

Aplikace řasových biotestů pro hodnocení SPMD.

Application of algal bioassays for toxicity evaluation of SPMD.

Vladimír K o č í¹, Martin M l e j n e k¹, Tomáš O c e l k a² & Lucie K o c h á n k o v á¹

¹*Ústav chemie ochrany prostředí, VŠCHT, Technická 5, CZ-166 28 Praha 6.*

vladimir.koci@vscht.cz <http://www.sweb.cz/ekotoxikologie/>

²*OHS Frýdek-Místek, Národní referenční laboratoř pro persistentní organické látky, Palackého 121, CZ-738 01 Frýdek-Místek.*

Abstract

This article focuses on a passive method of environmental sampling – semipermeable membrane device (SPMD). A sensitivity of algal bioassays for evaluation of SPMD in comparison to the test on photobacteria *Vibrio fischeri* was examined. We found that the sensitivity of algal bioassay was higher. Moreover, algal bioassay can better differentiate dialysates exposed to toxic and nontoxic conditions.

Úvod

Metodika vzorkování různých komodit životního prostředí pomocí semipermeabilních membrán (SPMD) je velmi perspektivní. Řadí se mezi metodiky tzv. pasivního vzorkování. Ve srovnání s konvenčním bodovým vzorkováním v určitém čase a na určitém místě poskytuje systém SPMD několik výhod. Základní ideou postupu je určité „zakoncentrování“ sledovaných kontaminantů prostředí a následná chemická a toxikologická analýza identického vzorku (HUCKINS et al. 1999). Toxikologických studií zabývajících se hodnocením exponovaných SPMD zatím nebylo zveřejněno mnoho. Jednalo se vesměs o hodnocení pomocí luminiscenčního testu na *Vibrio fischeri* a na komerčně dostupných toxkitech (SABALIUNAS et al. 1998, 2000). V této práci jsou zveřejněny první výsledky zkoušek toxicity SPMD na řasách.

Pasivní vzorkování

Metodiky odběru vzorků z prostředí lze rozdělit na dvě skupiny: bodové odběry a pasivní vzorkování. Bodové odběry představují většinou používané konvenční odběry v určitém čase a na konkrétním místě. Takovéto vzorkování s sebou nese určité nedostatky:

- analýzy vzorků získaných z bodových odběrů reprezentují pouze zbytkové složení v okamžiku odběru a nemusí zachytit periodickou kontaminaci
- nastávají problémy při kontrole kvality a manipulaci s velkými objemy vody potřebnými k analýze stopových koncentrací polutantů
- běžnými analytickými postupy není stanovována koncentrace skutečně rozpuštěných a biodostupných kontaminantů
- toxikologická data a chemická kritéria kvality vody jsou založena pouze na koncentraci rozpuštěných látek, ne na celkovém množství polutantů ve vodě
- běžné postupy často zklamou při stanovení stopových množství bioakumulujících kontaminantů, objemy vzorků pro biotesty jsou zřídka dostačující

Těmto nedostatkům lze předejít použitím metod pasivního vzorkování, mezi jejichž hlavní výhody patří:

- vysoká citlivost na specifické kontaminanty
- vzorkování biologicky dostupných kontaminantů
- eliminace náhodných změn v úrovni koncentrace, zprůměrované - integrální vzorkování
- u biotestů akumulace polutantů bez metabolizace
- zakoncentrování látek pro chemickou analýzu a biotesty
- komerční dostupnost ve srovnání s náklady na chronické testy a na složité zahušťování stopových koncentrací sledovaných látek
- možnost uchování vzorku pro pozdější potřebu

Pro efektivní hodnocení stavu kontaminace životního prostředí antropogenními polutanty je nezbytné revidovat použitelnost konvenčních bodových odběrů a používat pro vhodné aplikace pasivní metodiky odběru vzorků (KOČÍ et al. 2001a).

Metodika SPMD

Metoda pasivního vzorkování pomocí SPMD (semipermeable membrane device) je stále častěji používána pro akumulaci lipofilních, persistentních

organických látek. Důraz na trvalou inventarizaci persistentních organických látek (POP) vyplývá z ratifikace Stockholmské konvence o persistentních organických látkách. Přítomnost POP a těžkých kovů ve vodě odráží významné riziko jejich transportu do potravního řetězce.

POP jsou ve vodních ekosystémech obsaženy ve velmi nízkých koncentracích a jejich analytické stanovení je proto spojeno s problematickým zpracováním velkého množství vzorku pro dosažení požadované meze detekce. Toxikologické metody stanovení POP naráží na problémy špatné rozpustnosti těchto látek ve vodě, potřebu chronické expozice nízkých koncentrací a zavádění nestandardních podmínek provádění testů. To vše vede k zvýšené náročnosti na environmentální monitoring POP jak v oblasti analytické, tak ekotoxikologické a tudíž i k vyšším finančním nárokům.

Metoda SPMD, která je řazena k metodám *in-situ*, v sobě skrývá velký aplikační potenciál. Mezi nejvýznamnější použití patří rutinní monitorování POP, vyhledávání bodových zdrojů znečištění, sledování hygienicky významných toků, kvality surové vody přitékající na vodárny, zjišťování reziduálních polutantů a zbytkové toxicity z výtoků z čistíren odpadních vod atd. Významné místo pro některé aplikace také zaujímají imunologické testy a testy toxicity exponovaných SPMD, jež jsou významnými komplementárními metodami k chemickým metodám. (KOČÍ et al. 2001b, OCELKA & KOČÍ 2001). SPMD mají několik aplikačně významných vlastností.

- Expozice SPMD membrány v toku poskytuje integrální neboli časově zprůměrovanou informaci o množství i periodicky se vyskytujících polutantů.
- Užití SPMD dobře simuluje proces difúze přes biomembrány (např. epitel rybích žaber), který je považován za rozhodující při biokoncentraci polutantů.
- SPMD dokáží simulovat proces biokoncentrace v živém organismu.
- SPMD jsou vyráběny ze syntetických materiálů, jsou plněny syntetickým trioleinem (alternativa rybího tuku) a umožňují tak větší jednotnost a reprodukovatelnost analýz než živé organizmy.
- Zachytí širokou škálu chemikálií, včetně takových, které jsou organizmy metabolizovány.
- Mohou být exponovány nejen ve vodním prostředí, surové či upravené vodě, ale i v sedimentech.
- Pro toxikologická stanovení poskytují relevantní směs polutantů přítomných v životním prostředí (OCELKA et al. 2001a, PETTY et al. 2000).

Základem SPMD je polyethylenová membrána nízké hustoty, porozity do 10^{-9} m, oboustranně zatavená, rozměrů 2.5 x 91 cm, naplněná 1 ml trioleinu vysoké čistoty (97%). Tato membrána se umísťuje do pater ochranného vzorkovacího koše pomocí pružinek a háčků (Obr.1). Celý systém je zhotoven z nerezové oceli a je opatřen teplotním čidlem zaznamenávajícím teplotu po celou dobu

expozice. SPMD se používají snadno díky jejich standardizaci a komerční dostupnosti; lze je aplikovat v nejrozličnějších ekosystémech (Obr.2).

Použití řasových biotestů pro hodnocení SPMD

V naší práci byly použity standardní SPMD, výrobce EST (Environmental Sampling Technology). Ochranné koše byly použity originální (dodavatel ExposMeter AB) nebo modifikované (dodavatel Labicom s.r.o.). Díky standardním typům SPMD bylo možné provést přepočítání na integrální hodnotu koncentrace kontaminantu ve vodě.

Aplikace byly voleny za účelem monitorování persistentních organických látek, zejména PCDD/F, PAU, PCB, OCP, v různých ekosystémech. Aktuální skupinou polutantů se stávají PBDE, jejichž koncentrace ve složkách životního prostředí má stoupající tendenci.*

Cílem práce bylo zhodnotit pohyb POP a reziduální toxicity během procesu čištění na ČOV. Byla zvolena ČOV Ostrava (Obr.3), která zahrnuje několik zajímavých vstupů: splaškové vody (A), splaškové vody + neurčitý průmyslový (D), odpady z koksoven Šverma a Svoboda. Uvedená aplikace měla objasnit významné parametry na tvorbu kalu. V rámci aplikace byly sledovány tyto parametry: PAU (12 z 16 US EPA, vyjma naftalenu), PCB (rozsah měřitelných kongenerů - cca 95), PCDD/F (rozsah kongenerů dle TEQ WHO, z roku 1998) (OCELKA et al. 2001b, RÁCLAVSKÁ et al. 2001).

Membrány byly po expozici (2 krát 1 měsíc) řádně očištěny od mechanických nečistot, následně opláchnuty a osušeny. Dialýza se prováděla 3 dny s výměnou rozpouštědla každý den (3x 250 ml hexanu). Poté byl dialyzát zakonzentrován do objemu 10 ml. Dialyzovány byly vždy 2 membrány z každého odběru, přičemž výsledný objem dialyzátu činil 10 ml.

Pro toxikologické hodnocení bylo převedeno 2,5 ml dialyzátu do 2,5 ml směsi vhodně zvolených rozpouštědel.

Na dialyzátech ze SPMD byly komplementárně provedeny testy inhibice luminiscence bakterií *Vibrio fischeri* a chlorokokálních řas *Scenedesmus subspicatus*. Doba expozice byla v případě testu na bakteriích 5 a 15 minut, u řasového testu se jednalo o 96 hodinovou expozici. Pro oba testovací organizmy byly určeny efektivní koncentrace EC50 (Obr. 3-4). Koncentrační jednotky u řasového testu byly vyjádřeny v logaritmickém měřítku. Citlivost obou organizmů srovnává Obr. č.5.

Z výsledků jednoznačně vyplývá větší vhodnost řasového testu pro odlišení dialyzátů exponovaných v toxickém a méně toxickém prostředí. Rozdíly u luminiscenčního testu nebyly tak velké, jako u řasového biotestu, kde byly zaznamenány řádové rozdíly. Z dalších předností řasového biotestu je třeba zmínit:

sladkovodní řasy se vyskytují v tocích našich řek

- řasový test zachycuje chronickou toxicitu látek přítomných v tocích
- výrazný rozdíl v odezvě mezi toxickým a méně toxickým vzorkem
- možnost miniaturizace testu pro malé objemy vzorků

Závěr

Řasový biotest se ukázal jako výrazně vhodnější prostředek pro toxikologické hodnocení dialyzátů z exponovaných SPMD membrán. Jeho rozlišovací schopnost pro toxické a netoxické vzorky je několikařádově lepší nežli u doposud používaného testu na inhibici luminiscence bakterií *Vibrio fischeri*.

Vysvětlivky zkratk

PCDD/F polychlorované dibenzodioxiny/dibenzofurany

PAU polyaromatické uhlovodíky

PCB polychlorované bifenyly

OCP organické chlorované pesticidy

PBDE polybromované difenylethery

Literatura

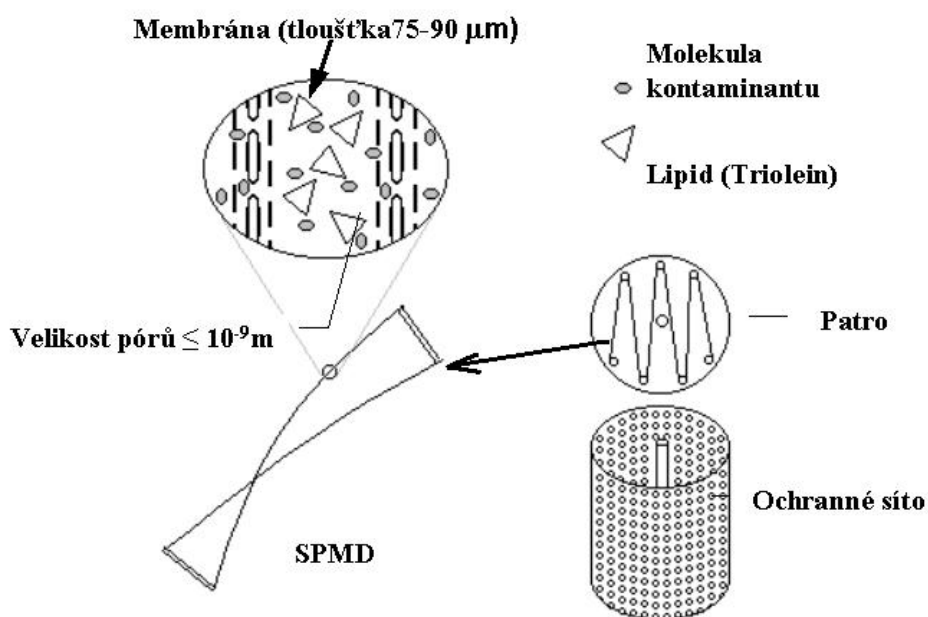
- HUCKINS, J.N., PETTY, J.D., ORAZIO, C.E., LEBO, J.A., CLARK, R.C., GIBSON, V.L., GALA, W.R. & ECHOLS, K.R. (1999): Determination of Uptake Kinetics (Sampling Rates) by Lipid-Containing Semipermeable Membrane Devices (SPMDs) for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Water.- *Environ.Sci.Technol.* 33: 3918-3923.
- KOČÍ, V., OCELKA, T. & KOCHÁNKOVÁ, L. (2001a): Semipermeabilní membrány – popis perspektivní metodiky monitorování persistentních organických polutantů v povrchových vodách a vodárenských zdrojích. - *Vodní hospodářství* 12: 1-2.
- KOČÍ, V., OCELKA, T. & KOCHÁNKOVÁ, L. (2001b): Semipermeabilní membrány – moderní přístup pasivního vzorkování. - *Vodní hospodářství* 11: 330-331.
- OCELKA, T. & KOČÍ, V. (2001): Užití SPMD (semipermeabilních membrán) ve vodárenství a pro hygienický monitoring. 17. seminář Aktuální otázky vodárenské biologie, Praha, 106-113.
- OCELKA, T., GRABIC, R., KOČÍ, V., HAPALA, P., ŠEBESTOVÁ M. & ČÍŽKOVÁ, M. (2001a): Použití SPMD pro monitoring Kvality pitných a glaciálních vod. Porovnání výsledků z SPMD a ryb. EKOANALYTIKA 2001, TESTY TOXICITY, Seč, 181-184.
- OCELKA T., GRABIC, R., HAPALA, P., ČÍŽKOVÁ, M., KOČÍ, V. & RÁCLAVSKÁ, H. (2001b) The semipermeable membrane device (SPMD) for monitoring aquatic environment. Application in sewage treatment plants. In: *Proceedings, 21st International symposium „Industrial toxicology 2001“*, Bratislava, p. 36-44.
- PETTY, J.D., JONES, S.B. & HUCKINS, J.N. (2000): An approach for assessment of water quality using semipermeable membrane devices (SPMDs) and bioindicator tests. *Chemosphere* 41: 311-321.
- RÁCLAVSKÁ, H., OCELKA, T., GRABIC, R., ČÍŽKOVÁ, M., ŠEBESTOVÁ, M., CARBOLOVÁ, J., ŠAMŠOVÁ, J., KOČÍ, V. & PRAŽÁK, J. (2001): Kontinuální monitorování organických látek pasivní metodou (SPMD) na ČOV Ostrava. In: 4. Mezinárodní bienální konference a výstava Odpadní vody – WasteWater, Mladá Boleslav, p. 493-496.

SABALIUNAS, D., LAZUTKA, J.R. & SABALIUNIENE, I. (2000): Acute toxicity and genotoxicity of aquatic hydrophobic pollutants sampled with semipermeable membrane devices. *Environmental Pollution* 109: 251-265.

SABALIUNAS, D., LAZUTKA, J.R., SABALIUNIENE, I. & SÖDERGREN, A. (1998) Use of semipermeable membrane devices for studying effects of organic pollutants: Comparison of pesticide uptake by semipermeable membrane devices and mussels. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 17(9): 1815-1824.

Obr.1: Uspořádání SPMD

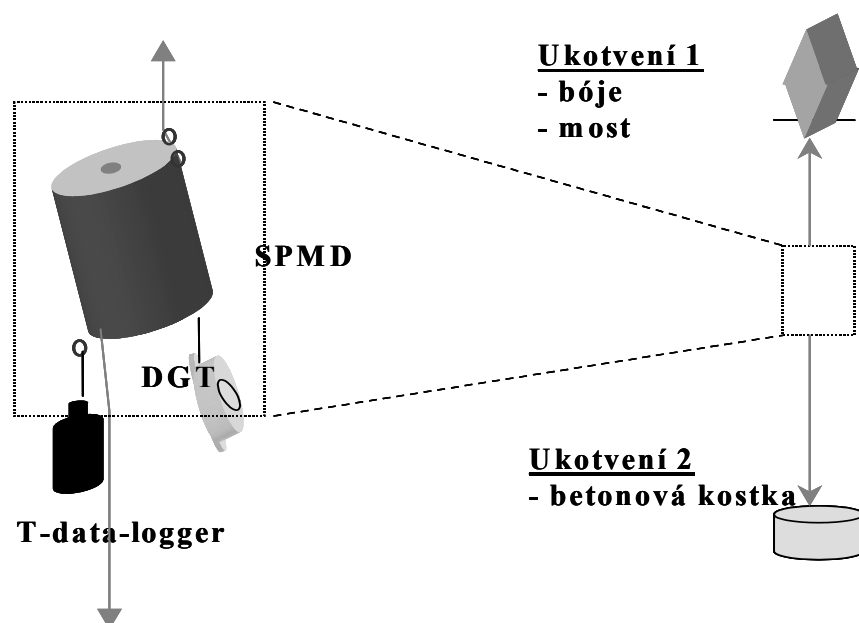
Fig. 1: The arrangement of SPMD



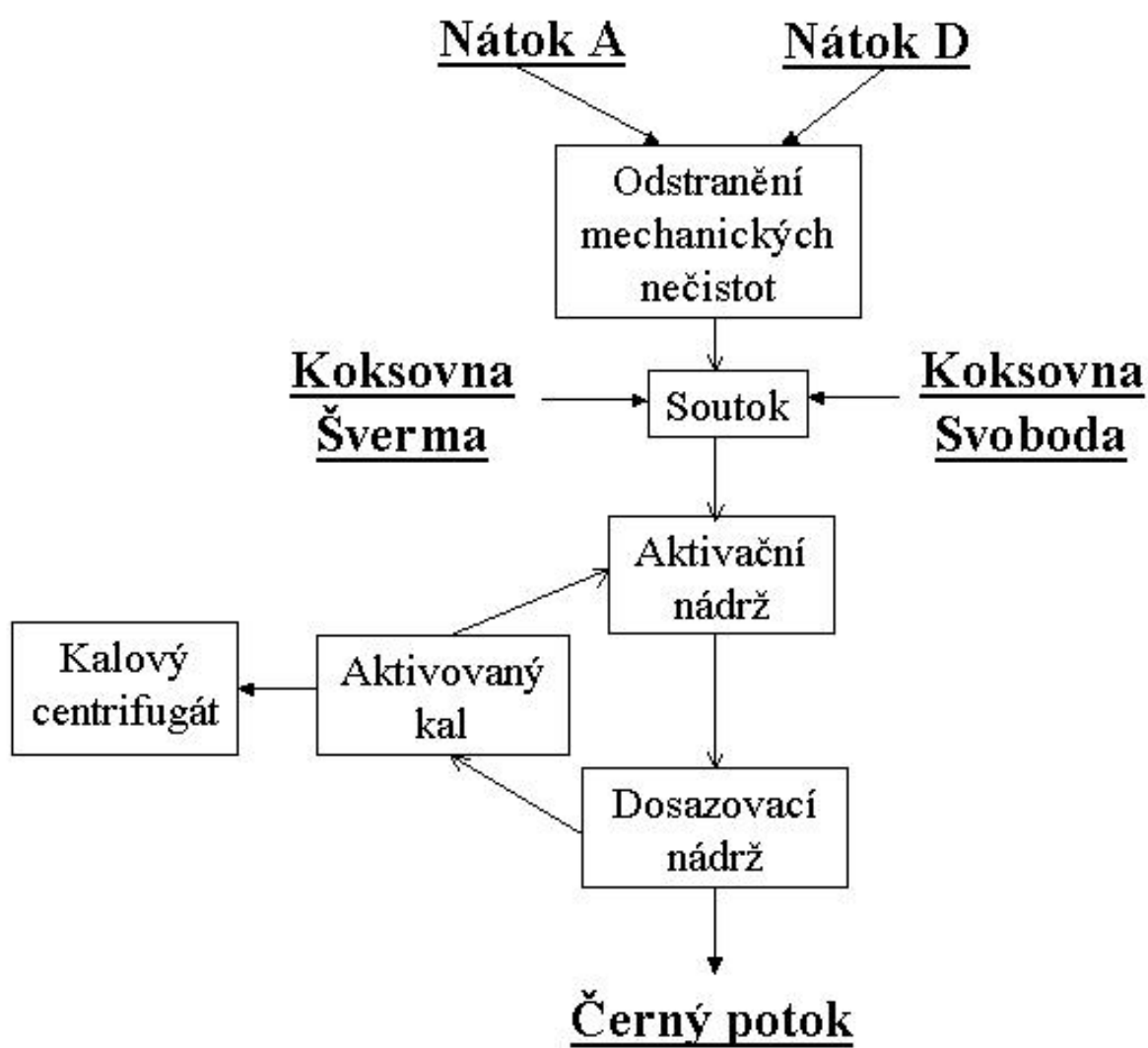
Obr.2:

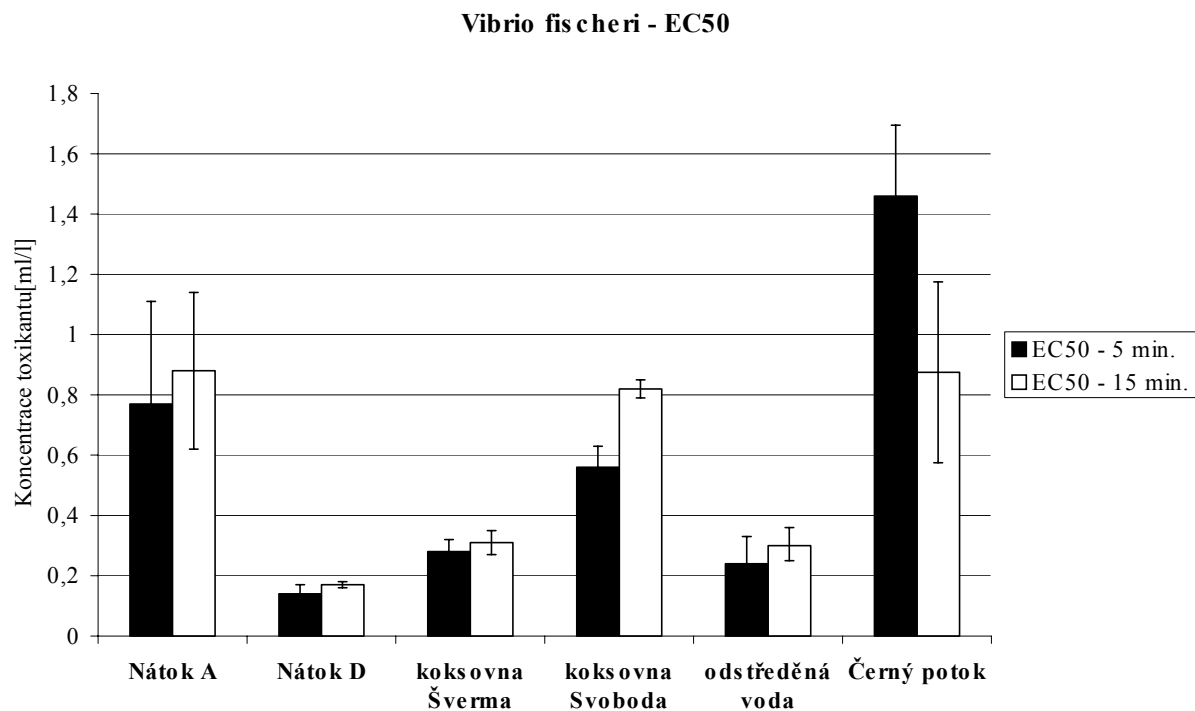
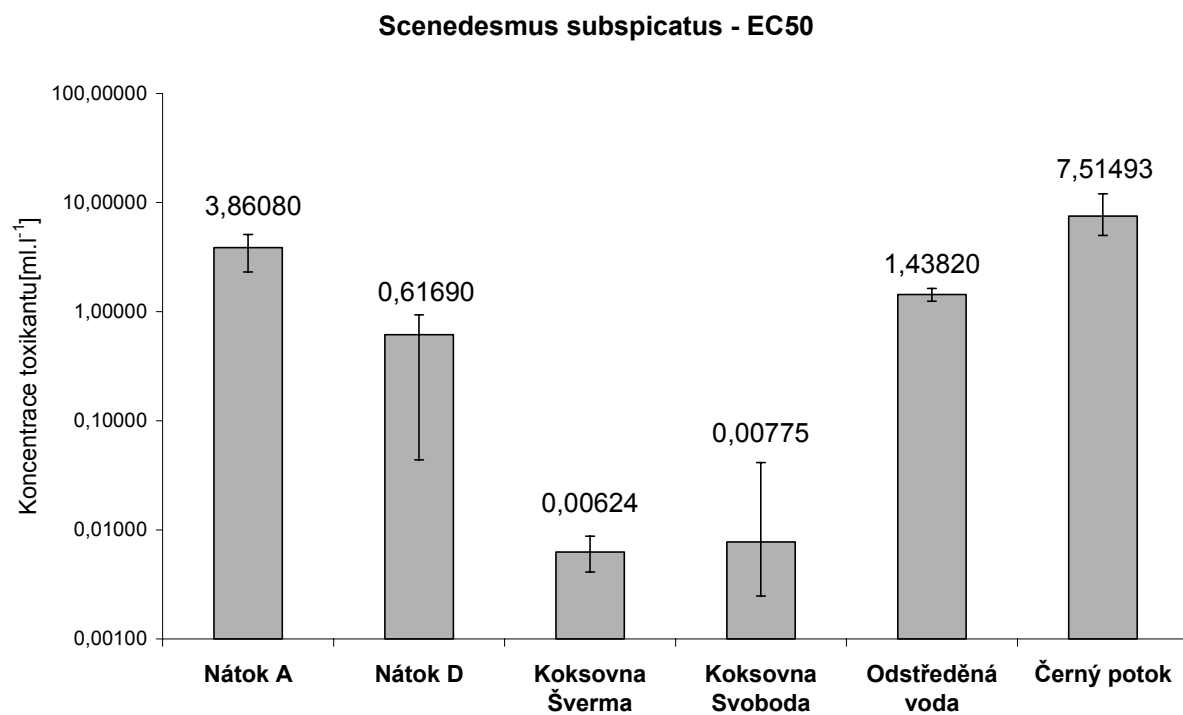
Umístění SPMD v ekosystému

Fig. 2: The location of SPMD in ecosystem



Obrázek č.2: Schéma čistírny odpadních vod Ostrava
Fig. 2: Scheme of Ostrava Waste Water Treatment Plant



Obr. 3: Efektivní koncentrace EC50 pro *Vibrio fischeri*Fig 3: The effective concentration EC50 – *Vibrio fischeri*Obr. 4: Efektivní koncentrace EC50 pro řasu *Scenedesmus subspicatus*Fig 4: The effective concentration EC50 – *Scenedesmus subspicatus*

Obr. 5: Srovnání citlivosti použitých organismů
Fig 5: Comparison of sensitivity of organisms

