

VYUŽITÍ ŘASOVÉHO TESTU K HODNOCENÍ AKUTNÍ TOXICITY LÁTEK ZPŮSOBUJÍCÍCH ZATÍŽENÍ ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

Martina Šimková

*Katedra biologie a ekologie, Přírodovědecká fakulta, Ostravská univerzita v Ostravě,
Chittussiho 10, 710 00 Ostrava, simkova.martina@centrum.cz*

Abstrakt

Práce se zabývá sledováním změn inhibice růstu zelených řas v závislosti na přítomnosti potenciálně toxických látek. Modelovým organismem pro řasový test byla sladkovodní zelená řasa rodu *Desmodesmus subspicatus*, která byla po dobu tří dnů exponována analyzovanými vzorky ve zvolených koncentracích. Pro ověření správnosti testu byly využity dvě standardní látky, a to dichroman draselný a 3,5dichlorofenol. Následně byly otestovány látky vstupující do prostředí z různých antropogenních zdrojů, kterými byly vzorek plastu podléhající biodegradaci a vzorek čistírenského kalu vznikající jako sekundární produkt v procesu čištění odpadních vod. V souvislosti s čistírenským kalem bylo otestováno také organické rozpouštědlo dimethylsulfoxid (DMSO). Cílem testů bylo zjistit, zda tyto látky způsobují u řas inhibiční účinky a následně stanovit hodnoty EC₅₀. Řasovým testem bylo zjištěno, že látky vykazují toxicitu, která se projevila inhibičními účinky v jednotlivých koncentracích.

Klíčová slova: řasový test; čistírenský kal; plasty; biodegradace

Úvod

V souvislosti s rozvojem antropogenní činnosti dochází ke kontaminaci životního prostředí xenobiotiky. Pro hodnocení možných rizik cizorodých látek jsou rutinně využívány chemické a fyzikální analýzy. Tento přístup však neumožňuje specifikaci jejich reálného účinku na biotu. K provedení komplexního hodnocení rizik pro živé organismy se využívají biologické testy toxicity na vybraných senzitivních organismech. Zástupcem testů akutní toxicity na producentech je řasový test využívající sladkovodní zelenou řasu rodu *Desmodesmus subspicatus*, kterým lze hodnotit kapalně vzorky i extrakty či vodné výluhy z pevných vzorků [1].

Čistírenský kal vznikající jako vedlejší produkt při čištění odpadních vod může obsahovat vysoké množství polutantů, které mohou mít nepříznivý efekt na životní prostředí. V závislosti na typu odpadní vody, ze které byl kal vyprodukován, bývá i různé množství polutantů. Znečištění je způsobeno především patogenními organismy (viry: hepatitida A; bakterie: *Salmonella*, *Escherichia coli*; protozoa a červi), chemickými látkami (AOX, PCB, NEL aj.) a těžkými kovy (Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Zn) [2].

Jako plasty jsou označovány polymery neboli makromolekulární látky, které bývají tvořeny převážně atomy C, H, O, N, F a Cl. Postupně dochází k vytvoření dlouhého makromolekulárního řetězce složeného z opakujících se strukturních jednotek [3]. Aby polymery získaly nejlepší vlastnosti, a aby byly poté i v praxi co nejefektivněji využívány, bývají přidávána různá aditiva. Mezi aditiva se řadí například stabilizátory, plastifikátory nebo retardéry hoření [4]. Plasty pak představují látky, které bývají vysoce odolné a v životním prostředí prakticky nerozložitelné. Jelikož obsahují řadu chemických složek, je možné je pokládat za potenciálně toxické. Pro efektivní nakládání s plasty jakožto odpady je možné využívat procesy recyklace. Recyklačního procesu se nemohou zúčastnit všechny typy plastů, a proto se hledají další metody. Jedním z přístupů je biodegradace plastů, při které dochází k rozkladu polymerů za využití mikroorganismů. Mikroorganismy jsou schopné produkce enzymů a volných radikálů způsobujících rozklad polymerů na jednodušší oligomery, dimery a monomery, čímž dochází ke snížení jejich molekulové hmotnosti [5].

Cílem práce bylo hodnocení akutní toxicity vzorků čistírenských kalů a plastů pomocí řasového testu využívajícího sladkovodní zelenou řasu rodu *Desmodesmus subspicatus*. Test

je standardizován a provádí se podle normy ČSN EN ISO (8692) Jakost vod – Zkouška inhibice růstu sladkovodních zelených řas [1].

Materiál a metody

K testování byla použita zásobní kultura *Desmodesmus subspicatus*, která byla uchovávána na šikmém agaru a do laboratoře byla objednána ze sbírky autotrofních organismů botanického ústavu AV ČR v Třeboni. Konkrétně jde o kmen LEPAILLEUR / CCAP 276 – 20 (<http://ccala.butbn.cas.cz>).

Podstatou zkoušky byla předkultivace dané řasové kultury po dobu tří dnů v živném roztoku. Následně bylo stanoveno množství inokula přidávaného k testovaným látkám. Test byl proveden v Erlenmayerových baňkách, ke kterým se přidávalo živné médium o objemu 100 ml, zvolené koncentrace pro testované látky a určené množství řasového inokula. Poté probíhala inkubace po dobu 72 hodin v růstové komoře při teplotě 23 ± 2 °C a kontinuálním osvětlením v rozsahu 6000 – 10 000 lux. Vyhodnocení testů probíhalo mikroskopicky za využití Bürkerovy komůrky, kdy bylo počítáno množství řas ve sto čtvercích pro jednotlivé baňky. Získané hodnoty byly následně přepočítány na objemy řas v 1 ml. Dále byly vypočítány růstové rychlosti a inhibice růstu řas dle vzorců. Následně byly získány hodnoty EC₅₀, které byly získány vynesemím inhibice pro jednotlivé koncentrace oproti logaritmické stupnici.

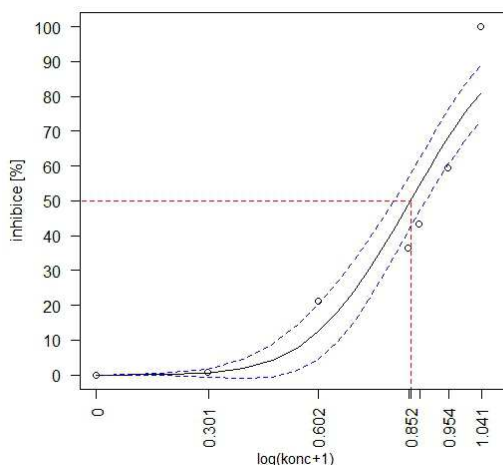
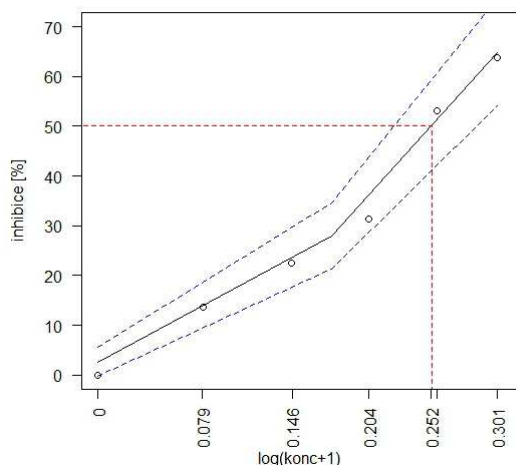
Jako standardní látky sloužily dichroman draselný a 3,5 dichlorofenol. Dichroman draselný (K₂Cr₂O₇) byl otestován v koncentrační řadě 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 mg/l. 3,5 – dichlorofenol byl otestován při koncentracích 1; 3; 6; 6,5; 8 a 10 mg/l. Testy byly provedeny vždy ve dvou paralelních stanoveních s kontrolními vzorky neobsahující testované látky.

Vzorek kalu byl extrahován v organickém rozpouštědle dimethylsulfoxidu (DMSO). Množství organických extrahovatelných látek ve vzorku bylo vyjádřeno hodnotou EOM (extrahovatelné organické hmoty). Vzorek byl testován při koncentracích EOM stanovených na 0,18; 0,36; 0,54; 0,72 a 1,8 mg/ml, tyto koncentrace odpovídaly objemům 0,05; 0,1; 0,15; 0,2 a 0,5 µl přidávaných k testovanému organismu. Pro vyloučení možné akutní toxicity použitého rozpouštědla - DMSO bylo provedeno testování při stejných objemových koncentracích jako vzorek kalu.

Poslední testovanou látkou byl vzorek plastu podléhající biodegradaci za využití houby *Aspergillus fumigatus*. Jednalo se o aromaticko – alifatický kopolyester, připravený solvolýzou. Pro testování byl využit vzorek v tekutém stavu po vystavení šesti týdenní biodegradaci. Testované objemy vzorku plastu byly 5; 10; 20; 50 a 65 ml na celkový objem 100 ml živného média.

Výsledky a diskuze

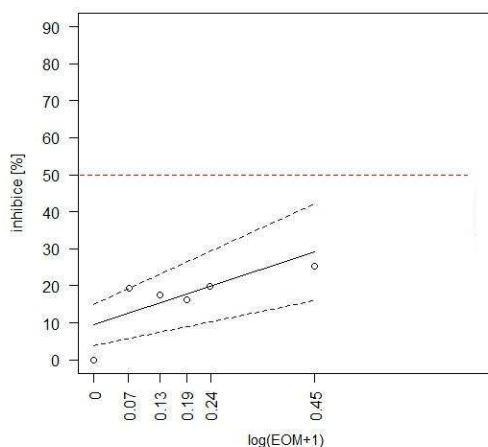
Správnost řasového testu byla ověřena pomocí standardních látek. Na obrázku 1 a 2 jsou zobrazeny stanovené hodnoty EC₅₀ pro jednotlivé látky. EC₅₀ pro dichroman draselný byla stanovena na 0,78 mg/l. Hodnota EC₅₀ pro 3,5 – dichlorofenol byla 6,11 mg/l. Hodnoty odpovídaly výsledkům uváděných v normě a test bylo možné pokládat za platný [1].



Obr 1: Stanovení hodnoty EC_{50} pro $K_2Cr_2O_7$ Obr 2: Určení EC_{50} u 3,5 – dichlorofenolu

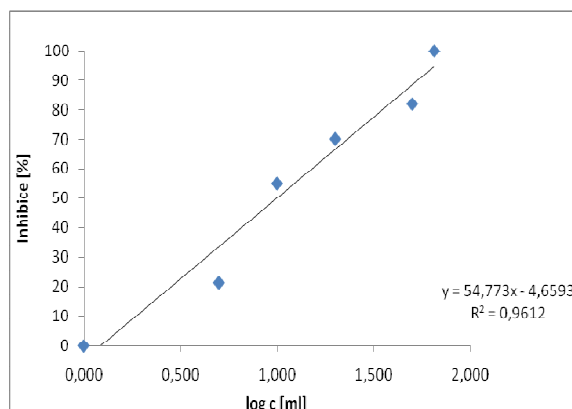
Další testovanou látkou byl vzorek čistírenského kalu, u kterého bylo zjištěno, že látka toxický účinek vyvolává. Hodnota EC_{50} pro vzorek čistírenského kalu byla stanovena na hodnotu 4,88 mg/ml.

Vzorek kalu byl extrahován v organickém rozpouštědle DMSO. Z důvodu vyloučení možného toxického účinku rozpouštědla bylo provedeno jeho otestování ve stejném koncentračním rozsahu jako u vzorku čistírenského kalu. Rozpouštědlo DMSO nevykazovalo toxický účinek a celkovou toxicitu kalu neovlivňovalo.



Obr 3: Stanovení hodnoty EC_{50} pro vzorek čistírenského kalu.

Vzorek plastu také způsoboval inhibiční účinek růstu zelených řas. Na obrázku 4 je zobrazena hodnota EC_{50} , která byla stanovena na 9,95 objemových procent.



Obr 4: Stanovení hodnoty EC_{50} u vzorku plastu metodou regresní analýzy

Závěr

Hodnocení akutní toxicity vzorků plastů a čistírenských kalů bylo provedeno testem akutní toxicity na řasách *Desmodesmus subspicatus*. Na základě dosažených výsledků a stanovených indexů EC_{50} lze konstatovat, že u sledovaných vzorků byla prokázána kontaminace látkami inhibujícími růst zelených řas.

Poděkování

Na tomto místě bych velice ráda poděkovala paní Mgr. Haně Sezimové, Ph.D. za užitečné rady a pomoc při zpracování této práce.

Literatura

- [1.] ČSN EN ISO 8692 Jakost vod - Zkouška inhibice růstu sladkovodních zelených řas.
- [2.] Lyčková, B., Fečko P. a Kučerová R. *Zpracování kalů*. Ostrava: VŠB – Technická univerzita v Ostravě, 2009. ISBN: 978-80-248-1921-1.
- [3.] Čada, R. *Technologie tváření a slévání: objemové tváření za tepla, nekonvekční způsoby tváření, plasty*. Ostrava: VŠB – Technická univerzita Ostrava, 2010. ISBN: 978-80-248-2273-0.
- [4.] Lithner, D., Damberk J., Dave, G., Larsson, Ä. *Leachates from plastic consumer products – Screening for toxicity with Daphnia magna*. Chemosphere 2009, 74, pp. 1195-1200.
- [5.] Lucas, N., Bionaimo, Ch., Belloy, Ch., Quoneudec, M., Silvestre, F., Nava – Saucedo, J. *Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques*. Chemosphere, 2008, 73 pp. 429-442.

Abstract

This work deals with monitoring changes of green algae's growth inhibition in relation to presence of potentially toxic substances. Model organism for algal test was freshwater green algae *Desmodesmus subspicatus*, which was exposed by analyzed samples at selected concentrations for three days. Two standard substances, potassium dichromate and 3,5 dichlorophenol, were used to verify accuracy of the test. Entering environmental substances from various antropogenic sources, which was sample of biogedradating plastic and sample of sewage sludge which is produced in wastewater treatment, were tested then. In connection with sewage sludge, an organic solvent dimethyl sulfoxide (DMSO) was tested too. As the result of this testing we have found that substances cause a toxicity by this algal test. The toxicity was demonstrated by inhibitory effects in individual concentrations of that substances.