

EFEKT MUTAGENNY GŁÓWNYCH GRUP ZANIECZYSZCZEŃ ORGANICZNYCH ZAADSORBOWANYCH NA CZĄSTKACH PYŁU ZAWIESZONEGO PM10 I PM 2,5 POBRANEGO NA TERENIE WROCŁAWIA

Katarzyna PIEKARSKA

Politechnika Wrocławska, Instytut Inżynierii Ochrony Środowiska
ul. Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław, katarzyna.piekarska@pwr.wroc.pl

STRESZCZENIE

Testem *Salmonella* stwierdzono mutagenne działanie zanieczyszczeń zaadsorbowanych na pyłe zawieszonym PM10 i PM2,5 pobranym wiosną 2007 r. na terenie Wrocławia. Testy prowadzono w obecności szczepu TA98 oraz jego pochodnej YG1041. W badanych próbkach stwierdzono obecność zanieczyszczeń mogących oddziaływać bezpośrednio i pośrednio na materiał genetyczny o charakterze mutagenów typu zmiany fazy odczytu. Uzyskano niższe wartości współczynnika mutagenności (MR) w testach, do których wprowadzano frakcje nitro-WWA i dinitro-WWA, w porównaniu do wartości MR uzyskanych dla całkowitych ekstraktów. Efektu mutagennego nie stwierdzono jedynie dla frakcji WWA i dinitro-WWA, obecnych w ekstrakcie pyłów PM2,5.

1. Wstęp

Od lat dostrzegany jest problem zdrowotnych i ekologicznych skutków zanieczyszczenia atmosfery. Zapylenie powietrza atmosferycznego jest jednym z parametrów charakteryzujących jego zanieczyszczenie. Większość zanieczyszczeń, które posiadają właściwości genotoksyczne, jest zaadsorbowanych na pyłe zawieszonym [1-3]. Od średnicy cząstek pyłu zależy ich szkodliwość dla organizmu. Najbardziej niebezpieczna dla zdrowia ludzi i zwierząt jest najdrobniejsza frakcja pyłu, o średnicy cząstek mniejszej niż 2,5µm, tzw. frakcja PM2,5. Frakcja ta wnika najgłębiej do dróg oddechowych i ostatecznie osadza się na powierzchni pęcherzyków płucnych. Tą drogą zanieczyszczenia dostają się do układu krwionośnego [4, 5]. Określenie rodzaju substancji odpowiedzialnych za mutagenność powietrza jest bardzo trudna ze względu na złożony skład zanieczyszczeń. W zanieczyszczonym powietrzu występuje bowiem ogromna liczba związków z różnych klas chemicznych, które tworzą bardzo złożone mieszaniny o nieznanymi właściwościami biologicznymi. Analiza literatury wskazuje, że za efekt mutageny pyłów zawieszonych głównie odpowiadają bardziej polarne WWA, czyli ich nitrowe i tlenowe pochodne, niż WWA niepodstawione [6]. Z powodu utrudnionej lub często niemożliwej identyfikacji poszczególnych związków chemicznych występujących w mieszaninie, jaką są pyły zawieszane, istotny staje się rozdział ekstraktu na frakcje zawierające poszczególne klasy związków oraz ocena mutagenności występujących w nich substancji przy pomocy testów bioindykacyjnych. Tylko na podstawie wyników uzyskanych metodami biologicznymi można otrzymać wiarygodne informacje odnośnie ich działania na organizmy żywe. Jest to szczególnie istotne, ponieważ związki te w wielu przypadkach działają synergistycznie [7]. W badaniach nad oceną mutagenności zanieczyszczeń środowiskowych znalazł zastosowanie krótkoterminowy bakteryjny test *Salmonella* (test Ames), określający poziom mutacji powrotnych z histydynowej auktotrofii do prototrofii w specjalnie skonstruowanych mutantach szczepów *Salmonella typhimurium* LT2 [6, 8-11].

Celem pracy było porównanie mutagenności głównych grup zanieczyszczeń organicznych, zaadsorbowanych na cząstkach pyłu zawieszonego PM10 i PM2,5, pobranego w sezonie wiosennym 2007 r. na terenie Wrocławia.

2. Materiały i metody

Próbki pyłu PM10 i PM2,5 pobierano na przełomie marca i kwietnia 2007 roku, na filtry szklane przy pomocy wysoko-przepływowego aspiratora powietrza typu Staplex. Filtry w aparacie zmieniano co 24 godziny, tak długo, aż zebrano cały potrzebny materiał badawczy. Stanowisko badawcze usytuowane było w miejscu o dużym natężeniu ruchu samochodowego, na terenie kampusu Politechniki Wrocławskiej (skrzyżowanie ulic Norwida i Wybrzeże Wyspiańskiego), na dachu, na wysokości drugiego piętra. Filtry wraz z pyłami z poszczególnych poborów łączono w jedną próbkę, cięto i wkładano do aparatów Soxhleta. Następnie ekstrahowano dichlorometanem bez dostępu światła, przez 16 godzin z 15 minutowym refleksem [12, 13]. Surowy ekstrakt frakcjonowano na kolumnach szklanych wypełnionych żelazem krzemionkowym. Kolumnę najpierw kondycjonowano cykloheksanem, a następnie nanoszono na jej czoło zatężony surowy ekstrakt i wymywano poszczególne frakcje, zgodnie z metodyką podaną przez Zaciera [14]. Następnie ekstrakty zagęszczano do sucha w wyparce próżniowej. Suchą pozostałość ekstraktów pyłów rozpuszczano w sterylnym dimetylosulfotlenku (DMSO) w taki sposób by w 1 cm³ roztworu podstawowego znajdowały się zanieczyszczenia pochodzące z 1000 m³ powietrza. W teście *Salmonella*, wykonywanym zgodnie z zaleceniami autorów [15] stosowano dwa szczepy: TA98 i YG1041 [16] w wariantach bez i z aktywacją metaboliczną frakcją mikrosomalną S9. Do testu wprowadzano wszystkie organiczne zanieczyszczenia obecne w pobranych próbkach oraz zanieczyszczenia zawarte w trzech frakcjach: WWA, nitropochodnych WWA i dinitropochodnych WWA. Efekt mutageny pyłów zawieszonych przedstawiono w postaci współczynnika mutagenności (MR), czyli ilorazu średniej liczby rewertantów wyrosłych w obecności badanej próbki i średniej liczby rewertantów spontanicznych. Za mutagenne uznawano próbki dla których współczynnik mutagenności MR był ≥ 2 .

3. Omówienie wyników badań

Na wybranym stanowisku badawczym, na terenie Wrocławia, zebrano wiosną 2007 roku 55,02 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ pyłów PM10 i 36,74 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ pyłów PM2,5. Objętość pobranych próbek powietrza wynosiła 6 739,24 m³ (PM10) i 7 642,08 m³ (PM2,5).

Test *Salmonella* wykazał właściwości mutagenne organicznych zanieczyszczeń powietrza zaadsorbowanych na cząstkach pyłu zawieszonego PM10 i PM2,5 pobranych wiosną we Wrocławiu (tabela 1). Wysokie współczynniki mutagenności (MR) uzyskane w testach przeprowadzanych z udziałem całkowitych ekstraktów na obu szczepach z aktywacją metaboliczną, jak i bez niej, świadczyły o obecności w badanych próbkach zanieczyszczeń mogących oddziaływać bezpośrednio (mutageny bezpośrednie) i pośrednio (promutageny) na materiał genetyczny.

W testach przeprowadzonych z udziałem szczepu TA98 największe wartości MR uzyskano dla całkowitego ekstraktu pyłów PM2,5 w badaniach wykonywanych bez aktywacji metabolicznej. W badaniach tych uzyskano również najmniejszą objętość powietrza wywołującą efekt mutageny w stosunku do szczepu TA98, wynoszącą 0,195 m³. W próbce pyłów PM2,5 przeważały więc mutageny bezpośrednie. W przypadku testów prowadzonych z udziałem poszczególnych frakcji pyłów PM2,5 dodatni wynik testu uzyskano jedynie w przypadku nitropochodnych WWA w teście bez aktywacji metabolicznej w najwyższym

Tabela 1. Wartości MR ekstraktów pyłowych zanieczyszczeń powietrza badanymi szczepem TA98 i YG 1041 w wariacie z S9 (+F) oraz bez S9 (-F)

Stężenie próby [m ³ /płytkę]	Rodzaj próby/ Szczep testowy																							
	PM10								TA98								PM2,5							
	-F				+F				-F				+F				-F				+F			
	Całość	WWA	Nitro-WWA	Dinitro-WWA	Całość	WWA	Nitro-WWA	Dinitro-WWA	Całość	WWA	Nitro-WWA	Dinitro-WWA	Całość	WWA	Nitro-WWA	Dinitro-WWA	Całość	WWA	Nitro-WWA	Dinitro-WWA				
50	6,15	3,16	2,92	2,94	6,11	3,16	3,16	2,19	9,47	1,43	2,46	1,25	4,3	1,62	1,83	1,54								
25	3,36	1,49	1,86	1,62	3,74	2,29	2,87	2,06	6,75	1,27	1,56	1,05	2,11	1,51	1,43	1,36								
12,5	3,04	1,40	1,82	1,23	2,62	1,64	1,48	1,93	5,37	1,07	1,16	1,01	1,53	1,44	1,41	1,26								
6,25	1,74	1,38	1,29	1,18	2,57	1,57	1,38	1,74	5,12	1,05	1,14	1,01	1,27	1,38	1,24	1,19								
3,125	1,42	1,35	1,25	1,14	1,61	1,37	1,25	1,63	3,91	1,05	1,05	1,01	1,20	1,36	1,21	1,04								
1,56	1,39	1,16	1,03	1,10	1,26	1,13	1,25	1,51	3,80	0,96	1,01	1,01	0,99	1,34	1,21	1,03								
0,78	1,18	1,07	0,88	1,07	0,99	1,21	1,17	1,36	3,31	0,94	0,99	0,99	0,97	1,19	1,17	1,0								
0,39	0,96	1,07	0,86	1,01	0,97	1,17	1,13	1,21	2,26	0,92	0,99	0,90	0,98	1,05	1,05	0,99								
0,195	1,0	1,02	0,86	0,96	0,91	1,11	1,13	1,04	2,10	0,90	0,96	0,89	1,0	0,83	0,99	0,92								
0,097	1,05	0,99	0,77	0,90	0,90	1,02	1,11	0,99	1,44	0,83	0,96	0,77	1,04	0,67	0,94	0,83								
0,049	1,05				0,97				1,32				1,02											
YG1041																								
50	4,97	3,18	3,75	4,47	18,11	4,85	5,83	5,89	5,87	3,21	4,16	5,18	10,86	1,75	3,4	1,46								
25	6,19	3,44	4,38	4,19	19,53	4,50	4,19	3,13	14,40	2,35	3,52	5,07	13,76	1,17	2,27	1,09								
12,5	10,99	3,96	4,07	3,27	15,78	2,13	2,09	1,80	10,62	1,34	2,68	3,12	5,19	1,16	1,48	1,02								
6,25	9,98	5,02	3,77	2,65	4,18	1,08	1,46	1,23	8,66	0,85	1,95	2,24	4,46	1,12	1,40	0,90								
3,125	6,97	1,82	2,83	1,53	1,77	0,99	1,01	1,20	7,98	0,95	1,24	1,37	3,54	0,99	1,07	0,92								
1,56	4,59	1,54	2,24	1,35	1,48	1,00	0,99	1,05	7,57	0,91	1,11	0,96	3,10	1,00	1,00	0,98								
0,78	2,64	1,26	1,85	1,21	1,02				6,16				2,61											
0,39	1,80	1,13	1,24	1,13	0,82				5,00				2,29											
0,195	1,40	1,04	1,12	1,02	0,93				3,90				2,20											
0,097	1,02				1,01				2,72				2,06											
0,049	0,93				0,94				1,42				1,64											

badanym stężeniu zanieczyszczeń powietrza. Z kolei w testach z udziałem całkowitego ekstraktu z pyłów PM10 otrzymano zbliżone wartości MR zarówno w badaniach z S9 jak i bez aktywacji metabolicznej. Najniższe stężenie tego ekstraktu wywołujące efekt mutageny pochodziło z 12,5 m³ powietrza w teście bez S9, a w wariancie z aktywacją metaboliczną z 6,25 m³. W przypadku próbki pyłów PM10 otrzymano również efekt mutageny w przypadku wszystkich badanych frakcji zarówno w badaniach z aktywacją metaboliczną, jak i bez niej. Współczynniki mutagenności MR były jednak niższe niż te otrzymane dla nierozfrakcjonowanego ekstraktu.

Największe wartości MR uzyskano w badaniach z udziałem szczepu *Salmonella typhimurium* YG1041. W testach przeprowadzanych na całkowitych ekstraktach z tym szczepem, wrażliwym na działanie nitrowych związków aromatycznych, uzyskano duże ilości rewertantów zarówno w obecności jak i bez S9. W badanym zakresie stężeń zanieczyszczeń powietrza (od 50 m³ do 0.049 m³) zaobserwowano dla tego szczepu wyraźną zależność dawka-odpowieź, co w pełni ilustrowało biologiczny efekt działania zanieczyszczeń obecnych w próbkach w zależności od ich stężenia. Najniższą objętość powietrza wywołującą efekt mutageny wobec szczepu YG1041 zaobserwowano w testach przeprowadzonych z pyłami PM2,5. Wynosiło ono 0,098 m³, zarówno w badaniach przeprowadzanych z aktywacją metaboliczną, jak i bez. W przypadku badań rozfrakcjonowanego ekstraktu pyłów PM2,5 bez udziału S9 otrzymano efekt mutageny dla frakcji WWA i obu frakcji zawierających nitrowe pochodne WWA. W testach z aktywacją metaboliczną efekt ten uzyskano tylko dla frakcji nitro-WWA. Przy czym wartości MR były niższe w porównaniu do otrzymanych dla ekstraktu całkowitego. Z kolei w przypadku całkowitego ekstraktu pyłów PM10 efekt mutageny zaobserwowano dla zanieczyszczeń powietrza pochodzących z 0,78 m³ powietrza w testach bez S9 i 6,25 m³ w testach z aktywacją metaboliczną. Działanie mutagenne wykazywały również wszystkie badane frakcje ekstraktu pyłów PM10. Również w tym przypadku otrzymano niższe wartości MR w porównaniu do wartości MR uzyskanych dla nierozfrakcjonowanego ekstraktu.

4. Wnioski

Całkowite ekstrakty pyłów PM10 i PM2,5 pobrane wiosną wykazywały aktywność mutageną wobec testowych szczepów *Salmonella typhimurium* TA98 i YG1041 w testach przeprowadzanych z aktywacją metaboliczną, jak i bez niej. W badanych próbkach obecne więc były mutageny typu zmiany fazy odczytu, zarówno o charakterze promutagenów jak i mutagenów bezpośrednich,

Mutageny obecne w całkowitym ekstrakcie pyłów PM2,5 wywoływały większą odpowiedź ze strony obu szczepów testowych w testach przeprowadzonych bez aktywacji metabolicznej (przewaga mutagenów bezpośrednich). Z kolei większe wartości MR uzyskano w badaniach z aktywacją metaboliczną całkowitego ekstraktu pyłów PM10 (przewaga promutagenów) w porównaniu do wartości uzyskanych dla całkowitego ekstraktu pyłów PM2,5,

Wyniki testu *Salmonella* otrzymane dla frakcji WWA, nitro-WWA i dinitro-WWA pochodzących z ekstraktu pyłów PM10 wykazały obecność związków o charakterze mutagenym, przy czym efekt mutageny był wyższy w badaniach z szczepem YG1041,

Dla frakcji pochodzących z próbki pyłów PM2,5 badanych w obecności szczepu TA98 uzyskano efekt dodatni jedynie w przypadku mononitrowych pochodnych WWA, w teście przeprowadzonym bez aktywacji metabolicznej, z kolei w obecności szczepu YG1041 efektu mutagennego nie uzyskano tylko w przypadku frakcji WWA i frakcji dinitropochodnych WWA w badaniach z aktywacją metaboliczną,

Badania potwierdziły wysoką przydatność szczepu YG1041 w wykrywaniu mutagennego działania nitrowych pochodnych związków aromatycznych. W przypadku tego szczepu uzyskano bowiem, w niektórych testach, wyniki dodatnie dla badanych grup zanieczyszczeń, mimo iż dla szczepu TA98 wynik testu był ujemny,

Rzeczywiste zagrożenie zdrowotne związane z mutagenami i kancerogenami zaadsorbowanymi na pyłe zawieszonym odzwierciedlają jedynie badania biologiczne, ponieważ uwzględniają one wypadkowy efekt działania zanieczyszczeń na organizmy żywe. We wszystkich testach uzyskano bowiem większy efekt mutageny całkowitych ekstraktów pyłów zawieszonych w porównaniu do efektu uzyskanego dla głównych grup zanieczyszczeń obecnych w badanych próbkach,

Stosowane w standardowym monitoringu wskaźniki zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego (określenie stężenia pyłu zawieszonego i stężeń WWA z listy EPA) tylko w przybliżeniu informują nas o zagrożeniu zdrowotnym. Monitoring zanieczyszczeń powietrza atmosferycznego należałoby uzupełnić o badanie aktywności mutagennej zanieczyszczeń organicznych testem *Salmonella*.

Praca została zrealizowana w ramach grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego Nr N305 096 31/3476

Literatura

1. De Kok T.M.C.M., Drieste H.A.L., Hogervorst J.G.F., Briede J.J.: Toxicological assessment of ambient and traffic-related particulate matter: A review of recent studies. *Mutat. Res.-Rev. Mut. Res.*, 2006, 613 (2-3), 103-122
2. Dehnen W., Pitz N., Tomingas R.: The mutagenicity of airborne particulate pollutants. *Cancer Lett.*, 2007, 4, 5-12.
3. Cohen A.J.: Outdoor air pollution and lung cancer. *Environ. Health Perspectives*, 2000, 108 (4): 743-750.
4. Mielżyńska D., Siwińska E., Kapka L.: Efekt mutageny pyłów zawieszonych w powietrzu jako wskaźnik jakości powietrza. Instytut Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego, Sosnowiec, 2002.
5. Seńczuk W. i in., Toksykologia. Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa, 1994.
6. 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.
7. Claxton L.D., Woodall Jr G.M.: A review of the mutagenicity and rodent carcinogenicity of ambient air, *Mutation Research*. 2007, 636, 36- 94.
8. Binkova B., Cerna B., Pastorkova A., Jelinek R., Benes I., Novak J., Sram R.J.: Biological activities of organic compounds adsorbed onto ambient air particles: comparison between the cities of Teplice and Prague during the summer winter seasons 2000-2001, *Mutation Research*. 2003, 525, 43-59.
9. Piekarska K., Karpińska-Smulikowska J.: Mutagenic activity of environmental air samples from the area of Wrocław. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2007, 16 (5), 757-764.
10. Du Four V.A., Van Larebeke N., Janssen C.R.: Genotoxic and mutagenic activity of environmental air samples in Flanders, Belgium. *Mutat. Res.*, 2004, 558, 155-167.
11. Gilli G., Pignata C., Schiliro T., Bono R., La Rosa A., Traversi D.: The mutagenic hazards of environmental PM2.5 in Turin. *Environ. Res.*, 2007, 103 (2), 168- 175.
12. De Raat W.K.: Genotoxicity of aerosol extracts. Some methodological aspects and the contribution of urban and industrial locations. *Mutat. Res.*, 1983, 116, 47- 63.

13. Lenicek J., Sekyra M., Badnarkova K., Benes I., Sipek F.: Fractionation and chemical analysis of urban air particulate extracts. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 2000, 77(4), 269- 288.
14. Zaciera M.: Metoda oznaczania nitrowych pochodnych WWA w powietrzu. W: *Ochrona powietrza w teorii i praktyce*. Pod red. J. Konieczynskiego. Instytut Podstaw Inżynierii Środowiska Polskiej Akademii Nauk w Zabrze, 2006.
15. Maron D.M., Ames B.N.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutat. Res.*, 1983, 113, 173-215.
16. Watanabe M., Ishidate M. Jr., Nohmi T.: Sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes and aromatic amines: new derivatives of Salmonella typhimurium tester strains possessing elevated O- acetyltransferase levels. *Mutat. Res.*, 1990, 234,3 37-347