

AGNIESZKA TRUSZ-ZDYBEK¹, ANNA SZYMCZYCHA-MADEJA², TEODORA M. TRACZEWSKA¹, KATARZYNA PIEKARSKA¹

¹Zakład Biologii Sanitarnej i Ekotechniki, Wydział Inżynierii Środowiska

²Zakład Chemii Analitycznej, Wydział Chemiczny

Politechnika Wrocławska

Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław

E-mail: agnieszka.trusz-zdybek@pwr.wroc.pl

ZASTOSOWANIE SYSTEMU MICROTOX W BIOINDYKACJI PRÓBEK ŚRODOWISKOWYCH

Świadomość społeczna dotycząca degradacji środowiska wskazuje na potrzebę obiektywnej, realnej oceny jego jakości. Przyczyniło się to do rozwoju toksykologii środowiskowej i ekotoksykologii dających narzędzie do prostej jego walidacji. Stąd w ostatnich latach wzrosło zainteresowanie przesiewowymi testami bakteryjnymi do szacowania toksyczności zanieczyszczeń próbek pochodzących ze środowiska. Badania nad wpływem substancji szkodliwych na procesy życiowe i aktywność mikroorganizmów stanowią bezpośredni, szybki i czuły sposób pomiaru stresu chemicznego (DUTKA i współaut. 1993).

Opracowano wiele technik mikrobiologicznych, które służą obecnie jako procedury przesiewowe (DIAZ-BAEZ i współaut. 2002). W testach standardowych są stosowane różne gatunki bakterii, w których toksyczność ocenia się np. na podstawie pomiaru bioluminescencji (*Vibrio fischeri* standard międzynarodowy ISO 11348, 2007), inhibicji wzrostu (*Pseudomonas putida*, ISO 10712, 1995) lub obserwacji wzrostu zespołu bakterii osadu czynnego (ISO 9408, 1999).

Vibrio fischeri (syn. *Photobacterium phosphoreum*) są wykorzystywane w kilku rodzajach testów toksykologicznych, np. Microtox, LUMISTox, ToxAlert 10 i ToxAlert 100. Bakterie te są polarnie urzęsionymi, gramujemnymi przecinkowcami, względnie tlenowymi, powszechnie występującymi w wodach słonych. *Vibrio fischeri* zużywają

mniej więcej 10% energii uzyskanej z metabolizmu na produkcję światła. Luminescencja zachodzi dzięki reakcji enzymu lucyferazy (L), która katalizuje utlenianie tlenem cząsteczkowym zredukowanego nukleotydu FMNH₂ i alifatycznego aldehydu długołańcuchowego (RCHO) do nietrwałego kompleksu (LFMNH₂O₂RCHO), który emituje fotony podczas rozpadu (ŁEBKOWSKA i współaut. 1999). Poziom toksyczności mierzy się za pomocą lumenometru, monitorując intensywność światła emitowanego przez bakterie luminescencyjne w jednostce czasu w wyniku kontaktu z substancją toksyczną. Intensywność świecenia odzwierciedla szybkość z jaką zachodzi złożony ciąg reakcji przemian metabolicznych prowadzących do uzyskania energii. Chemiczna inhibicja jakiegokolwiek enzymu zmienia tę szybkość i w wyniku tego również ilość wyemitowanego światła. Toksyczność jest wyrażana jako takie stężenie badanego związku, które powoduje 50% hamowanie procesu luminescencji u bakterii testowych w odniesieniu do czasu trwania eksperymentu (EC_{50-t}, 50-procentowy efekt testowy dla czasu inkubacji=t).

System Microtox jest uznanym światowym standardem w zakresie badania toksyczności. Ten test jest szybki w użyciu, czuły, powtarzalny i ekologicznie istotny (TRACZEWSKA 2011). Testem tym oznaczane mogą być próbki ciekłe takie jak: woda czy ścieki (Microtox® – System Oceny Toksyczności Ostrej) (NAŁĘCZ-JAWECKI 2003), oraz stałe (wodne ekstrakty np. z

Tabela 1. Klasyfikacja próbek w teście przesiewowym i podstawowym z rozcieńczeniami.

Klasa	Test przesiewowy		Test podstawowy z rozcieńczeniami	
	Efekt testowy PE	Zagrożenie	Jednostki toksyczności TU	Ostra toksyczność
I	Żaden z testów nie wykazał: $PE \leq 20\%$	Brak	Żaden z testów nie wykazał: Efektu toksycznego	Brak
II	Co najmniej jeden test wykazał: $20\% < PE \leq 50\%$	Niskie	Co najmniej jeden test wykazał: $0,4 < TU \leq 1$	Niska
III	Co najmniej jeden test wykazał: $50\% < PE < 100\%$	Ostre	Co najmniej jeden test wykazał: $1 < TU \leq 10$	Ostra
IV	Co najmniej jeden test wykazał: $PE = 100\%$	Wysokie ostre	Co najmniej jeden test wykazał: $10 < TU \leq 100$	Wysoka
V	Wszystkie testy wykazały: $PE = 100\%$	Bardzo wysokie ostre	Co najmniej jeden test wykazał: $TU > 100$	Bardzo ostra

gleby) (Microtox® – Test Fazy Stałej obejmuje protokoły Microtox Solid Phase Test, SPT, i Basic Solid Phase Test, BSPT) (TRACZEWSKA 2011).

W celu określenia stopnia toksyczności środowiska PERSOONE i współautorzy (2003) opracowali system klasyfikacji toksyczności, który obejmuje dwa etapy analizy: test przesiewowy (bez rozcieńczeń) i test podstawowy z rozcieńczeniami. W każdym z tych testów próbki podzielono na 5 klas toksyczności. Uzyskane w teście podstawowym wyniki pozwalają na porównywanie próbek między sobą, a także na charakterystykę toksyczności dotyczącą np. jej zmiany w czasie oraz ustalenia stopnia rozcieńczenia, przy którym ta toksyczność znika (PERSOONE i współaut. 2003; NAŁĘCZ-JAWECKI 2003, 2004).

Test przesiewowy służy do wytypowania próbek toksycznych z dużej grupy próbek badanych. Jest on stosowany do próbek prawdopodobnie nietoksycznych takich jak wody powierzchniowe, podziemne, ścieki oczyszczone itp. Efekt toksyczny danej próbki jest porównywany z próbką kontrolną. Jego wartość, tzw. procent efektu (PE), poniżej 20% oznacza, iż próbka jest nietoksyczna.

Jak wspomniano, próbki dzieli się na 5 klas (Tabelą 1) (PERSOONE i współaut. 2003, NAŁĘCZ-JAWECKI 2004). W każdej klasie oblicza się wagi (ważności) toksyczności w celu wskazania ilościowego znaczenia toksyczności. Umożliwia on porównanie próbek między sobą; im wyższa wartość wyniku wagi tym próbka stwarza większe zagrożenie.

Test podstawowy z rozcieńczeniami służy do oceny stopnia toksyczności próbek. Wykonuje się szereg rozcieńczeń, a ich ilość zależy od spodziewanej toksyczności próbki.

Dla każdego rozcieńczenia określa się wartość PE i oblicza EC_{50_t} , a wartość ta jest przekształcana na jednostki toksyczności TU (ang. toxicity units):

$$TU = (1 / EC_{50_t}) * 100 \quad (1)$$

Próbki również dzieli się na 5 klas (PERSOONE i współaut. 2003, NAŁĘCZ-JAWECKI 2004) (Tabela 2).

W celu zróżnicowania próbek w obrębie każdej klasy toksyczności oblicza się wagi (ważności) toksyczności. Każdej wartości TU nadaje się wartość liczbową oznaczaną jako WP równą:

- 0 – dla próbek nietoksycznych
- 1 – dla $0,4 < TU \leq 1$
- 2 – dla $1 < TU \leq 10$
- 3 – dla $10 < TU \leq 100$
- 4 – dla $TU > 100$

Wagę w ramach klasy oblicza się według wzoru:

$$WAGA = \sum WP / n \quad (2)$$

gdzie: $\sum WP$ – suma wartości WP wszystkich zastosowanych testów; n – liczba zastosowanych testów.

Wagę podaje się w procentach:

$$\% WAGA = WAGA / \max WP * 100 \quad (3)$$

gdzie: $\max WP$ – maksymalna wartość WP dla danej klasy.

Dla potwierdzenia i przedyskutowania przydatności testu Microtox do badań środowiskowych przytoczono wyniki oznaczania toksyczności ostrej próbek pochodzących z różnych elementów środowiska, w tym: ścieki, zioła (napary z liści, wyciągi wodne z korzeni) wraz z

Tabela 2. Rodzaj próbek badanych ścieków.

Oznaczenie	Rodzaj ścieków
P1	ścieki surowe dopływające do oczyszczalni próbka dobową
P2	ścieki z zakładu przemysłowego – o bardzo niskim stosunku BZT ₅ /ChZT, zapachu chemicznym, stanowiące 2% wszystkich dopływających na oczyszczalnię ścieków – próbka jednorazowa
P3	ścieki podczyszczone z browaru - próbka otrzymywana z pobornika zakładowego – kontrolna próbka dobową
P4	ścieki z browaru – próbka pobierana poza zakładem, na przyłączy, przy przepływomierzu ścieków MPWiK
P5	próbka zawierała wszystkie ścieki: po podczyszczalni i z pozostałych obiektów, stanowiące 50% wszystkich dopływających na oczyszczalnię ścieków (próbka dobową pobrana na kanalizacji O.Ś. z browaru) oraz ścieki bytowo-gospodarcze – pochodzące z gospodarstw domowych

próbką gleby, na której rosły oraz próbki gleby pobranej z różnych miejsc i głębokości hałdy poflotacyjnej.

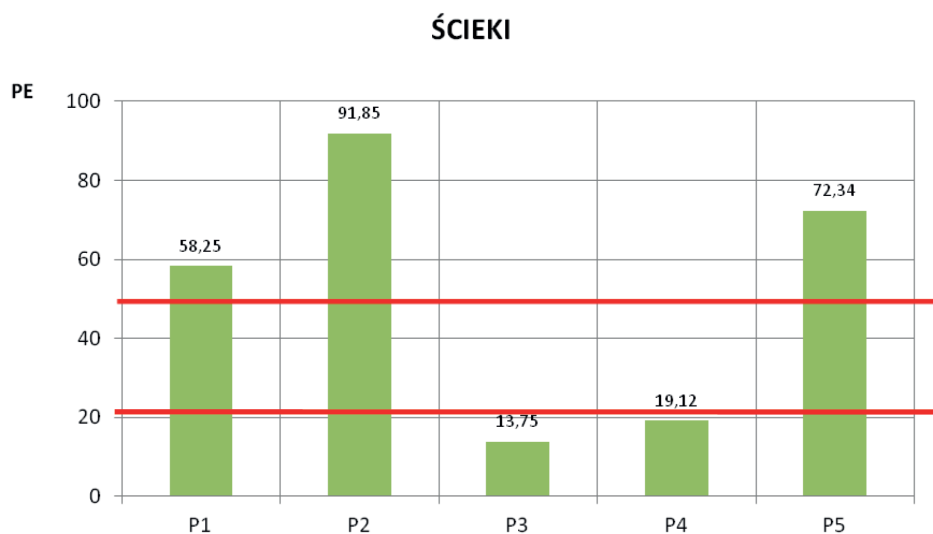
Badania ścieków przeprowadzono w celu wyjaśnienia przyczyn zaburzeń procesu sedymentacji osadu czynnego w miejskiej oczyszczalni ścieków. Rodzaj ścieków przedstawia Tabela 2.

Analizę toksyczności próbek ścieków przeprowadzono w pierwszym etapie z wykorzystaniem testu przesiewowego stosując procedurę Screening 81,9%, a następnie dla próbek charakteryzujących się efektem toksyczności (PE) $\geq 20\%$ wykonano test podstawowy z rozcieńczeniami w celu wyznaczenia EC50_t oraz TU wykorzystując procedurę Basic Test 81,9.

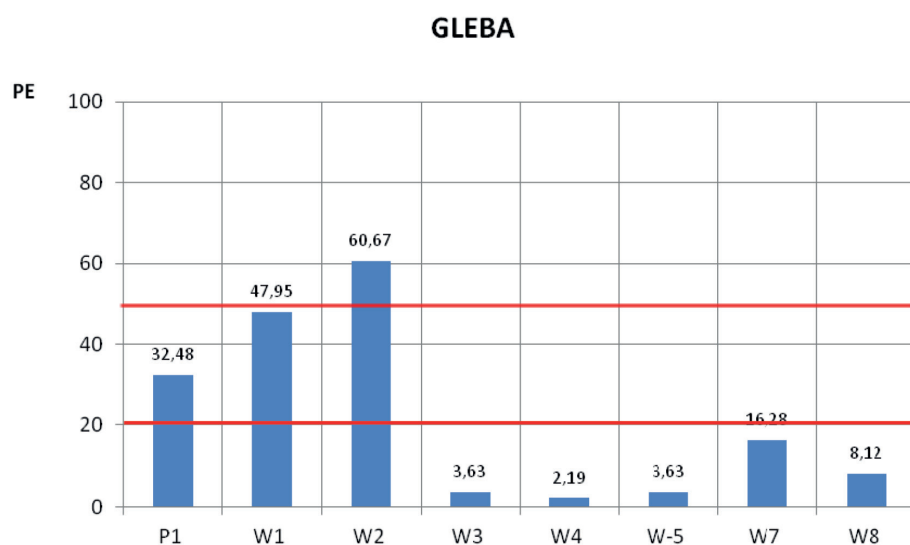
Dla próbek ścieków P3 i P4 (Ryc. 1) procent efektu toksycznego (PE) nie przekro-

czył wartości 20%, stąd próbki te uznano za nietoksyczne. Na podstawie wartości PE pozostałe próbki ścieków (P1, P2, P5) zakwalifikowano do III klasy, czyli stanowiące ostre zagrożenie, stąd poddano je dalszej analizie. Na podstawie wyników testu podstawowego z rozcieńczeniami (Tabela 3) zaobserwowano, iż najniższą wartością EC50_{15 min} charakteryzowała się próbka ścieków P2 pochodząca z zakładu przemysłowego (4,24%). Wykazując wysoką toksyczność ostrą, próbka ta została zakwalifikowana do klasy IV toksyczności. Ścieki pochodzące z gospodarstw domowych (P5) wykazywały wysoką toksyczność ostrą (IV klasa toksyczności).

Analiza wyników, uzyskanych przy zastosowaniu testu Microtox pozwoliła na określenie prawdopodobnej przyczyny zaburzeń procesu sedymentacji osadu czynnego w



Ryc. 1. Procent efektu toksycznego (PE) uzyskany w teście przesiewowym.



Ryc. 2. Procent efektu toksycznego (PE) dla najwyższego badanego stężenia próbek gleby uzyskany w teście podstawowym z rozcieńczeniami.

miejskiej oczyszczalni ścieków. Za taki stan rzeczy odpowiedzialnym mógł być zakład przemysłowy produkujący ścieki o wysokiej, ostrej toksyczności, które stanowiły zaledwie 2% dopływających do oczyszczalni ścieków. Również ścieki bytowo-gospodarcze mogły mieć wpływ na zaistniały stan rzeczy. Przeprowadzone badania wskazały na brak negatywnego oddziaływania ścieków pochodzących z browaru (brak toksyczności). Jakość toksyczna ścieków surowych (określona, jako niska) miała bezpośredni wpływ na organizmy osadu czynnego, co zostało potwierdzone poprzez m. in. badanie mikroskopowe.

Dodatkowe analizy wykonane w ramach tych badań wykazały, iż substancje powierzchniowo czynne zawarte w badanym materiale mogą dawać fałszywe dodatnie wyniki świadczące o wysokiej, ostrej toksyczności, co może nie przekładać się na realne zagrożenie środowiska.

Celem kolejnych badań była ocena potencjalnej toksyczności hałdy z uwagi na konieczność zmiany jej lokalizacji, ze względu na budowę autostrady. Analizom testem Microtox poddano próbki gleby hałdy poflotacyjnej. Uzyskane wyniki miały określić ewentualne szkodliwe oddziaływanie materiału

poflotacyjnego na pracowników zatrudnionych przy likwidacji hałdy.

Do analiz pobrano próbki gleby z różnych głębokości i miejsc: P1 (5,5–7,0 m); W1 (0,5–2,0 m); W2 (4,5–6,5 m); W3 (5,0–6,5 m); W4 (0,5–1,0 m); W5 (10,0–11,5 m), W7 (12,0–13,5 m), W8 (4,5–6,5 m). Toksyczność próbek badano używając procedury Basic Solid Phase.

Zgodnie z metodyką testu na Ryc. 2 podano wartości PE dla najwyższego badanego stężenia próbek. Na podstawie przedstawionych wyników można powiedzieć, że próbki oznaczone jako W2, W1 i P1, mieszcząc się w zakresie PE od 50 do 100%, stanowią ostre zagrożenie, w przeciwieństwie do pozostałych, dla których wartość PE nie przekroczyła 20%, czyli pozostałe można uznać za próbki nietoksyczne.

Uzyskane dla próbek W2 i W1 wartości EC_{50_30min}, które wynosiły odpowiednio 0,762 i 10,3% pozwoliły na wyznaczenie jednostki toksyczności i określenie klasy toksyczności tych próbek (Tabela 4).

Dzięki przeprowadzonym badaniom możliwe było wskazanie miejsc, które powinny zostać poddane dalszej rekultywacji oraz miejsc, z których gleba może być przeniesio-

Tabela 3. Jednostki toksyczności wraz z określeniem klasy toksyczności próbek ścieków.

Próbka ścieków	EC 50_15min. (%)	Jednostka toksyczności TU	Klasa toksyczności
P1	76,2	1,31	II Niska ostra toksyczność
P2	4,24	23,6	IV Wysoka ostra toksyczność
P5	55,2	1,81	III Ostra toksyczność

Tabela 4. Jednostki toksyczności wraz z określeniem klasy toksyczności próbek gleby.

Próbka	EC 50_30 min. (%)	Jednostka toksyczności TU	Klasa toksyczności
W1	10,3	9,71	III Ostra toksyczność
W2	0,762	131	V Bardzo wysoka ostra toksyczność

na bez narażenia zdrowotnego ludzi tam pracujących.

Ważnym elementem w ocenie próbki środowiskowej jest określenie jej toksyczności, poparte znajomością zawartości pierwiastków (metali ciężkich).

Celem badań przeprowadzonych na próbkach roślin leczniczych oraz próbce gleby, na której te rośliny zostały wyhodowane, była ocena stopnia zanieczyszczenia środowiska glebowego i roślin leczniczych w aspekcie wpływu na ludzi.

Materiałem badawczym był tymianek właściwy (*Thymus vulgaris* L.), szalwia lekarska (*Salvia officinalis* L.) i pokrzywa zwyczajna (*Urtica dioica* L.). Próbki ziół i gleby pochodziły z ogródków działkowych w Oławie, w pobliżu których znajdują się tory kolejowe (150 m) oraz droga wojewódzka nr 396 (250 m). W rejonie tym znajduje się również ciepłownia rejonowa (400 m) z kotłami opalnymi miałem węgla kamiennego i olejem opałowym. Rośliny posiano w maju 2010 r., a zebrano w sierpniu 2010 r.

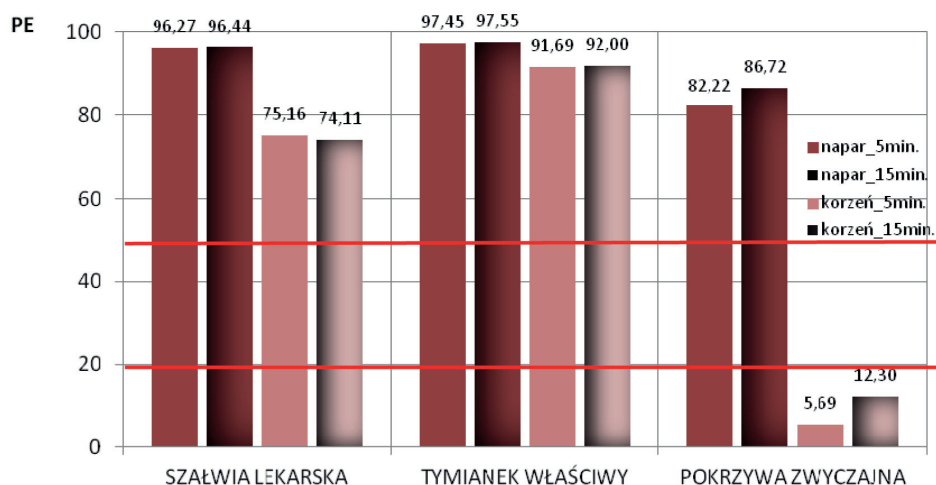
Przygotowanie materiału do testu Microtox polegało na wykonaniu naparu z liści roślin leczniczych. Analizom toksykologicznym poddano również korzenie roślin. W tym celu wykonano ekstrakcję wodną, odwiro-

wano, a następnie przesączono. Wykonano badania testem przesiewowym w celu wytypowania próbek toksycznych. Testem tym zbadano jedynie próbki wyjściowe (nierozcieńczone). Do oznaczenia toksyczności w naparach z liści ziół i wodnych ekstraktach korzeni zastosowano procedurę 81,9% Screening Test. Do oceny toksyczności gleby zastosowano procedurę testu podstawowego dla fazy stałej (Basic Solid-Phase Test, BSPT).

Wykonano również mineralizację części nadziemnych, korzeni roślin oraz gleby, ekstrakcję jednoetapową części nadziemnych oraz ekstrakcję sekwencyjną korzeni i gleby. Oznaczono m.in. pierwiastki toksyczne i ciężkie w tym: As, Hg, Pb, Cd, Cr, Ba, Ni.

Wykonany dla próbki gleby test podstawowy wykazał, że stężenie efektywne (w czasie 30 minut) powodujące spadek luminescencji o 50% (EC_{50}) wynosiło 52,7%, czyli próbka gleby wykazywała wysoką ostrą toksyczność (klasa IV). Procent efektu toksycznego (PE) w porównaniu do próbki kontrolnej dla badanych naparów z liści ziół i ekstraktów wodnych korzeni uzyskanych w teście przesiewowym przedstawiono na Ryc. 3. Zgodnie z systemem klasyfikacji wg PERSOONE i współautorów (2003) badane próbki należą do klasy III, czyli stanowią ostre zagrożenie

NAPARY Z LIŚCI I KORZENIE



Ryc. 3. Procent zahamowania luminescencji naparów z liści i ekstraktów wodnych korzeni – test przesiewowy.

(50% <PE< 100%). Jedynie w przypadku ekstraktu korzeni pokrzywy zwyczajnej nie zaobserwowano efektu toksycznego (PE ≤ 20%). Zarówno w próbce gleby, jak również w częściach nadziemnych i korzeniach badanych roślin wykazano obecność pierwiastków toksycznych i ciężkich. W przypadku wszystkich próbek (oprócz ekstraktu wodnego korzenia pokrzywy zwyczajnej) efekt toksyczności był znaczący, stąd zasadnym jest przeprowadzenie drugiego etapu analizy, czyli tzw. testu podstawowego. Umożliwi on ocenę stopnia toksyczności próbek, dzięki czemu będzie możliwe ich porównanie.

Spodziewane efekty toksyczne badanych roślin leczniczych i gleby związane są z lokalizacją materiału, co potwierdzają wyniki analiz chemicznych. Jednakże na tak wysoki uzyskany efekt toksyczny mogą również mieć wpływ obecne w roślinach leczniczych substancje biologicznie czynnych, takie jak np. olejki eteryczne, stąd wskazane jest wykonanie badań referencyjnych na naparach roślin pochodzących z niezanieczyszczonego środowiska.

Przeprowadzone testem Microtox analizy pozwoliły na określenie zakresu występowania skażeń poflotacyjnych i/lub wybrania miejsc, które muszą być poddane dalszym badaniom chemicznym bądź rekultywacji. Pokazały, że całkowita zawartość zarówno mikro-, jak i makroskładników w glebie znacząco wpływa na toksyczność badanych próbek. Z kolei badania ścieków dopływających do oczyszczalni przyczyniły się do wyjaśnienia przyczyn zaburzeń procesu sedymentacji osadu czynnego, spowodowanych obecnością w nich zarówno substancji toksycznych, jak i substancji powodujących zmiany napięcia powierzchniowego.

Pełna analiza chemiczna zanieczyszczeń środowiska jest nierealna ze względu na złożoność ich składu oraz wzajemne oddziaływania poszczególnych związków chemicznych w mieszaninie. Wykrycie oraz identyfikacja substancji w oparciu o analizę chemiczną jest również kosztowna i wymaga zastosowania nowoczesnych technik analitycznych. Nie może to stanowić podstawy do prognozowania biologicznych skutków jakie mogą wywołać zanieczyszczenia na organizmy żywe.

Zastosowanie biotestów to niezwykle użyteczna metoda analizy środowiska na podstawie reakcji układu żywego, pozwalająca na ocenę biologicznej aktywności badanej próbki. Jednak z uwagi na różne zakresy wrażliwości organizmów testowych przy analizie nieznanymi próbek zalecane jest stosowanie testów obejmujących organizmy należące do różnych poziomów troficznych badanego środowiska, począwszy od bakterii, glonów, pierwotniaków do skorupiaków i roślin wyższych (BIERKENS i współaut. 1998). Natomiast ocena toksykologiczna jakości próbek środowiskowych powinna się skupiać raczej na organizmach związanych z badanym środowiskiem (TRACZEWSKA 2011).

System Microtox® jest dobrym i coraz bardziej popularnym narzędziem do oceny próbek środowiskowych. Jednakże uzyskane tym testem wyniki należy interpretować z bardzo dużą ostrożnością z uwagi na fakt, iż na uzyskany efekt toksyczności może mieć wpływ cały szereg czynników, które nie zawsze można zakwalifikować, jako toksyczne. Stąd bardzo istotne jest między innymi prawidłowe wnioskowanie wykonywane w oparciu o wyniki tego rodzaju testów.

ZASTOSOWANIE SYSTEMU MICROTOX W BIOINDYKACJI PRÓBEK ŚRODOWISKOWYCH

Streszczenie

Konwencjonalne testy toksykologiczne prowadzone według krajowych lub międzynarodowych norm są skomplikowane, wymagają dużej przestrzeni laboratoryjnej i są czasochłonne. Konieczność badania wielu próbek środowiskowych w krótkim czasie doprowadziła do wzrostu zapotrzebowania na bardziej praktyczne i łatwe w wykonaniu metody pozwalające określić wpływ zanieczyszczenia na organizmy żywe, a w dalszym etapie na stan całego ekosystemu. Wzrosło, więc znaczenie szybkich zminiaturyzowanych testów toksyczności, zwanych mikrobiotestami. Działają one w oparciu o organizmy

jednokomórkowe lub małe – wielokomórkowe, które w wyniku kontaktu z próbką wykazują specyficzną odpowiedź. Jednym z takich testów jest system Microtox, wykorzystujący morskie bakterie luminescencyjne *Vibrio fischeri*.

W pracy przedstawiono przykłady zastosowań systemu Microtox w badaniach toksykologicznych próbek środowiskowych. Badaniom poddane były próbki ścieków, gleb oraz korzeni i naparów roślinnych. Wyniki analiz pozwoliły na oszacowanie potencjalnych zagrożeń zdrowia wynikających z zanieczyszczenia środowiska naturalnego.

APPLICATION OF THE MICROTOX® SYSTEM IN TOXICOLOGICAL STUDIES OF ENVIRONMENTAL SAMPLES

Summary

Conventional toxicological tests conducted according to national or international standards are complicated and time-consuming and require a large laboratory space.

The need for analysis of many environmental samples in a short time led to an increasing demand for more practical and easy methods for determination of the effect of pollution on organisms and in a later stage on the state/condition of the entire ecosystem. Therefore, high-speed miniaturized toxicity tests, called microbiotests, gain increased importance. They are based on single-cell or small –

multicellular organisms, which in contact with the sample show a specific response. One of such test is the Microtox system, using the marine luminescent bacterium *Vibrio fischeri*.

In this paper, examples of applications Microtox system in toxicological studies of environmental samples have been presented. The samples of sludge, soil, plant roots and plant infusions were examined. The results of the research allowed estimating the potential health risks resulting from environmental pollution

LITERATURA

- BIERKENS J., KLEIN G., CORBISIER P., WERCHAVE V. H., WELTENS R., SCHOETERG G., 1998. *Comparative sensitivity of 20 bioassays for soil quality*. *Chemosphere* 37, 29–35.
- DIAZ-BAEZ M. C., SANCHEZ W. A., DUTKA B. J., RONCO A., CASTILLO G., PICA-GRANDADOS Y., CASTILLO L. E., RIDAL J., ARKHIPCHUK V., 2002. *Overview of results from the WaterTox intercalibration and environmental testing phase II program*. Tom 2. *Ecotoxicological evaluation of drinking water supplies*. *Environ. Toxicol.* 17, 241–249.
- DUTKA B. J., NYHOLM N., PETERSEN J., 1993. *Comparison of several microbial toxicity screening tests*. *Environ. Toxicol. Water Quality* 8, 397–407.
- ŁEBKOWSKA M., ZAŁĘSKA-RADZIWIŁŁ M., SŁOMCZYŃSKA B., 1999. *Toksykologia środowiska – ćwiczenia laboratoryjne*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej.
- NAŁĘCZ-JAWECKI G., 2004. *Metody klasyfikacji toksyczności próbek środowiskowych*. Zakład Badań Środowiska Akademii Medycznej w Warszawie, www.tigret.eu
- NAŁĘCZ-JAWECKI G., 2003. *Badanie toksyczności środowiska wodnego metodą bioindykacji*. Biuletyn Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Warszawie 2, 11–17.
- Microtox® *System Oceny Toksyczności Ostrej*, Tigret, www.tigret.eu
- Microtox® *Test Fazy Stałej*, Tigret, www.tigret.eu
- PERSOONE G., MARSALEK B., BLINOVA I., TÖRÖKNE A., ZARINA D., MANUSADZIANAS L., NAŁĘCZ-JAWECKI G., TOFAN L., STEPANOVA N., TOTHOVA L., KOLAR B., 2003. *A practical and user-friendly toxicity classification system with microbiotests for natural waters and wastewaters*. *Environ. Toxicol.* 18, 395–402.
- TRACZEWSKA T. M., 2011. *Biologiczne metody oceny skażenia środowiska*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław.