

Testy toxicity na salinních vzorcích

Toxicological testing of high-salinity samples

Andrej Švagr, Vladimír Kočí, Tomáš Rakovický

*Ústav chemie ochrany prostředí, VŠCHT – Praha, Technická 5,
CZ - 166 28 Praha 6*

Abstract

The paper deals with the effect of high salinity on toxicity tests evaluation. In the Czech Republic, there is no legislation to adjust it. However, the question is whether it is needed and if so, which estuarine or marine organisms (algae) would be the most appropriate indicators. Further, species from high-salinity water bodies of arid regions are discussed, as well as a standard marine bioassay (ISO 10253).

Úvod

Podle platné legislativní normy se u nás na trofické úrovni producentů využívají při testech toxicity zelené sladkovodní řasy *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus subspicatus* [ČSN EN 28692], *Scenedesmus quadricauda*, příp. *Chlorella kessleri*. Tyto řasy jsou pěstovány a testovány v normalizované sladké vodě (ISO 8692). Lze je, podle Kolbeho systému z roku 1927 v Hustedtově úpravě z roku 1957 (sec. cit. HINDÁK ed. 1978), zařadit mezi organismy oligohalinní s ekologickou valencí na salinitu okolního prostředí zhruba do 200 mg.l⁻¹ (vyjádřeno jako koncentrace NaCl ve vodě). Při vyšší mineralizaci nejsou tyto organismy z osmotických důvodů schopny přežít. Zde se nabízí možnost testovat vzorky s vyšší mineralizací na organismech, jimž je toto prostředí vlastní, tedy na organismech mořských, které dobře snášejí salinitu nad 30 000 mg.l⁻¹ (~ 29 ‰).

1. Co je salinita a co mineralizace ?

Existují určité nejasnosti v definicích a používání pojmů „mineralizace“ a „salinita“. Salinita je hmotnostní množství všech rozpuštěných solí vztažených na objem roztoku (BÍNA a kol. 1976), původně popisovala vlastnost mořské vody. Pro charakteristiku stejné vlastnosti v prostředí sladké vody se používá termín mineralizace. Většinou se do ní zahrnují jen předpokládané dominantní kationty a anionty (Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, K⁺, HCO₃⁻, SO₄²⁻, Cl⁻, NO₃⁻, příp. Si, B) PITTER (1990). Měřicí přístroje často pracují na základě konduktivity zahrnující vliv náboje a teprve potom matematicky převádí naměřené hodnoty na hmotnostní vyjádření salinity či mineralizace

podle předpokládaných dominantních iontů. Díky tomu může docházet k nesouladu mezi naměřeným a skutečným množstvím rozpuštěných solí. Jiné přístroje pracují na principu optické refraktometrie. Zde se výsledky vztahují pouze k okalibrovanému iontu (látce) nebo jejich směsi. Nejjednodušší a nejlevnější je metoda hmotnostní, za použití odparku, příp. vyžihání. Při tom ale dochází k rozkladu hydrogenuhličitanů, organických látek, amonných solí i některých chloridů

Z uvedeného je zřejmé, že stanovení salinity neznámého roztoku je bez celkového rozboru vody a bližších znalostí případu věc poměrně obtížná.

2. Proč testovat „toxicitu vysoké mineralizace“ ?

Každý původce odpadu (nebo ten, kdo s odpadem manipuluje) má podle zákona č. 125/1997 Sb. o odpadech (Od 1.1. 2002 platí nová norma, z. 185/2001 Sb., ale prováděcí předpisy k tomuto zákonu nebyly ještě přijaty) za povinnost zařadit odpad podle jeho vyluhovatelnosti do určité třídy za účelem dalšího nakládání, zejm. skládkování. Vodný výluh se připravuje podle Vyhlášky MŽP ČR 338/97 Sb., o podrobnostech nakládání s odpady a má simulovat děje, které by mohly nastat v reálném prostředí v přírodě nebo na skládce. V tomtéž výluhu se provádějí toxikologické testy se standardizovanými organismy k určení nebezpečných vlastností toxicita a ekotoxicita a k zařazení odpadu podle Kategorizace a katalogu odpadů. Dále se toxikologických testů využívá při hodnocení vlastností nových stavebních materiálů apod.

Lze se domnívat, že jestliže v našich podmínkách dojde k úniku roztoku natolik mineralizovaného (jedná se zejména o průmyslové odpady), že v něm běžné oživení není z osmotických důvodů schopno existovat, je potom závěr hodnocení takového odpadu jednoznačný a není potřeba testovat další toxické vlastnosti.

Při průchodu odpadu půdním komplexem se ale mohou jeho fyzikální i chemické vlastnosti měnit i s možností zachování vlastní toxicity. Při testech, kde to osmotické důvody neumožňují, by se nemělo využívat sladkovodních organismů. Bylo by ale vhodné používat organismy polyhalinní, které jsou v nejpestřejší škále druhů zastoupeny organismy mořskými.

Nastávají i výjimečné situace typu havárií, kdy míra toxicity unikajícího roztoku spolupodmiňuje rozhodnutí akčního „water managementu“ směřujícího k likvidaci neřízeného úniku. Vysoká mineralizace zde může být překážkou k určení priorit řešení.

Dalším důvodem hovořícím pro využití halinních druhů je odpověď na otázky praktického provedení rychlého screeningu v případě havárií. Zde je často potřeba efektivně „vystopovat“ zdroj, nebo i více zdrojů znečištění a

nezáleží na tom, zda roztok s testovacím organismem má atributy sladké či slané vody. Naznačená situace nastala například při úniku kyanidů do řeky Tisy v Rumunsku roku 2000 a k jejímu zvládnutí bylo s úspěchem využito mořské bakterie *Vibrio fischeri* (SOLDÁN 2001). Test na těchto organismech je přitom již v současnosti běžný a provádí se podle platné normy ČSN EN ISO 11348-1.

Nejedná se jen o testování nebezpečných vlastností odpadů. I z hlediska ekologického výzkumu by bylo dobré určit pro dané rozpětí mineralizace vzorku určitý organismus jako standard.

3. Má se vliv mineralizace při hodnocení zanedbávat ?

Protože jsou výsledky biologických testů ovlivněny účinky všech přítomných komponent, mohla by eliminace „toxického“ (spíše fyziologický stres než vlastní toxicita) účinku mineralizované matrice na testovací organismus vést k mylnému opomíjení faktu z toxikologického hlediska stejně důležitého, jakým je přítomnost samotného jedu. Toxicita výluhu je v takovém případě dána jak přítomností toxikantu, tak vlastní mineralizací, a v příslušném hodnocení musí být toto jednoznačně uvedeno.

4. Proč neupravit vzorek před testováním?

Pro srovnávání nebezpečnosti látek a odpadů z hlediska jejich toxicity by bylo ideální používat takovou biologickou jednotku, která by mohla, na dané trofické úrovni, s dostatečnou vypovídací schopností zastoupit jakýkoli jiný organismus místně příslušného ekosystému. Z tohoto hlediska se jeví výhodnou taková úprava vzorku před vlastním stanovením, která zajistí možnost jeho testování na domácích organismech.

Proti možnosti upravovat vzorek ale hovoří několik důvodů:

- Prosté ředění potlačí vliv toxikantu na pozadí „netoxických“ solí.
- Jakákoliv jiná úprava mění vlastnosti vzorku. Podobně jako v případě otázky úpravy pH, i v tomto případě by se mělo s vlastním vzorkem co nejméně manipulovat.
- V souvislosti se současným trendem evropské integrace je namíste uvažovat o odpadech z širšího hlediska. Z pohledu očekávaného vstupu České republiky do Evropské unie je nutné si uvědomit, že současné právní normy Evropských společenství upravující nakládání s odpady jsou s odvoláním na Pátý akční program EU koncipovány pro ochranu životního prostředí jako celku. Lze očekávat, že státní hranice ztratí při nakládání s odpady ten smysl, jak jej chápeme dnes.

5. Které druhy řas by byly nejvhodnější?

Jak bylo uvedeno, tolerance běžných sladkovodních řas je limitována zhruba hodnotou 200 mg.l⁻¹ NaCl. Průměrná salinita vody mořské se pohybuje okolo 35 ‰ (BÍNA a kol. 1976), což odpovídá koncentraci NaCl asi 36 000 mg.l⁻¹. Salinita Rudého moře dosahuje dokonce 60 ‰ (asi 65 g.l⁻¹), čímž je zřejmě určena nejvyšší hranice snášenlivosti běžně se vyskytujících organismů.

Salinita výluhů průmyslových odpadů podle chemického složení daného odpadu pokrývá prakticky celou procentuální škálu.

Podobně vysokou salinitu vykazují vnitrozemská vysychající jezera aridních oblastí (Mrtvé moře ~ 40 ‰). Zde jsme ale při výběru vhodné řasy jakožto testovacího organismu omezeni chudší škálou vyskytujících se druhů, např. *Amphora coffaeiformis*, *Pleurosigma angulatum* (HINDÁK ed. 1977). Salinita totiž nemůže být jediným ukazatelem výběru, musí být brán zřetel i na další běžně popisované vlastnosti a kultivační podmínky, jakými jsou schopnost vyrovnávat se se změnami tepla, požadavky na intenzitu světla, CO₂, nutrienty a celková schopnost stabilního růstu v příhodných podmínkách. Díky vysokým nárokům na chlazení nelze například uvažovat o antarktických řasách jako o vhodném testovacím organismu.

Významnou schopností přizpůsobovat se kolísavým podmínkám růstu se vyznačují druhy původní v brakických vodách, které mohou sloužit jako dobrý univerzální testovací organismus LYTLE & LYTLE (2001). Otázkou vyžadující bližší zkoumání ale zůstává, zda jim tato jejich vlastnost neumožňuje přizpůsobovat se i některým toxikantům, což by mělo negativní vliv na interpretaci, ale i na reprodukovatelnost výsledků.

Podmínky biotestů na mořských řasách upravuje norma ISO 10253 pro řasu *Phaeodactylum tricornutum* pěstovanou v syntetické mořské vodě (ASTM D1141-75). Miniaturizaci této normy na imunologických destičkách provedl LUKAVSKÝ (2001). Možná by bylo praktické převzít tuto normu do systému českých legislativních úprav.

Práce na téma vlivu mineralizace prostředí na jednotlivé druhy řas jsou poměrně vzácné a výběr druhů vhodných z hlediska toxikologického je dosud oblastí unikající vědecké pozornosti. Samotný systém halóbií (analogicky k saprobii) je rozpracován pro rozsivky, které jsou hojně zastoupeny jak v slaných tak sladkých vodách. Z dalších taxonomicky významných skupin řas se ve slané vodě vyskytují např. *Nodularia spumigena*, *Dunaliella salina*, *Enteromorpha intestinalis*, *Chara crinita*, *Ch. foetida*, *Vaucheria* sp., *Chaetoceros* sp., *Nitzschia* sp., *Phaeodactylum tricornutum*, *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira pseudonana*, *Chlamydomonas magnusii*, *Gonyaulax tamarensis* aj.

(HINDÁK ed. 1978, KOMÁREK & LHOTSKÝ 1979) Z nich je v poslední době věnována větší pozornost rodům *Dunaliella* a *Nitzschia* (FISHER et al. 1996, BOROWITZKA et al. 1977, CIFUENTES et al. 1996).

O schopnosti některých řas přizpůsobit se i relativně značně zvýšené hladině mineralizace svědčí například studie popisující situaci v indické sladkovodní nádrži Narendra (MOHAPATRA et al. 1998). Nádrž se nachází uprostřed komplexu budov svatého města a díky tisícům poutníků, přicházejících v určitou dobu, a nestálé hladině zde v průběhu roku salinita kolísá v rozmezí koncentrací NaCl od 220 do 970 mg.l⁻¹. Tito poutníci totiž v nádrži provádějí očištnou lázeň, včetně praní šatů poté, co se na své cestě vykoupli v Bengálském zálivu. Autoři zjistili, že místní řasa *Scenedesmus bijugatus* výborně prosperuje (s přidavkem živin) i při salinitě 1,7 ‰, což odpovídá koncentraci NaCl asi 1695 mg.l⁻¹.

Jiná práce, zabývající se odpovědí tohoto toxikologicky významného rodu na salinitní stres, je studie o *Sc. regularis* a *Sc. pectinatus*

HEGEWALD et al. (2001). Tyto řasy jsou schopny prosperovat ještě kolem koncentrace NaCl 2500 mg.l⁻¹.

Dále byla studována tolerance mořské řasy *Dunaliella tertiolecta* na změny mineralizace (SPETCH & MILLER 1975). Testována byla salinita v rozsahu 5 - 35 ‰. Ukázalo se, že za přítomnosti živin (PO₄²⁻, NO₃⁻, NH₄⁺), je tato řasa vysoce univerzálním a pro svou stabilitu se k biotestům hodícím organismem. Po 10-ti dnech dosahovala suchá hmotnost biomasy od 100 mg.l⁻¹ při 5 ‰ do necelých 300 mg.l⁻¹ při 35 ‰.

Také byl studován vliv extrémně vysoké salinity, 3 až 23 ‰ (rozpuštěnost NaCl ve vodě při 20° C je asi 26% - FOGL & VOLKA 1994, na složení fotosyntetizujícího bentosu (CLAVERO et al. 2000). Vzorek bentosu byl odebrán ze zasolených nádrží se salinitou kolem 5 ‰. Po pěti dnech byly sledovány změny složení mikroorganismů v salinitní řadě 3, 9, 13, 18 a 23 ‰. V rozmezí 6 ‰ - 15 ‰ převládaly rozsivky, při vyšší salinitě dominovaly sinice, které nejsou pro toxikologická stanovení vhodné. Z rozsivek se nejčastěji objevoval druh *Amphora sp.* při salinitě 5 ‰ - 8 ‰ a druh *Climaconeis scopulorioides* při salinitě 5 ‰ - 13 ‰.

Kromě popisu vlivu salinity na některé zelené řasy byly uveřejněny i práce týkající se řas jiných, většinou ale s výsledky nacházejícími ne příliš významnou korelaci mezi zvyšující se salinitou a sledovanou veličinou, zastupující prosperitu organismů (BRODERICK & DAWES 1998, BUSKEY et al. 1998, RODRIGO & ROBAINA 1997, WOLFE et al. 1998, NYGAARD & EKELUND 1999).

Publikována byla i práce studující halofilní sinice (BROCK 1976). Sinice jsou ale, z hlediska jejich vlastností, pro toxikologická stanovení nevhodné.

Práce zabývající se vlivem salinity na řasy byly vyhledány pomocí dostupných databází (PolTox, Biotechnobase, Beilstein Abstracts, Compendex, Embase, Elsevier, Biobase, Fluidex, Gebase, OceanBase, World Textiles).

ZÁVĚR

- Při provádění toxikologických testů na řasách by měl být brán v úvahu vliv vysoké salinity (mineralizace) prostředí na schopnost existence testovacího organismu.
- Prací na téma vliv vysoké salinity na jednotlivé druhy řas je relativně málo, tato oblast dosud uniká vědecké pozornosti.
- Pro testy na vzorcích s vysokou salinitou by bylo dobré normalizovat druhy řas k tomu vhodné.

LITERATURA:

- BÍNA, J. a kol. (1976): Malá encyklopedie chemie, 1. vyd. Praha, SNTL
- BOROWITZKA, L.J., KESSLEY, D.S. & BROWN A.D. (1977): The salt relations of *Dunaliella*. Further observations on glycerol production and its regulation. *Archives of Microbiology*, 113: 131-138
- BROCK, T.D. (1976): Halophilic-blue-green algae. *Archives of Microbiol.*, 107: 109-111
- BRODERICK, M.E. & DAWES, C.J. (1998): Seasonal photosynthetic and respiratory responses of the red alga *Bostrychia tenella* (Ceramiales, Rhodophyta) from a salt marsh and mangal.- *Phycologia*, 37(2): 92-99
- BUSKEY, E.J.; WYSOR, B. & HYATT, C. (1998): The role of hypersalinity in the persistence of the Texas 'brown tide' in the Laguna Madre. *Journal of Plankton Research*, 20(8): 1553-1565
- CIFUENTES, A.S., GONZALES, M.A. & PARRA O.O. (1996): The effect of salinity on the growth and carotenogenesis in two Chilean strains of *Dunaliella salina* Teodoresco. *Biol. Res.*, 29: 227-236
- CLAVERO, E., GARCIA-PICHEL, F., GRIMALT, J.O. & Hernández-Maríné, M. (2000): Behaviour of Diatoms apparently adapted to salinity. The case of *Climaconeis scopulorioides* and *Amphora* sp. Sborník konference Algae and Extreme Environments - Ecology and Physiology, Třeboň, Czech Rep.
- FISHER, M., GOKHAM, I., PIK, U. & ZAMIR, A. (1996): A salt-resistant plasma membrane carbonic anhydrase is induced by salt in *Dunaliella salina*. *The Jour. Of Biol. Chem.*, vol. 271, July 26, pp. 17718-17723
- FOGL, J., VOLKA, K. (1994): Analytické tabulky, 5. vyd., VŠCHT Praha
- HEGEWALD, E., STOJKOVIC-TADIC, S., BELKINOVA, D. & MLADENOV, R. (2001): *Scenedesmus regularis* Svir. (Chlorophyta, Chlorophyceae), its taxonomy and salt stress response. *Algolog. Studies*, vol. 102, Stuttgart, pp. 147-159
- HINDÁK, F. (ed.) (1978): Sladkovodné riasy, SPN Bratislava

- KOMÁREK, J. & LHOTSKÝ, O. (1979): Review of algal assay strains, *Algal Assays and Monitoring Eutrophication*, pp. 103-118
- LUKAVSKÝ, J. & SIMMER, J. (2001): Microprocedure for a standard marine bioassay (ISO 10253). *Algolog. Studies*, 101: 137-147
- LYTLE, J.S. & LYTLE, T.F. (2001): Use of plants for toxicity assessment of estuarine ecosystems. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20:68-83
- MOHAPATRA, P.K.; DASH, R.C.; PANDA, S.S.; MISHRA, R.K. & MOHANTY, R.C. (1998): Effects of Nutrients at Different Salinities on Growth of the Freshwater Green Alga *Scenedesmus bijugatus* in Water of Narendra Pond, Puri, Orissa. *International Review of Hydrobiology*, 83(4): 297-304
- NYGAARD, C. & EKELOUND, N.G. (1999): Effects of lead (PbCl₂) on photosynthesis and respiration of the bladder wrack, *Fucus vesiculosus*, in relation to different salinities. *Water Air and Soil Pollution*, 116(3-4): 549-565
- PITTER, P. (1990): *Hydrochemie*. SNTL Praha
- RODRIGO, M. & ROBAINA, R.R. (1997): Stress tolerance of photosynthesis in sporelings of the red alga *Grateloupia doryphora* compared to that of Stage III thalli. *Marine Biology*, 128(4): 689-694
- SOLDÁN, P. (2001): Methods of detection of a toxic impact of Baia Mare accident used by the Czech Experts (přednáška). *Změny životního prostředí a jejich bioindikace*, Bartošovice
- SPETCH, D.T. & MILLER, W.E. (1975): The Development of a Standardized Marine Algal Assay Procedure for Nutrient Assessment. *Proceedings: Biostimulation (and) Nutrient Assessment Workshop*, Ecological Res. Series
- WOLFE, M. F., SCHWARTZ, G. J. B., SINGARAM, S., MIELBRECHT, E. E., TJEERDEMA, R. S. & SOWBY, M. L. (1998): Effects of Salinity and Temperature on the Bioavailability of Dispersed Petroleum Hydrocarbons to the Golden-Brown Algae, *Isochrysis galbana*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 35: 268-273