ŽIVÉ ORGANISMY JAKO DETEKTORY TOXICKÉHO ZNEČIŠTĚNÍ VODY V REÁLNÉM ČASE

Living organisms as real-time detectors of toxic pollution of water

8: 200 - 435, 2006
ISSN 1212-4117

Šárka Veselá

Ústřední vojenská nemocnice v Praze, odbor rozvoje, výzkumu a vývoje

Summary

For the detection of the toxic pollution over real time, so called biological early warning systems (BEWS) were developed. They are devices using living organisms as detectors of toxic pollution and comprising several parts: A water delivery system, an experimental chamber, an electronic or mechanical sensor (camera), from which the data measured are transmitted to an analyzer and alarm system, which will announce the toxicity found. The pollution monitoring is essentially continuous or it is performed repeatedly at very short intervals, time necessary for the detection is reduced to a minimum period, and the pollution detection is non-specific. For purposes of living biological detectors, fish, clams, water fleas and algae are most frequently used. The BEWS instruments were step-wise developed. Immobility or possibly death of the organism tested was first followed and latter applications were aimed at following changes in the behaviour and in physiologic parameters. BEWS are widely used for the on line monitoring of the toxic pollution. They are employed for monitoring the water quality and detection of accidents or deliberate pollution of rivers, following of water quality discharged from production enterprises, factories, waste water treatment plants and for monitoring the health non-harmfulness of water in water supply systems. The target of the work is to present basic data about problems of the BEWS and to make the reader familiar with the principle of the BEWS, with their possibilities and restrictions, with their use, principle of their function and with organisms used for their operation.

Key words: biological early warning systems – BEWS – on-line detection – biodetector – biomonitoring

Souhrn

Pro detekci toxického znečištění v reálném čase byly vyvinuty takzvané „biologické systémy časného varování“ (BEWS – biologically early warning systems). Jsou to zařízení, která jako detektor toxického znečištění využívají živý organismus a skládají se z několika částí: zařízení na odběr testované vody, experimentálních prostor, elektronického či mechanického čidla (kamery), odkud jsou naměřená data přenášena do analyzátoru a alarmu, jenž upozorní na zjištěnou toxicitu. Monitorování znečištění je prakticky kontinuální nebo probíhá opakovaně ve velice krátkých intervalech, čas nutný pro detekci je snížen na minimum, detekce znečištění je nespecifická. Nejčastěji se pro účely živých biodetektorů využívají ryby, mlži, perloočky a řasy. Přístroje BEWS byly vyvíjeny postupně. Nejprve byla sledována imobilita, popřípadě úmrtí testovaného organismu, postupem času se začalo využívat sledování změn v chování a ve fyziologických parametrech. Využití BEWS pro on-line monitoring toxického znečištění je široké. Jsou používány pro monitorování kvality vody a pro zachycování havárií či úmyslného znečištění říčních toků, sledování kvality vody vypouštěné z výrobních podniků, továren, čistíček odpadních vod, pro monitorování zdravotní nezávadnosti vody ve vodovodním řádu. Cílem článku je podat základní údaje o problematice BEWS. Seznámit čtenáře s tím, co to BEWS jsou, jaké jsou jejich možnosti a omezení, jak a kde je lze využít, jaký je princip jejich funkce a které organismy jsou v nich používány.

Klíčová slova: biologické systémy časného varování – BEWS – on-line detekce – biodetektor – biomonitoring

ÚVOD

Živé organismy jsou pro detekování toxického znečištění využívány již dlouho. Za první „živé biodetektory“ je možno považovat ochutnávače pokrmů a nápojů na dvorech významných osob. Římský císař Nero (54–68 n. l.) používal otroky k rozpoznávání jedlých a nejedlých druhů hub (Gallo, 2001). Do všeobecného povědomí se dostal i biodetektor „kanárek v kleci“, jenž sloužil horníkům v dolech k detekci zamoření těžebních prostor škodlivými plyny. Pro detekci úniku nervově paralytických látek ve vojenských skladech bývaly ještě nedávno do těchto prostor rozmístovány klece s králíky (States et al., 2003).

Využití organismů pro detekci toxického nečištění má své výhody a nevýhody. Při využití živého biodetektoru, pokud není jeho cílem monitorovat únik jedné konkrétní látky, je detekce znečištění nespecifická. To znamená, že zařízení ohlásí, že „něco je špatně“, ovšem neidentifikuje co. Toto je výhodou i nevýhodou. Toxické látky se většinou vyskytují ve směsích. V případě použití specifických metod detekce může být zachycena pouze jedna ze směsí látek, a to v množství, které nevykazuje toxické účinky. Avšak celkový toxický projev směsi není zachycen. Jednotlivé látky mohou účinek na organismus navzájem sčítat či dokonce násobit, nebo naopak může jejich toxicita poklesnout. K negativnímu ovlivnění organismu může též dojít až po delší době působení. Jednotlivé látky ve směsi spolu mohou postupně reagovat a vytvářet sloučeniny ještě toxičtější, než byly původní. Toxicita látky či směsi také závisí na prostředí, ovlivňuje ji například hodnota pH, množství rozpuštěných solí či teplota. Rizikem při použití specifické detekce je i možné nezachycení škodliviny, a to jak z důvodu nízké koncentrace, tak kvůli nevhodné metodice detekce a analýzy. Průběžné monitorování znečištění pomocí specifických metod je z mnoha důvodů prakticky neproveditelné (čas nutný pro přípravu vzorků a provedení analýzy, množství látek, jež by měly být monitorovány apod.).

V současné době je způsob sledování toxického znečištění pomocí živých organismů především využíván k monitorování toxického znečištění vody (Lange a Lange, 1997). Organismy, které se k těmto účelům využívají, jsou též často používány v ekotoxikologických testech. Tyto testy jsou jedním z pilířů akvatické ekotoxikologie. Jejich hlavními cíli je určit kritické množství

toxikantu nebo jejich směsi pro vodní živočichy a předpovědět jejich vliv na ekosystém. Mezi nejčastěji používané organismy patří ryby (např. akvarijní rybka paví očko), bezobratlí (perlločky, žábronožky, vírníci), rostliny (okřehek, semena rostlin), jednobuněčné zelené řasy a bakterie (Farré a Barceló, 2003). Testy jsou prováděny za definovaných podmínek a jejich postup je přesně popsán ve schválených metodikách a normách, např. ČSN EN ISO 28692 (1995), ČSN EN ISO 6341 (1997), ČSN ISO 10706 (2001). Vzhledem k časové náročnosti je – až na výjimky, tyto testy obtížné použít pro detekci toxického znečištění, kdy je nutno získat výsledky v reálném čase.

BIOLOGICKÉ SYSTÉMY ČASNÉHO VAROVÁNÍ

Pro detekci toxického znečištění v reálném čase byly vyvinuty takzvané „biologické systémy časného varování“ (BEWS – biologically early warning systems) (Gregor a Maršálek, 2004). Jsou to zařízení, která jako detektor toxického znečištění využívají živý organismus a skládají se z několika částí: zařízení na odběr testované vody, experimentálních prostor, elektronického či mechanického čidla (kamery), odkud jsou naměřená data přenášena do analyzátoru a alarmu, jenž upozorní na zjištěnou toxicitu. Monitorování toxického znečištění je prakticky kontinuální nebo probíhá opakovaně ve velice krátkých intervalech, čas nutný pro detekci je snížen na minimum. Nejčastěji se využívají, stejně jako v ekotoxikologických testech, ryby, perlločky a řasy, velice populární jsou také měkkýši (mlži) (Cairns a van der Schalie, 1980).

Přístroje BEWS byly vyvíjeny postupně. Nejprve byla sledována imobilita popřípadě úmrtí testovaného organismu, postupem času se začalo využívat sledování změn v chování a fyziologických parametrech.

ŽIVÉ ORGANISMY VYUŽÍVANÉ V BEWS

Ryby

Jako první organismy byly využity ryby (tab. 1). Jeden z prvních a nejjednodušších BEWS se skládal z průtočné, na konci zúžené nádrže, kde byly umístěny ryby. V případě, že byly zasaženy toxickou látkou, přestaly vzdorovat proudu a byly odneseny na transportní pás umístěný na zúženém konci, který je dopravil do sběrné nádrže. Nad pásem bylo umístěno čidlo zazname-

návající a vyhodnocující počet ryb, jež byly pásem přemístěny (Scharf, 1979). Podobného principu bylo využito i u BEWS používaného v Evropě v sedmdesátých letech. Místo transportního pásu však byl na zadní stěně nádoby umístěn senzor, který byl aktivován dotykem ryby, která již nebyla dále schopna vzdorovat proudu (Brosnan, 1999).

Novější, citlivější typy BEWS se zaměřují na jiné parametry. Monitorují změny v chování ryb vyvolané účinkem toxické látky. Jsou to například změny v rychlosti plavání, změny v charakteru a směru plavání, změny fyziologických parametrů. Mimo to se též sleduje rychlost růstu a počet živých ryb. Tyto údaje jsou zaznamenány, bodově ohodnoceny a poté je z nich vypočten takzvaný Index toxicity. Po překročení určité hodnoty Indexu je vyhlášen alarm.

Živé organismy generují bioelektrické signály, které jsou šířeny vodou, jež organismus obklopuje, a které je možno u některých druhů sledovat a měřit (Shedd et al., 2001). Zařízení BEWS monitorující tyto signály u ryb (jednalo se o druh pstruh duhový, *Salmo gairdneri*) bylo počátkem osmdesátých let vyvinuto ve Velké Británii. Tento systém využíval monitorování bioelektrického signálu ventilační frekvence ryby. V nádrži s rybou byly umístěny elektrody, které monitorovaly signály vydávané svaly živočicha. Ty byly pomocí počítače tříděny, byly vybrány signály pohybu žaber a z nich byla počítána ventilační frekvence. Aktuální údaje pak byly porovnávány s výsledky zjištěnými v kontrolní periodě; jež trvala 1 až 2 hodiny před započtím vlastního měření (Baldwin et al., 1994).

Využití bioelektrických signálů bylo dále rozpracováno v BEWS, který je používán americkou armádou. Zařízení sleduje a vyhodnocuje čtyři fyziologické parametry zachycené pomocí elektrod z charakteristiky a způsobu dýchání ryb (jedná se o druh slunečnice, *Lepomis macrochirus*). Jsou to rychlost dýchání a jeho hloubka, míra kašle a celkový pohyb těla. Především míra kašle vyvolaná znečištěním vody je, jak bylo zjištěno, velice citlivý indikátor přítomnosti toxické látky (Van der Schalie et al., 2001).

MLŽI

V současné době se prosazují BEWS, které jako detekční organismy využívají měkkýše, konkrétně mlže (tab. 1). Nejčastěji se jedná o druhy slávička mnohotvárná (*Dreissena polymorpha*)

a slávka jedlá (*Mytilus edulis*). Princip zařízení je jednoduchý. Určitý počet mlžů je umístěn do průtokové komory, jako indikátor toxického znečištění slouží pohyb lastur. Když se mlž dostane do styku s vodou obsahující toxikant, reaguje zavřením lastur. Pokud je kontaminace vážná, mlži uhynou a jejich lastury se naopak úplně rozevřou. Pro potřeby BEWS je sledován podíl otevřených a uzavřených lastur v populaci umístěné v zařízení. Původní systémy byly jednoduché. Mlži byli přilepeni jednou lasturou k podkladu, na druhou lasturu byl umístěn magnet, který sloužil jako spínač alarmu. Současná zařízení umožňují sledovat pomocí elektromagnetického senzoru umístěného na obou lasturách i stupeň, jak jsou otevřeny (Brosnan, 1999; Kamer et al., 1989).

Korýši

Dalším z organismů, které se poměrně často využívají, jsou sladkovodní korýši – perloočky (tab. 1). Perloočky jsou zooplanktonní živočichové o velikosti maximálně několika milimetrů, kteří se volně pohybují ve vodním sloupci (Veselá, 2004). Typický BEWS obsahuje několik perlooček, které plavou v uzavřené průtočné nádobě, jež je prosvětlována paprsky infračerveného světla. Přerušení procházejícího paprsku zvířetem je detekováno čidlem umístěným na opačném konci nádoby, stupeň aktivity perlooček je dán hodnotou počtu přerušení IČ impulzů. Toxikant ve vodě nejprve zvýší aktivitu perlooček, což se projeví zvýšením počtu impulzů. Znehybnění či úhyn perlooček následkem intoxikace se naopak projeví ostrým poklesem (Brosnan, 1999).

Novější BEWS je založen na přímém monitorování chování perlooček. Pomocí videokamery je v určitých intervalech snímán obraz nádoby, který je dále počítačovým programem vyhodnocován. Aktivita každé z perlooček je kontinuálně monitorována, je sledováno, zda nedochází ke změně jednoho či více definovaných parametrů. Tyto parametry jsou: průměrná rychlost pohybu, rozdělení perlooček do tříd podle rychlosti plavání, průměrná vzdálenost organismů od sebe, zakřivení dráhy pohybu, průměrná výška perlooček ve vodním sloupci, růst perlooček a počet přežívajících jedinců. Jednotlivým parametrům je přiřazen index důležitosti, změny jsou vyhodnocovány a je počítán Index toxicity. Pokud dojde ke změně v chování

perlooček, dojde i ke změně v hodnotě Indexu toxicity. Po dosažení určité hodnoty Indexu je vyhlášen alarm (Lechelt et al., 2000).

Ostatní organismy

Kromě živočichů se jako biodetektory v BEWS využívají i řasy a bičíkovci (tab. 1). V poslední době byl vyvinut BEWS, který pro detekci toxického znečištění využívá zelené řasy kultivované přímo v zařízení. Principem činnosti přístroje je monitorování kinetiky růstu a sledování fluorescenčního spektra chlorofylu *a* dalších pigmentů obsažených v buňkách řas. Pro řasy je světlo „potravina“. Pokud jsou řasové buňky zničené toxikantem, světelná energie nebude buňkami využita a i bez dodatečného světelného pozadí bude vyšší fluorescenční odpověď na světelný impuls (Maxwell a Johnson, 2000). Barva a intenzita excitovaného světla je sledována a porovnávána s kontrolním vzorkem. Pokud je mezi výsledky zjištěn rozdíl, je vyhlášen alarm (Brosnan, 1999).

Mimo zelené řasy jsou pro detekci toxického znečištění pomocí BEWS využívány i fotosyntetizující jednobuněční bičíkovci druhu krásnoočka štíhlá (*Euglena gracilis*), (tab. 1). Princip detekce znečištění je podobný jako v případě detekce perloočkami. Je monitorováno a vyhodnocováno několik parametrů - směr a rychlost pohybu jednotlivých buněk, orientace a celkový tvar bičíkovce (Tahedl a Hyder, 2001).

Mimo výše zmíněné organismy byly vyvinuty i BEWS, jež využívají jako biodetektory i jiné organismy a monitorují jiné parametry (tab. 1). Jedná se například o luminescenci bakterií (Chun et al., 1996; Brosnan, 1999), změnu v inhibici respirace bakterií (Gregor a Maršálek, 2004) či sledování chování kroužkovců (nítěnek) v sedimentu (Leynen, 1999). Tato zařízení jsou však spíše okrajovou záležitostí.

PRAKTICKÉ VYUŽITÍ BEWS

Využití BEWS pro on-line monitoring toxického znečištění je široké. Jsou používány k monitorování kvality vody a pro zachycování havárií či úmyslného znečištění říčních toků. Z tohoto důvodu byly vytvořeny monitorovací sítě skládající se z jednotlivých monitorovacích stanic, kde je umístěno jedno nebo více zařízení BEWS. V případě ohlášení alarmu na některé stanici je vyhlášen poplach a jsou podniknuta následná opatření s cílem eliminovat či alespoň

snížit následky znečištění dále po proudu. Tyto monitorovací sítě velice často fungují v rámci mezinárodní spolupráce, což umožňuje sledovat znečištění vodních toků po celé jejich délce. U nás je například ve spolupráci se SRN monitorována řeka Labe (Fuksa, 2002). Dalšími evropskými řekami, kde je takovýto monitoring prováděn, jsou například v Evropě Rýn, Mosela, Seina, Trent, Tyne, Llobregat, ve světě Ohio, Mississippi (USA), Severní Saskatchewan, řeka St. Clair (Kanada), řeka Yodo (Japonsko) či řeka Han (Korea) (Gullick et al., 2003).

Citlivost jednotlivých BEWS je různá. Důležitou roli hrají organismy, jež jsou v zařízení použity, typ sledovaných parametrů odezvy a jejich citlivost, způsob vyhodnocení a interpretace výsledků, spektrum toxických látek. Proto jsou v rámci monitorovacích sítí používány většinou minimálně dva různé typy BEWS s odlišným druhem organismů.

Dalším z možných využití BEWS je sledování kvality vody vypouštěné z výrobních podniků či továren, z čističek odpadních vod. V USA sloužil BEWS s rybami například jako detektor zbytkového znečištění při čištění a úpravě kontaminované podzemní vody čerpáné z místa bývalé vojenské skládky (Van der Schalie et al., 2001). Zařízení BEWS bývají používána i pro monitoring pitné vody při obavách z možného teroristického útoku na tento cíl. Například několik BEWS s perloočkami bylo využito pro monitorování nezávadnosti pitné vody v průběhu olympijských her konaných v Salt Lake City v roce 2002.

LITERATURA

- BALDWIN, I. G., HARMAN, M. M. I., NEVILLE, D. A.: Performance characteristics of a fish monitor for detection of toxic substances - I. Laboratory trials. *Water Research*, 1994. Vol. 28, s. 2191-2199.
- BROSNAN T. M. et. al.: Early warning monitoring to detect hazardous events in water supplies. *An ILSI Risk Science Institute Workshop Report: ILSI*, 1999, s.37.
- CAIRNS, J., VAN DER SCHALIE, W. H.: Biological monitoring Part I – Early warning systems. *Water Research*, 1980. Vol. 14, s. 1179-1196.
- ČSN EN ISO 28692. Jakost vod - Zkouška inhibice růstu sladkovodních řas *Scenedesmus subspicatus* a *Sele-nastrum capricornutum*. Praha: ČNI 1995, 2000. s. 12.
- ČSN EN ISO 6341. Jakost vod – Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (*Cladocera*, *Crustacea*) – Zkouška akutní toxicity. Praha: ČNI, 1997. s. 16.
- ČSN ISO 10706. Jakost vod - Stanovení chronické toxicity látek pro *Daphnia magna* Strauss (*Cladocera*, *Crustacea*). Praha: ČNI, 2001. s. 20.
- FARRÉ, M., BARCELÓ, D.: Toxicity testing of wastewa-

- ter and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 2003. Vol. 22, s. 299-310.
- FUKSA, J. K.: *Biomonitoring českého Labe: výsledky z let 1993-1996-1999*. Praha: Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, 2003, s. 103.
- GALLO, M. A.: History and scope of toxicology. In: Klaassen, C.D. (ed), *Casarett and Doull's Toxicology. The basic science of poisons*. New York: McGraw-Hill, Medical Publishing Division, 2001. s. 3-10.
- GREGOR, J., MARŠÁLEK, B.: Biologické systémy včasného varování – on-line detekce přítomnosti toxických látek ve vodě. In: Kočí, V., Maršálek, B., Tlustá, P. (eds.), *Ekotoxikologické biotesty IV*, 15.-17. září 2004, Chrudim, s. 106-112.
- GULLICK, R. W. et al.: Design of early warning monitoring systems for source waters. *American Water Works Association Journal*, 2003. Vol. 95, no 11, s. 58-72.
- GUNATILAKA, A., DIEHL, P.: A brief review of chemical and biological continuous monitoring of rivers in Europe and Asia. In: Gunatilaka, A., Gonsebatt, M.E. (eds.), *Biomonitoring and Biomarkers as indicators of environmental change*. Vol. II., Butterworth, F. M., New York: Kluwer Academic Plenum Publishing Corp., 2000. s. 9-28.
- CHUN, U-H. et al.: Continuous pollution monitoring using Photobacterium phosphoreum. *Resources, conservation and recycling*, 1996. Vol. 18, s. 25-40.
- KAMER, K. J. M., JENNER, H. A., DE ZWART, D.: The valve movement response of mussels: a tool in biological monitoring. *Hydrobiologia*, 1989. Vol. 188/189, s. 433-443.
- LANGE, C. R., LANGE, S. R.: Biomonitoring. *Water Environment Research*. Vol. 69, s. 900-915.
- LECHELT, M. et al., 2000. Monitoring of surface water by ultra-sensitive daphnia toximeter. *Environmental toxicology*, 1997. Vol. 15, s. 390-400.
- LEYNEN, M. et al.: The use of *Tubificidae* in a biological early warning system. *Environmental Pollution*, 1999. Vol. 105, s. 151-154.
- MAXWELL, K., JOHNSON, G. N.: Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 2000. Vol. 51, s. 659-668.
- SHEDD, T. R. et al.: Long-term operation of an automated fish biomonitoring system for continuous effluent acute toxicity surveillance. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2001. Vol. 66, s. 392-399.
- SCHARF, B., W.: A fish test alarm device for the continual recording of acute toxic substance in water. *Archiv für Hydrobiologie*, 1979. Vol. 85, s. 250-256.
- STATES, S. et al.: Utility based analytical methods to ensure public water supply security. *American Water Works Association Journal*, 2003. Vol. 95, no. 4, s. 103-115.
- TAHEDL, H., HÄDER, D. P.: Automated biomonitoring using real time movement analysis of *Euglena gracilis*. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 2001. Vol. 48, s. 161-169.
- VAN DER SCHALIE et al.: Using higher organisms in biological early warning systems for real-time toxicity detection. *Biosensors Bioelectronics*, 2001. Vol. 16, s. 457-465.
- VESELÁ, Š.: Co víme (a nevíme) o perloočkách. Perloočky v ekotoxikologii. In: Kočí, V., Maršálek, B., Tlustá, P. (eds.), *Ekotoxikologické biotesty IV*, 15.-17. září 2004, Chrudim, s. 18-25.

Poděkování

Tento článek vznikl v rámci řešení Projektu obranného výzkumu č. 9090, BIODETEKTOR.

Šárka Veselá
Sarkavesela2@seznam.cz

PŘÍLOHA (viz další str.)

Tab. 1: BEWS - přehled nejčastěji používaných organismů a sledovaných parametrů

Tab. 1: BEWS - přehled nejčastěji používaných organismů a sledovaných parametrů

Používané organismy	Sledované parametry
Ryby například druhy: <i>Salmo gairdneri</i> <i>Lepomis macrochirus</i> <i>Leuciscus idus</i> <i>Danio rerio</i>	Neschopnost vzdorovat proudu Změny v chování – rychlost a směr plavání, charakter plavání Monitorování fyziologických parametrů (bioelektrické signály) – rychlost dýchání a jeho hloubka, míra kašle, celkový pohyb těla
Kroužkovci <i>Tubifex tubifex</i>	Chování v sedimentu
Koryši <i>Daphnia magna</i>	Stupeň aktivity Více parametrů - charakter plavání a chování u jedince i celé skupi- ny
Mlži <i>Dreissena polymorpha</i> <i>Mytilus edulis</i>	Podíl otevřených a uzavřených lastur ve sledované skupině Stupeň otevření lastury
Fotosyntetizující jednobuněční bičíkovci <i>Euglena gracilis</i>	Více parametrů – rychlost pohybu, orientace a celkový tvar bičíkovce
Zelené řasy	Fluorescenční spektrum Kinetika růstu
Bakterie <i>Photobacterium phosphoreum</i> <i>Vibrio fischeri</i> nitrifikační bakterie	Luminiscence Změna v respiraci