

PIOTR JADCZYK

KORELACJE MIĘDZY MUTAGENNOŚCIĄ PYŁU ZAWIESZONEGO
A STĘŻENIAMI ZANIECZYSZCZEŃ W ATMOSFERZE

CORRELATIONS BETWEEN MUTAGENICITY OF AIRBORNE PARTICLES
AND CONCENTRATIONS OF AIR POLLUTANTS

Instytut Inżynierii Ochrony Środowiska, Politechnika Wrocławska
50–370 Wrocław, ul. Wybrzeże Wyspiańskiego 27,
Kierownik: dr hab. inż. W. Adamski

*Testem Amesą stwierdzono mutagenne działanie zanieczyszczeń zaadsorbowanych na pyłe zawieszonym w atmosferze pobranym w różnych punktach Wrocławia latem i zimą. Objętość zanieczyszczonego pyłem powietrza wywołująca efekt mutageny wobec szczepu *Salmonella typhimurium* TA 98 bez aktywacji frakcją S9 wykazywała zależność od stężeń pyłu zawieszonego (współczynnik korelacji – 0,35), związków organicznych zaadsorbowanych na pyłe (współczynnik korelacji – 0,58), WWA z listy EPA (współczynnik korelacji – 0,52) i benzo(a)pirenu (współczynnik korelacji – 0,52).*

WSTĘP

Szereg spośród 2000 związków zanieczyszczających atmosferę działa genotoksycznie. Najpowszechniej znane są właściwości mutagenne i kancerogenne WWA. Nowsze badania wskazują jednak, że szereg innych zanieczyszczeń organicznych o budowie pierścieniowej występujących w atmosferze wykazuje znacznie silniejszą genotoksyczność [7, 9]. Wcześniejsze badania własne wykazały również, że WWA nie są jedynymi mutagenami zaadsorbowanymi na pyłe zawieszonym w atmosferze [4]. Każdorazowe analizowanie wszystkich występujących w atmosferze zanieczyszczeń jest niemożliwe. W standardowej ocenie zanieczyszczenia atmosfery poprzestaje się na określaniu stężeń pyłu zawieszonego i związków genotoksycznych takich jak: benzo(a)piren i WWA z listy EPA. Nie odzwierciedla to w pełni aktywności genotoksycznej zanieczyszczeń atmosfery ze względu na interakcje zachodzące pomiędzy zanieczyszczeniami zarówno w atmosferze, jak i w organizmach, w tym w organizmie człowieka. W związku z powyższym Instytut Medycyny Środowiska w Sztokholmie postuluje uzupełnienie analiz fizykochemicznych oceną mutagenności zanieczyszczeń atmosfery testem *Amesa* [11].

Podjęto więc próbę określenia korelacji pomiędzy stężeniem w atmosferze pyłu zawieszonego, zaadsorbowanych na nim związków organicznych, WWA z listy EPA i

¹ Projekt finansowany przez KBN – grant 6/P04G 083 16.

benzo(a)pirenu [B(a)P] a rzeczywistą aktywnością mutageną w teście *Amesa* zaadsorbowanych na pyłe zanieczyszczeń. O zastosowaniu szczepu *Salmonella typhimurium* TA 98 przesądziła jego przydatność w ocenie czynników mutagennych zaadsorbowanych na pyłe zawieszonym we Wrocławiu [1]. W działaniu mutagenym pyłów zawieszonych w środowisku miejskim Wrocławia znaczącą rolę odgrywają mutageny bezpośrednie, które pod wpływem enzymów wątroby ulegają częściowej degradacji [4]. Dlatego też w niniejszej pracy oparto się na wynikach uzyskanych testem *Amesa* bez aktywacji metabolicznej frakcją S9.

METODYKA BADAŃ

Pobieranie i przygotowanie próbek. Pył pobierano w różnych punktach miasta metodą wysokowydajnej aspiracji na filtry szklane firmy Schleicher & Schuell GS9 o wymiarach 2005250 mm, bez użycia separatora zatrzymującego frakcję pyłu o średnicy większej niż 10 mm. Filtry zmieniano co 24 godziny. Stosowano aspirometr o wydajności 100 m³/godz. W jedną próbkę pulowano pył zebrany w każdym punkcie na kilku filtrach.

Filtry z zatrzymanym na nich pyłem poddano 8 godzinnej ekstrakcji dichlorometanem (Lab-Scan) w aparatach *Soxhleta*. Część próbek przeznaczonych do badań fizyczno-chemicznych pozostawiano w dichlorometanie. Pozostała część każdego z ekstraktów przeznaczoną do badań biologicznych odparowywano do sucha i ponownie rozpuszczano w dimetylosulfotlenku – DMSO (Fluka) tak aby 0,1 cm³ zawierało ekstrakt 3,2 mg pyłu zawieszonego. Roztwór w DMSO rozcieńczano ponownie i zawartość pyłu w 0,1 cm³ wynosiła odpowiednio 3,2, 1,6, 0,8, 0,4, 0,2 i 0,1 mg. Tak przygotowane próbki badano testem *Amesa*.

Analiza ilościowa WWA metodą GC-MS. Próbki wzorcowych WWA (Radian International LLC ERS-011) o stężeniu każdego składnika 2000 µg/cm³ rozcieńczono mieszaniną benzenu i dichlorometanu (1:1) tak, aby w 1 cm³ znajdowało się 240 µg każdego składnika. Tak przygotowaną próbkę stosowano jako zewnętrzny wzorec do oznaczeń chromatograficznych.

Analizy ekstraktów pyłu zawieszonego metodą GC-MS zostały wykonane przy zastosowaniu aparatu firmy Hewlett-Packard składającego się z chromatografu gazowego HP 6890 sprzężonego z selektywnym detektorem mas HP 5973. Chromatograf gazowy wyposażony był w kolumnę kapilarną HP-5 o średnicy 0,25 mm i długości 30 m. Gazem nośnym był hel (1,4 cm³/min.). Próbki o objętości 1 µl wstrzykiwano do dozownika nagrzanego do temperatury 50°C, w którym po odparowaniu ulegały rozcieńczeniu gazem nośnym w stosunku 1:5. Rozdziały wykonywano stosując następujący program temperaturowy: 50°C (1 min.) → 26°C/min. → 310°C (35 min.). Porównanie uzyskanych chromatogramów z chromatogramami wzorców pozwoliło obliczyć zawartość poszczególnych WWA w analizowanych ekstraktach.

Szczep testowy. Zastosowano szczep *Salmonella typhimurium* TA 98 otrzymany od prof. B. *Amesa* z *Ames* Laboratory, Department of Biochemistry, University of California posiadający następujący zestaw markerów genetycznych: *his⁻*, *rfa*, *ΔuvrB*, *+R*.

Metodyka wykonania testu i przedstawiania wyników. Stosowano procedurę oraz podłoża mikrobiologiczne i roztwory opisane przez *Maron* i *Amesa* [5]. Niezbędne szczegóły techniczne podano w poprzedniej pracy [4]. Zgodnie z procedurą za mutagenne uznawano próbki, które dawały co najmniej dwukrotny wzrost liczby rewertantów w stosunku do kontroli i wykazywały liniową zależność dawka – odpowiedź [5].

Na podstawie przebiegu krzywych dawka – odpowiedź oraz stężeń pyłu w atmosferze obliczono objętości zanieczyszczonego powietrza powodujące w teście *Amesa* efekt mutageny. Odpowiadały one objętościom powietrza zawierającym dawkę pyłu powodującą efekt mutageny. Aktywność genotoksyczna jednostkowej objętości zanieczyszczonego pyłem powietrza oraz narażenie ludności na działanie zawartych w nim czynników mutagennych są odwrotnie proporcjonalne do objętości zanieczyszczonego powietrza powodującej w teście *Amesa* efekt mutageny.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Stężenia pyłu zawieszonego stwierdzone we Wrocławiu latem 1998 i zimą 1998/99 wahały się w zakresie 17–144 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Były więc niższe od dopuszczalnego stężenia dla okresu 24 godzinnego wynoszącego 150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Dz. U. 55/98, poz. 355). Stężenia zaadsorbowanych na pyłe zawieszonym związków organicznych wahały się w zakresie 1,1–28,6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Stężenia WWA z listy EPA wahały się w zakresie 8,3–1211,6 ng/m^3 . We wszystkich próbkach pyłu około połowę z nich stanowił B(a)P, którego stężenia wahały się w zakresie 4,5–709 ng/m^3 . Dopuszczalne stężenie B(a)P dla okresu 24 godzinnego wynosi w Polsce 5 ng/m^3 (Dz. U. 55/98, poz. 355). Wysokie stężenia benzo(a)pirenu odnotowano jedynie w niektórych punktach Wrocławia. Na ogół stężenia B(a)P wynosiły od części do kilkudziesięciu ng/m^3 [10, 12, 14]. Stężenia rzędu kilkuset ng/m^3 odnotowano jednak na Górnym Śląsku [7]. Stężenia pyłu zawieszonego i zaadsorbowanych na nim zanieczyszczeń organicznych były znacznie wyższe zimą niż latem oraz w centrum miasta niż na jego peryferiach. Zimą na pyłe zawieszonym zaadsorbowanych jest więcej zanieczyszczeń niż latem. Latem, przy wyższych temperaturach część z nich przechodzi do fazy lotnej i półlotnej. W sezonie grzewczym następuje także wzrost niskiej emisji oraz emisji przez silniki samochodowe, które zużywają wówczas o kilkanaście procent więcej paliwa.

Objętości zanieczyszczonego powietrza wywołujące efekt mutageny w teście *Amesa* wobec szczepu TA 98 bez aktywacji frakcją S9 wahały się we Wrocławiu w zakresie 0,25–42,5 m^3 . Na nieuprzemysłowionym obszarze Holandii [2] objętości te wykazywały zbliżony zakres wartości (2–40 m^3).

Objętość zanieczyszczonego powietrza wywołująca efekt mutageny zależała we Wrocławiu od dwóch czynników: stężenia pyłu w atmosferze i jego aktywności mutagennej. Zależność pomiędzy stężeniem pyłu zawieszonego w atmosferze a dawką zanieczyszczonego powietrza wywołującą efekt mutageny była jednak umiarkowana; współczynnik korelacji wynosił – 0,35 (ryc. 1). Stężenie pyłu zawieszonego w atmosferze w stosunkowo niewielkim stopniu odzwierciedlało zagrożenie zdrowotne spowodowane obecnością zaadsorbowanych na nim mutagenów. W niektórych przypadkach stężenie pyłu było wysokie, natomiast stężenie zaadsorbowanych na nim związków genotoksycznych było niskie. W innych przypadkach stężenie pyłu było niskie, ale zawartość w nim związków genotoksycznych wysoka.

Lepszymi wskaźnikami zagrożenia zdrowotnego powodowanego przez zaadsorbowane na pyłe zawieszonym mutageny okazały się stężenia: zaadsorbowanych na pyłe związków organicznych rozpuszczalnych w dichlorometanie (ryc. 2), WWA z listy EPA (ryc. 3) i B(a)P (ryc. 4). Współczynniki korelacji wynosiły: – 0,58 dla związków organicznych, – 0,52 dla WWA z listy EPA i – 0,52 dla benzo(a)pirenu. Można zatem wnioskować, że stężenie wszystkich związków organicznych w atmosferze jest dokładniejszym wskaźnikiem aktywności mutagennej zaadsorbowanych na pyłe zawieszonym niż stężenia WWA z listy EPA czy benzo(a)pirenu. Na pyłe zawieszonym zaadsorbowanych jest szereg związków aktywnych biologicznie. Ich działanie może się nawzajem wzmacniać lub osłabiać. Odpowiedź uzyskiwana w testach przesiewowych, w tym również w teście *Amesa*, jest wypadkową tych procesów.

Stwierdzona we Wrocławiu zależność pomiędzy działaniem mutagennym pyłowych zanieczyszczeń powietrza a stężeniem w atmosferze benzo(a)pirenu potwierdziły bada-

Ryc. 1.

Ryc. 2.

Ryc. 3.

Ryc. 4.

nia przeprowadzone na Górnym Śląsku [7] i w Atenach [12]. Wyniki *Wasserkorta* i wsp. [13] dotyczyły także sumy WWA zaadsorbowanych na pyłe zawieszonym w Zurichu w Szwajcarii. Zależność od stężenia występującego w atmosferze benzo(a)pirenu i innych WWA wykazuje też zachorowalność i śmiertelność na nowotwory płuc [3, 6].

Uzyskane wyniki wykazały, że fizykochemiczne wskaźniki stosowane do oceny zanieczyszczenia atmosfery, takie jak stężenie w atmosferze pyłu zawieszonego, WWA czy benzo(a)pirenu tylko w przybliżeniu odzwierciedlają rzeczywiste zagrożenie zdrowotne związane z obecnością w atmosferze związków mutagennych i kancerogennych. Przedstawione wyniki badań wykazały, że najdokładniejszym wskaźnikiem mutagenności zanieczyszczeń zaadsorbowanych na pyłe zawieszonym jest stężenie związków organicznych. Na pełną ocenę aktywności genotoksycznej zanieczyszczeń atmosfery pozwalają tylko biotesty, w tym najbardziej rozpowszechniony test *Amesa*. W związku z powyższym, wniosek włączenia testu *Amesa* do zestawu badań wykonywanych rutynowo w ocenie stanu zanieczyszczenia atmosfery wydaje się w pełni uzasadniony.

WNIOSKI

1. Testem *Amesa* stwierdzono aktywność mutagenną zanieczyszczeń zaadsorbowanych na pyłe zawieszonym pobranym w różnych punktach Wrocławia latem i zimą.

2. Objętość zanieczyszczonego pyłem powietrza wywołująca efekt mutagenny wobec szczepu TA 98 bez aktywacji frakcją S9 korelowała ze stężeniem pyłu zawieszonego (współczynnik korelacji – 0,35), związków organicznych zaadsorbowanych na pyłe (współczynnik korelacji – 0,58), WWA z listy EPA (współczynnik korelacji – 0,52) i benzo(a)pirenu (współczynnik korelacji – 0,52).

3. Stosowane w standardowym monitoringu fizykochemiczne wskaźniki zanieczyszczenia atmosfery tylko w przybliżeniu odzwierciedlają zagrożenie zdrowotne powodowane przez mutageny i kancerogeny zaadsorbowane na pyłe zawieszonym. Dlatego monitoring zanieczyszczeń atmosfery należałoby uzupełnić o badanie mutagenności zanieczyszczeń pyłowych testem *Amesa*.

Podziękowania. Autor dziękuje Pani mgr *Marii Iwonie Pawlik* za sumienną i fachową pomoc techniczną.

P. J a d c z y k

CORRELATIONS BETWEEN MUTAGENICITY OF AIRBORNE PARTICLES AND CONCENTRATIONS OF AIR POLLUTANTS

Summary

With highly efficient spirometry method there were sampled airborne particles in different parts of Wrocław in winter and summer. Organic compounds adsorbed on the particles were extracted for 8 hours in *Soxhlet* apparatus. Concentration of PAHs and benzo(a)pyrene was determined with GC-MS. Mutagenicity of particles was examined with *Ames* test. Concentrations of airborne particles ranged from 17–144 mg/m³, and organic compounds adsorbed on the particles – 1,1–28,6 mg/m³. Concentrations of PAHs from EPA list ranged from 8,3–1211,6 ng/m³, benzo(a)pyrene's ones – from 4,5–709 ng/m³. Airborne particles sampled in many different locations of Wrocław in winter and summer displayed mutagenic activity. Air volumes polluted with the particles resulting in mutagenic effect in *Ames* test in TA 98 strain without

activation with fraction S9 ranged from 0,25–42,5 m³. They displayed correlation with concentration of airborne particles (correlation index –0,35), organic compounds adsorbed on the particles (correlation index –0,58), PAHs from EPA list (correlation index –0,52) and benzo(a)pyrene (correlation index –0,52). Physiochemical indexes of air pollution only approximately indicate health hazards caused by mutagens and carcinogens adsorbed on airborne particles. Therefore monitoring of air pollution should be supplemented with testing their mutagenicity with *Ames* test.

PIŚMIENNICTWO

1. *Adamiak W., Jadczyk P., Kucharczyk J.*: Application of *Salmonella* strains with altered nitroreductase and *O*-acetyltransferase activities to the evaluation of the mutagenicity of airborne particles. *Acta Microbiol. Polon.* 1999, 48, 131–140.
2. *Alink G.M., Smit H.A., van Houdt J.J., Kolkman J.R., Boleij J.S.M.*: Mutagenic activity of airborne particulates at non-industrial locations. *Mutation Res.* 1983 116, 21–34.
3. *Henderson B.E., Gordon R.J., Menck H., Soohoo J., Martin S.P., Pike M.C.*: Lung cancer and air pollution in south-central Los Angeles county. *Am. J. Epidemiol.* 1975, 101, 477–488.
4. *Jadczyk P.*: Mutagenność zanieczyszczeń organicznych zaadsorbowanych na pyłe zawieszonym w powietrzu atmosferycznym w centrum Wrocławia. *Roczn. PZH* 2000, 51, 299–305.
5. *Maron D.M., Ames B.N.*: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res.* 1983, 113:173–215.
6. *Menck H.R., Casagrande J.T., Henderson B.E.*: Industrial Air Pollution: Possible Effect on Lung Cancer. *Science* 1974, 183, 210–212.
7. *Motykiwicz G., Mańka G., Cimander B., Chorąży M.*: Mutagenic Activity in Air-Borne Particulate Pollutants at Industrial District of Silesia. *Bull. Pol. Acad. Sci. Biol.* 1985, 33, 7–16.
8. *Motykiwicz G., Pendzich J.*: Aktywność genotoksyczna zanieczyszczeń powietrza. *Biotechnologia* 1991, 13–14, 112–119.
9. *Rejmer P.*: Podstawy ekotoksykologii. Ekoinżynieria Lublin, 1997.
10. *Rossi C., Poli P., Buschini A., Cassoni F., Cattani S., DeMunari E.*: Comparative investigations among meteorological conditions, air chemical-physical pollutants and airborne particulate mutagenicity: a long-term study (1990–1994) from a northern Italian town. *Chemosphere* 1995, 30, 1829–1845.
11. *Szeszenia-Dąbrowska M.*: Skutki zdrowotne zanieczyszczenia środowiska. Biblioteka Monitoringu Środowiska. Warszawa, 1994.
12. *Viras L.G., Athanasiou K., Siskos P.A.*: Determination of mutagenic activity of airborne particulates and of the benzo[a]pyrene concentrations in Athens atmosphere. *Atmos. Environ.* 1990 24B, 267–274.
13. *Wasserkort R., Hartmann A., Widmer R.M., Burtcher H.*: Correlation between On-Line Detection in Airborne Particle Samples and Their Bacterial Genotoxicity. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 1998, 40, 126–136.
14. *Zwoździak J., Lisowski A., Zwoździak A.*: Zanieczyszczenie powietrza wielopierścieniowymi węglowodorami atmosferycznymi w otoczeniu elektrowni węglowych. *Ochrona Środowiska* 1986, 488/3(29) 17–19.

Otrzymano: 2000.05.22