

VÝZNAM EXPOZIČNÍCH CEST PRO BIODOSTUPNOST CHROMU V PŮDNÍM PROSTŘEDÍ

KLÁRA KOBETICOVÁ, ZDEŇKA PETROVÁ
a VLADIMÍR KOČÍ

Ústav chemie ochrany prostředí, Vysoká škola chemicko-
technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
Klara.Kobeticova@vscht.cz

Došlo 9.12.14, přijato 18.6.15.

Rukopis byl zařazen k tisku v rámci placené služby
urychleného publikování.

Klíčová slova: biodostupnost, $K_2Cr_2O_7$, *Enchytraeus albidus*, půdní prostředí, ekotoxicita

Úvod

Biodostupnost

O biodostupnosti různých organických látek a kovů v půdním prostředí bylo napsáno již mnoho odborných článků a knih a této problematice je v posledních letech věnována stále větší pozornost. Většina těchto studií se ale zabývá vlivem struktury testovaných chemických látek anebo fyzikálně-chemických vlastností půd na biodostupnost látek a následnou toxicitu^{1–4}. Organismy ale většinou mají více možností, jak mohou přijít do styku s chemickými látkami ve svém okolí. Mezi tyto možnosti expozice patří jednak příjem povrchem těla, příjem kontaminovanou potravou či vodou anebo vstup polutantu do organismu přes dýchací systém. Pro bezobratlé žijící v půdě patří mezi nejdůležitější expoziční cesty právě povrch těla anebo požití kontaminované potravy⁵. Neexistuje ale prozatím studie, zabývající se vlivem těchto expozičních cest na biodostupnost a následnou toxicitu pro půdní organismy. Cílem této práce proto bylo popsat účinky chromu (dichroman draselný) na půdní kroužkovce při použití jednotlivých expozičních cest (kontaminovaná půda, vodný roztok a kontaminovaná potrava) simultánně v čase.

Roupice

Roupice patří do říše Animalia (živočichové); kmenu Annelida (kroužkovci); třídy Oligochaeta (máloštětinatci); řádu Tubificida a čeledi *Enchytraeidae* (roupicovití). Tyto organismy tvoří podstatnou část půdních bezobratlých a podílejí se v přírodě na tvorbě půdního humusu⁶. Mají měkké tělo, které není chráněno pevnými částmi, kterými disponují bezobratlí jako např. brouci, stonožky, mnoho-

nožky či chvostokoci. Jsou proto náchylné k vysychání okolního prostředí a toxické látky v půdě se tak mohou do těla roupic dostat povrchem těla, případně kontaminovanou potravou. Bývají proto velmi často voleni jako modelové organismy pro studium toxicity různých chemických látek pro bezobratlé v půdě⁷.

Vlastnosti a toxicita chromu

Chrom je stříbrobílý kov. Často se využívá v ocelářství, k výrobě speciálních slitin nebo ke galvanickému pokovování. Oxid chromový je složkou pokovovacích lázní, používá se jako oxidační činidlo a může být výchozí látkou pro přípravu některých organokovových sloučenin a esterů kyseliny chromové. Estery kyseliny chromové se uplatňují v katalytické chemii, zejména v organické syntéze. Soli chromité a chromany slouží k vybarvování tkanin, k moření a leptání kovů a v kožedělném průmyslu při vyčiňování kůží. Chromany se též užívají při výrobě organických barviv. Některé sloučeniny chromu mají upotřebení jako anorganické pigmenty. Sloučeniny chromu jsou obsaženy také v některých přípravcích na konzervaci dřeva a jako inhibitory koroze v chladicích vodách elektráren⁸.

Chrom se dostává do ovzduší ve velkém množství v prachových částicích uvolňovaných při spalování fosilních paliv (ve stavu Cr^{3+}). Dalšími zdroji chromu jsou cementárny (cement obsahuje chrom), spalovny komunálních odpadů, výfukové plyny z automobilů s katalyzátorem, emise z klimatizačních chladicích věží používajících sloučeniny chromu jako inhibitory koroze a poléťavý azbest z opotřebovaných brzdových obložení automobilů (azbest obsahuje chrom). Atmosférickou depozicí se chrom dostává do ostatních složek životního prostředí⁸.

Antropogenním zdrojem chromu ve vodách jsou odpadní vody z barevné metalurgie, povrchové úpravy kovů, kožedělného a textilního průmyslu, kde je součástí některých barvicích lázní. Dalším zdrojem jsou některé inhibitory koroze používané v chladicích okruzích, při rozvodu teplé vody nebo při čištění kotlů. Značné koncentrace lze nalézt ve vodách z hydraulické dopravy popílků. Chrom může unikat do půdy či podzemní vody i ze špatně zabezpečených skládek. Může se také uvolňovat do prostředí při nakládání s odpady s obsahem chromu (komunální odpad, odpadní kaly, odpady z pokovování a zpracování chromu)⁸.

Chrom je v nízké koncentraci přítomen ve všech typech půd a dále v sopečném prachu a plynech. Všechny chromu přírodního původu je ve stavu Cr^{3+} , který se silně váže na záporně nabitě půdní částice, a proto jen malá část proniká z půdy do podzemních vod. Ve vodě se většina Cr^{3+} váže na částice nečistot a spolu s nimi klesá ke dnu, velká část Cr^{3+} tvoří nerozpustné koloidní hydroxidy. Cr^{6+} je velmi toxický pro vodní organismy. Na rozdíl od Cr^{3+} se vyskytuje ve formě záporně nabitých komplexů, proto se nesorbují na půdní částice a je mnohem mobilnější. Cr^{6+} je však velmi silné oxidační činidlo, v přítomnosti jakékoliv organické hmoty se poměrně rychle redukuje na Cr^{3+} . Pro-

to nebezpečí vysokých koncentrací Cr^{6+} hrozí jen v blízkosti jeho zdroje. Pokud nejsou organické látky přítomné, je Cr^{6+} za aerobních podmínek stabilní po dlouhou dobu. V anaerobním prostředí se Cr^{6+} redukuje velmi rychle (cit.⁸).

Toxicita dvou oxidačních stavů Cr^{3+} a Cr^{6+} je rozdílná. Cr^{3+} patří mezi esenciální stopové prvky zúčastněné v metabolismu savců. Inhalace prachů sloučenin Cr^{6+} vyvolává astmatické potíže. Dlouhodobé působení se projevuje tvorbou vředů a nádorů nosní dutiny, plic a zažívacího traktu a leptavým účinkem na kůži a sliznice, může dojít k proděravění nosní přepážky. Kontakt kapalin a pevných látek s obsahem Cr^{6+} může vést ke tvorbě kožních vředů, u alergických jedinců také k zarudnutí kůže a svědění. Chrom je klasifikován jako lidský karcinogen, způsobující rakovinu plic. V případě ryb a vodních bezobratlých je ale uváděno, že toxicitější je pro vodní organismy chrom trojmocný⁹.

Dichroman draselný

Dichroman draselný se používá jako pigment ve sklářském průmyslu. Je vysoce toxický, žravý, oxidující, zdraví škodlivý a nebezpečný pro životní prostředí. Může vyvolat rakovinu, poškodit plod v těle matky, poškozuje reprodukční schopnost, může poškodit dědičné vlastnosti, dráždí kůži a sliznice, je vysoce toxický pro vodní organismy^{10,11}; $\text{LC}_{50} = 37,1 \text{ mg kg}^{-1}$ (96 hodin) pro pstruha duhového a pro perloočky $\text{EC}_{50} = 21,0 \text{ mg kg}^{-1}$ (48 hodin). V ekotoxikologii patří mezi referenční látky¹² používané pro ověření standardní citlivosti použitých organismů jako jsou sladkovodní řasy, perloočky, ryby anebo semena rostlin. Bylo ale prokázáno, že chrom může působit toxicity také na půdní bezobratlé¹³, a proto byl použit jako modelová chemikálie v této studii.

Experimentální část

Testovací média

V této studii byla použita umělá půda, která se v půdní ekotoxikologii standardně používá a má přesně dané složení (10 % tvoří vysušená, přesátá rašelina, 20 % jemnozrnný jíl, 0,1–1 % CaCO_3 pro úpravu pH a zbytek tvoří jemnozrnný písek)¹⁴. Půda, ať už ta umělá anebo jakákoliv přírodní, se ale skládá ze tří fází – pevné, kapalné a plynné. Při studiu toxicity polutantů v pevné matici je proto často vhodné použít i test vodní, který může usnadnit studium různých efektů, jako je mortalita, vliv na reprodukci, morfologické a fyziologické změny organismu, protože v tomto případě je právě odstraněn vliv sorpce polutantu do půdy vedoucí k následnému snížení dostupnosti látek pro organismy. Ve vodním testu s půdními bezobratlými byla použita rekonstituovaná voda, která je předepsána pro test akutní toxicity se sladkovodními korýši – dafniemi¹². Toto médium obsahuje anorganické soli, jejichž koncentrace jsou voleny tak, aby jejich poměr vy-

hovoval k přežívání a reprodukci vodních korýšů a také umožňoval dlouhodobější přežívání kroužkovců v akvatických testech toxicity.

Modelový organismus

Nejčastěji používanou roupicí v ekotoxikologii bývá druh *Enchytraeus albidus*, který byl také použit k ověření biodostupnosti chromu v různých médiích v této práci. Roupice byly chovány v umělé půdě a krmeny suchými, pomletými ovesnými vločkami dvakrát týdně.

Testovaná chemikálie

V této studii byl testován dichroman draselný ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), od výrobce Lachner s.r.o. Testovaná koncentrační řada byla připravena rozpuštěním dichromanu ve zředěvací vodě a příslušné množství roztoku jednotlivých koncentrací bylo aplikováno do půdy tak, aby byla půda ovlhčena na 50 % své maximální vodní kapacity¹⁵. V případě akvatických testů byly roupice umístěny přímo do připravených koncentrací, které byly pipetovány do testovacích nádobek.

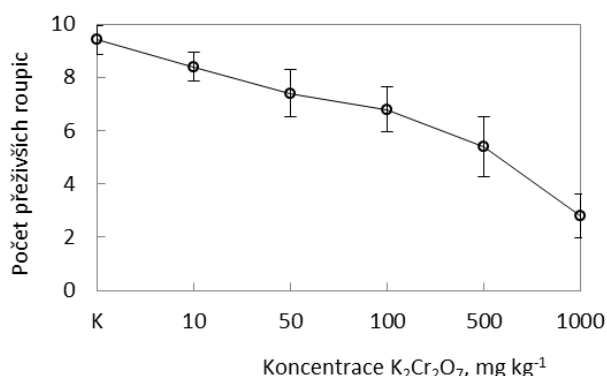
Kontaminovaná potrava byla připravena tak, že do suchých rozemletých ovesných vloček byl přidán dichroman draselný v suchém stavu a promíchán s vločkami. Potrava poté byla přidána do půdy a zakryta malým množstvím půdy, tak jak je to prováděno standardně v testech ekotoxicity s půdními roupicemi při testování pevných materiálů^{6,7}. Do kontrolních testovacích nádobek bez přídavku $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ a do půdy kontaminované bylo přidáno stejné množství pomletých, ale nekontaminovaných ovesných vloček, jako do varianty s kontaminovanou potravou.

Statistické zpracování dat

Hodnota LC_{50} byla získána pomocí statistického programu GraphPad Prism, statistickou metodou nelineární regrese (metodou nejmenších čtverců). Porovnání dat z pokusů s kontaminovanou potravou a kontaminovanou půdou bylo provedeno a statisticky porovnáno analýzou ANOVA (Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test).

Výsledky a diskuse

Hlavním cílem této studie není napodobit chování chromu v půdním prostředí za reálných podmínek, ale zjistit míru biodostupnosti a tím pádem toxicity chromu pro roupice při různých možnostech vstupu kovu do organismu roupic za použití standardních testovacích metod s půdními kroužkovci. Protože v přírodě i v klasických laboratorních testech jsou roupice vystaveny vzájemnému působení chemických látek všemi možnými expozičními cestami, bývá obtížné rozpoznat, jakou mírou přispívají jednotlivé expoziční cesty k výslednému efektu. V této studii proto byly jednotlivé expoziční cesty vstupu chromu do těla roupic odděleny (kontaminovaná půda, kontamino-



Obr. 1. Křivka koncentrace-odpověď akutního půdního testu s dichromanem draselným na roupici *E. albidus* ($n = 5$ opakování)

vaná potrava a kontaminovaný roztok simulující půdní vodu, která bývá ve studiích biodostupnosti polutantů považována za cestu nejvýznamnější⁴.

Pro stanovení vhodné koncentrace dichromanu draselného pro sledování vlivu různé expozice byl nejdříve proveden půdní test s více koncentracemi (obr. 1). Ze získaných dat byla v statistickém programu GraphPad Prism 5 a metodou nelineární regrese získána koncentrace, která v porovnání s kontrolou (čistá půda) způsobila 50% úmrtnost rouspic v kontaminované půdě (LC_{50}). Koncentrace odpovídající LC_{50} ($686\ mg\ kg^{-1}$) byla poté použita v následujících experimentech pro ověření významu jednotlivých expozičních cest na biodostupnost a toxicitu pro půdní roupice.

Význam designu testu s použitím různých médií na toxicitu pro půdní roupice byl popsán pro různé polutanty. Vždy bylo jasně prokázáno, že biodostupnost a toxicita

jakékoliv látky či kovu je x -krát vyšší ve vodním testu než v půdním¹³, protože testovaný polutant se v půdním prostředí může různými mechanismy vázat na půdní částice a je díky tomu snížena jeho biodostupnost a toxicita¹⁶. V této práci jsme se zaměřili na studium biodostupnosti chromu v kontaminované půdě a kontaminované potravě (pomleté ovesné vločky kontaminované $K_2Cr_2O_7$ o stejné koncentraci, která byla přidána do půdy a do zředěovací vody). Ve stejnou dobu tak probíhaly všechny testy a bylo možné pozorovat mortalitu rouspic ve stejných časových intervalech, ukončení všech typů testů bylo podřízeno času, kdy došlo k 100% úmrtnosti rouspic ve vodním testu. Získaná data jsou popsána v následujících tabulkách (tab. I a II).

Výsledky naznačují (tab. I), že roupice po 14 hodinách expozice nebyly schopné přežít ve vodním médiu, oproti tomu v kontaminované půdě či u varianty s kontaminovanou potravou došlo k poklesu úmrtnosti, která byla pravděpodobně způsobena sníženou dostupností chromu pro těla rouspic oběma expozičními cestami. Polovina testovacích nádobek s roupicemi byla nadále podrobena testování po celkovou dobu expozice 14 dní, aby byly roupice vystaveny působení chromu stejně dlouho jako roupice z prvního experimentu s více koncentracemi, kde bylo cílem získat hodnotu LC_{50} . Pokud srovnáme inhibice v obou testech (kontaminovaná potrava a kontaminovaná půda) po 14 hodinách a 14 dnech, zjistíme, že inhibice se v daných variantách příliš nezměnily, což naznačuje, že chrom má na roupice negativní vliv již v prvních hodinách expozice a prodloužení testu na 14 dní nemá tedy na výsledky již příliš velký vliv.

Ještě zajímavější závěry můžeme vyslovit u další sady experimentů (tab. II), kdy byl po pěti hodinách intenzivního sledování ukončen test vodní (100% úmrtnost rouspic) a s ním i obě varianty půdní. Zde byla naměřena číselně vyšší toxicita u kontaminované půdy než potravy,

Tabulka I

Průměrná mortalita rouspic (%) druhu *E. albidus* ve druhé sadě experimentů s kontaminovaným roztokem, potravou a půdou (koncentrace $K_2Cr_2O_7 = 686\ mg\ kg^{-1}$), $n = 5$ opakování. Do každé testovací nádoby bylo na začátku testu umístěno deset jedinců

Délka expozice	14 hodin ^b	14 dní
<i>Vodní test</i>		
Kontrola ^a	0	–
Kontaminovaný roztok	100	–
<i>Půdní test</i>		
Kontrola ^a	0	0
Kontaminovaná potrava	52	56
Kontaminovaná půda	36	42

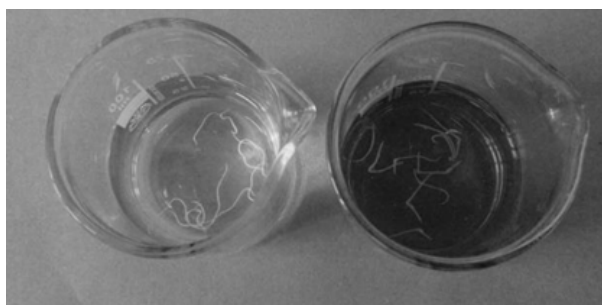
^a Kontrola = roupice nebyly vystaveny působení dichromanu, pouze stejným podmínkám kultivace jako roupice s kontaminovaným roztokem/půdou/potravou; ^b testy byly založeny navečer, z tohoto důvodu bylo pozorování provedeno až ráno (po 14 hodinách)

Tabulka II

Průměrná mortalita roupic (%) druhu *E. albidus* ve druhé sadě experimentů s kontaminovaným roztokem, potravou a půdou (koncentrace $K_2Cr_2O_7 = 686 \text{ mg kg}^{-1}$), 5 opakování. Do každé testovací nádoby bylo na začátku testu umístěno deset jedinců

Délka expozice	1 hodina	2 hodiny	3 hodiny	4 hodiny	5 hodin
<i>Vodní test</i>					
Kontrola ^a	0	0	0	0	0
Kontaminovaný roztok	0	4	56	94	100
<i>Půdní test</i>					
Kontrola ^a	–	–	–	–	0
Kontaminovaná potrava	–	–	–	–	10
Kontaminovaná půda	–	–	–	–	25

^a Kontrola = roupice nebyly vystaveny působení dichromanu, pouze stejným podmínkám kultivace jako roupice s kontaminovaným roztokem/půdou/potravou



Obr. 2. V levé testovací nádobě jsou živé – hýbající se roupice (kontrola), v pravé testovací nádobě roupice mrtvé – strnulé ($K_2Cr_2O_7$). Délka expozice 5 hodin

statistické porovnání získaných dat ale neprokázalo signifikantní rozdíl. I zde je ale jasně zřejmý negativní vliv prostředí (voda oproti půdě) na toxicitu chromu pro půdní kroužkovce¹³.

V obou experimentech bylo zřejmé, že dichroman při testované koncentraci roupice nejen usmrtil (obr. 2). Dá se předpokládat, že hlavní mechanismus poškození byl narкотický účinek, tj. poškození povrchových membrán vedoucí k udušení a rychlé smrti (kroužkovci dýchají povrchem těla). V literatuře se uvádí, že hlavním mechanismem účinku bývá velká afinita kovů pro vazbu s aminokyselinami a SH-skupinami bílkovin, a kovy tak působí jako enzymové jedy¹⁷, přičemž rozpustné formy a jednoduché ionty kovů přecházejí do ryb a dalších vodních organismů snadněji než nerozpustné formy. Při akutní intoxikaci sloučeninami chromu bývá povrch těla ryb silně pokryt hlenem, respirační epitel žáber je porušen a ryby hynou za příznaku udušení⁹. Podobné efekty byly zaznamenány i v naší studii, povrch roupic byl často poškozen a pokryt slizem.

Na toxicitu kovů má vliv také kyselost prostředí¹⁷. pH testovacích médií v naší studii bylo změřeno na začátku a na konci experimentu jak u kontrolních kádinek, tak v kádinkách s kontaminovaným roztokem, půdou či potravou. Všechny hodnoty se pohybovaly v optimálním rozmezí pro testy ekotoxicity, tj. v případě půdních testů v rozmezí pH 5,5–6,5 a v případě vodního testu v rozmezí 7,6–8,0 (cit.^{18,19}). U každé kádinky byly naměřeny přibližně stejné hodnoty na začátku i na konci, změna pH by tedy neměla hrát v naší studii roli.

Závěrem můžeme konstatovat, že provádění srovnávacích studií, kdy probíhá paralelně několik různých druhů testů s různými médii, může vést k rozkrytí zajímavých souvislostí mezi interakcemi polutantů a jejich toxicitou a o to přeci v (eko)toxikologii především jde.

LITERATURA

1. Tomečková Z.: *Bakalářská práce*. Masarykova Univerzita, Brno 2011.
2. Semple K. T., Morriss A. W. J., Paton G. I.: *Eur. J. Soil Sci.* 54, 809 (2003).
3. Alexander R. R., Alexander M.: *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 1140 (1999).
4. Lanno R., Wells J., Conder J., Bradham K., Basta N.: *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57, 39 (2004).
5. Didden W., Römbke J.: *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 50, 25 (2001).
6. Römbke J., Moser T.: *Chemosphere* 46, 1117 (2002).
7. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals* (Paris) 2004, 220.
8. <http://www.irz.cz/node/60>, staženo 29.3.2015.
9. http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=2304, staženo 29.3.2015.
10. http://www.korinek.cz/bezpecnostni-list_dichroman%20draseln%C3%BD.pdf, staženo 19.4.2014.
11. Punčochářová J.: *Chem. Listy* 96, 611 (2002).

12. OECD *Guidelines for testing of chemicals* (Paris) 2002, 202.
13. Römbke J., Knacker T.: *Hydrobiologia* 180, 235 (1991).
14. OECD *Guidelines for testing of chemicals* (Paris) 1984, 207.
15. ISO Standard 11465: Soil quality – Determination of dry matter and water content on a mass basis – Gravimetric method.
16. Kobetičová K.: *Dizertační práce*, Masarykova Univerzita, Brno 2011.
17. Svobodová Z.: *Toxikologie vodních živočichů*. SZN, Praha 1987.
18. ISO Standard 10390: Soil quality – Determination of pH.
19. Petrová Z.: *Bakalářská práce*. VŠCHT v Praze, Praha 2014.

K. Kobetičová, Z. Petrová, and V. Kočí
(Department of Environmental Chemistry, University of Chemistry and Technology, Prague): **Significance of Exposure Route for Bioavailability of Chromium in Soil Environment**

Bioavailability and hence the toxicity of various organic compounds and metals in the soil is influenced by many factors, among others physicochemical properties of the soil, chemical structure of the tested pollutants and also sensitivity of the test organisms. Few studies, however, deal with the influence of exposure pathways (food, body surface) through which pollutants can get into the body. This article describes the effect of some exposure routes (contaminated food, soil, water) on toxicity of Cr for *Enchytraeus albidus*.



ICCT

INTERNATIONAL CONFERENCE
ON CHEMICAL TECHNOLOGY



25. - 27. 4. 2016 | Mikulov

www.icct.cz

4. mezinárodní chemicko-technologická konference

4th International Conference on Chemical Technology



SEKRETARIÁT KONFERENCE

AMCA, spol. s r.o. | Academic and Medical Conference Agency
 Vyšehradská 320/49 | 128 00 Praha 2 | amca@amca.cz | www.icct.cz | www.amca.cz