

Toksisitetstester med bakterier

Av Kari S. Ormerod

Kari S. Ormerod er siv.ing. NTH 1958 og er ansatt som forsker ved Norsk institutt for vannforskning.

INNLEDNING

Det første internasjonale symposium om screening tester for toksisitet ved anvendelse av bakterier som testorganisme, ble avholdt i Burlington ved Canada Centre for Inland Waters (CCIW), 17.—19. mai 1983. Symposiet ble arrangert av Barney Dutka og Dickson Liu ved National Institute for Water Research, som er en del av CCIW. Deltakere fra Canada, USA, Japan, England, Frankrike, Sverige, Finland og Norge presenterte de forskjellige metoder og bruken av disse for diverse praktiske formål. Metodene dekket et vidt anvendelsesområde — fra mutagenitets-tester som Ames test til metoder for bedømmelse av effekter ved utslipp til kloakkrenseanlegg, til naturlige resipienter og til deponering av giftstoffer på jord. Symposiet ga en fin oversikt over metodene og deres anvendelsesområder. I denne artikkelen blir det gitt en oversikt over prinsippet og anvendelsesmulighetene for de mest benyttede testene utenom dem som tester for mutagenitet. Publikasjonene fra symposiet ventes utgitt innen 12 mnd. fra symposiet. Nærmere opplysninger om testene kan også fås ved henvendelse til Kari Ormerod.

MICROTOX-testen

Denne metoden er utviklet av firmaet Beckman Instruments Inc., og baserer seg på å måle hemming av det enzymet

som gjør den marine bakterien *Photobacterium phosphoreum* istand til å avgi lys. Beckman har utviklet et fotometer som egner seg til måling av bakterienes lysintensitet, og de leverer bakterien i frysetørret form sammen med den væsken bakteriene skal slemmes opp i under testprosedyren. Dette gjør metoden meget rask i bruk. Selve målingen tar bare noen få minutter. Det er derfor mulig å undersøke mange testkonsentrasjoner i løpet av kort tid, slik at konsentrasjonen for giftighet raskt kan lokaliseres. Dette gjør at testen egner seg til overvåkingsoppgaver.

Den organisme som benyttes i testen er en heterotrof bakterie som finnes i sjøvann og som vokser på død fisk, der den kan sees som en lysende hinne.

Metoden tester som før nevnt for hemming av bakterienes evne til å produsere lys, og ikke hemning av dens nedbrytningsaktivitet. Den økologiske betydning av bakterienes evne til å produsere lys er ikke kjent, men dette er av mindre betydning for tolkning av resultatene fra testen. Det har nemlig vist seg i praksis at denne testen er like ømfindlig for de fleste typer giftstoffer som fisk og ferskvannkreps (*Daphnia*). MICROTOX-testen kan derfor brukes istedenfor mer tids- og arbeidskrevende fiske- og krepsdyrtester til å påvise giftstoffer i avløpsvann, som screening test for å skille mel-

lom giftigheten av stoffer med samme anvendelsesområde, eller for å lokalisere konsentrasjonsområdet for begynnende giftteffekt av et stoff. Det sistnevnte kan være arbeidsbesparende i forbindelse med oppsett av en gifttest med f.eks. den type fisk som det er av størst interesse å beskytte. Metoden er bl.a. benyttet til overvåking av innløpsvann til biologiske kloakkrensingsanlegg. Hensikten var å lokalisere perioder på døgnet da avløpsvannet inneholdt stoffer som virket hemmende på renseprosessen, for så å forsøke å lokalisere kilden. Likeledes ble metoden anbefalt til å påvise forekomst av giftstoffer i industrielt avløpsvann, og om ønskelig til å finne de produksjonstrinn som forårsaker det giftigste avløpsvann, slik at dette kan skilles ut og behandles separat. Et nytt anvendelsesområde er testing for giftstoffer i plastmateriale som brukes til matvarer eller til medisinsk utstyr. De potensielle giftstoffer ekstraheres fra plastmaterialet og ekstraktet analyseres med MICROTOX. Dette går mye raskere enn inplantasjon av plastmaterialet i mus, eller cellekulturtester, som er de vanligste testmetoder for dette idag.

De nevnte anvendelsesområder kan anbefales fordi undersøkelser har vist at MICROTOX for de fleste stoffer er like sensitiv som de tester den erstatter. For noen stoffer er den imidlertid mindre sensitiv, men for mange er den mer sensitiv. Sålenge den er mer sensitiv er vi på den sikre siden med hensyn til ut-sagnet om giftighet. På den annen side kan man ikke bruke MICROTOX til å fastsette konsentrasjoner for hemming av nedbrytningsprosesser (biologiske renseanlegg, resipientvann). Måleapparatet er dyrt og driftsutgifter i form av bakterier og testmedium som kjøpes hos Beckman kommer i tillegg. Sistnevnte blir sannsyn-

ligvis ikke dyrere enn om man selv skal dyrke og vedlikeholde forsøksorganismer slik at de er klare for testing ved behov.

SPIRILLUM VOLUTANS TEST

Denne testen har samme bruksområde som MICROTOX, men for å utføre den trenger man kun utstyr som er vanlig ved alle bakteriologiske laboratorier. Man trenger et mikroskop, men bakterien er så stor at den er lett å se selv i mikroskop med det enkleste utstyr. For rutine-testing vil det lette arbeidet om et TV-kamera med skjerm eller et «omvendt tyverialarmsystem» koples til mikroskopet. Bakteriene beveger seg nemlig frem og tilbake ved hjelp av flageller i begge ender. Disse flagellene er koordinert slik at begge skifter bevegelsesretning samtidig når bakterien ønsker å reversere bevegelsen. Når et giftstoff rammer senteret for koordinering av disse bevegelsene, koordineres ikke flagellens bevegelser, og bakterien begynner å vibrere, den beveger seg ikke frem og tilbake. Derfor kan en «omvendt tyverialarm» benyttes til å registrere endepunktet for hemmingen, idet den innstilles på å gi signal når bevegelsen opphører. Dette lar seg også observere direkte i mikroskop. Bakterien finnes overalt i vannmasser som inneholder organisk stoff, men er fattig på oksygen. Vedlikehold av organismen er arbeidskrevende, da den må overføres til nytt vedlikeholdsmedium 2—3 ganger pr. uke. Responstiden i selve testen er bare noen få minutter. Foreløpig finnes det ikke så mye bakgrunnsstoff om denne metodens sensitivitet som for MICROTOX, men etter det som hittil er publisert, ser sensitiviteten ut til å ligge på samme nivå for disse to metoder.

Fordi man ikke behøver å gå til an-

skaffelse av dyrt måleinstrument, kan metoden lett tas i bruk ved de fleste mikrobiologiske laboratorier uten ekstra investering. Driftsomkostningene med vedlikehold av bakterien vil sannsynligvis være like store som innkjøp av bakterier og testmedium for MICROTOX-testen.

Den største usikkerhet ved bruk av begge de hittil nevnte testene er at de begge tester for hemming av helt spesielle prosesser. Stoffer som hemmer disse prosessene behøver ikke være giftige for andre organismer. Vi kan heller ikke være helt sikre på at stoffer som er lite giftige i disse testene også har lav giftighet overfor andre organismer, selv om praksis har vist at dette ofte er tilfelle for MICROTOX. Vi vet aldri når vi står overfor unntaket før vi har testet det.

DEHYDROGENASETESTER

Hemming av enzymet dehydrogenase som en parameter for hemming av nedbrytningsprosesser er en vanlig brukt bakterietest. Flere forskere hadde foredrag under dette emnet. Den hittil vanligste metode har vært å måle dehydrogenaseaktiviteten ved hjelp av TTC (2, 3, 5-trifenylnitroimidazoliumklorid), som under påvirkning av dehydrogenase reduseres til fargestoffet formazan. Denne metoden var nå blitt vesentlig forbedret ved at inkuberingstid, -temperatur og pH-verdi var optimalisert, og ved at TTC var byttet ut med et nær beslektet stoff, kalt INT (2- (p-iodofenyl) -3- (p-nitrofenyl) -5- fenyltetrazoliumklorid). INT reduseres til INT-formazan, INTF. Interferens fra små mengder oksygen i testløsningen er mindre med INT enn med TTC, og INTF adsorberes ikke så lett til partiklene i slammet. Det virket som om metoden nå var vesentlig forbedret.

Dehydrogenasetesten er mye brukt for å fastsette tilrådelig konsentrasjon ved utslipp til biologiske kloakkrensingsanlegg. En slik metode er blant tre bakteriegifttester som er under utarbeidelse som Dansk Standard. De oppnådde verdier er sterkt avhengige av den benyttede slamkonsentrasjon og slamtype. Derfor anbefales metoden enten for bruk med slam fra de aktuelle rensingsanlegg, eller i standardisert opplegg med hensyn til slamtype og -konsentrasjon.

En annen form for bruk av dehydrogenasetesten ble også presentert på symposiet. Metoden ble her brukt til å bekjempe et fenomen som kalles «bulking» i aktivslam kloakkrensingsanlegg. Problemet gir seg utslag i at slammet ikke vil sedimentere, men istedet flyter opp og ut av anlegget. I mange tilfeller skyldes dette unormalt kraftig vekst av den trådformede bakterien *Sphaerotilus natans*. Trådene til denne bakterien stikker da ut av de biologiske fnokkene og er derfor sårbare for desinfeksjonsmidler som klor. Hvis slammet viser tendens til svelling, kan dette avverges ved dosering av en passende mengde klor. Vanskeligheten ligger imidlertid i å fastsette den riktige klormengde. Dette kan nå bestemmes raskt ved å gjøre en gifttest med slammet, der det tilsettes forskjellige mengder klor til slamprøver som inkuberes i nærvær av INT. De filamentene som har aktiv dehydrogenase (ikke er hemmet) danner røde krystaller av INTF inne i cellene. Ved å farge de trådformede cellene med malakittgrønt, blir de lett synlige i mikroskop, slik at forholdet mellom inaktive, grønne filamenter og aktive, grønne filamenter med røde krystaller kan bestemmes. Ut fra ønsket grad av inaktivisering kan den riktige klordose fastsettes.

OKSYGENOPPTAKSTESTER

De fleste tester av denne type presentert på symposiet bestemte konsentrasjonen for akutt hemming av oksygenopptak hos aktivslam. Noen testet også for slammetts evne til å adapteres til giftstoffet. Den prosess som inaktiveres er etter de fleste testopplegg også her den aerobe nedbrytningsprosess, slik som i dehydrogenasetesten. Når alle testene og de oppnådde resultater sees under ett, kan følgende generelle konklusjon trekkes: De fleste giftstoffer har en øyeblikkelig hemmende virkning på oksygenopptaket hos bakterier. Målt over tid (noen timer), får man alltid avtakende oksygenopptakshastighet med økende mengde giftstoff. Oksygenopptaket tar seg imidlertid opp igjen i de aller fleste tilfeller. Dette kan skyldes at de enkelte bakterier adapteres til nærvær av giftstoffet, eller at noen bakterier i det benyttede podemateriale er mer motstandsdyktig enn de andre, slik at de vokser opp i tilstrekkelige mengder til at deres oksygenopptak kan måles. Når oksygenopptaket kommer igang igjen, viser det nesten alltid samme hastighet som i kontrollen uten giftstoff. Økende mengde giftstoff gir seg utslag i at det tar lenger og lenger tid før oksygenopptaket starter, og tilslutt starter det ikke innen testtiden. Disse opplysninger kan nå benyttes til å velge den type test som er relevant for hver enkelt problemstilling. Ved diskontinuerte utslipp til biologiske kloakkrensingsanlegg er akutt hemming mest relevant, mens man ved kontinuerlig utslipp kanskje ønsker å vite noe om slammetts evne til adaptering. En

slik akutt-test og en adapteringstest er nå under utarbeidelse til felles nordiske standarder.

TUNGMETALLFORURENSNING

Denne evnen til adaptasjon hos bakterier som nedbryter organisk stoff ble benyttet av noen forskere i California til å påvise tilstedeværelse av «biologisk aktive» (giftige) tungmetaller i jord og sedimenter. Testen utføres på prøver fra den lokalitet som antas å være påvirket. Metoden går ut på å antallbestemme aerobe, heterotrofe bakterier i prøvene, både i fravær (kontroll) og i nærvær av giftige former av de tungmetaller man søker. De relevante tungmetaller tilsettes i økende konsentrasjon inntil antall fremkomne bakteriekolonier er redusert til 1% av kontrollen. Til sammenligning analyseres samtidig en prøve som man vet er upåvirket av tungmetaller. Man sammenligner så konsentrasjonene som skal til for å redusere bakterieantallet til 1% av kontrollen hos upåvirket og påvirket prøve. Graden av resistens uttrykkes som forskjellen mellom disse konsentrasjonene. Jo mer resistente bakteriene er, jo større påvirkning av tungmetaller regner man at de har vært utsatt for.

Forskergruppen hadde planer om å benytte metoden som et hjelpemiddel i søkningen etter utnyttbare mineraler. Metoden kan også benyttes til å undersøke tungmetallvirkninger i grunnvann under søppelfyllplasser og andre deponier, samt å følge spredningen av aktivt virkende metaller i risipient-sedimenter.

LITTERATUR

I denne artikkelen er det gitt et sammendrag av mange forskjellige innlegg fra symposiet, som alle vil bli publisert i bokform iløpet av høsten 1983 — våren 1984. De fleste av de refererte foredrag er angitt med forfatter og tittel i det etterfølgende. Der det allerede eksisterer publisert materiale om samme emne, er dette tatt med slik at interesserte kan studere emnet med en gang, uten å måtte vente på symposiepublikasjonen.

Fra symposiet:

- Burlich, A. A.:* MICROTOX — A Bacterial Toxicity Test with Several Environmental Applications.
- Qureshi, A. A., Coleman, R. N., and Paran, J. H.:* Evaluation and Refinement of the MICROTOX Test for Use in Toxicity Screening.
- Goatcher, L. J., Qureshi, A. A., and Gaudet, I. D.:* Evaluation and Refinement of the *Spirillum volutans* Test for Use in Toxicity Screening.
- Viswanath, G. K.:* A Modified Method for Determination of Dehydrogenase Activity of Activated Sludge.
- Trevors, J. T.:* A Method for Assessing the Effects of Pollutants on Electron Transport System Activity in Soil and Sediment.
- Koopman, B., Bitton, G., Logue, C. L., Bossart, J. M., and Lopez, J. M.:* Validity of Tetrazolium Reduction Assay for Assessing Toxic Inhibition of Filamentous Bacteria in Activated Sludge.
- Anderson, A. C., Engelande, A. J., and Abdelghani, A.:* Comparison of Microbial Assay Techniques for Evaluation of Toxicity of Organics in Industrial Waste.
- King, E. F.:* Comparative Study of Assessments of Toxicity to Bacteria of Single Chemicals and Mixtures.
- Ormerod, K. S., and Efraimssen, H.:* Testing for Toxicity and Adaptation in Communities of Heterotrophic Microorganisms.
- Olson, B. H., Tripp, S. C., and Shearer, D. F.:* Bacterial System for Assessing Bioavailabilities of Metals in Soil Systems.

Publisert litteratur:

- Burlich, A. A., Greene, M. W., and Isenberg, D. L.:* Reliability of the Bacterial Luminescence Assay for Determination of the Toxicity of Pure Compounds and Complex Effluents. *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fourth Conference*. ASTM STP 737. D. R. Bransen and K. L. Dickson, Eds., American Society for Testing of Materials, 1981, pp. 338—347.
- Bitton, G., and Koopman, B.:* Tetrazolium reduction-malachite green method for assessing the viability of filamentous bacteria in activated sludge. *Appl. Env. Microbiol.* 43, 964—966 (1982).