

JADWIGA PALUS, EWA JANIK-SPIECHOWICZ, BOGUSŁAW BARAŃSKI

ZASTOSOWANIE TESTU AMESA DO IDENTYFIKACJI ŹRÓDEŁ
NARAŻENIA I GRUP PRACOWNIKÓW NARAŻONYCH NA CZYNNIKI
MUTAGENNE W ODLEWNIACH*

Z Zakładu Kancerogenezy Zawodowej Instytutu Medycyny Pracy w Łodzi
Dyrektor: prof. dr hab. med. J. Indulski

W pracy opisano metodykę pobierania aerozolu na stanowiskach pracy i izolowania z pobranych prób aerozolu substancji do badań mutagenności testem Ames. Przedstawiono również zasadę opracowania wyników uzyskanych za pomocą testu Ames oraz kryteria oceny narażenia zawodowego pracowników.

1. NIEZBĘDNY SPRZĘT, MATERIAŁY I ODCZYNNIKI

S p r z ę t

1. Pompy o dużej wydajności ok. 30 - 100 m³/godz., np. firmy Staplex Air, Sampler Division USA lub produkcji krajowej - urządzenie odciągowe dymów spalinowych IWO-2 z Gliwickiej Fabryki Urządzeń Wentylacyjnych "Gliwent", Gliwice, ul. Tarnogórska 13
2. Anemometr, np. anemometr ręczny AR-2, dystrybutor - Gwarectwo Automatyzacji Górnictwa "EMAG", Katowice, ul. Armii Czerwonej 83A
3. Stoper
4. Płuczka ultradźwiękowa, typ UM-4 - Zakład Urządzeń Technologicznych, Olsztyn, ul. Kętrzyńskiego 8
5. Łaźnia wodna
6. Waga analityczna
7. Zlewki
8. Erlenmayerki, szczelnie zamykane

M a t e r i a ł y i o d c z y n n i k i

Filtry szklane firmy Whatman, typ GF/A
Bibuła filtracyjna Whatman 1
Aceton cz.d.a.
Argon

*Instrukcja metodyczna dla pracowników służb nadzoru nad warunkami pracy w przemyśle opracowana w ramach tematu CPBR 11.5.68.3. - program "Zwalczanie chorób nowotworowych"

2. POBIERANIE PRÓB FAZY STAŁEJ AEROZOLU

Aerozol (pył, dym) występujący w środowisku pracy pobiera się na filtry za pomocą pomp o dużej wydajności. Najczęściej stosowane są filtry szklane firmy Whatman typu GF/A. Na tego rodzaju filtrach zatrzymywane są cząstki pyłów i dymów o średnicy powyżej $1\ \mu\text{m}$ [5 - 8]. Wielkość filtra uzależniona jest od typu pompy. Do pobierania aerozolu zalecane są filtry o dużych powierzchniach, tj. około 100 - 500 cm^2 ze względu na to, że w jednostce czasu otrzymuje się większą masę pyłu/dymu zatrzymanego na filtrze. Przed pobraniem i po pobraniu prób filtry należy zważyć w tych samych warunkach mikroklimatycznych (temperatura i wilgotność) z dokładnością przynajmniej do 0,1 mg. Próby aerozolu powinno się pobierać na stanowiskach pracy w strefie oddychania pracownika. Podczas pobierania prób należy kontrolować szybkość przepływu powietrza przez filtr w celu określenia objętości przefiltrowanego powietrza. Szybkość przepływu powietrza przez filtr zmienia się w czasie pobierania, gdyż pory filtra ulegają zatykaniu w wyniku osadzania się cząstek pyłu i dymu. Liniową szybkość przepływu powietrza przez filtr można mierzyć w sposób ciągły za pomocą przepływomierza lub okresowo za pomocą anemometru. Czas pobierania prób powinno określić się eksperymentalnie. Zaleca się pobieranie prób przez okres zmiany roboczej lub podczas procesów zachodzących cyklicznie w czasie zmiany roboczej, w trakcie których może dochodzić do emisji substancji mutagennych. W badanym środowisku pracy próby aerozolu powinno pobierać się co najmniej dwukrotnie (w różnych dniach lub porach roku), przy czym każdorazowo po 2 - 3 próby na badanych stanowiskach pracy. Pyły osadzone na filtrach powinno chronić się przed działaniem światła słonecznego, np. stosując do tego celu folię aluminiową i przechowywać w niskiej temperaturze przynajmniej $+4^{\circ}\text{C}$ nie dłużej niż przez tydzień lub przez dłuższy okres w temperaturze -20°C , aby zminimalizować procesy fotoutleniania i degradacji aktywnych chemicznie związków chemicznych [9]. W celu zbadania mutagenności substancji występujących w powietrzu na stanowisku pracy z użyciem jednego szczepu bakteryjnego należy pobrać na filtr lub filtry co najmniej 100 mg pyłu.

3. IZOLOWANIE SUBSTANCJI MUTAGENNYCH

W zależności od masy pyłu pobranego na filtr na stanowisku pracy substancje mutagenne ekstrahuje się z każdego filtra oddzielnie lub z 2 - 3 filtrów po połączeniu razem. Filtr lub filtry z pobranym pyłem po pocięciu nożyczkami na drobne części umieszcza się w szklanym naczyniu (zlewka, kolba Erlenmayera) o pojemności około 150 ml, zawierającym 100 ml acetonu lub innego rozpuszczalnika (metanol, dwuchlorometan, cykloheksan lub mieszaniny rozpuszczalników). Zawartość w naczyniu poddaje się działaniu ultradźwięków w płuczce ultradźwiękowej przez 15 - 20 min w temperaturze pokojowej i pozostawia na 2 - 3 godz. Po wymieszaniu zawartości oddziela się rozpuszczone cząstki fazy stałej przez przesączenie przez bibułę Whatman 1, którą przemywa się dodatkowo kilkoma mililitrami acetonu (roztwór rozpuszczalnik) w celu dokładniejszego wymycia substancji z pyłu zatrzymanego na bibule. Rozpuszczalnik odparowuje się w łaźni wodnej o temp. 70°C w atmosferze argonu. Cały proces ekstrakcji należy przeprowadzać w zaciemnionym pomieszczeniu lub przy żółtym świetle w celu zminimalizowania wpływu światła dziennego na pro-

cesy fotoutleniania izolowanych substancji. Równolegle taką samą procedurę należy przeprowadzić z czystym filtrem tego samego typu (filtr kontrolny), na który nie pobierano aerozolu. Pozostałość po odparowaniu szczelnie zamyka się i przechowuje w temperaturze -80°C do badań mutagenności, lecz nie dłużej niż przez miesiąc.

4. OCENA AKTYWNOŚCI MUTAGENNEJ SUBSTANCJI IZOLOWANYCH Z FAZY STAŁEJ AEROZOLU

Do badania właściwości mutagennych substancji wyekstrahowanych z pyłu i dymu pobranego na stanowiskach pracy stosuje się płytkowy test Ames. Testowanie substancji przeprowadza się z użyciem bakterii szczepów *Salmonella typhimurium* TA98 lub/i TA100 w nieobecności i w obecności frakcji S9 otrzymanej z wątroby szczurów po indukcji enzymów mikrosomalnych Aroclorem 1254. Dokładne wykonanie testu Ames opisane jest w pracy nt. ujednoliconej metodyki płytkowego testu Ames [1].

5. OPRACOWANIE WYNIKÓW

Wyniki testu przedstawiane są jako średnia liczba kolonii histydyno-nieależnych rewertantów na dawkę pyłu. Otrzymane wyniki poddaje się standaryzacji, obliczając liczbę mutacji indukowanych i aktywność mutagenną aerozolu wg następujących wzorów:

Liczba mutacji indukowanych (rewertantów) = $a - b$, gdzie:

a - średnia liczba rewertantów na płytkach, do których dodawano ekstrakt pyłu,

b - liczba rewertantów na płytkach, do których dodawano ekstrakt z czystego filtra.

$$\text{Aktywność mutagenna aerozolu} = \frac{\text{liczba indukowanych rewertantów}}{c}$$

gdzie: c - zawartość pyłu w mg lub objętość powietrza w m^3 , z której wyekstrahowane substancje dodawano na płytki.

6. INTERPRYTACJA

Według przyjętych kryteriów substancje ekstrahowane z fazy stałej aerozolu oceniane są jako mutagenne, jeżeli występuje zależność wzrostu liczby mutacji (rewertantów) od dawki pyłu (zależność dawka - odpowiedź). Wielkość narażenia zawodowego pracowników na substancje o właściwościach mutagennych szacuje się na podstawie aktywności mutagennej aerozolu, występującego na stanowiskach pracy w badanym środowisku. Ze względu na brak odpowiednich norm higienicznych stopień zagrożenia czynnikami mutagennymi w środowisku pracy można ocenić jedynie

porównując wielkość narażenia w badanym środowisku pracy z narażeniem na czynniki mutagenne, występującym w środowisku ekologicznym człowieka, najczęściej w środowisku komunalnym.

7. PIŚMIENNICTWO

1. Janik-Spiechowicz E.: Metodyki stosowane do oceny właściwości mutagennych i genotoksycznych związków chemicznych. Cz. II. Płytkowy test Ames (wersja skrócona). Med Pr 1989, 40, 28 - 37
2. Krishna G. i in.: Mutagenicity studies of ambient airborne particles. I. Comparison of solvent systems. Mutat Res 1983, 124, 113 - 120
3. Krishna G. i in.: Mutagenicity studies of ambient airborne particles. II. Comparison of extraction methods. Mutat Res 1983, 124, 121 - 128
4. Krishna G. i in.: A simple method for the extraction of mutagens from airborne particles. Environ Monitor Assessment 1985, 5, 393 - 398
5. Krøkje A. i in.: Testing for mutagens in filter samples from the work atmosphere of an aluminium plant. Scand J Work Environ Health 1985, 11, 311 - 316
6. Morin R.S., Tulis J.J., Claxton L.D.: The effect of solvent and extraction methods on the bacterial mutagenicity of sidestream cigarette smoke. Toxicol Lett 1987, 38, 279 - 290
7. Schimberg R., Skyttä E., Falck K.: Belastung von Eisenglessereiarbeitern durch mutagene polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe. Staub-Reinhalt Luft 1981, 41, 421 - 424
8. Skyttä E., Schimberg R., Vainio H.: Mutagenic activity in foundry air. Arch Toxicol 1980, 4, 68 - 72
9. Takeda N., Teranishi K.: Effects of environmental conditions on polycyclic aromatic hydrocarbons and mutagenicity of airborne particulate matter. Bull Environ Contam Toxicol 1986, 36, 685 - 692

J. Palus, E. Janik-Spiechowicz, B. Barański

USING AMES TEST FOR IDENTIFICATION THE SOURCES OF EXPOSURE AND THE GROUPS OF EXPOSED WORKERS TO THE MUTAGENIC SUBSTANCES IN THE FOUNDRIES

Summary

Methodology of sampling of the aerosol on the work-post and of isolating the substances from the particular matter samples for mutagenic studies using Ames test have been described. Besides that, the guidelines for data analysis and interpretation including the assessment of occupational exposure to mutagenic substances are given.

