

Barbara Kołwzan, Teodora M. Traczewska

Występowanie zanieczyszczeń o właściwościach mutagennych i rakotwórczych w wodzie rzeki Oławy

Przemysł oraz chemizacja rolnictwa są głównymi źródłami zanieczyszczenia środowiska wodnego. Najbardziej groźne dla zdrowia są te zanieczyszczenia chemiczne wody do picia, które po wniknięciu do organizmu, nawet w niskich dawkach, mogą już spowodować wyraźne skutki zdrowotne. Do takich zanieczyszczeń należą m.in. chemiczne mutageny, to jest wielopierścieniowe węglowodory aro-

matyczne, polichlorowane węglowodory, w tym niektóre pestycydy, metale ciężkie (Cr, Cd, As, Ni, Pb) oraz ich związki itd. Ingerują one w materiał genetyczny komórek, dokonując w nim trwałych zmian i stąd w wielu przypadkach mogą stać się przyczyną procesu nowotworowego.

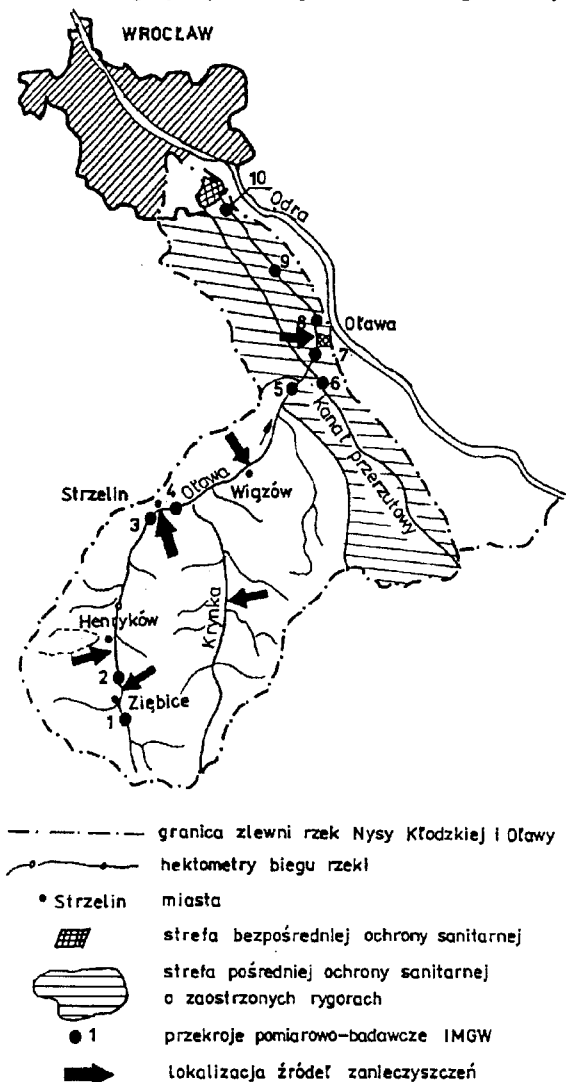
Wykrywanie i identyfikowanie obecnych w wodzie poszczególnych związków chemicznych metodami analitycznymi jest z wielu względów niecelowe, a nawet niemożliwe. Duża różnorodność związków chemicznych obecnych w środowisku naturalnym, stale zachodzące w nim przemiany (np. pod wpływem drobnoustrojów, światła itp.) oraz występowanie mikrozanieczyszczeń w ilościach często śladowych, stwarzają dla tego typu badań bardzo poważne ograniczenia. Nie dają one też informacji o biologicznej aktywności danego związku, o synergistycznym bądź antagonistycznym działaniu innych, towarzyszących substancji itd. Lukę tę mogą wypełnić badania bioindykacyjne, polegające na obserwacji skutków biologicznych u organizmów testowych (bakterie, hodowle tkankowe, zwierzęta doświadczalne). Wyniki tych badań mogą zatem informować o szkodliwości składników badanej próby dla roślin, zwierząt lub człowieka.

Szczególne znaczenie dla oceny zagrożenia zdrowia człowieka mają metody bioindykacyjne, umożliwiające wykrywanie obecności substancji chemicznych o charakterze mutagennym i rakotwórczym [5]. Dla badań masowych, jakie trzeba stosować podczas określania stanu zanieczyszczenia środowiska naturalnego oraz podjęcia szybkich działań profilaktycznych, najbardziej przydatny jest test Ames, który zastosowano w niniejszych badaniach. Jego nadzwyczajna zgodność z testami wykonanymi na komórkach hodowanych *in vitro* i na zwierzętach, wynosząca około 90 %, daje gwarancje uzyskania prawidłowych wyników w bardzo krótkim czasie. Obok innych korzyści, jest on ogólnie w świecie uznany i stosowany. Dlatego powinien też znaleźć zastosowanie w monitorowaniu środowiska, ustalaniu źródeł emisji zanieczyszczeń szczególnie szkodliwych dla zdrowia, weryfikacji norm dotyczących granic dopuszczalnych stężeń niektórych związków chemicznych w środowisku, przy tworzeniu nowych przepisów prawnych w tym zakresie itp.

Materiał i metody

Materiał do badań bioindykacyjnych stanowiła woda z rzeki Oławy (stanowiska 1÷5 i 7÷10) oraz woda z kanału przerzutowego z Nysy Kłodzkiej do Oławy (stan. 6), z której wydzielono frakcje mineralne i organiczne jej zanieczyszczeń (rys. 1).

Frakcję organiczną zanieczyszczeń wody separowano z 10 dm³ wody na żywicę Amberlite XAD-2, natomiast frakcję nieorganiczną stanowiła spopielenona w temperaturze 450 °C i rozpuszczona sucha pozostałość, uzyskana po odparowaniu 10 dm³ wody. Do badań zastosowano następujące mutanty żywieniowe (his-) bakterii *Sal-*



Rys. 1. Usytuowanie stanowisk badawczych wzdłuż biegu Oławy

Tabela 1. Szczepy bakterii stosowane w testach Amesa

Nazwa gatunkowa	Cechy charakterystyczne
<i>Salmonella typhimurium</i> TA97a	his- (his D 6610 mutation), rfa, ΔuvrB, +R
<i>Salmonella typhimurium</i> TA98	his- (his D 3052 mutation), rfa, ΔuvrB, + R
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100	his- (his G 46 mutation), rfa, ΔuvrB, + R

monella typhimurium LT₂: TA97a, TA98 i TA100. Charakterystykę genetyczną szczepów uzyskanych z Ames Laboratory (Department of Biochemistry, University of California, USA) podano w tabeli 1.

W wyniku działania substancji o właściwościach mutagennych u drobnoustrojów tych zachodzi rewersja mutacji objawiająca się uniezależnieniem szczepów od obecności histydy w podłożu hodowlanym. Przed przystąpieniem do badań sprawdzono markery genetyczne szczepów testowych. W celu odtworzenia przemian promutagenów w mutageny zachodzących w organizmie człowieka, frakcję organiczną wody poddano działaniu enzymów frakcji mikrosomalnej wątroby szczurów (frakcja S-9). Każdą serię testów poprzedzono wykonaniem kontroli pozytywnej, którą stanowiły 100-procentowe mutageny: daunomycyna, mitomycyna C i amino-

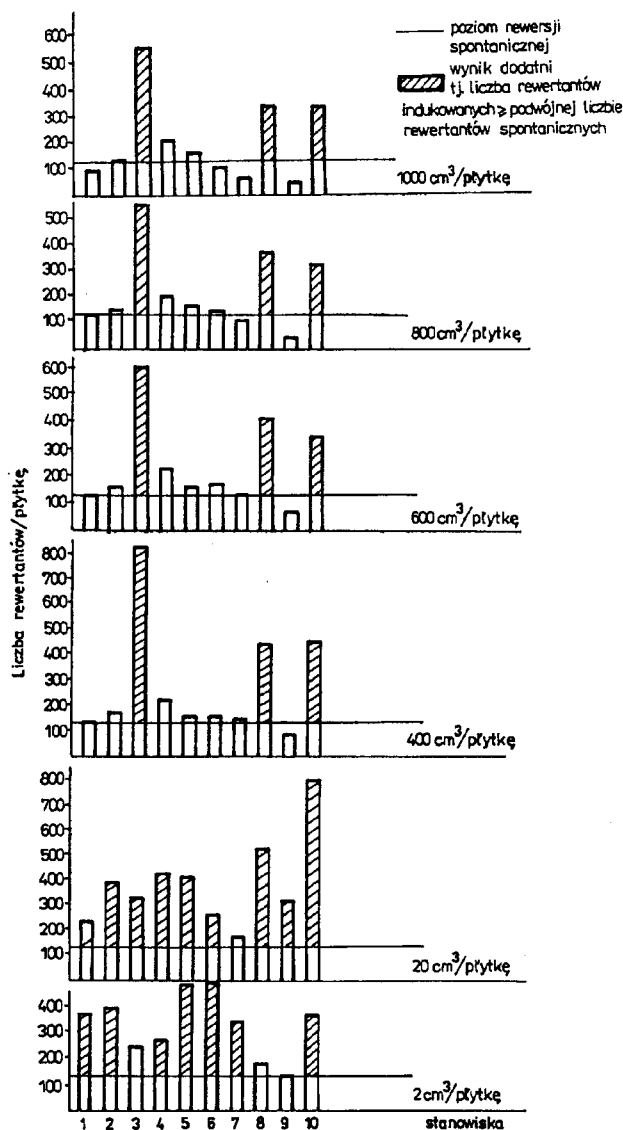
fluoren, oraz kontroli negatywnej, którą stanowiły rozpuszczalniki stosowane do badań (zneutralizowany 0,1 n HNO₃ dla frakcji nieorganicznej lub DMSO dla frakcji organicznej).

Badania bioindykacyjne prowadzono zgodnie z metodyką zalecaną przez Ames [2], wprowadzając modyfikację dla próby nieorganicznej, polegającą na zastosowaniu 20-minutowej preinkubacji bakterii testowych w obecności badanych zanieczyszczeń.

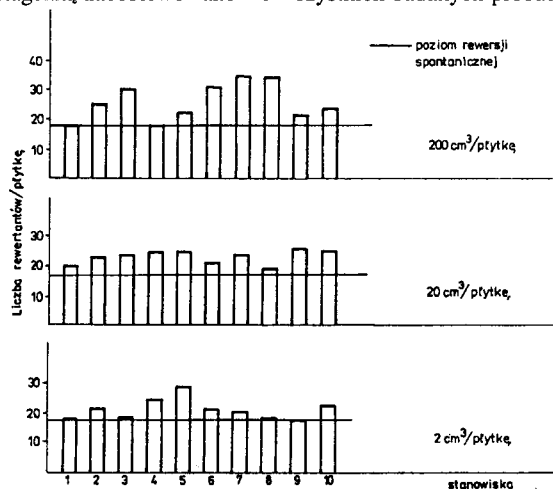
Wyniki badań

Próby wody poddane badaniom bioindykacyjnym przygotowano tak, aby frakcje organiczna i nieorganiczna zawierały możliwie szerokie spektrum zateżonych zanieczyszczeń. Zanieczyszczenia nieorganiczne wprowadzano do testów Amesa w postaci roztworów wodnych, a zanieczyszczenia organiczne były rozpuszczone w DMSO. Roztwory wodne zawierały zanieczyszczenia nieorganiczne pochodzące odpowiednio z 2, 20, 400, 600, 800, 1.000 cm³ wody, natomiast roztwory DMSO zawierały zanieczyszczenia organiczne z 3, 30, 300, 600, 900, 1.200 i 1.500 cm³ wody. Testowaniu poddano wodę powierzchniową pochodzącą z 10 stanowisk badawczych usytuowanych wzdłuż Oławy (rys. 1). Wyniki analiz zamieszczono na rysunkach 2-5, które przedstawiają liczbę rewertantów odpowiedniego szczepu *Salmonella typhimurium*, powstałych na skutek wprowadzenia do testu prób pochodzących z poszczególnych stanowisk badawczych. Wody dobrej jakości, pomimo wprowadzenia do testu najbardziej zateżonej próby, nie powinny powodować wzrostu liczby rewertantów powyżej rewersji spontanicznej.

W teście Amesa za wynik dodatni, a więc wskazujący na mutagenne właściwości próby, przyjmuje się taką liczbę rewertantów indukowanych, która jest co najmniej dwukrotnie wyższa od liczby rewertantów spontanicznych. Dla wszystkich wytypowanych stanowisk badawczych stwierdzono występowanie w wodzie z rzeki Oławy zanieczyszczeń o właściwościach mutagennych. Dotyczy to głównie frakcji nieorganicznej (tab.2, rys.2 i 3), gdyż aktywność mutageną zaobserwowano we wszystkich badanych próbach po



Rys. 2. Wpływ frakcji nieorganicznej domieszek wody na liczbę rewertantów szczepu *Salmonella typhimurium* TA97a



Rys. 3. Wpływ frakcji nieorganicznej domieszek wody na liczbę rewertantów szczepu *Salmonella typhimurium* TA98

Tabela 2. Miano mutagenności wody oznaczone dla prób z poszczególnych stanowisk badawczych (najmniejsza objętość wody wywołująca dodatni wynik testu, cm^3)

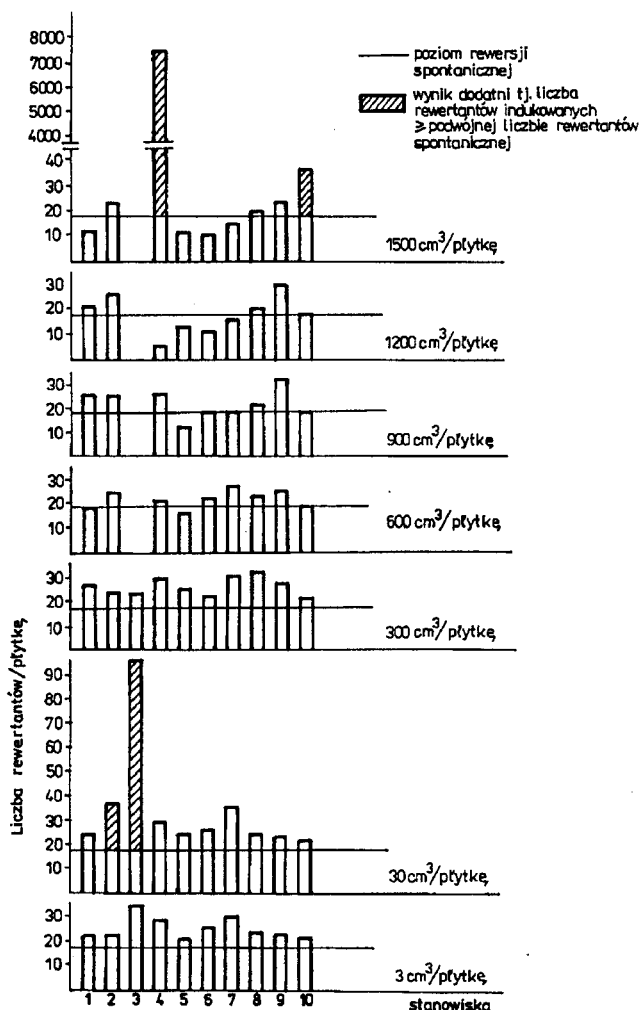
Fracja	Numer stanowiska badawczego									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Organiczna	nw	30	30 (t)	1.500	nw (t)	nw (t)	nw (t)	nw	nw	1.500
Nieorganiczna	2	2	>20	2	2	2	2	>20	20	>2

nw – nie wykryto w najmniejszej badanej objętości próbki wody; (t) – próba działająca toksycznie na bakterie testowe

wprowadzeniu do testu wody zatężonej 20 i 200 razy, tj. odpowiednio 2 i 20 cm^3 wody na płytkę (tab.2).

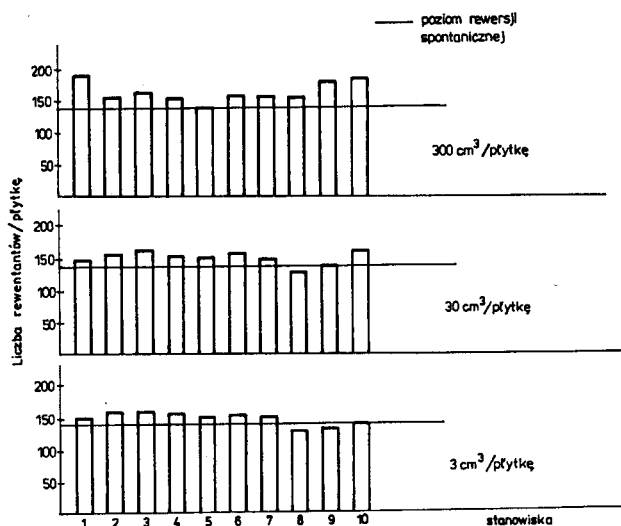
Przyczyną takiego stanu było prawdopodobnie występowanie w wodzie (w grupie zanieczyszczeń nieorganicznych) metali ciężkich, takich jak chrom, nikiel, kadm, ołów i rtęć. Wprawdzie analiza ilościowa wybranych metali (poza kadmem) nie wskazywała na przekroczenie dopuszczalnych norm [3], to jednak nie uwzględniała ona wszystkich pierwiastków oraz ich wzajemnych oddziaływań.

Fracja organiczna zanieczyszczeń wody wykazała aktywność mutageną w próbach ze stanowisk 2+4 i 10 (tab.2, rys.4 i 5). Woda pochodząca ze stanowisk 2 i 3, zatężona 300 razy (tj. 30 cm^3 wody na płytkę, tab.2), wywoływała co najmniej dwukrotnie wyższą od spontanicznej rewersję do prototrofii szczepów testowych. Z kolei wynik dodatni dla prób ze stanowisk 4 i 10 dotyczył zanieczyszczeń zawartych w znacznie większej objętości wody (1.500 cm^3 zatężone

Rys. 4. Wpływ frakcji organicznej domieszek wody na liczbę rewertantów szczepu *Salmonella typhimurium* TA98

do $0,5 \text{ cm}^3$ na płytkę, tab.2). Niektóre z badanych prób frakcji organicznej odznaczały się toksycznym oddziaływaniem na komórki bakterii, co objawiało się ograniczeniem ich liczebności (stan. 5+8), a w niektórych przypadkach całkowitym zahamowaniem ich wzrostu (stan. 3 i 5+7). Prawdopodobnie frakcja organiczna zawierała węglowodory, w tym głównie aromatyczne oraz pestycydy, z których wiele ma właściwości mutagenne i rakotwórcze [6], a nie wykazują właściwości cytotoksycznych.

Oznaczenie w analizach chemicznych zawartości niektórych pestycydów nie dało pełnego obrazu stanu zanieczyszczenia organicznego badanej wody [3]. Stąd też przeprowadzone badania wskazują na możliwość zastosowania w tym celu metod bioindy-

Rys. 5. Wpływ frakcji organicznej domieszek wody na liczbę rewertantów szczepu *Salmonella typhimurium* TA100

kacyjnych, pozwalających na szybką ocenę aktywności biologicznej frakcji nieorganicznej i organicznej zanieczyszczeń wody [1,4]. Na tej podstawie można ustalić punkty zrzutu ścieków czy też odcinki rzeki najbardziej zanieczyszczone niebezpiecznymi dla zdrowia substancjami chemicznymi.

Wnioski

- ♦ Woda z rzeki Oławy na wszystkich badanych stanowiskach zawierała zanieczyszczenia o potencjalnych właściwościach mutagennych, przy czym aktywność mutageną wykryto głównie w obrębie składników frakcji mineralnej.

- ♦ Wyniki testu Amesa wskazują, że zaliczanie wody do określonych klas czystości jedynie na podstawie składu fizyczno-chemicznego i bakteriologicznego jest obarczone błędem polegającym na pominięciu istotnych cech jakości wody, co ma szczególne znaczenie w przypadku Oławy, której wody stanowią źródło dla zaopatrzenia Wrocławia w wodę do picia i na potrzeby gospodarcze.

LITERATURA

1. B. KOŁWZAN, T. TRACZEWSKA, M. PAWLACZYK-SZIPIŁOWA: Występowanie związków mutagennych i rakotwórczych w wodzie ujmowanej i przeznaczonej do picia dla mieszkańców miasta Wrocławia. Mat. symp. „Aspekty higieniczno-zdrowotne ochrony i kształtowania środowiska”. PTH, Warszawa 1992, ss. 149-154.
2. D.M. MARON, B.N. AMES: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. Mutation Research, 1983, No. 113, pp. 173-215.
3. R.A. KOROL: Aktualny stan czystości wód powierzchniowych. Mat. konf. „Ochrona Zlewni Oławy i Nysy Kłodzkiej”, Wydz. Ochr. Środow. UW, IOŚ, WIOŚ, Wrocław 1992, ss. 34-42.
4. D. MIELŻYŃSKA: Zastosowanie testu biologicznego Ames do oceny jakości wód powierzchniowych. Mat. symp. Polskiego Komitetu ds. IAWPRC, Warszawa 1985.
5. M. PAWLACZYK-SZIPIŁOWA: Bioindykacyjne metody oceny stanu skażenia wody niektórymi związkami szkodliwymi dla zdrowia. Ochrona Środowiska, 1985, nr 4(26), ss. 3-6.
6. T. TRACZEWSKA: Ocena metodą Ames mutagenności i rakotwórczego działania wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w wodach naturalnych. Bromat. Chemia Toksyk., 1991, tom XXIV, nr 2, ss. 157-161.

Mutagenic and Carcinogenic Pollutants in the Oława River Water

The utility of biomonitoring in assessing the degree of river water contamination by mutagenic and carcinogenic pollutants was examined. Bioindication was carried out by Ames test. The organic and inorganic fraction of the water pollutants was isolated. It was found that, of the river pollutants examined, inorganic components showed the highest potentiality for health implications – their mutagenic activity was detected in all investigated

samples ranging in volume between 2 and 20 dm³. Organic pollutants creating health hazards were determined at some of the measuring sites. This finding is of importance as the river water is taken in for municipal supply (for the city of Wrocław). The investigations corroborated the utility of the Ames test as screening for the assessment of potential mutagenic and carcinogenic implications (which is part of biomonitoring).