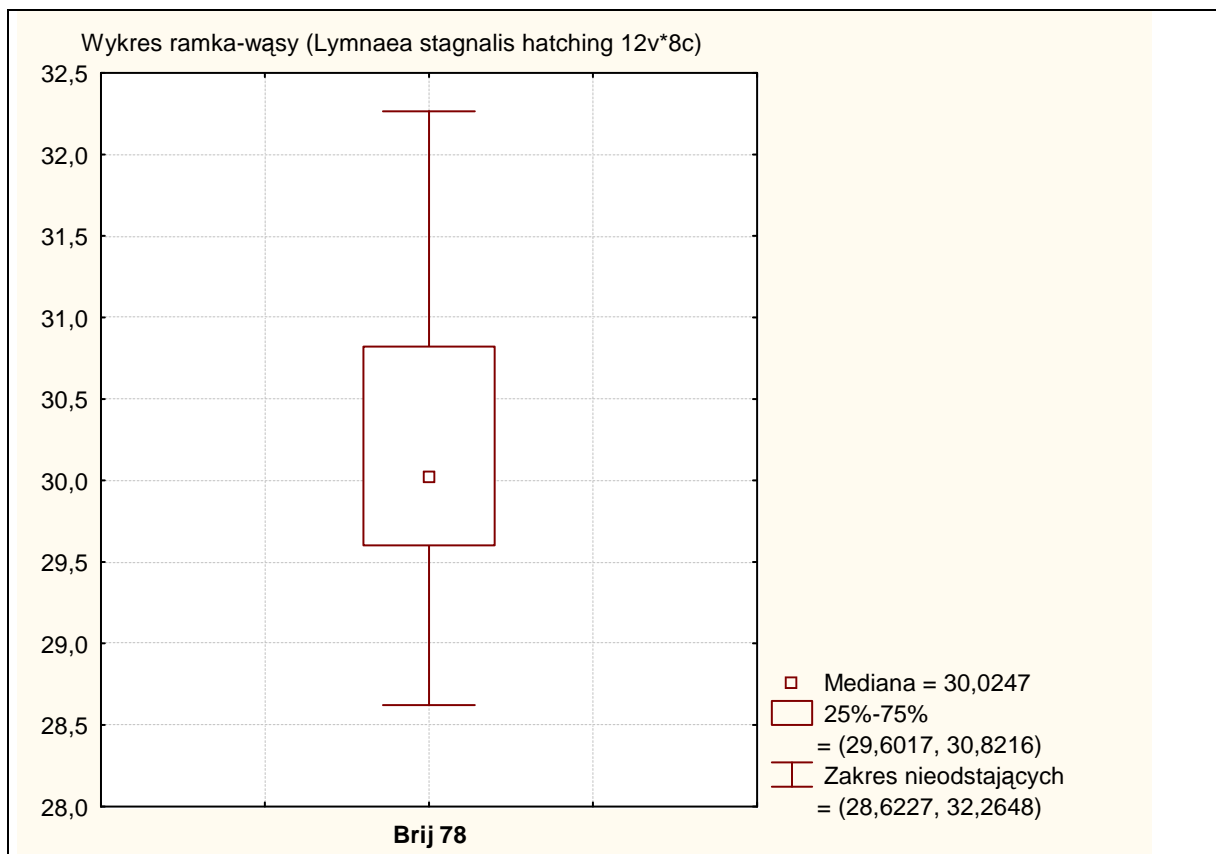


Fig. 221. Wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla Brij 78 (dla *Lymnaea stagnalis* Hatch.).

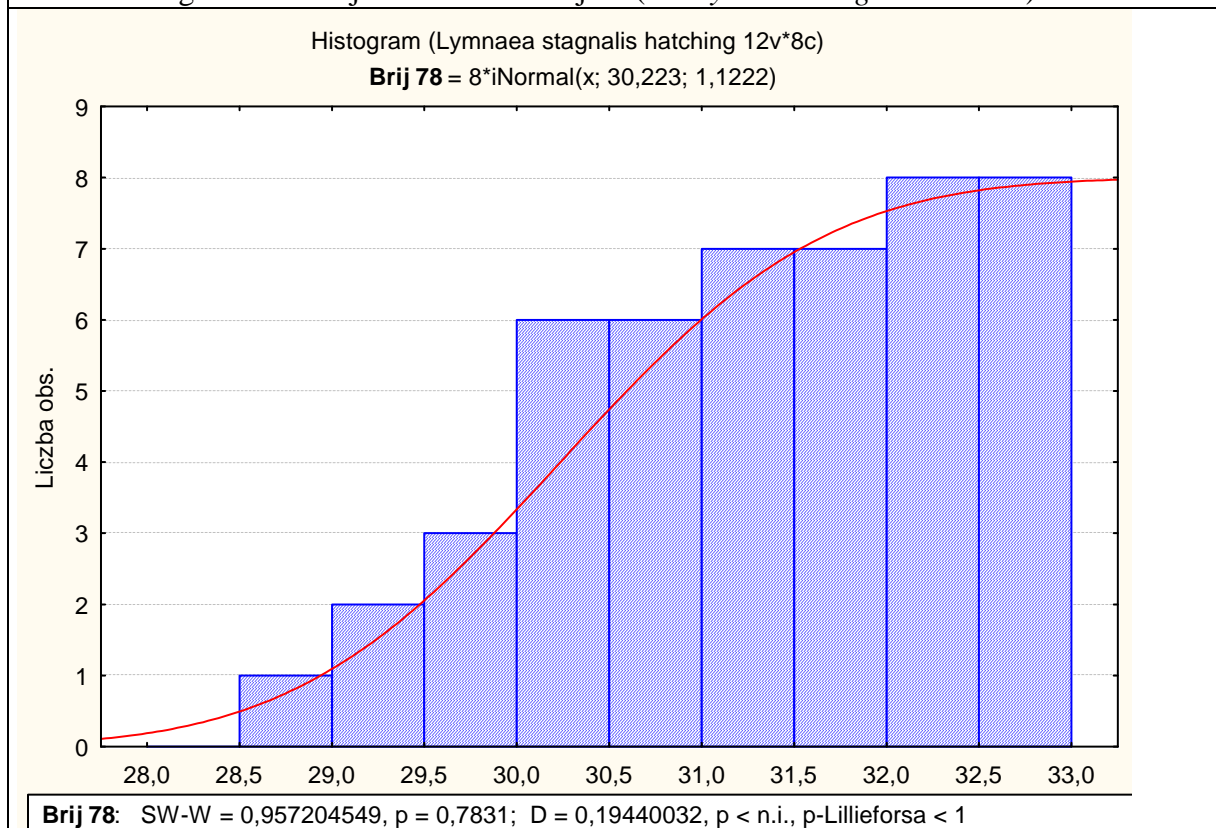


Fig. 222. Skumulowany histogram dla wartości LC50/24 dla *Lymnaea stagnalis* Hatch. dla Brij 78, z wynikami testu Shapiro – Wilka oraz Kołmogorowa – Smirnowa.

Ludwik

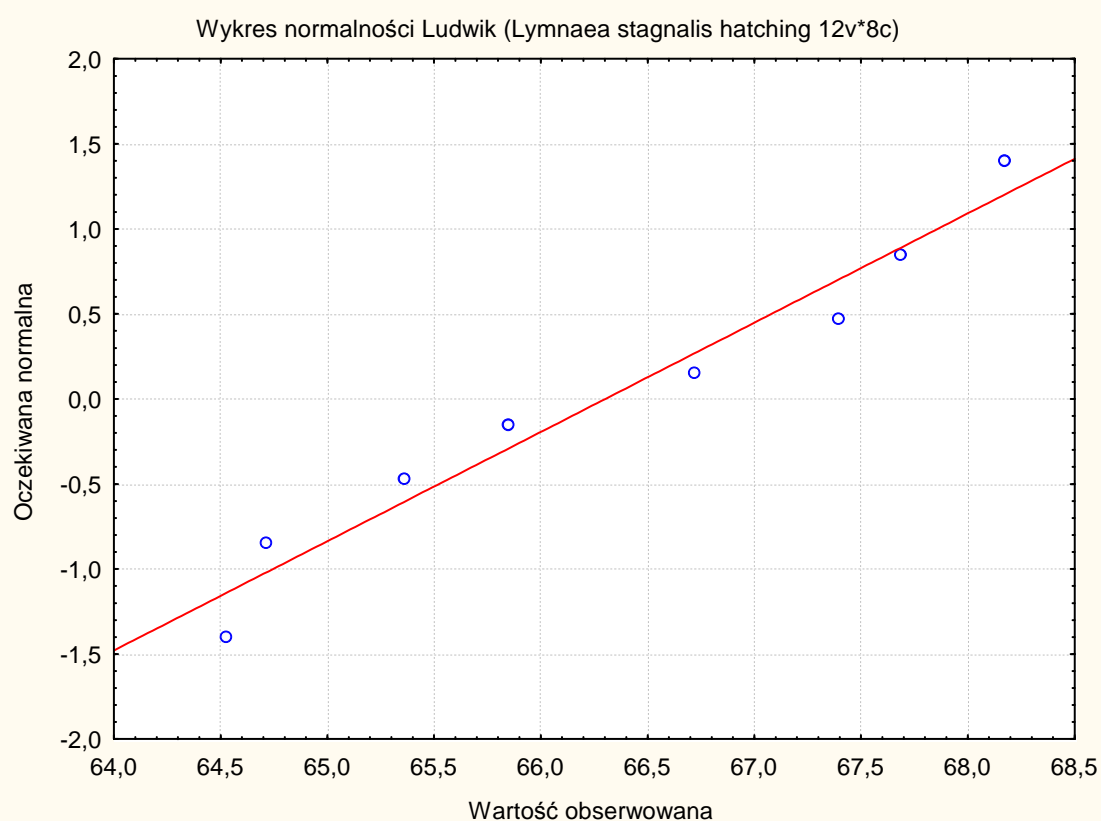


Fig. 223. wykres normalności dla próby Ludwik (LC50/24 – dla *Lymnaea stagnalis* Hatch.).

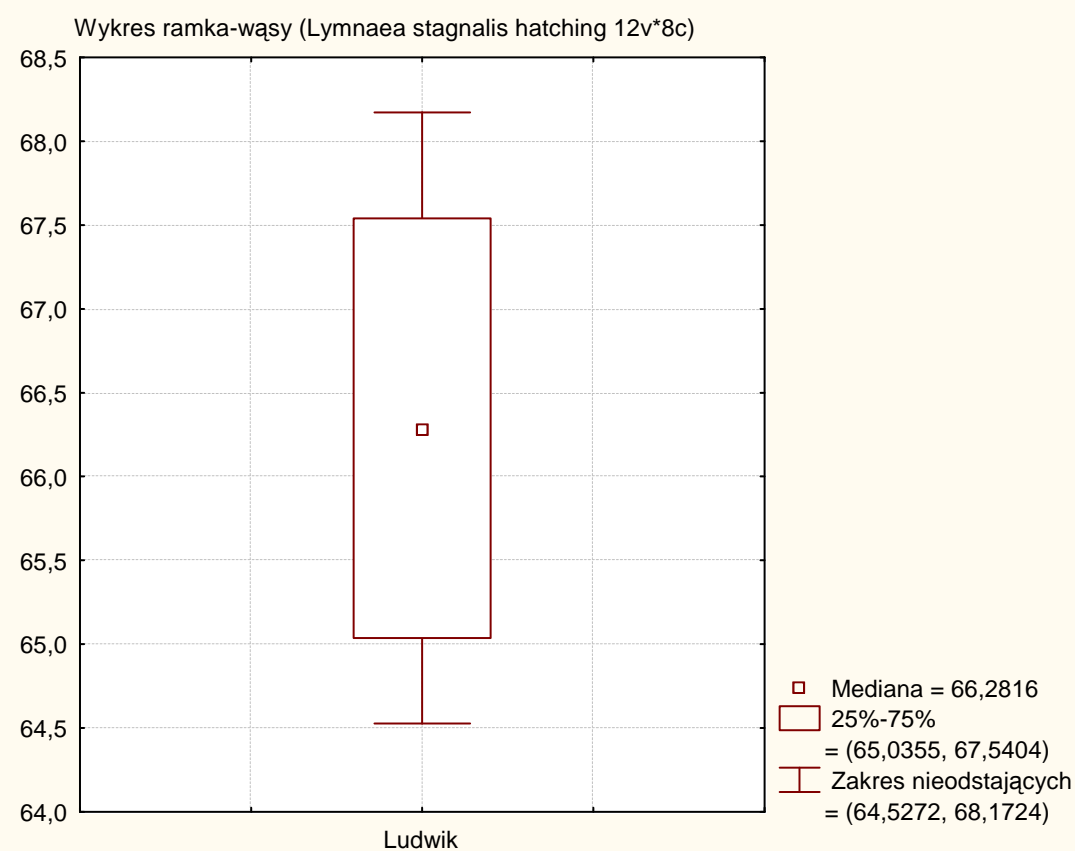


Fig. 224. Wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla Ludwik (dla *Lymnaea stagnalis* Hatch.).

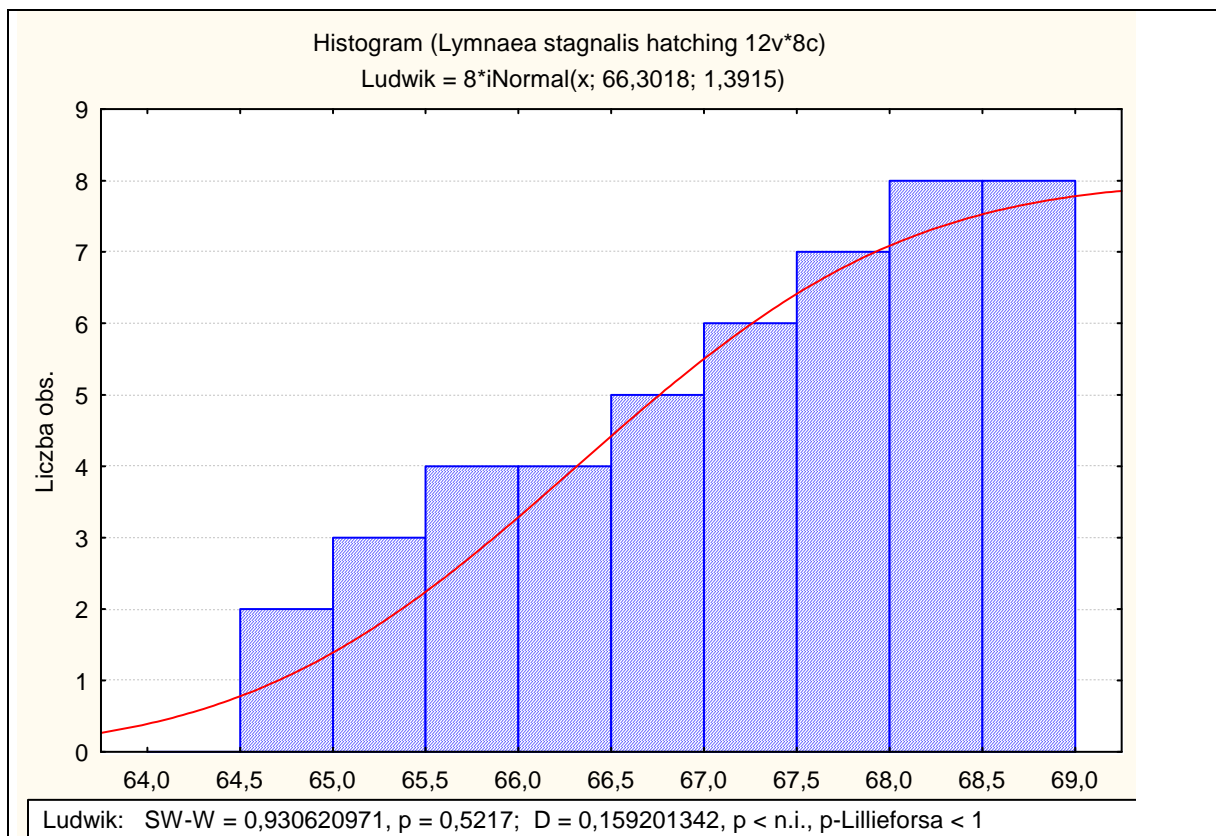


Fig. 225. Skumulowany histogram dla wartości LC50/24 dla *Lymnaea stagnalis* Hatch.dla Ludwik, z wynikami testu Shapiro – Wilka oraz Kołmogorowa – Smirnowa.

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

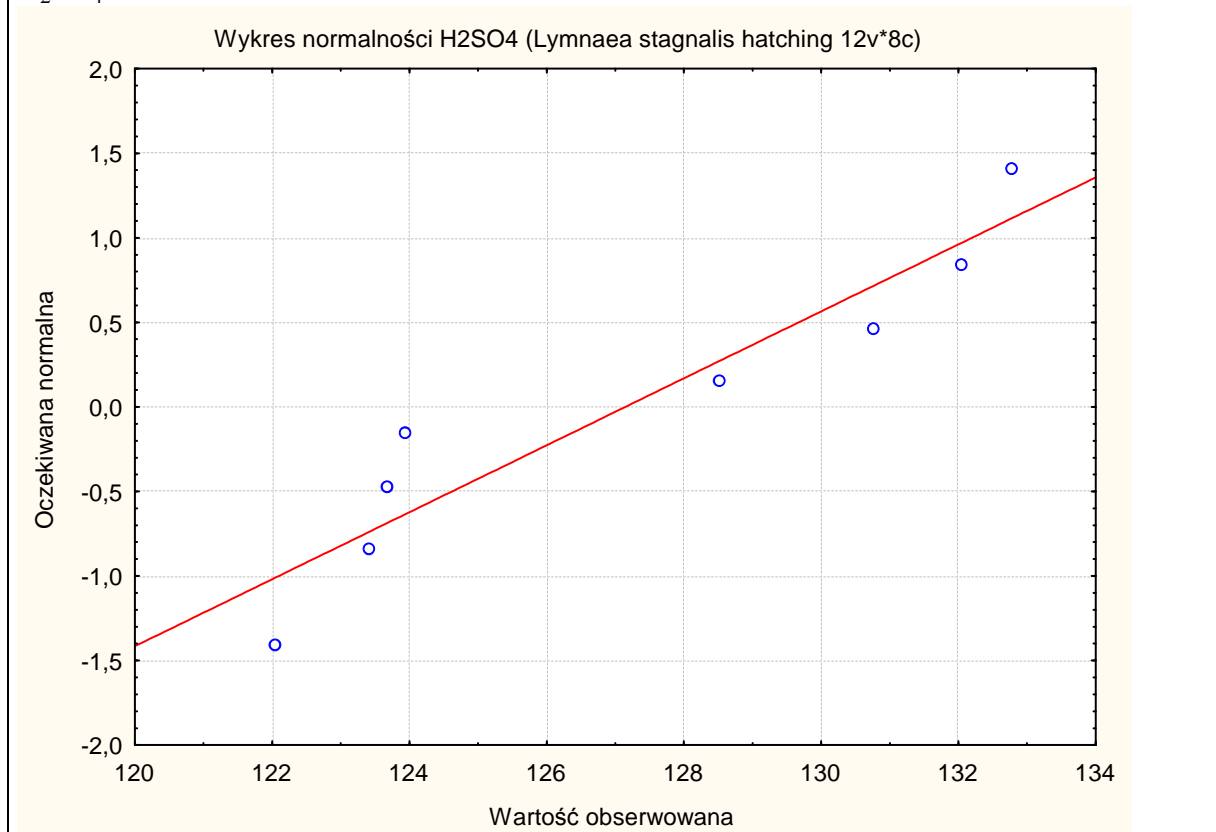


Fig. 226. wykres normalności dla próby H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (LC50/24 – dla *Lymnaea stagnalis* Hatch.).

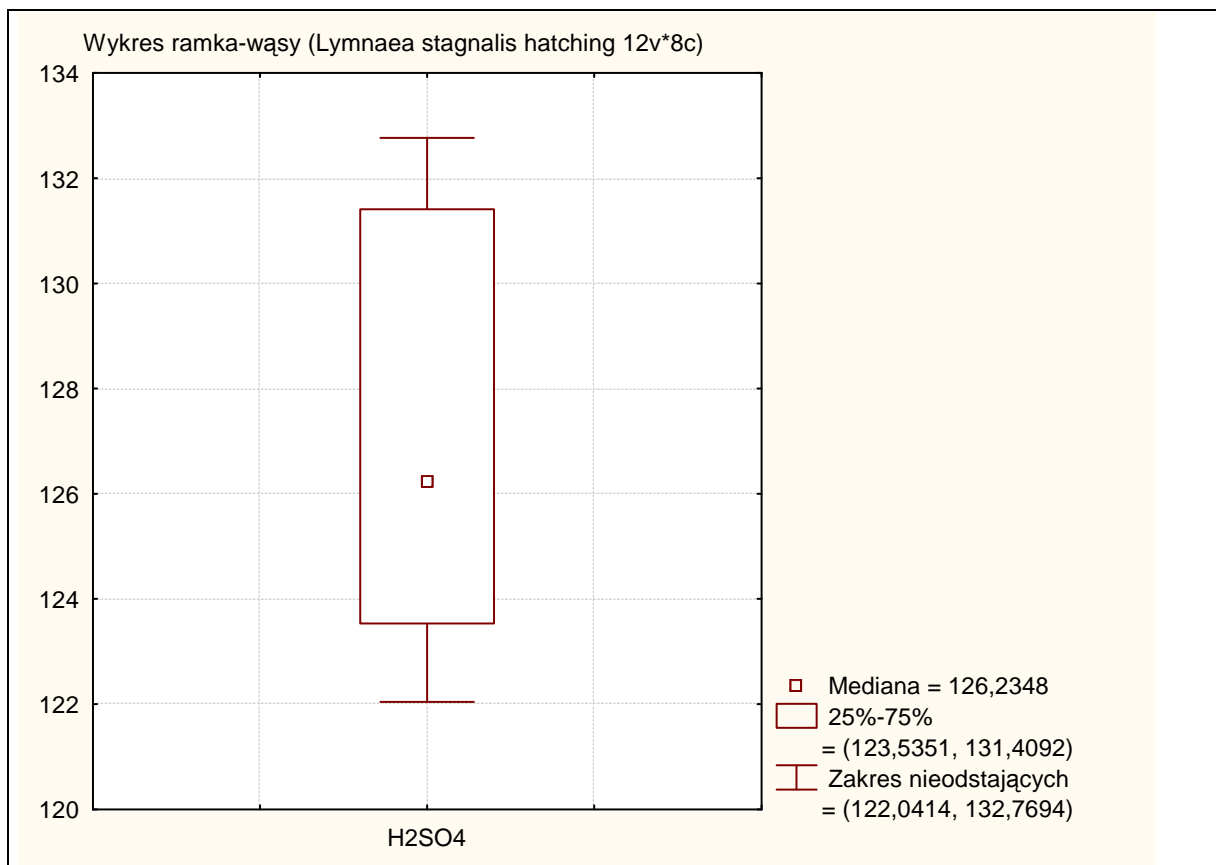
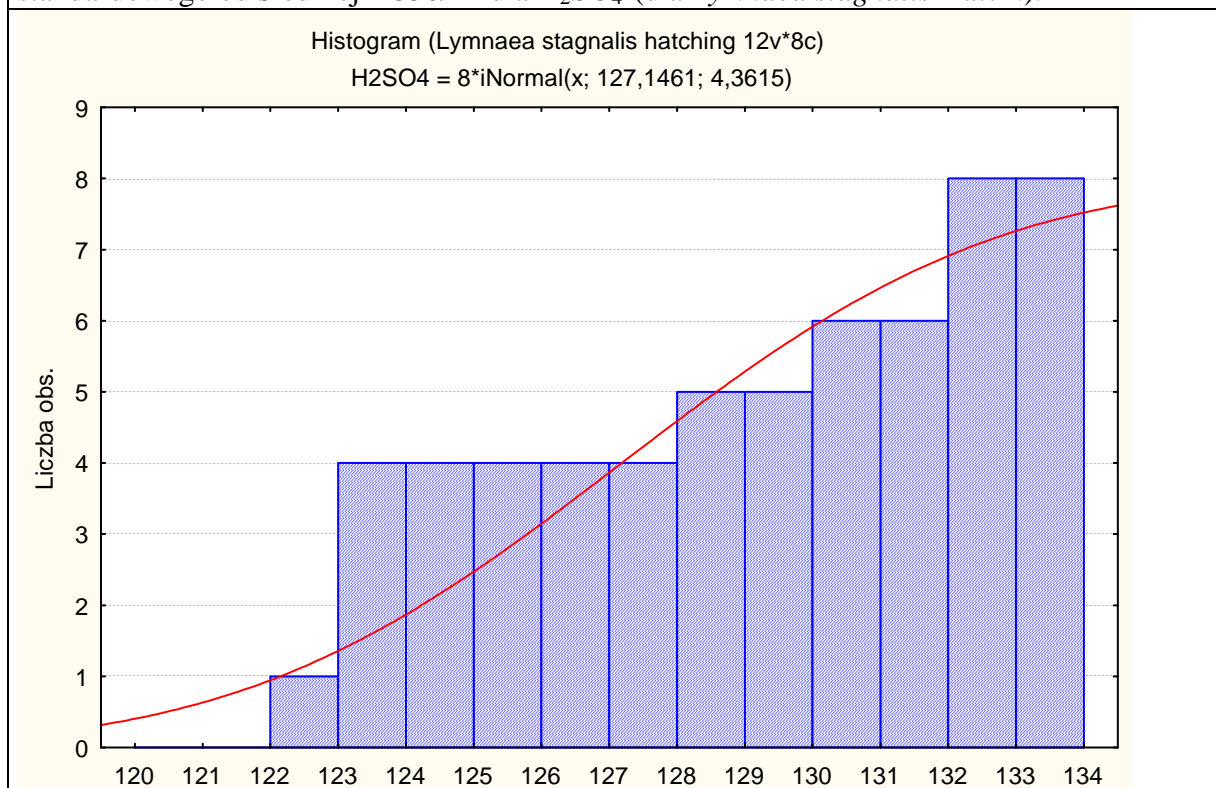


Fig. 227. Wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (dla *Lymnaea stagnalis* Hatch.).



H2SO4: SW-W = 0,864541156, p = 0,1332; D = 0,268704993, p < n.i., p-Lillieforsa < 0,10000001

Fig. 228. Skumulowany histogram dla wartości LC50/24 dla *Lymnaea stagnalis* Hatch. dla H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, z wynikami testu Shapiro – Wilka oraz Kołmogorowa – Smirnowa.



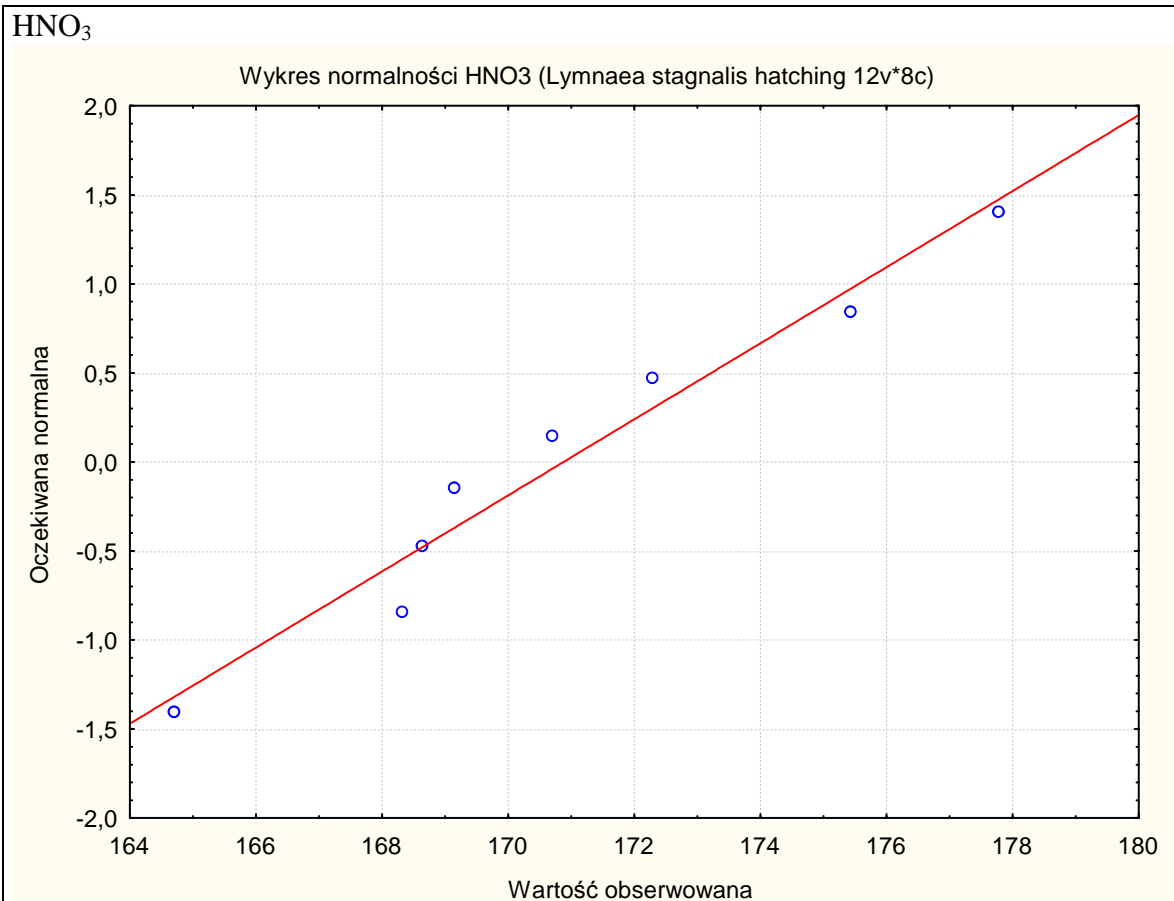


Fig. 229. wykres normalności dla próby HNO<sub>3</sub> (LC50/24 – dla *Lymnaea stagnalis* Hatch.).

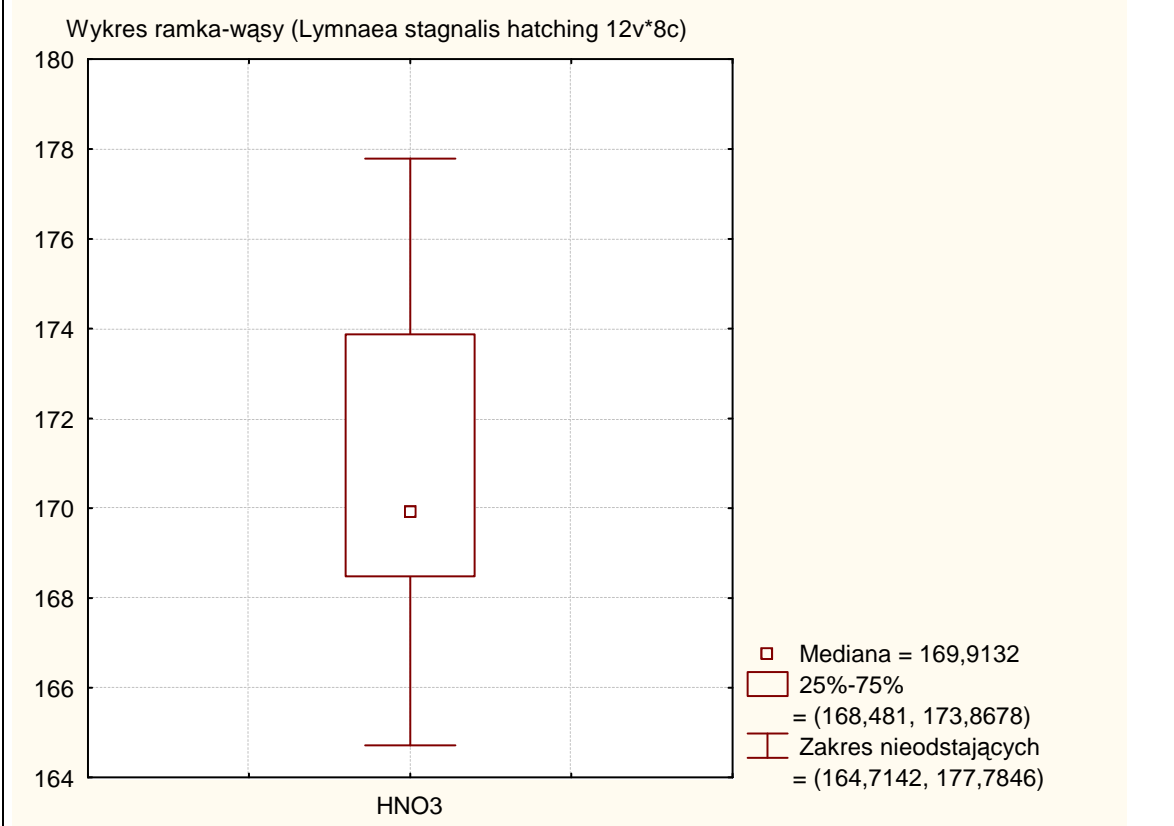


Fig. 230. Wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla HNO<sub>3</sub> (dla *Lymnaea stagnalis* Hatch.).

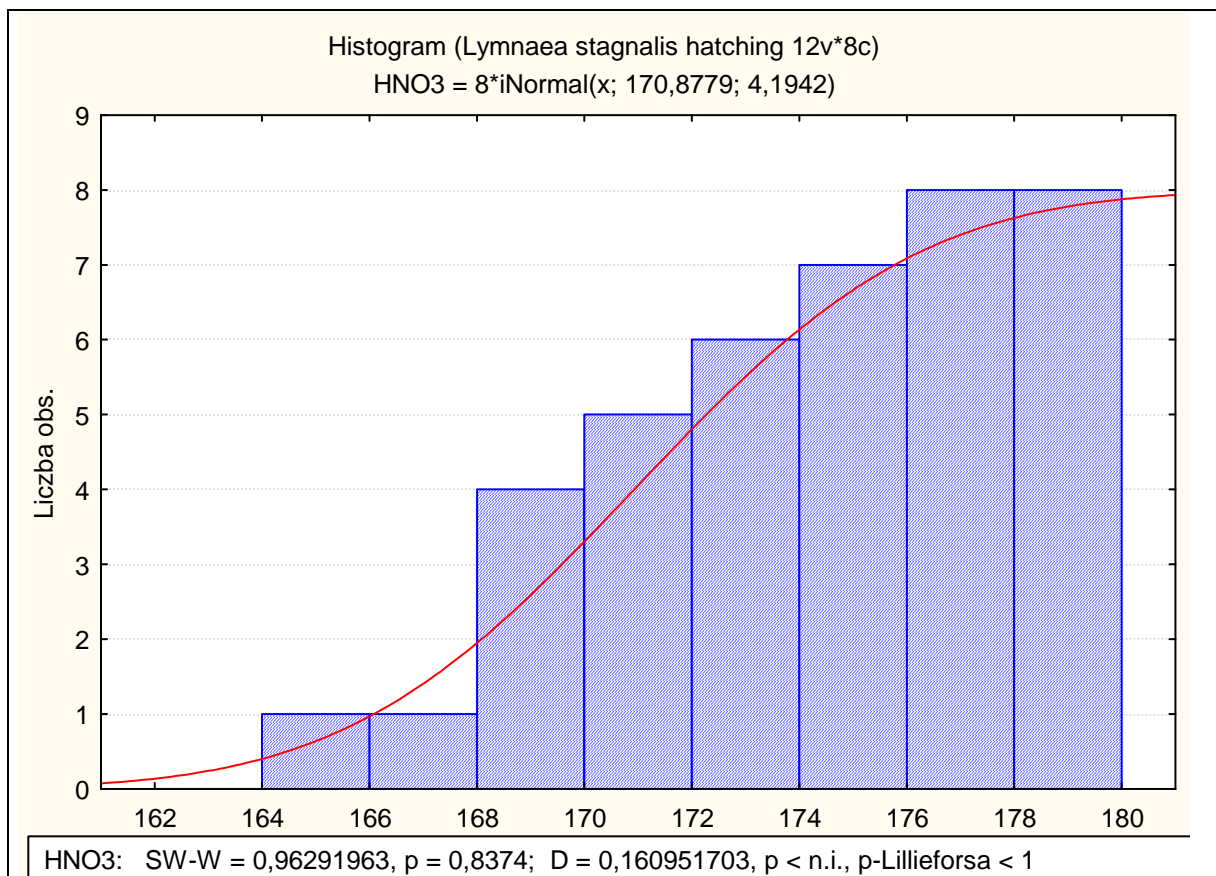


Fig. 231. Skumulowany histogram dla wartości LC50/24 dla *Lymnaea stagnalis* Hatch.dla HNO<sub>3</sub>, z wynikami testu Shapiro – Wilka oraz Kołmogorowa – Smirnowa.

NH<sub>4</sub>OH

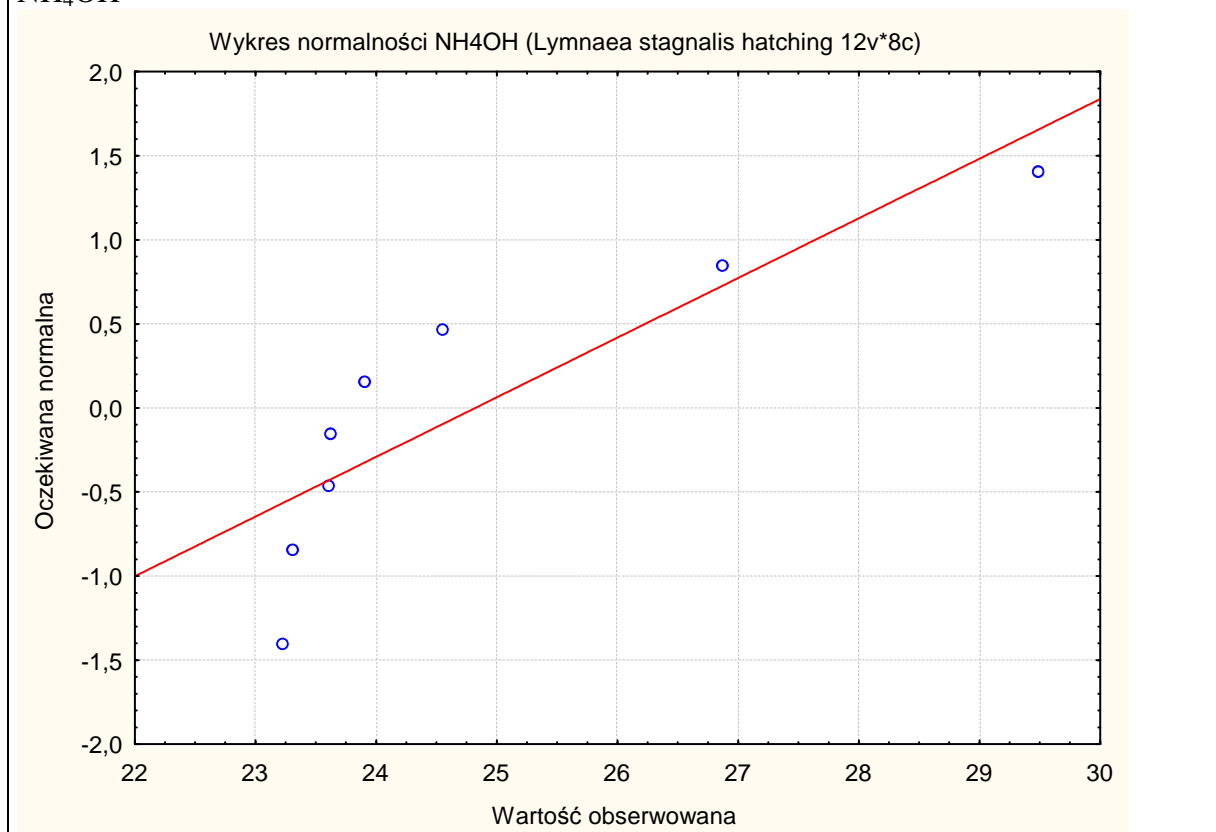


Fig. 232. wykres normalności dla próby NH<sub>4</sub>OH (LC50/24 – dla *Lymnaea stagnalis* Hatch.).

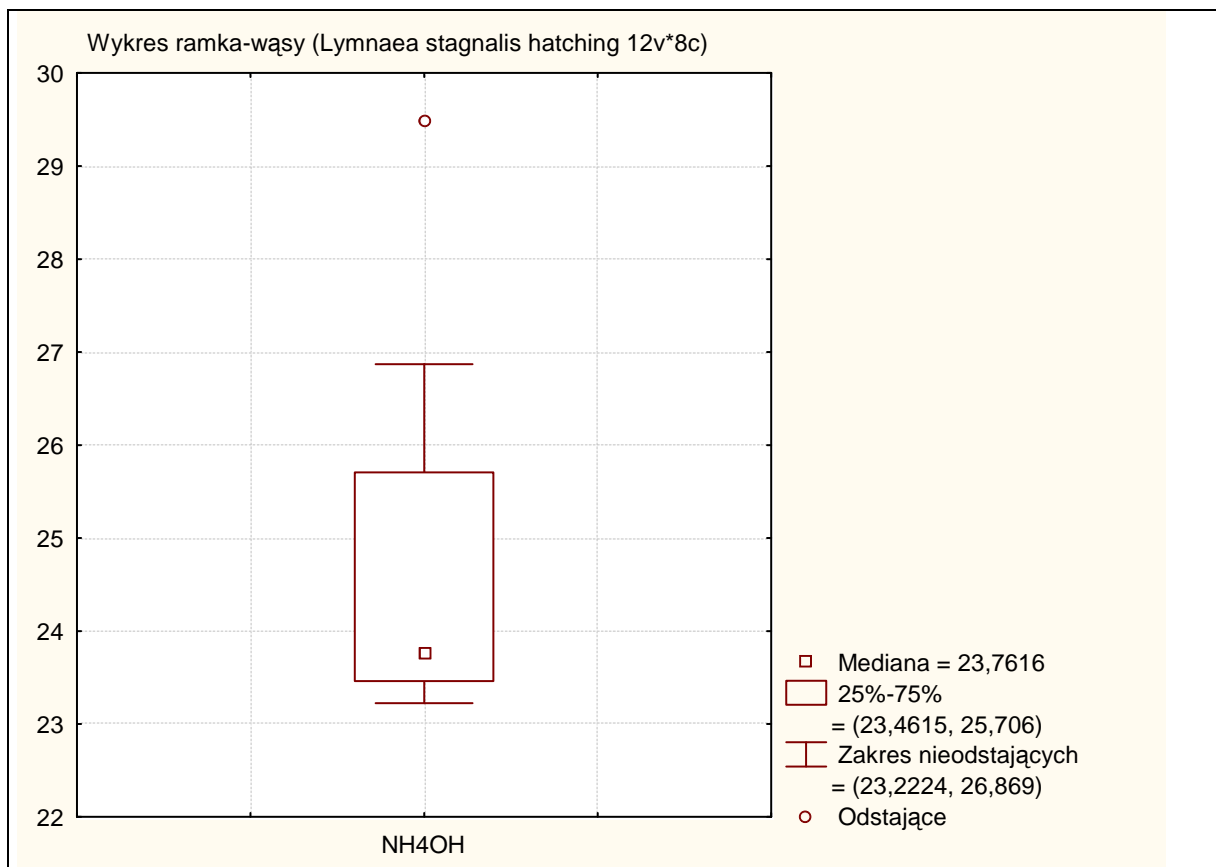


Fig. 233. Wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla NH<sub>4</sub>OH (dla *Lymnaea stagnalis* Hatch.).

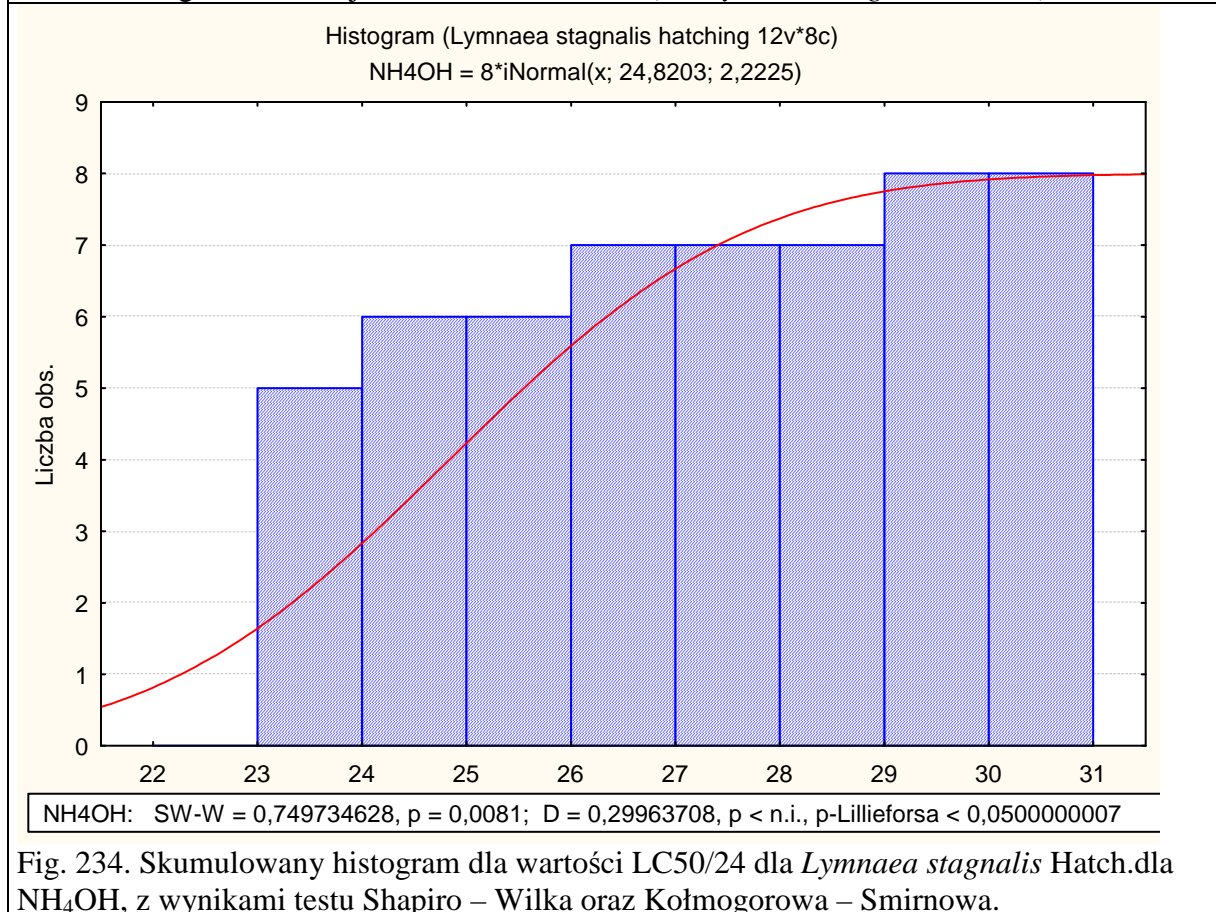


Fig. 234. Skumulowany histogram dla wartości LC50/24 dla *Lymnaea stagnalis* Hatch.dla NH<sub>4</sub>OH, z wynikami testu Shapiro – Wilka oraz Kołmogorowa – Smirnowa.

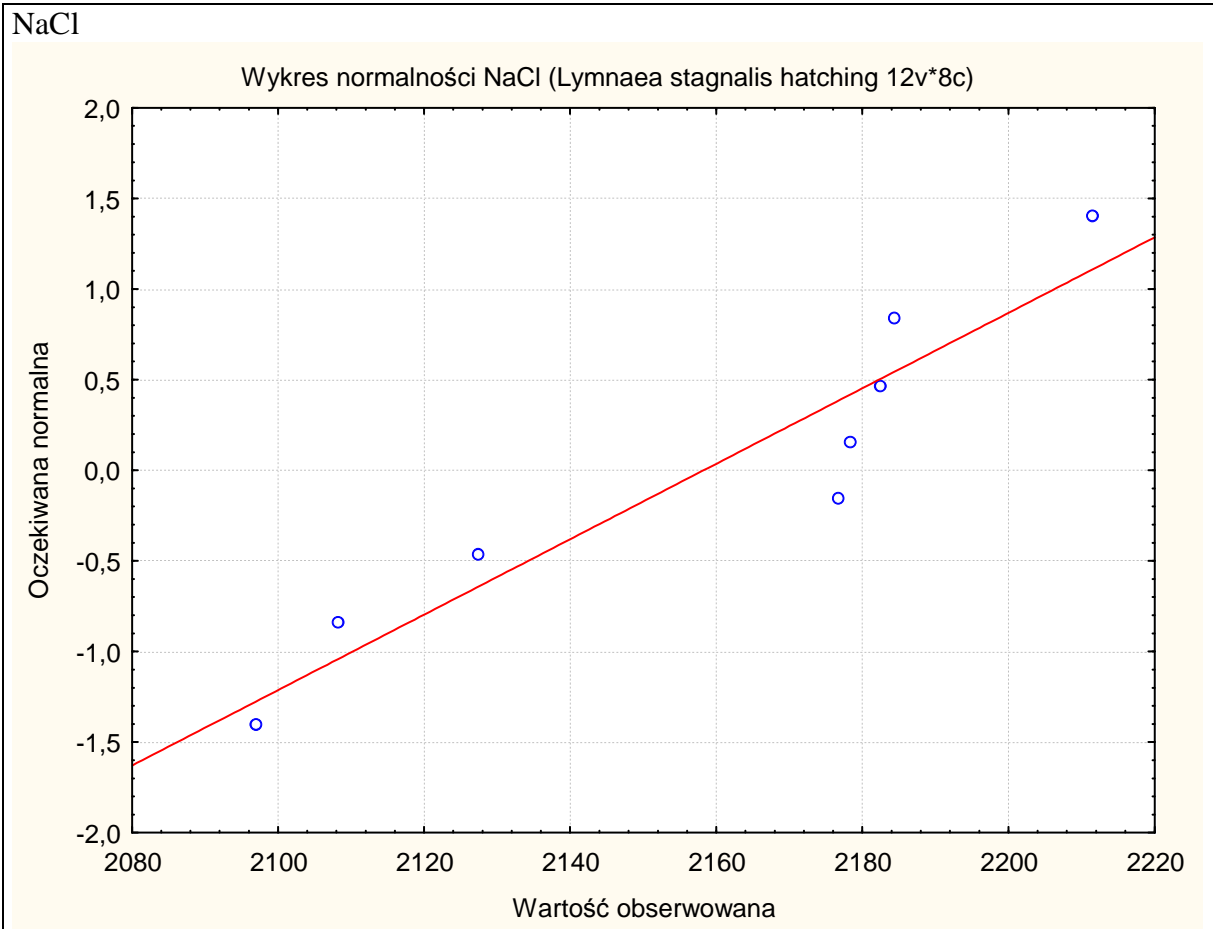


Fig. 235. wykres normalności dla próby NaCl (LC50/24 – dla *Lymnaea stagnalis* Hatch.).

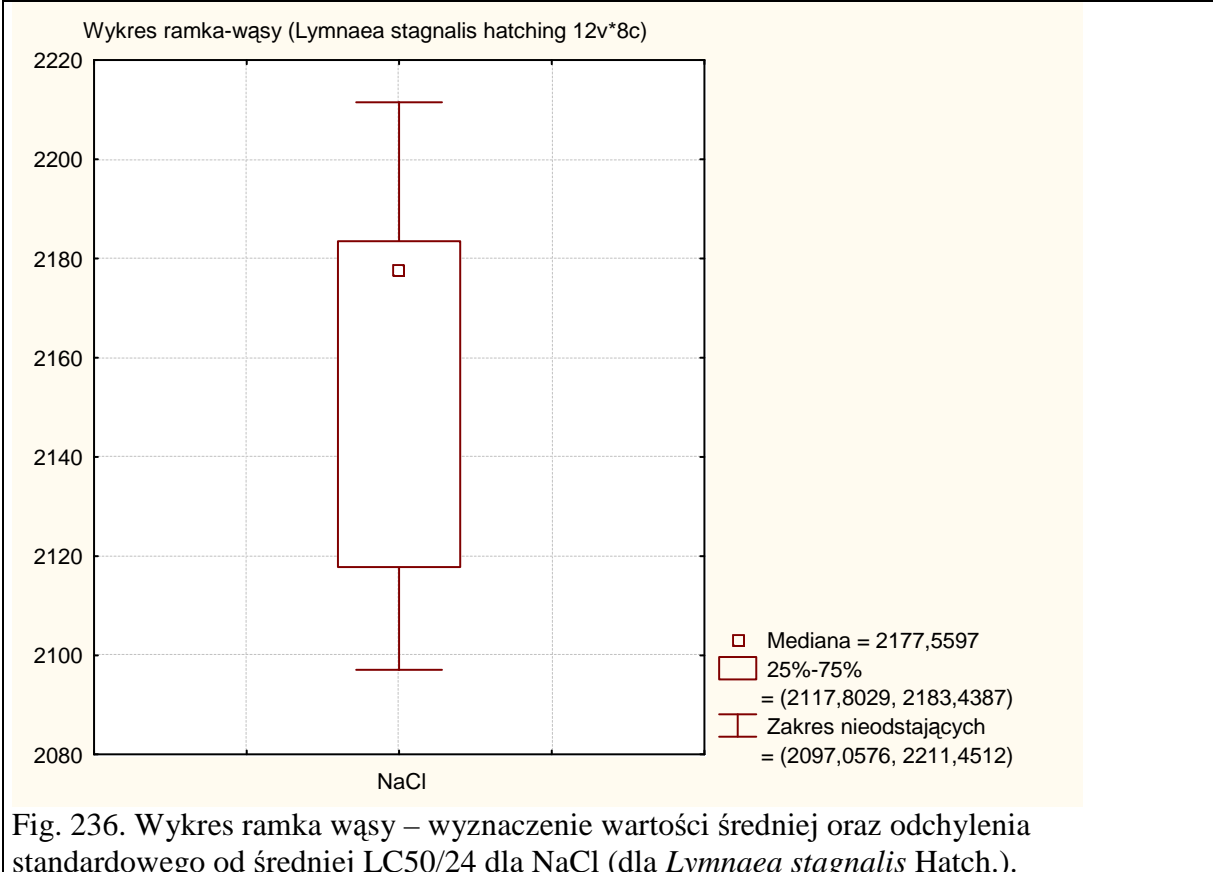


Fig. 236. Wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla NaCl (dla *Lymnaea stagnalis* Hatch.).

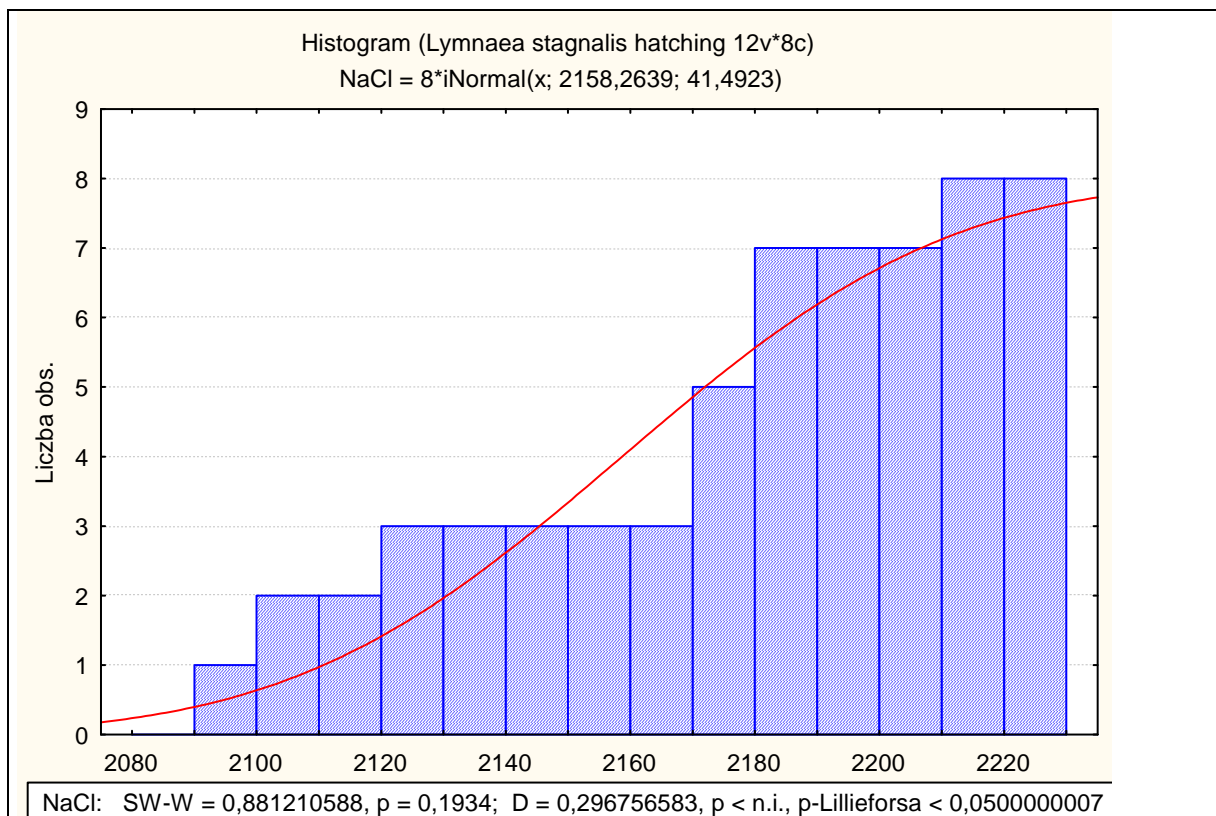


Fig. 237. Skumulowany histogram dla wartości LC50/24 dla *Lymnaea stagnalis* Hatch.dla NaCl, z wynikami testu Shapiro – Wilka oraz Kołmogorowa – Smirnowa.

KCl

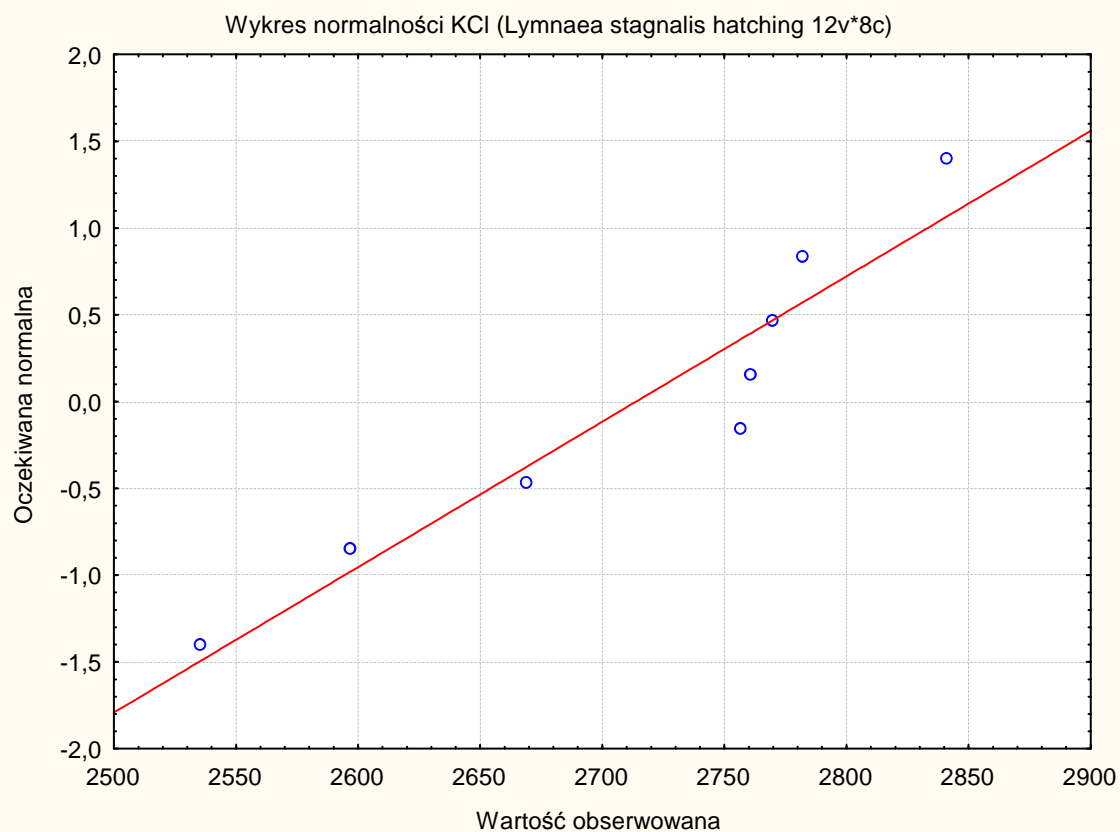


Fig. 238. wykres normalności dla próby KCl (LC50/24 – dla *Lymnaea stagnalis* Hatch.).

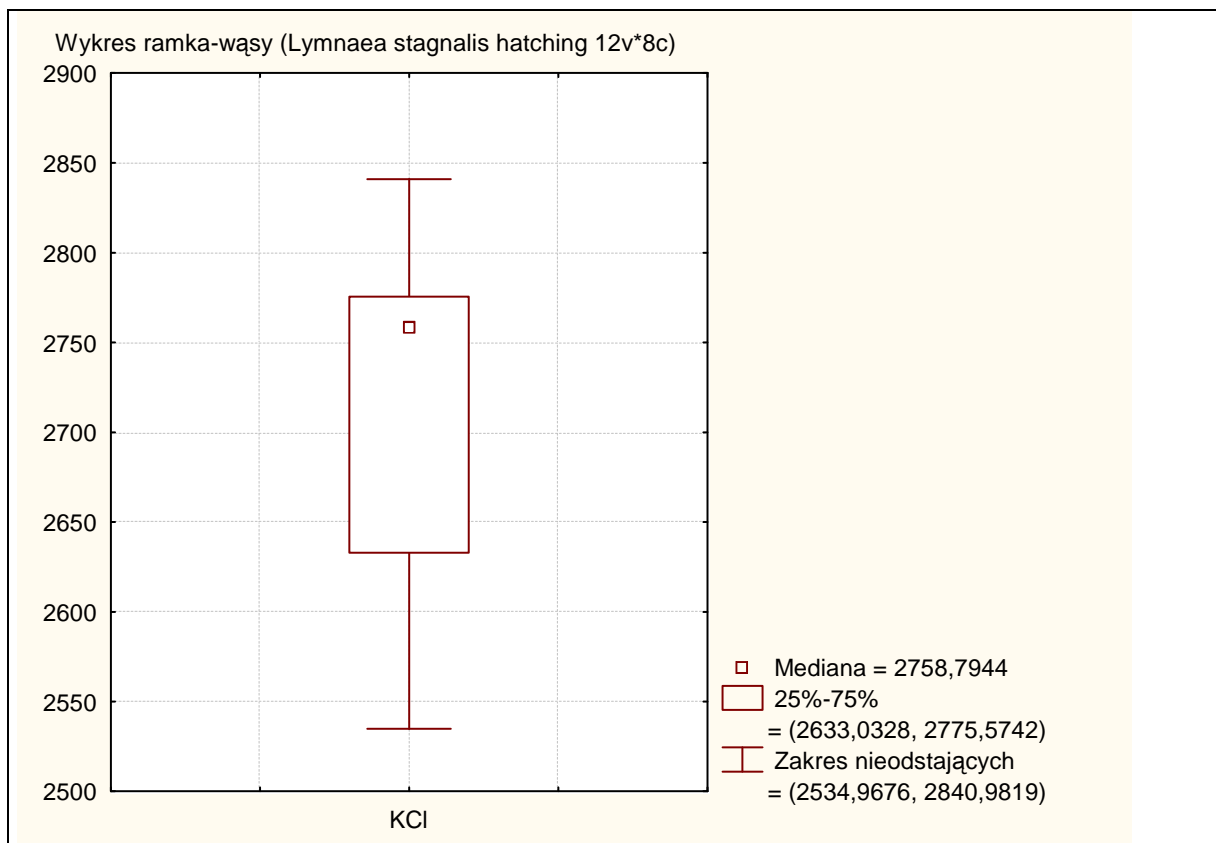


Fig. 239. Wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla KCI (dla *Lymnaea stagnalis* Hatch.).

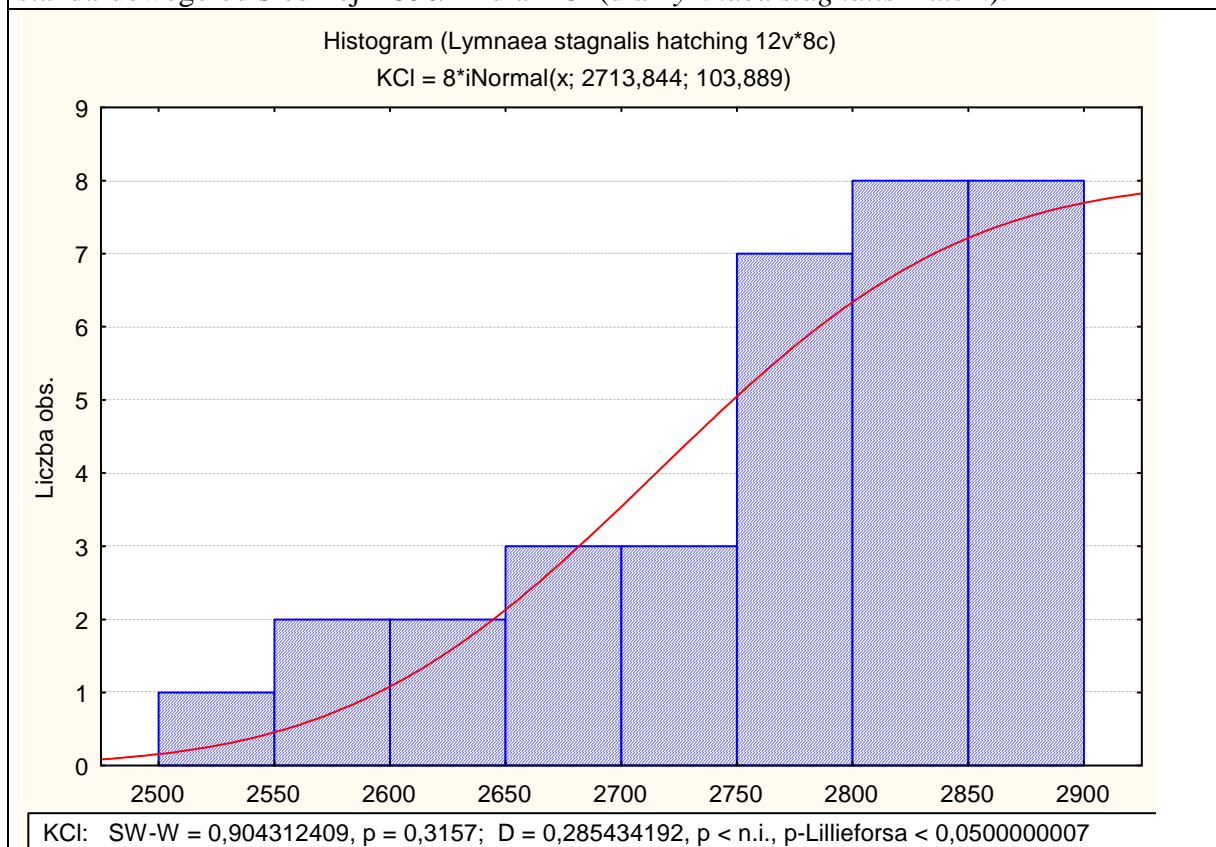


Fig. 240. Skumulowany histogram dla wartości LC50/24 dla *Lymnaea stagnalis* Hatch. dla KCI, z wynikami testu Shapiro – Wilka oraz Kołmogorowa – Smirnowa.

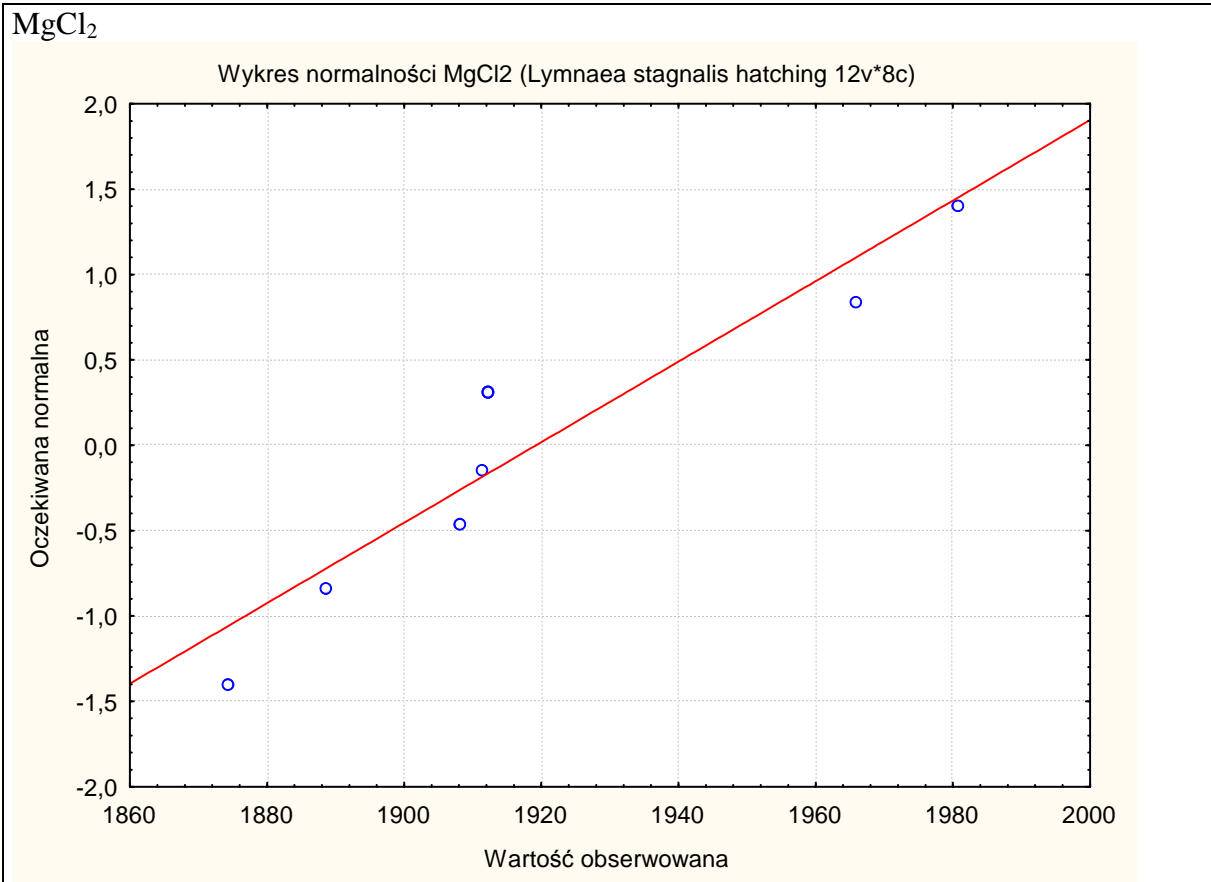


Fig. 241. wykres normalności dla próby MgCl<sub>2</sub> (LC50/24 – dla *Lymnaea stagnalis* Hatch.).

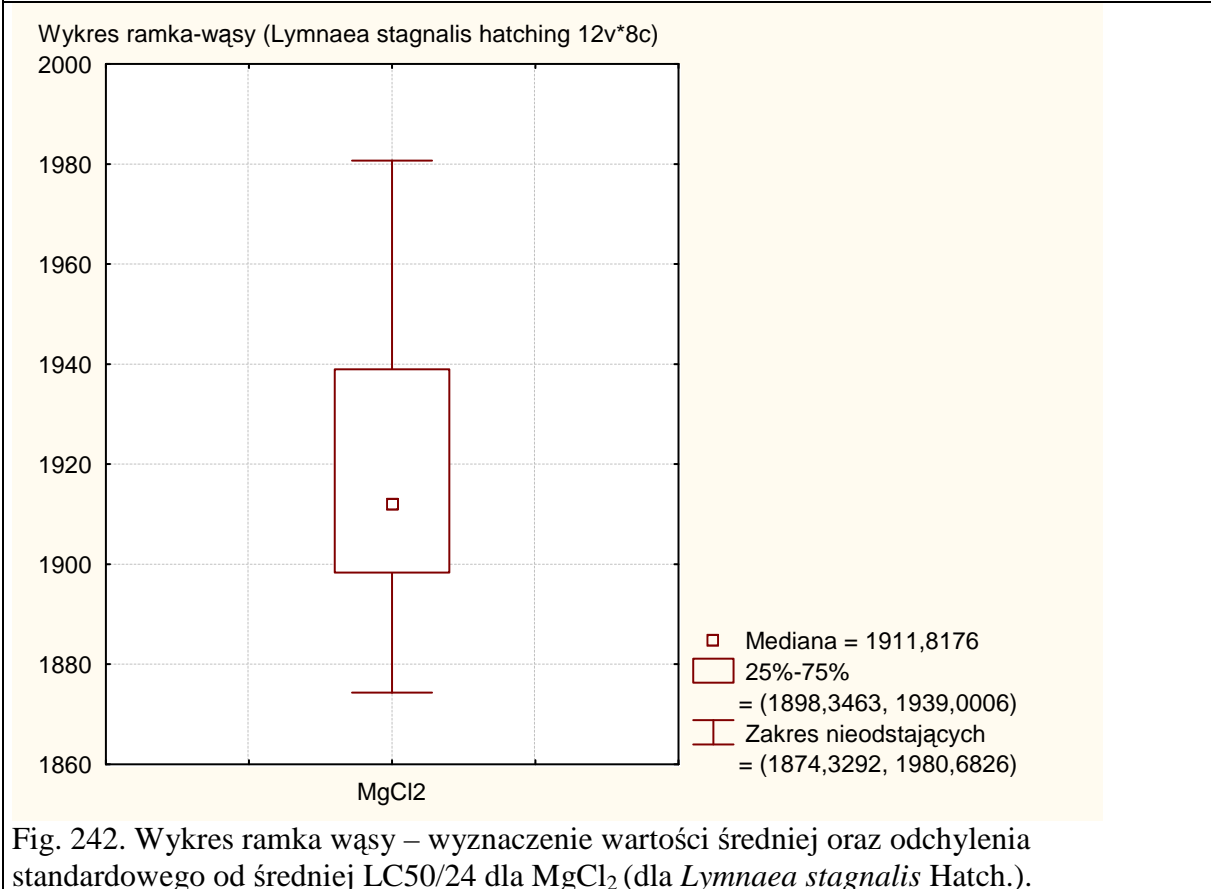
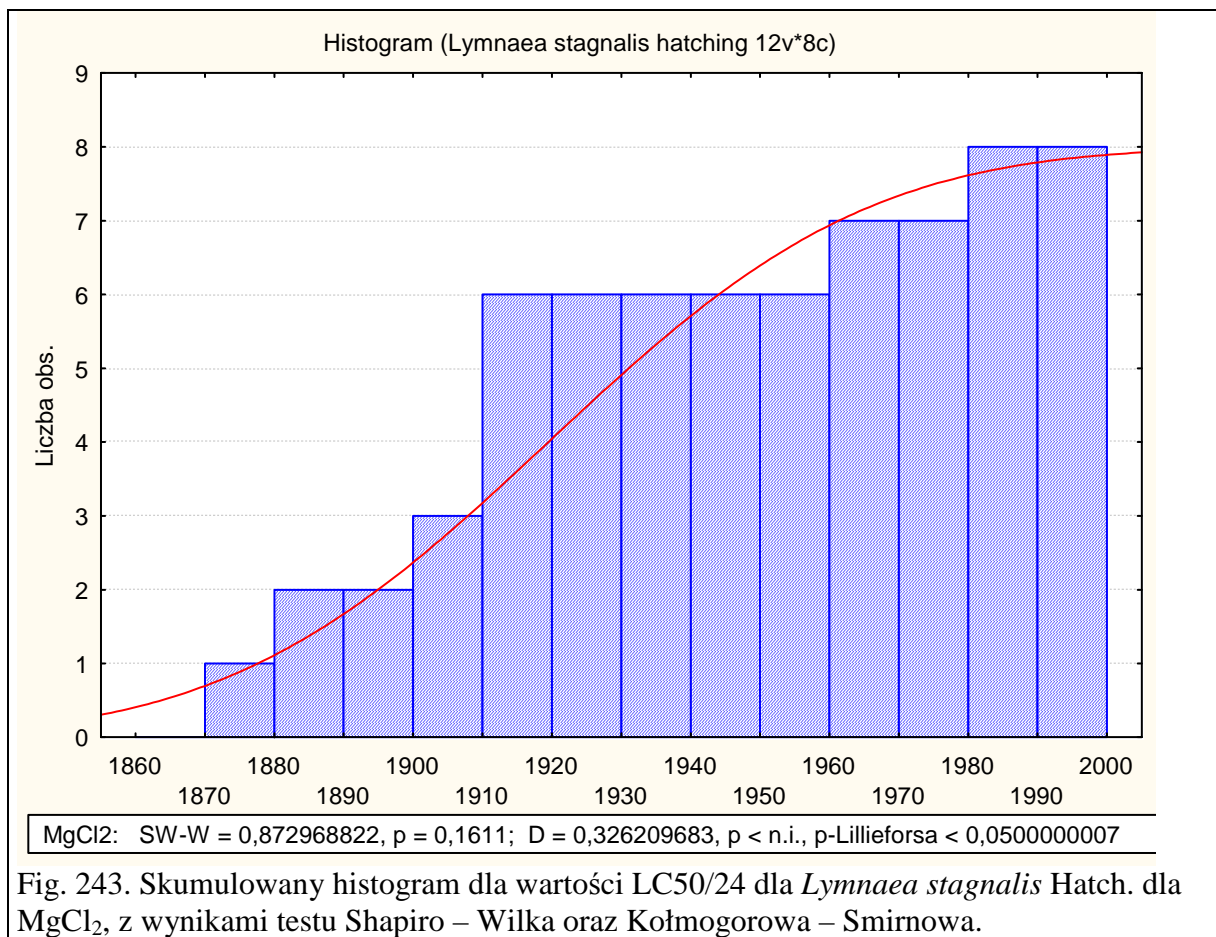


Fig. 242. Wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla MgCl<sub>2</sub> (dla *Lymnaea stagnalis* Hatch.).





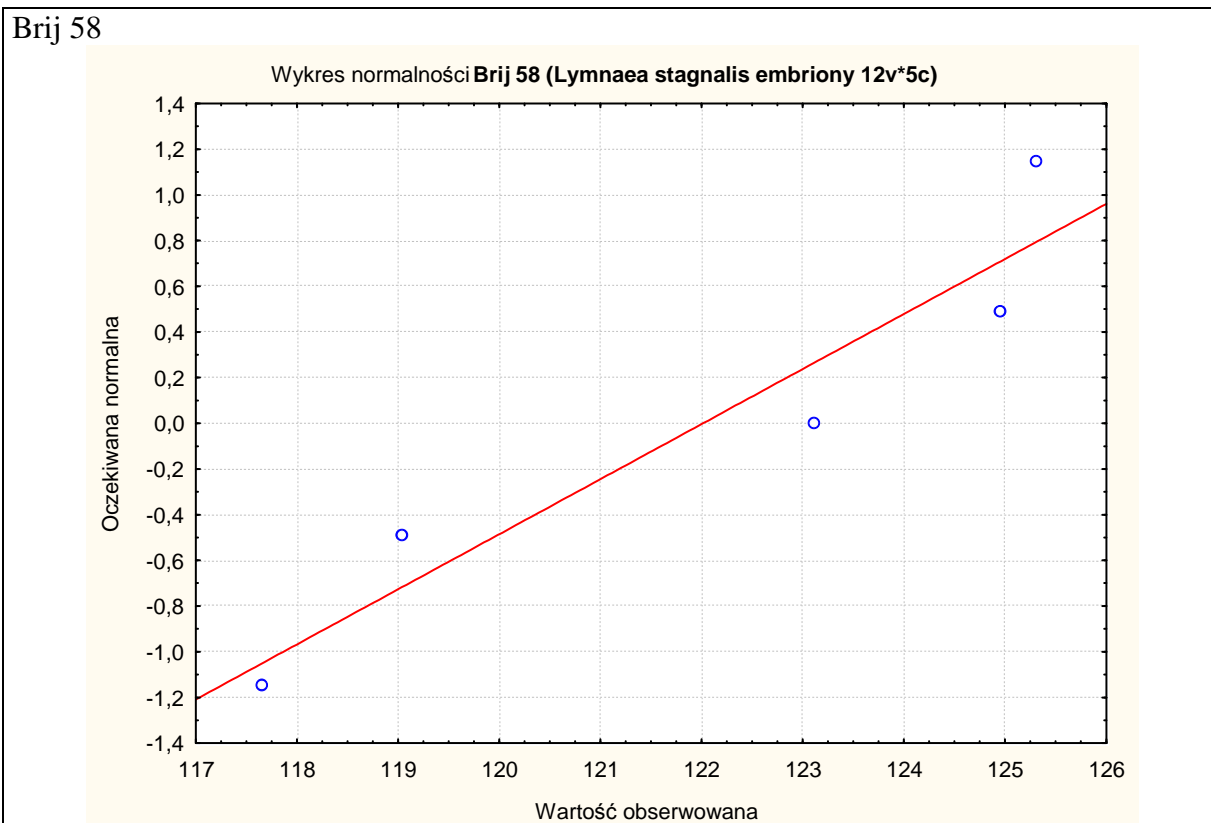


Fig. 178. wykres normalności dla próby Brij 58 (LC50/24 – dla *Lymnaea stagnalis* Emb.).

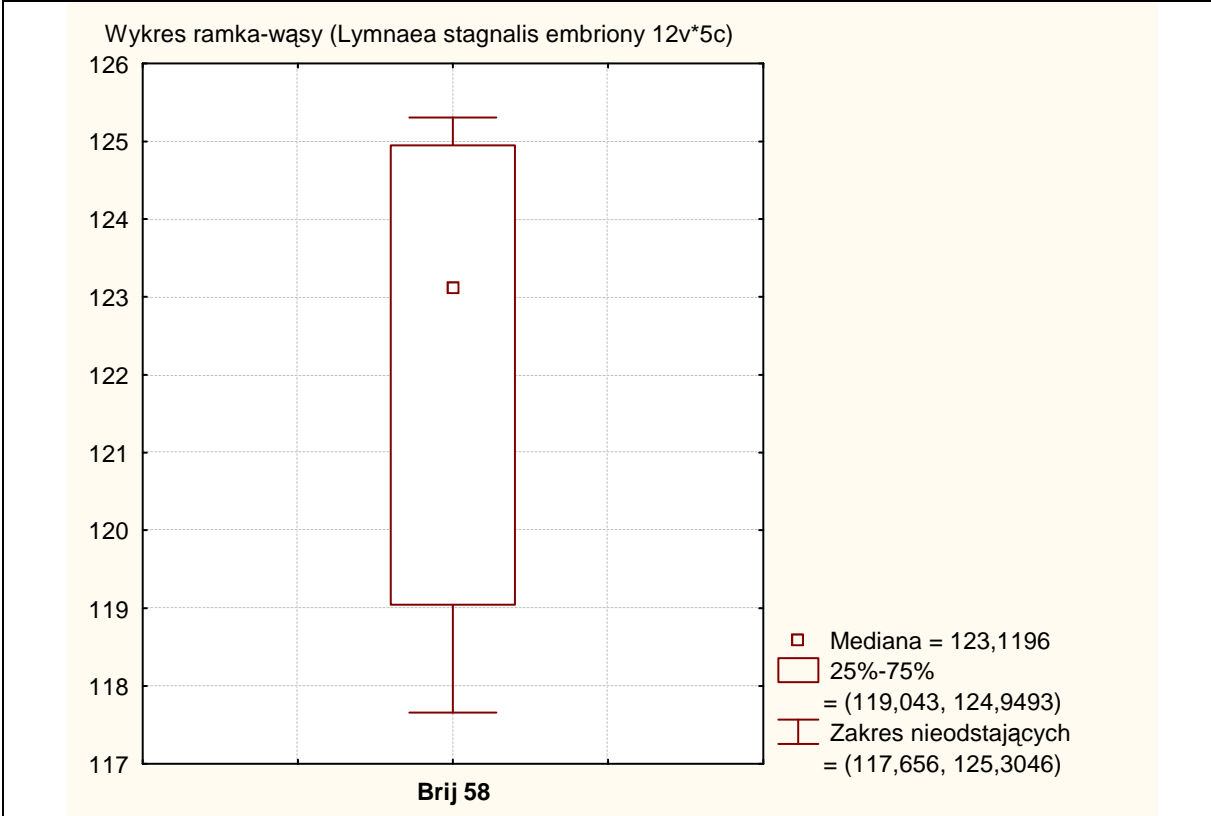


Fig. 179. Wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla Brij 58 dla *Lymnaea stagnalis* Emb.).

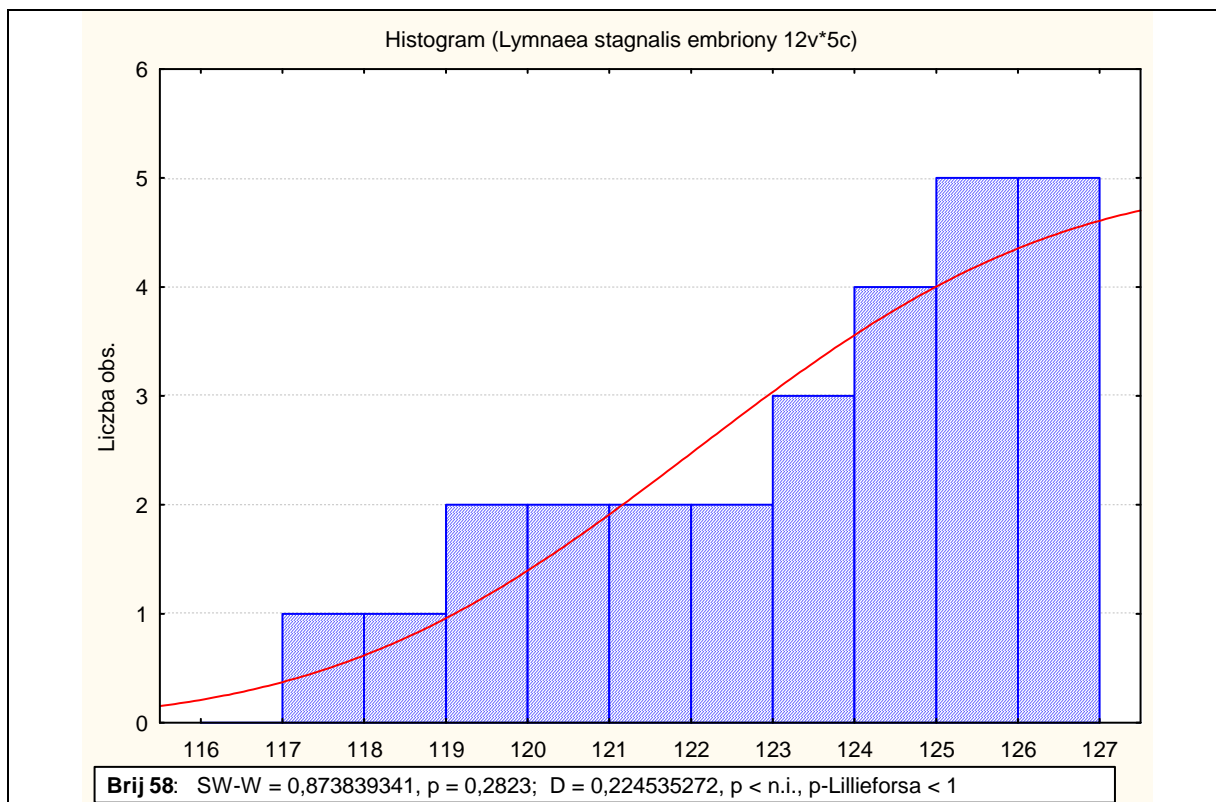


Fig. 180. Skumulowany histogram dla wartości LC50/24 dla *Lymnaea stagnalis* Emb. dla Brij 58, z wynikami testu Shapiro – Wilka oraz Kołmogorowa – Smirnowa.

Brij 72

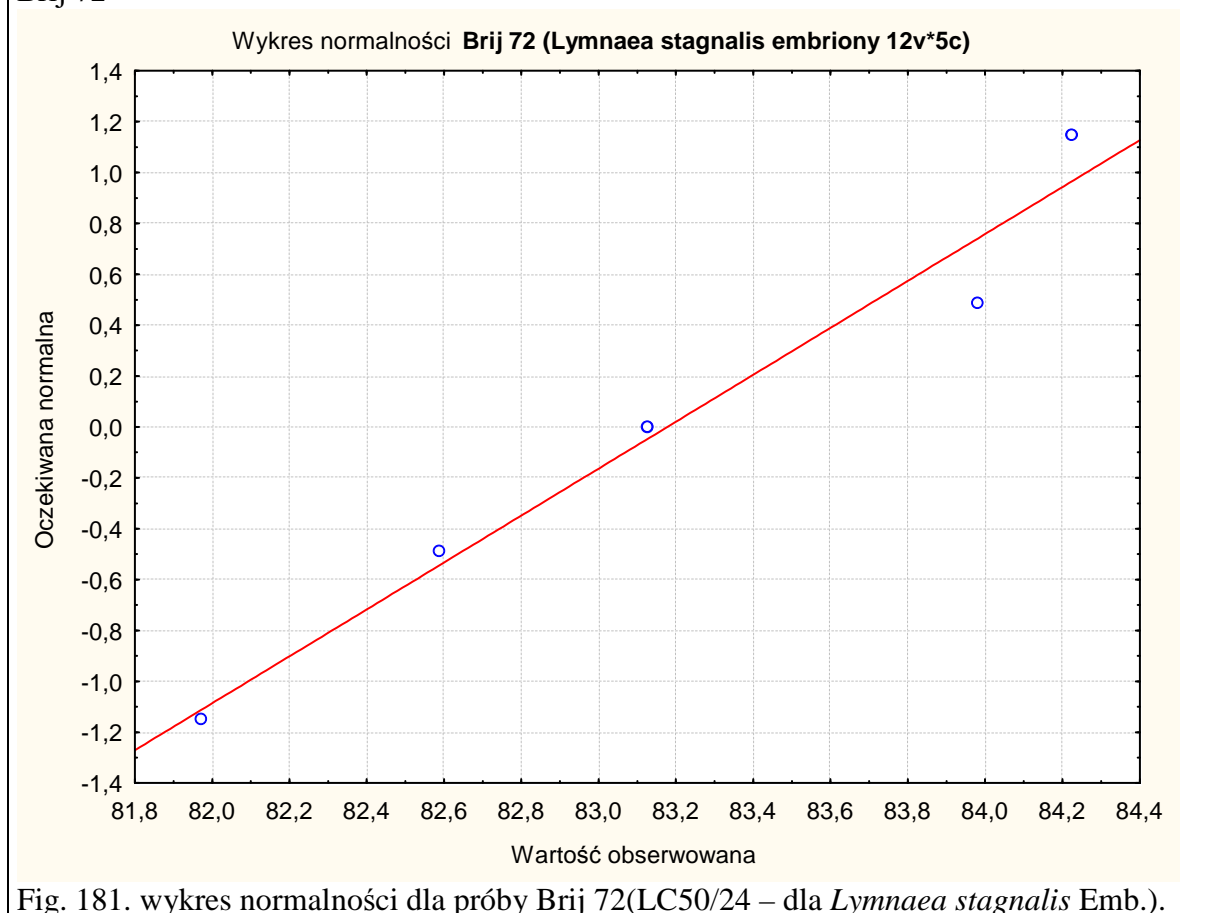


Fig. 181. wykres normalności dla próby Brij 72(LC50/24 – dla *Lymnaea stagnalis* Emb.).

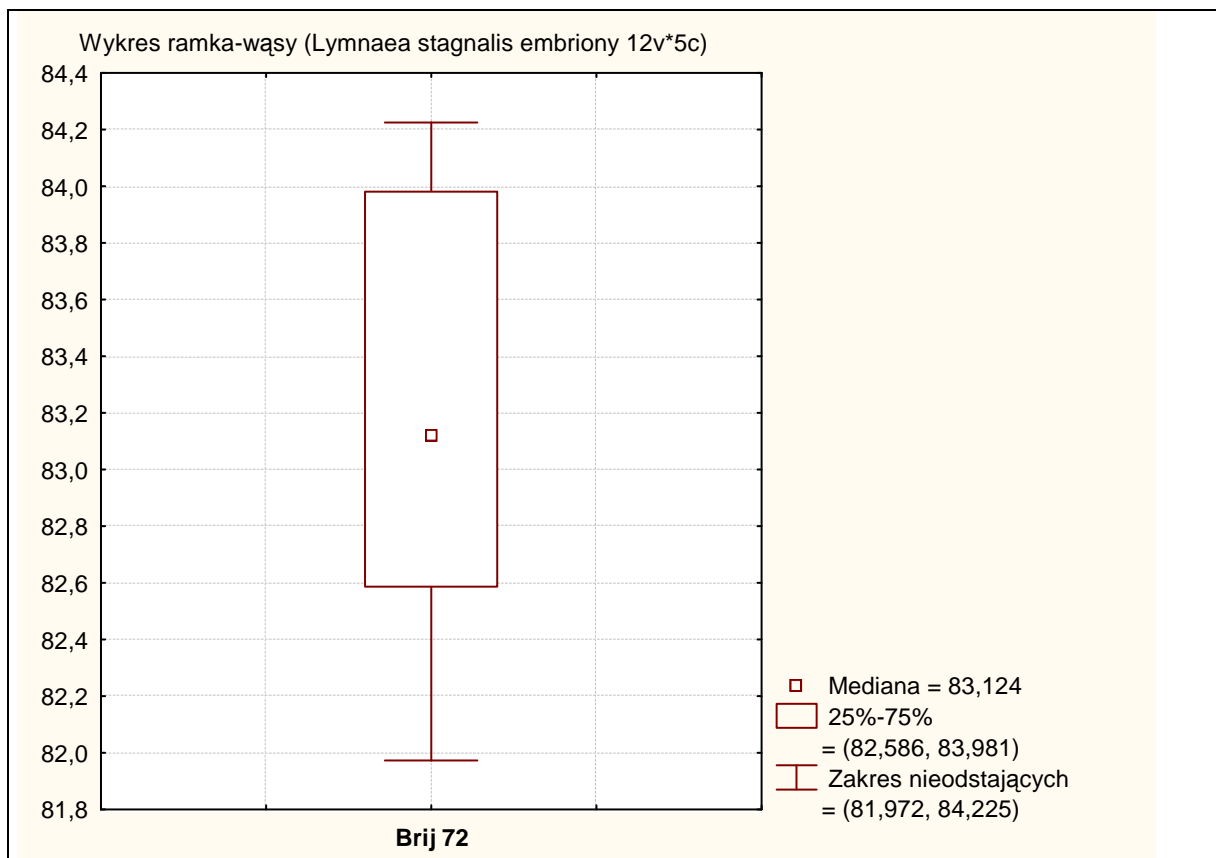


Fig. 182. Wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla Brij 72 (dla *Lymnaea stagnalis* Emb.).

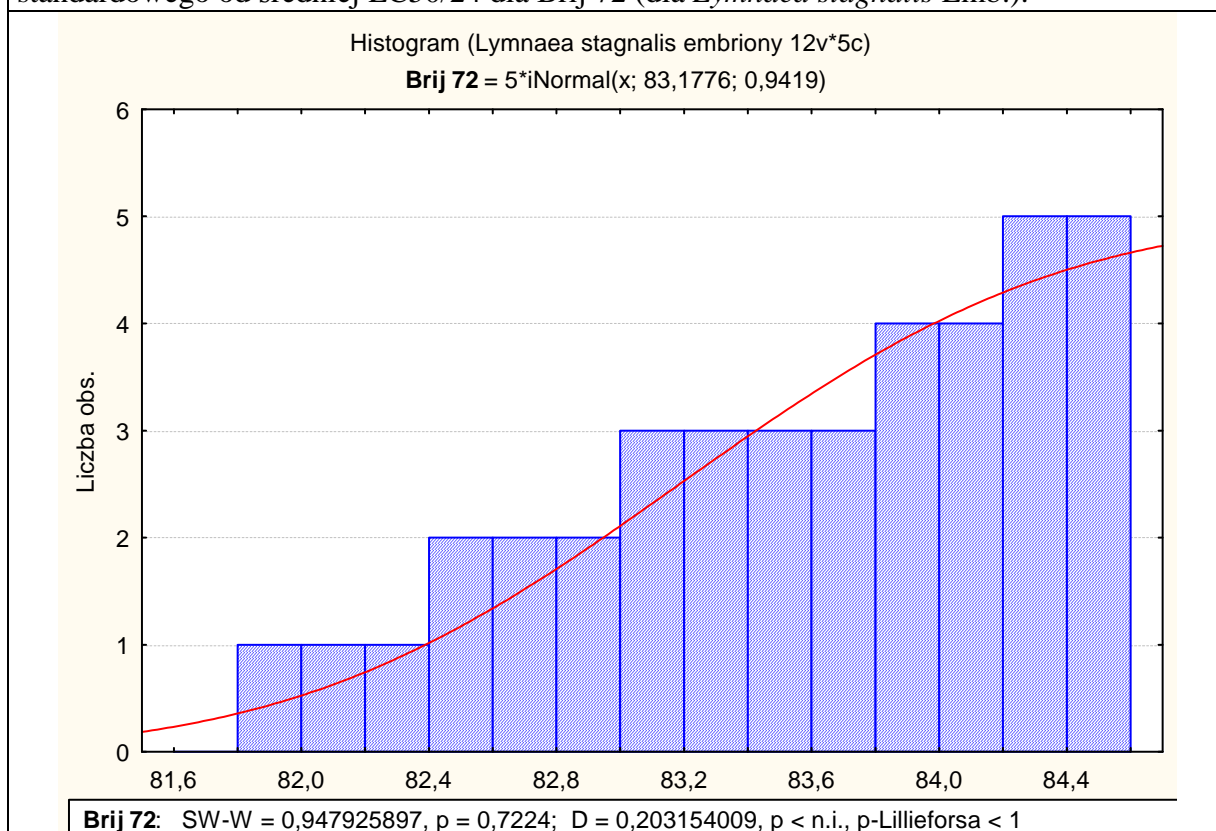


Fig. 183. Skumulowany histogram dla wartości LC50/24 dla *Lymnaea stagnalis* Emb. dla Brij 72, z wynikami testu Shapiro – Wilka oraz Kołmogorowa – Smirnowa.

## Brij 76

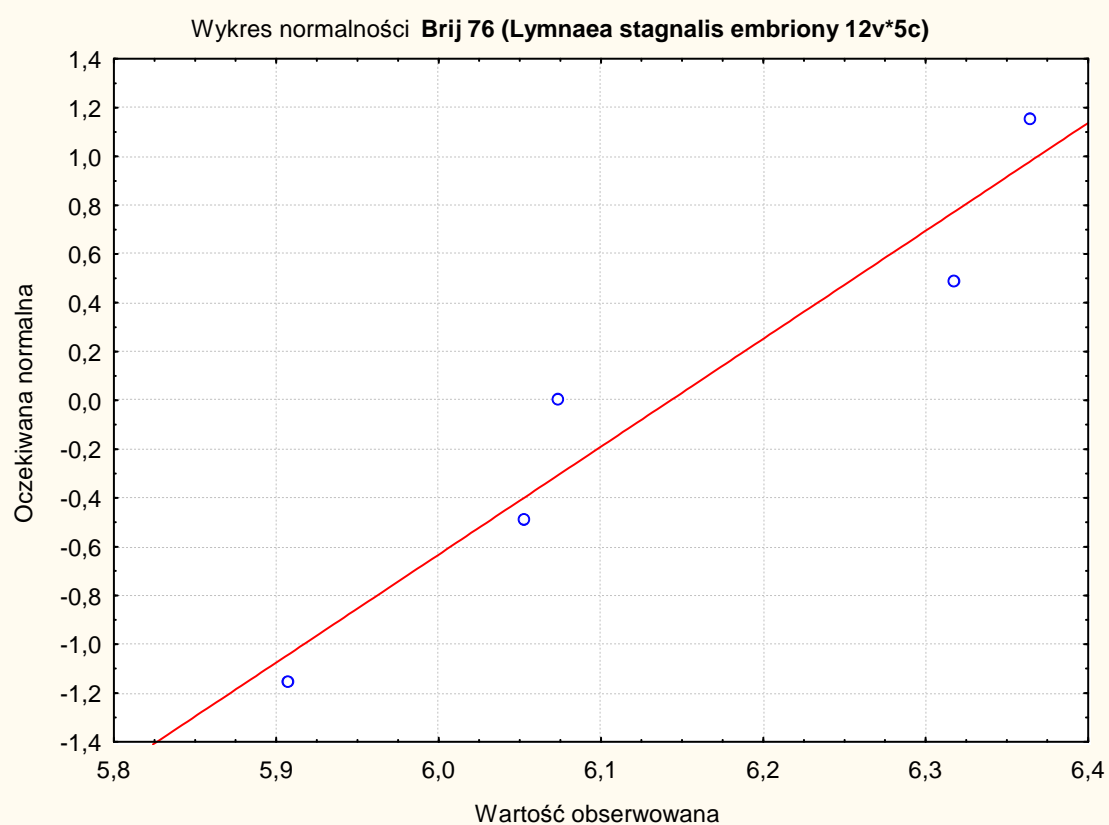


Fig. 184. wykres normalności dla próby Brij 76 (LC50/24 – dla *Lymnaea stagnalis* Emb.).

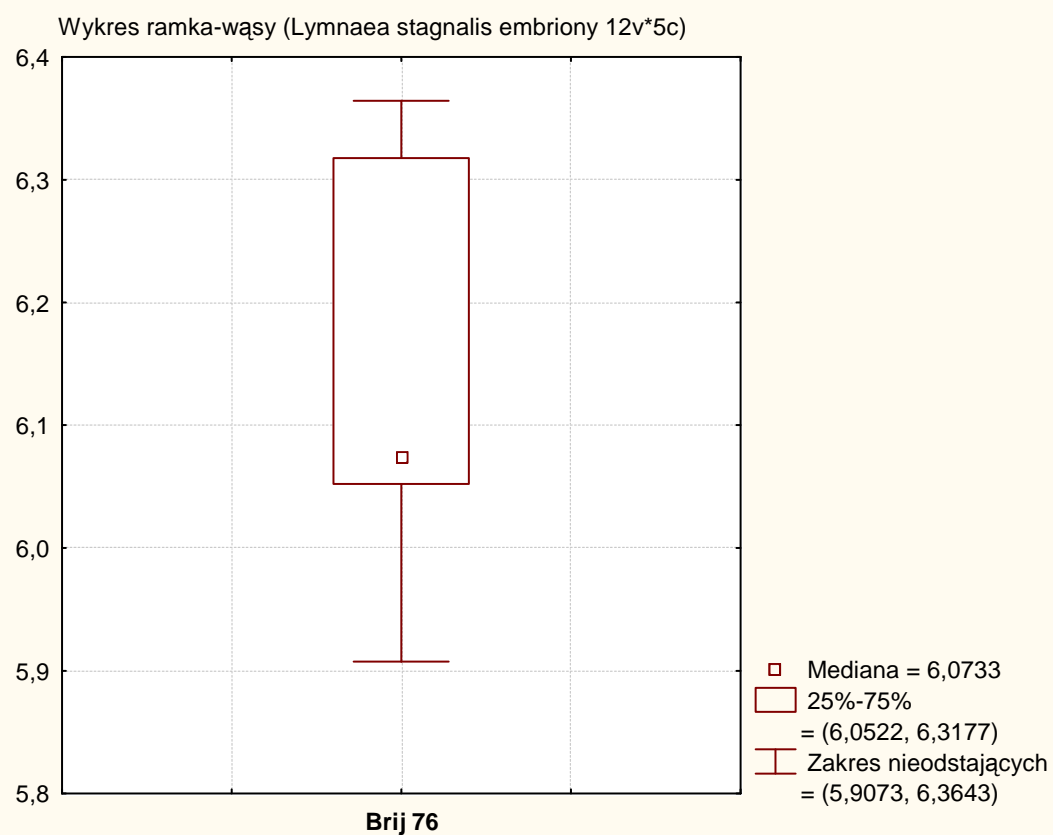


Fig. 185. Wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla Brij 76 (dla *Lymnaea stagnalis* Emb.).

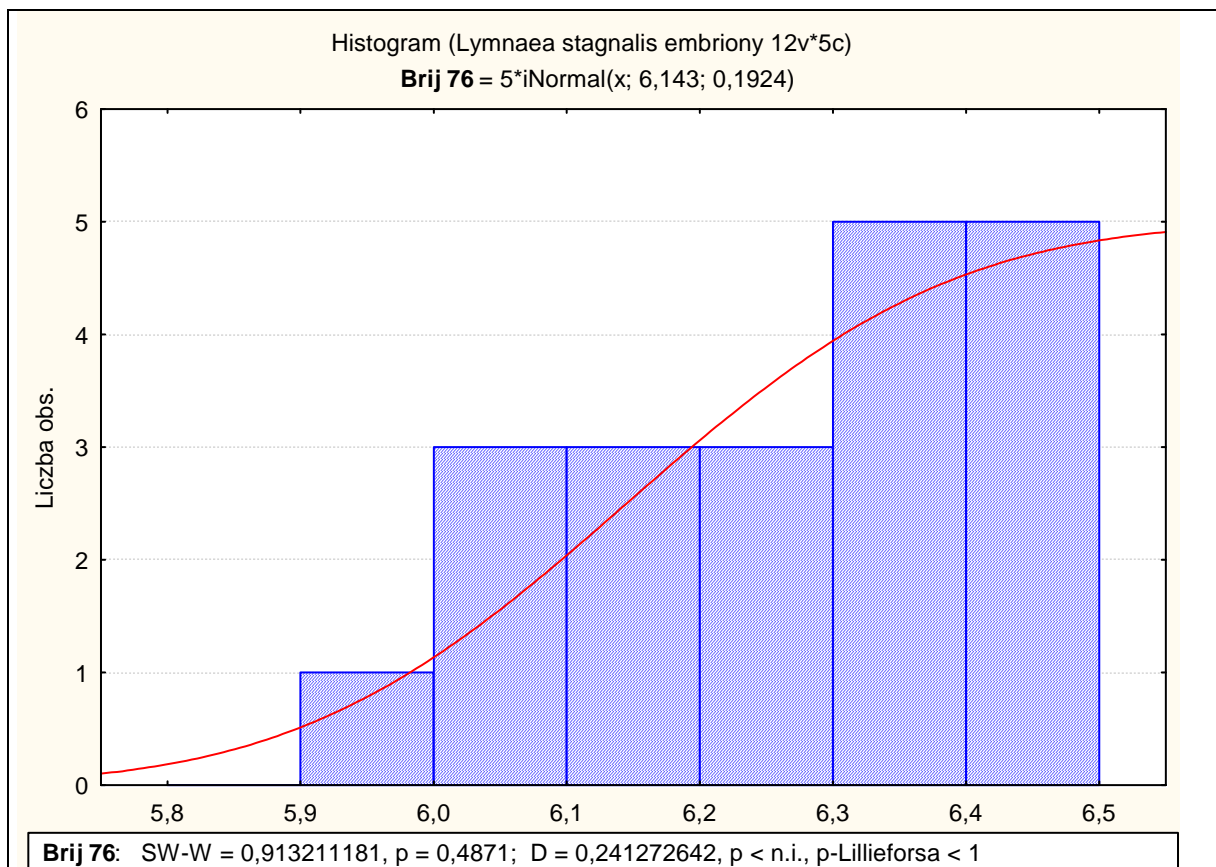


Fig. 186. Skumulowany histogram dla wartości LC50/24 dla *Lymnaea stagnalis* Emb. dla Brij 76, z wynikami testu Shapiro – Wilka oraz Kołmogorowa – Smirnowa.

Brij 78

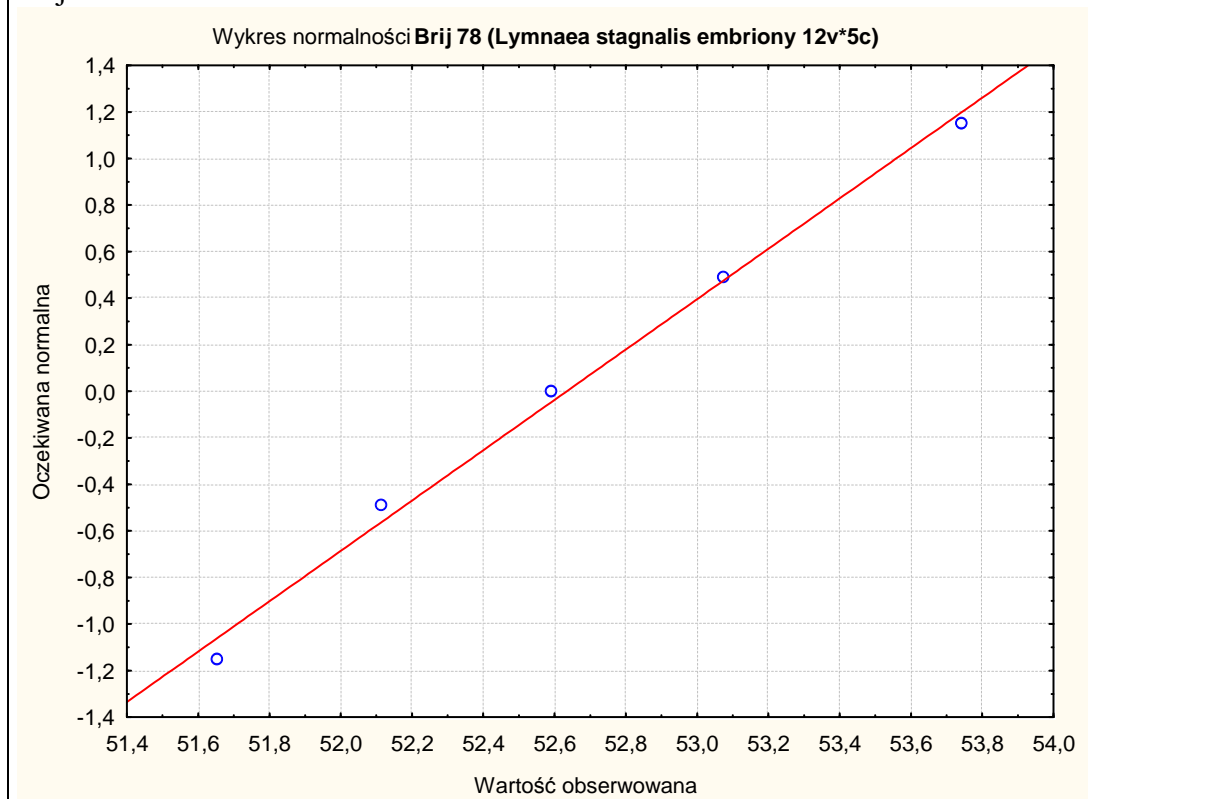


Fig. 187. wykres normalności dla próby Brij 78 (LC50/24 – dla *Lymnaea stagnalis* Emb.).

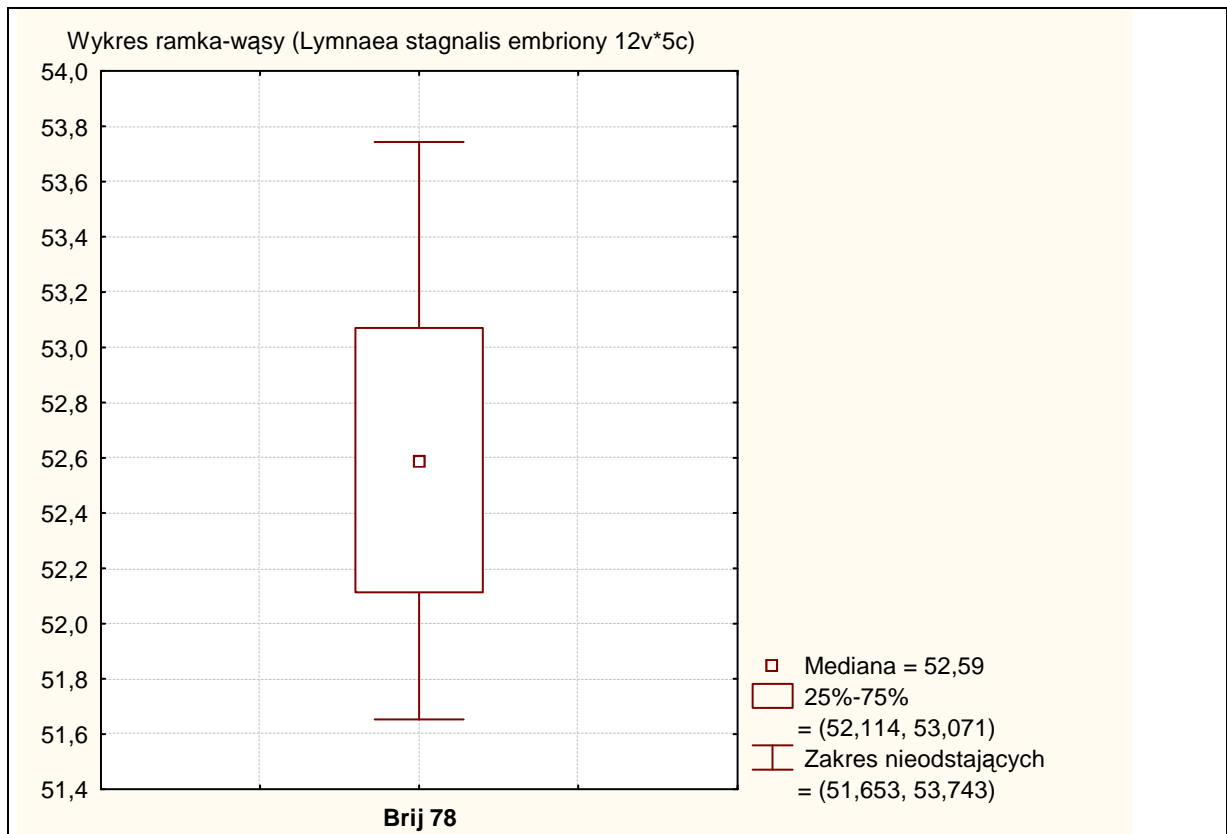


Fig. 188. Wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla Brij 78 (dla *Lymnaea stagnalis* Emb.).

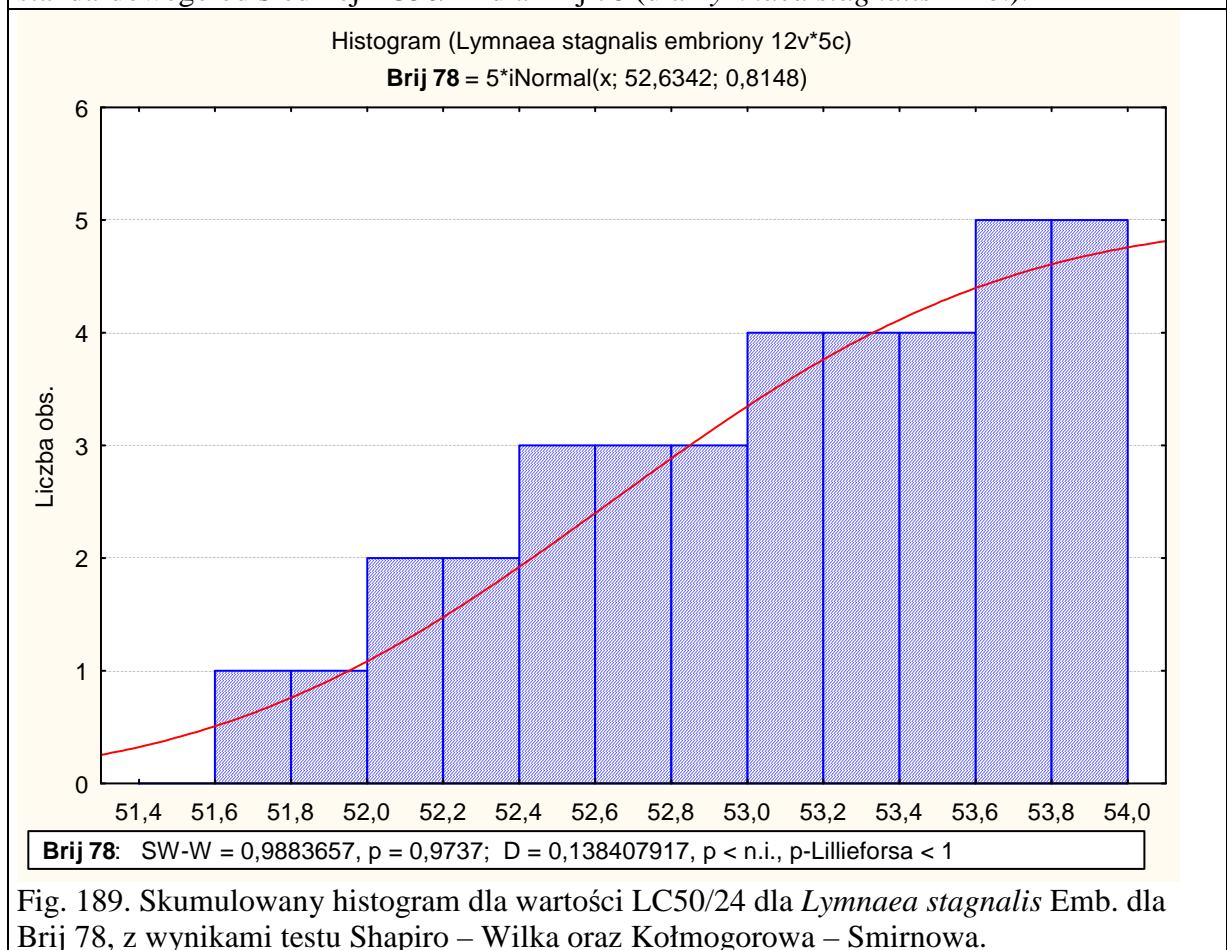


Fig. 189. Skumulowany histogram dla wartości LC50/24 dla *Lymnaea stagnalis* Emb. dla Brij 78, z wynikami testu Shapiro – Wilka oraz Kołmogorowa – Smirnowa.

## Ludwik

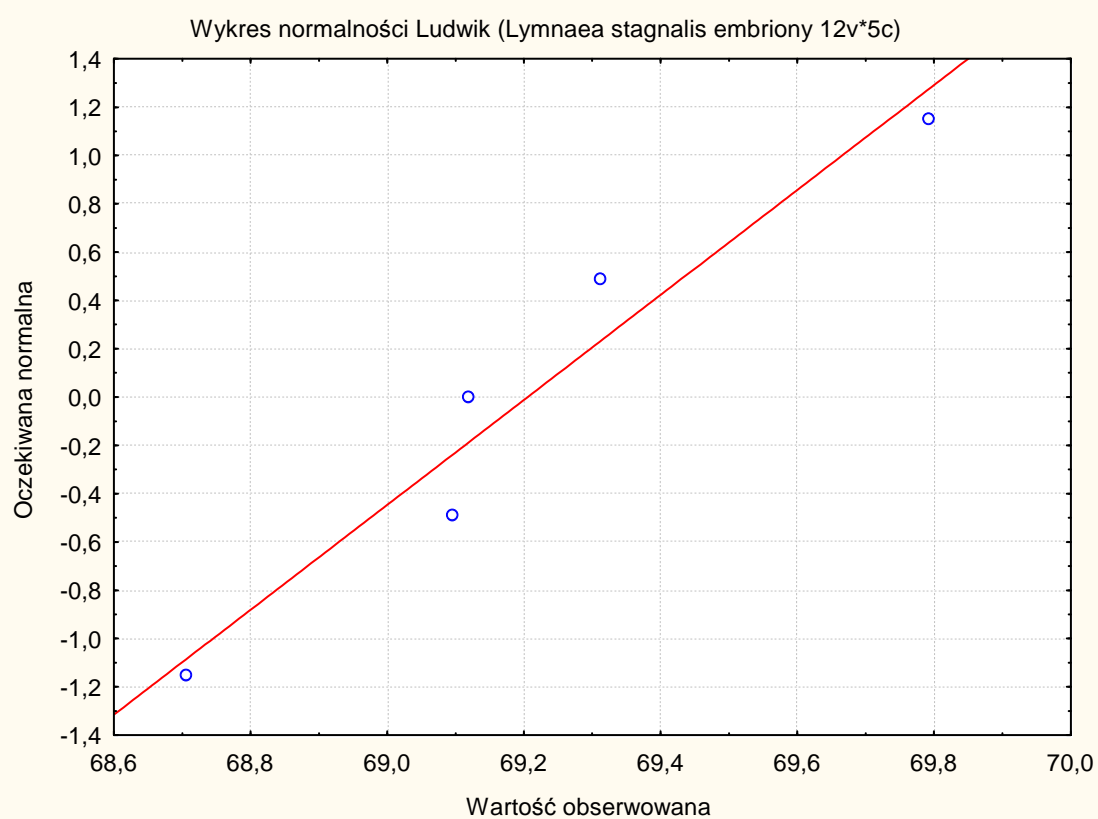


Fig. 190. wykres normalności dla próby Ludwik (LC50/24 – dla *Lymnaea stagnalis* Emb.).

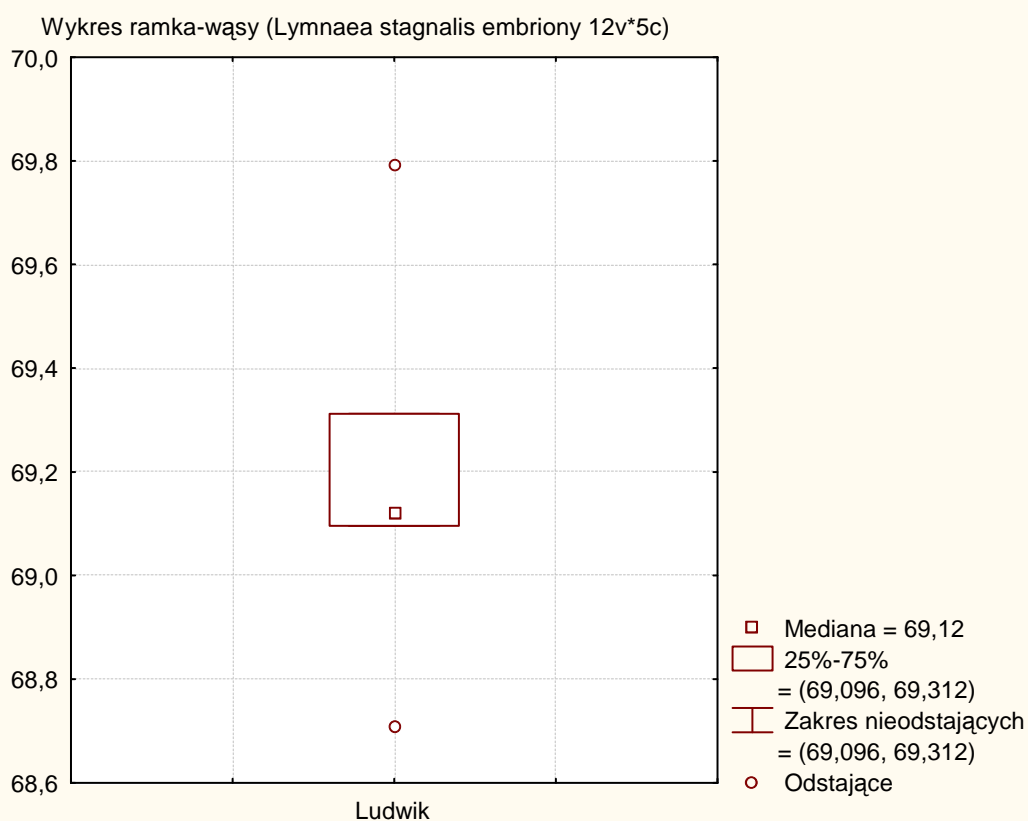


Fig. 191. Wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla Ludwik (dla *Lymnaea stagnalis* Emb.).

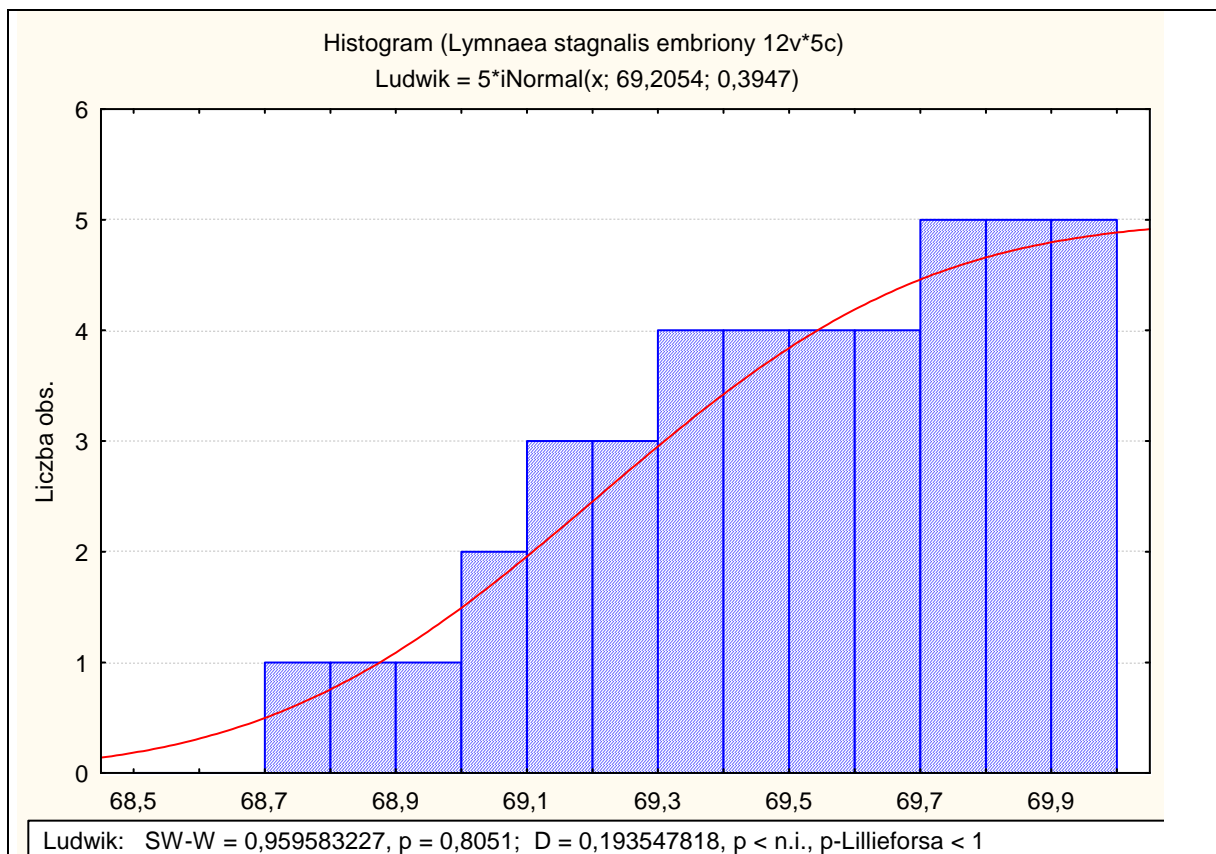


Fig. 192. Skumulowany histogram dla wartości LC50/24 dla *Lymnaea stagnalis* Emb. dla Ludwik, z wynikami testu Shapiro – Wilka oraz Kołmogorowa – Smirnowa.

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

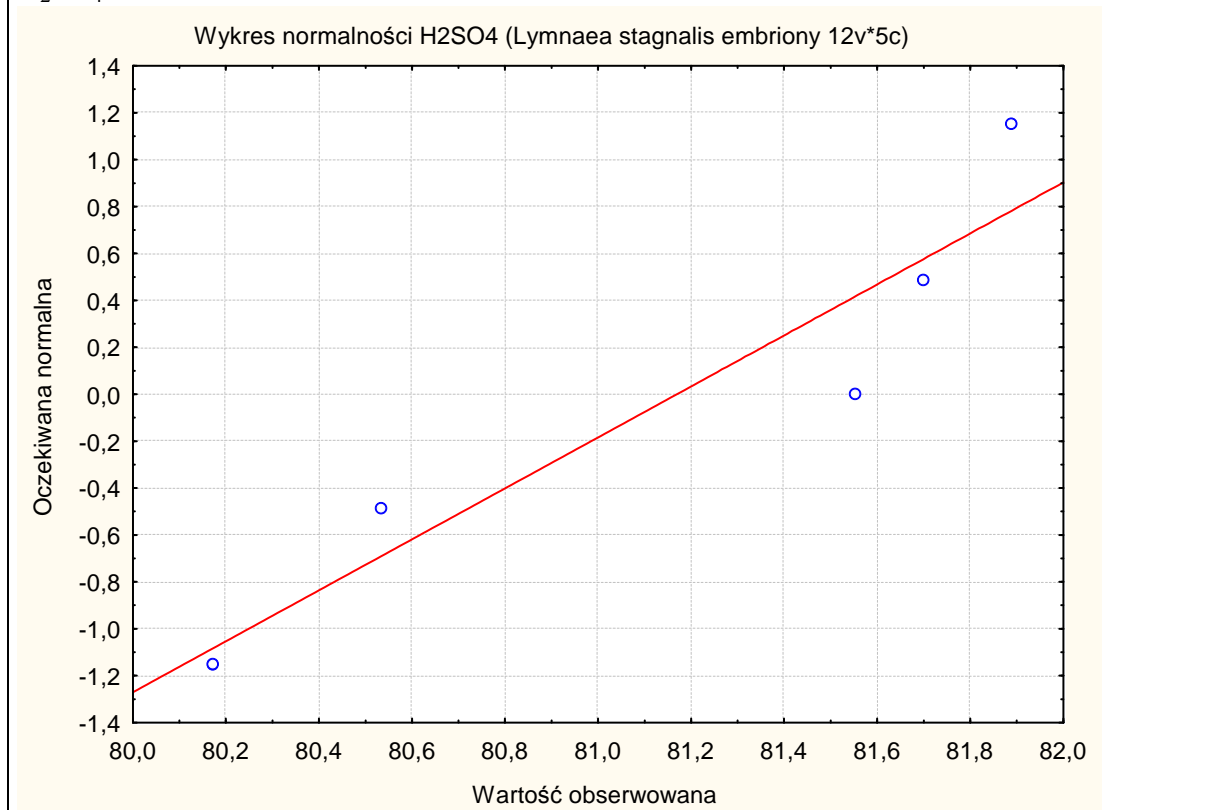


Fig. 193. wykres normalności dla próby H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (LC50/24 – dla *Lymnaea stagnalis* Emb.).



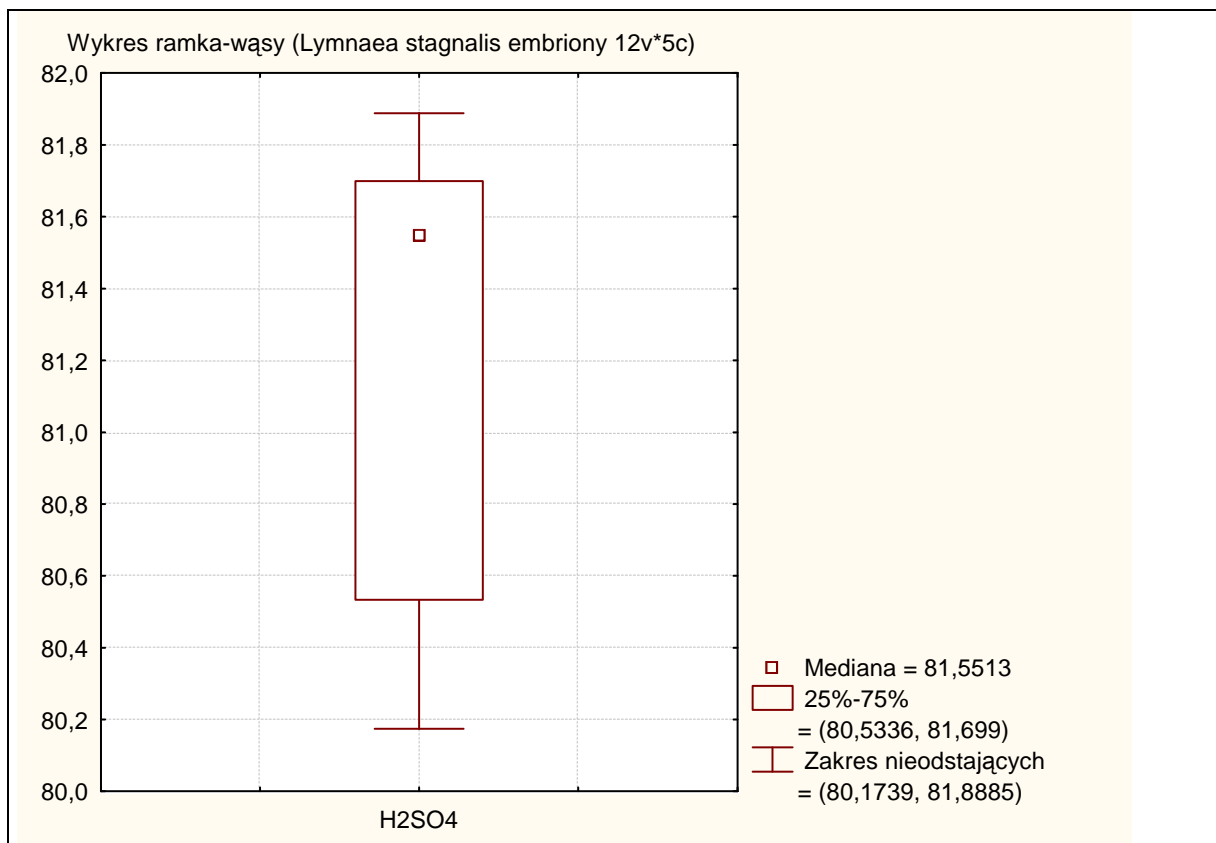


Fig. 194. Wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (dla *Lymnaea stagnalis* Emb.).

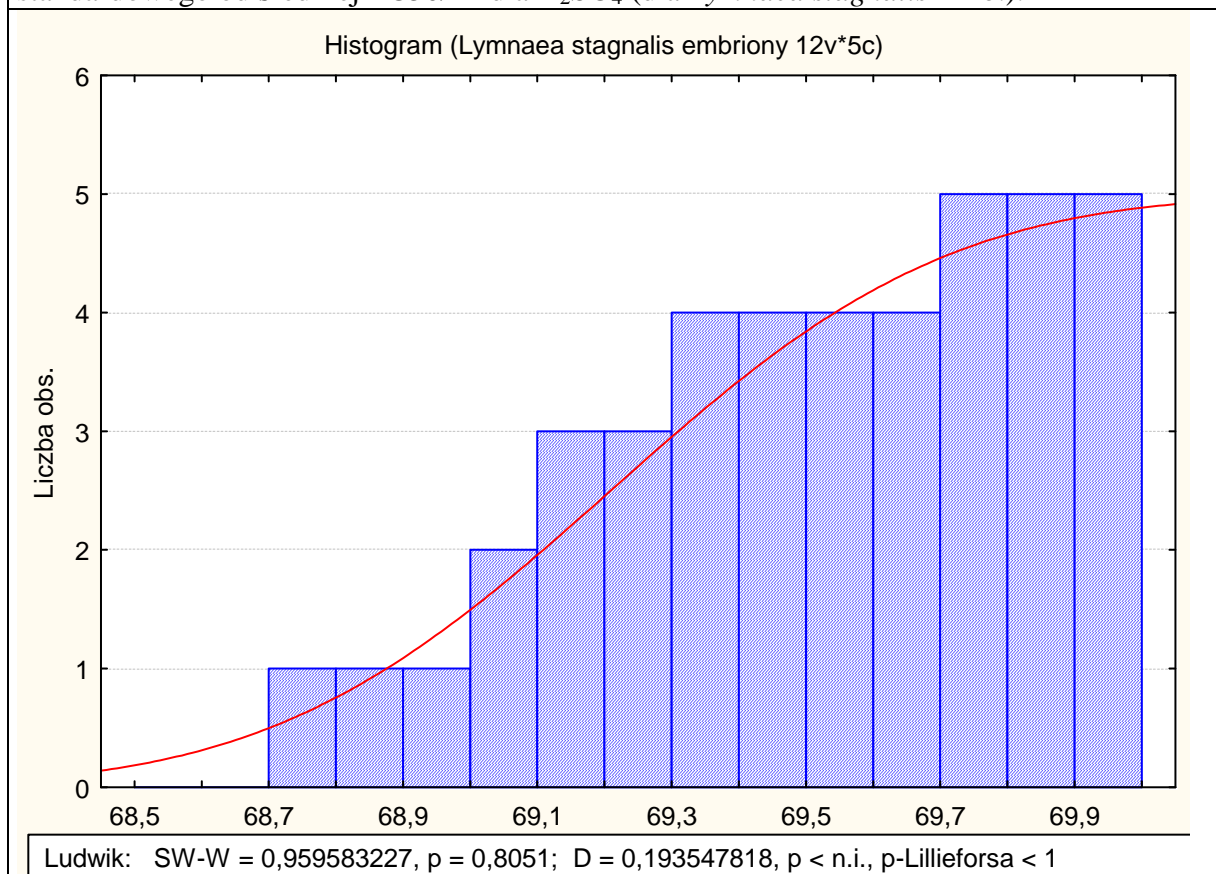


Fig. 195. Skumulowany histogram dla wartości LC50/24 dla *Lymnaea stagnalis* Emb. dla H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, z wynikami testu Shapiro – Wilka oraz Kołmogorowa – Smirnowa.

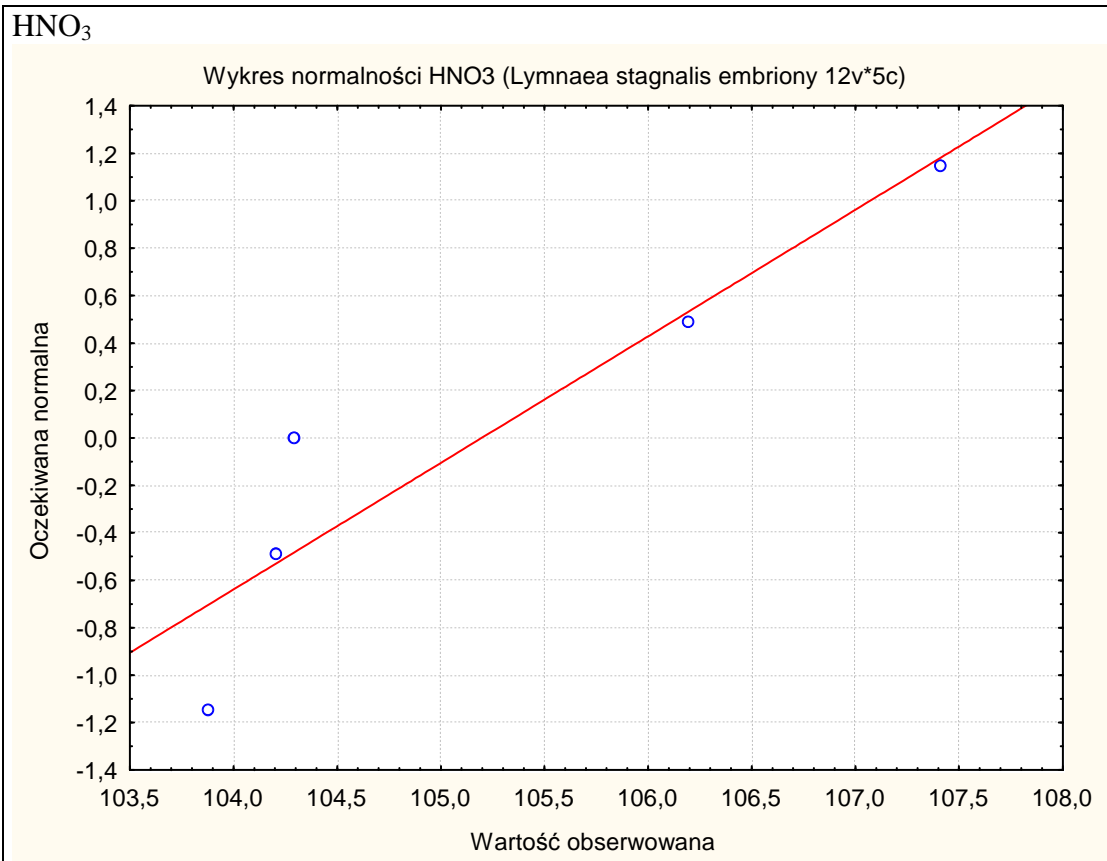


Fig. 196. wykres normalności dla próby HNO<sub>3</sub> (LC50/24 – dla *Lymnaea stagnalis* Emb.).

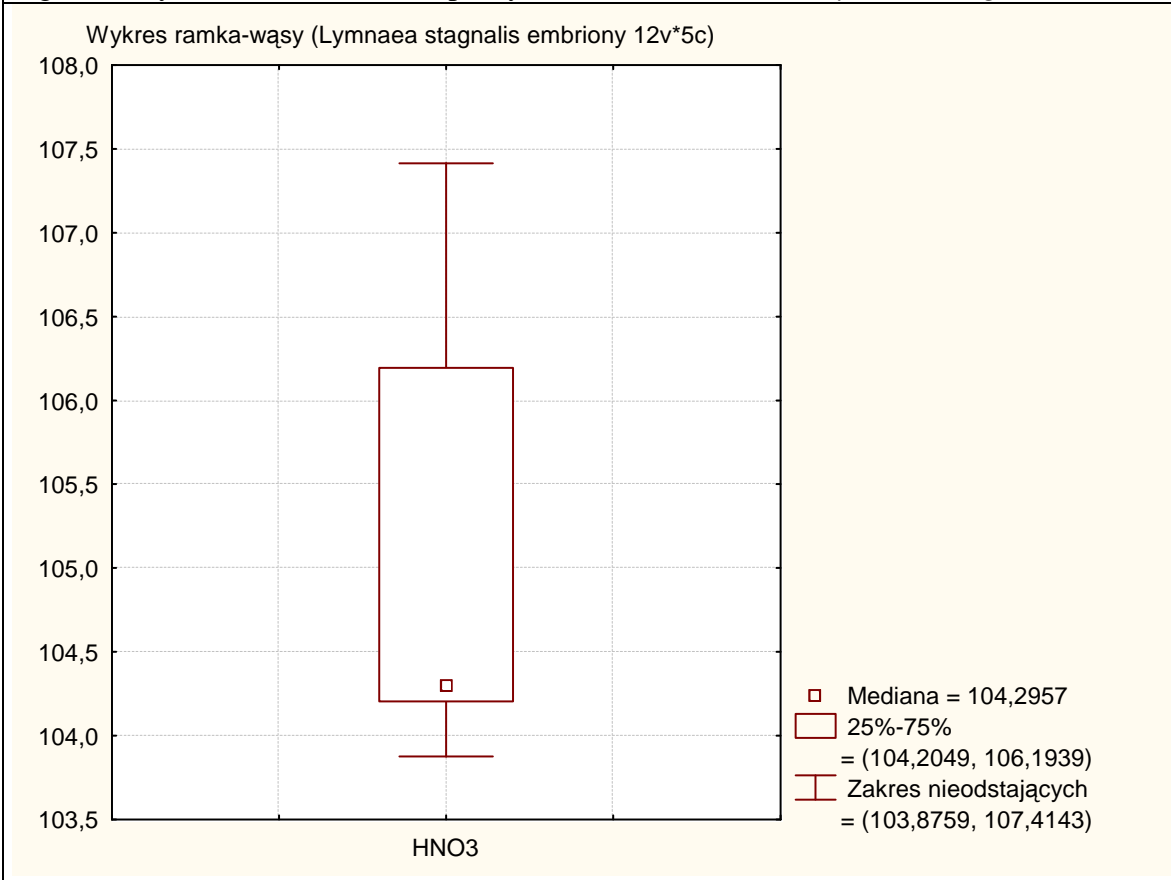
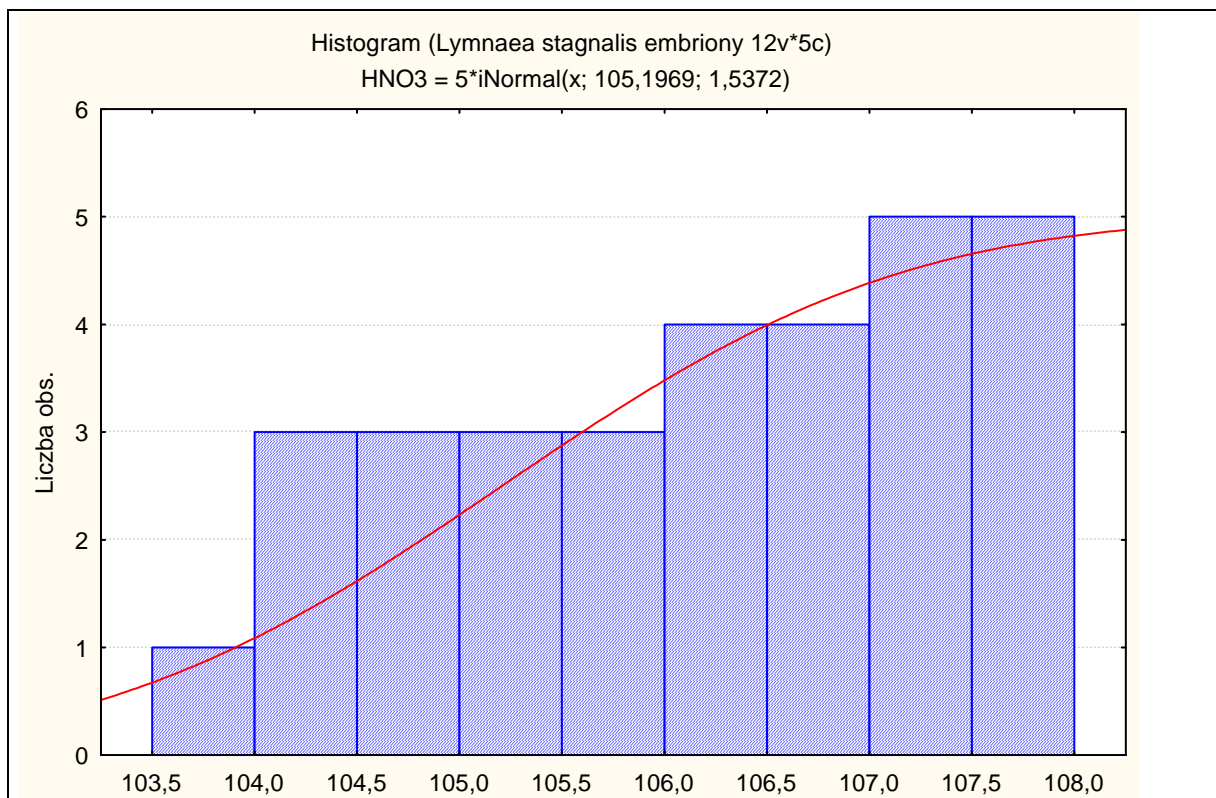


Fig. 197. Wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla HNO<sub>3</sub> (dla *Lymnaea stagnalis* Emb.).



HNO<sub>3</sub>: SW-W = 0,848396813, p = 0,1895; D = 0,321163106, p < n.i., p-Lillieforsa < 0,100000001

Fig. 198. Skumulowany histogram dla wartości LC50/24 dla *Lymnaea stagnalis* Emb. dla HNO<sub>3</sub>, z wynikami testu Shapiro – Wilka oraz Kołmogorowa – Smirnowa.

NH<sub>4</sub>OH

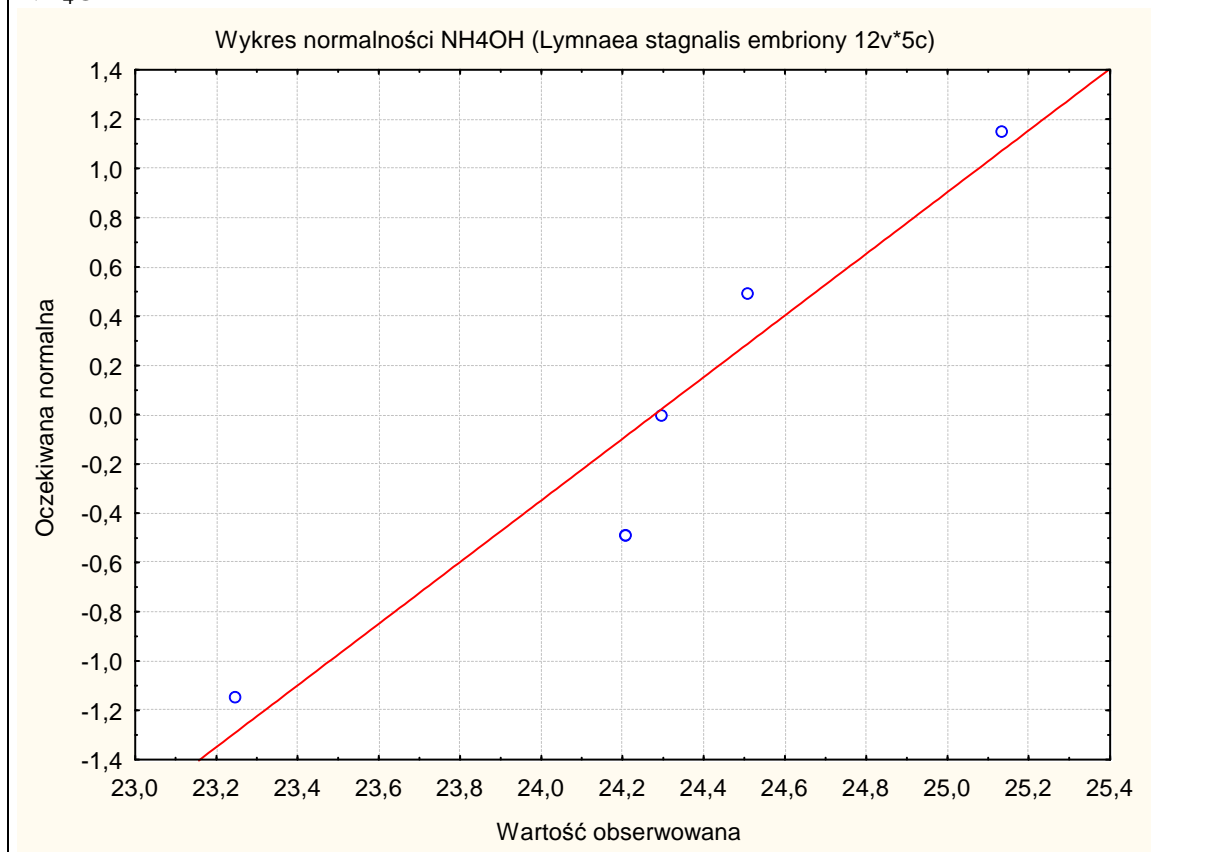


Fig. 199. wykres normalności dla próby NH<sub>4</sub>OH (LC50/24 – dla *Lymnaea stagnalis* Emb.).

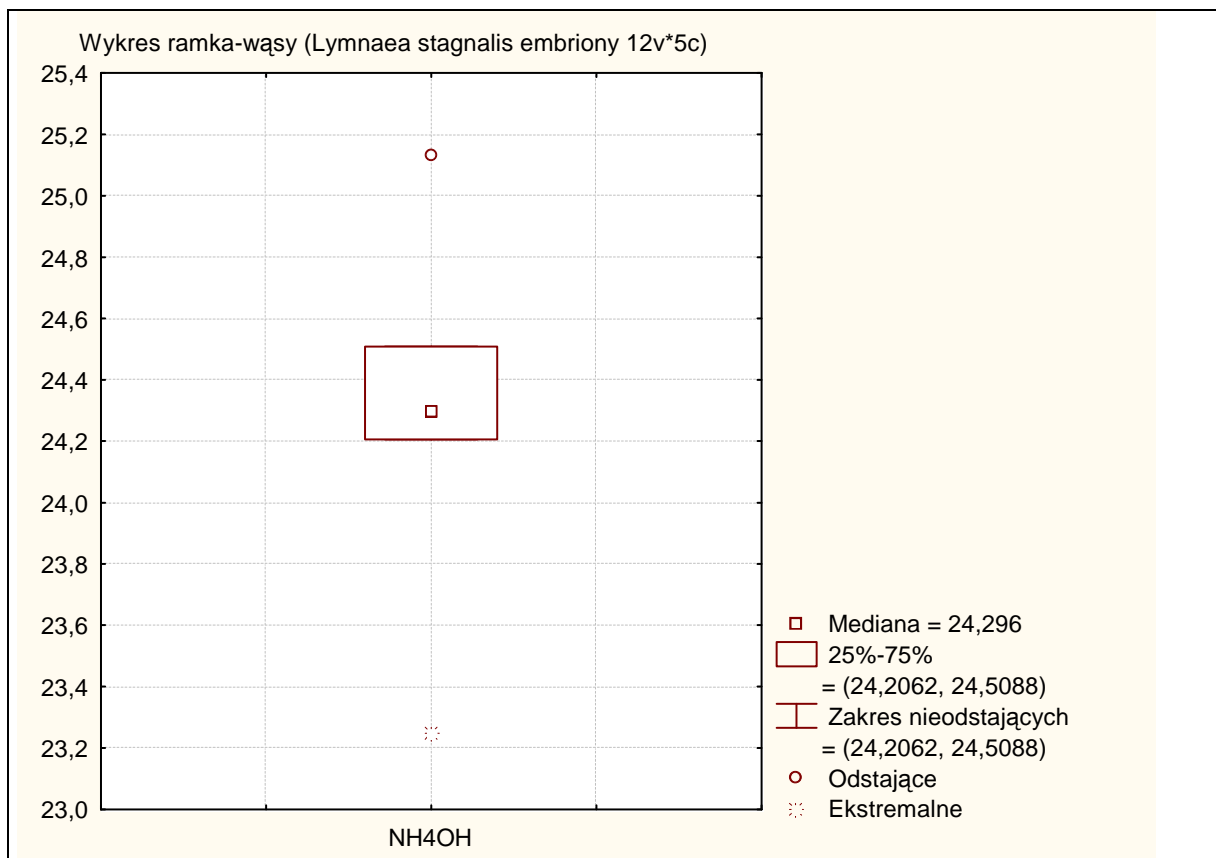


Fig. 200. Wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla NH<sub>4</sub>OH (dla *Lymnaea stagnalis* Emb.).

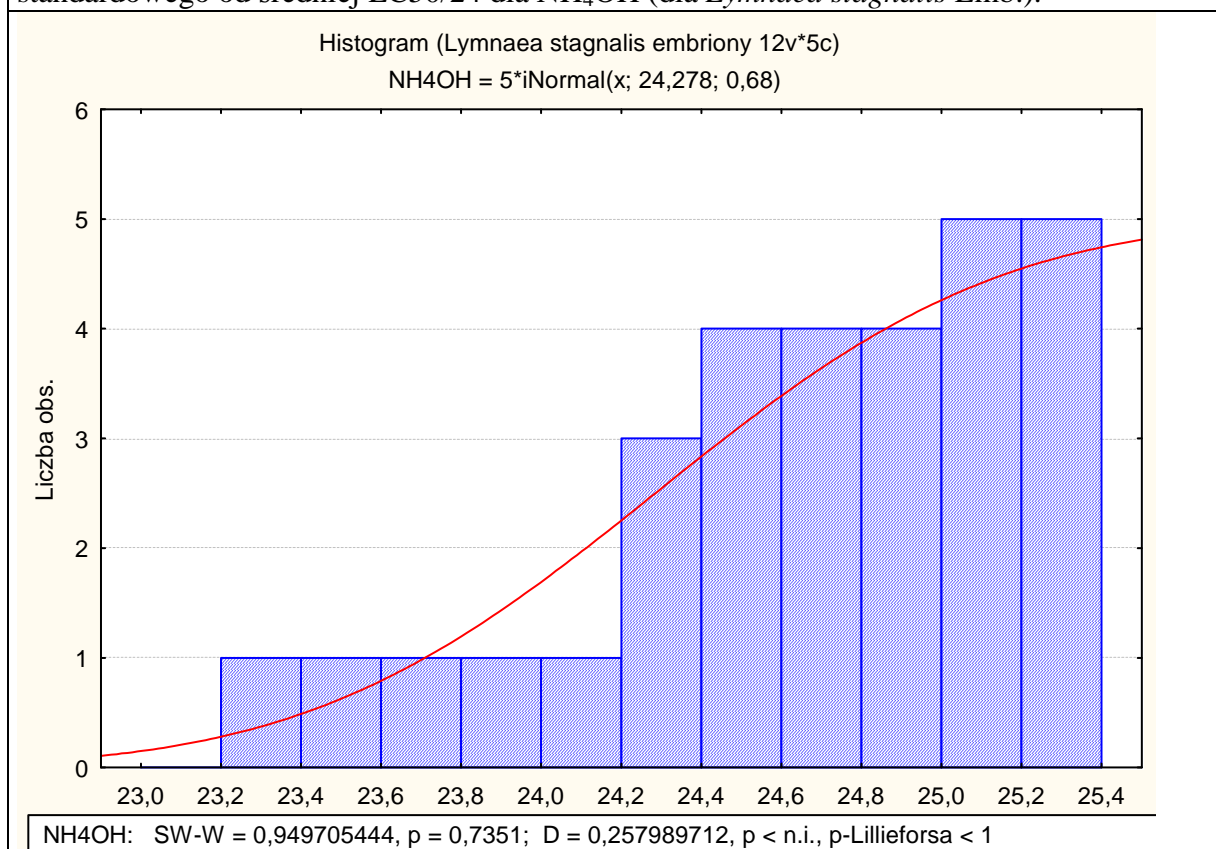


Fig. 201. Skumulowany histogram dla wartości LC50/24 dla *Lymnaea stagnalis* Emb. dla NH<sub>4</sub>OH, z wynikami testu Shapiro – Wilka oraz Kołmogorowa – Smirnowa.

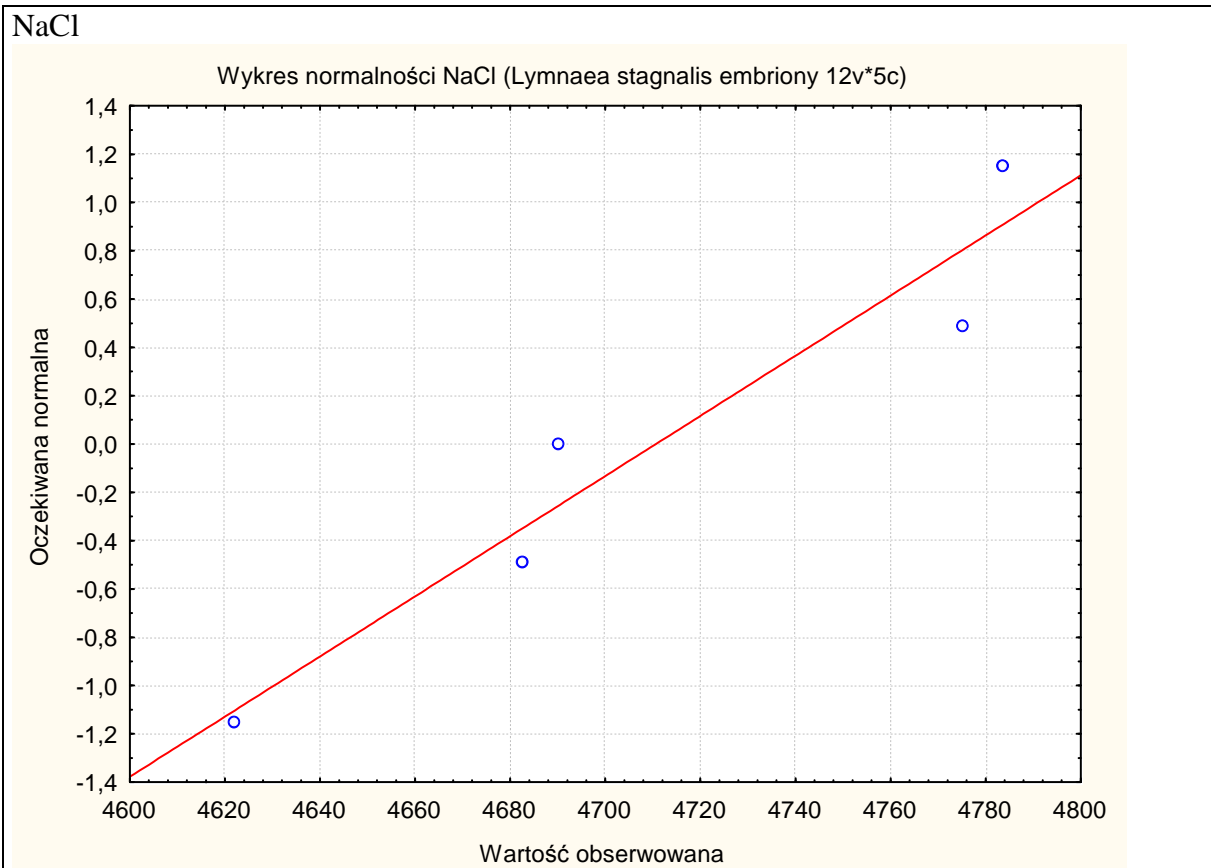


Fig. 202. wykres normalności dla próby NaCl (LC50/24 – dla *Lymnaea stagnalis* Emb.).

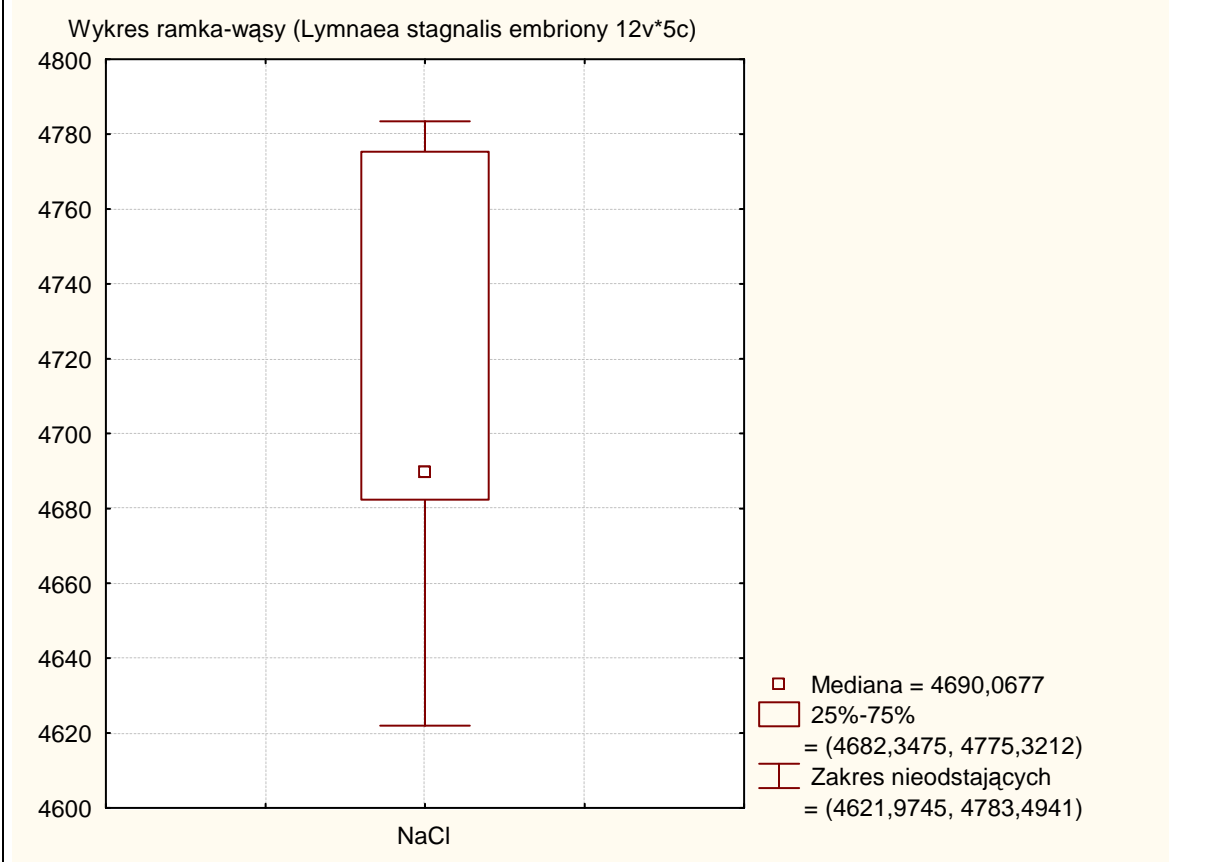


Fig. 203. Wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla NaCl (dla *Lymnaea stagnalis* Emb.).

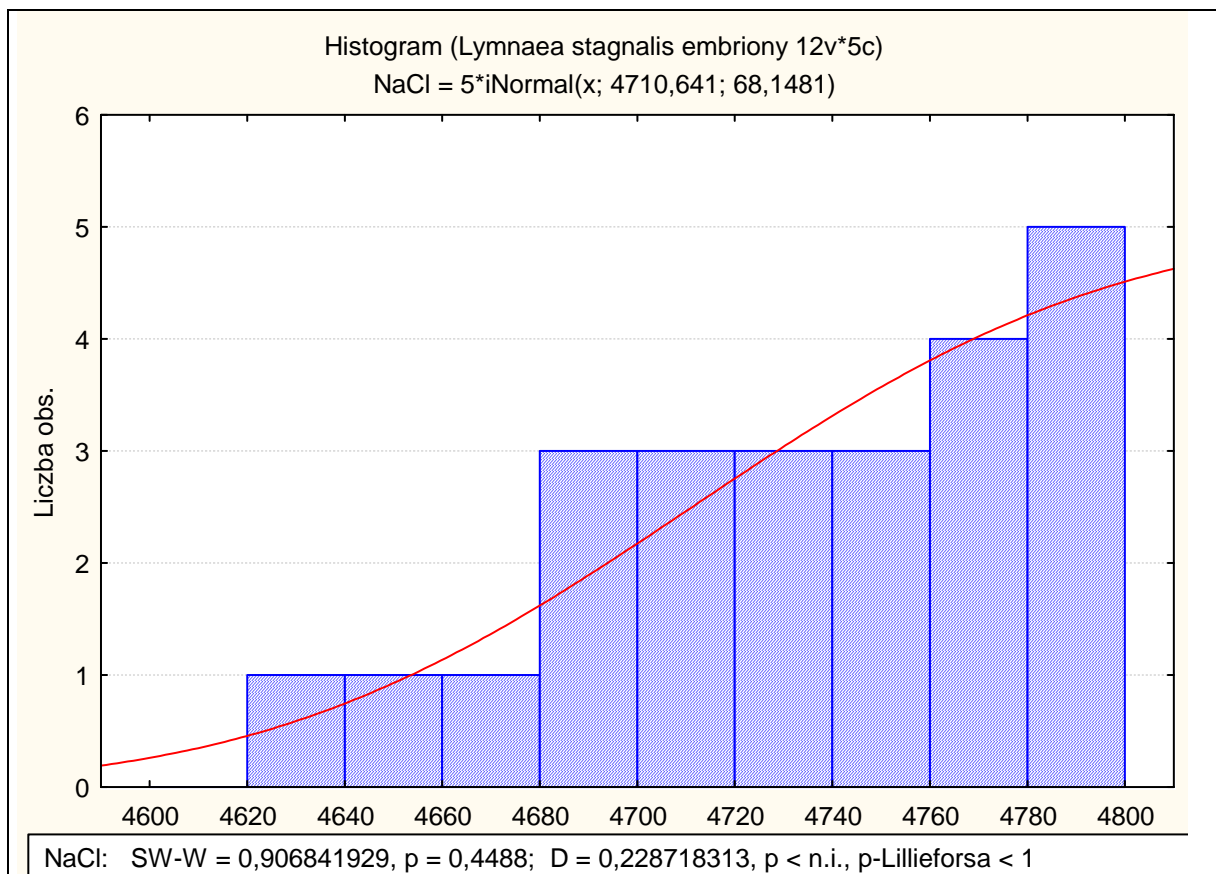


Fig. 204. Skumulowany histogram dla wartości LC50/24 dla *Lymnaea stagnalis* Emb. dla NaCl, z wynikami testu Shapiro – Wilka oraz Kołmogorowa – Smirnowa.

KCl

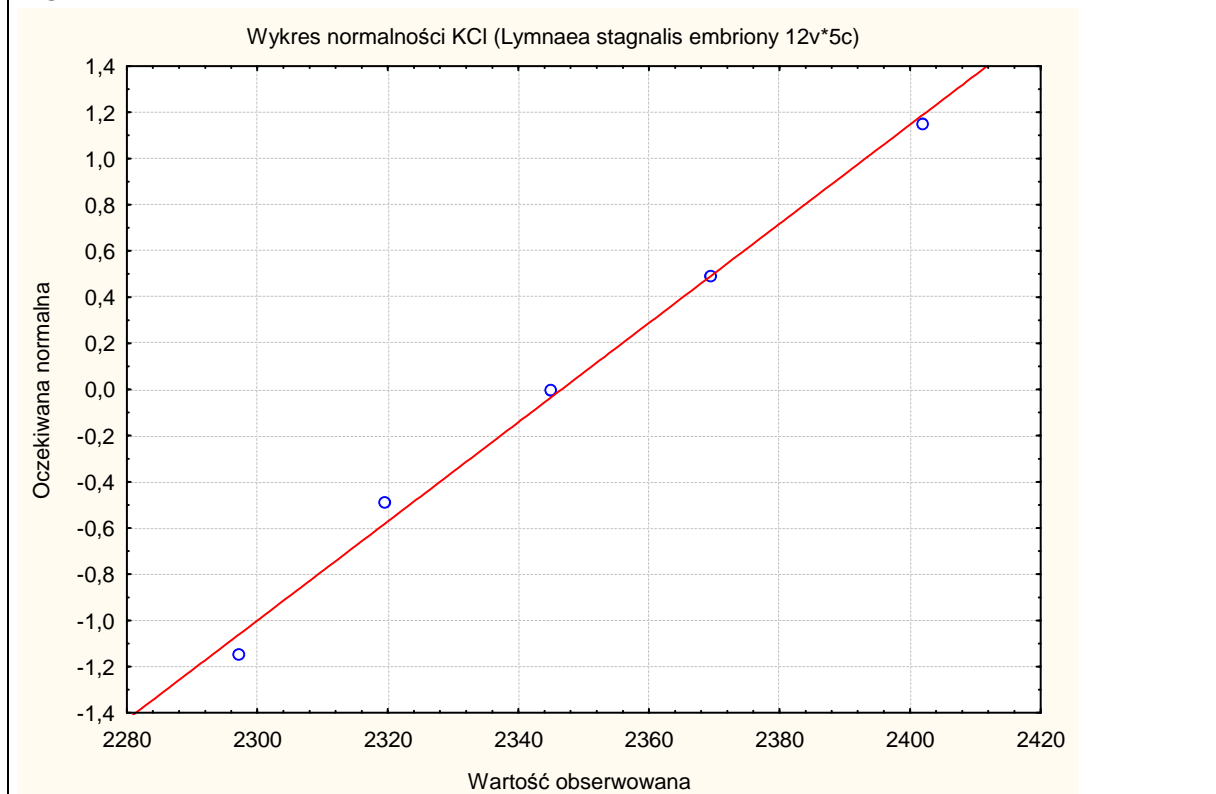


Fig. 205. wykres normalności dla próby KCl (LC50/24 – dla *Lymnaea stagnalis* Emb.).

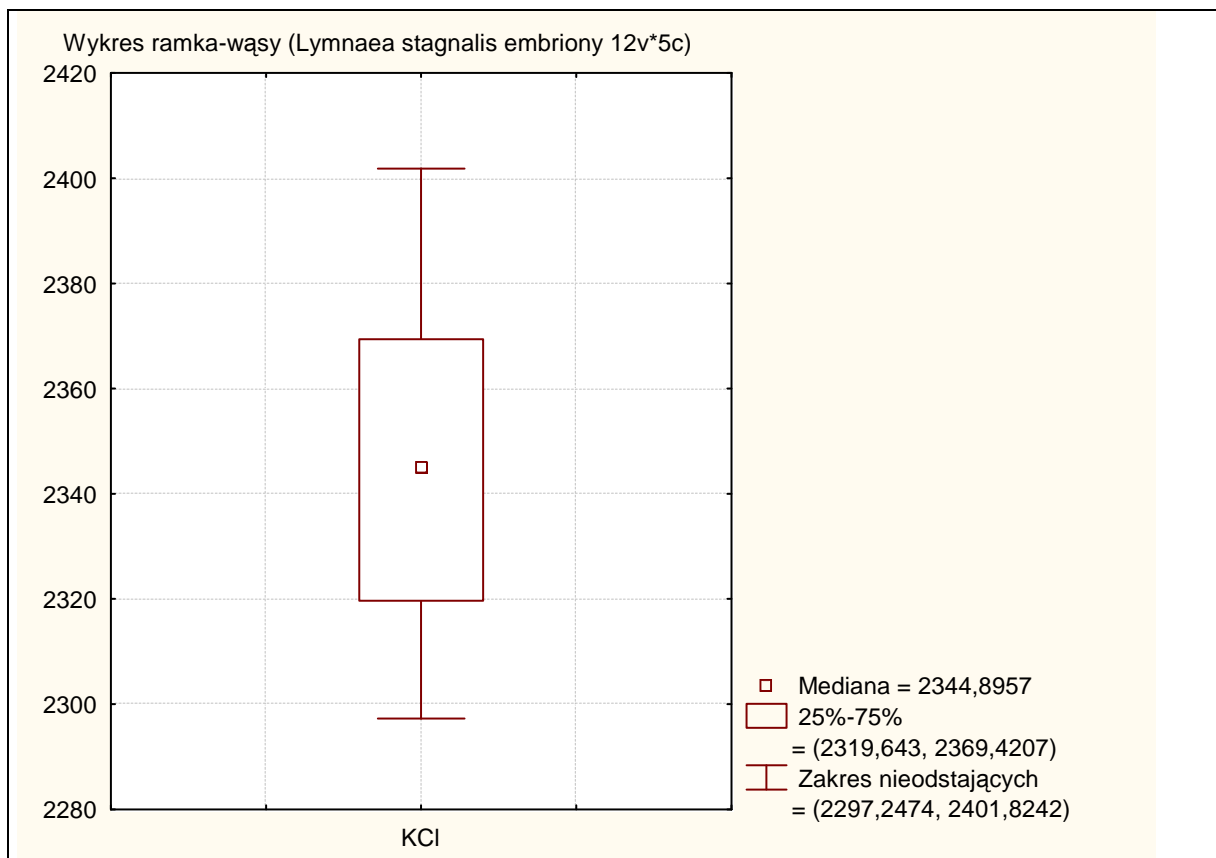


Fig. 206. Wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla KCI (dla *Lymnaea stagnalis* Emb.).

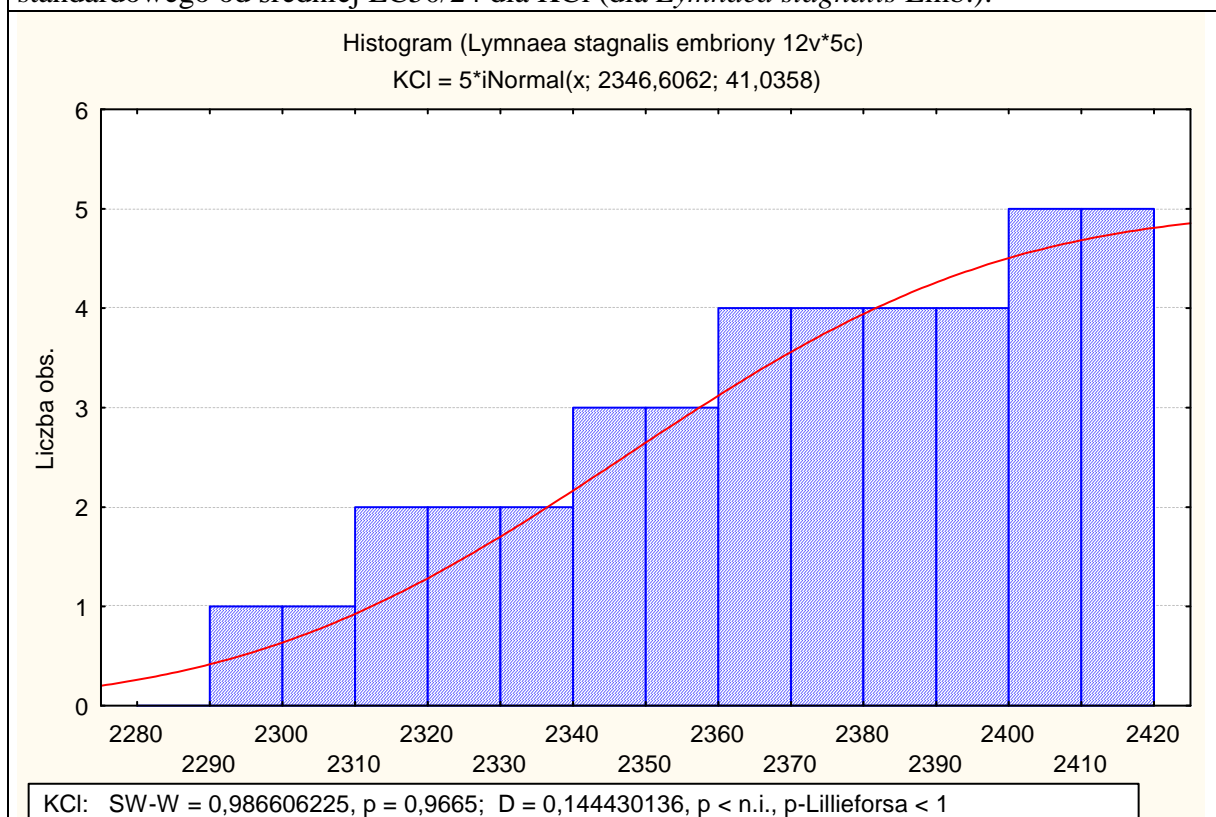


Fig. 207. Skumulowany histogram dla wartości LC50/24 dla *Lymnaea stagnalis* Emb.dla KCI, z wynikami testu Shapiro – Wilka oraz Kołmogorowa – Smirnowa.

MgCl<sub>2</sub>

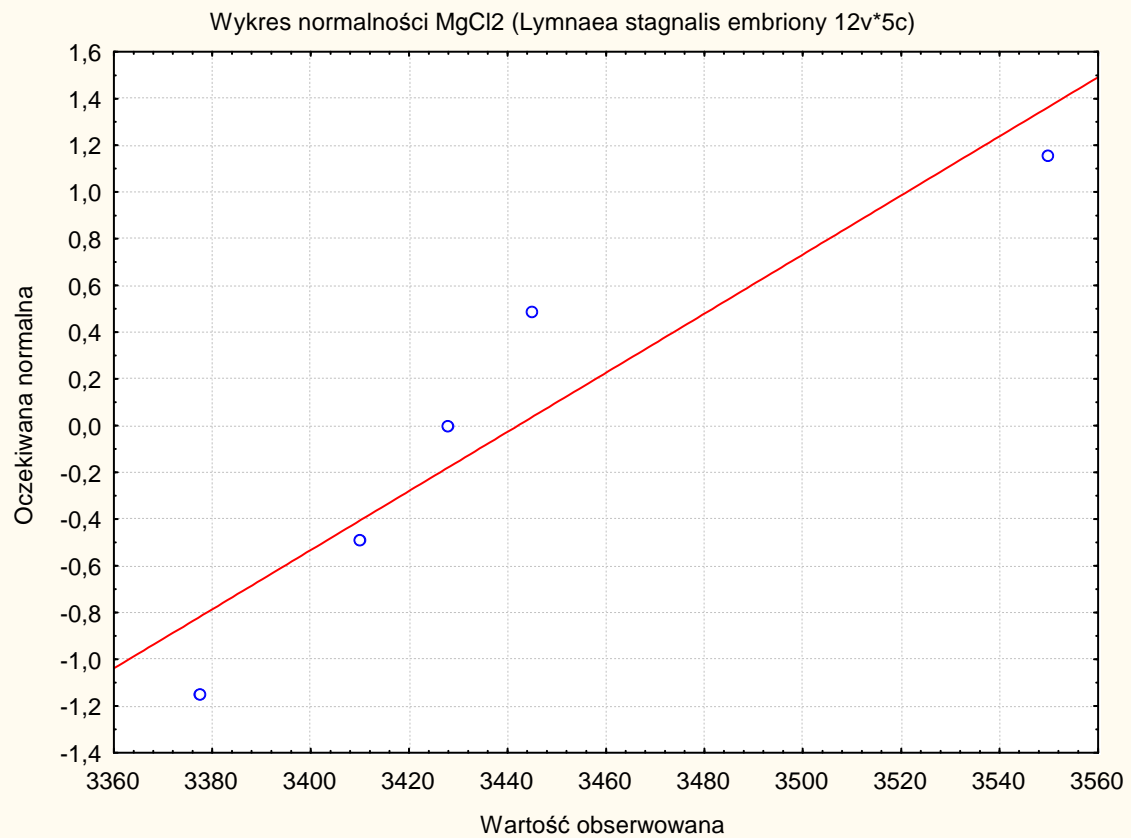


Fig. 208. wykres normalności dla próby MgCl<sub>2</sub> (LC50/24 – dla *Lymnaea stagnalis* Emb.).

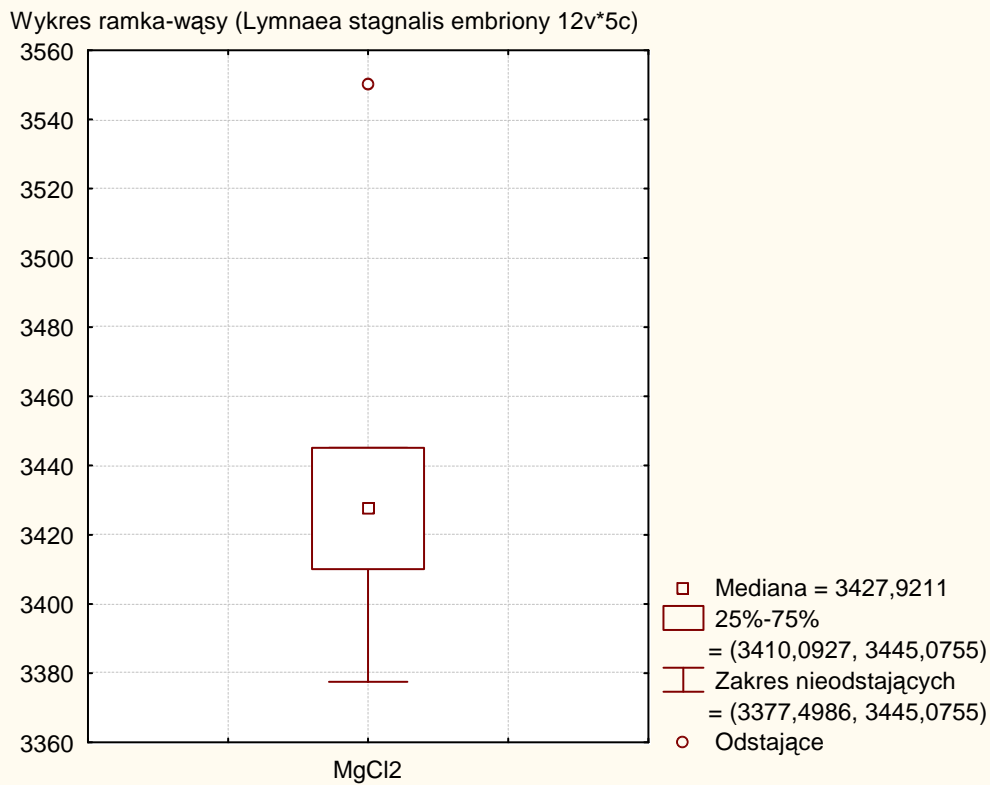
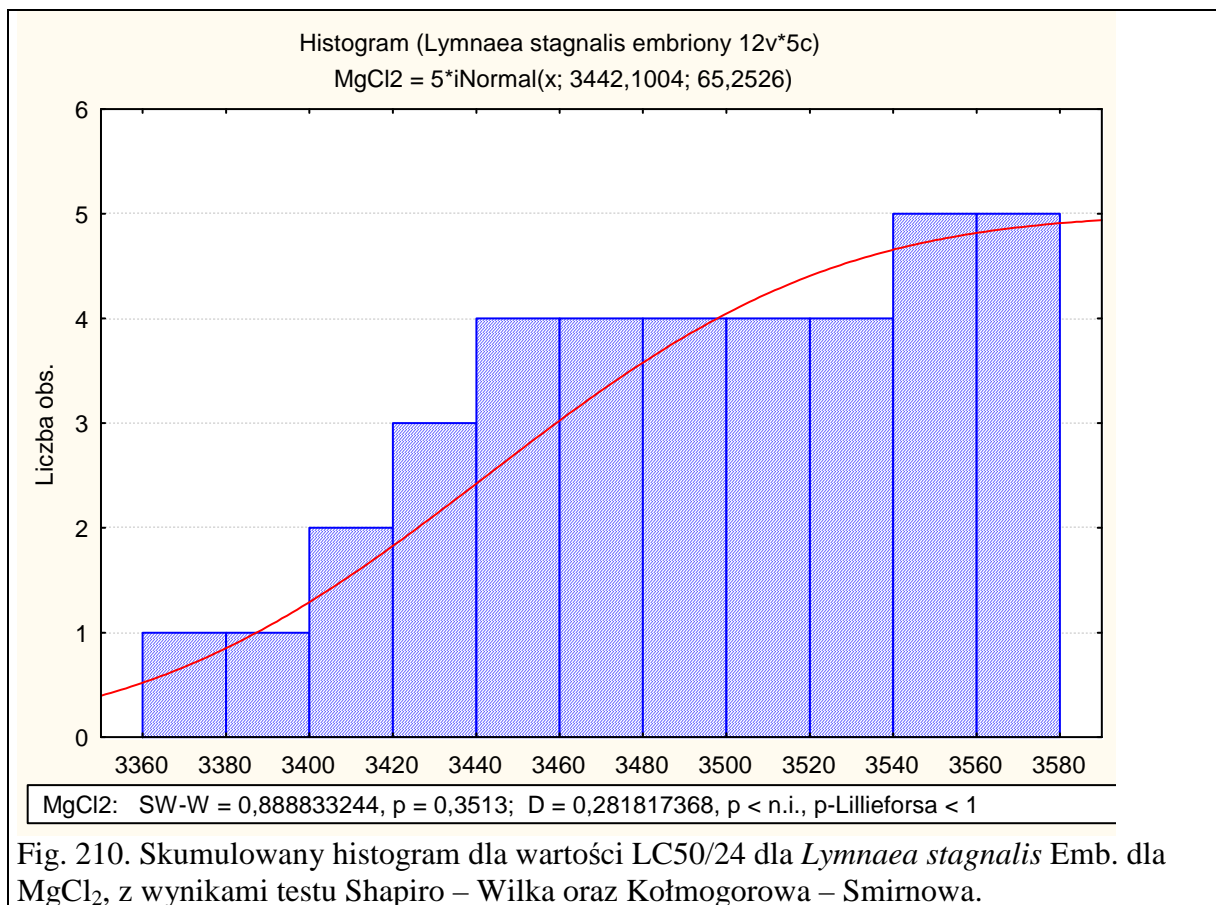


Fig. 209. Wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla MgCl<sub>2</sub> (dla *Lymnaea stagnalis* Emb.).





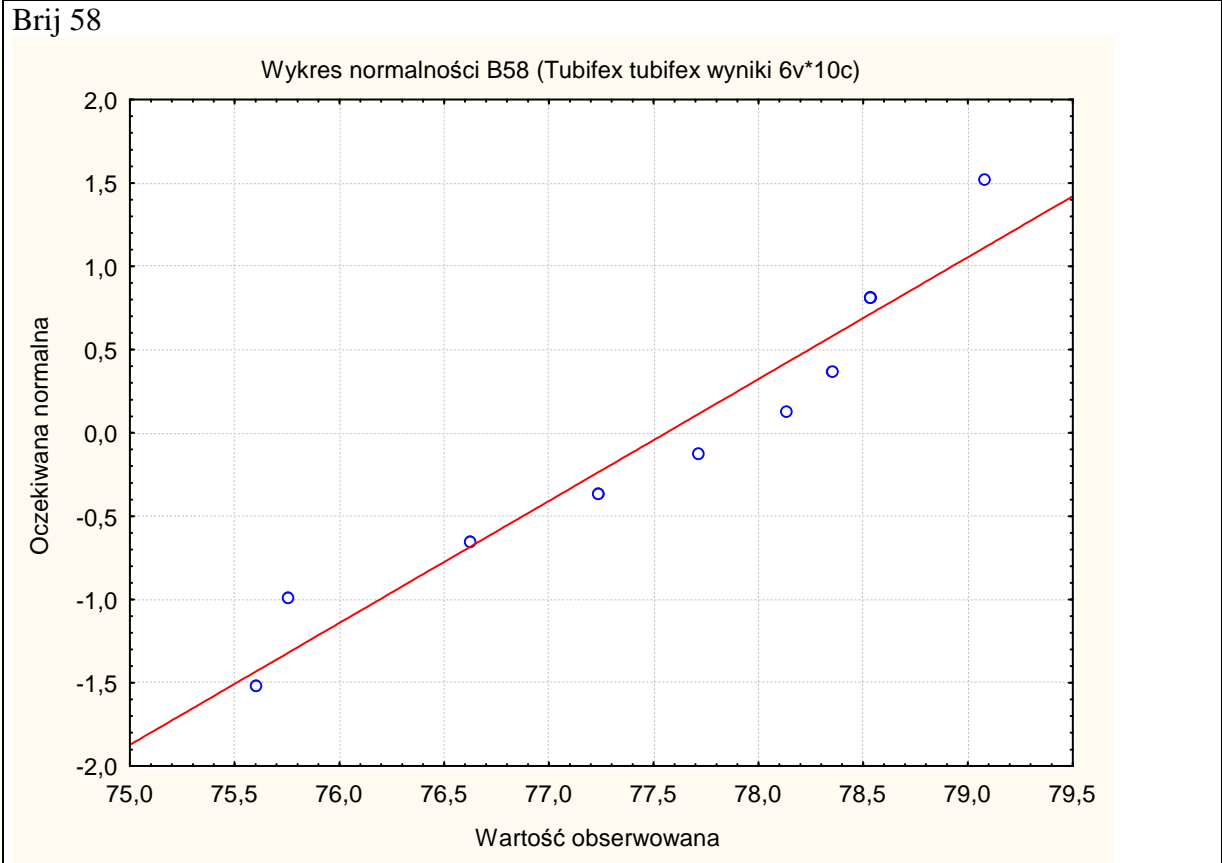


Fig. 244. wykres normalności dla próby Brij 58 (LC50/24 – dla *Tubifex tubifex*).

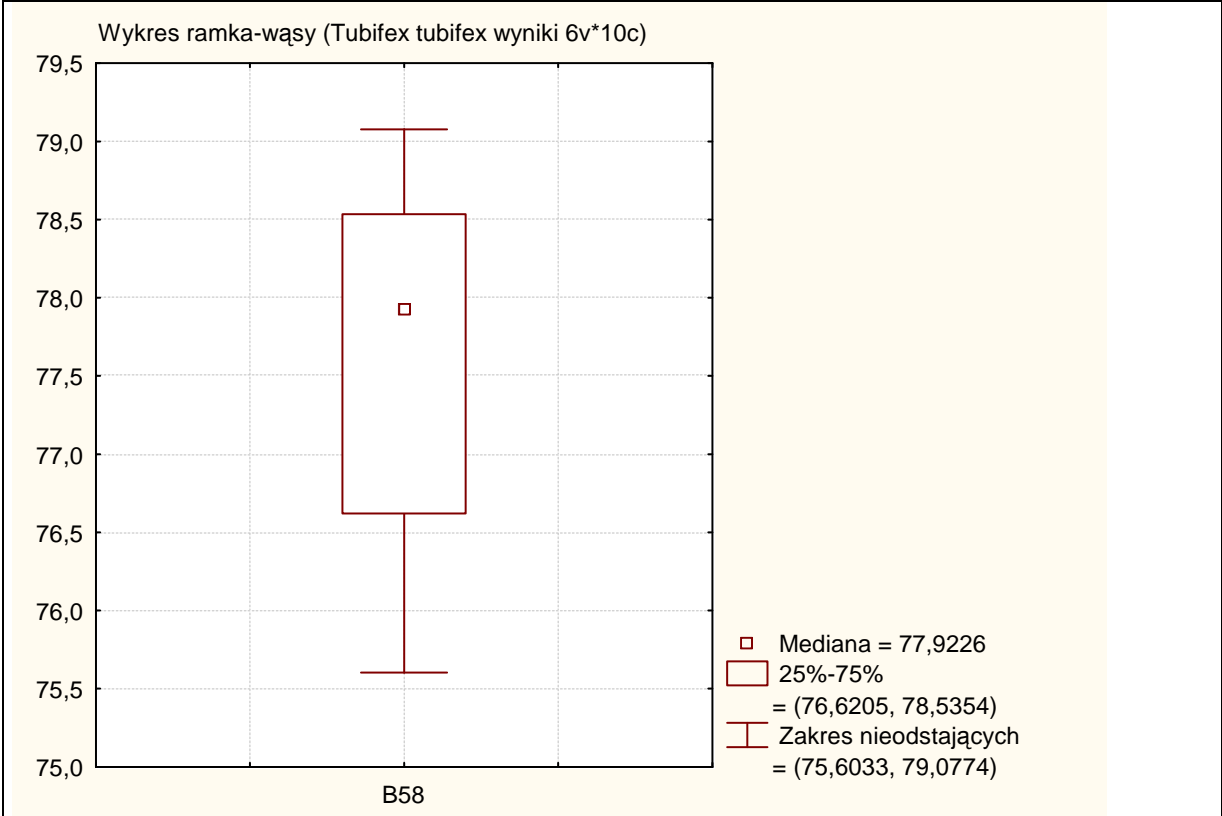


Fig. 245. Wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla Brij 58 (dla *Tubifex tubifex*).

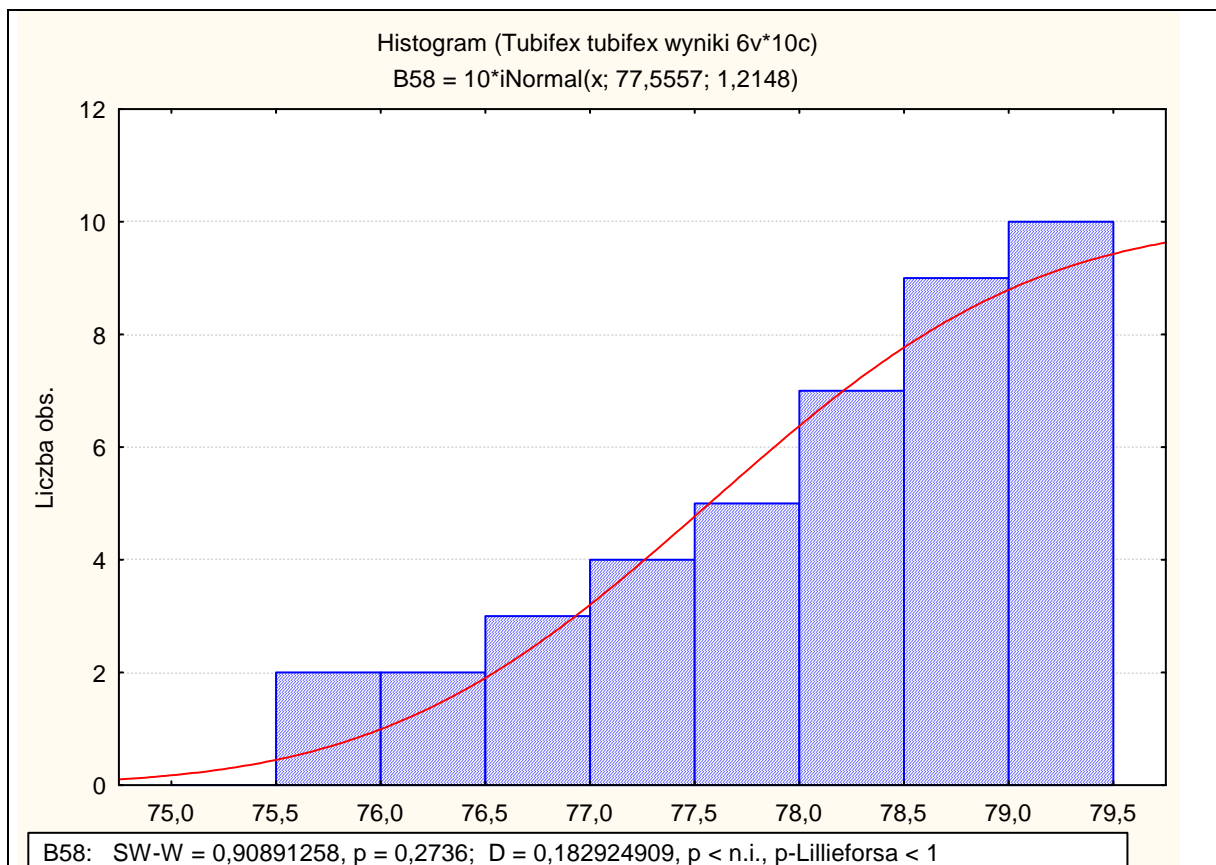


Fig. 246. Skumulowany histogram dla wartości LC50/24 dla *Tubifex tubifex* dla Brij 58, z wynikami testu Shapiro – Wilka oraz Kołmogorowa – Smirnowa z poprawką Lillieforsa.

Brij 72

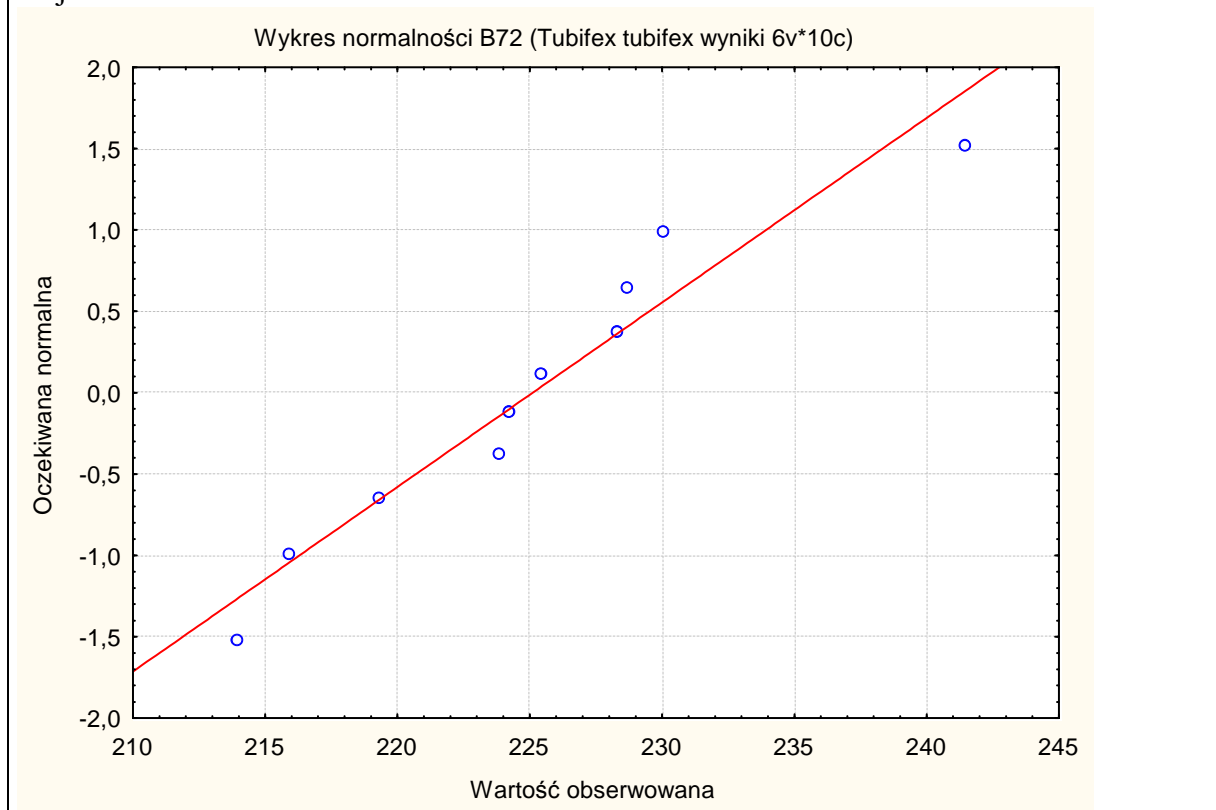


Fig. 247. wykres normalności dla próby Brij 72 (LC50/24 – dla *Tubifex tubifex*).

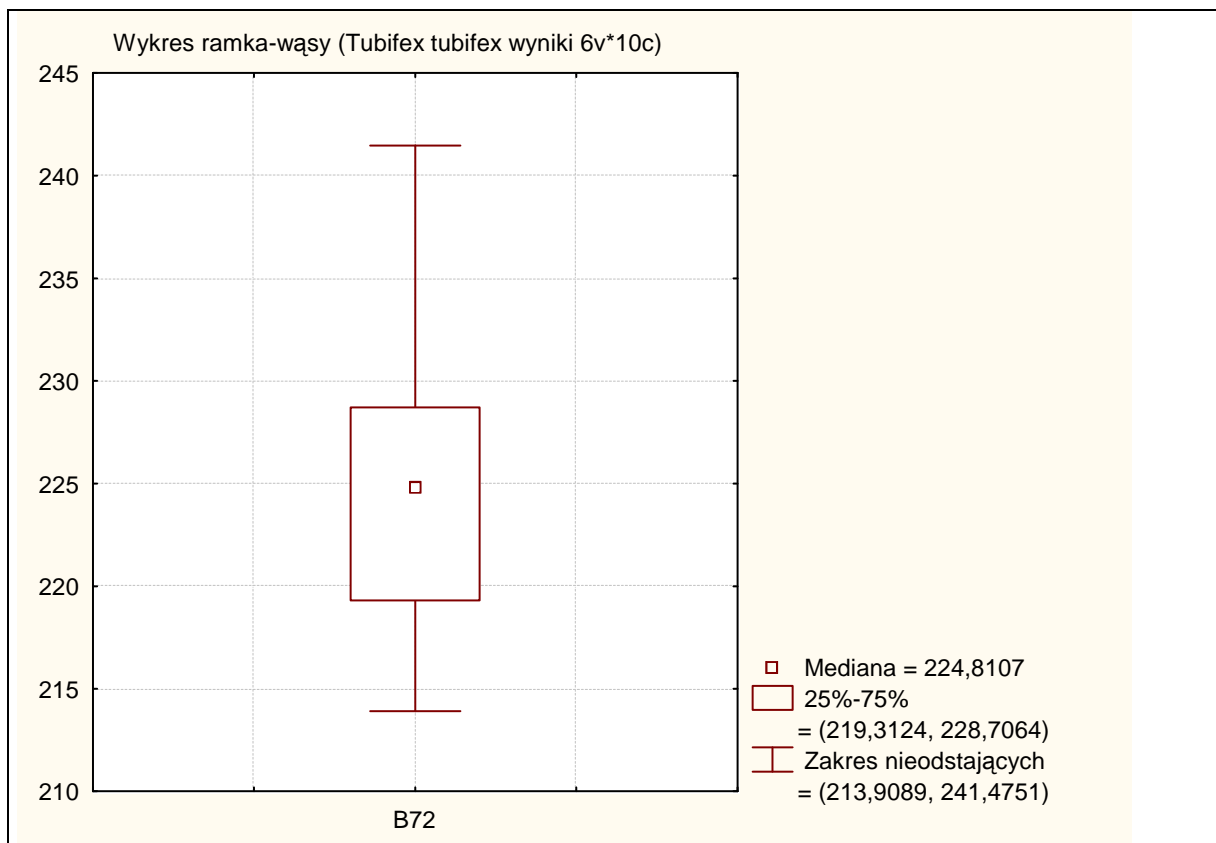


Fig. 248. Wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla Brij 72 (dla *Tubifex tubifex*).

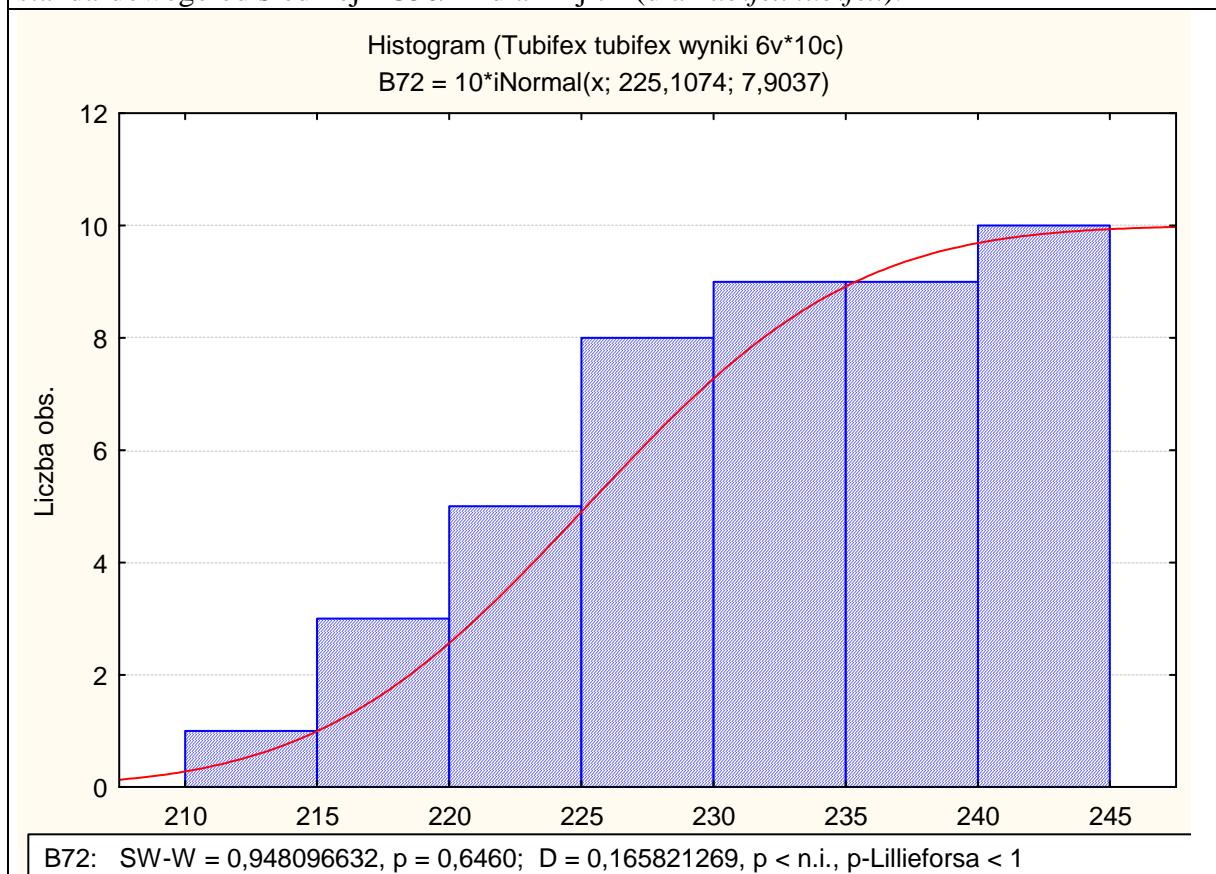


Fig. 249. Skumulowany histogram dla wartości LC50/24 dla *Tubifex tubifex* dla Brij 72, z wynikami testu Shapiro – Wilka oraz Kołmogorowa – Smirnowa z poprawką Lilieforsa.

### Brij 76

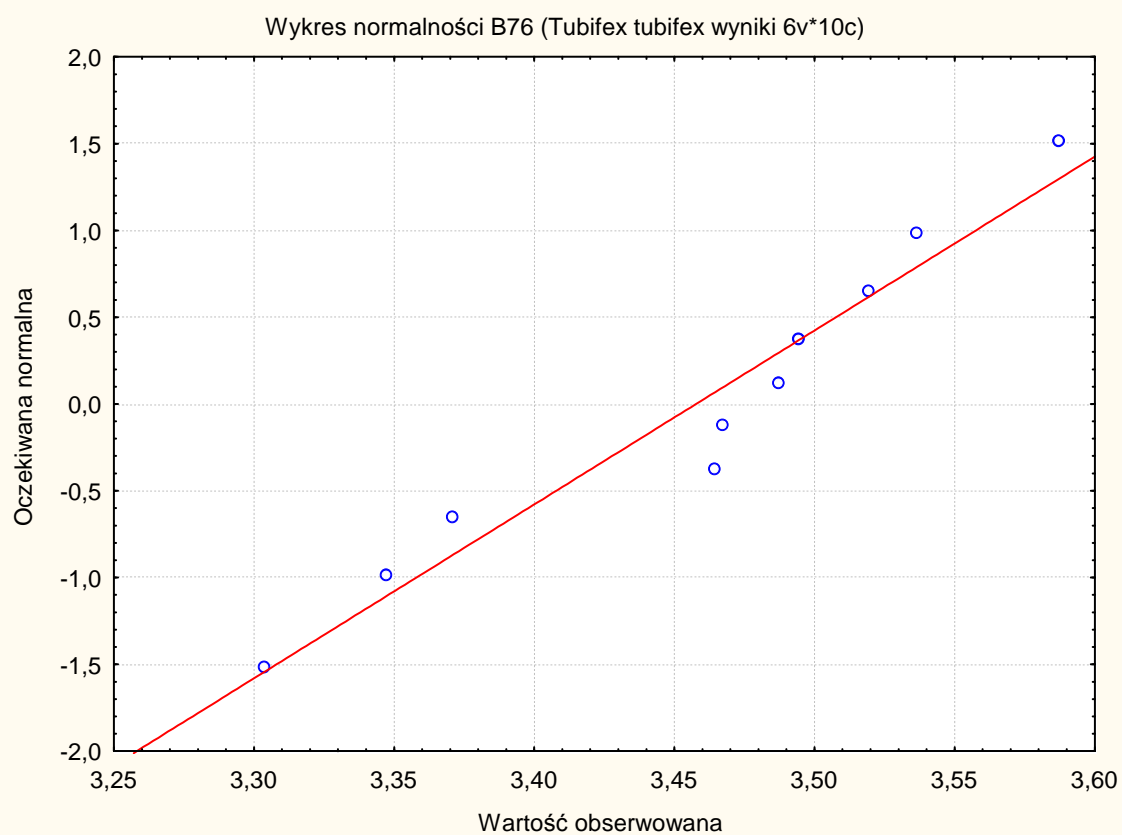


Fig. 250. wykres normalności dla próby Brij 76 (LC50/24 – dla *Tubifex tubifex*).

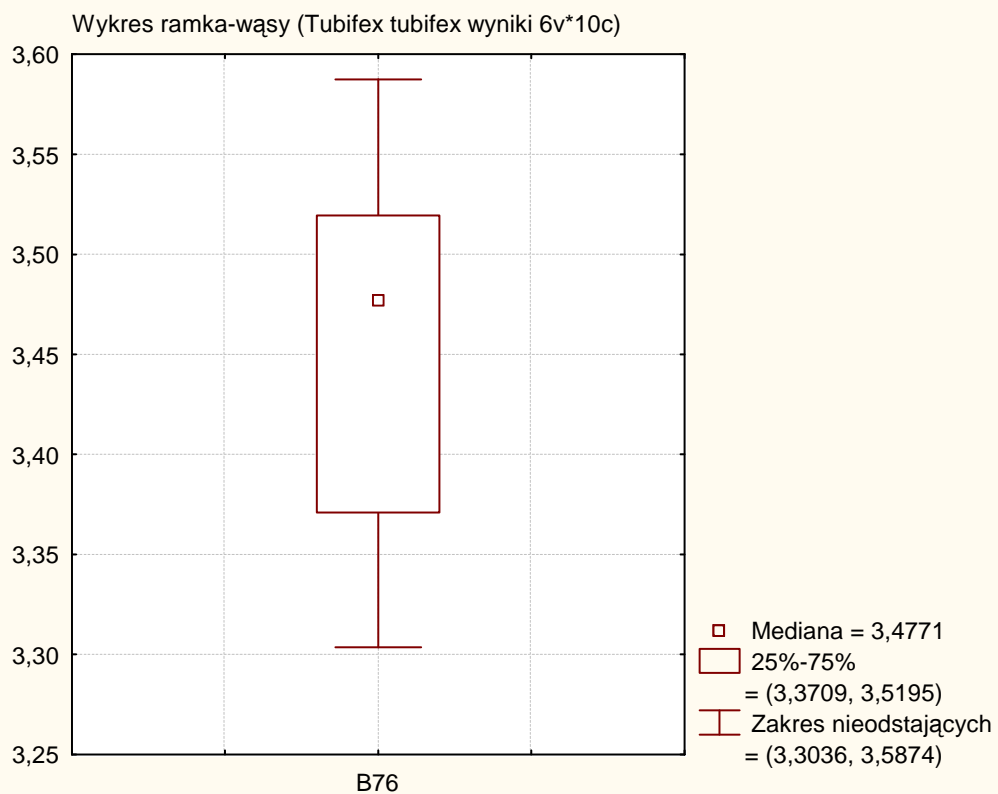


Fig. 251. Wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla Brij 76 (dla *Tubifex tubifex*).

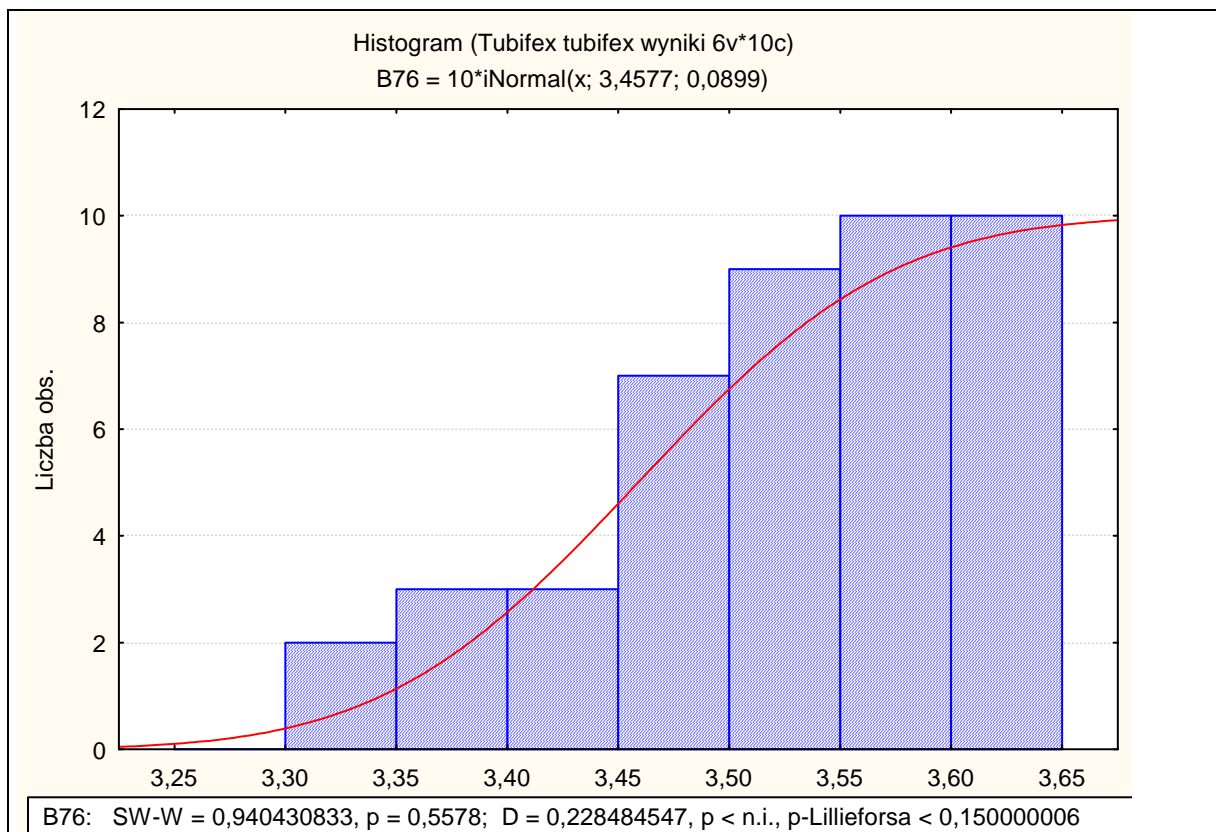


Fig. 252. Skumulowany histogram dla wartości LC50/24 dla *Tubifex tubifex* dla Brij 76, z wynikami testu Shapiro – Wilka oraz Kołmogorowa – Smirnowa z poprawką Lillieforsa.

Brij 78

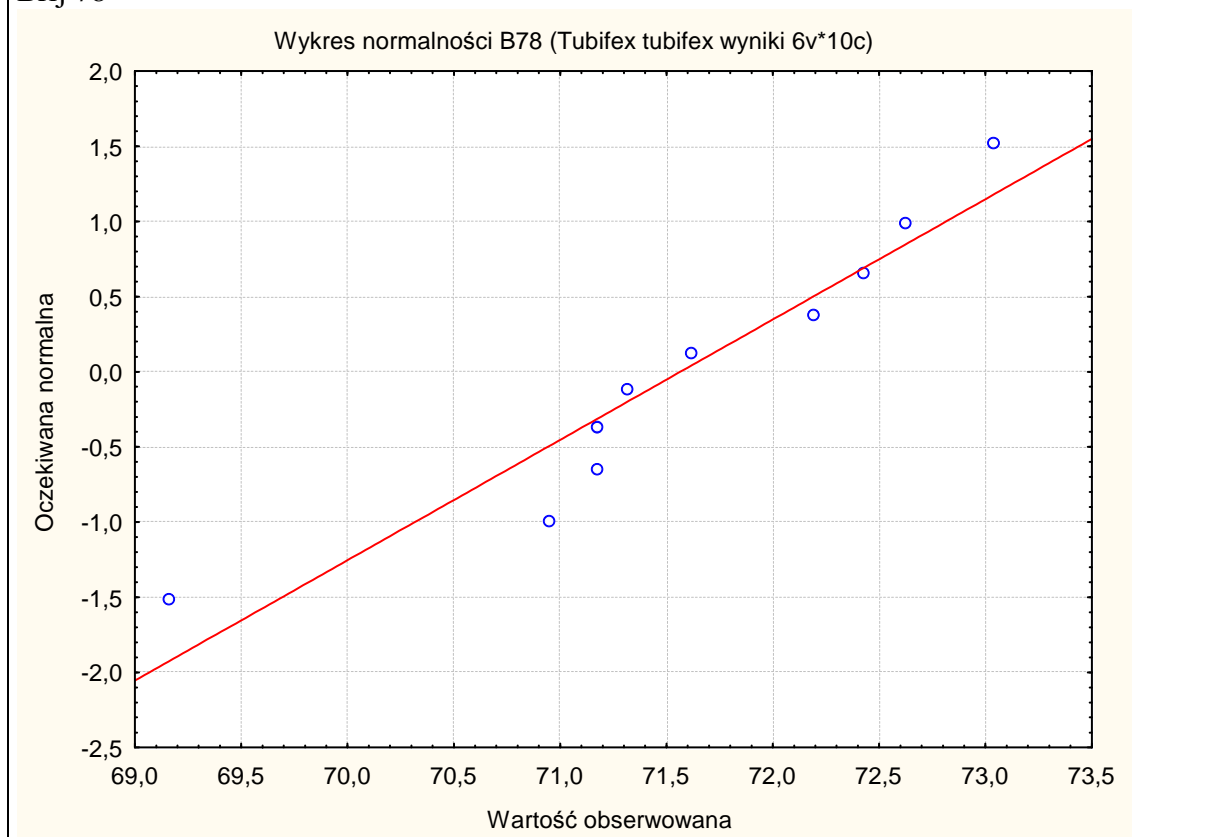


Fig. 253. wykres normalności dla próby Brij 78 (LC50/24 – dla *Tubifex tubifex*).

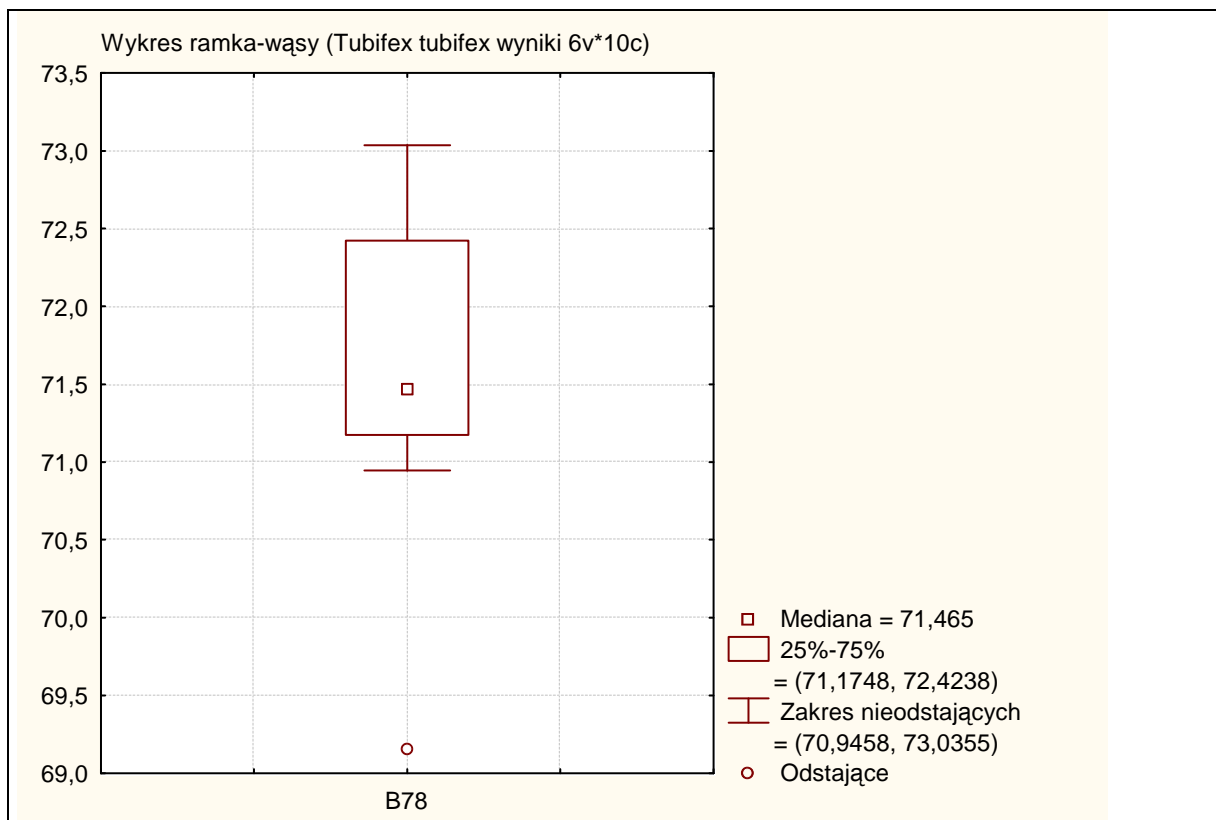


Fig. 254. Wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla Brij 78 (dla *Tubifex tubifex*).

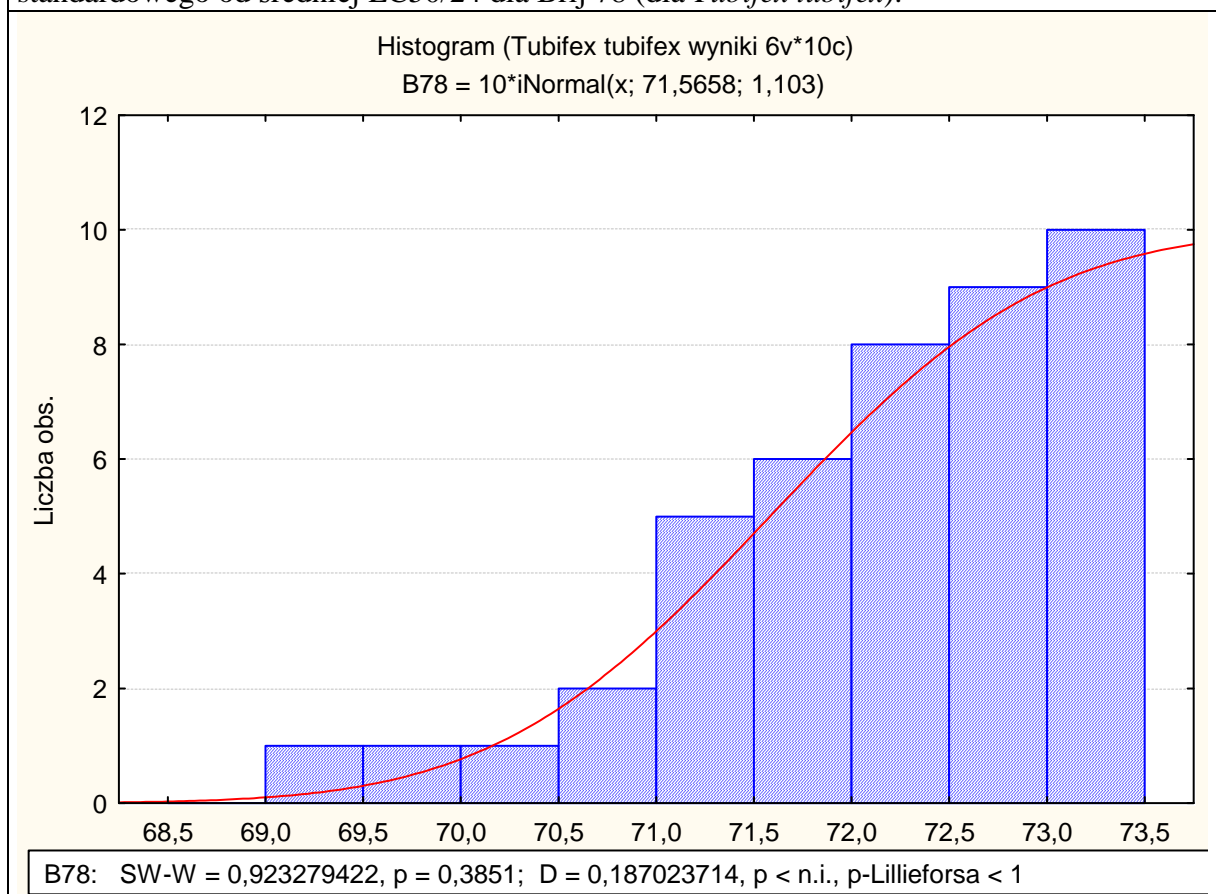


Fig. 255. Skumulowany histogram dla wartości LC50/24 dla *Tubifex tubifex* dla Brij 78, z wynikami testu Shapiro – Wilka oraz Kołmogorowa – Smirnowa z poprawką Lilieforsa.

### Ludwik

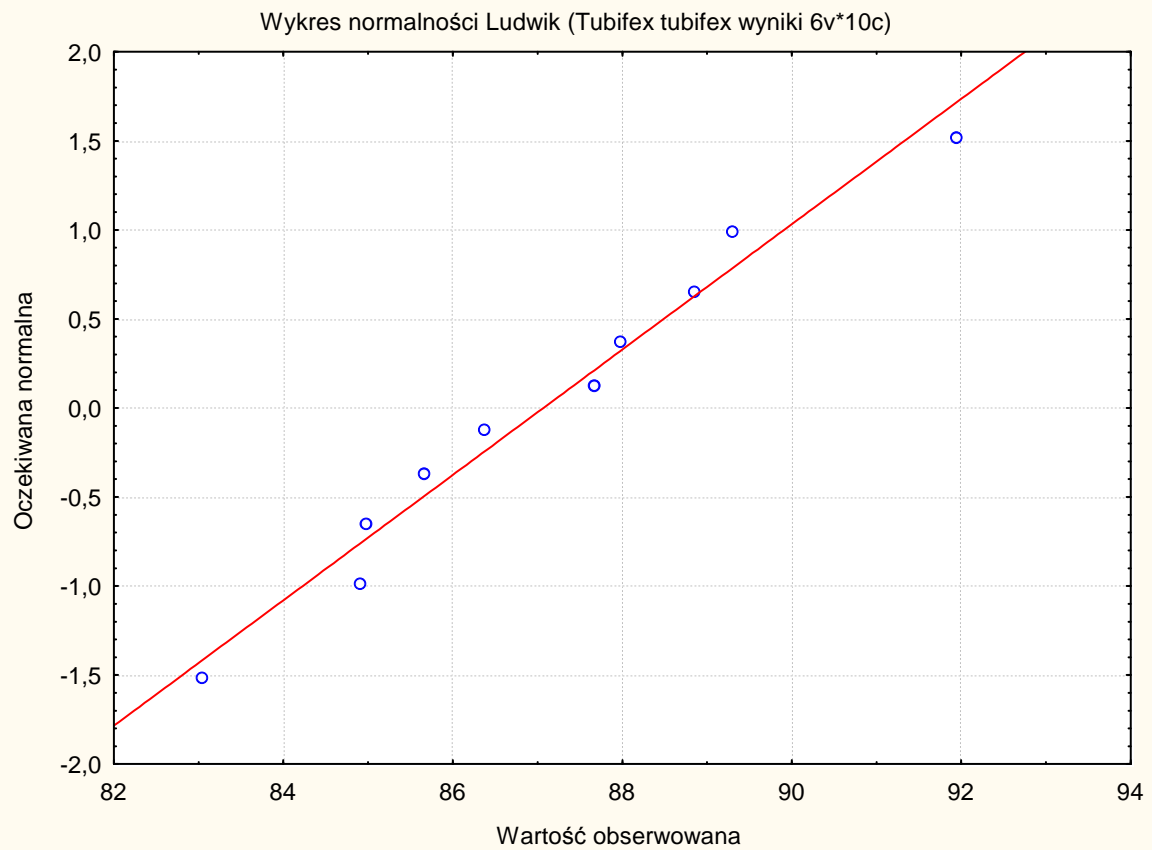


Fig. 256. wykres normalności dla próby Ludwik (LC50/24 – dla *Tubifex tubifex*).

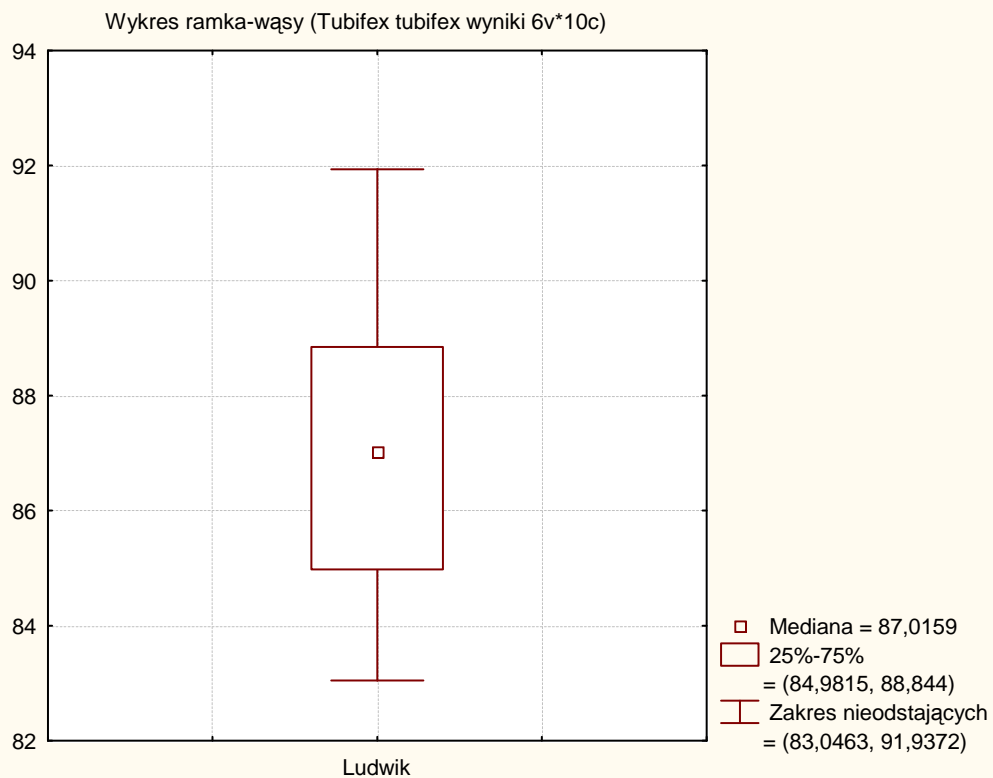
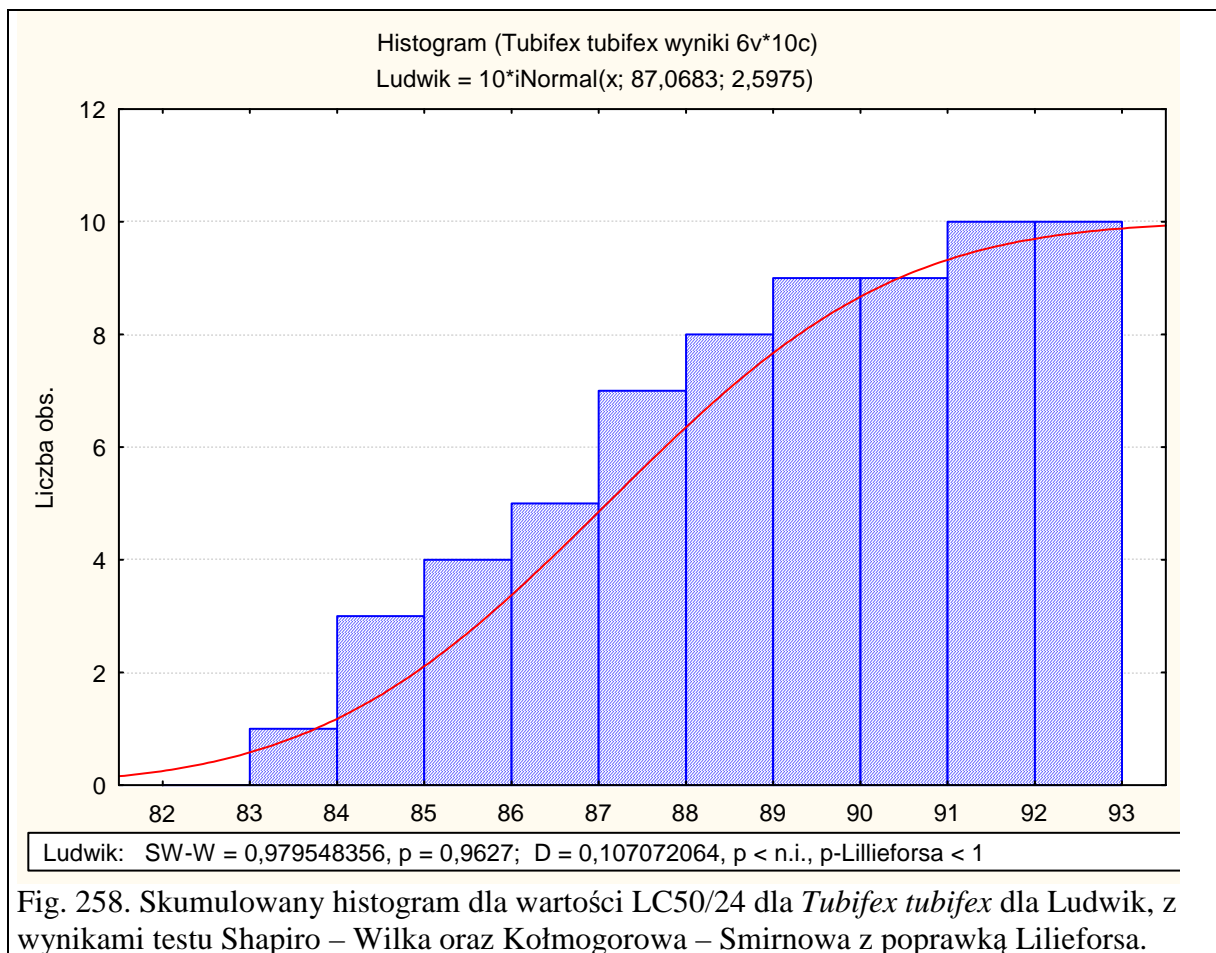


Fig. 257. Wykres ramka wąsy – wyznaczenie wartości średniej oraz odchylenia standardowego od średniej LC50/24 dla Ludwik (dla *Tubifex tubifex*).





**Test Levene'a**

- mocny test;
- dla każdej zmiennej zależnej przeprowadzana jest ANOVA na podstawie bezwzględnych odchyłeń wartości od średnich grupowych;
- jeżeli test Levene'a okaże się istotny to  $H_0$  o jednorodności wariancji w grupach należy odrzucić.

ale F jest mocną statystyką gdy:

- liczebności w grupach są  $>10$  (i w przypadku równych n);
- średnie w grupach nie są skorelowane z odchyleniami standardowymi w tych grupach;

**Test post-hoc (po fakcie) – Tukeya**

metoda polegająca na sprawdzeniu, czy zachodzi nierówność:

$$|\bar{x}_i - \bar{x}_j| \leq K \sqrt{\text{SK reszt} \left\{ \frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j} \right\}}$$

gdzie:

$K$  – to odpowiednia wartość związana ze statystyką wykorzystywaną w danej metodzie (np. rozkład  $F$  dla testu Scheffégo)

$n_i, n_j$  to odpowiednie liczebności i-tej i j-tej grupy

SK reszt jest średnim kwadratem błędu występującego w analizie wariancji

$\bar{x}_i$  oraz  $\bar{x}_j$  to porównywane średnie i-tej i j-tej grupy.

Nierówność ta umożliwia utworzenie przedziału ufności

$$(\bar{x}_i - \bar{x}_j) - K \sqrt{\dots}, (\bar{x}_i - \bar{x}_j) + K \sqrt{\dots} \quad \text{dla różnicy } \bar{x}_i - \bar{x}_j$$

Jeżeli tak skonstruowany przedział obejmuje wartość 0, to średnie  $\bar{x}_i, \bar{x}_j$  nie różnią się istotnie.

występuje w dwóch wariantach: dla równej liczebności próbek i dla nierównej liczebności

(test Spjotvolla i Stoline'a). Test Tukeya jest również oparty na "studentyzowanym"

rozkładzie. Metoda Tukeya jest bardziej konserwatywna niż test NIR, ale mniej niż test

Scheffégo. Oznacza to, że używając go, rzadziej będziemy odrzucać pojedyncze porównania niż w metodzie NIR. Test ten jest najbardziej polecany do porównań par średnich. Za jego pomocą możemy tworzyć grupy jednorodne. Błąd pierwszego rodzaju jest tutaj mniejszy niż przy innych testach (NIR, Duncana, Newmana i Keulsa). Ważne jest też to, że w teście Scheffégo mamy zagwarantowany łączny poziom istotności dla wszystkich testowanych par.

## Załącznik 11.

### Test Kruskala-Wallisa (Test K-W) Jednoczesne porównanie wielu średnich.

Test Kruskala-Wallisa jest nieparametrycznym odpowiednikiem jednoczynnikowej analizy wariancji. Za pomocą tego testu sprawdzamy czy  $n$  niezależnych próbek pochodzi z tej samej populacji, czy z populacji z taką samą medianą. Poszczególne próbki nie muszą mieć takiej samej liczebności. Maksymalnie możemy porównywać 10 grup.

Założenia:  $n_1, n_2, n_3 \rightarrow \infty$ ,  $k=3$

- wystarczają  $n_i > 10$

Wówczas statystyka;

$$\chi^2 = \frac{12}{n(n+1)} \sum_{i=1}^3 \frac{R_i^2}{n_i} - 3(n+1)$$

- ma asymptotyczny rozkład o  $(k-1)$  stopniach swobody.

Założenia:

$$k > 3$$

Wówczas statystyka;

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k \frac{12 \left[ R_i - \frac{n_i(n+1)}{2} \right]^2}{n_i(n-n_i)(n+1)}$$

- ma asymptotyczny rozkład o  $(k-1)$  stopniach swobody
- Porządkujemy rosnąco wartości prób.
- Zaczynając od wartości najmniejszej (lub największej), przyporządkowujemy poszczególnym obserwacjom kolejne liczby naturalne.
- W przypadku wystąpienia wartości jednakowych przyporządkowujemy im tzw. rangi wiązane (średnia arytmetyczna z rang, jakie powinno się im przypisać).

Przykład zastosowania: (Statistica – Moduł Statystyki nieparametryczne: Test Kruskala – Wallisa).

ANOVA rang Kruskala-Wallisa; LC50 (Porównanie stadium embrionalnego i hatchingu). Zmienna niezależna (grupująca): Porównanie stopnia toksyczności między testowanymi substancjami chemicznymi

Test Kruskala-Wallisa:  $H(11, N=156) = 140,8476$   $p = 0,000$

Zależna: LC50	Kod	N	Suma
<b>B35</b>	102	13	615,000
<b>B58</b>	103	13	876,000
<b>B72</b>	104	13	923,000
<b>B76</b>	105	13	91,000
<b>B78</b>	106	13	571,000
<b>Ludwik</b>	111	13	908,000
<b>H2SO4</b>	112	13	1255,000
<b>HNO3</b>	113	13	1378,000
<b>Amoniak</b>	114	13	286,000
<b>NaCl</b>	115	13	1806,000
<b>KCl</b>	116	13	1820,000
<b>MgCl2</b>	117	13	1717,000

Tab: Test Kruskala – Wallisa (Statistica).

Wynik testu pozwala na odrzucenie hipotezy o braku różnic między badanymi związkami. Teraz podobnie jak w przypadku analizy wariancji dla statystyk parametrycznych należy wykonać test post hoc dla określenia istotności różnic między poszczególnymi parami. W bazie Statistica jest makro zawierające: Test post hoc for Kruskal – Wallis. Przed uruchomieniem makra należy wynikowe okno ANOVA rang Kruskala-Wallisa, przenieść do osobnego niezależnego okienka, na bazie którego wczytane makro będzie pracowało. Wyniki testu post hoc podobnie jak w przypadku Testu Tukeya – dokonują porównania istotności różnic między średnimi wartościami dla poszczególnych par. Wyniki dla testu post hoc (Tab.) w pięciu przypadkach wykazują brak istotnych różnic w dla pozostałych różnice między średnimi są znaczne.

	B35	B58	B72	B76	B78	Ludwik	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	HNO <sub>3</sub>	Amoniak	NaCl	KCl	MgCl <sub>2</sub>
B35	---	20,07 69231	23,69 23077	40,30 76923	3,384 61538	22,53 84615	49,23 07692	58,69 23077	25,30 76923	91,61 53846	92,69 23077	84,76 92308
B58	20,07 69231	---	3,615 38462	60,38 46154	23,46 15385	2,461 53846	29,15 38462	38,61 53846	45,38 46154	71,53 84615	72,61 53846	64,69 23077
B72	23,69 23077	3,615 38462	---	64	27,07 69231	1,153 84615	25,53 84615	35	49	67,92 30769	69	61,07 69231
B76	40,30 76923	60,38 46154	64	---	36,92 30769	62,84 61538	89,53 84615	99	15	131,9 23077	133	125,0 76923
B78	3,384 61538	23,46 15385	27,07 69231	36,92 30769	---	25,92 30769	52,61 53846	62,07 69231	21,92 30769	95	96,07 69231	88,15 38462
Ludwik	22,53 84615	2,461 53846	1,153 84615	62,84 61538	25,92 30769	---	26,69 23077	36,15 38462	47,84 61538	69,07 69231	70,15 38462	62,23 07692
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	49,23 07692	29,15 38462	25,53 84615	89,53 84615	52,61 53846	26,69 23077	---	9,461 53846	74,53 84615	42,38 46154	43,46 15385	35,53 84615
HNO <sub>3</sub>	58,69 23077	38,61 53846	35	99	62,07 69231	36,15 38462	9,461 53846	---	84	32,92 30769	34	26,07 69231
Amoniak	25,30 76923	45,38 46154	49	15	21,92 30769	47,84 61538	74,53 84615	84	---	116,9 23077	118	110,0 76923
NaCl	91,61 53846	71,53 84615	67,92 30769	131,9 23077	95	69,07 69231	42,38 46154	32,92 30769	116,9 23077	---	1,076 92308	6,846 15385
KCl	92,69 23077	72,61 53846	69	133	96,07 69231	70,15 38462	43,46 15385	34	118	1,076 92308	---	7,923 07692
MgCl <sub>2</sub>	84,76 92308	64,69 23077	61,07 69231	125,0 76923	88,15 38462	62,23 07692	35,53 84615	26,07 69231	110,0 76923	6,846 15385	7,923 07692	---

Tab. Absolute Differences between Mean Rank Approx. significant if highlighted at 0,05 significance level.