VYUŽITÍ XAD RESINŮ PŘI DETEKCI GENOTOXICITY ORGANICKÉHO ZNEČIŠTĚNÍ ŘEK LUČINY A OSTRAVICE

Zuzana Jaskóová
Katedra biologie a ekologie, Přírodovědecká fakulta, Ostravská univerzita v Ostravě, 30. dubna 22, 701 03 Ostrava, Zuzana.Jaskoova@osu.cz

Abstrakt

V souvislosti s kontaminací způsobenou vyústěním odpadních vod a plošnými splachy představují řeky Lučina a Ostravice dlouhodobě silně antropogenně ovlivněné toky. Cílem práce bylo zhodnotit míru zatížení toků genotoxickými polutanty. Vzorky vody byly zahuštěny XAD resiny metodou extrakce na tuhou fázi (SPE) a mutagenita byla hodnocena *Salmonella*/microsome detekčním systémem. Přítomnost mutagenních organických polutantů byla sledována ve vzorcích pitné vody, bodových a pasivních odběrech z Lučiny-po ústí do toku Ostravice (0,5 ř.km) a Ostravice-nad Lučinou (4,7 ř.km). Byly použity kmeny bakterie *Salmonella typhimurium* His$^-$ TA98 a TA100 ve variantách testu bez i s S9 metabolickou aktivací *in vitro*. Mutagenní aktivita byla zaznamenána u bodových odběrů surové i zakoncentrované pitné vody z 10. 5. 2011, u koncentrátů řek z 28. 3. 2012 a pasivních odběrů z období 18. 7. - 10. 8. 2011.

Klíčová slova: *XAD resiny; pitná voda; říční voda; mutagenita; Amesův miniaturizovaný fluktuační test*

Úvod

V monitoringu znečistění vod genotoxickými kontaminanty se poměrně často využívá zkoncentrování analytů adsorbcí na XAD resiny. Amberlite® XAD-2 a XAD-4 resiny patří k adsorbentům polymérního typu. Jedná se o hydrofóbní umělé pryskyřice na bázi polystyren-divinyl benzenu ve formě bílých neprůhledných (XAD-2) nebo průsvitných (XAD-4) tuhých nerozpustných „kapiček“. Afinita k poutaným sloučeninám kolísá v závislosti na jejich polaritě, specifickém objemu pórů a velikosti povrchové plochy. XAD-2 adsorbenty (CAS No: 9060-05-3) se používají k prekoncentraci rozpustných organických sloučenin (pesticidy, PAU, antibiotika, tuky, surfaktanty). Typ XAD-4 (CAS No: 37380-42-0) je vhodný k adsorbci malých hydrofóbních sloučenin jako např. farmak, fenolů, chlorovaných organických látek nebo k záchytu těkavých organických látek a iontů kovů. Zatížení řek Lučiny a Ostravice organickým znečištěním je dlouhodobé a podílejí se na něm zejména podniky ArcelorMittal Ostrava a.s, ČOV Havířov či Biocel Paskov a.s., ale i splaškové vody.

Materiál a metody

Testované vzorky

Vzorky pitné vody byly získány v ekotoxikologické laboratoři KBE PřF OU v souladu s ČSN ISO 5667-5 [1] ve dnech 10. 5. 2011, 13. 7. 2011, 14. 7. 2011, 15. 2. a 22. 2. 2012. Odebírání vzorků povrchové vody se řídilo pokyny ČSN EN ISO 5667-3 [2] a ČSN ISO 5667-6 [3]. Zkoumány byly vzorky z říčních profilů Lučina-po ústí do toku Ostravice (Id. VÚ: 20451000; 0,5 ř.km; Loc: 49°49′45.36″N 18°18′4.13″E) a Ostravice-nad Lučinou (Id. VÚ: 20430000; 4,7 ř.km, Loc: 49°49′53.41″N 18°17′44.18″E). Bodové odběry byly provedeny ve dnech 11. 7. 2011 v 15.30 hodin a 28. 3. 2012 v 10.00 hodin. Dne 18. 7. 2011 v odpoledních hodinách byly do toků umístěny dosimetry s kondicionovanou směsí XAD-2 a 4 resinů, které zde byly ponechány po dobu 24 dní. Vzorky byly sterilizovány membránovou filtrací (0,45 µm).

Prekoncentrace XAD resiny

Zkoncentrování organického znečištění bylo provedeno podle normy TNV 75 7231 [4]. Bylo připraveno 30 ml rovnocenné směsi XAD-2 a XAD-4 resinů (15 + 15 ml), která byla promyta metanolem (aktivace) a destilovanou vodou (kondicionace). Při bodových odběrech bylo znečištění extrahováno z 15 l vzorku umístěného do skleněného demižonu s promytými sorbenty. Tato směs byla 24 hodin intenzivně promíchávána. Poté byly sorbenty od matrice odděleny dekantací. Při pasivním vzorkování bylo do toku umístěno zařízení, které již obsahovalo aktivované/kondicionované resiny. Sorbenty s navázanými látkami se pak naplnila skleněná kolona, ve které bylo co nejméně vody, ale zrna byla propojena vodním sloupcem s absencí vzduchových bublin. Eluci látek zajistila exposice 15 ml acetonu po dobu 15 minut. Eluent byl odstraněn probubláváním dusíkem. Výsledný koncentrát organického znečištění se doplnil destilovanou vodou na objem 15 ml, což odpovídá tisícinásobnému zahuštění vzorku. Byla také ověřena adsorpční schopnost resinů za neutrálního pH na modelovém roztoku destilované vody obohacené o fenol (C_6H_6O; CAS No: 108-95-2; rozpustnost ve vodě 0,638 mol/l) na výslednou koncentraci 0,01 mg/l. Návratnost fenolu ze vzorku byla stanovována spektrofotometricky při vlnové délce λ = 230 nm, byla přitom zaznamenána 51% retence.

Testovací organismus

Byly využity bakteriální kmeny *Salmonella typhimurium* His- TA98 a TA100 získané v lyofilizovaném stavu z České sbírky mikroorganismů, Brno. Oživení a příprava bakteriální suspenze se provádí podle přiloženého návodu. Kmen TA98 indikuje posunové a kmen TA100 záměnové mutace.

Test genotoxicity

Byl využit upravený postup Muta-ChromoPlate [5]. Metabolická aktivace byla modelována *in vitro* přídavkem krysí postmitochondriální jaterní frakce S9 (samci Wistar, SPF) získané ze Státního zdravotního ústavu, Ostrava. Před zahájením testování byla upravena optická denzita bakteriální suspenze (540 nm: 0,4 ± 0,01) a pH fosfátového pufru na 6,8-7,2. Do sterilních plastových zkumavek (V = 50 ml) byly aplikovány požadované objemy reakční směsi, fosfátového pufru, standardní ředicí vody, testovaného vzorku, standardního mutagenu popř. S9 směsi a bakteriální suspenze daného kmene [5]. Po důkladném promíchání se obsah každé zkumavky přemístil pomocí osmikanálové pipety na mikrotitrační destičku, přičemž v každé z jejích 96 jamek bylo 200 µl směsi. Inkubace probíhala 5 dní při teplotě 37 °C ve stacionárním termostatu. Za pozitivní odezvu je považována přítomnost žlutých, částečně žlutých a zakalených jamek. Fialové jamky se hodnotí jako negativní. Pokud byl použit paralelní design zkoušky, byl z hodnot získaných pro dílčí replikáty vypočten aritmetický průměr ($\bar{x}$) a výběrová směrodatná odchylka (s). Ke vzájemnému porovnání získaných výsledků slouží index R_t/R_c (počet pozitivních jamek ve vzorku/počet pozitivních jamek v negativní kontrole). Byl stanovován také stupeň genotoxického rizika organického znečištění vod v závislosti na míře zahuštění vzorku [6].

Výsledky a diskuse

Výsledky testování pro jednotlivé vzorky shrnují tabulky 1. až 5., přičemž pozitivní odezva je podbarvena šedě.

Tabulka 1. Počty pozitivních jamek a index mutagenity (± *s*) pitné vody z 10. 5. a 14. 7. 2011

PITNÁ VODA	**10. 5. 2011**				**14. 7. 2011**			
Koncentrace	**0x**		**250x**		**0x**		**250x**	
Kmen/Veličina	**Jamky**	**R_t/R_c**	**Jamky**	**R_t/R_c**	**Jamky**	**R_t/R_c**	**Jamky**	**R_t/R_c**
TA98/-S9	17 ± 8	0,89 ± 0,45	10 ± 2	0,50 ± 0,11	18 ± 1	1,59 ± 0,06	8 ± 4	0,73 ± 0,39
TA100/-S9	**44 ± 1**	**1,42 ± 0,05**	**44 ± 20**	**1,42 ± 0,64**	13 ± 1	0,87 ± 0,09	11 ± 4	0,73 ± 0,28

Tabulka 2. Výsledky (± *s*) pro vzorky pitné vody ze dnů 13. 7. 2011, 15. a 22. 2. 2012

PITNÁ VODA	**13. 7. 2011**		**15. 2. 2012**		**22. 2. 2012**	
Veličina/Koncentrace	**0x**	**250x**	**0x**	**500x**	**0x**	**500x**
Pozitivní jamky (TA100/-S9)	17 ± 3	11 ± 2	5	20	6	32
R_t/R_c (TA100/-S9)	0,85 ± 0,21	0,53 ± 0,11	0,63	2,5	0,75	4,0

Tabulka 3: Počty pozitivních jamek a index mutagenity **(± *s*)** Lučiny a Ostravice z 11. 7. 2011

11. 7. 2011	**LUČINA**				**OSTRAVICE**			
Koncentrace	**0x**		**250x**		**0x**		**125x**	
Kmen/Veličina	**Jamky**	**R_t/R_c**	**Jamky**	**R_t/R_c**	**Jamky**	**R_t/R_c**	**Jamky**	**R_t/R_c**
TA100/-S9	12 ± 4	0,60 ±0,28	7 ± 4	0,33 ± 0,25	16 ± 1	1,00 ± 0,09	12 ± 1	0,72 ± 0,04

Tabulka 4. Počty pozitivních jamek a index mutagenity Lučiny a Ostravice z 28. 3. 2012

28. 3. 2012	**LUČINA**				**OSTRAVICE**			
Koncentrace	**0x**		**250x**		**0x**		**250x**	
Kmen/Veličina	**Jamky**	**R_t/R_c**	**Jamky**	**R_t/R_c**	**Jamky**	**R_t/R_c**	**Jamky**	**R_t/R_c**
TA98/-S9	3	1,00	**32**	**10,67**	5	1,67	**40**	**13,33**
TA98/+S9	12	0,50	**59**	**2,46**	25	1,04	**74**	**3,08**
TA100/-S9	22	0,81	**75**	**2,78**	22	0,81	**63**	**2,33**
TA100/+S9	39	1,00	**72**	**1,85**	36	0,92	**89**	**2,28**

Tabulka 5. Počty pozitivních jamek a index mutagenity řek z období 18. 7. - 10. 8. 2011

18. 7. - 10. 8. 2011	**LUČINA**		**OSTRAVICE**	
Koncentrace	**250x**		**250x**	
Kmen/Veličina	**Jamky**	**R_t/R_c**	**Jamky**	**R_t/R_c**
TA98/-S9	**15**	**5,00**	**17**	**5,67**
TA98/+S9	32	1,33	40	1,67
TA100/-S9	26	0,96	37	1,37
TA100/+S9	44	1,13	34	0,87

Mutagenní aktivita pitné vody byla zaznamenána pro odběr z 10. 5. 2011 jak u surového, tak u 250x koncentrovaného vzorku na kmeni TA100 bez metabolické aktivace. Výsledek ukazuje na přítomnost přímých mutagenů. Obdobný výsledek byl zaznamenán v dalších pracích [7] a lze jej přičítat na vrub halogenderivátům (haloacetonitrily, haloocto vé kyseliny či chlorpikrin) organických látek tvořících se v důsledku desinfekce pitné vody chlorem, popř. chlordioxidem. Přímé i nepřímé mutageny vyvolávající posunové a záměnové mutace byly prokázány u 250x koncentrovaných vzorků vody a to jak z řeky Lučiny, tak z Ostravice ze dne 28. 3. 2012. Vzhledem k tomu, že šlo o jarní období, kdy taje sníh a prší, bylo předpokládáno, že vody budou oproti letním měsícům méně zatížené nečistotami. U 250x zahuštěných vzorků v letním období (18. 7. - 10. 8. 2011) získaných metodou pasivního odběru byla pozitivní odezva zaznamenána jen na kmeni TA98 bez metabolické aktivace, což naznačuje výskyt přímých mutagenů působících posunové mutace. Efekt mohl však také souviset s větší afinitou některých

polutantů k adsorbentům. XAD-2 resin dobře adsorbuje PAU, PCB nebo pesticidy [8]. Vzhledem k faktu, že TA98 spolehlivě detekuje četné organické látky, mohlo se jednat o jejich deriváty pocházející z průmyslového znečistění nebo o zbytky pesticidů, které se do říční vody mohly dostat splachem z polí. Voda z obou toků byla kontaminována genotoxickými látkami detekovatelnými při zkoncentrování 250x, představuje tedy mírné riziko genotoxicity pro vodní organismy, ale i pro člověka s ohledem na způsob jejího využívání, např. na koupání, zalévaní, apod.

Závěr

Na základě provedených experimentů bylo potvrzeno, že pro hodnocení mutagenity vod je vedle testů surových vzorků vhodné uskutečnit i jejich analytické zkoncentrování XAD resiny, což umožňuje zhodnotit genotoxicitu mikropolutantů. Amesův miniaturizovaný fluktuační test představuje účinnou monitorovací metodu pro screening mutagenity povrchových vod.

Literatura

[1] ČSN ISO 5667-5: *Jakost vod. Odběr vzorků. Část 5: Pokyny pro odběr vzorků pitné vody a vody užívané při výrobě potravin a nápojů.* Český normalizační institut, Praha, 1994.

[2] ČSN EN ISO 5667-3. *Jakost vod. Odběr vzorků. Část 3: Návod pro konzervaci vzorků a manipulaci s nimi*. Český normalizační institut, Praha, 2004.

[3] ČSN ISO 5667-6. *Jakost vod. Odběr vzorků. Část 6: Pokyny pro odběr vzorků z řek a potoků.* Český normalizační institut, Praha, 1994.

[4] TNV 75 7231: *Jakost vod. Metoda stanovení toxického rizika povrchových vod.* Hydroprojekt a.s., Praha, 2000.

[5] SEZIMOVÁ, H. *Hodnocení genotoxických účinků kontaminant životního prostředí.* Vysoká škola Báňská-Technická univerzita Ostrava, Hornickogeologická fakulta, Institut environmentálního inženýrství, Ostrava, 2006. ISBN 80-248-1041-7.

[6] SOLDÁN, P.; BADUROVÁ, J. *Ekotoxikologické hodnocení úrovně znečištění vodního prostředí v povodí řeky Odry.* Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, v. v. i.: Vodohospodářské Technicko-Ekonomické informace, Vol. 53, Issue 3, 2011, pp. 9-13. ISSN 0322-8916.

[7] ČERNÁ, M.; PASTORKOVÁ, A.; ŠMÍD, J.; BAVOROVÁ, H.; OČADLÍKOVÁ, D.; RÖSNER, P.; ZAVADIL, J. *Genotoxicity of industrial effluents, river waters, and thein fractions using the Ames test and in vitro cytogenetic assay.* Toxicology Letters, Vol. 88, 1996, pp. 191-197.

[8] OLIVELLA, M. Á. *Isolation and analysis of polycyklic aromatic hydrocarbons from natural water using accelerated solvent extraction followed by gas chromatography-mass spectometry.* Talanta, Vol. 69, 2006, pp. 267-275.

Abstract

The Lučina and Ostravice river are exposed to waste water outfalls and surface runoff contamination with the high intensity. The aim of the study was to evaluate the genotoxicity risks. The preconcentration of organic pollution in the potable water samples and the samples of the rivers Lučina and Ostravice by means of the Amberlite® XAD-2 and XAD-4 resins adsorbtion has been carried out. Subsequently, the mutagenic activity of these extracts in the miniaturized Ames fluctuation assay has been assessed. For the testing the mutant *Salmonella typhimurium* strains (TA98, TA100) were used. To assess the genotoxicity the variants of the assay without and with S9 metabolic activation has been conducted. Genotoxicity has been detected in potable water samples from 10. 5. 2011, surface water concentrates from 28. 3. 2012 and from the period 18. 7. - 10. 8. 2011.