

Določanje vsebnosti steroidnih estrogenov v odpadnih vodah brez predhodne ekstrakcije vzorcev

Miha Avberšek^{1,2}, Bojana Žegura³, Metka Filipič³, Ester Heath^{1,2}

¹ Odsek za znanosti o okolju, Institut Jožef Stefan, Ljubljana, Slovenija

² Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana, Ljubljana, Slovenija

³ Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana, Slovenija

miha.avbersek@ijs.si

Steroidni estrogeni so organska onesnažila naravnega izvora, ki lahko z vstopom v okolje povzročijo negativne učinke v ekosistemu. Zaradi njihovih nizkih koncentracij v okolju (ng/L) potrebujemo za zaznavanje teh spojin občutljive kemijske oziroma biološke metode. Ena izmed bioloških metod je tudi in vitro ER-Calux[®] test, ki za zaznavanje estrogenosti uporablja celično linijo. V naši raziskavi smo s prilagoditvijo ER-Calux[®] testa razvili postopek, ki omogoča zaznavanje estrogenega potenciala brez prehodne ekstrakcije vzorcev. Metodo smo optimizirali na umetnih vzorcih pitne in odpadne vode, kasneje pa še na realnih vzorcih iz čistilnih naprav in rečnih vod. Rezultati ER-Calux testa brez predhodne ekstrakcije vzorcev so pokazali, da je metoda dovolj občutljiva za dokazovanje prisotnosti nizkih vrednosti estrogenega potenciala v vodnih vzorcih, kar smo potrdili tudi z realnimi vzorci. Postopek nam omogoča testiranje večjega števila vzorcev z nižjimi materialnimi stroški in krajšim časom analize.

Ključne besede: steroidni estrogeni, odpadne vode, rečne vode, ER-Calux[®]

1 Uvod

Steroidni estrogeni (estron (E1), 17 β -estradiol (E2), estriol (E3) in 17 α -etinilestradiol (EE2)) so organska onesnažila, ki so pogosto prisotna v odpadnih vodah komunalnih čistilnih naprav in v vodnem ekosistemu, kamor se te vode stekajo [1]. Čeprav so večinoma naravnega izvora, so posledice njihove prisotnosti v okolju opazne kot motnje v rasti in razvoju živih organizmov (sesalci, ribe itd.),

prav tako pa lahko vplivajo na razmnoževanje in posledično na razvoj celotne populacije [2]. Prisotnost steroidnih estrogenov v odpadnih vodah so dokazali že v mnogih študijah. Koncentracije posameznih spojin, povzete po pregledni študiji Miege in sodelavcev [3], dosegajo do 670 ng/L (mediana 69 ng/L) v dotokih čistilnih naprav in do 285 ng/L (10 ng/L) v iztokih čistilnih naprav. V rečnih vodah so koncentracije tudi pod 1 ng/L, kar je že dovolj, za povzročanje negativnih učinkov na žive organizme, ki se zaradi kronične izpostavitve le še povečujejo.

Zaradi nizkih koncentracij so za ugotavljanje prisotnosti steroidnih estrogenov v okoljskih vzorcih potrebne dolgotrajne priprave vzorcev, ekstrakcije želenih spojin ter občutljive kemijske in biološke metode zaznavanja teh spojin v vzorcih [4], [5].

Kemijske metode zaznavanja steroidnih estrogenov temeljijo na ločbi analitov s plinsko ali tekočinsko kromatografijo in detekcijo z masno spektrometrijo [4]. Analizne metode nam podajo koncentracije posameznih analitov, ne pa tudi informacije o dejanski estrogeni aktivnosti vzorca. Le-to lahko določimo z *in vivo* ali *in vitro* biološkimi testi. Biološke metode uporabljajo različne vrste organizmov, pri čemer pa so, glede na podatke iz literature, zaradi enostavnega dela, hitrosti in nižje cene, *in vitro* testi na celičnih linijah ali kvasovkah med najbolj pogosto uporabljenimi. [5]. Tako kemijske kot tudi biološke metode zahtevajo dolgotrajno pripravo in predhodno ekstrakcijo vzorca.

V naši študiji smo uporabili ER-Calux[®] test [6], ki z uporabo celične linije omogoča zaznavanje estrogenosti v vzorcih. Cilj raziskave je bil, z uporabo in prilagoditvijo tega testa, razviti postopek, ki bo omogočal testiranje okoljskih vzorcev, predvsem odpadnih vod, brez predhodne ekstrakcije spojin ter razvito metodo optimizirati in uporabiti na realnih vzorcih.

2 Metode in materiali

1.1 Priprava vzorcev

Za optimizacijo postopka smo uporabili vzorce pitnih vod in odpadnih vod iz komunalne čistilne naprave, ki smo jim dodali znane količine standardnih raztopin štirih steroidnih estrogenov (estron (E1), 17 β -estradiol (E2), estriol (E3) in 17 α -etinilestradiol (EE2)) v okoljsko relevantnih koncentracijah (0-50 ng/L). Po dodatku standardov smo vzorce 30 minut stresali, nato pa po 10 mL vsakega vzorca shranili v zamrzovalniku (T=-20 °C). Preostanek, 200 mL vzorca, smo

ekstrahirali na trdem nosilcu (SPE). Po ekstrakciji smo preiskovane spojine eluirali z etil acetatom. Vzorce odpadne vode smo zaradi prisotnosti nečistoč dodatno čistili na silikagelski koloni. Neekstrahirane vzorce in njihove ujemajoče ekstrakte smo hkrati testirali z ER-Calux[®] testom in primerjali rezultate.

1.2 ER-Calux[®] test

ER-Calux[®] test je *in vitro* test za zaznavanje estrogenega potenciala v vzorcih. Temelji na celični liniji T47D-EREtata-Luc, ki je posebej občutljiva za zaznavanje spojin, ki se vežejo na estrogenski receptor.

Test izvedemo tako, da celice pripravimo na plošči s 96 luknjicami, ki jih po 48 urah rasti izpostavimo vzorcem, ki jih želimo testirati. Vzorec (ekstrakt) razredčimo (1:1, 1:3, 1:10, 1:30, 1:100) in ga primešamo rastnemu mediju tako, da je koncentracija topila 0,1 %. Na isto ploščo vključimo tudi umeritveno krivuljo s standardnimi koncentracijami 17 β -estradiola (0,6-30 pM), ki služijo za kasnejšo kvantifikacijo estrogenosti v vzorcu.

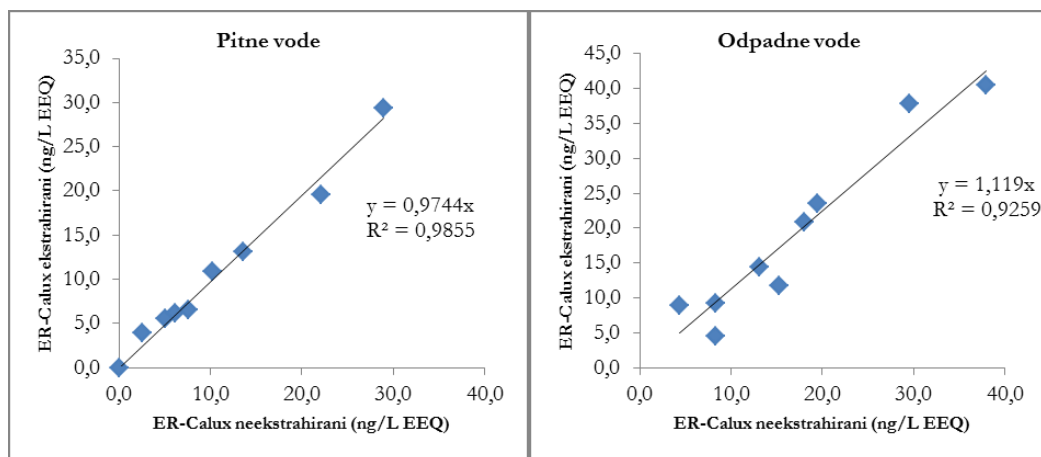
Za testiranje neekstrahiranih vzorcev pripravimo celice na enak način kot za ekstrahirane vzorce. Postopka se razlikujeta v načinu izpostavitve vzorca, saj v tem primeru celice izpostavimo vzorcu, ki je v razmerju 1:5 dodan rastnemu mediju. Vzorec pred uporabo steriliziramo z ANOTOP filtrom (velikost por 0,2 μ m). Tudi v tem primeru vključimo umeritveno krivuljo, ki je pripravljena v testnem mediju razredčenem s PBS (1:5).

Po 24 urah izpostavitve celicam dodamo SteadyLite plus[®] luminiscenčni kit. Ta celice lizira in sprosti luciferazo, ki je nastala kot posledica vezave spojin na estrogenske receptorje. Luciferaza povzroči nastanek luminiscence, ki jo izmerimo z luminimetrom. Intenziteta luminiscence je sorazmerna z estrogenostjo vzorca.

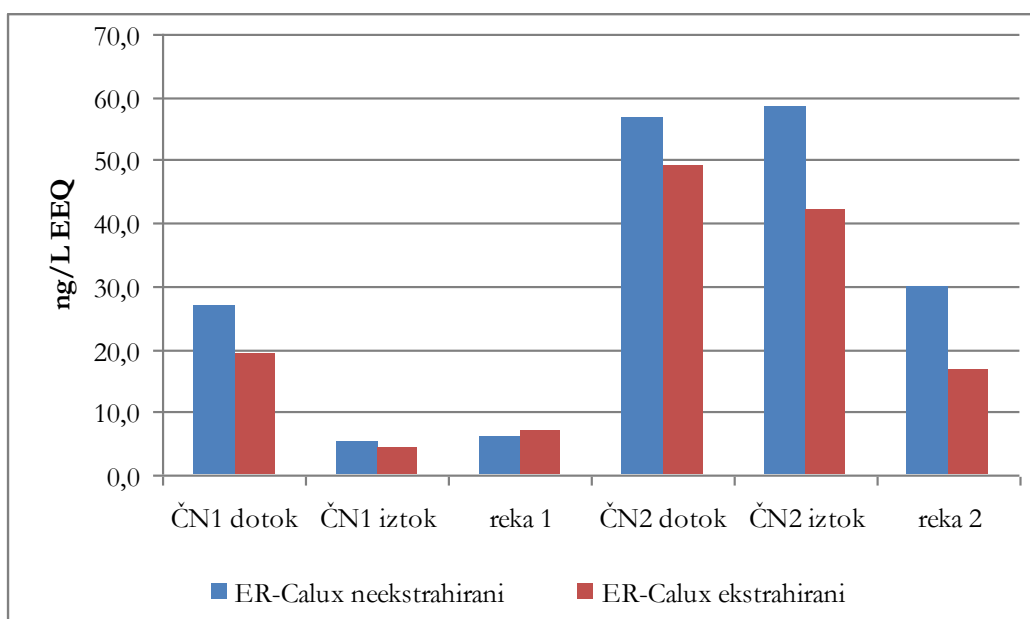
3 Rezultati in diskusija

Hitro in učinkovito zaznavanje prisotnosti steroidnih estrogenov je ključno pri oceni tveganja zaradi prisotnosti teh spojin v okoljskih vzorcih. V okviru naše raziskave smo razvili postopek, s katerim lahko estrogenost vzorcev določamo brez predhodne ekstrakcije in se tako izognemo zamudni pripravi vzorcev. Po naših

podatkih smo prvi laboratorij, ki je je uspešno razvil in optimiziral tovrsten postopek.



Slika 1: Primerjava rezultatov ekstrahiranih in neekstrahiranih vzorcev pitne in odpadne vode z dodanimi standardi



Slika 2: Primerjava rezultatov ekstrahiranih in neekstrahiranih vzorcev dotokov in iztokov z dveh komunalnih čistilnih naprav ter rek, v katere se iztoka izlivata.

Preverjanje delovanja postopka in njegovo optimizacijo smo izvedli na vzorcih pitne in odpadne vode z dodanimi znanimi količinami steroidnih estrogenov (0-50 ng/L). Rezultati (Slika 1) kažejo, da so vrednosti estradiolskih ekvivalentov (EEQ)

v ekstrahiranih in neekstrahiranih vzorcih medsebojno primerljive, saj se tako v primeru pitne, kot tudi odpadne vode, rezultati dobro ujemajo ($r^2 > 0,90$).

Pri obeh uporabljenih metodah je faktor redčenja enak, zato pri postopku brez ekstrakcije ohranimo občutljivost testa in posledično dosegamo dovolj nizke meje zaznave (LOD) in kvantifikacije (LOQ) za proučevanje prisotnosti estrogenov v okoljskih vzorcih.

Optimizirano metodo smo preizkusili na realnih rečnih in odpadnih vodah (Slika 2). Rezultati kažejo, da se določene vrednosti estrogenosti (estradiolskih ekvivalentov - EEQ) medsebojno ujemajo, kar potrjuje uporabnost metode za izvajanje presejalnih testov in nadzornih meritev.

Rezultati testiranja vzorcev brez predhodne ekstrakcije so primerljivi z običajno metodo, kjer je potrebno vzorce predhodno ekstrahirati. Prednost in uporabnost postopka je predvsem v tem, da hitreje pridemo do želenih rezultatov, kar omogoča hitre presejalne teste in izvajanje nadzornih meritev ter istočasno prihrani tudi porabljen material.

4 Literatura

- [1] G. D'Ascenzo, A. Di Corcia, A. Gentili, R. Mancini, R. Mastropasqua, M. Nazzari, R. Samperi. Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. *The Science of The Total Environment*, 302: 199-209, 2003
- [2] J.P. Sumpter, S. Jobling. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives*, 103: 173-178, 1995
- [3] C. Miège, J.M. Choubert, L. Ribeiro, M. Eusèbe, M. Coquery. Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants - Conception of a database and first results. *Environmental Pollution*, 157: 1721-1726, 2009
- [4] V. Gabet, C. Miège, P. Bados, M. Coquery. Analysis of estrogens in environmental matrices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26: 1113-1131, 2007
- [5] C.G. Campbell, S.E. Borglin, F.B. Green, A. Grayson, E. Wozel, W.T. Stringfellow. Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: A review. *Chemosphere*, 65: 1265-1280, 2006
- [6] J. Legler, C. van den Brink, A. Brouwer, A. Murk, P. van der Saag, A. Vethaak, B. van der Burg. Development of a stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line. *Toxicological Sciences*, 48: 55-66, 1999

Za širši interes

V Skupini za organsko analizo Odseka za znanosti o okolju se ukvarjamo z raziskovanjem prisotnosti organskih onesnažil (npr. zdravila in hormoni) v okoljskih vzorcih. Proučujemo njihov izvor (kje nastanejo), kroženje (kako potujejo) in vpliv na ekosistem (kakšen je njihov dejanski učinek). Zgoraj opisana študija je del širšega projekta (v sodelovanju z Nacionalnim inštitutom za biologijo), ki proučuje steroidne estrogene (hormone) in druge spojine, ki povzročajo motnje človeškega in živalskega hormonskega sistema. Steroidni estrogeni so pogosto prisotni v odpadnih vodah komunalnih čistilnih naprav in v površinskih vodah, kamor se odpadne vode iztekajo. Čeprav so naravnega izvora, njihova prisotnost v okolju povzroča negativne učinke na živih organizmih (motnje v rasti in razvoju osebkov). Cilj te študije je razviti metodo, ki bo omogočala hitro zaznavanje teh spojin v okolju in zagotavljala učinkovito proučevanje njihove (negativne) vloge v ekosistemu. Ker so koncentracije steroidnih estrogenov v vzorcih zelo majhne (ng/L) je potrebno spojine v vzorcih koncentrirati z zamudnimi postopki. V naši študiji smo uporabili ER-Calux[®] test, ki smo ga prilagodili tako, da omogoča neposredno testiranje vzorcev, brez predhodne obdelave, pri čemer postopek skrajšamo iz nekaj ur na nekaj minut. Hkrati ohranimo zmožnost zaznavanja dovolj nizkih koncentracij, ki so običajne v okoljskih vzorcih. Ta test omogoča izvedbo hitrih presejalnih testov in posledično hitrejšo in cenejšo oceno tveganja, ki ga povzročajo estroidni estrogene v okolju.