

Biotestsystemen voor automatische detectie van acute toxiciteit van water

1. Inleiding

Het belang van een betrouwbaar systeem voor de melding van toxiciteit van een oppervlaktewater wordt al geruime tijd onderkend. Een dergelijk systeem zou eveneens waardevol zijn voor de controle van uit sterk verontreinigd water bereid drinkwater. Ondanks geavanceerde analytische technieken kunnen vele verontreinigde stoffen, die meestal in microhoeveelheden aanwezig zijn, nog niet direct in het water worden gemeten.

Een systeem, dat wellicht wel mogelijkheden



DRS. J. J. M. VAN RHIJN
Rijksinstituut voor
Drinkwatervoorziening

voor directe detectie biedt, is een biologisch monitorsysteem, waarbij gebruik wordt gemaakt van organismen ter detectie van de toxische stoffen. Als testorganismen kunnen vissen gebruikt worden, geplaatst in een continu doorstroomd aquarium. Een groot aantal methoden zijn ontwikkeld om met behulp van vissen toxiciteitsmetingen uit te voeren. Naast vissen is het ook mogelijk om als testorganismen gebruik te maken van bacteriën en daphnia's. Om een beter inzicht te krijgen in de mate, waarin organismen gevoelig zijn voor toxische stoffen, in vergelijking tot de mens, is onlangs een literatuurstudie van Althaus en Jung verschenen over de schadelijkheid van stoffen voor waterorganismen en warmbloedige dieren. Op grond van deze literatuurgegevens kan worden vastgesteld, dat vissen in het algemeen veel gevoeliger zijn dan warmbloedigen. Vissen geven in een signaleringssysteem uiteraard geen uitsluitsel over chronische toxiciteit voor warmbloedigen.

Bij de bepaling van de schadelijke concentraties van toxische stoffen is de testvorm een van de belangrijkste factoren.

De meeste tests zijn als statische test uitgevoerd, d.w.z. de te onderzoeken oplossing wordt niet vernieuwd tijdens het experiment. Het is echter gebleken, dat bij de dynamische test de giftige concentraties veel lager liggen. Het testorganisme komt bij de dynamische test dan ook met een grotere hoeveelheid gif in aanraking dan bij de statische test. Naast het testsysteem is uiteraard de gevoeligheid van het testorganisme erg belangrijk.

Hiernavolgend zullen enige biotestsystemen worden beschouwd, die gebruikt kunnen worden voor automatische signalering van

toxische stoffen in oppervlaktewater en drinkwater.

2. Biotestsystemen

In de literatuur zijn diverse biologische testsystemen beschreven, die kunnen worden gebruikt voor automatische signalering van toxiciteit van water. Zo kan het zuurstofverbruik door bacteriën en vissen worden geregistreerd op het gedrag van organismen, waarbij met name de positieve rheotaxis en de ademhaling zich voor detectie lenen. Achtereenvolgens zullen de kenmerken en de voor- en nadelen van de verschillende mogelijkheden worden beschouwd.

2.1. Registratie zuurstofverbruik van bacteriën

Voor de meeste toxicologische onderzoeken is het mogelijk om in plaats van hogere diersoorten gebruik te maken van bacteriën. Ethische gezichtspunten daarop gelaten hebben bacteriën het voordeel zich zeer snel te vermeerderen. Door deze korte generatietijd is een vrijwel continue toxiciteitsmeting mogelijk. De bacteriën worden voor deze meting tezamen met een oplossing van voedingsstoffen en het te testen water continu in een meetvat gebracht, waar ten gevolge van de stofwisseling van de steeds zeer jonge en vitale bacteriën een verlaging van de concentratie aan opgelost zuurstof ontstaat, die voortdurend via een O₂-elektrode wordt gemeten. Zodra het te onderzoeken water stoffen bevat, die de stofwisseling van de bacteriën remmen of stopzetten, wordt het zuurstofverbruik kleiner en verdwijnt het in extreme gevallen zelfs geheel. De geregistreeerde zuurstofconcentratie is hier een maat voor de toxiciteit van het water.

Door de goede reproduceerbaarheid en de eenvoudige toepasbaarheid kan deze methode bijzonder waardevol zijn bij de eventuele bewaking van oppervlaktewater en drinkwater.

2.2. Registratie van het verdwijnen van de positieve rheotaxis bij vissen

Toxische stoffen kunnen veranderingen teweeg brengen in de fysiologische eigenschappen van vissen. Afhankelijk van de tijd en van de concentratie van de toxische stoffen zullen zich tenslotte gedragsveranderingen manifesteren. Het werkprincipe bij deze methode is de registratie van storingen in de positieve rheotaxis van testvissen bij acute vergiftiging. Wanneer vissen in een gerichte stroming gebracht worden, zullen zij zich in het algemeen tegen deze stroom in bewegen (positieve rheotaxis) en proberen zich op een bepaalde plaats te handhaven (fotomeno-

taxis). Dit gedrag wordt bij vergiftiging verstoord. De maat voor het kritische punt in de vergiftiging is een dusdanige storing in de bewegingscoördinaten van de vis dat deze naar het einde van de testruimte drijft. Aan het einde van het testbassin kunnen verschillende methoden van signalering toegepast worden, zoals foto-elektrische cellen of een drukgevoelige signalering. De stromingstest is alleen bruikbaar bij acute vergiftiging, die een directe inwerking op de vis heeft. Het is niet mogelijk op deze wijze veranderingen in resistentie of vitaliteit van de vis te registreren.

2.3. Respirometer

Het zuurstofgebruik door vissen kan worden gebruikt als een maat voor de algemene metabolische activiteit van het organisme.

Als indicaties voor de invloed van variabelen in de omgeving kunnen veranderingen in het metabolisme worden bestudeerd. Hiervoor is de respirometer ontwikkeld die continu het zuurstofverbruik meet.

Daar de gemeten zuurstofconcentratie in het water dat de vistestruimte verlaat, afhankelijk is van de stroomsnelheid van het water, kan het werkelijke zuurstofverbruik berekend worden via de formule:

$$(C_1 - C_0) F = R$$

C₁ = O₂-concentratie in het water, dat naar de testruimte toestroomt

C₀ = O₂-concentratie in het water, dat de testruimte verlaat

F = stroomsnelheid ml/hr

R = O₂-verbruik in mg/hr

Toevoeging van toxische stoffen aan het water veroorzaakt een toename van de ademhalingsfrequentie en daardoor treedt een toename van het zuurstofverbruik op. Dit laatste kan gemeten worden met de respirometer.

Over de bruikbaarheid van de methode als signalering voor vervuild oppervlaktewater is nog weinig bekend.

2.4. Frequentiemetingen aan de ademhaling van vissen

Door het nauwe verband, dat er bestaat tussen de ademhalingsactiviteit en de fysiologische omstandigheden, kan de ademhalingsfrequentie gebruikt worden om het effect van toxische stoffen en veranderingen in de omgeving op de vis te bestuderen.

In de afgelopen tien jaar zijn er verschillende methoden ontwikkeld voor het meten van de ademhalingsfrequentie, waarvan enige hier zullen worden behandeld.

2.4.1. Visuele observatie

Ademhalingsactiviteit gaat gepaard met beweging van mond en kieuwen van de vis. Tengevolge hiervan is het mogelijk de ademhalingsfrequentie te meten met behulp van een stopwatch en kan ook een subjectieve bepaling gegeven worden over de intensiteit van de ademhaling.

Deze methode vereist geen speciale apparatuur en is eenvoudig toe te passen. Nadelen zijn de voortdurende aanwezigheid van een waarnemer, hetgeen vooral bij langdurige experimenten moeilijkheden zal opleveren, het subjectieve element in de resultaten en de invloed van de waarnemer op de ademhalingsfrequentie van de vis. Uiteraard is deze methode ongeschikt voor automatisering.

2.4.2. Elektrodekamer

Een van de eenvoudigste methoden om de ademhalingsfrequentie te bepalen wordt verkregen door twee elektroden te plaatsen aan de uiteinden van een smalle meetsluis, waarin zich een vis bevindt.

De elektroden kunnen van dun roestvrij staal zijn of van zilverdraad. De ademhalingsbeweging veroorzaakt een cyclische potentiaalverandering. Bron van deze elektrode-potentiaalverandering is het door de ademhaling verstoren van het elektrochemisch evenwicht aan het electrodeoppervlak. Het spanningsverschil, dat ontstaat, is ter grootte van enige microvolts, afhankelijk van de grootte en de snelheid van de waterstroom.

Hoewel de ademhalingsbeweging de belangrijkste oorzaak is van het potentiaalverschil tussen de elektroden, kunnen ook andere bewegingen, die voldoende water verplaatsen, invloed hebben op de potentiaal. De normale vin-bewegingen voor het handhaven van de positie van de vis zijn dermate minder snel en meer diffuus dan de ademhaling dat deze relatief weinig effect hebben. Krachtige zwembewegingen verstoren het water echter in voldoende mate om het spanningsverschil tengevolge van de ademhaling te onderdrukken. Voor een juiste interpretatie van de resultaten is het dan ook noodzakelijk hiermee rekening te houden.

Deze methode is door de eenvoudige opzet bijzonder geschikt voor een snelle biologische bewaking van het water. Er worden echter geen aanwijzingen verkregen over de intensiteit van de ademhaling, terwijl een nadeel wordt gevormd door het onnatuurlijke milieu, waarin het testorganisme verkeert.

2.4.3. Meting van het door de kieuwen stromend watervolume

De techniek, die het meest wordt toegepast

voor de meting van het watervolume dat door de kieuwen wordt gepompt, maakt gebruik van de vergelijking van Fick. Bij deze methode wordt de zuurstofdruk, PO_2 , gemeten in de mondholte en in de kieuwholte van de vis door middel van in deze holten aangebrachte catheters (dunne buisjes).

De zuurstofopname kan zo bepaald worden en met de aldus verkregen waarden, ingevuld in de vergelijking van Fick, kan het door de kieuwen stromend watervolume worden berekend.

De gemeten PO_2 -waarden variëren sterk met de tijd en de meetplaats in de kieuwen en wat belangrijker is, de tot nu toe gemeten waarden blijken veel te hoog te zijn. Een ernstig nadeel is verder dat apparatuur aan de vis moet worden bevestigd.

2.4.4. Aan de kieuwen bevestigde koperdraden

De ademhalingsfrequentie wordt gemeten door twee koperen draden, voorzien van niet geïsoleerde uiteinden, door de kieuwdeksel heen in de kieuwholte te brengen. Op deze wijze wordt een bipolaire elektrode gevormd. De beweging van de kieuwdeksel doet de uiteinden van de beide draden ten opzichte van elkaar bewegen en veroorzaakt zo een potentiaalverschil dat door middel van een oscilloscoop gemeten kan worden.

In plaats van de niet-geïsoleerde uiteinden van de koperen draden is het ook mogelijk om aan de binnenkant van de kieuwdeksel een lichtgevoelig plaatje aan de draden te bevestigen. De kieuwbeweging wordt nu geregistreerd door lichtmodificaties, die optreden in de kieuwholte tijdens de ademhaling. Bij deze methode kan de vis, hoewel in beperkte mate, vrij rondzwemmen. Het nadeel is ook hier dat er apparatuur aan de vis zelf bevestigd moet worden.

2.4.5. Meting van drukveranderingen in de mond- en kieuwholte

De expansie en de contractie van de mond- en kieuwholte van een vis produceert drukveranderingen van 0,5 tot enige centimeters waterdruk. Door deze drukveranderingen wordt het water door de kieuwen gepompt. Meting van de drukvariaties gaat via dunne plastic buisjes, die ingebracht worden in de neus en in de kieuwdeksel. De buisjes zijn verbonden met drukgevoelige magnetische versterkers en via deze versterkers worden de drukveranderingen weergegeven op een oscilloscoop. Naast de frequentie van de ademhaling kan met deze methode ook de intensiteit van de ademhaling worden bepaald. De amplitude van de drukverandering

geeft zeer betrouwbaar de diepte van de ademhaling aan.

Veranderingen in de omgeving veroorzaken bij een aantal vissoorten (bijv. forel) primair veranderingen in de intensiteit van de ademhaling, terwijl de ademhalingsfrequentie eerst bij grotere storingen verandert.

Het meten van drukveranderingen in de mondholte kan ook gebruikt worden om te bepalen hoe vaak de waterstroom in omgekeerde richting de kieuwen passeert. Dit laatste dient om de in de kieuwzeeft achtergebleven verontreinigingen te verwijderen. Normaal doet de vis dit 1 à 2 maal per minuut. Bij aanwezigheid van toxische stoffen in het water zal de frequentie hiervan sterk toenemen en dit is een zeer gevoelig mechanisme voor het meten van de toxiciteit van het water.

Nadelig bij deze methoden is echter het aanbrengen van apparatuur aan de vis wat het gedrag kan beïnvloeden.

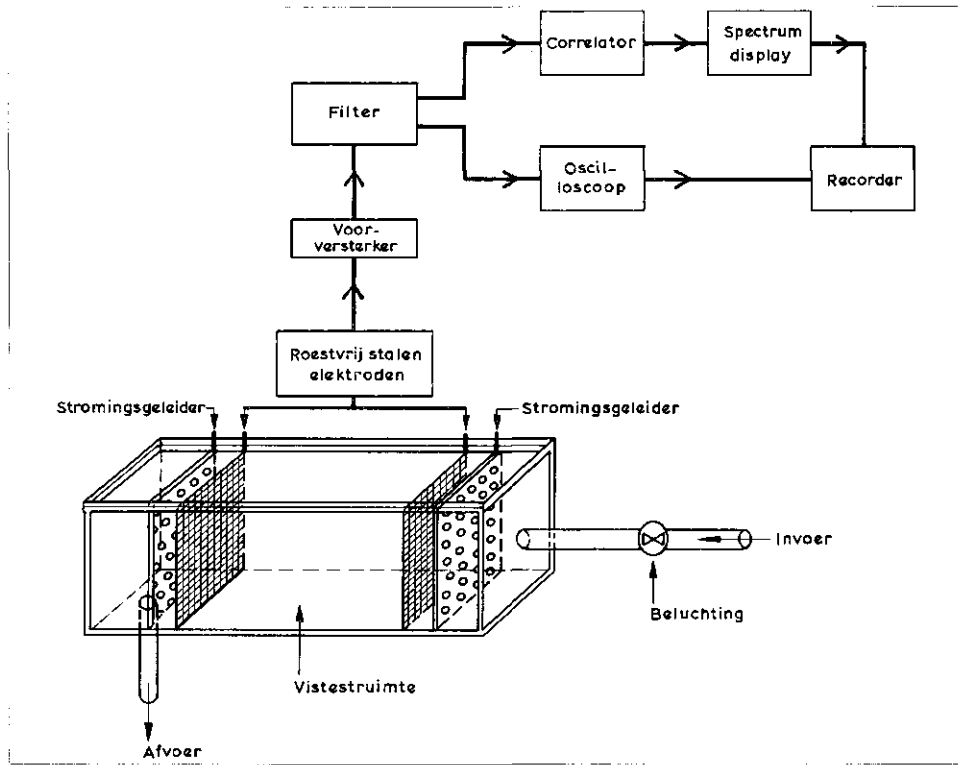
2.5. Registratie van het gedrag van *daphnia's*

De eerder beschreven methode van de elektrodekamer ter meting van de ademhalingsfrequentie van vissen kan ook toegepast worden bij toxiciteitsmetingen met *daphnia's* (watervlooien). De *daphnia* is een uiterst gevoelig en beweeglijk organisme. Wanneer in een meetsluis, vervaardigd volgens het principe van de elektrodekamer, enige *daphnia's* geplaatst worden, zullen deze organismen door hun bewegingen een spanningsverschil doen ontstaan tussen de elektroden. De grote gevoeligheid van *daphnia's* heeft ten gevolge dat reeds bij kleine concentraties van toxische stoffen in het water de *daphnia* dood gaat. De beweging stopt en het potentiaalverschil tussen de elektroden verdwijnt. Nadeel kan zijn dat de *daphnia* wellicht te gevoelig is en een te vroege signalering geeft, waardoor ze voor een bewakingssysteem van sterk vervuild water ongeschikt zijn.

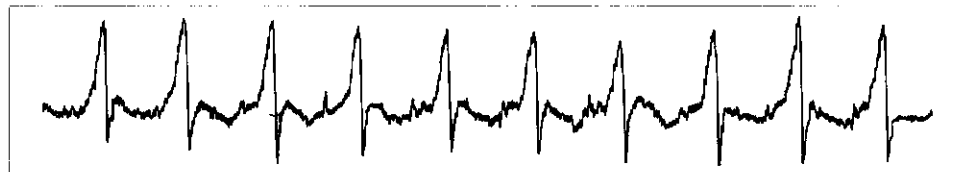
3. Oriënterende experimenten met de elektrodekamer

Om een eerste indruk te krijgen van de werking van de elektrodekamer zijn in samenwerking met het Nederlands Centraal Instituut voor Hersenonderzoek oriënterende experimenten gedaan.

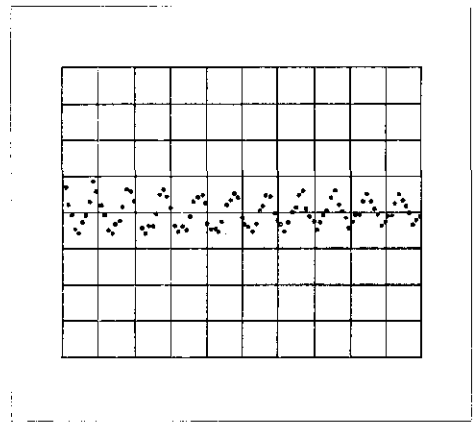
In een eenvoudige proefopstelling bestaande uit een meetsluis (afb. 1) met twee roestvrij stalen elektroden, bevindt zich een vis. Het door de ademhaling van de vis veroorzaakte potentiaalverschil wordt aangeboden aan een voorversterker en een filter. Het versterkte en gefilterde signaal wordt daarna overgebracht op een oscilloscoop en een recorder.



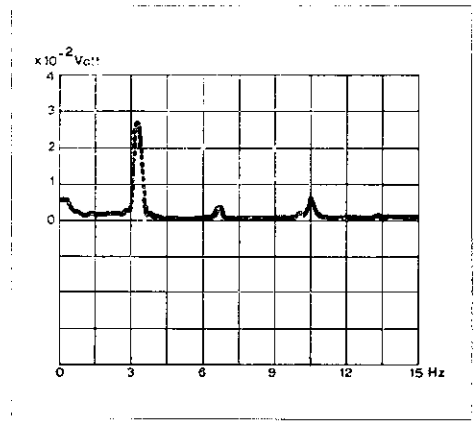
Afb. 1 - Doorsnede door de elektrodekamer. De vistestruimte is 28 cm lang en geschikt voor een vis van ± 15 cm.



Afb. 2 - Elektrisch ademhalings signaal als functie van de tijd.



Afb. 3 - Gecorreleerd ademhalings signaal als functie van de tijd.



Afb. 4 - Ontwikkeling van het gecorreleerde ademhalings signaal in een harmonische reeks als functie van de frequentie.

Na herhaald instellen van de apparatuur wordt het in afb. 2 weergegeven signaal op de recorder verkregen.

Het is ook mogelijk het signaal na versterking en filtrering aan te bieden aan apparatuur uit een „correlator” en een „spectrum display”.

De „correlator” geeft een gecorreleerde functie van het signaal (zie afb. 3). Deze gecorreleerde functie kan door de „spectrum display” ontwikkeld worden in een Fourierreeks (zie afb. 4).

De eerste piek geeft de grondharmonische aan van de ademhaling, de andere pieken de hoger harmonischen.

Bij verhoging van de ademhalingsfrequentie door in het water voorkomende toxische stoffen verschuiven de pieken op het scherm van de „spectrum display”. Deze verschuiving kan als signalering dienen voor de toxiciteit van vervuuld water.

4. Conclusies en problematiek van het onderzoek

Uitgaande van de verwachting, dat in de toekomst in toenemende mate gebruik zal

moeten worden gemaakt van vervuuld oppervlaktewater als grondstof voor de watervoorziening, is het uiterst belangrijk om te komen tot een signaleringssysteem voor toxische stoffen in de bron.

In principe zouden alle hier genoemde signaleringssystemen kunnen worden gebruikt. Voor snelle biologische detectie zijn echter een aantal systemen niet geschikt. De methode van de visuele observatie is te arbeidsintensief en te subjectief. Bij metingen van het ventilatievolume, van de ademhalingsfrequentie met kieuwdraden of van drukveranderingen in de mond- en kieuwholte van de vis moet apparatuur aan de vis zelf worden bevestigd. Dit moet voor een snelle en betrouwbare signalering worden vermeden. Met de methode van het tegenstroomprincipe kan een snelle detectie plaatsvinden en heeft de vis ook een grote beweeglijkheid in het testbassin. Acute vergiftigingen kunnen op deze wijze goed worden gesignaleerd. Het is echter niet mogelijk resistentieveranderingen te registreren. Het is wel mogelijk resistentieveranderingen met de methode van de

elektrodekamer te meten. Heeft de elektrodekamer als nadeel de geringe beweeglijkheid van de vis, iedere verandering in het milieu wordt door het nauwe verband tussen de fysiologische omstandigheden en de ademhalingsfrequentie gedetecteerd. De optredende veranderingen in de ademhalingsfrequentie kunnen een maat zijn voor het variëren van de toxiciteit van het oppervlaktewater.

Een methode, die door z'n eenvoudige opzet ongetwijfeld ook bijzonder bruikbaar kan zijn in bewakingssystemen is de methode van de registratie van het zuurstofgebruik door bacteriën en eventueel door vissen.

Uitgaande van de methode van de elektrodekamer wordt door het RID in een daartoe ingericht laboratorium op het terrein van het GEB te Dordrecht onderzocht in hoeverre met Nederlandse vissoorten kan worden gekomen tot een praktisch toepasbaar alarmeringssysteem. De vissoorten, die hierbij gebruikt worden zijn karper en forel en over enige tijd zal

ook de daphian bij het onderzoek worden betrokken.

De gevoeligheid van de ademhalingsfrequentie voor toxische stoffen brengt mee dat de ademhaling ook bijzonder gevoelig is voor andere effecten zoals angst, aanwezigheid van waarnemers en invloeden ten gevolge van de overbrenging naar de testruimte. De eerste twee effecten kunnen vermeden worden door de meetsluis in een afgesloten ruimte te plaatsen en de eventuele visuele observatie door apparatuur te laten verrichten.

Het effect van de overbrenging naar de testruimte kan opgelost worden door een vis te verdoven voor de overbrenging en gedurende enige uren in de meetsluis te laten acclimatiseren alvorens te gaan meten.

Een ander probleem is de gewenning die kan optreden bij de vis door langzaam toenemende concentraties van toxische stoffen. Dit zou ondervangen kunnen worden door meerdere identiek geconditioneerde vissen gefaseerd in te zetten.

Naast de problemen, die het gevolg zijn van de fysiologie van de vis, zijn er ook moeilijkheden die kunnen ontstaan door het principe van de elektrodekamer.

De optredende periodieke spanningsverschillen worden beïnvloed door veranderingen in:

- temperatuur
- concentratie van de opgeloste zuurstof
- pH
- zoutconcentratie

van het door de meetsluis stromende water. Deze invloeden maken een strenge bewaking van het naar de meetsluis stromende water noodzakelijk.

Het alarmeringssysteem, dat met de methode van de elektrodekamer wordt ontwikkeld, kan worden toegepast bij het beheer van het oppervlaktewater in het algemeen en in het bijzonder bij waterleidingbedrijven, die voor hun watervoorziening grotendeels zijn aangewezen op het oppervlaktewater.

Ook is bewaking en testen van de waterkwaliteit met dit systeem mogelijk in het geval dat huishoudelijk afvalwater als bron voor drinkwaterbereiding wordt aangewend. In de praktijk zal het overigens gewenst zijn meerdere systemen van gelijke en verschillende aard tegelijk in te zetten. Tijdige waarneming van sublethale concentraties van onbekende toxische stoffen in water is tot op heden niet mogelijk.

Door toepassing van biotestsystemen zal in de toekomst de hygiënische betrouwbaarheid van de openbare watervoorziening en een verantwoord kwalitatief beheer van het oppervlaktewater beter kunnen worden gegarandeerd.

Literatuur

- Althaus, H. en Jung, K. D.: Hygiene-Institut te Gelsenkirchen (1972).
- Jung, K. D.: GWF-Wasser/Abwasser 114 (1973).
- Axt, G.,: Institut zur Förderung der Wassergüte- und Wassermengenwirtschaft, Kurzbericht nr. 19, april 1972.
- Juhnke, I. en Bosch, W. K.: Gewässer und Abwasser 1971.
- Schmitz, W.: Institut zur Förderung der Wassergüte- und Wassermengenwirtschaft, Kurzbericht no. 29, april 1972.
- O'Hara, J.: Water Research, 1971.
- Jones, J. R. E.: J. Exp. Biol., 1941.
- Spoor, W. A., Neiheisel, T. W. en Drummond, R. A.: Trans Americ. Fish. Soc., 1971.
- Davis, J. C. en Cameron, J. N.: J. Exp. Biol., 1972.
- Sutterlin, A. M.: Physiological Zoology, 1969.
- Hughes, G. M. en Roberts J. L.: J. Exp. Biol., 1970.
- Hughes, G. M. en Saunders: J. Exp. Biol., 1971.
- Schaumberg, F. D., Howard, T. E. en Walden, C. C.: Water Research, 1967.
- Wells, N. A.: Proc. Nat. Acad. Sci., 18.
- Lee, E. L. en Buzzel, J. C.: Proc. of the 24th Industr. Waste Conf., 1969.

