

# Biotester i vannforskningen – eksempler på muligheter og metoder med alger og bakterier som testorganismer

Av Dag Klaveness

Dag Klaveness er universitetslektor i limnologi ved Universitetet i Oslo.

*Artikkelen bygger på et innlegg holdt i Norsk Forening for Vassdragspleie og Vannbygiene 21. april 1977.*

Biotester har vunnet innpass som et supplement til mer tradisjonell limnologisk metodikk i vannforskningen. To biotester benyttes rutinemessig ved større vannforskningsinstitusjoner idag: måling av primærproduksjonen i en lokalitet, og måling av algevekstpotensialet i vannprøver fra lokaliteten.

Primærproduksjonsmålingene skjer nå nesten utelukkende ved bruk av isotopen  $C^{14}$  i form av bikarbonat. Vannprøvene med sine naturlige samfunn av mikroorganismer tilsettes små mengder av radioaktivt bikarbonat og inkuberes i klare flasker, enten *in situ* eller i et simulierende system (inkubator med temperaturkontroll og forskjellige lysstyrker). Opptak av  $C^{14}$  gir hovedsakelig et mål på fotosynteseaktiviteten i vannprøvene, og målingene tolkes som representative for fotosynteseaktiviteten i lokaliteten på de aktuelle dyp, steder og tider. Utført i samsvarende med et godt undersøkelsesprogram

(som må bl.a. omfatte et tilstrekkelig antall målinger pr. tidsenhet) er primærproduksjonsintensiteten den beste parameter for å karakterisere en vannforekomst og for å oppdage langsomme, systematiske endringer i lokaliteten. Primærproduksjonsintensiteten i en lokalitet bestemmer ofte de potensielle brukerinteresser. Primærproduksjonsmålingene er vannforskerens viktigste biotest, og kanskje også den som er lettest å gi en meningsfylt tolkning. En videreutvikling av metodene synes å gå i retning av standardiserte inkubatorer og bruk av stadig mer raffinerte matematiske modeller, der presise produksjonsestimater søkes framskaffet på grunnlag av færre observasjoner. For den grunnleggende og nyere metodikk, se Vollenweider (27), Gargas & Hare (4).

Den andre biotesten nevnt innledningsvis, måling av algevekstpotensialet (AGP = «Algal Growth Potential», og andre navn), kan også gjennomføres med enkel utrustning. Men resultatene kan være vanskelige å tolke i sammenheng med de aktuelle forholdene i lokaliteten. Metoden

er i sin enkleste form basert på måling av utbyttet av alger som vokser opp på de næringsstoffer som finnes i prøvevannet. Algene, vanligvis grønnalgen *Selenastrium capricornutum*, må på forhånd være holdt i et medium med lavt næringsinnhold (for å unngå overføring av næringsstoffer i algene). I sin enkleste form, slik her skissert, i kulturer av begrenset volum (kolber, «batch»), gir metoden et mål for den maksimalt mulige algevekst, noe som vel aldri realiseres i naturen. Under naturlige forhold pågår prosesser som synking, beiting, regenerasjon og tilførsel av næringsstoffer kontinuerlig, disse prosessene er stoppet opp i en filtrert vannprøve av et svært begrenset volum. Dette problemet, pluss flere andre potensielle feilkilder som trekker i den ene eller annen retning, gjør at metoden må brukes kritisk og i sammenheng med måling av andre parametre. Etter flere forsøk på interkalibrering av metoden er det enighet om at den neppe egner seg som en absolutt målemetode. Til det er de systematiske forskjeller laboratoriene imellom altfor store. Innenfor et gitt laboratorium er imidlertid metoden velegnet som et relativt mål for prøvevannets fertilitet. Innenfor rammen av fornuftige, flersidige prøvetakingsprogrammer har AGP-metoden gitt verdifull informasjon som ikke ville være tilgjengelig med andre metoder. Teori, metodikk og eksempler på anvendelser finnes spredt i litteraturen (3, 5, 10, 15, 18, 19, 25). Nylig har tilsvarende biotester også vært forsøkt utført med lokalitetens naturlige planktonpopulasjoner. Utviklingen av en slik metode kan på det praktiske plan by på både fordeler og ulemper. Fra forskere med innsikt i eksperimentell planktonøkologi foreligger også teoretiske innvendinger som må diskuteres.

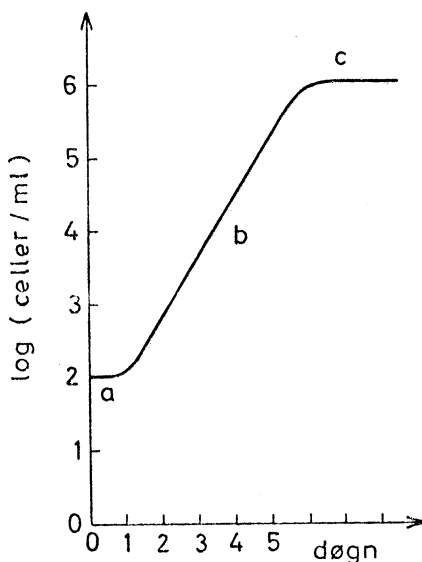


Fig. 1. Vekstforløpet hos alger i en kultur av begrenset volum (kolbe, «batch»). a = lag-fasen: liten endring i cellekonsentrasjonen. Cellene omstiller seg til nye forhold. Lag-fasen kan, under ideelle forhold, reduseres til et minimum ved riktig valg av testorganisme og ved korrekt behandling av cellene. b = log-fasen: cellekonsentrasjonen øker eksponentielt, vekstkurven blir lineær som semilog plot. r = den stasjonære fasen: cellekonsentrasjonen har nådd sitt maksimum og forblir konstant i kortere eller lengre tid. Cellekonsentrasjonen i den stasjonære fasen er et mål for utbyttet under de gitte betingelser.

De fleste biotester er basert enten på måling av veksthastighet, eller på måling av utbyttet av testorganismer i et begrenset volum. Fig. 1 gir en forklaring på de viktigste begrepene. Utbyttet, f.eks. ved måling av AGP, er avhenging av den initiale næringsstoff-konsentrasjonen i vannprøven; i våre naturlige ferskvannsføremønstre vil utbyttet ofte være kor-

relert med fosfatinnholdet i prøven. Utbyttet kan imidlertid bli mindre enn forventet ut fra næringsstoffinnholdet dersom humussyrer eller inhibitorer er tilstede.

Veksthastigheten er svært avhengig av ytre faktorer som lys, temperatur og turbulens, men disse forholdene kan lett standardiseres. Veksthastighetene kan imidlertid påvirkes sterkt av stimulanter eller inhibitorer i mediet, innenfor begrensede konsentrasjonsområder. Mange følsomme og presise biotester er basert på måling av veksthastigheter.

Vitaminer i vann (thiamin, biotin, cyanocobalamin) på langt under nanogram-nivå kan bestemmes kvantitativt med alger som testorganismer. Bakterier kan i visse tilfelle også brukes.

Metodikken med alger er best utviklet for, og mest prøvet på vitaminbestemmelser i sjøvann. Aktuelle stammer av marine alger kan også brukes i ferskvann etter tilsetning av vitaminfrie salter eller fortykning med vitaminfritt sjøvann. På samme måte som ved kjemiske analyser konstrueres en kalibreringskurve hvor responen (f.eks. veksten) plottes som funksjon av kjente vitaminkonsentrasjoner. Ved målinger i ukjente vannprøver kjøres flere paralleller, og indre standarder må brukes. Hos dinoflagellaten *Amphidinium carterae* er opptaket av radioaktivt bicarbonat proposjonalt med biotinkonsentrasjonen i mediet innenfor et begrenset konsentrasjonsområde, følgelig brukes i dette tilfellet  $C^{14}$ -opptakshastigheten ved måling av biotinkonsentrasjoner. Cyanocobalamin-analoger kan måles ved å måle utbyttet av diatomeen *Thalassiosira pseudonana* etter f.eks. 5 døgn, og jmføre med kalibrerte systemer. I ferskvann kan chrysophyceen *Ochromonas malhamensis* brukes for «ekte»

B12, bakterien *Escherichia coli* kan brukes som testorganisme for total-innholdet av B12-analoger (22).

For bestemmelse av thiamin i ferskvann finnes en stamme av *Ochromonas danica*, i sjøvann kan benyttes flere forskjellige stammer av alger (26). For den uinformerte leser bør det her nevnes at de frittlevende primærproduzentene i vann, planktonalgene, kan trenge vitaminer. I store trekk ser det ut til at grønnalger har lite behov, diatomeer trenger ofte  $B_{12}$ , mens chrysophyceer ofte trenger thiamin (22). Noen arter trenger også flere vitaminer. Vitamininnholdet i vann er derfor av interesse i planktonforskningen. Nærvær av eller mangel på vekstfaktorer som vitaminer kan tenkes å lede suksesjonsforløpet i bestemte retninger. Det finnes få undersøkelser over disse forhold; vitaminarbeid krever en ekstrem grad av nøyaktighet, renslighet og rutine.

Biologiske metoder kan også brukes til kvantitativ bestemmelse av sporstoffer. Lindstrøm og Rodhe (14) har utviklet en metode til bestemmelse av selén i naturlig vann, ned til 5 nanogram/l. En stamme av dinoflagellaten *Peridinium cinctum* f. *westii* har et obligat behov for spor av selen i mediet. Innenfor et bestemt konsentrasjonsområde gir variasjoner i selenmengden i mediet eller prøvevannet et målbart utslag på veksthastigheten hos testalgen.

I miljøtoksikologisk sammenheng synes også algene å vinne innpass som brukbare testorganismer. Inhibitorer eller giftstoffer i mediet kan gi opphav til de forskjelligste vekstresponser så som nedsett utbytte, endret veksthastighet, progressivt avtagende veksthastighet eller fullstendig inhibisjon. Eksempler er gitt i fig. 2. Toksisitetstester med mikroorganismer krever et inngående kjennskap til

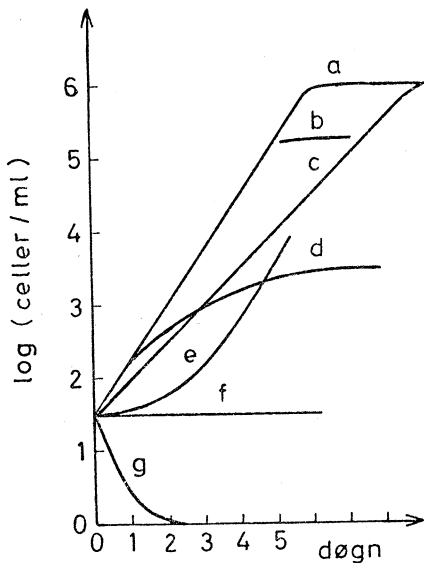


Fig. 2. Vekstresponser hos alger i kultur av begrenset volum, under påvirkning av faktorer som modifiserer vekstforløpet. a = normalt vekstforløp i kultur under ideelle betingelser. b = utbyttet begrenset. c = veksthastigheten begrenset. d = progressivt avtagende veksthastighet og begrenset utbytte. e = forlenget lagfase. f = fullstendig inhibisjon, uten celledød. g = celledød.

opptaks- og vekstkinetikk og membran- og cellefysiologi. Som et eksempel på en farlig metode kan nevnes metoden til Payne (20), som bruker MAC-5 («Minimum Algistic Concentration, after 5 days»), den konsentrasjon av inhibitor som gir ingen vekst i løpet av 5 døgner i kolbekultur, som et mål på giftighet. Metoden kan skjule progressive effekter som kun kan avsløres gjennom lengre tid eller i kontinuerlige kulturer. Et lærerikt eksempel på anvendelse av alger i toksisitetsstudier i semi-kontinuerlige og kon-

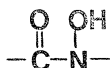
tinuerlige kultursystemer er gitt av Reynolds et al. (23).

Davey et al. (1) bruker giftvirkningen av kobber på diatomeen *Thalassiosira pseudonana* som indikator ved undersøkelse av chelatoreffekten i vann. I følge Irwing-Williams «regel» vil spesielt kobber danne sterke komplekser med organiske kompleksdannere, og også kunne fortrenge andre kompleksbundne ioner som Ca, Mg og endel spormetaller. Det er kun de frie kobberioner som er giftige for *Thalassiosira*, kompleksbundet kobber har ingen innflytelse på algens veksthastighet. Vannprøvene tilsettes f.eks. 10 forskjellige konsentrasjoner av  $\text{Cu}^{++}$ , fra 1 til f.eks.  $50\mu\text{g/l}$ . Etter ekvibrering inkuberes prøvene med *Thalassiosira*, og veksten måles i løpet av kortest mulig tid. Så lenge alt det tilsatte kobber kan kompleksbindes til nærværende humus-stoffer, forblir veksthastigheten like høy som i kontrollen (uten kobber). Straks kompleksbindingskapasiteten er overskredet, avtar veksthastigheten meget raskt med økende kobberkonsentrasjoner. Plottes veksthastigheten som funksjon av total kobberkonsentrasjon i prøvevannet, fås en kurve som likner en tilsvarende titreringskurve med kobber-sensitiv elektrode.

Bioassay-metoden har kun den fordel at den er medfølsom enn titrering med kobber-sensitiv elektrode. For undersøkelser i ferskvann bør testalgen *Sele-nastrum* ikke brukes, den bør erstattes med en art med mer presis respons ovenfor kobber. I humuspåvirkede sjøer vil nok en direkte titrering med elektrode være å foretrekke.

En annen metode som kan være interessant i forbindelse med studiet av spormetaller og chelatorer i naturlig vann. Enkelte bakterier og blågrønne alger produserer organiske forbindelser som danner

svært stabile komplekser med jern. Disse forbindelsene, såkalte «siderochromer» eller hydroxamater, inneholder en eller flere av den kjemiske gruppe



som selektivt danner komplekser med jern. Produksjonen av siderochromer er vist å være induktiv, siderochromproduksjon induseres ved lave konsentrasjoner av jern i mediet. Stoffene antas å fungere som «kampstoffer» i planktonsamfunnet, der en siderochromproducent kan eliminere konkurrentene ved å chelatere ut det tilgjengelige jern. Dette synes f.eks. å være tilfelle hos blå-grønne alger (16, 24). De kjemiske metoder for påvisning av denne typen kompleksdannelse er lite følsomme. I naturlige konsentrasjoner påvises derfor hydroxamat-chelatorene ved hjelp av en siderochrom-auxotrof stamme av bakterien *Arthobacter* (*A. terregens* eller *A. flavescens*). (17) har gitt en oversikt over siderochromer, og nyere litteratur (6, 2) har aktuelle eksempler.

I denne kortfattede oversikten har jeg begrenset meg til å nevne noen få me-

toder som jeg selv har funnet interessante. Prinsippene bak de fleste biotest-undersøkelser er de samme, og metodene er hverandre nokså like. Jeg må imidlertid understreke at endel slike tester krever bruk av semikontinuerlige eller kontinuerlige kultursystemer (kjemostater eller turbidostater), og dette har jeg med vilje unngått å komme inn på i denne kortfattede redegjørelsen. Se lærebøker i mikrobiologisk kulturteknikk (13, 21).

Viktige forbedringer av batch-metoden har sett dagens lys i de senere år. Metoden til Klaveness & Guillard (11) med ekstremt tynne kulturer gir tilnærmede «kjemostat-forhold» over lengre tid, og bør kunne prøves i biotestsammenheng. Klotz, Cain & Trainor (12) har introdusert en semikontinuerlig batch-teknikk som tillater måling av relative algevekstpotensialer i svært næringsfattige vann. En dialysemetode utviklet ved NTH-Trondheim synes spesielt godt egnet til toksisitets-tester (7, 8, 9).

Biotest-metodikk synes å ha framtida foran seg både i praktisk vannforskning og til løsning av problemer av mer grunnforskningspreget natur.

#### LITTERATUR:

1. Davey, E. W; Morgan, M. J. & Erickson, S. J. 1973. A biological measurement of the copper complexation capacity of seawater. *Limnology and Oceanography* 18 (6), 993—997.
2. Estep, M; Armstrong, J. E. & van Baalen, C. 1975. Evidence for the occurrence of specific iron (III) — binding compounds in near-shore marine ecosystems. *Appl. Microbiol.* 30 (2), 186—188.
3. Gargas, E. & Pedersen, J. S. 1974. Algal assay procedure bath technique. *Contr. from The Water Quality Institute*, no. 1 (1974). Danish Academy of Technical Science. 48 pp.
4. Gargas, E. & Hare, I. 1976. User's manual for estimating the daily phytoplankton production measured in incubator. *Contr. from The Water Quality Institute*, no. 2. (1976). Danish Academy of Technical Science 75 pp.

5. Glass, G. E. (ed). 1973.  
Bioassay techniques and environmental chemistry. Ann Arbor Science Publ., Inc. 499 pp.
6. Gonye, E. R. & Carpenter, E. J. 1974.  
Production of ironbinding compounds by marine microorganism. *Limnology and Oceanography* 19 (5), 840—842.
7. Jensen, A. & Rystad, B. 1973  
Semi-continuous monitoring of the capacity of sea water for supporting growth of phytoplankton. *J. Exp. mar. Biol.* 11, 275—285.
8. Jensen, A., Rystad, B. & Melson, S. 1974.  
Heavy metal tolerance of marine phytoplankton I. The tolerance of three algal species to zink in costal sea water. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 15, 145—157.
9. Jensen, A., Rystad, B. & Melsom, S. 1976.  
Heavy metal tolerance of marine phytoplankton. II. Copper tolerance of three species in dialysis and batch cultures. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 22, 249—256.
10. Källqvist, T. 1975  
Algal growth potential of six Norwegian waters receiving primary, secondary and tertiary sewage effluents. *Verh. internat. Verein. Limnol.* 19, 2070—2081.
11. Klaveness, D. & Guillard, R.R.L. 1975.  
The requirement for silicon in *Synura petersenii* (Chrysophyceae). *J. Phycol.* 11, 349—355.
12. Klotz, R. L., Cain, J. R. & Trainor, F. R. 1975.  
A sensitive algal assay: an improved method for analysis of freshwaters. *J. Phycol.* 11, 411—414.
13. Kubitschek, H. E. 1970.  
Introduction to research with continous cultures. Prentice-Hall, Inc. 195 pp.
14. Lindstrøm, K. & Rohde, W. 1976.  
Selenium as a micronutrient for the dinoflagellate *Peridinium cinctum* fa. Westii. First International Conference on the Use of Algal Cultures in Limnology, Sandefjord 26—28 October 1976.
15. Middlebrooks, E. J., Falkenborg, D. H. & Maloney, T. E. 1976.  
Biostimulation and nutrient assessment. *Ann Arbor Science.* 390 pp.
16. Murphy, T. P., Lean, D.R.S. & Nalewajko, C. 1976.  
Blue-green algae: ther excretion of ironselective chelators enables the to dominate other algae. *Science* 192, 900—902.
17. Neilands, J. B. 1973. Microbial iron transport compounds (siderochromes). *Inorganic Biochemistry* (Eichhorn, G. L., ed), IVol. 1, 167—202. Elsevier Sci. Publ. Co.
18. Nordforsk 1973. Algal assays in water pollution research. Nordforsk, miljövårdssekretariatet publ. 1973: 2. 128 pp.
19. Nordforsk 1975. Jämförelse av algtestmetodik. Nordforsk miljövårdssekretariatet publ. 1975: 4 20 pp.
20. Payne, A. G. 1976.  
Application of the algal assay procedure in biostimulation and toxicity testing. *Biostimulation and nutrient assessment* (Middlebrooks et al., eds.), 3—27. *Ann Arbor Science.*
21. Pirt, s. J. 1975.  
Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Sci. Publ. 274 pp.
22. Provasoli, L. 1969.  
Algal nutrition and eutrophication. *Eutrophication, causes, consequences, correctives* (Natl. Acad. Sci., Washington, ed.), 574—593. *Natl. Acad. Sci.*

23. Reynolds, J. H., Middlebrooks, E. J., Porcella, D. B. & Grenney, W. J. 1976. Comparison of semicontinuous and continuous flow bioassay. Biostimulation and nutrient assessment (Middlebrooks et al., eds.), 241—265. Add Arbor Science.
24. Simpson, F. B. & Neilands, J. B. 1976. Siderochromes in Cyanophyceae: isolation and characterisation of schizokinen from *Anabaena* sp. *J. Phycol.* 12, 44—48.
25. Skulberg, O. M. 1975. Observation and monitoring of water quality by use of experimental biological methods. *Verh. internat. Verein. Limnol.* 19, 2053—2063.
26. Stein, J. R. 1973. *Handbok of phycological methods.* Cambridge 448 pp.
27. Vollenweider, R. A. 1969. A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments. IBP handbook no. 12. Blackwell Sci. Publ. 213 pp.