

Teodora M. Traczewska, Barbara Kołwzan, Maria Pawlik

Zastosowanie testów bioindykacyjnych do oceny jakości zdrowotnej wody

Rozwój chemii stanowi jeden z kluczowych elementów rozwoju gospodarczo-społecznego, bowiem – według danych Unii Europejskiej z przełomu lat 70. i 80. – w działalności gospodarczej człowieka stosuje się około 100 tys. związków chemicznych, a corocznie do produkcji i obrotu handlowego trafia od 1,5 do 3 tys. nowych substancji. Zarówno na szczeblu lokalnym jak i globalnym substancje te mogą wywoływać poważne szkody w zdrowiu ludzi i w stanie środowiska, których naprawa jest trudna lub często niemożliwa. W tej sytuacji bardzo istotne jest wdrożenie programu działań minimalizujących stopień narażenia ludności do takiego poziomu, który jest akceptowany w świetle obowiązującej pragmatyki prawnej w dziedzinie ochrony zdrowia.

Ogólnie przyjętą zasadą jest ustalanie standardów dla poszczególnych związków chemicznych. Dane te określone są na podstawie indywidualnych cech toksykologicznych, potwierdzonych w badaniach epidemiologicznych. Kryteria zdrowotne dotyczące zwłaszcza wody do picia, jak również innych środków spożywczych, powinny uwzględniać fakt sumowania się dawek i efektów działania wszystkich substancji pobieranych drogą pokarmową. W tej grupie powinny znajdować się również zanieczyszczenia powstające w procesie uzdatniania wody [1,4]. W ocenie narażenia zdrowia ludzi na zanieczyszczenia środowiskowe często pomija się wodę do picia, a przecież wraz z nią wprowadzane są do organizmu człowieka niebagatelne ilości zanieczyszczeń, gdyż średnie zapotrzebowanie dorosłego człowieka na płyny wynosi dwa litry w ciągu doby. Oddziaływanie zanieczyszczeń obecnych w wodzie należy uzupełnić o ksenobiotyki wnoszone drogą dermalną i oddechową dla związków lotnych z parą wodną [5].

Kompleksowa ocena jakościowa i ilościowa zanieczyszczeń wprowadzanych do organizmu człowieka nie jest możliwa przy zastosowaniu konwencjonalnych metod analitycznych. Taka pełna analiza wymagałaby zastosowania bardzo wysublimowanych metod analitycznych, stąd byłaby bardzo kosztowna i pracochłonna. Dotyczy to przede wszystkim zanieczyszczeń występujących w ilościach śladowych, a mogących inicjować procesy nowotworowe. W dziedzinie mutagenetyki, wydzielonej z genetyki i biologii molekularnej, odgrywającej obecnie dużą rolę w zrozumieniu kancerogenezy, naukowcy wykazali duże zainteresowanie i pomysłowość w adaptowaniu specyficznych systemów biologicznych do śledzenia tego procesu.

Od momentu opracowania przez Bruce'a Amesa testu do wykrywania mutagenów przy użyciu szczepu bakterii *Salmo-*

nella typhimurium [2] zaczęto powszechnie zwracać uwagę na nieumyślną ekspozycję populacji ludzkiej na związki rakotwórcze. Badanie to pozwala otrzymać wyniki w ciągu tygodnia, co przy długotrwałości badań na gryzoniach, a także badań epidemiologicznych, jest dużym udogodnieniem. Materiały Międzynarodowej Komisji ds. Ochrony przed Mutegenami Środowiskowymi (*International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens*) potwierdziły znaczenie testu Amesa jako podstawowego i najczęściej stosowanego modelu do wykrywania potencjalnych mutagenów i kancerogenów [6]. Dlatego też powinien być on wprowadzony do rutynowej analizy narażenia na działanie czynników rakotwórczych, zwłaszcza że od 1991 roku proponowany jest on do badań mutagennego działania zanieczyszczeń wody i ścieków [7].

Celem niniejszej pracy było wykazanie przydatności testu Amesa do szybkiej skринningowej oceny jakości zdrowotnej wody do picia.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiła woda surowa z rzeki Oławy oraz woda po różnych procesach uzdatniania, z której wydzielono mineralną i organiczną frakcję zanieczyszczeń.

Jakość zdrowotna wody uzależniona jest od jej składu fizyczno-chemicznego. Trudnością metodyczną w ocenie stopnia narażenia jest przygotowanie prób do testów krótkoterminowych. Wynika to z konieczności takiego zateżenia prób wody, które nie spowoduje ich wtórnego zanieczyszczenia, bądź nie zmieni postaci chemicznej obecnych w nich substancji. Frakcję organiczną zanieczyszczeń uzyskano poprzez ich zateżenie na żywicach Amberlite XAD2 i XAD7. W celu uzyskania frakcji nieorganicznej próby wody odparowywano, po czym mineralizowano je w temperaturze 450 °C. Maksymalna krotność zateżenia prób wynosiła 3.000 dla frakcji organicznej oraz 1.000 dla frakcji mineralnej.

Ocenę mutagennego i rakotwórczego działania frakcji organicznej i nieorganicznej zanieczyszczeń wód przeprowadzono metodą Amesa [2]. Do badań zastosowano szczep testowy *Salmonella typhimurium* LT₂. We wszystkich przypadkach zastosowano szczep TA 98 oraz zamiennie lub w pełnym zestawie szczep TA 97, TA 100, TA 102 i TA 104. Za wynik pozytywny dla danej próby wody uznano każdy przypadek dodatniego wyniku testu na jednym ze szczepów. Za wynik dodatni uważane jest pojawienie się co najmniej dwukrotnie wyższej od spontanicznej rewersji indukowanej do prototrofii mutagenów żywieniowych *Salmonella typhimurium*. W testach stosowano aktywację metaboliczną ekstraktów poprzez dodanie frakcji mikrosomalnej wątroby szczurów.

Tabela 1. Wpływ aktywacji metabolicznej organicznych zanieczyszczeń wody na rezultaty testów Amesa

Rodzaj próby wody	Testy z frakcją S9		Testy bez frakcji S9	
	wyniki dodatnie	wyniki ujemne	wyniki dodatnie	wyniki ujemne
Surowa	2	9	1	8
Po koagulacji	0	2	0	2
Po napowietrzaniu	0	2	0	2
Chlorowana Cl ₂	1	7	0	8
Chlorowana ClO ₂	1	3	2	4
Ozowana	0	2	0	2
Chlorowana i ozonowana	0	2	0	2
Suma rodzajów testów	4	27	3	28
Suma w zależności od frakcji	31		31	
Ogółem	62			

Tabela 2. Wyniki testu reperacyjnego wykonanego na mineralizatach prób wody

Rodzaj próby wody	Krotność zagęszczenia	Strefa zahamowania wzrostu szczepów mm		Różnica	Wynik
		H17 (Rec ⁺)	M45 (Rec ⁻)		
Surowa	1.000	1	7	6	+
	750	0	5	5	+
	500	0	4	4	+
	250	0	1	1	-
	125	0	0	0	-
	75	0	0	0	-
	50	0	0	0	-
	25	0	0	0	-
Uzdatniona	1.000	0	5	5	+
	750	0	2	2	-
	500	0	0	0	-
	250	0	0	0	-
	125	0	0	0	-
	75	0	0	0	-
	50	0	0	0	-
	25	0	0	0	-

Znane są sugestie, że mutagenne działanie niektórych związków chemicznych może być niewykrywalne metodą Ames. Dlatego też, jako uzupełnienie dla frakcji nieorganicznej, wprowadzono test reperacyjny z zastosowaniem dwóch szczepów testowych *Bacillus subtilis*, tj. H17 (Rec⁺) i M45 (Rec⁻). Pierwszy z nich jest szczepem dzikim, natomiast drugi charakteryzuje się brakiem systemu poreplikacyjnej naprawy DNA. Obserwacja letalnego działania badanego preparatu na szczep M45, które jest wynikiem trwałego uszkodzenia DNA, świadczy o właściwościach mutagennych próby poddawanej analizie. Punkt odniesienia stanowił niezakłócony wzrost szczepu H17. W obu testach każdej serii badawczej towarzyszyło sprawdzenie markerów genetycznych szczepów testowych oraz określenie ich wrażliwości na mutageny diagnostyczne.

Wyniki badań

Przeprowadzone badania dowiodły, że zarówno w surowej wodzie powierzchniowej jak i uzdatnionej występują związki bądź ich metabolity, które mogą wchodzić w interakcje z DNA i wywoływać mutacje [8]. Dotyczy to zarówno frakcji organicznej jak i nieorganicznej zanieczyszczeń wody (tab.1).

Jak widać z sześćdziesięciu dwóch prób frakcji organicznej zanieczyszczeń przebadanych testem Ames, zarówno w surowej wodzie powierzchniowej jak i uzdatnionej występowały związki, których mutagenność ujawniała się po aktywacji metabolicznej. A zatem były to tzw. prokancerogeny, a więc związki, które nabywają właściwości mutagennych pod wpły-

wem przemian zachodzących z udziałem enzymów frakcji mikrosomalnej. Zaledwie cztery badane próby wody dały wyniki dodatnie testu bez zastosowania frakcji mikrosomalnej.

Związki chemiczne, które powodują powstawanie mutacji u bakterii bez użycia systemu aktywacji metabolicznej są zwykle zaliczane na podstawie tych badań do mutagenów bezpośrednich. Jeżeli z badań *in vitro* wynika, że włączenie systemu aktywacji metabolicznej obniża lub eliminuje działanie mutagenne, to można przypuszczać, że enzymy frakcji mikrosomalnej służą do detoksykacji ksenobiotyku. W przedstawionych badaniach takie zjawisko zaobserwowano dla wody dezynfekowanej dwutlenkiem chloru.

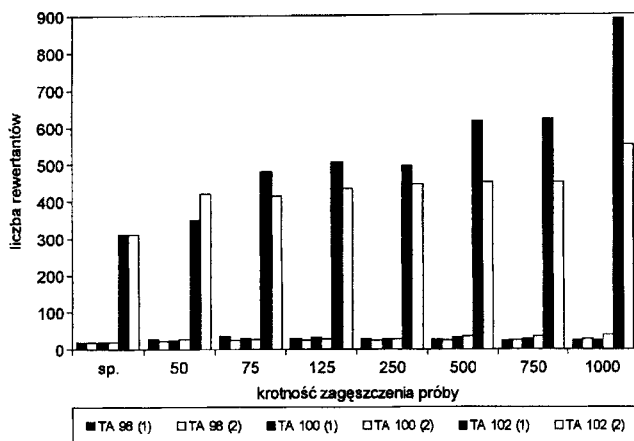
Stwierdzono ponadto, że od 20 do 30% badanych prób wody charakteryzowało się aktywnością mutagenną, z czego górny pułap dotyczył wody uzdatnionej. Potwierdza to pogląd, że w procesach uzdatniania, a zwłaszcza podczas dezynfekcji wody, mogą pojawiać się nowe związki, będące prawdopodobnie pochodnymi chloru.

Trudności w stosowaniu testów bioindykacyjnych do wykrywania aktywności mutagennej związków nieorganicznych spowodowały konieczność równoległego zastosowania dwóch testów bakteryjnych. Dla zilustrowania tego zagadnienia wybrano przykład bioindykacji wody surowej i uzdatnionej, dla których oznaczono również zawartość wybranych metali ciężkich. Badania bioindykacyjne przy zastosowaniu testu Ames oraz testu reperacyjnego wykazały obecność czynników mutagennych w nieorganicznej frakcji zanieczyszczeń badanych wód.

Tabela 3. Zawartość metali ciężkich w próbach wody, g/m³

Rodzaj próby wody	Mg	Ni	Cr	Cu	Zn	Fe	Mn	Ca	Na	K	Pb	Cd
Surowa	8,0	0,0075	<0,005	0,005	0,050	0,05	0,125	41,5	22,5	7,2	0,018	0,007
Uzdatniona	7,0	0,0075	<0,005	0,005	0,045	0,08	0,175	40,0	22,5	7,2	0,005	0,005

Czułość użytych testów oraz zastosowanych w teście Amesa szczepów bakteryjnych okazała się zróżnicowana. Z trzech zastosowanych szczepów *Salmonella typhimurium* jedynie szczep TA102 był wrażliwy na mutagenne działanie substancji nieorganicznych i to jedynie przy bardzo wysokim – tysiąc-krotnym – zateżeniu próbek wody (rys.1).



Rys. 1. Wpływ mineralizatu na liczbę rewertantów szczepu *Salmonella typhimurium* (sp. – wersja spontaniczna, 1 – woda surowa, 2 – woda uzdatniona)

Znacznie wyższą wrażliwością na działanie nieorganicznych zanieczyszczeń wody wykazał się test reperacyjny z *Bacillus subtilis* (tab.2).

Wykryto nim substancje mutagenne, zarówno w wodzie surowej jak i uzdatnionej. Wyższą aktywnością mutageną charakteryzowała się próba wody surowej, w której stwierdzono obecność mutagenów już przy pięćsetkrotnym jej zateżeniu. Wynik dodatni, świadczący o obecności czynników mutagennych, otrzymano dla wody uzdatnionej dopiero po jej tysiąc-krotnym zateżeniu. Uzyskane wyniki badań znajdują potwierdzenie w analizie zawartości w próbach wody metali ciężkich. W wodzie surowej i uzdatnionej wykryto obecność niklu, chromu, ołowiu i kadmu, tj. metali uznanych za czynniki zdolne do ingerencji w strukturę DNA (tab.3).

Wnioski

♦ Wykazano, że badana woda powierzchniowa zawierała substancje o potencjalnych właściwościach mutagennych i ra-

kotwórczych, w tym zarówno prokancerogeny jak i kancerogeny. Podczas procesów koagulacji i napowietrzania wody substancje te były eliminowane do poziomu poniżej oznaczalności stosowanymi testami.

♦ W wyniku dezynfekcji wody związkami chloru powstawały wtórne zanieczyszczenia o charakterze mutagennym i rakotwórczym. Ich prekursorami były prawdopodobnie zanieczyszczenia organiczne wody, nie usuwane w procesach poprzedzających chlorowanie.

♦ Woda powierzchniowa zawierała zanieczyszczenia nieorganiczne o potencjalnych właściwościach mutagennych. Ich ilość malała w procesach uzdatniania o około 50%, co jednakże oznacza występowanie tego typu aktywności w 100 cm³ wody uzdatnionej.

♦ Przeprowadzone badania wykazały przydatność testu Ames oraz testu reperacyjnego z *Bacillus subtilis* do skrinin-gowej oceny potencjalnych właściwości mutagennych i rakotwórczych zanieczyszczeń wody.

LITERATURA

1. L. KRONBERG, R.F. CHRISTMAN: Chemistry of mutagenic by-products of water. The Science of the Total Environment, 1989, 81/82, pp. 219–230.
2. D.M. MARON, B.N. AMES: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Research, 1983, 113, pp. 173–215.
3. S. MATSUI: Evaluation of a Bacillus subtilis Rec-assay for the detection of mutagens which may occur in water environments. Water Research, 1980, Vol. 14, pp. 1613–1619.
4. T. VARTIAINEN, S. LAMPELO, P. KAURANEN: Mutagenicity of drinking waters in Finland. Mutation and the Environment, Part E, 1–9, 1990, Wiley-Liss, Inc.
5. Water Contamination and Health, 1994, Ed. G.M. Rhoda, Wang, Human Risk Assessment Branch USEPA, Washington D.C.
6. Kryteria zdrowotne środowiska, tom 51 Przewodnik do testów krótkoterminowych przeznaczonych do wykrywania mutagennych i rakotwórczych substancji chemicznych. Instytut Medycyny Pracy, Łódź 1993.
7. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 1991, Supplement to the 17th Edition, Washington D.C.
8. T. TRACZEWSKA, B. KOŁWZAN, Zastosowanie testu Ames do oceny jakości zdrowotnej wody uzdatnionej. Mat. konf. „Współczesne problemy gospodarki wodno-ściekowej”, WSI, PZITS, Koszalin 1995.

On the Utility of Bioindication Tests in Assessing Water Quality

In the bioindication study use was made of the *Salmonella* mutagenicity test and the repair assay with *Bacillus subtilis*. Both the tests allow a quick assessment of mutagenic activity for the organic and inorganic pollutants present in the water. Samples collected from the river Oława contained substances of potential mutagenic and carcinogenic properties in each of

the two investigated fractions. These substances were removed in the course of coagulation and aeration. However, water disinfection with chlorine compounds produced organic pollutants of a mutagenic and carcinogenic nature. Their precursors must have been the polluting species which were not removed prior to chlorination.