

Instytut Inżynierii Ochrony Środowiska
Politechniki Wrocławskiej

Seria PRE nr 75/85

Biologiczna transformacja i indykacja zanieczyszczeń o charakterze mutagenym i rakotwórczym wody powierzchniowej ze szczególnym uwzględnieniem wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych.

Rozprawa doktorska

Teodora Małgorzata Traczewska

Promotor:

Profesor dr hab. Maria Pawlaczyk-Szpilowa

Praca wykonana w ramach Programu Międzyresortowego
MR II - 17.5.2.

Słowa kluczowe: wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, woda powierzchniowa i nadosadowa, bakterie wrażliwe i odporne, kumulacja, biotransformacja, metabolity, bioindykacja, mutagenność, rakotwórczość.

Wrocław 1985

Mgr Teodora Małgorzata Traczewska

Instytut Inżynierii Ochrony Środowiska

Politechnika Wroclawska

Plac Grunwaldzki 9

53-317 Wrocław

Promotorowi

Pani Profesor dr hab. Marii Pawlaczyk-Szpilowej

wyrażam serdeczne podziękowanie

za okazaną życzliwość, cenne uwagi

i opiekę podczas realizacji pracy.

SPIS TREŚCI

	<u>Strona</u>
1. WSTEP	14
2. STUDIA LITERATUROWE	17
2.1. Charakterystyka wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych	17
2.1.1. Mutagenne i rakotwórcze działanie wielopierścieniowych węglowodorów . aromatycznych	21
2.2. Zanieczyszczenie środowiska wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi.	24
2.2.1. Zanieczyszczenie powietrza wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi.	24
2.2.2. Zanieczyszczenie wód przez wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne.	29
2.2.2.1. Pochodzenie WWA w środowisku wodnym	29
2.2.2.2. Ilość wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w wodach .	32
2.2.3. Zanieczyszczenie gleby wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi.	36
2.2.4. Zanieczyszczenie żywności przez wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne.	39
2.3. Przemiany wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych	42

2.3.1. Rozkład WWA pod wpływem czynników fizycznych i chemicznych.	42
2.3.2. Rozkład WWA przez mikroorganizmy	47
2.4. Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne a rak u ludzi.	51
2.4.1. Przemiany wielopierścieniowych węglowodórów aromatycznych w organizmach wyższych.	54
2.4.1.1. Aktywacja metaboliczna WWA	56
2.4.2. Akumulacja i wydalanie WWA.	65
2.4.3. Transformacja nowotworowa.	70
2.5. Ekologiczne uwarunkowania chorób nowotworowych i kontrola występowania w środowisku chemicznych mutagenów i karcinogenów.	78
3. ZAGADNIENIE I CEL PRACY	85
4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	88
4.1. Materiały i metody	88
4.1.1. Badania nad obecnością w wodzie rzeki Oławy składników o działaniu mutagennym i rakotwórczym.	88
4.1.1.1. Metody ekstrakcji i oznaczania ilościowego wybranych wielopierścieniowych węglowodórów aromatycznych z rzeki Oławy.	88
4.1.1.2. Badania nad występowaniem w wodzie rzeki Oławy składników o potencjalnym mutagennym i rakotwórczym działaniem z zastosowaniem testu Ames'a.	90

- 4.1.1.3. Przygotowanie cykloheksanowych ekstraktów wody rzeki Oławy do testu Ames'a. 94
- 4.1.2. Badania nad interakcją naturalnej mikroflory wody a wybranymi wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi. 94
- 4.1.2.1. Zastosowane w badaniach wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne 94
- 4.1.2.2. Badania nad różną wrażliwością mikroflory rzeki Oławy na wybrane wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne w cyklu rocznym. 96
- 4.1.2.3. Selekcja ilościowa i jakościowa naturalnej mikroflory rzeki Oławy pod wpływem wybranych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. 97
- 4.1.2.4. Badania nad rozkładem wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych przez naturalną mikroflorę wody. 99
- 4.1.2.5. Badania nad kumulacją wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych przez naturalną mikroflorę rzeki Oławy. 100
- 4.1.3. Badania nad interakcją naturalnej mikroflory a wybranymi wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi w układzie dynamicznym. 101

- 4.1.3.1. Badania nad selekcją ilościową w obrębie wybranych grup bakterii pod wpływem wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych dozowanych w sposób ciągły do filtrów glebowych. **103**
- 4.1.3.1.1. Badania nad selekcją bakterii glebowych pod wpływem wybranych WWA, oceniana w przesączu filtrów glebowych. **103**
- 4.1.3.1.2. Badania nad selekcją bakterii glebowych pod wpływem wybranych WWA, oceniana w profilach glebowych lizymetrów. **106**
- 4.1.3.2. Badania modelowe nad przemieszczaniem się badanych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych z gleby do wody. **106**
- 4.1.3.2.1. Sorpcja i desorpcja badanych związków przez glebę. **106**
- 4.1.3.2.2. Udział mikroflory gleby w sorpcji i desorpcji WWA. **107**
- 4.1.4. Badania nad interakcją wyizolowanych czystych szczepów bakterii a wybranymi wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi **107**

- 4.1.4.1. Izolacja czystych szczepów bakterii wrażliwych i niewrażliwych na stosowane wysokie stężenia WWA. 107
- 4.1.4.2. Identyfikacja szczepów bakterii wrażliwych i opornych na wysokie stężenia WWA. 108
- 4.1.4.3. Określenie aktywności oddechowej czystych wrażliwych i opornych szczepów bakterii wobec wybranych WWA jako jedynych źródeł węgla i energii. 110
- 4.1.4.4. Badania nad biotransformacją antracenu przez czyste wrażliwe i niewrażliwe szczepy bakterii. 112
- 4.1.4.4.1. Badania nad biotransformacją antracenu z zastosowaniem czystych szczepów bakterii wykorzystujących badany związek jako jedyne źródło węgla i energii. 112
- 4.1.4.4.1.1. Określenie rozwoju populacji wobec antracenu jako źródła węgla i energii. 114
- 4.1.4.4.1.2. Określenie ubytku substratu w czasie biotransformacji antracenu przez czyste szczepy bakterii i ich mieszaninę. 114
- 4.1.4.4.1.3. Określenie mutagennego i rakotwórczego działania produktów biodegradacyjnych antracenu. 114

4.1.4.4.2.	Dalsze badania nad biotransformacją antracenu.	115
4.1.4.4.2.1.	Określenie przyrostu bakterii metodą płytkową Kocha.	116
4.1.4.4.2.2.	Określenie aktywności oddechowej szczepów bakterii w czasie biotransformacji antracenu metodą manometryczną Warburga.	116
4.1.4.4.2.3.	Określenie mutagennego i rakotwórczego działania produktów pobiodegradacyjnych antracenu.	116
4.1.4.4.2.4.	Próby ustalenia szlaku metabolicznego antracenu u bakterii.	117
4.2.	Wyniki	117
4.2.1.	Charakterystyka zlewni rzeki Oławy, od źródeł do ujęcia powierzchniowego i opis terenu badań.	117
4.2.2.	Występowanie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w wodzie rzeki Oławy w cyklu rocznym.	119
4.2.3.	Występowanie zanieczyszczeń o charakterze mutagennym i rakotwórczym w wodzie rzeki Oławy.	122
4.2.3.1.	Ustalenie warunków testu Ames'a.	122
4.2.3.2.	Badania metodą Ames'a prób wody z rzeki Oławy	123
4.2.3.3.	Badania nad obecnością w cykloheksanowych ekstraktach wody rzeki Oławy składników o potencjalnym	

mutagennym i rakotwórczym działaniu

- 4.2.4. Badania nad interakcją naturalnej mikroflory wody a wybranymi wielopierścieniowymi węglowodórami aromatycznymi w warunkach statycznych. 131
- 4.2.4.1. Badania nad różną wrażliwością mikroflory rzeki Oławy na wybrane wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne w cyklu rocznym. 137
- 4.2.4.2. Selekcja ilościowa i jakościowa naturalnej mikroflory rzeki Oławy pod wpływem wybranych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. 138
- 4.2.4.3. Badania nad rozkładem wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych przez naturalną mikroflorę wody. 162
- 4.2.4.4. Badania nad kumulacją wybranych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych przez naturalną mikroflorę rzeki Oławy. 173
- 4.2.5. Badania nad interakcją mikroflory z wybranymi wielopierścieniowymi węglowodórmi aromatycznymi benzo/a/pirenem, antracenenem i fluorantenenem w warunkach dynamicznych. 176
- 183

- 4.2.5.1. Selekcja ilościowa w obrębie
wybranych grup bakterii pod wpły-
wem WWA dozowanych w sposób ciąg-
ły do filtrów glebowych. **184**
- 4.2.5.1.1. Selekcja bakterii pod wpływem
WWA oceniana w przesączu fil-
trów glebowych. **184**
- 4.2.5.1.2. Selekcja bakterii pod wpływem
WWA oceniana w profilach glebo-
wych lizymetrów. **197**
- 4.2.5.2. Badania modelowe nad przemiesz-
czaniem się badanych WWA z gle-
by do wody. **205**
- 4.2.5.2.1. Badania nad sorpcją i desorpcją
WWA w glebie niesterylnej. **205**
- 4.2.5.2.2. Udział mikroflory gleby w sor-
pcji i desorpcji wielopierście-
niowych węglowodorów aromatycz-
nych. **210**
- 4.2.6. Badania nad interakcją wyizolowanych czys-
tych szczepów bakterii a wybranymi wielo-
pierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi. **214**
- 4.2.6.1. Izolacja czystych szczepów bakte-
rii wrażliwych i niewrażliwych na
wysokie stężenia wybranych wielo-
pierścieniowych węglowodorów aro-
matycznych. **215**

- 4.2.6.2. Identyfikacja szczepów bakterii wrażliwych i niewrażliwych na wysokie stężenia wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. 217
- 4.2.6.3. Określenie aktywności oddechowej czystych niewrażliwych i wrażliwych szczepów bakterii wobec wybranych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. 220
- 4.2.6.4. Badania nad biotransformacją antracenu przez czyste niewrażliwe i wrażliwe szczepy bakterii. 226
- 4.2.6.4.1. Badania nad biotransformacją antracenu z zastosowaniem czystych szczepów bakterii wykorzystujących badany związek jako źródło węgla i energii. 227
- 4.2.6.4.1.1. Określenie rozwoju populacji bakterii wobec antracenu jako źródła węgla i energii. 227
- 4.2.6.4.1.2. Określenie ubytku substratu w czasie biotransformacji antracenu przez czyste szczepy bakterii i ich mieszaninę. 230
- 4.2.6.4.1.3. Określenie mutagennego i rakotwórczego działania produktów pobiodegradacyjnych antracenu. 231

4.2.6.4.2. Dalsze badania nad biotransformacją antracenu	238
4.2.6.4.2.1. Określenie przyrostu bakterii metodą płytkową Kocha.	239
4.2.6.4.2.2. Określenie aktywności oddechowej szczepów bakterii w czasie biodegradacji antracenu metodą manometryczną Warburga.	239
4.2.6.4.2.3. Określenie mutagennego i rakotwórczego działania produktów pobiodegradacyjnych antracenu	245
4.2.6.4.2.4. Próby ustalenia szlaku metabolicznego antracenu u bakterii	247
5. PODSUMOWANIE I DYSKUSJA	251
6. WNIOSKI	260
7. LITERATURA	264
8. SPIS TABEL	288
9. SPIS RYSUNKÓW	293

1. WSTĘP

Występowanie coraz liczniejszych rodzajów obcych związków chemicznych w powietrzu, glebie, wodzie i żywności, możliwość kumulacji niektórych z nich w organizmach żywych oraz migracji w łańcuchu troficznym stwarza poważne zagrożenie dla środowiska i zdrowia człowieka. Wiele z tych zanieczyszczeń jest bowiem szczególnie szkodliwych ze względu na swe własności toksyczne, mutagenne, rakotwórcze, teratogenne lub alergiczne.

Wyda się, że ekologiczne uwarunkowania powstawania zwłaszcza chorób nowotworowych u ludzi stanowią zagadnienie pierwszoplanowe, gdyż postępująca degradacja środowiska naturalnego pozostaje w bezpośrednim związku z eksplozją chorób nowotworowych obserwowaną w ostatnich latach. Dlatego też wydaje się, że ściśle ukierunkowanie badań wyłącznie w celu stwierdzenia rakotwórczego charakteru określonego związku, czy grupy związków, w stosunku do wyższych kręgowców /ssaków/ i człowieka jest pierwszym i najważniejszym krokiem zmierzającym do ograniczenia tych związków w środowisku naturalnym. Rozpatrując zagadnienie chemicznej karcinogenezy należy brać ponadto pod uwagę cały szereg czynników środowiskowych, a także kierunek przemian badanych związków w ekosystemie. Ważne uzupełnienie stanowi także poznanie zakresu ekspozycji organizmu ludzkiego, w tym rozpoznanie źródeł skażenia, wielkość emisji, a także trwałości związków w środowisku naturalnym.

Bardzo istotnym elementem jest problem przemian badanych substancji w środowisku naturalnym. Znane bowiem są

przypadki powstawania związków karcinogennych w środowisku naturalnym z prekursorów, które takich własności nie posiadają lub powstawania produktów charakteryzujących się aktywnością biologiczną ze związków pod tym względem obojętnych itp.

Istotne znaczenie mają również zagadnienia dotyczące kumulacji badanych związków, a zatem istnienia i powiększania depozytu tych substancji w środowisku naturalnym oraz tkankach roślin i zwierząt, ich migracji w łańcuchu troficznym, przy jednoczesnym rozpatrzeniu tego zjawiska w aspekcie aktywnego gromadzenia się zanieczyszczeń w produktach roślinnych i zwierzęcych stanowiących źródło pokarmu dla ludzi.

Dopiero wtedy, mając ogólny pogląd na zakres ekspozycji organizmu ludzkiego i ich przemiany w środowisku naturalnym, można w pełni wypowiedzieć się na temat korelacji pomiędzy narażeniem organizmu ludzkiego na kontakt z badanymi związkami, bądź ich metabolitami a transformacją nowotworową prowadzącą w konsekwencji do pojawienia się zmian patologicznych.

Oddzielnym zagadnieniem w karcinogenezie jest poznanie losów substancji rakotwórczej w obrębie organizmu ludzkiego lub zwierzęcego:

Są one niezwykle ważne zwłaszcza na poziomie molekularnym, gdyż poznanie szlaków przemian enzymatycznych być może pozwoliłyby szukać możliwości ich przerwania i tym samym uniemożliwienia powstawania zmian nowotworowych,

co dotyczyć może zwłaszcza związków podlegających aktywacji metabolicznej.

Badania na poziomie molekularnym dają możliwość zapobiegania chorobom o skutkach odległych. Mieści się w tym mało jeszcze poznana część zagadnienia etiologii chorób nowotworowych oraz mutagenezy i teratogenezy [123] .

Poza bezpośrednim oddziaływaniem, o szkodliwości dla zdrowia niektórych związków chemicznych decyduje również wiele innych czynników np. droga i szybkość wchłaniania, wydalanie lub odkładanie się w tkankach, działanie różnych barier ochronnych wraz z obroną immunologiczną włącznie itp.

Do związków wykazujących dużą aktywność nowotworową w stosunku do ssaków, w tym do organizmu ludzkiego, zalicza się również wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne /WWA/.

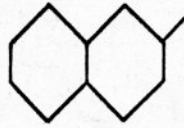
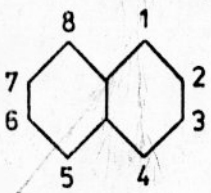
2. STUDIA LITERATUROWE

2.1. Charakterystyka wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych.

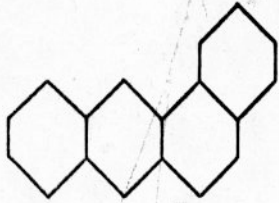
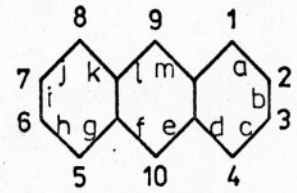
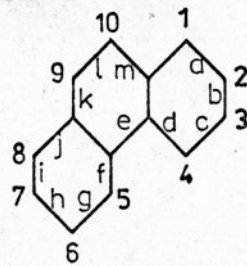
Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne zbudowane są z dwóch do wielu skondensowanych pierścieni benzenowych. W układach tych niektóre atomy węgla w cząsteczce należą jednocześnie do dwóch, a nawet trzech pierścieni. Jeżeli dwa pierścienie benzenowe połączone są w ten sposób, że będą miały dwa atomy węgla wspólne, to jest to prosty układ skondensowany zwany naftalenem $/C_{10}H_8/$. W połączeniach trój- i więcej pierścieniowych wyróżniamy dwa układy przestrzenne: układ linearny i angularny [125]. W środowisku naturalnym grupa reprezentowana jest przez szereg związków od naftalenu $/C_{10}H_8/$ do koronenu $/C_{24}H_{12}/$.

System nazewnictwa WWA związany jest z ich strukturą. Podana tu nomenklatura oparta jest na ustaleniach IUPAC /International Union of Pure and Applied Chemistry, podana w The Ring Index [131] /rys. 1/.

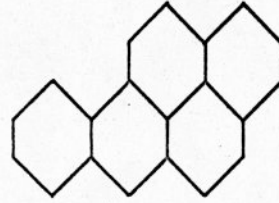
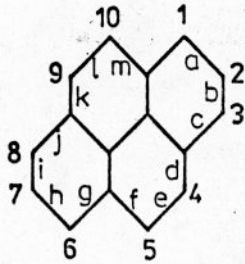
Niemal wszystkie wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne fluoryzują w świetle nadfioletowym. W wodzie ze względu na swą strukturę i brak polarnych substitutów są praktycznie nierozpuszczalne [137]. Wybrane własności fizyczne niektórych WWA przedstawiono w tabeli 1.



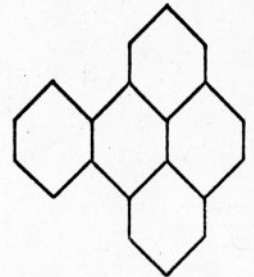
2-metylnaftalen



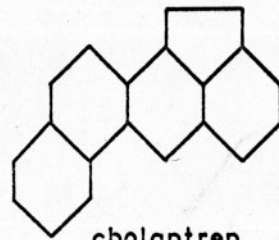
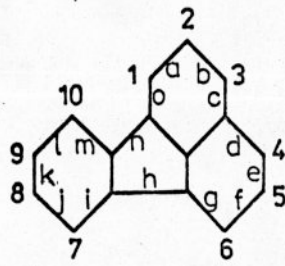
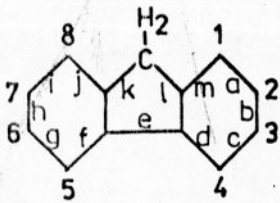
benzo(a) antracen



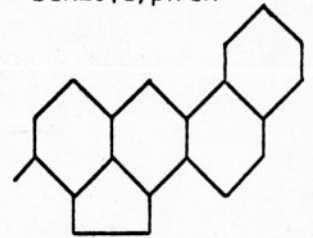
benzo(a) piren



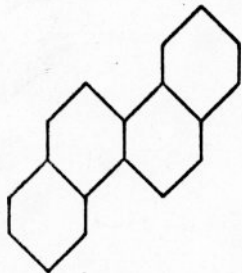
benzo(e)piren



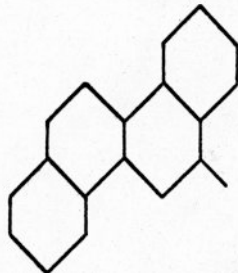
cholantren



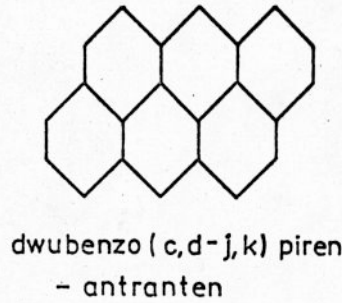
3-metylocholantren



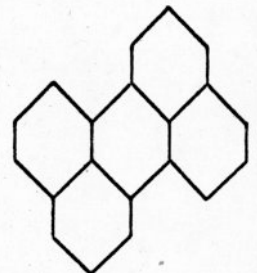
chryzen



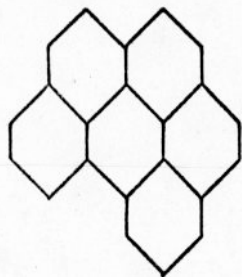
5-metylochryzen



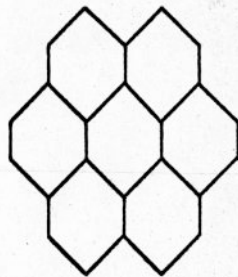
dwubenzo (c,d-j,k) piren
- antranten



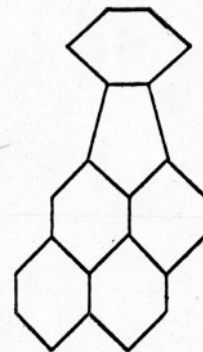
perylen



benzo (g,h,i) perylen



koronen



indeno (1,2,3 - c,d) piren

Rys.1 Struktura pierścieniowa reprezentatywnych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych

Tabela 1. Wybrane własności fizyczne niektórych WWA

Związek	Wzór sumaryczny	Ciężar molekularny	Temp. topnienia °C	Rozpuszczalność w wodzie w mg/dm ³ w 20°C
naftalen	C ₁₀ H ₈	128,17	80,2	
2-metylnaftalen	C ₁₁ H ₁₀	142,2	34,5	brak danych
fenantren	C ₁₄ H ₁₀	178,22	100-101	1,6
antracen	C ₂₀ H ₁₆	256,5	122-123	0,075
benzo/a/antracen	C ₁₈ H ₁₂	228	254-256	0,011;0,01
piren	C ₁₆ H ₁₀	202,26	149-150	0,175;0,165
benzo/a/piren	C ₂₀ H ₁₂	252	176,5-179	0,004;0,012; 0,06
benzo/e/piren	C ₂₀ H ₁₂	252	178-179	0,0073
fluoren	C ₁₃ H ₁₀	166,21	116-117	brak danych
fluoranten	C ₁₆ H ₁₀	202,24	110	0,24:0,265
cholanten	C ₂₀ H ₁₄	254	170	brak danych
3-metylochlo- ranten	C ₂₁ H ₁₆	268	176,5	0,016;0,0015
chryzen	C ₁₈ H ₁₂	228,3	254-256	0,006;0,0015
5-metylochryzen	C ₂₁ H ₁₆	268,36	176-177	brak danych
antranten	C ₂₁ H ₁₂	264	brak	danych
perylene	C ₂₀ H ₁₂	252,36	273-274	0,0005
benzo/ghi/perylene	C ₂₂ H ₁₂	276	272-273	brak danych
koronen	C ₂₄ H ₁₂	300	brak	danych
indeno/1,2,3-od/ piren	C ₂₂ H ₁₂	276	162,5-164	brak danych

Wśród tych związków występują substancje wykazujące mniejszą lub większą aktywność biologiczną związaną z ich strukturą. Wspomniana aktywność biologiczna WWA uzależniona jest często od aktywacji metabolicznej tych substancji [92] .

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne tworzą się głównie w procesach wysokotemperaturowej pirolizy węgla, wchodzą również w skład ropy naftowej. Obecność w środowisku WWA jest przede wszystkim wynikiem zanieczyszczeń przemysłowych. Szczególne zagrożenie stwarzają ścieki koksownicze, gazownicze, z zakładów rafineryjnych, z zakładów przeróbki odgazowania węgla oraz przerobu produktów naftowych. Ponadto obecność tych związków w środowisku związana jest z ich emisją do atmosfery we wszystkich procesach technologicznych związanych z uzyskiwaniem energii w wyniku spalania węgla i paliw płynnych, zcieraniem nawierzchni z mas bitumicznych i wreszcie w wyniku spalania w silnikach pojazdów mechanicznych. Oprócz wymienionych źródeł nie bez znaczenia jest również fakt powstawania tych niebezpiecznych dla zdrowia związków w procesach przetwarzania żywności takich jak wędzenie, smażenie i opiekanie na rusztach z zastosowaniem węgla drzewnego.

A zatem wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne są szeroko rozprzestrzenione w środowisku naturalnym - występują w powietrzu, w wodach powierzchniowych i podziemnych, a także w żywności.

2.1.1. Mutagenne i rakotwórcze działanie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych.

Nie wszystkie wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne są kancerogenne w stosunku do ssaków. Rakotwórczość poszczególnych WWA przedstawiono w tabeli 2 [119]. Najbardziej rakotwórcze są WWA zbudowane z czterech, pięciu i sześciu skondensowanych pierścieni benzenowych. Natomiast zawierające mniejszą od wymienionej lub większą liczbę pierścieni charakteryzują się słabszą aktywnością biologiczną w transformacji nowotworowej, bądź jej nie wykazują. Również konfiguracja pierścieni decyduje o ich charakterze rakotwórczym. WWA o konfiguracji angularnej są bardziej rakotwórcze niż o linearnej. Ponadto stopień rakotwórczości WWA jest relatywny do ich struktury, stopnia skondensowania, a także do ilości powstających aktywnych metabolitów. Również alkilacja ma istotne znaczenie w aktywności nowotworowej tych związków. Położenie grupy alkilowej decyduje o inicjacji przemian enzymatycznych węglowodoru z udziałem MFO cytochromowego systemu P-450 [62,120].

Mechanizm działania związków rakotwórczych lub ich metabolitów polega na tym, że związki te ingerują w strukturę DNA komórkowego [2,132,133].

Stwierdzono np. że 1,2,5,6 - dwubenzoantracen ^{14}C łączy się z RNA i DNA skóry myszy [104,105]. Podobne łączenie się WWA z DNA i RNA oraz ich zależności w powstawaniu nowotworów wykazali Brookes i Lawley [23]. Wykazano również łączenie się *in vitro* benzo/a/pirenu z DNA [165].

Tabola 2

Rakotwórczość WWA w stosunku do zwierząt laboratoryjnych z grupy ssaków

Związek	Rako- twór- czość	Związek	Rako- twór- czość
antraceni	-	benzo/k/fluoranten	-
fenantren	-	benzo/mno/fluoranten	-
benzo/a/antraceni	+	chloranten	-
7,12 dwumetylo benzo/a/antraceni	++++	benzo/j/chloranten	++
dwubenzo/aj/ antraceni	+	3-metylochloranten	++++
dwubenzo/ah/ antraceni	+++	naftalen	-
dwubenzo/a, c/antraceni	+	piren	-
benzo/a/fenantren	+++	benzo/a/piren	+++
fluoreni	-	benzo/e/piren	-
benzo/a/fluoreni	-	dwubenzo/al/piren	+/-
benzo/b/fluoreni	-	dwubenzo/ak/piren	+++
benzo/e/fluoreni	-	dwubenzo/ai/piren	+++
dwubenzo/ag/fluoreni	+	dwubenzo/cd, jk/piren	-
dwubenzo/ah/fluoreni	+/-	indeno/1,2,3-cd/piren	+
dwubenzo/ac/fluoreni	+/-	chryzen	+/-
fluoranten	-	dwubenzo/b, def/ chryzen	++
benzo/b/fluoranten	++	dwubenzo/def, p/ chryzen	+
benzo/j/fluoranten	++	antranten	-
		perylene	-
		benzo/hgi/perylene	-
		koronen	-

- nie kancerogenne, +/- wątpliwy lub słabo kancerogenne

+ kancerogenne, ++, +++, ++++ silnie kancerogenne

Wiadomo, że większość związków rakotwórczych, w tym także benzo/a/piren, nie posiadają bezpośredniego działania rakotwórczego. Działanie to wykazują natomiast niektóre z metabolitów /biokarcinogeny/ powstających w wyniku przemian /aktywacji/ związku macierzystego /prokarcinogenu/, zachodzących przy udziale enzymów komórkowych. Na przykład stwierdzono, że fenantren nie wykazuje mutagennego działania, natomiast dwa jego metabolity wykazują taką aktywność [128]. Dlatego też wydaje się, że hamowanie procesu przemian metabolicznych WWA w komórkach zwierzęcych może mieć istotne znaczenie w zapobieganiu powstawania nowotworów wywoływanych np. przez benzo/a/piren, a także przez inne związki rakotwórcze [42, 94, 96, 101].

Z badań niektórych autorów [133] wynika, że butylohydroksyanizol jest inhibitorem aktywacji benzo/a/pirenu.

Brak zależności liniowej między działaniem a dawką, jak również dane o sumowaniu się nieodwracalnego działania małych dawek, przemawiają za tym, że na występowanie nowotworów u zwierząt wpływa ogólna ilość substancji, jaka wniknęła do ustroju. Choroba nowotworowa może się ujawnić po upływie długiego czasu od całkowitego wydalenia substancji z ustroju, nawet jeżeli wniknęła ona jednorazowo. Sprzyja temu obecność w środowisku oraz w pożywieniu substancji kokarcinogennych [50, 129].

Poglądy dotyczące etiologii nowotworów skłaniają się coraz częściej do poglądu, iż za rozwój tych chorób w świecie współczesnym są odpowiedzialne różnorodne substancje oraz chemizacja środowiska.

Spośród zbadanych w tym kierunku 336 związków, 26 okazało się rakotwórczych dla ludzi, 156 - bezwzględnie dla zwierząt doświadczalnych, o 154 związkach nie można się było wypowiedzieć z całą pewnością co do ich rakotwórczości.

Związki rakotwórcze różnią się między sobą znacznie pod względem siły działania [110] .

Ponadto w wyniku badań laboratoryjnych stwierdzono, że wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne wykazują działanie karcinogenne, kokarcinogenne, mutagenne i teratogenne również w stosunku do organizmów wodnych. Badania prowadzono na gąbkach [87] , małżach [79] , na kulturach komórek *Salmo gairdneri* /RTG-2/, *Pimephales promelas* /FHM/ [20] , embrionach *Brachydanio rerio* [74] , na skórze trzech gatunków ryb /*Gasterosteus aculeatus*, *Rhodeus amarus* i *Cyprinus carpio*/ [37] , trąszkach [151] i ropuchach [29] . W wyniku tych prac potwierdzono powstawanie zmian nowotworowych mutagennego i teratogennego działania karcinogennych WWA zarówno na bezkręgowce jak i kręgowce niższe.

Równocześnie jednak stwierdzono zróżnicowaną pod względem gatunkowym wrażliwość badanych zwierząt na patogenne działanie WWA.

2.2. Zanieczyszczenie środowiska wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi

2.2.1. Zanieczyszczenie powietrza przez wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne

Zanieczyszczenia powietrza można podzielić na [57] :

1. Zanieczyszczenia pierwotne, które występują w powietrzu w postaci takich substancji chemicznych w jakich zostały

uwolnione do atmosfery ze źródła ich wytwarzania.

2. Zanieczyszczenia będące produktami reakcji chemicznych lub fotochemicznych, jakie mogą zachodzić pomiędzy naturalnymi składnikami atmosfery i jej zanieczyszczeniami.

Pod względem chemicznym głównymi zanieczyszczeniami powietrza atmosferycznego są: tlenki węgla, dwutlenki siarki, tlenki azotu, związki ołowiu i innych metali ciężkich, azotany, węglowodory alifatyczne i aromatyczne [76,77,78,168] i ich pochodne chlorowe oraz fluor.

Głównymi źródłami zanieczyszczenia powietrza wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi są:

1. Spalanie węgla i paliw ciekłych w elektrowniach, elektrociepłowniach, zakładach przemysłowych oraz gospodarstwach domowych i produkty uboczne z zakładów chemicznych [75] .
2. Transport samochodowy.

Na podstawie wieloletnich badań prowadzonych na terenie Polski przez stacje sanitarno-epidemiologiczne [124] stwierdzono, iż w dużych miastach i aglomeracjach miejsko-przemysłowych zanieczyszczenie powietrza przewyższa wartości normatywne. Przykładem tego mogą być wyniki obrazujące wzrost emisji toksycznych składników gazów spalinowych z terenu Polski i obszaru Warszawy w latach 1970-1975. Opracowano je na podstawie zawartości rakotwórczych węglowodorów, tlenków azotu i ołowiu /tabela 3/.

Tabela 3.

Wzrost emisji toksycznych składników gazów spalinowych w Polsce i Warszawie w latach 1970-1975.

Polska			Warszawa		
Silniki z zapłonem iskrowym	Silniki z samoczynnym zapłonem	Razem	Silniki z zapłonem iskrowym	Silniki z samoczynnym zapłonem	Razem
137%	182%	139%	133%	198%	138%

Stwierdzono też, że na obszarach zurbanizowanych większa jest kumulacja benzo/a/pirenu w płucach u ludzi.

Dutkiewicz i współautorzy [34] podają, iż w miejscach położonych z dala od ruchu drogowego stężenie antracenu, pirenu, fluorantenu, benzo/a/antracenu, chryzenu, benzo/a/pirenu, perylenu i koronenu kształtuje się na poziomie 0,003-0,15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, natomiast na obszarach o nasilonym ruchu drogowym wynosi 0,13-0,244 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ powietrza, przy czym norma krajowa przewiduje NDS benzo/a/pirenu 0,05 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ [35].

Woźniak J. i Tokarz A. [167] badali próby powietrza pochodzące z centrum Łodzi i z Płocka z obrzeża strefy ochronnej Zakładów Przemysłu Petrochemicznego i Rafineryjnego. Stwierdzili oni, iż w Łodzi benzo/a/piren występował w granicach 0,0606-0,2260 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, zaś w Płocku 0,0026-0,1066 $\mu\text{g}/\text{m}^3$.

Environmental Protection Agency /EPA/ podaje koncentrację benzo/a/pirenu w powietrzu w 139 miastach i na 21 niezurbanizowanych terenach USA w latach 1966-1970 [119].

W miastach zawartość benzo/a/pirenu wahała się w granicach 0,2-29,5 ng/m³, zaś na terenach niezurbanizowanych 0,1-2,1 ng/m³.

Schuetzle [149] przytacza znaczną koncentrację WWA w różnych frakcjach gazów spalinowych silników Diesla, zaś Salmeen [148] i inni [130,150] podają zawartość w tym materiale nitrowych pochodnych WWA, uważanych za bardziej karcinogenne od związków podstawowych. Również znaczny udział w zanieczyszczeniu powietrza wielopierścieniowymi węglowodarami aromatycznymi mają silniki samolotowe [93].

Neff [119] podaje dane dotyczące emisji benzo/a/pirenu do atmosfery w USA i na świecie w okresie od 1966-1969 roku w wyniku gospodarczej działalności człowieka /tabela 4/.

Na wzrost toksyczności zanieczyszczeń powietrza atmosferycznego mogą mieć również wpływ warunki klimatyczne oraz zjawiska fotochemiczne. Najbardziej charakterystyczne jest zjawisko tzw. inwersji cieplnej, jakie powstaje nad dużymi miastami przy spalaniu dużych ilości stałych i płynnych materiałów energetycznych.

Pod katalitycznym wpływem promieni nadfioletowych [107] zawartych w widmie promieniowania słonecznego, niektóre związki chemiczne zawarte w powietrzu, a przede wszystkim węglowodory alifatyczne i aromatyczne, aldehydy, tlenki azotu ulegają utlenianiu do silnie toksycznych nitroolefin, ozonu, nadtlenków oraz rakotwórczych związków epoksydowych [140]. Zjawisko smogu fotochemicznego potęguje znacznie toksyczność zanieczyszczeń powietrza w okolicach, gdzie jest duże nasłonecznienie i natężony ruch samochodowy oraz silne zapylenie powietrza.

Tabela 4.

Emisja benzo/a/pirenu do atmosfery w latach 1966-1969
na terenie USA i całego świata [119].

Źródła zanieczyszczenia	Emisja benzo/a/pirenu w tonach/rok		
	USA	Cały świat bez USA	Na całym świecie
<u>Spalanie i uzyskiwanie energii</u>			
węgiel	431	1954	2376
olej	2	3	5
gaz	2	1	3
drewno	40	180	220
<u>procesy przemysłowe</u>			
produkcja koksu	192	841	1033
katalityczne rafinacje	6	6	12
<u>odpady i otwarte spalanie</u>			
otwarte spalanie komercyjne i przemysłowe	23	46	69
inne	11	22	33
otwarte spalanie węgla w kominkach	340	340	680
wprawy leśne i rolne	140	280	420
<u>pojazdy</u>			
samochody ciężarowe i autobusy	12	17	29
samochody	10	6	16
Całkowita emisja	1283	3761	5044

Zanieczyszczenie powietrza atmosferycznego wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi stanowi istotny element skażenia biosfery tymi niebezpiecznymi dla zdrowia związkami, gdyż można wykazać korelację pomiędzy ilością tych związków w powietrzu, a stopniem skażenia wód powierzchniowych i podziemnych, gleby a także żywności, zwłaszcza warzyw i zbóż. Ponadto emisja WWA do atmosfery jest istotnym czynnikiem rozprzestrzeniania się tych związków w środowisku, ze względu na fakt przemieszczania się ich wraz z drobnocząsteczkowym pyłem i sadzą na znaczne odległości od źródła skażenia. Wnikanie WWA do organizmu ludzkiego drogą oddechową uważane jest za najbardziej niebezpieczne dla zdrowia.

2.2.2. Zanieczyszczenie wód przez wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne.

2.2.2.1. Pochodzenie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w środowisku wodnym.

Obecność wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w wodach jest przede wszystkim wynikiem zanieczyszczenia zbiorników wodnych ściekami przemysłowymi [10, 17] . Policykliczne węglowodory aromatyczne tworzą się głównie w procesach wysokotemperaturowej pirolizy węgla [119] , wchodzą również w skład ropy naftowej. Stąd szczególne zagrożenie stanowią ścieki koksownicze, gazownicze, z zakładów rafineryjnych, z zakładów przeróbki produktów odgazowania węgla oraz przerobu produktów naftowych, w których stwierdza się obecność np. benzo/a/pirenu i 1,2 benzoantracemu. [1, 4, 57, 60, 156]

Obecność WWA w wodach naturalnych może być również wynikiem wymywania tych związków z bitumicznych nawierzchni dróg oraz z atmosfery zanieczyszczonej gazami spalinowymi [54,77].

Nie bez znaczenia pozostają także ilości WWA dostające się do wód powierzchniowych w wyniku opadów atmosferycznych [54] /tabela 5/.

Tabela 5.

Zawartość WWA w pokrywie śnieżnej [54] .

Rodzaj próbki	Zawartość WWA $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ wody ze śniegu			
	benzo/a/piren	średnio	fluoranten	średnio
Świeżo po opadzie	39-61	50	649-1417	1055
	29-69	49	573-1944	1026
1 tydzień po opadzie	104-194	149	1556-1944	1750
4 tygodnie po opadzie	556-695	616	4167-6944	5384

Stwierdzono, że istnieje także niewielki naturalny poziom stężenia WWA w wodach, gdyż węglowodory mogą być syntetyzowane przez bakterie i rośliny [16] .

Konorr i Schenk [82] stwierdzili, że wiele szczepów bakterii rosnących na agarze odżywczym i na podłożu glicerynowo-glukozowym /glicerol-grape-sugar agar/ wytwarzają benzo/a/piren, który jest kumulowany w ich komórkach.

Saprophytyczny szczep *Mycobacterium smegmatis* zawierał 2,0 - 4,8 μg B/a/P w 100 g suchej masy. Szczepy *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* i *Mycobacterium Z6* zawierały od 2,0 - 6,0 μg B/a/P w 100 g suchej masy.

Istnieje również wiele doniesień na temat biosyntezy benzo/a/pirenu przez bakterie anaerobowe, zwłaszcza *Clostridium putride* [98,102,122]. Stwierdzono również biosyntezę benzo/a/pirenu u wielu organizmów planktonowych [121].

Według niektórych autorów również niższe i wyższe rośliny mają zdolność biosyntezy wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych [18,19,59,112,113].

Obecnie niektórzy autorzy podważają istnienie zjawiska biosyntezy WWA, tłumacząc wyniki wcześniejszych badań mało precyzyjnymi i selektywnymi metodami analitycznymi. Wniosek ten wysnuto na podstawie pracy dotyczącej zjawiska biosyntezy benzo/a/pirenu przez bakterie anaerobowe, z zastosowaniem spektrofotometrycznej chromatografii masowej [61].

W sumie wydaje się, iż wprawdzie istnieje pewien niewielki naturalny poziom wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w wodach, nie mniej stwierdzone wzrastające zanieczyszczenie zarówno wód powierzchniowych, podziemnych i morskich tymi związkami, jest głównie wynikiem gospodarczej działalności człowieka.

2.2.2.2. Ilość wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w wodach

Światowa Organizacja Zdrowia już w 1964 roku zwróciła uwagę na potrzebę kontrolowania zawartości WWA w wodzie do picia. Opierając się na badaniach Borneffa i Kunte'a [14,15] zaproponowano ograniczenie kontroli do sześciu wytypowanych związków, przyjętych jako reprezentatywne dla całej grupy. Są to benzo/a/piren, benzo/b/fluoranten, benzo/k/fluoranten, benzo/g,h,i/perylen, fluoranten, indeno/1,2,3-c,d/piren. Zalecaną dopuszczalną zawartość wymienionych związków w wodzie do picia określono na 200 ng/dm^3 [70] .

Punktem wyjścia do ustalenia tej granicznej wartości stężenia były badania Borneffa i Kunte'a [17] , w których analizowano wody podziemne z 14 studni zlokalizowanych na obszarze Nadrenii, Palatynatu i Hesji oraz sieci wodociągowych rozprowadzających te wody po uzdatnieniu. Średnia wartość WWA w przebadanych wodach studziennych wynosiła $63,3 \text{ ng/dm}^3$, natomiast w wodach pochodzących z sieci stwierdzono zawartość wyższą, wynoszącą średnio $95,5 \text{ ng/dm}^3$. Wzrost stężenia oznaczanych związków w wodach uzdatnionych, mógł być - zdaniem autorów - wyłącznie wynikiem wymywania WWA z bitumicznych, antykorozyjnych powłok stosowanych w przewodach wodociagowych. Na podstawie powyższych danych, jako podstawowy naturalny poziom zawartości WWA w wodach podziemnych przyjęto 50 ng/dm^3 natomiast w wodzie wodociągowej pochodzącej ze źródeł podziemnych - 100 ng/dm^3 .

Po przemnożeniu tej ostatniej wartości przez współczynnik pewności wynoszący 2, uzyskano przyjęty przez WHO normatyw 200 ng/dm³. Ponieważ woda do picia, której źródłem są wody powierzchniowe, nie powinna zawierać również większych stężeń WWA, wspomniany limit dopuszczalnej zawartości WWA postanowiono uznać za obowiązujący - niezależnie od pochodzenia ujmowanej i uzdatnionej wody.

W wodach naturalnych WWA występuje w postaci rozpuszczonej oraz w formie związków zaadsorbowanych na cząsteczkach stałych. Równoczesna obecność substancji powierzchniowo-czynnych wielokrotnie zwiększa zdolność rozpuszczania WWA w wodzie w wyniku procesu solubilizacji [89, 119] .

Podwyższenie rozpuszczalności może być ponadto wynikiem występowania, także innych związków organicznych w wodzie. Przykładem może być podwyższenie rozpuszczalności benzo/a/pirenu w wodzie z dodatkiem kwasu mlekowego, puryn /np. kofeiny/, acetonu, metanolu, etanolu i dioksanu [157] .

Zawartość wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w wodach powierzchniowych jest zróżnicowana. Donoszą o tym Grochmalicka-Mikołajczyk i współaut. [55] , Grochmalicka-Mikołajczyk i współaut. [56] , Ochocka i współaut. [126] , Koch i współaut. [84] . Wartości jakie przyjmują WWA w niektórych rzekach Polski ilustruje tabela 6.

Tabela 6

Zawartość wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w niektórych wodach powierzchniowych na terenie Polski [171]

Pochodzenie próby wody	Zawartość WWA [ng/dm ³]						
	benzo/a/ piren	benzo/b/ fluoranten	benzo/k/ fluoranten	indeno /1,2,3-c,d/ piren	fluoranten	benzo/ghi/ perylene	suma
rzeka Warta Poznań	2-3	12-30	2-37	18-48	55-130	10-60	124-269
rzeka Wisła Kraków	115-130	90-125	125-135	80-90	200-210	120-150	740-830
rzeka Wisła Warszawa	20-54	40-48	24-28	32-48	47-96	23-24	190-294
rzeka Kłodawka Gorzów	2	4	2	6	4	3	21

Neff [119] zamieszcza tabelę zawartości wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w wodach rzek różnych regionów świata /tabela 7/ .

Tabela 7

Koncentracja benzo/a/pirenu i innych WWA w różnych wodach rzecznych [119] .

Pochodzenie próby wody	Koncentracja w ng/dm ³	
	benzo/a/piren	inne WWA
Ren przy Mainz RFN	50-110	730-1500
Ren przy Koblenz RFN	10-60	500-3000
Aach przy Stockach RFN	4-43	1440-3100
inne rzeki w RFN	0,6-10	200-1000
Psków ZSRR	0,01-0,1	-
Suncha ZSRR	50-3500	-
Tamiza Anglia	170-280	800-2350
Trent Anglia	5,3-504	25-3790
Severn Anglia	1,5-48	20-256
Oyster USA	78-150	-
Monongahela przy Pitsburgu USA	42-77	600-663
Ohio przy Huntington USA	5,6	57,9
Delavare przy Filadelfii USA	41,1	351,8

2.2.3. Zanieczyszczenie gleby przez wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne

W przeciwieństwie do zanieczyszczeń powietrza i wody zanieczyszczenia gleby nie ulegają łatwo dyspersji i mogą zalegać w niektórych miejscach przez bardzo długi czas [57] . Na trwałość substancji chemicznych w glebie wpływają różnorodne czynniki, a przede wszystkim charakter sorpcyjny gleby. Sorpcja gleby może być mechaniczna, fizyczna, chemiczna, wymienna i biologiczna. Trwałość związków chemicznych w glebie zależy również od warunków klimatycznych. Substancje chemiczne, które dostały się do gleby mogą ulegać metabolizmowi mikrobiologicznemu do związków mniej lub bardziej trwałych. Z kolei właściwości zanieczyszczeń chemicznych mogą w istotny sposób przyspieszać lub hamować aktywność metaboliczną drobnoustrojów gleby.

Substancje chemiczne mogą dostawać się do gleby z powietrza jako cząstki stałe, kropelki cieczy, lub w postaci rozpuszczonej w wodzie opadowej.

Źródłami zanieczyszczenia są: rolnictwo, przemysł, transport i gospodarstwa domowe.

Zanieczyszczenia przemysłowe są bardzo złożone pod względem chemicznym. W sąsiedztwie fabryk i zakładów energetycznych istnieje potencjalne niebezpieczeństwo zanieczyszczenia gleby węglowodorami zaadsorbowanymi na cząstkach sadzy. Hałdy odpadów kopalnianych, hutniczych i innych zakładów są źródłem zanieczyszczeń przenoszonych przez wiatr w postaci pyłu lub wymytych przez wodę deszczową.

Często przyczyną zanieczyszczenia gleby są osady ściekowe z oczyszczalni ścieków przemysłowych lub miejskich oraz niedostatecznie oczyszczone ścieki wykorzystywane do nawadniania pobliskich gruntów uprawnych. W pobliżu autostrad i większych dróg zanieczyszczeniem gleby są niektóre węglowodory.

Borneff, Fischer i Kunte [11,12,13] analizowali próby leśnej gleby z obszarów, które były oddalone od ośrodków przemysłowych i miast. Stwierdzili wysoką koncentrację benzo/a/pirenu w glebie /0,001-0,042 mg/kg/ pochodzącej również z obszarów leśnych była podana przez innych autorów [6]. Bartaček [6] przytacza pracę, w której stwierdzono, iż nieznaczna zawartość w glebie benzo/a/pirenu stymuluje proces nityfikacji, natomiast większe ilości /10 mg/kg/ proces ten inhibują. W glebie benzo/a/piren może utrzymywać się przez dłuższy czas np. po 120 dniach stwierdzono 25-50% pozostałości wartości początkowej.

Górska E. i Górski T. [49] badali zawartość benzo/a/pirenu w glebie z terenów rolniczych i przemysłowych 49 województw /tabela 8/.Przebadali 119 prób gleby i stwierdzili najniższy poziom benzo/a/pirenu w próbce pobranej z terenu województwa białostockiego z pola 250 m od wsi i 15 km od osiedla miejskiego, wynosił on 3,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ suchej masy gleby. Natomiast najwyższe stężenie wykryto w próbce gleby pobranej 150 m od parowozowni w województwie krośnieńskim. Stężenie to wynosiło 8054 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Nie znaleziono ani jednej próby, która byłaby wolna od benzo/a/pirenu. Fakt ten ma zapewne związek z możliwością biosyntezy benzo/a/pirenu przez niektóre mikroorganizmy w środowisku glebowym [103].

Ze szczegółowych danych wynika, że 50% prób gleby zawierało do 35 $\mu\text{g}/\text{kg}$ suchej masy gleby, w tym 40% do 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Wartość tę uznano za "tło" uwarunkowane źródłami naturalnymi.

Tabela 8

Zawartości benzo/a/pirenu w glebie w najbardziej zanieczyszczonych miejscach poboru prób [49] .

Miejsce pobrania próby	pH gleby	stęż. B/a/P w $\mu\text{g}/\text{kg}$
150 m od parowozowni	7,99	8046,0
100 m od jezdni z nasilonym ruchem	8,40	1302,5
10 m od parowozowni	8,40	1302,5
10 m od jezdni w terenie uprzemysłowionym	8,10	1062,1
200 m od zakładów bitumicznych	7,33	734,6
6 m od jezdni z nasilonym ruchem	7,03	632,2
300 m od starych zakładów chemicznych	6,66	515,4
2000 m od lotniska, od osi pasa startowego	7,69	456,7
500 m od asfaltowni	7,47	399,4
100 m od asfaltowni	6,60	357,7

Na podstawie tych badań stężenie 25-30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ gleby można przyjąć w Polsce jako zanieczyszczenie na poziomie tła, zawartość benzo/a/pirenu w przedziale 31-60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ jako stężenie umiarkowanego zanieczyszczenia, od 61-300 $\mu\text{g}/\text{kg}$

jako zanieczyszczenie znaczne, od 300-1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ jako wysoki stopień zanieczyszczenia gleby, a ponad 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ jako bardzo wysoki stopień zanieczyszczenia. Kryteria te oparto na badaniach przenikania benzo/a/pirenu z gleby do ziemniaków, które w znaczny sposób wzrastało w przypadkach występowania w glebie wyższego od 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ stężenia benzo/a/pirenu.

2.2.4. Zanieczyszczenia żywności przez wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne.

Zawartość benzo/a/pirenu w różnych elementach środowiska, w tym także i żywności, przyjęto się uważać za wskaźnik skażenia węglowodorami o działaniu rakotwórczym.

Należy przede wszystkim zwrócić uwagę na wpływ emisji przemysłowych na zawartość WWA np. w zbożu, ziemniakach, sałacie, kapuście i korelację pomiędzy ich zawartością a stężeniem w glebie. Gimmer G. i Hildebrandt A. [52] stwierdzili w zbożu zawartość benzo/a/pirenu w granicach 0,72-4,14 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Zaskakująca jest zawartość benzo/a/pirenu w warzywach. Na przykład w kapuście z terenów willowych w Niemczech zawartość benzo/a/pirenu wynosiła 6-12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ suchej masy [39]. Inni autorzy stwierdzili [135] w kapuście pobranej z handlu 12,6-24,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, a w pobranej z pola 20,45 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Sokołowska [154,155] badała zawartość benzo/a/pirenu w kapuście na terenie Polski w latach 1977-78. Stwierdziła, iż w próbach kapusty pobranej z pól odległych około 50 m, a nawet 10 m od dróg o dużym nasileniu ruchu zawartość benzo/a/pirenu /0,33-0,54 $\mu\text{g}/\text{kg}$ mokrej masy/ nie odbiegała

od zawartości benzo/a/pirenu w próbach z pól odległych od takich dróg i ośrodków przemysłowych /0,29-0,59 $\mu\text{g}/\text{kg}$ mokrej masy/. Stwierdziła natomiast duże zawartości benzo/a/pirenu w kapuście z poletek odległych o 300-1000 m od komina elektrociepłowni, w ogródkach przydomowych okolicznej ludności /0,69-1,97 $\mu\text{g}/\text{kg}$ mokrej masy/. Uzyskane wyniki są porównywalne z wynikami autorów niemieckich, uwzględniając fakt, że były one podane w przeliczeniu na suchą masę, która stanowi około 10% biomasy.

Znaczne ilości benzo/a/pirenu stwierdzono również w ziemniakach na terenie 49 województw Polski [49] . 84,5% ze 112 pobranych prób zawierało do 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ zaś 5,4% powyżej 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Fakty te nabierają szczególnego znaczenia wobec doniesień niektórych autorów [161] , iż benzo/a/piren skażający ustrój człowieka przez układ pokarmowy w połowie swej masy przedostaje się z ziemniaków.

Potthast K. et al [135] podaje zawartość benzo/a/pirenu w różnych naturalnych produktach pochodzenia roślinnego /tabela 9./

Tabela 9

Zawartość benzo/a/pirenu w wybranych produktach pochodzenia roślinnego

Nazwa produktu żywnościowego	Zawartość B/a/P w ppb	Nazwa produktu żywnościowego	Zawartość B/a/P w ppb
sałata	12,8	olej palmowy	1,2
kapusta	12,0	olej sojowy	1,8
endywia	50,0	olej lniany	1,4

c.d. Tabeli. 9

Nazwa produktu żywnościowego	Zawartość B/a/P w ppb	Nazwa produktu żywnościowego	Zawartość B/a/P w ppb
ogórki	12,6-24,5	herbata	21,30
pory	6,6	ziarno żyta	2,2
pomidory	0,2	ziarno pszenicy	1,8
szpinak	20,0	orzechy	-
zboże	0,7	orzeszki ziemne	0,6
olej rzepakowy /surowy/	2,5	kopra	1,3
olej rzepakowy /rafinowany/	0,9	soja	1,4
olej słonecznikowy /surowy/	1,9	nasienie bawełny	0,4
olej słonecznikowy /rafinowany/	10,60	oliwki	0,5
		olej arachidowy	1,9

Kolar i współautorzy badali koncentrację benzo/a/pirenu w glebach i w roślinach uprawnych na terenie Czechosłowacji [85,86]. Stwierdzili oni korelację pomiędzy ilością skumulowanego benzo/a/pirenu w roślinie i ilością badanego związku w glebie. Ponadto zaobserwowali oni, iż znacznie więcej benzo/a/pirenu znajduje się w części nadziemnej rośliny, a znacznie mniej w podziemnej. Emisja przemysłowa na tereny rolnicze doprowadza do skażenia żywności pochodzenia roślinnego wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi. Nagromadzenie WWA w nadziemnej części roślin, a także w owocach pozwala przypuszczać, iż jest to proces bioakumulacji.

Jest to jedna z dróg zanieczyszczenia żywności związkami rakotwórczymi.

Ponadto w produktach spożywczych występują liczne związki wielopierścieniowe, które tworzą się z naturalnych związków chemicznych w wyniku oddziaływania różnych czynników stosowanych podczas procesów technologicznych, a przede wszystkim wysokiej temperatury [66,67] . Dotyczy to przede wszystkim produktów poddawanych takim zabiegom jak wędzenie, smażenie, pieczenie [30,39,40,41,52,66,67,153] .

W sumie należy stwierdzić, iż ekspozycja organizmu ludzkiego na wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne jest znaczna. Kontakt z tymi niebezpiecznymi dla zdrowia związkami następuje poprzez wszystkie elementy środowiska naturalnego, poprzez powietrze, wodę, a także żywność. Nie bez znaczenia jest również palenie papierosów, bądź przebywanie w zadymionych dymem tytoniowym pomieszczeniach.

2.3. Przemiany wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne ulegają w środowisku naturalnym procesom degradacji. Są one przede wszystkim wynikiem fotooksydacji, oksydacji chemicznej, a także biologicznej transformacji dokonywanej przez bakterie, grzyby, zwierzęta.

2.3.1. Rozkład WWA pod wpływem czynników fizycznych i chemicznych

Stabilność benzo/a/pirenu zależy w dużej mierze od warunków świetlnych [158] . Bartaček [6] cytuje pracę

Jager i Kassowitzowej z Instytutu Higieny i Epidemiologii w Pradze. W pracy tej podano wyniki dotyczące ubytku benzo/a/pirenu w roztworach wodnych na drodze jego samorzutnej oksydacji przy dostępie światła, na dwa chinony: benzo/a/piren-1,6-dion i benzo/a/piren-3,6-dion.

Przytacza również prace Borneffa i Kunte'a z 1959 roku, w których autorzy porównywali wrażliwość benzo/a/pirenu na światło dzienne i UV. Zaobserwowali oni najszybszy rozpad benzo/a/pirenu w wodnym roztworze detergentu, a najwolniejszy w stanie krystalicznym. Stwierdzili, że najbardziej aktywne są krótkie fale światła.

Bartaček [6] przytacza pracę innych autorów, którzy badali stabilność benzo/a/pirenu w wodzie pod wpływem światła w czasie /tabela 10/.

Tabela 10

Rozkład benzo/a/pirenu w wodzie pod wpływem światła [6].

Rodzaj wody	Pierwotna koncentracja benzo/a/pirenu w mg/m ³	5 dni	10-15 dni	30-35 dni	45 dni
woda wodociągowa	2,0	1,74	0,26	0,094	0
woda rzeczna	2,0	nb.	1,07	0,57	0,35

Stabilność innych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych pod wpływem promieniowania UV jest bardzo różna [68].

Nagata i Konodo [117] badali fotodegradację wielu WWA rozpuszczonych w mieszaninie aceton-woda i czterochlorek węgla-woda w czasie /tabela 11/.

Tabela 11

Fotodegradacja WWA pod wpływem naturalnego światła [117] .

Badany związek	Stopień fotodegradacji /mg pozostałe ze 100 mg próby/	
	5 godzin	10 godzin
antracen	52,9	32,6
fenantren	57,0	35,9
benzo/a/antracen	45,5	0,0
chryzen	96,0	94,0
fluoren	94,3	91,9
piren	94,6	89,1
benzo/a/piren	93,6	90,5

Według danych National Academy of Science [118] fotooksydacja wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych zachodzi w sposób przedstawiony na rys. 2.

W wyniku tego procesu z benzo/a/pirenu powstają 6,12 -; 1,6 -; i 3,6 - diony, zaś z antracenu 1,4 - dwuhydroksy 9,10 - antraquinon.

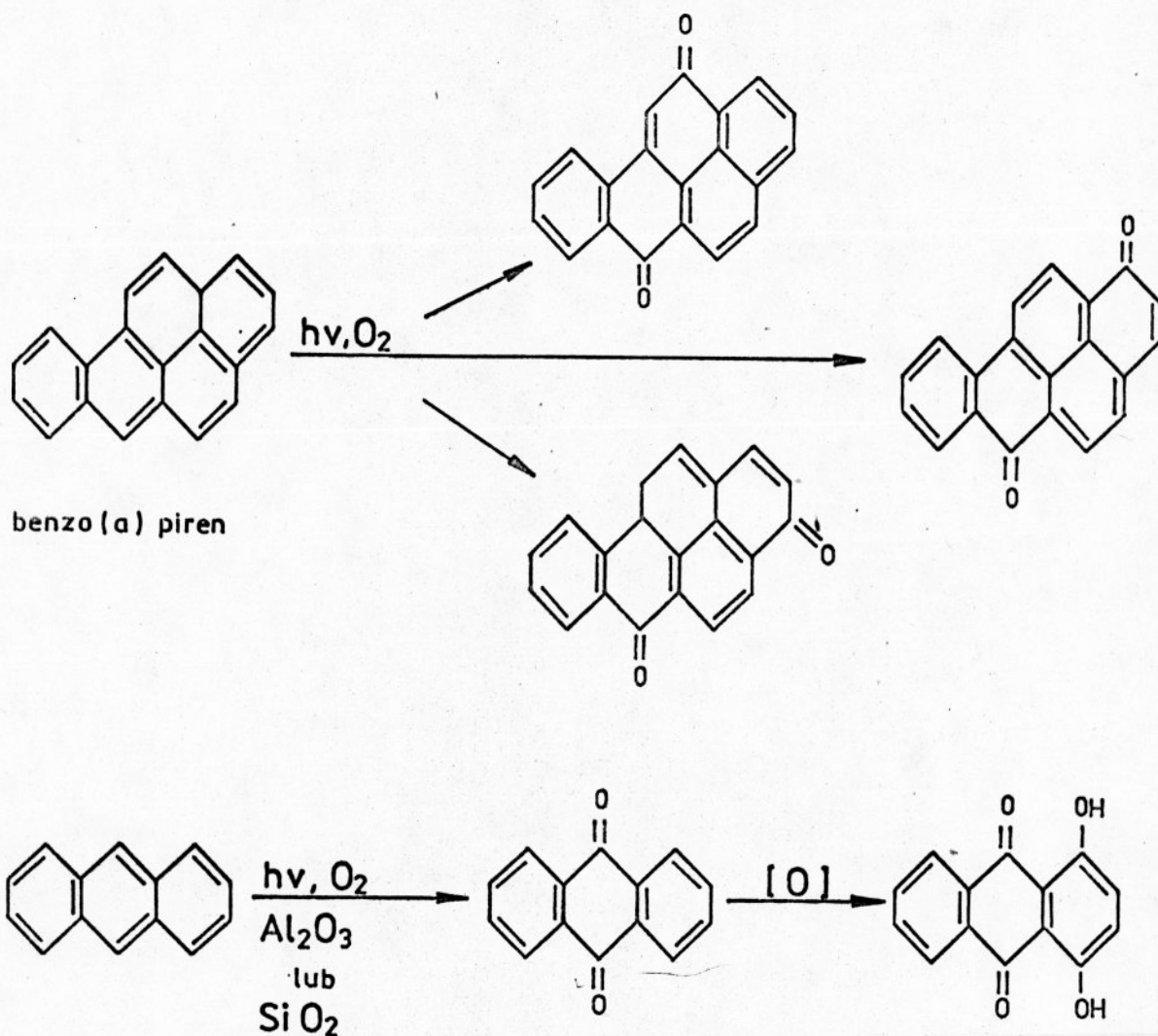
Ponadto, silne utleniacze chemiczne jak chlor, ozon czy nadmanganian potasu powodują rozkład wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych [69] , co znajduje głównie zastosowanie

w procesach uzdatniania wody [53, 116, 127, 144] .

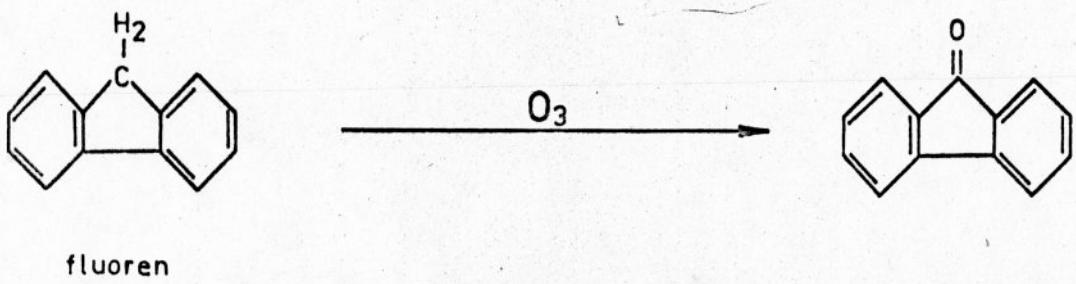
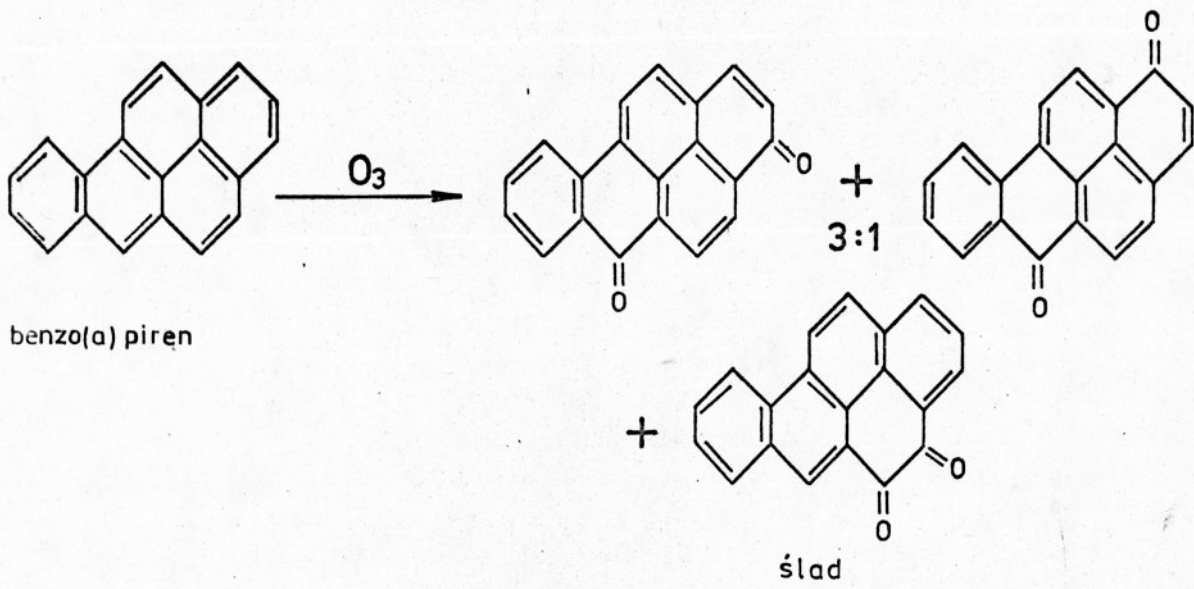
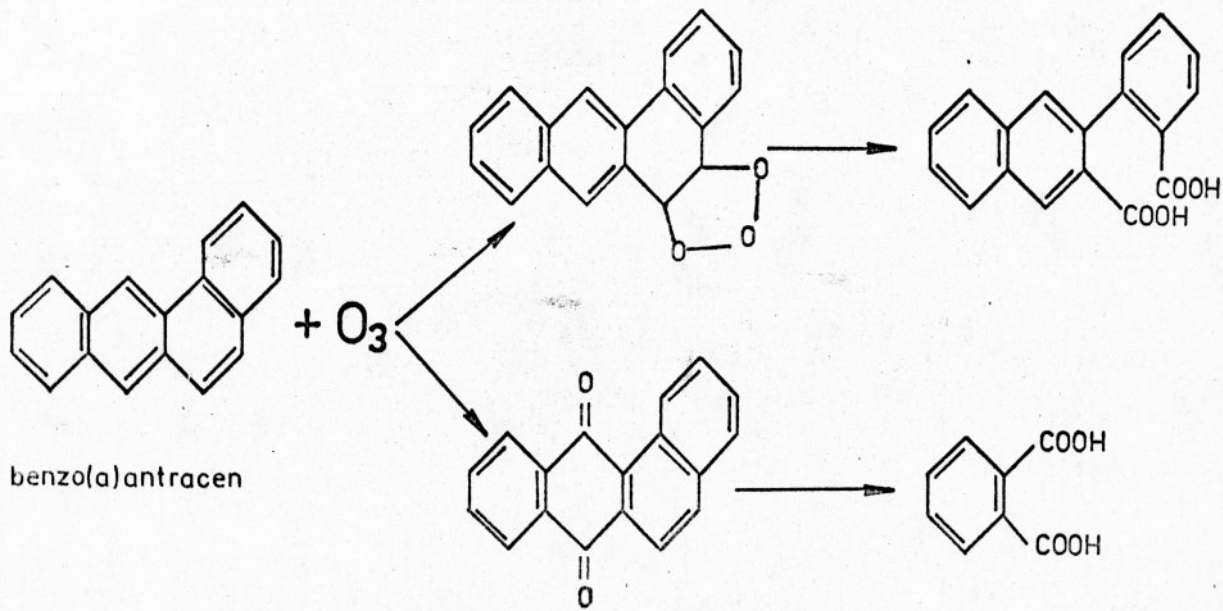
Z rezultatów podanych przez National Academy of Science [118]

widać, że proces rozkładu WWA pod wpływem ozonu przebiega

w sposób podany na rys. 3.



Rys. 2. Fotooksydacja benzo(a)pirenu i antracenu



Rys. 3 Rozkład benzo(a)antracenu, benzo(a)pirenu i fluorenu pod wpływem ozonu

W wyniku ozonowania z benzo/a/antracenu powstaje 7,12 - quinon i inne produkty, fluorenu - fluorenon, zaś z benzo/a/pirenu 3,6 -; 1,6 -; i 4,5 - dion.

We wrażliwości WWA na fotooksydację, a także silne utleniacze takie jak chlor, ozon i nadmanganian potasu, leży możliwość usuwania tych niebezpiecznych dla zdrowia związków, zwłaszcza z środowiska wodnego, co w znacznym stopniu może ograniczyć narażenie organizmu ludzkiego na ten ważny czynnik etiologiczny w powstawaniu chorób proliferacyjnych.

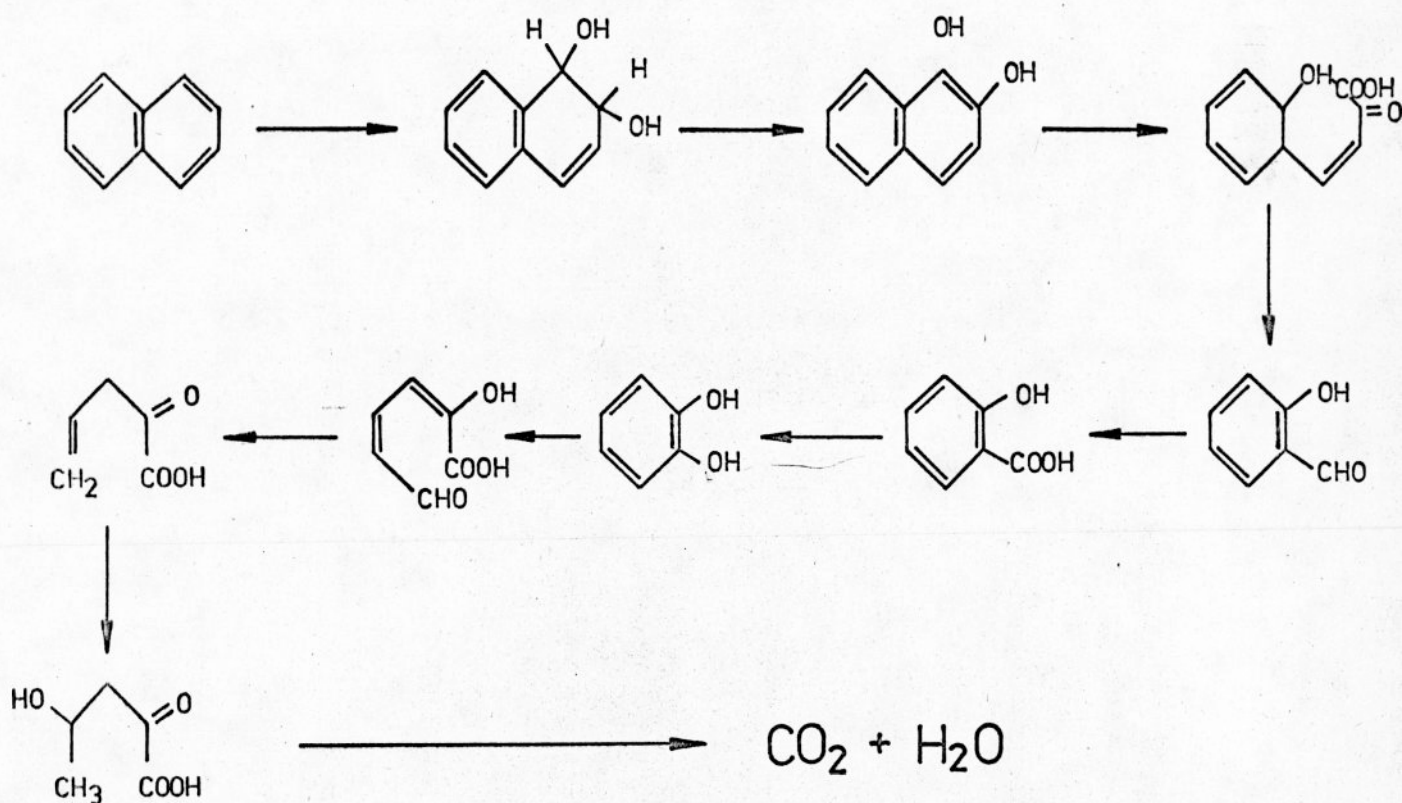
2.3.2. Rozkład wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych przez mikroorganizmy

Wiele bakterii i grzybów degraduje [33] w warunkach tlenowych, węglowodory aromatyczne, do dwutlenku węgla i wody, uzyskując w ten sposób energię i węgiel do budowy własnej biomasy. Inne nie są zdolne do całkowitego utleniania związków aromatycznych, gdyż są one dla nich albo niedostępne, albo też metabolizują je częściowo do wielu tlenowych metabolitów. Ten ostatni proces zwany jest ko-oksydacją [46].

Wiele gatunków bakterii zdolnych jest do biodegradacji monocyklicznych węglowodorów aromatycznych np. benzenu. Początkowa reakcja polega na przyłączeniu dwóch grup hydroksylowych, w wyniku której powstaje dwuhydrodiol z pierścieniem aromatycznym. Grupy hydroksylowe przyłączane mogą być w położeniu orto, wtedy powstaje katechol, lub położeniu para wtedy powstaje kwas gentyzynowy /gentisic acid/.

Dwuhydroksylacja jest najprawdopodobniej koniecznym wstępnym warunkiem do późniejszego, enzymatycznego rozszczępienia pierścienia benzenowego.

Poszczególne szczepy bakterii mają zdolność częściowego lub całkowitego metabolizowania wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Reakcja inicjująca jest podobna do opisanej wcześniej. Naftalen w wyniku utleniania przez *Pseudomonas putida* i z pewnością inne gatunki bakterii przekształcony jest w *cis*-1,2-dwuhydroksy-1,2-dwuhydronaftalen [72]. Dwuhydrodiol jest następnie utleniany do 1,2-dwuhydroksynaftalenu. Rozszczępienie w położeniu orto-mającego dwie grupy hydroksylowe pierścienia benzenowego jest drogą do powstania kwasu salicylowego, który następnie jest biodegradowany do dwutlenku węgla i wody /rys. 4/.

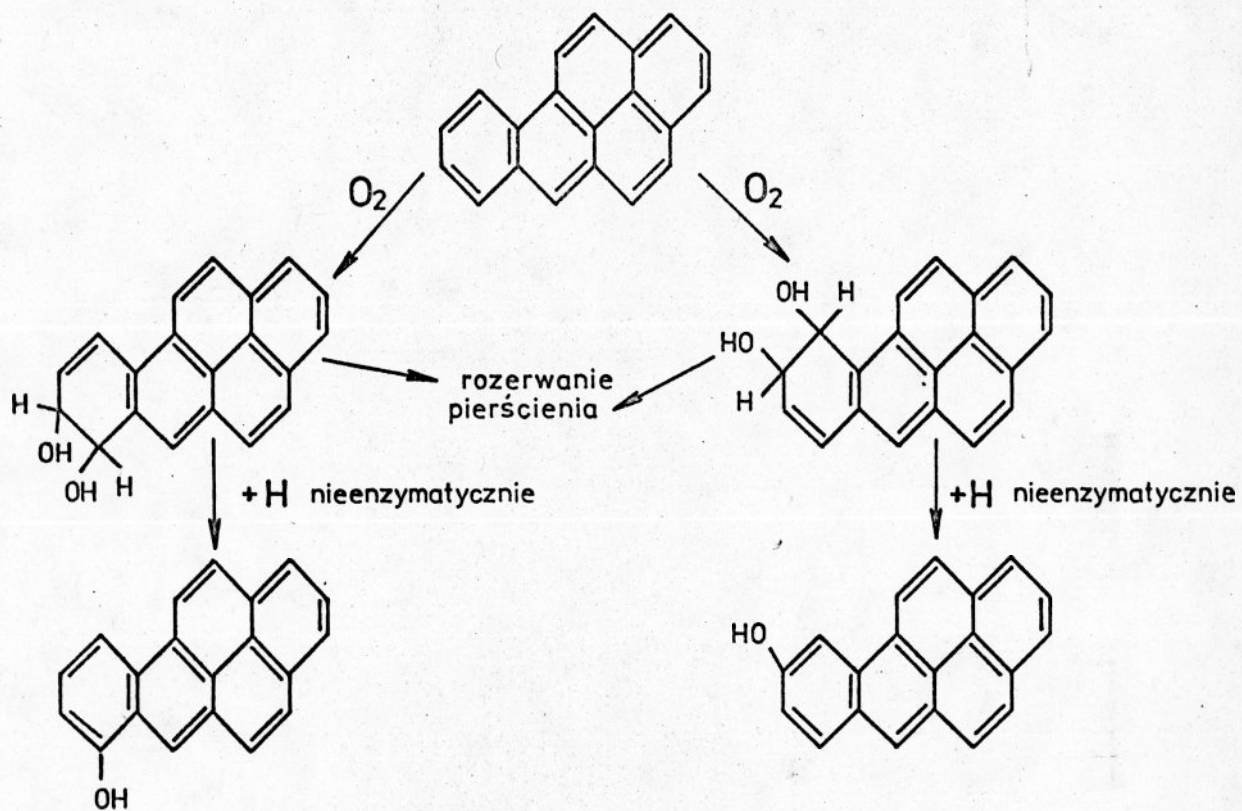


Rys. 4. Rozkład naftalenu przez *Pseudomonas putida*

Metabolitem pośrednim powstającym w wyniku degradacji przeprowadzanej przez bakterie jest cis-dwuhydrodiol, podczas gdy w wyniku tego procesu prowadzonego przez układ mikrosomalny ssaków powstaje jako produkt pośredni trans-dwuhydrodiol.

Poszczególne szczepy bakterii mają również zdolność rozkładu rakotwórczych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, takich jak benzo/a/piren i benzo/a/antracen. Gibson i współpracownicy [47,48] wyizolowali z zanieczyszczonej wody szczep bakterii Beijerinckia sp. Szczep ten miał zdolność utleniania benzo/a/pirenu do cis-9,10-dwuhydroksy-9,10-dwuhydrobenzo/a/pirenu /główny produkt/ i cis-7,8-dwuhydroksy-7,8-dwuhydrobenzo/a/pirenu /10%/ . Oba hydrodiole w następnej kolejności były redukowane na drodze nieenzymatycznej do odpowiednio 9-hydroksybenzo/a/pirenu i 7-hydroksybenzo/a/pirenu. Inny szczep Beijerinckia sp. miał zdolność do dalszej degradacji dwuhydroli przez rozerwanie pierścieni, wg zamieszczonej reakcji /rys. 5/.

Borneff i Kunte [14] podają, iż przy zastosowaniu biologicznego oczyszczania ścieków można usunąć 70-98% WWA /tabela 12/.



Rys. 5. Mikrobiologiczne utlenianie benzo(a)pirenu

Tabela 12.

Zawartość wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w ściekach /w mg/m³/ i w osadzie czynnym.

Węglowodów	Ścieki			Osad czynny	
	surowe	po oczyszczaniu mechanicznym	po oczyszczaniu biologicznym	Osad pierwotny	Osad nadmier-ny
fluoranten	3,23	1,22	0,28	4,09	2,78
piren	1,24	0,35	0,0	3,08	1,22
benzo/a/antracen	1,87	0,28	0,06	0,75	0,67
benzo/a/fluoranten	0,58	0,25	0,05	2,16	1,14
benzo/a/piren	0,43	0,15	0,07	0,63	1,33
benzo/g h i/perylen	0,26	0,16	0,12	0,69	1,22
indeno/1,2,3-cd/piren	0,60	0,14	0,07	0,67	1,20

Jak wynika z przedstawionych danych ubytek węglowodorów w oczyszczonych ściekach następuje raczej przez adsorpcję, a nie przez enzymatyczny rozkład. Brak zdolności do utleniania WWA przez osad czynny, potwierdzają również prace innych autorów [100].

Natomiast informacje o rozkładzie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w glebie można znaleźć w szeregu prac [106,134]. W rozkładzie tym biorą udział przede wszystkim bakterie właściwe, rzadziej promieniowce. Fenol,

naftalen i antracen rozkładane są głównie przez bakterie z rodzaju *Pseudomonas* i *Mycobacterium*, *Achromobacter* i *Bacillus*, a z promieniowców przez rodzaj *Nocardia*. Mikroorganizmy glebowe rozkładające węglowodory mogą ponadto metabolizować cukry proste, kwasy organiczne i inne związki. W czasie rozkładu węglowodórów aromatycznych najpierw atakowany jest łańcuch boczny, a później po kolei pierścienie benzenowe. Katechol i pokrewne związki są ostatnimi substancjami cyklicznymi poprzedzającymi rozerwanie pierścienia benzenowego. W wyniku tego rozerwania z 6 atomów węgla, jako produkty końcowe, powstają kwasy - bursztynowy i octowy - które mogą być dalej utleniane do dwutlenku węgla i wody.

Również grzyby, a zwłaszcza drożdże, mają zdolność utleniania WWA. Interesujący jest fakt, że grzyby przeprowadzają ten proces podobnie, jak przebiega on u ssaków, w wyniku czego powstają pochodne o położeniu grup hydroksylowych w pozycji trans [32,38].

Tak więc, jakkolwiek niektóre drobnoustroje posiadają zdolność rozkładu WWA, nawet do dwutlenku węgla i wody, to mimo to proces ten ogólnie należy uznać za trudny i nie całkowicie jeszcze poznany.

2.4. Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne a rak u ludzi

Obecnie wiadomo wg danych Światowej Organizacji Zdrowia, iż 50 do 90 procent przypadków chorób nowotworowych u ludzi wykazuje korelację z czynnikami środowiskowymi, w tym w głównej mierze chemicznymi karcinogenami [108].

Ponadto uważa się, iż istotny jest wpływ czynników geochemicznych na zróżnicowane częstości występowania niektórych "chorób cywilizacyjnych", a szczególnie nowotworów i białaczek. Wydaje się, iż powiązanie między środowiskiem geochemicznym i zdrowiem lub chorobą związane jest z mikroelementami biologicznie aktywnymi. Szereg śladowych mikroelementów, szczególnie ważnych w żywieniu zwierząt, jak J, F, Se, Cr, Co, stanowi specjalny problem, ponieważ nie są one niezbędne dla roślin /zawartość tych pierwiastków w roślinach nie wpływa na wydajność plonowania/.

Uważa się również, iż sama tylko zmiana np. składu chemicznego wody pitnej może znacznie modyfikować przebieg procesu karcinogenezy. W ten sposób obniżenie zawartości związków mineralnych w wodzie może pośrednio wpływać na wyższą zapadalność na choroby proliferacyjne. A zatem roli czynników pokarmowych przypisuje się szczególnie doniosłe znaczenie w etiologii większości nowotworów.

Środowiskowe uwarunkowanie 80% zachorowań na choroby nowotworowe jest powszechnie akceptowane. Wskazuje to na zasadnicze znaczenie badań ekologicznych dla stworzenia naukowych podstaw aktywnej profilaktyki tych chorób.

Żywy organizm stanowi bowiem obiekt dynamicznie zmieniający się i ściśle związany ze środowiskiem przyrodniczym. Na jego reakcje wpływają nie tylko predyspozycje genetyczne i obecny stan degradacji środowiska, ale także zespół poprzednio działających czynników.

Ze względu na fakt, iż komórka stanowi podstawową jednostkę morfologiczną w organizmie, szczególne znaczenie posiadają

badania na poziomie komórkowym.

Sformułowano pogląd, iż określony stan środowiska wewnętrznego wpływa na reaktywność organizmu na bodźce docierające ze środowiska zewnętrznego, w tym także na karcinogeny. Można wyróżnić warunki, które nie sprzyjają rozwojowi nowotworów "cancer antagonistic properties", bądź też warunki sprzyjające powstawaniu objawów onkologicznych "cancer favoring properties". Z uwagi na wysoki stopień spójności poszczególnych składników środowiska zewnętrznego i wewnętrznego, zmiana chociażby tylko jednego z nich, np. zawartości aktywnego biologicznie mikroelementu, może pośrednio oddziaływać na stan całego systemu.

Na szczególną uwagę zasługuje stwierdzenie, że sumują się skutki działania środowiskowych czynników rakotwórczych, a nie dawki poszczególnych z tych czynników. Wydaje się, że pełna integracja różnorodnych oddziaływań środowiska zewnętrznego na środowisko wewnętrzne następuje na poziomie molekularnym. Na poziomie tym znajduje się dopiero wspólny mianownik dla efektów działania fizycznych, chemicznych i biologicznych karcinogenów o bardzo różnorodnych mechanizmach oddziaływania na organizm [31] .

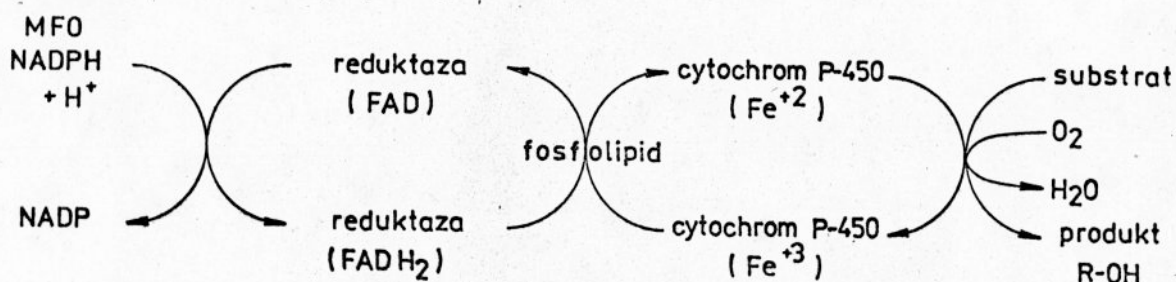
Do szczególnie aktywnych karcinogenów należą wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne. Ich potencjalnym źródłem dla ludzi jest zanieczyszczenie tymi związkami powietrza atmosferycznego, woda pitna, jarzyny, tłuszcze roślinne i oleje, a także wędzona, pieczona lub opiekana na ruszcie żywność [51, 141] .

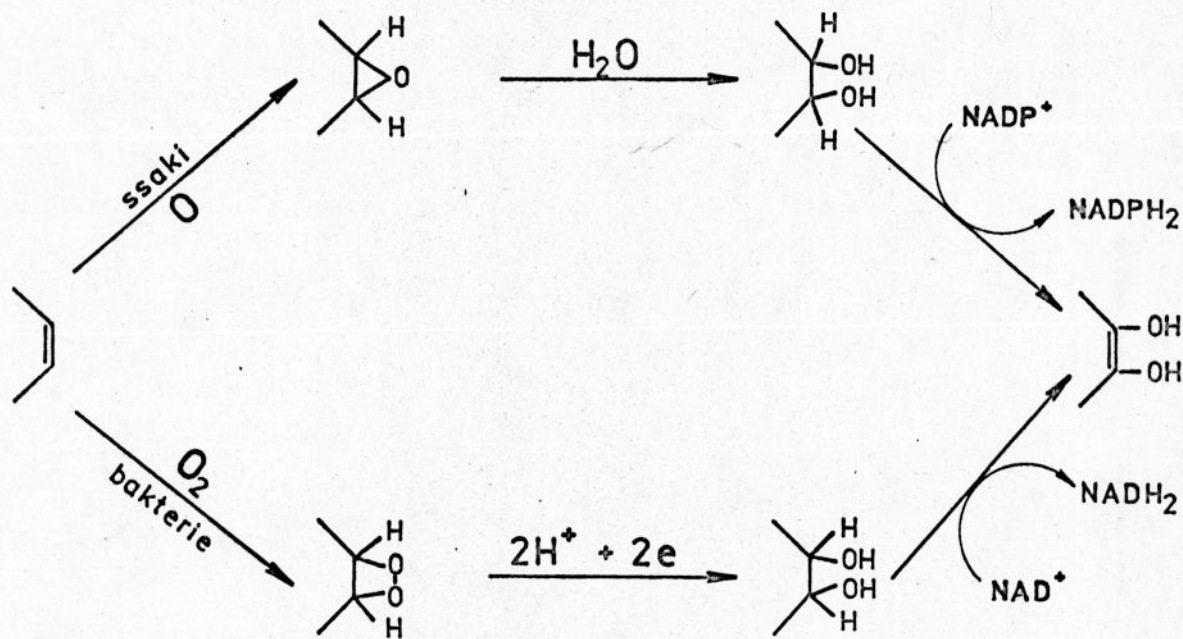
2.4.1. Przemiany wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w organizmach wyższych.

Do reakcji transformacji metabolicznych u zwierząt należą takie reakcje chemiczne jak utlenianie, redukcja, hydroliza itp. Wynikiem tych reakcji jest zwykle wprowadzenie grup funkcyjnych, powodujących zwiększenie polarności cząsteczki, a będących niejednokrotnie centrum katalitycznym dla drugiej fazy reakcji. Enzymy metabolizujące związki toksyczne występują przeważnie w siateczce endoplazmatycznej /frakcja mikrosomalna/ komórek wątroby i innych tkanek /tzw. system MFO - mixed function oxygenase/ - układy enzymatyczne przeprowadzające biochemiczne utlenianie obejmują szeroki zakres reakcji.

Frakcja mikrosomalna zawiera wiele różnych enzymów wbudowanych w błony biologiczne. Najważniejszym z nich są: gluko-6-fofataza, dehydrogenaza NAD, dehydrogenaza NADP, esterazy, esteraza cholinowa, dwufosfataza nukleozydowa, trójfosfataza nukleodydowa, pirofosfokinaza tiaminowa, reduktaza cytochromu b. Ponadto frakcja ta zawiera również enzymy katalizujące biosyntezę cholesterolu oraz enzymy metabolizujące inne sterydy, a także enzymy biorące udział w powstawaniu glukuronidów.

Ogólnie reakcje podlegają wspólnemu mechanizmowi hydroksylacji. Hydroksylacja związków aromatycznych przebiega zgodnie z reakcją [119].





Rys.6. Drogi rozkładu WWA przez organizmy prokariotyczne i eukariotyczne

Należy podkreślić, że przemiany WWA w organizmach żywych przebiegają dwoma różnymi drogami, w zależności od wyposażenia enzymatycznego danego organizmu. U Prokaryota metabolizacja wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych prowadzi do powstania dwuhydrodioli, z grupami hydroksylowymi w pozycji ois, zaś u Eukariota /przede wszystkim u Mammalia/- w pozycji trans [133] według reakcji /rys. 6/.

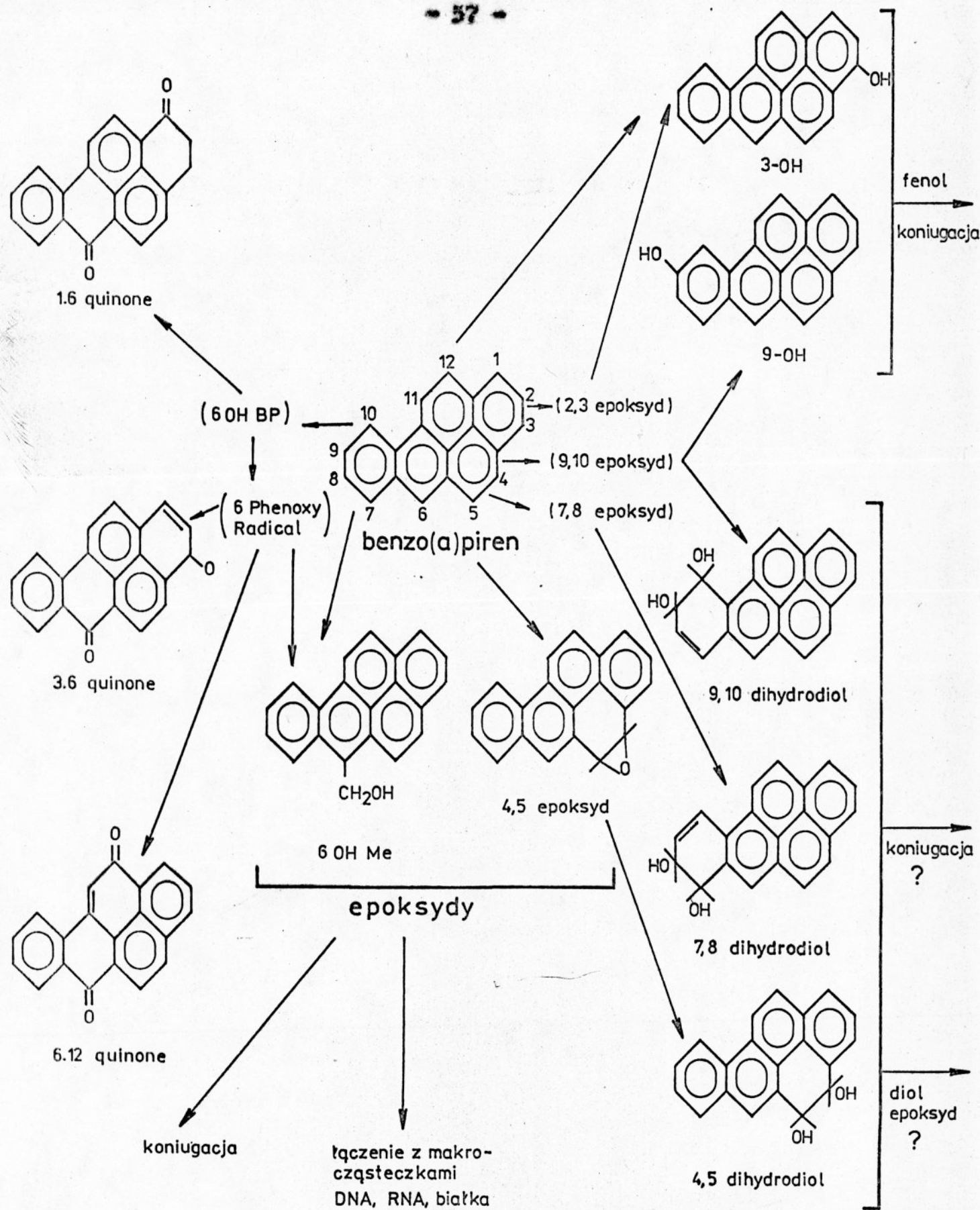
2.4.1.1. Aktywacja metaboliczna wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w organizmach ssaków.

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne same nie są rakotwórcze. Dopiero ich aktywacja metaboliczna, prowadząca do powstania formy diol-epoksyd, powoduje powstanie cząsteczki polarnej, zdolnej do dalszych reakcji. Wynikiem tych przemian może być transformacja nowotworowa [2,94,101].

Metabolizm benzo/a/pirenu:

Po dostaniu się do organizmu żywego benzo/a/piren ulega wstępnemu utlenianiu poprzez działanie mikrosomalnej frakcji enzymatycznej /MFO/, zawierającej wielokrotne formy cytochromu P-450. Powoduje to powstanie z benzo/a/pirenu jego estrów cyklicznych - epoksydów, w pozycji 4,5-; 7,8-; 9,10-.

Z epoksydów w wyniku działania hydratazy epoksydowej frakcji mikrosomalnej, powstają odpowiednie dwuhydrodiole. Natomiast fenole i chinony mogą powstawać bez udziału enzymów, poprzez uwodnienie epoksydów bądź bezpośrednio przez utlenianie benzo/a/pirenu za pomocą frakcji mikrosomalnej MFO wg zamieszczonego schematu /rys. 7/ [45,58,73,169].



Rys.7 Schemat przemian benzo(a)pirenu w ustroju ssaków

Yang i współautorzy [170] podaje schemat aktywacji metabolicznej i detoksykacji benzo/a/pirenu przez mikrosomalną frakcję wątroby ssaków /rys. 8/.

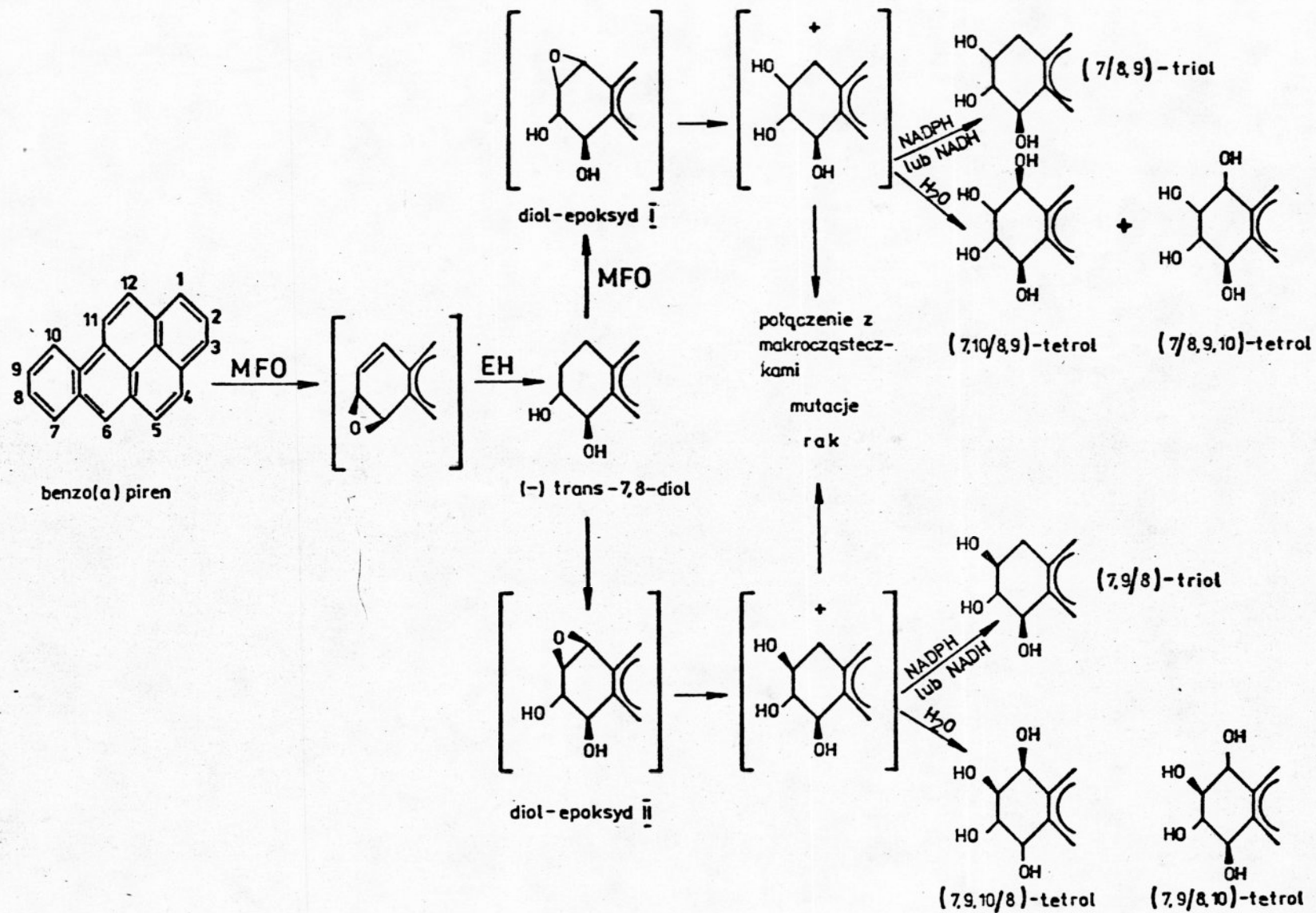
Węglowodory zbudowane z dwóch lub więcej pierścieni benzenowych, jak naftalen, antracen i fenantren przechodzą u zwierząt hydroksylację i syntezę z kwasem merkapturowym [28]. W wyniku hydroksylacji powstają głównie mono- i dwuhydroksylowe metabolity.

Powstawanie epoksydów jest zawsze stadium pośrednim i jest katalizowane przez specyficzne monooksygenazy /enzym epoksydujący/.

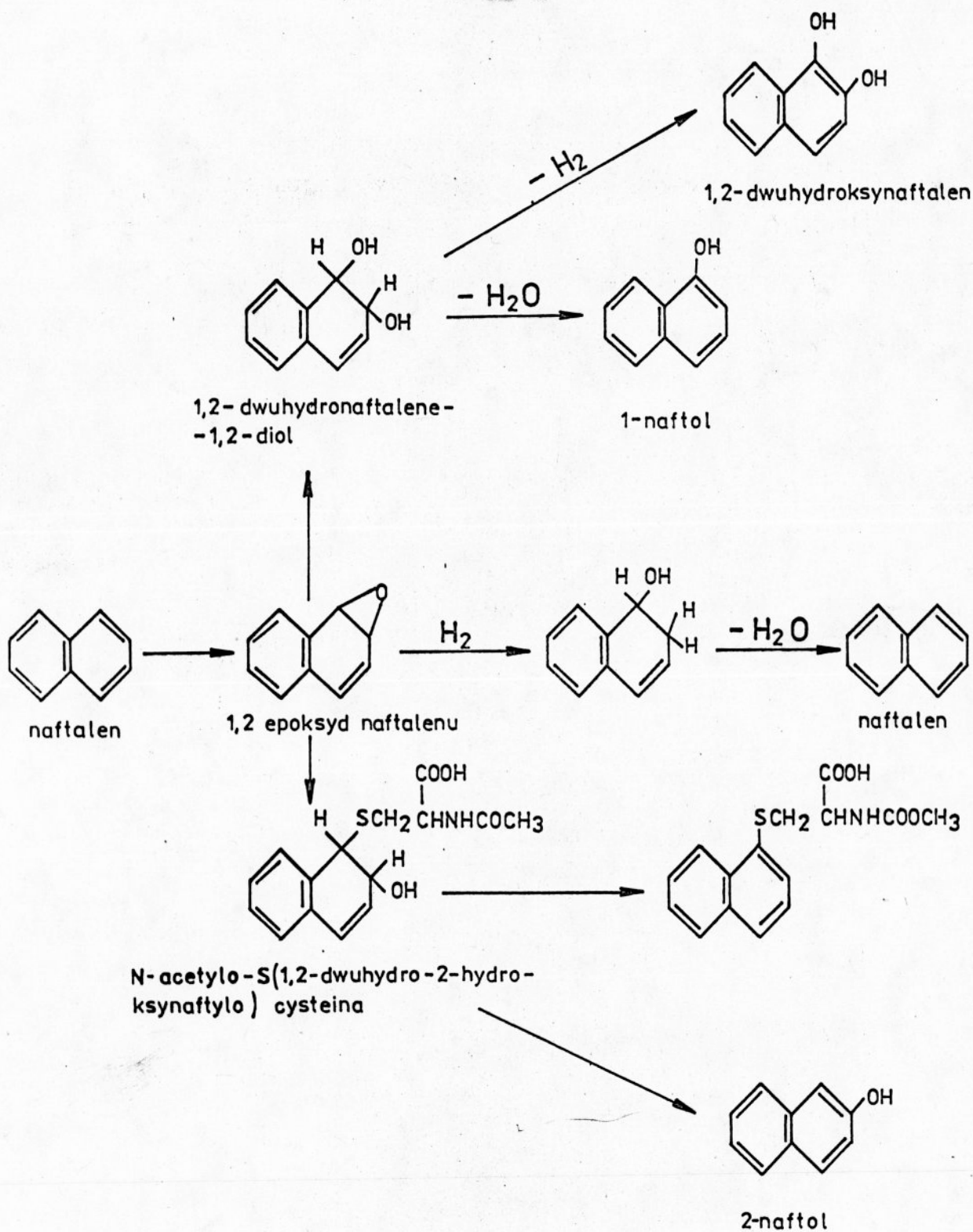
Metabolizm naftalenu przedstawia rys. 9.

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne mogą tworzyć połączenia z glutationem. Należą do nich naftalen, antracen, benzo/a/antracen. Metabolizowane są do kwasów merkapturowych. Połączenia te tworzą się w ten sposób, że połowa α -acetylocysteiny wchodzi w miejsce atomu wodoru związku aromatycznego. Połączenia te wydalone są z moczem [25] jako odpowiednie kwasy merkapturowe i tworzą się prawdopodobnie przez łączenie epoksydu związku aromatycznego z glutationem [136]. Następnie połączenie glutationu przekształca się w odpowiednią pochodną α -cysteiny, ta zaś w końcu jest acetylowana, dając w efekcie kwas merkapturowy /rys. 10/.

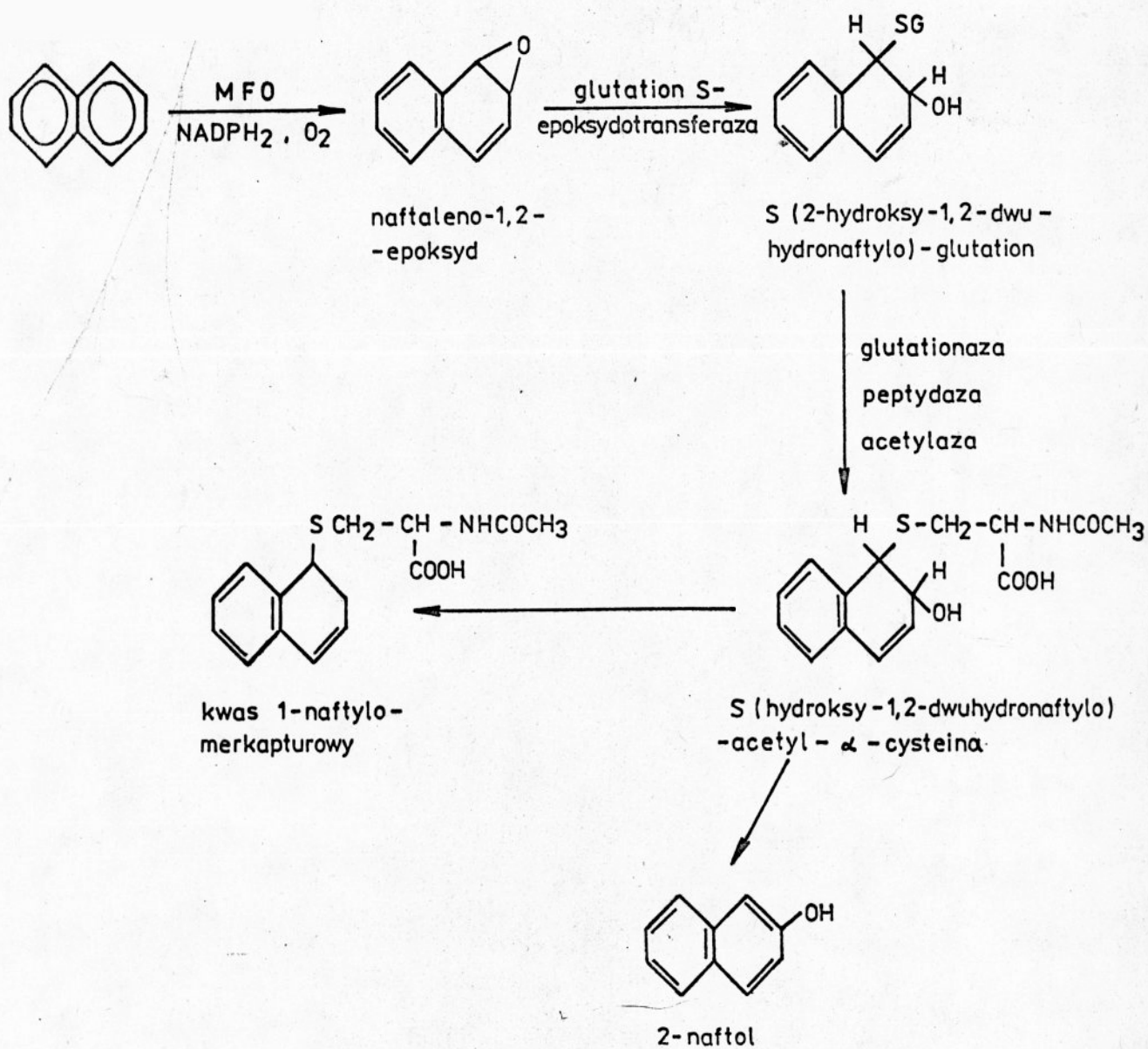
Połączenia z glutationem, cysteinoglicyną oraz cysteiną w organizmach występują jako produkty pośrednie przy tworzeniu się kwasów merkapturowych. Wydalone są one przede wszystkim z żółcią, jako połączenia takich związków jak jodobenzeny naftalenu i pirenu [21,22].



Rys 8 Aktywacja metaboliczna i detoksykacja benzo(a)pirenu przez frakcję mikrosomalną wątroby ssaków



Rys. 9 Metabolizm naftalenu



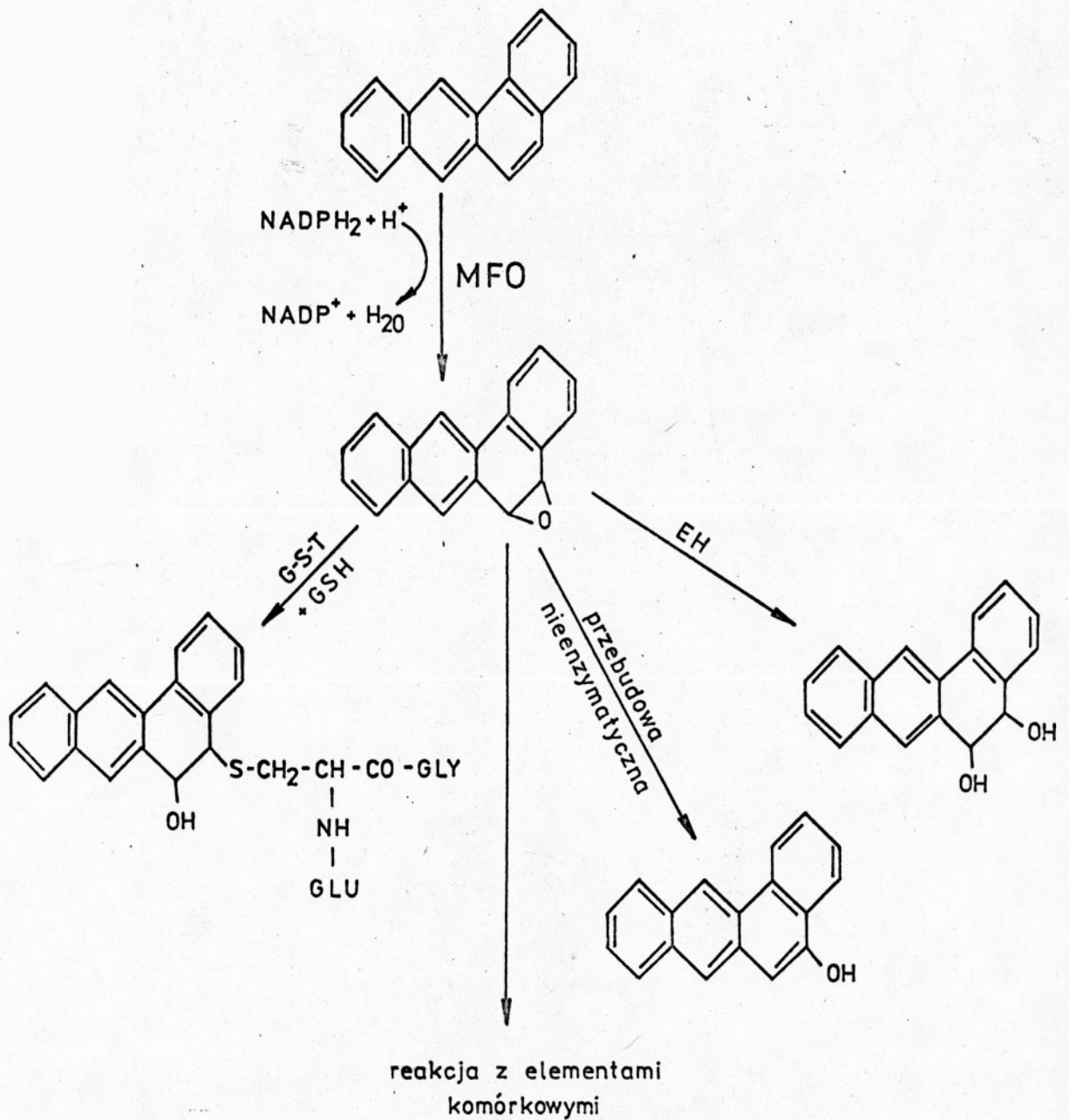
Rys. 10. Przemiany naftalenu do kwasu 1-naftylomerkapturowego w organizmach ssaków

Metabolity wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych fenole, dwuhydroksydiolole oraz epoksydy [21,22] jako koniuganty z glicyną, cysteiną lub glutationem wydalone są z ustroju zwierzęcego. /rys. 11/.

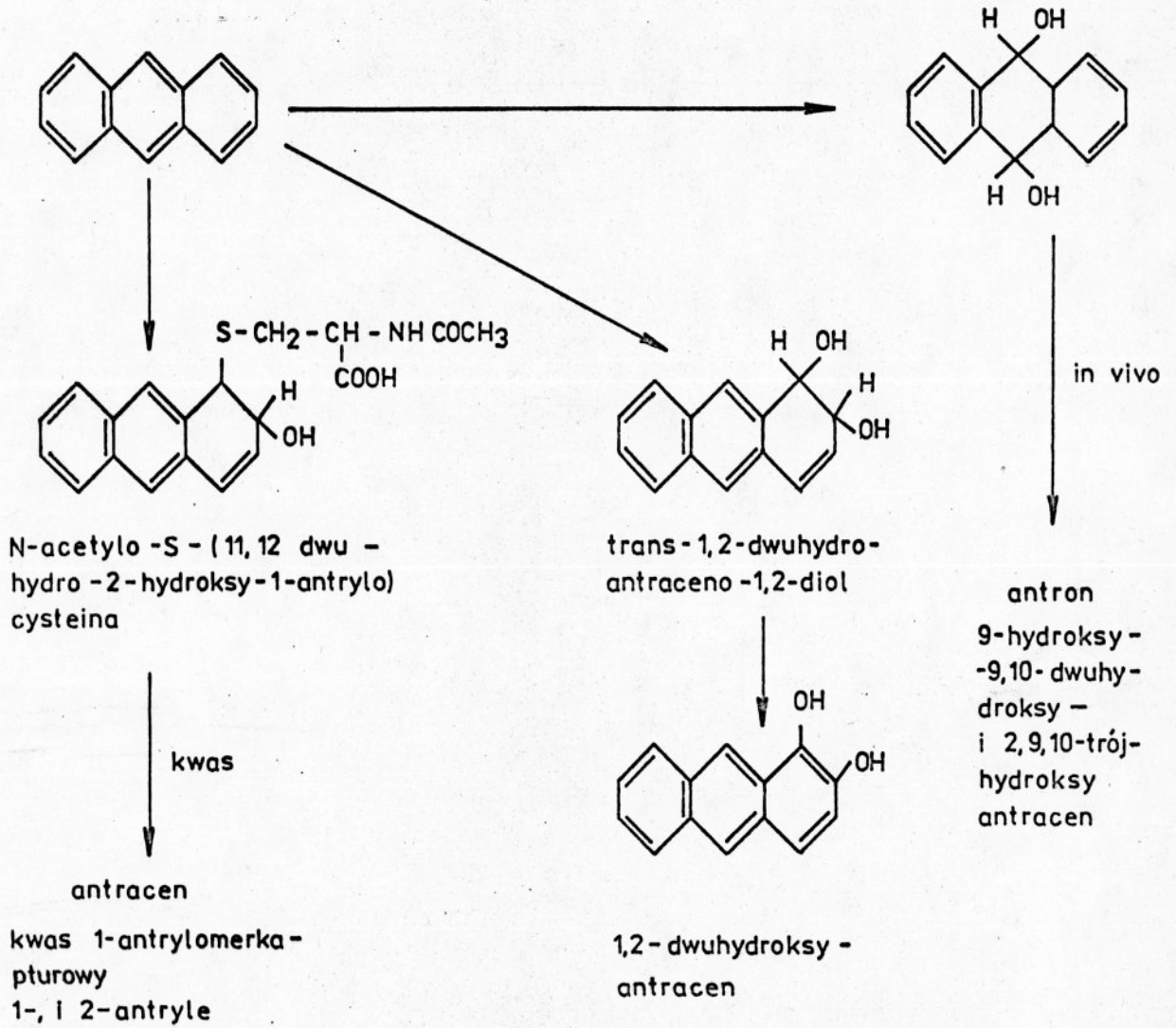
Antracen podawany doustnie zwierzętom jest wydalany w kale w postaci niezmienionej w 70-80% dawki [136]. W moczu natomiast występują metabolity N-acetylo-S/1,2-dwuhydro-2-hydroksy-antryle/ cysteiny oraz w postaci sprzężonej trans-1,2-dwuhydroantracen-1,2-diol i 1,2-dwuhydroksyantracen. Sprzężony z cysteiną metabolit rozkładany jest przez kwasy mineralne na kwas 1-antrylomerkaptoowy, 1,2-antrale oraz na antracen. Szczury również metabolizują antracen, dają jednak inne produkty tych przemian [21], jak trans-9,10-dwuhydroksyantraceno-9,10-diol, który następnie ulega dalszej metabolizacji na antron i kilka hydroksylowych pochodnych /rys. 12/.

Istniejące różnice w szlakach metabolicznych są wynikiem posiadania niejednakowego wyposażenia enzymatycznego poszczególnych gatunków zwierząt. I tak na przykład hydroksylację związków aromatycznych stwierdzono u pstrąga, żaby, kury, gołębia, licznych gryzoni, zwierząt mięsożernych, u małpy i człowieka [123]. Jednakże występują w procesie tym istotne różnice międzygatunkowe, głównie ilościowe. Ponadto obserwuje się również różnice w położeniach w cząsteczce, w których hydroksylacja może następować /orto,meta lub para/.

Najwięcej prac poświęconych jest aktywacji metabolicznej WWA przez frakcję mikrosomalną wątroby szczurów [7,64, 91,95,115 in.]



Rys. 11 Przemiany w ustroju benzo(a)antracenu
(EH-hydryza epoksydowa, G-S-T-glutation - S-transferaza
GSH-glutation)



Rys. 12 Metabolizm antracenu

Ogólnie należy stwierdzić, że dotychczasowe wyniki badań wskazują, iż wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne podlegają w organizmie przemianom metabolicznym, prowadzącym do powstawania pośrednich produktów będących niejednokrotnie bezpośrednio odpowiedzialnymi za transformację nowotworową. A zatem istnieje potencjalna możliwość zapobiegania rakotwórczemu działaniu tych związków poprzez odpowiednią ingerencję w szlak metaboliczny.

2.4.2. Akumulacja i uwalnianie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w organizmach zwierzęcych.

Zarówno rośliny jak i zwierzęta wprowadzają do organizmu wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne [63,83], a następnie przekształcają je w wyniku przemian metabolicznych. Podczas tego procesu część metabolitów może wejść w połączenia z makrocząsteczkami będącymi składnikami komórki i pozostać w niej na stałe, część zaś może zostać wydalona na zewnątrz. Ta część WWA, która zostaje we wnętrzu komórki bądź tkanki zatrzymana, stanowi pulę tych związków, która z punktu widzenia fizjologicznego, jest obca i nie wynika z potrzeb życiowych. Pula ta może być zwiększona w wyniku incydentalnych lub stałych kontaktów ustroju żywego z WWA występującymi w środowisku i prowadzić do tzw. akumulacji.

Badania nad akumulacją i wydalaniem WWA były prowadzone zwłaszcza na organizmach wodnych. Neff [119] przytacza dane dotyczące akumulacji i uwalniania czterech wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych przez *Rangia cuneata* /tabela 13/.

Tabela 13

Akumulacja z wody morskiej i uwalnianie WWA przez *Rangia cuneata* [119].

Badane parametry	Badane WWA			
	naftalen	fenantren	chryzen	benzo/a/pi- ren
początkowe stężenia WWA w wodzie [ppm]	0,071	0,089	0,066	0,052
stężenie w tkankach po 24-godzinnej ekspozycji [ppm]	0,43±0,1	2,85±1,1	0,54±0,3	0,45±0,1
współczynnik bioakumulacji [tkanki/woda]	6,1	32,0	8,2	8,7
stężenie w tkankach po 24 godzinny usuwaniu [ppm]	0,15±0,02	2,47±1,2	0,40±0,15	0,38
procent wydalania po 24 godzinach [%]	66	13	26	16

Lee i współpracownicy [97] badali bioakumulację benzo/a/pirenu przez kraby. Umieszczono je początkowo na 2 doby w wodzie z zawartością $2,5 \mu\text{g B/a/P/dm}^3$, a następnie przeniesione do wody wolnej od badanego związku. Otrzymane przez nich wyniki ilustruje tabela 14.

Jak wynika z tabeli 14 najwyższy stopień akumulacji benzo/a/pirenu występował u krabów w skrzelach i trzustkowątrobie.

Wchłanianie związku następowało przez skrzela, a następnie był on transportowany przez krew do trzustkowątrobki.

Na podstawie przedstawionych danych można sądzić, iż istnieje wyraźne powinowactwo obcej substancji do tkanek. A zatem istnieje korelacja pomiędzy związkiem karcinogennym, a zagrożeniem nowotworowym konkretnej tkanki, w tym przypadku trzustkowątrobki. Proces ten wiąże się zapewne ze szczególnym wyposażeniem tkanki wątroby w enzymy odpowiedzialne za przemiany metaboliczne substancji toksycznych. Wskazują na to również przedstawione wyniki, gdyż w trzustkowątrobce stwierdzono 50 procent polarnych metabolitów benzo/a/pirenu, związanych z makrocząsteczkami.

Interesującym zjawiskiem związanym z akumulacją WWA jest migracja tych zanieczyszczeń w łańcuchu troficznym.

Lu i współpracownicy [119] badali model ekosystemu wodnego do którego bezpośrednio do wody, dozowano $^{14}\text{C-B/a/P}$ w stężeniu 2ppb. Biocenozę modelu stanowiły organizmy planktonowe, nitkowate sinice /*Oedogonium cardiacum*/, rozwielitki /*Daphnia magna*/, larwy komarów /*Culex pipiens*/,

Tabela 14. Losy ³H-benzo/a/pirenu zakumulowanego z wody przez Callinectes sapidus [97]

Produkt	Czas [doby]	Ilość w tkankach [$\mu\text{g} \times 10^4$]				
		skrzela	krew	trzustko-wątroba	żołądek	mięśnie
Całkowita	1	150 ± 70	90 ± 70	270 ± 90	14 ± 2	10 ± 3
	2	410 ± 85	85 ± 20	590 ± 210	11 ± 6	18 ± 7
	4	100 ± 32	80 ± 52	300 ± 18	10 ± 4	88 ± 5
	8	70 ± 55	65 ± 21	210 ± 16	4 ± 5	4 ± 3
	12	35 ± 12	20 ± 13	310 ± 74	6 ± 2	2 ± 2
	20	1 ± 2	6 ± 5	40 ± 26	2 ± 1	2 ± 3
benzo/a/piren	1	110	50	160	3	4
	2	290	30	280	2	2
	4	70	12	40	1	2
	8	22	8	21	a	1
	12	10	1	21	1	a
	20	a ^x	1	2	a	a

c.d. tabeli 14

Produkt	Czas [doby]	Ilość w tkankach [$\mu\text{g} \times 10^{-4}$]				
		skrzela	krew	trzustko- wątroba	żołądek	mięśnie
hydroksyben- zo/a/piren	1	10	27	20	2	2
	2	15	12	84	2	2
	4	5	21	90	2	1
	8	11	9	40	a	a
	12	7	6	24	1	a
	20	a	2	5	a	a
metabolity polarne	1	15	10	89	8	2
	2	3	26	210	6	8
	4	12	32	140	7	4
	8	17	36	130	2	2
	12	11	10	224	2	1
	20	a	2	29	1	1

a^x zawartość oznaczona mniejsza niż $0,5 \times 10^{-4} \mu\text{g}$

ślimaki /*Physa sp.*/ i ryby /*Gambusia affinis*/. Inkubację prowadzono przez trzy dni w temperaturze 26,7°C w warunkach naturalnych. B/a/P był akumulowany i zatrzymywany przez wszystkie organizmy modelowego ekosystemu. Różnice w całkowitej zawartości ¹⁴C benzo/a/pirenu wyekstrahowanego z poszczególnych poziomów łańcucha troficznego wahały się od 46 procent w larwach komarów do 90 procent w rozwielitkach. Współczynnik bioakumulacji / B/a/P tkanki, / B/a/P woda/ układał się od 930 w rybach do 134248 w rozwielitkach. U wszystkich badanych organizmów stwierdzono również obecność polarnych metabolitów. Jednakże autorzy nie badali mechanizmów bioakumulacji benzo/a/pirenu, stwierdzając jedynie, iż badany związek nie jest akumulowany przez ryby bezpośrednio z roztworu wodnego.

Przedstawione prace dowodzą o możliwościach organizmów do bioakumulacji WWA, a co się z tym wiąże do krążenia ich w łańcuchu troficznym. Problem ten ma istotne znaczenie w aspekcie narażenia organizmu ludzkiego na kontakt ze związkami rakotwórczymi.

2.4.3. Transformacja nowotworowa i proces nowotworzenia

Transformacja nowotworowa komórek jest właściwością organizmów wielokomórkowych. Polega ona na zmianie właściwości komórki podlegającej transformacji. Dotyczy to wytworzenia nowych enzymów, czasem wytworzenia nowych antygenów, przyspieszenia podziałów, zmian morfologicznych, utraty

zdolności do tzw. inhibicji kontaktowej itp. Następstwem tych zmian jest proces nowotworzenia. Proces nowotworowy jest zaburzeniem wszystkich podstawowych czynności komórek, takich jak rozmnażanie, różnicowanie, dojrzewanie i przemiana materii.

Metabolizm komórek nowotworowych w znacznym stopniu odbiega od metabolizmu komórek prawidłowych. [24] .

Zmiany aktywności wielu enzymów w komórkach nowotworowych oraz szybkość syntezy lub degradacji metabolitów w porównaniu z aktywnościami tych procesów w komórkach prawidłowych sugerują, że transformacja nowotworowa wpływa na zmianę mechanizmów regulujących aktywności poszczególnych dróg metabolicznych. W najlepiej poznanych pod względem regulacji metabolizmu komórkach wątrobiaka, przyspieszeniu ulegają procesy: glikozy, syntezy kwasów tłuszczowych, syntezy cholesterolu oraz syntezy kwasów nukleinowych i białka. Jednocześnie obserwuje się spadek syntezy glikogenu, degradacji glikogenu, oddychania i aktywności cyklu Krebsa, glukoneogenezy oraz katabolizmu cholesterolu, aminokwasów i kwasów nukleinowych.

Transformację nowotworową może wywołać szereg czynników. Do najważniejszych należą:

- substancje karcinogenne i współdziałanie kokarcinogenów,
- promienie jonizujące,
- mutacje somatyczne,
- wirusy onkogenne.

Do substancji chemicznych wywołujących transformację nowotworową należą zarówno związki nieorganiczne /chrom,

nikiel, arsen, azbest, pierwiastki radioaktywne itp./, a także związki organiczne. Organiczne karcinogeny należą do następujących grup związków [28] :

- aromatyczne węglowodory o wielopierścieniowej strukturze,
- aromatyczne aminy,
- aromatyczne azo-związki jak amino-azobenzen i ich heterocykliczne pochodne,
- N-nitro-związki,
- biologiczne związki alkilujące /epoksydy, laktony/,
- i inne.

Ogólnie związki chemiczne wywołujące transformację nowotworową można podzielić na dwie grupy [24] :

- związki nie wymagające aktywacji metabolicznej dla działania karcinogennego /epoksydy, laktony, sulfoniany alkiloalkenów, metale, związki nieorganiczne/,
- związki zwane prokarcinogennymi, wykazujące działanie karcinogenne dopiero w wyniku przekształceń enzymatycznych w komórkach poddawanych transformacji nowotworowej /aminy aromatyczne, nitrozoaminy, hydrazyny, węglowodory aromatyczne, węglowodory heterocykliczne, proste związki organiczne/.

Związki karcinogenne wpływają na transformację nowotworową w wyniku oddziaływania z makrocząsteczkami komórkowymi o kluczowym znaczeniu dla życia komórki: kwasami nukleinowymi i białkami. Związki karcinogenne są substancjami o silnych właściwościach elektrofilowych. Dlatego też aktywacja metaboliczna związków prokarcinogennych polega na wykształceniu w nich miejsc elektrofilowych związanych z atomami węgla.

W wyniku chemicznej karcinogenezy mogą powstawać następujące zjawiska [99] :

- a/ zmiany w komórkowym DNA, somatyczna mutacja,
- b/ efekty epigenetyczne,
- c/ aktywacja wirusów onkogennych,
- d/ selekcja komórek o obniżonej barierze immunologicznej.

ad.a/ Według niektórych autorów przyczyną powstawania nowotworów są mutacje somatyczne [163] . Hipoteza ta opiera się na tym, że mutacje materiału genetycznego prowadzą do transformacji komórek, w wyniku zajścia kilku kolejnych mutacji.

ad.b/ Wiele wczesnych stadiów nowotworowych nie wykazuje kariotypowej nienormalności, co świadczy o epigenetycznym mechanizmie powstawania tych nowotworów.

ad.c/ U podłoża indukcyjnego działania związków chemicznych w procesie transformacji nowotworowej należy również aktywacja wirusów onkogennych. Istnieją liczne wirusy zawierające RNA powodujące transformację nowotworową u różnych organizmów jak kury, myszy, króliki, koty, małpy, a być może także u człowieka. W wyniku tych transformacji powstają nowotwory różnego typu, jak na przykład mięsaki, białaczki rak gruczołu mlecznego i inne.

W jądrach komórek nowotworowych wykształconych w wyniku działania wirusów zawierających RNA lub DNA znajduje się bądź cały aparat genetyczny wirusa, bądź też jego fragmenty /tzw. prowirusy/. W przypadku transformacji komórek przez wirusy zawierające DNA nie zachodzi zwykle namnażanie wirusa prowadzące do śmierci komórek. Natomiast komórki transformowane

przy udziale RNA często produkują wirusy infekcyjne.

Wiele spośród tzw. prawidłowych komórek zawiera odcinki wirusowego DNA wbudowane w komórkowy aparat genetyczny, nie wykazujące właściwości onkogennych /tzw. wirusy endogenne/. Transformacja nowotworowa komórek zawierających wirusy endogenne musi być więc wynikiem, pominięcia mechanizmów regulacyjnych w komórce gospodarza.

ad.d/ Mechanizm chemicznej karcinogenezy jest również wynikiem selektywnego działania związków chemicznych na komórki o obniżonej barierze immunologicznej.

Istnieją dane wskazujące, że niektóre związki potęgują działanie substancji karcinogennych.

Wiele substancji o działaniu inicjującym nie powoduje transformacji nowotworowej, natomiast przygotowuje komórkę do działania promotora, nie będącego zwykle mutagenem.

Ogólnie należy stwierdzić, że zmiany zachodzące w komórkach podlegających transformacji nowotworowej dotyczą ich wszystkich cech życiowych, co pociąga za sobą daleko posunięte zaburzenia tkankowe i ustrojowe w organizmie.

W modelu przekształceń komórkowych i tkankowych rozwijających się w kierunku nowotworu złośliwego należy rozważyć takie pojęcia jak: różnicowanie się komórek, dojrzałość, wzrost, metaplazja, dysplazja i anaplazja.

Pojęcie różnicowania się i dojrzewania komórek w ustroju łączy się ze stopniowym przekształcaniem się młodej komórki zarodkowej w komórkę o określonym charakterze czynnościowym. Niektóre komórki nowotworowe zachowują zdolności

do różnicowania się i dojrzewania. Stopień dojrzałości komórek nowotworowych zależy jest od stopnia zaburzeń mechanizmów regulujących wzrost i funkcję komórki. Im niższy stopień nasilenia tych zaburzeń, tym większe jest zróżnicowanie i dojrzałość nowotworu. W nowotworach niezróżnicowanych /anaplastycznych/ struktura niedojrzałych komórek i utkanka guza nie da się porównać z żadną z prawidłowych tkanek ustroju. Proces różnicowania się komórek nowotworowych jest odwrotnie proporcjonalny do tempa wzrostu guza. Najszybszy wzrost i naciekanie wykazują nowotwory nisko zróżnicowane /anaplastyczne/. Takie nowotwory są najczęściej bardzo złośliwe. Rozrost /hyperplazja/ jest zjawiskiem fizjologicznym. Zmiany nowotworowe mogą cofać się i tkanka może powrócić do stanu prawidłowego, bądź też w warunkach nasilonego lub długotrwałego działania czynników patologicznych mogą doprowadzić do powstania nowotworu. Przemiana jednego rodzaju tkanki w inny nosi nazwę metaplazji np. "napełzanie" i zastępowanie jednego rodzaju dojrzałego nabłonka przez inny rodzaj dojrzałego nabłonka. Ponieważ tkanka nowotworowa nie jest tkanką obcą dla ustroju, zatem zdolna jest do metaplazji. Mianem dysplazji określa się zespół zmian dotyczących budowy komórek jak i struktury tkankowej o charakterze przejściowym między tkanką prawidłową /normoplastyczną/ a nowotworową /anaplastyczną/. Zmiany te polegają na występowaniu w komórkach cech charakterystycznych dla uszkodzenia komórek, upośredzonym ich dojrzewaniu, zaburzeniach ilościowych komórek w tkance. Do charakterystycznych cech dysplazji

w ocenie cytologicznej należą powiększenia rozmiarów całej komórki, występowanie wodniczek w cytoplazmie, pojawienie się więcej niż jednego jądra komórkowego powodujące przesunięcie się stosunku jądro-cytoplazmatycznego na korzyść jądra, rozkład chromatyny w jądrze jest grudkowaty i nieregularny. Odchylenia od normy dotyczące samej cytoplazmy mają mniejsze znaczenie.

Charakterystyczną cechą komórki nowotworowej jest atypia, która jest całkowitym zakłóceniem harmonii budowy komórek. Charakteryzuje się przesunięciem stosunku jądro-cytoplazmatycznego na rzecz jądra, hiperchromatozą, nieregularnością aparatu chromatynowego, powiększeniem i zniekształceniem jądra oraz ciała komórkowego.

Anaplazja jest nieodwracalnym stanem polegającym na rozroście komórek nowotworowych. Rozrost ten cechuje atypia komórek i liczne figury podziału, zanikanie dojrzewania komórek, chaotyczny układ komórek oraz tendencja do naciekania. Zdolność naciekania może w niektórych przypadkach pozostać utajona. Ten okres procesu nowotworowego nazwano przedinwazyjnym.

Rak przedinwazyjny określa się jako stan względnej równowagi między ustrojem a nowotworem. Równowaga ta jest przejściowa i po pewnym okresie zostaje zachwiana i wówczas nowotwór wkracza w fazę naciekania.

W postępującym procesie naciekania /inwazji/ bariera naczyń zostaje zniszczona i komórki nowotworowe wnikają do ich światła i tam rozrastają się. Dotyczy to zarówno

naczyń limfatycznych jak i krwionośnych.

Natomiast złośliwość jest biologiczną właściwością procesu nowotworowego. Wyraża się ona postępującym wzrostem nowotworu, naciekaniem tkanek otaczających i daniem bliskich i odległych przerzutów.

Z różnych tkanek ustroju mogą rozwijać się nowotwory o różnym stopniu złośliwości. Mogą to być nowotwory:

a/ łagodne

b/ potencjalnie złośliwe tj. takie, które często dają nawroty i nie rzadko ulegają przekształceniu złośliwemu.

c/ nowotwory złośliwe potocznie zwane rakiem.

Z uwagi jednak na pochodzenie tkankowe wyróżnia się nowotwory pochodzące z tkanki nabłonkowej /i to są rzeczywiste raki/ oraz nowotwory rozwijające się z różnych tkanek ustroju pochodzenia mezenchymatycznego /tkanki łącznej, chrzęstnej, kostnej, mięśniowej/ nazywane ogólnie mięsakami.

I tak z nabłonka płaskiego mogą powstawać - brodawczaki i raki płaskonabłonkowe, z nabłonka gruczołowego - raki gruczołowe.

Z tkanek pochodzenia mezenchymalnego mogą rozwijać się: włókniakomięśniaki, chrzęstniakomięsaki, mięśniakomięsaki gładkomomórkowe, mięśniakomięsaki prążkowanokomórkowe, mięsaki kostnopoходne itp.

Z tkanki nerwowej mogą powstawać nowotwory łagodne i złośliwe o dużym zróżnicowaniu histofornatywnym.

Ponadto z wyspecjalizowanych komórek i tkanek narządowych mogą także powstawać nowotwory np. z komórek barwnikotwórczych

skóry - czerniaki, z komórek wątroby - wątrobiaki i raki wątroby, z komórek wysp trzustki - wyspiaki itp.

2.5. Ekologiczne uwarunkowania chorób nowotworowych i kontrola występowania w środowisku chemicznym mutagenów i karcinogenów.

W obecnym stanie wiedzy uważa się, iż 80% zachorowań na nowotwory ma uwarunkowania środowiskowe, wynikające ze ścisłego powiązania organizmu z jego środowiskiem przyrodniczym. Szczególną uwagę należy zwrócić na fakt, iż w organizmie sumują się skutki działania środowiskowych czynników rakotwórczych. Mniej istotne natomiast są dawki poszczególnych z tych czynników.

W tej sytuacji, szczególnego znaczenia nabiera fakt wprowadzenia do środowiska obcych związków o działaniu toksycznym lub mutagennym czy karcinogennym, bądź też zwiększenie naturalnego poziomu związków mających takie działanie. Dlatego szczególnego znaczenia nabiera potrzeba stałej kontroli różnych elementów środowiska naturalnego i ustalenia dopuszczalnych granic zanieczyszczenia.

Testy, które pozwalają na doświadczalne ustalenie maksymalnego poziomu dawkowania, nie powodującego szkodliwych skutków ubocznych dla organizmów doświadczalnych i w konsekwencji - po zastosowaniu odpowiednich współczynników bezpieczeństwa - ustalenia poziomu bezpiecznej ekspozycji dla człowieka, można przedstawić w postaci pięciu grup [160] :

- Grupa I - Wstępne informacje o związku czy produkcji,
Grupa II - Niezbędne dane umożliwiające wybór do badań właściwego materiału,
Grupa III - Jakościowe, ilościowe i dynamiczne aspekty biotransformacji,
Grupa IV - Podbudowujące dane o właściwościach biologicznych.
Grupa V - Badania długookresowe i testy specjalne.

Kluczowym momentem w ocenie działania na organizm substancji jest interpretacja wyników badań, ich ekstrapolacja na człowieka i środowisko. O ile wyniki testów mają charakter obiektywny, o tyle ustalenie na tej podstawie standardów bezpieczeństwa zawiera przeważnie wiele elementów arbitralnych.

Rada Europejskiego Towarzystwa ds. Mutagenów Środowiskowych powołała w 1976 r. Komitet dla opracowania "Ogólnych zasad i minimalnych kryteriów skringingu na mutagenność". Opracowane zasady, dotyczące przydatności szybkich testów na mutagenność, do przewidywania ryzyka genetycznego i rakotwórczości, zawierają wymaganie, aby każdy system skringingowy składał się co najmniej z dwóch testów obrazujących następujące dwa rodzaje uszkodzeń:

1. Powodowanie uszkodzeń DNA, albo wywoływanie mutacji punktowych z zastosowaniem organizmów prokariotycznych
2. powodowanie mutacji chromosomowych z zastosowaniem organizmów eukariotycznych.

Natomiast Purchase et al postuluja wykonywanie 6 testów do wykrywania chemicznych karcinogenów [139] .

Testy skriningowe słuzące do wykrywania związków mutagennych polegają na indukcji specyficznych efektów biologicznych w różnych układach in vitro i in vivo. W poszczególnych testach określa się występowanie wiązania kowalencyjnego danego związku z kwasem nukleinowym, indukcję mutacji w komórkach mikroorganizmów, owadów i ssaków, indukcję profaga, syntezę naprawczą DNA, wymianę siostrzanych chromatyd, transformację komórek in vitro.

Do najczęściej stosowanych zestawów skriningowych z użyciem mikroorganizmów należy test Ames'a [3] .

Testem tym przebadano bardzo wiele różnorodnych związków chemicznych [2, 7, 8, 25, 43, 50, 71, 80, 81, 88, 94, 95, 96, 110, 114, 129, 152, 164] . Test ten został uznany za najbardziej reprezentatywny w bakteryjnych testach chemicznej mutagenyzy.

Zasada testu polega na wykrywaniu rewersji do prototrofii /his+/ histydynozależnych bakterii *Salmonella typhimurium* /his-/ pod wpływem działania związków mutagennych.

Stosowane w tym teście szczepy bakteryjne zawierają różne typy uszkodzeń DNA w operonie histydynowym.

Szczep *Salmonella typhimurium* TA 1535 może być stosowany do wykrywania mutagenów powodujących mutacje zastępstwa par zasad, szczepy *Salmonella typhimurium* TA 1537 i *Salmonella typhimurium* TA 1538 do wykrywania różnych rodzajów frame shift mutagenów.

Ustalono molekularną podstawę frame shift mutacji w tych szczepach. Powstają one przez przesunięcie w kopii sekwencji DNA, tak że posiadają długie nici powtarzające zasady -C-G-C-G-C-G-C-G- lub -C-C-C-C-

Oprócz mutacji w operonie histydynowym każdy szczep zawiera jeszcze dwie dodatkowe mutacje. Jedna dotyczy utraty systemu naprawy /uvrB-delecja/, druga zaś pozbawia bakterie otoczki lipopolisacharydowej /rfa/ umożliwiającej dyfuzję dużych organicznych cząsteczek.

Natomiast szczepy *Salmonella typhimurium* TA98 i *Salmonella typhimurium* TA100 powstały przez przeniesienie czynnika oporności R do szczepów *Salmonella typhimurium* TA1538 i *Salmonella typhimurium* TA1535, co zwiększyło ich wrażliwość na niektóre związki karcinogenne, takie jak wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, aflatoksyna B₁ i inne [111].

Powyższe badania umożliwiają stwierdzenie mutagennego charakteru substancji. Natomiast sprawdzenie potencjalnego działania rakotwórczego, metodą Ames'a, wymaga stosowania mikrosomalnej frakcji wątroby szczurów indukowanej wcześniej Aroclorem.

Dzięki zastosowaniu tej frakcji również badane promutageny mogą ulegać metabolizmowi w wyniku działania enzymów ssaków *in vitro* [5, 36, 44, 64, 101, 142], co pozwala na stwierdzenie ich aktywności nowotworowej.

Cały szereg innych testów skriningowych służących do oceny potencjalnego mutagennego/rakotwórczego działania związków chemicznych podaje Przybojewska [138]. Oprócz testu Amesa wymienia ona:

- testy reperacji DNA w systemach bakteryjnych, testy te

- pozwalają wykryć uszkodzenia DNA indukowane przez związki chemiczne o działaniu mutagennym. Oparte są one na założeniu, że komórki bakterii pozbawione zdolności naprawy uszkodzeń DNA, są bardziej wrażliwe na działanie związków mutagennych niż komórki bakterii szczepu dzikiego. Obecnie stosuje się szereg metod opartych na tej zasadzie, przy czym wykorzystuje się różne szczepy bakterii /*S.typhimurium*, *E.coli*, *B.subtilis*/ pozbawione zdolności do reparaacji DNA;
- test indukcji profaga i mutagenezy, który opiera się na tej zasadzie, iż związki indukujące układ reperacji SOS przyczyniają się do zniszczenia represora profaga, w lizogennych szczepach *E.coli* K₁₂ i namnażanie się faga;
 - test wymiany siostrzanych chromatyd /SCE/, który opiera się na semikonserwatywnych właściwościach replikacji DNA i zdolności wbudowywania się w nici DNA chromosomów analogu tyminy, bromodezoksyurydyny /BrdU/, co prowadzi do powstania siostrzanych chromatyd różniących się budową chemiczną;
 - test analizy chromosomów w komórkach ssaków, który dostarcza specyficznych informacji na temat częstości różnych typów aberracji indukowanych przez badane związki chemiczne;
 - test mikrojąderekowy, w którym wykorzystano fakt tworzenia się mikrojąderek w komórkach erytrocytów polichromatycznych pod wpływem działania związków o właściwościach mutagennych.

- test gospodarza i pośrednika, który polega na wprowadzeniu komórek bakterii do ustroju zwierząt doświadczalnych, którym podano badany związek chemiczny, a następnie odzyskaniu tych komórek i określeniu w nich zmian genetycznych;
 - test reperacji DNA w hodowlach komórek w obecności znakowanej tymidyny in vitro, który jest metodą autoradiograficzną polegającą na wykrywaniu tymidyny wbudowanej do nienamnażającej się hodowli komórek. W metodzie tej uszkodzone na skutek działania związków mutagennych odcinki DNA są eliminowane w wyniku syntezy naprawczej;
 - test transformacji komórek ssaków in vitro, który polega na badaniu uszkodzeń DNA w komórkach fibroblastów zarodków myszy lub w komórkach chomika syryjskiego in vitro, pod wpływem działania związków mutagennych, które ujawniają się jako zmiany fenotypowe;
 - test z *Drosophila melanogaster* polegający na ujawnianiu się agresywnych mutacji u muszki owocowej. Metoda ta odznacza się wysoką wrażliwością w wykrywaniu związków chemicznych, które stają się mutagenne po zmetabolizowaniu.
- M.Hollstein i J.Mo Cann [65] podają zestaw testów do badania karcinogenezy i mutagenezy, które dzielą się na sześć podstawowych grup:
- testy z użyciem mikroorganizmów prokariotycznych, fagów itp.
 - testy z użyciem mikroorganizmów eukariotycznych
 - testy z użyciem kultur komórek ssaków hodowanych in vitro

- testy z użyciem owadów in vitro
- testy in vitro na ssakach polegające na badaniu uszkodzeń DNA-komórkowego
- cytogenetyczne testy na ssakach polegające na wykryciu zmian fenotypowych komórek pod wpływem związków mutagennych i rakotwórczych.

W oparciu o testy mutagenezy [143] i hodowle tkankowe [90] bada się obecnie węglowodory aromatyczne i szereg ich metabolitów [81], jak również związki będące inhibitorami enzymów transformujących WWA.

Z powszechnie stosowanych do oceny potencjalnych właściwości mutagennych i rakotwórczych związków chemicznych testów bakteriologicznych, za najbardziej reprezentatywny uznany został test Ames'a z zastosowaniem aktywacji metabolicznej badanych substancji [143].

3. ZAGADNIENIE I CEL PRACY

Obecnie uważa się zgodnie z danymi WHO, iż więcej niż 80% chorób nowotworowych u ludzi, jest w bezpośredni sposób związanych z działaniem czynników występujących w środowisku naturalnym. Dzięki stosowanym obecnie nowoczesnym metodom udało się zidentyfikować cały szereg związków chemicznych bezpośrednio odpowiedzialnych za transformację nowotworową u ssaków.

Do szczególnie niebezpiecznych pod tym względem zanieczyszczeń naturalnego środowiska należą wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne.

Wraz z rozwojem przemysłu i motoryzacji wzrasta zanieczyszczenie wszystkich elementów środowiska naturalnego tymi niebezpiecznymi dla zdrowia ludności związkami. Stwierdza się ich obecność w powietrzu, wodach powierzchniowych, morskich, głębinowych, w glebie, a także w żywności.

Dlatego też koniecznym wydaje się rozpoznanie stopnia narażenia organizmu ludzkiego na wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, ich transformację i kumulację, a także możliwość ich migracji w środowisku naturalnym, a przede wszystkim opracowanie szybkich metod rozpoznawania występowania w elementach środowiska mutagennego i rakotwórczego zagrożenia.

Wobec tego interesującym wydało się zagadnienie zanieczyszczenia wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi wody powierzchniowej ujmowanej do celów wodociągowych

i ich mikrobiologiczna transformacja w aspekcie powstawania związków o potencjalnym rakotwórczym działaniu, a także możliwości zaadaptowania metody Ames'a do bezpośredniego wykrywania w wodzie czynników o potencjalnym mutagennym i rakotwórczym działaniu.

Wobec tak sformułowanego założenia celem niniejszej pracy było:

- określenie stopnia skażenia wody rzeki Oławy wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi;
- określenie interakcji naturalnej mikroflory wody z wybranymi wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi poprzez rozpoznanie stopnia zróżnicowania wrażliwości mikroflory na ich działanie, zdolności do biodegradacji i kumulowania się badanych związków;
- określenie selekcji naturalnej mikroflory wody i gleby przez WWA, polegającej na eliminowaniu form wrażliwych z zespołu, a tym samym modyfikowania biologicznej części procesów samooczyszczania;
- określenie interakcji czystych szczepów bakterii wyizolowanych ze środowiska naturalnego, a badanymi związkami pod kątem wykorzystywania wybranych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, jako jedyne źródła i energii, a także powstawania w wyniku mikrobiologicznej transformacji związków o potencjalnym mutagennym i rakotwórczym działaniu;
- określenie interakcji naturalnej mikroflory gleby z wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi w aspekcie przenikania ich do wody powierzchniowej;

- określenie możliwości stosowania skryningowego testu inkorporacji płytkowej /testu Ames'a/ do bezpośredniego oznaczania występowania w wodzie składników o potencjalnym rakotwórczym działaniu.

Przedstawione założenia pracy nabierają szczególnego znaczenia wobec faktu, iż w Polskiej Normie dotyczącej dopuszczalnych zanieczyszczeń wód powierzchniowych nie ujęto dotychczas wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych.

4. CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

4.1. Materiały i metody

Materiał do badań stanowiła woda rzeki Oławy oraz gleba przybrzeżna pobrana na stanowisku najbardziej narażonym na wpływy emisji przemysłowych i komunikacyjnych, leżącym na granicy terenów wodonośnych MPWiK we Wrocławiu.

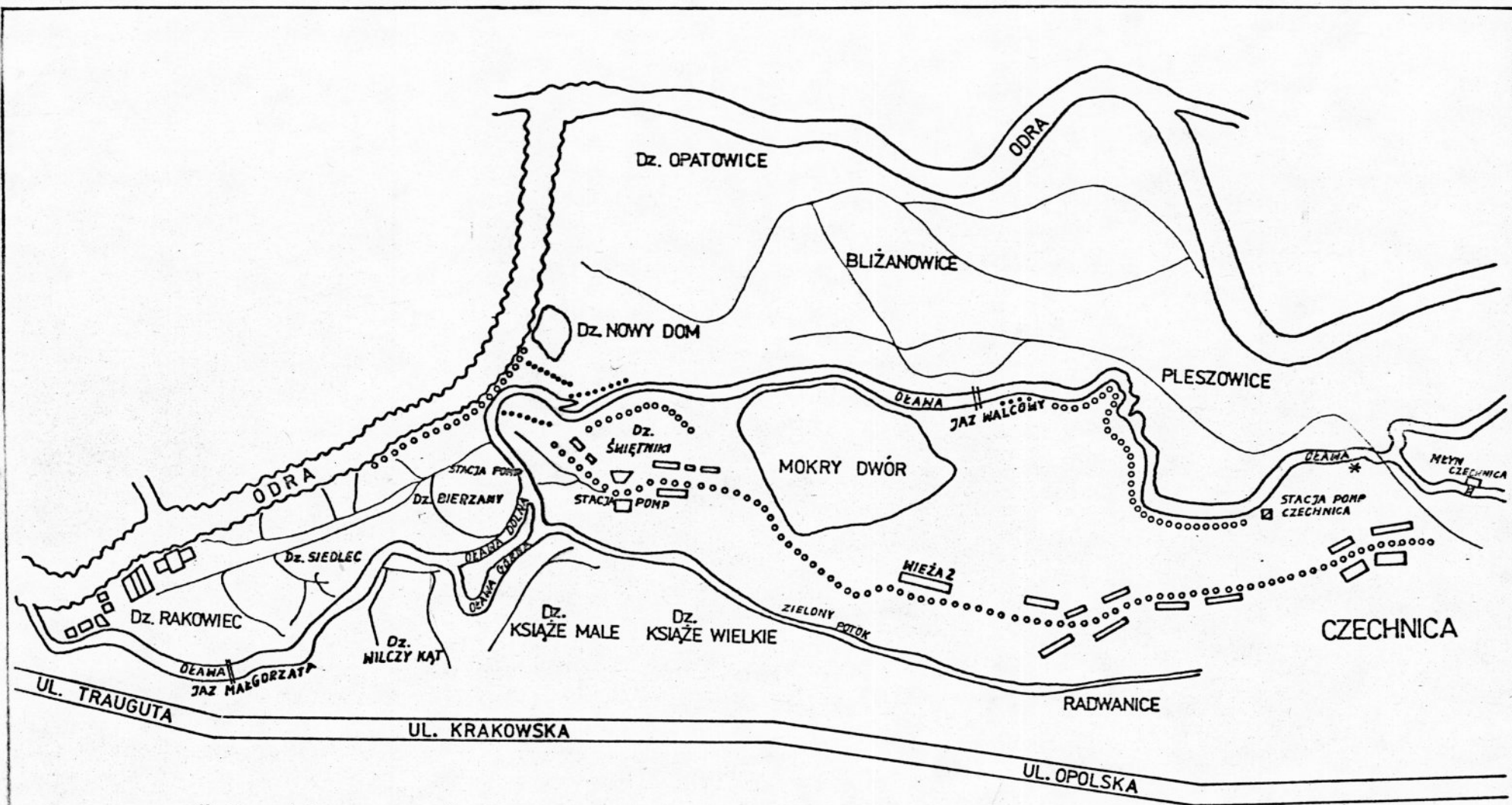
Ujęcie powierzchniowe, od którego stanowisko znajdowało się w niewielkiej odległości, usytuowane jest na końcowym odcinku biegu rzeki. Na istniejące w wodzie zanieczyszczenia, wynikające z gospodarki wodno-ściekowej terenu zlewni rzeki Oławy, nakładają się zanieczyszczenia przemysłowe pochodzące z huty żelazochromu Siechnice i elektrociepłowni Czechnica. Ponadto w niedużej odległości znajduje się trasa szybkiego ruchu w kierunku Opola i Górnego Śląska /rys. 13/

4.1.1. Badania nad obecnością w wodzie składników o działaniu mutagennym i rakotwórczym

4.1.1.1. Metody ekstrakcji i oznaczania ilościowego wybranych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych z wody rzeki Oławy.

Badania nad zawartością wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w wodzie rzeki Oławy przeprowadzono metodą zalecaną przez WHO [166] według Borneffa i innych [148], dostosowaną do warunków własnych.

Do badań przyjęto węglowodory objęte normą WHO dla wód przeznaczonych do picia /benzo/a/piren, benzo/b/fluoranten,



* Stanowisko poboru prób

Rys. 13. Szkic sytuacyjny terenów ujęć wody dla miasta Wrocławia

benzo/k/fluoranten, fluoranten, benzo/ghi/perylen i indeno/1,2,3-o,d/piren, poszerzając je o antracen.

Próby wody ekstrahowano cykloheksanem, a ekstrakty zagęszczano przez destylację w próżni. Następnie przeprowadzano rozdział chromatograficzny prób na cienkiej warstwie. Jako fazę rozwijającą wykorzystywano układ izooktan-heksan-benzen /9:1/, eter etylowy - metanol - woda destylowana /4:1:4/. Związki identyfikowano na podstawie porównania barwy fluorescencji plam na chromatogramach w nadfiolecie, wartości R_f wzorców, oraz widm absorpcji wzorcowych roztworów WWA.

W celu oznaczenia ilości WWA, plamy na chromatogramach eluowano i oznaczano spektrofotometrycznie na spektrofluorymetrze firmy Jobin-Yvon-3.

4.1.1.2. Badania nad występowaniem w wodzie rzeki Oławy składników o potencjalnym mutagennym i rakotwórczym działaniu z zastosowaniem testu Ames'a.

Ustalenie mutagennego i rakotwórczego charakteru surowej wody rzeki Oławy i jej cykloheksanowych ekstraktów prowadzono w oparciu o test Ames'a [50,109]. Zgodnie z nim, użyto w pracy mutantów *Salmonella typhimurium* LT₂ o charakterystyce zamieszczonej w tabeli 15.

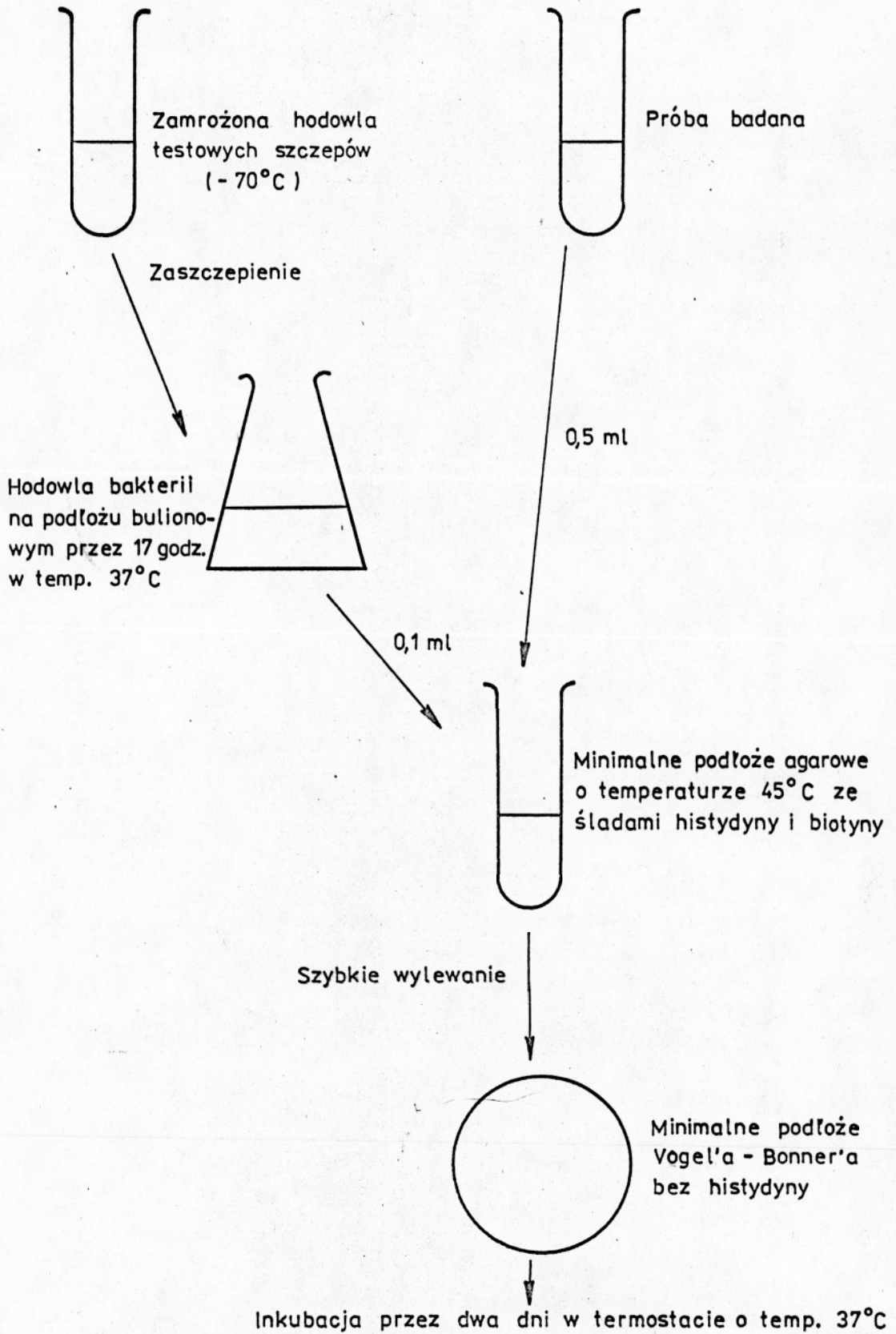
Tabela 15

Charakterystyka szczepów bakterii *Salmonella typhimurium* LT₂ użytych w teście Ames'a.

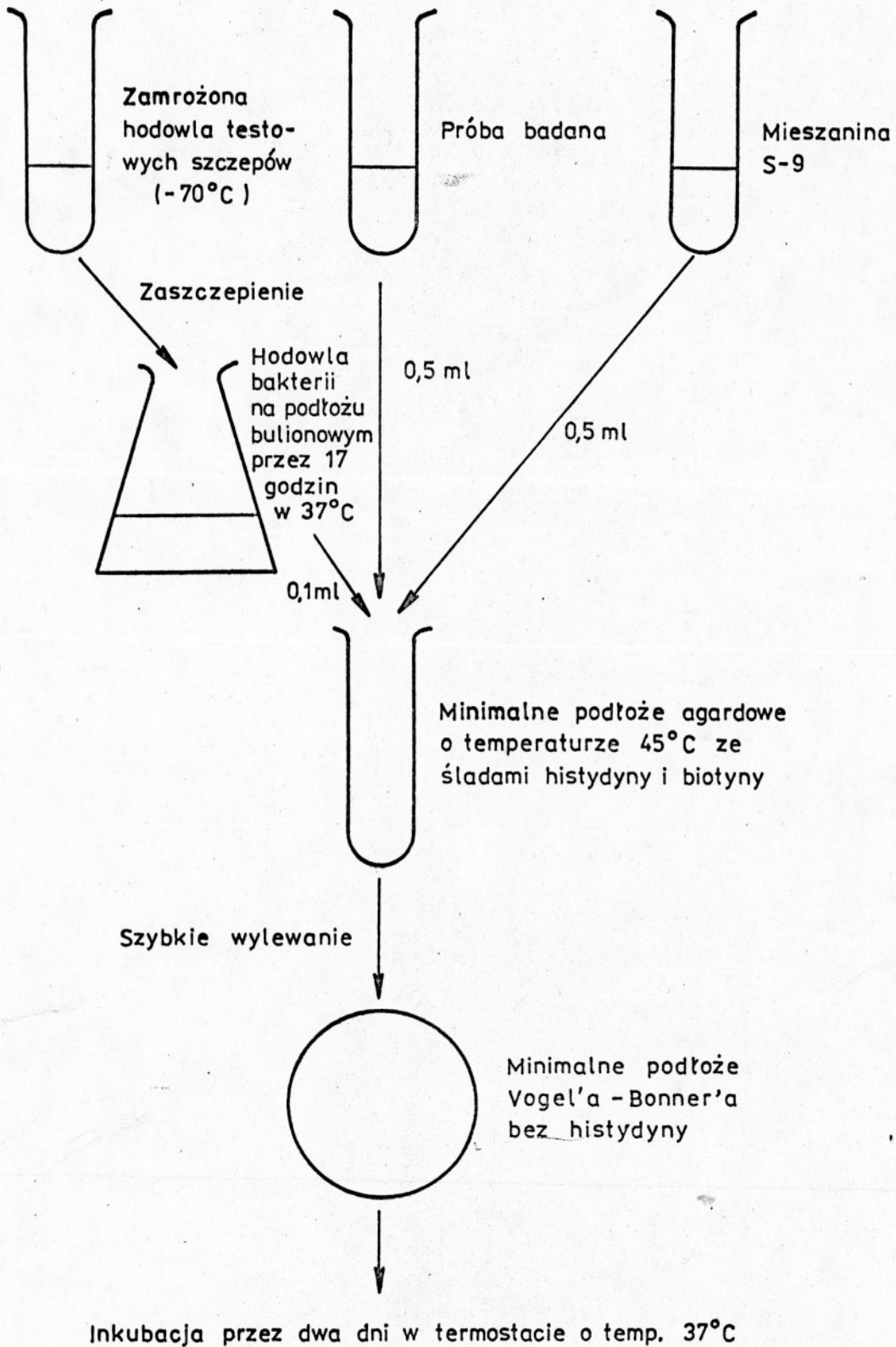
Skrótowe oznaczenia szczepów	Genotyp
TA 98	his-, rfa, uvr B + R
TA 100	his-, rfa, uvr B + R
TA 1535	his-, rfa, uvr B
TA 1537	his-, rfa, uvr B
TA 1538	his-, rfa, uvr B

W teście Ames'a wykorzystuje się fakt, iż pod wpływem czynników mutagennych histydynozależne szczepy rewertują do stanu prototroficznego. Przed przystąpieniem do właściwych badań sprawdzono markery genetyczne badanych szczepów oraz stopień ich spontanicznej rewersji. Badania mutagennego działania wody rzeki Oławy przy pomocy testu Ames'a przeprowadzono zgodnie ze schematem /rys. 14/

W celu metabolicznej aktywacji związków i stwierdzenia ich rakotwórczego działania zastosowano mikrosomalną frakcję wątroby szczurów /mieszanina S-9/ indukowanych Aroclorem 1254 /rys. 15/. Przygotowanie zwierząt doświadczalnych, preparację frakcji mikrosomalnej i mieszaniny S-9 przygotowano ściśle według wskazań autorów [109,110] .



Rys. 14. Schemat testu Ames'a na określenie mutagennego działania wody bez aktywacji metabolicznej związków w niej występujących



Rys. 15. Schemat testu Ames'a na określenie mutagennego rakotwórczego działania wody z aktywacją metaboliczną związków w niej występujących

4.1.1.3. Przygotowanie cykloheksanowych ekstraktów wody rzeki Oławy do testu Ames'a

Przeprowadzono ekstrakcję wody powierzchniowej i nadosadowej rzeki Oławy pochodzącej ze stanowiska 1,2 i 3. Próby o wielokrotności objętości 100, 50, 25 i 12,5 cm³ ekstrahowano cykloheksanem zgodnie z normą WHO. Następnie ekstrakt odparowywano w próżni w temp. 50°C do sucha, a następnie rozpuszczano w DMSO. Tak przygotowany materiał zastosowano w teście Ames'a wprowadzając do prób po 0,1 cm³ roztworu.

4.1.2. Badania nad interakcją naturalnej mikroflory wody a wybranymi wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi.

4.1.2.1. Zastosowane w badaniach wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne.

W badaniach stosowano następujące wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne:

- benzo/a/piren	- C ₂₀ H ₁₂
- antracen	- C ₂₂ H ₁₄
- fluoranten	- C ₁₆ H ₁₀
- acenaften	- C ₁₀ H ₆ /CH ₂ /2
- naftalen	- C ₁₀ H ₈

Punktem wyjścia w doborze stężeń była rozpuszczalność badanych węglowodorów w wodzie. Stosowano zgodnie z postępowaniem arytmetycznym dwa stężenia poniżej i trzy powyżej rozpuszczalności w wodzie redestylowanej.

Zakres stosowanych stężeń przedstawiono w tabeli 16.

Tabela 16

Zakres stężeń stosowanych w podłożach hodowlanych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych.

Badany węglowódor	Rozpuszczalność w wodzie [mg/dm ³]	Stosowane stężenie [mg/dm ³]
benzo/a/piren	0,06	0,48 0,24 0,12 0,06 0,03 0,015
antracen	0,075	0,6 0,3 0,15 0,075 0,0375 0,0162
fluoranten	0,265	2,12 1,06 0,53 0,265 0,1325 0,0662

C.d. Tabeli 16

Badany węglowodór	Rozpuszczalność w wodzie [mg/dm ³]	Stosowane stężenie [mg/dm ³]
acenaften	0,3	2,4 1,2 0,6 0,3 0,15 0,075
naftalen	40,0	320 160 80 40 20 10

Badane węglowodory rozpuszczano w acetonie, a następnie przenoszono do podłoża w objętości 0,1 cm³.

4.1.2.2. Określenie stopnia zróżnicowania wrażliwości mikroflory rzeki Oławy na wybrane wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne w cyklu rocznym.

Liczbę bakterii mających zdolność wzrostu wobec gradientu stężeń wybranych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych określano zmodyfikowaną metodą płytkową.

Do 2 cm³ półpłynnego agaru /"top-agar"/ o temperaturze 45°C dodawano 0,1 cm³ badanej wody powierzchniowej lub nadosadowej i 0,1 cm³ acetonowego roztworu badanego związku w odpowiednim stężeniu, w przeliczeniu na objętość "top-agaru", a następnie wylewano na 10 cm³ zestalonego podłoża agarowego. Po 78 godzinach inkubacji w temperaturze 25°C liczono wszystkie wyrosłe kolonie. Próby kontrolne wykonywano analogicznie, nie dodając badanego węglowodoru.

Liczbę bakterii mających zdolność wykorzystywania badanych WWA jako jedynych źródeł węgla i energii określano analogicznie, używając zestalonego podłoża mineralnego Šiškinovej i Trocenko [162]. W próbach kontrolnych do "top-agaru" - zamiast węglowodoru - dodawano jako substratu energetycznego 0,5% glukozę.

4.1.2.3. Selekcja ilościowa i jakościowa naturalnej mikroflory rzeki Oławy pod wpływem wybranych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych.

Materiał do badań stanowiła woda powierzchniowa rzeki Oławy pobrana na stanowisku znajdującym się pod bezpośrednim wpływem hałdy żużla pochromowego huty Siechnice /stanowisko 2/, wzbogaconą odpowiednimi stężeniami wybranych WWA.

Hodowlę prowadzono w kolbach Erlenmayera w objętości 250 cm³, z wytrząsaniem, w temp. 25°C. Do badań zastosowano antracen w stężeniach 0,3 i 0,6 mg/dm³, benzo/a/pirenu w stężeniach 0,24 i 0,48 mg/dm³ oraz fluoranten w stężeniach 1,6 i 2,12 mg/dm³.

Wpływ badanych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych na naturalną mikroflorę wody rzeki Oławy, oceniano w okresie trzech tygodni, prowadząc oznaczenia w czasie 0 i po 7, 14 i 21 dobach. Badano ilości bakterii psychrofilnych, przetrwalnikujących, proteolitycznych, amonifikacyjnych, nitryfikacyjnych I-szej i II-giej fazy, denitryfikacyjnych, amyloolitycznych.

Liczbę bakterii psychrofilnych określano ogólnie przyjętą techniką, na agarze odżywozym w temperaturze 20°C po czasie 72 godzinnej inkubacji.

Liczbę bakterii przetrwalnikujących oznaczano w wodzie poddając próbki wody działaniu temperatury 80°C przez 10 minut, a następnie ich natychmiastowemu schłodzeniu.

Tak przygotowane próby posiewano w ilości 1 cm³ na agar odżywczy i po 72 godzinnej inkubacji w temperaturze 20°C liczono wszystkie wyrosłe kolonie.

Liczbę bakterii amyloolitycznych określano na agarze skrobiowym. Próby posiewano na wymienione podłoże, a następnie inkubowano 72 godziny w 20°C. Po tym czasie powierzchnię płytek zalewano płynem Lugola w celu określenia stref hydrolyzy skrobi wokół kolonii bakterii posiadających enzymy amyloolityczne.

Ilość bakterii proteolitycznych określano poprzez posiew badanych prób wody na podłoże żelatynowe Frazier'a [145]. Po 72 godzinach inkubacji w temperaturze 20°C, zalewano podłoże chlorkiem rtęci w HCl, w celu zaobserwowania stref rozkładu żelatyny wokół kolonii bakterii posiadających enzymy proteolityczne.

Miano bakterii amonifikacyjnych ustalano na podłożu glukozowo-peptonowym. Nad pożywką zawieszano papierki Kruppa [145], w celu stwierdzenia wydzielania amoniaku przez bakterie. Próby, posiewane w szeregu rozcieńczeń, inkubowano 72 godziny w temperaturze 20°C, a następnie ustalano miano tych bakterii.

Miano bakterii nitryfikacyjnych I fazy ustalano na podłożu Winogradzkiego [145] dla nitryfikatorów I fazy. Szeregi rozcieńczeń inkubowano 72 godziny w temperaturze 20°C, po czym odczynnikiem Griesa stwierdzano obecność azotynów, ustalając miano bakterii badanej grupy.

Miano bakterii nitryfikacyjnych II fazy określano na podłożu Winogradzkiego dla II fazy nitryfikacji [145]. Po inkubacji trwającej 72 godziny w temperaturze 20°C stwierdzono obecność azotanów przy użyciu dwufenyloaminy, po uprzednim rozłożeniu pozostałości azotynów metodą moczniową [145].

Miano bakterii denitryfikacyjnych określano na podłożu Giltay'a. Po 72 godzinnej inkubacji w temperaturze 20°C ustalano miano tych bakterii w wyniku zmiany barwy podłoża. Ponadto stwierdzano obecność azotynów odczynnikiem Griesa i jonów amonowych odczynnikiem Nesslerera.

4.1.2.4. Badania nad rozkładem wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych przez naturalną mikroflorę wody,

W celu stwierdzenia rozkładu WWA przez mikroflorę naturalną wody prowadzono, z prób przygotowanych do badań nad selekcją, ekstrakcją badanych związków. Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne wyodrębniano z wody przy pomocy

ekstrakcji bezpośredniej w czasie 0 oraz 14 i 21 dób. Próbę objętości 250 cm³ ekstrahowano 15 cm³ cykloheksanu w ciągu 30 minut /dwukrotnie/. Otrzymany ekstrakt zagęszcza-
no w próżni, a następnie rozpuszczano w mieszaninie benzenu i metanolu /1:2/ i poddawano oznaczeniu metodą chromatografii cieczowej. Warunki oznaczenia: kolumna 25/83, eluent-metanol, zakres ciśnień 3-17 bar, przesuw taśmy 10 mm/min. Wyniki podano jako procentowy ubytek badanego związku w stosunku do wzorca o danym stężeniu.

4.1.2.5. Badania nad kumulacją wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych przez naturalną mikroflorę rzeki Oławy.

W celu określenia stopnia kumulacji wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych przez mikroflorę naturalną rzeki Oławy posiewano 50 cm³ wody rzecznej /powierzchniowej i nadosadowej/ do kolbek Erlenmayera, zawierających 50 cm³ podwójnie zatęzonego podłoża hodowlanego, wzbogaconego badanymi węglowodorami [134] .

Stosowano podłoże mineralne Šiškina, Trocenko [162] i bulionowe zawierające następujące stężenia węglowodorów:

antracen	- 0,15; 0,075; 0,0375 mg/dm ³
benzo/a/piren	- 0,12; 0,06 ; 0,03 mg/dm ³
fluoranten	- 0,53; 0,265; 0,132 mg/dm ³

Próby kontrolne posiewano w tych samych warunkach na podłożu bulionowym i podłożu mineralnym z 0,5% glukozą. Kolby z podłożem bulionowym inkubowano w temp. 20°C w okresie siedmiu dób, zaś z podłożem mineralnym w tej samej temperaturze

14 dób. Po inkubacji pobierano 10 cm³ hodowli i odwirowywano, a następnie trzykrotnie odplukiwano wodą destylowaną. Tak przygotowaną biomasę suszono w temperaturze 60°C przez 12 godzin /do stałej wagi/ i ustalano suchą masę, w której następnie oznaczano zawartość wybranych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Po bezpośredniej ekstrakcji cykloheksanem i odparowaniem w próżni ilość wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych oznaczano wykorzystując efekt Szpotalskiego, polegający na pojawianiu się quasiliniowej struktury widm substancji rozpuszczonych w zamrożonych węglowodorach nasyconych [146], z zastosowaniem MTF 44 Perkin-Elmer z przystawką mikrotemperaturową.

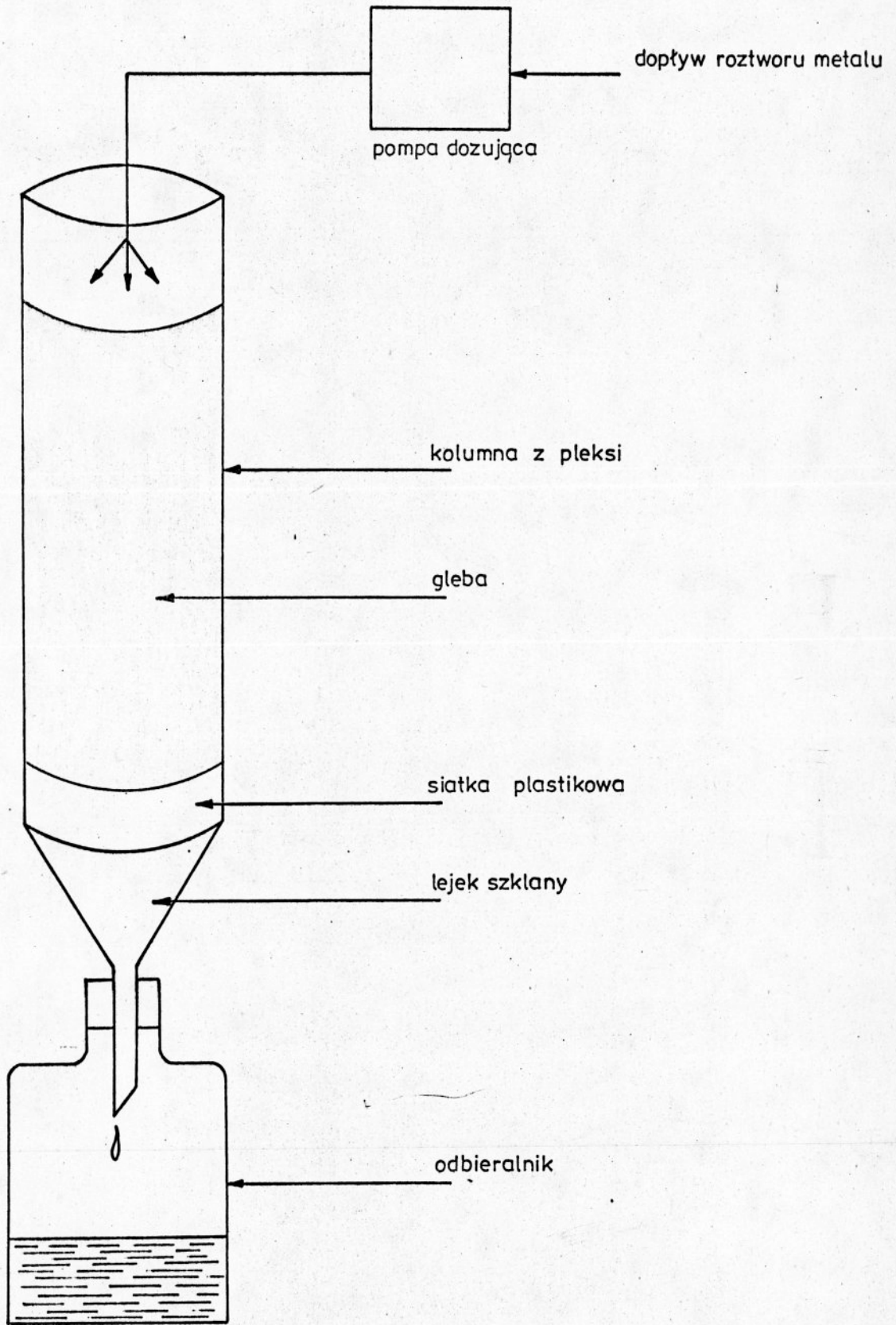
Badania wykonano trzykrotnie, a wyniki podano w postaci średniej.

4.1.3. Badania nad interakcją naturalnej mikroflory gleby a wybranymi wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi w układzie dynamicznym.

Badania laboratoryjne prowadzono na modelu laboratoryjnym ze szkła, zbudowanym na zasadzie lizymetru /rys. 16/.

Wypełnienie w wysokości 45 cm stanowiła gleba przybrzeżna rzeki Oławy pobrana na stanowisku znajdującym się pod bezpośrednim wpływem hałdy żużlu pochromowego /stanowisko 2/, Huty Siechnica.

Przy wypełnianiu zachowano naturalną strukturę gleby. Badania prowadzono równolegle na siedmiu kolumnach, dozuując w sposób ciągły wodne roztwory wybranych węglowodorów



Rys.16. Schemat modelu badawczego

aromatycznych, bądź wodą redestylowaną /kontrola/ /tabela 17/ z prędkością $25 \text{ cm}^3/\text{godzinę}$.

Badania prowadzono w ciągu 5 tygodni, przy czym przez pierwsze 3 tygodnie dozowano roztwory węglowodorów, a przez następne dwa tygodnie wodą destylowaną. Badania te miały na celu:

- wykazanie zmian w obrębie naturalnej mikroflory gleby pod wpływem WWA, dozowanych w sposób ciągły przez okres 21 dób, ocenianych na podstawie badań wycieków z lizymetrów i naturalnych warstw profilu glebowego,
- określenie stopnia usuwania badanych WWA w czasie infiltracji przez glebę,
- określenie sorpcji i desorpcji WWA przez filtr glebowy.

4.1.3.1. Badania nad selekcją ilościową w obrębie wybranych grup bakterii pod wpływem WWA dozowanych w sposób ciągły do filtrów glebowych.

4.1.3.1.1. Badania nad selekcją bakterii glebowych pod wpływem wybranych WWA, oceniana w przesączu filtrów glebowych

Odpiływ z kolumn glebowych pobierano do sterylnych naczyń po czasie 0 i po 7, 14 i 21 dobach. Badania mikrobiologiczne obejmowały określenie zmian ilościowych w obrębie bakterii psychrofilnych, przetrwalnikujących, amylolytycznych, proteolitycznych, amonifikacyjnych, nitryfikacyjnych I i II fazy i denitryfikacyjnych. Oceny ilościowej wymienionych grup bakterii dokonywano analogicznie jak w próbach wody /p. 4.1.2.3/.

Tabela 17

Schemat dozowania roztworów wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych do lizymetrów

nr kolum- ny	czas [tygodnie]	Rodzaj i ilość dozowanej substancji					
		0	1	2	3	4	5
1 /kontrola/		600 cm ³ H ₂ O redesy- tylowanej	4200 cm ³ H ₂ O redest.	4200 cm ³ H ₂ O redest.	4200 cm ³ H ₂ O redest.	4200 cm ³ H ₂ O redest.	4200 cm ³ H ₂ O redest.
2		600 cm ³ H ₂ O redest.	4200 cm ³ roztworu antracenu w wodzie redest. w stężeniu 0,3 mg/dm ³	4200 cm ³ r-ru antracenu w H ₂ O re- dest. w stężeniu 0,3 mg/dm ³	4200 cm ³ r-ru antracenu w H ₂ O re- dest. w stężeniu 0,3 mg/dm ³	4200 cm ³ redest.	4200 cm ³ redest.
3		600 cm ³ H ₂ O redest.	4200 cm ³ r-ru antra- cenu w H ₂ O redest. w stężeniu 0,6 mg/ dm ³	4200 cm ³ r-ru antra- cenu w H ₂ O redest. w stężeniu 0,6 mg/ dm ³	4200 cm ³ r-ru antra- cenu w H ₂ O redest. w stężeniu 0,6 mg/ dm ³	4200 cm ³ H ₂ O redest.	4200 cm ³ H ₂ O redest.

c.d. tabeli 17

4	600 cm ³ H ₂ O redest.	4200 cm ³ r-ru benzo/a/ pirenu w H ₂ O redest. w ² stęż. 0,24 mg/ dm ³	4200 cm ³ r-ru benzo/a/ pirenu w H ₂ O redest. w ² stęż. 0,24 mg/ dm ³	4200 cm ³ reru benzo/a/ pirenu w H ₂ O redest. w ² stęż. 0,24 mg/ dm ³	4200 cm ³ H ₂ O redest.	4200 cm ³ H ₂ O redest.
5	600 cm ³ H ₂ O redest.	4200 cm ³ r-ru benzo/a/ pirenu w H ₂ O redest. w ² stęż. 0,48 mg/ dm ³	4200 cm ³ r-ru benzo/a/ pirenu w H ₂ O redest. w ² stęż. 0,48 mg/ dm ³	4200 cm ³ r-ru benzo/a/ pirenu w H ₂ O redest. w ² stęż. 0,48 mg/ dm ³	4200 cm ³ H ₂ O redest.	4200 cm ³ H ₂ O redest.
6	600 cm ³ H ₂ O redest	4200 cm ³ r-ru fluoran- tenu w H ₂ O redest. w ² stęż. 1,06 mg/ dm ³	4200 cm ³ r-ru fluoran- tenu w H ₂ O redest. w ² stęż. 1.06 mg/ dm ³	4200 cm ³ r-ru fluoran- tenu w H ₂ O redest. w ² stęż. 1,06 mg/ dm ³	4200 cm ³ H ₂ O redest	4200 cm ³ H ₂ O redest
7	600 cm ³ H ₂ O redest	4200 cm ³ r-ru fluo- rantenu w H ₂ O redest w ² stęż. 2,12 mg/dm ³	4200 cm ³ r-ru fluo- rantenu w H ₂ O redest w ² stęż. 2,12 mg/dm ³	4200 cm ³ r-ru fluo- rantenu w H ₂ O redest w ² stęż. 2,12 mg/dm ³	4200 cm ³ H ₂ O redyst	4200 cm ³ H ₂ O redyst

4.1.3.1.2. Badania nad selekcją bakterii glebowych pod wpływem wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych oceniana w profilach glebowych lizymetrów.

W celu określenia liczebności wybranych grup bakterii glebowych pod wpływem wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, dozowanych do lizymetrów w sposób ciągły przez 21 dób, a następnie przemywanych przez 14 dób wodą destylowaną /tabela 17/, dokonywano posiewów prób gleby z 3 warstw profilu glebowego na podłoża wybiórcze /p.4.1.2.3/. Badania te wykonano trzykrotnie tj. przed rozpoczęciem dozowania WWA, po 21 dobach dozowania związków w sposób ciągły i po 14 dobach dozowania wody redystylowanej.

4.1.3.2. Badania modelowe nad przemieszczaniem się badanych WWA z gleby do wody.

4.1.3.2.1. Sorpcja i desorpcja badanych związków przez glebę.

W celu określenia usuwania wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w wyniku infiltracji przez filtr glebowy, dokonywano ich bezpośredniej ekstrakcji z wycieków z lizymetrów po czasie 0 i po 7, 14, 21, 28 i 35 dobach. Próbę objętości 1 dm³ ekstrahowano 60 cm³ cykloheksanu w ciągu 30 min. /dwukrotnie/. W dalszej części postępowano jak z próbami wody /p. 4.1.2.4./.

Aby wyjaśnić losy WWA w filtrze glebowym, przeprowadzono również oznaczenia zawartości antracenu, benzo/a/pirenu i fluorantenu w trzech warstwach gleby, po czasie 0 i po 21 dobach dozowania WWA, a także po 14 dobach przemywania wodą redestylowaną:

4.1.3.2.2. Udział mikroflory gleby w sorpcji i desorpcji WWA

Aby porównawczo ocenić udział mikroflory gleby w badanych procesach, przeprowadzono eksperyment z zastosowaniem gleby sterylizowanej.

Badania prowadzono na modelach laboratoryjnych typu lizymetru, wypełnionych sterylizowaną glebą przybrzeżną, pobraną na stanowisku 2. Wypełnienie i warunki dozowania węglowodorów były analogiczne do podanych w p. 4.1.3.

4.1.4. Badania nad interakcją wyizolowanych czystych szczepów bakterii a wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi

4.1.4.1. Izolacja czystych szczepów bakterii wrażliwych i niewrażliwych na stosowane wysokie stężenia WWA.

Izolowania szczepów bakterii wrażliwych na wysokie stężenia benzo/a/pirenu, antracenu i fluorantenu dokonano w następujący sposób: w pierwszej kolejności izolowano z wody powierzchniowej i nadosadowej rzeki Oławy na stanowisku 2, na podłożu mineralnym z glukozą [162] w temperaturze 20°C, wszystkie wyrosłe szczepy bakterii. Następnie oczyszczano je

na tym samym podłożu. Czyste szczepy bakterii przesiewano na podłoża mineralne zestalone agarem, zawierające benzo/a/piren w stężeniu $0,24 \text{ mg/dm}^3$, antracenu w stężeniu $0,3 \text{ mg/dm}^3$ i fluorantenu w stężeniu $1,06 \text{ mg/dm}^3$. Do dalszych badań wybrano szczepy, które nie miały możliwości wzrostu na podłożu mineralnym zawierającym badany węglowodór jako jedyne źródło węgla i energii. Te szczepy uważano dalej za bakterie wrażliwe na określone WWA.

Izolowania szczepów opornych na wysokie stężenia WWA dokonywano w następujący sposób: w pierwszym etapie posiewano $0,1 \text{ cm}^3$ wody powierzchniowej i nadosadowej rzeki Oławy, na podłoże mineralne zawierające wybrane WWA. Zastosowano stężenia benzo/a/pirenu $0,48 \text{ mg/dm}^3$, antracenu $0,6 \text{ mg/dm}^3$, fluorantenu $2,12 \text{ mg/dm}^3$, acenaftenu $2,4 \text{ mg/dm}^3$ i naftalenu 160 mg/dm^3 . Następnie izolowano wszystkie morfologicznie różne kolonie, jakie w tych warunkach wyrosły i przesiewano na to samo podłoże zawierające badane WWA, jako jedyne źródło węgla i energii.

Te szczepy uważano dalej za bakterie odporne na określone WWA.

4.1.4.2. Identyfikacja szczepów bakterii wrażliwych i opornych na wysokie stężenia WWA.

W wyniku wstępnych badań selekcyjnych wybrano do dalszych badań szczepy charakteryzujące się najlepszą przydatnością do dalszych eksperymentów.

Klasyfikacji wyizolowanych z wody szczepów bakterii dokonywano na podstawie badania ich cech morfologicznych i fizjologicznych.

Badano:

1. Cechy morfologiczne i anatomiczne komórek, kształt, ruchliwość, barwienie metodą Grama, wytwarzanie i lokalizacja przetrwalników,
2. Cechy morfologiczne kolonii bakterii: kolor, kształt, profil, brzeg, powierzchnia i konsystencja.
3. Cechy morfologiczne rasy: wygląd, wzrost, powierzchnia, konsystencja, profil i przezroczystość.
4. Charakterystyka wzrostu na bulionie odżywczym i ziemniaku.
5. Cechy fizjologiczne : optimum termiczne, stosunek do wolnego tlenu, wzrost na podłożu bulionowym zawierającym 2,5,7 i 10% NaCl, fermentacja węglowodorów, /glukoza, ksyloza, arabinoza, sacharoza, laktoza, mannitol/, wykorzystanie różnych źródeł węgla /cytrynian, skrobia/, produkcja indolu, siarkowodoru, acetoiny z zakwaszeniem, upłynnianie żelatyny, amonifikacja, redukcja azotanów, hydroliza mocznika, dezaminacja fenyloalaniny, aktywność katalazy i oksydazy, peptonizacja i koagulacja mleka.

Badania identyfikacyjne dla niektórych szczepów, uzupełniano o określanie wzrostu bakterii na podłożach specjalnych takich jak: agar z krwią i podłoże Mac Conkeya. Szczepy bakteryjne oznaczano posługując się odpowiednimi kluczami identyfikacyjnymi [9,26,27] .

4.1.4.3. Określenie aktywności oddechowej czystych wrażliwych i opornych szczepów bakterii wobec wybranych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych jako jedynych źródeł węgla i energii.

W badaniach zastosowano następujące szczepy bakterii:

- szczep $\epsilon/H/1$ - dobrze rosnący wobec antracenu w stężeniu $0,6 \text{ mg/dm}^3$ jako jedynego źródła węgla i energii;
- szczep ϵ_7 - nierosnący wobec antracenu w stężeniu $0,3 \text{ mg/dm}^3$ jako jedynego źródła węgla i energii;
- szczep ϵ_8 - dobrze rosnący wobec fluorantenu w stężeniu $2,12 \text{ mg/dm}^3$ jako jedynego źródła węgla i energii;
- szczep d_7 - nierosnący wobec fluorantenu w stężeniu $1,06 \text{ mg/dm}^3$ jako jedynego źródła węgla i energii;
- szczep ϵ_2 - dobrze rosnący wobec benzo/a/pirenu w stężeniu $0,48 \text{ mg/dm}^3$ jako jedynego źródła węgla i energii;
- szczep d_7 - nierosnący wobec benzo/a/pirenu w stężeniu $0,24 \text{ mg/dm}^3$ jako jedynego źródła węgla i energii.

Zastosowano acetonowe roztwory benzo/a/pirenu, antracenu i fluorantenu w takich stężeniach, by po dodaniu do naczynka reakcyjnego otrzymać następujące stężenia:

- benzo/a/piren $0,48$ i $0,24 \text{ mg/dm}^3$
- antracenen $0,6$ i $0,3 \text{ mg/dm}^3$

- fluoranten 2,12 i 1,06 mg/dm³

Zawiesinę bakterii przygotowywano w następujący sposób: badane szczepy bakterii namnażano na podłożu mineralnym z 0,5% glukozą [162] w czasie 18 godzin. Następnie bakterie odwirowywano i dwukrotnie przemywano 0,05 molowym buforem fosforanowym o pH 7,0, po czym bakterie zawieszano w tym samym buforze i ustalano ekstynkcję dla trzykrotnie rozcieńczonej zawiesiny na $E_{550 \text{ nm}} = 1,0$.

Każdą z prób badano w trzech powtórzeniach według schematu przedstawionego w tabeli 18. Obserwację aktywności oddechowej badanych szczepów prowadzono w czasie 180 minut w temperaturze 25°C.

Tabela 18

Warianty prób przygotowywanych dla określenia aktywności oddechowej w aparacie Warburga.

Składniki mieszaniny reakcyjnej	Stosowane ilości komponentów w cm ³ w naczynkach reakcyjnych				
	oddych. substratowe	oddych. endogenne	kontrola	chemidegradacja	termobarometr
zawiesina bakterii	0,5	0,5	0,5	-	-
bufor fosforanowy	2,4	2,4	2,4	2,4	-
acetonowy r-r WWA	0,1	-	-	0,1	-
5% glukoza	-	-	0,1	-	-
woda redestyl,	-	0,1	-	0,5	3,2
20% KOH	0,2	0,2	0,2	0,2	-
Całkowita obj. próby	3,2	3,2	3,2	3,2	3,2

4.1.4.4. Badania nad biotransformacją antracenu przez czyste wrażliwe i odporne szczepy bakterii.

Badania nad biotransformacją antracenu przeprowadzono w dwóch wariantach:

- zastosowano dwa szczepy bakterii mające zdolność wzrostu wobec antracenu jako jedyne źródła węgla i energii, wyizolowane z wody powierzchniowej / $\epsilon/4/1/$ i nadosadowej / $d/3/2/$. Zastosowano dwa stężenia związku 0,3 i 0,15 mg/dm³;
 - zastosowano ponownie szczep $\epsilon/4/1$ jako odporny na antracen, a w miejsce szczepu $d/3/2$ zastosowano szczep bakterii / $\epsilon_7/$ nie mających zdolności wzrostu wobec badanego związku.
- Badania prowadzono w stężeniach antracenu - 0,3 i 0,6 mg/dm³.

4.1.4.4.1. Badania nad biotransformacją antracenu z zastosowaniem czystych szczepów bakterii wykorzystujących badany związek jako jedyne źródło węgla i energii.

Hodowlę prowadzono w warunkach statycznych stosując dwa szczepy $\epsilon/4/1$ i $d/3/2$, a także ich mieszaninę /tabela 19/. Zastosowano następujące warunki hodowli:

- objętość próby 500 cm³
- objętość inoculum 5 cm³
- ekstynkcyjność inoculum $E_{550 \text{ nm}} 0,15$
- ciągłe mieszanie z zastosowaniem mieszadła magnetycznego.

Tabela 19

Warianty eksperymentów dotyczących biodegradacji antracenu przez szczepy $\epsilon/4/1$ i $d/3/2$

Szczep bakterii	Źródło węgla i energii	stężenie mg/dm^3
$\epsilon/4/1$	antracem	0,3
	antracem	0,15
	glukoza	500
$d/3/2$	antracem	0,3
	antracem	0,15
	glukoza	500
mieszanka szczepów $\epsilon/4/1$ i $d/3/2$ w stosunku 1:1	antracem	0,3
	antracem	0,15
	glukoza	500

Jako kontrolę ewentualnego procesu chemidegradacji, zastosowano podłoże mineralne z antracemem w stosowanych stężeniach, nie zaszczone mikroorganizmami.

Czas inkubacji wynosił 14 dni. W czasie trwania doświadczenia przeprowadzano następujące badania:

- określenie rozwoju populacji bakterii metodą Mc Crady'ego w czasie 0,7 i 14 dób
- zmiany ilości antracenu w czasie 0,7 i 14 dób
- określenie mutagennego i rakotwórczego działania produktów pobiodegradacyjnych po czasie 7 i 14 dób.

4.1.4.4.1.1. Określenie rozwoju populacji bakterii wobec antracenu jako źródła węgla i energii.

Rozwój populacji bakterii w hodowlach z antracenenem śledzono metodą Mc Crady'ego z zastosowaniem podłoża mineralnego z dodatkiem antracenu w odpowiednim stężeniu i równocześnie na podłożu mineralnym z glukozą. Próby inkubowano w temperaturze 25°C przez 72 godziny a następnie określano wzrost bakterii poprzez ocenę zmętnienia podłoża.

4.1.4.4.1.2. Określenie ubytku substratu w czasie biotransformacji antracenu przez czyste szczepy bakterii i ich mieszaninę.

Zastosowano ekstrakcję bezpośrednią prób, w których przeprowadzono badania nad biotransformacją antracenu i oznaczano antracenen jak w p. 4.1.2.5.

4.1.4.4.1.3. Określenie mutagennego i rakotwórczego działania produktów pobiodegradacyjnych antracenu

W badaniach zastosowano test Ames'a w układzie analogicznym jak w badaniach nad obecnością potencjalnych mutagennych i rakotwórczych składników wody rzeki Oławy /p.4.1.1.2/

4.1.4.4.2. Badania nad biotransformacją antracenu z zastosowaniem czystych szczepów bakterii wrażliwych i opornych na wysokie stężenia tego związku.

Hodowlę prowadzono w warunkach statycznych z ciągłym mieszaniem. Zastosowano szczep $\epsilon/4/1$ jako mający zdolność wzrostu z wykorzystaniem antracenu jako jedyne źródła węgla i energii i szczep ϵ_7 , który nie posiadał tej zdolności. Do hodowli zastosowano podłoże mineralne zawierające [162] 0,3 i 1,2 mg/dm³ antracenu. W tych samych warunkach prowadzono próby kontrolne z zastosowaniem glukozy jako substratu energetycznego i próby mające ustalić ewentualną chemidegradację antracenu.

W czasie trwania doświadczenia prowadzono następujące badania:

- określenie przyrostu bakterii metodą płytkową po czasie 0, 7 i 14 dób.
- określenie aktywności oddechowej szczepów po czasie 0, 7 i 14 dób.
- określenie mutagennego i rakotwórczego działania produktów pobiodegradacyjnych antracenu po czasie 7 i 14 dób.
- próby ustalenia szlaku metabolicznego antracenu u bakterii

Hodowlę prowadzono w objętości 500 cm³. Do podłoża wprowadzono węglowodór w odpowiednim stężeniu w objętości 1 cm³ wodoru acetonowego. Próby zaszczepiano zawiesiną bakterii w objętości 5 cm³ o ekstynkcji E_{550} um szczepu ϵ_7 1,6 i $\epsilon/4/1$ 1,25.

4.1.4.4.2.1. Określenie przyrostu bakterii metodą płytkową Kocha.

W badaniach zastosowano podłoże mineralne z 0,5% glukozą. Odpowiednie rozcieńczenia prób posiewano zalewając 1 cm³ próby 10 cm³ podłoża o temperaturze 45°C. Odczytu dokonywano po 72 godzinnej inkubacji w temp. 20°C.

4.1.4.4.2.2. Określenie aktywności oddechowej szczepów ϵ_7 i $\epsilon/4/1$ metodą manometryczną Warburga w czasie biotransformacji antracenu.

Do badań pobierano mikroorganizmy z hodowli w objętości 100 cm³, odwirowywano i przemywano dwukrotnie buforem fosforanowym 0,05 molowym o pH 7,0, zawieszano w 5 cm³ buforu, po czym ustalano ich ekstynkcję na poziomie $E_{550 \text{ nm}} = 1,0$. W badaniach zrezygnowano z próby blanc, natomiast każda z prób substratowych miała swój odpowiednik w próbie na oddychanie endogenne. Wypełnienie naczynek i warianty prób były analogiczne do przedstawionych w punkcie 4.1.4.3.

4.1.4.4.2.3. Określenie mutagennego i rakotwórczego działania produktów pobio-degradacyjnych antracenu.

Do przeprowadzenia testu Ames'a użyto odmiennego zestawu szczepów Salmonella typhimurium LT₂. W miejsce szczepu S.typhimurium TA 1535 wprowadzono szczep S.typhimurium TA 97 o genotypie his⁻, rfa, uvr B+R. W teście postępowano zgodnie z metodyką podaną w punkcie 4.1.1.2.

4.1.4.4.2.4. Próby ustalenia szlaku metabolicznego antracenu u bakterii.

Próby hodowlane nad biotransformacją antracenu, w objętości 500 cm³ ekstrahowano trzykrotnie porcjami po 50 cm³ eteru etylowego. Połączone ekstrakty eterowe suszono bezwodnym siarczanem sodowym, sączone i odparowywano do sucha pod próżnią w temperaturze nie przekraczającej 30°C. Suchą pozostałość rozpuszczano w 5 cm³ metanolu i analizowano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Stosowano chromatograf złożony z pompy Dupont model 410, dedektora UV ze zmienną długością fali produkcji Zakładu Chemii Fizycznej PAN w Warszawie. Stosowano kolumnę długości 25 cm, o przekroju wewnętrznym 0,5 cm, w której fazę stacjonarną stanowił Zorbax ODS, zaś fazę ruchomą mieszanina metanolu i wody w stosunku objętościowym 85:15. Chromatogram rozwijano w warunkach izokratycznych.

4.2. Wyniki

4.2.1. Charakterystyka zlewni rzeki Oławy od źródeł do ujęcia powierzchniowego i opis terenu badań

Zlewnia rzeki Oławy od źródeł do ujęcia powierzchniowego zajmuje 74096 ha, z czego 69733 ha obejmują grunty orne, zaś 17740 ha lasy. Większość miast znajdujących się na terenie zlewni posiada oczyszczalnie ścieków, jednakże często

przeciążone ładunkiem zanieczyszczeń /Ziębice, Strzelin, Henryków, Przeworno/. W mieście Oławie pomimo istnienia oczyszczalni część ścieków komunalnych odprowadzana jest kanalizacją deszczową i rowami melioracyjnymi. Oczyszczalni nie posiadają miejscowości Wiązów i Siechnica, a ścieki z szamb lokalnych odprowadzane są do Oławy kanalizacją deszczową.

Obszar zlewni pokryty jest siecią dróg państwowych utwardzonych i linii PKP [147] .

Do szczególnie niebezpiecznych źródeł zanieczyszczenia chemicznego wód rzeki Oławy należą Huta i Elektrociepłownia Siechnice.

W Hucie Siechnice z rudy chromowej wytapiany jest żelazochrom. Produktem ubocznym jest wywożony na hałdy, zlokalizowane w pobliżu ujęcia MPWiK, żużel chromowy. Transport żużlu jest suchy, zraszany jest tylko sam zsyp na hałdę. Żużel jest lotny i pokrywa teren zakładu oraz przyległe tereny wodonośne.

Elektrociepłownia Siechnice nie odprowadza do rzeki ścieków, gdyż krążą one w obiegu zamkniętym. Na terenie Elektrociepłowni znajduje się żużlowisko, gdzie odprowadzane są odpływy z wymienników, z odmulania reaktorów oraz płukania filtrów zwirowych.

Odpady poprodukcyjne Huty i Elektrociepłowni Siechnice mogą przedostawać się do wody powierzchniowej drogą infiltracji, spływów z opadami atmosferycznymi, a także opadów pyłów. Najgroźniejsze z nich to związki chromu oraz węglowodory aromatyczne, alifatyczne, a także metale ciężkie.

Brak roślinnego pasa ochronnego wokół Huty Siechnice i Elektrociepłowni Czechnica, a także wokół terenów wodonośnych, sprzyja przedostawaniu się zanieczyszczeń do wody rzeki Oławy, a także rozprzestrzenianie się pyłów na cały obszar wodonośny. Ponadto w niedużej odległości przebiega droga szybkiego ruchu w kierunku Opola.

Stanowisko badawcze wyznaczono w odległości około 200 m poniżej ujęcia wody przez MPWiK Wrocław na wysokości hałdy żużlu pochromowego Huty Siechnice.

4.2.2. Występowanie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w wodzie rzeki Oławy w cyklu rocznym.

Dopuszczalne stężenie sześciu wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w wodzie tj. benzo/a/pirenu, fluorantenu, benzo/k/fluorantenu, benzo/b/fluorantenu, benzo/ghi/perylenu i indenopirenu określa norma Światowej Organizacji Zdrowia. Sumaryczna zawartość objętych normą WWA nie może przekraczać 200 ng/dm^3 lub 5 ng/dm^3 dla benzo/a/pirenu.

Otrzymane na ten temat wyniki wskazują, iż w wodzie rzeki Oławy wartości te były znacznie przekroczone /tabela 20/. Sumaryczna zawartość oznaczanych WWA objętych normą WHO wahała się dla wody powierzchniowej w granicach od $368,7$ do $1587,0 \text{ ng/dm}^3$, dla wody nadosadowej od $418,7$ do $1597,4 \text{ ng/dm}^3$, a więc od wartości dwukrotnie przewyższającej

normę, do wartości przewyższającej ją prawie ośmiokrotnie.

Stężenie benzo/a/pirenu, uważanego za najbardziej niebezpieczny dla zdrowia związek, ustalony przez Światową Organizację Zdrowia na 5 ng/dm^3 , wynosiło w badanej wodzie od 12,5 do $55,2 \text{ ng/dm}^3$, a więc przewyższało normę od dwu- do jedenastokrotnie, w wodzie nadosadowej od 11,9 do $96,5 \text{ ng/dm}^3$. Przekroczenie wynosiło od dwu- do dziewiętnastokrotnego.

Pozostałe WWA nie są objęte normą WHO, niemniej jednak bardzo wysokie stężenia antracenu stwierdzone w wodzie rzeki Oławy w pobliżu ujęcia wodociągowego, wydaje się niebezpieczne. Z drugiej strony wskazuje na poważne zanieczyszczenie i niewłaściwą ochronę tej rzeki.

Wiadomo bowiem, że wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne należą do związków oddziałujących szkodliwie już w bardzo małych dawkach, a wiele z nich poprzez swoje mutagenne i rakotwórcze działanie należy do szczególnie niebezpiecznych dla zdrowia zanieczyszczeń. Ponadto stwierdzono, iż niekancerogenne węglowodory takie jak fluoranten, piren czy chryzen tworzą na drodze biotransformacji metabolity posiadające własności mutagenne i rakotwórcze. Wspomniane tu czynniki jak i zaobserwowane tak znaczne stężenia WWA w wodzie rzeki Oławy nabierają szczególnego znaczenia wobec faktu ujmowania tych wód do celów wodociągowych.

Tabola 20

Ilość wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w próbach wody rzeki Olawy

Rodzaj badanej wody	Data poboru prób	Badane wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne [ng/dm ³]							
		benzo/a/piren	fluoranten	benzo/k/fluoranten	benzo/b/fluoranten	benzo/g/h/i/porylen	indeno-piren	Suma	antracen
woda powierzchniowa	III 1982	12,5	206,2	22,5	30,0	45,0	52,5	368,7	150,0
	IV 1982	31,2	1110,9	101,2	112,5	138,7	92,5	1587,0	493,7
	V 1982	brak rozdziła		—	—	—	—	—	—
	VI 1982	55,2	308,2	38,4	90,0	139,7	141,2	772,7	273,4
	XI 1982	17,8	243,7	15,0	30,6	60,6	52,5	410,2	743,7
	XII 1982	21,9	646,9	21,2	34,8	78,7	56,2	855,7	5875,0
	I 1983	25,0	585,3	32,5	nb	88,1	71,2	802,1	3812,0
	II 1983	17,5	375,0	18,75	nb	69,4	61,2	541,85	2025,0
woda nadsadowa	III 1982	48,7	581,2	90,0	197,5	367,5	312,5	1597,4	268,7
	IV 1982	brak rozdziła		—	—	—	—	—	—
	V 1982	66,2	693,7	71,2	125,0	225,0	175,0	1356,1	743,7
	VI 1982	96,5	761,7	57,2	151,6	258,5	219,8	1545,3	2699,2
	VII 1982	25,0	285,9	40,0	58,7	103,1	80,0	592,7	312,5
	VIII 1982	25,0	234,3	30,0	55,0	118,1	100,0	562,4	143,7
	IX 1982	11,9	215,6	20,0	35,6	35,6	35,0	415,7	418,7
	XI 1982	16,25	215,6	20,0	40,0	67,5	67,5	426,85	287,5
	XII 1982	25,0	609,4	25,0	45,5	88,12	67,5	860,52	5250,0
	I 1983	68,1	745,3	48,7	nb	294,4	245,0	1356,5	5062,0
	II 1983	19,4	473,2	23,7	nb	76,9	61,2	654,4	2700,0

4.2.3. Występowanie zanieczyszczeń o charakterze mutagennym i rakotwórczym w wodzie rzeki Oławy.

Wodę do badań nad mutagennym i rakotwórczym działaniem składników w niej zawartych pobrano wielokrotnie. W pierwszym terminie pobrano wodę z rzeki Oławy na wysokości hałdy żużlu pochromowego i najbliższego stawu infiltracyjnego. W kolejnych terminach pobrano wodę powierzchniową i nadosadową z trzech stanowisk na rzece Oławie tj.:

- bezpośrednio przy ujęciu powierzchniowym wody dla miasta Wrocławia /stanowisko 1/,
- na wysokości hałdy żużla pochromowego huty Siechnice /stanowisko 2/,
- powyżej jazu na rzece Oławie /stanowisko 3/.

W ostatnim wariancie doświadczeń zastosowano cykloheksanowe ekstrakty wody rzecznej w różnych rozcieńczeniach.

4.2.3.1. Ustalenie warunków testu Ames'a

Dużym utrudnieniem było otrzymanie wody w jej pełnym i niezmienionym składzie chemicznym, a jednocześnie uzyskanie jej całkowitej sterylności. Ponieważ nie można było w tym przypadku stosować sterylizacji termicznej zdecydowano się uzyskać stan pełnej jałowości wody metodą filtracji. Filtrację prowadzono z zastosowaniem filtrów membranowych Sartorius 0,01 nm i filtrów azbestowych 6 CMS DIA. Jedyną skuteczną i możliwą do stosowania metodą sterylizacji wody okazała się filtracja z zastosowaniem filtrów Seitza z sączkami azbestowymi 6 CMS DIA.

Po ustaleniu metody sterylizacji wody przystąpiono do określenia stałej liczby bakterii szczepów testowych *Salmonella typhimurium* LT₂. W tym celu hodowlę bakterii, po inkubacji na bulionie i po odwirowaniu, zawieszano w roztworze fizjologicznym tak, by otrzymać z posiewu 10⁸ kolonii bakterii na płycie, co równało się E_{550 nm} 0,05.

Dla stwierdzenia ewentualnego mutagennego i rakotwórczego działania składników wody zastosowano najwyższą dopuszczalną w teście Ames'a objętość badanej próby tj. 0,5 cm³. Zaś ekstrakty wody wprowadzano w DMSO w objętości 0,1 cm³.

4.2.3.2. Badania metodą Ames'a prób wody z rzeki Oławy.

Przed przystąpieniem do właściwych badań wchodzących w zakres testu Ames'a przeprowadzono, zgodnie z zaleceniem autora, kontrolę cech genetycznych testowych szczepów *Salmonella typhimurium* LT₂. /tabela 21/.

W następnej kolejności wykonano test Ames'a na wodzie z rzeki Oławy i stawu infiltracyjnego. Wyniki przedstawiono w tabeli 22. Jak widać, spośród badanych prób wody, podwyższoną dwukrotnie rewersję do prototrofii, świadczącą równocześnie o wyniku dodatnim, stwierdzono w przypadku wody rzeki Oławy w stosunku do szczepu *S. typhimurium* TA 98. Pozostałe próby dały wyniki negatywne.

W dwóch kolejnych seriach zastosowano wodę rzeki Oławy, pochodzącą z trzech wyznaczonych stanowisk badawczych, pobraną w maju 1981 r. /tabela 23 i 24/ i listopadzie 1981 r. /tabele 25 i 26/.

Tabela 21

Cechy genetyczne szczepów testowych *Salmonella typhimurium* LT₂ użytych do badań

Nr szczepu	Wymaganie na L-histydynę		Obecność rfa mutacji	Obecność R-czynnika	Obecność uvB delecji	Średni stopień spontanicznej rewersji
	histydyna + biotyna	biotyna				
TA 98	+++	---	+++/r · 1cm/	+	+	15,5 ± 2,3
TA 100	+++	---	+++/r 1 cm/	*	+	99,1 ± 2,1
TA 1535	+++	---	+++/r 1 cm/	-	+	13,0 ± 2,0
TA 1537	+++	---	+++/r 1 cm/	-	+	4,0 ± 2,0
TA 1538	+++	---	+++/r 1 cm/	-	+	99,3 ± 4,0
	+++ dobry wzrost	--- brak wzrostu	r- promień strefy zahamowania wzrostu	/+/- dobry wzrost w obecności ampicyliny /-/ brak wzrostu w obecności ampicyliny	/+/- brak wzrostu po naświetleniu promieniami UV	

Tabela 22 Ilość rewertantów do prototrofii *Salmonella typhimurium* LT₂ pod wpływem wody z Oławy, i stawu infiltracyjnego

Nr testowego szczepu <i>Salmonella typhimurium</i>	Średnia wartość rewersji		
	Kontrola spontanicznej rewersji	Woda z Oławy na wysokości hałdy żużla pochromowego	Woda ze stawu infiltracyjnego na wysokości hałdy żużlu pochromowego
TA 98	27,8 ± 7,0	73,4 ± 8,88	31,4 ± 5,8
TA 100	72,2 ± 10,3	85,4 ± 7,9	94,0 ± 8,4
TA 1535	6,8 ± 2,2	9,0 ± 0,4	2,4 ± 1,4
TA 1537	6,2 ± 2,3	5,75 ± 0,75	5,8 ± 1,4
TA 1538	7,4 ± 1,5	12,8 ± 1,8	8,8 ± 1,8

Tabela 23

Ilość rewertantów do prototrofii *Salmonella typhimurium* LT₂ pod wpływem wody rzeki Olawy /5.05.1981 r./

Numer testowego szczepu <i>Salmonella typhimurium</i>	Średnia wartość rewersji						
	Kontrola spontanicznej rewersji	Stanowisko 1		Stanowisko 2		Stanowisko 3	
		woda powierzchniowa	woda nadosadowa	woda powierzchniowa	woda nadosadowa	woda powierzchniowa	woda nadosadowa
TA 98	5,0±2,0	6,4±1,3	8,5±3,25	7,7±4,2	11,25±7,8	24,3±9,7	10,25±3,75
TA 100	23,25±4,25	44,75±2,25	35,7±16,9	31,0±12,6	31,5±8,75	19,0±5,0	29,3±4,36
TA 1535	2,6±1,9	4,2±1,64	4,2±2,24	1,8±1,04	3,5±0,5	5,5±1,75	3,2±0,96
TA 1537	2,6±0,8	1,2±1,04	3,5±1,25	3,5±0,75	2,6±1,12	2,4±1,16	2,8±1,36
TA 1538	3,2±2,6	16,4±4,8	4,0±4,0	7,33±1,76	9,0±4,8	5,5±4,0	15,0±10,0

Tabela 24

Ilość rewertantów do prototrofii *Salmonella typhimurium* LT₂ w obecności mieszaniny S-9 pod wpływem wody rzeki Oławy /5.05.1981/

Nr testowego szczepu <i>Salmonella typhimurium</i>	Średnia wartość rewersji						
	Kontrola spontanicznej rewersji	Stanowisko 1/ujęcie/		Stanowisko 2 /hałda/		Stanowisko 3/jaz/	
		woda powierzchniowa	woda nadosadowa	woda powierzchniowa	woda nadosadowa	woda powierzchniowa	woda nadosadowa
TA 98	47,75±8,0	45,0±12,0	60,3±5,1	65,6±2,46	80,5±4,25	61,0±6,0	236,6±31,4
TA 100	42,4±11,52	32,5±2,5	58,75±3,25	35,4±3,52	38,0±11,2	55,25±9,25	49,0±5,5
TA 1535	10,75±1,75	9,6±4,2	10,25±3,25	10,5±2,5	8,4±1,92	14,0±1,5	7,75±2,13
TA 1537	6,8±1,44	3,0±0,5	10,0±0,7	10,8±3,36	5,4±0,48	7,4±2,88	13,0±2,0
TA 1538	25,3±2,9	24,25±3,88	22,3±3,1	43,0±5,6	118,7±43,5	16,5±4,5	18,75±3,25

Tabela 25

Ilość rewertantów do prototrofii *Salmonella typhimurium* LT₂ pod wpływem wody rzeki Oławy /19.11.1981 r./

Nr testowego szczepu <i>Salmonella typhimurium</i>	Średnia wartość rewersji						
	Kontrola spontanicznej rewersji	Stanowisko 1		Stanowisko 2		Stanowisko 3	
		woda powierzchniowa	woda nadosadowa	woda powierzchniowa	woda nadosadowa	woda powierzchniowa	woda nadosadowa
TA 98	13,8±1,04	22,6±5,9	18,15±5,25	18,0±4,8	20,6±4,08	16,6±5,3	14,75±4,2
TA 100	128,4±5,04	176,8±25,8	206,0±24,5	123,2±23,04	157,2±10,16	158,0±4,5	169,2±7,04
TA 1537	10,2±1,44	13,4±3,32	12,0±3	15,2±3,44	16,6±0,88	8,2±2,32	7,2±2-64
TA 1538	6,5±2,5	9,0±1,2	9,25±1,62	10,6±1-52	10,0±3,0	6,75±1-25	5,5±3,25

Tabela 26

Ilość rewertantów do prototrofii *Salmonella typhimurium* LT₂ w obecności mieszaniny S-9 pod wpływem wody rzeki Oławy /10.11.1981/

Numer testowego szczepu <i>Salmonella typhimurium</i>	Średnie wartości rewersji						
	Kontrola spontanicznej rewersji	Stanowisko 1		Stanowisko 2		Stanowisko 3	
		woda powierzchniowa	woda nadosadowa	woda powierzchniowa	woda nadosadowa	woda powierzchniowa	woda nadosadowa
TA-98	59,0±14,6	41,6±9,9	52,4±11,04	77,75±21,25	52,6±16,08	52,25±35	54,5±18
TA 100	98,0±16,0	150,0±16,25	90,0±9,6	156,25±23,88	155,5±19,25	105,0±24,4	85,0±11,2
TA 1535	61,5±17,25	48,2±20,44	38,5±16,5	24,5±14,75	43,0±11,5	29,25±11,12	47,3±14,1
TA 1538	23,66±8,6	70,25±22,15	26,0±10,5	41,4±6,28	92,0±15,6	46,0±10,66	18,2±2,84

Stwierdzono, że woda powierzchniowa pobrana w maju 1981 r. dała wynik pozytywny na stanowisku 1 u szczepów *Salmonella typhimurium* TA 100 i TA 1538 oraz na stanowisku 2 u szczepu *S. typhimurium* TA 1538 i na stanowisku 3 w przypadku szczepów *S. typhimurium* TA 98 i TA 1538.

Również woda nadosadowa pobrana na stanowisku 2 i 3 dała odpowiedź świadcząca o obecności składników o charakterze mutagennym przy zastosowaniu szczepów *S. typhimurium* TA 98 i TA 1538. W celu stwierdzenia obecności związków wymagających metabolicznej aktywacji, wykonano test z zastosowaniem frakcji mikrosomalnej wątroby szczurów /tabela 24/. Okazało się, że woda nadosadowa indukowała co najmniej dwukrotnie wyższą od spontanicznej rewersji do prototrofii w przypadku stanowiska 2 u szczepu *S. typhimurium* TA 1538 i stanowiska 3 u *S. typhimurium* TA 98. Przy zastosowaniu wody powierzchniowej nie stwierdzono podobnego efektu.

Natomiast w teście Ames'a wykonanym na wodzie powierzchniowej i nadosadowej pobranej w listopadzie 1981 roku, stwierdzono w wielu przypadkach bardzo wyraźnie podwyższoną rewersję do prototrofii z zastosowanych szczepów *Salmonella typhimurium* LT₂ /tabela 25 i 26/. Otrzymane wyniki nie pozwalają wprawdzie jednoznacznie wypowiedzieć się na temat obecności w wodzie składników o potencjalnym mutagennym czy rakotwórczym działaniu, jednakże wskazują na istotną aktywność biologiczną badanej wody. Na podstawie wcześniej przedstawionych wyników można przypuszczać, iż w momencie poboru wody do badań, stężenie wielopierścieniowych

węglowodorów aromatycznych nie było dostatecznie wysokie do wywołania co najmniej dwukrotnie wyższej od spontanicznej rewersji do prototrofii.

Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że w wodzie rzeki Oławy znajdują się zanieczyszczenia chemiczne mające potencjalne działanie mutagenne i rakotwórcze. Wydaje się, iż test Ames'a, opracowany do określania mutagennego i rakotwórczego działania związków chemicznych, może być stosowany do bezpośredniego badania wód. Możliwość pominięcia takich zabiegów metodycznych jak ekstrakcja określonej grupy związków, umożliwia uwzględnienie w teście inkorporacji płytkowej badania pełnego spektrum zanieczyszczeń wody. W tak przeprowadzonym teście uwzględnia się ponadto synergistyczne bądź antagonistyczne oddziaływanie zanieczyszczeń.

4.2.3.3. Badania nad obecnością w cykloheksanowych ekstraktach wody rzeki Oławy składników o potencjalnym mutagennym i rakotwórczym działaniu.

W celu określenia rodzaju związków wywołujących wyniki dodatnie w rewersji do prototrofii auksotroficznych szczepów *Salmonella typhimurium* LT₂, przeprowadzono ekstrakcję cykloheksanem w kierunku wyeluwowania z wody wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych.

Tabela 27 przedstawia wyniki testu Ames'a wykonanego na ekstraktach wody rzecznej ze stanowiska 1. W przypadku

wody powierzchniowej uzyskano wynik dodatni rewersji szczepu *S. typhimurium* TA 98, natomiast podwyższone wartości rewersji zanotowano u szczepów *S. typhimurium* TA 100 i TA 1535. Ekstrakty wody nadosadowej wywołały u szczepu *S. typhimurium* TA 98 podwyższoną rewersję, jednak nie w takim stopniu, by można było w pełni uznać to za wynik dodatni.

Tabela 28 przedstawia wyniki testów na ekstraktach wody pobranej na stanowisku 2. Wyniki dodatnie zaobserwowano u szczepu *S. typhimurium* TA 98 na skutek działania ekstraktów wody nadosadowej. Natomiast ekstrakty wody powierzchniowej podwyższają rewersję szczepu *Salmonella typhimurium* TA 98, jednak nie na tyle, by można ją było zakwalifikować jako wynik pozytywny.

Ekstrakty wody pobranej na stanowisku 3 nie dawały pozytywnej odpowiedzi /tabela 29/.

Otrzymane pozytywne wyniki testów Ames'a z zastosowaniem cykloheksanowych ekstraktów wody rzeki Oławy na stanowisku 1 i 2 pozwalają sądzić, iż już w 100 cm³ wody znajdowała się wystarczająca ilość wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych do wywołania mutacji i co zostało potwierdzone, potencjalnego rakotwórczego działania.

Jakkolwiek nie we wszystkich przypadkach uzyskano wyniki pozytywne, jednakże ogólnie można stwierdzić, iż zanieczyszczenie wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi wody rzeki Oławy było bardzo wysokie, a wynikające z tego faktu konsekwencje mogą być bardzo poważne.

Tabela 27

Ilość rewertantów do prototrofii *Salmonella typhimurium* LT₂ w obecności mieszaniny S-9 pod wpływem ekstraktów wody rzeki Oławy na stanowisku 1.

Nr testowego szczepu <i>Salmonella typhimurium</i>	Średnia wartość rewersji								
	Kontrola spontanicznej rewersji	ekstrakt 100 cm ³ wody wody pow.	ekstrakt 50 cm ³ wody wody pow.	ekstrakt 25 cm ³ wody wody pow.	ekstrakt 12,5 cm ³ wody wody pow.	ekstrakt 100 cm ³ wody wody nadob.	ekstrakt 50 cm ³ wody wody nadob.	ekstrakt 25 cm ³ wody wody nadob.	ekstrakt 12,5 cm ³ wody wody nadob.
TA 98	62,75±5,75	95,0±22,5	138,5±17,5	119,0±11,2	111,75±10,12	102,8±7,3	114,6±9,2	116,0±2,4	122,0±24,8
TA 100	125,2±9,44	201,8±2,4	210,4±35,68	236,0±23,2	174,75±27,62	183,6±31,9	176,0±13	182,6±31,12	191,0±32,8
TA 1537	102,25±11,125	138,67±10,44	130,33±14,2	117,67±7,66	109,33±5,1	113,4±7,84	105,2±11,2	111,0±17,5	107,4±8,88
TA 1538	105,0±8,66	65,4±6,16	70,8±11,04	64,8±9,36	79,0±9,2	139,2±13,44	101,6±11,08	114,0±15	110,0±6,5

Tabela 28

Ilość rewertantów do prototrofii *Salmonella typhimurium* LT₂ w obecności mieszaniny S-9 pod wpływem ekstraktów wody rzeki Olawy na stanowisku 2

Nr testowego szczepu <i>Salmonella typhimurium</i>	Średnia wartość rewersji								
	Kontrola spontanicznej rewersji	Woda powierzchniowa				Woda nadosadowa			
		ekstrakt 100 cm ³ wody	ekstrakt 50 cm ³ wody	ekstrakt 25 cm ³ wody	ekstrakt 12,5 cm ³ wody	ekstrakt 100 cm ³ wody	ekstrakt 50 cm ³ wody	ekstrakt 25 cm ³ wody	ekstrakt 12,5 cm ³ wody
TA 98	62,75±5,75	114,8±18,64	66,0±21,5	52,5±5,36	65,0±13,6	129,25±10,25	106,6±4,22	111,5±16,5	94,5±3,75
TA 100	125,2±9,44	96,2±6,45	90,75±2,375	106,0±9,0	107,0±11,0	116,25±6,25	100,0±13,0	73,75±6,43	106,5±15,5
TA 1537	102,25±11,25	151,75±12,25	104,25±17,75	98,5±10,0	97,2±12,16	69,75±12,13	136,75±6,25	140,4±8,48	125,8±8,96
TA 1538	105,0±8,66	63,75±1,625	126,0±16,8	126,0±11,5	165±30,06	136,0±6,0	126,0±16,4	149,6±14,08	114,2±12,16

Woda rzeki Oławy ujmowana jest do celów wodociągowych, a zatem po procesach uzdatniania stanowi źródło wody pitnej dla miasta Wrocławia. Stosowany ciąg technologiczny obejmuje m.in. takie procesy jak chlorowanie i ozonowanie, które powinny usunąć z wody badane związki zanieczyszczające. Jednakże skuteczność chlorowania i ozonowania zależy od wielu czynników, do których należy m.in. ogólny stan zanieczyszczenia i zastosowana do niego odpowiednia dawka utleniaczy. Stan zagrożenia zdrowia ludności może wystąpić zwłaszcza w sytuacji awarii urządzeń uzdatniających. Może to pociągnąć za sobą nieodwracalne skutki, gdyż wywołanie zmian mutacyjnych prowadzących do transformacji nowotworowej nie zależy od czasu ekspozycji organizmu, a często wystarczy jedynie jednorazowy kontakt ze związkami inicjującymi ten proces.

Stąd też, konieczna jest ochrona wody powierzchniowej i stała jej kontrola w kierunku obecności WWA, przy jednoczesnym kontrolowaniu wody uzdatnionej. Ponadto należałoby wprowadzić badania biologicznej aktywności w kierunku transformacji nowotworowej pełnego spektrum zanieczyszczeń. Postulat ten można spełnić stosując test Ames'a wykonywany bezpośrednio na wodzie z pominięciem jej ekstrakcji.

Tabela 29.

Ilość rewertantów do prototrofii *Salmonella typhimurium* LT₂ w obecności mieszaniny S-9 pod wpływem ekstraktów wody rzeki Olawy na stanowisku 3.

Nr testowego szczepu <i>Salmonella typhimurium</i>	Średnia wartość rewersji								
	Kontrola spontanicznej rewersji	Woda powierzchniowa				Woda nadosadowa			
		ekstrakt 100 cm ³ wody	ekstrakt 50 cm ³ wody	ekstrakt 25 cm ³ wody	ekstrakt 12,5 cm ³ wody	ekstrakt 100 cm ³ wody	ekstrakt 50 cm ³ wody	ekstrakt 25 cm ³ wody	ekstrakt 12,5 cm ³ wody
TA 98	64,75±18,25	56,2±9,84	69,6±7,36	66,4±11,32	55,25±8,25	69,75±3,375	69,2±11,44	46,5±8,75	60,25±12,75
TA 100	129,17±25,83	132,8±18,56	118,0±9,5	157,4±9,36	128,4±12,48	162,0±15,0	125,25±46,75	133,7±13,75	160,4±10,72
TA 1537	96,4±13,12	58,75±3,375	65,5±8,25	73,33±14,443	49,8±4,64	92,4±21,84	91,4±12,8	62,2±11,84	54,0±6,4
TA 1538	85,6±6,88	51,8±6,56	76,2±6,96	65,5±2,875	70,0±6,0	63,0±4,0	61,8±7,4	66,8±3,44	49,0±6,0

4.2.4. Badania nad interakcją naturalnej mikroflory wody a wybranymi wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi.

Wzajemne oddziaływanie wielopierścieniowych węglowodórów aromatycznych i mikroflory bakteryjnej polega z jednej strony na inicjowaniu przez WWA zmienności u bakterii, a z drugiej strony na biochemicznym rozkładzie WWA przez bakterie.

Zmienność - jak przewidywano - dotyczyła różnej wrażliwości mikroflory naturalnej na określone stężenie tego samego węglowodoru, jak również na obecność innych WWA.

To różnicowanie mikroflory miało w warunkach naturalnych co najmniej dwojakiego rodzaju skutki, a mianowicie - obecne w wodzie WWA były prawdopodobnie czynnikiem selekcyjującym naturalny skład mikroflory przez eliminowanie lub ograniczanie rozwoju form wrażliwych na ich działanie, - selekcja biocenozy wywierała z kolei swój wpływ na proces samooczyszczania wody w rzece.

Dla potwierdzenia tych przypuszczeń przeprowadzono badania nad wrażliwością naturalnej mikroflory wody rzeki Oławy na badane WWA, w cyklu rocznym. Zebrany materiał posłużył następnie do wyprowadzenia czystych kultur bakterii wrażliwych i opornych, którymi posługiwano się w dalszych badaniach.

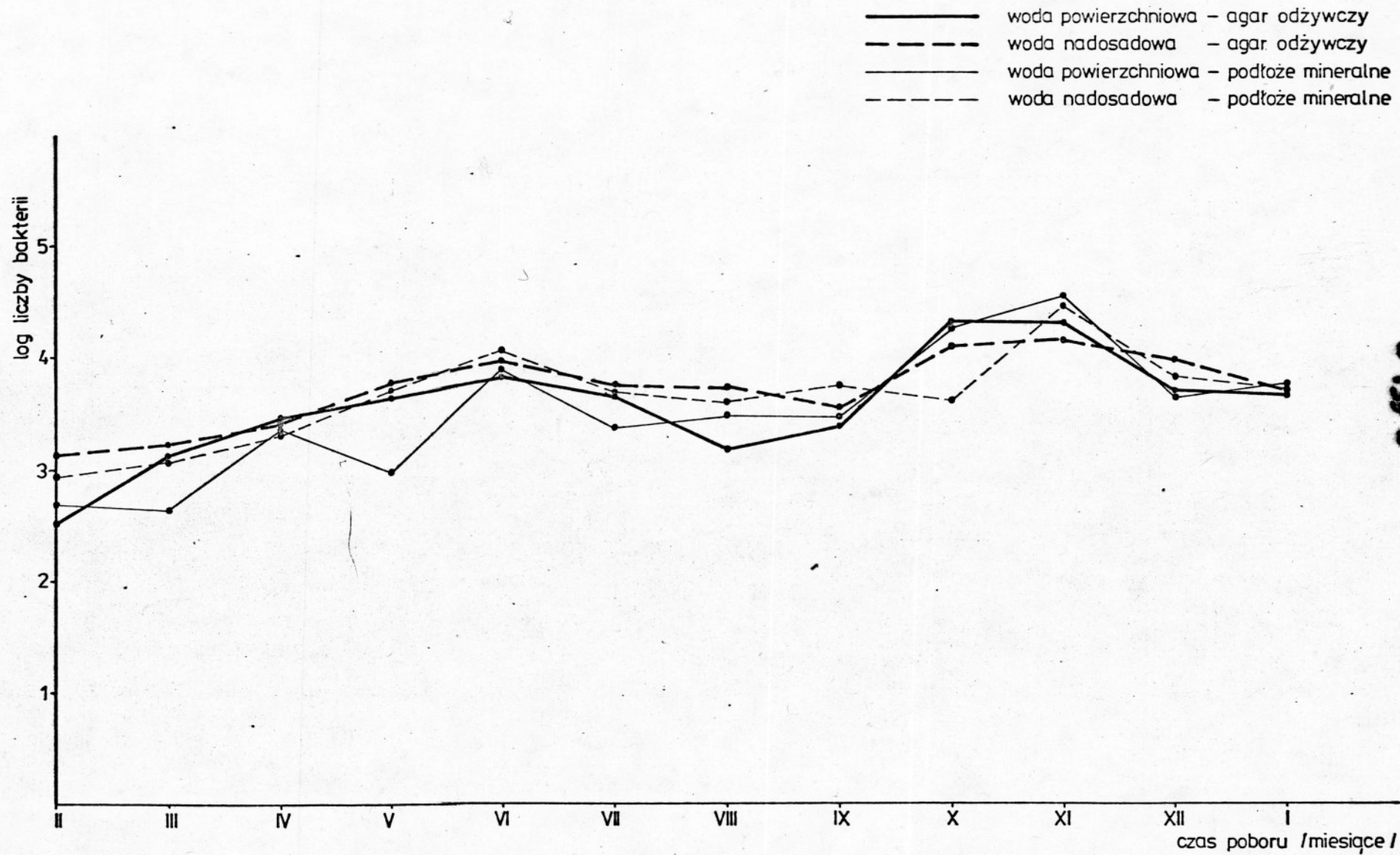
4.2.4.1. Badania nad różną wrażliwością mikroflory rzeki Oławy na wybrane wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne w cyklu rocznym.

Możliwość wzrostu naturalnej mikroflory wody powierzchniowej i nadosadowej w obecności wzrastających stężeń benzo/a/pirenu, antracenu, fluorantenu, acenaftenu i naftalenu, a także wykorzystywanie ich jako jedynych źródeł węgla i energii jest dowodem oporności drobnoustrojów na ich szkodliwe działanie oraz posiadania odpowiednich enzymów, dzięki którym możliwe jest wykorzystanie WWA jako substratów.

Na podstawie przeprowadzonych badań ustalono, iż za bakterie odporne na działanie WWA można uważać te, które mają zdolność wzrostu wobec stężeń benzo/a/pirenu, antracenu, fluorantenu, acenaftenu i naftalenu stosowanych w stężeniach przekraczających ich naturalną rozpuszczalność w wodzie /tabela 16/.

W badaniach zastosowano dwa podłoża mikrobiologiczne - podłoże agarowe i podłoże mineralne.

Ogólna liczba bakterii zarówno w wodzie powierzchniowej jak i nadosadowej ulegała w cyklu rocznym dość znacznym wahaniom /rys. 17/. Najmniejszą liczebność mikroflory w wodzie powierzchniowej na podłożu agarowym zaobserwowano w lutym /320 kom/cm³/, a na podłożu mineralnym z glukozą w lutym i w marcu odpowiednio 496 i 440 kom/cm³. Najwyższe jej wartości wystąpiły w listopadzie 21 850 kom/cm³ /na podłożu agarowym/ i 35840 kom/cm³ /na podłożu



Rys.17. Ilość bakterii w wodzie rzeki Otawy w cyklu rocznym.

mineralnym z glukozą/. Średnia liczba bakterii w cyklu rocznym nie wykazywała znaczniejszych zależności od stosowanego podłoża i wynosiła dla podłoża agarowego 6482 kom/cm³ i 6888 kom/cm³ dla podłoża mineralnego /tabela 30 i 31/. Podobnie w wodzie nadosadowej otrzymano zbliżone wartości średniej ogólnej liczby bakterii 6537 kom/cm³ na podłożu agarowym i 6688 kom/cm³ na podłożu mineralnym /tabela 38 i 39/. Rozrzut liczby bakterii w 1 cm³ w cyklu rocznym był dość znaczny, a zaobserwowane minimalne i maksymalne wartości wystąpiły w tych samych miesiącach roku, analogicznie jak w wodzie powierzchniowej /tabela 30 i 31/. Ponadto stwierdzono nieznacznie więcej komórek bakteryjnych wyrastających na podłożu mineralnym z glukozą w stosunku do ilości uzyskanej na agarze odżywcym, wynoszący procentowo dla wody powierzchniowej 106,2%, a dla wody nadosadowej 102,3% /tabela 32/.

Zarówno liczebność bakterii jak i zakres wahań wskazują na pojawiające się w rzece okresy znacznego zanieczyszczenia bakteriologicznego będące zapewne wynikiem zanieczyszczenia wód związkami organicznymi pochodzenia ściekowego i spływów powierzchniowych, jak i okresy wskazujące na przypuszczalne zatrucia /320 kom/cm³ czy 440 kom/cm³/. Ilość bakterii mających zdolność wzrostu w obecności wzrastających stężeń benzo/a/pirenu ulegała znacznym wahaniom w cyklu rocznym /rys. 18/. Niewielkie ilości tych bakterii w stosunku do ogólnej liczby bakterii psychrofilnych występujących w wodzie powierzchniowej i nadosadowej, stwierdzono w lutym, kwietniu i czerwcu.

Tabela 30

Wrażliwość naturalnej mikroflory wody rzeki Olawy na obecność w ugarzo odżywozym
wzrostających stężeń badanych WWA

Badany węzłowodór i zakres jego stężeń [mg/dm ³]	Woda powierzchniowa			Woda nadsadowa		
	Średnia ogólna liczba bakterii [kom/cm ³]	Zakres wartości [kom/cm ³]	Wzrost w stosunku do kontroli [%]	Średnia ogólna liczba bakterii [kom/cm ³]	Zakres wartości [kom/cm ³]	Wzrost stosunku do kontroli [%]
Kontrola	6482	320-21850	-	6537	1328-14400	-
B/a/P 0,015	14819	198-133200	228,6	8879	122-3880	135,8
0,03	13838	360-129200	213,5	6766	240-37440	
0,06	10384	104-80400	160,2	6395	68-31040	97,8
0,12	10899	132-100400	168,1	6376	78-21680	97,5
0,24	14245	94-136400	219,7	9260	60-47000	141,7
0,48	7654	150-60400	118,1	1960	150-4040	30,1
A 0,0162	8284	760-41680	127,8	12584	110-54400	192,5
0,0375	6045	720-35920	93,2	6639	60-36800	101,6
0,075	7019	300-32000	108,3	6881	210-33600	105,3
0,15	5932	510-23120	80,7	4342	350-15160	66,8
0,3	5199	560-18800	80,2	4469	160-18360	68,4
0,6	2715	420-6200	41,8	1925	210-5120	29,4
F1 0,0662	11388	180-80000	175,7	5496	530-18560	84,1
0,1325	5299	90-15280	81,7	7085	400-32960	108,4
0,265	8922	30-39200	137,6	7949	400-25600	121,6
0,53	4919	110-14480	75,9	5679	400-13280	86,8
1,06	7264	0-22400	112,1	7911	140-19120	121,0
2,12	4440	10-10560	68,5	3336	210-9680	51,0
Ac 0,075	8006	752-46880	123,5	7581	390-23120	116,0
0,15	8292	700-30640	127,9	9442	310-26880	144,4
0,3	7291	1200-19200	112,5	8925	430-29580	136,5
0,6	7033	410-30160	108,5	6305	280-19440	104,1
1,2	10099	750-35280	155,8	8128	140-30480	124,3
2,4	4031	250-22800	62,2	3094	40-9280	47,3
N 10	6246	130-39920	90,4	3429	250-12920	52,5
20	5887	180-37440	90,8	4389	380-16640	67,1
40	6435	260-33200	99,3	4626	410-16800	70,7
80	4283	30-42500	66,1	1372	110-3400	21,0
160	446	30-1260	6,9	823	20-3680	12,6
320	157	0-490	2,4	224	0-1010	3,4

B/a/P - benzo/a/piron, A - antracen, F1 - fluoranton

Ac - acetonafen, N - naftalen

Tabela 31

Zdolność wzrostu naturalnej mikroflory wody rzeki Olawy wobec badanych KWA jako jedynych źródeł węgla i energii

Badany wę- glowodór i za- kres jego stężenia	Mikroflora wody powierzchniowej			Mikroflora wody nadosadowej		
	Średnia o- gólna licz- ba bakterii	Zakres wartości	Wzrost w stosunku do kontro- li	Średnia o- gólna liczba bakterii	Zakres wartości	Wzrost stosunku do kontro- li
[mg/dm ³]	[kom/dm ³]	[kom/cm ³]	[%]	[kom/cm ³]	[kom/cm ³]	[%]
kontrola	6888	440-35840	--	6688	880-30000	-
B/a/P 0,015	2498	40-7800	36,3	4304	20-14240	64,4
0,03	4987	10-32600	72,4	5423	0-22400	81,1
0,06	4229	42-21600	61,4	4929	12-24160	73,7
0,12	4901	40-40000	71,2	6199	6-24000	92,7
0,24	5107	0-19200	74,1	4915	0-22000	73,5
0,48	2203	30-14400	31,9	1997	0-12000	29,8
A 0,0162	11498	0-93000	166,9	5119	20-30040	76,5
0,0375	7315	70-24000	106,2	3488	10-13000	52,2
0,075	4708	10-9300	68,4	4559	0-11600	68,2
0,15	5209	180-13440	75,6	6109	10-14300	91,3
0,3	5217	10-12800	75,7	6786	30-24640	101,5
0,6	3001	0-16000	43,5	2496	0-3400	37,5
F1 0,0662	4294	40-14080	62,3	6987	0-37760	104,5
0,1325	5167	10-18040	75,0	6911	110-18000	103,3
0,265	11412	0-79400	165,7	6633	30-17840	99,2
0,53	4911	30-13500	71,3	7023	70-25800	105,0
1,06	7750	10-34400	125,5	8573	0-30720	128,2
2,12	2854	0-11600	41,4	3156	80-9200	47,2
Ac 0,075	6480	160-19860	94,1	5599	20-13400	83,7
0,15	6004	370-32000	87,2	8586	50-21600	128,4
0,3	5153	50-12500	74,8	7726	10-23200	115,5
0,6	5070	100-24000	73,6	7204	50-26400	107,7
1,2	6373	60-28000	92,5	10578	10-34240	158,2
2,4	3321	100-12000	48,2	3337	20-12400	49,9
N 10	4229	20-22400	61,4	3647	50-16200	54,5
20	2616	40-10400	38,0	4722	40-18320	70,6
40	4322	20-32000	62,8	3196	120-14400	47,8
80	956	30-3850	13,9	1768	30-7280	26,4
160	408	0-1200	5,9	729	0-3860	10,9
320	189	0-750	2,7	129	0-480	1,8

B/a/P, - benz/a/piren, A - antracen, F1 - fluoranten

Ac - acenafion, N - naftalen

Tabela 32,

Zdolność do wzrostu naturalnej mikroflory wody rzeki Olawy wobec badanych WWA jako jedynych źródeł węgla i energii w stosunku do wzrostu na agarze odżywczym wzbogaconym wzrastającymi stężeniami WWA.

Numer stężenia badanych WWA	Stosunek wzrostu na podłożu mineralnym do wzrostu na podłożu agarowym [%]									
	benzo/a/piren		antracen		fluoranten		acenaften		naftalen	
	woda powierzchni.	woda nadosadowa	woda powierzchni.	woda nadosadowa	woda powierzchni.	woda nadosadowa	woda powierzchni.	woda nadosadowa	woda powierzchni.	woda nadosadowa
K	106,2	102,3	106,2	102,3	106,2	102,3	106,2	102,6	106,2	102,3
1	16,8	48,5	138,8	40,7	37,7	127,1	80,9	73,8	67,7	106,4
2	36,0	80,1	121,0	52,5	97,5	97,5	72,4	90,9	44,4	107,6
3	30,6	77,0	67,1	66,3	127,9	83,4	70,7	86,5	67,2	69,1
4	44,9	97,2	87,8	140,7	99,8	123,6	72,0	105,9	22,3	128,8
5	35,8	53,1	100,3	151,8	106,7	108,3	63,1	130,1	91,5	88,6
6	28,8	101,4	110,5	129,6	64,3	94,6	82,3	107,9	120,4	53,6
Stężenia badanych WWA [mg/dm ³]	1-0,015; 3-0,06; 5-0,24;	2-0,03; 4-0,12; 6-0,48	1-0,0162; 3-0,075; 5-0,3;	2-0,0375; 4-0,15; 6-0,6;	1-0,0662; 3-0,265; 5-1,06;	2-0,1325; 4-0,53; 6-2,12;	1-0,075; 3-0,3; 5-1,2;	2-0,15; 4-0,6; 6-2,4;	1-10; 3-40; 5-160;	2-20; 4-80; 6-320;

Maksymalny udział omawianych bakterii zaobserwowano w październiku i listopadzie. Miesiące te pokrywały się z wynikami otrzymanymi na podłożu nie zawierającym badanego związku.

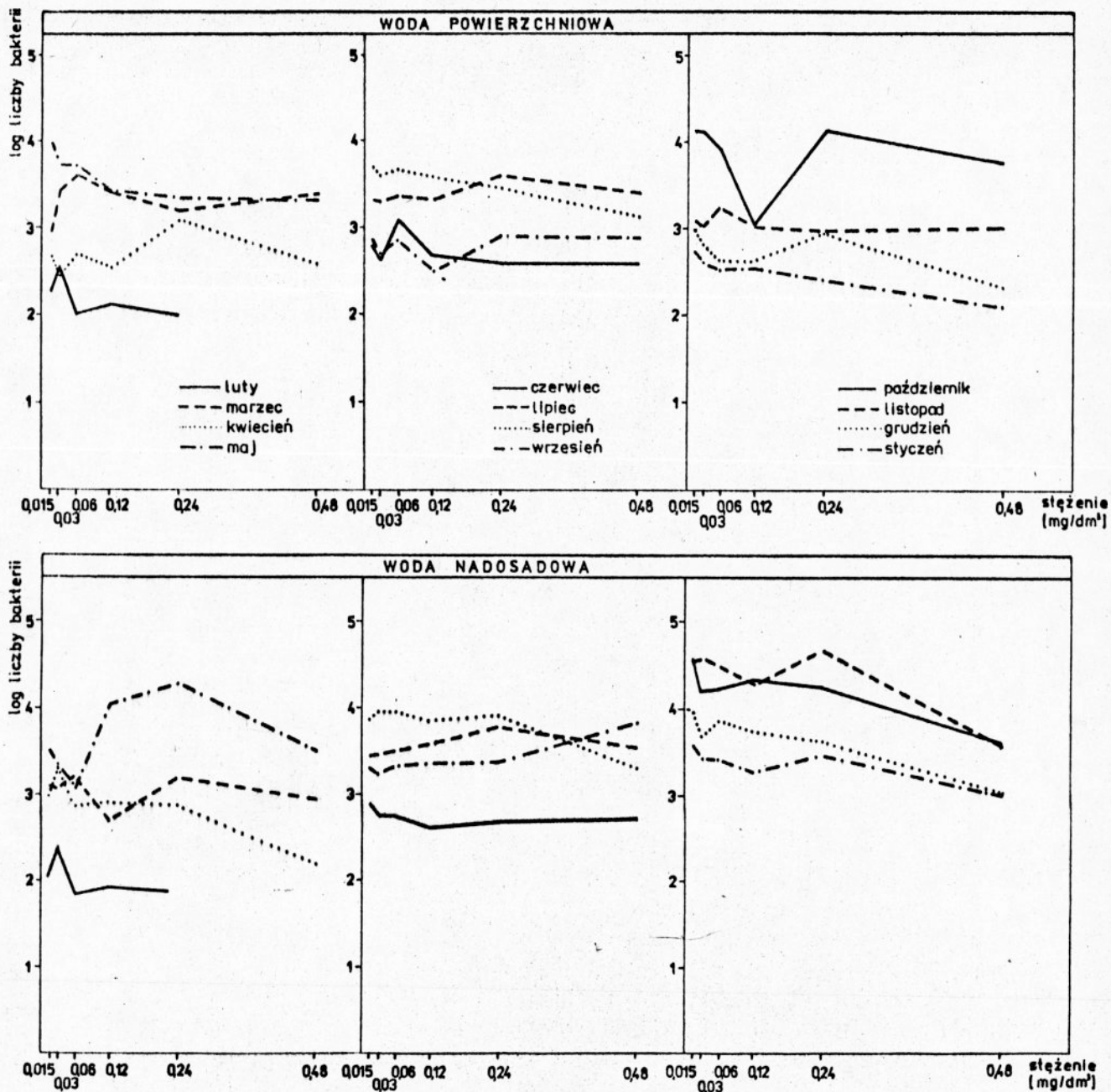
Rozpatrując zagadnienie wrażliwości naturalnej mikroflory na benzo/a/piren porównano średnie wartości ogólnej liczby bakterii psychrofilnych w cyklu rocznym z średnią liczbą bakterii wyrastających na agarze odżywczym zawierającym wzrastające stężenia benzo/a/pirenu /tabela 30/.

Otrzymano wyniki wskazujące, iż na odżywczym agarze, zawierającym benzo/a/piren z wody powierzchniowej wyrastało procentowo więcej bakterii niż na podłożu standardowym.

Ilość ta malała wraz ze wzrostem stężenia.

Można zatem przypuszczać, iż zachodziło w tym przypadku zjawisko pobudzania do wzrostu przez benzo/a/piren szczepów bakterii, które w normalnych warunkach nie wyrastają na agarze odżywczym. Podobne zjawisko obserwowano w stosunku do mikroflory przydennej, jednakże jedynie w wyniku działania najniższych stężeń badanego związku. Wyższe stężenia wyraźnie hamowały wzrost populacji bakterii.

A zatem wrażliwość naturalnej mikroflory wodnej i jej reakcje na stosowany związek zależały od jego stężenia. Również ilość bakterii mających zdolność wykorzystywania benzo/a/pirenu jako jedyne źródła węgla i energii ulegała w cyklu rocznym znacznym wahaniom /rys. 19/, które występowały w zgodności czasowej z wynikami uzyskanymi z zastosowaniem agaru odżywczego, zawierającego wzrastające

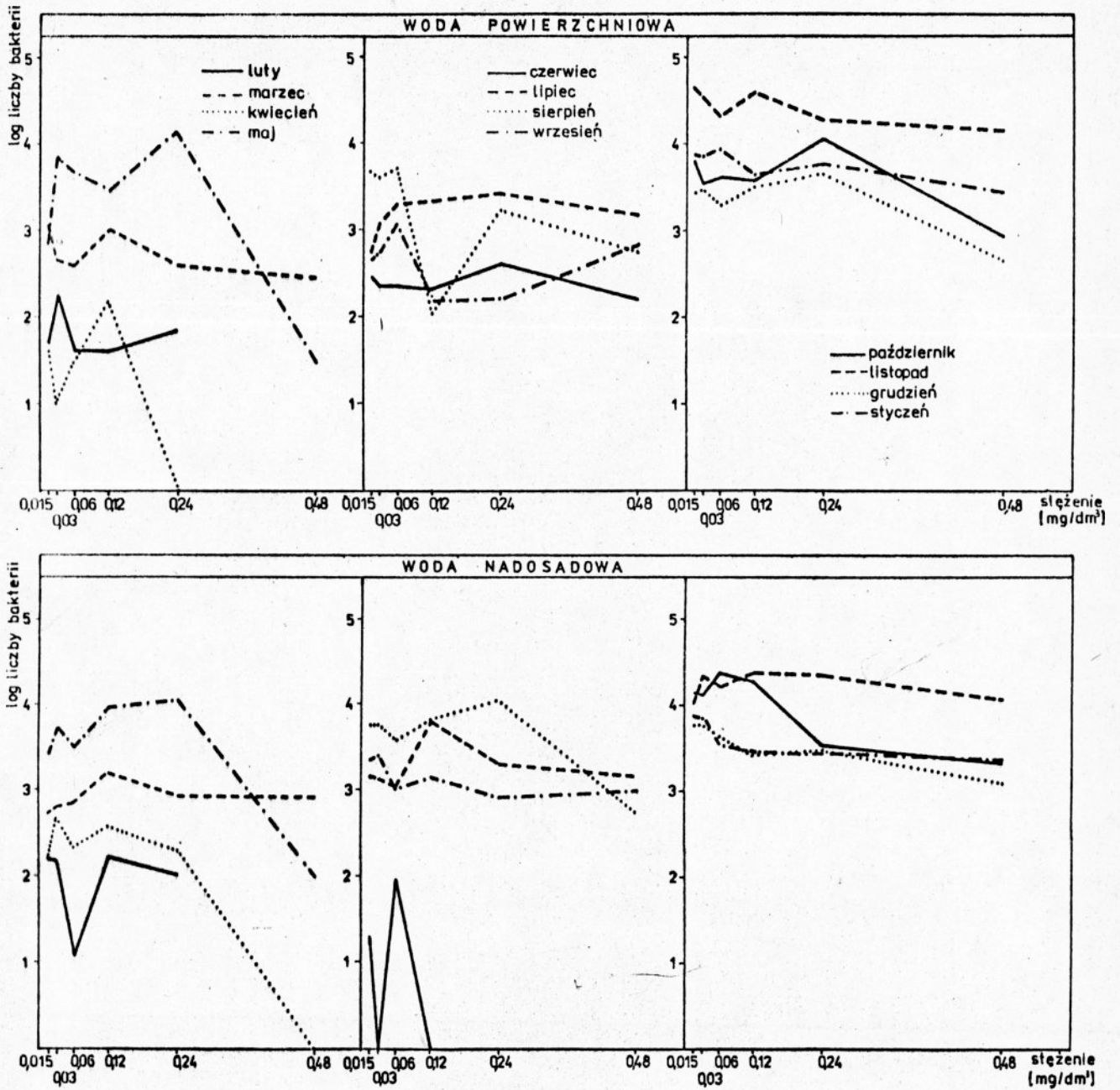


Rys. 18. Ilość bakterii rosnących wobec gradientu stężeń benzo(a)pirenu występujących w wodzie rzeki Oławy w cyklu rocznym

stężenia badanego związku.

Rozpatrując zagadnienie możliwości wykorzystywania badanego węglowodoru jako substratu energetycznego przez bakterie wodne, porównano średnią liczbę bakterii psychrofilnych wyrastających na podłożu mineralnym z glukozą do średniej liczby bakterii mających odpowiednie wyposażenie enzymatyczne do uzyskiwania energii z rozkładu benzo/a/pirenu /tabela 31/. Otrzymane wyniki wskazują, iż na podłożu mineralnym zawierającym benzo/a/piren we wzrastających stężeniach jako jedyne źródło węgla i energii wyrastało mniej bakterii niż na podłożu z glukozą. Dowodzi to, iż tylko pewien procent bakterii ma odpowiednie wyposażenie enzymatyczne, pozwalające na wykorzystywanie benzo/a/pirenu jako substratu /tabela 31/. Ponadto w tych warunkach hamujący wpływ stosowanego najwyższego stężenia /0,48 mg/dm³/ benzo/a/pirenu był znacznie wyraźniejszy, a więc jego selekcyjonujące działanie w tych warunkach było znacznie dalej posunięte.

Można zatem stwierdzić, że benzo/a/piren wpływał na naturalną mikroflorę wody rzeki Oławy w cyklu rocznym w dwojaki sposób. Z jednej strony w stosowanych niższych stężeniach pobudzał rozwój bakterii w obecności bogatego w substancje odżywcze podłoża hodowlanego, co odnosiło się głównie do mikroflory wody powierzchniowej, z drugiej strony obserwowano znaczny udział procentowy bakterii wykorzystujących go jako jedyne źródło węgla i energii. Wyraźne selekcyjonujące działanie najwyższego stosowanego stężenia benzo/a/pirenu w stosunku do mikroflory dotyczyło



Rys. 19. Ilość bakterii wykorzystujących benzo(a)piren jako źródło węgla energii występujących w wodzie rzeki Otawy w cyklu rocznym

zarówno bakterii rosnących wobec badanego związku, jak również mających zdolność wykorzystywania go jako jedyne źródła węgla i energii /tabela 32/.

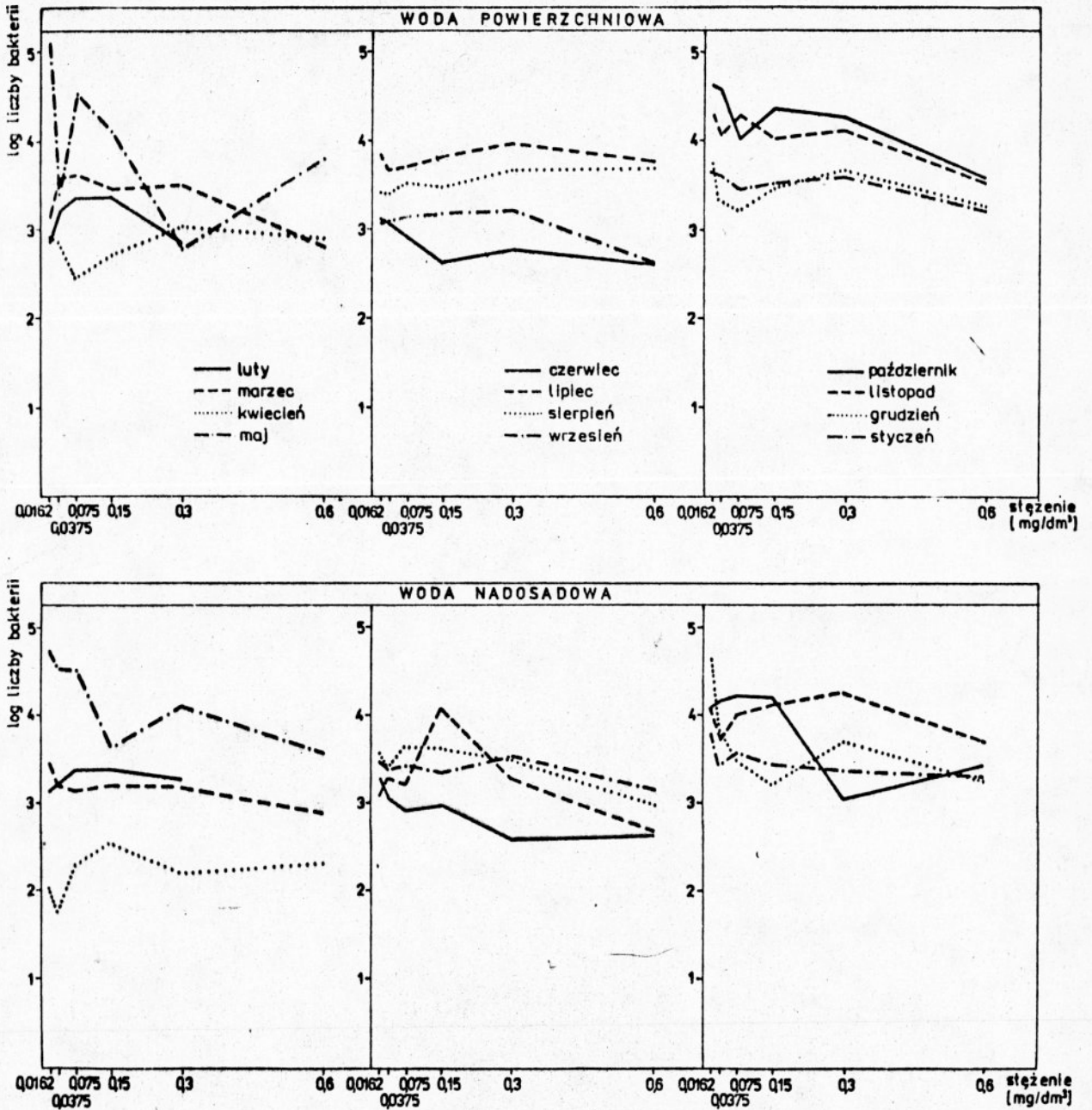
Również ilość bakterii mających zdolność wzrostu w obecności wzrastających stężeń antracenu ulegała dość znacznym wahaniom w cyklu badań /rys. 20/. Stosunkowo niewielkie ilości tych bakterii w populacji mikroflory wody powierzchniowej zaobserwowano w kwietniu, czerwcu, wrześniu i listopadzie, grudniu i styczniu, zaś w wodzie nadosadowej w lutym, marcu i maju.

Podobnie jak benzo/a/piren, antraceni w zastosowanych niskich stężeniach pobudzały do wzrostu bakterie, które nie rozwijały się w agarze odżywczym nie zawierającym badanego związku /tabela 30/, zaś zastosowane najwyższe stężenie /0,6 mg/dm³/ wywierało znaczny hamujący wpływ.

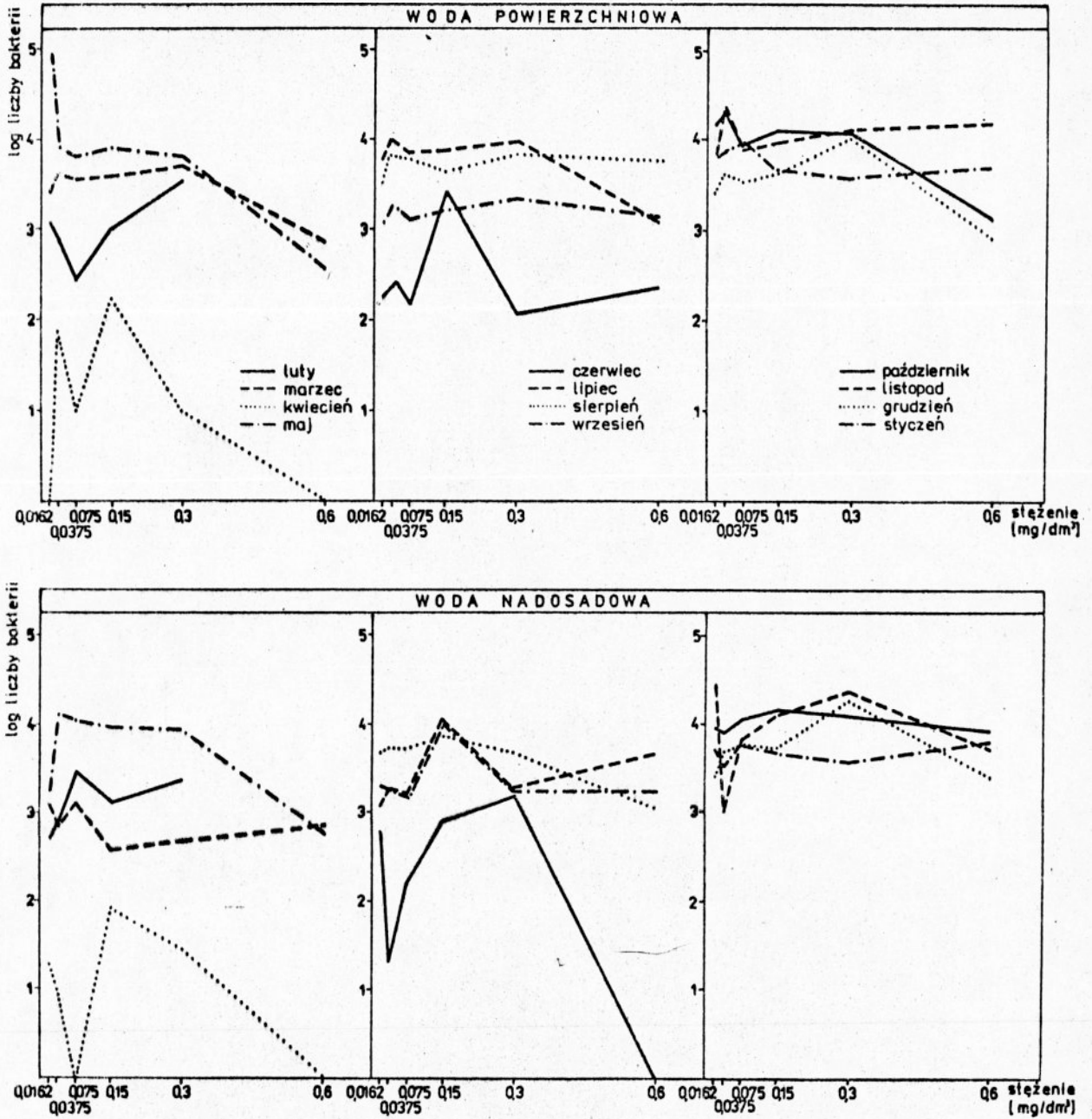
Rozrzut ilościowy w rocznym cyklu, bakterii mających zdolność do wykorzystywania antracenu jako substratu pokarmowego, pokrywał się w czasie z wahaniami ilościowymi bakterii wyrastających na bogatym podłożu zawierającym wzrastające stężenia badanego związku /rys. 21/.

Ilość bakterii mających zdolność wykorzystywania antracenu jako jedyne źródła węgla i energii /tabela 31/, w stosunku do wyrastających na podłożu z glukozą, była wysoka w cyklu badań, przy jednoczesnym hamującym wpływie zastosowanego najwyższego stężenia.

Dowodzi to, iż znaczna ilość bakterii ma odpowiednie wyposażenie enzymatyczne pozwalające na uzyskiwanie energii z badanego związku. Wskazują na to również wyniki porównania



Rys. 20. Ilość bakterii rosnących wobec gradientu stężeń antracenu występujących w wodzie rzeki Olawy w cyklu rocznym

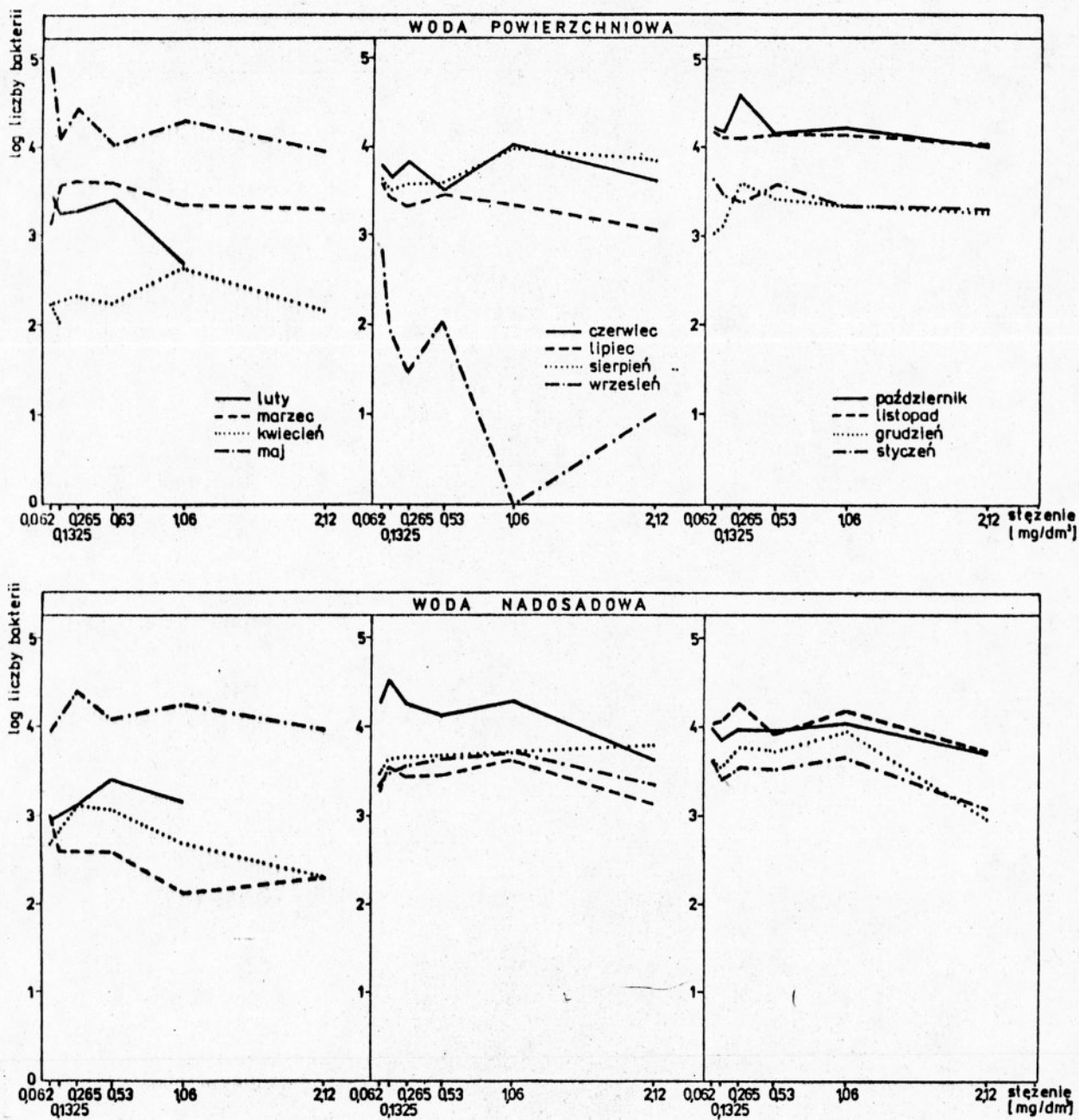


Rys. 21. Ilość bakterii wykorzystujących antraczen jako źródło węgla i energii występujący w wodzie rzeki Oławy w cyklu rocznym

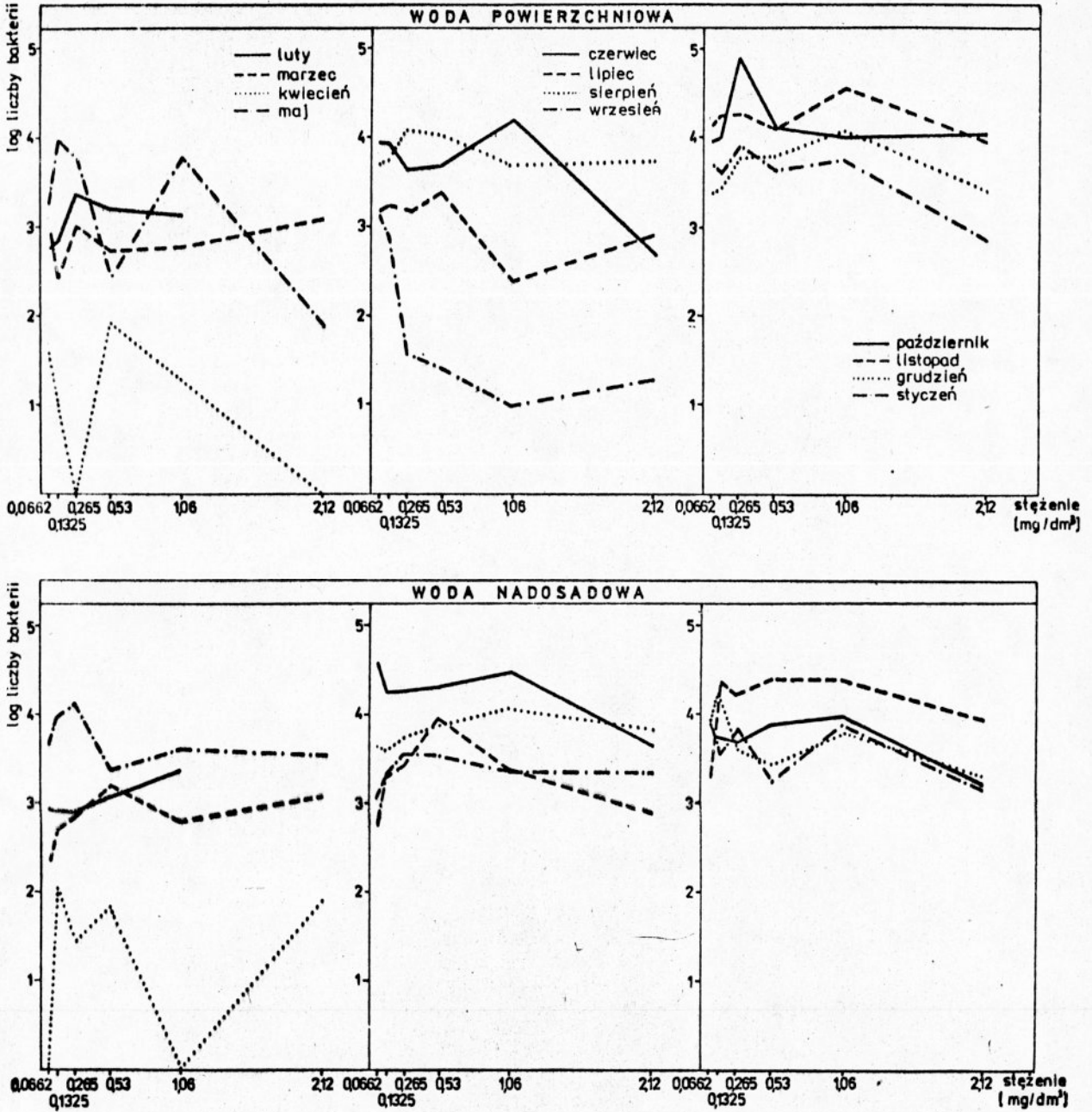
średniej liczby bakterii wyrastających wobec wzrastających stężeń antracenu stosowanego jako substrat energetyczny, do średniej wzrostu bakterii wyrastających wobec wzrastającego gradientu stężeń związku w obecności bogatego podłoża /tabela 32/. Uzyskane wyniki wskazują na bardzo dużą oporność naturalnej mikroflory wody rzeki Oławy na antracen, związaną zapewne ze stwierdzoną w wodzie znaczną jego koncentracją. Niemniej zastosowane najwyższe stężenia działały hamująco na wzrost niektórych bakterii, a więc można również w tym przypadku mówić o selekcyjnym wpływie antracenu na naturalną mikroflorę wody.

Podobnie ilość bakterii mających zdolność wzrostu w obecności wzrastających stężeń fluorantenu była zmienna w cyklu rocznym /rys. 22/. Najniższą ilość bakterii tych zanotowano, zarówno w wodzie powierzchniowej jak i nadosadowej, w kwietniu, podczas gdy największa ich ilość w wodzie powierzchniowej, wystąpiła w maju 80.000 kom/cm³, a w wodzie nadosadowej w czerwcu 19.120 kom/cm³.

Z porównania średniej liczebności bakterii wyrastających wobec wzrastających stężeń fluorantenu w stosunku do średniej liczby bakterii psychrofilnych określanej na agarze odżywczym, iż fluoranten w stosowanych niskich stężeniach wpływał bodźcowo na rozwój form, które nie mają zdolności wzrostu na standardowym podłożu /tabela 30/. Natomiast najwyższe stosowane stężenie związku /2,12 mg/dm³/ w niewielkim stopniu wpływa hamująco, co dowodzi znacznej oporności mikroflory naturalnej na fluoranten.



Rys. 22. Ilość bakterii rosnących wobec gradientu stężeń fluorantenu występujących w wodzie rzeki Oławy w cyklu rocznym

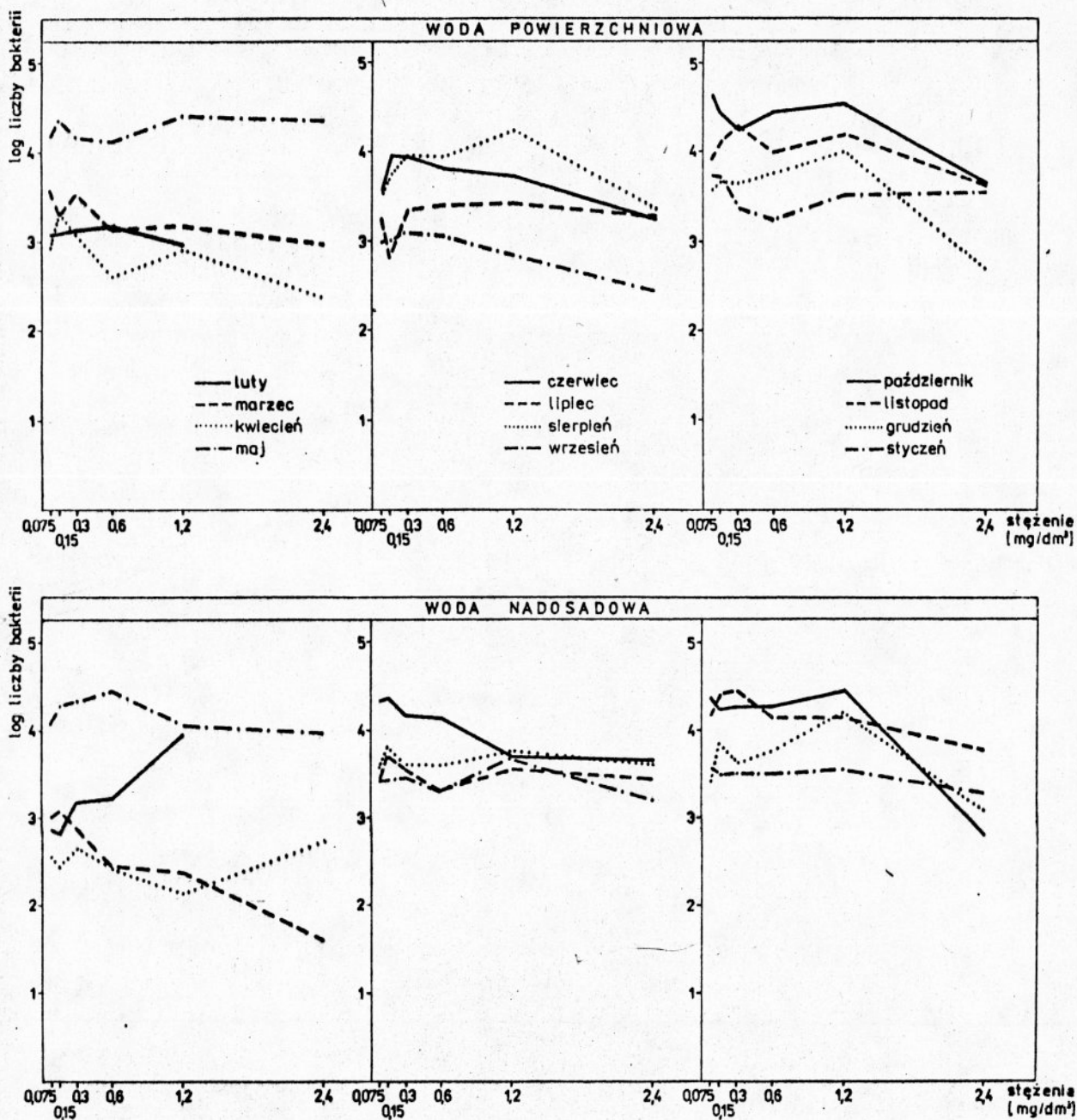


Rys. 23. Ilość bakterii wykorzystujących fluoranten jako źródło węgla i energii występujących w wodzie rzeki Olawy w cyklu rocznym

Na podłożu mineralnym zawierającym fluoranten jako jedyne źródło węgla i energii obserwowano w cyklu rocznym bardzo zróżnicowany wzrost bakterii /rys. 23/. Jak wynika z danych przedstawionych w tabeli 39, fluoranten jest dostępnym substratem pokarmowym dla bardzo licznych bakterii. Jednakże najwyższe stosowane stężenie /2,12 mg/dm³/ wykorzystywane było przez procentowo niewiele szczepów bakterii. Potwierdzają to również wyniki uzyskane z porównania wzrostu bakterii na obu stosowanych podłożach zawierających badany związek /tabela 32/. Obserwowano wyższy procentowy wzrost bakterii na podłożu zawierającym fluorantem jako jedyne źródło węgla i energii, przy hamującym wpływie najwyższego stężenia.

Acenaften w stosowanych stężeniach, podobnie jak omówione już węglowodory wywierał wyraźny wpływ na naturalną mikroflorę wody rzeki Oławy w całym rocznym cyklu badań /rys. 24/. Najmniejszą liczbę bakterii zarówno w wodzie powierzchniowej jak i nadosadowej zaobserwowano w kwietniu. Najliczniejszą mikroflorę, mającą zdolność wzrostu wobec wznoszących się stężeń acenaftenu zaobserwowano w wodzie powierzchniowej w maju i październiku. zaś w nadosadowej w maju, czerwcu, październiku i listopadzie.

Acenaften działał silnie bodźcowo na naturalną mikroflorę wody powierzchniowej i nadosadowej, pobudzając do wzrostu bakterie, które nie wyrastały w normalnych warunkach na podłożu agarowym /tabela 30/. Wykazano hamujące działanie jedynie najwyższego stosowanego stężenia tego węglowodoru /2,4 mg/dm³/.

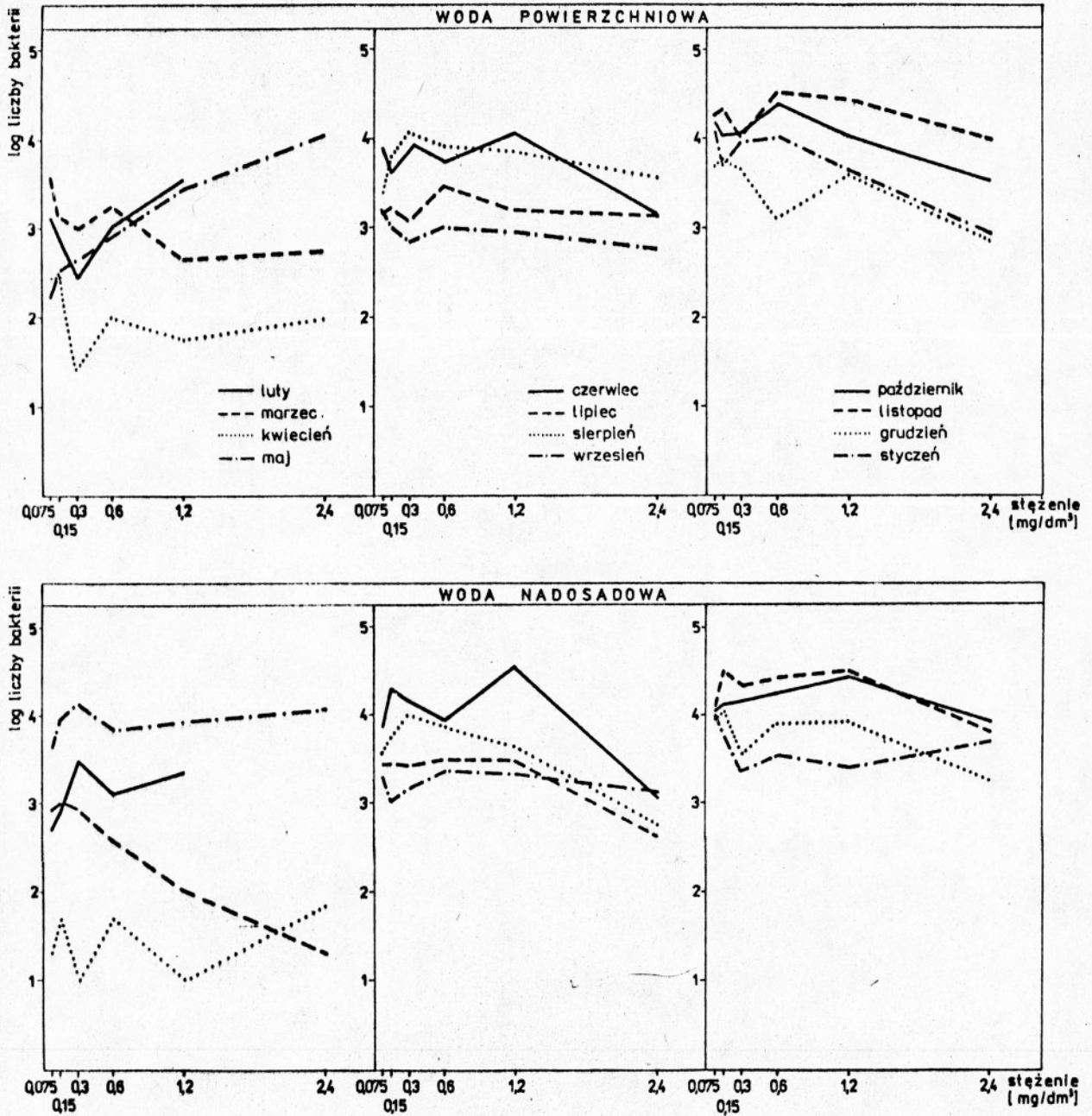


Rys. 24. Ilość bakterii rosnących wobec gradientu stężeń acenaftalenu występujących w wodzie rzeki Oławy w cyklu rocznym

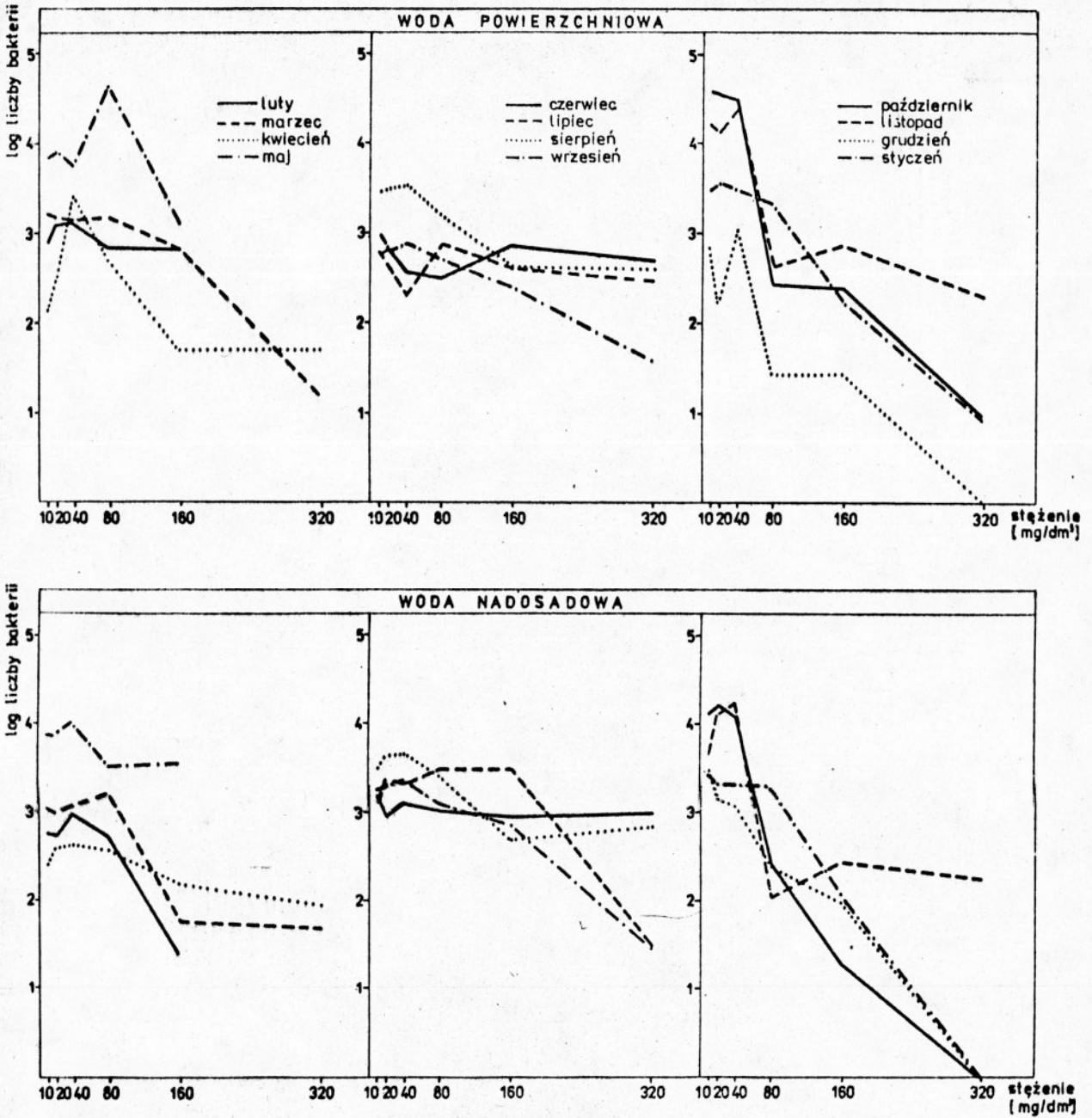
Podobnie na podłożu mineralnym zawierającym acenaf-
ten jako jedyne źródło węgla i energii /rys. 25/najmniej
bakterii zaobserwowano w kwietniu /10 kom/cm³/ w obu bada-
nych próbach wody, a najwięcej w czerwcu /34240 kom/cm³/
/rys. 25/. Procentowy udział mikroflory mającej zdolność
wykorzystywania acenaftenu do procesów metabolicznych był
wysoki, zwłaszcza w wodzie nadosadowej. I podobnie w tym
przypadku z hamującym działaniem charakteryzowało się
jedynie najwyższe zastosowane stężenie /tabela 32/.
Natomiast porównując średnie ilości bakterii rosnących wobec
wzrastających stężeń acenaftenu jako substratu energetycz-
nego do średniej ich liczby stwierdzonej na podłożu aga-
rowym z badanym związkami można wnioskować, iż zwłaszcza
w wodzie nadosadowej mikroflora w znacznym procencie po-
siada zdolność wykorzystywania badanego związku jako jedyne-
go źródła węgla i energii /tabela 32/.

Znaczna oporność naturalnej mikroflory wody rzeki
Oławy na acenaf-ten w stosowanych stężeniach, a także zdol-
ność do wykorzystywania go jako substratu energetycznego
pozostaje zapewne w związku z intensywną gospodarką rolną
prowadzoną na terenie zlewni. Związek ten jest powszechnie
stosowany w produkcji środków owadobójczych i grzybobój-
czych.

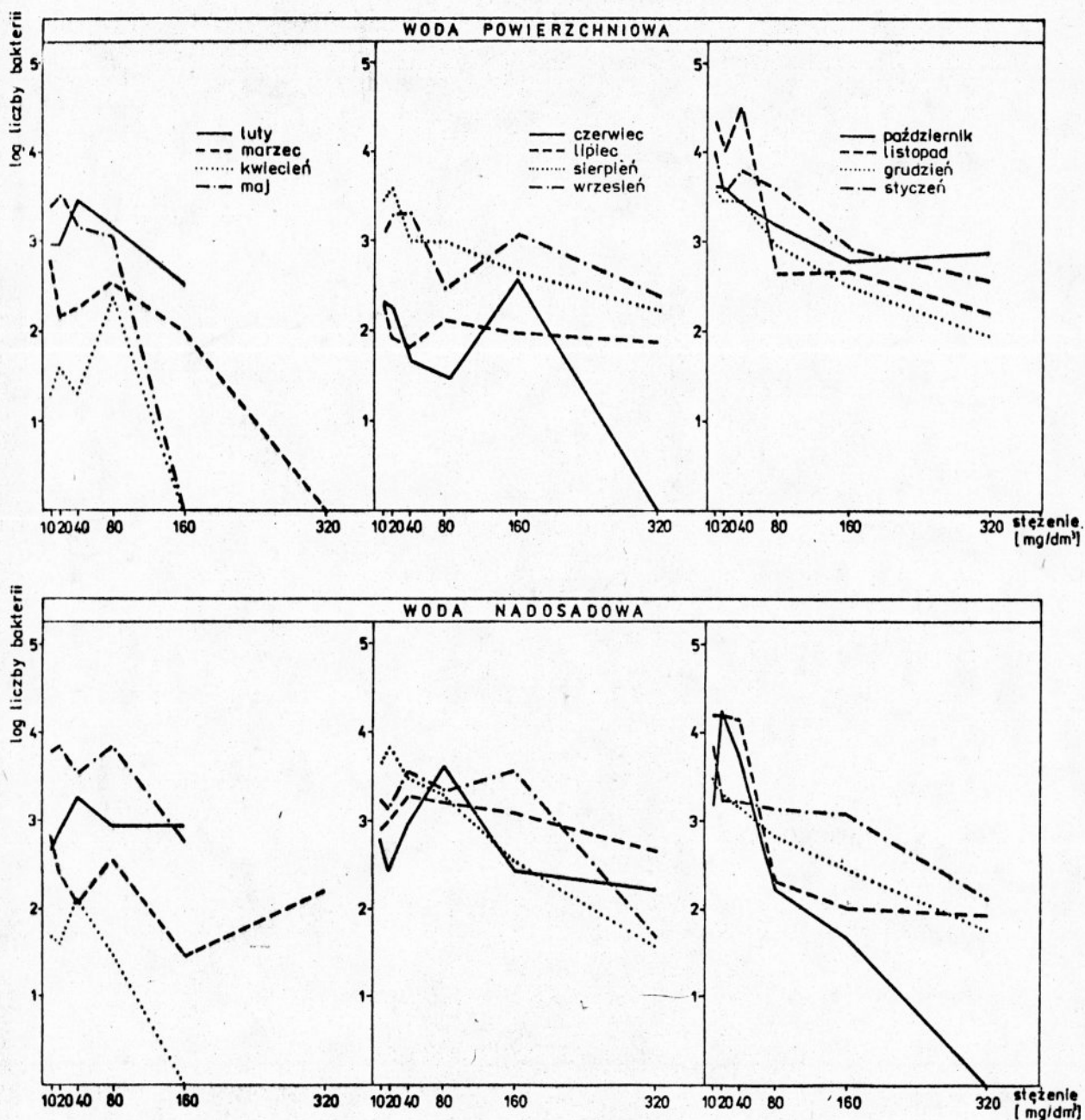
Zastosowane stężenia naftalenu, oparte, jak w przy-
padku wszystkich badanych wielopierścieniowych węglowo-
dorów aromatycznych na rozpuszczalności w wodzie, były
obiektywnie najwyższe. Dlatego też zaobserwowano, wraz
ze wzrostem stosowanych stężeń, hamujące działanie naftalenu



Rys. 25. Ilość bakterii wykorzystujących acenafthen jako źródło węgla i energii występujących w wodzie rzeki Oławy w cyklu rocznym



Rys. 26. Ilość bakterii rosnących wobec gradientu stężeń naftalenu występujących w wodzie rzeki Oławy w cyklu rocznym



Rys. 27. Ilość bakterii wykorzystujących naftalen jako źródło węgla i energii występujących w wodzie rzeki Oławy w cyklu rocznym

na rozwój naturalnej mikroflory wody rzeki Oławy /rys. 26 i 27/.

Najmniej bakterii rosnących w obecności naftalenu, stwierdzono w kwietniu, podczas gdy największy udział tej mikroflory wystąpił w maju i październiku /rys. 26/.

Hamujący wpływ wzrastających stężeń naftalenu na rozwój mikroflory najwyraźniej można zaobserwować, porównując średni wzrost bakterii w cyklu rocznym w obecności badanego związku i średnią ogólną liczbę bakterii psychrofilnych /tabela 30/. Stosowane trzy najniższe stężenia działały słabo na naturalną mikroflorę wody, a trzy najwyższe stężenia bardzo silnie różnicowały bakterie, tak, że ostatecznie przy stężeniu naftalenu 320 mg/dm^3 z wody powierzchniowej średnio wyrastało $2,4\%$, a z wody nadosadowej $3,4\%$.

Jeszcze słabiej rosły bakterie na podłożu zawierającym naftalen jako jedyne źródło węgla i energii chociaż rozrzut otrzymanych wartości w cyklu rocznym był znaczny /rys. 27/. Ponadto zaobserwowano zwłaszcza w wodzie nadosadowej stosunkowo dużo bakterii mających odpowiednie wyposażenie enzymatyczne pozwalające im na wykorzystanie naftalenu, w niższych stężeniach, jako jedynego źródła węgla /tabela 31/. Natomiast w najwyższym stężeniu $/320 \text{ mg/dm}^3/$ naftalen wykorzystywany był jedynie przez $2,7\%$ bakterii żyjących w wodzie powierzchniowej i $1,8\%$ w wodzie nadosadowej. Jak wynika z danych przedstawionych w tabeli 32 z wody powierzchniowej, przy najwyższym stosowanym stężeniu naftalenu, wyrastało procentowo więcej bakterii na podłożu mineralnym zawierającym badany związek jako jedyny substrat

energetyczny, zaś w wodzie nadosadowej proporcje te były odwrotne. Obserwowana sytuacja była prawdopodobnie wynikiem wcześniejszej adaptacji niektórych bakterii do naftalenu. Możliwość taka istnieje w związku z szerokim zastosowaniem naftalenu w produkcji różnych preparatów chemicznych, między innymi środków owadobójczych. Jednakże stosowane wysokie stężenia związku oddziaływały toksycznie w stosunku do większości bakterii wchodzących w skład biocenozy rzeki Oławy.

Podsumowując należy stwierdzić, że stosowane w badaniach wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne w bardzo istotny sposób oddziaływały na naturalną mikroflorę wody.

Przede wszystkim w biocenozie rzeki Oławy występuje bardzo liczna populacja bakterii niewrażliwych na szkodliwy wpływ badanych związków.

Na uwagę zasługuje również interesujące zjawisko znacznie lepszego rozwoju mikroflory pod wpływem stosowanych WWA niż na zwykłym podłożu agarowym. Wydaje się, iż jest to działanie bodźcowe, którego istoty należy szukać we właściwościach biochemicznych badanych związków i ich zdolności do wywoływania procesów niekontrolowanego rozwoju komórek. Zatem mogą one inicjować rozwój np. form przetrwalnych, które w normalnych warunkach nie rozwijają się na podłożu agarowym czy mineralnym z glukozą. Bądź też w populacji bakterii znajdują się formy wysoce wyselekcjonowane, które ujawniają się jedynie w przypadku bezpośredniego kontaktu z wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi.

Ponadto w wodzie rzeki Oławy występują liczne bakterie mające odpowiednie wyposażenie enzymatyczne do metabolicznego rozkładu benzo/a/pirenu, antracenu, fluorantenu, acetonafenu i naftalenu.

W tym fakcie należy upatrywać możliwości do samooczyszczania rzeki z tych niebezpiecznych zanieczyszczeń.

Niemniej stosowane najwyższe stężenia badanych związków wpływały hamująco na wzrost bakterii co może być bezpośrednią przyczyną selekcji naturalnej mikroflory rzeki Oławy, a zatem możliwości zakłócenia procesów rozkładu innych związków zanieczyszczających.

4.2.4.2. Selekcja ilościowa i jakościowa naturalnej mikroflory rzeki Oławy pod wpływem wybranych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych.

Stwierdzona zróżnicowana wrażliwość bakterii na działanie niektórych WWA jest zapewne czynnikiem selekcyjnym w warunkach naturalnych. Dla bliższego wyjaśnienia tego zagadnienia przeprowadzono badania nad wpływem benzo/a/pirenu, antracenu i fluorantenu na liczebność wybranych grup fizjologicznych bakterii: proteolitycznych, amonifikacyjnych, nitryfikacyjnych I i II fazy oraz bakterii denitryfikacyjnych. Ponadto badaniami objęto również bakterie psychrofilne, przetrwalnikujące i amyloolityczne.

Doświadczenia jakie na ten temat przeprowadzono trwały trzy tygodnie. Inkubacja bakterii z wody rzeki Oławy,

po wprowadzeniu wymienionych węglowodorów, odbywała się w warunkach hodowli statycznej w temperaturze 20°C.

Uzyskane wyniki przedstawiono na rys. 26, 27, 28, 29, jako logarytm liczby bakterii w przypadku bakterii psychrofilnych, przetrwalnikujących, proteolitycznych i amylolitycznych i jako ujemny logarytm miana w przypadku bakterii amonifikacyjnych, denitryfikacyjnych i nitryfikacyjnych I i II fazy.

Analizując wyniki badań widać, że w próbie kontrolnej /rys. 28 i 29/ w czasie trwania doświadczenia, nastąpił początkowo spadek liczebności ogólnej liczby bakterii z 9 400 do 936 kom/cm³, po czym znaczny ich wzrost, tak że po trzech tygodniach stwierdzono 314 000 kom/cm³.

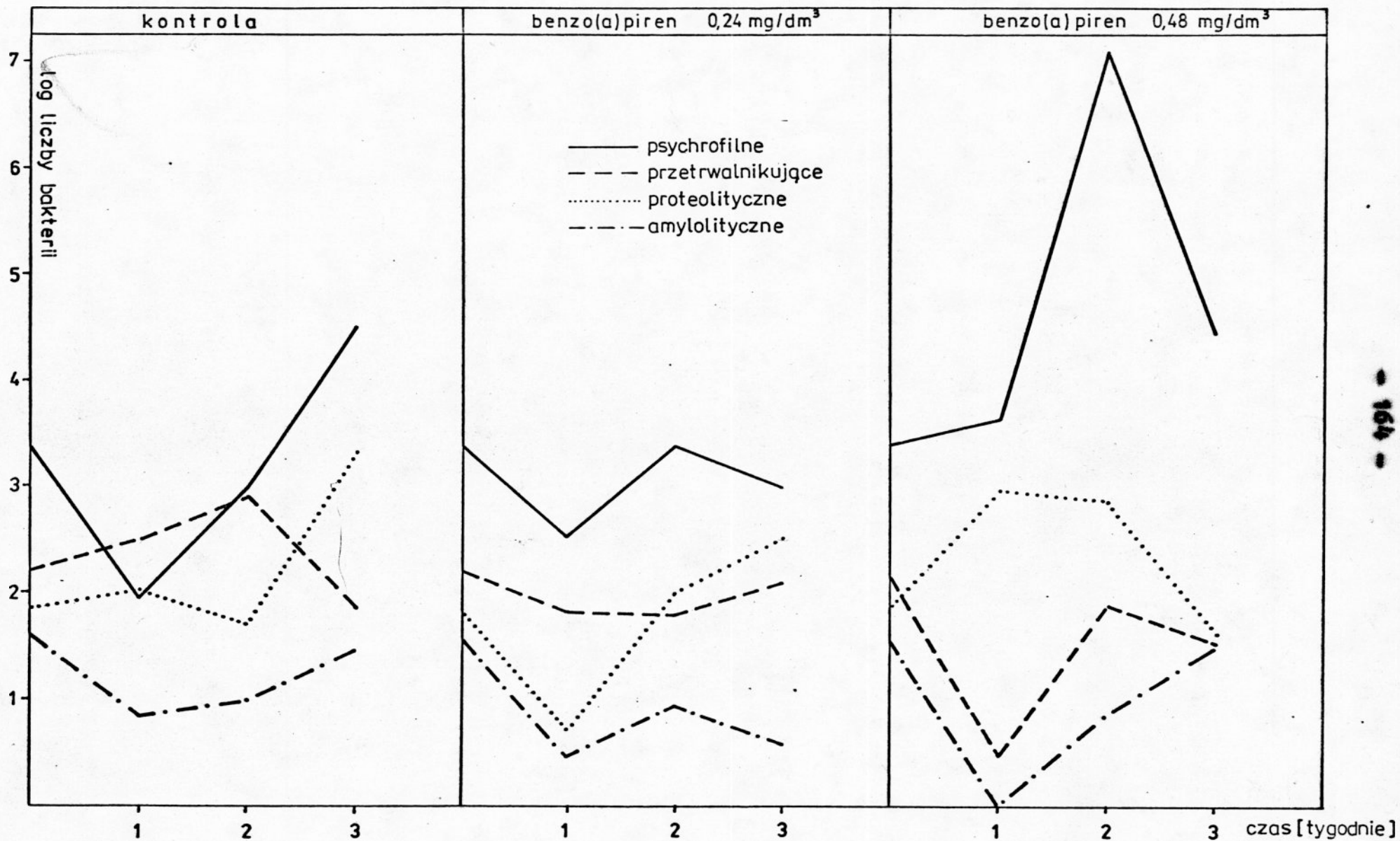
Na tym tle, liczba bakterii przetrwalnikujących w czasie hodowli kształtowała się odmiennie. Początkowo - po pierwszym tygodniu - stwierdzono ich znaczny przyrost natomiast pod koniec doświadczenia obserwowano spadek ich liczebności, tak iż osiągnęły one wartość początkową.

Udział bakterii proteolitycznych korelował z ogólną liczbą bakterii psychrofilnych.

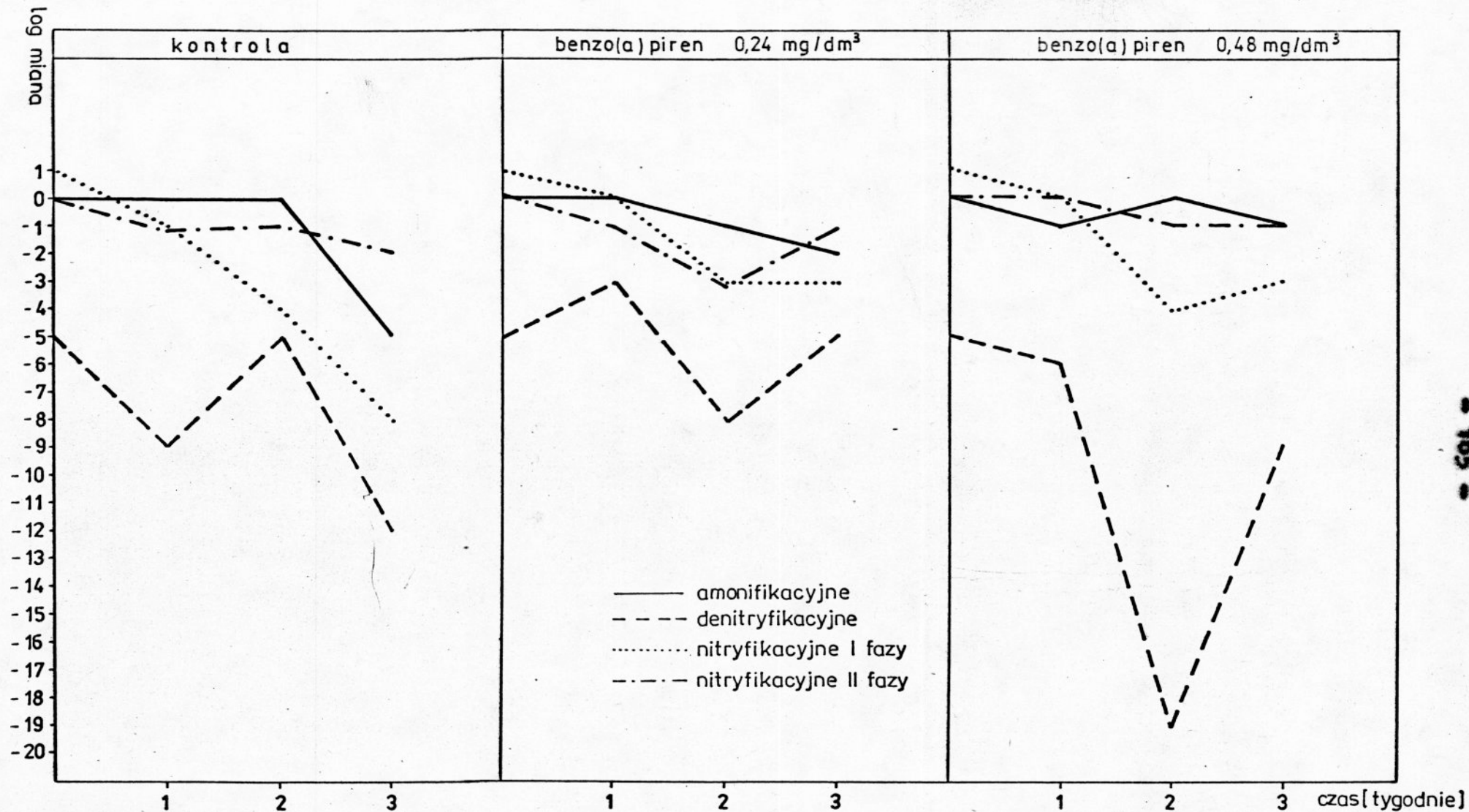
Bakterie przemian azotowych wykazywały wyraźną aktywność rozwojową w czasie trwania eksperymentu, zwłaszcza zaś bakterie denitryfikacyjne i nitryfikacyjne I fazy.

Zastosowane w badaniach dwa stężenia benzo/a/pirenu oddziaływały odmiennie na mikroflorę wody rzeki Oławy /rys. 28 i 29/.

Stężenie 0,24 mg/dm³ /rys. 28 i 29/ powodowało w stosunku do kontroli, niewielkie obniżenie liczebności bakterii psychrofilnych, przetrwalnikujących, proteolitycznych,



Rys. 28. Liczba bakterii psychrofilnych, przetrwalnikujących, proteolitycznych i amylolitycznych w wodzie z rzeki Oławy wzbogaconej benzo(a)pirenem



Rys. 29. Miano bakterii denitryfikacyjnych, amonifikacyjnych, nitryfikacyjnych I fazy i nitryfikacyjnych II fazy w wodzie z rzeki Oławy wzbogaconej benzo(a)pirenem

nitryfikacyjnych I fazy, denitryfikacyjnych i amyloolitycznych, podczas gdy nieznacznie wzrosła liczebność bakterii amonifikacyjnych i nitryfikacyjnych II fazy.

Natomiast bardzo wyraźnie stymulujący wpływ na rozwój naturalnej mikroflory rzeki Oławy, miał benzo/a/piren w stężeniu $0,48 \text{ mg/dm}^3$ /rys. 28 i 29/. Już po pierwszym tygodniu trwania doświadczenia zaobserwowano gwałtowny wzrost liczebności bakterii psychrofilnych, która w drugim tygodniu doświadczenia osiągnęła wartość $10.880.000 \text{ komórek/cm}^3$, po czym równie gwałtownie zmalała. Podobnie zareagowały również bakterie proteolityczne i denitryfikacyjne.

Nieznacznemu zahamowaniu uległ rozwój bakterii amonifikacyjnych i nitryfikacyjnych I i II fazy, a także bakterii amyloolitycznych.

Wydaje się zatem, że benzo/a/piren w stężeniu $0,48 \text{ mg/dm}^3$ działał wyraźnie selekcyjnie na mikroflorę naturalną wody, doprowadzając do hamowania rozwoju niektórych, wrażliwych grup bakterii, a wyraźnie stymulując rozwój innych. W stymulacji tej można doszukiwać się możliwości enzymatycznych niektórych bakterii do wykorzystywania benzo/a/pirenu jako źródła węgla i energii lub stymulacji ogólnej aktywności metabolicznej. Wreszcie należy tu wspomnieć o fakcie, iż benzo/a/piren w stężeniu $0,48 \text{ mg/dm}^3$ działał wyraźnie selekcyjnie na mikroflorę naturalną wody, doprowadzając do hamowania rozwoju niektórych, wrażliwych grup bakterii, a wyraźnie stymulując rozwój innych. W stymulacji tej można się doszukiwać możliwości enzymatycznych niektórych bakterii do wykorzystywania benzo/a/pirenu jako źródła węgla i energii lub stymulacji

ogólnej aktywności metabolicznej. Wreszcie należy tu wspomnieć o fakcie, iż benzo/a/piren jest jednym z głównych czynników wywołujących proces nowotworzenia u organizmów wyższych.

Doszukiwanie się analogii między tymi zjawiskami, jest na pewno bardzo ryzykowne i być może obarczone zasadniczym błędem, ale przynajmniej zasygnalizowanie tego jest potrzebne. Należy przy tym pamiętać, że w zanieczyszczonej wodzie rzeki Oławy bakterie mają dość substratów energetycznych, z których mogą przez dłuższy czas korzystać, czego wyraźnym dowodem jest rozwój bakterii w próbie kontrolnej. Pamiętając o udowodnionym zjawisku kolejnego wykorzystywania substratów w zależności od struktury cząsteczek wyzyskiwanego związku chemicznego, trudno zgodzić się z tym, iż policykliczna budowa cząsteczki benzo/a/pirenu jest tak łatwo dostępna dla większości bakterii, iż pobierają go przed wyczerpaniem łatwiej dostępnych źródeł węgla i energii zawartych w wodzie.

Odmienne kształtowała się liczebność badanych grup bakterii w próbach wody rzeki Oławy wzbogaconej antracenenem w stężeniach 0,3 i 0,6 mg/dm³ /rys. 30 i 31/.

Interesujący jest fakt gwałtownego spadku liczebności po 7 dobach trwania eksperymentu bakterii psychrofilnych, proteolitycznych, amylolitycznych i przetrwalnikujących, po czym ponownego ich przyrostu. Należy nadmienić, iż zachowana została, obserwowana w kontroli, zależność w liczebności bakterii psychrofilnych i proteolitycznych. Obserwacje te pozwalają przypuszczać, iż antracenen oddziałuje selekcyjnie na mikroflorę wody, ale dla pozostałych żywych komórek wymaga długiego okresu adaptacyjnego, po którym następuje wzrost populacji.

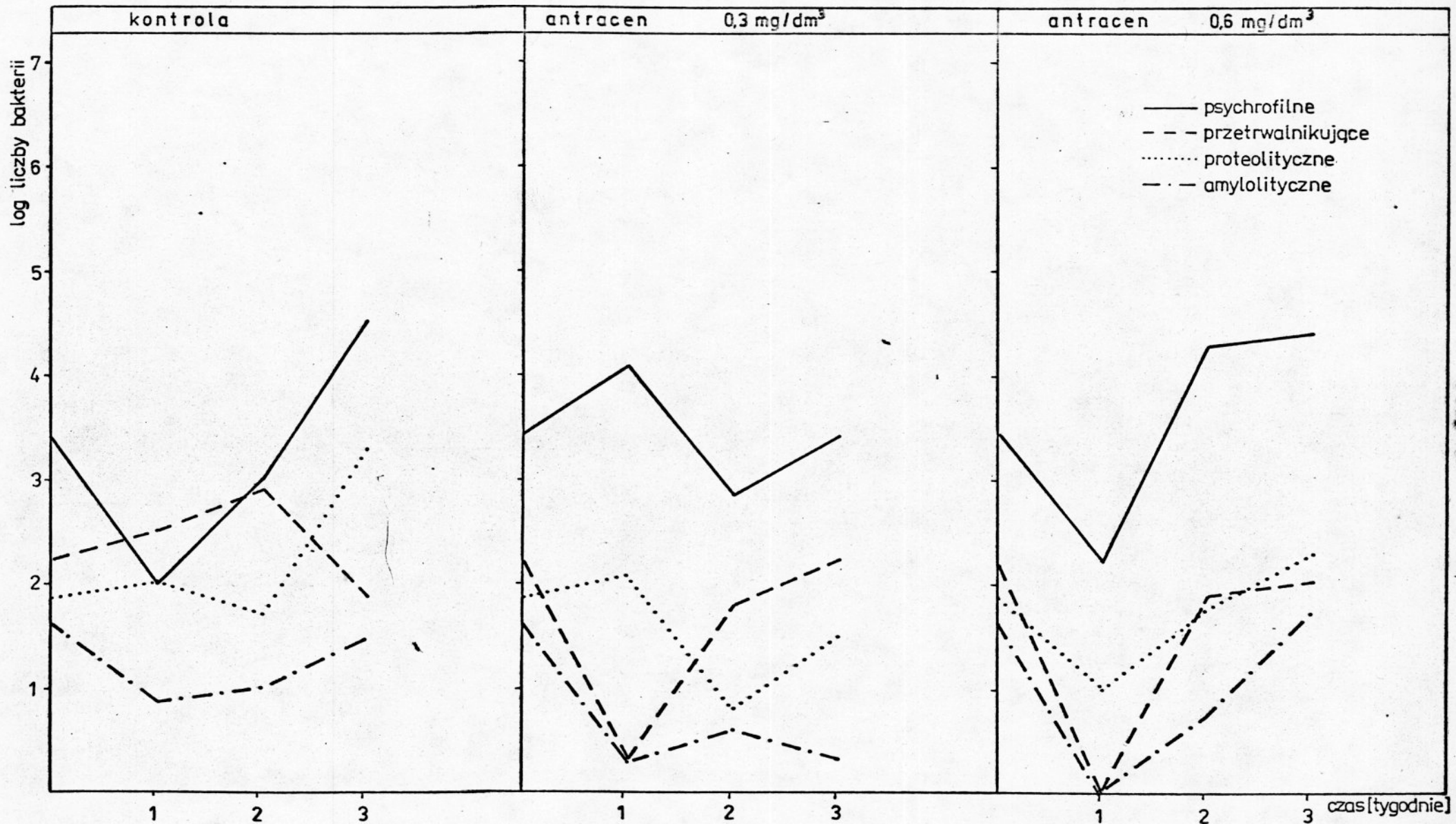
Natomiast rozwój populacji bakterii przemian azotowych był zbliżony do wyników uzyskanych w próbie kontrolnej, za wyjątkiem bakterii denitryfikacyjnych w przypadku zastosowanego stężenia antracenu 0,3 i 0,6 mg/dm³ i nitryfikacyjnych III fazy w przypadku stężenia 0,6 mg/dm³.

Fluoranten w zastosowanych stężeniach również oddziaływał stymulująco na mikroflorę wodną. W stężeniu 1,06 mg/dm³ /rys. 32 i 33/ zaobserwowano znaczny wzrost bakterii psychrofilnych, w tym także bakterii proteolitycznych. Natomiast po pierwszym tygodniu trwania doświadczenia wystąpił prawie całkowity zanik bakterii przetrwalnikujących /1 kom/cm³/, bądź też zahamowanie procesu wytwarzania przetrwalników.

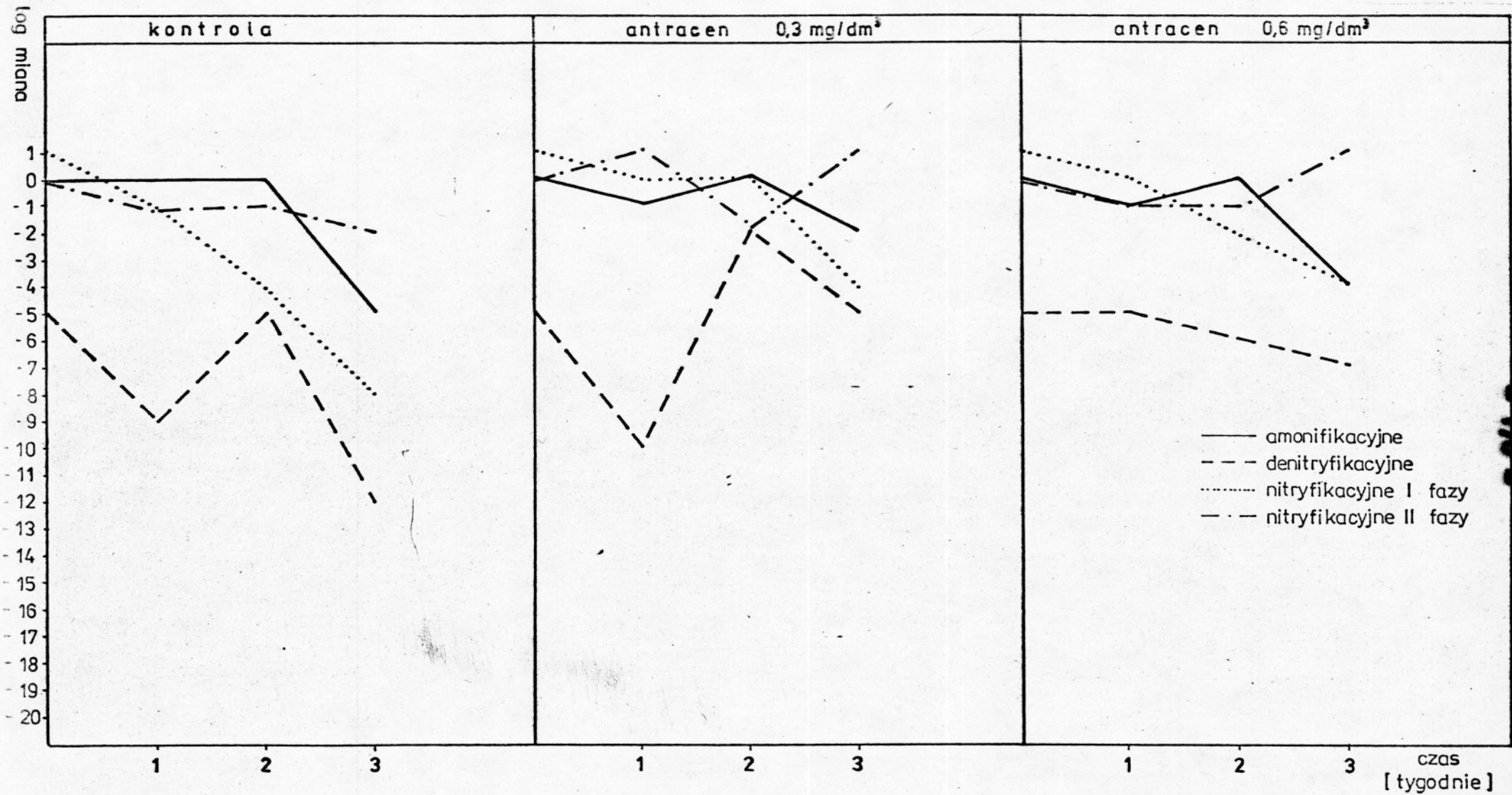
Równocześnie, prawie całkowicie ustąpiły bakterie amyloolityczne. Natomiast w drugim i trzecim tygodniu ilość tych bakterii znacznie wzrosła /w przypadku bakterii amyloolitycznych ponad wartość początkową do 600 kom/cm³/ . W okresie trwania doświadczenia obserwowano systematyczny przyrost bakterii denitryfikacyjnych i nitryfikacyjnych obu faz.

Przebieg krzywych obrazujących rozwój bakterii w obrębie badanych grup, w przypadku fluorantenu zastosowanego w dwukrotnie wyższym stężeniu /rys. 32,33/ jest bardzo podobny do wyników uzyskanych przy stężeniu 1,06 mg/dm³. Jednakże uzyskane wartości maksymalne były niższe, co może dowodzić, iż zastosowane stężenie powodowało nieznaczne hamowanie rozwoju naturalnej mikroflory wody.

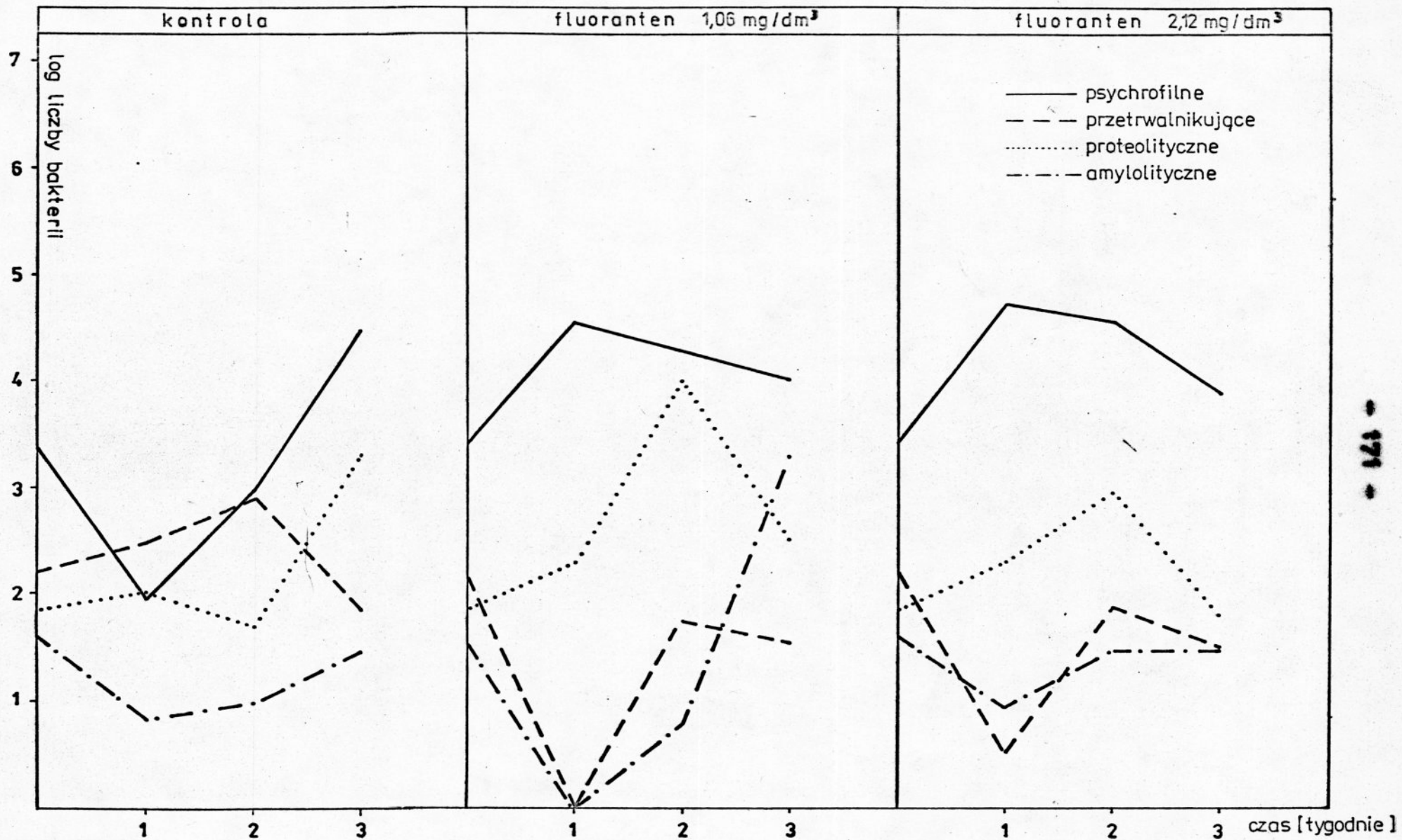
Reasumując należy stwierdzić, że wybrane wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, w zastosowanych stężeniach,



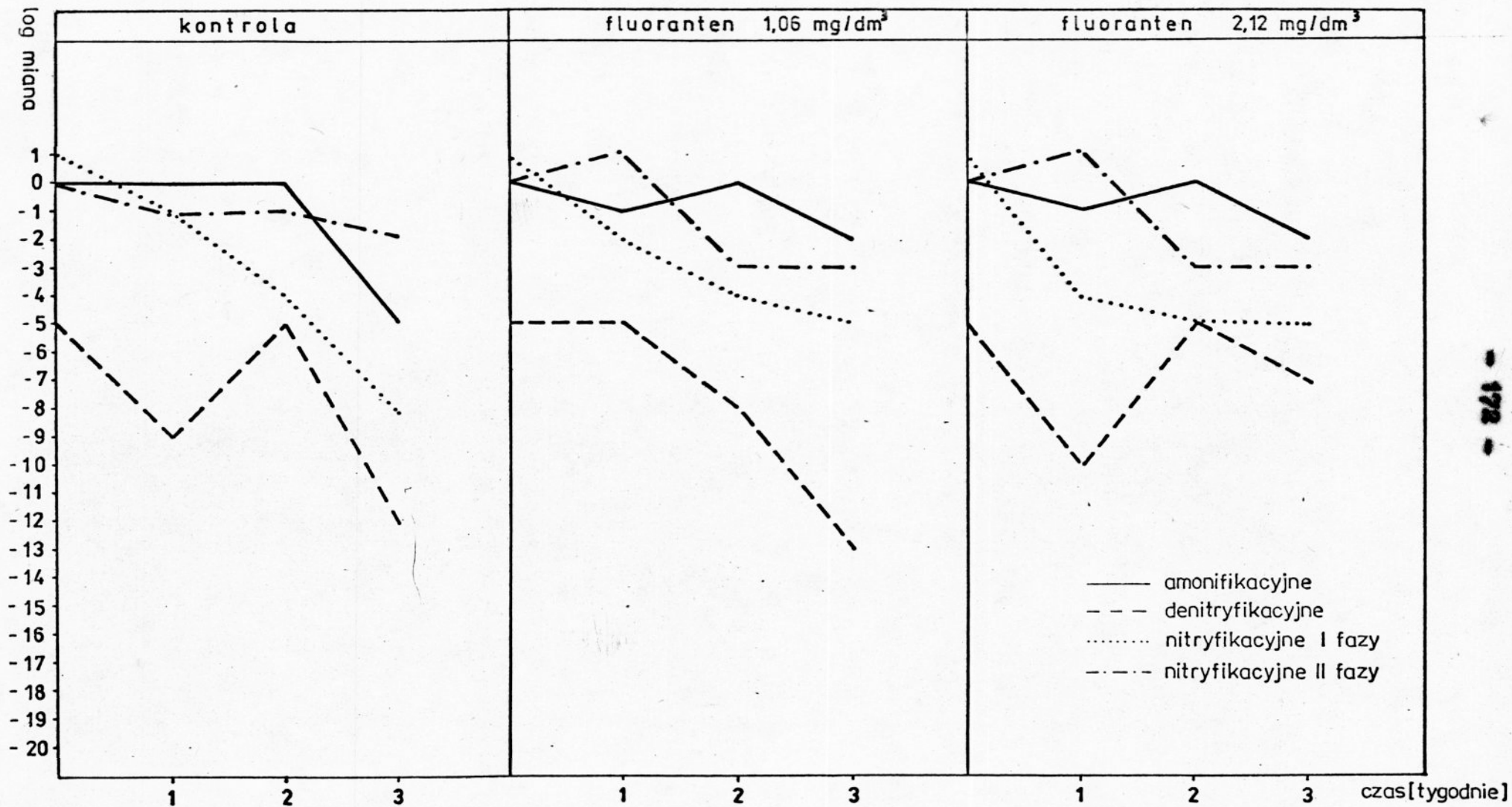
Rys.30. Liczba bakterii psychrofilnych, przetrwalnikujących, proteolitycznych i amyloolitycznych w wodzie z rzeki Oławy wzbogaconej antracenenem



Rys. 31. Miano bakterii denitryfikacyjnych, amonifikacyjnych, nitryfikacyjnych I fazy i nitryfikacyjnych II fazy w wodzie z rzeki Oławy wzbogaconej antracenenem



Rys. 32. Liczba bakterii psychrofilnych, przetrwalnikujących, proteolitycznych i amylolitycznych w wodzie rzeki Oławy wzbogaconej fluorantem



Rys. 33. Miano bakterii denitryfikacyjnych, amonifikacyjnych, nitryfikacyjnych I fazy i nitryfikacyjnych II fazy w wodzie rzeki Oławy wzbogaconej fluorantenem

oddziaływały niejednorodnie na różne grupy bakterii.

Charakterystyczną cechą tego był fakt znacznie niższej liczebności bakterii przetrwalnikujących, niż w próbie kontrolnej, przy jednoczesnym wzroście ogólnej liczby bakterii psychrofilnych. Wynik ten zdaje się potwierdzać wcześniej zasygnalizowany pogląd, iż omawiane węglowodory wpływają na szybkość reprodukcji niektórych gatunków bakterii. Działanie to było uzależnione od rodzaju stosowanego związku, bądź stężenia, gdyż ilości maksymalne występowały po 7 lub 14 dobach trwania eksperymentu. Na pierwsze miejsce pod względem bodźcowego działania na populację bakterii wysunął się benzo/a/piren w stężeniu $0,48 \text{ mg/dm}^3$.

Drugą charakterystyczną cechą był fakt bodźcowego działania stosowanych węglowodorów na bakterie przemian azotowych, w tym zwłaszcza na bakterie denitryfikacyjne. A zatem wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, poprzez swe oddziaływanie, zmieniały proporcje naturalnych komponent^{ów} mikroflory, wyraźnie uaktywniając niektóre grupy bakterii przemian azoto^cwych, a hamując inne.

Jednocześnie w większości przypadków najbardziej wrażliwe okazały się bakterie amylolityczne.

4.2.4.3. Badania nad rozkładem wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych przez naturalną mikroflorę wody

W celu określenia udziału naturalnej mikroflory wody rzeki Oławy w procesie biodegradacji WWA, przeprowadzono doświadczenie, w którym do wody dodawano benzo/a/piren w stężeniu $0,24$ i $0,48 \text{ mg/dm}^3$ i antracen w stężeniu $0,3$

i 0,6 mg/dm³, fluoranten w stężeniu 1,06 i 2,12 mg/dm³. Próby przetrzymywano w kolbach o objętości 250 cm³, w temperaturze 20°C i co tydzień ustalano poziom badanych węglowodorów. Doświadczenie prowadzono przez 21 dób.

Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 33, jako procentowy ubytek WWA w stosunku do ilości dodanej na początku doświadczenia.

Należy zaznaczyć, iż w wodzie powierzchniowej rzeki Oławy pobranej w celu przeprowadzenia badań, na wysokości hałdy żużlu pochromowego, nie stwierdzono w tym dniu benzo/a/pirenu, antracenu i fluorantenu.

W całym okresie trwania doświadczenia nie stwierdzono w próbie kontrolnej obecności benzo/a/pirenu, antracenu i fluorantenu, a zatem można wykluczyć naturalne pochodzenie badanych WWA w wodzie rzeki Oławy.

Natomiast w próbach wody, do których dodano wybrane WWA w stosowanych stężeniach zaobserwowano pewną prawidłowość.

Po pierwszych siedmiu dniach zanotowano znaczny ubytek badanych związków /za wyjątkiem antracenu w stężeniu 0,3 mg/dm³/ Po 14 dniach ilości węglowodorów były wyższe, a po 21 dniach zanotowano ponowny spadek ich zawartości w próbach.

Z podobnym zjawiskiem można się spotkać w przypadku naftalenu, gdzie po epoksydacji i hydratacji powstaje ponownie produkt wyjściowy. Wydaje się, iż przekształcenia dodanych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych mogą przebiegać podobnym szlakiem. Zwłaszcza, że badania przeprowadzono z udziałem naturalnej mikroflory wodnej, a więc w rozkładzie benzo/a/pirenu, antracenu i fluorantenu brały udział

Tabela 33

Procentowy ubytek antracenu, benzo/a/pirenu i fluorantenu w próbach wody wzbogaconych badanymi WWA w procentach

Rodzaj próby	Kontrola ^x	benzo/a/piren		antracen		fluoranten	
steż.pocz. czas [dni]	0	0,24mg/dm ³	0,48mg/dm ³	0,3 mg/dm ³	0,6 mg/dm ³	1,06mg/dm ³	2,12mg/dm ³
0	nw ^{xx}	0	0	0	0	0	0
7	nw	93,7	91,8	32,0	77,0	85,7	87,1
14	nw	78,5	89,9	22,7	59,0	62,2	58,2
21	nw	96,2	88,4	81,3	89,0	79,3	94,4

x próbę kontrolną badano w kierunku obecności antracenu, benzo/a/pirenu i fluorantenu

xx nw nie wykryto

drobnoustroje o różnorodnych cechach metabolicznych.

Istnieje też druga możliwość, w której zamiast biodegradacji omawianych węglowodorów występowało zjawisko biokumulacji, a po pewnym czasie następowało ich wtórne wydalenie na skutek lizy komórek.

4.2.4.4. Badania nad kumulacją wybranych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych przez naturalną mikroflorę wody rzeki Oławy.

Kumulację benzo/a/pirenu, antracenu i fluorantenu przez mikroflorę naturalną wody powierzchniowej i nadosadowej rzeki Oławy badano zaszczipiając podłoże bulionowe lub mineralne zawierające odpowiednie stężenia stosowanych WWA wodą rzeczną w stosunku 1:1. Inkubację prowadzono w temperaturze 20°C przez okres 7 dni dla bulionu odżywczego i 14 dni dla podłoża mineralnego.

Biomasę bakterii odwirowywano, a następnie po trzykrotnym przemyciu wodą redestylowaną, suszono w temperaturze 60°C do stałej wagi. W tak przygotowanej suchej masie po ekstrakcji oznaczano zawartość badanych WWA.

We wszystkich badanych próbach z benzo/a/pirenu zarówno na podłożu bulionowym jak i mineralnym stwierdzono jego kumulację w biomacie bakterii /tabela 34/ w stosunku do prób kontrolnych.

Ilość skumulowanego benzo/a/pirenu w przeliczeniu na gram suchej masy bakterii wzrastała wraz ze wzrostem stosowanego stężenia. Na uwagę zasługuje fakt uzyskanych znacznie wyższych wartości /średnio o jeden rząd/ kumulacji badanego węglowodoru

w próbach, gdzie benzo/a/piren był jedynym źródłem węgla i energii.

W próbach na podłożu bulionowym zawierającym benzo/a/piren przyrost biomasy bakterii był nieco wyższy niż w kontroli. Na podłożu mineralnym, gdzie benzo/a/piren był jedynym źródłem węgla i energii, przyrost biomasy był niewielki i obserwowano nieznaczny wpływ hamujący omawianego związku. Uzyskane wyniki mogły być związane z faktem trudnej podatności benzo/a/pirenu na rozkład, a także z selekcyjnym jego wpływem na mikroflorę wodną.

W takich samych warunkach starano się ustalić kumulację antracenu /tabela 35/ przez mikroflorę wody rzeki Oławy. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, iż antracen podobnie jak benzo/a/piren, był pobierany i odkładany przez mikroorganizmy, jednakże nie we wszystkich przypadkach ilość oznaczanego w biomacie związku była zależna od zastosowanego stężenia. Interesująca jest zaobserwowana prawidłowość w próbach na podłożu bulionowym, gdzie w przypadku lepszego przyrostu biomasy, ilość skumulowanego antracenu była niższa w stosunku do prób, gdzie przyrost ten był mniejszy.

Natomiast w próbach, w których antracen był jedynym źródłem węgla i energii stopień kumulacji był tym wyższy im większy był przyrost biomasy.

Ogólnie można stwierdzić, iż antracen był kumulowany przez naturalną mikroflorę wody rzeki Oławy. Na podłożu bulionowym wraz ze wzrostem stosowanego stężenia obserwowano obniżanie się ilości badanego związku w biomacie, zaś na podłożu mineralnym skumulowane ilości antracenu były wprost

Tabela 34

Kumulacja benzo/a/pirenu przez naturalną mikroflorę wody rzeki Olawy po 7 i 14 dobach inkubacji w temperaturze 20°C.

Pochodzenie mikroflory	Podłoże	Dodane stężenie benzo/a/pirenu [mg/dm ³]	Średnia sucha masa [g/dm ³]	Średnia wartość kumulacji [mg/g s.m]
woda powierzchniowa	bulionowe	0,12	2,34	0,00651
		0,06	2,59	0,00485
		0,03	2,59	0,00363
		0	2,48	0
	mineralne	0,12	0,203	0,0678
		0,06	0,355	0,02286
		0,03	0,475	0,01353
		0	0,405	0
woda nadosadowa	bulionowe	0,12	1,97	0,01295
		0,6	1,65	0,00423
		0,03	1,52	0,0018
		0	2,065	0
	mineralne	0,12	0,34	0,05813
		0,06	0,56	0,02189
		0,03	0,56	0,01114
		0	0,51	0

proporcjonalne od zastosowanego stężenia.

Ponadto można zauważyć, iż antracen miał nieznacznie stymulujący wpływ na rozwój populacji bakterii hodowanych na podłożu bulionowym. Natomiast, gdy antracen był jedynym źródłem węgla i energii, działał nieznacznie hamująco, zwłaszcza w stosunku do mikroflory nadosadowej. Podobnie jak w przypadku benzo/a/pirenu mogły się na to składać co najmniej dwie przyczyny. Z jednej strony mogło to być skutkiem trudnej dostępności substratu, z drugiej zaś strony z selekcji wynikającej z różnej wrażliwości na badany związek mieszanej populacji bakterii.

Kumulację fluorantenu stwierdzono jedynie w próbach, w których zastosowano podłoże bulionowe. Wystąpiła tam prosta zależność ilości skumulowanego związku od zastosowanego stężenia. Obserwowano jednocześnie lepszy przyrost biomasy bakterii - zwłaszcza mikroflory wody powierzchniowej - w stosunku do próby kontrolnej, co zapewne było wynikiem bodźcowego działania badanego związku /tabela 36/.

Natomiast na podłożu mineralnym w obecności fluorantenu jako źródła węgla i energii, zaobserwowano bardzo słaby przyrost biomasy bakterii, a ponadto nie stwierdzano w niej kumulacji badanego związku. Pozwala to przypuszczać, iż fluoranten bądź nie był dostępnym dla bakterii substratem energetycznym, bądź oddziaływał toksycznie. Czas ekspozycji bakterii na badany związek był dość długi /14 dób/, a zatem uzyskane wyniki nie pozostają w sprzeczności z danymi dotyczącymi dobrego wzrostu bakterii na stałym podłożu mineralnym zawierającym fluoranten, gdzie obserwowano jego bodźcowe

Tabela 35

Kumulacja antracenu przez naturalną mikroflorę wody rzeki Oławy

Pochodzenie mikroflory	Podłoże	Dodane stężenie antracenu [mg/dm ³]	średnia sucha masa [g/dm ³]	średnia wartość kumulacji [mg/g.s.m]
Woda powierzchniowa	bulionowe	0,15	2,11	0,0105
		0,075	2,045	0,01136
		0,0375	2,135	0,01365
		0	2,478	0
	mineralne	0,15	0,335	0,13636
		0,075	0,21	0,00917
		0,0575	0,10	ślad
		0	0,20	0,00228
Woda nadosadowa	bulionowe	0,15	2,27	0,006284
		0,075	2,04	0,01847
		0,0375	1,607	0,03308
		0	2,065	0
	mineralne	0,15	0,16	0,05263
		0,075	0,08	0,01428
		0,0375	0,14	0,02
		0	0,506	0

działanie. We wspomnianym przypadku wzrost ten mógł być wynikiem zwiększonej aktywności fizjologicznej pod wpływem związku toksycznego.

Reasumując należy stwierdzić, iż badane wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne oddziałują niejednorodnie na mikroflorę wodną, co zapewne pozostaje w związku z ich odmienną budową chemiczną i przestrzenną.

Ogólnie można stwierdzić, iż proces ten był zależny w większości przypadków, od stosowanego stężenia badanego związku. Natomiast, gdy benzo/a/piren i antracen były jedynym źródłem węgla i energii, ilość węglowodoru oznaczana w biomacie była wyższa niż w analogicznych próbach uzyskanych na podłożu bulionowym. W przypadku fluorantenu w omawianych warunkach nie stwierdzono kumulacji.

Fakt kumulowania wymienionych węglowodorów przez mikroorganizmy należy z jednej strony uznać za zjawisko pozornego usuwania tych związków z wody, a z drugiej za możliwość powstawania zanieczyszczeń wtórnych lub migowania w łańcuchu troficznym. Jak wynika z poprzednich doświadczeń węglowodory mają bardzo znaczny wpływ na mikroflorę wodną. Pewne stężenia powodują selekcję form wrażliwych lub tak jak w przypadku fluorantenu wykazują toksyczne działanie. Odmienne zachowanie się drobnoustrojów wobec benzo/a/pirenu dowodzi, że w warunkach naturalnych, gdzie na ogół występuje kilka różnych węglowodorów, a ich stężenia gwałtownie się zmieniają, należy się liczyć z ich poważnym wpływem na zakłócenie równowagi biologicznej i zmianę składu zarówno ilościowego jak i jakościowego mikroflory. To z kolei odbija się na procesie

Tabela 36. Kumulacja fluorantenu przez naturalną mikroflorę wody rzeki Oławy

Pochodzenie mikroflory	Podłoże	Dodane stężenie fluorantenu [mg/dm ³]	średnia sucha masa [g/dm ³]	średnia wartość kumulacji [mg/g.s.m]
Woda powierzchniowa	bulionowe	0,53	1,046	0,0214
		0,265	0,9325	0,01127
		0,132	0,888	0,01612
		0	0,0065	0
	mineralne	0,53	0,034	nie stwierdz.
		0,265	0,0445	"
		0,132	0,0635	"
		0	0,1655	"
Woda nadosadowa	bulionowe	0,53	0,691	0,0134
		0,265	0,596	0,00889
		0,132	0,587	0,00341
		0	0,7065	0
	mineralne	0,53	0,0285	nie stwierdz.
		0,265	0,0235	"
		0,132	0,0375	"
		0	0,095	"

biodegradacji oraz kumulacji wymienionych węglowodorów. Rzeczywista ocena biologicznego usuwania tych zanieczyszczeń jest przez to utrudniona, gdyż oba procesy nakładają się w swych skutkach na siebie do momentu, gdy nie nastąpi wtórne uwolnienie skumulowanych węglowodorów. W rzece, w której woda ujmowana jest do celów wodociągowych incydenty polegające na samozanieczyszczeniu są wyjątkowo niebezpieczne.

4.2.5. Badania nad interakcją mikroflory z wybranymi wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi: benzo/a/pirenu, antracenu i fluorantenu w warunkach dynamicznych.

Badania nad interakcją naturalnej mikroflory z wybranymi węglowodorami przeprowadzono w modelu laboratoryjnym typu lizymetru, wypełnionym glebą pobraną na stanowisku badawczym, zachowując jej naturalne uwarstwienie.

Do lizymetrów dozowano w sposób ciągły benzo/a/piren w stężeniach 0,24 i 0,48 mg/dm³, antracenu w stężeniach 0,3 i 0,6 mg/dm³ i fluorantenu w stężeniach 1,06 i 2,12 mg/dm³. Temperatura wynosiła 20°C.

Badania miały na celu wykazanie selekcji ilościowej w obrębie wybranych grup bakterii pod wpływem WWA dozowanych w sposób ciągły oraz zmian składu bakterii pod wpływem WWA w profilach glebowych. Poza tym badania pozwoliły na ocenę przemieszczania się badanych WWA z gleby do wody wraz z uwzględnieniem ich sorpcji i desorpcji w glebie.

Zakładano przy tym, że gleba wokół stanowiska badawczego zanieczyszczona jest podobnie jak woda przez WWA,

a zaplanowane badania pozwolą na określenie infiltracji. Ponadto spodziewano się, że dostarczą one informacji na temat selekcji mikroflory gleby pod wpływem omawianych węglowodórów oraz jej udziału w biodegradacji.

4.2.5.1. Selekcja ilościowa w obrębie wybranych grup bakterii pod wpływem WWA dozowanych w sposób ciągły do filtrów glebowych.

Zmiany ilościowe w obrębie wybranych grup bakterii pod wpływem WWA śledzono w oparciu o badania przesączu z filtrów glebowych jak i mikroflorę zasiedlającą glebę wypełniającą filtry.

4.2.5.1.1. Selekcja bakterii glebowych pod wpływem WWA oceniana w przesączu z filtrów glebowych.

W badaniach określano wpływ benzo/a/pirenu, antracenu i fluorantenu na liczebność bakterii psychrofilnych, proteolitycznych, amonifikacyjnych, nitryfikacyjnych obu faz, a także ilości bakterii przetrwalnikujących oraz amyloolitycznych. Uzyskane wyniki przedstawiono na rys. 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 i 41.

W próbie kontrolnej /rys. 34, 35/, do której dozowano wyłącznie wodę redestylowaną, obserwowano stopniowo spadek liczebności bakterii psychrofilnych i proporcjonalnie - przetrwalnikujących, proteolitycznych i amonifikacyjnych.

Znaczne wahania/w granicach miana $1 \cdot 10^{-4}$ do $1 \cdot 10^{-9}$ / charakteryzowały rozwój populacji denitryfikatorów. Natomiast

bakterie nitryfikacyjne I i II fazy wykazywały stosunkowo niewielkie wahania.

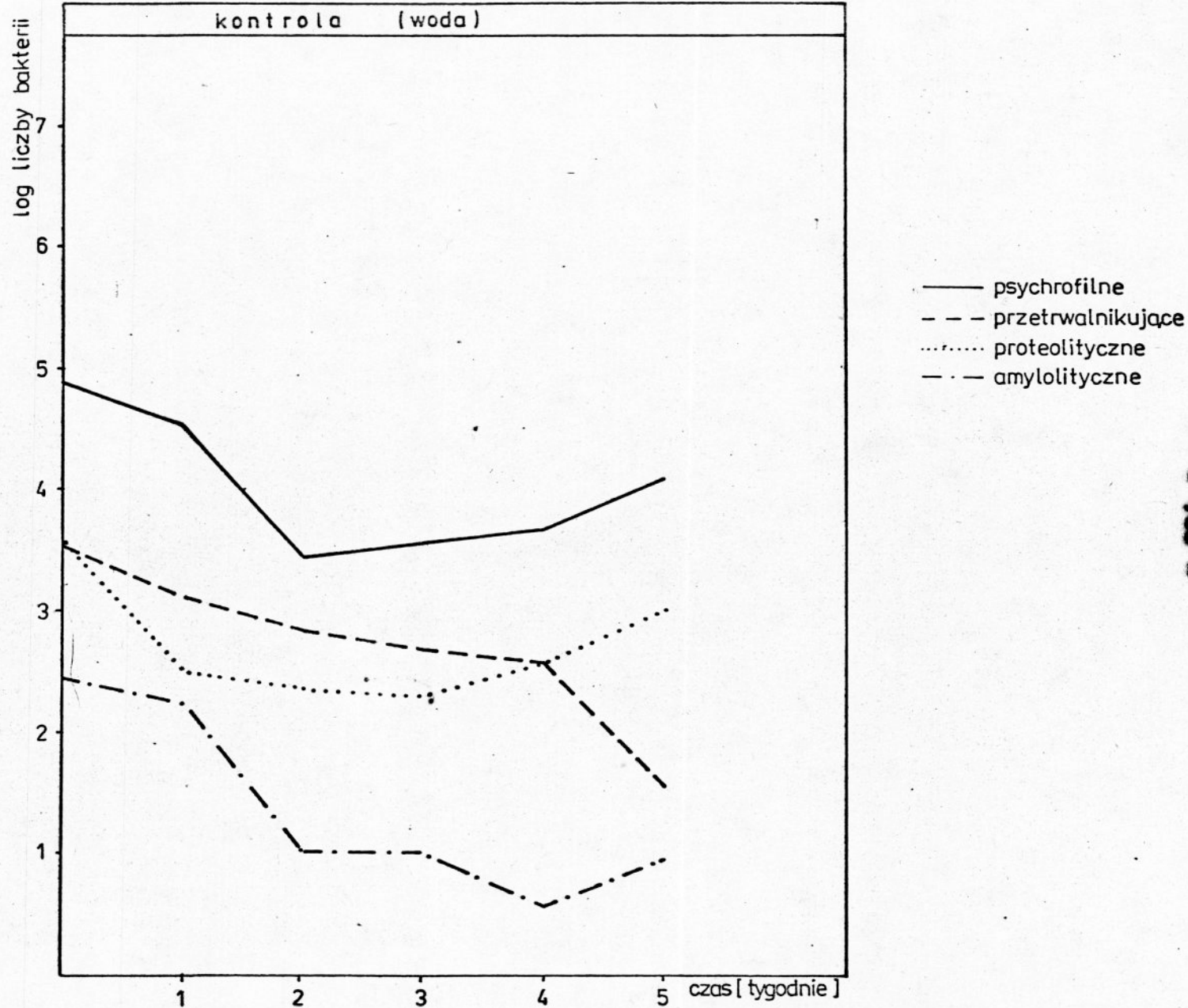
Ogólnie można stwierdzić, iż wraz z wypłukiwaniem z gleby związków rozpuszczalnych w wodzie, w tym substancji biogennych, następował spadek liczebności badanych grup bakterii za wyjątkiem nitryfikatorów I i II fazy.

Odmienne kształtował się rozwój populacji badanych grup bakterii w przesączach z lizymetrów, do których dozowano wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne w stosowanych stężeniach /tabela 17/.

Benzo/a/piren, dozowany w stężeniu $0,24 \text{ mg/dm}^3$ /rys. 36, 37/ nie wywierał większego wpływu na naturalną mikroflorę wymywaną z lizymetru, gdyż uzyskane wyniki zasadniczo nie odbiegały od wyników lizymetru kontrolnego. Wyjątek stanowiły bakterie amylolityczne i amonifikacyjne.

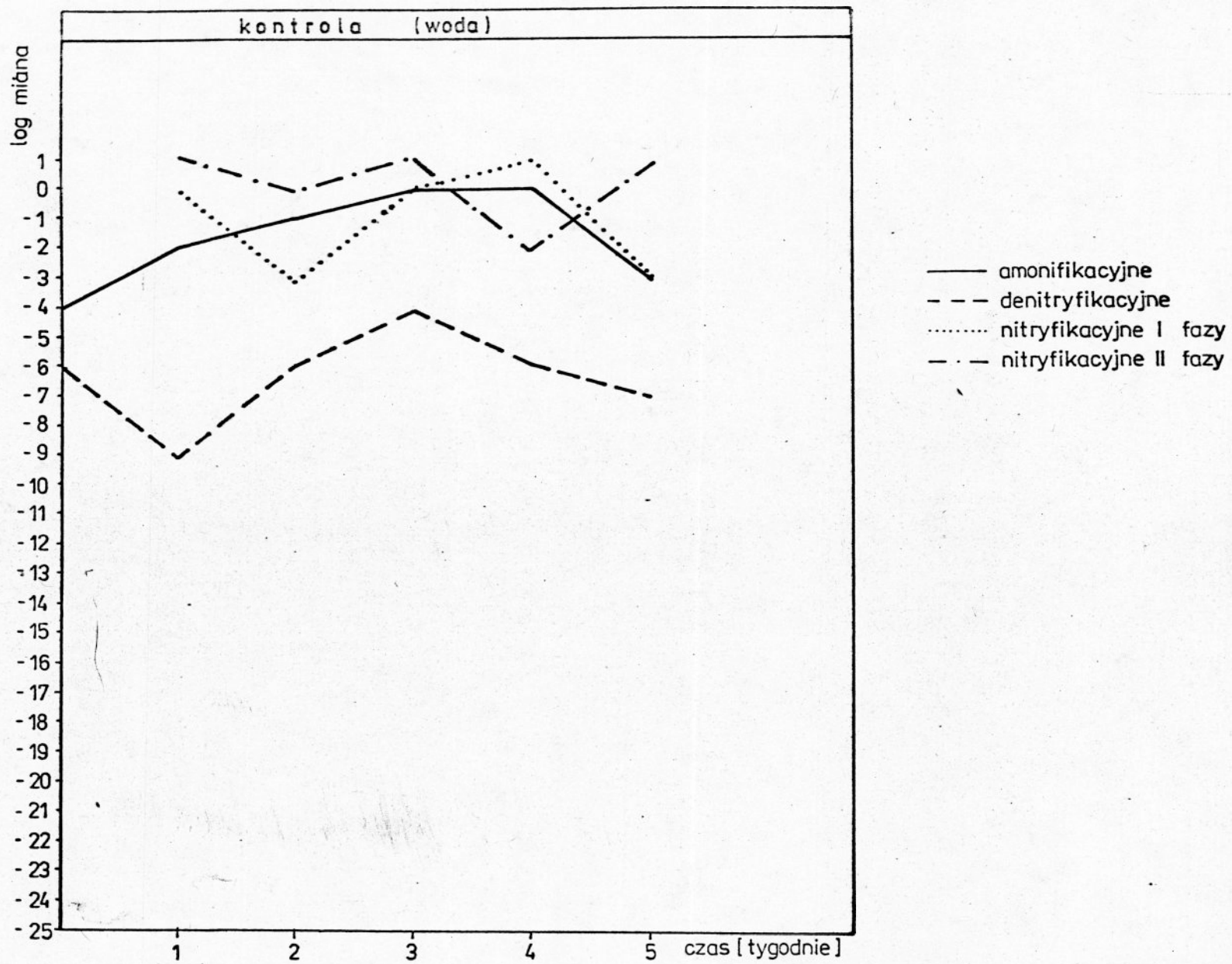
Bakterie amylolityczne okazały się najbardziej wrażliwe na zastosowane stężenie czego dowodem było obniżenie się ich liczebności, w ciągu 21 dób dozowania benzo/a/pirenu, z 4000 kom/cm^3 do 1 kom/cm^3 wycieku. Całkowicie przeciwnie reagowały bakterie amonifikacyjne. W pierwszej fazie nastąpił gwałtowny rozwój ich populacji /miano $1 \cdot 10^{-8}$ /, po czym spadek i w dalszej części doświadczenia liczebność tej grupy bakterii utrzymywała się na stałym poziomie.

Natomiast benzo/a/piren dozowany w stężeniu $0,48 \text{ mg/dm}^3$ /rys. 36 i 37/ wywoływał w początkowym okresie bardzo wyraźną stymulację rozwoju bakterii psychrofilnych, proteolitycznych, denitryfikacyjnych i amylolitycznych przy równoczesnym spadku liczebności bakterii przetrwalnikujących. Po 14 dniach

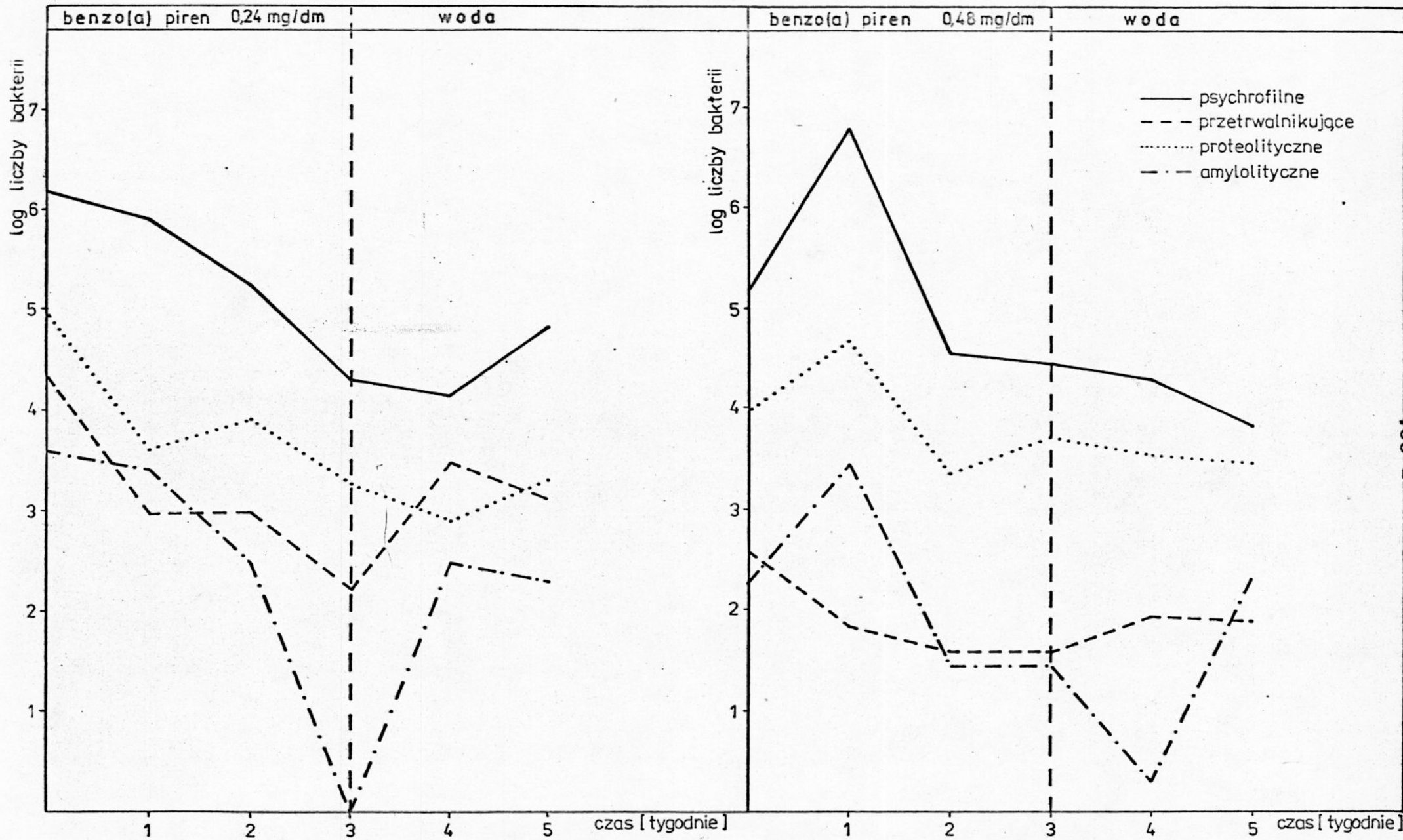


Rys. 34. Zmiany liczby bakterii psychrofilnych, przetrwalnikujących, proteolitycznych i amylolitycznych podczas sorpcji i desorpcji WWA przez filtr glebowy (próba kontrolna).

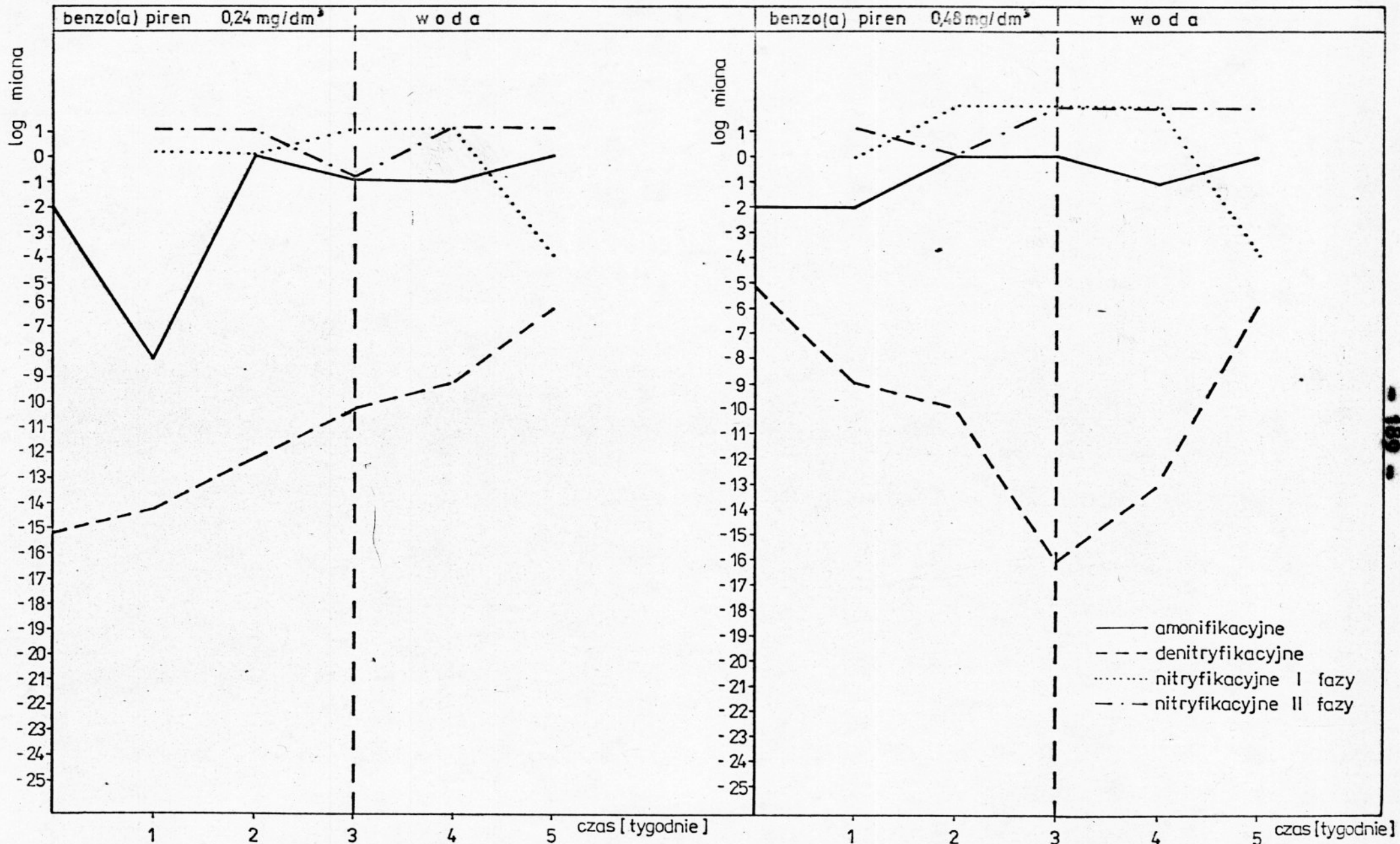
- 185 -



Rys. 35. Zmiany miana bakterii denitryfikacyjnych, amonifikacyjnych, nitryfikacyjnych I fazy i nitryfikacyjnych II fazy podczas sorpcji i desorpcji WWA przez filtr glebowy (próba kontrolna).



Rys.36. Zmiany liczby bakterii psychrofilnych, przetrwalnikujacych, proteolitycznych i amyloolitycznych podczas sorpcji i desorpcji benzo(a) pirenu przez filtr glebowy.

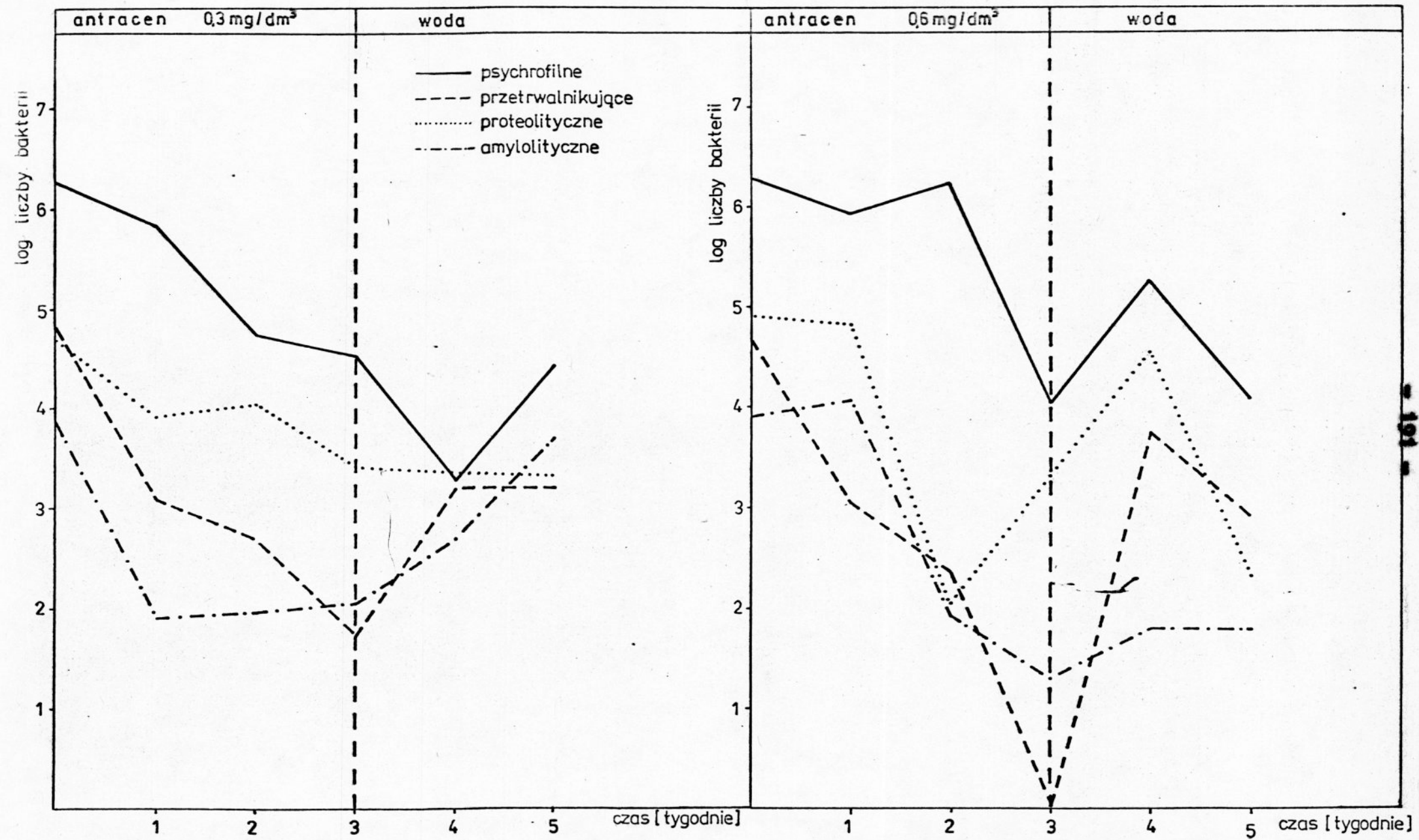


Rys.37. Zmiany miana bakterii denitryfikacyjnych, amonifikacyjnych, nitryfikacyjnych I fazy i nitryfikacyjnych II fazy podczas sorpcji i desorpcji benzo(a) pirenu przez filtr glebowy.

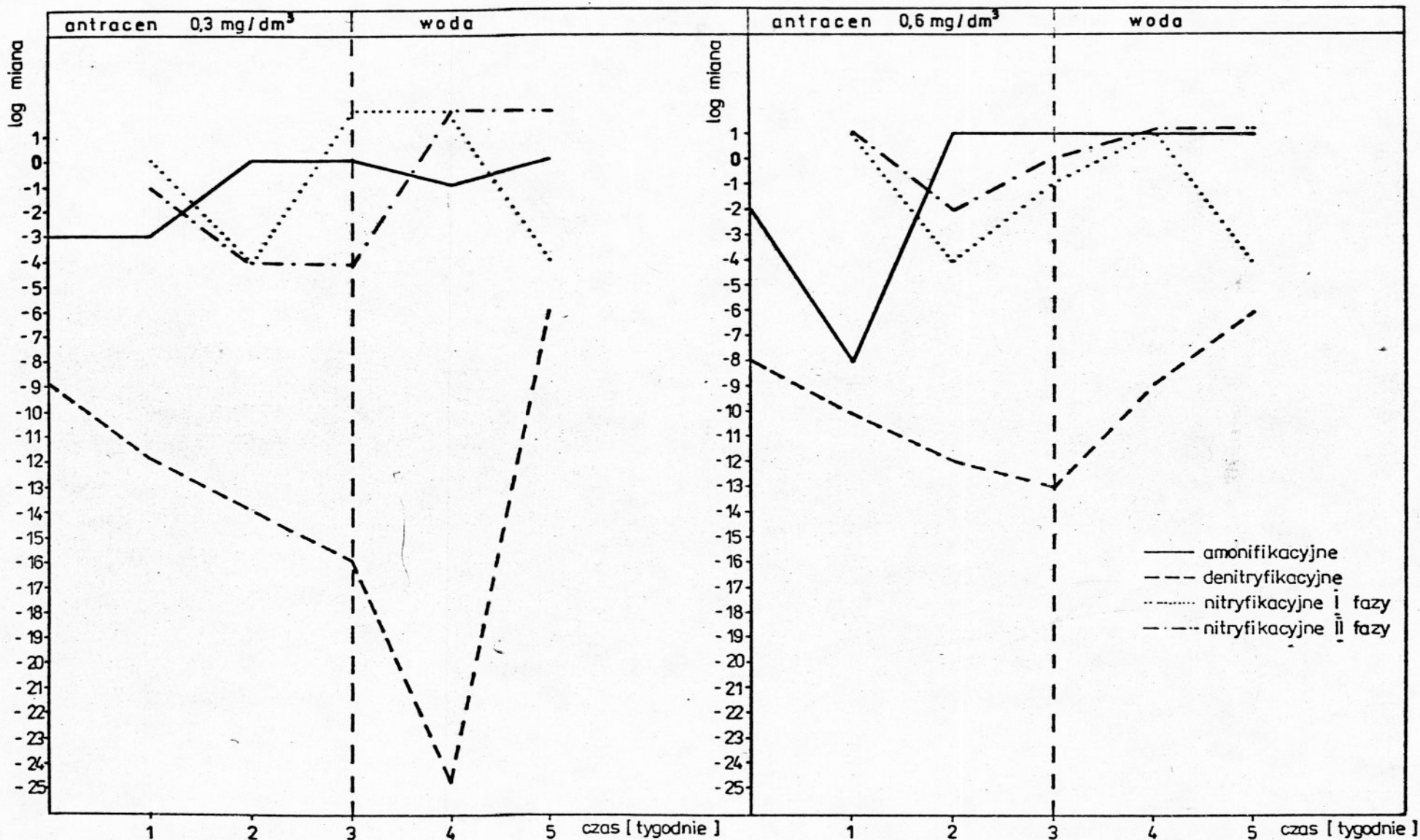
ilość bakterii psychrofilnych, proteolitycznych i amyloolitycznych, ustaliła się na poziomie zbliżonym do wartości początkowych i do końca doświadczenia ulegała tylko bardzo nieznacznemu obniżeniu. Interesujący wydaje się wpływ benzo/a/pirenu na bakterie denitryfikacyjne. Bakterie te w okresie dozowania omawianego związku systematycznie rozwijały się, a ich miano obniżyło się z $1 \cdot 10^{-5}$ do $1 \cdot 10^{-16}$ lecz po zaprzestaniu dozowania, również systematycznie wzrosło do miana $1 \cdot 10^{-6}$. Nie zaobserwowano natomiast istotnego wpływu benzo/a/pirenu w stężeniu $0,48 \text{ mg/dm}^3$ na rozwój nitryfikatorów I i II fazy.

Ogólnie można powiedzieć, że niższe stężenie benzo/a/pirenu nie wpływało w istotny sposób za wyjątkiem bakterii amyloolitycznych - na skład mikroflory wymywanej z lizymetru. W przypadku benzo/a/pirenu w stężeniu $0,48 \text{ mg/dm}^3$ otrzymano wyniki ściśle korelujące z wynikami badań dotyczącymi wpływu tego związku na mikroflorę wodną. A zatem z całą pewnością można wysnuć wniosek o działaniu stymulującym na rozwój bakterii.

Przy zastosowaniu antracenu w stężeniach $0,3$ i $0,6 \text{ mg/dm}^3$ /rys. 38 i 39/ zaobserwowano bardzo wyraźny, systematyczny spadek liczebności bakterii psychrofilnych, proteolitycznych, amonifikacyjnych i amyloolitycznych oraz przetrwalnikujących, przy czym obserwowano istotną zależność tych zmian od zastosowanego stężenia badanego związku. Obserwowany spadek liczebności bakterii wymienionych grup był znacznie wyraźniejszy w przypadku dwukrotnie wyższego stężenia antracenu. Natomiast bakterie przemian azotowych - denitryfikacyjnych i nitryfikacyjnych obu faz - reagowały wyraźną stymulacją rozwoju.



Rys.38. Zmiany liczby bakterii psychrofilnych, przetrwalnikujących, proteolitycznych i amylobitycznych podczas sorpcji i desorpcji antracenu przez filtr glebowy.



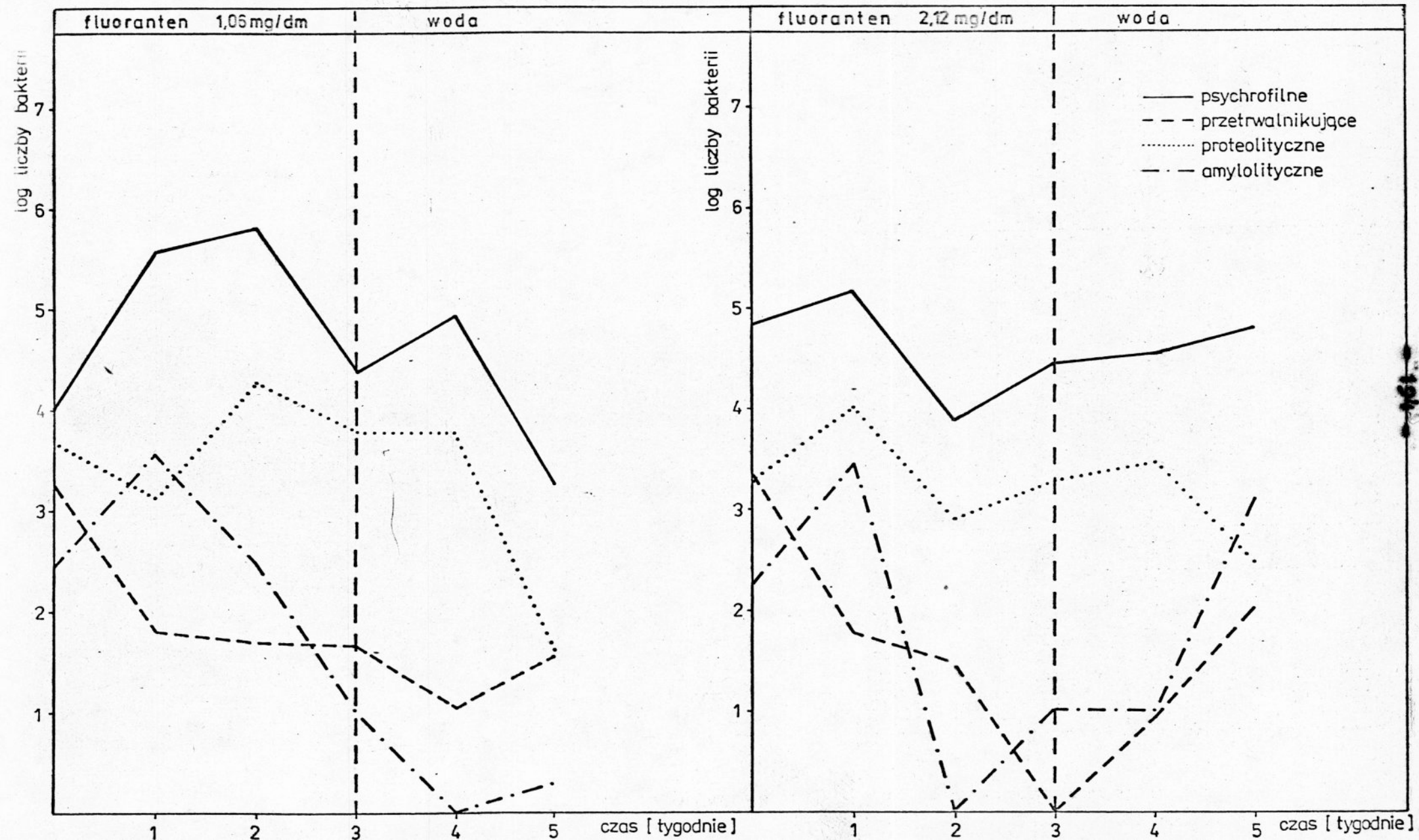
Rys.39. Zmiany miana bakterii denitryfikacyjnych, amonifikacyjnych, nitryfikacyjnych I fazy i nitryfikacyjnych II fazy podczas sorpcji i desorpcji antracenu przez filtr glebowy.

Pomimo tak głębokich zmian w liczebności mikroflory, badane bakterie nie utraciły zdolności regeneracyjnych. Dowodzi tego fakt, iż w okresie 14 dni przemywania lizymetrów wodą redestylowaną obserwowano systematyczny wzrost liczebności bakterii psychrofilnych, przetrwalnikujących, proteolitycznych, podczas gdy bakterie amonifikacyjne utrzymywały się na stałym poziomie, zaś pozostałe grupy bakterii przemian azotowych wykazywały spadek liczebności.

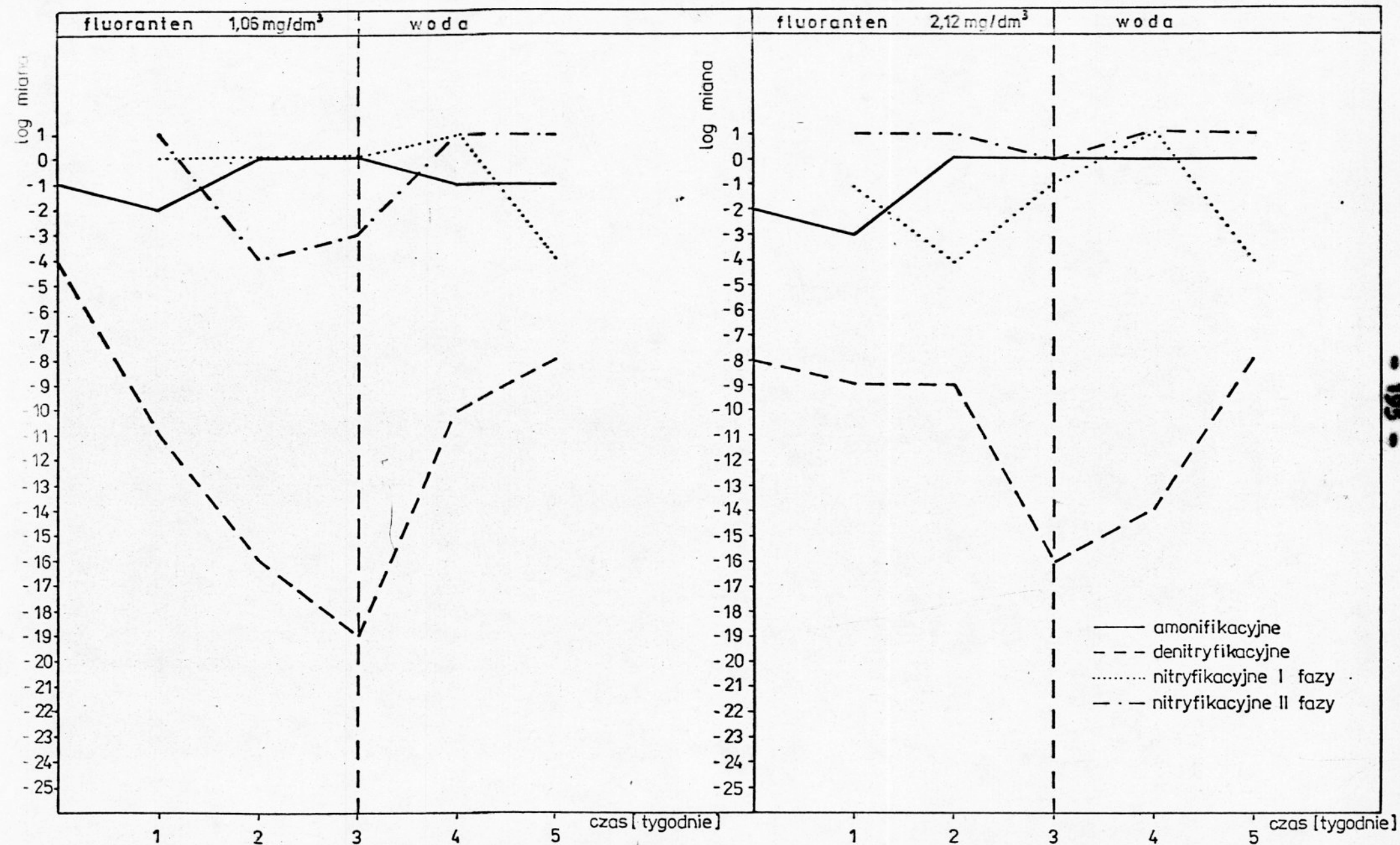
Reasumując należy stwierdzić, że antracen w stosowanych dwóch stężeniach wywierał wyraźny hamujący wpływ na mikroflorę gleby, co dotyczy zwłaszcza stężenia $0,6 \text{ mg/dm}^3$. Interesujący jest fakt spadku liczebności większości badanych grup bakterii przy jednoczesnym znacznym rozwoju bakterii denitryfikacyjnych. Hamujący wpływ antracenu został także potwierdzony przez gwałtowny wzrost populacji bakterii po zaprzestaniu dozowania omawianego związku.

Fluoranten dozowany do filtrów glebowych powodował wyraźną stymulację rozwoju niektórych grup bakterii.

W przypadku stężenia $1,06 \text{ mg/dm}^3$ /rys. 40 i 41/ obserwowano znaczny przyrost w początkowej fazie liczby bakterii psychrofilnych, amonifikacyjnych, nitryfikacyjnych II fazy i denitryfikacyjnych oraz amyloolitycznych. W stosunku do bakterii denitryfikacyjnych tendencja ta utrzymywała się w całym okresie dozowania fluorantenu. Inaczej zachowywała się grupa bakterii amyloolitycznych, które po początkowym okresie dobrego rozwoju zaczęły z zespołu ustępować, po czym znowu - pod koniec doświadczenia - ich liczba nieznacznie wzrosła.



Rys. 40. Zmiany liczby bakterii psychrofilnych, przetrwalnikujących, proteolitycznych i amylolitycznych podczas sorpcji i desorpcji fluorantenu przez filtr glebowy.



Rys. 41. Zmiany miana bakterii denitryfikacyjnych, amonifikacyjnych, nitryfikacyjnych I fazy i nitryfikacyjnych II fazy podczas sorpcji i desorpcji fluorantenu przez filtr glebowy.

Podwyższenie stężenia fluorantenu do $2,12 \text{ mg/dm}^3$ /rys. 36 i 37/ spowodowało niewielką stymulację rozwoju bakterii psychrofilnych, proteolitycznych, amonifikacyjnych i denitryfikacyjnych a także amyloolitycznych, poprzedzającą wyraźny wpływ hamujący, który od początku był wyraźny w stosunku do bakterii przetrwalnikujących. Po zaprzestaniu dozowania fluorantenu obserwowano ponowny rozwój bakterii omawianych grup.

Uzyskane wyniki wskazują, iż fluoranten w stosowanych stężeniach wykazuje wpływ hamujący po okresie początkowej stymulacji rozwoju. Wpływ hamujący na grupę bakterii przetrwalnikujących, obserwowano od początku doświadczenia. Podobnie jak w przypadku pozostałych badanych węglowodorów fluoranten stymulował rozwój bakterii denitryfikacyjnych.

Reasumując należy stwierdzić, że antracen, benzo/a/piren i fluoranten w zastosowanych stężeniach wywierały bardzo różnorodny wpływ na mikroflorę gleby ocenianą poprzez analizę bakteriologiczną wyników z lizymetrów.

W próbie kontrolnej następował systematyczny spadek liczebności bakterii badanych grup powodowany przypuszczalnie zużyciem i wymywaniem z gleby związków biogenych. Nie zaobserwowano istotnego wpływu na mikroflorę glebową antracenu w stężeniu $0,3 \text{ mg/dm}^3$ i benzo/a/pirenu w stężeniu $0,24 \text{ mg/dm}^3$ poza bakteriami amyloolitycznymi i denitryfikacyjnymi.

Zupełnie odmiennie oddziaływał benzo/a/piren w stężeniu wyższym poprzez bardzo wyraźną stymulację rozwoju bakterii. Natomiast fluoranten wykazywał działanie hamujące

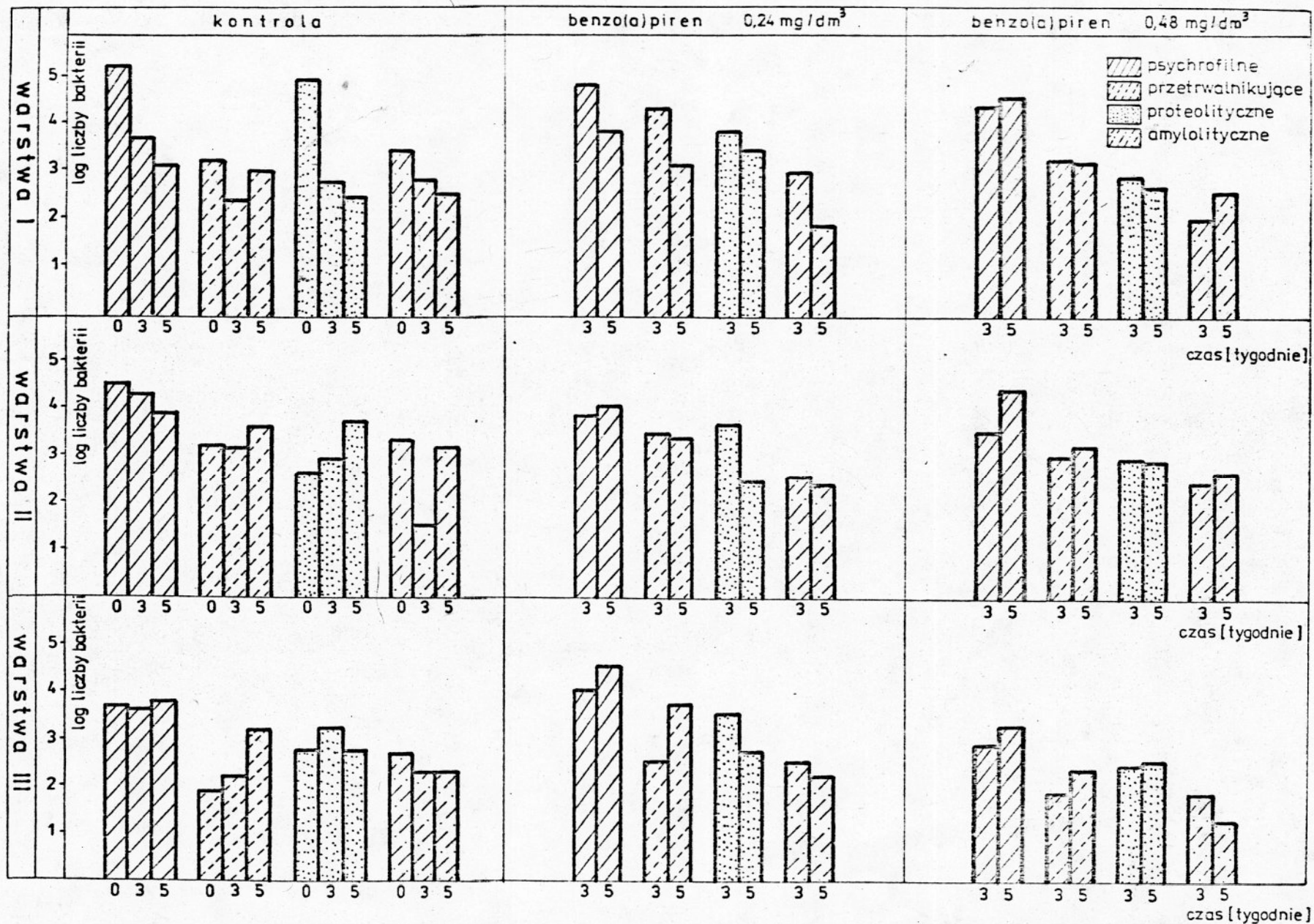
poprzedzane wcześniejszą stymulacją rozwoju bakterii, zwłaszcza w stężeniu $2,12 \text{ mg/dm}^3$.

We wszystkich próbach, do których dozowano wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne obserwowano znaczne obniżenie liczebności bakterii przetrwalnikujących. Największą wrażliwość na dozowane związki stwierdzono u bakterii amyloolitycznych. W większości przypadków zanotowano wzrost liczby bakterii denitryfikacyjnych pod wpływem stosowanych WWA. W okresie dozowania wody redestylowanej większość grup bakterii uzyskiwała liczebność wyjściową a zatem skutki oddziaływania antracenu, benzo/a/pirenu i fluorantenu były odwracalne.

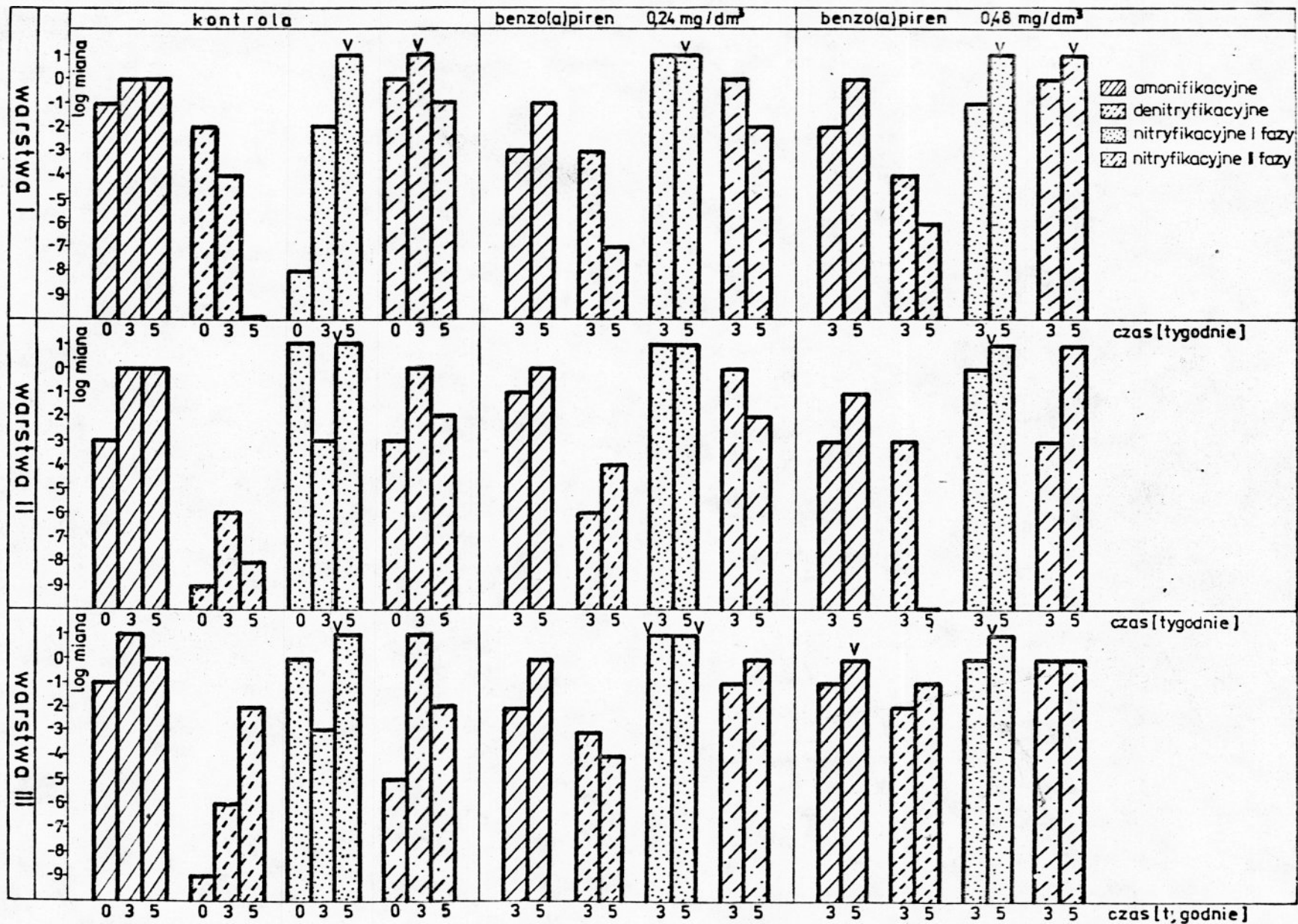
4.2.5.1.2. Selekcja bakterii pod wpływem WWA oceniana w profilach glebowych lizymetrów.

W celu określenia zmian liczebności bakterii psychrofilnych, przetrwalnikujących, proteolitycznych, amonifikacyjnych, nitryfikacyjnych I i II fazy, denitryfikacyjnych oraz amyloolitycznych w profilach glebowych lizymetrów, pod wpływem dozowanych w sposób ciągły wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, wykonano analizy bakteriologiczne gleby w czasie 0 oraz po 21 dobach dozowania WWA. Aby określić zdolności regeneracyjne bakterii glebowych wykonano analogiczne analizy po 14 dobach przemywania filtrów glebowych, wodą redestylowaną.

Uzyskane wyniki badań przedstawiono na rysunkach 42, 43, 44, 45.



Rys. 42. Liczba bakterii psychrofilnych, przetrwalnikujących, proteolitycznych i amylolitycznych w glebie modeli doświadczalnych (próba kontrolna i z benzo(a)pirenem)



Rys.43. Miłano bakterii denitryfikacyjnej, amonifikacyjnych, nitryfikacyjnych I fazy i nitryfikacyjnych II fazy w glebie modeli doświadczałnych (próba kontrolna i z benzo(a)pirenem)

Jak widać w próbie kontrolnej /rys. 42,43/ ilość bakterii psychrofilnych ulegała systematycznemu obniżaniu w górnej i środkowej warstwie gleby, natomiast w dolnej warstwie, piaszczystej, utrzymywała się mniej więcej na stałym poziomie. Zjawisko to spowodowane było prawdopodobnie procesem wymywania zarówno związków biogenych jak i przemieszczania się samych bakterii.

Podobnie wahania liczebności bakterii przetrwalnikujących i proteolitycznych wynikały z przemieszczania się ich w warstwach filtrów glebowych.

Natomiast obserwowane zmniejszanie się liczby bakterii amylo-litycznych było wyraźne we wszystkich warstwach gleby w zestawieniu z ich ubytkiem w wyciekach z lizymetru kontrolnego dowodzi ustępowania tej grupy bakterii związanej przypuszczalnie ze zubażaniem podłoża w substraty pokarmowe.

Bakterie przemian związków azotowych występowały w próbie kontrolnej w stosunkowo niewielkich ilościach z wyjątkiem bakterii denitryfikacyjnych, które były dość licznie reprezentowane.

Ilość bakterii amonifikacyjnych i nitryfikacyjnych I i II fazy wykazywały tendencję spadkową poza nitryfikatorami obu faz w warstwie powierzchniowej.

W lizymetrze do którego dozowano benzo/a/piren w stężeniu $0,24 \text{ mg/dm}^3$ /rys. 42 i 43/ obserwowano przemieszczanie się bakterii psychrofilnych i przetrwalnikujących z powierzchniowej do głębszych warstw gleby. Natomiast liczba bakterii proteolitycznych i amylo-litycznych uległa we wszystkich warstwach gleby podwyższeniu w stosunku do gleby kontrolnej.

w okresie dozowania związku, a następnie obniżeniu. Pozostałe grupy bakterii wykonywały nieznaczne wahania.

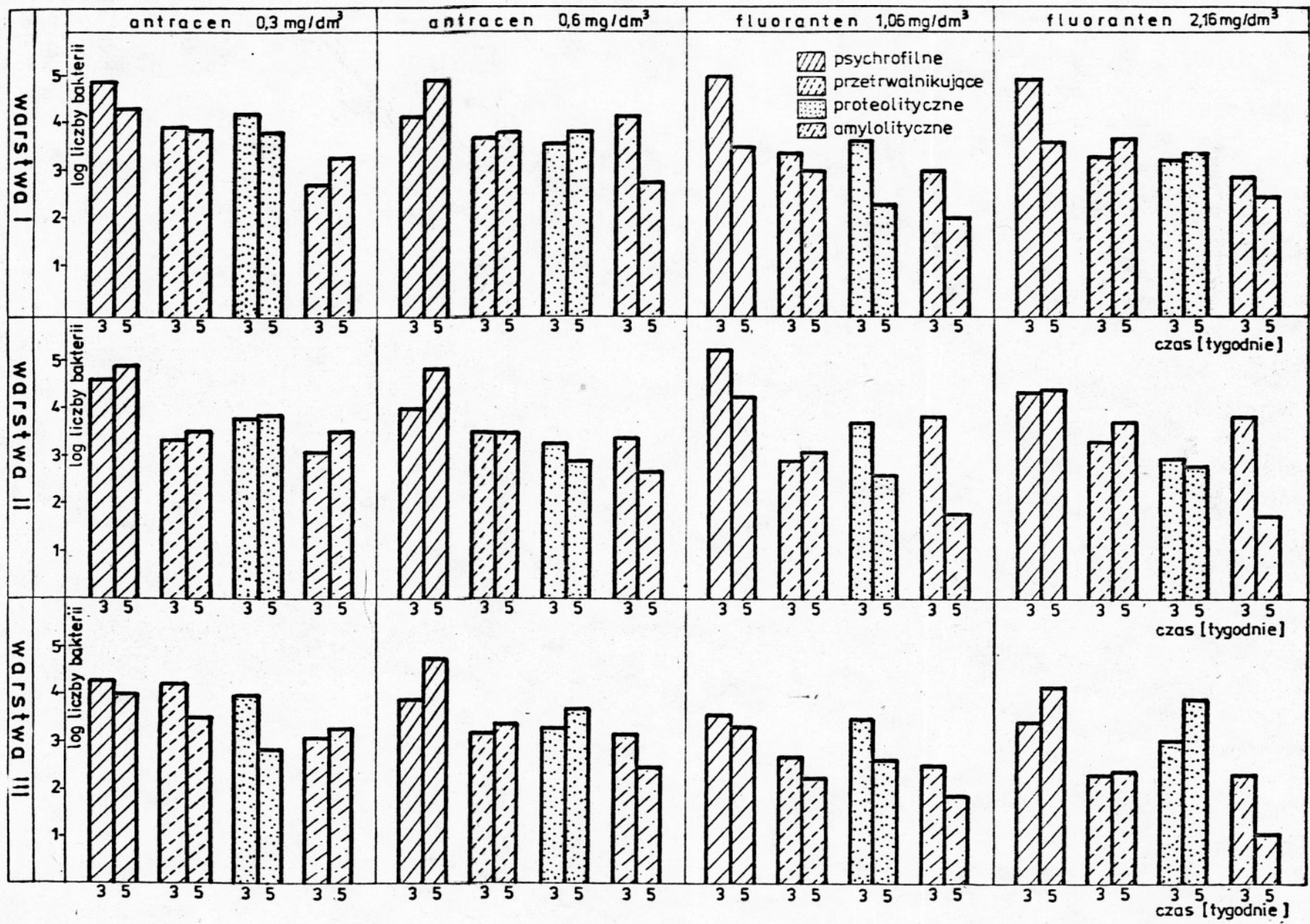
W lizymetrze, do którego dozowano benzo/a/piren w stężeniu dwukrotnie wyższym /rys. 40 i 41/ obserwowano przyrost ilości bakterii psychrofilnych. Nie zanotowano istotnego wpływu badanego związku na liczebność bakterii przetrwalnikujących i proteolitycznych.

Wyraźny wpływ hamujący wykonywał benzo/a/piren w stężeniu $0,48 \text{ mg/dm}^3$ w stosunku do bakterii amyrolitycznych, zaś stymulujący w stosunku do bakterii przemian azotowych.

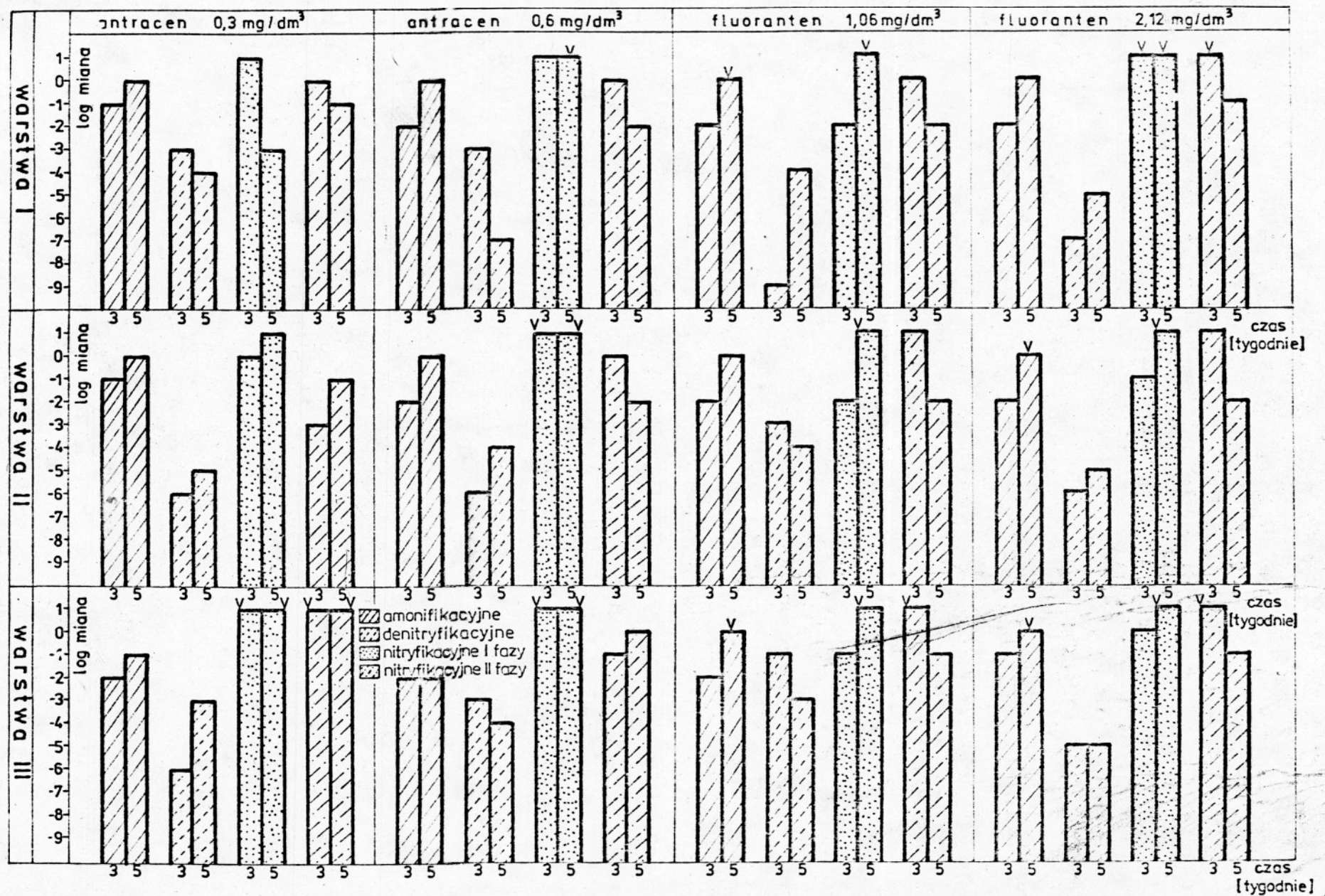
Ogólnie należy stwierdzić, iż benzo/a/piren w stosowanych stężeniach powodował znaczne zmiany mikroflory glebowej polegające na stymulacji rozwoju większości badanych grup bakterii przy równoczesnym hamowaniu pozostałych.

W glebie lizymetru, do którego dozowano antracen w stężeniu $0,3 \text{ mg/dm}^3$ /rys. 44 i 45/ zaobserwowano niewielki wzrost populacji bakterii w stosunku do próby kontrolnej. Jedyne dał się zauważyć niekorzystny wpływ dozowanego węglowodoru na bakterie przemian azotowych, co w konsekwencji doprowadziło do zaniku bakterii nitryfikacyjnych I i II fazy /miano 10/.

Antracen w stężeniu $0,6 \text{ mg/dm}^3$ /rys. 44 i 45/ spowodował obniżenie ilości w glebie bakterii psychrofilnych we wszystkich trzech warstwach gleby, jednakże po zaprzestaniu dozowania związku zanotowano wyraźny ich rozwój. Liczebność bakterii przetrwalnikujących, amyrolitycznych i proteolitycznych była nieznacznie wyższa w stosunku do próby kontrolnej z tym, że liczba bakterii amyrolitycznych w końcowej fazie badań



Rys. 44. Liczba bakterii psychrofilnych, przetrwalnikujących, proteolitycznych i amylolitycznych w glebie modeli doświadczalnych (próba z antracenenem i fluorantenem)



Rys. 45. Miano bakterii denitryfikacyjnych, amonifikacyjnych, nitryfikacyjnych I fazy i nitryfikacyjnych II fazy w glebie modeli doświadczalnych (próby z antracenenem i fluorantenenem)

we wszystkich warstwach gleby uległa pięciokrotnemu obniżeniu. Nie zaobserwowano istotnego wpływu antracenu w stężeniu $0,6 \text{ mg/dm}^3$ na liczebność bakterii przemian azotowych, za wyjątkiem nitryfikatorów I fazy, które praktycznie ustąpiły we wszystkich trzech warstwach gleby /miano 10/.

Ogólnie można stwierdzić, iż antraceni nie powodował istotnych zmian ilościowych w mikroflorze gleby, poza wyraźnym jego wpływem na bakterie nitryfikacyjne I i II fazy.

W glebie lizymetru, do którego dozowano fluorantenu w stężeniu $1,06 \text{ mg/dm}^3$ /rys. 40 i 41/ obserwowano intensywny rozwój bakterii psychrofilnych /zwłaszcza w warstwie powierzchniowej/, a także proteolitycznych, w całym profilu glebowym. Ponadto obserwowano korzystny wpływ fluorantenu na rozwój bakterii amonifikacyjnych, denitryfikacyjnych i nitryfikacyjnych I fazy przy równoczesnym hamowaniu rozwoju bakterii nitryfikacyjnych II fazy.

Zaobserwowane zmiany w liczebności bakterii badanych grup pod wpływem fluorantenu w stężeniu $2,12 \text{ mg/dm}^3$ świadczyły o jego wpływie selekcyjnym zwłaszcza w stosunku do bakterii nitryfikacyjnych. W stosunku do pozostałych grup obserwowano przemieszczanie się bakterii w profilu glebowym.

Uzyskane wyniki wskazują, iż fluorantenu powodował stymulację rozwoju mikroflory glebowej, zwłaszcza obserwowano to przy zastosowaniu niższego stężenia, które wydaje się optymalnym dla rozwoju bakterii.

Reasumując należy stwierdzić, iż dozowane do filtrów glebowych wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne stano-

wiły źródło węgla i energii dla niektórych bakterii.

Jednakże zaobserwowany różnorodny wpływ badanych związków na mikroflorę, uzależniony był nie tylko od rodzaju stosowanego związku, ale również od jego stężenia. Wpływ ten obserwowano z jednej strony poprzez przemieszczanie się bakterii w profilu glebowym, czego skutkiem mogło być ich wymywanie z gleby, z drugiej zaś strony przez wyraźnie hamujący wpływ na ich rozwój.

4.2.5.2. Badania modelowe nad przemieszczaniem się badanych WWA z gleby do wody.

Badania nad przemieszczaniem się benzo/a/pirenu, antracenu i fluorantenu z gleby do wody prowadzono w omówionym układzie modelowym, w dwóch wariantach. W pierwszym zastosowano glebę pobraną na stanowisku badawczym, w drugim wariantcie pobraną glebę poddano sterylizacji w celu wyeliminowania naturalnej mikroflory z procesów sorpcyjnych.

4.2.5.2.1. Badania nad sorpcją WWA w glebie niesterylnej

Wyniki badań dotyczących zawartości wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w przesączach z filtrów glebowych przedstawiono w tabeli 37.

Przed rozpoczęciem dozowania badanych WWA, filtr glebowy poddano 24 godzinnemu przemywaniu wodą redestylowaną oznaczając w przesączu zawartość benzo/a/pirenu, antracenu i fluorantenu. W przesączach stwierdzono jedynie obecność fluorantenu w

ilości 2,03% w stosunku do wzorca 1,06 mg/dm³.

W próbie kontrolnej, w czasie 35 dób dozowania wody redestylowanej nie zanotowano obecności w przesączach żadnego z trzech badanych węglowodorów.

W odpływach z lizymetrów, do których dozowano antracen w dwóch stężeniach /tabela 17/ ubytek związku w stosunku do ilości badanej był stuprocentowy.

Analogiczne wyniki uzyskano w przypadku obu stężeń /tabela 17/ benzo/a/pirenu. W odpływie z filtra glebowego do którego dozowano fluoranten w stężeniu 1,06 mg/dm³, po 7 dniach trwania doświadczenia, pomimo stwierdzonej oznaczalnej ilości związku w odpływie początkowym, fluoranten występował jedynie w ilościach śladowych. Natomiast w kolejnych próbach stwierdzono, jego ubytek stuprocentowy. W przypadku dwukrotnie wyższego stężenia badanego związku, stwierdzono stuprocentowy ubytek dopiero po 14 dobach dozowania wody redestylacyjnej, podczas gdy we wcześniejszych okresach poboru prób stwierdzono w odpływach jego obecność.

Wyniki badań dotyczących zawartości badanych węglowodorów w profilu glebowym filtra przedstawiono w tabeli 38.

W próbach gleby z lizymetru kontrolnego w żadnej z trzech warstw, w całym cyklu badawczym, nie stwierdzono obecności antracenu, benzo/a/pirenu i fluorantenu.

W glebie, do której dozowano antracen, badany związek stwierdzono sporadycznie w drugiej /środkowej/ i w trzeciej /dolnej/ warstwie gleby. Przeciwnie, obecność benzo/a/pirenu, stwierdzono jedynie w warstwie I-powierzchniowej.

Natomiast fluoranten występował w glebie praktycznie w całym

Tabela 37

Procentowy ubytek antracenu, benzo/a/pirenu i fluorantenu w próbach z przesączów z filtrów glebowych /niesterylizowanych/

Rodzaj próby	Kontrola ^x	Antraceni		benzo/a/piren		fluoranteni	
stężenie badane czas /doby/	0	0,3 mg/dm ³	0,6 mg/dm ³	0,24 mg/dm ³	0,48 mg/dm ³	1,06 mg/dm ³	2,12 mg/dm ³
0	nw ^{xx}	nw	nw	nw	nw	2,03	nw
7	nw	100	100	100	100	śląd	śląd
14	nw	100	100	100	100	100	śląd
21	nw	100	100	100	100	100	99,6
28	nw	100	100	100	100	100	96,5
35	nw	100	100	100	100	100	100

x - próbę kontrolną badano w kierunku obecności antracenu, benzo/a/pirenu i fluorantenu

xx nw - nie wykryto

cyklu badawczym i to zarówno przy dozowaniu stężenia $1,06 \text{ mg/dm}^3$ i $2,12 \text{ mg/dm}^3$, jednakże nie zaobserwowano korelacji pomiędzy stężeniem fluorantenu z ilością otrzymaną w wyniku ekstrakcji gleby. Bliższych badań i wyjaśnienia wymaga jednak zanotowanie zjawiska zaniku przepuszczalności gleby w czasie dozowania fluorantenu.

W sumie należy stwierdzić, iż badane wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, były w znacznym stopniu usuwane z wody w czasie filtracji przez glebę. Stuprocentową skuteczność filtra glebowego zanotowano w przypadku antracenu i benzo/a/pirenu, chociaż niewielkie ich ilości stwierdzano w glebie. Pomimo, iż obecność fluorantenu obserwowano w glebie w filtrze, do którego dozowano badany związek w ilości $1,06 \text{ mg/dm}^3$, w przesączach glebowych występował on w ilościach śladowych. Dwukrotnie wyższe stężenie fluorantenu nie było już tak skutecznie usuwane z wody. Należy tu ponadto podkreślić iż pod wpływem dozowania tego związku zmieniały się po dłuższym czasie własności fizyczno-chemiczne gleby. Ich skutkiem była pełna utrata przepuszczalności gleby.

Biorąc pod uwagę fakt, iż dozowane do lizametrów stężenia WWA były wysokie, a stwierdzone zarówno w odpływach jak i w glebie ilości antracenu, benzo/a/pirenu i fluorantenu niewielkie, bądź śladowe, można stwierdzić, iż stopień ich usuwania z gleby jest bardzo wysoki. Tak znaczną aktywnością gleby w usuwaniu badanych WWA można tłumaczyć fakt nie wykrycia ich w próbach przed rozpoczęciem doświadczeń. Natomiast potencjalne skażenie gleby na badanym terenie znajduje swe potwierdzenie w analizie żużlu pochromowego,

Tabela 38

Procentowa zawartość antracenu, benzo/a/pirenu i fluorantenu w glebie z lizymetrów niesterylizowanych w czasie 0, po 21 dobach dozowania WWA i 14 dobach dozowania wody redestylowanej.

Warstwy gleby	Rodzaj próby	Kontrola	antracen		benzo/a/piren		fluoranten	
	stężenie badane		0,3 mg/dm ³	0,6 mg/dm ³	0,24 mg/dm ³	0,48 mg/dm ³	1,06 mg/dm ³	2,12 mg/dm ³
	Czas [doby]		0					
I /górna /	0	nw ^{xx}	nw	nw	nw	nw	śląd	śląd
	21	nw	nw	nw	nw	2,95	śląd	śląd
	35	nw	nw	nw	śląd	1,5	2,03	1,62
II /środkowa/	00	nw	nw	nw	nw	nw	0,8	0,4
	21	nb ^{xxx}	nb	nb	nb	nb	nb	nb
	35	nw	3,0	śląd	nw	nw	śląd	0,6
III /dolna/	0	nw	nw	nw	nw	nw	0,8	0,4
	21	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
	35	nw	nw	śląd	nw	nw	śląd	nw

x wszystkie próby były badane w kierunku antracenu, benzo/a/pirenu i fluorantenu

xx nw nie wykryto

xxx nb nie badano, by nie naruszyć struktury filtra glebowego

w którym stwierdzono obecność 1,999 mg/kg benzo/a/pirenu. Benzo/a/piren ten może być przemieszczany z hałdy na okoliczne tereny na skutek pylistej struktury odpadów hutniczych, łatwo unoszonych przez wiatr.

4.2.5.2.2. Udział mikroflory gleby w sorpcji i desorpcji wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych.

W celu wyjaśnienia udziału mikroflory w procesie usuwania WWA, przeprowadzono analogiczne do opisanych badania z zastosowaniem gleby sterylizowanej przez 30 minut w temp. 121°C pod ciśnieniem 1,5 atmosfery. Otrzymane wyniki dotyczące ubytku WWA w przesączach przedstawiono w tabeli 39.

W przesączach przez filtry glebowe przed dozowaniem badanych związków nie stwierdzono obecności antracenu, benzo/a/pirenu i fluorantenu. Również w całym cyklu badań nie zanotowano pojawienia się żadnego z badanych węglowodorów w próbie kontrolnej, do której dozowano jedynie wodę redestylowaną.

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, iż antracen w stosowanych stężeniach usuwany jest w procesie filtracji bez udziału mikroflory, na drodze zjawisk fizykochemicznych. Również benzo/a/piren w stężeniu 0,24 mg/dm³, był usuwany w 100%. Jedynie przy stężeniu 0,48 mg/dm³, po 3 tygodniach dozowania związku ubytek w przesączu wynosił 98,5%, po czym podczas dozowania wody redestylowanej benzo/a/piren nie pojawił się już w odpływie.

Tabela 39

Procentowy ubytek antracenu, benzo/a/pirenu i fluorantenu w próbach przesączów z filtrów glebowych sterylizowanych

Rodzaj próby	kontrola ^x	Antracen		benzo/a/piren		fluoranten	
stężenie badane	0	0,3 mg/dm ³	0,6 mg/dm ³	0,24 mg/dm ³	0,48 mg/dm ³	1,06 mg/dm ³	2,12 mg/dm ³
czas /doby/							
0	nw ^{xx}	nw	nw	nw	nw	nw	nw
7	nw	100	100	100	100	100	99,4
14	nw	100	100	100	100	100	96,3
21	nw	100	100	100	98,5	100	98,5
28	nw	100	100	100	100	100	99,4
35	nw	100	100	100	100	100	98,5

x - próbę kontrolną badano w kierunku obecności antracenu, benzo/a/pirenu i fluorantenu

xx nw - nie wykryto

Fluoranten w stężeniu $1,06 \text{ mg/dm}^3$ usuwany był z wody na drodze filtracji w 100%, natomiast w przypadku stężenia $2,12 \text{ mg/dm}^3$ obserwowano jego obecność w odpływie w całym okresie trwania doświadczenia, choć w ilościach niewielkich.

Wyniki badań dotyczących zawartości badanych węglowodorów w profilu glebowym filtra przedstawiono w tabeli 40.

W próbach z lizymetru kontrolnego w żadnej z trzech warstw, w całym cyklu badawczym, nie stwierdzono obecności antracenu, benzo/a/pirenu i fluorantenu.

W lizymetrze, do którego dozowano antracen w stężeniu $0,3 \text{ mg/dm}^3$ zaobserwowano jego znaczną koncentrację, po 21 dobach jego dozowania, w powierzchniowej warstwie gleby. Usunięcie związku następowało dość szybko, gdyż po 14 dobach dozowania wody redestylowanej stwierdzano jedynie jego śladowe ilości. W głębszych warstwach filtra glebowego nie stwierdzano obecności związku. Podobne zjawisko obserwowano w lizymetrze, do którego dozowano antracen w stężeniu dwukrotnie wyższym.

Natomiast benzo/a/piren występował w glebie lizymetrów zarówno po 21 dobach dozowania związku, jak i po 14 dobach przemywania filtra wodą redestylowaną. Z tym, że przy zastosowaniu stężenia $0,24 \text{ mg/dm}^3$ benzo/a/piren, po 14 dobach przemywania lizymetru wodą redestylowaną we wszystkich trzech warstwach gleby stwierdzano go jedynie w ilościach śladowych, podczas gdy przy zastosowaniu dwukrotnie wyższego stężenia ilości te były oznaczalne.

Podobnie fluoranten, obserwowany był we wszystkich warstwach gleby zarówno po 21 dniach dozowania związku, jak i po 14 dniach przemywania lizymetru wodą redestylowaną.

Tabela 40

Procentowa zawartość antracenu, benzo/a/pirenu, i fluorantenu w glebie z lizymetrów sterylizowanych w czasie 0, po 21 dobach dozowania WWA i 14 dobach dozowania wody redestylowanej

Warstwy gleby	Rodzaj próby ^x	Kontrola	antracen		benzo/a/piren		fluoranten		
	stężenie badane		0	0,3	0,6	0,24	0,48	1,06	2,12
	Czas [doby]			mg/dm ³	mg/dm ³	mg/dm ³	mg/dm ³	mg/dm ³	mg/dm ³
I /górna/	0	nw ^{xx}	nw	nw	nw	nw	nw	nw	
	21	nw ^{xxx}	14,6%	-	0,3%	0,3%	0,19%	0,8%	
	35	nw	śląd	śląd	śląd	0,3%	0,14%	0,4%	
II /środkowa/	0	nw	nw	nw	nw	nw	nw	nw	
	21	nw ^{xxx}	nb	nb	nb	nb	nb	nb	
	35	nw	nw	nw	śląd	0,07%	1,6%	nw	
III /dolna/	0	nw	nw	nw	nw	nw	nw	nw	
	21	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	
	35	nw	nw	nw	śląd	0,07%	śląd	1,3%	

x wszystkie próby były badane w kierunku antracenu, benzo/a/pirenu i fluorantenu

xx nie wykryto

xxx nb - nie badano, by nie naruszyć struktury filtra glebowego

Podsumowując przeprowadzony eksperyment można stwierdzić, iż filtracja przez glebę w znacznym stopniu usuwa badane WWA z gleby, przy czym ilość czystych związków w warstwach gleby była niewielka. Pozwala to przypuszczać, iż usuwanie antracenu, benzo/a/pirenu i fluorantenu z gleby odbywa się w przeważającym stopniu na drodze przemian fizyczno-chemicznych tych związków prawdopodobnie związanych z obecnością w niej związków kleszczowych i krzemowych. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt pojawienia się na wykresach widm pików niecharakterystycznych dla substancji wyjściowej, będących prawdopodobnie pochodnymi badanych związków.

A zatem by móc wypowiedzieć się na temat mechanizmów usuwania węglowodorów przez glebę należałoby przeprowadzić bardzo szczegółowe badania w kierunku identyfikacji powstających pochodnych.

Niemniej można stwierdzić, iż w przypadku gleby zawierającej naturalną mikroflorę, proces usuwania związków był bardziej skuteczny.

4.2.6. Badania nad interakcją czystych szczepów bakterii a wybranymi wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi.

Badania nad interakcją czystych szczepów bakterii z benzo/a/pirenem, antracenenem i fluorantenenem miały na celu wykazanie zdolności niektórych mikroorganizmów, wyizolowanych ze środowiska naturalnego, do wykorzystywania tych związków jako substratów energetycznych. Ponadto poszukiwano różnic

w aktywności oddechowej wobec badanych WWA bakterii opornych i wrażliwych na wysokie stężenia stosowanych związków.

Miało to na celu potwierdzenie selekcyjonującego działanie WWA na naturalną mikroflorę wodną. Przede wszystkim jednak poszukiwano odpowiedzi na pytanie, czy powstające w procesie biotransformacji nieaktywnego karcinogennego związku, jakim jest antracen, nie powstają metabolity biologicznie czynne.

4.2.6.1. Izolacje czystych szczepów bakterii wrażliwych i niowrażliwych na wysokie stężenia wybranych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych.

Przeprowadzono izolację czystych szczepów bakterii z wody powierzchniowej i nadosadowej rzeki Olawy wykorzystujących wybrane wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, jako jedyne źródło węgla i energii zastosowano podłoże mineralne, gdzie substratem energetycznym były badane związki w najwyższych stosowanych stężeniach, dla benzo/a/pirenu $0,48 \text{ mg/dm}^3$, antracenu $0,6 \text{ mg/dm}^3$, fluorantenu $2,12 \text{ mg/dm}^3$, acenaftenu $2,4 \text{ mg/dm}^3$ i naftalenu 160 mg/dm^3 .

W ten sposób wyizolowano z wody powierzchniowej 4 szczepy bakterii wykorzystujące benzo/a/piren, 2 szczepy wykorzystujące antracen, 4 szczepy wykorzystujące fluoranten, 4 szczepy wykorzystujące acenaften i 3 wykorzystujące naftalen. Z wody nadosadowej wyizolowano 4 szczepy wykorzystujące benzo/a/piren, 2 antracen, 4 fluoranten, 4 acenaften i 3 naftalen.

Na podstawie dynamiki rozwoju wyizolowanych szczepów w obecności badanych WWA wybrano szczepy wykazujące najlepszy wzrost w celu zastosowania ich do dalszych badań.

Dla benzo/a/pirenu wybrano szczep ϵ_7 wyizolowany z wody powierzchniowej, dla antracenu szczepy $\epsilon/4/1$ pochodzący z wody powierzchniowej i $d/3/2$ z wody nadosadowej, szczep ϵ_5 pochodzący z wody powierzchniowej dla fluorantenu.

Przeprowadzono również izolację szczepów nie posiadających zdolności wzrostu wobec wysokich stężeń badanych związków.

Izolację tą prowadzono w kierunku otrzymania szczepów nie posiadających zdolności wykorzystywania jako jedynej źródła węgla i energii benzo/a/pirenu, antracenu i fluorantenu.

Uzyskane szczepy wykorzystano następnie do badań porównawczych przy obserwacji aktywności oddechowej szczepów opornych na badane WWA, a także zdolności biotransformacji antracenu.

Ogółem przetestowano 17 szczepów bakterii, z których tylko 1 szczep bakterii $/d_7/$ nie miał zdolności do wykorzystywania benzo/a/pirenu jako substratu energetycznego.

Dla antracenu wyizolowano 2 szczepy bakterii charakteryzujące się podobnymi własnościami $/\epsilon_7$ z wody powierzchniowej i d_7 z wody nadosadowej/ a dla fluorantenu 4 szczepy bakterii

- dwa z wody powierzchniowej $/\epsilon_5$ i $\epsilon_7/$ i dwa z nadosadowej $/d_4$ i $d_7/$. W dalszej kolejności przeprowadzono identyfikację wybranych szczepów bakterii opornych i wrażliwych na stosowane w badaniach WWA.

4.2.6.2. Identyfikacja szczepów bakterii wrażliwych i niewrażliwych na wysokie stężenia wielopierścieniowych węglowodórów aromatycznych.

Do dalszych badań wybrano następujące szczepy bakterii: $\epsilon/4/1$, $d/3/2$, ϵ_7 , ϵ_2 , ϵ_5 i d_7 . Cechy identyfikacyjne bakterii przedstawiono w tabeli 41.

Tabela 41

Cechy identyfikacyjne bakterii wrażliwych i niewrażliwych na wysokie stężenia antracenu, benzo/a/pirenu i fluorantenu

Badane cechy	Oznaczenia badanych szczepów					
	$\epsilon/4/1$	$d/3/2$	ϵ_7	ϵ_2	ϵ_5	d_7
kształt	Z	P	L	L	L	L
zarodniki	-	-	-	-	-	-
barwienie Gramma	+	-	+	+/-	+	+
Wzrost w temp.						
4°	-	+++	-	+	+	+
20°	+++	+++	+++	+++	+++	+++
37°	+/-	+++	+	+	-	+
42°	+/-	-	-	-	-	-
ruchliwość	-	-	-	+	+	-
Stosunek do O ₂	tlenowa	wzrost wzdłuż nakłucia	wzrost wzdłuż nakłucia	tlenowy	tlenowy	tlenowy
aktywność katalazowa	+++	+	+++	++	++	+++

c.d. tabeli 41

Badane cechy	Oznaczenia badanych szczepów					
	$\epsilon/4/1$	d/3/2	ϵ_7	ϵ_2	ϵ_5	d ₇
Rozkład węglowodorów	w k g	w k g	w k g	w k g	w k g	w k g
glukoza	++/--	+ - -	+ + -	++/--	++/--	+ + -
arabizoza	++/--	+ + -	+ + -	++/--	++/--	+ + -
laktoza	- - -	+ - -	+ - -	+ - -	+ - -	+ - -
sacharoza	- - -	++/--	+ + -	++/--	++/--	+ + -
mannitol	+ - -	++/--	+ + -	++/--	++/--	+ + -
MR	+	-	-	-	-	-
VP	-	-	+	-	-	+
hydroliza skrobi	-	-	-	-	-	-
uplymienie żelatyny	-	-	-	-	-	-
Redukcja azotanów						
do NO ₂	-	-	+ + +	+/-	-	+ + +
do NH ₃	-	-	-	+ + +	+ + +	-
amonifikacja	+	+	+	+	+	+
hydroliza mocznika	-	-	-	-	-	-
dezaminacja fenyloalaniny	-	-	-	-	-	-
wytwarzanie indolu	-	-	-	-	-	-
wykorzystanie cytrynianu	-	+	-	+	+	-

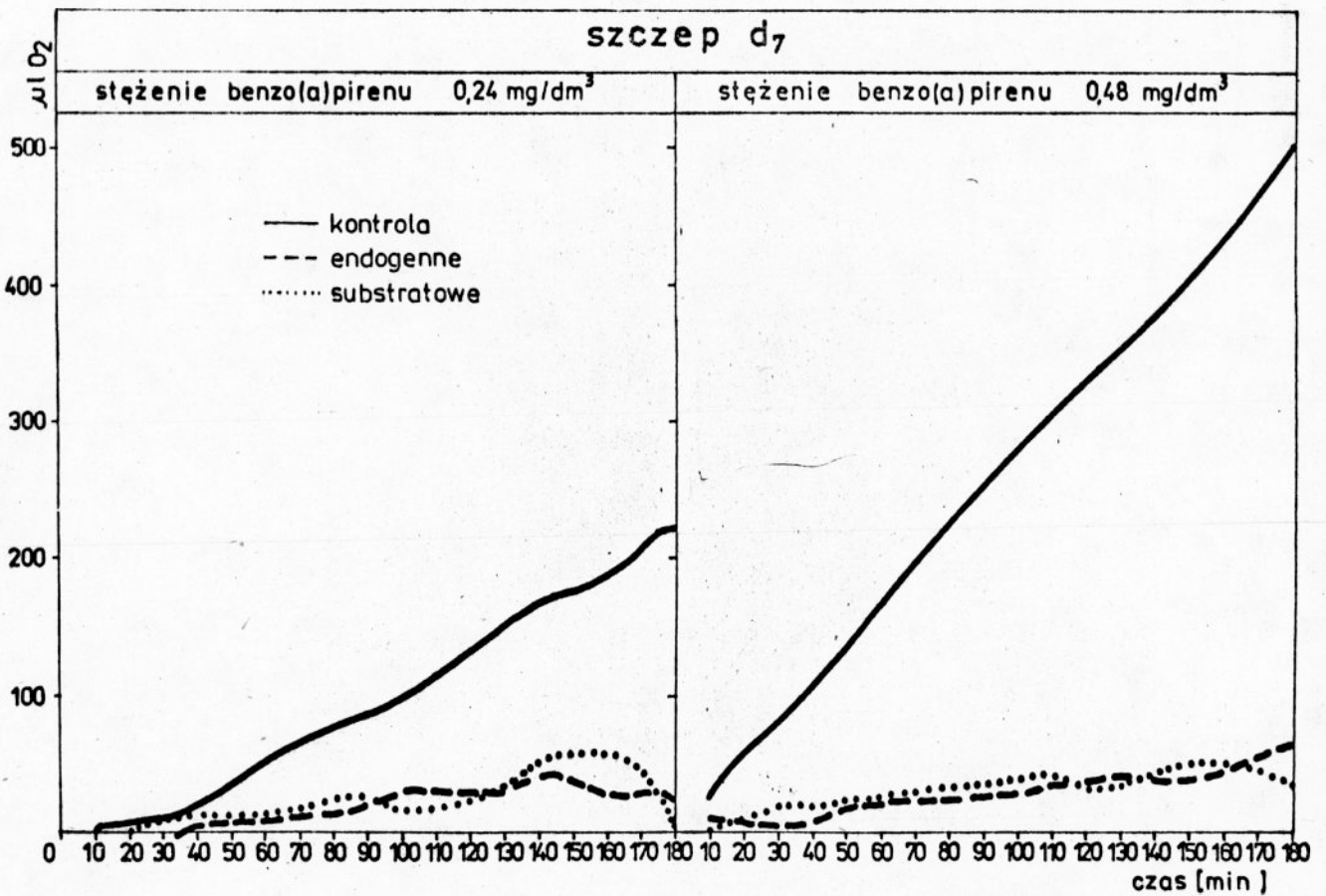
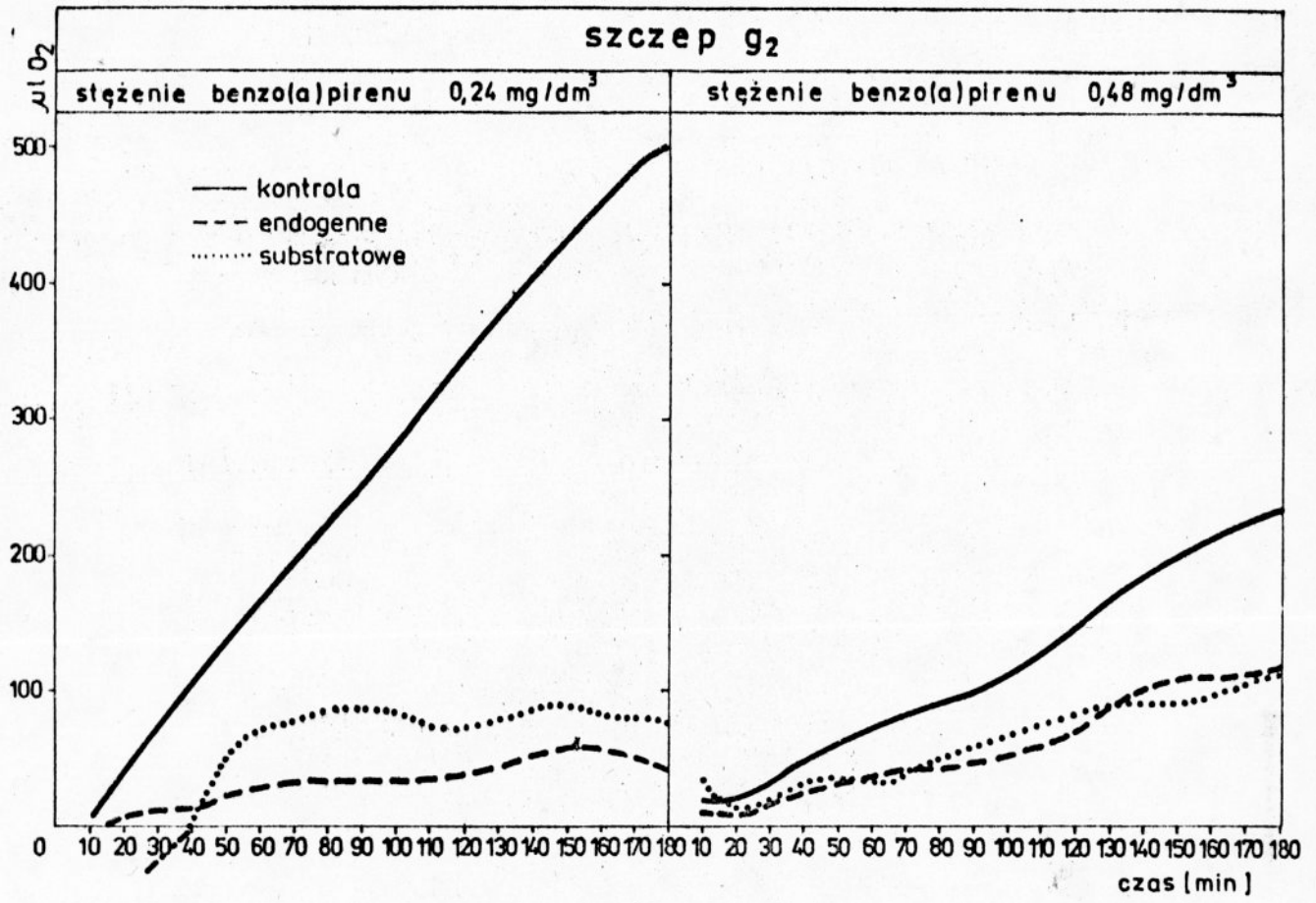
Badane cechy	Oznaczenia badanych szczepów					
	ε/4/1	d/3/2	ε ₇	ε ₂	ε ₅	d ₇
rozkład mleka	pepton.		pepton.	koagul.	koagul.	pepton.
Wzrost wobec NaCl						
2%	+++	-	++	+++	++	++
5%	++	-	+	+	-	++
7%	-	-	+	+	-	++
10%	-	-	-	-	-	-
homoliza krwi	-	+	--	-	+/-	-
wytwarzanie H ₂ S	-	-	-	-	-	-
Wzrost na Mc Conkey'u	-	-	drobne pomar.-brązowe	-	-	drobne pomar.-brązowe
wytwarzanie fluoresceiny	nb	+	nb	nb	nb	nb
wytwarzanie barwnika	-	+	-	-	-	-
oksydaza	nb	+	nb	nb	nb	nb
lizyna	nb	-	nb	nb	nb	nb
podłoże Kliglera	nb	-	nb	nb	nb	nb
Rodzaj i gatunek	Micrococcus luteus	Pseudomonas sp.	Bacillus sp.	Kurtzia sp.	Dacillus sp.	Bacillus sp.

4.2.6.3. Określenie aktywności oddechowej czystych niewrażliwych i wrażliwych szczepów bakterii wobec wybranych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych.

Aby określić wpływ badanych WWA na funkcje fizjologiczne komórek bakterii niewrażliwych i wrażliwych na badane związki, przeprowadzono obserwację nad aktywnością oddechową bakterii w obecności benzo/a/pirenu, antracenu i fluorantenu jako jedynych substratów energetycznych. Ponadto poszukiwano potwierdzenia wcześniejszych wyników sugerujących, iż niektóre bakterie mają odpowiednie wyposażenie enzymatyczne, umożliwiające im biodegradację badanych związków.

Wyniki pomiarów respiromatrycznych prowadzonych metodą Warburga z zastosowaniem szczepów niewrażliwych i wrażliwych przedstawiono dla benzo/a/pirenu na rys. 46, dla antracenu na rys. 47 i dla fluorantenu na rys. 48,

Aktywność oddechowa szczepu S_2 , uznanego na podstawie wcześniejszych badań za wykorzystujący benzo/a/piren jako substrat energetyczny, była dość wysoka /rys. 46/. Benzo/a/piren w stężeniu $0,24 \text{ mg/dm}^3$ był wykorzystywany, na co wskazywał znacznie wyższy pobór tlenu przy oddychaniu substratowym, niż poziom oddychania endogennego. Niemniej związek był substratem trudnodostępnym na co wskazuje różnica aktywności respirometrycznej szczepu pomiędzy ilością pobranego tlenu w procesie utleniania glukozy a benzo/a/pirenu. Natomiast w przypadku dwukrotnie wyższego stężenia badanego związku ilość pobieranego tlenu wobec substratu /benzo/a/pirenu/była zbliżona do aktywności oddechowej endogennej.



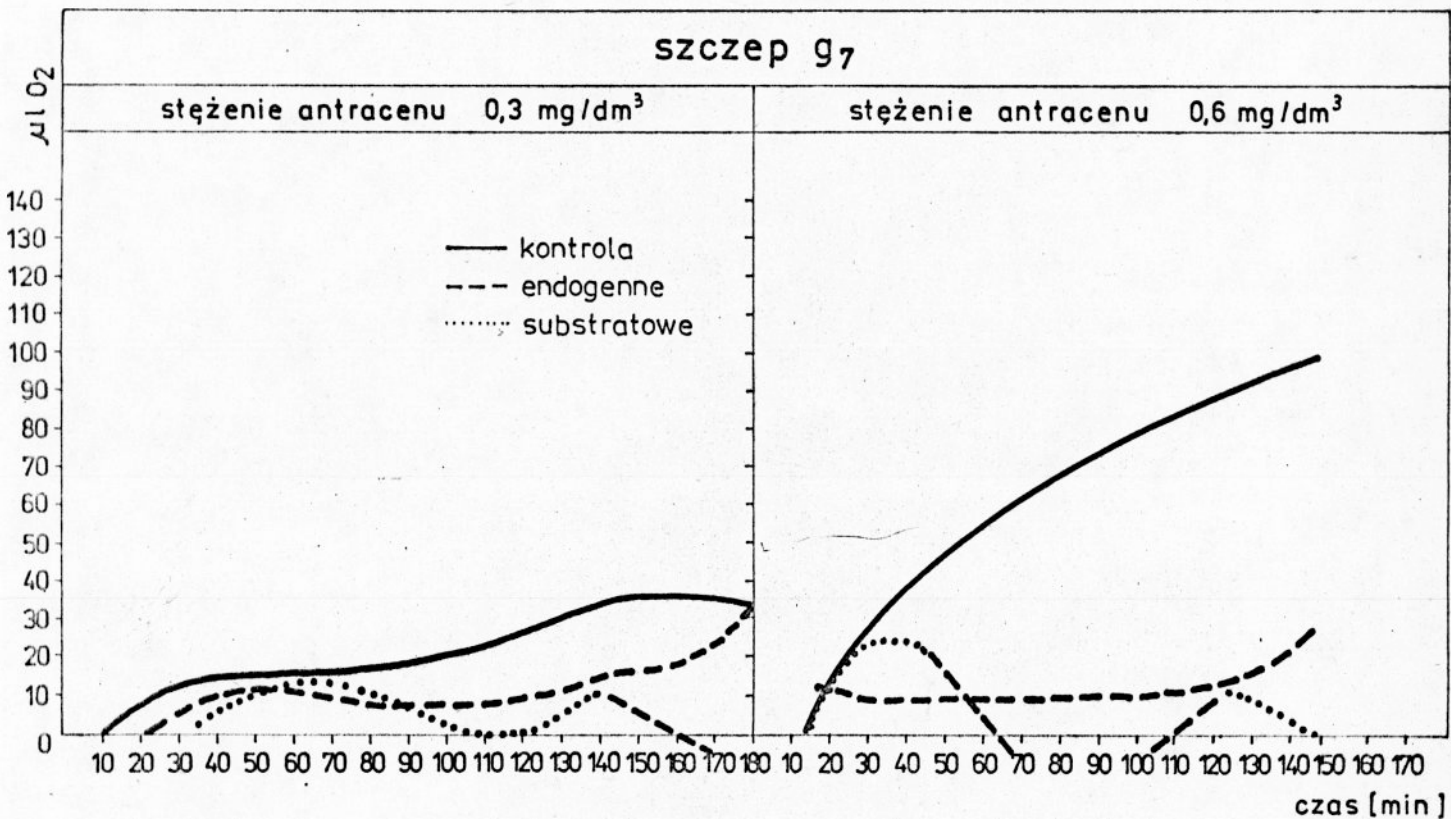
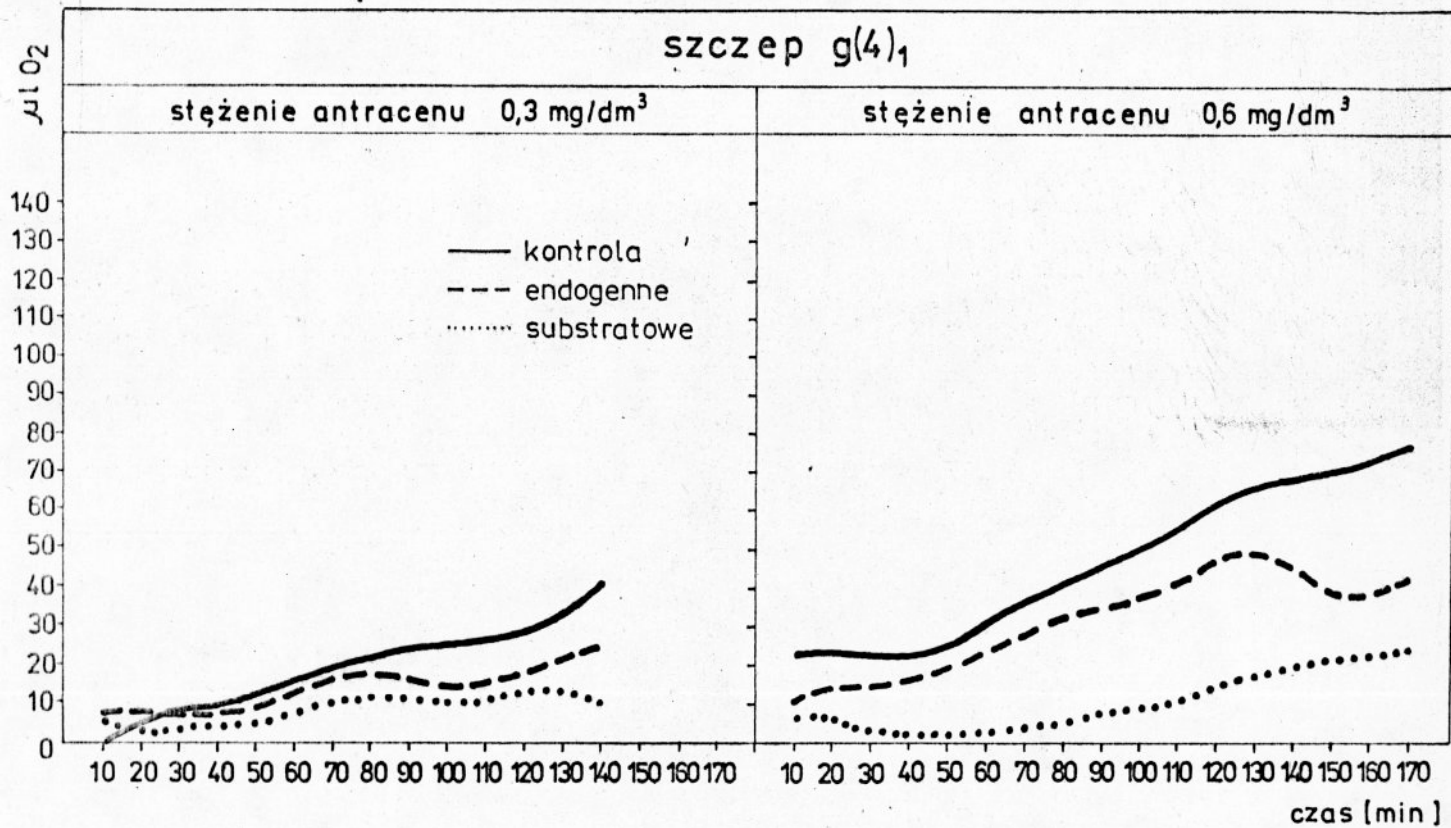
Rys.46. Określenie intensywności oddychania czystych szczepów bakterii w obecności benzo a pirenu jako jedynego źródła węgla i energii

Zatem wydaje się, iż zastosowane stężenie było trudniej dostępne dla bakterii, nie mniej nie zauważono oznak oddziaływania toksycznego.

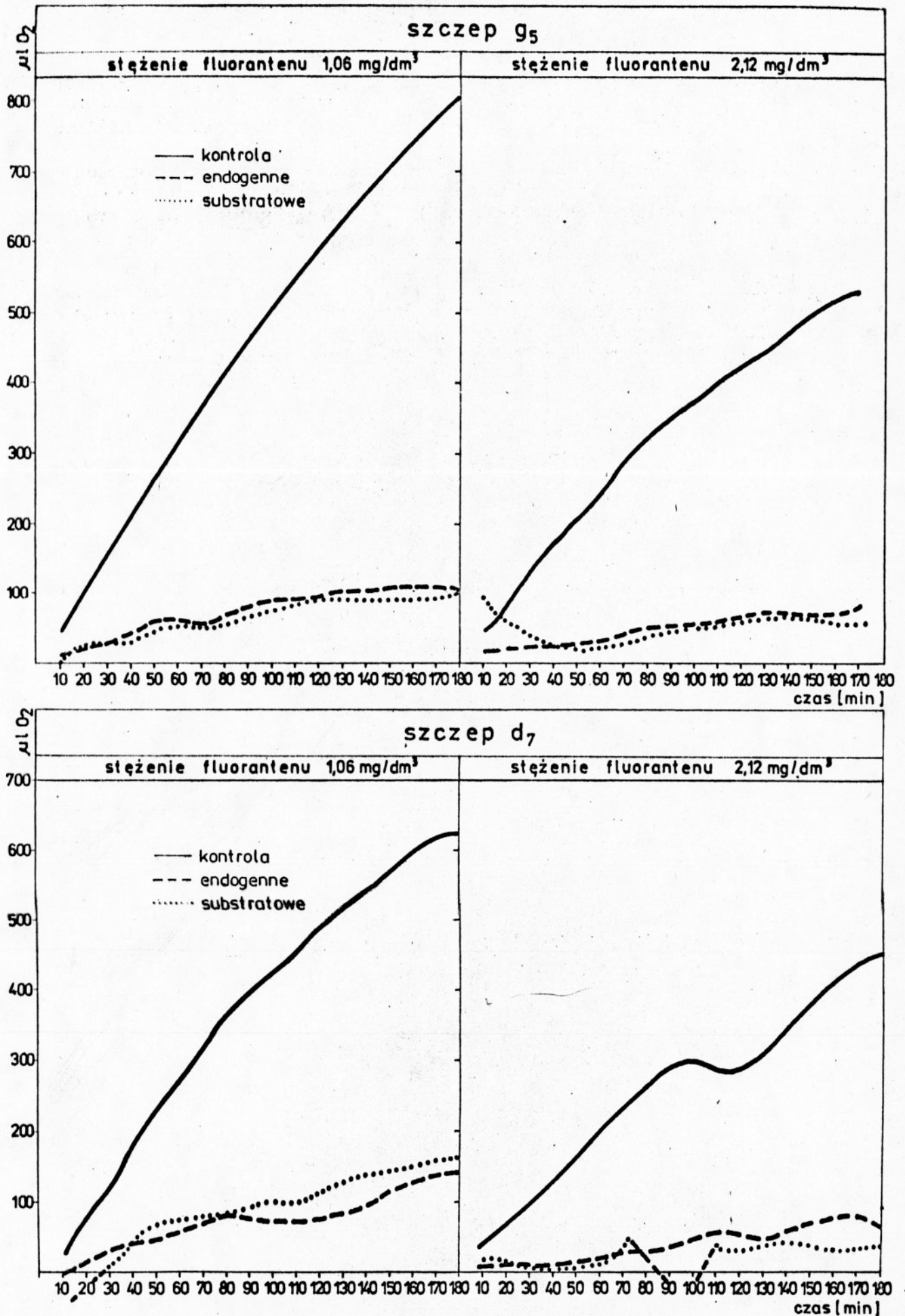
W przypadku szczepu ϵ_7 wartości oddychania substratowego w obecności obu stosowanych stężeń oscylowały wokół aktywności oddychania endogennego. Pozwala to wysnuć przypuszczenie, iż w tym wariancie eksperymentu, benzo/a/pirenu nie był wykorzystywany jako substrat pokarmowy lecz bakterie korzystały z własnych wewnątrzkomórkowych substratów energetycznych.

Szczep $\epsilon/4/1$, wyizolowany na podłożu z antracenenem jako jedynym źródłem węgla i energii, wykazywał ogólnie niską aktywność oddechową wobec badanego związku /rys. 47/.. Zarówno przy zastosowaniu stężenia $0,3 \text{ mg/dm}^3$, jak i $0,6 \text{ mg/dm}^3$ ilość zużywanego tlenu była niższa, niż w przypadku oddychania endogennego. Natomiast szczep ϵ_7 określony jako wrażliwy, ponieważ nie posiadał zdolności rozwoju wobec antracenu, wykazał znaczne zakłócenia w procesie oddychania substratowego. W pomiarach aktywności oddechowej szczepu wobec stężenia $0,3 \text{ mg/dm}^3$ w mniejszym stopniu, zaś wobec stężenia $0,6 \text{ mg/dm}^3$ w większym stopniu, pojawiało się zjawisko wzrostu ciśnienia w układach manometrycznych, co sugerować mogło powstawanie lotnych metabolitów w procesie biodegradacji tego związku.

Aktywność oddechowa szczepu ϵ_5 , który wykorzystywał fluoranten /rys. 48/ jako źródło węgla i energii, była wyraźnie hamowana przez badany węglowodór i to zarówno w stężeniu $1,06 \text{ mg/dm}^3$, jak i $2,12 \text{ mg/dm}^3$. Ilość pobieranego



Rys. 47. Określenie intensywności oddychania czystych szczepów bakterii w obecności antracenu jako jedynego źródła węgla i energii



Rys.48. Określenie intensywności oddychania czystych szczepów bakterii w obecności fluorantenu jako jedynego źródła węgla i energii

tlenu w procesie oddychania substratowego była nieznacznie niższa, od pobieranej w procesie oddychania endogennego. Fluoranten w stężeniu $1,06 \text{ mg/dm}^3$, w stosunku do szczepu d_7 powodował podwyższenie jego aktywności respirometrycznej, natomiast w momencie zastosowania dwukrotnie wyższego stężenia, występowało zjawisko podwyższania ciśnienia w układach manometrycznych. Biorąc pod uwagę fakt, iż szczep ten nie miał zdolności wzrostu wobec fluorantenu jako źródła węgla i energii wydaje się, że wpływ badanego związku w niższym stężeniu był wynikiem reakcji na stężenie podprogowe, objawiającej się wzmożoną aktywnością fizjologiczną. Zaś stężenie $2,12 \text{ mg/dm}^3$ powodowało wyraźne zakłócenia dysymilacji komórek co wskazuje na jego toksyczne działanie.

Reasumując należy stwierdzić, iż badane wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne były przez niektóre szczepy bakterii wykorzystywane jako substraty energetyczne, lecz są one, w porównaniu z glukozą substratami trudnodostępnymi. W przypadku szczepów wyizolowanych jako wrażliwe na stosowane wysokie stężenia badanych związków, obserwowane zjawisko podwyższania ciśnienia w układach manometrycznych mogło być wynikiem wytwarzania pewnych produktów lotnych. Substancje te mogły być bądź produktem rozkładu badanego węglowodoru, przebiegającego nieznanym szlakiem metabolicznym, ewentualnie maskującego pobór tlenu, bądź też produktem biologicznego spalania materiałów zapasowych komórek lub ich struktur wewnątrzkomórkowych z zaburzeniem na skutek toksycznego działania związku prawidłowych dróg metabolicznych.

4.2.6.4. Badania nad biotransformacją antracenu przez czyste niewrażliwe i wrażliwe szczepy bakteriami.

Zagadnienie biotransformacji wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych ma szczególne znaczenie ze względu na wzrastające zanieczyszczenie środowiska tymi związkami. Jak wiadomo, nie wszystkie substancje chemiczne charakteryzujące się skondensowaną budową pierścieniową są aktywne w procesach chemicznej karcinogenezy. Do takich nieaktywnych należy między innymi antracen. Ale wiadomo, również iż niejednokrotnie w wyniku biotransformacji mikrobiologicznej ze związków obojętnych biologicznie, mogą powstawać metabolity charakteryzujące się aktywnością nowotworową. Dlatego też przeprowadzono badania mające na celu z jednej strony wykazanie, iż w środowisku naturalnym występują szczepy bakterii mające zdolność do wykorzystywania antracenu jako substratu energetycznego, z drugiej strony starano się uzyskać odpowiedź na zagadnienie aktywności biologicznej metabolitów powstających w procesie biodegradacji.

Badania prowadzono w dwóch niezależnych eksperymentach. W pierwszym wariantcie zastosowano dwa szczepy niewrażliwe *Micrococcus luteus* i *Pseudomonas* sp. i ich mieszanę, w drugim jeden szczep wrażliwy i jeden niewrażliwy.

4.2.6.4.1. Badania nad biotransformacją antracenu z zastosowaniem czystych szczepów bakterii wykorzystujących badany związek jako źródło węgla i energii.

Badania obejmowały następujące oznaczenia:

- określenie rozwoju populacji bakterii metodą Mc Crady'ego /NPL/
- zmiany ilości antracenu,
- określenie mutagennego i rakotwórczego działania produktów pobiodegradacyjnych.

4.2.6.4.1.1. Określenie rozwoju populacji bakterii wobec antracenu jako źródła węgla i energii.

Rozwój populacji bakterii w hodowlach z antracenenem, ślędzono metodą Mc Crady'ego z zastosowaniem podłoża mineralnego z dodatkiem antracenu jako jedyne go energetycznego substratu w stężeńiach 0,15 i 0,3 mg/dm³ i równolegle na podłożu mineralnym z glukozą.

Po czasie 0,7 i 14 dób określano liczbę komórek bakterii na podłożach płynnych /NPL/ z zastosowaniem dwóch niezależnych szeregów powtórzeń. W jednym przypadku stosowano podłoże mineralne z glukozą, w drugim zaś podłoże mineralne z odpowiednim stężeniem antracenu. Na podstawie uzyskanych wyników /tabela 42/ można stwierdzić, iż badane szczepy

Tabela 42

Rozwój populacji bakterii określany metodą najbardziej prawdopodobnej liczby bakterii w procesie biodegradacji antracenu

Stężenie antracenu [mg/dm ³]	Czas [doby]	0			7			14		
		NPL na podłożu w glukozą		NPL na podłożu z antracেনem	NPL na podłożu z glukozą		NPL na podłożu z antracেনem	NPL na podłożu z glukozą		NPL na podłożu z antracেনem
		z hodowli na podłożu z glukozą /kontrola/	z hodowli na podłożu z antracেনem	z hodowli na podłożu z antracেনem	z hodowli na podłożu z glukozą /kontrola/	z hodowli na podłożu z antracেনem	z hodowli na podłożu z antracেনem	z hodowli na podłożu z glukozą /kontrola/	z hodowli na podłożu z antracেনem	z hodowli na podłożu z antracেনem
0,3	d/3/2	140.10 ⁷	140.10 ⁷	140.10 ⁷	45.10 ³⁵	11,5.10 ²¹	4.10 ¹³	140.10 ⁴⁴	140.10 ²⁴	45.10 ²³
	ε/4/1	15.10 ⁶	4,5.10 ⁶	4,5.10 ⁷	110.10 ²⁹	45.10 ¹⁰	11,5.10 ⁷	140.10 ⁴⁴	11,5.10 ¹⁸	1,6.10 ¹³
	mieszanina	4,5.10 ⁷	140.10 ⁷	20.10 ⁷	110.10 ²⁶	4,5.10 ³¹	7,5.10 ⁷	140.10 ⁴⁴	7,5.10 ¹⁷	15.10 ¹⁶
0,15	d/3/2	7,5.10 ²⁰	140.10 ¹¹	140.10 ¹⁰	140.10 ³⁴	2.10 ²⁸	4,5.10 ²²	110.10 ⁶⁴	45.10 ⁴²	140.10 ²⁴
	ε/4/1	1,6.10 ²⁰	140.10 ²⁰	140.10 ¹⁰	20.10 ³⁹	110.10 ²⁸	20.10 ²²	45.10 ⁶⁴	45.10 ²⁹	1,5.10 ²¹
	mieszanina	140.10 ¹³	4,5.10 ¹⁰	140.10 ²⁰	2,5.10 ²⁵	140.10 ³⁸	20.10 ²¹	140.10 ⁶⁴	4,5.10 ²⁸	11,5.10 ²⁹

rozwijały się bardzo dobrze na podłożu mineralnym z glukozą /próby kontrolne/ natomiast w próbach, gdzie jedynym źródłem węgla i energii był antracen w stężeniu $0,3 \text{ mg/dm}^3$ najlepszy rozwój populacji zaobserwowano w przypadku szczepu $d/3/2$ wyizolowanego z wody nadosadowej rzeki Oławy.

Szczep $\varepsilon/4/1$ wyizolowany z wody powierzchniowej, jak i mieszanina szczepów $d/3/2$ i $\varepsilon/4/1$ charakteryzowały się podobnym przyrostem komórek lecz był on w porównaniu z glukozą znacznie słabszy.

W przebiegu doświadczenia, w przypadku szczepów biodegradacyjnych antracenu zaznaczyła się wyraźna różnica pomiędzy ilością bakterii uzyskanych metodą NPL z zastosowaniem antracenu jako substratu energetycznego, w stosunku do prób z zastosowaniem glukozy. Uzyskane wyższe wartości dowodzą, iż antracen jest substratem trudniej dostępnym, hamującym dynamikę rozwoju populacji.

W drugim wariancie doświadczenia, gdzie zastosowano antracen w stężeniu $0,15 \text{ mg/dm}^3$ zaobserwowano podobne prawidłowości w rozwoju populacji bakterii, z tą różnicą, że najlepszy rozwój populacji stwierdzono w przypadku mieszaniny bakterii, natomiast czyste szczepy $\varepsilon/4/1$ i $d/3/2$ przyrastały w zbliżony sposób.

Reasumując należy stwierdzić, iż przy zastosowaniu obydwu stężeń antracenu obserwowano systematyczny przyrost biomasy bakterii pozwalający przypuszczać, że wyizolowane z rzeki Oławy szczepy mają zdolność wykorzystywania antracenu jako jedyne źródła węgla i energii.

4.2.6.4.1.2. Określenie ubytku antracenu w czasie biotransformacji przez czyste szczepy bakterii i ich mieszaninę.

Uzyskane wyniki dotyczące ilości antracenu w czasie inkubacji szczepów przedstawiono w tabeli 43.

Tabela 43

Pozostałość antracenu podczas jego biodegradacji przez czyste szczepy bakterii i ich mieszaninę

Dodane stężenie antracenu [mg/dm ³]	Czas ekspozycji	Ilość antracenu w mg/dm ³			
		Chemidegradacja	Biodegradacja przez szczep 6/4/1	Biodegradacja przez szczep d/3/2	Biodegradacja przez mieszaninę szczepów 6/4/1 i d/3/2
03	1	nb	0,118	0,337	0,136
	7	0,339	0,085	0,26	0,129
	14	0,309	0,0828	0,28	0,0086
0,15	1	nb	0,015	0,0082	0,0091
	7	0,15	0,0052	0,0023	0,0035
	14	0,148	0,0031	0,0006	0,0025

Otrzymane wyniki wskazują na fakt, iż antraceni w podłożu hodowlanym nie podlegał chemidegradacji, a nieznaczny rozrzut otrzymanych wyników mieścił się w granicach błędów, wynikających z metodyki oznaczania.

Natomiast przebieg biodegradacji był zróżnicowany jednak ogólnie stosunkowo wysoki. Różnice jakie zanotowano, spowodowane były różną aktywnością szczepów jakie stosowano w badaniach.

Szczep $\epsilon/4/1$ charakteryzował się znacznie wyższą dynamiką rozkładu antracenu w stężeniu $0,3 \text{ mg/dm}^3$ niż szczep $d/3/2$ natomiast przy zastosowaniu stężenia dwukrotnie niższego większy ubytek antracenu uzyskano dzięki działalności szczepu $d/3/2$.

Również dobre wyniki uzyskano przy zastosowaniu szczepów $\epsilon/4/1$ i $d/3/2$.

4.2.6.4.1.3. Określenie mutagennego i rakotwórczego działania produktów pobiodegradacyjnych antracenu.

Ponieważ ilość antracenu wykrywana w wodzie rzeki Oławy była bardzo wysoka, a jego biodegradacja stwierdzona w badaniach laboratoryjnych znaczna, wydawało się celowe sprawdzenie, czy powstające metabolity nie wykazują aktywności biologicznej w kierunku wywoływania zmian mutagennych prowadzących do transformacji nowotworowej.

Mutagenny i rakotwórczy charakter produktów pobiodegradacyjnych antracenu określono posługując się testem Ames'a. Zgodnie z tym testem użyto w pracy specjalnych mutantów *Salmonella typhimurium* LT₂.

Testowe szczepy posiadają mutacje w różnych miejscach genu niosącego informację związaną z syntezą histydyny.

Mogą więc być użyte do wykrywania różnych mutagenów. Szczepy *S. typhimurium* TA 1535 nadaje się do wykrywania mutagenów powodujących substytucję par zasad. Szczepy *S. typhimurium* TA 1537 i TA 1538 służą natomiast do wykrywania "frame shift" mutagenów. Testowe szczepy zawierają ponadto dodatkowe mutacje, zwiększające ich wrażliwość i brak mechanizmów naprawy DNA i liposacharydowej bariery na powierzchni komórki.

Czynnik plazmidowy obecny w szczepach *S. typhimurium* TA 98 i TA 100 zwiększa wrażliwość bakterii na liczne związki chemiczne. W teście Ames'a wykorzystuje się fakt, iż pod wpływem czynników mutagennych szczepy histydynozależne ulegają rewersji do stanu prototroficznego.

Z kolb, w których przebiegała biodegradacja antracenu przeprowadzana przez szczepy g/4/1 i d/3/2 oraz mieszaninę tych szczepów pobrano 10 cm³ hodowli po 7 i 14 dniach trwania eksperymentu. Pobrane próby sączono przez filtr Seitz'a z sączkiem azbestowym celem usunięcia bakterii. Przesącz traktowano następnie jako roztwór mogący zawierać mutagenne lub rakotwórcze składniki.

W tabeli 44 przedstawiono wyniki testu Ames'a dla przesączu hodowlanego po 7 dniach biodegradacji antracenu w stężeniu 0,3 mg/dm³. Nie zaobserwowano, w żadnym wariancie, co najmniej dwukrotnie podwyższonej rewersji histydynozależnych szczepów do prototrofii, co świadczyło o wyniku ujemnym czyli braku potencjalnie rakotwórczych własności badanych przesączów hodowlanych.

Należy jednak podkreślić, że zaobserwowano podwyższoną rewersję w przypadku użytych w teście Ames'a przesączów

hodowlanych szczepu G/4/1 w stosunku do plazmidowych szczepów *Salmonella typhimurium* TA 98 i TA 100.

Tabela 45 przedstawia wyniki testu Ames'a dla przesączu hodowlanego po 14 dniach biodegradacji antracenu w stężeniu 0,3 mg/dm³. Jak widać stwierdzono wynik pozytywny dla szczepu *S. typhimurium* TA 100 wówczas, gdy zastosowano przesącz hodowlany po biodegradacji antracenu przez szczep G/4/1 i d/3/2.

W tabeli 46 przedstawiono wyniki testu Ames'a dla przesączu hodowlanego po 7 dobach biodegradacji antracenu w stężeniu 0,15 mg/dm³. Nie stwierdzono podobnie jak w przypadku stężenia 0,3 mg/dm³ antracenu, mutagennych własności badanych przesączów. W żadnym bowiem analizowanym wariancie nie otrzymano co najmniej dwukrotnie wyższej spontanicznej rewersji histydynozależnych szczepów do prototrofii.

Po 14 dobach inkubacji /tabela 47/ w żadnym z zastosowanych wariantów doświadczeń nie uzyskano wyników pozytywnych, a więc dwukrotnie wyższej rewersji w stosunku do rewersji spontanicznej,

Podsumowując można przypuszczać iż antracen, który nie jest związkami rakotwórczym, może w wyniku biotransformacji dawać produkty o takim charakterze, choć uzyskane w tym wariancie doświadczeń wyniki wymagały dalszego potwierdzenia, gdyż sugerowały iż zastosowane stężenie 0,15 mg/dm³ było za niskie dla otrzymania odpowiedniej do testu ilości metabolitów.

Tabela 44

Test Ames^a wykonany na przesączu hodowlanym po 7 dobach biodegradacji antracenu w stężeniu 0,3 mg/dm³

Nr szczepu Salmonella typhimurium LT ₂	Rewersja sponta- niczna	Rewersja histydynozależnych szczepów do prototrofii po inkubacji z przesączami różnych wariantów biodegradacji antracenu			
		Podłoże mine- ralne z antra- cenenem /che- midegradacja/	Podłoże mine- ralne z antra- cenenem zaszcze- pionym miesza- niną szczepów s/4/1 i d/3/2	Podłoże mine- ralne z antra- cenenem zaszcze- pione szczepem s/4/1	Podłoże mine- ralne z antra- cenenem zaszcze- pione szczepem d/3/2
TA 98	147,0	100,25	119,25	237,6	194,7
TA 100	151,5	134,25	140,0	204,4	157,0
TA 1535	124,6	126,0	158,75	185,5	76,0
TA 1537	142,4	141,0	97,5	185,7	137,25
TA 1538	131,2	155,0	153,25	188,0	165,25

Wyniki są średnią z pięciu powtórzeń

Tabela 45

Test Ames'a wykonany na przesączu hodowlanym po 14 dobach biodegradacji antracenu w stężeniu $0,3 \text{ mg/dm}^3$

Nr szczepu Salmonella typhimurium LT ₂	Rewersja sponta- niczna	Rewersja histydynozależnych szczepów do prototrofii po inkubacji z przesączami różnych wariantów biodegradacji antracenu			
		Podłoże mine- ralne z antra- cenenem /bez bakterii/-che- midegradacja	Podłoże mine- ralne z antra- cenenem zaszcze- piona miesza- niną bakterii ε/4/1 i d/3/2	Podłoże mine- ralne z antra- cenenem zaszcze- piona szczepem ε/4/1	Podłoże mine- ralne z antra- cenenem zaszcze- piona szczepem d/3/2
TA 98	21	12	39	6,5	9
TA 100	21,3	38,75	32	53,6	46,6
TA 1535	4,5	3,4	1,5	5,6	2,4
TA 1537	4,2	3,25	2,6	4,6	6,5
TA 1538	17	4,4	4,0	3,0	5,2

Wyniki są średnią z pięciu powtórzeń

Tabela 46

Test Ames'a wykonany na przesączach hodowlanych po 7 dobach biodegradacji antracenu w stężeniu 0,15 mg/dm³

Numer szczepu Salmonella typhimurium LT ₂	Rewersja sponta- niczna	Rewersja histydynozależnych szczepów do prototropii po inkubacji z przesączami różnych wariantów biodegradacji antracenu			
		Podłoże mine- ralne z antra- cenem /bez bakterii/che- midegradacja	Podłoże mine- ralne z antra- cenem zaszcze- piona miesza- niną bakterii g/4/1 i d/3/2	Podłoże mine- ralne z antra- cenem zaszcze- piona szcze- pem g/4/1	Podłoże mine- ralne z antra- cenem zaszcze- pione szcze- pem d/3/2
TA 98	103,0	158,0	152,0	133,0	12,0
TA 100	31,2	45,25	43,2	32,3	36,4
TA 1535	6,8	7,25	11,0	8,0	11,6
TA 1537	5,0	6,5	6,25	7,75	5,2
TA 1538	97,5	152,0	147,4	111,4	85,0

Wyniki są średnią z pięciu powtórzeń

Tabela 47

Test Ames'a wykonany na przesączu hodowlanym po 14 dobach biodegradacji antracenu w stężeniu 0,15 mg/dm³

Nr szczepu Salmonella typhimurium LT ₂	Rewersja sponta- niczna	Rewersja histydynozależnych szczepów do prototrofii po inkubacji z przesączami różnych wariantów biodegradacji antracenu			
		Podłoże mine- ralne z antra- cenenem /bez bak- terii/-chemi- degradacja	Podłoże mine- ralne z antra- cenenem zaszcze- pione miesza- niną bakterii ε/4/1 i d/3/2	Podłoże mine- ralne z antra- cenenem zaszcze- pione szcze- pem ε/4/1	Podłoże mine- ralne z antra- cenenem zaszcze- pione szcze- pem d/3/2
TA 98	146,6	153,8	220,8	102,4	269,6
TA 100	69,5	74,7	55,0	66,6	39,75
TA 1535	7,33	16,4	9,2	7,0	6,0
TA 1537	6,25	13,3	6,8	8,0	7,3
TA 1538	219,75	262,0	306,0	221,6	262,0

Wyniki są średnią z pięciu powtórzeń

4.2.6.4.2. Badania nad biotransformacją antracenu z zastosowaniem czystych szczepów bakterii wrażliwych i niewrażliwych na wysokie stężenia tego związku

Kontynuując badania nad mutagennym lub rakotwórczym charakterem produktów pobiodegradacyjnych antracenu wprowadzono szczep uważany za wrażliwy na działanie wysokich stężeń tego związku w celu badań porównawczych. Ze względu na wcześniej uzyskane wyniki zastosowano odpowiednio wyższe stężenia antracenu 0,3 i 1,2 mg/dm³. Ponadto jako kontrolę funkcji fizjologicznych komórek pod wpływem badanego związku wprowadzono pomiary aktywności oddechowej zastosowanych szczepów bakterii. Test Ames'a wykonano po 14 dobach inkubacji, gdyż wydawało się, iż czas ekspozycji wynoszący 7 dni był zbyt krótki.

W drugim wariancie doświadczeń przeprowadzono następujące badania:

- określenie przyrostu bakterii metodą płytkową,
- określenie aktywności oddechowej szczepów metodą manometryczną Warburga,
- określenie mutagennego i rakotwórczego działania produktów pobiodegradacyjnych antracenu po 14 dobach hodowli,
- określenie ubytku substratu i określenie składu jakościowego metabolitów pobiodegradacyjnych antracenu.

4.2.6.4.2.1. Określenie przyrostu bakterii metodą płytkową Kocha.

Ilość bakterii w czasie biodegradacji antracenu przedstawiono w tabeli 48. Pomimo wprowadzenia do układów doświadczalnych zawiesiny o zbliżonej ekstynkcji, okazało się, że wniesiono dwukrotnie wyższą ilość komórek szczepu ϵ_7 . W ciągu 1 tygodnia oba szczepy bakterii przyrastały równomiernie za wyjątkiem szczepu $\epsilon/4/1$ przy stężeniu antracenu wynoszącym $1,2 \text{ mg/dm}^3$. Natomiast po 14 dniach inkubacji stwierdzono znaczny przyrost bakterii szczepu $\epsilon/4/1$, zaś przyrost szczepu ϵ_7 był znacznie mniej dynamiczny. A zatem wydaje się, że szczep $\epsilon/4/1$ miał dość długi okres adaptacyjny, natomiast zwolnienie tempa przyrostu przez szczep ϵ_7 może się wiązać z jego wcześniej stwierdzoną wrażliwością na antracen lub na produkty jego rozkładu,

4.2.6.4.2.2. Określenie aktywności oddechowej szczepów bakterii, w czasie biodegradacji antracenu, metodą manometryczną Warburga.

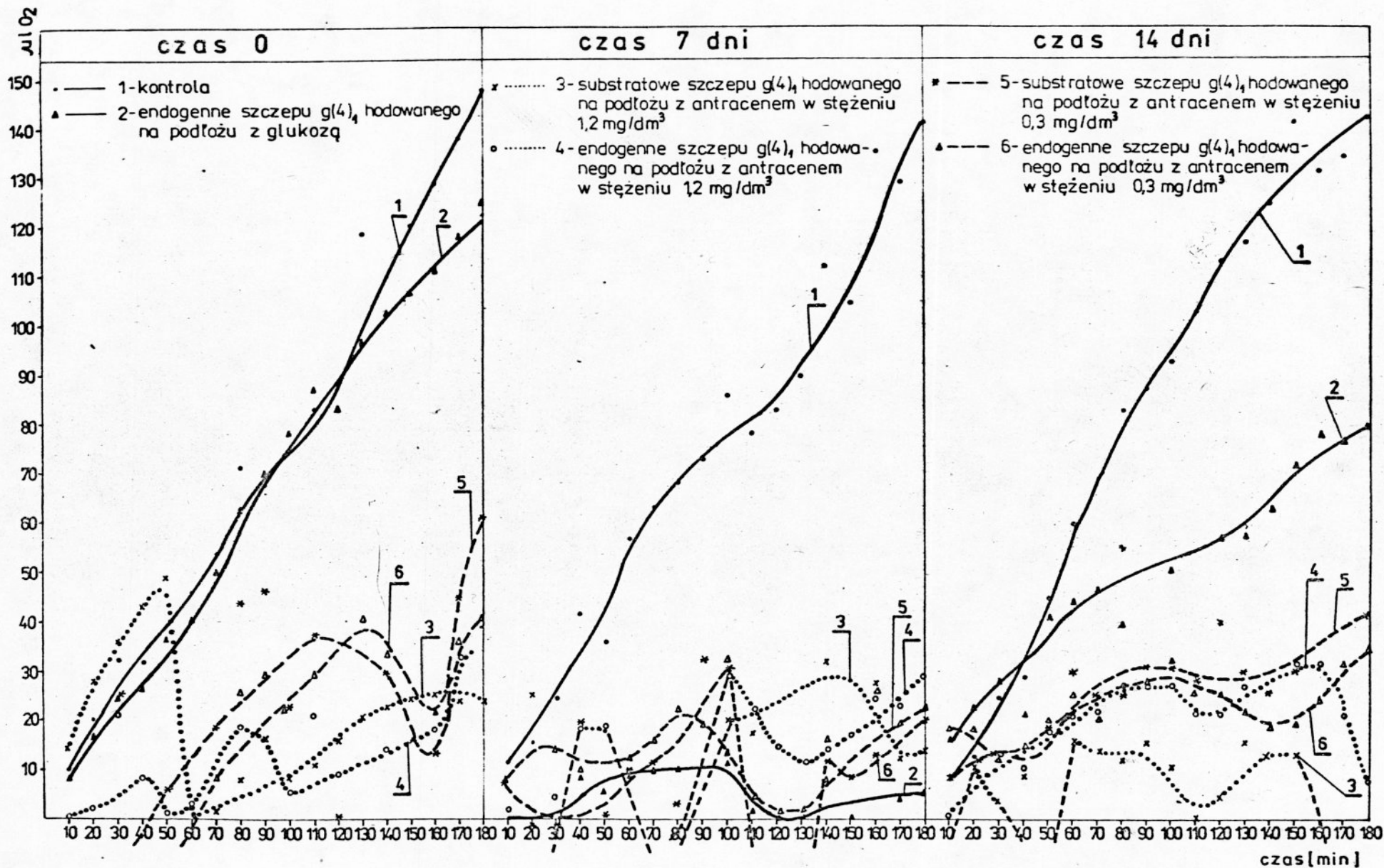
Badanie respirometryczne metodą Warburga prowadzono w czasie 180 min., określając dla każdego szczepu aktywność oddychania substratowego i endogennego, po hodowli na podłożu z antracenu trwającej 0,7 i 14 dób.

Wyniki przedstawiono dla szczepu $\epsilon/4/1$ na rys. 49 i szczepu ϵ_7 na rys. 50.

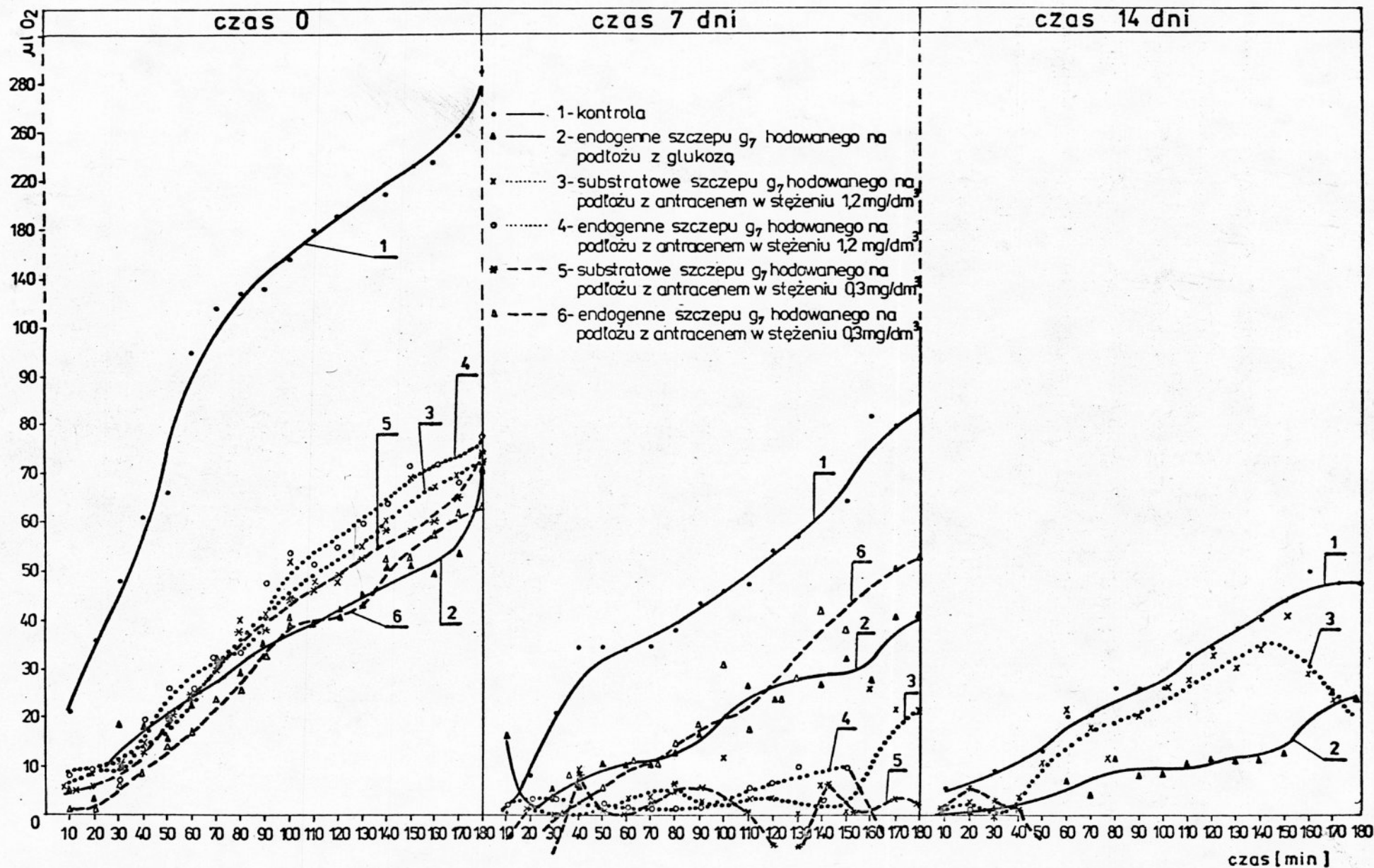
Tabela 48

Określenie rozwoju populacji bakterii w procesie biodegradacji antracenu

Szczepy	Stężenie antracenu [mg/dm ³]	0 dni	7 dni	14 dni
		Ilość bakterii [kom/cm ³]	Ilość bakterii [kom/cm ³]	Ilość bakterii [kom/cm ³]
ε/4/1	0/k/	49 · 10 ⁵	820 · 10 ⁵⁰	60 · 10 ³⁰
	0,3	106 · 10 ⁵	174 · 10 ¹¹	64 · 10 ¹⁸
	1,2	46 · 10 ⁵	163 · 10 ⁷	78 · 10 ¹⁹
ε7	0/k/	251 · 10 ⁹	152 · 10 ⁴⁹	70 · 10 ⁵⁴
	0,3	422 · 10 ¹⁰	116 · 10 ¹⁸	95 · 10 ²⁴
	1,2	432 · 10 ¹⁰	110 · 10 ¹⁸	120 · 10 ²⁰



Rys. 49. Intensywność oddychania szczepu $g(4)_1$ podczas biodegradacji antracenu



Rys. 50. Intensywność oddychania szczepu *g7* podczas biodegradacji antracenu

Szczep $g/4/1$ w czasie 0 charakteryzował się dobrą aktywnością oddechową, jednakże wprowadzenie go do mieszaniny reakcyjnej, zawierającej odpowiednio stężenia 0,3 i 1,2 mg/dm³ antracenu spowodowało pewne zaburzenia i to zarówno w przypadku oddychania substratowego jak i endogennego. Należy również zaznaczyć, iż wszystkie stężenia antracenu w początkowej fazie spowodowało stymulację procesu oddechowego, a następnie hamowanie jego aktywności.

Natomiast szczep g_7 okazał się mniej wrażliwy na krótkotrwały kontakt z antracenenem niezależnie od jego stężenia. Wszystkie wartości dotyczące oddychania substratowego, gdzie źródłem węgla i energii był antracen i odpowiednio oddychania endogennego, oscylowały wokół aktywności oddychania endogennego szczepu hodowanego na glukozie.

Następne pomiary aktywności oddechowej przeprowadzono po 7 dobach hodowli. Aktywność szczepu $g/4/1$ hodowanego na glukozie była zbliżona do aktywności w czasie 0. Natomiast aktywność oddechowa tego samego szczepu hodowanego na antracenie była nieznacznie niższa, szczególnie przy stężeniu badanego związku wynoszącego 0,3 mg/dm³.

Podobnie jak w badaniach nad aktywnością repiometryczną czystych szczepów bakterii wobec antracenu jako substratu energetycznego, tak i w tym przypadku wystąpiło zjawisko okresowego podwyższenia ciśnienia w układzie manometrycznym i to zarówno w oddychaniu substratowym jak i endogennym.

Aktywność oddechowa szczepu g_7 po 7 dobach inkubacji zmalała i to zarówno w próbie kontrolnej jak i w próbach

substratowych. W przypadku oddychania substratowego w obecności antracenu zaobserwowano działanie hamujące aktywność oddechową przez badany związek, jak i występowanie podobnego zjawiska wzrostu ciśnienia w układach manometrycznych, jak i w przypadku szczepu $\text{G}/4/1$.

Po 14 dobach hodowli szczep $\text{G}/4/1$ charakteryzował się nadal wysoką aktywnością oddechową we wszystkich wariantach doświadczeń. Jedynie przy wysokim stężeniu antracenu $/1,2 \text{ mg/dm}^3/$ w procesie oddychania substratowego występowało nadal zjawisko okresowego wzrostu ciśnienia w układach manometrycznych. Wysoka aktywność oddechowa szczepu przy stężeniu antracenu $0,3 \text{ mg/dm}^3$ pozwala przypuszczać, iż antracem był stosunkowo dobrym substratem energetycznym dla badanego szczepu.

Natomiast szczep G_7 w znacznym stopniu utracił aktywność oddechową w próbie kontrolnej. Przy stężeniu $0,3 \text{ mg/dm}^3$ antracem zarówno w przypadku oddychania substratowego i endogennego, pojawiło się zjawisko podwyższenia ciśnienia w układach manometrycznych. Jedynie przy stężeniu $1,2 \text{ mg/dm}^3$ antracenu ilość pobieranego tlenu przez bakterie była znaczna.

Reasumując należy stwierdzić, iż dobór szczepów zgodny był z założeniem doświadczenia. Szczep $\text{G}/4/1$ uznany za niewrażliwy na wysokie stężenia antracenu wykazywał znacznie wyższą aktywność oddechową wobec antracenu, a zatem można przypuszczać, iż wykorzystywał ten związek jako źródło węgla i energii na drodze przemian tlenowych. Szczep G_7 uznany za "wrażliwy" na wysokie stężenia antracenu, przypuszczalnie

również wykorzystywał antracen, jako substrat pokarmowy jednakże w procesie tym **musiały** pojawiać się lotne metabolity. zakłócające odczyty w stosowanej metodzie.

Wyjaśnienia zaistniałych zjawisk należy oczekiwać dopiero w momencie dokładnego rozpracowania szlaku metabolicznego antracenu, co wymaga bardzo długotrwałych i żmudnych badań, opartych na specjalistycznej aparaturze.

4.2.6.4.2.3. Określenie mutagennego i rakotwórczego działania produktów pobiodegradacyjnych antracenu /szczep ϵ_7 /.

Mutagenny i rakotwórczy charakter produktów pobiodegradacyjnych antracenu określano posługując się testem Ames'a.

W tabeli 49 przedstawiono wyniki testu Ames'a dla przesączu hodowlanego po 14 dobach biodegradacji antracenu w stężeniu 0,3 i 1,2 mg/dm³.

Wyniki powyższe zanotowano w przypadku wysokiego stężenia antracenu dla wszystkich pięciu szczepów testowych. Przy wyjściowym stężeniu antracenu 0,3 mg/dm³ wyniki wskazujące na potencjalne mutagenne i rakotwórcze działanie metabolitów uzyskano dla szczepów *S.typhimurium* TA 98, TA 1537 i TA 1538. Interesującym jest fakt uzyskania pozytywnych wyników na przesączach pochodowlanych szczepu uważanego za wrażliwy na wysokie stężenia antracenu. Wydaje się, iż pełną informację dotyczącą tego zagadnienia będzie można uzyskać dopiero po poznaniu szlaku przemian metabolicznych antracenu u bakterii.

Tabela 49.

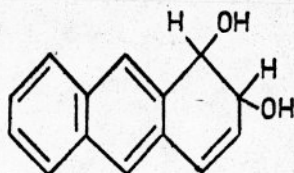
Test Ames'a wykonany na przesączu hodowlanym po 14 dniach biodegradacji antracenu przez szczep E₇

Numer szczepu	Średnia rewersja spontaniczna	Indukowana średnia rewersja histydynozależnych szczepów do prototrofii		
		antracenenem w stężeniu 1,2 mg/dm ³	przesączkami pobioodegradacyjnymi	
			antracenu w stężeniu 1,2 mg/dm ³	antracenu w stężeniu 0,3 mg/dm ³
TA 97	92,6	112,0	373,3	96,0
TA 98	8,0	15,6	402,8	39,5
TA 100	74,8	55,5	539,8	117,8
TA 1537	8,6	13,0	585,4	68,8
TA 1538	8,5	7,2	339,3	53,0

4.2.6.4.2.4. Próby ustalenia składu metabolicznego antracenu u bakterii.

Po 14 dobach hodowli szczepów $\epsilon/4/1$ i ϵ_7 w obecności antracenu w stężeniu $1,2 \text{ mg/dm}^3$ próby poddano ekstrakcji bezpośredniej eterem. Otrzymane ekstrakty eterowe poddano analizie chromatograficznej metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

Chromatogramy ekstraktów pobliodoegradacyjnych antracenu w przypadku szczepu $\epsilon/4/1$ nie wykazywały obecności tego związku, zaś w przypadku szczepu ϵ_7 stwierdzono ubytek $1/5$ ilości badanego węglowodoru. W obu chromatogramach występował natomiast pik o względnym czasie retencji w stosunku do antracenu $r = 0,51$, co wskazuje, że badana substancja jest znacznie bardziej polarna od związku wyjściowego. Widmo w nadfiolecie roztworu metanolowego badanej substancji wykazuje maksimum absorpcji przy $\lambda_{\text{max}} = 252 \text{ nm}$ /identyczne jak antracenu/ oraz przegięcie w zakresie $263-286 \text{ nm}$. Na podstawie powyższych danych można z dużym prawdopodobieństwem stwierdzić, że oznaczany związek jest 1,2 -dwohydro-1,2 dwuhydroksyantracenenem.



Na chromatogramach występowały dodatkowo dwa słabo rozdzielone piki.

W celu uzyskania pełniejszych informacji przeprowadzono analogiczne badania w czasie o połowę krótszym tj. 7 dób.

Uzyskane chromatogramy przedstawiono na rys. 51.

Porównując oba chromatogramy można zauważyć różnice ilościowe na podstawie wielkości pików, natomiast nie stwierdza się różnic jakościowych.

Tabela 50

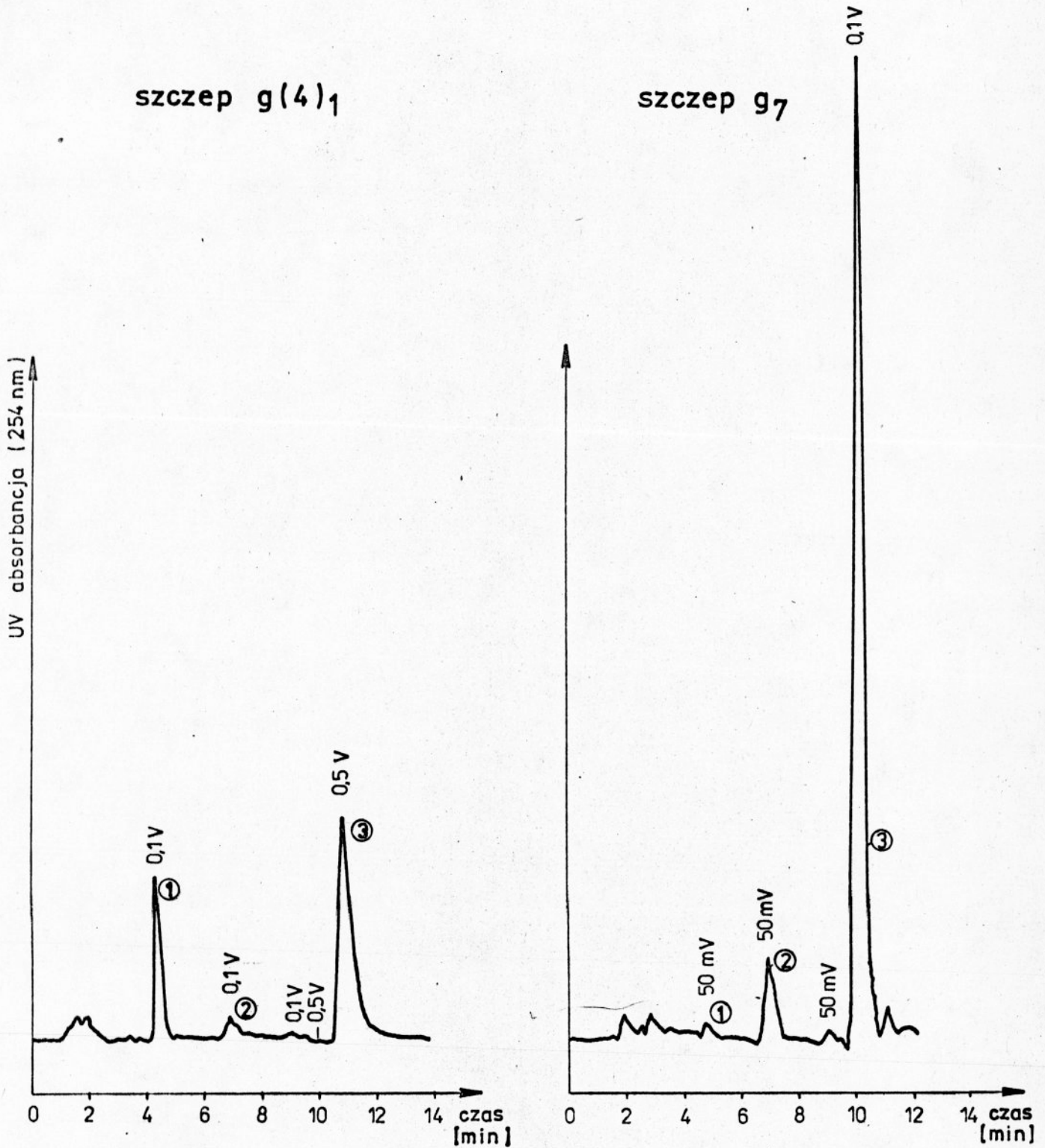
Względne czasy retencji produktów pobiodegradacyjnych antracenu.

Szczep bakterii	Szczep ϵ_7		Szczep $\epsilon/4/1$	
nr pików /rys. 51/	1	2	1	2
Względny czas retencji	0,46	0,67	0,42	0,61

Na podstawie względnych czasów retencji można wysnuć wnioski, że antraceni ulegał biodegradacji do substancji bardziej polarnych od antracenu. Ponieważ diole posiadają zwykle względne czasy retencji około 0,5, pozwala to sądzić, iż pik nr 1 uzyskane na obu chromatogramach są 1,2-dwukydroksy-1,2-dwuhydroantracenu. Natomiast mniej polarne pik nr 2 mogą być chinonem lub fenolem.

Identyfikacja tych pików wymaga jednak dalszych badań.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, iż antraceni w stosowanym stężeniu ulegał mikrobiologicznemu rozkładowi w kierunku substancji bardziej polarnych od związku wyjściowego. Tego typu przekształceniami można tłumaczyć uzyskane pozytywne wyniki testu Ames'a na przesączach pobiodegradacyjnych. Jednak pełną odpowiedź na problem



Rys. 51 Chromatogramy produktów pobiodegradacyjnych antracenu w stężeniu $1,3 \text{ mg/dm}^3$ po 7 dobach inkubacji

potencjalnych właściwości mutagennych i rakotwórczych metabolitów antracenu będzie można dać dopiero w momencie przeprowadzenia syntezy tych związków i wykonaniu testów na czystych związkach i ich mieszaninach.

5. PODSUMOWANIE I DYSKUSJA

Na podstawie danych literaturowych oraz badań własnych można stwierdzić, że zanieczyszczenie środowiska naturalnego wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi stanowi zagadnienie niezwykle trudne i złożone.

Szczególne znaczenia nabiera ono w przypadku występowania tych związków w wodach powierzchniowych [1, 4, 54, 55, 56, 57, 60, 84, 126, 156], gdyż z jednej strony - ze względu na wysoki stopień zanieczyszczenia środowiska wodnego - są one częstym składnikiem wody, a z drugiej właściwości mutagenne i rakotwórcze WWA dyskwalifikują wodę zawierającą te związki jako surowiec dla celów wodociągowych.

Sytuację tę pogarsza fakt dużej trudności w usuwaniu tych związków w czasie uzdatniania wody [53, 116, 127, 144]. Najbardziej skutecznym sposobem ich eliminacji z wody jest ozonowanie, jednakże wiadomo, że tylko nieliczne zakłady wodociągowe w kraju dysponują tym sposobem dezynfekcji.

Trzeba jednak podkreślić, że nawet wtedy gdy ozonowanie wody jest stosowane, konieczna jest stała kontrola w kierunku wykrywania WWA, zarówno w wodzie surowej, jak i kierowanej do sieci miejskiej.

Nade wszystko jednak, winna być prowadzona bardzo intensywna ochrona wód, które użytkowane są jako źródło wody pitnej zwłaszcza, w zakresie eliminacji źródeł zanieczyszczenia środowiska przez WWA, zachowanie procesów samooczyszczania na możliwie najwyższym poziomie aktywności biologicznej, poznanie mechanizmów biotransformacji, biokumulacji i migracji

WWA w łańcuchu troficznym.

Temu celowi powinno również służyć ustalenie norm dla WWA oraz metod wykrywania i stwierdzania ich aktywności mutacyjnej i nowotworowej.

Niniejsza praca miała wyjaśnić niektóre aspekty tego zagadnienia.

Objęty badaniami teren usytuowany jest w dolnym biegu rzeki Oławy, powyżej ujęcia wodociągowego dla miasta Wrocławia. Teren znajduje się pod bezpośrednim wpływem elektrociepłowni i huty żelazochromu, stanowi brzeżny obszar terenów wodonośnych. Wpływ wspomnianych zanieczyszczeń przemysłowych, a także znajdującej się w niedużej odległości trasy szybkiego ruchu, znajduje swe odzwierciedlenie w wykazanych ilościach wielopiersścieniowych węglowodorów aromatycznych w wodzie rzeki Oławy.

Zaobserwowane w cyklu rocznym ilości wielopiersścieniowych węglowodorów aromatycznych dowodzą bezsprzecznie bardzo znacznego skażenia wód rzeki Oławy tymi niebezpiecznymi dla zdrowia związkami. Należy podkreślić, iż w każdym przypadku sumaryczna zawartość WWA przekraczała normy Światowej Organizacji Zdrowia co najmniej dwukrotnie, a incydentalnie nawet ośmiokrotnie. Największe jednak zagrożenie stanowi obecność w wodzie powierzchniowej benzo/a/pirenu, którego ilość przekraczała normy od dwu- do jedenastokrotnie, zaś w wodzie nadosadowej od dwu- nawet do dziewiętnastokrotnie w stosunku do wymienionych norm.

Istniejąca sytuacja ma zapewne daleko idące skutki przede wszystkim z uwagi na fakt, iż WWA z całą pewnością odpo-

wiedzialne są za wywoływanie transformacji nowotworowej [2,7, 42,73,76,77,81,95,110,116,120,159,169], przy jednoczesnej niepełnej skuteczności usuwania ich z wody w wyniku stosowanych procesów uzdatniania [53,116,127,144] .

Jednocześnie należy podkreślić, iż występujące bardzo wysokie zanieczyszczenie wahające się od 143,7 do 5875,0 ng/dm³ wody nierakotwórczym antracenenem dowodzi z jednej strony niewłaściwej ochrony wody rzeki Oławy, a z drugiej strony - co wykazano w przedstawionej pracy - że biodegradacja tego związku dostarcza metabolitów o potencjalnym charakterze rakotwórczym.

Znaczna koncentracja WWA w wodzie rzeki Oławy wraz z innymi zanieczyszczeniami pociągała za sobą poważne zmiany w składzie ilościowym i jakościowym naturalnej mikroflory wodnej, co zapewne miało wpływ na procesy biologicznej części samooczyszczania. Zachwianie równowagi biologicznej pociąga bowiem za sobą poważne zakłócenia tego procesu. Jak wynika z przedstawionych badań dotyczących interakcji naturalnej mikroflory wodnej i glebowej z badanymi związkami, WWA oddziaływały na mikroflorę niejednorodnie co zapewne pozostawało w związku z ich zróżnicowaną budową chemiczną i przestrzenną, jednak w większości przypadków było ono zależne od stężenia badanego węglowodoru.

Z badań nad selekcją ilościową i jakościową mikroflory wynika, że pod wpływem WWA występowało w wodzie znacznie mniej bakterii przetrwalnikujących, przy jednoczesnym wzroście ogólnej liczby bakterii psychrofilnych. Wyniki te zdają się

potwierdzać pogląd, iż WWA wpływają na szybkość reprodukcji niektórych gatunków bakterii. Najsilniejszym bodźcowym oddziaływaniem na rozwój bakterii charakteryzował się benzo/a/piren w najwyższym stosowanym stężeniu $0,48 \text{ mg/dm}^3$.

Również w stosunku do bakterii przemian azotowych a zwłaszcza bakterii denitryfikacyjnych zanotowano przyspieszenie rozwoju populacji w obecności stosowanych WWA.

A zatem WWA zmieniały proporcje naturalnych komponentów mikroflory, wyraźnie uaktywniając niektóre grupy bakterii, a hamując inne. Obserwowane uaktywnienie bakterii denitryfikacyjnych może wyraźnie zachwiać równowagę w biocenozie w wyniku zubożenia wody pod względem istotnego pierwiastka biogenego jakim jest azot. Ponadto, w większości przypadków największą wrażliwością na WWA charakteryzowały się bakterie amylolityczne. Brak tej grupy bakterii w biocenozie może zaburzać rozkład nawet naturalnych zanieczyszczeń wody.

Odrębnym, choć wiążącym się z selekcją wpływem WWA na drobnoustroje jest występowanie w wodzie bakterii o zróżnicowanej wrażliwości na te związki. Stwierdzono, między innymi, iż w wodzie rzeki Oławy występują bakterie odporne na wysokie stężenia badanych związków, a także mające odpowiednie wyposażenie enzymatyczne do metabolicznego rozkładu benzo/a/pirenu, antracenu, fluorantenu, acenaftenu i naftalenu. Z obserwacji dotyczących aktywności respirometrycznej czystych szczepów bakterii opornych i wrażliwych na WWA, wyizolowanych z wody rzeki Oławy można stwierdzić, że badane węglowodory były - mimo wszystko - substratem. trudnodostępnym.

Wobec tego można przypuszczać, iż w związku z naturalną kolejnością wykorzystywania przez bakterie substratów energetycznych i pokarmowych wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne będą usuwane z wody na drodze naturalnej, po długim okresie czasu. Potwierdziły to w pełni dane dotyczące ubytku badanych WWA z wody, uzyskane w wyniku doświadczeń nad usuwaniem benzo/a/pirenu, antracenu i fluorantenu przez naturalną mikroflorę wodną. Stopień eliminacji WWA z wody zależał od czasu kontaktu mikroflory z badanymi związkami, jednakże można stwierdzić, że rozkład WWA w tym środowisku był bardzo powolny.

Należy do tego doliczyć ponadto fakt stwierdzonego kumulowania się benzo/a/pirenu, antracenu i fluorantenu w komórkach mikroorganizmów. Z jednej strony należy zjawisko to uznać za objaw pozornego usuwania tych związków z wody, a z drugiej za możliwość powstawania zanieczyszczeń wtórnych lub migrowania w łańcuchu troficznym.

W sumie WWA wpływają na zakłócenie równowagi biologicznej i zmianę składu zarówno ilościowego jak i jakościowego mikroflory. Rzeczywista ocena biologicznego usuwania tych zanieczyszczeń jest przez fakt kumulacji utrudniona, gdyż te procesy nakładają się w swych skutkach na siebie do momentu, gdy nie nastąpi wtórne uwolnienie skumulowanych węglowodorów. W rzece, której woda zajmowana jest do celów wodociągowych incydenty polegające na samooczyszczaniu są wyjątkowo niebezpieczne.

Podobne zagadnienia wyłaniają się w stosunku do naturalnej mikroflory gleby, z jednej strony w aspekcie wpływu bezpośredniego WWA na mikroflorę gleby, z drugiej strony infiltracji tych zanieczyszczeń poprzez glebę do wód powierzchniowych, lub w ciągach technologicznych procesów uzdatniania wody, do studni infiltracyjnych.

Ponieważ można było zaobserwować wyraźny wpływ selekcyjny badanych WWA w stosunku do mikroflory naturalnej gleby, przy równoczesnej znacznej aktywności w rozkładzie badanych związków, istnieje wobec tego możliwość zaburzeń cykli biogeochemicznych niektórych pierwiastków.

Eliminacje WWA z gleby ma bardzo istotne znaczenie zwłaszcza w procesach infiltracyjnych. Przeprowadzone badania wskazują iż problem przenikania WWA przez glebę ma drugoplanowe znaczenie w zagadnieniach zanieczyszczenia wód powierzchniowych tymi niebezpiecznymi związkami. Istnieje jednak pewne niebezpieczeństwo związane ze zmianami właściwości fizykochemicznych gleby w wyniku jej ekspozycji na wysokie stężenia badanych związków. Problem ten wymaga wyjaśnienia i specjalistycznych badań geotechnicznych i hydrogeologicznych.

Ponadto wyniki przeprowadzonych badań sugerują, iż określenie skażenia wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi jedynie na podstawie ilości benzo/a/pirenu jak to jest w przypadku norm dla powietrza [43] i propozycji norm dla gleby [80], a w przypadku wód na podstawie ilości benzo/a/pirenu lub alternatywnie sumy sześciu WWA /benzo/a/pirenu, benzo/k/fluorantenu, benzo/b/fluorantenu, benzo/ghi/perylenu, indenopirenu [186] nie wyczerpuje wszystkich

możliwości potencjalnego niebezpieczeństwa związanego z zanieczyszczeniem przez WWA środowiska wodnego. Uzyskane wyniki dowodzą wielokrotnie wyższego skażenia wód antracenenem uważanym za obojętny w transformacji nowotworowej [18].

Niemniej, co starano się wykazać w niniejszej pracy, ulega on mikrobiologicznej biotransformacji do produktów podejrzanych o potencjalnie mutagenne i rakotwórcze własności.

W wyniku biologicznego rozkładu antracenu powstają znacznie bardziej polarne metabolity, głównie dwuhydroksydioł, charakteryzujące się znacznie wyższą aktywnością biologiczną. Powstawaniem tego typu metabolitów należy tłumaczyć uzyskanie pozytywnych wyników testów Ames'a wykonanych na przesączach hodowlanych po 14 dobowej inkubacji bakterii wobec badanego związku jako jedyne źródła węgla i energii. Ponadto wydaje się, iż szlak metaboliczny antracenu jest w przypadku głównego produktu zbliżony do jego przekształceń w wyniku transformacji metabolicznej przez enzymy frakcji mikrosomalnej [138].

Powstawanie, na skutek biotransformacji mikrobiologicznej produktów o potencjalnym mutagennym i rakotwórczym charakterze, z punktu widzenia zdrowia ludzkiego, jest bardzo niepokojącym zjawiskiem. A zatem proces utylizacji tego związku na drodze biodegradacji prowadzić może do powstania zanieczyszczeń znacznie bardziej niebezpiecznych od substancji podstawowej. Wobec tej sytuacji należałoby wysunąć dwa istotne postulaty. Po pierwsze należy wprowadzić do norm określających stopień saniecyzyszczenia wód, a tym samym ich przydatność gospodarczą, dopuszczalną zawartość wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych z uwzględnieniem antracenu.

Po drugie należy rozpatrzyć możliwości badawcze rozpoznawania i metod analitycznych określania jakościowego i ilościowego metabolitów wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, w aspekcie ich potencjalnego działania mutagennego i rakotwórczego.

Wydaje się, iż jedną z możliwości rozwiązania tego problemu jest dostosowanie szybkich metod skryningowych do określania występowania mutagennych i rakotwórczych składników wód. Z tym kierunkiem badań można wiązać pewne nadzieje, zwłaszcza, że przy doborze odpowiednich metod przygotowania prób wody, można uzyskać wyniki będące skutkiem synergistycznego bądź antagonistycznego oddziaływania związków zanieczyszczających [16]. W tej sytuacji najlepszym rozwiązaniem byłoby bezpośrednie analizowanie wody pozbawionej naturalnej mikroflory jedynie na drodze filtracji. W przypadku wody rzeki Oławy, uzyskano w wyniku tak przygotowanego testu, wyniki pozytywne. Jednakże wydaje się, iż w przypadku niższego stopnia zanieczyszczenia wody, uzyskany tą metodą wynik negatywny, nie byłby jednoznaczny z nieobecnością w niej związków o własnościach mutagennych i rakotwórczych. Metodą pewniejszą wydaje się stosowanie odpowiednio przygotowanych ekstraktów wody w serii rozcieńczeń. Należy tu wziąć pod uwagę fakt, iż ekstrakcja jest operacją ukierunkowaną tak, że uzyskane wyniki można jedynie interpretować w odniesieniu do działania określonych związków.

Niemniej uzyskane wyniki dotyczące występowania w wodzie rzeki Oławy składników o potencjalnym mutagennym i rakotwórczym działaniu wykazały, iż pozytywne wyniki testu Ames'a nie były wynikiem jedynie zanieczyszczenia przez wielopier-

ścieniowe węglowodory aromatyczne. Wskazywały one; iż w wodach Oławy znajdują się inne zanieczyszczenia o podobnych własnościach.

Zagadnienie zanieczyszczenia wód powierzchniowych wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi stanowi jedynie część problemu ekspozycji organizmu ludzkiego na wpływ czynników środowiskowych, pozostających w bezpośrednim związku z powstawaniem chorób nowotworowych. Jednakże w sytuacji, gdy wody te stanowią główny surowiec do zaopatrzenia ludności w wodę, wydaje się iż problem ten powinien stanowić zagadnienie priorytetowe w ochronie środowiska naturalnego.

6. WNIOSKI

1. Woda powierzchniowa i nadosadowa rzeki Oławy wykazuje znaczne zanieczyszczenie wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi, przekraczające incydentalne jedenasto- a nawet dziewiętnasto-krotnie normę WHO, co wobec ich karcinogennego działania i ujmowania wód rzeki Oławy do celów wodociągowych ma bardzo duże znaczenie, w aspekcie zdrowia ludzkiego.
2. Obserwowana bardzo wysoka koncentracja w wodzie nierakotwórczego antracenu dowodzi poważnego zanieczyszczenia rzeki Oławy i niewłaściwej ochrony jej wód.
3. Wykonane na wodzie rzeki Oławy i jej ekstraktach testy inkorporacji płytkowej Ames'a potwierdziły występowanie w niej zanieczyszczeń o działaniu mutagennym i rakotwórczym; jednocześnie wykazano, iż test Ames'a może być stosowany do bezpośredniego badania wód.
4. Uzyskane różnice w wynikach testów Ames'a wykonanych na wodzie rzeki Oławy i jej ekstraktach świadczą o występowaniu innych niż wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne zanieczyszczeń o działaniu mutagennym i rakotwórczym.
5. W puli zanieczyszczeń wody rzeki Oławy wykazujących potencjalne mutagenne i rakotwórcze działanie znajdowały się zapewne metabolity antracenu; świadczą o tym wyniki testów Ames'a wykonanych na produktach pobiodegradacyjnych czystych szczepów bakterii wyizolowanych z badanej wody.

6. Wrażliwość naturalnej mikroflory wodnej na WWA była zróżnicowana i zależała z jednej strony od związku zanieczyszczającego i jego stężenia, z drugiej zaś od gatunku a nawet szczepu bakterii.
7. Z badanych WWA, benzo/a/piren, w obecności innych substancji odżywczych oddziaływał bodźcowo na mikroflorę, pobudzając populację bakterii do znacznie szybszego rozwoju. Istoty tego oddziaływania należy szukać we właściwościach biochemicznych badanych związków i ich zdolności do wywoływania procesów niekontrolowanego rozwoju komórek.
8. W biocenozie rzeki Oławy duży udział procentowy stanowiły bakterie mające zdolność wykorzystywania benzo/a/pirenu, antracenu, fluorantenu, acenaftenu i naftalenu jako jedynych źródeł węgla i energii, co pozostaje zapewne w związku z ich dużą koncentracją w ich środowisku naturalnym.
9. Benzo/a/piren, antraceni, fluoranteni wykazywały działanie selekcyjonujące mikroflorę, poprzez zmianę proporcji jej naturalnych komponent^{ów}, wyraźnie uaktywniając niektóre grupy bakterii przemian azotowych, a hamując inne, przy jednoczesnej eliminacji np. bakterii amyloリティcznych.
10. Naturalna mikroflora rzeki Oławy wykazywała zdolność do usuwania wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, jednakże proces ten był dość powolny, co w aspekcie wykorzystywania badanej wody do celów wodociągowych ma istotne znaczenie.
11. Stwierdzony fakt kumulowania benzo/a/pirenu, antracenu i fluorantenu przez naturalną mikroflorę wody rzeki Oławy

można uznać z jednej strony za zjawisko pozornego usuwania tych związków z wody, z drugiej zaś możliwość powstawania zanieczyszczeń wtórnych, lub ich migracji w łańcuchu troficznym.

12. Wpływ benzo/a/pirenu, antracenu i fluorantenu na naturalną mikroflorę glebową wywoływał w niej daleko posunięte zmiany będące wynikiem obniżenia ilości bakterii przetrwalnikujących, wzrostu liczby bakterii denitryfikacyjnych, eliminację bakterii amylolitycznych, a także przemieszczania się w warstwach gleby poszczególnych grup badanych mikroorganizmów. Jednakże skutki oddziaływania węglowodorów na mikroflorę glebową były w większości odwracalne.
13. Gleba charakteryzowała się znacznymi zdolnościami sorpcyjnymi w stosunku do WWA, przy czym ilość cząstek związków ekstrahowanych z gleby była niewielka. Jednocześnie nie można stwierdzić, że usuwanie benzo/a/pirenu, antracenu i fluorantenu z wody na drodze filtracji przez glebę odbywało się w przeważającym stopniu na drodze przetrwalnikowości biologicznych.
14. Na podstawie uzyskanych danych można stwierdzić, że zjawisko zanieczyszczenia wody przez WWA w wyniku infiltracji przez glebę ma znaczenie drugorzędne.
15. Badania aktywności podłożowej czystych szczepów bakterii wyizolowanych z wody rzeki Olsawy wykazały, że benzo/a/pirenu, antracen i fluoranten mogą być przez niektóre bakterie wykorzystywane jako substraty energetyczne.
16. Stwierdzono zdolność podłożową gleby zanieczyszczonej przez dwa szczepy bakterii wyizolowane z wody rzeki Olsawy.

Micrococcus luteus /g/4/1/ i *Pseudomonas* sp /d/3/2/

określoną na podstawie ubytku substratu, aktywności oddechowej i przyrostu biomasy bakterii w czasie trwania doświadczenia .

17. W wyniku analiz chemicznych stwierdzono, iż głównym metabolitem antracenu jest 1,2-dwuhydro-1,2-dwuhydroksyantracen.
18. Wobec uzyskanych wyników koniecznym wydaje się wprowadzenie norm określających dopuszczalne zanieczyszczenia wód, wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi, a także stosowanie stałej kontroli wód przeznaczonych do celów wodociągowych w kierunku określania w nich obecności zanieczyszczeń o potencjalnym , mutagennym i rakotwórczym działaniu.

7. LITERATURA .

- [1] Acheson M.A., Harrison P.M., Perry R., Wellings R.A.,
Factors affecting the extraction and analysis
of polynuclear aromatic hydrocarbons in water.
Wat.Res. 10, 207-210, 1976.
- [2] Ames B., Sims P., Grover P.L., Epoxides of carcinogenic
polycyclic hydrocarbons are frameshift mutagens
Science, 201, 47-49, 1978.
- [3] Ames B.N., Mc Cann J.J., Yamasaki E., Methods for detec-
ting carcinogenes and mutagens with the Sal-
monella/mammalian - microsome mutagenicity test.
Mutat.Res. 31, 343-374, 1975.
- [4] Andelmann J.B., Stess M.J. Polynuclear aromatic hydro-
carbons in the water environment. Bull. Wld.Hlth.
Org. 43, 479-508, 1970.
- [5] Bardodej Z. Metabolic studies and the evaluation of
genetic risk from the viewpoint of industrial
toxicology. Mutat. Res. 41, 7-14, 1976.
- [6] Bartaček J. Kancerogenni latky ve vodach. Sbornik Vysoke
Skoly Chemicko-technologicke w Praze F22 1978
Technologie vody a prostredi.
- [7] Bartsch H., Malaveille C., Camus A.M., Martel-Planche G.,
Brun G., Hautefeuille A., Sabadie N., Barbin A., Kuroki T.,
Drevon C., Piccoli C., Montesano R.,: Validantion and
comparative on 180 chemicals with S.typhimurium
strains and V79 chinese hamster cells in the

- presence of various metabolizing systems. *Mutat. Res.*, 76, 1-50, 1980.
- [8] Bartsch H., Malabietti C., Montesano R., Tomatis L.,
Tissue-mediated mutagenicity of vinylidene chloride
and 2-chlorobutadiene in *Salmonella typhimurium*.
Nature 255, 641-644, 1975.
- [9] *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Eighth
Edition. Buchanan R.E., Gibbons N.E. The Williams
and Wilkins Company. Baltimore 1974.
- [10] Borneff J. Polyzyklische Aromate in Oberflächen und
Grundwasser. Sch.Reihe Verwäss. Boden-Lufthyg
Berlin Dahlen 40, 53-60, 1973.
- [11] Borneff J., Fischer R. Kanzerogene Substanzen in Wasser
und Boden *Arch.Hyg.Bakt.* 146, 430-436, 1963.
- [12] Borneff J., Fischer R., Kanzerogene Substanzen in Wasser
und Boden. *Arch.,Hyg.Bakt.* 146, 572-578, 1963.
- [13] Borneff J., Kunte H. Kanzerogene Substanzen in Wasser
und Boden. *Arch.Hyg.Bakt.* 147, 401-410, 1963.
- [14] Borneff J., Kunte H., Kanzerogene Substanzen in Wasser
und Boden. *Arch.Hyg.Bakt.* 151, 193-202, 1967.
- [15] Borneff J., Kunte H., Cancerogenic substances in water
and soil. Part XIX The effect of sewage purti-
fication on PAH. *Arch.Hyg.Bakt.* 151,202-212, 1967.
- [16] Borneff J., Kunte H., The synthesis of B/a/P and others
PAH in plants. *Arch,Hyg.Bact.* 152,279-285, 1968.

- [17] Borneff J., Kunte H., Kanzerogene Substanzen in Wasser und Boden. XXVI. Routine methode zur Bestimmung von polyzyklische Aromaten im Wasser. Arch.Hyg. Bakt. 153, 220-229, 1969.
- [18] Borneff J., Selenka F., Kunte H., Maximos A., Experimental studies on the formation of polycyclic aromatic hydrocarbons in plants. Environ. Res. 2, 22-29, 1968.
- [19] Borneff J., Selenka F., Kunte H., Maximos A.: The synthesis of 3,4-benzopyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons in plants. Arch.Hyg. 152, 279-282, 1968.
- [20] Bourne E.W., Jones R.W., Effects of 7,12-dimethyl-benz /a/anthracene /DMBA/ in fish cells in vitro. Trans. Amer.Microsc.Soc. 92, 140-142, 1973.
- [21] Bøylund E., Sims P., Metabolism of polycyclic compounds. The metabolism of pyrene in rats and rabbits. Biochem. J. 90, 391-402, 1964.
- [22] Bøylund E., Sims P., Metabolism of polycyclic compounds. The metabolism of 9,10-epoxy-9,10-dihydrophenanthrene in rats. Biochem. J. 95, 788-795, 1965.
- [23] Brooks P. Lawley P.P. Evidence for the binding of polynuclear aromatic hydrocarbons to the nucleic acids of mouse skin: relation between carcinogenic power of hydrocarbons and their binding to desoxyribonucleic acid. Nature 202, 781-798, 1964.

- [24] Bryła J., Regulacja metabolizmu komórki. PWN, Warszawa 1981.
- [25] Commoner B., Hunt D.M. Detection of metabolic carcinogen intermediates in urine of carcinogenfed rats by means of bacterial mutagenesis. Nature 249, 850-852. 1974.
- [26] Cowan S.T., Steel's: Manual for the identification of bacteria. Cambridge University Press, Cambridge 1975.
- [27] Davis B.O. et al. Microbiology. Medical Department Harper and Row. Publishers. Hagerstown, Maryland, New York, San Francisco, London, 1973.
- [28] De Bruin A. Biochemical toxicology of environmental agents. Elsevier/North - Holland Biochemical Press, 1976.
- [29] De Lustig E.S., Matos E.L. Teratogenic effects induced in tail of Bufo arenarum tadpoles following treatment with carcinogens. Experientia 27, 555-556, 1971.
- [30] Department of Health Education and Welfare, Chemical compounds in food-producing animals, Federal Register 44, 55, 17070-17114, 1979.
- [31] Dobrowolski J.W. Badania nad środowiskowymi warunkowaniami chorób proliferacyjnych ze szczególnym uwzględnieniem białaczek bydła. Zeszyty Naczelnych Wydawnictw Naukowych Akademii Górniczo-Hutniczej Kraków 1981.

- [32] Duppel W., Lebeault J.M., Coon M.J. Properties of a yeast cytochrome P-450-containing enzyme system which catalyzes the hydroxylation of fatty acids, alkanes and drugs. *Eur.J.Biochem.* 36, 583-592, 1973.
- [33] Dutkiewicz T., Lulek G., Masny N.: Wstępne badania nad biodegradacją wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych *Arch.Ochr.Środow.* 3-4, 85-88, 1980.
- [34] Dutkiewicz T., Masłowski J., Rybosz S., Masny N.: Oznaczanie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w elementach środowiska metodą cieczowej chromatografii kolumnowej. *Bromat.Chem.Toksykol.* XIII, 1, 89-99, 1980.
- [35] Dziennik Ustaw PRL Nr 24, 5 listopada 1980.
- [36] Ecobichon D.J., Comeau A.M. Comparative effects of commercial Aroclors on rat liver enzyme activities. *Chem.-Biol.Interactions* 9, 341-350, 1974.
- [37] Ermer M. Studies with carcinogens in short-lived fish species. *Zool.Anz.* 184, 1975-193, 1970.
- [38] Ferris J., Mac Donald L.H., Patrie M.A., Martin M.A. Aryl hydrocarbon hydroxylase activity in the fungus *Cunninghamella bainierii*. Evidence of the presence of cytochrome P-450, *Arch.Biochem.Biophys.* 175, 443-452, 1976.
- [39] Fritz W. Zur Bildung cancerogener Kohlewasserstoffe bei der thermischen Behandlung von Lebensmitteln.

- 6.Mitt. Untersuchung zur Kontamination bei der direkten Rauchgastrocknung von Getreide. Nahrung 18, 83-90, 1974.
- [40] Fritz W. Zur Bildung cancerogener Kohlenwasserstoffe bei der thermischen Behandlung von Lebensmitteln. 2.Mitt.Das Rosten von Bohnenkaffe und Kafee-Ersatzstoffen. Nahrung 12, 799-802. 1968.
- [41] Fritz W. Zur Bildung cancerogener Kohlenwasserstoffe bei der thermischen Behandlung von Lebensmittelstoffen. 3. Mitt. Das Backen von Brot und Biskuits. Nahrung 12, 805-811, 1968.
- [42] Fu P.P., Frederick A., Beland A., Yang S.K. Cyclopenta - polycyclic aromatic hydrocarbons: Potential carcinogens and mutagens. Carcinogenesis, 1, 725-727, 1980.
- [43] Gałkiewicz E., Sikora M., Chromiczewski J., Górski T. Wpływ wybranych związków chemicznych na indukcję rewersji histydynowych mutacji szczepów *Salmonella typhimurium*. Med.Dośw. Mikrobiol., 32, 243-251, 1980.
- [44] Garner R.C., Miller E.C., Miller J.A. Liver microsomal metabolism of aflatoxin B₁ to a reactive derivative toxic to *Salmonella typhimurium* TA 1530¹. Cancer Res. 32, 2058-2066, 1972.
- [45] Gelboin H.V., Selkirk J.K., Okuda T., Nemoto N., Yang Sh.K. Biological Reactive Intermediates. Plenum Press 98-123, 1977.

- [46] Gibson D.T. Biodegradation of aromatic petroleum hydrocarbons pp. 36-46-Za: Neff J.M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. Appleid Science Publisher LTD. London 1979.
- [47] Gibson D.T., Mahdevan V., Jerina D.M., Yagi H., Yeh H.J. Oxidation of the carcinogens benzo/a/ pyrene and benzo/a/anthracene to dihydrodiols by a bacterium. Science 189, 295-297, 1975.
- [48] Gibson D.T. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Public Health Servis Cancer Development. 57-66, 1976.
- [49] Góraska E., Górski T., Benzo/a/piren w glebie i ziemiakach. Bromat.Chem.Toksykol.XII,3,257-262, 1980.
- [50] Grabow W.OK., Van Rossum P.G., Grabow N.A., Denkhaus R. Relationship of the row water quality to mutagens detectable by the Ames Salmonella/microsome assay in a drinking - water supply Wat.Res.,15,1037-1043, 1981.
- [51] Greinke R.A., Lewis I.C., Development of a gas chromatographic - ultraviolet-absorption spectrometric methods for monitoring petroleum pitch volatiles in the environment. Analyt.Chem.47, 2151-2155, 1975.
- [52] Gimmer G., Hildebrandt A.: Kohlenwasserstoffe in der Umgebung das Menschen. VI Mitt. Der Gehalt polycyclischer Kohlenwasserstoffe in rohen Pflanzenölen. Arch.Hyg.Bakt. 152, 255-263, 1968.

- [53] Grochmalicka-Mikołajczyk J., Ochocka J.R., Lulek J.,
Wpływ ozonowania na zawartości wielopierścienio-
wych węglowodorów aromatycznych /WWA/ w wodach.
Gaz Woda i Technika Sanitarna 53, 74, 1979.
- [54] Grochmalicka-Mikołajczyk J., Ochocka J., Lulek J.,
Oznaczanie wielopierścieniowych węglowodorów
aromatycznych /WWA/ nagromadzonych w pokrywie
śnieżnej. Bromat.Chem.Toksykol. XV, 1982, 1-2,
67-69.
- [55] Grochmalicka-Mikołajczyk J., Ochocka J., Lulek J.,
Zawartość wielopierścieniowych węglowodorów aro-
matycznych /WWA/ w wodach jezior okolic Poznania.
Bromat.Chem.Toksykol. XV, 3, 199-202, 1982.
- [56] Grochmalicka-Mikołajczyk J., Ratajczyk D., Policykliczne
węglowodory aromatyczne w wodzie rzeki Warty przed
i po jej oczyszczeniu. Arch.Ochr.Środow., 2,
167-178, 1976.
- [57] Grzybowska J. Zanieczyszczenia chemiczne PWN Warszawa 1976.
- [58] Grzybowski J., Gazda K., Rewkowska G., Żychlińska L.
Rozdział benzo/a/pirenu i jego metabolitów metodą
wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej /HPLC/
Bromat.Chem.Toksykol. XVI, 1, 21-29, 1983.
- [59] Hancock J.L., Applegate H.G., Dodd J.D. Polynuclear
aromatic hydrocarbons on leaves. Atmosph.Environ.
4, 363-370, 1970.

- [60] Harrison R.M., Perry R., Wellings R.A. Polynuclear aromatic hydrocarbons in raw potable and waste waters. *Wat.Res.* 9, 331-339, 1975.
- [61] Hase A., Hites R.A., On the origin of polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments: biosynthesis by anaerobic bacteria. *Geochim.Cosmochim. Acta* 40, 1141-1143, 1976.
- [62] Hecht S.S., M.Loy, D.Hoffmann. On the structure and carcinogenicity of the methylchrysenes pp 325-340 *Za R. Frendanthal and P.W Jones Cacinogenesis - A Comprehensive Survey. Vol. 1. Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. Chemistry, Metabolism, and Carcinogenicity. New York, Raven Press 1976.*
- [63] Hellmann H.: Fluorimetrische Bestimmung von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen in Blättern, Blüten und Phytoplankton. *Z.Anal.Chem.* 287, 148-151, 1977.
- [64] Herbes S.E., Schwall L.R., Williams G.A.: Rate of microbial transformation of polycyclic hydrocarbons: a chromatographic quantification procedure. *Appl.Environ.Microbiol*, 34, 2, 244-246, 1977.
- [65] Hollstein M., Mc Cann J., Short-term tests for carcinogens and mutagens. *Mutat.Res.*, 65, 133-266, 1979.
- [66] Howard J., Fazio T. : A review of polycyclic aromatic hydrocarbons in foods. *Agricul. and Food.Chem.* 17, 3, 527-531, 1969.

- [67] Howard J., Fazio T.: Review of polycyclic aromatic hydrocarbons in foods. *J.Assoc.Off.Anal.Chem.* 63,3, 1077-1104, 1980.
- [68] Ilnitskii A.P., Ershova K.P., Khesina A.Y., Rozhkova L.G., Klubkov V.G., Korolev A.A.: Stability of carcinogens in water and efficacy of methods of decontamination *Gig.Sanit.*, 36, 9-13, 1971.
- [69] Ilnitskii A.P., Khesina A.Y., Cherkinskii S.N., Shabad L.M. Effect of ozonation upon aromatic hydrocarbons, including carcinogens *Gig.Sanit.*, 33, 323-327. 1968.
- [70] International Standards for Drinking Water 3 vol. Ed.WHO Geneva 1971.
- [71] Jaszczuk E., Syrowatka T. Działanie mutagenne wybranych pestycydów na *Salmonella typhimurium*. *Roczn.PZH.* XXXI, 3, 305-311, 1980.
- [72] Jerina D.M., Daly J.W., Jeffrey A.M., Gibson D.T. Cis-1,2-dihydroxy-1,2-dihydronaphthalene: A bacterial metabolite from naphthalene. *Arch.Biochem.Biophys.* 142, 394-396, 1971.
- [73] Jerina D.M., Yagi H., Lehr R.E. Polycyclic Hydrocarbons and Cancer. *Academ.Press*, 1, 173-188, 1978.
- [74] Jones R.W. Huffman M.N. Fish embryos as bio-assay material in testing chemicals for effects on cell division and differentiation. *Trans.Amer.Microsc. Soc.* 76, 177-183, 1957.

- [75] Jurkiewicz J., Rosiński S., Karbochemia PWN Warszawa 1968
- [76] Just J., Maziarka S., Długasiewicz M.,: Umieralność na raka płuc mieszkańców wybranych miast polskich, a zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego. Roczn.PZH, 20, 515-526, 1969.
- [77] Just J., Maziarka S., Długasiewicz M.,: Badania składu i własności rakotwórczych substancji zawartych w pyłe zawieszonym w powietrzu atmosferycznym. Roczn.PZH, 21, 221-239, 1970.
- [78] Just J., Maziarka S., Wyszynska H., Węglowodory rakotwórcze w powietrzu atmosferycznym 10 wybranych miast w Polsce. Ochrona Powietrza 4, 14-16, 1970.
- [79] Khudolei V.V., Sirenko O.A.: Tumor development in the bivalve mollusk *Unio pictorum* induced by N-nitroso compounds. Bull.Exper.Biol.Med. 83, 684-686, 1977.
- [80] Kier L.D., Yamasaki E., Ames B.N.: Detection of mutagenic activity in cigarette smoke condensates. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 71, 10, 4159-4163, 1974.
- [81] Kiyoshi Teranishi, Kokiehi Hamada, Hiromu Watanabe
Quantative relationship between carcinogenicity and mutagenicity of polyaromatic hydrocarbons in *Salmonella typhimurium* mutants. Mutat.Res. 31, 97-102, 1975.
- [82] Knorr M., Schenk D.: The question of the synthesis of polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria Arch.Hyg. 152, 63-65, 1968.

- [83] Knutzen J., Sortland B.: Polycyclic aromatic hydrocarbons /PAH/ in some algae and invertebrates from moderately polluted parts of the coast of Norway. *Wat.Res.* 16, 421-428, 1982.
- [84] Koch R., Strobel K., Halogenkohlenwasserstoffe als toxikologisch relevante Substanzen im Trinkwasser. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*
- [85] Kolar L. Kontaminace pud a zemedelskych plodin kancerogennim 3,4-benzopyrenem a její príciný. *Rostlinna Vyroba* 21, 261-269, 1975.
- [86] Kolar L., Ledvina R., Ticha J., Hanus F.: Znečistení pud, zemedelskych plodin a zeleniny 3,4-benzopyrenem v okolí Ceckych Budejovic. *Cečkoslovenska Hygema* 20, 135-139, 1975.
- [87] Korotkova G.P., Tokin B.P.: Stimulation of the process of somatic embryogenesis in some porifera and coelenterata I. Effect of carcinogenic agents on some porifera. *Acta Biol. Hungary* 19, 465-474, 1968.
- [88] Kowbel D.J., Nestmann E.R., Malaiyandi M., Helleur R., Detection of mutagenic activity in Salmonella of residual fulvic acids after ozonation. *Wat. Res.* 16, 1537-1538, 1982.
- [89] Krasnosčekova R., Gubergrits M., Solubilisation of benzo/a/pyrene in aqueous solutions of ionic surfactants. *Acta Hydrochim. et Hydrobiol* 11,2,181-186 1983.

- [90] Kugaczewska M., Piekarski L., Michalik E., Kamińska M.
Ocena toksykologicznego działania furfuralu,
benzo/a/pirenu i frakcji ropy A-33. Bromat.Chem.
Toksykol. XV 217-221, 1982
- [91] Lamparczyk H.S., Farmer P.B., Cary P.D., Grover P.L.,
Sims P.: The metabolism of 9,10-dimethyloanthracene
by rat liver microsomal preparations. Carcino-
genesis, 5, 11, 1405-1410, 1984.
- [92] Lamparczyk H., Radecki A., Kaliszan R., Application of a
geometric parameter defining molecular shape, for
the quantitation of interaction of polycyclic aroma-
tic hydrocarbons with enzyme systems. Biochem.
Pharm. Vol. 30, m16, 2337-2344, 1981.
- [93] Lao R.C., Thomas R.S., Monkman J.L. Computerized gas
chromatographic - mass spectrometric analysis
of polycyclic aromatic hydrocarbons in environ-
mental samples. Journal of Chromat. 112, 681-700,
1975.
- [94] La Voie E.J., Hecht S.S., Amin S., Bedenko V., Hoffmann.
Identification of mutagenic dihydrodiols meta-
bolites of benzo/j/fluoranthene and benzo/a/fluo-
ranthene. Can.Res. 40, 4528-4532, 1980.
- [95] La Voie E.J., Tulley-Freiler L., Bedenko V., Hoffmann D.
Mutagenicity, tumor - initiating activity, and
metabolism of methylphenanthrenes. Cancer Res.
41, 3441-3447, 1981.

- [96] La Voie E.J., Tulley-Freiler L., Bedenko V., Hoffmann D.
Mutagenicity of substituted phenanthrenes in
Salmonella typhimurium. Elsevier Biomedical
Press, 1982.
- [97] Lee R.F., Ryan C., Nouhauser M.L. Fate of petroleum
hydrocarbons taken up from food and water by the
blue crab *Callinectes sapidus*. Mar.Biol. 37,
363-370, 1976.
- [98] Lima-Zanghi C. Fatty acid balance of marine plankton
and pollution by benzo-3,4-pyrene. Cah.Oceanogr.
3, 203-216, 1968.
- [99] Magee P.N. The relationship between mutagenesis, carcino-
genesis and teratogenesis. Elsevier/North/Holland
Biochemical Press. Progress in Genetic Toxicology,
15-27, 1977.
- [100] Malaney G.W., Lutin A.A., Cibulka J.J., Hickerson L.H.
Resistance of carcinogenic organic compounds to
oxidation by activated sludge. J.Wat.Pollut.Contr.
Fed.39.2020-2029, 1967.
- [101] Malaveille C., Hautefeuille A., Bartsch H., Mac Nicoll A.D.,
Grover P.L., Sims P.,: Liver microsome-mediated mutageni-
city of dihydrodiols derived from dibenzo/a,c/an-
thracene in Salmonella typhimurium TA 100. Carci-
nogenesis 1, 287-289, 1980.

- [102] Mallet L.C., Lima-Zanghi C., Brison J.: Investigations of possibilities of biosynthesis of polybenzene hydrocarbons of the benzo-3,4-pyrene type by *Clostridium putride* in the presence of marine plankton lipids. C.R.Acad.Sci.Ser.D.264, 1534-1537, 1967.
- [103] Mallet L., Tissier M. Experimental biosynthesis of polybenzene hydrocarbons of the benzo-3,4-pyrene type at expense of forest soils. C.R.Soc.Biol. 163, 63-65, 1969.
- [104] Marroquin F.R., Faber E.: The apparent binding of radioactive 2-acetylamino-fluorence to rat-liver ribonucleic acid in vivo. Biochem.Biophys.Acta 55, 403-409, 1962.
- [105] Marroquin F.R., Faber E.: The binding of 2-acetylamino-fluorence to rat-liver ribonucleic acid in vitro. Cancer Resear. 25, 1262-1269, 1965.
- [106] Marszewska-Ziemięcka J. et al. Mikrobiologia gleby i nawozów organicznych P.W.R. i L. Warszawa 1974.
- [107] Masuda Y., Kuratsune M. Photochemical oxydation of benzo/a/pyrene. Int.J.Air Wat.Pollut. 10, 805-811, 1966.
- [108] Naugh T.H. Chemicals carcinogens a long neglected field blossoms. Science 183, 940-944, 1974.
- [109] Mc Cann J., Ames B.N. The Salmonella/microsome mutagenicity test: predictive value for animal chemistry organisms of Human Cancer, Hialt H.H.Watson

J.D. Winston J.A. Eols. Cold Spring Harbor
Laboratory New York /from conference/ 1976.

- [110] Mc Cann J.J., Choi E., Yamasaki E., Ames B.N. Detection of carcinogenes as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals. Proc. Nat.Acad.Sci.USA, 72, 5135-5139, 1975.
- [111] Mc Cann J., Spingarn N.E., Kobori J., Ames B.N., Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester strains with R factor plasmids. Proc.Natl.Acad. Sci. USA. 72, 979-983, 1975.
- [112] Mc Ginnis E.L., Norris M.S. Determination of four-and five - ring condensed hydrocarbons. I.Analysis of polynuclear aromatic hydrocarbons in yeast produced by growth on both n-hydrocarbon and dextrose feeds. J.Agr.Food.Chem. 23,2,221-225,1975.
- [113] Mc Ginnis E.L. Determination of four- and five-ring condensed hydrocarbons.II.Analysis of polynuclear aromatic compounds in n-paraffin feed oil for yeast fermentation. J.Agr.Food Chem. 23,2, 226-229, 1975.
- [114] Minako Nagao, Takashi Sugimura, Shen K. Yang. Gelboin H.D. Mutagenicity of optically pure +/-trans-7,8-dihydroxy-dihydrobenzo/a/pyrene. Mutat.Res.58, 361-365, 1978.

- [115] Modica R., Fiume M., Bartošek J.: Gas-liquid chromatographic assay of polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures: specifically modified method for rat tissues. J.Chromatography 247, 352-255, 1982.
- [116] Müller F.E., Reichert J.K., Carcinogenic substances in water and soil. Past. XXV Examination through animal tests of the carcinogenicity of chlorinated derivatives of BP. Arch.Hyg.Bakt. 153, 26-35. 1969.
- [117] Nagata S., Konodo G. Photo-oxidation of crude oils pp 617-620 Proc.Oil.Spill Conference 1977 za: Neff J.M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. Appleid Science Publishers LTD 1979.
- [118] National Academy of Science Particulate Polycyclic Organic Matter Washington D.C. NAS. 1972.
- [119] Neff J.M.: Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment, Sources, fates and biological effects Appleid, London 1979, Science Publishers LTD.
- [120] Newman M.S. Carcinogenic activity of benz/a/anthracenes pp. 203-208. za: R.Frendenthal and P.W.Jones; Carcinogenesis - A Comprehensive Survey Vol.1. Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. Chemistry, Metabolism and Carcinogenesis. New York Raven Press 1976.
- [121] Niassut P. Pollution by in situ biosynthesis of carcinogenic hydrocarbons of a lagoon ecosystem: reproduction in vitro of this phenomenon. Rev.Int. Oceanog.Med. 17, 87-98, 1970.

- [122] Niaussat P., Auger C. Distribution of benzo/a/pirene and perylene in various organism of the Clipperton Lagoon ecosystem. C.R.Acad.Sci.Ser.D.270, 2702-2705, 1970.
- [123] Nikonorow M. Zanieczyszczenia chemiczne i biologiczne żywności. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne Warszawa 1980, 146-148.
- [124] Nikonorow M. Aktualne zagadnienia zdrowotne w związku z zanieczyszczeniem gleby, wody, powietrza atmosferycznego oraz roślin i pasz. Roczn. PZH XXXII 5-6, 393-405 1981.
- [125] Nyrek St. Chemia Organiczną PWN Warszawa 1973.
- [126] Ochocka J.R., Grochmalicka-Mikołajczyk J. Badania stopnia eliminacji wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych /WWA/ w wodzie uzdatnionej Cz.I. Zawartość WWA w ujmowanej dla celów wodociągowych wodzie rzecznej. Roczn.PZH.XXXI, 6, 629-635, 1980.
- [127] Ochocka J.R., Grochmalicka-Mikołajczyk J. Badania stopnia eliminacji wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych /WWA/ z wody uzdatnionej. Cz.II. Eliminacja WWA w trakcie stosowania procesów uzdatniania wody. Roczn. PZH. XXII, 1, 45-52, 1981.
- [128] Oesch F., Brückner M., Glatt H.R. Activation of phenanthrene to mutagenic metabolites and evidence for at least two different activation pathways. Mutat.Res., 81- 1-10- 1981.

- [129] Osborne L.L., Dawles R.U., Dixon K.R., Moore R.L.:
Mutagenic activity of fish and sediments in the
Sheep River, Alberta Wat.Res.16, 902-911, 1982.
- [130] Paputa-Peck M.C., Morano R.S., Schultze D., Riley T.L.
Hampton C.V., Prater T.J., Skewes L.M., Jensen T.E.
Determination of nitrated polynuclear aromatic
hydrocarbons in particulate extracts by capillary
column gas chromatography with nitrogen selective
detection. *Analyt.Chem.*55, 1946-1954, 1983.
- [131] Patterson A.M.L.T. Capell and D.F. Walker. The ring Index
A List of Ring Systems Used in Organic Chemistry
/2nd ed./ Washington. D.C.American Chemical Society
1960.
- [132] Pascal Y., Free radical mediated linkage of carcinogenic
hydrocarbons to polynucleotides *Biochemie*, 53,
365-372, 1974.
- [133] Piekarski L., Barczak A., Sawicki J. Badania oddziaływania
butylohydroksyanizolu oraz innych przeciwutlenia-
czy na proces aktywacji benzo/a/pirenu w hodowlach
komórkowych. *Bromat.Chem.Toksykol.*XV, 3, 203-207,
1982.
- [134] Poglazova M.N., Chesina A.J., Fiedosieva G.E.: O razru-
senii mikroorganizmami benzo/a/pirena w stojnych
vodach. *Mikrobiologia* 1, 222-225, 1972.
- [135] Potthast K. et all. 3,4-Benzpyren gehalt in Gewürzen.
Sonderdruck aus *Die Fleischwirtschaft*, 7,
1290-1296, 1977.

- [136] Przeździecki Z.: Biologiczne przemiany substancji toksycznych PWN Warszawa 1976.
- [137] Przeździecki Z.: Biologiczne skutki chemizacji środowiska PWN Warszawa 1980.
- [138] Przybojewska B. Przegląd i ocena wybranych testów skринingowych stosowanych do badania mutagenego/rakotwórczego działania związków chemicznych. *Bromat. Chem. Toksykol.* XVII, 2, 163-169, 1984.
- [139] Purchase J.F.H., Longstaff E., Ashby J., Styles J.A., Anderson D., Lefevre P.A., Westwood F.R.: An evaluation of 6 short-term tests for detecting organic chemical carcinogens. *Br.J.Cancer* 37, 873-959, 1978.
- [140] Radding S.B., Mill T., Gould C.W., Liu D.H., Johnson H.L., Bomberger D.C., Fojo C.V. The environmental fate of selected polynuclear aromatic hydrocarbons. *Environ Prot. Ag. Washington. D.C.* 1976.
- [141] Radecki A., Lamparczyk H., Grzybowski J., Halkiewicz J., Gas-chromatographic determination of benzo/a/pyrene in petroleum products used for the manufacture of drugs and cosmetics. *Fre:Z.Anal.Chem.* 303, 397-400, 1980.
- [142] Ramug U., Johansson A., Ramel C., Wachtmeister C.A.: The mutagenicity of vinyl chloride metabolic activation. *Ambio*, 3, 5, 194-197, 1974.

- [143] Raport of a workshop on bacterial in vitro mutagenicity test systems 1978. Mutat.Res. 53, 369-378.
- [144] Reichert J.K. Carcinogenic substances in water and soil Part. XXIII, XXIV. The removal of PAH with ClO_2 while treating drinking water. Isolation and identification of BP derivative products. Arch. Hyg.Bakt. 152, 266-265, 277-283, 1963.
- [145] Rodina A. Mikrobiologiczne metody badania wód.PWRiL Warszawa 1968.
- [146] Ruziewicz Z.: Quasi-linowe widma luminescencji i absorpcji wieloatomowych drobin organicznych. Postępy Fizyki XXIV, 3, 311-330, 1973.
- [147] Rzewuska E., Karłowska-Jasek M., Narcoń-Kępińska A., Domaradzki R.: Studia i badania nad sposobem ochrony rzeki Nysy Kłodzkiej od zbiornika Kamienia do ujścia w Michałowie oraz rzeki Oławy przed zanieczyszczeniem. Inst.Kształt.Środow. Oddział Wrocław 1974, praca niepublikowana.
- [148] Salmeen J.T., Pero A.M., Zator R., Schuetzle D., Riley T.L. Ames assay - chromatograms and the identification of mutagenes in Diesel particle extracts. Env. Sei.Tech. 12/28 1-36, 1984.
- [149] Schuetzle D. Sampling of Vehicle emissions for chemical analysis and biological testing. Environ.Health Perspec. 47, 65-80, 1983.

- [150] Schuetzle D., Perez J.M. Factors influencing the emissions of nitrated - polynuclear aromatic hydrocarbons /Nitro-PAH/ from diesel engines. Air. Pollut. Con. Assoc. 33, 8, 751-755, 1983.
- [151] Seilern-Aspang F., Kratochwil K. Spontaneous healing of an infiltrating and metastasizing epithelial tumor of Triturus cristatus. Arch. Geschwulstforsch. 21, 292-300, 1963.
- [152] Shigeaki Sato, Yuko Seino, Tomoko Ohka, Takie Yahagi, Minako Nagao, Taijiro Matsuhima, Takashi Sugimura: Mutagenicity of smoke condensates from cigarettes, cigars and pipe tobacco. Cancer Letters 3, 1-8, 1977.
- [153] Sokołowska R. Badania niektórych produktów spożywczych na zawartość benzo/a/pirenu, Roczn. PZH. 27, 253-256, 1976.
- [154] Sokołowska R. Wyodrębnianie wielopierscieniowych węglowodorów aromatycznych z kapusty Roczn. PZH, 30, 606-611, 1979.
- [155] Sokołowska R. Zawartość benzo/a/pirenu w kapuście. Roczn. PZH, XXXI, 1, 53-58, 1980.
- [156] Sokołowska J., Maciejewski F. Oznaczenie węglowodorów aromatycznych metodą chromatografii gazowej w ściekach z produkcji styrenu i kumenu G.W.T.S. 2, 56-58, 1977.

- [157] Süess M.J. Aqueous solutions of 3,4-benzopyrene wat.Res. 6, 981-985, 1972.
- [158] Süess M.J. Laboratory experimentation with 3,4-benzopyrene in aqueous systems and environmental consequences. Zblt.Bakt.Hyg. 155, 541-546, 1972.
- [159] Swaisland A.J., Glover P.L., Sims P., Epoxides in polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism and carcinogenesis. Biochem.Pharmacol. 22, 1547-1556, 1973.
- [160] Syrowatka T.: Współczesne problemy toksykologii substancji chemicznych. Przewidywanie odległych skutków stosowania. Bariery bezpieczeństwa. Roczn. PZH. XXX, 4, 317-322, 1979.
- [161] Szabad L.M.: O cyrkulacji karcinogenów w okrużajuszej sriedie. Moskwa 1973.
- [162] Šiškina W.N., Trocenko J.A. Svoistva novago štamma Hyphomicrobium ispolsuišćego odhouglerodnyde soiedimania. Mikrobiologia 5, 765-770, 1974.
- [163] Tore Aune 1979 Carcinogenicity of chemical compounds and their detection in several bacterial short-term testes N.I.P.H. Annals 2, 1, ssiv, 5, 332-5652.
- [164] Trescott E.J., Schuetzle D., Prater T.J., Ball J.C., Salmeen J. : Biological and chemical characterization of a composite heavy-duty diesel particle sample over a long period of time. Proceedings of the Eight International Symposium on PAH

Oct. 26-28, 1983. Battelle Press, Columbus, Ohio.

- [165] Ts'o P.O., Panzy Lu. Interaction of nucleic acids. II
Chemical linkage of the carcinogen 3,4- benzo
pyrene to DNA induced by photoradioaction.
Proc. Nat. Acad. Scienc 51, 272-281, 1964.
- [166] World's Health Organisation International Standards for
Drinking Water 3rd Edition, Geneva 1971.
- [167] Woźniak J. Tokarz A. Chromatograficzne oznaczanie benzo/a/
pirenu w powietrzu. Bromat. Chem. Toksykol. XV,
3, 209-215, 1982.
- [168] Wyszowska H. Występowanie w pyłach powietrza atmosferycznego
koronenu, perylenu i antracenu obok innych
węglowodorów aromatycznych wielopierścieniowych
zaliczanych do rakotwórczych. Roczn. PZH 60,
1221-1234, 1968.
- [169] Yang S.K., Deutsch J., Gelboin H.V. Polycyclic Hydrocarbons
and Cancer, Academic Press Inc. 1, 205-1978.
- [170] Yang S.K., Mc Court D.W., Leutz J.C., Gelboin H.V. Benzo/a/
pyrene diol epoxides mechanism of enzymatic formation
and optically active intermediates. Science
196, 1199-1201. 1977.
- [171] Zawadzka H., Karalkiewicz D., Zerbe J. Występowanie poli-
cyklicznych węglowodorów aromatycznych w wodach
powierzchniowych w Polsce. Gospodarka wodna 8/9,
264-265, 1980.

8. SPIS TABEL

- Tabela 1 Wybrane własności fizyczne niektórych WWA
- Tabela 2 Rakotwórczość WWA w stosunku do ssaków laboratoryjnych
- Tabela 3 Wzrost emisji toksycznych składników gazów spalinowych w Polsce i w Warszawie w latach 1970-1975.
- Tabela 4 Emisja benzo/a/pirenu do atmosfery w latach 1966-1969 na terenie USA i całego świata.
- Tabela 5 Zawartość WWA w pokrywie śnieżnej
- Tabela 6 Zawartość wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w niektórych wodach powierzchniowych na terenie Polski.
- Tabela 7 Koncentracja benzo/a/pirenu i innych WWA w różnych wodach rzecznych.
- Tabela 8 Zawartość benzo/a/pirenu w glebie w najbardziej zanieczyszczonych miejscach poboru prób.
- Tabela 9 Zawartość benzo/a/pirenu w wybranych produktach pochodzenia roślinnego.
- Tabela 10 Rozkład benzo/a/pirenu w wodzie pod wpływem światła.
- Tabela 11 Fotodegradacja WWA pod wpływem naturalnego światła.
- Tabela 12 Zawartość wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w ściekach [mg/m³] i osadzie czynnym.
- Tabela 13 Akumulacja z wody morskiej i wydalanie WWA przez *Rangia cuneata*.
- Tabela 14 Losy ³H-benzo/a/pirenu zakumulowanego w wody przez *Collinectes sapidus* [144]

- Tabela 15 Charakterystyka szczepów bakterii *Salmonella typhimurium* LT₂ użytych w teście Ames'a.
- Tabela 16 Zakres stosowanych w podłożach hodowlanych stężeń wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych.
- Tabela 17 Schemat dozowania roztworów wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych do lizymetrów.
- Tabela 18 Warianty prób przygotowywanych dla określenia aktywności oddechowej w aparacie Warburga.
- Tabela 19 Warianty eksperymentów dotyczących biodegradacji antracenu przez szczepy $\epsilon/4/1$ i $d/3/2$.
- Tabela 20 Ilość wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w próbach wody rzeki Oławy.
- Tabela 21 Cechy genetyczne szczepów testowych *Salmonella typhimurium* LT₂ użytych do badań.
- Tabela 22 Ilość rewertantów do prototrofii *Salmonella typhimurium* LT₂ pod wpływem wody z rzeki Oławy i stawu infiltracyjnego.
- Tabela 23 Ilość rewertantów do prototrofii *Salmonella typhimurium* LT₂ pod wpływem wody rzeki Oławy /maj 1981/.
- Tabela 24 Ilość rewertantów do prototrofii *Salmonella typhimurium* LT₂ w obecności mieszaniny S-9, pod wpływem wody rzeki Oławy /maj 1981/.
- Tabela 25 Ilość rewertantów do prototrofii *Salmonella typhimurium* LT₂ pod wpływem wody rzeki Oławy /listopad 1981/.
- Tabela 26 Ilość rewertantów do prototrofii *Salmonella typhimurium* LT₂ w obecności mieszaniny S-9 pod wpływem wody rzeki Oławy /listopad 1981/.

- Tabela 27 Ilość rewertantów do prototrofii *Salmonella typhimurium* LT₂ w obecności mieszaniny S-9 pod wpływem ekstraktów wody rzeki Oławy na stanowisku 1.
- Tabela 28 Ilość rewertantów do prototrofii *Salmonella typhimurium* LT₂ w obecności mieszaniny S-9 pod wpływem ekstraktów wody rzeki Oławy na stanowisku 2.
- Tabela 29 Ilość rewertantów do prototrofii *Salmonella typhimurium* LT₂ w obecności mieszaniny S-9 pod wpływem ekstraktów wody rzeki Oławy na stanowisku 3.
- Tabela 30. Wrażliwość naturalnej mikroflory wody rzeki Oławy na obecność w agarze odżywczym wzrastających stężeń badanych WWA.
- Tabela 31 Zdolność wzrostu naturalnej mikroflory wody rzeki Oławy wobec badanych WWA jako jedynych źródeł węgla i energii.
- Tabela 32 Zdolność do wzrostu naturalnej mikroflory wody rzeki Oławy wobec badanych WWA jako jedynych źródeł węgla i energii w stosunku do wzrostu na agarze odżywczym wzbogaconym wzrastającymi stężeniami WWA.
- Tabela 33 Procentowy ubytek antracenu, benzo/a/pirenu i fluorantenu w próbach wody wzbogaconej badanymi WWA.
- Tabela 34 Kumulacja benzo/a/pirenu przez naturalną mikroflorę wody rzeki Oławy.
- Tabela 35 Kumulacja antracenu przez naturalną mikroflorę wody rzeki Oławy.
- Tabela 36 Kumulacja fluorantenu przez naturalną mikroflorę wody rzeki Oławy.

- Tabela 37 Procentowy ubytek antracenu, benzo/a/pirenu i fluorantenu w próbach przesączów z filtrów glebowych /niesterylnych/.
- Tabela 38 Procentowa zawartość antracenu, benzo/a/pirenu, i fluorantenu w glebie z lizymetrów niesterylizowanych w czasie 0, po 21 dobach dozowania WWA i 14 dobach dozowania wody redestylowanej.
- Tabela 39 Procentowy ubytek antracenu, benzo/a/pirenu i fluorantenu w próbach przesączów z filtrów glebowych sterylizowanych.
- Tabela 40 Procentowa zawartość antracenu, benzo/a/pirenu i fluorantenu w glebie z lizymetrów sterylizowanych w czasie 0, po 21 dobach dozowania WWA i 14 dobach dozowania wody redestylowanej.
- Tabela 41 Cechy identyfikacyjne bakterii wrażliwych na wysokie stężenia antracenu, benzo/a/pirenu i fluorantenu.
- Tabela 42 Rozwój populacji bakterii określany metodą najbardziej prawdopodobnej liczby bakterii w procesie biodegradacji antracenu.
- Tabela 43 Ilość antracenu w czasie jego biotransformacji przez czyste szczepy bakterii i ich mieszaninę.
- Tabela 44 Test Ames'a wykonany na przesączu hodowlanym po 7 dniach biodegradacji antracenu w stężeniu $0,3 \text{ mg/dm}^3$
- Tabela 45 Test Ames'a wykonany na przesączu hodowlanym po 14 dobach biodegradacji antracenu w stężeniu $0,3 \text{ mg/dm}^3$.

- Tabela 46 Test Ames'a wykonany na przesączu hodowlanym po 7 dobach biodegradacji antracenu w stężeniu $0,15 \text{ mg/dm}^3$.
- Tabela 47 Test Ames'a wykonany na przesączu hodowlanym po 14 dobach biodegradacji antracenu w stężeniu $0,15 \text{ mg/dm}^3$.
- Tabela 48 Określenie rozwoju populacji bakterii w procesie biodegradacji antracenu.
- Tabela 49 Test Ames'a wykonany na przesączu hodowlanym po 14 dniach biodegradacji antracenu przez szczep \mathcal{E}_7 .
- Tabela 50 Względne czasy retencji produktów pobiodegradacyjnych antracenu.

9. SPIS RYSUNKÓW

- Rys. 1 Struktura pierścieniowa reprezentowanych WWA
- Rys. 2 Fotooksydacja benzo/a/pirenu i antracenu
- Rys. 3 . Rozkład benzo/a/antracenu, fluorenu i benzo/a/pirenu pod wpływem ozonu.
- Rys. 4. Rozkład naftalenu przez *Pseudomonas putida*
- Rys. 5. Mikrobiologiczne utlenianie benzo/a/pirenu
- Rys. 6. Drogi rozkładu WWA przez organizmy prokariotyczne i eukariotyczne.
- Rys. 7. Schemat przemian benzo/a/pirenu w ustroju.
- Rys. 8. Aktywacja metaboliczna i detoksykacja benzo/a/pirenu przez frakcję mikrosomalną wątroby ssaków.
- Rys. 9. Metabolizm naftalenu
- Rys. 10. Przemiany naftalenu do kwasu 1-naftylomerkapturowego.
- Rys. 11. Przemiany w ustroju benzo/a/antracenu [120].
- Rys. 12. Metabolizm antracenu [123].
- Rys. 13. Szkic sytuacyjny terenów ujęć wody dla miasta Wrocławia
- Rys. 14. Schemat testu Ames'a na określenie mutagenego i rakotwórczego działania wody bez aktywacji metabolicznej związków w niej występujących.
- Rys. 15. Schemat testu Ames'a na określenie mutagenego i rakotwórczego działania wody z aktywacją metaboliczną związków w niej występujących.
- Rys. 16. Schemat lizymetru stosowanego do badań
- Rys. 17. Ilość bakterii w wodzie rzeki Oławy w cyklu rocznym.
- Rys. 18. Ilość bakterii rosnących wobec gradientu stężeń benzo/a/pirenu występujących w wodzie rzeki Oławy w cyklu rocznym.

- Rys. 19. Ilość bakterii wykorzystujących benzo/a/piren jako źródło węgla i energii występujących w wodzie rzeki Oławy w cyklu rocznym.
- Rys. 20. Ilość bakterii rosnących wobec gradientu stężeń antracenu występujących w wodzie rzeki Oławy.
- Rys. 21. Ilość bakterii wykorzystujących antracen jako źródło węgla i energii występujących w wodzie rzeki Oławy w cyklu rocznym.
- Rys. 22. Ilość bakterii rosnących wobec gradientu stężeń fluorantenu występujących w wodzie rzeki Oławy w cyklu rocznym.
- Rys. 23. Ilość bakterii wykorzystujących fluoranten jako źródło węgla i energii występujących w wodzie rzeki Oławy w cyklu rocznym.
- Rys. 24. Ilość bakterii rosnących wobec gradientu stężeń acenaftenu występujących w wodzie rzeki Oławy w cyklu rocznym.
- Rys. 25. Ilość bakterii wykorzystujących acenaften jako źródło węgla i energii występujących w wodzie rzeki Oławy w cyklu rocznym.
- Rys. 26. Ilość bakterii rosnących wobec gradientu stężeń naftalenu występujących w wodzie rzeki Oławy w cyklu rocznym.
- Rys. 27. Ilość bakterii wykorzystujących naftalen jako źródło węgla i energii w wodzie rzeki Oławy w cyklu rocznym.
- Rys. 28. Liczba bakterii psychrofilnych, przetrwalnikujących, proteolitycznych i amylolitycznych w wodzie z rzeki

Oławy wzbogaconej benzo/a/pirenem.

- Rys. 29. Miano bakterii denitryfikacyjnych, amonifikacyjnych, nitryfikacyjnych I fazy i nitryfikacyjnych II fazy w wodzie rzeki Oławy wzbogaconej benzo/a/pirenem.
- Rys. 30. Liczba bakterii psychrofilnych, przetrwalnikujących, proteolitycznych i amylolitycznych w wodzie z rzeki Oławy wzbogaconej antracenenem.
- Rys. 31. Miano bakterii denitryfikacyjnych, amonifikacyjnych, nitryfikacyjnych I fazy i nitryfikacyjnych II fazy w wodzie z rzeki Oławy wzbogaconej antracenenem.
- Rys. 32. Liczba bakterii psychrofilnych, przetrwalnikujących, proteolitycznych i amylolitycznych w wodzie rzeki Oławy wzbogaconej fluorantenem.
- Rys. 33. Miano bakterii denitryfikacyjnych, amonifikacyjnych, nitryfikacyjnych I fazy i nitryfikacyjnych II fazy w wodzie rzeki Oławy wzbogaconej fluorantenem.
- Rys. 34. Zmiany liczby bakterii psychrofilnych, przetrwalnikujących, proteolitycznych i amylolitycznych podczas sorpcji i desorpcji WWA przez filtr glebowy /próba kontrolna.
- Rys. 35. Zmiany miana bakterii denitryfikacyjnych, amonifikacyjnych, nitryfikacyjnych I fazy i nitryfikacyjnych II fazy podczas sorpcji i desorpcji WWA przez filtr glebowy /próba kontrolna/.

- Rys. 36. Zmiany liczebności bakterii psychrofilnych, przetrwalnikujących, proteolitycznych i amylolitycznych podczas sorpcji i desorpcji benzo/a/pirenu przez filtr glebowy.
- Rys. 37. Zmiany miana bakterii denitryfikacyjnych, amonifikacyjnych, nitryfikacyjnych I fazy i nitryfikacyjnych II fazy podczas sorpcji i desorpcji benzo/a/pirenu przez filtr glebowy.
- Rys. 38. Zmiany liczby bakterii psychrofilnych, przetrwalnikujących, proteolitycznych i amylolitycznych podczas sorpcji i desorpcji antracenu przez filtr glebowy.
- Rys. 39. Zmiany miana bakterii denitryfikacyjnych, amonifikacyjnych, nitryfikacyjnych I fazy i nitryfikacyjnych II fazy podczas sorpcji i desorpcji antracenu.
- Rys. 40. Zmiany liczby bakterii psychrofilnych, przetrwalnikujących, proteolitycznych i amylolitycznych podczas sorpcji i desorpcji fluorantenu przez filtr glebowy.
- Rys. 41. Zmiany miana bakterii denitryfikacyjnych, amonifikacyjnych, nitryfikacyjnych I fazy i nitryfikacyjnych II fazy podczas sorpcji i desorpcji fluorantenu przez filtr glebowy.
- Rys. 42. Liczba bakterii psychrofilnych, przetrwalnikujących, proteolitycznych, amylolitycznych w glebie modeli doświadczalnych /próba kontrolna i z benzo/a/pirenem.
- Rys. 43. Miano bakterii denitryfikacyjnych, amonifikacyjnych, nitryfikacyjnych I fazy i nitryfikacyjnych II fazy

w glebie modeli doświadczalnych /próba kontrolna i z benzo/a/pirenem/

- Rys. 44. Liczba bakterii psychrofilnych, przetrwalnikujących proteolitycznych i amyloolitycznych w glebie modeli doświadczalnych /próby z antracenenem i fluorantenenem/.
- Rys. 45. Miano bakterii denitryfikacyjnych, amonifikacyjnych, nitryfikacyjnych I fazy i nitryfikacyjnych II fazy w glebie modeli doświadczalnych /próby z antracenenem i fluorantenenem/.
- Rys. 46. Określenie intensywności oddychania czystych szczepów bakterii w obecności benzo/a/pireni jako jedynego źródła węgla i energii.
- Rys. 47. Określenie intensywności oddychania czystych szczepów bakterii w obecności antracenu jako jedynego źródła węgla i energii.
- Rys. 48. Określenie intensywności oddychania czystych szczepów bakterii w obecności fluorantenu jako jedynego źródła węgla i energii.
- Rys. 49. Intensywność oddychania szczepu $g/4/1$ podczas biodegradacji antracenu.
- Rys. 50. Intensywność oddychania szczepu g_7 podczas biodegradacji antracenu.
- Rys. 51. Hromatogramy produktów pobiodegradacyjnych antracenu.

Teodora Małgorzata Traczewska

Biologiczna transformacja i indykacja zanieczyszczeń o charakterze mutagennym i rakotwórczym wody powierzchniowej ze szczególnym uwzględnieniem wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych.

Streszczenie

W wyniku przeprowadzonych badań, w których materiałem była woda rzeki Oławy oraz naturalną mikroflorą, a także gleba przybrzeżna, pobierane na stanowisku najbardziej narażonym na emisję zanieczyszczeń przemysłowych, a jednocześnie leżącym na terenach wodonośnych uzyskano następujące wyniki:

Zarówno woda powierzchniowa jak i nadosadowa rzeki Oławy wykazywała znaczne zanieczyszczenie wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi, przekraczając incydentalnie jedenasto- a nawet dwiętnastokrotnie normę WHO, przy jednoczesnym wysokim zanieczyszczeniu antracenenem. Ponadto wykazano, iż test Ames'a może być stosowany do bezpośredniego badania wód. W puli zanieczyszczeń wody wykazujących potencjalne mutagenne i rakotwórcze działanie znajdowały się zapewne metabolity antracenu, o czym świadczą wyniki testów Ames'a wykonanych na produktach pobioodegradacyjnych czystych szczepów bakterii wyizolowanych z badanej wody. Wrażliwość naturalnej mikroflory wodnej na WWA była zróżnicowana, przy czym z badanych związków benzo/a/piren oddziaływał na mikroflorę bodźcowo, pobudzając ją do wzrostu. W biocenozie rzeki Oławy udział procentowy stanowiły bakterie mające zdolność wykorzystywania badanych WWA jako źródła węgla i energii, przy czym jednocześnie obserwowano ich działanie selekcyjne. Ponadto stwierdzono, iż naturalna mikroflora miała zdolność biodegradacji WWA, a także ich kumulacji.

Wpływ benzo/a/pirenu, antracenu i fluorantenu na naturalną mikroflorę glebową objawiał się się obniżeniem ilości bakterii przetrwalnikujących, wzrostem liczby bakterii denitryfikacyjnych, eliminacji bakterii amylolitycznych, a także przemieszczaniem się poszczególnych grup bakterii w warstwach gleby. Przy tym gleba charakteryzowała się znacznymi zdolnościami sorpcyjnymi w stosunku do WWA, a zatem zanieczyszczenie wód przez badane związki na drodze infiltracji przez glebę, ma raczej drugoplanowe znaczenie.

Ponadto stwierdzono zdolność biodegradacji antracenu przez dwa szczepy bakterii wyizolowane z wody rzeki Gławy /*Micrococcus luteus* i *Pseudomonas* sp./. W wyniku analiz chemicznych stwierdzono, iż głównym metabolitem antracenu jest 1,2-dwuhydro-1,2-dwuhydroksyantracen.

Teodora Małgorzata Traczewska

Biological transformation and indication of mutagenic and cancerigenic pollution of surface water with specific consideration of polynuclear aromatic hydrocarbons

ABSTRACT

During studies where material was Olawa river water together with natural microflora and also coastal soil sampled in environment most endangered with industrial pollution emission and still located in a water-bearing area the following results were obtained:

Both surface water and sediment water of Olawa river contained serious contamination with polynuclear aromatic hydrocarbons incidentally exceeding eleven or even nineteen times WHO specifications with simultaneous severe contamination with anthracene. In addition it was shown that Ames test may be used for direct examinations of waters. Within the water pollution pool exhibiting potentially mutagenic and cancerigenic action, there existed some anthracene metabolites as shown by results of Ames tests performed on postbiodegradation products of pure bacterial strains isolated from water under testing. Natural water microflora sensitiveness to PAH was diversified wherein from the compounds under testing benzo/a/pyrene acted on microflora stimulusly prompting it to grow.

In Olawa river biocenosis high percentage constituted bacteria able to use PAH tested as a source of coal and energy; at the same time their selectioning action was observed. At the same time it was found that natural microflora was able to PAH biodegradation and also to cummulation of them. Influence of benzo/a/pyrene,

anthracene and fluoranthene on natural soil microflora exhibited in decreased amount of sporulation bacteria, increased amount of denitrification bacteria, elimination of amylolytic bacteria and displacement of individual bacterial groups in soil layers. At the same time soil characterized by considerable sorption capacity with respect to PAH. Hence contamination of waters by the compounds under testing in the way of infiltration through soil is rather of secondary importance.

Additionally ability was found to biodegradation of anthracene by two bacterial strains isolated from Olawa river water /*Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* sp./. In result of chemical analyses it was found that the main metabolite of anthracene is 1,2,-dihydro-1,2,-dihydroxyanthracene.

Analiza dokumentacyjna

(D) Materiałem do badań była woda rzeki Oławy z naturalną mikroflorą oraz gleba przybrzeżna pobierana na terenach wodonośnych w obszarze wpływów Huty Siechnica i Elektrociepłowni Czechnica. Stwierdzono bardzo wysoki stopień zanieczyszczenia wód przez WWA, w tym antracen. Woda oraz jej ekstrakty wykazywały potencjalne mutagenne i rakotwórcze działanie. Wrażliwość naturalnej mikroflory na badane WWA była zróżnicowana. Bakterie miały zdolność kumulacji i biotransformacji WWA, a także wykorzystywania ich jako jedynego źródła węgla i energii. Dwa czyste szczepy bakterii wyizolowanych z wody rzeki Oławy miały zdolność do biodegradacji antracenu, a produktem metabolizmu był 1,2-dwuhydroksy-1,2-dwuhydroantracen, który powodował dodatnie wyniki testu Ames'a.

Imię i Nazwisko autora analizy

Teodora Traczewska

Słowa kluczowe

(S wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, woda powierzchniowa, woda nadosadowa, bakterie wrażliwe, bakterie odporne, kumulacja, biotransformacja, metabolit, bioidykcja, mutagenność, rakotwórczość.

**0480*00* 047522

(A 056962 *B _____ *C _____ *D _____

*E _____ *F _____ *G _____ *H _____

Tylko PRL	CINTE	APW	Podpis red.	Podpis asyst. d/s badań	Potwierdzenie przyjęcia poprawki	Potwierdzenie przyjęcia karty w Oddziale Dokumentacji
WPB						
Nie						
Wpisać TAK lub NIE						

		1	2	3	4	5	6	7	8	9
* N *		N,N,P,V,N,V,V,N								
										1,0111017
	Rezpocz. pr.	Zakończ. pr.	Opubl. pr.		Instytut		Nr tematu.			
		0485			I 15		15001			
Nr zlecenia.		Nr archiwalny								
310934		I 15 P			85 *					
628.515 Symbol UKD.		Środki tech. ochr. przed zanieczyszczeniem wód								
576.8.083		Specjalne techniki...								
576.8.095.1		Ogólne wpływy otaczającego.....								
<p>Opis bibliograficzny.</p> <p>Teodora Traczewska</p> <p>Biologiczna transformacja i indykacja zanieczyszczeń o charakterze mutagennym i rakotwórczym wody powierzchniowej ze szczególnym uwzględnieniem wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych.</p> <p>Raporty Inst. Inż. Ochr. Środow. PWr 1985 ser. PRE nr 297 s. 16 rys. 50 tab. 35 wyk. bibliogr. 171 poz./maszyn. powiel./</p> <p>Rozprawa doktorska</p> <p>Politechnika Wrocławska, Instytut Inżynierii Ochrony Środowiska, Wrocław</p> <p>Promotor: prof. dr hab. Maria Pawlaczyk-Szpilowa</p> <p>297,6</p> <p>Charakter pracy: podstawowa</p> <p>Materiały odpłatne:</p> <p>Rozpowszechnianie: -</p>										

