

Słowa kluczowe: odcieki ze składowisk komunalnych, genotoksyczność, test mikrojądrowy

Joanna KALKA*, Aleksandra OŚLIŚŁOK*, Joanna SURMACZ-GÓRSKA*,
Sylwia FUDALA-KSIAŻEK**

WYKORZYSTANIE TESTU MIKROJĄDROWEGO DO OCENY GENOTOKSYCZNOŚCI ODCIEKÓW ZE SKŁADOWISK ODPADÓW

Genotoksyczność odcieków badano za pomocą testu cytogenetycznego na podstawie zmiany częstości powstawania mikrojąder w komórkach korzeni *Vicia faba*. Odcieki pobierane do badań pochodziły ze składowiska „młodego”, którego okres eksploatacji nie przekraczał 2 lat. Podczas badań wykazano istotną zależność pomiędzy częstością powstawania mikrojąder i aberracji chromosomowych, a stężeniem odcieków. Stwierdzono, iż test mikrojądrowy może być skutecznym narzędziem w monitorowaniu genotoksyczności prób środowiskowych.

1. WPROWADZENIE

W ostatnich latach obserwuje się wzrost zanieczyszczenia środowiska substancjami genotoksycznymi, oraz rosnącą ich koncentrację w ściekach miejskich i przemysłowych oraz, jak można sądzić w odciekach ze składowisk odpadów [4,6]. Ścieki miejskie i przemysłowe po oczyszczeniu są odprowadzane najczęściej do wód powierzchniowych. Z kolei odcieki ze składowisk odpadów najczęściej są w Polsce oczyszczane wraz ze ściekami miejskimi w komunalnych oczyszczalniach ścieków. Znaczna część pochodzących z odcieków związków refrakcyjnych nie jest usuwana, a jedynie rozcieńczana i opuszcza oczyszczalnię wraz z odpływem. Istnieje zatem niebezpieczeństwo, iż związki te mogą stanowić zagrożenie dla organizmów w ekosystemie wodnym, jak również dla człowieka, poprzez akumulację w łańcuchu pokarmowym. Genotoksyczność ścieków miejskich i przemysłowych oraz osadów ściekowych została stwierdzona przez wielu autorów w testach z wykorzystaniem takich organizmów jak: ryby (np. *Tilapia rendalli* czy *Oreochromis niloticus*), bakterie (*Salmonella thypimurium*, *Bacillus subtilis*) oraz rośliny (*Allium cepa* i *Vicia faba*) [1,3,4,8,9].

* Politechnika Śląska, Katedra Biotechnologii Środowiskowej

Testy z wykorzystaniem roślin mogą stanowić interesującą alternatywę testów bardziej konwencjonalnych. Jak wynika z badań Fiskesjo, testy z wykorzystaniem roślin wykazują większą wrażliwość na obecność niektórych zanieczyszczeń w porównaniu z testem Ames [2]. Ponadto ekspozycja organizmów w systemach wykorzystujących rośliny może być przeprowadzana w warunkach laboratoryjnych jak również *in situ*. Jest to szczególnie ważne podczas oceny genotoksyczności prób środowiskowych, do których należą odcieki ze składowisk odpadów.

2. MATERIAŁY I METODY

2.1. POCHODZENIE ODCIEKÓW

Odcieki do badań pobrano z dwóch składowisk odpadów komunalnych zlokalizowanych na terenie Górnośląskiego Okręgu Przemysłowego. Odcieki pochodzące ze składowiska w Gliwicach (seria I – marzec; seria II- czerwiec) zostały pobrane ze zbiornika retencyjnego, do którego spływają odcieki powstające w eksploatowanym w składowisku i sąsiadującym z nim obiekcie poddawanych rekultywacji. Próby z Gliwic stanowiły więc mieszaninę odcieków z młodego i starego składowiska. W Zabrze odcieki zostały pobrane osobno ze składowiska młodego i składowiska wyłączzonego z eksploatacji (seria III – składowisko stare, czerwiec; seria IV składowisko młode, czerwiec).

Próby zostały pobrane do pojemników z tworzywa sztucznego i przewiezione do laboratorium. Testy genotoksyczności prowadzono natychmiast po otrzymaniu prób, lub w razie konieczności, odcieki przechowywano w ciemności, w temperaturze 4⁰C.

2.2. ANALIZA FIZYKO-CHEMICZNA

W pobranych próbach oznaczono podstawowe parametry fizyko-chemiczne: BZT₅ (za pomocą urządzenia OxiTop firmy WTW), rozpuszczony węgiel organiczny – RWO (za pomocą urządzenia TOC -Shimadzu), azot amonowy (metodą kolorymetryczną bezpośredniej nesslerizacji).

2.3. TEST MIKROJĄDROWY

Do oceny własności genotoksycznych pobranych odcieków wybrano test z wykorzystaniem komórek stożka wzrostu korzenia wyki zwyczajnej (*Vicia faba*) [5,8]. Test ten pozwalał na obserwację zmiany indeksu mitotycznego (czyli stosunku ilości komórek będących w trakcie podziału do całkowitej ilości komórek w próbce) oraz częstości występowania mikrojąder pod wpływem ekspozycji roślin na próby odcieków ze składowisk. Jako kontrolę pozytywną stosowano roztwór hydrazynu maleinowego o stężeniu 1,12 mg/l; kontrolę negatywną stanowiła odchlorowana woda

wodociągowa. O własnościach genotoksycznych prób świadczyło pojawianie się mikrojąder w korzeniach roślin oraz obniżenie indeksu mitotycznego.

3. WYNIKI BADAŃ

Wyniki analizy fizyko-chemicznej przedstawione zostały w tabeli 1. Wartości wskaźników fizyko-chemicznych różniły się zasadniczo dla różnych partii odcieków. Próby pobrane z SOK w Gliwicach charakteryzowały się znacznie mniejszą zawartością związków organicznych i azotu amonowego, niż próby ze składowiska młodego w Zabrze. Dodatkowo próby marcowe były znacznie rozcieńczone wodami opadowymi. Mimo tego, odcieki charakteryzowały się podobną podatnością na biodegradację i pośrednio biodostępnością; wartość wskaźnika BZT₅/ChZT była zbliżona i wynosiła 0,61–0,7 co odpowiada podatności na biodegradację ścieków bytowo-gospodarczych.

Tab. 1. Parametry fizyko-chemiczne odcieków

Parametr	Jednostka	Odcieki			
		I	II	III	IV
BZT ₅	[mgO ₂ /dm ³]	106,4	296,4	1 008,0	6 622,0
ChZT	[mg/dm ³]	152,0	425,6	1 640,0	9460,0
RWO	[mgC/l]	133,4	119,5	701,9	4403,0
N-NH ₄	[mgN-NH ₄ /l]	25,4	142,0	220,4	703,2
BZT ₅ /ChZT		0,7	0,69	0,61	0,7

Test genotoksyczności umożliwił prowadzenie obserwacji zmian indeksu mitotycznego (IM - tab. 2) oraz częstości pojawiania się mikrojąder (MN- tab. 3). Zmiany wartości indeksu mitotycznego określone dla serii I były niewielkie i statystycznie nieistotne (test Dunetta; p<0,05) w stosunku do wartości IM w kontroli negatywnej (KN). Jednak odcieki pobrane z tego samego miejsca w okresie o niewielkiej ilości opadów – seria nr II– istotnie wpływały na obniżenie częstości podziału komórek korzenia *Vicia faba*. Istotne różnice pomiędzy wartościami IM w kontroli negatywnej obserwowano także dla pozostałych prób odcieków tj. III i IV. Najwyższe stężenia odcieków serii IV działały silnie toksycznie na rośliny powodując ich obumieranie.

Średnia liczba mikrojąder obserwowana w nierozcieńczonych próbach odcieków I–III stanowiła 2,7–9,5% liczby mikrojąder obserwowanych w próbach kontroli pozytywnej (KP), którą stanowił roztwór hydrazynu maleinowego (tab. 3). Dla odcieków IV serii w najwyższym badanym stężeniu (25%) pojawiało się średnio 6% mikrojąder w stosunku do próby kontrolnej. Porównując liczbę mikrojąder dla kontroli pozytywnej można stwierdzić znaczne różnice w kolejnych seriach badań. Podobne zjawisko obserwował Ma i wsp. [5] oraz Rank [7], którzy wskazywali na

dalszą potrzebę standaryzacji testu. Dla każdej serii badań konieczne było równoległe prowadzenie kontroli pozytywnej i negatywnej. Własności genotoksyczne prób nie powinny być charakteryzowane na podstawie liczby mikrojąder, lecz na podstawie ich stosunku do kontroli pozytywnej.

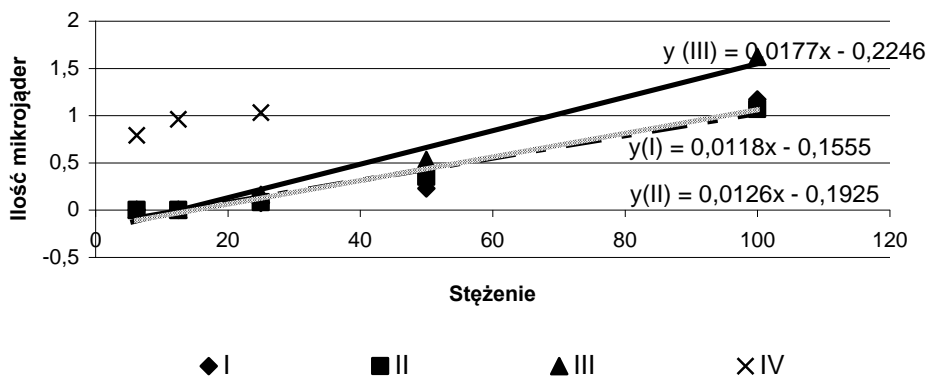
Tab. 2. Wpływ odcieków na częstość podziału komórek stożka wzrostu korzenia *Vicia faba* (liczba powtórzeń dla danego stężenia n=12, ilość obserwowanych komórek w każdym powtórzeniu k= 1000; KN – kontrola negatywna, KP – kontrola pozytywna)

Stężenie [%]	Średnia wartość indeksu mitotycznego (IM) komórek korzeni <i>Vicia faba</i> % ($X \pm SD$)			
	I	II	III	IV
KN	14,67 ± 5,63	18,15 ± 4,08	13,64 ± 3,99	13,64 ± 3,99
KP	0,66 ± 1,23	0,17 ± 0,36	0,04 ± 0,07	0,04 ± 0,07
100	12,44 ± 2,99	9,33 ± 3,23	5,33 ± 2,14	-
50	14,37 ± 5,81	13,43 ± 3,01	5,94 ± 1,78	-
25	11,59 ± 2,84	14,15 ± 2,55	7,86 ± 3,32	1,61 ± 0,68
12,5	12,12 ± 3,656	17,50 ± 5,57	8,02 ± 3,11	3,84 ± 2,46
6,25	13,73 ± 5,92	18,87 ± 6,09	10,75 ± 3,27	5,16 ± 1,78

Określono zależność pomiędzy liczbą mikrojąder i stężeniem odcieków w próbce. Dla wszystkich serii badań zależność ta kształtowała się liniowo (rys. 1). Przebieg krzywych serii I i II był w zasadzie identyczny i zbliżony do przebiegu krzywej dla odcieków ze składowiska starego w Zabrze (seria III). Wartość współczynnika korelacji Pearsona (r) wynosiła dla wyznaczonych krzywych odpowiednio (I) 0,964; (II) 0,988 i (III) 0,990. Obserwowano także zależność pomiędzy stężeniem odcieków serii IV, a częstością pojawiania się mikrojąder, jednak ze względu na toksyczne działanie odcieków obserwacje przeprowadzono tylko dla 3 najniższych stężeń odcieków, dlatego też na podstawie uzyskanych wyników nie można wnioskować o liniowym charakterze tej zależności.

Tab. 3. Wpływ odcieków na częstość występowania mikrojąder w komórkach stożka wzrostu korzenia *Vicia faba* (liczba powtórzeń dla danego stężenia n=12, ilość obserwowanych komórek w każdym powtórzeniu k= 1000)

Stężenie [%]	Średnia liczba mikrojąder (MN) w komórkach korzeni <i>Vicia faba</i> ‰($X \pm SD$)			
	I	II	III	IV
KN	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
KP	43,35 ± 12,81	18,75 ± 7,78	17,14 ± 7,67	17,14 ± 7,67
100	1,17 ± 1,45	1,07 ± 1,12	1,62 ± 1,70	-
50	0,23 ± 0,42	0,35 ± 0,68	0,53 ± 0,73	-
25	0,077 ± 0,23	0,081 ± 0,28	0,16 ± 0,38	1,03 ± 0,86
12,5	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,960 ± 0,93
6,25	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,79 ± 0,89



Rys. 1. Zależność pomiędzy stężeniem odcieków a liczbą mikrojąder w komórkach stożka wzrostu korzeni *Vicia faba*.

Stwierdzono również istnienie zależności pomiędzy zawartością związków organicznych w nierozcieńczonych próbach odcieków (RWO), a częstością występowania mikrojąder (MN). Zależność ta kształtowała się liniowo - współczynnik korelacji pomiędzy stężeniem węgla organicznego a MN wynosił 0,978. Genotoksyczność badanych odcieków mogła być więc powodowana nie tylko obecnością specyficznych zanieczyszczeń (choć nie można jej wykluczyć), lecz także nadmiernym sumarycznym stężeniem związków organicznych. Hipotezę tą potwierdzają wyniki testów Ma i wsp. [5], który stwierdził genotoksyczne własności 80 mM roztworu sacharyny w teście mikrojądrowym z *Allium cepa*. Wyniki te wydają się być istotne w świetle toczących się w Komisji Europejskiej dyskusji na temat uzupełnienia wykazu priorytetowych substancji, które w ramach dyrektywy 200/60/WE powinny być w wodach identyfikowane i monitorowane. Identyfikacja zanieczyszczeń w próbach środowiskowych często jest procesem trudnym i kosztownym. Tymczasem zastosowanie biotestów w monitoringu środowiskowym daje stosunkowo szybką odpowiedź na temat skutków jakie dana substancja (czy grupa substancji) wywołuje w środowisku.

Autorzy pragną wyrazić swoją wdzięczność dla Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego za finansowe wsparcie badań w ramach grantu: N 523 077 32/2900.

LITERATURA

- [1] Claxton L. D., Honk V. S., Huges J. T. 1998. *Genotoxicity of industrial wastes and effluents*. *Mutat. Res.*, 410: 237-243.
- [2] Fiksejo G. 1988. *The Allium test – an alternative in environmental studies: The relative toxicity of metal ions*. *Mutat. Res.*, 197: 243-269.
- [3] Grisolia C.K., Cordeiro C. M. T. 2000. *Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish*. *Genetics and Molecular Biology*, 23:235-239
- [4] Grisolia C.K., de Oliveira A. B. B., Bonfim H., Klantau-Guimaraes M.N. 2005. *Genotoxicity evaluation of domestic sewage in a municipal wastewater treatment plant*. *Genetics and Molecular Biology*, 28: 334-338.
- [5] Ma T.H., Xu Z., Xu C., Mc Conell H., Rabago E. V., Arreola G. A., Zhang H. 1995. *The improved Allium/Vicia root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants*. *Mutat. Res.* 334: 185-195.
- [6] Maluszyńska J., Juchimiuk J. 2005. *Plant Genotoxicity: a mollecular cytogenetic approach in plant bioassays*. *Arch. Hig Rada Toxicol.*, 56: 177-184.
- [7] Rank J. 2003. *The method of Allium anaphase-telophase chromosome aberration assay*. *Ekologija*, 1:38-42.
- [8] Rank J., Nielsen M., N. 1993. *A modified Allium test as a tool in the screening of genotoxicity of complex mixtures*. *Hereditas*, 118: 49-53.
- [9] Rank J., Nielsen M., N. 1994. *Evaluation of the Allium anaphase-telophase in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater*. *Mutat. Res.*, 312: 17-24.

APPLICATION OF MICRONUCLEUS BIOASSAY FOR THE EVALUATION OF LANDFILL LEACHATES GENOTOXICITY (ABSTRACT)

Genotoxicity of landfill leachates sampled from municipal landfills was examined with *Vicia faba* root-tips cytogenic bioassay. It was found, that landfill leachates increased the frequency of micronucleus formation and decreased observed mitotic index. Genotoxicity of samples depended strongly on the age of landfill – leachates from „new” landfills exhibited stronger genotoxic potential than samples taken from „old” landfills.