

ELŻBIETA NIEMIRYCZ¹, AGNIESZKA KWIECIŃSKA²

WŁAŚCIWOŚCI MUTAGENNE ŚRODOWISKA WODNEGO POLSKI PÓŁNOCNEJ

MUTAGENIC PROPERTIES OF INLAND WATERS AND SEDIMENTS IN NORTHERN POLAND

¹ Instytut Meteorologii i Gospodarki Wodnej Oddział Morski
Zakład Ochrony Wód Przymorza
80-286 Gdańsk, ul. Jaškowa Dolina 29
Kierownik: dr inż. E. Niemirycz
e-mail: Elzbieta.Niemirycz@imgw.pl

² Politechnika Gdańska
Wydział Chemiczny
Katedra Technologii Leków i Biochemii
80-952 Gdańsk, ul. Narutowicza 11/12

*Przedstawiono wyniki badań właściwości mutagennych wód i osadów dennych obszarów przyujściowych Wisły i Odry oraz jezior Pojezierza Kaszubskiego, znanego regionu rekreacyjnego Polski Północnej. Badania przeprowadzono stosując bakteryjny test Ames – wobec dwóch szczepów *Salmonella typhimurium* TA98 i TA100.*

Słowa kluczowe: właściwości mutagenne, test Ames, *Salmonella typhimurium* TA 98 i TA 100, wody, osady dennie

Key words: mutagenic properties, Ames test, *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100, waters, sediments

WSTĘP

Rozwój przemysłu i urbanizacja kraju wpływają na zanieczyszczenie środowiska wodnego przez szkodliwe substancje chemiczne. Obecność tych substancji w wodach powierzchniowych, zwłaszcza w wodach będących źródłem wód pitnych stwarza poważne zagrożenie dla organizmów żywych oraz zdrowia człowieka. Najbardziej groźne są substancje o właściwościach mutagennych i rakotwórczych, które nawet w niskich dawkach mogą spowodować ujemne skutki zdrowotne [8, 10]. Właściwości mutagenne i kancerogenne wykazuje między innymi wiele związków stanowiących produkty działalności człowieka, takich jak: pestycydy, WWA, dioksyny, czy metale ciężkie [8].

Do oceny mutagenności zanieczyszczeń najczęściej stosowane są dwa testy bakteryjne: *Ames* i *Mutatox*. Oznaczają się one dużą zgodnością wyników z testami wykonywanymi

na komórkach hodowlanych *in vitro* i na zwierzętach [3, 4, 7, 11]. Oba testy dają porównywalne wyniki zarówno pod względem czułości, selektywności i powtarzalności [7]. Jakkolwiek test *Amesa* jest bardziej czasochłonny, to o jego zastosowaniu w prezentowanych badaniach zdecydowały znacznie niższe koszty analizy.

Test *Amesa* wykorzystuje zdolność histydyno-zależnych mutantów *Salmonella typhimurium* do rewersji mutacji pod wpływem czynników wywołujących mutację powrotną, która przejawia się wzrostem na podłożu minimalnym, pozbawionym aminokwasu L-histydyny [5, 6]. Do badań wybrano dwa szczepy testowe *Salmonella typhimurium* TA98 i TA100.

Celem niniejszej pracy była ocena potencjalnych właściwości mutagennych wód i osadów dennych z dorzecza Dolnej Wisły i Odry oraz jezior Polski Północnej za pomocą bakteriologicznego testu *Amesa*.

MATERIAŁ I METODY

Ocenie pod względem właściwości mutagennych poddano wody i osady dennie rzek i jezior pobrane w okresie od maja do lipca 2002 roku. W tabeli I przedstawiono lokalizację punktów badawczych oraz parametry jakości pobranych próbek (ChZT, zawartość części organicznych, miano *E. coli*).

Próbki wód pobierano podpowierzchniowo, bez pęcherzy powietrza, bezpośrednio do szklanych naczyń lub z określonej głębokości rzeki bądź jeziora za pomocą batometru i przechowywano w temperaturze +4°C. Badania wód przeprowadzano bezpośrednio po dostarczeniu 250 ml próbki do laboratorium.

Próbki osadów pobierano stalowym czerpakiem (powierzchniowo) lub w przypadku rdzenia osadu sondą Nurek lub sondą Nemisto (średnica rdzenia 5 cm i długość do 50 cm). Pobrane rdzenie osadu dzielono na 10 cm warstwy (2-4 warstwy w zależności od długości rdzenia). Badaniu poddawano każdą warstwę rdzenia osadowego oddzielnie. Próbki osadów przechowywano w szczelnie zamkniętych słoikach, w temperaturze +4°C. Po dostarczeniu próbek do laboratorium osady suszono napowietrznie a następnie poddawano homogenizacji, poprzez zmielenie w młynku kulowym. Z tak przygotowanych osadów sporządzano 50% roztwory wodne (5g osadu i 5 ml jałowej wody destylowanej), z których następnie przygotowywano odpowiednie rozcieńczenia, otrzymując roztwory o stężeniach 5%, 10%, 20%, 30%. Roztwory wodne osadów przechowywano do czasu analizy w temperaturze -20°C [2, 4].

Ocenę właściwości mutagennych wód powierzchniowych i osadów dennych przeprowadzono zgodnie z metodyką opracowaną przez *Amesa* [1, 3, 9], wstępnie stosując metodę krążkową (jakościową), a następnie w zależności od wyniku testu jakościowego wybierając próbki do dalszych badań metodą płytkową (ilościową). Badania wykonano wobec dwóch szczepów *Salmonella typhimurium* TA98 i TA100, sprawdzając uprzednio obecność mutacji w operonie histydynowym, delecję *uvrB*, mutację *rfa* oraz obecność plazmidu pKM 101 [5, 6, 7]. Jako odnośnika użyto kontrolnego mutagenu: 4-nitrochinoliny N-tlenek (4NQO, CAS 56-57-5). Wodne roztwory osadów oraz dimetylosulfotlenku (DMSO), stosowanego do bezpiecznego przechowywania testowych szczepów bakterii) sporządzano przy pomocy kontrolowanej równolegle wody destylowanej.

Właściwości mutagenne wód i osadów określano w pierwszej kolejności metodą krążkową, wykonując pomiar średnicy gęstego wzrostu wokół krążka z badaną próbką za pomocą suwmiarki [mm]. Im związek był bardziej mutagenny tym większą średnicę miała strefa gęstego wzrostu [1].

Wybrane na podstawie metody krążkowej próbki o właściwościach mutagennych (średnica gęstego wzrostu przekraczała wartość określoną dla mutagenu kontrolnego) poddawano badaniom metodą płytkową, ustalając dla nich tzw. współczynniki mutagenności MR (ang. *mutagenic rate*) [6]. Analizowaną próbkę uznawano za mutagenną, jeżeli wywoływała co najmniej dwukrotny wzrost

Tabela 1. Miejsca pobierania oraz charakterystyka próbek wód i osadów dennych pobranych w 2002 r.
Sampling sites and characteristic of water and bottom sediment samples collected in 2002

Lp.	Miejsce pobierania próbki	Czas pobierania	Wody			Osady			Polożenie geograficzne punktu pobierania
			głębokość [cm]	ChZT [mgO ₂ /l]	miano E. Coli	głębokość [cm]	części organiczne [%]	miano E. Coli	
Wisła									
1	Port Świbno	maj	0,5	-	>2	-	-	-	54°20'15" N 18°56'35" E
	Kieżmark ^a								
2	1	maj	powierzchniowo	23,2	0,4	0-10	1,1	0,04	54°07'35" N 18°50'85" E
3	2		-			10-20	2,2	0,4	
4	3	lipiec	powierzchniowo	25,1	0,08	0-10	0,2	-	
5	4		-			10-20	0,4	-	
	Kieżmark ^b								
6	1	maj	powierzchniowo	37,6	0,04	0-10	1,6	0,004	54°07'35" N 18°50'15" E
7	2		-			10-20	1,5	-	
8	3	lipiec	powierzchniowo	-	0,4	0-10	1,2	-	
9	4		-			10-20	1,6	-	
10	Kwidzyn ^e	lipiec	powierzchniowo	33	0,01	powierzchniowo	1	0,01	53°37'58" N 18°53'12" E
11	Kwidzyn ^d	lipiec	powierzchniowo	31,6	0,01	-	-	-	53°37'08" N 18°53'12" E
Odra									
	Police								
12	1		powierzchniowo	27,2	0,01	0-10	37,5	0,3	53°35'35" N 14°35'11" E
13	2	czerwiec	-			10-20	69,3	0,01	
14	3		-			20-50	74,5	0,2	
15	Szczecin	czerwiec	powierzchniowo	27,2	0,01	-	-	-	53°23'26" N 14°32'33" E

cd. tab. I

16	Krajnik Dolny	czerwiec	powierzchniowo	32,1	0,04	powierzchniowo	3,4	0,2	53°03'75" N 14°21'50" E
Jeziora									
17	Klasztorne Małe Tuchomskie	maj	powierzchniowo	44,8	4	powierzchniowo	2,3	0,4	54°21'46" N 18°13'32" E
18	1		powierzchniowo	65,6	2	0-10	46,5	>2	54°26'35" N 18°22'48" E
19	2		1,5	63,2	17	10-20	42,3	>2	
20	3	maj	3	65,6	4	20-30	37	>2	
21	4		-	-	-	30-40	31	>2	
22	Goszyńskie	lipiec	powierzchniowo	16,3	<20	powierzchniowo	0,7	0,08	54°19'17" N 18°30'29" E

Objaśnienia:

- a – prawy brzeg Wisły w przekroju Kieżmark
- b – lewy brzeg Wisły w przekroju Kieżmark
- c – prawy brzeg Wisły – 100 m poniżej zrzutu ścieków z kolektora International Paper S.A. Kwidzyn
- d – prawy brzeg Wisły – w miejscu zrzutu ścieków z kolektora International Paper S.A. Kwidzyn

liczby kolonii rewertantów (mutantów odzyskujących cechy szczepu poprzedniego) w porównaniu do liczby kolonii rewertantów spontanicznych tzn. komórek bakterii, w których mutacja powrotna nastąpiła samorzutnie ($MR \geq 2$). Współczynnik mutagenności MR obliczono według wzoru:

$$MR = \frac{\text{Liczba indukowanych rewertantów}}{\text{Liczba spontanicznych rewertantów}}$$

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W próbkach wód powierzchniowych badanych metodą krążkową (jakościową) nie wykazano istotnego działania mutagennego. Średnica gęstego wzrostu wokół krążków adsorpcyjnych z analizowanymi próbkami wód dla badanych szczepów TA98 i TA100 wahała się od 15 do 26 mm, nie przekraczając wartości odnotowanej dla kontrolnego mutagenu.

Natomiast większość próbek osadów dennych badanych metodą jakościową charakteryzowało się silnymi właściwościami mutagennymi. Wysoki poziom mutagenności osadów zaobserwowano szczególnie wyraźnie w przypadku szczepu TA100 (80% próbek) i w mniejszym stopniu w przypadku szczepu TA98 (30% próbek) (Ryc. 1). Zwiększonej mutagenności towarzyszyła wysoka zawartość substancji organicznych w osadach, jak też ich gorszy stan sanitarny (Tabela I). Osady wykazujące brak właściwości mutagennych pochodziły z Wisły w przekroju Kwidzyn oraz z dwóch jezior Pojezierza Kaszubskiego (Klasztorne Małe i Goszyńskie).

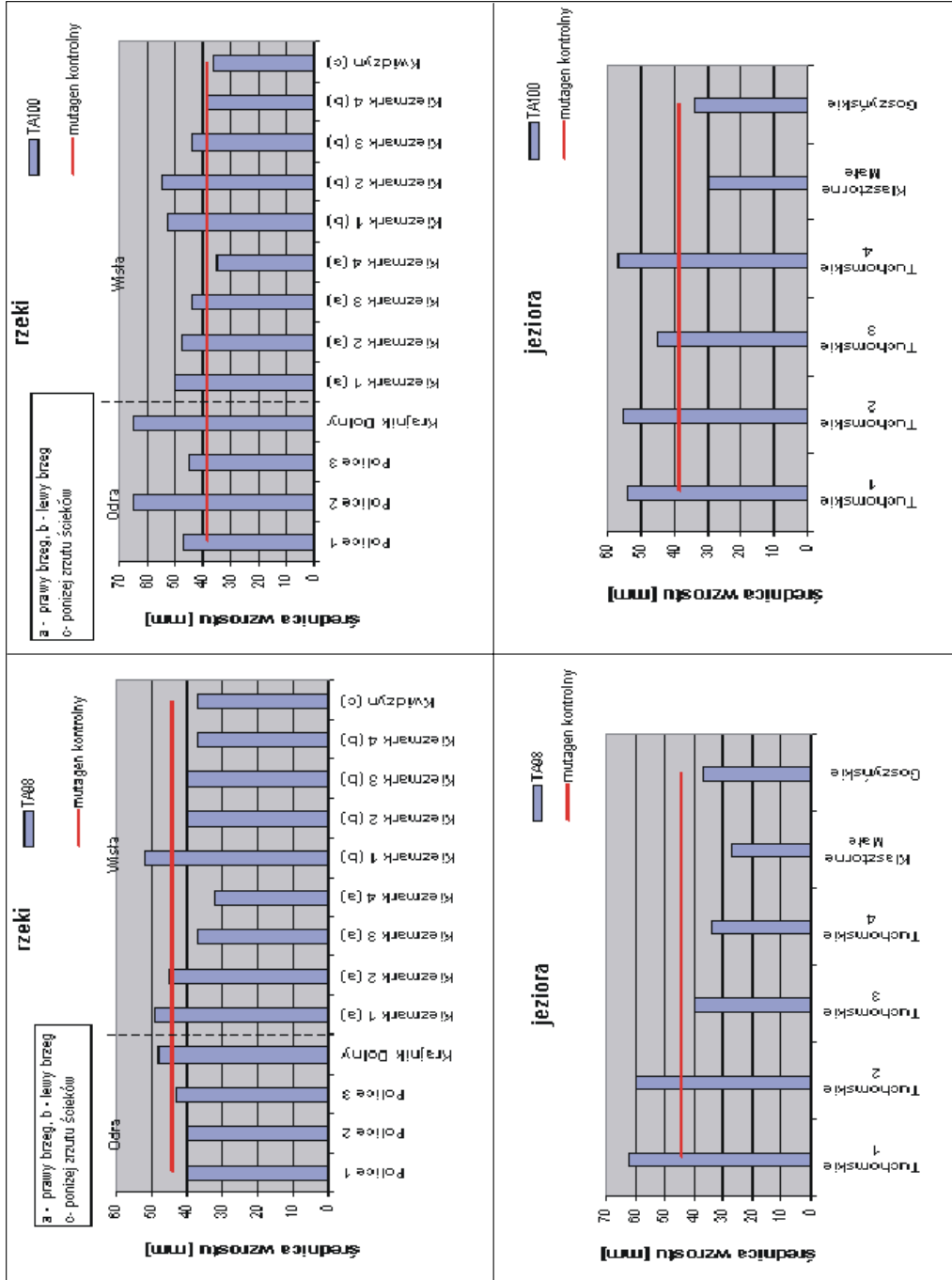
Wyniki oceny mutagenności badanych osadów dennych metodą jakościową (krążkową) zostały w pełni potwierdzone badaniami metodą ilościową (płytkową). W przypadku obu badanych szczepów najwyższym poziomem mutagenności charakteryzowały się osady denne pochodzące z obszaru przyujściowego Odry (MR 12-169) i z Jeziora Tuchomskiego (MR 22-158) (Ryc. 2 a, b, c). Dużo niższy poziom mutagenności cechował osady z Wisły, gdzie maksymalna wartość współczynnika mutagenności MR, zanotowana na lewym brzegu przekroju Kiezmark wynosiła 33. Niższe wartości współczynników MR zaobserwowane w miesiącu lipcu dla badanych osadów rzecznych i jeziornych można tłumaczyć faktem większej aktywności w okresie letnim (Tabela I) bakterii i organizmów jednokomórkowych, biorących udział w biodegradacji zanieczyszczeń, także tych mutagennych. Zmienność współczynnika MR w kolejnych warstwach osadów pochodzących z Jeziora Tuchomskiego, Wisły w przekroju Kiezmark oraz Odry w przekroju Police wykazywała tendencję do niewielkiego wzrostu w głąb profilu, spowodowaną przypuszczalnie kumulacją w osadach czynników mutagennych z poprzednich lat.

WNIOSKI

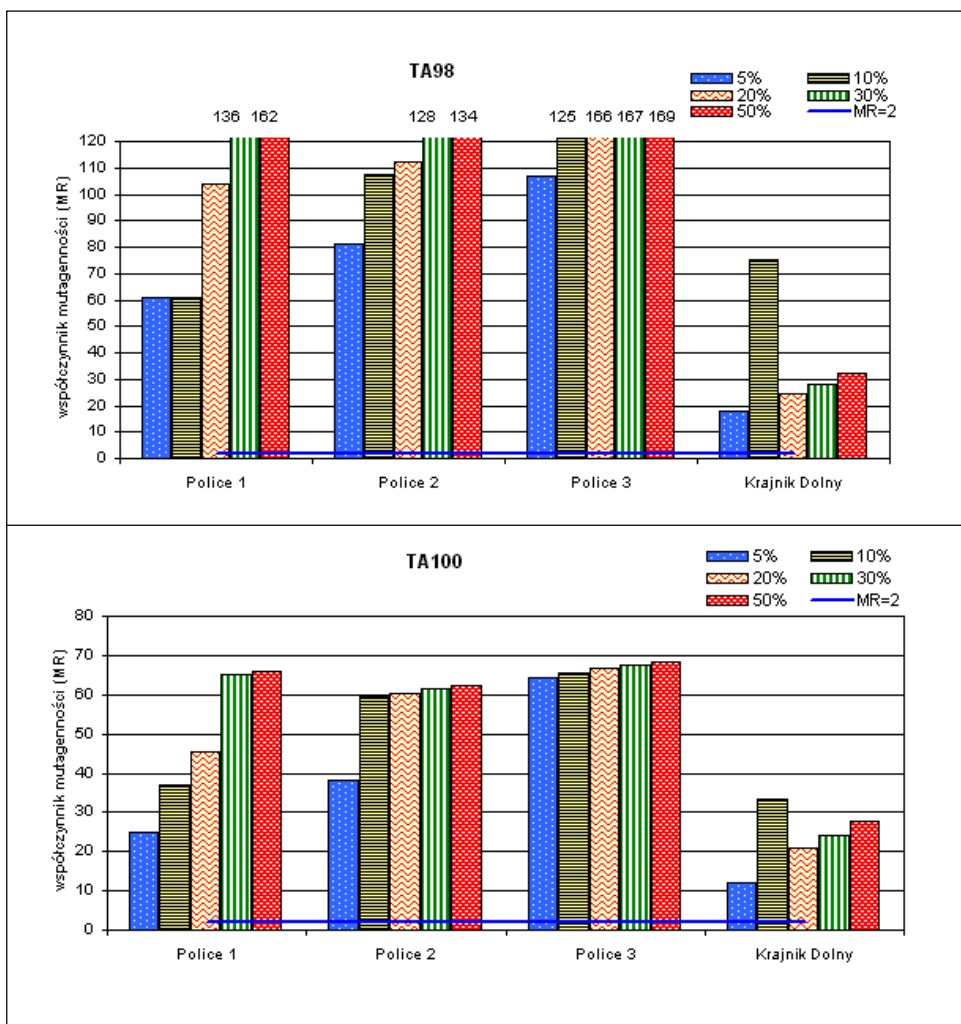
1. Stosując test *Amesa* większości osadów dennych przyujściowych obszarów Wisły i Odry oraz Jeziora Tuchomskiego (Pojezierze Kaszubskie) odnotowano obecność zanieczyszczeń o właściwościach mutagennych.

2. Wody rzeczne i jeziorne z tych obszarów charakteryzowały się niskim poziomem mutagenności, nie przekraczającym mutagenności kontrolnej.

3. Najwyższymi właściwościami mutagennymi, określonymi metodą ilościową testu *Amesa* charakteryzowały się osady pochodzące z obszaru przyujściowego Odry (MR 12-169) i z Jeziora Tuchomskiego (MR 22-158). W osadach dennych z obszaru przyujścio-



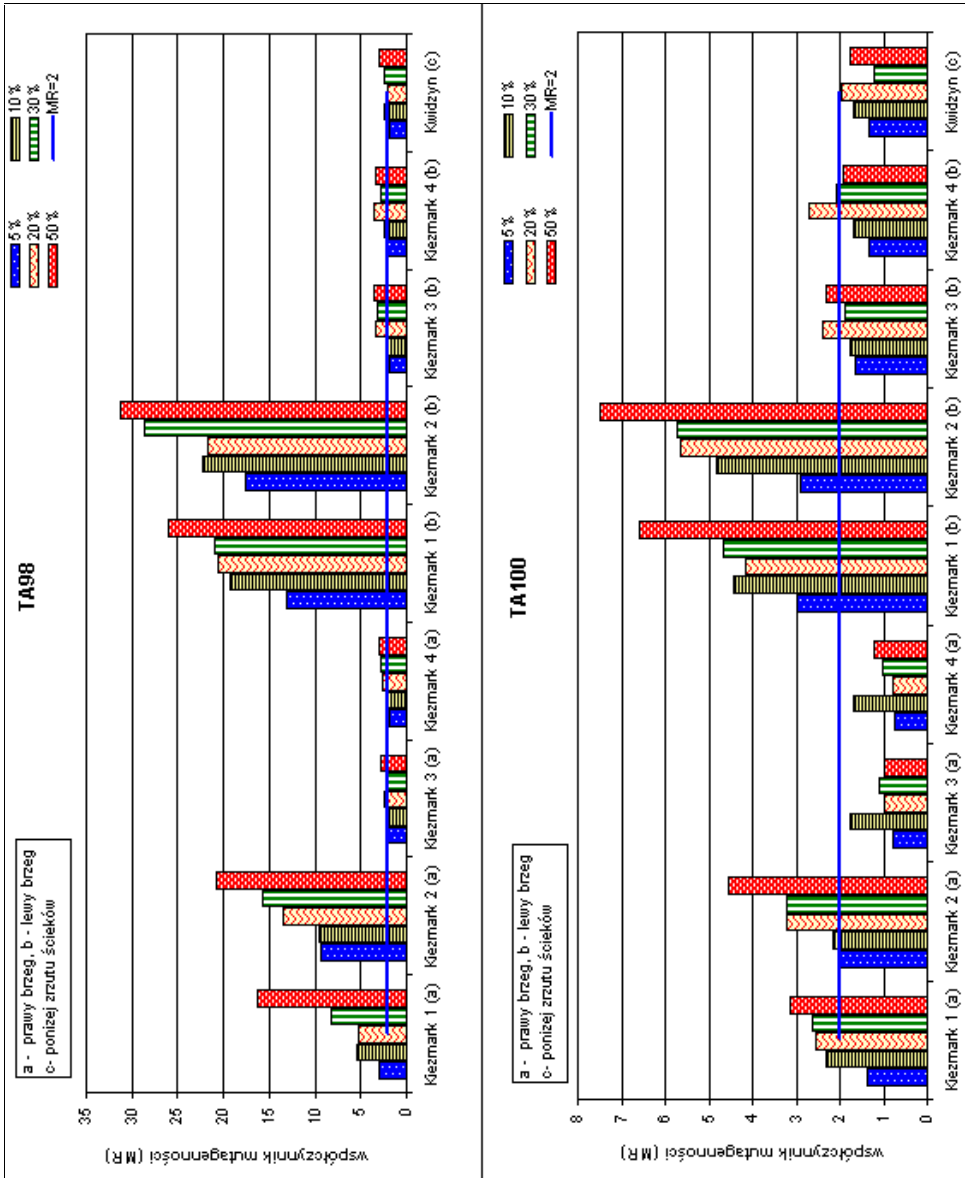
Ryc. 1. Efekt mutageny osadów dennych rzek i jezior Polski Północnej w oparciu o metodę jakościową, zgodnie z testem Ames
Mutagenic effect of bottom riverine and lacustrine sediments in northern Poland on qualitative method of the Ames test



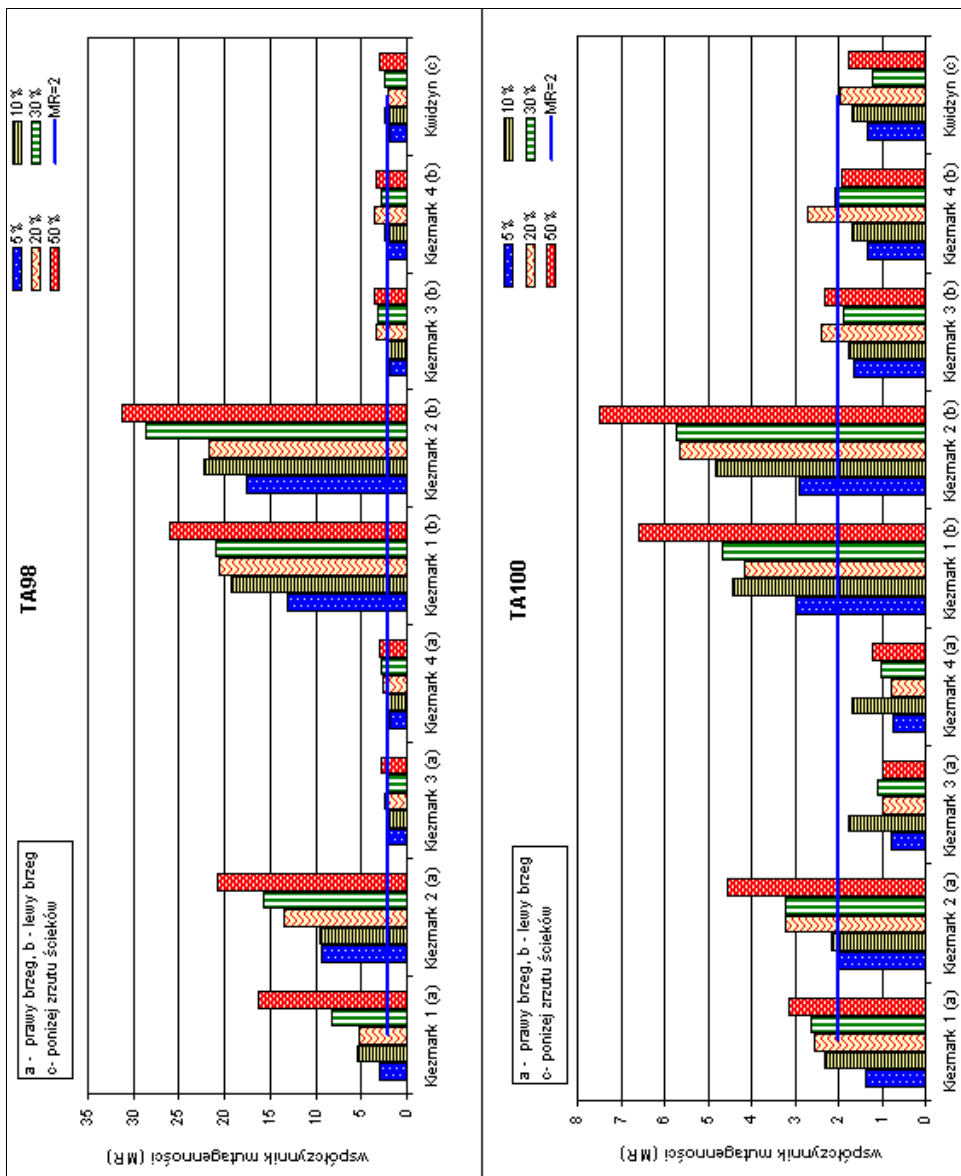
Ryc. 2a

Ryc. 2. Mutagenność badanych osadów dennych rzek i jezior Polski Północnej w oparciu o metodę ilościową, zgodnie z testem Amesa
 Mutagenicity of bottom riverine and lacustrine sediments in northern Poland on quantitative method of the Ames test

- a) odcinek przyujściowy Odry
the close-to-mouth Odra River
- b) Dolna Wisła
the Lower Vistula River
- c) Jeziora Pojezierza Kaszubskiego
the Kashubian Lake District



Ryc. 2b



Ryc. 2c

wego Wisły zaobserwowano dużo niższy poziom czynników mutagennych (maksymalne MR=33).

4. Wzrostowi mutagenności badanych osadów rzecznych i rzecznych towarzyszył wzrost zawartości materii organicznej (ChZT) oraz wzrost ilości bakterii typu fekalnego (miano *E. coli*).

5. Wysoka mutagenność osadów dennych w badanym regionie uzasadnia przeprowadzenie dalszych badań potwierdzających uzyskane wyniki, jak i wyjaśniających pochodzenie i rodzaj czynników mutagennych odpowiedzialnych za zły stan środowiska.

Podziękowania

Niniejsza publikacja powstała w oparciu o wyniki badań prowadzonych w ramach grantu indywidualnego Komitetu Badań Naukowych 6 P04G 027 19.

Autorzy składają podziękowania Pani dr inż. *Teresie Zieniawie* z Katedry Technologii Leków i Biochemii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej za cenne uwagi wykorzystane w przygotowaniu tej pracy oraz Pani *mgr Joannie Gozdek* za pomoc w uzyskaniu właściwej formy graficznej.

E. Niemirycz, A. Kwiecińska

MUTAGENIC PROPERTIES OF INLAND WATERS AND SEDIMENTS IN NORTHERN POLAND

Summary

Mutagenic properties of inland waters in northern Poland were evaluated using the *Ames* test. The tested surface waters were characterised by low mutagenic impact, while the majority of bottom sediment samples turned out to be highly mutagenic. The mutagenic rates (MR) of sediments ranged from 2 to 169 and depended on pollution of aquatic environment by organic substances and bacteria *Escherichia coli*. The most polluted sites of the studied rivers and lakes were indicated (MR=158, 169). This information should be useful for local governments as well as habitants.

PIŚMIENNICTWO

1. *Ames B.N.*: The detection of chemical mutagens with enteric bacteria; w: *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*, ed. A. Hollaender, Vol. 1 Plenum, New York, 1971, 267-282.
2. *Ames B.N., Lee F.D., Durston W.E.*: An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1973, 70, 782-786.
3. *Ames B.N., McCann J., Yamasaki E., Lee F.D.*: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Res.* 1975, 31, 347-364.
4. *Békaert C., Rast C., Ferrier V., Bispo A., Jourdain M.J., Vasseur P.*: Use of *in vitro* (*Ames* and *Mutatox* tests) and *in vivo* (Amphibian Micronucleus test) assays to assess the genotoxicity of leachates from contaminated soil. *Org. Geochem.* 1999, 30, 953-962.
5. *Chung K., Hughs T.J., Claxton L.D.*: Comparison of the mutagenic specificity induced by four nitro-group-containing aromatic amines in *Salmonella typhimurium his* genes. *Mutation Res.* 2000, 465, 165-171.

6. *Janik-Spiechowicz E.*: Ujednolicona metodyka płytkowego testu *Amesa*. Instytut Medycyny Pracy, Łódź 1995.
7. *Johnson B.T.*: Detection of genotoxins in contaminated sediments: An evaluation of a new tests for complex environmental mixtures. Assessment Document Great Lakes Program Office U.S. Environmental Protection Agency Project Officer: Rick Fox, 1995, 1-7.
8. *Kołwzan B., Traczewska T.M.*: Występowanie zanieczyszczeń o właściwościach mutagennych i rakotwórczych w wodzie rzeki Oławy. *Ochrona Środowiska* 1994, 3-4, 54-55.
9. Organization for Economic Cooperation and Development. Wytyczne OECD z zakresu badań toksykologii genetycznej oraz przewodnik do wyboru i stosowania testów. OECD, 1993.
10. *Piekarska K., Kołwzan B., Traczewska T.M., Adamiak W.*: Wykrywanie substancji genotoksycznych w wodach naturalnych i uzdatnionych. Materiały Sympozjum Polskiego Komitetu ds. IAWQ & IAWPRC, Warszawa, 1995
11. *Zeiger E.*: Identification of rodent carcinogens and noncarcinogens using genetic toxicity tests: premises, promises and performance. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 1998, 28, 85-95.

Otrzymano: 2005.10.07