

Biotester anvendt i vannressursforvaltningen

Av Morten Laake

Morten Laake er førsteamanuensis ved Institutt for Generell Mikrobiologi, Universitetet i Bergen. Han er formann i NORDFORSKs Planleggingsgruppe for toksisitetstester.

Foredrag ved NFVV Kollokvium,
21. april 1977.

1. DEFINISJON

En biotest kan kort defineres som «måling av en biologisk respons på en gitt påvirkning av kjemisk-fysisk karakter». Ordet «biotest» er avledet av det engelske «bioassay», som opprinnelig har hatt betydning «biologisk målemetode», f.eks. bestemmelse av vitamininnhold i µg-området ved hjelp av bakterier, men også dette brukes nå i utvidet betydning.

I vannkvalitetssammenheng har vi to hovedformer innrettet på:

- a) måling av en *positiv* respons, som f.eks. algevekst ved tilsetning av næringssalter i vann, og
- b) måling av en *negativ* respons, som f.eks. død av fiskeyngel ved tilsetning av giftstoffer i vann

— for å ta de to mest kjente eksempler. Det kan være nødvendig å presisere at i begrepet biotest kan ikke inkluderes innsamling av organismer fra miljøet for ved kjemisk analyse av disse å overvåke belastningen av miljøgifter (f.eks. sink i

tang). Det innebærer nemlig også en høy grad av kontroll med påvirkningens varighet, miljøbetingelser som lys og temperatur, kjemiske konsentrasjoner i vannet og organismenes antall, alder og type — for å nevne de viktigste punktene.

2. MÅLSETNING

En overordnet *målsetning* er å bruke biotester som et instrument til å forutsi en økologisk respons på en gitt kjemisk eller fysisk påvirkning, eller med andre ord å forbedre det naturvitenskapelige grunnlaget for anvendelsen av kvalifisert skjønn i vannressursforvaltningen. En sideordnet målsetning er også indirekte å forutsi skadevirkninger på menneskets helse.

Det er *ikke* noen målsetning å erstatte kjemiske analyser eller å gjøre resipientundersøkelser overflødige; tvertimot danner disse ofte et nødvendig grunnlag for en relevant fortolkning av testens resultater. Verdien av biotester ligger dessuten i at de ofte danner et nødvendig forklarende bindeledd mellom en ofte lett registrerbar fysisk-kjemisk påvirkning og en ofte langt vanskeligere registrerbar og forklarbar økologisk respons.

3. VALG AV ORGANISMER

Fire hovedgrupper av organismer er de mest benyttede; alger, hvirvelløse dyr, fisk og mikro-organismer. Årsaken er å finne i hovedmålsetningen om å forutsi økologisk respons, som en forstår ut fra en forenklet fremstilling av næringscyklus i vann. Gruppene representerer fire hovedledd i økosystemet; primærproduksjon — sekundærproduksjon — tertiærproduksjon — dekomponering, selv om naturen er langt mer komplisert enn som så.

Ved valg av art innen gruppene er det imidlertid *ikke* i hvilken grad arten er representativ for gruppen som avgjør, men oftest praktiske hensyn, som om arten er lett å holde i laboratoriet, om effekter lett lar seg måle, og om arten er sensitiv nok overfor påvirkninger. Innen hvert land brukes gjerne arter som er vidt utbredt i landets vannforekomster. Å velge *en* art som representativ for en hel gruppe er i praksis umulig. Alger og

mikroorganismer kan studeres som naturlige eller kunstige populasjoner i benkeskala, men for hvirvelløse dyr og fisk må hovedregelen være at det såvidt mulig velges en art som er vanlig forekommende i det vannmiljø den aktuelle påvirkning vil gjøre seg gjeldende.

En internasjonal rundspørring om metodikk for «toxicity tests for aquatic organisms» ble i 1976 gjennomført av en gruppe ved Gøteborgs Universitet (H. Blanck, G. Dave og K. Gustafsson; Toxicity Tests for Aquatic Organisms. En inventering av rutinemetodikk. Gøteborg 1977), og jeg kommer i fortsettelsen til å vise noen av deres resultater. I alt innkom 156 svar (27%) fra statlige laboratorier, forskningsinstitusjoner og industri-laboratorier, hvorav 81 selv drev rutinemessige undersøkelser. Antall anvendte metoder fordeler seg ganske jevnt på de fire organismegruppene (tab. 1).

Tabell 1. *Utnyttelsen av ulike typer akvatiske organismer i gifttester*
(Etter Blanck, Dave og Gustafsson 1977).

Type testorganisme	Antall opplysnings-givere	Antall anvendte metoder*
Vekster, vesentlig alger	26 (24)**	44
Hvirvelløse dyr	37	46
Fisk	49	76
Mikroorganismer	21 (21)**	55

*) Angir *ikke* hvor mange ulike metoder som anvendes, men antall metoder som ble rapportert ved rundspørringen.

***) Antall laboratorier angitt i parentes.

Tabell 2. *Algearter utnyttet som testorganismer ved vekstforsøk gruppert etter taxonomisk tilhørighet og relatert til antall testede substanser.* (Etter Blanck, Dave og Gustafsson 1977).

		<i>Antall metoder</i>	<i>Antall testede substanser</i>
CHLOROPHYTA (grønnalger)			
Volvocales	Chlamydomonas reinhardtii	1	2
	*Dunaliella tertiolecta	0	0
	Sum	1	2
Chlorococcales	Ankistrodesmus falcatus	3	110
	Chlorella ovalis	1	100
	Chlorella pyrenoidosa	1	17
	Chlorella vulgaris	2	5050
	*Chlorococcum sp.	0	0
	*Scenedesmus quadricauda	4	251
	*Selenastrum capricornutum	6	214
Sum	17	5742	
BACILLARIOPHYTA (diatoméer)			
	Asterionella formosa	1	25
	*Cyclotella sp.	0	0
	*Navicula seminulum	1	2
	*Navicula pelliculosa	1	2
	*Nitzschia linearis	0	0
	*Nitzschia sp.	0	0
	*Synedra sp.	0	0
	*Thalassiosira pseudonana	0	0
Sum	3	29	
CHRYSOPHYTA (gulalger)			
	Phaeodactylum tricornutum	2	108
RHODOPHYTA (rødalger)			
	*Porphyridium cruentum	0	0
	Ceramium strictum	1	1
	Sum	1	1
CYANOPHYTA (blågrønnalger)			
	*Anabaena flos-aquae	0	0
	*Microcystis aeruginosa	2	227
	Oscillatoria agardii	—	—
	Oscillatoria rubescens	—	—
	Phormidium sp.	—	—
	Synechococcus sp.	1	12
Sum	3	239	

* Art anvendt som testorganisme i standard-metode.

— Antall metoder og testede substanser ikke angitt.

Ser en på antall alger som anvendes (tab. 2) er det stort, men likevel svært lavt i forhold til hva naturen rommer av artsrikdommer og variasjon. Enkelte arter blir typiske «forsøksdyr» som mange etter hvert velger fordi mange andre har gjort det før. Tilsvarende gjelder også for hvirvelløse dyr, hvor 80% av alle testede substanser er testet på *Daphnia magna*, en hoppekreps, mens de øvrige er spredd på ca. 40 andre arter. For fisk er bildet

mer variert og avhengig av geografisk region, men gullfisk, sebrafisk, vederbuk og forskjellige laksefisk er de mest benyttede. Giftvirkninger overfor mikroorganismer er hovedsakelig testet på aktivt slam, visse bakterier og protozoer (tab. 3). I tillegg kommer metodikk for studier av bioakkumulering, mutagenitet og karsinogenitet, hvor også mikroorganismer i stor grad anvendes, og hvor en risikovurdering overfor menneskets helse er det sentrale.

Tabell 3. Mikroorganismer utnyttet i giftighetstester med angivelse av antall metoder og antall testede stoffer. (Etter Blanck, Dave og Gustafsson 1977).

Organismesystem	Metoder	Testede stoffer
Aktivt slam eller avløpsvann	20 (11)*	7040
Bakterieblandpopulasjoner	8	264
Escherichia coli	2 (1)	25
Pseudomonas putida	34	550
Salmonella typhimurium	2 (1)	35
32 ulike indikatororganismer	1	—
Blandpopulasjoner av protozoer	2 (1)	220
Paramecium caudatum	2 (3)	120
P. bursaria	1	—
Colpoda maupasi	1	—
Cristigera spp.	1	10

*) I parentes angis det antall metoder der opplysningsgiveren har angitt hvor mange substanser som er testet.

4. BIOTESTENS RELASJON TIL ØKOSYSTEMET

Det er ganske klart at et biotestresultat aldri kan overføres direkte til naturen; resultatet vil alltid bare være kvalitativt veiledende. Ved enkelte institutter, som f.eks. IVL i Sverige, satses det mye på biotester med hele modelløkosystemer i akvarier. Det er likevel så at jo lenger en går i å tilpasse metodikk og organismesamfunn til det økosystem en ønsker å forutsi effekten på, dess vanskeligere blir det å kontrollere testbetingelsene og å

sammenligne resultater for f.eks. ulike kjemiske forbindelser, og dess mindre egnet blir metoden for rutinemessig bruk i stor skala. En vil likevel aldri oppnå å kunne forutsi en integrert økologisk respons med 100% sikkerhet. Forsøk med f.eks. analogresipienter (renner) har vist sin store berettigelse i mange forskningsmessige sammenhenger, men bør ikke rommes under begrepet biotest.

Imidlertid bør en ved utforming av metodikk så langt det er praktisk mulig utsette organismen for en påvirkning i den

form den opptrer i naturen. Tendensen går i retning av kontinuerlig strømmende systemer med lave og konstante konsentrasjoner av kjemikalier i gift-tester, og det er etter hvert utviklet mange gode teknikker for dette formålet.

5. ANVENDELSESOMRÅDER

Når biotestmetodikk diskuteres er det svært viktig å klarlegge hvilket problem som skal belyses og i hvilken sammenheng resultatet skal benyttes. The European Inland Fisheries Advisory Commission (EIFAC) har lagt til grunn følgende inndeling:

- a) Screening of chemicals
- b) Water quality criteria
- c) Legal tests
- d) Monitoring — effluents and recipients.

Med det store antall nye kjemikalier som hvert år produseres, er det klart at behovet for relativt enkle, hurtige og rimelige *screeningmetoder* er potensielt stort. En stadig strengere lovgivning i de fleste land krever etter hvert forhåndsprøving av kjemikalier i stor skala, enten det gjelder produkt, råstoff, mellomprodukt eller avfallsprodukt (Jfr. den norske Produktkontroll-loven). Screeningmetodene må være relevante i forhold til det miljø påvirkningen eksponeres i, og være seg overfor dyr, planter eller mennesker. De er således først og fremst redskaper i kampen for å *minimalisere* summen av negative virkninger av vår industrielle og høyeffektive produksjonsform, ved at de minst miljøvennlige produkter og prosesser elimineres allerede på utviklingsstadiet. Metoden må gi internasjonalt sammenlignbare resultater, men kan neppe tas

ut av forskningsinstitusjoner og spesiallaboratorier.

Med *vannkvalitetskriterier* forstås et sett av objektive kriterier, målbare med fysisk-kjemiske metoder, for hva som er akseptabel vannkvalitet i et gitt miljø. Disse er avhengige av hvilken målsetning som ligger til grunn. For fastleggelsen av disse har man behov for biotestmetoder som med stor grad av sikkerhet og høy sensitivitet kan fastsette grenseverdier for negativ påvirkning, definert f.eks. ut fra at en viktig art ikke har levevilkår, eller at kraftig algevekst oppstår når verdien overskrides. Vannkvalitetskriterier representerer kanskje det viktigste arbeidsgrunnlag for statlige myndigheter og ingeniører, men de kan ikke sees på som endelige. Forbedrede testmetoder og økende krav til sikkerhet vil stadig presse grensene nedover. Miljøforskningsinstitusjonene har her et av sine viktigste arbeidsfelter.

Med *legale tester* forstås biotester med standardiserte prosedyrer innarbeidet i lovttekster, forskrifter og konsesjonsvilkår. En bedrift pålegges f.eks. å teste sitt avløpsvann med en viss frekvens, og svaret skal tilfredsstillende forutbestemte normer. Metodene må være relativt hurtige og enkle å utføre, men samtidig ha et klart definert forhold til vannkvalitetskriterier, og heri ligger et stort problem. Systemet er i bruk i f.eks. V.-Tyskland, men er enda lite utviklet.

Utslippsovervåking bør foregå ved rørets munning. Ofte kan fysikalsk-kjemiske metoder være tilfredsstillende, men like ofte er utslippets sammensetning så kompleks eller grenseverdien for negative virkninger så lave, at bare en kontinuerlig biologisk overvåking er relevant. De mest vellykkede systemer hittil baseres på giftvirkning overfor fisk og aktivt slam og

på vekst av alger, men mye metodeutvikling gjenstår ennå før praktisk bruk i noe omfang kan påregnes.

6. STANDARDISERING

Det er klart at tanken om *standardisering* av biotestmetoder fort melder seg, men det er all grunn til å slå kaldt vann i blodet på eventuelle optimister. Vi er her inne på et svært vanskelig felt. Det man kan tenke seg å å standardisere *hvor* dan en viss metode skal utføres, slik at det sikres en jevn kvalitet og sammenlignbarhet av resultater. Dette arbeidet er allerede i gang innen flere organisasjoner. Hva man *ikke* i dag kan tenke seg å gjøre er å standardisere *hvilken* metode som skal anvendes for et visst problemområde eller formål. Tankegangen bak dette er at biotestresultater på vårt nåværende kunnskapsnivå krever kvalifisert bedømmelse, og at valg av metodikk vil måtte variere mye med bruksområdet. Et spørsmål som også melder seg er hvilke krav en må stille til testlaboratoriernes kvalitet og kompetanse.

7. INTERNASJONALT ARBEID

Flere stater har kommet langt med egne standarder, først og fremst USA, Storbritannia, V.-Tyskland og Japan. De viktigste referanseverker er i dag EPA-standarder, Deutsche Einheitsverfahren og 1976-utgaven av Standard Methods for Examination of Water and Wastewater.

Som nevnt arbeider en rekke internasjonale organer med utvikling og standardisering av biotestmetoder, ofte med over-

lappende aktiviteter. Kort nevnes ISO, FAO, OECD, EF, WHO og Den Internasjonale Komité for Havforskning. På nordisk plan tas arbeidet nå opp av Nordisk Standardiseringskomité og NORD-FORSK. Norge er representert i de aller fleste komitéer. Det er åpenbart et sterkt behov for koordinering og informasjonsutveksling over landegrensene.

8. UTVIKLINGSPERSPEKTIVER

Her hjemme er det et klart behov for forskningsmidler for med større kraft å kunne ta biotestmetoder i bruk i praktisk vannressursforvaltning. Vi savner blant annet basal kunnskap om testorganismens fysiologi i mange tilfeller. Innen NORD-FORSK startes det nå opp et større prosjekt på «Utvikling av ensartede toksisitetstester for akvatiske miljøer», som skal ledes av en koordinator innen hvert av de nordiske land. Når prosjektplanen foreligger en gang i løpet av 1978, er det å håpe at NTNF og Miljøverndepartementet griper sjansen til å støtte et viktig og ressurskrevende arbeid, som raskt vil kunne heve kvaliteten på og rasjonalisere det viktigste anvendelsesområdet for biotester — miljøtoksikologien. Skal intensjonene i Lov om vern mot vannforurensning og Lov om produktkontroll oppfylles tilnærmedesvis, trenger vi et skikkelig biologisk verktøysett å arbeide med for å kunne gjennomføre intelligente risikoanalyser. Retter vi blikket mot EF, USA og Øst-Europa synes det klart at vi har en del å ta igjen.