

PŮVODNÍ A METODICKÉ PRÁCE

METODA DETEKCE KONTAMINACE PŮDY TĚŽKÝMI KOVY POMOCÍ STANOVENÍ METALOTHIONEINŮ

TEREZA STACHUROVÁ a HANA SEZIMOVÁ

Katedra biologie a ekologie, Ostravská univerzita,
Chittussiho 10, 710 00 Ostrava
hana.sezimova@osu.cz

Došlo 23.1.19, přijato 1.4.19.

Klíčová slova: metalothioneiny, *Eisenia foetida*, těžké kovy, metoda ELISA, chlorid kademnatý, chlorid měďnatý, životní prostředí

Úvod

Těžké kovy se vyskytují ve všech složkách životního prostředí. V půdě jsou poměrně silně vázány na půdní částice a jejich kumulace má negativní dopad na kvalitu půdy, ale také na rostliny a půdní edafon (mikrofaunu a mikroflóru). V ČR jsou povolené limity obsahu rizikových látek a prvků pro zemědělské půdy uvedeny ve vyhlášce č. 153/2016 Sb.¹, podmínky použití kalů na zemědělské půdě jsou upraveny vyhláškou č. 437/2016 Sb.². Dodržování stanovených limitů podle legislativních předpisů zajišťuje kontrolu množství vybraných těžkých kovů, která ale neumožňuje bližší identifikaci jejich reálného účinku na přítomné organismy. Pro úplnější zhodnocení možných rizik je vhodné doplnit chemické analytické postupy biologickými testy toxicity na vybraných indikátorových organismech. Mezi nejvhodnější testovací organismy pro půdní vzorky patří žížaly, vzhledem k jejich velkému rozšíření a důležité roli v půdním ekosystému. Žížaly jsou typičtí geobionti. Dochází u nich k vysoké expozici kontaminantů a také jsou citlivější na znečištění kovy, než jiné skupiny půdních bezobratlých³. Standardní testovací organismus používaný v terestrické toxikologii v EU (OECD 222, cit.⁴, OECD 207, cit.⁵) je epigeická žížala *Eisenia foetida*. Výhodou tohoto druhu je především snadný chov v laboratorních podmínkách, krátký generační čas a vysoký generační potenciál. Ve standardizovaných laboratorních testech se nejčastěji sledují parametry na úrovni jedince (mortalita) a výsledek testů toxicity se uvádí pomocí toxikologických indexů. Současný vývoj ekotoxikologických testů směřuje k hledání citlivějších nástrojů biomonitoringu sloužících jako varovné signály potencionálního poškození organismu (tzv. „early warning tests“), které

umožní odhalit negativní působení toxických látek dříve než klasické ekotoxikologické testy. Mezi tyto nástroje řadíme biologické markery, definované jako měřitelné biochemické odpovědi organismu na toxickou látku. Zástupcem biomarkerů jsou metalothioneiny (MT), tvořící superrodinu intracelulárních a termostabilních proteinů s nízkou molekulovou hmotností (6 až 8 kDa) a s vysokým obsahem cysteinu³. MT se účastní homeostázy kovů, zejména zinku a mědi, a detoxikace těžkých kovů, především kadmia, olova a rtuti⁶. Rovněž se podílejí na ochraně organismu před oxidačním stresem. Experimenty provedené na *E. foetida*, které byly vystaveny působení Cd, naznačují, že MTs mohou být považovány za velmi citlivé potenciální biomarkery expozice Cd (cit.⁷).

Cílem práce bylo zavedení metody detekce kontaminace půdy těžkými kovy stanovením MT pomocí testu ELISA (imunoanalýza s enzymem vázaným na imunosorbent) u modelového organismu *Eisenia foetida*. Postup byl ověřen na uměle připravené půdě (artificiální půdě), exponované chloridem kademnatým a měďnatým za kontrolovaných podmínek a porovnan s klasickým stanovením toxického vlivu pomocí detekce mortality indikátorového organismu.

Experimentální část

Chemikálie

Testované látky: chlorid měďnatý (VWR Chemicals) a chlorid kademnatý (Acros Organics).

Sloučeniny potřebné pro přípravu roztoků: detergent Tween 20 (Calbiochem), hovězí sérový albumin (BSA), azid sodný (NaN_3), 2-merkaptóethanol, fenylmethylsulfonfyl fluorid, *p*-nitrofenyl fosfát (pNpp) (všechno Sigma-Aldrich), myši monoklonální protilátky proti metalothioneinu (M mAb) (Enzo Life Sciences), kozi polyklonální protilátky připravené proti myšimu imunoglobulinu G (G pAb IgG) (Enzo Life Sciences), metalothionein: 1-61 (Santa Cruz Biotechnology).

Půdní substrát

Pro testování bylo připraveno 10 kg standardní artificiální půdy (OECD 207, cit.⁵) složené ze směsi vysušeného jemnozrného křemenného písku (Agro, s.r.o.), kaolinového jílu s obsahem kaolinitu nad 30 % (Lasselsberger, s.r.o.) a jemně proseté rašeliny (<2 mm) (Agro s.r.o.) v hmotnostním poměru 7 : 2 : 1. Acidita artificiálního výluhu byla před použitím upravena pomocí uhličitánu vápenatého (VWR Chemicals) na hodnotu pH 6,5 (ISO 10390)⁸. Maximální vodní kapacita (WHC) artificiální půdy byla upravena na 40 % pomocí destilované vody (ISO 11274)⁹.

Testovací organismus

Žížaly *Eisenia foetida* (Ekovermes, Pustějov) byly v laboratorních podmínkách chovány v plastových boxech o objemu 15–20 litrů při teplotě 18–25 °C. Chovný substrát tvořila směs rašeliny a zahradnického substrátu s vlhkostí 40–50 %. Jako potrava byl do půdy přidáván kukuřičný šrot. Před zahájením testování došlo k věkové synchronizaci žížal a pro test byli využíváni dospělí jedinci ve věku dvou měsíců.

Stanovení akutní toxicity na žížalách *Eisenia foetida*

Experiment probíhal ve skleněných nádobách o objemu 1000 ml, do kterých bylo naváženo 500 g připravené zvlhčené umělé půdy. Pro každou testovanou látku (CdCl_2 , CuCl_2) byla připravena koncentrační řada 75, 150, 300, 500, 1000 a 2000 mg kg^{-1} suché umělé půdy, která byla aplikována do jednotlivých testovacích nádob. Kontrolní vzorek obsahoval 500 g umělé půdy bez testované látky. Dospělí jedinci žížal ze synchronního chovu byli umístěni v počtu 10 ks o průměrné hmotnosti $0,24 \pm 0,04$ g na povrch substrátu v každé testovací nádobě. Po 14denní expozici při teplotě 20 ± 2 °C byla vyhodnocena mortalita žížal a ze získaných dat byla stanovena hodnota LC_{50} .

Příprava vzorků pro metodu ELISA

Vzorky přeživších exponovaných žížal byly homogenizovány v obohaceném PBS (fosfátový pufr – Phosphate Buffered Saline) pufru (1 ml), který byl připraven rozpuštěním NaN_3 (81,25 mg), 2-merkaptioethanolu (350 μl) a fenylmethylsulfonfyl fluoridu (4,35 mg) v 250 ml PBS pufru (0,05M, pH 7,4). Zhomogenizovaný materiál byl centrifugován v předchlazené centrifuze na 4 °C při 15 000 g po dobu 10 min.

Stanovení celkové koncentrace proteinů

Celková koncentrace proteinů ve vzorcích byla stanovena metodou dle Bradforda¹⁰ s využitím kalibrační křivky čistého BSA v koncentrační řadě 0–100 $\mu\text{g}/100$ μl obohaceného pufru PBS. Na mikrotitrační destičku bylo aplikováno 5 μl vzorku nebo 5 μl roztoku BSA z přichystané koncentrační řady a následně bylo přidáno 250 μl bílkovinného činidla připraveného rozpuštěním *Coomassie Brilliant Blue G-250* (50 mg), 96% ethanolu (25 ml) a 85% kyseliny fosforečné (50 ml) v destilované vodě (500 ml). Po sedmiminutové inkubaci mikrotitrační destičky ve tmě byla změřena absorbance při vlnové délce 595 nm na ELISA spektrofotometru (Epoch BioTek, program Gen 5). Ze získaných dat byla sestrojena grafická závislost absorbance (při 595 nm) na koncentraci BSA. Za využití rovnice lineární regrese byla stanovena celková koncentrace proteinů ve všech vzorcích. Vzorky byly naředěny obohaceným PBS pufrům tak, aby koncentrace pro-

teinů ve 100 μl každého vzorku byla stejná. Jako optimální byla zvolena koncentrace 60 μg proteinů/100 μl vzorku.

Popis metody ELISA pro stanovení metalothioneinů

Na mikrotitrační destičku bylo dávkováno 100 μl naředěných vzorků obsahujících 60 μg bílkovin. Mikrotitrační destička byla inkubována přes noc při teplotě 4 °C. Po proběhlé inkubaci bylo provedeno odstranění vzorků pomocí pipety s následným trojnásobným promytím jamek mikrotitrační destičky promývacím roztokem (PBS pufr pH 7,4, Tween 20). Poté byl na mikrotitrační destičku aplikován blokovací roztok 1% BSA v obohaceném PBS (dávkování 0,1 ml/jamka, inkubace 60 min při teplotě 37 °C), který byl po hodinové inkubaci pipetou odstraněn, a jamky byly trojnásobně promyty promývacím roztokem. Následně byl do všech jamek destičky aplikován 0,1% roztok monoklonální protilátky (M mAb), (dávkování 0,1 ml/jamka, inkubace 150 min při teplotě 37 °C), která byla po inkubaci z jamek destičky pomocí pipety odstraněna. Po promytí promývacím roztokem ve třech opakováních byl do všech jamek aplikován roztok 0,1% polyklonální protilátky (G pAb IgG), (dávkování 0,1 ml/jamka, inkubace 120 min při teplotě 37 °C). Na závěr bylo po odstranění polyklonální protilátky a trojnásobném promytí promývacím roztokem do všech jamek destičky aplikováno 0,1 ml roztoku pNpp. Mikrotitrační destička byla inkubována 30 min při pokojové teplotě. Výsledný barevný produkt byl změřen spektrofotometricky při vlnové délce 405 nm na ELISA spektrofotometru. Koncentrace metalothioneinů ve vzorcích byly odečteny z kalibrační křivky čistého metalothioneinu v koncentrační řadě v rozsahu 0,5–0,002 $\mu\text{g}/100$ μl obohaceného PBS.

Vyhodnocení výsledků

Ze zaznamenané mortality *Eisenia foetida* po 14denní expozici CdCl_2 a CuCl_2 byla sestrojena grafická závislost procentuální mortality na koncentraci testovaných látek. Výsledky testů byly zpracovány regresní analýzou a byla stanovena letální koncentrace LC_{50} .

Hodnoty absorbance (405 nm) závislé na koncentraci standardu MT byly zpracovány regresní analýzou a byla stanovena koncentrace MT ve vzorcích. Výsledky testů byly zpracovány s využitím statistického programu R (R Core Team, 2016, verze 3.0.2). Významné rozdíly ($P < 0,05$) v měřených parametrech byly hodnoceny testem ANOVA.

Výsledky a diskuse

Akutní toxicita chloridu kadmnatého a měďnatého u žížal byla sledována v rozsahu koncentrací 75–2000 mg kg^{-1} CdCl_2 a CuCl_2 . U testů nebyla překročena 10% mortalita v negativní kontrole, což potvrdilo platnost testů.

Kadmnaté ionty jsou pro většinu organismů velmi toxické, proto jsou využívány jako standardní látky v tes-

tech toxicity. U všech aplikovaných koncentrací CdCl_2 byla pozorována zvýšená mortalita jedinců oproti kontrole. Zjištěná hodnota LC_{50} pro CdCl_2 byla $972 \pm 21,4 \text{ mg kg}^{-1}$ ($R^2 = 0,9263$). Podobné hodnoty uvádí i ostatní autoři ($\text{LC}_{50} = 810 \text{ mg kg}^{-1}$ (cit.¹¹), $\text{LC}_{50} = 911,2 \text{ mg kg}^{-1}$ (cit.¹²)). Z uvedených výsledků lze konstatovat, že kadmium v půdním prostředí způsobuje akutní toxický účinek až při vyšších koncentracích. Nebezpečí této látky spočívá ve schopnosti kumulace v organismu a její chronické expozici¹³.

Jako druhá látka byl testován chlorid měďnatý. Měď je stopový prvek, který hraje důležitou roli v organismech. Nicméně při vysoké hladině se měď stává jedním z nejtoxičtějších těžkých kovů pro bezobratlé¹⁴. U všech aplikovaných koncentrací CuCl_2 byla pozorována zvýšená mortalita jedinců oproti kontrole. Zjištěná hodnota LC_{50} pro CuCl_2 byla $1304 \pm 45,78 \text{ mg kg}^{-1}$ ($R^2 = 0,8843$). K podobnému výsledku dospěli i jiní autoři (např. $\text{LC}_{50} = 1322 \text{ mg kg}^{-1}$ (cit.¹⁵)).

Pro citlivější hodnocení toxicity CdCl_2 a CuCl_2 byla stanovena hladina metalothioneinů ve vzorcích tkání jedinců *Eisenia foetida* pomocí enzymatické imunoanalýzy ELISA. Naměřené průměrné koncentrace MT ve vzorcích tkání žížal *Eisenia foetida* u jednotlivých koncentrací CdCl_2 a CuCl_2 shrnuje tab. I. Závislost koncentrace metalothioneinů na koncentraci CdCl_2 a CuCl_2 je graficky vyjádřena na obr. 1.

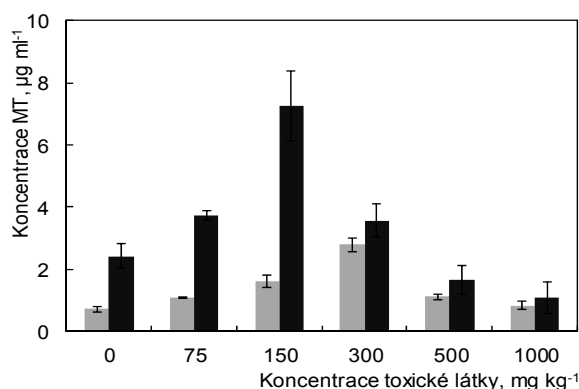
Hodnoty obsahu MT ve vzorcích naznačují, že do koncentrace 300 mg kg^{-1} chloridu kademnatého vzrůstá koncentrace metalothioneinů. Koncentraci 300 mg kg^{-1} CdCl_2 odpovídá hladina MT $2,79 \pm 0,22 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$. Další zvyšování koncentrace CdCl_2 již vyvolává mírné snížení hladiny metalothioneinů. K podobným výsledkům došel i Demuyne¹⁶, který stanovil nejvyšší hladinu MT $1,11 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ u koncentrace kadmia 200 mg kg^{-1} . U druhé testované látky chloridu měďnatého byla nejvyšší koncentrace MT $7,26 \pm 1,14 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ u koncentrace 150 mg kg^{-1} CuCl_2 . Od této koncentrace CuCl_2 došlo k výraznému snížení hladiny metalothioneinů.

Tato práce ukázala, že Cd a Cu indukují různou produkci MT. Cu se jeví jako silnější induktor produkce MT než Cd. Porovnáním výsledků použití metody stanovení

metalothioneinů a klasického postupu detekce akutní toxicity je zřejmé, že oba sledované kovy vyvolávají syntézu metalothioneinů u *Eisenia foetida* ve výrazně nižších koncentracích než v klasickém testu akutní toxicity. Výsledky potvrdily vhodnost použití stanovení metalothioneinů pro detekci neletálních koncentrací těžkých kovů v hodnocených vzorcích půd.

Závěr

Na základě dosažených výsledků lze konstatovat, že metalothioneiny patří mezi velmi citlivé biomarkery expozice kovům. U indikátorového organismu intoxikovaného chloridem kademnatým a chloridem měďnatým se potvrdila schopnost indukce metalothioneinů již po expozici nízkými koncentracemi kadmia a mědi. Navržený postup stanovení metalothioneinů u indikátorového organismu *Eisenia foetida* je vhodnou metodou detekce kontaminace půdy těžkými kovy, která významně doplňuje chemické analytické postupy i klasické ekotoxikologické hodnocení.



Obr. 1. Závislost koncentrace metalothioneinů ($\mu\text{g ml}^{-1}$) na koncentraci CdCl_2 a CuCl_2 (mg kg^{-1}) u modelového organismu *Eisenia foetida* po 14denní expozici; ■ chlorid kademnatý, ■ chlorid měďnatý

Tabulka I

Průměrné koncentrace metalothioneinů ($\mu\text{g ml}^{-1}$) ve vzorcích tkání u jedinců *Eisenia foetida* po expozici CdCl_2 a CuCl_2 (mg kg^{-1})

Koncentrace testované látky [mg kg^{-1}]	Koncentrace MT [$\mu\text{g ml}^{-1}$] po expozici:	
	chloridem kademnatým	chloridem měďnatým
0	0,70 ± 0,07	2,42 ± 0,40
75	1,07 ± 0,02	3,73 ± 0,14
150	1,60 ± 0,19	7,26 ± 1,14
300	2,79 ± 0,22	3,55 ± 0,53
500	1,11 ± 0,09	1,64 ± 0,45
1000	0,83 ± 0,13	1,08 ± 0,50

Seznam použitých zkratek

ANOVA	analysis of variance, analýza rozptylu
BSA	bovine serum albumin, hovězí sérový albumin
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, imunoanalýza s enzymem vázaným na imunosorbent
G pAb IgG	goat polyclonal antibodies against mouse immunoglobulin G, kozí polyklonální protilátky připravené proti myšimu imunoglobulinu G
ISO	International Organization for Standardization, Mezinárodní organizace pro normalizaci
LC ₅₀	letální koncentrace pro 50 % jedinců
M mAb	anti-metallothionein mouse monoclonal antibody, myší monoklonální protilátky proti metallothioneinu
MT	metalothioneiny
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development, Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj
PBS	phosphate buffered saline, fosfátový pufr
pNpp	<i>p</i> -nitrofenyl fosfát
WHC	water-holding capacity, maximální vodní kapacita

LITERATURA

1. Vyhláška č. 153/2016 Sb. o stanovení podrobností ochrany kvality zemědělské půdy.
2. Vyhláška č. 437/2016 o podmínkách použití upravených kalů na zemědělské půdě.
3. Ndayibagira A., Sunahara G. I., Robidoux P. Y.: *Soil Biol. Biochem.* 39, 194 (2007).
4. OECD Guidelines: *Earthworm Reproduction Test (Eisenia fetida/Eisenia andrei)* 2004, 222.
5. OECD Guidelines: *Earthworm acute toxicity tests* 1984, 207.
6. Zalewska M., Trefon J., Milnerowicz H.: *Proteomics* 14, 1343 (2014).
7. Brulle F., Mitta G., Cocquerelle C., Vieau D., Lemièrre S., Leprêtre A., Vandenbulcke F.: *Environ. Sci. Technol.* 40, 2844 (2006).
8. ČSN ISO 10390: *Kvalita půdy – Stanovení pH* (2005).
9. ČSN EN ISO 11274: *Kvalita půdy – Stanovení retenčních vlhkostních charakteristik – Laboratorní metody* (2014).
10. Bradford M. M.: *Anal. Biochem.* 72, 248 (1976).
11. Dou J., Hu S.: *Biotechnol. Ind. J.* 10, 9737 (2014).
12. Liu H., Li M., Zhou J., Wang Y.: *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 3708 (2018).
13. Zhang S., Tang C., Li H., Wei Z., Hu F.: *Int. J. Phytorem.* 12, 24 (2010).
14. Duan X., Xu M., Zhou Y., Yan Z., Du Y., Zhang L., Zhang Ch., Bai L., Nie J., Chen G., Li F.: *Chemosphere* 145, 185 (2016).
15. Qiu H., Vijver M. G., He E., Peijnenburg W. J. G. M.: *Environ. Sci. Technol.* 47, 4796 (2013).
16. Demuynck S., Grumiaux F., Mottier V., Schikorski D., Lemièrre S., Leprêtre A.: *Comp. Biochem. Physiol.* 145, 658 (2007).

T. Stachurová and H. Sezimová (*Department of Biology and Ecology, University of Ostrava, Ostrava*):
The Method for Detection the Presence of Heavy Metals in the Soil Environment by the Determination of Metallothioneins

This article is focused on the determination of metallothioneins by the ELISA enzyme immunoassay in the model organism *Eisenia foetida*. The results were obtained using artificially prepared soil with increasing levels of added cadmium or copper salts and laboratory-induced earthworms of the same age. It has been shown that metallothioneins are sensitive biomarkers of metal exposure. The ability to induce metallothioneins in the *Eisenia foetida* exposed to cadmium and cupric chloride was confirmed at low concentrations. The classical method of detecting toxic effects by determining the mortality of indicator organisms is less sensitive. The use of metallothioneins in practice will allow better identification of the influence of non-lethal concentrations of heavy metals on organisms in contaminated soils and provide a better assessment of the risk of environmental pollution.

Keywords: metallothioneins, *Eisenia foetida*, heavy metals, ELISA assay, cadmium chloride, cupric chloride, environment