



ANALIZA EFEKTU MUTAGENNEGO PRZECHOWYWANYCH EKSTRAKTÓW PYŁOWYCH ZANIECZYSZCZEŃ POWIETRZA POBIERANYCH W WYBRANYCH MIASTACH WOJEWÓDZTWA ŚLĄSKIEGO

MUTAGENIC EFFECT ANALYSIS OF STORED AIRBORNE PARTICLES EXTRACTS COLLECTED IN SELECTED CITIES OF SILESIA VOIVODESHIP

Agnieszka Kozłowska¹⁾, Lucyna Kapka¹⁾, Rafał Jasiński²⁾

*¹⁾ Zakład Toksykologii Genetycznej, Instytut Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego
Dyrektor: dr n. med. Edmund Anczyk*

*²⁾ Katedra Chemii Technologii Wody i Ścieków, Politechnika Częstochowska
Kierownik Katedry: prof. dr hab. inż. Marta Janosz-Rajczyk*

Streszczenie

Substancje mutagenne i kancerogenne są stosunkowo powszechne w środowisku, a tym samym zagrażają zdrowiu ludzi. Teren o wysokim stopniu uprzemysłowienia, jakim jest obszar województwa śląskiego jest szczególnie zanieczyszczony przez pyły zawieszane emitowane przez koksownie, gazownie, huty, zakłady używające paliwa kopalne, smołę węglową, asfalt, a także piece węglowe i transport samochodowy, które mogą pośrednio wywoływać negatywne skutki zdrowotne u ludzi.

Dla ekstraktów pyłowych zanieczyszczeń powietrza przechowywanych w dimetylosulfotlenku (DMSO), pobieranych w sezonach: jesiennym i zimowym, w sześciu miastach województwa śląskiego zbadano efekt mutageny za pomocą krótkoterminowego bakteryjnego testu *Salmonella*. Próby pyłowych zanieczyszczeń powietrza były pobierane na filtry z włókna szklanego za pomocą wysoko przepływowego aspiratora. Ekstrakcję pyłowych zanieczyszczeń powietrza przeprowadzono chlorkiem metylenu.

Zastosowanie w teście *Salmonella* standardowego szczepu TA 98 oraz jego pochodnej YG 1041, pozwoliło na wstępne rozpoznanie związków odpowiedzialnych za

efekt mutageny pyłów zawieszonych w powietrzu atmosferycznym. W sezonie jesiennym zaobserwowano przewagę mutagenów działających pośrednio (wymagających aktywacji metabolicznej). Dla prób z sezonu zimowego stwierdzono, iż za efekt mutageny odpowiedzialne były głównie związki działające bezpośrednio (niewymagające aktywacji metabolicznej).

Test *Salmonella* może być wykorzystywany do badania efektu mutagennego przechowywanych ekstraktów pyłowych zanieczyszczeń powietrza atmosferycznego.

Słowa kluczowe: *pył zawieszony, aktywność mutagenna, liczba rewertantów, test Salmonella*

Abstract

Mutagenic and carcinogenic substances are ubiquitous in the environment and dangerous to the health of people. Area of high level industrialization – Silesian voivodship is particularly contaminated with suspended particulate matter emitted by coking plants, gasworks, smelters, plants using fossil fuels, coal pitch, asphalt as well as coal stoves and road transport, that may indirectly contribute

Nadestano: 3.08.2007

Zatwierdzono do druku: 13.11.2007

to the occurrence of negative health effects in people.

For the airborne particles extracts stored in dimethyl sulphoxide (DMSO), collected in: autumn and winter seasons, in six Silesian cities, the mutagenic effect was examined by short-term bacterial *Salmonella* test. Airborne particulate matter was collected on glass fiber filters by high-volume samplers. Extraction of airborne particles was carried out using methylene chloride.

Using of standard TA 98 strain and its derivative YG 1041 in *Salmonella* test, allowed to preliminarily identify the compounds responsible for mutagenic effect of air-

borne particles. In the autumn season predominance of mutagens acting indirectly (requiring metabolic activation) was observed. For arrays from winter season, it was stated, that the compounds acting directly (not requiring metabolic activation) were mostly responsible for the mutagenic effect.

Test *Salmonella* test can be used to examine mutagenic effect of stored airborne particles extracts.

Key words: *particulate matter, mutagenic activity, number of revertants, Salmonella test*

Wstęp

Powietrze atmosferyczne jest zanieczyszczone różnymi substancjami, których ilość i rodzaj jest uzależniony od źródeł emisji. Najpoważniejszymi źródłami emisji zanieczyszczeń powietrza są: koksownie, gazownie, huty, rafinerie ropy naftowej, zakłady wykorzystujące paliwa kopalne, smołę węglową, asfalt, a także fabryki chemiczne. Poważny udział w całkowitej emisji mają również piece węglowe używane w gospodarstwach domowych oraz transport samochodowy, który stanowi coraz większy problem w związku z gwałtownym rozwojem komunikacji w latach 90. Na Górnym Śląsku został nadmiernie skoncentrowany jednorodny przemysł, głównie kopalnie, huty i elektrownie opalane węglem, co doprowadziło do degradacji środowiska na wielką skalę. Ten proces został częściowo zahamowany poprzez zmniejszenie wydobycia węgla, likwidację niektórych kopalń, ograniczenie produkcji hut oraz budowę nowych zakładów czystej technologii (1–4).

W powietrzu atmosferycznym znajdują się szczególnie niebezpieczne dla zdrowia substancje wykazujące właściwości mutagenne i kancerogenne. Należą do nich m.in. wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) oraz ich nitrowe (NWWA) i aminowe pochodne. Zawartość WWA w powietrzu jest uzależniona przede wszystkim od: wielkości opadu pyłów emitowanych przez zakłady przemysłowe, sposobu ogrzewania, intensywności transportu samochodowego, zastosowanych rozwiązań urbanistycznych ułatwiających bądź utrudniających wymianę powietrza oraz warunków meteorologicznych i klimatycznych. Znaczącym źródłem WWA i ich pochodnych w powietrzu atmosferycznym są procesy niepełnego spalania związków organicznych, wysokotemperaturowych procesów spalania i przeróbki paliw oraz reakcje chemiczne zachodzące w atmosferze, które odpowiadają za część aktywności genotoksycznej WWA (5, 6). Każdy składnik reakcji spalania dostarcza pośrednich produktów pirolizy, które z kolei uczestniczą

w syntetyzowaniu WWA. Zatem, każdy wysokotemperaturowy proces z udziałem prostych związków organicznych może być źródłem WWA, które następnie przedostają się do różnych elementów środowiska (6). W przemianach substancji zanieczyszczających powietrze ważną rolę pełnią również reaktywne formy tlenu (RFT) powstające głównie w wyniku reakcji fotolizy. Powstające RFT, a zwłaszcza rodnik hydroksylowy ($\cdot\text{OH}$) utleniają obecne w środowisku substancje tj. ditlenek siarki, ditlenek azotu, tlenek węgla, metan (7). W atmosferze znajdują się także inne zanieczyszczenia powodujące powstawanie mutacji. Są to jednopierścieniowe i dwupierścieniowe węglowodory aromatyczne, węglowodory alifatyczne, cykloalkany, związki organiczne zawierające w cząsteczce atomy tlenu, azotu, siarki, chloru oraz metali. Szczególną aktywnością mutagenną wyróżniają się wśród nich nitrowe i aminowe pochodne WWA oraz dioksyny i furany. Aktywność mutagenną i kancerogenną wykazują także niektóre czynniki fizyczne, np. promienie UV. Istnieje szereg związków nieorganicznych, które mogą wchodzić w reakcje z WWA. Większość zanieczyszczeń w atmosferze, które posiadają właściwości genotoksyczne jest zaadsorbowana na pyłe zawieszonym. Potencjalna szkodliwość różnych frakcji pyłu jest uzależniona od średnich wielkości jej cząstek. Najbardziej niebezpieczna dla zdrowia ludzi i zwierząt jest najdrobniejsza frakcja pyłu (o średnicy cząstek mniejszej niż $2,5\ \mu\text{m}$, tzw. $\text{PM}_{2,5}$). Frakcja ta wnika najgłębiej do dróg oddechowych i ostatecznie osadza się w pęcherzykach płucnych (8).

Ze względu na zagrożenie jakie niosą WWA, ich zawartość w poszczególnych elementach środowiska podlega monitorowaniu. Wiele z nich powoduje różnego rodzaju uszkodzenia materiału genetycznego komórki w postaci mutacji genowych i chromosomowych. Uszkodzenia w materiale genetycznym mogą prowadzić do zmian patologicznych, między innymi chorób nowotworowych, jak i nega-

tywnych następstw zdrowotnych u kolejnych pokoleń. Stwierdzono wyraźną zależność pomiędzy zdolnością do wywoływania mutacji, a potencjałem rakotwórczym danego czynnika (2). Warunkiem skutecznego eliminowania zagrożeń zdrowotnych wywołanych substancjami mutagennymi i kancerogennymi jest zidentyfikowanie narażenia na tego typu czynniki oraz poszukiwanie wskaźników wczesnych skutków biologicznych.

Uniwersalność materiału genetycznego organizmów prokariotycznych oraz eukariotycznych pozwala na badanie mutagenności związków chemicznych i ich mieszanin (9). Badania mutacji genowych prowadzi się wykorzystując bakterie, charakteryzując się one bardzo prostą budową, mają pojedynczą okrągłą cząsteczkę DNA, która jest łatwo dostępna dla związków chemicznych. Te jednokomórkowe organizmy ulegają częstym podziałom i w ciągu kilku godzin można uzyskać dziesiątki milionów organizmów (10). Bakterie *Salmonella typhimurium* – pałeczki duru mysiego – w naturze (szczyty dzikie) są prototrofami co oznacza, że do swojego rozwoju potrzebują zaledwie jednego związku organicznego. Szczyty używane w teście są zmutowane w kilku miejscach genomu. Przede wszystkim w wyniku mutacji w jednym z genów odpowiedzialnym za syntezę histydyny zostały one pozbawione zdolności do syntezy tego aminokwasu, którą mają szczyty niezmutowane. Dlatego do swojego rozwoju potrzebują dwóch związków organicznych, między innymi histydyny (histydyno-zależne, his⁻) czyli są tzw. auktotrofami. Pod wpływem czynnika mutagennego bakterie ulegają mutacji powrotnej, która przywraca im pierwotną zdolność do syntezy aminokwasu i umożliwia wzrost na podłożu bez tego związku. Są one wówczas histydyno-zależnymi prototrofami (his⁺) zdolnymi do pobierania histydyny z glukozy i soli mineralnych zawartych w pożywce (2). Do wykrywania efektu mutagennego znalazł zastosowanie krótkoterminowy bakteriologiczny test *Salmonella*, opracowany w latach siedemdziesiątych XX wieku przez amerykańskiego profesora Bruca Amesa. Krótkoterminowy test umożliwia wykrywanie potencjalnych mutagenów i kancerogenów. Ponadto wprowadzenie wariantu z aktywacją metaboliczną (S9) do testu daje możliwość przenoszenia wyników uzyskanych w teście bakteriologicznym na organizmy ssaków (1, 11–14).

Celem pracy było przeprowadzenie analizy aktywności mutagennej zanieczyszczeń zaadsorbowanych na cząstkach pyłu zawieszonego pobranych w sezonie jesiennym i zimowym w 6 wybranych miastach województwa śląskiego przechowywanych w temperaturze -80°C w postaci ekstraktów zawieszonych w rozpuszczalniku organicznym – dimetylosulfotlenku (DMSO).

Materiały i metody

Pobór i ekstrakcja prób pyłów zawieszonych

Spośród wielu miast województwa śląskiego wybrano 6 (Katowice, Bytom, Sosnowiec, Dąbrowa Górnicza, Częstochowa, Wodzisław Śląski), w których pobrane zostały próby pyłowych zanieczyszczeń powietrza. Czynniki, które w znacznym stopniu wpływają na skład pobieranego na filtry powietrza jest temperatura, skład chemiczny oraz miejsce poboru prób. Uwzględniając ten fakt próby pobrano oddzielnie w sezonie jesiennym i zimowym. Próby pyłowych zanieczyszczeń powietrza zostały pobrane na filtry z włókna szklanego za pomocą wysoko przepływowych aspiratorów HVS z częstotliwością 10 poborów 24-godzinnych na miesiąc, w dwóch sezonach: jesiennym (październik–grudzień) i zimowym (styczeń–marzec). Filtry z materiałem przeznaczonym do badań przechowywano w zamrażarce w temperaturze -20°C do momentu zebrania całego potrzebnego materiału badawczego. Po utworzeniu prób zbiorczych dla każdej miejscowości i sezonu przeprowadzono ekstrakcję prób chlorkiem metylenu w aparacie Soxhleta przez 8 godzin w ciemności. Następnie próby zagęszczano za pomocą wyparki próżniowej i odparowywano do sucha w atmosferze azotu. Suche ekstrakty rozpuszczano w DMSO i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu wykonania testu *Salmonella*.

Badanie efektu mutagennego powietrza

Badania ekstraktów pyłowych zanieczyszczeń powietrza pod względem mutagenności przeprowadzono przy użyciu krótkoterminowego testu *in vitro* z wykorzystaniem szczepu *Salmonella typhimurium* TA 98 i jego pochodnej YG 1041. W zależności od testowanego szczepu zastosowano odpowiednią objętość badanego powietrza (dla szczepu TA 98 to: 2,5 m³, 5,0 m³, 10,0 m³; natomiast dla szczepu YG 1041: 0,625 m³, 1,25 m³, 2,5 m³), w dwóch powtórzeniach i dwóch wariantach: bez (–S9) i z udziałem egzogenego systemu aktywacji metabolicznej (+S9). Test Amesa (*Salmonella*) przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną przez Maron i Ames (11).

Przed przystąpieniem do badań efektu mutagennego ekstraktów powietrza sprawdzono również markery genetyczne szczepów testowych m.in. kontrolując obecność mutacji w operonie histydyny, mutacji *rfa*, delekcji *uvrB* oraz plazmidów: pKM 101 i pYG 233. Sprawdzono również, poziom ich spontanicznej rewersji oraz liczbę rewertantów w kontroli negatywnej oraz pozytywnej. W kontrolach pozytywnych poziom rewertantów indukowa-

ny jest przez mutageny diagnostyczne działające bezpośrednio i pośrednio. Zastosowano mutageny diagnostyczne o działaniu bezpośrednim takie jak: 4 nitrocholino-N-tlenek (NQNO) dla szczepu TA 98 i 1-nitropiren (1NP) dla szczepu YG 1041, oraz o działaniu pośrednim z wykorzystaniem aktywacji metabolicznej: benzo(a)piren (B(a)P) dla szczepu TA 98 oraz 2-aminofluoren (2-AF) dla szczepu YG 1041. Głównym składnikiem egzogenego systemu aktywacji metabolicznej jest frakcja składająca się enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z wątroby szczura rasy Wistar. W celu zwiększenia aktywności enzymatycznej przeprowadza się indukcję enzymów wątrobowych przez dodanie indykatora, którym jest mieszanina polichlorowanych bifenyli zawartych w preparacie Aroclor 1254, który jest odpowiedzialny za indukcję enzymów oksydacyjnych.

Do sterylnych próbek umieszczonych w łaźni wodnej wprowadzono kolejno: odpowiednią ilość badanego ekstraktu powietrza rozpuszczonego w DMSO lub mutagenu diagnostycznego, 0,1 cm³ zawiesiny bakteryjnej, 2,5 cm³ top agaru, uzupełnionego śladowymi ilościami chlorowodoru L-histydyny i 0,5 cm³ S9-mix w wariacie z aktywacją metaboliczną (+S9). Mieszanina S9-mix zawierała: 8 mM MgCl₂, 33 mM KCl, 5 mM G-6-P, 4 mM NADP, 100 mM buforu fosforanowego o pH=7,4 oraz S9 w ilości zależnej od stężenia białka (0,04 cm³ na 1 cm³ mieszaniny). Zawartość próbek dokładnie mieszano i wylewano na powierzchnię płytki zawierającej agar minimalny. Płytki inkubowano w temp. +37°C przez 48 godzin dla szczepu TA 98 oraz 72 godziny dla szczepu YG 1041, a następnie liczono kolonie histydyno-niezależnych rewertantów za pomocą automatycznego licznika kolonii. Analiza ta polegała na określeniu liczby rewertantów spontanicznych oraz rewertantów w kontrolach pozytywnych i kontrolach negatywnych.

Ocenę otrzymanych wyników do założonego modelu liniowej zależności dawka – odpowiedź (objętość powietrza – liczba kolonii rewertantów) przeprowadzono testem nieparametrycznym Wilcozona, wykorzystując analizę regresji oraz analizę wariancji z założonym poziomem istotności. Zgodnie z piśmiennictwem przedmiotu oraz założonym poziomem istotności uznano, że efekt mutageny dla niskich dawek ekstraktów powietrza stosowanych w teście Ames jest w przybliżeniu liniowy. Dla każdego ekstraktu na podstawie zależności dawka – odpowiedź, obliczono równanie ekstrapolacji wyrażone funkcją $y = ax + b$, w którym y (zmienna zależna) to oczekiwana liczba rewertantów, x (zmienna niezależna) to badane dawki ekstraktu powietrza, a jest to liczba rewertantów w kontroli negatywnej oraz b to nachylenie krzywej badanej zależności. W oparciu

o parametry równania obliczono przewidywaną liczbę kolonii rewertantów indukowanych przez 1 m³ powietrza i obliczono aktywność mutageną (AM). Efekt mutageny oceniono na podstawie aktywności mutagennej, czyli względnej miary mutagenności, która jest ilorazem liczby netto kolonii rewertantów do liczby kolonii w kontroli negatywnej.

Oceny efektu mutagennego ekstraktów powietrza dokonano w następujący sposób:

1. Zbadano zależność liniową dawka – odpowiedź,
2. Obliczono aktywność mutageną 1 m³ powietrza (AM/1 m³), uwzględniającego liczbę rewertantów w kontroli negatywnej, według podanego wzoru:

$$AM = \frac{LR/1 \text{ m}^3 - LR \text{ w kontroli negatywnej}}{LR \text{ w kontroli negatywnej}}$$

Zgodnie z danymi piśmiennictwa przedmiotu oraz własnymi doświadczeniami w niniejszej pracy przyjęto następujące kryteria klasyfikacji efektu mutagennego powietrza w przeliczeniu na 1 m³ przepuszczonego przez filtr powietrza. Zgodnie z procedurą (Tab. I) za mutagenne uznano te próby, które wykazywały co najmniej dwukrotny wzrost liczby rewertantów w stosunku do kontroli i wykazywały liniową zależność dawka – odpowiedź (11).

Tabela I. Zastosowana klasyfikacja aktywności mutagennej (AM).

Próba	Wartość AM
nie mutagenna	AM < 1
słabo mutagenna	1 ≤ AM < 2
silnie mutagenna	AM ≥ 2

Wyniki badań

Wyniki analizy efektu mutagennego ekstraktów zanieczyszczeń zaadsorbowanych na cząstkach pyłu zawieszonego zwanych dalej pyłowymi zanieczyszczeniami powietrza badanych za pomocą szczepu TA 98 przedstawiono w tabeli II, natomiast dla szczepu YG 1041 w tabeli III. Na potrzeby dyskusji służącej porównaniu wyników uzyskanych w niniejszej pracy z wynikami innych badaczy, w tabelach poza wartościami aktywności mutagennej, przedstawiono również średnią liczbę kolonii rewertantów netto (LR) stwierdzoną podczas analizy pyłowych zanieczyszczeń powietrza w wybranych miejscowościach za pomocą testu *Salmonella*.

W ekstraktach pobranych w sezonie jesiennym testowanych przy użyciu szczepu TA 98 w wariacie bez aktywacji metabolicznej (–S9) wszystkie próby wykazywały słabą lub silną aktywność mutagen-

ną. Najwyższą wartość AM zanotowano w Wodzisławiu Śląskim (AM=4,52), natomiast najniższa aktywność mutagenna została zaobserwowana w Częstochowie i Dąbrowie Górniczej (AM=1,43). Po zastosowaniu aktywacji metabolicznej (+S9) w próbach zauważono wzrost aktywności mutagennej we wszystkich miastach. We wszystkich miastach stwierdzono bardzo wysoki efekt mutageny, przy czym najwyższa wartość AM została wykazana w Wodzisławiu Śląskim (AM=11,43), a najniższa w Częstochowie (AM=4,90).

Tabela II. Wyniki aktywności mutagennej i liczby rewertantów otrzymane dla ekstraktów pyłowych zanieczyszczeń powietrza testowanych przy użyciu szczepu *Salmonella typhimurium* TA 98.

	Aktywność mutagenna (AM/lm ³)			
	Sezon jesienny		Sezon zimowy	
	(-S9)	(+S9)	(-S9)	(+S9)
Częstochowa	1,43	4,90	0,77	2,68
Sosnowiec	1,86	5,67	0,97	2,71
Bytom	4,38	9,76	1,39	3,85
Dąbrowa Górnicza	1,43	5,05	1,10	3,44
Wodzisław Śląski	4,52	11,43	0,97	3,44
Katowice	3,29	8,43	2,00	4,44
	Średnia liczba rewertantów (LR/lm ³)			
	Sezon jesienny		Sezon zimowy	
	(-S9)	(+S9)	(-S9)	(+S9)
Częstochowa	51	124	50	125
Sosnowiec	60	140	61	126
Bytom	112	225	74	165
Dąbrowa Górnicza	51	127	65	151
Wodzisław Śląski	116	260	67	151
Katowice	90	198	93	185

(-S9) wariant bez aktywacji metabolicznej; (+S9) wariant z aktywacją metaboliczną

Dla ekstraktów pobranych w sezonie zimowym zaobserwowano znacznie niższe wartości aktywności mutagennej badanej za pomocą szczepu TA 98, zarówno w wariacie bez aktywacji, jak i z aktywacją metaboliczną, w porównaniu do prób z sezonu jesiennego. W wariacie bez aktywacji metabolicznej stwierdzono, iż w 3 miejscowościach: Częstochowie, Sosnowcu i Wodzisławiu, próby pobrane w sezonie zimowym nie wykazały właściwości mutagennej badanych szczepem TA 98. Natomiast

najniższe wartości AM odnotowano w Częstochowie, gdzie wynosiła ona w zależności od wariantu testu: 0,77 (-S9) i 2,68 (+S9). Najwyższe wartości AM odnotowano w Katowicach zarówno dla prób bez aktywacji metabolicznej (AM=2,00), jak i z aktywacją (AM=4,44).

Tabela III. Wyniki aktywności mutagennej i liczby rewertantów otrzymane dla ekstraktów pyłowych zanieczyszczeń powietrza testowanych przy użyciu szczepu *Salmonella typhimurium* YG 1041.

	Aktywność mutagenna (AM/lm ³)			
	Sezon jesienny		Sezon zimowy	
	(-S9)	(+S9)	(-S9)	(+S9)
Częstochowa	8,75	8,04	7,12	6,55
Sosnowiec	10,17	8,70	8,06	6,31
Bytom	10,58	8,51	7,78	6,86
Dąbrowa Górnicza	9,71	9,06	7,38	7,46
Wodzisław Śląski	10,35	8,43	7,01	7,55
Katowice	10,87	8,77	7,34	7,86
	Średnia liczba rewertantów (LR/lm ³)			
	Sezon jesienny		Sezon zimowy	
	(-S9)	(+S9)	(-S9)	(+S9)
Częstochowa	1462	1211	1429	1162
Sosnowiec	1675	1300	1595	1125
Bytom	1737	1275	1545	1211
Dąbrowa Górnicza	1606	1348	1475	1304
Wodzisław Śląski	1702	1264	1409	1318
Katowice	1783	1309	1467	1363

(-S9) wariant bez aktywacji metabolicznej; (+S9) wariant z aktywacją metaboliczną

Analizując liczbę badanych ekstraktów oraz ich procentowy udział ze względu na aktywność mutagenną stwierdzono, że w ekstraktach pochodzących z sezonu jesiennego w wariacie bez aktywacji metabolicznej 50% badanych ekstraktów stanowiły próby słabo mutagenne i 50% silnie mutagenne, natomiast w wariacie +S9 100% stanowiły próby silnie mutagenne. W przypadku analizy ekstraktów pochodzących z sezonu zimowego w wariacie -S9 50% stanowiły ekstrakty nie mutagenne, 33% słabo mutagenne i 17% stanowiły ekstrakty silnie mutagenne. Natomiast w wariacie +S9 wszystkie (100%) testowane ekstrakty pochodzące z sezonu zimowego wykazywały właściwości silnie mutagenne (Tab. IV).

Tabela IV. Udział procentowy prób mutagennych i nie mutagennych badanych przy użyciu szczepu *Salmonella typhimurium* TA 98.

Próba	Sezon jesienny		Sezon zimowy	
	(-S9) n (%)	(+S9) n (%)	(-S9) n (%)	(+S9) n (%)
niemutagenna	0 (0)	0 (0)	3 (50)	0 (0)
słabo mutagenna	3 (50)	0 (0)	2 (33)	0 (0)
silnie mutagenna	3 (50)	6 (100)	1 (17)	6 (100)

(-S9) wariant bez aktywacji metabolicznej; (+S9) wariant z aktywacją metaboliczną

Szczep YG 1041 był bardziej skuteczny w wykrywaniu efektu mutagennego pyłowych zanieczyszczeń powietrza, gdzie niezależnie od sezonu poboru prób oraz zastosowanego wariantu testu (-S9) wszystkie próby (100%) były silnie mutagenne ($AM > 2$). Dla ekstraktów pochodzących z sezonu jesiennego najniższą wartość AM odnotowano w Częstochowie zarówno w próbach: bez aktywacji ($AM = 8,75$), jak i z aktywacją metaboliczną ($AM = 8,04$). Natomiast najwyższe wartości AM zostały stwierdzone w Katowicach ($AM = 10,87$) i w Dąbrowie Górniczej ($AM = 9,06$) dla wariantu bez mieszaniny S9. Zastosowanie frakcji mikrosomalnej S9 w przypadku tego szczepu spowodowało nieznaczny spadek aktywności mutagennej we wszystkich badanych próbach. Szczep YG1041 był bardziej efektywny w wariancie bez aktywacji metabolicznej (-S9) dla ekstraktów pochodzących z sezonu jesiennego (Tab. II). Wysoką aktywność mutagenną ($AM > 2$) wykazały wszystkie próby pobrane w sezonie zimowym testowane przy użyciu szczepu YG 1041 w obu badanych wariantach (-S9). Ekstrakty prób pobrane w Sosnowcu wykazywały najwyższą aktywność mutagenną w wariancie bez aktywacji ($AM = 8,06$) i najniższą aktywność mutagenną w wariancie z aktywacją ($AM = 6,31$). Natomiast najniższą wartość AM w wariancie bez aktywacji zanotowano w Wodzisławiu Śląskim ($AM = 7,01$). Najwyższą AM w wariancie z aktywacją zanotowano w Katowicach ($AM = 7,86$). W przypadku trzech ekstraktów pyłowych zanieczyszczeń powietrza pochodzących z Częstochowy, Sosnowca i Bytomia zastosowanie frakcji mikrosomalnej S9 spowodowało nieznaczny spadek aktywności mutagennej, a w pozostałych ekstraktach minimalny wzrost aktywności mutagennej.

Dyskusja

Określenie rodzaju substancji odpowiedzialnych za mutagenność powietrza jest niezwykle trudne, ze względu na złożony skład chemiczny ekstraktów,

który uniemożliwia jednoznaczne wykrycie i identyfikację poszczególnych związków. Analiza mutagenności ekstraktów pyłu zawieszonego zaprezentowana w niniejszej pracy została przeprowadzona poprzez badanie biologicznej aktywności ekstraktów z wykorzystaniem szczepu *Salmonella typhimurium* TA 98 oraz jego pochodnej YG 1041. Mutagenność pyłowych zanieczyszczeń powietrza została stwierdzona przez wielu autorów badających ekstrakty powietrza za pomocą testu *Salmonella* zarówno w Polsce, jak i na świecie (13, 15–19). Mutagenność ekstraktów powietrza w dużej mierze powiązana jest ze stężeniem w atmosferze benzo(a)pirenu, co stwierdzono w badaniach powietrza na Górnym Śląsku i we Wrocławiu (1, 4, 5, 14–17). Zastosowanie szczepu standardowego TA 98 razem z jego pochodną: szczepem YG 1041 w przeprowadzonych badaniach dało możliwość analizowania wyników efektu mutagennego pyłowych zanieczyszczeń powietrza pod względem zróżnicowania wrażliwości oraz mechanizmu działania poszczególnych mutagenów. Wielu naukowców stosuje takie połączenie szczepu standardowego z jego pochodną umożliwiającą wykrywanie nitrowych i aminowych pochodnych WWA (14, 15, 17, 20). Zastosowanie dwóch szczepów *Salmonella typhimurium* w niniejszych badaniach pozwoliło na wstępne rozpoznanie związków odpowiedzialnych za efekt mutageny pyłów zawieszonych w powietrzu na terenie aglomeracji śląskiej. Dla prób pobranych w sezonie jesiennym zaobserwowano przewagę mutagenów działających pośrednio. Natomiast za efekt mutageny prób pobieranych w sezonie zimowym odpowiedzialne były nitroareny, z których większość to związki działające bezpośrednio.

Brak jest jednolitej metody przedstawiania wyników testu *Salmonella*. Wielu autorów dokonuje oceny efektu mutagennego posługując się liczbą kolonii rewertantów netto (LR; różnica między liczbą rewertantów indukowanych przez badany ekstrakt i rewertantów spontanicznych) w przeliczeniu na objętość powietrza, inni natomiast określają aktywność mutagenną (AM). Przeliczenie wyników na 1 m^3 lepiej wyraża potencjał mutageny prób powietrza (20).

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że aktywacja za pomocą enzymów mikrosomalnych pochodzących z homogenatu wątroby ssaka powodowała istotny wzrost odpowiedzi mutagennej szczepu TA 98 w odniesieniu do wszystkich przechowywanych w DMSO ekstraktów, pochodzących z badanych sezonów. Przeprowadzone badania wykazały jednoznacznie, że w strefie klimatu umiarkowanego, zarówno w sezonie jesiennym, jak i zimowym mutagenność pyłu zawieszonego w atmosferze jest bardzo wysoka. Prawidłowość taką poza obsza-

rem Górnego Śląska zaobserwowano również we Wrocławiu oraz w uprzemysłowionych regionach Republiki Czeskiej, Włoch i Japonii (16, 17, 19, 21, 22). We włoskich miastach: Piacenza, Modena i Bologna liczba rewertantów w sezonie jesiennym była na podobnym poziomie, jak dla badanych ekstraktów pochodzących z Częstochowy i Dąbrowy Górniczej. Natomiast w sezonie zimowym ekstrakty powietrza pochodzące z miast województwa śląskiego wykazywały wyższą liczbę rewertantów niż próby powietrza pobrane we włoskim regionie Emilia-Romagna (19). Dużo bardziej zanieczyszczonym terenem okazał się natomiast przemysłowy region Japonii, gdzie średnia liczba kolonii rewertantów indukowanych przez ekstrakty pyłowych zanieczyszczeń powietrza była trzykrotnie wyższa ($565\text{LR}/\text{m}^3$) niż na terenie badanych sześciu miast województwa śląskiego ($179\text{LR}/\text{m}^3$) (22).

Tokiwa i wsp. przedstawili klasyfikację (Tab. V) terenów pod względem liczby kolonii rewertantów szczepu TA 98 indukowanych przez 1 m^3 powietrza w wariancie z aktywacją metaboliczną (22).

Tabela V. Klasyfikacja stanu zanieczyszczenia terenu zaproponowana przez Tokiwa i wsp. (22) ze względu na liczbę kolonii rewertantów (LR) dla szczepu TA 98.

Klasa	LR/m ³	Stan zanieczyszczenia terenu
A	<2,3	niezanieczyszczony
B	2,4–8,6	słabo zanieczyszczony
C	8,7–30,2	średnio zanieczyszczony
D	30,3–115	znacznie zanieczyszczony
E	>115	silnie zanieczyszczony

Zgodnie z zamieszczoną klasyfikacją (Tab. V) wszystkie badane ekstrakty niezależnie od miejsca poboru czy sezonu zakwalifikowano do klasy E. Jest to dowód wskazujący na silne zanieczyszczenie badanego regionu związkami mutagennymi o działaniu pośrednim.

Poziom aktywności mutagennej wykrywanej szczepem YG 1041 nie zależał od miejsca poboru próby. We wszystkich badanych ekstraktach zaobserwowano bardzo wysokie wartości LR/ 1 m^3 . Szczep YG 1041 jest bardziej czuły w wykrywaniu mutagenów działających bezpośrednio (np. NWWA) nie wymagających aktywacji metabolicznej. Wykrywanie powyższych związków jest bardziej skuteczne dzięki plazmidowi pYG233 oraz wielokrotnie kopii genów: nitroreduktazy i O-acetylotransferazy. Potwierdzają to wyniki uzyskane przez wielu badaczy w różnych testach zarów-

no w standardowym teście Ames, jak i w teście preinkubacyjnym (13–15, 23). Liczba kolonii rewertantów indukowana przez ekstrakty pyłowych zanieczyszczeń przechowywane w DMSO badana szczepem YG 1041 była niższa w zimie, zwłaszcza w wariancie z aktywacją, co świadczy nie tylko o ilościowych różnicach między sezonami grzewczymi, ale również o zmianach jakościowych mieszaniny mutagennej, jaką jest ekstrakt pyłów zawieszonych. Jest to dowód na to, że w składzie ekstraktów pochodzących z tego sezonu znajduje się więcej nitrowych związków aromatycznych. Hydroksyloaminy i aminy aromatyczne mogą być nieobecne, co jest zgodne z danymi z piśmiennictwa (23–25).

Zaobserwowany wzrost liczby rewertantów w wariancie –S9, zarówno w sezonie jesiennym, jak i zimowym, może być spowodowany wymywaniem z ekstraktów przez dimetylosulfotlenek mutagenów działających bezpośrednio. Ekstrakty te, zostały przygotowane z prób powietrza pobranych w miastach centralnej części województwa śląskiego, które należą do najbardziej zanieczyszczonych w całym regionie. Można przypuszczać, iż w ekstraktach tych znalazła się większa ilość nitrowych i aminowych pochodnych WWA, co potwierdziły dużo wyższe wartości AM dla szczepu YG 1041.

Pomimo tego, że na terenie województwa śląskiego jakość powietrza atmosferycznego ulega stopniowej poprawie, jest ona nadal niezadowalająca, zwłaszcza w centralnej części aglomeracji. Występują tu znaczne przekroczenia wartości stężeń B(a)P, które na wielu stanowiskach pomiarowych wielokrotnie przekraczają wartości najwyższych dopuszczalnych stężeń. Uzyskane wyniki przedstawione w tej pracy oraz wyniki uzyskane przez innych badaczy wskazują na duże narażenie mieszkańców różnych miast w kraju i na świecie na substancje mutagenne i kancerogenne. Mieszkańcy centrum konurbacji śląskiej są bardziej narażeni na działanie genotoksyczne zanieczyszczeń zaadsorbowanych na pył zawieszonym, podobnie jak mieszkańcy dużych miast we Włoszech czy centrum Wrocławia, gdzie prowadzono badania efektu mutagennego (1, 3, 5, 14–16, 19). Ze względu na duże narażenie na czynniki środowiskowe należy zwrócić większą uwagę na wprowadzenie do monitoringu środowiska badań genotoksyczności pyłowych zanieczyszczeń powietrza, co może stanowić podstawę do szacowania ryzyka zachorowalności na choroby nowotworowe.

Wnioski

1. Ekstrakty pyłowych zanieczyszczeń powietrza testowane za pomocą testu *Salmonella* przy użyciu szczepu TA 98 i jego pochodnej szczepu YG

- 1041, charakteryzował wysoki poziom efektu mutagennego oraz wysoka średnia liczba rewertantów netto w 1 m³.
2. Wyniki testu *Salmonella* przy użyciu szczepu TA 98 badanych ekstraktów pochodzących z sezonu jesiennego i zimowego wykazały, że efekt mutageny wywołują głównie związki o działaniu pośrednim, wymagające tzw. aktywacji metabolicznej.
 3. Dla ekstraktów z sezonu jesiennego stwierdzono, iż szczep YG 1041 jest dobrym indykatorem efektu mutagennego powodowanego przez zawarte w pyłe zawieszonym związki działające bezpośrednio (niewymagające aktywacji metabolicznej).
 4. Test *Salmonella* jest miarodajnym i efektywnym testem, który może być wykorzystywany w badaniach monitoringu jakości powietrza atmosferycznego.

Wyniki zaprezentowanej pracy zostały uzyskane w oparciu o materiał badawczy będący własnością Zakładu Toksykologii Genetycznej, Instytutu Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego w Sosnowcu. Przedstawione wyniki stanowią część pracy inżynierskiej wykonanej na Wydziale Inżynierii i Ochrony Środowiska, Politechniki Częstochowskiej.

Wykaz piśmiennictwa

1. Piekarska K., Karpińska-Smulikowska J.: Wpływ indukcji frakcji mikrosomalnej na wykrywalność mutagennych zanieczyszczeń powietrza frakcji PM10 bakteryjnym testem Ames (w:) Musialik-Piotrowska A., Rutkowski J. (ed.): Ochrona powietrza atmosferycznego. Osiągnięcia w nauce, energetyce i przemyśle. Politechnika Wroclawska, Wroclaw 2006: 175-180.
2. Kołwzan B., Pawlaczek-Szpilowa M., Adamiak W.: Bioindykacja zanieczyszczeń mutagennych i rakotwórczych w próbach środowiskowych (w:) Zwoździak J. (ed.): Człowiek, środowisko, zagrożenie. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wroclawskiej, Wroclaw 2002: 165-181.
3. Krogulski A., Borkowska M.: Metoda oznaczania aktywności mutagennej substancji smołowych zawartych w pyłach powietrza atmosferycznego. Rocznik PZH, Warszawa 1996; 47, 2: 176-180.
4. Mielżyńska D., Siwińska., Kapka L.: Efekt mutageny frakcji PM10 pyłów zawieszonych na obszarze województwa śląskiego. Materiały konferencyjne V Krajowej Konferencji Polskiego Towarzystwa Medycyny Środowiskowej. Medycyna Środowiskowa, Sosnowiec 2002; 5, 1: 57-58.
5. Kapka L., Mielżyńska D., Siwińska E.: Ocena sezonowej i przestrzennej zmienności stężeń PM10 oraz wybranych WWA w powietrzu atmosferycznym województwa śląskiego. Medycyna Środowiskowa, Sosnowiec 2004; 7, 1: 25-31.
6. Bezak-Mazur E.: Elementy toksykologii środowiskowej. Wydawnictwo Politechniki Świętokrzyskiej, Kielce 2001; 372: 69-80.
7. Bartosz G.: Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. Wydawnictwo naukowe PWN, Warszawa 2006: 289-290.
8. Jarosińska D., Biesiada M., Dąbkowska B., i wsp.: Środowiskowe zagrożenia zdrowia w Polsce – wybrane zagadnienia. Informator dla administracji rządowej i samorządowej. IMPiZŚ, Sosnowiec 2001: 1-62.
9. Barański B., Sitarek K.: Zagrożenie substancjami aktywnymi genetycznie w środowisku pracy. Sekcja Wydawnictw Instytutu Medycyny Pracy w Łodzi, 1995; 5-61.
10. Sadowska A., Obidowska G., Rumowska M.: Ekotoksykologia. Toksyczne czynniki środowiskowe i metody ich wykrywania. Wydawnictwo SGGW, Warszawa 2000; 43-112.
11. Maron D.M., Ames B.N.: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. Mutat Res 1983; 113: 173-215.
12. Claxton L.D., Matthews P.P., Warren S.H.: The genotoxicity of ambient outdoor air, a review: *Salmonella* mutagenicity. Mutat Res 2004; 567: 347-399.
13. Mielżyńska D., Siwińska., Kapka L.: Efekt mutageny pyłów zawieszonych jako wskaźnik jakości powietrza. Wydawnictwo IMPiZŚ, Sosnowiec 2002.
14. Karpińska-Smulikowska J., Piekarska K.: Zastosowanie testu preinkubacyjnego jako metody zwiększenia wykrywalności mutagennych zanieczyszczeń w powietrzu aglomeracji miejskiej bakteryjnym testem Ames (Testem *Salmonella*), Medycyna Środowiskowa, Sosnowiec 2006; 9, 2: 85-93.
15. Bubak A.: Szczepy *Salmonella typhimurium* o różnicowanym poziomie enzymów nitroreduktazy i O-acetylotransferazy jako indykatory efektu mutagennego wywołanego przez zanieczyszczenia pyłowe. Praca doktorska. Śląska Akademia Medyczna, Sosnowiec 1998.
16. Jadczyk P.: Mutagenność pyłowych zanieczyszczeń powietrza w środowisku miejskim. Praca doktorska. Politechnika Wroclawska, Wroclaw 2000.
17. Rossi C., Polii P., Buschini A., i wsp.: 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.
18. Fukino H., Mitura S., Inoue K., i wsp.: Mutagenicity of airborne particles. Mutat Res 1982; 102: 237-247.
19. Cassoni F., Bocchi C., Martino A., i wsp.: The *Salmonella* mutagenicity of urban airborne particulate matter (PM2,5) from eight sites of the Emilia-Romagna regional monitoring network (Italy). Sci Total Environ 2004; 324: 79-90.
20. Müller M., Altfheim I.: Mutagenicity and PAH-analysis of airborne particulate matter. Atmos Environ 1980; 14: 83-88.
21. Binkova B., Vesely D., Vesela D., i wsp.: Genotoxicity and embryotoxicity of urban air particulate matter collected during winter and summer period in to different districts of the Czech Republic. Mutat Res 1999; 440: 45-58.
22. Tokiwa H., Kitamori S., Horikawa K., i wsp.: Some findings on mutagenicity in airborne particulate pollutants. Environ Mutagen 1983; 5: 87-100.
23. Hagiwara Y., Watanabe M., Oda Y., i wsp.: Specificity and sensitivity of *Salmonella typhimurium* YG1041 and YG1042 strains possessing elevated levels of nitroreductase and acetyltransferase activity. Mutat Res 1993; 291: 171-180.
24. Watanabe M., Ishidate M.Jr., Tahomi T.: Sensitive method for detection of mutagenic nitroarenes and aromatic amines: New derivatives of *Salmonella typhimurium* tester strains possessing elevated-acetyltransferase levels. Mutat Res 1990; 234: 337-348.
25. Hayakawa K., Kawaguchi Y., Murahashi T. i wsp.: Distribution of nitropyrenes and mutagenicity in airborne particulates collected with an Andersen sampler. Mutat Res 1995; 348: 57-61.

Adres do korespondencji:

inż. Agnieszka Kozłowska

Zakład Toksykologii Genetycznej

Instytut Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego

ul. Kościelna 13; 41-200 Sosnowiec

tel. (032) 266 08 85 wew. 194; fax (032) 266 11 24

e-mail: a.kozlowska@imp.sosnowiec.pl