

Maciej K. BEŁCIK*, Katarzyna PIEKARSKA*

BADANIA GENOTOKSYCZNOŚCI PRÓBEK ŚRODOWISKOWYCH NA PRZYKŁADZIE TESTÓW WYKORZYSTUJĄCYCH SZCZEP *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

Rozwój technologiczny, wzrost industrializacji oraz zwiększanie się liczby ludności na świecie powoduje coraz bardziej drastyczne pogarszanie się warunków środowiskowych na Ziemi. Długotrwała ekspozycja na zanieczyszczenia, wśród których znajdują się substancje genotoksyczne powoduje zachorowalność populacji na choroby nowotworowe. W pracy przedstawiono testy wykrywające działanie genotoksyczne próbek środowiskowych bazujące na bakterii *Salmonella typhimurium*, omówiono zasady ich przeprowadzania oraz badane efekty końcowe poszczególnych z nich. Omówione zostały także szczepy wykorzystywane w poszczególnych testach. W pracy przedstawiono test klasyczny test *Salmonella*, mikropłytkowy test Ames II oraz test UMU wykorzystujący system SOS do naprawy DNA.

1. GENOTOKSYCZNOŚĆ

Rozwój nowych technologii, wzrost industrializacji oraz wzrost liczby ludności sprawia, że od kilkunastu lat obserwuje się coraz bardziej widoczne pogorszenie warunków środowiskowych na Ziemi. Dążenie do obniżenia kosztów produkcji zarówno dóbr codziennego użytku, jak i tych luksusowych wiąże się z opracowywaniem coraz to nowszych technologii, które niejednokrotnie powodują pogarszanie się jakości środowiska naturalnego. Do tego procesu przyczynić się mogą między innymi: wykorzystywanie nowych substancji chemicznych, produkty pośrednie, w tym także uboczne, powstające w trakcie procesu produkcji oraz wprowadzanie do środowiska odpadów z procesów przemysłowych. Nie bez znaczenia są także substancje zawierające w swojej strukturze atomy meta-

* Instytut Inżynierii Ochrony Środowiska Politechniki Wrocławskiej, pl. Grunwaldzki 9, 50-377 Wrocław.

li. Wszystkie te czynniki oddziałując na środowisko powodują także niekorzystny wpływ na zwierzęta oraz ludzi [1].

Szacuje się, że dorosły człowiek pobiera w ciągu doby od 12 do 15 m³ powietrza, a zapotrzebowanie na wodę u dorosłego człowieka, w zależności od warunków atmosferycznych oraz trybu życia, waha się od 2 od 5 dm³ wody na dobę. Ponadto, dieta zawiera wiele owoców i warzyw, które pobierają wodę oraz sole mineralne z gleby [1].

Dziś coraz powszechniejsza staje się zachorowalność na choroby nowotworowe. Jednym z podstawowych czynników prowadzących do tego stanu rzeczy jest stosunkowo łatwe narażenie na działanie substancji powodujących uszkodzenia materiału genetycznego. Związki takie nazywamy związkami genotoksycznymi, a genotoksycznością zjawisko wywoływane przez nie, powodujące szkodliwe działanie na materiał genetyczny [2, 3].

Czynniki powodujące trwałe zmiany w materiale genetycznym mogą mieć charakter chemiczny wywołwany przez określone substancje, należące zazwyczaj do grupy substancji organicznych, bądź charakter fizyczny wywołwany przez promieniowanie UV lub promieniowanie X [4]. Najlepiej poznanymi i zidentyfikowanymi związkami o właściwościach genotoksycznych są substancje takie jak: wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, jedno- i dwupierścieniowe węglowodory aromatyczne, węglowodory alifatyczne, cykloalkany, oraz takie, które w swoich strukturach zawierają metale, siarkę, chlor bądź tlen [2, 5].

Analiza chemiczna wszystkich substancji występujących w próbkach środowiskowych jest niemożliwa z wielu względów z których najistotniejszymi są: brak technik analitycznych pozwalających na wykrywanie wszystkich związków, mnogość powstających substancji chemicznych w różnych gałęziach przemysłu, wzajemne oddziaływanie między nimi, wysokie koszty analiz oraz konieczność zastosowania specjalistycznych technik analitycznych, obecność poszczególnych związków na poziomie śladowym trudno wykrywalnym w trakcie badań [2].

Wśród badań genotoksyczności próbek środowiskowych najczęściej wykorzystuje się badania przesiewowe. Ich celem jest wyselekcjonowanie poszczególnych substancji, które należałoby poddać dalszej i bardziej starannej obserwacji. Badania przesiewowe opierają się głównie na krótkoterminowych testach bakteryjnych. Wśród testów najczęściej wymienianych w literaturze występują klasyczny test *Salmonella*, test kometkowy, test SOS Chromotest oraz test UMU [6-9]. Alternatywą do testów bakteryjnych są testy z wykorzystaniem organizmów eukariotycznych takich jak: grzyby, ryby, rośliny, owady [3, 10, 11, 12].

W niniejszej pracy skupiono się na porównaniu testów wykorzystujących szczep bakteryjny *Salmonella typhimurium* w badaniach genotoksyczności próbek środowiskowych.

2. KLASYCZNY TEST *SALMONELLA* (AMESA)

Klasyczny test bakteryjny *Salmonella* opracowany został w latach 70. XX wieku przez Bruca Amesę i nazwany jego nazwiskiem. Niedługo później zyskał powszechne uznanie wśród badaczy zajmujących się mutagennością, a także jest zalecany przez Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem (International Agency for Research on Cancer) oraz proponowany do oceny jakości zdrowotnej wody przeznaczonej do spożycia przez Standard Methods for Examination of Water and Wastewater US EPA [2, 4].

Zasada testu polega na badaniu występowania rewersji mutacji u histydynozależnych aukstotroficznych szczepów *Salmonella typhimurium* LT2. Szczepy wykorzystywane do badania zostały zmutowane w taki sposób, aby nie miały możliwości syntezy histydyny. Ponadto, do szczepów wprowadzana została mutacja *rfa* powodująca zwiększoną przepuszczalność błony komórkowej poprzez zmianę jej składników lipoproteinowych oraz delecja Δ uvrB zmniejszająca zdolność naprawy materiału genetycznego poprzez wycinanie uszkodzonych fragmentów i zastępowanie ich prawidłowymi. Do wzrostu zmutowanym bakteriom niezbędne jest podłoże zawierające histydynę i biotynę. W trakcie ekspozycji szczepów testowych na związek o działaniu mutagennym przedostaje się on przez przepuszczalną błonę komórkową powodując mutację powrotną. Na podstawie obserwacji wzrostu szczepu testowego na podłożu niezawierającym histydyny wnioskuje się o mutagennych właściwościach badanych związków [2, 13].

Wśród wielu szczepów bakteryjnych uzyskanych metodami inżynierii genetycznej używanych do testu Amesę, najczęściej w badaniach wykorzystuje się szczepy *Salmonella typhimurium* TA97, TA98, TA100, TA102, TA104, a także ich pochodne uzyskane na bazie szczepów podstawowych takie jak: YG1041 i YG1042. Pochodne szczepów konstruuje się w celu selektywnego określania działania konkretnych grup związków mutagennych. Zastosowanie danego szczepu zależy od specyfiki badanej próbki i tak przykładowo do oznaczeń potencjalnej mutagenności wody stosuje się szczepy TA98 oraz TA100, natomiast w przypadku badań próbek powietrza, a w szczególności zawierających pochodne nitrowe, należy wziąć pod uwagę rozszerzenie badań o szczepy YG1041 oraz YG1042 [2, 13].

Podstawową cechą bakterii stosowanych w testach przesiewowych są różnice pomiędzy budową bakterii, a organizmów wyższych oraz brak zdolności bakterii do aktywacji metabolicznej takich promutagenów jak w przypadku organizmów wyższych. Aby umożliwić interpolację wyników uzyskanych w testach bakteryjnych na organizm ludzki, jako jeden z wariantów stosowanych w czasie badań wykorzystuje się frakcję S-9 enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z wątroby szczura. Frakcję tę indukują przy pomocy bifenili [13, 14].

Tabela 1. Przykładowe szczepy używane w teście *Salmonella* [2]

Szczep <i>Salmonella typhimurium</i>	Opis
TA 97	TA 1537 his D6610-01242 (pKM101)
TA 98	TA 1538 his D3052 (pKM101)
TA 100	TA 1535 his G46 (pKM101)
TA 102	TA 1537 (pAQ1)
TA 104	TA 1537 his G428 (pKM101)
YG 1041	TA 98 (pYG233): szczep o podwyższonej aktywności nitroreduktazy i O- acetylotransferazy (pYG233)
YG 1042	TA100(pYG233): szczep o podwyższonej aktywności nitroreduktazy i O- acetylotransferazy (pYG233)

Procedura wykonywania klasycznego testu Amesa polega na przygotowaniu płytek z podłożem mineralnym niezawierającym histydyny. W trakcie testu przygotowuje się próbę badaną zawierającą badaną substancję, szczep testowy oraz frakcję S-9 (lub bufor fosforanowy w przypadku badań bez użycia frakcji mikrosomalnej). Następnie do przygotowanej próby dodaje się półpłynny agar zawierający w swoim składzie śladowe ilości biotyny i histydyny, pozwalające na około 2-3 podziały komórkowe. Tak przygotowaną mieszaninę przenosi się na podłoże mineralne. W trakcie trwającej od 48 do 72h inkubacji (w zależności od zastosowanego szczepu bakteryjnego) bakterie, które uległy mutacji powrotnej tworzą na płytce agarowej kolonie. Ilość powstających w trakcie inkubacji kolonii proporcjonalna jest do działania mutagennego zastosowanego związku. W trakcie prowadzenia badań pamiętać należy o sprawdzeniu zdolności bakterii do rewersji spontanicznej [2, 13].

3. TEST AMES II

Test Ames II jest testem oceny mutagenności wykonywanym w formie mikropłytkowym. Opracowany i produkowany przez szwajcarską firmę Xenometrix test Ames II jest alternatywą do wykonywania klasycznego testu *Salmonella*.

W szczepach przeznaczonych do tego testu wprowadzono mutacje punktowe uniemożliwiające im syntezę histydyny. W związku z tym, bakterie nie mają możliwości wzrostu na podłożach niezawierających tego aminokwasu. Rewersja wprowadzonej mutacji, a co za tym idzie ponowna możliwość wzrostu bakterii na podłożach pozbawionych histydyny może zostać osiągnięta poprzez substytucję zasad lub zmianę ramki odczytu w obrębie genu po dodaniu do hodowli czynnika mutagennego [15].

Test zawiera standardowo dwa szczepy bakteryjne: *Salmonella typhimurium* TA98 oraz TA-Mix. Pierwszy z nich wykrywa zmianę ramki odczytu, a mieszanina szczepów substytucję par zasad. W skład mieszaniny TA-Mix wchodzi, w równych propor-

cjach, sześć szczepów otrzymanych metodami inżynierii genetycznej na bazie szczepu TA100. Szczepy te oznaczone jako TA7001, TA7002, TA7003, TA7004, TA7005 oraz TA7006 umożliwiają wykrycie substytucji wszystkich sześciu możliwych par zasad (każdy ze szczepów wykrywa jedną specyficzną mutację). W tabeli 2 przedstawiono zestawienie szczepów oraz typy wykrywanych przez nich mutacji. Szczepy TA7001-TA7006 okazały się szczególnie przydatne w przypadku badań nitrowych pochodnych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych [2, 15, 16].

Test Ames II przewiduje badanie 6 stężeń związku oraz kontroli pozytywnej i ilości powstających rewersji spontanicznych. Procedura przeprowadzenia testu polega na ekspozycji szczepów na badane związki w podłożu zawierającym śladowe ilości histydyny przez okres 90 minut. Producent określa, że w tym okresie oraz przy ograniczonej ilości aminokwasu możliwe będą około 2 podziały komórkowe. Następnym etapem jest rozcieńczenie hodowli podłożem niezawierającym histydyny, które jest jednocześnie wskaźnikiem zmiany pH oraz przeniesienie jej do płytek inkubacyjnych. Inkubacja trwa 48h, w trakcie której komórki bakteryjne w których wystąpiła mutacja powrotna zaczynają prowadzić metabolizm. Produkty metabolizmu kolonii bakteryjnych powodują obniżenie pH, które skutkuje zmianą barwy podłoża wskaźnikowego z fioletowej na żółtą. Test Ames II wykonywać można zarówno w obecności jak i bez frakcji S-9 [15, 17].

Tabela 2. Szczepy używane w teście Ames II oraz typy wykrywanych przez nie mutacji [16, 17]

Szczep	Typ wykrywanej mutacji	Mutacja
<i>S. typhimurium</i> TA98	Ramka odczytu	GCGCGCGC
<i>S. typhimurium</i> TA-Mix:		
<i>S. typhimurium</i> TA7001	Substytucja par zasad	A:T>G:C
<i>S. typhimurium</i> TA7002	Substytucja par zasad	T:A>A:T
<i>S. typhimurium</i> TA7003	Substytucja par zasad	T:A>G:C
<i>S. typhimurium</i> TA7004	Substytucja par zasad	G:C>A:T
<i>S. typhimurium</i> TA7005	Substytucja par zasad	C:G>A:T
<i>S. typhimurium</i> TA7006	Substytucja par zasad	C:G>G:C

Optyczne porównanie ilości dołków o zmienionej barwie z rewersją spontaniczną bakterii pozwala na szacowanie właściwości mutagennych substancji poddawanych ocenie. Jako mutację pozytywną określa się każdy dołek o barwie odbiegającą od podstawowej.

4. TEST UMU

Innym z testów wykorzystujących bakterie *Salmonella typhimurium* jest uważany za prosty i szybki test UMU. Wykorzystywany tutaj szczep o oznaczeniu

TA1535/pSK1002. Szczep testowy posiada zwielokrotniony plazmid pSK1002, który pozwala przyspieszyć otrzymaną w trakcie testu odpowiedź oraz zwiększyć czułość bakterii. Czynniki powodujące uszkodzenie materiału DNA powodują ekspresję genu UmuC znajdującego się w operonie SOS. Gen ten, który powiązany jest z indukowanymi genami *recA*, *lexA* i *UmuD* odpowiada za występowanie procesu naprawy DNA. Wywołanie indukcji genu UmuC, który połączony jest z genem LacZ powoduje aktywność wewnątrzkomórkową β -galaktozy w połączeniu z delecją regionu LacZ genomu bakteryjnego. Zwielokrotnienie plazmidu UmuC-LacZ pozwala na zwiększenie szybkości i czułości prowadzonego badania. Poza zwielokrotnionym plazmidem w szczepie zastosowano mutację *rfa* oraz delecję Δ uvrB [2, 3, 6, 9].

Test opiera się zatem o proces naprawy DNA uruchamiany przez komórkę w momencie stwierdzenia uszkodzenia nici DNA. W skutek uszkodzenia nici DNA następuje wzrost aktywności enzymu β -galaktozy. Zauważenie tej aktywności wykazuje potencjalne działanie mutagenne zastosowanych w trakcie badań związków [2, 9, 18]. Przydatność testu UMU wykazano do wykrywania mutagennego działania różnorodnych związków i mieszanin w tym także dwutlenku azotu (NO_2), którego nie wykazały badania prowadzone klasycznym testem *Salmonella* przy zastosowaniu szczepów TA98 i TA100 [3].

5. PODSUMOWANIE

Szczep *Salmonella typhimurium* jest szeroko stosowany do badań związanych z potencjalną mutagennością i genotoksycznością próbek środowiskowych. Nie bez znaczenia dla tego faktu wydaje się być ogromna liczba szczepów testowych wykorzystywanych w badaniach. Ilość dostępnych szczepów oraz możliwość wprowadzania w ich materiale genetycznym specyficznych mutacji pozwala na ocenę różnorodnych komponentów środowiskowych takich jak gleba, woda czy powietrze. Ponadto, możliwości konstrukcji pochodnych szczepów na bazie szczepów macierzystych zwiększa czułość testów dla konkretnych substancji np. nitrowych pochodnych WWA w przypadku szczepów YG1041 oraz YG1042.

Popularność testów wykorzystujących bakterie *Salmonella typhimurium* jest nadal bardzo duża wśród badaczy efektów genotoksycznych różnego rodzaju próbek. Dodatkowo, zastosowanie, w trakcie badań, mikrosomalnej frakcji z wątroby szczura pozwala na interpolację wyników uzyskanych w bakteryjnych testach przesiewowych na organizmy ludzi i zwierząt.

Począwszy od lat 70. XX wieku, kiedy opracowany został klasyczny test *Salmonella*, do dnia dzisiejszego opracowano i wprowadzono do użycia testy opierające się na tej samej zasadzie działania, ale umożliwiające automatyzację oraz ograniczenie

żywanych w trakcie testu odczynników w stosunku do testu podstawowego. Przykładem tego może być test w formie mikropłytkowej.

Wreszcie, mnogość testów oraz szczepów testowych pozwala na badanie różnych efektów końcowych wywoływanych przez działanie mutagenów na komórki bakterii. Pozwala to na przygotowanie baterii testów badających zmianę ramki odczytu, mutacje genowe czy też uszkodzenie oraz naprawę DNA, tylko i wyłącznie przy użyciu bakterii z rodzaju *Salmonella typhimurium*, co może usprawnić i uprościć pracę laboratorium badawczego, poprzez brak konieczności zachowania specyficznych warunków namnażania i inkubacji dla różnych bakterii.

Szczep *Salmonella typhimurium* jest wykorzystywany w wielu testach mających na celu szybkie badania przesiewowe wielu związków, na które jesteśmy narażeni na co dzień. Łatwość i prostota wykonania tych testów pozwala na szybką ocenę czy poddawane badaniom związki niosą ze sobą zagrożenie w postaci działania mutagennego i genotoksycznego, a w przypadku ich wykrycia pozwalają na skierowanie ich do dalszych, bardziej szczegółowych analiz.

*Praca została zrealizowana w ramach grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa
Wyższego Nr N523 612939 (2010-2013)*

LITERATURA

- [1] BUBAK A., *Biomonitoring mutagenności powietrza atmosferycznego i wody*, [w:] Materiały Szkoleniowe Instytutu Ekologii Terenów Uprzemysłowionych, 127–136.
- [2] PIEKARSKA K., *Modyfikacje testu Salmonella do oceny mutagenności pyłowych zanieczyszczeń powietrza atmosferycznego*, Prace Naukowe Instytutu Inżynierii Ochrony Środowiska Politechniki Wrocławskiej, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, 2008.
- [3] TRACZEWSKA T.M., *Biologiczne metody oceny skażenia środowiska*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 2011.
- [4] BRUZAN P., WOŹNY M. i in., *Toksykologia molekularna – przewodnik do ćwiczeń*, Olsztyn 2007.
- [5] JADCZYK P., *Genotoksyczność zanieczyszczeń atmosfery*, [w:] Serwis informacyjny TOZ we Wrocławiu.
- [6] BRONISŁAWSKA A., DEMKOWICZ-DOBRZAŃSKI K. i in., *Ocena przydatności krótkoterminowych testów bakteryjnych SOS Chromotest oraz Umu Test w badaniach genotoksyczności związków chemicznych oraz prób środowiskowych*, [w:] Ekotoksykologia w Ochronie Środowiska, PZITS, 2008, 37–44.
- [7] SKRZYPCZAK A., BRONISŁAWSKA A. i in., *Wpływ promieniowania UV na genotoksyczność chlorpromazy ocenianą w teście SOS Chromotest i Umu Test*, [w:] Ekotoksykologia w Ochronie Środowiska, PZITS, 2008, 389–396.
- [8] STEINMETZ-BECK A., SZAHIDEWICZ-KRUPSKA E., *Genotoksyczny Efekt przewlekłej ekspozycji na ołów w teście kometkowym*, Medycyna Pracy, 2005, Vol. 56, No. 4, 295-302.
- [9] PODSIADŁY T., *Genotoksyczność wody do picia w wybranych wodociągach*, Ochrona Środowiska, 1999, Vol. 74, No. 3, 45–48.

- [10] CORBISIER P., BARCELO D., *European Union Concerted Action; BIOSSET: Biosensors for Environmental Technology*, Newsteller No. 8, March 2001; Report on the technical workshop on genotoxicity biosensing, Mol, Belgium 2000.
- [11] KALKA J., OŚLIŚŁOK A., i in., *Wykorzystanie testu mikrojądrowego do oceny genotoksyczności odcieków ze składowisk odpadów*, [w:] *Ekotoksykologia w Ochronie Środowiska*, PZITS, 2008, 173–178.
- [12] GRISOLIA C.K., CORDEIRO C.M.T., *Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish*, *Genetics and Molecular Biology*, 2000, Vol. 23, No. 1, 235–239
- [13] BÉLCIK M., *Wpływ środków dezynfekcyjnych na mutagenność mikrozanieczyszczeń wody do picia*, Praca inżynierska, Wrocław, 2011.
- [14] ONG T.M., MUKHTAR C.R., et al., *Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S9 from rat liver*, *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, 1980, vol. 4, 55–65.
- [15] *Ames II Test do oceny mutagenności w formie mikroplatyki – instrukcja stosowania*, 2012.
- [16] FLÜCKIGER-ISLER S., BAUMEISTER M. i in., *Assessment of the performance of the Ames II™ assay: a collaborative study with 19 coded compounds*, *Mutation Research*, 2004, Vol. 558, 181–197.
- [17] KAMBER M., FLÜCKIGER-ISLER S. i in., *Comparison of the Ames II and traditional Ames test responses with respect to mutagenicity, strain specificities, need for metabolism and correlation with rodent carcinogenicity*, *Mutagenesis*, 2009, Vol. 24, No. 4, 359–366.
- [18] SCHMID C., REIFFERSCHIED G. i in., *Increase of sensitivity and validity of the SOS/umu-test after replacement of the β -galactosidase reporter gene with luciferase*, *Mutation Research*, 1997, Vol. 394, 9–16.

GENOTOXICITY TEST OF ENVIRONMENTAL SAMPLES ON EXAMPLE OF *SALMONELLA* *TYPHIMURIUM* STRAINS

Technological development, growth of industrialization and increasing the number of the world's population will increasingly drastic deterioration of environmental conditions on Earth. Prolonged exposure to pollution, among which are genotoxic substances causes morbidity of the population on cancer.

The paper presents tests to detection genotoxic effects of environmental samples based on the bacteria *Salmonella typhimurium*, discusses the rules of their conduct, and end results detected by each of them. In this paper where also discussed strains used in different assays. The paper presents a classic *Salmonella* test, microplate *Salmonella* test – Ames II and aUMU test using system SOS to repair DNA.