

BIOTESTY A JEJICH APLIKACE V ANALYTICE ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

ZDENĚK KAFKA a JANA PUNČOCHÁŘOVÁ

Ústav chemie ochrany prostředí, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6
e-mail: Zdenek.Kafka@vscht.cz

Došlo dne 27.VII. 1998

Klíčová slova: biotesty, Microtox test, luminiscenční bakterie

Obsah

1. Úvod
2. Testy toxicity
3. Bakteriální bioluminiscenční test toxicity
 - 3.1. Historie Microtox testu
 - 3.2. Biochemická podstata bakteriální bioluminiscence
 - 3.3. Faktory ovlivňující bioluminiscenci
 - 3.4. Výhody Microtox testu
 - 3.5. Využití Microtox testu
4. Závěr

1. Úvod

Všechny složky životního prostředí jsou kontaminovány převážně z antropogenních zdrojů neustálým přísunem nežádoucích látek, jejichž koncentrace často stoupá nad úroveň přirozeného pozadí. Pro hodnocení stupně znečištění hraje nezastupitelnou roli chemická a fyzikální analýza, která při současném stavu přístrojové techniky umožňuje s vysokou přesností stanovit ve vzorcích z životního prostředí velmi malá množství kontaminujících látek. Ani sebecitlivější analytické metody však nemohou zodpovědět všechny otázky týkající se toxických účinků xenobiotik. Na základě přítomnosti a koncentrace jednotlivých sloučenin nelze totiž spolehlivě předpovědět jejich toxický vliv na různé formy života. U směsí toxikantů pak zpravidla nebývá výsledný účinek prostým součtem toxických vlivů jednotlivých složek a proto nelze předem určit, zda budou toxikanty ve směsi vykazovat synergický nebo naopak antagonistickejší efekt. Některé kontaminanty vyskytující se v životním prostředí nebyly dokonce dosud spolehlivě identifikovány. Proto se stále ve větší míře využívají biologické metody stanovení toxicity a to především v zemích, kde je péči o životní prostředí věnována zvýšená pozornost.

2. Testy toxicity

Biotesty slouží k hodnocení nepříznivého vlivu škodlivin na biotickou složku životního prostředí. Posouzení kontaminantů z biologického hlediska tvoří vhodný doplněk k tradičně

používaným fyzikálně-chemickým metodám. Biotesty pro vodné různě kontaminované vzorky nebo jejich výluhy jsou navrhovány tak, aby indikátorovými organismy byly typické druhy zastupující nejvýznamnější složky ekosystémů povrchových vod. Bioindikátory mohou reagovat na přítomnost toxikantu např. určitou změnou některé fyziologické funkce, změnou pohyblivosti, růstu nebo reprodukce. V krajním případě může být testovací organismus toxikantem usmrcen.

Existuje velké množství biologických testů, které mohou být různým způsobem klasifikovány. Nejběžnější je klasifikace podle délky kontaktu bioindikátoru s testovaným toxikantem, podle které jsou testy členěny na akutní, subchronické a chronické. Je ovšem třeba zdůraznit, že toxicita určité látky může být pro různé organismy různá. Proto je nutné postupovat velmi opatrně při zobecňování informací získaných na jednotlivých testovacích bioindikátorech zvláště ve vztahu k člověku. Pro zvýšení objektivity se často pro testování používá nejen jeden druh organismu, ale soubor několika biologických druhů různé složitosti a trofické úrovně.

Německá norma DIN uvádí pro hodnocení vodných roztoků kombinaci čtyř biotestů (tab. I).

V České republice je obdobný soubor biotestů doporučen např. Vyhláškou č.339/1997 MŽP o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů. Tyto biotesty se používají při zjišťování ekotoxicity jako jedné z nebezpečných vlastností odpadů. Podle definice ekotoxicity vykazují takové odpady, jejichž vodný výluh negativně ovlivní alespoň jeden druh testovacích organismů, přičemž doba kontaktu výluhu s bioindikátorem je pevně stanovena. Jako bioindikátory se používají ryby, řasy, dafnie a semena hořčice bílé.

3. Bakteriální bioluminiscenční test toxicity

Biotesty, které se u nás v současné době využívají a jsou předepsány normou, mají některé nevýhody. Jejich hlavním nedostatkem je dlouhá doba potřebná pro získání výsledků analýz (hodiny až desítky hodin). V případě ekologických havárií tak existuje nebezpečí rozšíření kontaminace na rozsáhlá území, což může mít za následek velké ekonomické a ekologické škody. Jinou nevýhodou je malá statistická spolehlivost vzhledem k omezenému počtu jedinců používaných v testu a značná subjektivita při jejich vyhodnocování. Biotesty založené na mortalitě také neumožňují kvantifikovat slabší toxické účinky a vedle námitek proti etickým stránkám těchto metod nelze zjistit ani eventuální stimulační efekt některých typů látek na živé organismy. Variantou uvedených postupů je alternativní biotest, bakteriální bioluminiscenční test toxicity (Microtox test), který eliminuje některé uvedené nedostatky a který se využívá pro stanovení akutní toxicity různých xenobiotik.

3.1. Historie Microtox testu

Historický přehled týkající se prvních objevů v oblasti bioluminiscence a biologie luminiscenčních bakterií uvádí Har-

Tabulka I
Biotesty podle DIN 38412

Označení	Rybí test	Test na řasách	Test na daňiích	Microtox test
<i>Oddíl</i>	31	33	30	34
Typ organismu	obratlovci	rostliny	bezobratlí	bakterie
Testovací organismus	ryba <i>Leuciscus idus</i>	zelená řasa <i>Scenedesmus subspicatus</i>	vodní korýš <i>Daphnia magna</i>	fotobakterie <i>Vibrio fischeri</i> <i>Photobacterium phosphoreum</i>
Princip testu, kritérium	přežití nebo úhyn	dělení buněk měřené pomocí fluorescence chlorofylu	pohyb jedinců	bioluminiscence
Doba testu	48 h	48 h	24 h	30 min

vey¹. Ještě před těmito objevy bylo již v 17. století zjištěno, že světélkování v přírodních materiálech probíhá bez znatelného tepelného efektu a je inhibováno chemickými činidly. Tak byl vlastně proveden první test za použití luminiscenčních bakterií, aniž by byla známá jejich existence. Předpoklad, že bioluminiscence vzniká v živých organismech, byl potvrzen později, když se podařilo ze svítícího masa získat první mikroorganismus nazvaný *Sarcina lutea*. V této době již byla známa závislost světélkování mořských luminiscenčních bakterií na teplotě, tlaku vzduchu a slanosti mořské vody. Následně byla získána čistá kultura luminiscenčních bakterií, která byla později nazvána *Micrococcus phosphoreus* (dnes *Photobacterium phosphoreum*). Systematicky v této oblasti pracoval v osmdesátých a devadesátých letech 19. stol. Fischer, který popsal 9 druhů luminiscenčních bakterií a později byl po něm jeden druh pojmenován *Photobacterium fischeri* (dnes *Vibrio fischeri*). Využití bakteriální luminiscence při sledování nebezpečnosti fyziologicky aktivních látek uvádí Johnson a spol.² a aplikace pro detekci toxikantů přítomných v ovzduší je obsahem amerického patentu³.

Biotest Microtox^{4,5} byl vyvinut v r. 1979 pro německou firmu Beckman Instrument a v průběhu dalších pěti let využíván řadou laboratoří a výzkumných pracovišť např. pro hodnocení akutní toxicity skládkových výluhů nebo vrtných výplachů. Studiu tohoto biotestu a jeho aplikacím v ekotoxikologickém monitoringu je věnována monografie M. L. Richardsova⁶.

3.2. Biochemická podstata bakteriální bioluminiscence

Microtox test využívá ke zjišťování toxicity pokles produkce světelného bioluminiscenčního toku mořských světélkujících bakterií *Photobacterium phosphoreum* vlivem xenobiotik přítomných v hodnoceném vzorku. Tyto bakterie využívají přibližně 10 % metabolické energie při přeměně energie chemické na viditelné světlo pomocí elektronového transportního systému. Uvedená přeměna je spojena s buněčným dýcháním. Změna buněčného metabolismu nebo porušení buněčné struktury ovlivňuje dýchání a tedy i intenzitu bioluminiscence. Produkce světla souvisí se zdravotním stavem organismu. Přítomnost toxických látek pak může být příčinou různých poruch buněčného metabolismu souvisejících se změnou buněčného transportního systému, které se kvantitativně projeví změnou intenzity produkovaného světelného toku.

3.3. Faktory ovlivňující bioluminiscenční test

- hodnota pH měřeného vzorku

Měření je značně ovlivněno hodnotou pH sledovaného vzorku. Proto je třeba před měřením vzorek upravit vhodným pufracním činidlem, např. acetátovým pufrům na hodnotu pH, která je specifická pro určité typy kontaminujících látek a obvykle se blíží neutrální hodnotě. McDowell a spol.⁷ uvádí, že maximální citlivosti pro nízké koncentrace kontaminantů běžných ve spodních vodách bylo dosaženo úpravou pH na hodnotu 6,0-7,0. V uvedené práci je dále popsána reverzibilita efektu pH, kdy při změnách hodnoty pH v obou směrech opakovaně docházelo k odpovídajícímu poklesu či zesílení intenzity bioluminiscence.

- zákal a zbarvení měřeného vzorku

Reálné vodné vzorky nejsou většinou dokonale čiré, ale vykazují určitou míru zbarvení nebo zákalu. Biotest Microtox byl původně koncipován pro měření nezabarvených vzorků, ale aparaturu lze poměrně jednoduše upravit i pro měření vzorků barevných nebo zakalených⁸. Úprava spočívá v použití referenčních korekčních roztoků a speciálních měřících květ s dvojími stěnami.

- koncentrace solí v měřených vzorcích

Protože bakterie *Photobacterium phosphoreum* jsou mořské mikroorganismy, testované vzorky musí být upraveny přídatkem chloridu sodného obvykle v dvouprocentní hmotnostní koncentraci. Je třeba připomenout, že kovy a některé organické ligandy se mohou v přítomnosti chloridových iontů vázat do komplexních sloučenin, čímž se sníží množství volného kovového iontu či ligandu, který je odpovědný za toxický účinek vzorku.

- rozpustnost kontaminantu ve vodě

Biotest Microtox umožňuje upravit experiment pro zjišťování toxicity organických látek s omezenou rozpustností ve vodě⁹. Většinu organických látek tvoří totiž právě látky tohoto typu. Jako příklady lze uvést benzen, toluen, kresoly, pentachlorfenol nebo 1,1,1-trichlorethen. Modifikace experimentálních podmínek vyplývá z tolerance, kterou bioluminiscenční bakterie vykazují vůči nízkým koncentracím 2-propanolu. Malý přídatek tohoto polárního organického rozpouštědla umožňuje převedení organických látek obtížně rozpustných ve vodě do testovaného vodného roztoku.

3.4. Výhody Microtox testu

Důležitým kritériem při volbě biotestu je jeho cenová dostupnost a jednoduchost. Microtox je v tomto ohledu velmi výhodný, protože patří k nejméně cenově náročným biomonitoringovým metodám a obsluhu zařízení lze zvládnout již po krátkém zaškolení. Rychlost bývá často klíčovým faktorem monitorovacích programů. Rychlé testy mohou především poskytnout více informací v krátkém časovém intervalu. Ještě důležitější je však skutečnost, že data charakterizující toxicitu jsou dostupná co nejdříve, takže je např. možné včas aplikovat vhodná sanační opatření. Z tohoto hlediska je Microtox test považován za jeden z nejrychlejších testů vůbec. Dalším důležitým faktorem, který je třeba vzít v úvahu, je objem vzorku potřebný pro experiment. V případě reálných výluhů, sedimentárních extraktů i např. meziproduktů chemických výrob je často k dispozici pouze omezené množství vzorku. Microtox test s potřebným objemem vzorku méně než 5 ml je v tomto směru jedním z nejméně náročných. Rovněž jeho citlivost je dostatečná a srovnatelná s jinými testy (např. na daňních nebo střevlích) používanými pro hodnocení toxicity vodných roztoků a byla potvrzena pro více než tisíc sloučenin. Větší počet organismů použitých pro jeden pokus představuje větší statistickou věrohodnost oproti jiným testům, např. na rybách nebo hlodavcích.

3.5. Využití Microtox testu

Microtox test se podobně jako ostatní biotesty obecně používá k detekci akutního toxického účinku vodných roztoků látek nebo směsí látek o koncentracích řádově mg.l^{-1} , při nichž nastává měřitelné poškození zdravotního stavu testovacích organismů. Tradiční oblastí jeho aplikace je ochrana životního prostředí. Tento biotest by měl poskytnout základní rychlou informaci, zda toxický efekt nepřesahuje stanovenou normu. Ve Spolkové republice Německo je zahrnut do státní normy DIN 38412 pro testování zdravotní nezávadnosti průmyslových odpadních produktů. K normativním testům se řadí i ve Francii a v Kanadě.

Microtox test je vhodný k vyhodnocování akutní toxicity průsakových vod, skládkových vod a výluhů z průmyslových odpadů, které mohou mít jak pevnou, tak i pastovitou nebo kašovitou konzistenci. Toxický účinek lze sledovat jak u organických kontaminantů, např. u chlorovaných alkanů nebo aromátů¹⁰, tak i u kontaminantů anorganických, jako jsou těžké kovy". Dále je využitelný pro průběžné monitorování průmyslových odpadních vod, vstupních a výstupních vod v čistících stanicích, ale i v zemědělství např. pro kontrolu zemědělských produktů z hlediska jejich možné kontaminace pesticidy. Další oblastí uplatnění by mohla být kontrola biokompatibility nově vyvinutých materiálů. Cenné informace může Microtox test poskytnout i ve farmakologii. Tolerance bioluminiscenčních bakterií k 2-propanolu dovoluje hodnotit i materiály hydrofobní povahy, např. ropné produkty a měřicí systém lze upravit i pro měření zbarvených roztoků. Nevhodný je však pro hodnocení toxicity emulzí, suspenzí a silně agresivních vodných roztoků.

Specifickou modifikací Microtox testu je biotest zvaný Mutatox¹², který se využívá pro hodnocení genotoxicity (mutagenity) a pro rychlý screening kancerogenních látek zejména v potravě a v lécích. Mutatox je typickým příkladem aplikace bioluminiscenčních bakterií pro měření chronické toxicity.

4. Závěr

Aplikace biologických metod stanovení toxicity tvoří vhodný doplněk k tradičně používaným fyzikálně-chemickým metodám pro hodnocení kontaminace životního prostředí z biologického hlediska. Z biotestů využívaných u nás v současné době se jeví jako perspektivní bakteriální bioluminiscenční test toxicity, který pracuje s velkým množstvím indikátorových organismů a využívá závislosti inhibice bakteriemi emitovaného světla na koncentraci toxikantů v testovaném vzorku. Z porovnání s ostatními testy je zřejmá jeho ekonomická efektivnost, jednoduchost, rychlost, dobrá reprodukovatelnost a citlivost. Vhodný je pro monitorování znečištění prostředí a to zejména pro screening akutní toxicity povrchových a odpadních vod a skládkových výluhů nebo ke kontrole vstupních surovin pro biotechnologické procesy a sledování procesů probíhajících při biodegradaci toxikantů přítomných v životním prostředí.

LITERATURA

1. Harvey E. N.: *Bioluminescence I*. Academic Press, New York 1952.
2. Johnson F. H., Eyring H., Williams R. W.: *J. Cell. Comp. Physiol.* 20, 247(1942).
3. Rockwell Inc.: US 3370175.
4. Bulich A. A.: *Aquatic Toxicology, Second Conference ASTM STP 667. Philadelphia 1979.*
5. Bulich A. A.: *Process Biochem.* 17, 45 (1982).
6. Richardson M. L.: *Ecotoxicology Monitoring*. VCH, Weinheim 1993.
7. Mc Dowell A. S., Boardman G.: *Three Screening Tests for the Evaluation of Groundwater Quality*, (unpublished report), 1984, 1.
8. Microbics Corporation, Inc. (Successor to Beckman Instruments, Inc): *Microtox System Operating Manual*. Microbics Corp., Carlsbad 1982.
9. Janda I., Link M.: nepublikované výsledky.
10. Kafka Z., Punčochářová J., Hřebíková M., Kuraš M.: *Fresenius Environ. Bull.* 4, 707 (1995).
11. Kafka Z., Punčochářová J., Švadlenka J., Kuraš M.: *Toxicol. Environ. Chem.* 63, 119 (1997).
12. Ulitzer S., Weiser I., Yannai S.: *Bioluminescence and Chemiluminescence— Basic Chemistry and Applications*. Academic Press, New York 1981.
13. Ulitzer S.: *Trends Anal. Chem.* 1, 329 (1982).

Z. Kafka and J. Punčochářová (Department of Environment Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague): **Biotests and Their Application on Environmental Analysis**

The article presents a survey of biotests and their application in environmental analysis. Attention is directed towards a bacterial bioluminescence toxicity test (Microtox test) which exhibits a number of advantages in comparison with the other biotests. The factors and sources of errors are discussed which affect the correctness of the results as well as some of its advantages. Its use in the detection of acute toxicity of substances is also assessed where the state of health of the testing organisms is damaged. This plays an important role in environmental protection.