
LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

VLIV ZPŮSOBU EXTRAKCE ŘÍČNÍCH SEDIMENTŮ NA VÝSLEDKY VYBRANÝCH EKOTOXIKOLOGICKÝCH TESTŮ

PETRA BERÁNKOVÁ, JANA MÁCHOVÁ,
JITKA KOLÁŘOVÁ, TOMÁŠ RANDÁK
a SIMONA POLÁKOVÁ

*Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta
rybnářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum
akvakultury a biodiverzity hydrocenóz, Zátíší 728/II,
389 25 Vodňany
berankova@frov.jcu.cz*

Došlo 2.2.10, přijato 21.1.11.

Klíčová slova: dichlormethan, vodný výluh, Soxhletova
extrakce, sonifikace, *Daphnia magna*, *Sinapis alba*, SOS-
chromotest, *Escherichia coli*

Úvod

Sedimenty jsou heterogenní polyfázový systém obsahující anorganickou i organickou hmotu, vodu a různé plyny. Ve své podstatě jsou směsí tuhých částic usazujících se na dně vodních těles. Na jejich povrch se mohou různým způsobem vázat látky obsažené ve vodě. Mobilita, biodostupnost a biologické účinky těchto látek závisí právě na způsobu této vazby.

Sedimenty představují významný indikátor znečištění vodních ekosystémů. Obsah toxických prvků v sedimentech vodních toků a nádrží odráží celkovou kontaminaci dané lokality lépe než okamžitá koncentrace znečišťujících látek ve vodě¹. Proto představují sedimenty významný indikátor znečištění vodních ekosystémů.

Při studiu znečištění sedimentů je možno použít dva přístupy. Přístup chemický, kdy se stanovuje chemické složení a koncentrace látek vyskytujících se v analyzovaném vzorku. Přístup ekotoxikologický, kdy se stanovuje účinek na biologické systémy². Oba dva přístupy mají svá pro a proti. Při chemické analýze nelze postihnout přítomnost všech látek přítomných ve směsi a jejich vzájemné interakce, ekotoxikologický přístup naopak nepodává informaci, která látka byla příčinou pozorovaného toxického účinku. Dalším úskalím ekotoxikologického přístupu je volba způsobu přípravy testovaného vzorku, neboť ne všechny testy lze provádět přímo se sedimentem, tedy bez předchozí extrakce.

Způsob extrakce a použité extrakční činidlo určují, které látky obsažené v sedimentu přejdou do extraktu. V extraktu získaném pomocí polárního rozpouštědla lze očekávat vyšší obsah látek polárních a naopak u rozpouštědla nepolárního vyšší obsah látek nepolárních. Proto je volba extrakčního činidla velmi významným faktorem ovlivňujícím konečné výsledky ekotoxikologických testů. Zejména u vzorků neznámé povahy je vhodné volit paralelní extrakci různými extrakčními činidly.

K nejčastěji používaným způsobům extrakce sedimentů patří prostý vodný výluh a extrakce organickým rozpouštědlem³. Voda je typickým polárním rozpouštědlem. Dobře se v ní rozpouštějí látky polární, v jejichž molekulách je náboj rozložen nepravidelně. Patří mezi ně většina anorganických solí, karboxylové kyseliny, alkoholy a velká část cukrů.

Z organických rozpouštědel patří k nejpoužívanějším dichlormethan (DCM) a jeho směsi s dalšími rozpouštědly (hexan, methanol a aceton). DCM patří mezi nepolární rozpouštědla. Dobře se v něm rozpouštějí látky nepolární, v jejichž molekulách je náboj rozložen rovnoměrně. Patří mezi ně většina uhlovodíků, tuky a vosky a některé anorganické látky (např. jód).

Mnoho z organických rozpouštědel používaných pro extrakce však vykazuje závažné toxické účinky pro testovací organismy (např. DCM, methanol a aceton). V takovém případě jsou extrakty převáděny do jiných rozpouštědel, která kombinují schopnost rozpouštět velké množství chemických látek a nízkou toxicitu pro testovací organismy. Jedním z nich je i dimethylsulfoxid (DMSO), který zároveň patří k nejčastěji používaným. DMSO se jeví jako vhodné rozpouštědlo na základě výsledků testů využívajících různé organismy^{4–6}.

Při výběru způsobu extrakce je třeba zohlednit povahu testovaného vzorku. Vzhledem k tomu, že vlastní způsob extrakce může významně ovlivnit výsledky ekotoxikologických testů a reálnost jejich odpovědi vzhledem k původnímu vzorku, byla naše pozorování zaměřena právě na tuto fázi přípravy vzorku.

Interpretace výsledků testů s extrakty na celé ekosystémy je sice problematická, neboť nelze přesně postihnout interakce probíhající mezi látkami, sedimentem a organismy žijícími v sedimentu a na sedimentu (biodostupnost *versus* extrahovatelnost látek), přesto je pro nás cennou informací o stavu našeho životního prostředí.

V předložené studii jsou srovnávány: vodný výluh, který je dlouhodobě používán pro testování tuhých odpadů a dva extrakty do DCM. Extrakce do DCM byla provedena Soxhletovou extrakcí a sonifikací. Obě metody patří mezi nejčastěji používané extrakční postupy.

Experimentální část

Odběr, úprava a zpracování sedimentu

Sediment byl odebírán z řeky Klenice (ČR). Klenice je levostranným přítokem řeky Jizery, do které ústí v Mladé Boleslavi. Hlavními zdroji znečištění v povodí řeky Klenice jsou lidská sídla a splachy ze zemědělských ploch a pozemních komunikací.

Vzorek byl odebrán v blízkosti obce Řepov, přibližně 4 km nad ústím do Jizery. Jednalo se o jemnozrnný sediment s malým podílem hrubých pískových zrn (přibližně 20 hm.%).

K odběru sedimentu byl použit Bridge-Eckmanův drapák. Odebrány byly přibližně 2 kg zvodnělého vzorku. Vzorek byl zabalen, individuálně označen a uložen v chladícím boxu (4 °C) až do doby jeho zpracování v laboratoři. Vzorek byl vysušen lyofilizací. Následně byl mechanicky homogenizován a přesát přes síto s průměrem ok 2 mm.

Extrakce sedimentu

Pro extrakci sedimentů byly vybrány tři nejčastěji používané způsoby³.

Každý způsob extrakce byl proveden v pěti nezávislých opakováních. S každým získaným extraktem bylo nakládáno jako se samostatným vzorkem.

Příprava vodného výluhu

Vodný výluh byl připraven vytřepáním 100 g lyofilizovaného sedimentu s 1000 ml destilované vody po dobu 24 hodin. Získaný vodný výluh byl přefiltrován přes papírový filtr o průměru pórů 5 µm.

Extrakce do DCM

Výhodou organického extraktu je snadná příprava koncentrovaných vzorků (dle povahy obsažených látek jednotky až desítky gramů v mililitru). To umožňuje získání informace i o přítomnosti toxických a genotoxických látek, jejichž koncentrace je pod mezí detekce analytických přístrojů.

Extrakce na Soxhletově extraktoru

50 g lyofilizovaného sedimentu bylo po dobu 8 h extrahováno 250 ml DCM v Soxhletově extraktoru. Získaný extrakt byl zahuštěn na přibližně 5 ml, následně odpařen a převeden do DMSO.

Extrakce sonifikací

50 g suchého sedimentu bylo po dobu 30 min extrahováno 50 ml DCM v ultrazvukové lázni. Získaný extrakt byl dekantován a uchován. Extrakce byla opakována čtyřikrát. Získaný extrakt byl zahuštěn na přibližně 5 ml, následně odpařen a převeden do DMSO.

Ekotoxikologické testy

Vliv způsobu extrakce na výsledky biotestů byl hod-

nocen pomocí tří vybraných testů (Akutní imobilizační test na vodních korýších (hrotnatka velká – *Daphnia magna*), Test inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*) a SOS-chromotest. Tyto testy jsou běžně používány pro hodnocení toxických a genotoxických vlastností vzorků životního prostředí a patří k celosvětově nejčastěji používaným.

Všechny testy byly provedeny s neřaděným vodným výluhem i DCM extrakty. Testovaná koncentrace DCM extraktů byla shodná s koncentrací neřaděného vodného výluhu, aby bylo možno srovnávat účinky extraktů získaných různým způsobem extrakce.

Každý test byl proveden ve třech nezávislých opakováních pro každý připravený extrakt. Získané výsledky byly statisticky vyhodnoceny. V testech, kde byla provedena předúprava testovaného vzorku za použití DMSO, byly souběžně nasazovány 2 kontroly: *i*) za použití ředící vody bez přídavku testované látky, *ii*) za použití roztoku ředící vody a DMSO v maximální koncentraci, která byla použita při přípravě testového roztoku. Odezva testovacích organismů na testovaný vzorek byla vztahována k odpovídající negativní kontrole a dále byl v závěru testu srovnáván stav organismů v obou kontrolách, aby bylo možné posoudit, do jaké míry byly pokusné organismy ovlivněny samotným rozpouštědlem.

Akutní imobilizační test na vodních korýších (hrotnatka velká – *Daphnia magna*)

Akutní imobilizační test na *D. magna* byl proveden dle normy OECD 202 (cit.⁷). Zjišťována byla mortalita a imobilizace jedinců *D. magna*. V každém opakování bylo nasazeno 10 jedinců *D. magna*.

K testům byli použiti korýši laboratorního chovu, jejichž citlivost byla prověřena testem se standardní látkou K₂Cr₂O₇ p.a. Zjištěná hodnota 24h-EC50 pro K₂Cr₂O₇ = 1,13 mg l⁻¹ spadá do povoleného limitu (0,6–1,7 mg l⁻¹)⁸ pro tento test a standardní látku.

Test inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*)

Test inhibice růstu kořene *S. alba* byl proveden dle Metodického pokynu Ministerstva životního prostředí (MŽP) z roku 2007 (cit.⁹). Byla zjišťována inhibice klíčení semen a růstu primárního kořene. V každém opakování bylo nasazeno 30 semen *S. alba*. Nevyklíčené semeno bylo v souladu s pokyny Metodického pokynu MŽP z roku 2007 (cit.⁹) započítáno do výpočtu průměrné délky primárního kořene jako nulová hodnota.

SOS-chromotest

Jedná se o bakteriální test genotoxicity, založený na detekci produkce β-galaktosidasy v důsledku spuštění SOS reparačního systému bakteriální buňky. K aktivaci SOS reparačního systému dochází v případě poškození DNA.

Principem SOS-chromotestu^{10,11} je kolorimetrická detekce změny enzymatické aktivity v důsledku vlivu testovaného vzorku na testovací organismus. Test byl proveden dle metodiky popsané v práci Xu a spol. 1989 (cit.¹²). Pro každý z testovaných vzorků byl vypočítán indukční

faktor (IF). Překročili-li hodnota IF hodnotu 1,5, je testovaný vzorek považován za významně genotoxický^{10,11}.

Testovacím organismem je geneticky modifikovaná bakterie (*Escherichia coli* K12 PQ37), na kterou se vztahuje příslušná legislativa ČR (cit.^{13,14}).

Statistické vyhodnocení

Rozdíly ve výsledcích, které byly získány v ekotoxikologických testech (Akutní imobilizační test na *D. magna*, Test inhibice růstu kořene *S. alba* a SOS-chromotest), při použití jednotlivých způsobů extrakce, byly z hlediska statistické významnosti testovány pomocí neparametrického Kruskal-Wallisova testu. Ke statistickým analýzám byl použit program STATISTICA 8.0 (cit.¹⁵).

Výsledky a diskuse

Výsledky získané v ekotoxikologických testech při použití jednotlivých způsobů extrakce jsou shrnuty v tab. I ve formě průměrů ze tří opakování a směrodatné odchylky (všechny způsoby extrakce byly provedeny v pěti nezávislých opakováních).

V akutním imobilizačním testu na *D. magna* došlo k 100% mortalitě případně imobilizaci testovacích jedinců ve vodném výluhu i v obou DCM extraktech, a tudíž mezi nimi nebyl zjištěn statistický rozdíl. Mortalita a imobilizace testovacích organismů v negativních kontrolách (v průměru 0 a 3,3 %) splnila podmínky validace použitého testu. Odpověď testovacích organismů na testované vzorky se průkazně lišila od odpovědi na negativní kontroly (N = 51, df = 4, H = 50, P < 0,001). Vliv vlastního extrakčního postupu na výsledky vybraných testů byl zanedbatelný.

V testu inhibice růstu kořene *S. alba* nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi účinky testovaného vzorku získaného jednotlivými způsoby extrakce (N = 51, df = 4, H = 36, P < 0,001) (obr. 1). Rozdíly průměrné délky kořenů v jednotlivých testech v porovnání s příslušnou negativní kontrolou nepřesáhly 30 %, a proto byly výsledky získané v tomto testu posouzeny jako negativní. (Způsob hodnocení vychází z Metodického pokynu MŽP z roku 2007 (cit.⁹) pro hodnocení ekotoxicity odpadů, kde rozdíly v růstu kořene v testovaném výluhu ve srovnání s kontrolou do 30 % se považují za negativní).

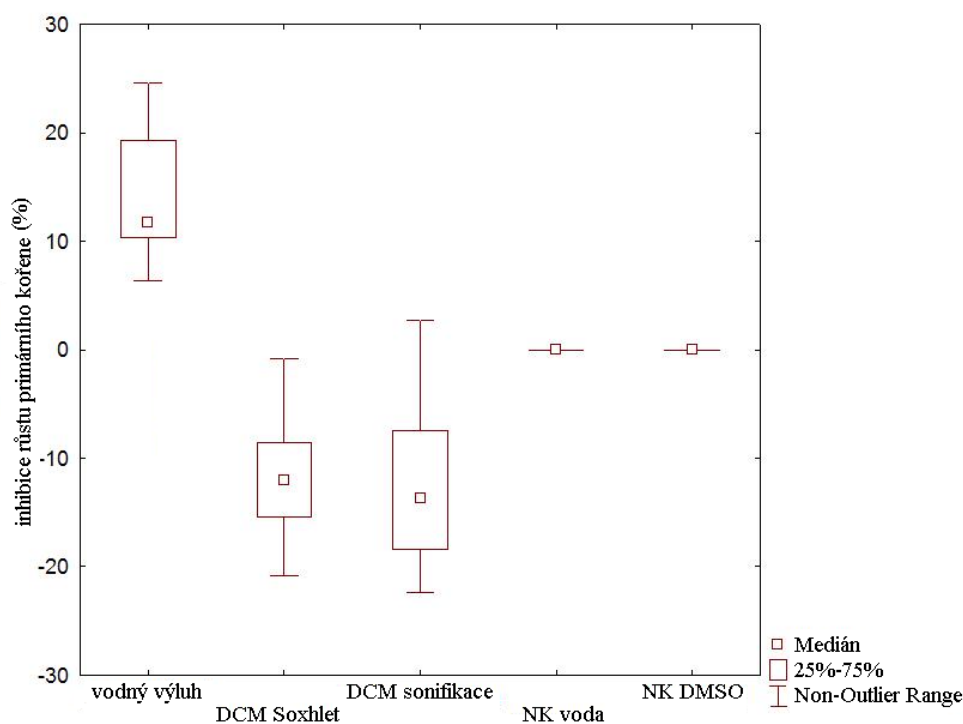
V SOS-chromotestu při použití vodného výluhu nebyl zjištěn rozdíl v odezvě u pokusných a kontrolních organismů, tzn., že výsledek tohoto testu byl negativní. Naproti tomu byly prokázány významné statistické rozdíly účinku

Tabulka I

Přehled hodnot získaných ve vybraných ekotoxikologických testech^a

Ekotoxikologický test	Způsob extrakce			Kontrola	
	vodný výluh	DCM soxhlet. extrakce	DCM sonifikace	H ₂ O	DMSO
Akutní imobilizační test na <i>D. magna</i> – uhynulí a imobilizovaní jedinci [%]	100 (0)	100 (0)	100 (0)	0 (0)	3,33 (5,77)
	100 (0)	100 (0)	100 (0)		
	100 (0)	100 (0)	100 (0)		
	100 (0)	100 (0)	100 (0)		
	100 (0)	100 (0)	100 (0)		
Test inhibice růstu kořene <i>S. alba</i> – inhibice klíčení a růstu primárního kořene [%]	14,89 (5,93)	-5,38 (8,18)	-10,24 (11,31)	0 (0)	0 (0)
	15,21 (3,52)	-10,17 (6,43)	-10,06 (5,03)		
	13,23 (6,25)	-9,07 (7,39)	-13,82 (7,67)		
	9,19 (2,22)	-13,77 (1,52)	-8,76 (11,05)		
	14,42 (9,35)	-26,17 (4,60)	-16,05 (2,99)		
SOS-chromotest – hodnota IF	1,02 (0,01)	1,62 (0,11)	1,94 (0,09)	1,01 (0,02)	1,03 (0,04)
	1,01 (0,01)	1,62 (0,05)	2,06 (0,18)		
	1,01 (0,01)	1,55 (0,13)	1,86 (0,32)		
	1,03 (0,01)	1,63 (0,08)	1,95 (0,20)		
	1,02 (0,01)	1,63 (0,05)	2,00 (0,16)		

^a V tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty získané ze tří opakování testu pro každý testovaný extrakt. V závorkách je uvedena směrodatná odchylka vypočteného aritmetického průměru. Inhibice/stimulace klíčení a růstu primárního kořene *S. alba* byla vypočítána porovnáním průměrné délky primárního kořene v testovaném vzorku s délkou primárního kořene příslušné kontroly. Kladné hodnoty znamenají inhibiční účinek testovaného výluhu v porovnání s kontrolou, záporné hodnoty znamenají stimulační účinek v porovnání s kontrolou.



Obr. 1. Výsledky statistického vyhodnocení vlivu způsobu extrakce sedimentu na výsledky Testu inhibice růstu primárního kořene *S. alba* (Kruskal-Wallis test: $N = 51$, $df = 4$, $H = 36$, $P < 0,001$)

DCM extraktů získaných Soxhletovou extrakcí a extraktu získaného sonifikací ($N = 51$, $df = 4$, $H = 43,5$, $P < 0,001$). Účinky DCM extraktů získaných oběma způsoby se lišily vzájemně a lišily se i od výsledků s vodným výluhem (obr. 2).

Jak se tedy ukazuje, rozdílné ekotoxikologické testy a rozdílné způsoby extrakce testované matrice přináší diametrálně rozdílné výsledky. Zatímco při použití testu na hořčici bílé byly získány negativní výsledky u všech způsobů extrakce, v testu na *Daphnia magna* byly výsledky všech extraktů pozitivní. Při posuzování genotoxických účinků SOS-chromotestem byly získány pozitivní výsledky s nepolárním extraktem a negativní výsledek s vodným výluhem. Tento fakt svědčí o tom, že k posuzování ekotoxikologických vlastností určité matrice musí být použity různé způsoby extrakce, ale i různé typy ekotoxikologických testů. V opačném případě existuje riziko, že případné nežádoucí účinky látek obsažených v sedimentu nebudou „odhaleny“ a hodnocení bude provedeno na základě falešně negativních výsledků.

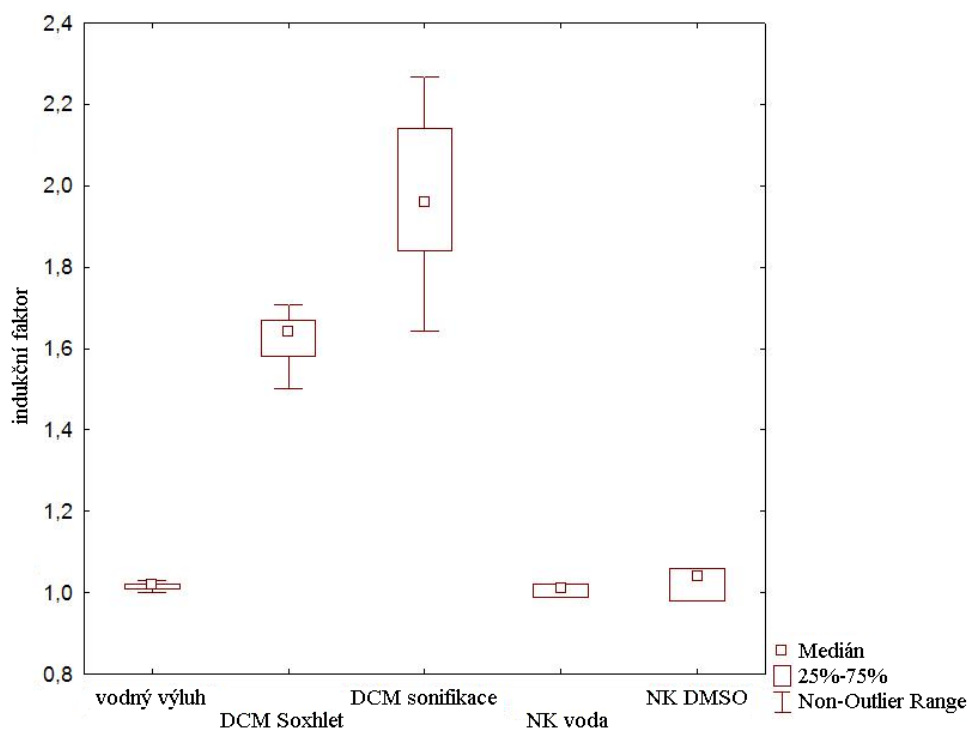
V publikovaných studiích zabývajících se vlivem způsobu extrakce na výsledky Amesova testu (bakteriální test genotoxicity používající bakterii *Salmonella typhimurium*) použili autoři různá rozpouštědla a jejich směsi (např. směs voda/ether, methanol, toluen, DCM a destilovanou vodu)^{16–20}. Autoři jedné z uvedených studií¹⁶ provádě-

děli testy na sedimentech z řeky Tama (Japonsko) a uvádějí, že polární extrakty z těchto sedimentů vykazovaly v Amesově testu vyšší genotoxický účinek než extrakty nepolární (směs voda/ether > ethyl acetát > methanol ~ *n*-hexan). Naproti tomu studie provedená na sedimentech z německé části řeky Labe dokazuje vyšší genotoxický účinek v Amesově testu u nepolárních extraktů (toluen) než u extraktů do methanolu a mnohem vyšší než u vodného výluhu¹⁸.

Nekonzistentnost těchto výsledků naznačuje, že použití pouze jednoho typu rozpouštědla (polární × nepolární) není vhodné pro objektivní postihnutí účinků testovaných sedimentů. Neznáme-li povahu znečištění zkoumané lokality, jeví se jako vhodnější použití extrakce polárními i nepolárními rozpouštědly, případně jejich směsí. Vždy však musíme respektovat požadavky zvoleného ekotoxikologického testu, jenž má být použit pro hodnocení ekotoxikologických účinků testovaného sedimentu.

Závěry

1) Získané výsledky potvrzují, že při posuzování toxických a genotoxických vlastností sedimentů je nutné volit různé způsoby extrakce tak, aby došlo k uvolnění co možná nejúplnější škály látek přítomných v sedimentu.



Obr. 2. Výsledky statistického vyhodnocení vlivu způsobu extrakce sedimentu na výsledky SOS-chromotestu (Kruskal- Wallis test: $N = 51$, $df = 4$, $H = 43,5$, $P < 0,001$)

Dále je třeba připravené extrakty podrobit ekotoxikologickým testům, při kterých jsou použity rozdílné testovací organismy.

2) Způsoby extrakce sedimentu popsané v předložené práci se jeví jako vhodné pro testy toxicity na *D. magna*, *S. alba* i v SOS-chromotestu, neboť chemické látky používané při předúpravě vzorku nejsou toxické pro pokusné organismy (dokladováno chováním organismů v kontrolách s rozpouštědly bez testované látky).

3) Při hodnocení sedimentů je zapotřebí používat více způsobů jejich extrakce (vodný výluh i DCM extrakty, případně jinou kombinaci polárních a nepolárních rozpouštědel), neboť do vodného výluhu se uvolňují převážně látky ve vodě rozpustné (polární), které mohou mít jiné účinky než vyluhované nepolární látky. Vodný výluh sice vhodně simuluje reálnou expozici vodních organismů látkám obsaženým v sedimentu, na druhé straně se ukázal jako ne příliš vhodným pro SOS-chromotest. Je tomu tak v důsledku známé skutečnosti, že většina látek poškozujících DNA je lipofilní povahy, a jsou tedy snáze extrahovatelné nepolárními rozpouštědly.

Seznam použitých zkratk

DCM	dichlormethan
DMSO	dimethylsulfoxid
IF	indukční faktor

Autoři děkují za finanční podporu grantu Ministerstva školství a tělovýchovy ČR č. CZ.1.05/2.1.00/01.0024, grantu Grantové agentury Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích č. 047/2010/Z, grantu Národní agentury pro zemědělský výzkum NAZV QH82117 a grantu Ministerstva životního prostředí ČR č. SP/2e/229/07.

LITERATURA

1. Fergusson J. E.: *The Heavy Element. Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*. Pergamon Press, Oxford 1990.
2. Kočí V.: Chem. Listy 100, 882 (2006).
3. Chen G., White P. A.: Mutat. Res. 567, 151 (2004).
4. El Jay A.: Bull. Environ. Contam. Toxicol. 57, 191 (1996).
5. Stratton G. W.: Arch. Environ. Contam. Toxicol. 14, 651 (1985).
6. Bowman M. C., Oller W. L., Cairns T.: Arch. Environ. Contam. Toxicol. 10, 9 (1981).

7. OECD 202: *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test and Reproduction Test Part I – 24 H EC50 Acute Immobilisation test (1996).
8. ČSN EN ISO 6341 – Jakost vod – Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Stratus (*Cladocera, Crustacea*) – Zkouška akutní toxicity (1997).
9. Metodický pokyn odboru odpadů MŽP ČR ročník XVII. ČSN EN ISO 6341 Jakost vod – Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Stratus (*Cladocera, Crustacea*) – zkouška akutní toxicity (1997) Sběrka zákonů 2007, částka 4, str. 5.
10. Qullard P., Hofnung M.: *Mutat. Res.* 147, 65 (1985).
11. Qullard P., Hofnung M.: *Mutat. Res.* 297, 235 (1993).
12. Xu H., Dutka B. J., Sharr K.: *Toxicity Assessment: An International J.* 4, 105 (1989).
13. Zákon č. 78/2004 Sb., o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty. Sběrka zákonů 2004, částka 25, str. 1165.
14. Vyhláška č. 209/2004 Sb., o bližších podmínkách nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty. Sběrka zákonů 2004, částka 70, str. 3258.
15. StatSoft, Inc. (2007). STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. www.statsoft.com.
16. Suzuki J., Sadamasu T., Suzuki S.: *Environ. Pollut., Ser. A* 29, 91 (1982).
17. Waldron M. C., White A. R.: *Ohio J. Sci.* 89, 176 (1989).
18. Vahl H. H., Karbe L., Westendorf J.: *Mutat. Res.* 394, 81 (1997).
19. Picer M., Kovac T., Britvic S., Picer N.: *Chemosphere* 44, 1673 (2001).
20. Roubicek D. A. *Genotoxicity Evaluation of a Contaminated Estuarine Region*. University of Sao Paulo, Sao Paulo 2003, 109 stran.

**P. Beránková, T. Randák, J. Kolářová, J. Mácho-
vá, and S. Poláková** (*University of South Bohemia, České
Budějovice, Faculty of Fishery and Protection of Waters,
South Bohemian Research Center of Aquaculture and Bio-
diversity of Hydrocenoses, Vodňany*): **Influence of Meth-
ods of River Sediment Extraction on the Results of
Selected Ecotoxicological Tests**

River sediments are contaminated with a wide range of substances from the water environment. Such contaminants may be buried for a long time and then gradually released into the environment. For this reason, attention must be paid to their load. Ecotoxicological tests are usually used to assess toxic and genotoxic effects of sediments; the sediment extracts are adjusted for these purposes. The aim of this article is to assess the effect of three common methods of sediment extraction on results of three selected standardized ecotoxicological tests. The samples were prepared by shaking with water, Soxhlet extraction with dichloromethane (DCM) or extraction with DCM under sonication. Toxicity was tested using the acute immobilisation test on water flees (*Daphnia magna*) and the test based on inhibition of growth of the *Sinapsis alba* root. The SOS-chromotest was used as a genotoxicity test. The experiments performed show that the selected method of extraction can significantly influence the results of ecotoxicological tests.