

BIOINDIKÁTORY V MONITORINGU 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 20.X.1999

Klíčová slova: bioindikátory, testy toxicity, biomonitoring

Obsah

1. Úvod
2. Základní pojmy
3. Legislativní opatření
4. Testy toxicity
5. Testovací organismy používané v ČR
 - 5.1. Test akutní toxicity na rybách
 - 5.2. Test akutní toxicity na perloočkách
 - 5.3. Test inhibice růstu sladkovodních řas
 - 5.4. Test inhibice růstu kořene
6. Testovací organismy používané v jiných zemích
 - 6.1. Testy podle DIN
 - 6.2. Testy podle ASTM
7. Závěr

1. Úvod

Sledování procesů znečišťování životního prostředí a účinný přístup k této problematice vyžaduje rozsáhlé znalosti o škodlivých efektech, které v životním prostředí nastávají a o škodlivých faktorech, které je zapříčiňují. Změny v přírodním prostředí způsobené antropogenními vlivy probíhají ve stále rychlejším sledu. Nahromadění ekologických problémů a jejich případné interakce ztěžují mnohdy člověku včasné rozpoznání nebezpečných situací, analýzu příčin a aplikaci vhodných protipatření. Systematický dohled na životní prostředí se proto stává nutností.

Uvedený přehledný referát se zabývá hodnocením účinků znečišťujících látek na živé organismy.

2. Základní pojmy

Ekotoxikologie je vědní odvětví zabývající se účinky chemických látek na strukturu a funkci ekologických systémů se zvláštním důrazem na ovlivnění biotické složky těchto ekosystémů¹.

Ekotoxicitou rozumíme nepříznivý účinek chemikálií na organismy daný koncentrací působící látky a dobou expozice. Tento účinek je modifikován okolními faktory prostředí, např. teplotou, hodnotou pH, spolupůsobením dalších chemických látek včetně složek potravy atd. Reakce na určitou chemickou

látku je různá pro různé druhy použitých testovacích organismů především v závislosti na jejich metabolismu.

Jako bioindikátory jsou označovány organismy nebo skupiny organismů, které odpovídají na zatížení škodlivinami změnami svých životních funkcí nebo které akumulují škodliviny. Mohou tedy poskytnout informace o dopadu xenobiotik na určitý typ organismu a přitom může být zjištěn výsledný efekt škodlivé látky nebo může být sledován časový průběh poškozování biotiky příslušnou toxickou látkou^{2,3}.

K účelům biomonitoringu^{4,5} lze použít i dlouhodobých studií vývoje stavu druhů, druhových skupin populací vybraných druhů rostlin a živočichů a komplexů vegetace. Pomocí biomonitoringu je možné sledovat rozdílné cíle, např. analýzu stavu daných organismů nebo abiotických médií, analýzu zatížení biotických a abiotických složek, změny ekologických podmínek, prostorové a časové porovnávání negativního dopadu toxických látek na živé organismy, kontrolu kvality různých přírodních procesů, stanovení mezních a prahových hodnot koncentrace škodlivých látek atd.

Inhibice vyjadřuje toxické působení kontaminovaného prostředí, které se u organismu neprojevuje smrtícím účinkem, nýbrž jen zpomalením enzymatických reakcí, růstu, rozmnožování, respirace, metabolismu atd.

Ekologické experimenty se provádějí s ohledem na délku expozice toxické látky a podle ní lze sledovat akutní nebo chronické toxické účinky daného xenobiotika⁶.

Akutní účinek bývá charakteristický co nejkratší a jednorázovou aplikací toxikantu a poměrně krátkodobým sledováním intoxikovaného modelu. Akutní toxicita v hydroekotoxikologii se vyjadřuje jako LC_{50} v $mg.l^{-1}$ vody. Tato veličina vypovídá o tom, zda je nebo není sledovaná látka vůči živým organismům použitým pro příslušný biotest škodlivá.

Chronické účinky jsou charakterizovány opakovaným podáváním toxické látky, podle něhož se dělí na testy subakutní (14–28 dní), subchronické (90 dní) a chronické (až 2/3 délky života použitých bioindikátorů). Sledování účinků je dlouhodobé úměrně délce aplikace.

3. Legislativní opatření

Ekotoxikologické testy a metody pro zjišťování nebezpečných vlastností chemických látek a chemických přípravků jsou součástí řady vyhlášek a nařízení, týkajících se problematiky ochrany životního prostředí. Mezi nejdůležitější patří:

- Vyhláška č.339/1997 Sb. MŽP o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů,
- Vyhláška č.251/1998 Sb., kterou se stanoví metody pro zjišťování toxicity chemických látek a chemických přípravků,
- Vyhláška č.299/1998 Sb., kterou se stanoví metody pro zjišťování fyzikálně chemických a chemických vlastností chemických látek a chemických přípravků a vlastností chemických látek a chemických přípravků nebezpečných pro životní prostředí,
- Nařízení vlády č.25/1999, kterým se stanoví postup hodnocení nebezpečnosti chemických látek a chemických pří-

pravků, způsob jejich klasifikace a označování a vydává Seznam dosud klasifikovaných nebezpečných chemických látek.

4. Testy toxicity

Existuje velké množství testů toxicity⁷ lišících se buď použitými bioindikátory nebo sledováním různých reakcí, aspektů, nebo faktorů pro určitý testovací organismus. Výběr biologické metody závisí na rozšíření a vazbě daného organismu na sledovaný ekosystém. Voleny jsou zpravidla takové organismy, které se v hodnocené složce ekosystému přirozeně vyskytují a podstatnou měrou ji ovlivňují (mají např. vliv na komplexnost biologické komunity v daném biotopu). Důležitá je i délka testu⁸, kterou je nutné volit s ohledem na délku života a vývoj organismu.

Akutní testy toxicity se týkají pouze relativně krátkého úseku v životě organismu. V případě použití ryb, dafnií, potkanů a ptáků jako bioindikátorů je volena doba pokusu obvykle 24–48 hodin. Řasy jsou schopné dělit se do 24 hodin a bakterie se v řadě případů dělí na dceřinné buňky za dobu kratší než 1 hod. S ohledem na tyto skutečnosti je třeba upravit délku biotestu s bioindikačními řasami a bakteriemi.

Chronické a subchronické testy trvají značnou část života testovacího organismu. Jedná se např. o reprodukční testy, při kterých se sleduje reprodukční schopnost organismu, nebo růstové testy sledující růst biomasy.

Nejobtížnější a ekonomicky velmi náročné jsou terénní studie probíhající v přírodních podmínkách reálných ekosystémů. Trvají často měsíce až roky a získané výsledky je nutné sladit s daty získanými při měření v laboratoři.

Použitím rostlin jako bioindikátorů se zabývá fytoekotoxikologie. V pracích Federa a Manninga^{9,10} je uveden detailní popis použití rostlin ke zjišťování přítomnosti a množství řady chemických škodlivin, např. oxidu siřičitého, fluorovodíku, těžkých kovů, ethylenu, prachových částic atd. Byly měřeny koncentrace těchto škodlivin v rostlinách nebo byly hodnoceny fyziologické reakce rostlin či jejich biologické změny v souvislosti s působením těchto xenobiotik. V rámci terénní studie pak byla sledována skladba rostlinného porostu v kontaminované lokalitě.

5. Testovací organismy používané v ČR

V naší legislativě je pozornost věnována především hydroekotoxikologii a to zejména posuzování odpadních vod a různých vodních výluhů. Pro ekotoxikologické testování a hodnocení vodních výluhů jsou používány čtyři druhy testovacích organismů reprezentujících různé trofické úrovně¹¹:

- zástupci obratlovců – ryby,
- zástupci zooplanktonu – dafnie (perloočka),
- zástupci fytoplanktonu – řasy,
- semena kulturní rostliny.

Jako součást základních zkušebních baterií testů se využívá rovněž test na bakteriích (např. test inhibice dýchání aktivovaného kalu).

Výběr organismů se provádí na základě odlišné citlivosti jednotlivých zástupců k chemickým látkám ve vodném výluhu. Přitom je nutné vzít v úvahu skutečnost, že laboratorní

podmínky, za nichž se testy provádějí, se mohou výrazně lišit od souhrnu podmínek, při kterých chemikálie v životním prostředí působí. Testovací organismy by měly být přesně definované a snadno dostupné v dostatečném množství s možností laboratorní přípravy vlastních „chovů“. Měla by být známá historie jejich vývoje a pokud možno dokonale prozkoumána jejich anatomie a fyziologie. Při jejich aplikaci se rovněž předpokládá dostatečná citlivost na dané xenobiotikum.

K ověření ekotoxicity jako nebezpečné vlastnosti odpadů se používají čtyři testy akutní toxicity na následujících organismech:

5.1. Test akutní toxicity na rybách

Základním testem v hydroekotoxikologii je určení letální dávky pro ryby po 96 hodinové expozici¹². Kvalitní chov testovacích ryb je stejně náročný jako chov teplokrevných pokusných laboratorních zvířat. V případě ryb přibývá navíc problém přesné definice jejich životního prostředí, tj. vody. Je nutné znát koncentraci vodíkových iontů, iontovou sílu, obsah kyslíku, obsah anorganických látek, obsah mikroorganismů atd. Vlastní test spočívá ve sledování chování a přežívání akvarijních ryb v různých koncentracích toxikantu ve vodném výluhu za definovaných podmínek testu. Nejčastěji se používají akvarijní ryby *Poecilia reticulata* Peters s českým názvem živorodka duhová, méně často pak ryby *Brachydanio rerio* Hamilton-Buchan s českým názvem danio pruhované. Vedle akvarijních typů se využívají i větší druhy ryb jako jsou kapr, karas nebo pstruh. Testovací organismy jsou vybírány ze zdravých chovů v přirozeném poměru pohlaví (nejčastěji 1:1) a test je prováděn za přesně definovaných podmínek (teplota, délka expozice, počet jedinců, množství testovaného roztoku na jeden testovací organismus). Zároveň je realizován kontrolní pokus (paralelní test) prováděný za stejných podmínek s příslušnými testovacími organismy, kde místo testovaného vodného výluhu je sledována ředící voda. V kontrolních nádobách nesmí být během testu zjištěna mortalita ani výrazné změny v chování ryb. Výsledkem testu je zjištění letální koncentrace LC, tj. koncentrace toxikantu vyvolávajícího smrt organismu. Obvykle se stanovuje LC₅₀ znamenající usmrcení 50 % testovacích organismů za určitou dobu působení roztoku.

5.2. Test akutní toxicity na perloočkách

Testování spočívá ve sledování chování a přežívání planktonních koryšů perlooček, které figurují v potravním řetězci ryb (jsou základní potravní složkou ryb) v různých koncentracích toxikantu ve vodném výluhu za definovaných podmínek testu. Nejčastěji používanými organismy jsou perloočka *Daphnia magna* Straus. Podobně jako v předchozím případě musí testovací organismy, jejichž stáří se pohybuje v rozmezí 6–24 hodin, pocházet ze zdravých chovů získaných acyklickou partogenezí (samobřezostí) za přesně definovaných podmínek testu (teplota, délka expozice, počet a stáří jedinců, množství testovaného roztoku na jeden testovací organismus). V kontrolním pokusu nesmí být zjištěna imobilizace nebo mortalita organismů vyšší než 10 %. Výsledkem testu je zjištění imobilizace perlooček spočívající v makroskopicky pozorovatelné neschopnosti samostatného prostorového pohybu. Důvodem zjišťování imobilizace je skutečnost, že je velmi obtížné určit přesný okamžik usmrcení testovacího organismu. Výsledky se vyjadřují hodnotou EC₅₀, což je koncentrace vodného výluhu,

kteřá způsobí imobilizaci 50 % testovacích perlooček za určitou dobu působení testovaného vodného výluhu. V environmentální legislativě je dafnie obecně považována za základní testovací organismus pro ekologické testy.

5.3. Test inhibice růstu sladkovodních řas

Testování spočívá ve sledování vlivu vodou vyluhovatelných toxikantů z odpadů na růst nejjednodušších autotrofních organismů – řas. K tomu se používají planktonní sladkovodní řasy *Scenedesmus subspicatus* Chodat a *Selenastrum capricornutum* Printz. Jednodruhové řasové kmeny se po několika generacích kultivují v definovaném médiu připraveném smícháním odpovídajících objemů zásobních roztoků živin, vody, příslušné koncentrace vodného výluhu toxikantu a inokula – tj. exponenciálně rostoucích řasových buněk. Roztoky se inkubují za přesně definovaných podmínek minimálně 72 hodin a vždy po 24 hodinách od počátku testu se zjišťuje hustota buněk. Předepsané podmínky testu (teplota, osvětlení, délka expozice, typ kultivačního média, celkový objem kultivovaných roztoků, hustota buněk na počátku testu) je nutné dodržet. Hodnota pH se může během zkoušky změnit maximálně o 1,5 jednotky. Výsledkem testu je zjištění inhibice růstu měřená jako snížení růstu nebo růstové rychlosti ve vztahu k růstu kontrolních kultur. Vyjadřuje se hodnotou IC_{50} , což je koncentrace vodného výluhu obohaceného živinami, která způsobí padesátiprocentní redukci růstu nebo růstové rychlosti řasové kultury v určitém časovém intervalu ve srovnání s kontrolním vzorkem. Metody, které využívají řasy jako testovací organismy, jsou ze skupiny tzv. fyziologických metod, jejichž principem je zjistit reakci použitých organismů na toxickou látku¹³. Jako testovací organismy mohou být použity druhově čisté nebo smíšené kultury získané buď ze Sbírek organismů nebo izolací z přírodního prostředí. Výběr vhodné testovací kultury je složitý. Někteří autoři dávají přednost použití smíšených kultur jako modelu, který je bližší skutečným přírodním poměrům. Nevýhodou této volby je ale zhoršená reprodukovatelnost oproti čistým kulturám. Citlivost různých kmenů řas na různé toxikanty může být velmi rozdílná; neexistuje totiž kmen s univerzální reakcí na všechny toxikanty. Při pokusu je možno hodnotit vliv xenobiotika na rozmnožování řas metodou růstových křivek nebo množství nárůstu biomasy po uplynutí zvolené testovací doby např. počítáním buněk pomocí celloskopu, stanovením úrovně chlorofylu nebo ovlivnění kyslíkového režimu ve vodním objemu atd.

5.4. Test inhibice růstu kořene

Testování spočívá ve sledování vlivu vodou vyluhovatelných látek z odpadu na růst kořene v počátečních stádiích vývoje semen kulturní vyšší rostliny. K pokusům se používají semena hořčice bílé (*Sinapis alba*) s minimální klíčivostí 90 %. Test spočívá v kultivaci semen na Petriho miskách se skleněnou nebo silonovou tkaninou nasycenou vodnými výluhy v příslušných koncentracích. Opět je nutné dodržet předepsané podmínky testu, jako je teplota, velikost misek, počet semen v misce, objem testovaného roztoku a délka expozice. V kontrolním pokusu se kultivují semena na podložce nasycené ředící vodou. Výsledkem testu je zjištění průměrné délky kořene v neředěném výluhu nebo jeho ředěních ve srovnání s průměrnou délkou kořene v kontrolním pokusu. Výsledky se

vyjadřují hodnotou IC_{50} , což je koncentrace vodného výluhu, která způsobí padesátiprocentní inhibici růstu kořene ve srovnání s kontrolním vzorkem v určitém časovém intervalu, obvykle 72 hodin.

6. Testovací organismy používané v zahraničí

Z testů používaných v zahraničí se v ČR nejčastěji setkáváme s metodami stanovení biologické toxicity zahrnutými do německé státní normy DIN 38412 (Deutsches Institut für Normung) a do normy ASTM D 4229-84, E 1193-87 (American Society for Testing and Materials) případně US.EPA 600/4-78/012 (Environmental Protection Agency), platnými v USA.

6.1. Norma DIN

(Deutsches Institut für Normung)

Podle této normy jsou stanoveny následující soubory testů pro výluhy:

- 2 testy s použitím bakterií *Pseudomonas putida* a *Photobacterium phosphoreum*,
- test s použitím producentů – řasa *Selenastrum quadricauda*,
- test s použitím primárních konzumentů – koryš *Daphnia magna*,
- test s použitím sekundárních konzumentů – ryba *Leuciscus idus* (Goldenorfe).

Měří se dva typy vzorků – náhodně odebrané reprezentativní vzorky a směšné vzorky (dvouhodinový průměrný vzorek). Výsledkem testu pro akutní toxicitu pro jednotlivé organismy je růstová inhibice pro bakterie a řasy, inhibice luminiscence pro luminiscenční bakterie, imobilita pro dafnie a mortalita pro ryby. V případě průsakových vzorků (sewage samples) je nutné ředění vodou, aby se zjistila koncentrace, při které organismy přežívají. Jako konečné určení toxicity se obvykle nepoužívá průměrná odezva, ale výsledek získaný na nejcitlivějším organismu.

6.2. Norma ASTM (American Society for Testing and Materials)

Test na akutní toxicitu – 48 hodin, dafnie

Tento test patří mezi nejběžnější při posuzování kvality kontaminovaných vod. Jako testovací organismy se pro dobrou dostupnost a snadnou kultivovatelnost používají dafnie – *Daphnia magna* pro tvrdou vodu a *Daphnia pulex* pro měkkou vodu. Nejdůležitějším faktorem ovlivňujícím zdraví a prosperitu jedinců daného druhu je kvalita vody při kultivaci. Pro *Daphnia magna* je např. doporučena tvrdost vody daná obsahem $CaCO_3$ 80–100 mg.l⁻¹.

Průběh testu: 10 jedinců dafnií mladších než 24 hodin je umístěno do kádinky o obsahu 125 ml, obsahující 100 ml testovaného roztoku. Současně se měří 5 koncentrací a kontrolní pokus. Test se provádí celkem třikrát. Protože okamžik smrti lze obtížně určit, je za konečný výstup považována imobilizace organismu. Organismus je považován za imobilní, jestliže se nezačne pohybovat (plavat) ani po doteku pipetou nebo skleněným vláknem. Měření se provádí ve 24 hodinových intervalech a organismy nejsou během pokusu kr-

meny. Tento test je obvyklým testem toxicity pro jednoduché sloučeniny a směsi xenobiotik ve vodných roztocích a pro výluhy. Výhodou testu na dafniích je krátký čas měření, malé množství vzorku, nízká cena a citlivost vůči toxikantům, která je ve srovnání s obratlovcí v řadě případů vyšší. Nevýhodou je citlivost ke kvalitě vody (dafnie je obecně mnohem citlivější k přítomnosti těžkých kovů v měkké vodě než ve vodě tvrdé se zvýšeným obsahem CaCO_3) a časově náročná příprava vhodných kultur těchto bioindikátorů.

Test na akutní toxicitu – 96 hodin, řasy

Jde o měření toxicity xenobiotika ve vodném prostředí vůči sladkovodním a mořským řasám. Ve vodních ekosystémech jsou řasy odpovědné za velké procento primární produkce biomasy. Poškození těchto jednobuněčných fotosyntetizujících organismů by mělo dlouhodobý negativní dopad na celou biotiku. Ze sladkovodních řas se používají zelené řasy *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus subspicatus* a *Chlorella vulgaris* a modrozelené řasy *Microcystis aeruginosa* a *Anabena flos-aque*, z mořských řas pak nejčastěji *Skeletonema costatum*, *Thalassiorisa pseudonana* a *Dunaliella tertiolecta*. Ve zvláštních případech pak mohou být využity další druhy řas, např. se zvýšenou citlivostí na měřené xenobiotikum. Výhodou těchto používaných organismů je jejich snadná adaptovatelnost.

Postup měření: k inokulaci média v testovací nádobce je použito 2×10^4 – 5×10^4 řasových buněk a jejich hustota je po dobu trvání testu denně kontrolována. Počítání buněk se provádí pomocí hemocytometru nebo elektronického částicového počítáče. Hladina chlorofylu se stanovuje spektrofotometricky nebo se měří fluorometricky. Při nízké koncentraci testovacích organismů je fluorometrické měření přesnější. Teplota, světelná intenzita a hodnota pH jsou zaznamenávány průběžně. Další možností měření je zjišťování obsahu DNA, ATP nebo ^{14}C asimilace. Důležitým požadavkem metody je zajištění mikrobiologické sterilizační techniky, aby se snížila na minimum kontaminace jinými řasami a bakteriemi. Tato kontaminace by se mohla projevit např. jako degradace toxikantu zejména bakteriemi a následně poklesem toxicity vodného roztoku. V některých případech může dojít dokonce k eliminaci toxikantu z média. Dalším zajímavým aspektem je zvýšení růstu řas při nízkých koncentracích toxikantu. Důvodem může být např. spontánní hydrolýza nebo jiný rozklad testované sloučeniny, při kterém vzniknou nutriční látky pro testované řasy.

7. Závěr

Pro vypracování jakéhokoliv ekologického projektu je nezbytné důkladné ekotoxikologické posouzení dané situace.

Přítomnost a koncentrace jednotlivých xenobiotik v prostředí však nevypovídá o biologickém riziku, které vyplývá např. ze synergických nebo antagonistických efektů současně působících kontaminantů. Pro účinné zlepšení a ochranu životního prostředí je možno volit v zásadě dva typy strategie monitoringu. Buď se jedná o monitoring škodlivých látek v životním prostředí sledující jejich přítomnost a množství v dané lokalitě (tzv. factor monitoring) nebo se hodnotí dopad těchto škodlivin v určitém místě (tzv. target monitoring). V tom případě se zjišťuje především vliv toxikantů na biotiku, která je navíc ovlivněna i širokým souborem přírodních faktorů. Začlenění biologických metod do celkového hodnocení kontaminačních efektů se proto stává stále významnějším.

LITERATURA

1. Landis W. G., Ming-Ho Yu: *Introduction to Environmental Toxicology: Impacts of Chemicals Upon Ecological Systems*. Lewis Publishers, Boca Raton 1995.
2. Stöhr M.: *Landschaft Stadt 21*, 121 (1989).
3. Kafka Z., Punčochářová J.: *Chem. Listy* 10, 604 (1999).
4. Connel D. W., Miller G. J.: *Chemistry and Ecotoxicology of Pollution*. Wiley, New York 1984.
5. Richardson M.: *Ecotoxicology Monitoring*. Verlagsgesellschaft, Weinheim 1993.
6. Matrka M., Rusek V.: *Planeta* 11, 26 (1993).
7. Cockerham L. G., Shane B. S.: *Basic Environmental Toxicology*. CRC Press, Boca Raton 1994.
8. Pitter P., Grünwald A., Sládeček V., Koller J.: *Základy hydrochemie, technologie vody a hydrobiologie*. ČVUT, Praha 1984.
9. Feder W. A.: *Environ. Health Perspect.* 27, 139 (1978).
10. Manning W. J., Feder W. A.: *Biomonitoring Air Pollutants with Plants*. Applied Science Publishers, London 1980.
11. Olivková E.: *Odběr vzorků odpadů a postup hodnocení nebezpečných vlastností odpadů*. Česká společnost pro jakost, Praha 1998.
12. Matrka M., Rusek V., Bajer T.: *Eko* 2, 12 (1997).
13. Kolektiv autorů: *Nové poznatky z technické hydrobiologie*. Nakladatelství VŠCHT, Praha 1972.

Z. Kafka and J. Punčochářová (Department of Environmental Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague): **Bioindicators in the Environment Monitoring**

A survey of bioindicators utilized in monitoring of the environment is given. Attention is aimed at the tests used in the Czech Republic: tests of acute toxicity on fish and waterfleas, of growth inhibition in fresh-water algae and of root growth inhibition. The test organisms used abroad are also discussed.