

DETEKCE TOXICKÉHO PŮSOBNÍ SYNTETICKÝCH BARVIV POMOCÍ TESTU NA *VIBRIO FISCHERI*

Lucie Vašutová, Ivana Felgenträgerová

*Katedra biologie a ekologie, Přírodovědecká fakulta, Ostravská univerzita v Ostravě,
Chittussiho 10, 710 00 Ostrava*

Abstrakt

Bioluminiscenční test toxicity je celosvětově používaný, rychlý, citlivý a jednoduše proveditelný. Slouží ke zjištění polutantů ve vodním prostředí. Je založen na zjištění inhibice luminiscence emitované mořskými bakteriemi *Vibrio fischeri*. Kritériem zkoušení je snížení luminiscence měřené po expozici 15 a 30 minut. Pomocí koncentračních řad je možné stanovit inhibiční účinek vzorku jako hodnotu EC50. Práce je zaměřena na zjištění akutní toxicity barviva Disperse Blue 3 (DB 3). Toto barvivo je rozloženo v rotačním diskovém bioreaktoru účinkem lignolytické houby *Pleurotus ostreatus*. Cílem práce bylo porovnání akutní toxicity vstupního produktu – DB 3 v základním stavu a meziprojektu – DB 3 po částečné biodegradaci. Zjištění účinnosti biodegradace pomocí procenta inhibice bylo provedeno u vstupního vzorku i meziprojektu u koncentrace 150mg/l. Vstupní vzorek vykazoval v expozičním čase 15 minut inhibici 43,41% a v čase 30 minut 42,96%. Meziprojekt vykazoval po 15 minutách inhibici 76,34% a v čase 30 minut 80,94%. Na základě těchto výsledků lze konstatovat, že akutní toxicita u meziprojektu vykazovala vyšší hodnotu, než barvivo v základním stavu.

Klíčová slova: bioluminiscenční test; biodegradace; syntetická barviva; disperse blue 3; akutní toxicita

Úvod

Syntetická barviva jsou v dnešní době velmi hojně užívána v mnoha oblastech života. Poptávka po těchto látkách roste především v textilním průmyslu, který je také hlavním zdrojem znečištění ekosystému syntetickými barvivy. Tyto organické sloučeniny se mohou dostávat do prostředí prostřednictvím odpadních vod v průběhu barvicího procesu. Emise barev do prostředí je nežádoucí z důvodu způsobení neprůhlednosti vody a ovlivnění rozpustnosti plynů ve vodním prostředí. Některé látky se navíc vyznačují vysokou toxicitou a hrozí zde nebezpečí karcinogenních a mutagenních účinků na živé systémy [4]. Přes odpadní vody dochází ke kontaktu barviva s vodními organismy. Některé druhy postrádají schopnost metabolizovat tyto cizorodé látky, a proto dochází k bioakumulaci. Potravním řetězcem se pak barviva dostávají do těl vyšších organismů [3].

Diskutovaným tématem je v posledních letech odstranění nežádoucích barviv z odpadních vod. Tradičně se využívají fyzikálně-chemické metody jako je filtrace, koagulace, použití aktivního uhlí, flokulace apod. Limitujícími faktory jsou však v těchto oblastech finance, provoz, účinnost a selektivita [5]. Proto se uvažuje o možnosti využít k odstranění barviv mikrobiálních systémů, které vynikají genetickou rozmanitostí, metabolickou všestranností a všudypřítomností. Zde je však nutno brát v úvahu i negativní dopad solí přítomných v barvivech, které zajišťují lepší fixaci k vláknu, a zapříchují osmotické rozdíly v buňce mikroorganismu [6].

V současnosti jsou zkoumány způsoby biodegradace syntetických barviv za použití lignolytických hub. Ty napomáhají degradaci ligninu působením lignolytických enzymů, a tím minimalizují jejich negativní vliv na biosféru [2]. K biodegradaci dochází při výběru vhodného kmene a jeho použití při optimálních podmínkách. Degradční kapacita hub je spojována s

produkci tří hlavních extracelulárních enzymů: mangan-dependentní peroxidasy (MnP), ligninperoxidasy (LIP) a lakasy (Lac) [7].

Cílem práce bylo zjistit akutní toxicitu vzorku syntetického barviva DB 3 v základním stavu, a poté po působení lignolytické houby *Pleurotus ostreatus* v rotačním diskovém bioreaktoru. Pro testování akutní toxicity byl využit luminiscenční test na bakteriích *Vibrio fischeri*.

Materiál a metody

Testovací organismus

Pro testování byl použit bakteriální kmen *Vibrio fischeri*, který byl získán v lyofilizované formě od německé společnosti Dr. Bruno Lange. Bakteriální suspence potřebná k měření byla kultivována a připravena podle normy ČSN EN ISO 11348-1 a ČSN EN ISO 11348-3 [8, 9].

Testované látky

Dichroman draselný ($K_2Cr_2O_7$): toxické účinky, mutagen. Test byl prováděn s roztokem dichromanu draselného o výchozí koncentraci 400 mg/l. Dále byl roztok ředěn v poměru 1:1 2% roztokem NaCl. Testování probíhalo v koncentrační řadě od 200 mg/l po 0,90625 mg/l. Testy zahrnovaly 2 paralelní měření.

Disperse Blue 3: zdraví škodlivý (R22), může vyvolat senzibilizaci při styku s kůží (R43). Testování barviva v základním stavu probíhalo v koncentrační řadě od 500 mg/l po 31,25 mg/l. Dále probíhalo měření meziprojektu barviva. Vstupní koncentrace DB3 v reaktoru byla 150 mg/l. Pro účely testování byl vzorek s nejvyšší koncentrací osolen pevným NaCl a byl považován za 100%. Poté byl vzorek ředěn 2% roztokem NaCl v poměru 1:1. Byla tak vytvořena koncentrační řada od 100 % po 0,390625 %. Vstupní produkt i meziprojekt byl testován ve 2 paralelních měřeních.

Luminiscenční test

Test byl prováděn na přístroji LUMISTox 300 za použití bakteriálního kmene *Vibrio fischeri*, který se vyznačuje emisí světla. Měření probíhalo při 15 °C. Tuto teplotu zajišťoval inkubační blok LUMISTherm. Nejdříve byla změřena počáteční hodnota luminiscence bakterií, poté byl přidán vzorek testované látky s 2% roztokem NaCl, který vytváří přirozené prostředí, v němž zůstávají zachovány životní funkce bakterií. Po uplynutí expoziční doby (15 a 30 minut) byla opět změřena hodnota luminiscence [1].

Prostřednictvím programu Microsoft Excel byla vypočítána inhibice luminiscence, vytvořen graf závislosti účinku na koncentraci a vypočítána hodnota EC50.

Výsledky a diskuse

Test akutní toxicity byl nejprve proveden na dichromanu draselném, jako standardní látce, na které byla ověřena citlivost systému. Látka se jeví jako vysoce toxická, karcinogenní, proto bylo nutno dbát při manipulaci s ní o bezpečnost. Z naměřených dat byla vypočítána hodnota EC50 v čase 15 minut a 30 minut po expozici danou látkou. Testy s oběma vzorky dichromanu draselného splnily podmínky platnosti zkoušky dané normou ČSN EN ISO 11348-1 [8].

Podle stejné metodiky probíhaly testy akutní toxicity na vzorcích syntetického barviva DB 3, o kterém je známo, že vykazuje toxicitu. V průběhu testování byla tato organická sloučenina vystavena biodegradaci za působení houby *Pleurotus ostreatus* v rotačním diskovém bioreaktoru. Následně byly srovnány hodnoty toxicity DB 3 před biodegradací a po částečném rozkladu.

Hodnota EC50 vstupního vzorku DB 3 byla stanovena v čase 15 minut v koncentracích 262,64 mg/l a 280, 63 mg/l, v čase 30 minut v koncentracích 268,81 mg/l a 280,627 mg/l. Z výsledků tedy vyplývá, že účinnost toxicity DB 3 není přímo úměrná době působení.

U meziprojektu odebraného z bioreaktoru nebylo možné stanovit přesnou koncentraci obsažených látek, proto jsou výsledky vyjádřené v objemových procentech. Hodnota EC50 u meziprojektu byla stanovena v čase 15 minut 12,87% a 21,59%, v čase 30 minut 12,87% a 21,59%. Tyto hodnoty byly stanoveny na základě logaritmických os. Naměřené výsledky jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Srovnání akutní toxicity u vzorků DB 3

Testovaná látka	EC50			
	15 minut	Průměr	30 minut	Průměr
Dichroman draselný	12,08 mg/l 19,07 mg/l	15,58±3,5	3,72 mg/l 23,38 mg/l	13,55±9,83
DB 3 vstup	280,63 mg/l 262,63 mg/l	271,63±9	280,63 mg/l 268,81 mg/l	274,72±5,91
DB 3 meziprojekt	12,87% 21,59%	17,23%±4,36	12,87% 21,59%	17,23%±4,36

Zjištění účinnosti biodegradace pomocí procenta inhibice bylo provedeno u vstupního vzorku a meziprojektu u koncentrace 150 mg/l. Vstupní vzorek vykazoval v expozičním čase 15 minut inhibici 43,41% a v čase 30 minut 42,96%. Meziprojekt vykazoval vyšší procento inhibice v obou expozičních časech. Po 15 minutách byla stanovena inhibice 76,34% a v čase 30 minut 80,94%. Na základě těchto výsledků lze konstatovat, že akutní toxicita u meziprojektu vykazovala vyšší hodnotu, než barvivo v základním stavu. Důvodem může být to, že lignolytické houby rozkládají syntetická barviva na směs látek, které jeví vyšší toxicitu než barvivo samotné. Konečný produkt z bioreaktoru nebyl dosud testován, lze však předpokládat na základě výsledků testů biodegradace DB3 pomocí houby *Irpex lacteus*, postupný pokles toxických účinků.

Závěr

Cílem práce bylo srovnání akutní toxicity syntetických barviv pomocí testu na bakterii *Vibrio fischeri*. Pro ověření citlivosti testu byla nejprve testována standardní látka dichroman draselný, která svými naměřenými hodnotami odpovídala požadavkům normy. Dále bylo testováno syntetické barvivo Disperse blue 3 (DB 3), a to nejprve v základním stavu, a poté v průběhu biodegradace lignolytickou houbou *Pleurotus ostreatus* v rotačním diskovém bioreaktoru. Meziprojekt vykazoval vyšší hodnoty akutní toxicity než barvivo v základním stavu. Práce budou pokračovat zjištěním inhibice luminiscence u bakterií *Vibrio fischeri* u konečného-výstupního produktu z bioreaktoru a celkovým vyhodnocením účinnosti biodegradace.

Poděkování

Článek byl vypracován v rámci projektu Institut environmentálních technologií, reg. č. CZ.1.05/2.1.00/03.0100 podporovaného Operačním programem Výzkum a vývoj pro Inovace, financovaného ze strukturálních fondů EU a ze státního rozpočtu ČR a projektu SGS 19/PrF/2012 Studium faktorů ovlivňujících průběh biodegradčních procesů syntetických barviv.

Literatura

- [1.] Fargašová, A., 2009: Ekotoxikologické biotesty, Perfekt, Bratislava, ISBN 978-80-8046-422-6.
- [2.] Pavlíčková, Z., Malachová, K., Lednická, D., Šušla, M., Doležilková, I., Novotný, Č., 2003: Mutagenita a účinnost biodegradace vybraných textilních syntetických barviv, Sborník prací Přírodovědecké fakulty OU, str. 136-141, ISBN 80-7042-941-0.
- [3.] Novotný Č., 2005: Biodegradace a biotechnologie, Ostravská Univerzita v Ostravě, 96 stran, ISBN 80-7368-096-3.
- [4.] Firmino, P.I., Silva, M.E.R., Cervantes, F.J., Santos, A.B., 2010: Colour removal of dyes from synthetic and real textile wastewaters in one- and two-stage anaerobic systems, *Bioresource Technology* 101, str. 7773-7779, received 10 May 2010/ accepted 17 May 2010, Elsevier Science Ltd. 2010.
- [5.] Jadhav, J.P., Kalyani, D.C., Telke, A.A., Phugare, S.S., Govindwar, S.P., 2010: Evaluation of the efficacy of a bacterial consortium for the removal of color, reduction of heavy metals, and toxicity from textile dye effluent, *Bioresource Technology* 101, str. 165-173, received 30 April 2009/ accepted 6 August 2009, Elsevier Science Ltd. 2009.
- [6.] Ogugbue, C.J., Sawidis, T., Oranusi, N.A., 2011: Evaluation of colour removal in synthetic saline wastewater containing azo dyes using an immobilized halotolerant cell system, 2011: *Ecological Engineering* 37, str. 2056-2060, received 16 February 2011/ accepted 10 September 2011, Elsevier B.V. 2011.
- [7.] Novotný, Č., Svobodová, K., Kasinath, A., Erbanová, P., 2004: Biodegradation of synthetic dyes by *Irpex lacteus* under various growth conditions, *International Biodeterioration & Biodegradation* 54, str. 215-223, Elsevier Ltd. 2004.
- [8.] ČSN EN ISO 11348-1 Jakost vod - Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) - Část 1: Metoda s čerstvě připravenými bakteriemi.
- [9.] ČSN EN ISO 11348-3 Jakost vod - Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) - Část 3: Metoda s lyofilizovanými bakteriemi.

Abstract

Bioluminescence assay of toxicity is widespread worldwide, rapid, sensitive and easily feasible. It is used to detect pollutants in the aquatic environment. It is based on the determination of inhibition of luminescence, which radiate marine bacteria *Vibrio fischeri*. Inhibition is determined from the selected concentration range of dilution and is measured in time intervals 15 and 30 minutes after exposure to the substance. The evaluation will be based on established values EC50.

The work is focused on the acute toxicity of dye Disperse Blue 3 (DB 3). Aim of this study was to compare the acute toxicity of feedstock - DB 3 in the ground state and intermediate - DB 3 after partial biodegradation. Determining the effectiveness of biodegradation using percent inhibition was performed in the input sample and at intermediate concentrations of 150 mg / l. The input sample shown 43,41% inhibition in the exposure time of 15 minutes and 42.96% inhibition in time of 30 minutes. Showed intermediate inhibition after 15 minutes, 76.34%, and 30 minutes time of 80.94%. Based on these results we can say that the acute toxicity of the intermediate showed a higher value than the input sample in the ground state.