

Barbara Kołwzan

BADANIA NAD BIOINDYKACJĄ METALI CIĘŻKICH O WŁAŚCIWOŚCIACH MUTAGENNYCH I RAKOTWÓRCZYCH W WODACH POWIERZCHNIOWYCH

Szczególne zagrożenie środowiska naturalnego stanowią substancje o właściwościach mutagennych i rakotwórczych. Należą do nich m. in. chrom, nikiel, kadm i arsen, a także beryl, kobalt, żelazo, ołów, tytan i cynk, których działanie karcinogenne zostało udowodnione na zwierzętach eksperymentalnych [2, 7]. W ostatnich latach zajęto się zagadnieniem bioindykacji tego typu zanieczyszczeń, przy czym wśród stosowanych metod zdecydowaną większość stanowią testy wykrywające wszelkiego rodzaju mutacje [3, 6]. Uzasadnieniem tego jest wysoka korelacja pomiędzy aktywnością mutagenną a karcinogenną związków chemicznych [2]. Najprostszym obiektem do badań mutagenyzy, ze względu na fakt szybkiej reprodukcji i możliwość otrzymania w krótkim czasie wyników badań, są bakterie.

Przedstawiona praca jest próbą zastosowania testu Amesa oraz testu reperacyjnego do wykrywania obecności metali ciężkich o właściwościach mutagennych i rakotwórczych w wodach powierzchniowych.

Materiały i metodyka badawcza

Oceny potencjalnych właściwości mutagennych i rakotwórczych badanych preparatów dokonano metodą Amesa [1] oraz metodą testu reperacyjnego wg Kanematsu [4]. W metodzie Amesa zastosowano specjalnie uwrażliwione mutanty szczepu *Salmonella typhimurium* LT₂. Szczepy te są mutantami żywieniowymi, niezdolnymi do syntezy histydyny, lecz w obecności substancji o aktywności mutagennej tracą tę cechę; następuje rewersja do prototrofii i zostaje przywrócona ich zdolność do syntezy histydyny. Test wykonano zgodnie ze schematem podanym na rysunku 1.

Zasada testu reperacyjnego polega na porównaniu wzrostu dwóch szczepów testowych: *Bacillus subtilis* H17(Rec⁺) i *Bacillus subtilis* M45(Rec⁻). Pierwszy z wymienionych jest szczepem dzikim, natomiast drugi został pozbawiony systemu poreplikacyjnej naprawy DNA. Obserwacja letalnego działania badanego preparatu na szczep M45, świadczy o jego właściwościach mutagennych.

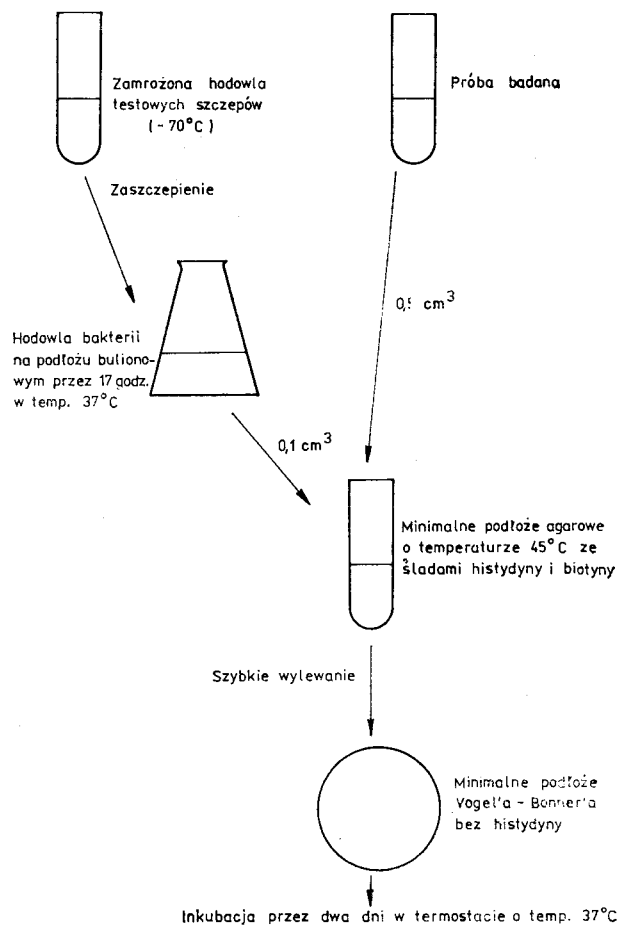
Każdej serii badawczej towarzyszyło sprawdzenie markerów genetycznych szczepów testowych oraz określenie ich wrażliwości na mutageny diagnostyczne.

Materiał do badań stanowiła woda powierzchniowa i nadosadowa z rzeki Oławy, pobrana w pobliżu ujęcia wody dla Wrocławia, a także wyciąg wodny z gleby przybrzeżnej i pył żużla pochromowego. Żużel pochromowy pochodził z hałdy Huty „Siechnice”, znajdującej się w pobliżu terenów ujęć wodociągowych dla Wrocławia.

Próby do badań bioindykacyjnych przygotowywano w następujący sposób:

— Próby wody rzecznej odparowywano, po czym mineralizowano w temperaturze 450°C przez 6 godzin, a następnie rozpuszczano w sterylnej wodzie redestylowanej. Otrzymany roztwór wprowadzano w ilości 0,1 cm³ na płytkę Petriego, co odpowiadało 4 cm³ wody rzecznej.

— Wyciąg glebowy sporządzoną wytrząsając glebę z wodą redestylowaną w stosunku masowym 1:2 przez 24 godziny, a następnie odparowywano i mineralizowano jw.



Rys. 1. Schemat testu Amesa

Po rozpuszczeniu osadu w sterylnej wodzie redestylowanej, próbę wprowadzano do testu w ilości 0,1 cm³ na płytkę, co dopowiadało 1 cm³ wyciągu glebowego.
— Pył żużla pochromowego sterylizowano i wprowadzano bezpośrednio do testu.

Wyniki badań

Jak wykazały wcześniejsze analizy fizyczno-chemiczne, wody rzeki Oławy są w znacznym stopniu skażone metalami ciężkimi [5]. Zazwy-

czaj nie udaje się jednak oznaczyć zawartości w wodzie wszystkich metali ciężkich, posiadających potencjalne właściwości mutagenne i rakotwórcze. Dlatego też metody bioindykacyjne okazały się dużo prostszym i szybszym sposobem ich wykrywania, uwzględniającym ponadto wzajemne synergistyczne bądź antagonistyczne działanie tych zanieczyszczeń.

Wyniki badań bioindykacyjnych prowadzonych metodą Amesa na wodzie z rzeki Oławy umieszczono w tabeli 1 (wartość rewersi szczepów

WYNIKI TESTU AMESA DLA PRÓB WODY Z RZEKI OŁAWY

Tabela 1

Numer szczepu	Rewersja spontaniczna	Wartość rewersi szczepów testowych			
		woda nadosadowa (pr. nr 1)	woda powierzchniowa (pr. nr 2)	woda nadosadowa (pr. nr 3)	woda powierzchniowa (pr. nr 4)
97a	64,2 ± 5,	58,8 ± 4,7	55,2 ± 3,2	28,4 ± 7,2	39,2 ± 2,1
98	55,0 ± 2,4	64,8 ± 5,2	35,6 ± 4,1	53,2 ± 5,9	44,2 ± 1,8
100	11,4 ± 1,8	39,0 ± 3,5	81,0 ± 5,3	38,2 ± 2,8	10,0 ± 0,2
102	110,1 ± 10,2	225,5 ± 10,7	198,0 ± 9,7	237,0 ± 31,2	205,0 ± 12,3
104	253,0 ± 27,1	316,0 ± 18,5	344,1 ± 12,8	288,8 ± 34,8	153,0 ± 14,5
1537	10,1 ± 1,2	21,5 ± 1,9	19,3 ± 2,7	29,8 ± 1,2	20,5 ± 1,7
1538	19,8 ± 2,1	35,5 ± 2,8	47,0 ± 6,3	21,2 ± 3,5	25,2 ± 0,9

WYNIKI TESTU REPERACYJNEGO

Tabela 2

Badany związek	Ilość naniesionego na krążek materiału w cm ²	Strefa zahamowania wzrostu mm		Różnica mm	Wynik
		H17 (Rec)	M45 (Rec)		
K ₂ Cr ₂ O ₇					
Kontrola pozytywna	0,05	6	23	17	++
Woda redestylowana	0,10	0	1	1	—
kontrola negatywna	0,05	2	2	0	—
Woda nadosadowa (pr. nr 1)	0,05	0	2	2	—
	0,10	0	4	4	+
Woda powierzchniowa (pr. nr 2)	0,05	0	2	2	—
	0,10	0	5	5	+
Woda nadosadowa (pr. nr 3)	0,05	0	1	1	—
	0,10	5	5	0	—a
Woda powierzchniowa (pr. nr 4)	0,05	0	1	1	—
	0,10	0	5	5	+
Woda powierzchniowa (pr. nr 5)	0,05	0	2	2	—
	0,10	0	5	5	+
Wyciąg glebowy	0,05	0	0	0	—
	0,10	0	5	5	+
Pył żużla pochromowego (w gramach)	0,05	3	5	2	—
	0,10	7	11	4	+a

++ strefa zahamowania większa od 6 mm
+ strefa zahamowania większa od 4 mm, mniejsza niż 6 mm
— strefa zahamowania mniejsza od 4 mm
a próbka toksyczna dla bakterii

testowych jest średnią z pięciu odczytów). Przyjęto, że o właściwościach mutagennych i rakotwórczych próby świadczył co najmniej dwukrotny wzrost rewersi jednego ze szczepów testowych, w stosunku do rewersi spontanicznej.

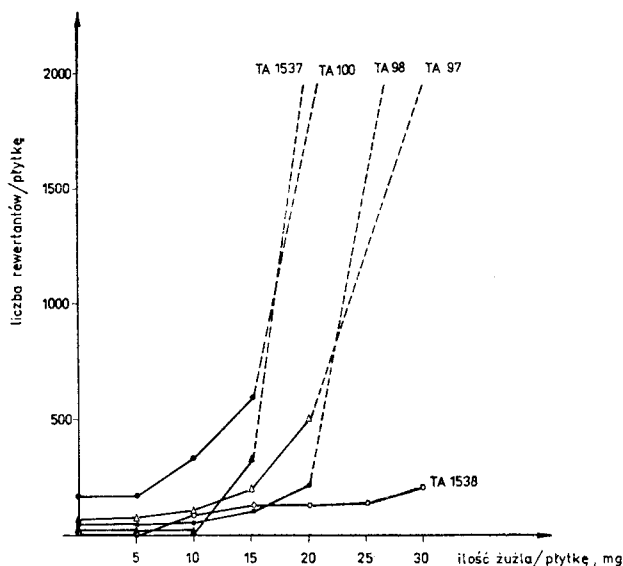
Wszystkie próby wody z rzeki Oławy wykazały potencjalne właściwości mutagenne i rakotwórcze. Woda nadosadowa (pr. 1, 3) powodowała wzrost rewersi aż trzech szczepów testowych *Salmonella typhimurium*: TA 100, TA 102, TA 1537. Woda powierzchniowa zwiększała ilość mutacji powrotnych szczepu *Salmonella typhimurium* TA 100, TA 1538 (pr. 2) oraz TA 1537 (pr. 4). Badania wykazały, że szczepy testowe są wrażliwe na występujące w tych próbach zanieczyszczenia i mogą być stosowane do ich bioindykacji.

Potwierdzenie tych spostrzeżeń uzyskano w wynikach testu reperacyjnego (tab. 2). Zahamowanie wzrostu szczepu testowego *Bacillus subtilis* M45 powodowało wprowadzenie do testu prób wody nr 1, 2 i 4, co świadczy o ich mutagennych właściwościach. Próba nr 3 okazała się toksyczna, hamowała bowiem wzrost obu szczepów testowych.

WYNIKI TESTU AMESA DLA PRÓB WODY Z RZEKI OŁAWY, WYCIĄGU GLEBOWEGO I ŻUŻLA POCHROMOWEGO

Tabela 3

Numer szczepu	Rewersja spontaniczna	Wartość rewersi szczepów testowych				
		K ₂ Cr ₂ O ₇ kontrola pozytywna	woda redestylowana kontrola negatywna	wyciąg glebowy	woda z Oławy (pr. nr 5)	pył żużla pochromowego 15 mg/płytkę
97a	96,0 ± 3,2	192,1 ± 5,6	102,1 ± 2,8	120,1 ± 2,5	116,6 ± 2,0	321,3 ± 4,9
98	15,2 ± 1,8	90,2 ± 4,9	16,5 ± 1,5	190,1 ± 3,1	47,5 ± 4,8	201,3 ± 2,1
100	66,9 ± 2,5	287,3 ± 6,6	72,1 ± 2,3	103,3 ± 1,8	230,0 ± 3,9	397,0 ± 3,9
102	107,7 ± 4,1	204,5 ± 6,8	112,1 ± 6,5	240,1 ± 2,7	225,6 ± 3,6	230,0 ± 12,5
104	430,1 ± 12,5	782,1 ± 7,2	415,3 ± 8,9	72,6 ± 1,7	270,1 ± 4,9	527,0 ± 10,8
1537	9,3 ± 0,8	18,2 ± 0,5	10,8 ± 0,5	20,6 ± 0,9	46,1 ± 2,7	760,5 ± 32,9
1538	28,5 ± 2,1	84,3 ± 1,9	31,5 ± 1,8	42,1 ± 2,8	302,6 ± 30,8	349,8 ± 41,5



Rys. 2 Wpływ ilości żużla pochromowego na liczbę rewertantów szczepów testowych *Salmonella typhimurium*

Dalsze badania dotyczyły ustalenia ewentualnych źródeł zanieczyszczenia rzeki substancjami mutagennymi i rakotwórczymi. Ustalono, że na terenach wodonośnych część zanieczyszczeń może przedostawać się do rzeki na drodze opadu pyłu oraz spływów powierzchniowych. Badaniom bioindykacyjnym poddano zatem próbki żużla pochromowego oraz wyciąg z gleby przybrzeżnej. Stwierdzono, że żużel pochromowy posiada dużą aktywność mutageną. Wymagany wzrost rewersji szczepów testowych uzyskano już po wprowadzeniu na płytkę 15 mg żużla (tab. 3), przy czym wzrost liczby rewertantów zależał od ilości żużla pochromowego na płytce (rys. 2). Potencjalne właściwości mutagenne posiadały także pobrane w tym samym czasie próby wody rzecznej i wyciągu glebowego. Otrzymane wyniki zostały potwierdzone testem reperacyjnym.

Podsumowanie

Wyniki badań wskazują na możliwość wykorzystania testu Ames oraz testu reperacyjnego do bioindykacji zanieczyszczeń o charakterze

mutagennym i rakotwórczym, występujących w wodach powierzchniowych. Uwzględniają one nie tylko poziom tych zanieczyszczeń w środowisku, ale także ich wzajemne synergistyczne bądź antagonistyczne oddziaływanie.

Metodą Ames i testem reperacyjnym ustalono, że w wodzie rzeki Oławy występują metale ciężkie o potencjalnych właściwościach mutagennych i rakotwórczych. Jest to szczególnie niebezpieczne z uwagi na fakt ujmowania tych wód do celów wodociągowych. Duże znaczenie dla polepszenia jakości wód miałyby zatem ograniczenie ilości substancji mutagennych wprowadzanych do rzeki na drodze opadu pyłu żużla pochromowego oraz spływów powierzchniowych.

Stwierdza się pilną potrzebę stałej kontroli poziomu zanieczyszczeń o charakterze mutagennym i rakotwórczym w wodach powierzchniowych, ujmowanych na cele wodociągowe, a także w wodzie pitnej. Zakres badań bioindykacyjnych powinien być szeroki i obejmować jak największą ilość zanieczyszczeń przemysłowych.

LITERATURA

1. B. N. AMES, J. McCANN, E. YAMASAKI: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella/mammalian-microsome* mutagenicity test. *Mutation Research*, 1975, 31, 347—364.
2. H. BARTSCH, L. TOMATIS: Comparison between carcinogenicity and mutagenicity based on the IARC monographs. *Environmental Health Perspectives*, 1983, 47, 305—317.
3. M. COSTA: Metal carcinogenesis testine. Principles and in vitro methods. The Humana Press. Inc. Clifton New Jersey, 1981.
4. N. KANEMATSU, M. HARA, T. KADA: Rec assay and mutagenicity studies on metal compounds. *Mutation Research*, 1980, 77, 109—116.
5. B. KOŁWZAN: Wybrane aspekty oddziaływania metali ciężkich na mikroflorę wód powierzchniowych. Rozprawa doktorska. Politechnika Wrocławska, Wrocław 1986.
6. H. NISHIOKA: Mutagenic activities of metal compounds in bacteria. *Mutation Res.*, 1975, 31, 185—189.
7. S. VENITT, L. S. LEVY: Mutagenicity of chromates in bacteria and its relevance to chromate carcinogenesis. *Nature*, 1974, 250, 493—495.

BIOINDICATION OF MUTAGENIC AND CANCEROGENIC HEAVY METALS IN SURFACE WATERS

The Ames test and the *Bacillus subtilis* repair test were used for detecting the presence of mutagenic and cancerogenic substances in surface waters. The investigations have revealed that heavy metals of

a mutagenic and cancerogenic nature are present in the Oława river which is made use of for the needs of municipal water supply. The investigations have also corroborated the utility of the two tests when applied for bioindication of heavy metals. The testing results substantiate the urgent need for continuous monitoring by bioindication of all surface waters that are to be used for municipal supply.