

Joanna Kalka, Aleksandra Ośliśłok, Joanna Surmacz-Górska, Sylwia Fudala-Książek

Wykorzystanie testu mikrojądrowego do oceny genotoksyczności odcieków ze składowisk odpadów

W ostatnich latach obserwuje się wzrost zanieczyszczenia środowiska naturalnego substancjami genotoksycznymi poprzez rosnącą ich zawartość w ściekach miejskich i przemysłowych oraz prawdopodobną obecność w odciekach ze składowisk odpadów [4,6]. Znaczna część związków refrakcyjnych pochodzących z odcieków nie jest usuwana w procesach oczyszczania ścieków. Istnieje zatem niebezpieczeństwo, że związki te mogą stanowić zagrożenie organizmów w ekosystemie wodnym, jak również 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* i *Oreochromis niloticus*), bakterie (*Salmonella thypimurium*, *Bacillus subtilis*) oraz rośliny (*Allium cepa* i *Vicia faba*) [1,3,4,8,9].

Testy z wykorzystaniem roślin mogą stanowić interesującą alternatywę dla testów bardziej konwencjonalnych. Jak wynika z badań opisanych w pracy [2], testy z wykorzystaniem roślin wykazują większą wrażliwość na obecność niektórych zanieczyszczeń w porównaniu z testem Ames. Ponadto ekspozycja organizmów w systemach wykorzystujących rośliny może być przeprowadzona zarówno w warunkach laboratoryjnych, jak też in situ. Jest to szczególnie ważne podczas oceny genotoksyczności próbek środowiskowych, jakimi są odcieki ze składowisk odpadów.

Materiały i metody

Próbki odcieków pobrano z dwóch składowisk odpadów komunalnych zlokalizowanych na terenie Górnośląskiego Okręgu Przemysłowego. Odcieki pochodzące ze składowiska w Gliwicach (seria I – marzec 2007 r., seria II – czerwiec 2007 r.) zostały pobrane ze zbiornika retencyjnego, do którego spływają odcieki powstające w eksploatowanym składowisku i sąsiadującym z nim obiekcie poddawanych rekultywacji. Próbki z Gliwic stanowiły więc mieszaninę odcieków z nowego (czas eksploatacji poniżej 2 lat) i starego składowiska. W Zabrze odcieki zostały pobrane osobno ze składowiska nowego i składowiska starego, wyłączono go z eksploatacji (seria III – składowisko stare, czerwiec 2007 r., seria IV –

składowisko nowe, czerwiec 2007 r.). Testy genotoksyczności przeprowadzono w laboratorium natychmiast po pobraniu próbek lub – w razie konieczności – odcieki przechowywano w ciemności, w temperaturze 4 °C. W próbkach odcieków oznaczono podstawowe wskaźniki fizyczno-chemiczne: BZT₅ (OxiTop, WTW), rozpuszczony węgiel organiczny – RWO (TOC, Shimadzu), azot amonowy (metodą bezpośredniej nesslerizacji).

Do oceny genotoksyczności odcieków ze składowisk wybrano test z wykorzystaniem komórek stożka wzrostu korzenia wyki zwyczajnej (*Vicia faba*) [5,8]. Test ten pozwala na obserwację zmiany indeksu mitotycznego (czyli stosunku liczby komórek będących w trakcie podziału do całkowitej liczby komórek w próbce) oraz częstości występowania mikrojąder pod wpływem ekspozycji roślin na odcieki. Proces formowania mikrojąder rozpoczyna się w komórkach stożka wzrostu z chwilą, gdy pod wpływem działania związków chemicznych – po pęknięciu podwójnej helisy DNA – dochodzi do oderwania fragmentu chromosomu. Podczas anafazy elementy chromosomów z centromerami przesuwały się w kierunku wrzeciona kariokinetycznego, natomiast acentryczne, oderwane, fragmenty opóźniają się. Gdy telofaza ulega zakończeniu zarówno niezmienione chromosomy, jak i pozostałe elementy centryczne służą jako podstawa jądra siostrzanego komórki potomnej. Fragmenty opóźniające się tworzą jedno, bądź kilka jąder drugorzędowych. Są one z reguły znacznie mniejsze od jądra głównego komórki, dlatego określa się je mianem mikrojąder.

Jako kontrolę pozytywną zastosowano roztwór hydrazynu maleinowego o stężeniu 1,12 g/m³, natomiast kontrolę negatywną stanowiła zdechlorowana woda wodociągowa. O właściwościach genotoksycznych próbek świadczyło pojawienie się mikrojąder w korzeniach roślin oraz zmniejszenie wartości indeksu mitotycznego.

Wyniki badań

Wyniki analizy odcieków przedstawiono w tabeli 1. Wartości wskaźników fizyczno-chemicznych poszczególnych partii odcieków różniły się zasadniczo. Próbki pobrane ze składowiska w Gliwicach charakteryzowały się znacznie mniejszą zawartością związków organicznych i azotu amonowego niż próbki z nowego składowiska w Zabrzu. Dodatkowo próbki pobrane w marcu 2007 r. były znacznie rozcieńczone wodami opadowymi. Mimo to odcieki charakteryzowały się podobną podatnością na biodegradację i pośrednio biodostępnością. Wartości wskaźnika BZT₅/ChZT były zbliżone i wynosiły 0,61±0,7,

Dr inż. J. Kalka, mgr inż. A. Ośliśłok, dr hab. inż. J. Surmacz-Górska, prof. nadzw.: Politechnika Śląska, Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki, Katedra Biotechnologii Środowiskowej, ul. Akademicka 2A, 44-100 Gliwice
joanna.kalka@polsl.pl

Mgr inż. S. Fudala-Książek: Politechnika Gdańska, Wydział Inżynierii Lądowej i Środowiska, Katedra Technologii Wody i Ścieków, ul. G. Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk

Tabela 1. Charakterystyka odcieków ze składowisk odpadów
Table 1. Characteristics of the landfill leachates examined

Wskaźnik, jednostka	Seria badań			
	I	II	III	IV
BZT ₅ , gO ₂ /m ³	106	296	1008	6622
ChZT, gO ₂ /m ³	152	426	1640	9460
RWO, gC/m ³	133	120	702	4403
Azot amonowy, gNH ₄ ⁺ /m ³	25	142	220	703
BZT ₅ /ChZT	0,70	0,69	0,61	0,70

co odpowiadało podatności na biodegradację ścieków byto-gospodarczych.

Test genotoksyczności umożliwił przeprowadzenie obserwacji zmian indeksu mitotycznego (tab. 2) oraz częstości pojawiania się mikrojąder (tab. 3). Zmiany wartości indeksu mitotycznego określone w serii I były niewielkie i statystycznie nieistotne (test Dunetta, $p < 0,05$) w stosunku do wartości tego indeksu w kontroli negatywnej (KN). Jednak odcieki pobrane z tego samego miejsca w czasie niewielkich opadów (seria II) istotnie wpłynęły na zmniejszenie częstości podziału komórek korzenia *Vicia faba*. Istotne różnice między wartościami indeksu mitotycznego w kontroli negatywnej zaobserwowano także w pozostałych próbkach odcieków, tj. III i IV. Największe stężenia odcieków w serii IV działały silnie toksycznie na rośliny powodując ich obumarcie.

Tabela 2. Wpływ odcieków na częstość podziału komórek stożka wzrostu korzenia *Vicia faba* (liczba powtórzeń $n=12$, liczba obserwowanych komórek w każdym powtórzeniu $k=1000$)

Table 2. Effect of landfill leachates on the frequency of cell division in the *Vicia faba* root-tips (number of replications: $n=12$, number of cells observed in each replication: $k=1000$)

Stężenie %	Średni indeks mitotyczny komórek korzeni <i>Vicia faba</i> % (X ±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 ±3,66	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

KN – kontrola negatywna
KP – kontrola pozytywna

Średnia liczba mikrojąder stwierdzona w nierozcieńczonych próbkach odcieków w seriach I–III stanowiła 2,7÷9,5% liczby mikrojąder w próbkach kontroli pozytywnej (KP), którą stanowił roztwór hydrazidu maleinowego (tab. 3). W przypadku odcieków w serii IV w najwyższym badanym stężeniu (25%) pojawiło się średnio 6% mikrojąder w stosunku do próbki kontrolnej. Porównując liczbę mikrojąder w kontroli pozytywnej można stwierdzić znaczne różnice w kolejnych seriach badań. W każdej serii badań konieczne było równoległe przeprowadzenie kontroli pozytywnej i negatywnej. Podobne zjawisko zaobserwowano w pracach [5,7], wskazując na dalszą potrzebę standaryzacji testu.

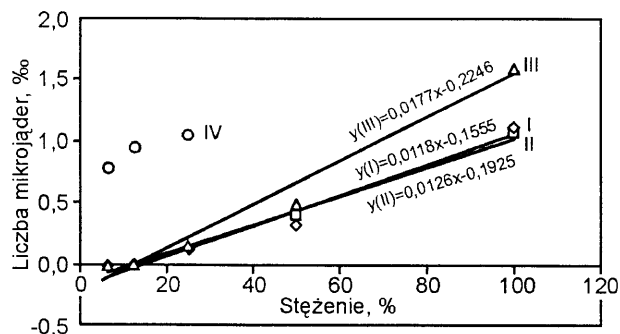
Tabela 3. Wpływ odcieków na częstość występowania mikrojąder w komórkach stożka wzrostu korzenia *Vicia faba* (liczba powtórzeń $n=12$, liczba obserwowanych komórek w każdym powtórzeniu $k=1000$)

Table 3. Effect of landfill leachates on the frequency of micronuclei formation in the cells of *Vicia faba* root-tips (number of replications: $n=12$, number of cells observed in each replication: $k=1000$)

Stężenie %	Średnia liczba mikrojąder w komórkach korzeni <i>Vicia faba</i> ‰ (X ±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	0,08 ±0,23	0,08 ±0,28	0,16 ±0,38	1,03 ±0,86
12,5	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,96 ±0,93
6,25	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,79 ±0,89

KN – kontrola negatywna
KP – kontrola pozytywna

Określono także zależność między liczbą mikrojąder i stężeniem odcieków. We wszystkich seriach badań zależność ta kształtowała się liniowo (rys. 1). Przebieg krzywych w seriach I i II był w zasadzie identyczny i zbliżony do przebiegu krzywej w przypadku odcieków ze składowiska starego w Zabrze (seria III). Wartości współczynnika korelacji Pearsona (r) wyznaczone w seriach I, II i III wynosiły odpowiednio 0,964, 0,988 i 0,990. Obserwowano także zależność pomiędzy stężeniem odcieków w serii IV a częstością pojawiania się mikrojąder, jednak ze względu na toksyczne działanie odcieków obserwacje przeprowadzono tylko przy trzech najmniejszych stężeniach odcieków, dlatego też na podstawie uzyskanych wyników nie można wnioskować o liniowym charakterze tej zależności.



Rys. 1. Zależność pomiędzy stężeniem odcieków a liczbą mikrojąder w komórkach stożka wzrostu korzenia *Vicia faba*
Fig. 1. Relationship between the concentration of leachate and the number of micronuclei in the cells of *Vicia faba* root-tips

Stwierdzono również zależność pomiędzy zawartością związków organicznych w nierozcieńczonych próbkach odcieków (RWO) a częstością występowania mikrojąder. Zależność ta kształtowała się liniowo – współczynnik korelacji pomiędzy zawartością węgla organicznego a częstością występowania mikrojąder wynosił 0,978. Genotoksyczność badanych odcieków mogła być więc spowodowana nie tylko obecnością specyficznych zanieczyszczeń (choć nie można tego wykluczyć), lecz także nadmiernym sumarycznym stężeniem związków organicznych w odciekach. Hipotezę tę potwierdzają wyniki testów podane w pracy [5], w której stwierdzono genotoksyczne właściwości 80 mM roztworu sacharyny w teście mikrojądrowym z *Allium cepa*.

Różnice w zawartości związków organicznych w próbkach odcieków spowodowane były zarówno naturalnym ich rozcieńczeniem wodami opadowymi, jak i różnym czasem eksploatacji składowisk w Zabrze i Gliwicach. Wiek (starzenie się) składowiska wpływał bardzo istotnie na skład odcieków, gdyż odzwierciedlał procesy rozkładu substancji organicznych zawartych w odpadach. W pracy wykazano, że większym potencjałem genotoksycznym charakteryzowały się odcieki ze składowiska młodego. Wraz z postępem procesów rozkładu zachodzącym w składowisku wzrasta stabilność zanieczyszczeń zawartych w odciekach, co powoduje ich mniejszą biodostępność i w konsekwencji również słabsze oddziaływanie na organizmy żywe.

Podsumowanie

Otrzymane wyniki 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 próbkach 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 podziękować Ministerstwu Nauki i Szkolnictwa Wyższego za finansowe wsparcie badań w ramach grantu nr N 523 077 32/2900.

Kalka, J., Ośliśłok, A., Surmacz-Górska, J., Fudala-Książek, S. Assessing the Genotoxicity of Landfill Leachates with the Aid of the Micronucleus Bioassay. *Ochrona Środowiska* 2008, Vol. 30, No. 4, pp. 15–17.

Abstract: The cytogenetic biotest was used to examine the genotoxicity of landfill leachates by analyzing the changes in the frequency of micronuclei formation in the cells of *Vicia faba* root-tips. The leachate samples collected for the purpose of the study came from two landfills differing in age, both situated in the Upper Silesian Industrial District (Gliwice, Zabrze). The results of the study have disclosed a significant relationship

LITERATURA

1. L.D. CLAXTON, V.S. HONK, J.T. HUGES: Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutation Research* 1998, 410, pp. 237–243.
2. G. FIKSJO: The Allium test – an alternative in environmental studies: The relative toxicity of metal ions. *Mutation Research* 1988, 197, pp. 243–269.
3. C.K. GRISOLIA, C.M.T. CORDEIRO: Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. *Genetics and Molecular Biology* 2000, 23, pp. 235–239.
4. C.K. GRISOLIA, A.B.B. DE OLIVEIRA, H. BONFIM, M.N. KLANTAU-GUIMARAES: Genotoxicity evaluation of domestic sewage in a municipal wastewater treatment plant. *Genetics and Molecular Biology* 2005, 28, pp. 334–338.
5. T.-H. MA, Z. XU, C. XU, H. MCCONELL, E.V. RABAGO, G.A. ARREOLA, H. ZHANG: The improved Allium/Vicia root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutation Research* 1995, 334, 185–195.
6. J. MALUSZYŃSKA, J. JUCHIMIUK: Plant Genotoxicity: A molecular cytogenetic approach in plant bioassays. *Arh. Hig. Rada Toxicol.* 2005, 56, pp. 177–184.
7. J. RANK: The method of Allium anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Ekologija* 2003, 1, pp. 38–42.
8. J. RANK, M.N. NIELSEN: A modified Allium test as a tool in the screening of genotoxicity of complex mixtures. *Hereditas* 1993, 118, pp. 49–53.
9. J. RANK, M.N. NIELSEN: Evaluation of the Allium anaphase-telophase in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. *Mutation Research* 1994, 312, pp. 17–24.

between the frequency of micronuclei formation, chromosome aberration and concentrations of the leachates, expressed in terms of organic carbon content. The micronucleus bioassay was found to be a valuable tool for monitoring the genotoxicity of environmental samples. The results obtained can be of significance in the light of the European Commission debates on updating the list of priority substances that are to be identified and monitored in the aquatic environment under the regulations of Directive 200/60/EU.

Keywords: Landfill leachates, genotoxicity, micronucleus bioassay, *Vicia faba* root-tips.