

SABINA SUSEK-BEŚKA

Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Śląski  
ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice

## ZNACZENIE TESTÓW BAKTERYJNYCH W BADANIACH NAD WYKRYWANIEM KARCINOGENNEGO I MUTAGENNEGO DZIAŁANIA METALI CIĘŻKICH

### WSTĘP

Termin mutacja został wprowadzony do biologii przez de Vriesa w 1909 roku. Dzisiaj pod tym pojęciem rozumiemy nagłe, dziedziczące się zmiany w sekwencji zasad DNA, powodujące zaburzenia w kodzie genetycznym. Zmiany mutacyjne mogą obejmować mutacje punktowe (które mogą polegać na zmianie jednej pary zasad na inną, na ubytku par zasad lub wstawieniu dodatkowych par), zmiany w strukturze chromosomu lub zmiany liczby chromosomów. U mikroorganizmów materiał genetyczny (genofor) stanowi pojedynczy chromosom, dlatego u bakterii rozpatrujemy głównie mutacje punktowe czyli zmiany sekwencji nukleotydów w nici DNA.

Mutacje są wynikiem działania czynników fizycznych i licznych związków chemicznych, które pośrednio lub bezpośrednio powodują zmiany w materiale genetycznym. Lista czynników fizycznych wydaje się być ograniczona, natomiast liczba związków chemicznych o działaniu mutacyjnym jest długa i ciągle zwiększa się. Dopisywane są związki nowo powstałe, ale i takie które były powszechnie stosowane (np. oranż akrydyny był stosowany jako barwnik w przemyśle spożywczym).

O ile u organizmów jednokomórkowych zmiany genetyczne objawiają się poprzez zmiany cech morfologicznych lub fizjologicznych, to u organizmów wielokomórkowych mogą ujawnić się niekontrolowaną proliferacją komórek, w wyniku których obserwujemy powstanie nowotworów. Mutacje i transformacje nowotworowe, jak dzisiaj przyjmujemy, są ze sobą ściśle związane. Karcynogeny powodujące nowotwory wzrost komórek w zdecydowanej większości przypadków są mutagenami (ale nie wszystkie mutageny są karcynogenami). W teście Amesa z użyciem *Salmonella typhimurium* uży-

skano pozytywną odpowiedź na pytanie, czy mutageny są również karcynogenami, ponieważ wśród związków wykazujących mutagenność było 72%–91% związków rakotwórczych w badaniach na zwierzętach, zaś te które nie wykazywały mutagenności w 74%–94% nie wywoływały nowotworów u zwierząt (NAMIEŚNIK i JAŚKOWSKI 1995). W teście Rec z użyciem szczepu *Bacillus subtilis* również uzyskano pozytywną (w 84%) odpowiedź, że mutagen może być karcynogenem, ponieważ na 25 badanych karcynogenów 21 dało wynik pozytywny (HIRANO i współaut. 1982). W testach z użyciem *Escherichia coli* na 100 badanych związków karcynogennych aż 91 dało wynik pozytywny (SCHLEGEL 1995).

Karcynogeny dzieli się na dwie kategorie: genotoksyczne i epigenetyczne. Określenie karcynogeny genotoksyczne jest związane z ich potencjalną możliwością zmieniania komórkowego kodu genetycznego. Uszkodzenie polega na kowalencyjnym wiązaniu się aktywnej formy karcynogenu genotoksycznego z DNA (powstaje addukt). Najczęściej modyfikacji ulegają zasady azotowe. Powszechnie uważa się, że związek, który ma zdolność tworzenia adduktów, jest potencjalnym karcynogenem. Obecność adduktu zakłóca prawidłowe parowanie się komplementarnych zasad, co uniemożliwia prawidłowy przebieg replikacji DNA. W wyniku replikacji uszkodzenie DNA spowodowane związkiem karcynogennym utrwała się jako mutacja. Karcynogeny epigenetyczne nie indukują mutacji, podstawą ich działania rakotwórczego są, na przykład, zaburzenia hormonalne, cytotoksyczność, immunosupresja i udział w generowaniu wolnych rodników tlenowych (NAMIEŚNIK i JAŚKOWSKI 1995).

## METODY BADANIA MUTACJI

Badanie działania mutagennego, jak i rakotwórczego związków chemicznych można przeprowadzić:

1. Epidemiologicznie — przez stwierdzenie zależności między częstością występowania choroby a obecnością w środowisku substancji mutagennej (karcynogennej). Tradycyjną metodę, opartą na monitorowaniu i prowadzeniu kwestionariuszy, stosuje się obecnie rzadko, gdyż wyniki uzyskuje się *post factum*. Częściej stosuje się obecnie tak zwaną epidemiologię molekularną, polegającą na wykrywaniu markerów molekularnych, które są wskaźnikami uszkodzeń DNA powstałych na skutek działania określonego karcynogenu. Addukt PAH-DNA (PAH, policykliczne węglowodory aromatyczne) uważa się, że świadczy o podwyższonym ryzyku zachorowania na raka płuc.

2. Laboratoryjnie — jest to szereg testów, w których używa się zwierząt (badania długoterminowe) lub mikroorganizmów i modeli biologicznych (linie komórkowe) — są to tak zwane badania krótkoterminowe.

Badania długoterminowe są wykonywane na szczurach, myszach lub chomikach syryjskich. Każdy związek jest testowany na przynajmniej dwóch gatunkach i obydwóch płciach, a każdy test powinien obejmować przynajmniej 50 zwierząt w każdej grupie eksperymentalnej i trwać 2 lata.

Badania krótkoterminowe obejmują testy wykorzystujące zjawiska zachodzące w komórkach ssaków pod wpływem uszkodzeń DNA. Wymienia się tutaj badania polegające na określeniu, czy zaszła wymiana odcinków pomiędzy chromatydami siostrzanymi (SCE sister-chromatid exchange).

Krótkoterminowe testy z użyciem mikroorganizmów są oparte na założeniu, że DNA jest materiałem genetycznym wszystkich żywych komórek i substancje szkodliwe dla DNA komórki bakteryjnej będą najprawdopodobniej szkodliwe dla ludzkiego DNA (NAMIEŚNIK i JAŚKOWSKI, 1995). Testy bakteryjne są zaliczane do trzech klas: wykrywające mutacje postępujące i wsteczne oraz wykrywające reperację uszkodzeń DNA (INDULSKI 1993).

Opracowano wiele testów umożliwiających wykrycie substancji mutagennych, w których używa się szczepów bakteryjnych. Testem powszechnie używanym jest test Ames — bakteriologiczna metoda wykrywania i określenia substancji niszczących strukturę DNA i przyjmowanych z uzasadnionym prawdopodobieństwem

za rakotwórcze (SCHLEGEL 1995). W teście tym używa się genetycznie zmienionych szczepów *Salmonella typhimurium*; zawierają one mutację ( $his^-$ ), to znaczy nie dokonują syntezy histydyny, gdyż nie są zdolne do produkcji enzymu uczestniczącego w tym procesie. Jest to mutacja typu pokarmowego. Czasami w celu podwyższenia wrażliwości szczepów stosowanych w tym teście dokonuje się w nich innych mutacji, na przykład uszkodzenie ściany komórkowej, co powoduje większą jej przepuszczalność dla substancji chemicznych lub zmniejszenia zdolności naprawy uszkodzeń DNA.

Test Amesa polega na pomiarze częstotliwości mutacji powrotnych (wstecznych) do szczepu histydynoniezależnego pod wpływem badanego związku. Mutacje powrotne (rewersje) zdarzają się znacznie częściej, gdy bakterie histydynozależne ( $his^-$ ) są narażone na działanie czynników mutagennych. Według przyjętych kryteriów testowana substancja jest uznawana za mutagenną, jeśli powoduje co najmniej dwukrotny wzrost liczby kolonii rewertantów w porównaniu do liczby kolonii rewertantów spontanicznych.

Przyczyną fałszywych negatywnych wyników w teście Amesa może być brak systemu aktywującego, ponieważ pewne związki są mutagenne dopiero po aktywacji metabolicznej (nazywa się je promutagenami), aby uniknąć tego stosuje się metaboliczną aktywację przez enzymy zawarte w homogenacie wątroby szczurzej oznaczonego S-9. Próbowano stosować frakcję S-9 z innych tkanek i innych zwierząt (np. z szczurzego płuca lub ludzkiej wątroby) ale okazało się, że wątroba szczurza jest najbardziej dogodnym źródłem aktywnych enzymów (AMES i współaut. 1975). Obecność S-9 zafałszowała wyniki w przypadku badania mutagennego wpływu metali ciężkich. Znoszenie mutagennego i toksycznego wpływu metali zachodziło z powodu metaloprotein obecnych w S-9. Proteiny wiążą metale, które nie mogą w tej formie działać na DNA (WONG 1988).

Można użyć innej metody aby określić czy dany związek jest mutagenny, która również wykorzystuje bakterie. Metoda ta opracowana przez Tsuneo Kada (często jest określana jako test Rec) wykorzystuje szczepy *Bacillus subtilis*. Wyselekcjonował on mutanty z uszkodzonym genem *rec45*, które nie posiadają zdolności reperacji uszkodzonego DNA. Bakterie nie posiadające zdolności naprawy są bardziej wrażli-

we na związki uszkadzające DNA niż dzikie szczepy. Szczep nazwany M45Rec<sup>-</sup> nie posiada genu *rec45* używany w tym teście w kombinacji ze szczepem H17Rec<sup>+</sup>, który jest dziki, czyli posiada własność rekombinacji DNA. Porównując rodzicielski szczep H17Rec<sup>+</sup> ze szczepem M45Rec<sup>-</sup>, to ten ostatni ma mniejsze zdolności do transformacji, jest bardziej wrażliwy na promieniowanie UV i gama ( $\gamma$ ) (KADA 1975).

Określenie za pomocą tego testu czy badany związek chemiczny jest mutageny czy nie, polega na określeniu różnic w wielkości stref zahamowania pomiędzy szczepami rec<sup>+</sup> i rec<sup>-</sup>. Udoskonalenia tego testu polegają na użyciu kiełkujących przetrwalników w miejsce komórek wegetatywnych, umożliwia to 50-krotny wzrost wrażliwości. Kiełkujące przetrwalniki mają wyższą wrażliwość na związki powodujące uszkodzenia w DNA (KADA i WATANABE 1983, HIRANO i współaut. 1982). Również jak w teście Amesa stosuje się metaboliczną aktywację za pomocą frakcji S-9.

W testach na mutagenność związków chemicznych stosuje się czasami szczep *Escherichia coli* WP2 (*tyr*<sup>-</sup>). Dokonano w nich mutacji pokarmowej, nie są one zdolne do wytwarzania tryptofanu. Stosuje się czasami szczep o zwiększonej wrażliwości na promieniowanie UV (*hcr*<sup>-</sup>), w których zdolność do naprawy zniszczonego DNA jest znacznie obniżona. Potwierdzeniem wpływu mutagennego związku jest indukcja mutacji powrotnej *try*<sup>-</sup> → *try*<sup>+</sup> (KADA 1973).

Oprócz podstawowych testów stosowanych od wielu lat i które są uznawane za standardy, w ostatnich latach pojawiło się dużo nowych testów, które również przeprowadza się na mikroorganizmach.

Mutatox (TM) jest to test wykorzystujący morską, bioluminescencyjną bakterię *Photobacterium phosphoreum*. Zdolność substancji do uszkodzenia DNA określa się na podstawie przejścia luminescencyjnych bakterii w formy nieświecące (ciemne). JOHNSON (1992) porównuje Mutatox z testem Amesa i twierdzi, że jest on łatwiejszy, szybszy i tańszy. Inni badacze (COTE i współaut. 1996) połączyli obydwie te metody. Do szczepu *Salmonella typhimurium* TA98 wprowadzono geny *lux* odpowiedzialne za emitowanie światła w procesie bioluminescencji.

Do nowszych testów na genotoksyczność, pozwalających na ilościową ocenę indukcji poszczególnych genów uczestniczących w procesach uruchomianych w komórce bakteryjnej po uszkodzeniu DNA jest grupa testów, które są szybkie, proste, mierzone kolorymetrycznie, polegające na indukcji transkrypcji genów regulo-

nu SOS. Są to testy: SOS chromotest, Umu test i RecA test.

W systemie naprawy SOS dwa geny odgrywają kluczową rolę: *lexA* kodujący represor dla wszystkich genów systemu naprawczego i *recA* kodujący białko zdolne do rozkładania represora LexA. Monitorowanie uruchamiania systemu naprawczego SOS może polegać na obserwacji aktywacji białka RecA, rozszczepiania represora LexA lub ekspresji innego genu z systemu SOS. Wzmoczona transkrypcja genu *recA* zaczyna się na skutek uszkodzenia DNA, białko RecA w kompleksie z jednoniciowym DNA nabiera właściwości proteolitycznych i jest w stanie inaktywować represor LexA. Aby ułatwić monitorowanie indukcji systemu SOS dokonano fuzji jednego genu z tego systemu z genem *lacZ* (strukturalny gen kodujący enzym  $\beta$ -galaktozydazę), (MULLER i JANZ 1992, QUILLARDET i HOFNUNG 1993). Standardowym szczepem w SOS chromotest jest szczep *Escherichia coli* PQ37—ma on fuzję genów *sfiA::lacZ*; dokonano u tego szczepu również delecji normalnego regionu *lac*<sup>-</sup>, dlatego aktywność  $\beta$  galaktozydazy jest ściśle zależna od ekspresji genu *sfiA*. Konstytutywna synteza fosfatazy zasadowej, enzymu niezależnego od kontroli SOS, stanowi kontrolę w tym modelu badań (QUILLARDET i HOFNUNG 1993). Używa się też szczepu PQ300, który ma dodatkową mutację w genie *oxyR* (kluczowy gen w obronie przed związkami utleniającymi), przez co staje się wrażliwszy w wykrywaniu utleniających związków genotoksycznych (MULLER i JANZ 1993, QUILLARDET i HOFNUNG 1993).

W testach Umu i RecA bada się indukcję genów *umuC* lub *recA*, które poddano fuzji z genem *lacZ-umuC::lacZ* lub *recA::lacZ*. Wykorzystuje się w tych testach szczepy *Salmonella typhimurium* TA1535. Tak jak w SOS chromotest badanie polega na określeniu aktywności enzymu  $\beta$ -galaktozydazy, który odzwierciedla indukcję genu *umuC* lub *recA* (NUNOSHIBA i NISHIOKA 1991, REIFFERSCHIED i współaut. 1992, ODA i współaut. 1992, PAL i współaut. 1992).

Do badań nad mutagennością różnych związków używa się również drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*) uważając, że jako organizmy eukariotyczne są bardziej odpowiednie do badań związków potencjalnie rakotwórczych (KUNGOLOS i AOYAMA 1993).

Ponieważ znaczna część związków chemicznych wykazuje działanie genotoksyczne dopiero po przemianach metabolicznych, dlatego podaje się frakcję mikrosomalną homogenatu wątroby szczurzej w celu ich aktywacji. Badania BUCHOLZA i współpracowników (1992) wykazały, że

dwa zrekombinowane szczepy *Streptomyces griseus* umożliwiają przemiany promutagenów, to znaczy że są zdolne do aktywacji związków promutagennych i wykrycia ich jako metabolity mutagenne bez egzogenego źródła aktywacji.

Testy z bakteriami zostały opracowane w daleko większych szczegółach niż inne metody używane obecnie w toksykologii genetycznej, ale wrażliwość tych testów jest różna i końcowy efekt jest mieszaniną pozytywnych i negatywnych wyników z prób. Na przykład badając mutagenny wpływ jonów metali ciężkich (ostatnio zwraca się coraz większą uwagę na możliwość mutagennego, a i w konsekwencji karcynogennego oddziaływania niektórych jonów metali) okazało się, że ten sam metal może być niemutagenny dla jednego szczepu a mutagenny dla innego. Na przykład badania nad mutagennym działaniem metali wykazały mniejszą niż 30% zgodność metody *Bacillus subtilis* Rec

i metody z wykorzystaniem rewersji (testy z *Salmonella typhimurium* i *Escherichia coli*), ponieważ na 14 metali dających efekt pozytywny w teście *Bacillus subtilis* Rec (As, Cd, Co, Cr, Cs, Hg, Ir, Pt, Rh, Se, Sb, Te, Tl, V) tylko 4 indukowały rewersje powrotne (Rh, Pt, Te, Cr) u *Salmonella typhimurium* i *Escherichia coli* (KANEMATSU i współaut. 1980).

Spośród 10 badanych metali: As, Be, Cd, Co, Cr, Ni, Mn, Pb, Sb, Zn tylko jeden (chrom) dał jednoznacznie pozytywny wynik w standardowych krótkoterminowych badaniach (MAGOS 1991).

Próbuje się to wytłumaczyć różnym podłożem i specyficzną dla każdego szczepu przepuszczalnością błony lub różną metaboliczną modyfikacją metalu. Okazało się również, że badacze niezależnie pomiędzy sobą uzyskiwali różne wyniki stosując ten sam test.

#### MUTAGENNOŚĆ METALI

Potencjalna mutagenność jonów metali zależy od wielu czynników, zwłaszcza od tych które przyczyniają się do łatwiejszego pobierania metalu przez komórkę. Innymi faktorem wpływającymi na mutagenność metali są ich właściwości fizyko-chemiczne, na przykład stopień utlenienia (np. Cr(III) nie jest rakotwórczy, a Cr(VI) ma zdolność do penetrowania przez błonę komórkową, oddziaływania na strukturę DNA i metabolizm komórkowy), reagowanie z ligandami oraz obecność innych metali. Są metale, które same nie są rakotwórcze ale mogą wzmacniać tę zdolność innego metalu (CHANG i COCKERHAM 1994) lub wzmacniać genotoksyczne działanie takich czynników, jak promieniowanie UV lub związków alkilujących (BEYERSMANN 1994). HARTWIG (1995) podaje, że dominują dwa modele oddziaływania metalu z DNA: jeden na zasadzie utleniacza — przykładem są związki chromu — i drugi polegający na interakcji metalu z procesem naprawczym DNA.

Istnieją również inne czynniki, na które nie zwraca się uwagi, a mogą one wywierać wpływ na fakt wystąpienia mutacji bądź jej brak. Do tego typu czynników wydają się należeć: rodzaj użytego podłoża, wiek stosowanej do badań hodowli a także obecność dodatkowych związków w środowisku doświadczalnym. Podłoża o bogatym składzie, a zwłaszcza zawierające dodatkowe źródła białka w postaci peptonu lub wyciągu mięsnego, mogą w znacznym stopniu zafałszować obraz działania badanego metalu. Metale znajdują się w podłożu w postaci związanej, tylko bardzo niewielki procent jest obec-

ny w postaci jonowej. Jon metalu w postaci związanej może być niedostępny dla komórki lub być właśnie w tej postaci transportowany w poprzek błony. Prawdopodobnie te czynniki, jak i jeszcze wiele innych związanych z rodzajem użytej do badań metody, mają wpływ na rozbieżności w uzyskiwanych wynikach. Na podstawie wybranych metali przedstawię, jak różnie mogą one oddziaływać w zależności od użytej metody.

I tak na przykład związki arsenu nie były mutagenne dla *Salmonella typhimurium* w teście Ames a w teście z użyciem szczepu *Escherichia coli* WP2. Natomiast w teście *Bacillus subtilis* Rec uzyskano silnie pozytywny efekt mutagenny ze związkami arsenu: As<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, AsCl<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>. Także badania epidemiologiczne wskazały, że metal ten jest karcynogenny (COSTA i współaut. 1984).

KURODA i współpracownicy (1991) badając trzy związki antymonu: SbCl<sub>3</sub>, SbCl<sub>5</sub> i Sb<sub>2</sub>O<sub>3</sub> stwierdzili, że są mutagenne w teście *Bacillus subtilis* Rec, a brak takiego wpływu w teście Ames. Związki SbCl<sub>3</sub> i Sb<sub>2</sub>O<sub>3</sub> silnie wpływały na indukcję wymiany odcinków pomiędzy chromatydami siostrzanymi (SCE) (COSTA i współaut. 1984). Te same związki badane przez KANEMATSU i współpracowników (1980) w teście Rec pokazały, że Sb (VI) jest silniejszym mutagenem od Sb (III).

Badania epidemiologiczne wykazały karcynogenny wpływ berylu. W badaniach z użyciem bakterii uzyskano sprzeczne wyniki, to znaczy w teście *Bacillus subtilis* Rec beryl wykazał muta-

genny wpływ, zaś w teście Ames a i w teście z użyciem *Escherichia coli* beryl nie powodował indukcji rewersji wstecznych. Podobne wyniki uzyskali KURODA i współpracownicy (1991), to znaczy związki  $\text{BeCl}_2$  i  $\text{Be}(\text{NO}_3)_2$  były mutagenne w teście Rec, a w teście Ames a dały wynik ujemny.

Chrom jest obecny w środowisku głównie w postaci zredukowanej Cr(III) oraz jako Cr(VI)-chromian. Chromian jest biologicznie bardzo aktywny, a będąc tetraedrycznym oksoanionem jest strukturalnym analogiem  $\text{HPO}_4^{-2}$  i  $\text{SO}_4^{-2}$ , które są aktywnie transportowane przez błonę komórkową (WATTERHAHN i HAMILTON 1989). Wewnątrzkomórkowo Cr(VI) jest redukowany poprzez słabo aktywne pośrednie produkty redukcji do stałej formy Cr(III). Jego toksyczność zależy właśnie od stanu utlenienia. Jako pierwszy VENITT i LEVY (1974, za INDULSKI 1992) wykazali, że sześciowartościowy a nie trójwartościowy jest mutageny dla bakterii. Badania wielu badaczy wykazały brak działania Cr(III) na komórki ssaków, zaś Cr(VI) dawał pozytywne wyniki (LEONARD i LAUWERYS 1980, WATTERHAHN i HAMILTON 1989). Różnice w oddziaływaniu pomiędzy związkami chromowymi i chromianowymi są związane z możliwością penetracji membrany komórkowej przez chrom (VI) a brakiem tej możliwości przez chrom (III) (MAGOS 1991). Toksyczny i mutageny efekt jest spowodowany przez zmiany w materiale genetycznym i zmiany reakcji metabolicznych i fizjologicznych (LOSI i współaut. 1994). Wszystkie mikroorganizmy użyte w testach wykazały mutagenność chromu (VI).

Badane związki galu ( $\text{GaCl}_3$  i  $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ ) posiadają zdolność uszkodzenia DNA bakterii *Bacillus subtilis* w teście Rec ale brak takiego wpływu na *Salmonella typhimurium* w teście Ames a i w teście SCE (KURODA i współaut. 1991).

Badania z użyciem *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* i drożdży nie dały rozstrzygających wyników z chlorkiem kadmu;  $\text{CdCl}_2$  był słabo mutageny i silnie cytotoksyczny w badaniach ze szczepem *Salmonella*; zaś takie związki kadmu, jak azotan, siarczan i chlorek działały słabo mutagenie na *Bacillus subtilis* (KANEMATSU i współaut. 1980, COSTA i współaut. 1984, MAGOS 1991).

Kobalt był określany jako słabo mutageny w teście Rec, a w teście z *Salmonella typhimurium* i z *Escherichia coli* nie indukował wcale mutacji (COSTA i współaut. 1984, MAGOS 1991).

Wyniki badań z użyciem miedzi i organizmów prokariotycznych są także dwuznaczne. Test Rec i Ames a dały wyniki ujemne, jedynie w badaniach z *Escherichia coli* miedź wykazywała właściwości mutagenne (Syracuse Research Corporation 1990).

Związki niklu określono jako niemutagenne w testach z *Bacillus subtilis*, z *Salmonella typhimurium* oraz *Escherichia coli* WP2 (COSTA i współaut. 1984). Inni badacze stosując *Escherichia coli* stwierdzili, że mutagenność niklu zależy od formy związku (LEE i współaut. 1993).

Ołów jest uważany za jeden z metali, którego stężenie w środowisku najbardziej wzrosło pod wpływem ludzkiej cywilizacji. Ten wzrost stężenia jest wynikiem rozległego użycia Pb przez człowieka oraz rozprzestrzenienie emisji przemysłowych zawierających ten metal. Ołów ze względu na duże podobieństwo chemiczne (podobny promień jonowy, sposób pobierania) jest biochemicznym analogiem wapnia i dlatego tak łatwo jest włączany w łańcuch troficzny i metaboliczny w miejsce Ca (CHANG i COCKERHAM 1994). Pierwsze dane, że Pb może być genotoksyczny podali w latach 60-tych MURO i GOYER (1969 wg WINDER i BONIN 1993). Dalsze badania z użyciem różnych metod dały sprzeczne rezultaty. Wyniki uzyskane w różnych testach z użyciem *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* były ujemne (WINDER i BONIN 1993). HARTWIG i współautorzy (1990) sugerują, że Pb reaguje z enzymami naprawczymi, takimi jak ligazy lub polimerazy. ROY i ROSSMAN (1992) podaje, że niskie, niemutagenne stężenie octanu ołowiu podnosi mutageny wpływ światła UV.

Rtęć jest najstarszym toksycznym metalem znanym człowiekowi. Jest silnie toksyczna dla człowieka, zwierząt, roślin i mikroorganizmów. W komórkach występuje on jako rtęć metylowana ( $\text{CH}_3\text{Hg}$ ). Jego olbrzymia toksyczność jest związana z predyspozycją do ligandów sulfhydrylowych (-SH). Kompleksy  $\text{CH}_3\text{Hg}$ -cysteina zaburzają syntezę białka. Związki rtęci są słabo mutagenne dla szczepu *Bacillus subtilis* i *Salmonella typhimurium* 1537.

Selenian był mutageny dla szczepu *Salmonella typhimurium*, a  $\text{SeO}_2$  był silnie mutageny dla szczepu *Bacillus subtilis* w teście Rec, w tym teście selenian był mniej aktywny niż selenin (MAGOS 1991).

## PODSUMOWANIE

Pomimo uzyskiwanych rozbieżności testy bakteryjne są bardzo przydatne jako szybki test skringingowy służący do oceny potencjalnie mutagennego i rakotwórczego działania związków chemicznych.

Kryteria prowadzenia badań oraz szczegóły techniczne muszą zostać ujednoczone, aby uniknąć rozbieżności w uzyskiwanych wynikach, dlatego należy użyć tego samego testu i związku, oraz wątpliwości co do ich niezawodności. Na przykład badania WILCOX i współpracowników (1992) wykazują, że wrażliwość szczepu *Salmonella typhimurium* na testowane związki zależy od zastosowanego agaru do zestawienia podłoża. Ważny jest każdy aspekt metodyki, najdrobniejsze niedociągnięcia mogą zagrozić całemu badaniu (INDULSKI 1993, 1994).

W 1985 roku został opracowany raport oceniający testy krótkoterminowe pod patronatem Programu Środowiskowego Organizacji Narodów Zjednoczonych, Międzynarodowej Organizacji Pracy i Światowej Organizacji Zdrowia, w którym znajdujemy, że preferowanym badaniem jest test Amesa a komplementarnym dla niego — badania aberracji chromosomalnych. Uważa się, że są one wystarczające do określenia genotoksyczności związku chemicznego na poziomie skringingu.

Podsumowując, badania z użyciem organizmów prokariotycznych są najszybszymi badaniami skringingowymi i mogą stanowić punkt wyjścia do dalszych badań z użyciem organizmów wyższych.

## THE USE OF BACTERIA IN EVALUATION OF CARCINOGENECITY AND MUTAGENECITY OF HEAVY METALS

## Summary

Almost all DNA damaging and carcinogenic substances may be (but need not be) mutagenic. Many new compounds are produced per annum. It is difficult to identify those that could be carcinogenic because many factors affect carcinogenicity, and time-consuming animal tests are needed to gain a degree of certainty. Microbial test systems for studying the genotoxic potential of chemical agents have been developed. The reason for using short-term mutagenesis tests with bacteria or cultured cells to detect potential carcinogens is the association between their mutagenic activity and carcinogenicity. Many bacterial tests exist now

for detection of mutagens. The Salmonella/microsome mutagenicity (AMES) test is the most widely and commonly used. Several metal compounds are considered to be carcinogens and/or mutagens. The metals that so far have been recognized as potentially carcinogenic are limited to Cr(VI), Cd, Ni, As and Be). Also short-term tests are used to survey mutagenic effects of metal compounds, but metal ions cause sometimes trouble and the test results are often unclear. Mutagenic effect of metals depends on environmental conditions and physicochemical properties of the metals.

## LITERATURA

- AMES B. N., McCann J., YAMASAKI E., 1975. *Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella / mammalian-microsome mutagenicity test*. Mutat. Res. 31, 347-364.
- BEYERSMANN D., 1994. *Interactions in metal carcinogenesis*. Toxicol. Lett. 72, 333-338.
- BUCHOLZ S., OMER C., VIITANEN P., SARASLANI F., STAHL R., 1992. *Activation and detection of (pro)mutagenic chemicals using recombinant strains of Streptomyces griseus*. Appl. Biochem. Biotech. 32, 149-158.
- CHANG L. W., COCKERHAM L., 1994. *Toxic metals in the environment [W:] Basic Environmental Toxicology*. CRC Press, 109-129.
- COSTA M., KRAKER A. J., PATIERNO S. R., 1984. *Toxicity and carcinogenicity of essential non-essential metals [W:] Progress in clinical biochemistry*. Springer-Verlag, Berlin, 1-45.
- COTE C., BLAISE C., DELISLE C. E., MEIGHEN E. A., HANSEN P. D., 1996. *A miniaturized Ames mutagenicity assay employing bioluminescent strains of Salmonella typhimurium*. Mutat. Res. 34, 137-146.
- HARTWIG A., SCHLEPEGRELL R., BEYERSMANN D., 1990. *Indirect mechanism of lead induced genotoxicity in cultured mammalian cells*. Mutat. Res. 241, 75-82.
- HARTWIG A., 1995. *Current aspects in metal genotoxicity*. Bio-metals 8, 3-11.
- HIRANO K., HAGIWARA T., OHTA Y., MATSUMOTO H., KADA T., 1982. *Rec-Assay with spores of Bacillus subtilis with and without metabolic activation*. Mutat. Res. 97, 339-347.
- INDULSKI J. A. *Kryteria zdrowotne środowiska, 1994. Raport oceny testów krótkoterminowych dla kancerogenów*, t. 47, Instytut Medycyny Pracy im. prof. Nofera.
- INDULSKI J. A., *Kryteria zdrowotne środowiska, 1992. „Chrom”*, t. 61, Instytut Medycyny Pracy im. prof. Nofera.
- INDULSKI J. A., *Kryteria zdrowotne środowiska, 1993. Przewodnik do testów krótkoterminowych przeznaczonych do wykrywania mutagennych i rakotwórczych substancji chemicznych*, t. 51, Instytut Medycyny Pracy im. prof. Nofera.
- JOHNSON B. T., 1992. *An evaluation of genotoxicity assay with liver-S9 for activation and luminescent bacteria for detection*. Environ. Toxicol. Chem., 11, 473-480.
- KADA T., 1975. *Mutagenicity and carcinogenicity screening of food additives by the rec-assay and reversion procedures*. Screen. Tests Chem. Carcinogen. 12, 105-115

- KADA T., WATANABE S., 1983. *Bacillus subtilis* rec-assay with and without metabolic activation: improvements and applications, *in vitro* toxicity testing of environmental agents, part A, 41-60.
- KADA T., 1973. *Escherichia coli* mutagenicity of furyl furamide. *J. Gen.* 48 301-305.
- KANEMATSU N., HARA H., KADA T., 1980. Rec assay and mutagenicity studies on metal compounds. *Mutat. Res.* 77, 109-116.
- KUNGOLOS A., AOYAMA I., 1993. Using *Saccharomyces cerevisiae* for toxicity assessment including interacting effects and DNA damage. *Water Sci. Technol.* 25, 309-316.
- KURODA K., ENDO G., OKAMOTO A., YOO Y. S., HORIGUCHI S., 1991. Genotoxicity of beryllium, gallium and antimony in short-term assays. *Mutat. Res.* 264, 163-170.
- LEE Y. W., POUS C., TUMMOLO D. M., KLEIN C. B., ROSSMAN C. G., CHRISTIE N. T., 1993. Mutagenicity of soluble and insoluble nickel compounds at the GPT locus in G12 Chinese hamster cells. *Environ. Molec. Mutagen.* 21, 365-379.
- LEONARD A., LAUWERYS H., 1980. Carcinogenicity and mutagenicity of chromium. *Mutat. Res.* 76, 227-239.
- LOSI M., AMRHEIN E., FRANKENBERGER W., T., JR., 1994. Environmental biochemistry of chromium. *Rev. Environ. Contam. Toxic.* 136, 91-121.
- MAGOS L., 1991. Epidemiological and experimental aspects of metal carcinogenesis: Physicochemical properties, kinetics and the active species. *Environ. Health Perspect.* 95, 157-189.
- MULLER J., JANZ S., 1992. Assessment of oxidative DNA damage in the oxyr-deficient SOS chromotest strain *Escherichia coli* Pq 300. *Environ. Molec. Mutagen.* 20, 297-306.
- MULLER J., JANZ S., 1993. Modulation of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced SOS response in *Escherichia coli* Pq 300 by aminoacids, metal chelators, antioxidants and scavengers of reactive oxygen species. *Environ. Molec. Mutagen.* 22, 157-163.
- NAMIEŚNIK J., JAŚKOWSKI J., 1995. *Zarys ekotoksykologii*. EKO-Pharma, Gdańsk, 1995.
- NUNOSHIBA T., NISHIOKA H., 1991. Rec-lac test for detecting SOS-inducing activity of environmental genotoxic substances. *Mutat. Res.* 254, 71-77.
- ODA Y., SCHIMADO T., WATANABE M., ISHIOKA M., NOHMI T., 1992. A sensitive Umu test system for rapid detection of mutagenic nitroarens in Nm 1011 having a high nitroreductase activity. *Mutat. Res.* 272, 91-99.
- PAL A. K., RAHMAN M. S., CHATTERJEE S. N., 1992. On the induction of Umu gene-expression in *Salmonella typhimurium* strain TA1535 Psk 100 2 by some nitrofurans. *Mutat. Res.* 280, 67-71.
- QUILLARDET P., HOFNUNG M., 1993. The SOS chromotest: a review. *Mutat. Res.* 297, 235-279.
- REIFFERSCHIED G., HEIL J., ODA Y., ZAHN R. K., 1992. A microplate version of the SOS/Umu test for rapid detection of genotoxins and genotoxic potentials of environmental samples. *Mutat. Res.* 253, 215-222.
- ROY N. K., ROSSMAN T. G., 1992. Mutagenesis and comutagenesis by lead compounds. *Mutat. Res.* 298, 97-103.
- SCHLEGEL H. G., 1995. *General microbiology*. Cambridge University Press, Cambridge, 1995.
- Toxicological Profile for Copper*, IARC, 1990.
- Syracuse Research Corporation, 1990. *Toxicological Profile for Copper*.
- TSUCHIYA K., 1986. Lead [W:] *Handbook on the Toxicology of Metals* t. II. Elsevier, Oxford, 319-342.
- WATTERHAHN K. E., HAMILTON J. W., 1989. Molecular basis of hexavalent chromium carcinogenicity: Effect on gene expression. *Sci. Total Environ.* 86, 113-129.
- WILCOX P., WEDD O. J., WILLIAMS W. R. D., MEE C. D., O'DONOVAN M. R., 1992. Sensitivity of *Salmonella typhimurium* TA97A to the type of agar used for preparation of Vogles-Bonner Plates. *Mutagenesis* 7, 13-18.
- WINDER C., BONIN T., 1993. The genotoxicity of lead. *Mutat. Res.* 285, 117-124.
- WONG P. K., 1988. Mutagenicity of heavy metals. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 40, 597-603.
- ZAKRZEWSKI S. F., 1995. *Podstawy toksykologii środowiska*. PWN, Warszawa.