

UGOTAVLJANJE MUTAGENE/ GENOTOKSIČNE AKTIVNOSTI ODPADNIH VOD PAPIRNE INDUSTRIJE

DETERMINATION OF MUTAGENIC/GENOTOXIC ACTIVITY OF PAPER MILL WASTEWATERS

Damjan Balabanič¹, Bojana Žegura², Aleksandra Krivograd Klemenčič^{3,4}, Metka Filipič²

IZVLEČEK

Spremljanje kakovosti odpadnih in površinskih vod temelji na spremljanju fizikalno-kemijskih parametrov. Vendar pa s kemijskimi analizami prisotnosti genotoksičnih snovi pogosto ne ugotovimo, ker so navadno prisotne pod mejo zaznavanja analitskih metod. Poleg tega analitske metode ne pokažejo genotoksičnega potenciala celotnega vzorca, še zlasti, če med posameznimi onesnaževali pride do medsebojnih antagonističnih ali sinergističnih vplivov. Z ustreznimi biološkimi testi lahko zaznamo odziv na vse škodljive snovi, ki so v vodi, tudi če ne poznamo njihove identitete in medsebojnih interakcij. Zato pripomorejo k preseganju nekaterih pomanjkljivosti v kemijsko specifičnem pristopu ocenjevanja kakovosti odpadnih in površinskih vod. V tej raziskavi smo primerjali citotoksičnost in genotoksičnost vzorcev odpadnih vod dveh papirnic, od katerih ena kot surovino za izdelavo papirnih izdelkov uporablja celulozna vlakna, druga pa reciklirana vlakna. Vzorce odpadne vode, ki smo jih odvzeli pred in za čistilno napravo ter vzorce prejemne vode odvzete nad in pod izpustom odpadne vode v vodotok smo testirali s testoma z bakterijami *Salmonella typhimurium*: SOS/umuC in Ames MPF 98/100 Aqua™ test, ter s testom komet na človeških jetrnih celicah (celice HepG2). Ugotovili smo, da so bile mutagene in genotoksične le odpadne vode papirne industrije, ki za izdelavo papirnatih izdelkov uporablja reciklirana vlakna. Poleg tega smo ugotovili, da je anaerobno in aerobno čiščenje odpadne vode, iz te papirnice, uspešno odstranilo in/ali inaktiviralo spojine, ki so bile odgovorne za mutagenost za bakterije, ne pa tudi spojin, odgovornih za genotoksičnost za celice HepG2. Predlagamo nadaljnje raziskave, ki bodo omogočile identifikacijo genotoksičnih snovi ter na osnovi tega ustrezne ukrepe za njihovo zmanjšanje v izpustu v vodotok. Ta raziskava potrjuje pomembnost uporabe bioloških testov za kontrolo kakovosti odpadnih in površinskih voda.

Ključne besede: papirna industrija, odpadne vode, biološki testi, citotoksičnost, mutagenost, genotoksičnost.

ABSTRACT

Assessment of wastewater and surface water quality is based on monitoring of physico-chemical parameters. However, the chemical analyses do not always show the presence of genotoxic substances, as they are usually present in concentrations that are below the detection limit of analytical methods. In addition, analytical methods do not show genotoxic potential of the whole sample, especially if there are antagonistic or synergistic effects of individual pollutants present. With appropriate biological tests we can detect response to the harmful substances in water, even if we do not know their identities and interactions. Therefore biological tests can contribute to overcoming deficiencies in chemical approach of wastewater and surface water quality assessment. In present study we compared the cytotoxic and genotoxic activity of wastewater samples from two paper mills, one of them is using cellulose fibres and the other recovered fibres for manufacturing of paper products. Wastewater samples were taken before and after the biological treatment plant and the receiving water samples were taken above and below the discharge of wastewater into the river. Samples were tested with two bacterial tests with *Salmonella typhimurium*: SOS/umuC and Ames MPF 98/100 Aqua™ test and with the comet assay in human liver cells (HepG2 cells). The results showed that only wastewater from paper mill that uses recovered fibres for paper production was mutagenic and genotoxic. The anaerobic and aerobic biological treatment of wastewater from the paper mills successfully removed and/or inactivated compounds responsible for genotoxic effect on HepG2 cells. We suggest further research that will enable the identification of genotoxic substances and the appropriate measures for reduction of these substances in effluents entering the watercourse. This study confirms the importance of using biological tests for quality control of wastewater and surface water.

Key words: paper industry, wastewaters, bioassays, cytotoxicity, mutagenicity, genotoxicity.

1. UVOD

Na kakovost voda vplivajo najrazličnejša toksična onesnažila, ki izvirajo iz industrije, kmetijstva in gospodinjstih komunalnih odplak. Pri tem so industrijske odpadne vode in iztoki iz čistilnih naprav pomemben točkovni vir onesnaženja. Papirna industrija v tem pogledu ni izjema. Papirna industrija je ena od največjih industrijskih porabnic vode [1], posledica

so velike količine odpadnih voda, ki lahko vsebujejo organske snovi, škodljive za organizme in okolje. Pri proizvodnji papirnatih izdelkov uporablja papirna industrija vlaknine, polnila in kemikalije, med katerimi so zelo pomembni biocidi, alkilfenolne spojine, policiklični aromatski ogljikovodiki (PAH) in ftalati. Večina teh snovi je toksičnih, številne med njimi pa so

tudi genotoksične. Spremljanje kakovosti odpadnih in površinskih vod temelji na spremljanju fizikalno kemijskih parametrov. Vendar pa so koncentracije genotoksičnih snovi v odpadnih in površinskih voda pogosto pod mejo določljivosti s kemijskimi analitskimi metodami, zato je zelo težko oceniti tveganja zaradi njihove prisotnosti.

Zgolj na osnovi kemijskih analiz ni mogoče predvideti genotoksičnosti celotnega vzorca zaradi morebitnih interakcij med komponentami kompleksnih vzorcev vod, ki lahko privedejo do sinergističnih učinkov [2]. Alternativni pristop za oceno genotoksičnosti kompleksnih vzorcev, ki se čedalje bolj uveljavlja, je uporaba bioloških testov, ki pokažejo odziv na delovanje celotnega vzorca.

V predstavljeni raziskavi smo primerjali citotoksično, mutageno in/ali genotoksično aktivnost odpadnih vod iz dveh papirnic z različnima proizvodnima procesoma, pred in po biološkem čiščenju ter gorvodno in dolvodno od izpusta odpadne vode v vodotok. Znano je, da noben test genotoksičnosti ne zazna vseh možnih genotoksičnih snovi, ki imajo različne mehanizme delovanja. Zato je potrebno uporabljati kombinacije testov. V naši raziskavi smo uporabili kombinacijo dveh bakterijskih testov: SOS/umuC s *S. typhimurium* TA1535/pSK1002, in Ames MPF 98/100 Aqua™ test, in komet test s celicami človeških jeter HepG2.

2. MATERIALI IN METODE

Vzorci odpadnih vod

Vzorce vod smo odvzeli v dveh papirnicah z različnima proizvodnima procesoma. Papirnica 1 kot surovino uporablja celulozna vlakna, papirnica 2 pa reciklirana vlakna. Izvedli smo enkratni odvzem vzorcev odpadnih vod pred in za aerobno čistilno napravo (papirnica 1). Papirnica 2 ima pred aerobno čistilno napravo tudi anaerobno čistilno napravo, zato smo vzeli vzorec tudi tu. Vzorce prejemnih vod iz vodotoka smo odvzeli nad in pod izpustom odpadne vode. Skupaj smo odvzeli 5 vzorcev odpadnih in 4 vzorce površinskih vod.

Pred biološkim testiranjem smo vzorce odpadnih vod filtrirali (Whatman cellulose acetate syringe filter, 0.2 µm) in uravnali pH na 7±0.2 (v skladu s standardom ISO 5667-16-1998) Š3Ć.

Biološki testi

Za določevanje citotoksičnosti, mutagenosti in/ali genotoksičnosti odvzetih vzorcev odpadnih in površinskih vod smo uporabili bakterijska testa SOS/umuCin Ames MPF 98/100 Aqua™ test, ter testni sistem s človeškimi jetrnimi celicamiHepG2, kje smo genotoksičnost vzorcev določili s testom komet.

BAKTERIJSKA TESTA

SOS/umuC test

Testni organizem so genetsko

spremenjene bakterije *Salmonellatyphimurium* sev TA1535/pSK1002. Test smo izvedli po klasični metodi z nekaterimi spremembami, prilagojenimi za ugotavljanje citotoksične in genotoksične aktivnosti nekoncentriranih vodnih vzorcev, kot je opisano v ISO standardu [4]. Citotoksičnost vzorcev smo določili spektrofotometrično z merjenjem absorbance celične suspenzije pri valovni dolžini 600 nm, genotoksičnost pa z β-galaktozidaze aktivnosti z merjenjem pretvorbe substrata o-nitrofenil-β-D-galaktopiranozida (ONPG) v rumeno obarvan produkt, ki ga določimo z merjenjem absorbance pri 420 nm. Bakterijske celice niso metabolno aktivne, zato smo testiranje izvedli brez in z dodatkom sistema za metabolno aktivacijo (S9-zmes).

Ames MPF 98/100 Aqua™ test

Ames MPF 98/100 Aqua™ test je kolorimetrična različica klasičnega Ames testa, ki vključuje seva *Salmonella typhimurium* sev TA 98 in TA100[5]. Testni sistem zaznava povratne mutacije zaradi premika bralnega okvirja in povratne mutacije zaradi zamenjave parov baz. Test smo izvedli po navodilih proizvajalca [6]. Vzorce smo testirali pri redčitvi 1:1. V primeru pozitivnega odziva smo testiranje ponovili še pri redčitvah 1:2 in 1:4. Mutageno aktivnost vzorcev smo izračunali s pomočjo programa proizvajalca Š6Ć. Testiranje smo izvedli brez in z dodatka sistema za metabolno aktivacijo (S9-zmes).

TESTIRANJE S ČLOVEŠKIMI JETRNIMI CELICAMI HepG2

Za ugotavljanje citotoksičnosti in genotoksičnosti vzorcev odpadnih vod z evkariontskimi celicami smo uporabili metabolno aktivne celice človeškega hematoma HepG2. Izbrali smo jih, ker so uveljavljen model za ugotavljanje genotoksičnosti in ker zaradi svoje ohranjene metabolne aktivnosti boljše odražajo morebitne škodljive učinke pri ljudeh, kot drugi testni sistemi.

MTT test

S testom MTT določamo citotoksičnost vzorcev za sesalske celice. Test smo izvedli po postopku, kot ga je opisal Mossman (1983)[7]. HepG2 celice smo izpostavili 30 % vzorca vode, ki je najvišja možna koncentracija pri testiranju nekoncentriranih vzorcev vod za 24 ur.

Komet test

Test komet je preprosta, hitra in občutljiva metoda za določanje poškodb DNK molekul posameznih evkariontskih celic. Test komet smo izvedli po postopku, kot ga je opisal Singh (1988) [8],

s spremembami, kot je opisano v Žegura in Filipič (2004) [9]. Za vsako skupino smo analizirali 50 kometov.

3. REZULTATI IN DISKUSIJA

V predstavljeni raziskavi, v kateri smo testirali citotoksičnost in genotoksičnost vzorcev odpadnih vod dveh papirnic z različnima proizvodnima procesoma, smo ugotovili, da odpadna voda iz papirnice, ki pri proizvodnji papirja uporablja celulozna vlakna, ni imela citotoksičnih, mutagenih in/ali genotoksičnih lastnosti, medtem ko so bili vzorci odpadnih vod iz papirne industrije, ki pri proizvodnji papirja uporablja reciklirana vlakna, genotoksični.

Testiranje vzorcev odpadnih vod in vodotokov nad in pod izpustom odpadne vode s SOS/umuC testom s sevom *S. typhimurium* TA 1535/pSK1002 z dodatkom in brez dodatka metabolne aktivacije S9 je pokazalo, da noben od odvzetih vzorcev ni deloval citotoksično in/ali genotoksično na bakterijske celice (rezultati niso prikazani).

Pri testiranju mutagene aktivnosti vzorcev odpadnih in površinskih vod z Ames MPF 98/100 Aqua™ testom z bakterijskimi celicami w. Vzorec odpadne vode papirnice 2, odvzete pred čiščenjem, je bil mutagen, vendar le pri testiranju z dodatkom metabolne aktivacije, medtem ko vzorca, odvzeta po aerobnem in anaerobnem čiščenju, nista bila mutagena (tabela 1). Prav tako nista bila mutagena vzorca, odvzeta iz vodotoka nad in pod izpustom odpadne vode iz te papirnice. To kaže, da so bili v neočiščeni odpadni vodi prisotni mutageni, ki potrebujejo metabolično aktivacijo. Reciklirana vlakna lahko vsebujejo ostanke različnih dodatkov in tiskarskih barv, med katerimi so nekatere genotoksične, kar je verjetno razlog za mutageno aktivnost te odpadne vode. Odsotnost mutagene aktivnosti v vzorcih odpadne vode po anaerobnem in aerobnem čiščenju pa kaže, da obstoječa čistilna naprava učinkovito odstrani in/ali inaktivira bakterijske mutagene.

Tabela 1: Mutagena aktivnost vzorcev odpadnih in površinskih vod papirnice 1 in papirnice 2, določena z Ames MPF 98/100 Aqua™ testom

Testiranje citotoksičnosti vzorcev z MTT testom smo izvedli pred izvedbo komet testa, z namenom, da za ugotavljanje genotoksičnosti izberemo netoksične koncentracije vzorcev. Rezultati MTT testa so pokazali, da noben vzorec odpadnih ali površinskih vod pri koncentraciji 30 % vzorca ni deloval citotoksično na celice HepG2. Zato smo za testiranje genotoksičnosti s testom komet kot najvišjo testirano koncentracijo uporabili 30 % vzorca.

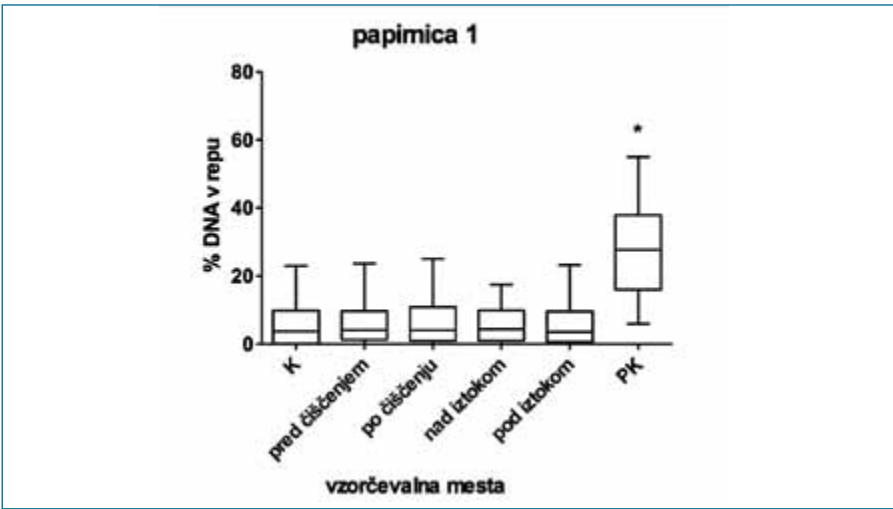
Tabela 1: Mutagena aktivnost vzorcev odpadnih in površinskih vod papirnice 1 in papirnice 2, določena z Ames MPF 98/100 Aqua™ testom

		TA98				TA100			
vzorec	razredčite v	brez metabolične aktivacije		z metabolično aktivacijo		brez metabolične aktivacije		z metabolično aktivacijo	
		pozitivne jamice ± SD	FIBa	pozitivne jamice ± SD	FIBa	pozitivne jamice ± SD	FIBa	pozitivne jamice ± SD	FIBa
Papirnica 1									
kontrola		0.67±0.58		0.33±0.58		3.0±1.73		1.67±1.15	
pred biološkim čiščenjem	1:1	1.33±0.58	0.79	2.0±1.0	1	3.67±2.52	0.65	2.33±1.53	0.83
po biološkem čiščenju	1:1	0.67±1.15	0.35	2.0±2.65	1	1.33±0.58	0.24	3.33±2.31	1.18
nad iztokom	1:1	0.67±0.58	0.35	1.0±1.0	0.5	1.0±1.0	0.18	2.0±0.0	0.71
pod iztokom	1:1	0.67±4.04	0.26	0.67±0.58	0.33	1.67±0.58	0.30	2.0±1.0	0.71
Papirnica 2									
kontrola		0.67±0.58		1.33±2.31		4.0±1.0		1.0±1.0	
pred anaerobnim čiščenjem	1:1	2.0±2.0	1.61	2.33±0.58	0.53	2.67±2.08	0.53	26.0±6.0	13.5
	1:2	-	-	-	-	-	-	4.67±1.15	2.33
	1:4	-	-	-	-	-	-	0.33±0.58	0.17
po anaerobnem čiščenju	1:1	0.67±0.58	0.54	2.67±0.58	0.40	2.0±1.0	0.40	1.3±1.15	0.67
po aerobnem čiščenju	1:1	0.67±0.58	0.33	2.0±1.0	0.60	3.0±1.0	0.60	1.0±1.0	1.0
nad iztokom	1:1	1.0±1.0	0.50	0.67±0.58	0.60	3.0±1.73	0.60	0.0±0.0	/
pod iztokom	1:1	1.33±1.53	0.67	1.67±2.89	0.73	3.67±1.53	0.73	1.33±2.65	1.33

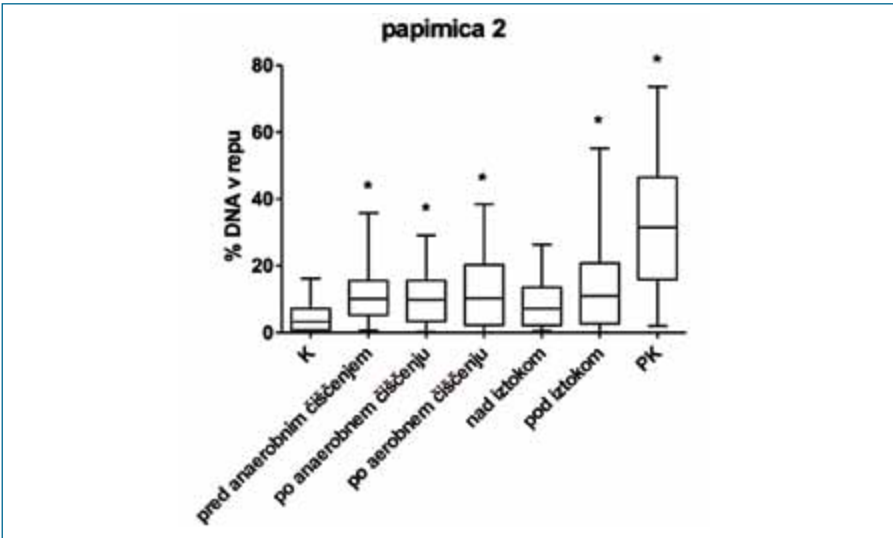
Test komet s HepG2 celicami je pokazal, da vzorci odpadnih vod pred in po biološkem čiščenju iz papirnice 1, kot tudi vzorci vod iz vodotoka nad in pod izpustom odpadne vode, niso bili genotoksični (slika 1).

Vzorci odpadnih vod papirnice 2 pa so bili genotoksični, in sicer pred čiščenjem, kot tudi po anaerobnem in aerobnem čiščenju (slika 2). Pri vseh vzorcih smo signifikantno povečanje poškodb DNA zaznali le pri najvišji testirani koncentraciji (30 %). Pri tem je bila poškodovanost celic, izpostavljenih vzorcu neočiščene odpadne vode in vzorcu, odvzetem po aerobnem čiščenju, nekoliko večja od poškodovanosti, ki jo je povzročila izpostavljenost vzorcu vode po anaerobnem čiščenju. Poškodbe DNA, ki so bile nekoliko manjše, kot pri vzorcu po anaerobnem čiščenju, pa je povzročil tudi vzorec vodotoka odvzet pod izpustom odpadne vode.

Primerjava rezultatov testiranja z Ames MPF 98/100 Aqua™ testom in testom komet s celicami HepG2 kaže, da so bile v neočiščeni odpadni vodi papirnice 2 prisotne genotoksične snovi, ki so mutagene za bakterije in genotoksične za človeške celice. Genotoksičnost vzorcev odpadne vode po anaerobnem in aerobnem čiščenju, ki za bakterije nista bila mutagena, pri HepG2 celicah pa sta povzročila poškodbe DNA, pa kaže, da so za mutagenost za bakterije in genotoksičnost za celice odgovorne različne snovi. Možno je, da so nastali genotoksični produkti pretvorbe, lahko pa gre tudi za sinergistične učinke, ki jih



Slika 1: Vpliv odpadnih in površinskih vod papirnice 1 na poškodbe DNA celic HepG2. * prikazuje statistično značilno povečanje (test Dunnet, p < 0.01).



Slika 2: Vpliv odpadnih in površinskih vod papirnice 2 na poškodba DNA celic HepG2. * prikazuje statistično značilno povečanje (test Dunnet, p < 0.01).

Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili vodnim različnim vzorcem (30% v.v). Poskus smo ponovili v 3 neodvisnih ponovitvah in v vsakem poskusu analizirali 50 jeder. Rezultati so podani kot % DNA v repu in prikazani kot grafikon kvantilov. Razlike med celicami tretiranimi z vzorci in kontrolnimi celicami smo analizirali z enosmerno analizo variance (ANOVA, Kruskal-Wallis). Za primerjavo median % DNA v repu smo uporabili Dunnetov test.

bakterijski test ne zazna. Zaskrbljujoče pa je, da je bila genotoksična aktivnost ugotovljena pri vzorcu vode iz vodotoka pod izpustom odpadne vode. To kaže, da lahko pride do negativnih vplivov na vodne organizme.

ZAKLJUČKI

Rezultati naše raziskave so pokazali, da je genotoksičnost odpadnih vod papirne industrije odvisna od surovin, ki jih uporablja pri proizvodnji papirnih izdelkov, saj je bil neočiščen vzorec odpadne vode iz papirne industrije, ki uporablja celulozna vlakna, negenotoksičen, medtem ko je neočiščen vzorec odpadne vode iz papirne industrije, ki uporablja reciklirana vlakna, povzročil mutacije pri testiranju z Ames MPF 98/100 Aqua™ testom, kot tudi poškodbe DNA pri testiranju s celicami HepG2. Pokazalo se je tudi, da je anaerobno in aerobno čiščenje odpadne vode papirnice 2 odstranilo in/ali inaktiviralo bakterijske mutagene, ne pa tudi genotoksičnih snovi, ki povzročajo poškodbe DNA pri HepG2 celicah. Genotoksičnost odpadne vode, ki se izteka v prejemno vodo, in genotoksičnost prejemne vode kaže, da odpadne vode iz papirne industrije, ki v proizvodnji uporabljajo reciklirana vlakna, predstavljajo nevarnost tako za okolje, predvsem za vodne organizme, posredno pa tudi za človeka. Na osnovi

teh rezultatov ne moremo sklepati, katere snovi v odpadni vodi so genotoksične. Za identifikacijo teh snovi bi bile potrebne kemijske analize oziroma tako imenovano z biološkim testiranjem vodeno frakcioniranje. Podatki o naravi genotoksičnih snovi v odpadni vodi bi papirni industriji omogočili usmerjen razvoj učinkovitejših postopkov za odstranjevanje oziroma zmanjšanje prisotnosti snovi, ki prispevajo h genotoksični aktivnosti odpadnih vod, in/ ali zamenjala proizvodne surovine z okolju bolj prijaznimi.

ZAHVALA

Raziskavo delno financira Evropska unija, in sicer iz Evropskega socialnega sklada. Delno je bila raziskava financirana tudi znotraj ARRS programa P1-0245. Zahvaljujemo se tudi podjetju Xenometrix AG (Švica), ki nam je za to raziskavo podarilo Ames MPF 98/100 Aqua™ test (<http://www.xenometrix.ch>).

Do danes se je ohranilo 78 evidentiranih primerkov izvirne Dalmatinove Biblije, od tega 36 v Sloveniji. Primerek, ki ga hrani knjižnica v Kranju, je bil eden izmed huje poškodovanih, zato smo se odločili za konservatorsko-restavratorski poseg. V okviru raziskav, ki so bile izvedene pred in ob konservatorsko-restavratorskem posegu je bila opravljena tudi karakterizacija papirja, ki sestavlja knjižni blok Dalmatinove Biblije iz kranjske knjižnice. Cilj raziskave je bila primerjalna analiza in opredelitev lastnosti papirja kot nosilca tiskane knjige, z namenom opredelitve postopkov pri konserviranju in restavriranju tiskane in poslikane knjige kot dragocenega dokumenta, za hrambo za čim daljše obdobje v prihodnosti.



LITERATURA

[1] POKHREL, D. in VIRARAGHAVAN, T. Treatment of pulp and paper mill wastewater – a review. Science of the Total Environment, 2004, vol. 133, št. 1–3, str. 37–58.

[2] ŽEGURA, B., HEATH, E., ČERNOŠA, A. in FILIPIČ, M. Combination of in vitro bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples. Chemosphere, 2009, vol. 75, št. 11, str. 1453–1460.

[3] ISO 5667-16, 1998. Water analysis – General Guidance for the Biotesting.

[4] ISO 13829, 2010. Kakovost vode – Določevanje genotoksičnosti vode in odpadne vode z umu-preizkusom.

[5] MARON, D. M. in AMES, B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Research, 1983, vol. 113, št. 3–4, str. 173–215.

[6] Xenometrix, 2010. Ames MPF™ 98/100 Aqua Microplate Format Mutagenicity Assay for testing of water samples using S. typhimurium TA98 and TA100. Instructions for use. Version 1.4_S June 2010, Allschwil, Switzerland.

[7] MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. Journal of Immunological Methods, 1983, vol. 65, št. 1–2, str. 55–63.

[8] SINGH, N. P., McCOY, M. T., TICE, R. R. in SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage individual cells. Experimental Cell Research, 1988, vol. 175, št. 1, str. 184–191.

[9] ŽEGURA, B. in FILIPIČ, M. Application of in vitro comet assay for genotoxicity testing, Optimization in Drug Discovery: In Vitro Methods (Methods in Pharmacology and Toxicology, YAN, Z. in CALDWELL, G. (urednika), str. 301–313.

¹Inštitut za celulozo in papir
²Nacionalni inštitut za biologijo, oddelek za genetsko toksikologijo in biologijo raka
³Fakulteta za gradbeništvo in geodezijo, Univerza v Ljubljani
⁴Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani