

KÖRNYEZETI MINTÁK GENOTOXICITÁSÁNAK MÉRÉSE KVANTITATÍV MIKROTITER LEMEZES AMES TESZTTTEL

Palágyi Andrea¹, Filep Ágnes², Manczinger László¹ és Vágvölgyi Csaba¹

¹Szegedi Tudományegyetem, Mikrobiológiai Tanszék,
6726 Szeged, Közép fasor 52., E-mail: manczing@bio.u-szeged.hu

²MTA-SZTE Fotoakusztikus Kutatócsoport
6720 Szeged, Tisza Lajos krt. 103., E-mail: afilep@titan.physx.u-szeged.hu

Bevezetés

A levegő és a felszíni vizek szennyezettsége komoly és egyre növekvő egészségügyi problémát jelent világszerte. A levegőbe és a felszíni vizeinkbe kerülő szerves és szervetlen szennyezéseknek nem csak akut citotoxikus hatásai lehetnek, de jelentős részük mutagén, potenciális karcinogén karakterrel is rendelkezik. A környezeti minták genotoxicitásának vizsgálatára Bruce Ames és munkatársai az 1970-es évek elején egy egyszerű, mutáns baktériumtörzseket felhasználó módszert dolgoztak ki (Ames *et al.*, 1975). Ezt az úgynevezett Ames tesztet azóta is széles körben használják. Vizsgálataink során kidolgoztuk az Ames teszt egy módosított, egyszerűen végrehajtható mikrotiter lemezes változatát, amelyet sikerrel alkalmaztunk levegőminták és felszíni vízminták genotoxicitásának mérésére.

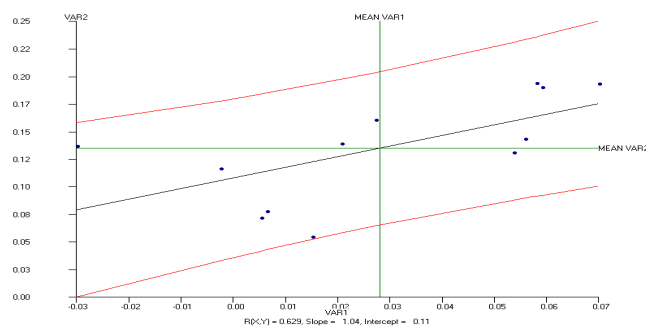
Anyagok és módszerek

A szálló porban, illetve a Marosból származó vízmintákban lévő szennyező anyagok genotoxicitásának vizsgálatához az Ames teszt klasszikus változatát (Mortelmans és Zeiger, 2000) is használtuk. A tesztben hisztidin auxotróf (his-) *Salmonella typhimurium* baktériumtörzseket (TA98 és TA1535) alkalmaztunk, amelyek szennyező anyagok hatására képződő his+ revertánsainak gyakoriságából következtettünk a mutációs rátára, a minta genotoxicitására. A levegő toxicitási vizsgálatokhoz a levegőszűrők 1 cm²-es darabjaiból készítettünk vizes kivonatokat nagyfrekvenciás Eppendorf-csöves rázókészülék segítségével. A vízmintákat töményítés nélkül vizsgáltuk. A levegőszűrő extraktumokat, illetve a vízmintákat 0,22 mikronos membránszűrőn keresztül sterilre szűrtük. Az Ames teszt vizsgálat kivitelezésében a klasszikus módszerhez képest némi változtatást hajtottunk végre. A toxikológiai vizsgálatokhoz használt *Salmonella* törzseket LB tápoldatban neveltük fel, majd a tenyészetek OD-jét 0,5-re állítottuk be 620 nm-nél. Az így kapott szuszpenzió 0,15 ml-éhez a levegőszűrő minta 0,05 ml-ét adtuk majd 4 órán át 30 °C-on inkubáltuk. A kezelt szuszpenziókat 0,9%-os steril nátrium klorid oldattal átmostuk Eppendorf csövekben, majd 0,05 ml-enként minimál táplemezekre szélesztettük a sejteket. Ezután steril fülke alatt beszárítottuk a táplemezeket és 30 °C-on 4 napig inkubáltuk a csészéket, majd megszámláltuk a revertáns telepeket. A mintasorozatokkal egy egyszerűsített, általunk kidolgozott mikrotiter lapos módszerrel is kiviteleztük az Ames teszteket. Ebben az esetben az LB tápoldatban előtenyésztett baktériumsejteket kicentrifugálás után minimál tápoldatban szuszpendáltuk fel és a szuszpenzió OD-jét 620 nm-nél 0,5-re állítottuk. Ebből a baktérium szuszpenzióból 0,15 ml-ek kerültek steril mikrotiter lemezre és ezekhez mértük a szűrt mintasorozatok 0,05-0,05 milliliterait. Ezután a mikro tenyészetek OD-jét 620 nm-nél azonnal lemértük mikrotiter lap fotométer segítségével, majd újabb mérés következett 48 óra inkubáció után. A mérhető OD emelkedés a revertánsok számával arányos.

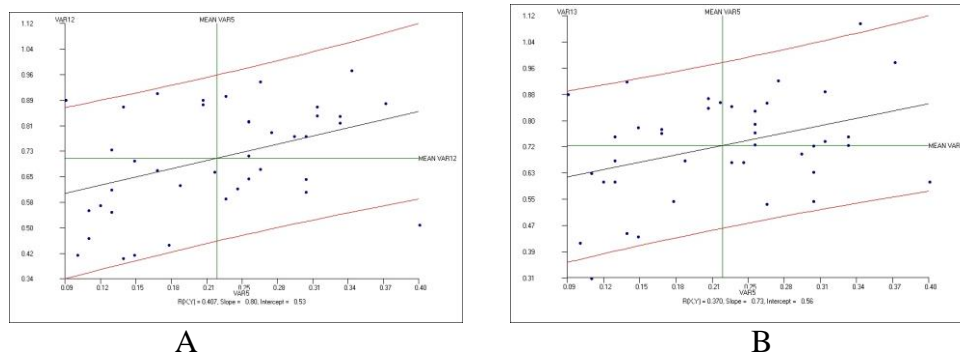
A korreláció analízisekhez az OpenStat Windows szoftvert használtuk fel.

Eredmények

A mikrotiter lapos módszer esetében sokkal több esetben detektáltunk mutagén hatást mutató mintát, tehát érzékenyebbnek bizonyult, mint a táplemezre-szélesztéses klasszikus módszer. Megvizsgáltuk, hogy a szűrőkön levő szerves szennyezések négy különböző hullámhossznál mérhető abszorpciói és a genotoxicitási adatok között van-e korreláció. A korreláció analízisekhez az OpenStat Windows szoftvert használtuk fel. A levegőminták 355 nm-nél mérhető kumulált abszorpciói értékei pozitív korrelációt mutattak az Ames teszttel mért mutagenecitási adatsorokkal a TA98 teszt törzs használata esetén. A levegőminták TA98 és TA1535 törzsekkel, a mikrotiter lemezes módszerrel mért genotoxicitási adatsorai pozitív korrelációt mutattak egymással (1. ábra). A Maros vízminták mikrotiter lapos módszerrel megmért genotoxicitási értékei pozitív korrelációt mutattak a minták nitrit ion tartalmával (2. ábra). Mindez azt mutatja, hogy új mikrotiter lemezes Ames teszt módszerünk környezeti minták esetében is elég érzékeny és megfelelően működik.



1. ábra. Pozitív korreláció kisteleki levegőminta sorok TA98 és TA1535 törzsszel mért genotoxicitása között. Korrelációs koefficiens = 0,63.



2. ábra. Korreláció a Maros vízminták nitrit ion tartalma és genotoxicitása között. A: TA98 (korrelációs koefficiens = 0,41), B: TA1535 (korrelációs koefficiens = 0,37).

Köszönetnyilvánítás

A kutatás kapcsolódik a SOILMAP (HURO/0901/062/2.2.2) és a MARIVMICCOLL (HURO/1001/129/2.2.2) Magyarország-Románia Határonátnyúló Együttműködési Program 2007-2013 részeként megvalósuló projektekhez. A munkát támogatta az Európai Szociális Alap TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0047 jelű projektje is

Irodalom

- Ames, B., McCann, J., Yamasaki, E., 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* 31, 347-364.
- Mortelmans, K., Zeiger, E., 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.* 455, 29-60.