

TESTY TOKSYCZNOŚCI OSTREJ WYKORZYSTUJĄCE
BIOLUMINESCENCJĘ BAKTERII W OCENIE EFEKTÓW SKAŻENIA
I REMEDIACJI ŚRODOWISKA

BEATA CWALIŃ, ANNA WIĄCEK-ROSIŃSKA

Politechnika Krakowska, Wydział Inżynierii Środowiska, Instytut Zaopatrzenia w Wodę i Ochrony Środowiska,
Zakład Podstaw i Systemów Ochrony Środowiska, 31-155 Kraków, Warszawska 24

Keywords: toxicity, biotest, bioluminescence, bacteria, environment, contamination, remediation.

ACUTE TOXICITY TESTS BASED ON BACTERIAL BIOLUMINESCENCE IN
EVALUATION OF ENVIRONMENT CONTAMINATION AND REMEDIATION EFFECTS

Principles of bioluminescence have been described as well as some examples of the biotests that utilize natural bacterial luminescence for assessment of the effects of environment contamination and remediation have been reviewed. The achievements of the last eight years and a new outlook on using rapid biotests for waters, wastewaters, sediments and soils toxicity investigations have been taken into account.

Streszczenie

Przedstawiono podstawy bioluminescencji oraz przykłady stosowania biotestów wykorzystujących naturalną luminescencję bakterii do oceny efektów skażenia i remediacji środowiska. Uwzględniono osiągnięcia ostatnich ośmiu lat i nowe spojrzenie na stosowanie szybkich biotestów w badaniach toksyczności wód, ścieków, osadów i gleb.

WPROWADZENIE

Organizmy zasiedlające skażone obszary wodne i lądowe są narażone na toksyczne oddziaływanie wielu różnych zanieczyszczeń, najczęściej wprowadzonych do środowiska przyrodniczego w efekcie działalności człowieka. Mnogość i zmienna koncentracja substancji szkodliwych lub nawet trujących utrudnia jednoznaczną ocenę stanu zagrożenia, a także przewidywanie skutków skażenia dla poszczególnych organizmów oraz dobór skutecznych metod neutralizacji i/lub usuwania zanieczyszczeń [21].

Na podstawie analizy chemicznej wód i gleb nie można ocenić ich toksyczności, na którą wpływają zarówno rodzaj i stężenie ksenobiotyków, jak i interakcje występujące między nimi oraz między nimi a produktami funkcjonowania poszczególnych ekosystemów. Istotną rolę odgrywają także aktualne warunki środowiskowe [20].

Mimo, że świadomość złożoności problemu toksyczności poszczególnych elementów środowiska przyrodniczego rośnie, jednak względy ekonomiczne powodują, że przy ocenie stopnia jego skażenia przyjmuje się wiele uproszczeń. Znajduje to odzwierciedlenie w normach

określających wielkości i metody oznaczania zarówno dopuszczalnych stężeń poszczególnych zanieczyszczeń w środowisku, jak i ich toksyczności [20].

Badania toksyczności prowadzone są z użyciem m.in. biologicznych testów toksyczności wykorzystujących organizmy zwierzęce (króliki, myszy, szczury, świnki morskie, ryby, ślimaki, skorupiaki), a także organizmy roślinne i bakteryjne [21, 41]. Oznaczanie toksyczności poszczególnych elementów środowiska na podstawie badania reakcji żywego układu (inaktywacja określonych enzymów, czas snu, częstość występowania nowotworu, zahamowanie wzrostu komórek, śmierć [41]) oraz pomiaru jakościowego i ilościowego tych reakcji nazywane jest bioindykacją [25]. Bioindykatorami mogą być układy żywe na różnym poziomie organizacji – od osobnika, poprzez populację, aż do biocenozy.

Aspekty etyczne oraz względy ekonomiczne i czasowe spowodowały, że testy toksyczności ostrej (śmiertelności) organizmów wyższych są wypierane przez testy oparte na zmianie aktywności metabolicznej mikroorganizmów – bakterii i jednokomórkowych glonów, a także na zmianie aktywności wyodrębnionych enzymów lub układów enzymatycznych [33, 41]. Dają one odpowiedź w czasie od kilku minut do 1 godz., podczas gdy badania z użyciem klasycznych testów toksyczności ostrej wymagają kilku dni, a w przypadku testów rakotwórczości – nawet 30 miesięcy [41].

Do bakteryjnych testów toksyczności należą m.in. metody wykorzystujące efekt zmiany (zmniejszenia) bioluminescencji bakterii wskutek negatywnego oddziaływania ksenobiotyków na ich aktywność metaboliczną. Zestawy spektrofotometrów i odczynników (bakteryjnych i uzupełniających) dostępne są w handlu pod nazwami: Microtox, Mutatox, LUMITOX, LUMISTox, Biotox. Opublikowane prace doświadczalne dotyczą najczęściej badań prowadzonych z użyciem biotestu Microtox. Obszerny przegląd literatury z okresu od 1980 r. do połowy 1994 r., dotyczącej wykorzystania pomiarów bioluminescencji w badaniach środowiskowych, został opublikowany przez Steinberga i wsp. [37].

W niniejszej pracy przedstawiono podstawy bioluminescencji oraz przykłady stosowania biotestów wykorzystujących naturalną luminescencję bakterii do oceny efektów skażenia i remediacji środowiska, opisane w publikacjach z okresu ostatnich ośmiu lat.

BIOLUMINESCENCJA

Pojęciem „bioluminescencja” określa się zdolność emitowania światła przez organizmy żywe, takie jak np. świecący żuk *Lampyrus noctiluca*, świetlik *Photinus pyralis*, bakterie *Photobacterium phosphoreum* oraz *Vibrio fischeri* [35]. Bioluminescencja jest odmianą chemiluminescencji, w której energia chemiczna jest zamieniana na energię świetlną [14]. Proces ten nie jest uwarunkowany absorpcją światła przez organizm. Emisja światła jest w tym przypadku następstwem katalizowanej enzymatycznie reakcji chemicznej (reakcji biochemicznej), w której powstaje produkt w stanie wzbudzonym. Przechodząc do stanu podstawowego, cząsteczka produktu emituje foton. Jego energia zależy od częstotliwości (koloru) światła, która jest charakterystyczna dla wzbudzonej cząsteczki, niezależnie od sposobu jej wzbudzenia.

W zależności od organizmu, substraty uczestniczące w bioluminescencji są różne, jednak przyjęła się dla nich wspólna nazwa „lucyferyna”, a dla enzymu katalizującego omawianą reakcję – „lucyferaza” [35]. Warunkiem wystąpienia bioluminescencji jest obecność tlenu. W przypadku bakterii, lucyferyna może być zredukowanym mononukleotydem flawinowym [19], zredukowanym fosforanem ryboflawinowym [16] lub dwunukleotydem flawinowo-

adeninowym [32]. Pozostałe substraty uczestniczące w tej reakcji, to tlen i długołańcuchowy aldehyd (np. tetradekanal). Reakcja jest katalizowana przez monoooksygenazę (oksygenazę alkanową), która pełni rolę lucyferazy [35].

Luminescencja jest indukowana w komórkach bakterii podczas ich wzrostu. Ekspresja genu luminescencji (bakteryjne geny *lux* [14, 38]) i synteza lucyferazy następują po osiągnięciu odpowiednio dużego stężenia autoinduktora w podłożu, co jest jednoznaczne z dużą gęstością komórek [35, 36]. Z tego względu morskie bakterie świecące nie wykazują zjawiska luminescencji w morzu, natomiast świecą intensywnie w narządach świetlnych ryb, gdzie ich koncentracja wynosi ok. 10^{10} komórek/cm³ [35]. W bakteriach *Vibrio fischeri* i *Vibrio harveyi* geny *luxAB* kodują lucyferazę katalizującą produkcję światła podczas utleniania substratu (*n*-dekanalu), natomiast geny *luxCDE* kodują reduktazę kwasów tłuszczowych, która jest odpowiedzialna za produkcję *n*-dekanalu [30].

Reakcje, których skutkiem jest bioluminescencja, są włączone w komórkowy system transportu elektronów i przez to stanowią istotny element metabolizmu bakterii. Wszelkie czynniki zakłócające ten metabolizm, a także hamujące działanie izolowanych enzymów i układów enzymatycznych, powodują zmniejszenie natężenia bioluminescencji [2, 23, 31, 32, 37]. Efekt ten wykorzystano w różnych technicznych i medycznych biosensorach [24] oraz biotestach stosowanych do badania toksyczności środowiska [21, 37].

TESTY BIOLUMINESCENCYJNE W OCENIE SKAŻENIA WÓD I ŚCIEKÓW

Testy bioluminescencyjne są zalecane w wielu krajach (np. USA, Kanadzie, Francji, Niemczech, Szwecji, Włoszech, Holandii, Hiszpanii, Meksyku), jako szybkie metody badania toksyczności wód i ścieków [16, 37]. Pozytywnie oceniono badania toksyczności wód powierzchniowych, infiltracyjnych, przybrzeżnych przeznaczonych na cele rekreacyjne i sporty wodne, odcieków, dopływów do oczyszczalni ścieków, odpływów i osadów ze stacji uzdatniania wody [7], a także ścieków bytowo-gospodarczych [9] i przemysłowych: petrochemicznych, rafineryjnych, garbarskich, celulozowych oraz farmaceutycznych [12].

Stwierdzono korelację między toksycznością ścieków przemysłowych poddawanych oczyszczaniu biologicznemu, a fizykochemicznymi wskaźnikami (ChZT, BZT, zawiesina) charakteryzującymi te ścieki [22]. W kontakcie z zawartymi w nich substancjami chemicznymi powodującymi inhibicję aktywności metabolicznej organizmów, bakterie *Vibrio fischeri* były bardziej wrażliwe, aniżeli organizmy osadu czynnego [1, 39].

Fernandez i wsp. [7] wykorzystali test LUMISTox (bakterie *Photobacterium phosphoreum*) do oceny wpływu ścieków miejskich i przemysłowych zrzucanych do rzeki Tormes przed, w obrębie i za miastem Salamanca w Hiszpanii. Wody rzeczne wykazywały małą toksyczność, która jednak wzrastała w miejscach zrzutu ścieków. Największą toksyczność stwierdzono w miejscu koncentracji kilku źródeł zanieczyszczeń (cukrownia i zakłady wędliniarskie).

Oanh i Bengtsson [27] badali toksyczność ścieków powstających w wietnamskich zakładach papierniczych, wykorzystując Microtox, glony *Selenastrum capricornutum* oraz rzęsę *Lemna aequinoctialis*. Okazało się, że najbardziej czułym wskaźnikiem toksyczności badanych ścieków były glony, a następnie Microtox. Rzęsa nie była wrażliwa na działanie badanych ścieków.

Przedmiotem badań prowadzonych przez Heida i van der Oost [14] były wody infiltracyjne uzyskane z osadów pochodzących z dziewięciu ujęć wody w Amsterdamie i wokół tego miasta. Autorzy stwierdzili, że spośród wykorzystanych biotestów toksyczności

(Microtox – inhibicja bioluminescencji bakterii *Photobacterium phosphoreum*, Rotoxkit F – pomiar LC_{50} dla wrotek *Brachionus calyciflorus*, Thamnotoxkit F – pomiar LC_{50} dla krewetek *Thamnocephalus platyurus* oraz Toxichromotest – inhibicja tworzenia β -galaktozydazy w *Escherichia coli*), największą czułość wykazały Microtox i Thamnotoxkit F. Podobny zestaw biotestów został zaproponowany w projekcie Rodrigue i wsp. [33] w celu stwierdzenia, które z nich mogłyby zastąpić testy śmiertelności na rybie (pstragu tęczowym *Oncorhynchus mikiss*) oraz skorupiaku (rozwieltce *Daphnia magna*).

Ciekawych informacji dostarczyły badania, które prowadzili Gupta i Karuppiach [10] na wodach rzeki Wicomico dopływającej do zatoki Chesapeake. Wykorzystując trzy biotesty (Microtox, TOXITRAX, *Ceriodaphnia dubia*), badacze stwierdzili, że największą toksyczność wykazywały wody w sąsiedztwie wypływu wód z oczyszczalni ścieków. Toksyczność wód była powodowana głównie przez substancje wrażliwe na zmiany pH (np. związki amonowe) oraz metale ciężkie, a nie przez związki organiczne.

Microtox został z powodzeniem użyty także do ujawnienia efektu zmniejszenia toksyczności ścieków komunalnych w oczyszczalni ścieków (Salisbury), wskutek adsorpcji zanieczyszczeń na powierzchni popiołów lotnych [11]. W wodach odpływających z oczyszczalni stwierdzono istotny spadek zarówno toksyczności, jak i stężeń zanieczyszczeń (Cu, Pb, PO_4^{3-} , NO_3^-).

Wiącek-Rosińska i wsp. [40] badali zależności między zawartością wybranych jonów metali w surowych ściekach bytowo-gospodarczych, a ich toksycznością określaną z użyciem bioluminescencyjnych bakterii *Vibrio fischeri* w bioteście Microtox. Na podstawie analizy współczynników korelacji Pearsona stwierdzono statystycznie istotne korelacje między toksycznością EC_{50} badanych ścieków, a stężeniami zawartych w nich metali. Autorzy sugerują, że o toksyczności ścieków przesądzała zawartość w nich głównie srebra, a w mniejszym stopniu także ołowiu. Jego inhibujący wpływ na aktywność bakterii w bioteście Microtox mógł ulec zmniejszeniu dzięki obecności w ściekach znacznych ilości cynku, podejrzewanego o antagonizm wobec ołowiu [15].

W badaniach Pardosa i wsp. [28], prowadzonych nad toksycznością wód dostępnych w Krakowie i jego okolicach, wykorzystano trzy organizmy testowe: jamochłon *Hydra attenuata*, glony *Selenastrum capricornutum* oraz bakterie *Vibrio fischeri* (Microtox). Stwierdzono, że mogą one być rekomendowane do śledzenia toksyczności wód i ścieków. Autorzy sugerują potrzebę promocji mikrobiotestów w krajach Europy centralnej.

TESTY BIOLUMINESCENCYJNE W OCENIE SKAŻENIA OSADÓW I GLEB

Obszerny przegląd publikacji dotyczących wykorzystania biotestu Microtox do badania toksyczności osadów i gleb został opracowany przez Doherty [5]. Przedstawiono w nim wyniki badań prowadzonych z użyciem samego testu Microtox, jak i w kombinacji z innymi biotestami. Znaczna liczba porównawczych badań wskazuje na użyteczność, czułość, szybkość i dostępność biotestu Microtox. Toksyczność zanieczyszczeń obecnych w osadach i glebach, rozpuszczalnych oraz związanych z fazą stałą, można określić, stosując ekstrakty organiczne lub bezpośrednie badanie materiału w fazie stałej. Badania wykorzystujące elutriaty (lepiszcze odmyte z piasku) lub wodę infiltracyjną (porową) pozwalają na szacowanie toksyczności tylko zanieczyszczeń rozpuszczalnych. Na ujawnioną toksyczność elutriatów może wpływać zarówno rodzaj rozpuszczalnika, jak i całość procedur wstępnych. Czynniki te zostały uwzględnione także w pracy zespołu Dombroski i wsp. [6]. Wykazali oni, że

istotne znaczenie dla wyników badania toksyczności ekstraktów z próbek stałych ma sposób uzyskania ekstraktu. Badano między innymi wpływ rodzaju rozpuszczalnika, czasu ekstrakcji i metod usuwania cząsteczek stałych z zawiesin. Stwierdzono, że największe rozbieżności między wartościami $EC_{50}_{15 \text{ min}}$ występowały w przypadku stosowania prostych metod klarowania ekstraktów. W rezultacie podciśnieniowego sączenia zawiesin różnice między średnimi wartościami EC_{50} osiągnęły 55,8%, a po wirowaniu – 22,3%. Autorzy wskazują na konieczność bardzo starannego wyboru metod uzyskiwania ekstraktów z próbek stałych, uwzględniającego zarówno czułość metody oznaczania toksyczności, jak i możliwość przemieniania się substancji toksycznych w odmiennych warunkach środowiskowych.

Według Doherty [5], na wyniki badania toksyczności próbek w fazie stałej wpływa także ich kolor oraz skład, zwłaszcza stosunek ilości gliny i mułu. Autor konkluduje, że wyniki uzyskiwane z użyciem biotestu Microtox są często zgodne z wynikami laboratoryjnych testów na bezkręgowcach oraz testów przeżywalności makrobezkręgowców w warunkach terenowych, a wiele spośród cytowanych prac wskazuje także na korelację toksyczności oznaczonej za pomocą biotestu Microtox ze stężeniami określonych grup zanieczyszczeń.

Wyniki wskazujące na istotną korelację ($p < 0,05$) między toksycznością oznaczoną w fazie stałej za pomocą biotestu Microtox i fizykochemicznymi wskaźnikami zanieczyszczenia osadów bagrowanych w Hong Kongu, a także uzyskanych z nich elutriatów, zostały przedstawione w pracy Cheung i wsp. [4]. Autorzy zauważają jednak, że obecność związków amonowych w osadach zawierających wysokie stężenia substancji organicznych może zniekształcać obraz zanieczyszczenia osadów.

Grant i Briggs [8] wykorzystali Microtox do badania toksyczności osadów wokół platformy wiertniczej na Morzu Północnym. Jakkolwiek elutriaty nie powodowały mierzalnego spadku bioluminescencji, jednak związki organiczne ekstrahowane za pomocą dichlorometanu były bardzo toksyczne. Wielkości EC_{50} mierzone po 15 min. nie przekraczały $0,25 \text{ mg/cm}^3$ i były ściśle skorelowane ze stężeniami węglowodorów.

Z kolei badania przeprowadzone przez Carter i wsp. [3] wykazały, że toksyczność zanieczyszczonych próbek gleb i osadów niekoniecznie korelowała z wynikami analiz chemicznych. Toksyczność oceniano za pomocą biotestów wykorzystujących: przeżywalność dżdżownicy *Eisenia andrei*, kiełkowanie sałaty *Lactuca sativa*, wzrost glonów *Selenastrum capricornutum*, przeżywalność i wzrost muszki *Chironomus tentans*, przeżywalność i wzrost *Hyaella azteca* oraz bioluminescencję bakterii *Vibrio fischeri* (Microtox). Stwierdzono, że w badaniach gleby czułość biotestów wzrastała w porządku: dżdżownica < sałata = glon < Microtox, podczas gdy w badaniach osadów szereg wzrastającej czułości przedstawiał się następująco: Microtox < *Hyaella* < muszka < glon. Autorzy rekomendują stosowanie biotestów toksyczności jako uzupełniających dla konwencjonalnego, chemicznego monitorowania zanieczyszczonych środowisk w Kanadzie.

Pedersen i wsp. [29] stwierdzili brak korelacji między toksycznością oznaczoną z użyciem biotestów (*Microtox*, *Acartia tonsa*, *Corophium volutator*, glony *Skeletonema costatum*) i stężeniem zanieczyszczeń w osadach portowych Kopenhagi. Uważają oni jednak, że biotesty powinny być stosowane w kombinacji z analizami chemicznymi do oceny zagrożenia stwarzanego w środowisku przez osady.

Toksyczność gleb skażonych ropą naftową oraz efekty ich bioremediacji były przedmiotem badań Salanito i wsp. [34]. Stosując chromatografię gazową, autorzy wykazali, że po procesie bioremediacji stężenie węglowodorów w skażonej glebie zmniejszyło się o ok. 35–90%, zależnie od długości łańcucha węglowego. Ze wzrostem długości łańcucha

węglowego (od C-11 do C-44) następował spadek efektywności biodegradacji węglowodoru. Zanieczyszczone gleby wykazywały znaczną toksyczność dla dżdżownic i bakterii (Microtox), natomiast gleby po remediacji okazały się zupełnie nietoksyczne. Uzyskane wyniki sugerują, że związki chemiczne pozostałe w glebach po remediacji mogą być związane lub niedostępne dla organizmów testowych, a także – że ulegają one dalszej biodegradacji, ani nie są podatne na ługowanie, dzięki czemu nie powinny przedostawać się do wód gruntowych.

Zespół Kaisera [17, 18, 26] pracuje nad wykorzystaniem sieci neuronowych do przewidywania toksyczności związków chemicznych: ponad 1200 substancji dla ryb (fathead minnow) i ponad 400 substancji dla bakterii *Vibrio fischeri*. Niezależne parametry stanowi ok. 50 zmiennych będących prostymi wskaźnikami strukturalnymi specyficznych grup funkcyjnych, cząsteczek jako całości oraz poszczególnych elementów wzorów cząsteczkowych. W analizie wykorzystano także wybrane fizyko-chemiczne parametry masowe: współczynnik podziału oktanol/woda oraz rozpuszczalność substancji w wodzie. Autorzy uważają, że uzyskane modele sieci neuronowych znacznie przewyższają tradycyjne typy zależności struktura-aktywność i zachęcają do dalszych badań nad innymi fragmentami i obliczonymi parametrami cząsteczkowymi.

PODSUMOWANIE

Podsumowując – można stwierdzić, że szybkie, biologiczne testy toksyczności (wykorzystujące np. bakterie świecące) mogą być używane jako pierwsze wskaźniki pojawienia się toksycznych zanieczyszczeń w wodach, ściekach, osadach i glebach. Biotesty nie mogą jednak zastąpić chemicznych metod monitorowania skażenia środowiska, umożliwiających wskazanie czynnika powodującego toksyczność.

Praca finansowana przez Komitet Badań Naukowych (grant 3T09C00918).

LITERATURA

- [1] Arretxe M., J.M. Heap, N. Christofi: *The effect of toxic discharges on ATP content in activated sludge*, Environ. Toxicol. Water Qual., **12**, 23–29 (1997).
- [2] Bundy K.J., F. Mowat: *Speciation studies and toxicity assessment of complex heavy metal mixtures*, [w:] Proc. HSRC/WERC Joint Conf. on the Environment, Albuquerque, NM, 1996, 35–47.
- [3] Carter J.A., R.E. Mroz, K.L. Tay, K.G. Doe: *An evaluation of the use of soil and sediment bioassay in the assessment of three contaminated sites in Atlantic Canada*, Water Qual. Res. J. Canada, **33**, 295–317 (1998).
- [4] Cheung Y.H., A. Neller, K.H. Chu, N.F.Y. Tam, C.K. Wong, Y.S. Wong, M.H. Wong: *Assessment of sediment toxicity using different trophic organisms*, Arch. Environ. Contam. Toxicol., **32**, 260–267 (1997).
- [5] Doherty F.G.: *A review of the Microtox® toxicity test system for assessing the toxicity of sediments and soils*, Water Qual. Res. J. Canada, **36**, 475–518 (2001).
- [6] E.C. Dombroski, I.D. Gaudet, L.Z. Florence, A.A. Qureshi: *A comparison of techniques used to extract solid samples prior to acute toxicity analysis using the Microtox test*, Environ. Toxicol. Water Qual., **11**, 121–128 (1996).
- [7] Fernandez A., C. Tejedor, F. Cabrera, A. Chordi: *Assessment of toxicity of river water and effluents by the bioluminescence assay using Photobacterium phosphoreum*, Water Res., **29**, 1281–1286 (1995).
- [8] Grant A., A.D. Briggs: *Toxicity of sediments from around a North Sea oil platform: Are metals or hydrocarbons responsible for ecological impact?* Marine Environ. Res., **53**, 95–116 (2002).
- [9] Grau P., B.P. Da-Rin: *Management of toxicity effects in a large wastewater treatment plant*, Water Sci. Technol., **36**, 1–8 (1997).

- [10] Gupta G., M. Karuppiah: *Toxicity study of a Chesapeake Bay tributary – Wicomico River*, Chemosphere, **32**, 1193–1215 (1996).
- [11] Gupta G., N. Torres: *Use of fly ash in reducing toxicity of and heavy metals in wastewater effluent*, J. Hazard. Mater., **57**, 243–248 (1998).
- [12] Hao O.J., Ch.-J. Shin, Ch.-F. Lin, F.-T. Jeng, Z.-Ch. Chen: *Use of Microtox test for screening industrial wastewater toxicity*, Water Sci. Technol., **34**, 43–50 (1996).
- [13] Hastings W.: *Bioluminescence*, [w:] Cell Physiology Source Book, Acad. Press, 1998, 984–1000.
- [14] Heida H., R. van der Oost: *Sediment pore water toxicity testing*, Water Sci. Technol., **34**, 109–116 (1996).
- [15] Kabata-Pendias A., H. Pendias: *Biogeochemia pierwiastków śladowych*, PWN, Warszawa 1999.
- [16] Kaiser K.L.E.: *Correlation of Vibrio fischeri bacteria test data with bioassay data for other organisms*, Environ. Health Perspect., **106** (Suppl. 2), 583–591 (1998).
- [17] Kaiser K.L.E., S.P. Niculescu, K.M. Gough: *Neural network modeling of Vibrio fischeri and fathead minnow acute toxicity data with molecular indicator variables and physico-chemical bulk parameters*, <http://www.osc.edu/CCM/toxicology/abstracts/abs14.html>, 2002.
- [18] Kaiser K.L.E., S.P. Niculescu, G. Schüürmann: *Feed forward backpropagation neural networks and their use in prediction the acute toxicity of chemicals to the fathead minnow*, Water Qual. Res. J. Canada, **32**, 637–657 (1997).
- [19] Krieg N.R., J.G. Holt: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, William & Wilkins, Baltimore 1984.
- [20] Lee G.F., A. Jones-Lee: *„Co-occurrence” in sediment quality assessment*, <http://www.gfredlee.com/cooccur2.htm>, 1996.
- [21] Lee H.: *A hypothetical scenario in environment biodegradation / biotransformation*, <http://www.uoguelph.ca/~hlee/418chap4.htm>, 2002.
- [22] Lin C.-F., O.J. Hao, F.-T. Jeng: *Microtox evaluation of industrial wastewaters*, Water Sci. Technol., **30**, 97–106 (1994).
- [23] *Microtox Acute Toxicity Basic Test Procedures*, Azur Environmental, 1996.
- [24] Moses V., S. Moses: *Exploiting biotechnology*, Harwood Acad. Publ., Chur (Switzerland) 1995.
- [25] Nałęcz-Jawecki G.: *Badanie toksyczności wody metodą bioindykacji*, <http://www.farm.amwaw.edu.pl/~axzimni/01pokazy.html>, 2001.
- [26] Niculescu S.P., K.L.E. Kaiser, G. Schüürmann: *Influence of data preprocessing and kernel selection on probabilistic neural network modeling of the acute toxicity of chemicals to the fathead minnow and Vibrio fischeri bacteria*, Water Qual. Res. J. Canada, **33**, 153–165 (1998).
- [27] Oanh N.T.K., B.E. Bengtsson: *Toxicity to Microtox, micro-algae and duckweed of effluents from the Bai Bang Paper Company (BAPACO), a Vietnamese bleached kraft pulp and paper mill*, Environ. Pollut., **90**, 391–399 (1995).
- [28] Pardos M., C. Benninghoff, R.L. Thomas, J. Dobrowolski, J. Dominik: *Water ecotoxicity studies in Cracow (Poland) using Hydra attenuata, Selenastrum capricornutum and Microtox® toxicity tests*, Lakes Reservoirs Res. Manag., **5**, 75–81 (2000).
- [29] Pedersen F., E. Bjørnstad, H.V. Andersen, J. Kjølholt, C. Poll: *Characterization of sediments from Copenhagen Harbour by use of biotests*, Water Sci. Technol., **37**, 233–240 (1998).
- [30] Prosser J.I.: *Molecular marker systems for detection of genetically engineered micro-organisms in the environment*, Microbiology, **140**, 5–17 (1994).
- [31] Ribo J.M., K.I.E. Kaiser: *Photobacterium phosphoreum toxicity bioassay. I. Test procedures and applications*, Toxicol. Assess., **2**, 305–323 (1987).
- [32] Ribo J.M., F. Rogers: *Toxicity of mixtures of aquatic contaminants using the luminescent bacteria bioassay*, Toxicol. Assess., **5**, 135–152 (1990).
- [33] Rodrigue D., K. Mailhot, T.P. Hynes, L.J. Wilson, M. Blanchette: *Aquatic effects monitoring in the mining industry: review of appropriate technologies*, <http://www.nbiap.vt.edu/brarg/brasym95/rodrigue95.htm>, 1995.
- [34] Salanitro J.P., P.B. Dorn, M.H. Huesemann, K.O. Moore, I.A. Rhodes, L.M.R. Jackson, T.E. Vipond, M.M. Western, H.L. Wisniewski: *Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment*, Environ. Sci. Technol., **31**, 1769–1776 (1997).
- [35] Schlegel H.G.: *Mikrobiologia ogólna*, Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 1996.
- [36] Singleton P.: *Bakterie w biologii, biotechnologii i medycynie*, Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 2000.
- [37] Steinberg S.M., E.J. Poziomek, W.H. Engelmann, K.R. Rogers: *A review of environmental applications of bioluminescence measurements*, Chemosphere, **30**, 2155–2197 (1995).

- [38] Stewart G.S., P. Williams: *Lux genes and the applications of bacterial bioluminescence*, J. Gen. Microbiol., **138**, 1289–1300 (1992).
- [39] Symons B.D., R.C. Sims: *Assesing detoxification of a complex hazardous waste, using the Microtox bioassay*, Arch. Environ. Contam. Toxicol., **17**, 497–505 (1988).
- [40] Wiącek-Rosińska A., B. Cwalina, C. Guéguen, Z. Ślusarczyk: *Zawartość metali w ściekach, a ich toksyczność określana z użyciem biotestu Microtox*, [w:] Biotechnologia Środowiskowa (Red. K. Miksch), Wyd. Politechniki Śl., Gliwice 2001, 253–261.
- [41] Zakrzewski S.F.: *Podstawy toksykologii środowiska*, Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 1997.

Wpłynęło: 24 lutego 2003, zaakceptowano do druku: 1 sierpnia 2003.