



## Genotoxicity of leachates from municipal landfill in Kozodrza (Poland) against *E. fetida* celomocytes in vitro

Lukasz JURCZYK<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra Biologicznych Podstaw Rolnictwa i Edukacji Środowiskowej, 35-601 Rzeszów, tel.: 17 872 17 25, e-mail: [ljurczyk@univ.rzeszow.pl](mailto:ljurczyk@univ.rzeszow.pl)

### Abstract

One of the biggest problems of operating a landfill is leachate, resulting from the leaching of substances contained in waste and products of their decomposition by water penetrating the bed. The complex nature of this mixture requires both the chemical analyzes and tests on biological systems to assess environmental risk. The aim of the study was to investigate the effect of leachate derived from an organized, stabilized landfill, in a large range of dilutions, on nuclear DNA damage in the *E. fetida* celomocytes. Damage induced by leachate during a short, 2h exposure were small but noticeable, statistical analysis showed a significant ( $p < 0.001$ ) differences in such parameters as comet moment and tail intensity between the control probe, and the concentrations of  $\geq 6.2\%$ .

**Keywords:** municipal waste, waste disposal, landfill leachate, toxicity, genotoxicity, comet assay

### Streszczenie

Genotoksyczność odcieków ze składowiska odpadów komunalnych w Kozodrzy wobec celomocytów *E. fetida*

Jednym z największych problemów eksploatacyjnych na składowiskach są odcieki, powstające podczas wymywania substancji zawartych w odpadach i produktach ich rozkładu przez wodę penetrującą złożę, a ich złożony charakter wymaga stosowania do oceny ryzyka środowiskowego oprócz analiz chemicznych, testów na układach biologicznych. Celem pracy było zbadanie wpływu odcieków pochodzących ze zorganizowanego, ustabilizowanego składowiska, w dużym zakresie rozcieńczeń, na uszkodzenia materiału genetycznego jąder komórkowych *E. fetida*. Uszkodzenia indukowane przez odcieki w czasie krótkiej, 2h ekspozycji były niewielkie ale zauważalne, analiza statystyczna wykazała istotne ( $p > 0,001$ ) różnice wartości momentu kometowego i intensywności świecenia pomiędzy próbą zerową, a stężeniami  $\geq 6,2\%$ .

**Słowa kluczowe:** odpady komunalne, składowanie odpadów, odcieki składowiskowe, toksyczność, genotoksyczność, test kometowy

### 1. Wstęp

Wynikiem rozwoju cywilizacyjnego jest wytwarzanie rosnącej ilości odpadów. Pomimo znacznego postępu technologicznego, jaki odbył się w ostatnich latach w dziedzinie przetwarzania odpadów, nadal najpowszechniejszym sposobem ich unieszkodliwiania, tak w Polsce, jak w wielu krajach świata, jest składowanie [1, 2]. Składowanie odpadów komunalnych, nawet na obiektach wyposażonych w instalacje techniczne zaprojektowane w celu kontrolowania emisji, prowadzi zawsze do powstania potencjalnie niebezpiecznych dla zdrowia i środowiska produktów ubocznych. Jednym z największych problemów eksploatacyjnych na składowiskach są odcieki, powstające podczas wyłukiwania substancji zawartych w odpadach i produktach ich rozkładu przez wodę penetrującą złożę składowiska. W odciekach mogą znajdować się też pewne ilości związków nierozpuszczalnych i zawieszonych części stałych [3].

Objętość odcieków powstających w przeliczeniu na jednostkę masy odpadów, a przez to również stężenie substancji w nich rozpuszczonych, jest przede wszystkim wynikiem intensywności opadów atmosferycznych, stosunku otwartej powierzchni składowiska do grubości warstwy odpadów oraz przewodności hydraulicznej składowiska. Jakość odcieków odzwierciedla głównie skład i rozpuszczalność substancji zawartych w odpadach,

które ulegają znaczącym zmianom wraz z upływem czasu składowania i przechodzeniem składowiska w kolejne fazy przemian biochemicznych [2,3,4].

Najbardziej popularne metody badawcze opierały się dotąd na analizach składu chemicznego odcieków, jednak heterogeniczny skład odpadów i złożoność fizycznych, chemicznych i biologicznych procesów jakie zachodzą w złożu składowiska powodują, że procedury szacowania ryzyka skażenia środowiska wymagają również stosowania układów biologicznych [5]. W ostatnich latach, oprócz oceny toksyczności ogólnej wobec licznej grupy organizmów modelowych, zaczęto zwracać uwagę również na szczególne cechy odcieków składowiskowych, między innymi zdolność do uszkodzania materiału genetycznego. Substancje genotoksyczne są szczególnie niebezpieczne dla środowiska. Intoksykacja substancją chemiczną poniżej dawki letalnej, może skończyć się jej rozkładem na drodze przemian metabolicznych lub wydaleniem z organizmu i przywróceniem homeostazy. Genotoksykanty mogą natomiast indukować trwałe zmiany, których konsekwencje będą odczuwalne dla organizmu po usunięciu czynnika toksycznego, a w skrajnych przypadkach mogą przenosić się na następne pokolenia, i multiplikować [6]. Znakomita większość zanieczyszczeń ulega w środowisku rozcieńczeniu i stopniowej degradacji, co naturalnie zmniejsza ich uciążliwość. Składowisko odpadów traktować można jako potencjalne (np. w wyniku awarii) punktowe źródło zanieczyszczeń, w miarę oddalania się od którego, stężenie odcieków będzie ulegało znacznemu rozcieńczeniu, jednocześnie organizmy, między innymi glebowe, wyraźnie unikają wysokich stężeń odcieków. W rzeczywistości więc organizmy w środowisku, nie są narażone na tak duże stężenia, jakie bada się w pracach laboratoryjnych, choć mogą być ekspozowane długo na stężenia, których nie wyczuwają.

Do badań wpływu odcieków na środowisko wykorzystuje się baterie różnorodnych organizmów testowych, z różnych poziomów troficznych: bakterii, roślin i zwierząt należących do różnych taksonów. Najczęściej stosuje się wybrane organizmy modelowe, które charakteryzują się odpowiednią do badań odpornością na toksykanta na poziomie populacji, a także łatwą hodowlą oraz dostępnością w różnych porach roku. Stosunkowo niewiele jest informacji na temat wpływu odcieków na faunę glebową, spośród której duże znaczenie ekologiczne mają dżdżownice (*Oligochaeta*; *Lumbricidae*). Mogą być one jednocześnie bezpośrednio narażone na działanie tego typu zanieczyszczeń. *E.fetida* jest organizmem, który preferuje środowisko bogate w materię organiczną, a więc takie jakie może być w otoczeniu składowisk, miejsc składowania osadów ściekowych czy tlenowej stabilizacji odpadów, i z tego powodu może być wykorzystywany jako biomarker zanieczyszczeń odciekami [7]. Ciekawym i użytecznym materiałem badawczym pozyskiwanym od *Lumbricidae*, mogą być celomocyty [8]; komórki można łatwo pobierać przeżywczo i długą żywotność, natomiast na wynik badań może wpływać fakt istnienia kilku typów komórek o różnej budowie (eleocytów, amebocytów i granulocytów) i ich zdolność do agregacji poza ustrojem [9]. Celem pracy było zbadanie wpływu odcieków składowiskowych w dużym zakresie rozcieńczeń, na uszkodzenia materiału genetycznego jąder komórkowych *E.fetida*.

## 2. Materiały i metody

W badaniach wykorzystano odcieki składowiskowe, pochodzące ze składowiska odpadów komunalnych w Kozodrzy (Polska, woj. podkarpackie). Składowisko funkcjonuje od 1990 roku, zaliczyć je więc należy do składowisk starych. Zajmuje powierzchnię ponad 18ha i jako RIPOK Regionu Zachodniego woj. podkarpackiego przyjmuje rocznie do unieszkodliwienia około 92 000 Mg odpadów.

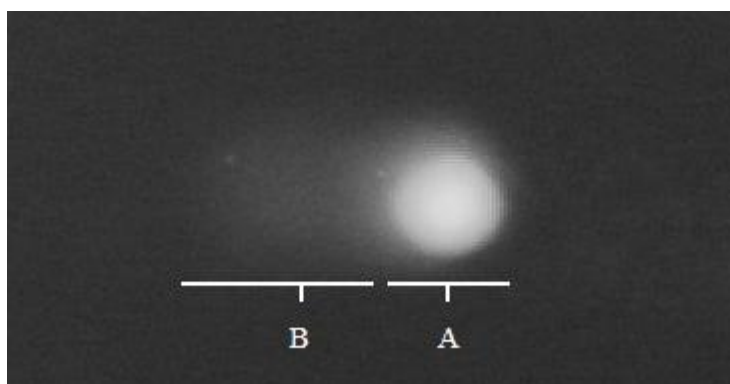
Składowisko nie przyjmuje odpadów niebezpiecznych, jest zorganizowane, izolowane od podłoża, wyposażone w instalację odgazowującą i odbierającą odcieki, a także własną biologiczno-chemiczną oczyszczalnię, której ciąg technologiczny oparty jest na usuwaniu azotu amonowego wapnem (*stripping*) oraz reaktor ze złożem biologicznym. Od 2 lat funkcjonuje też system odwróconej osmozy.

Odcieki surowe, pobierano ze zbiornika retencyjnego po czym przewożono do laboratorium i przechowywano w 20dm<sup>3</sup> zbiornikach w temperaturze 4°C i ciemności. W badaniach wykorzystano komórki pobrane od dojrzałych osobników ( $n=50$ ), *Eisenia fetida* (*Lumbricidae*), o masie około 0,65g ( $\pm 0,05$ ). Celomocyty pobierano w polu elektrycznym prądu stałego o napięciu około 1-2 V/cm, partiami, do szklanego naczynia zawierającego sterylny 1x bufor PBS (pH=7,4). Po delikatnym wymieszaniu całej puli komórek, przenoszono po 100 $\mu$ l zawiesiny do próbek eppendorfa i uzupełniano roztworem odcieków składowiskowych w 1x buforze PBS uzyskując kolejno rozcieńczenia: 50, 25, 12,5, 6,25, 3,1, 1,6 oraz 0.8%. Próbę kontrolną stanowiły celomocyty zawieszony w buforze PBS. Zawiesiny komórek inkubowano w ciemności i temperaturze 20°C (Ekocell) przez 2h, po czym niezwłocznie mieszano w stosunku 1:1 z 2% roztworem żelu agarozowego LMP (o niskim punkcie krzepnięcia, Roth) w PBS i nanoszono po 100 $\mu$ l na szkiełka mikroskopowe uprzednio pokryte warstwą 0,5% żelu agarozowego NMP (Roth), schładzano i umieszczano w buforze lizującym ściany błony komórkowe (2,5M

NaCl, 100mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10mM Tris, NaOH, 1% Triton X-100, pH=10) na 1 godzinę w temperaturze 4°C i ciemności. Po wypłukaniu, szkiełka umieszczano w wypoziomowanym aparacie do elektroforezy, zalewano buforem (300mM NaOH, 1mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH>13) i pozostawiano na 40 min. w celu rozluźnienia struktury DNA jąder komórkowych. Elektroforezę prowadzono przez 30 min przy napięciu 1,2 V/cm. Po pobraniu i inkubacji komórki poddawano testowi żywotności barwiąc błękitem trypanu i bromkiem etydyny.

Po rozdziale preparaty trzykrotnie płukano roztworem Tris (pH=7,5) a następnie wybarwiano EtBr. Obrazy mikroskopowe (Nikon) analizowano przy użyciu oprogramowania CASP 1.2 [10]. Każde stężenie badano w 3 powtórzeniach analizując obrazy 50 losowo wybranych jąder komórkowych (rys. 2.1). Prawidłowość wykonania preparatów sprawdzano na podstawie próby kontrolnej ekspozycji na 500µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Różnice pomiędzy ilością pęknięć DNA jądrowego komórek inkubowanych w poszczególnych stężeniach odcieków składowiskowych, przedstawione jako relatywna intensywność fluorescencji ogona komety (TI - zawartość DNA w ogonie = suma intensywności pikseli w obrazie ogona), długość ogona (TL - dystans [µm] migracji DNA z jądra komórkowego), oraz moment kometowy (TM - wielkość bezwymiarowa, iloczyn długości i % zawartości DNA w ogonie/100) analizowano za pomocą testu Kruskal'a-Wallis'a oraz Mann'a-Whitneya (SOFA 1.3.5.) [11].



Rys. 2.1. Obraz DNA jądrowego pojedynczego celomocyta ekspozowanego na odcieki składowiskowe po elektroforezie na szkiełku mikroskopowym. Wybarwione fluorochromem kwasy nukleinowe znajdujące się w obrębie strawionego jądra komórkowego tworzą w świetle UV „głowę” (A), a materiał migrujący w polu elektrycznym „ogon” komety (fot. Ł. Jurczyk).

### 3. Wyniki i dyskusja

Metoda SCGE (*Single-cell Gel Electrophoresis*), zwana potocznie metodą kometową (*comet assay*), jest obecnie szeroko rozpowszechniona jako szybka, czuła i tania metoda oceny uszkodzeń nici DNA jądrowego komórek eukariotycznych ekspozowanych na potencjalnie genotoksyczne czynniki. W skrócie, polega ona na umieszczeniu komórek, uprzednio ekspozowanych na czynnik genotoksyczny *in vivo* lub *in vitro*, w cienkiej warstwie żelu agarozowego, poddaniu w tej postaci działaniu usuwającemu błony komórkowe i jądrowe, rozluźnieniu struktury DNA i rozdzielaniu elektroforetycznemu na drodze kilkudziesięciu mikrometrów. Po wybarwieniu kwasów nukleinowych, w obrazie mikroskopowym powstaje charakterystyczny obraz przypominający kometę, z głową w miejscu gdzie znajdowało się jądro komórkowe i ogonem z wywędrowujących w polu elektrycznym, krótkich odcinków DNA [12]. Spośród wielu parametrów jakie można otrzymać z analizy takich obrazów, trzy miary uszkodzeń DNA są powszechnie uznawane za użyteczne: długość ogona komety (TL – *tail length*), moment kometowy (TM – *tail moment*) oraz odsetek zawartości DNA w „ogonie”. Wymiary długości ogona lub głowy komety przedstawiony np. w µm, uważa się często za niewystarczający jako miara uszkodzeń materiału genetycznego. Różnice wydłużenia ogona obserwować można raczej przy małym stopniu uszkodzeń. W teorii za pomocą tego parametru można by badać różnice ekspozycji na mniejsze dawki, jednak precyzja pomiaru zależy w dużej mierze od intensywności świecenia tła oraz czułości systemu analizy obrazu (optyki mikroskopu, matrycy kamery, możliwości graficznych komputera i oprogramowania), od tego zależy bowiem określenie, gdzie ogon komety się kończy (rys. 2.1). Moment kometowy jest wielkością bezwymiarową, biorącą pod uwagę zarówno odległość migracji DNA jak i odsetek

całkowitego DNA, które migrowało z jądra. Z kolei procent DNA w ogonie wynika z relatywnej intensywności fluorescencji głowy i ogona, którą oblicza się sumując jasność poszczególnych pikseli wchodzących w skład obrazu ogona. Największą zmienność można obserwować w zakresie około 50% [13].

Charakter danych uzyskiwanych z analizy kometowej (m.in. szeroki rozkład uzyskiwanych wartości) powoduje, że w analizie wyników doświadczeń trzeba stosować miary statystyczne, pozwalające na wykrycie niekiedy bardzo dyskretnych różnic. W porównywaniu wyników przydatne okazują się takie miary tendencji centralnych jak średnia trymowana czy mediana (50ty centyl), a czasem 75 lub nawet 25 centyl. Autorzy stosują też różnorakie metody analiz statystycznych, najczęściej, w zależności od rozkładu danych, spotyka się w pracach testy: Mann'a-Whitney'a, Kruskal'a-Wallis'a, test- t czy jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA [13].

W doświadczeniu zastosowano krótki czas ekspozycji i dużą skalę rozcieńczeń, dlatego też osiągnięto stosunkowo niskie wartości parametrów odczytywanych z fluorogramów. Należy zauważyć, że stężenia odcieków jakie mogą w rzeczywistości oddziaływać na organizmy glebowe są z reguły niewielkie. Przy ustalonych warunkach badań (rozcieńczenia, czas ekspozycji, gatunek i rodzaj komórek) odcieki pobrane z danej lokalizacji nie wykazywały wysokiej genotoksyczności (rys. 3.1) - średnia trymowana relatywnej intensywności świecenia ogona, przy współczynniku ucięcia 0,5 osiągnęła wartość zaledwie 6,67% dla komórek eksponowanych na 50% stężenie odcieków, a inna miara tendencji centralnej, mediana, osiągnęła tylko 5,52%. Ilość DNA, która migrowała z obszaru jądra komórkowego była więc relatywnie niewielka. Wartość średniej i mediany momentu kometowego mieściła się odpowiednio pomiędzy 0,95 i 0,90 przy ekspozycji na 50% odcieki, a 0,14 w próbie kontrolnej. Analiza statystyczna wykazała jednak istotne ( $p > 0,001$ ) różnice wartości momentu kometowego i intensywności świecenia pomiędzy próbą zerową, a stężeniami  $\geq 6,2\%$ .

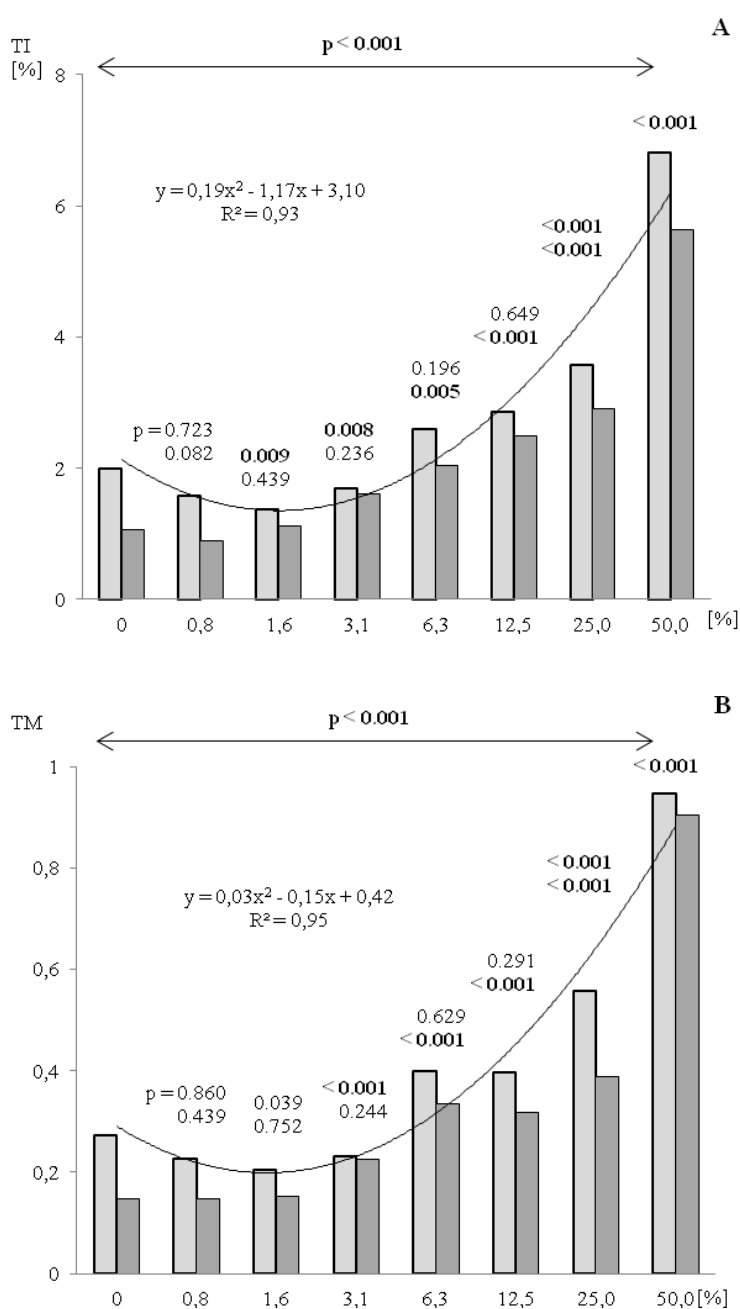
Jakkolwiek wartości miar uszkodzeń były niskie, można stwierdzić, że były obserwowane głównie na podstawie ilości DNA, które wyemigrowało do ogona komety - moment kometowy (TM) zależał głównie od fluorescencji (rys. 3.2A,  $R^2=0,76$ ). Natomiast wydłużenie ogona komety nie było silnie zdeterminowane wzrostem stężeń odcieków, na jakie eksponowano komórki (rys. 3.2B,  $R^2=0,44$ ), co jest zależnością opisaną powyżej [13].

Odcieki surowe wykorzystane w badaniach charakteryzowały się stężeniem azotu amonowego na poziomie  $896 \text{ mg/dm}^3$ , średnie stężenie związków organicznych wyrażonych jako ChZT wyniosło  $6092 \text{ mg/dm}^3$ , BZT<sub>5</sub> równe  $311 \text{ mg/dm}^3$ , a  $\text{pH} \approx 8,5$ . Porównując te dane z dostępnymi w literaturze, trudno mówić o wartościach przeciętnych, ponieważ w odciekach ze składowisk komunalnych odnotowuje się duże różnice składu i stężenia, pomiędzy różnymi obiektami, a nawet czasem pobierania próbek, a nawet miejscami próbkowania w tym samym obiekcie [14, 15, 16, 17].

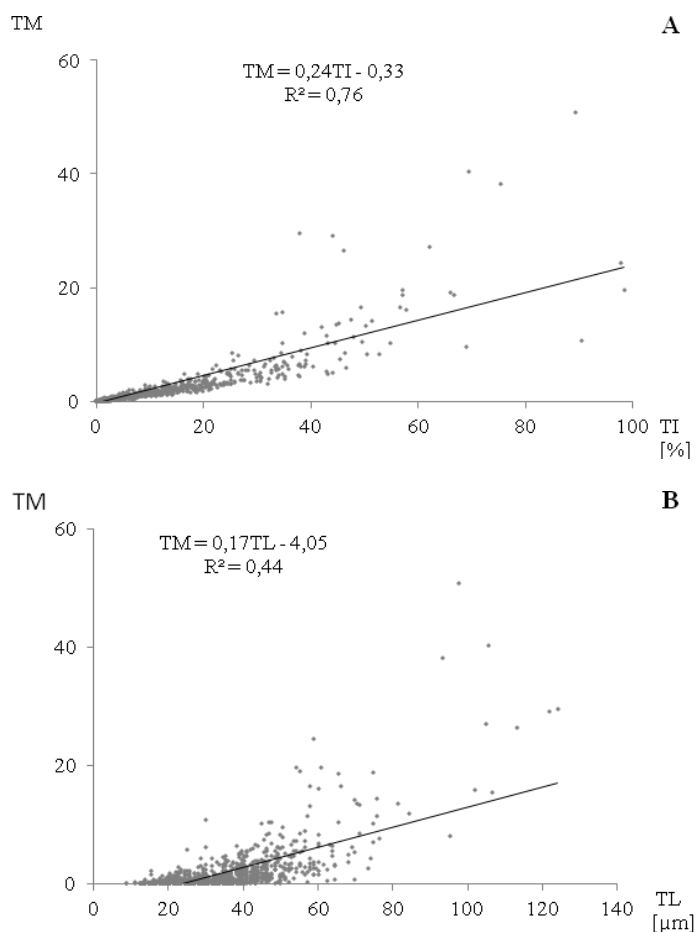
Na toksyczność odcieków składowiskowych może mieć wpływ wiele związków chemicznych wchodzących w ich skład. Biologiczne, chemiczne i fizyczne przemiany zachodzące w składowisku oraz w samych odciekach mogą prowadzić do powstania związków toksycznych z substancji pierwotnie nieszkodliwych. [18]. W przypadku złożonych mieszanin, interakcje pomiędzy poszczególnymi toksykantami a organizmem mogą mieć charakter synergistyczny, antagonistyczny lub addytywny. Z tego powodu sama analiza chemiczna nie wystarcza do określenia potencjału toksycznego. Dlatego coraz powszechniejsza staje ocenę efektu toksycznego tego typu mieszanin w oparciu o modele biologiczne.

Odcieki zarówno z aktywnych, jak i zamkniętych składowisk odpadów mogą być głównym źródłem zanieczyszczeń wód gruntowych i powierzchniowych [19]. Ekspozycja na odcieki składowiskowe może następować na różne sposoby: niekontrolowane wypływy, spływy powierzchniowe po opadach czy infiltracja. Dlatego najczęstszym sposobem uniknięcia ryzyka jest zbieranie odcieków z basenach bezodpływowych i przepompowywanie ich do instalacji podczyszczających

Uważa się, że wpływ odcieków na organizmy żywe; faunę, florę i mikroflorę może być bardzo silny, a powodować go może wiele czynników: wysoki ładunek materii organicznej, metale ciężkie, wysoka zawartość soli mineralnych czy ksenobiotyki. W literaturze naukowej dostępny jest pewien zasób informacji o potencjalnie toksycznych składnikach odcieków. Matejczyk i wsp. (2011) badali skład chemiczny odcieków pochodzących z 22 składowisk odpadów komunalnych w Polsce południowej [20]. Stwierdzono relatywnie małe koncentracje kadmu i ołowiu. Toksyczne związki organiczne wymienione w dyrektywie o substancjach priorytetowych były nieobecne lub występowały w niewielkich stężeniach. Dichlorometan i WWA obecne były we wszystkich badanych próbach, w bardzo szerokim zakresie, odpowiednio od  $3,1$  do  $197 \text{ } \mu\text{g/dm}^3$  oraz od  $0,057$  do  $77,2 \text{ } \mu\text{g/dm}^3$ . Ponadto w ponad połowie prób stwierdzono benzen w ilości od  $0,25$  do  $7,58 \text{ } \mu\text{g/dm}^3$ , a w próbkach z niektórych składowisk stwierdzono niewielkie ilości ( $0,008$  do  $0,84 \text{ } \mu\text{g/dm}^3$ ) heksachlorobutadienu, polichlorowanych bifenili ( $0,008$  do  $0,056 \text{ } \mu\text{g/dm}^3$ ) czy pentachlorofenolu ( $0,16$  do  $0,64 \text{ } \mu\text{g/dm}^3$ ) [20].



Rys. 3.1. Słupki jasne przedstawiają wartości średniej trymowanej intensywności świecenia ogonów komet (A) oraz momentów kometowych (B) u komórek eksponowanych na rozcieńczenia odcieków ze składowiska odpadów komunalnych. Porównania dokonano z użyciem jednokierunkowej analizy Kruskal'a-Wallis'a, a następnie testu U Mann'a-Whitney'a. Graniczne poziomy istotności wskazują różnice pomiędzy wynikiem uzyskanym w danej wartości stężenia, a wynikiem uzyskanymi w próbie kontrolnej (wartość dolna), oraz wynikiem uzyskanym dla wyższego stężenia (wartość górna). Wartości  $p < 0,01$  pogrubiono, słupki ciemne przedstawiają wartości 50-tego percentyla.



Rys. 3.2. Współzależności między: (A) momentem kometowym (TM), a intensywności świecenia (TI), oraz (B) wydłużeniem ogona komety (TL).

Odpady mogą zawierać wieloskładnikowy zespół metali, które są szczególnie intensywnie uwalniane w fazie kwaśnej przemian na składowisku. Większość metali wytwarza reaktywne formy tlenu, np. jony nadtlennkowe, nadtenki wodoru czy rodniki hydroksylowe. Mogą one skutkować utlenianiem lipidów wchodzących w skład błon komórkowych, a nawet uszkodzeniem kwasów nukleinowych. W odpowiedzi na działanie tego typu związków wykrywane są dysmutaza nadtlennkowa czy katalaza – enzymy charakterystyczne dla stresu oksydacyjnego [21].

Podobne wartości parametrów komet jak otrzymane w pracy uzyskali też Gajski i wsp. (2012), którzy badali genotoksyczności odcieków składowiskowych ze starego składowiska w Chorwacji, wobec ludzkich komórek krwi ekspozowanych *in vitro* przez 6 i 24h. Wszystkie parametry (TM, TL i TI) wskazywały statystyczne różnice testowanymi grupami natomiast nie występowały różnice pomiędzy czasami ekspozycji, ani odciekami pobranymi z różnych punktów. W przypadku intensywności świecenia i momentu kometowego istotne różnice występowały dopiero przy 24 godzinnej ekspozycji [22].

Sang i Li (2005) badali uszkodzenia cytogenetyczne w komórkach szpiku kostnego myszy, indukowane przez komunalne odcieki składowiskowe zbierane w różnych porach roku [23]. Osiągnięte przez nich rezultaty wskazują na obniżenie indeksu mitotycznego i znaczące podwyższenie poziomu aberracji chromosomowych. Wskazali oni na związek pomiędzy toksycznością a stężeniem  $CHZT_{Cr}$ , a jako możliwy mechanizm takich uszkodzeń proponują formowanie wolnych rodników, zarówno poprzez autooksydację jak i katalizowane enzymatycznie utlenianie związków organicznych. Kwaśniewska i wsp. (2012) podjęli próbę oceny potencjału genotoksycznego odcieków składowiskowych pochodzących z 22 składowisk na górnym Śląsku [24]. W tym celu wykorzystali komercyjne zestawy, których działanie opiera się na indukcji mutacji zwrotnej genu związanego z syntezą histydyny u *Salmonella typhimurium* (test Ames), oraz ekspresji operonu Umu związanego z tzw. odpowiedzią SOS. Ponadto oceniali: indeks mitotyczny, obecność mikrojąder i aberracje

chromosomowe w komórkach korzeni cebuli (test *Allium*). Badania wykazały, że testy mikrobiologiczne są w przypadku odcieków mało czułe; Umu okazał się całkowicie nieprzydatny do oceny genotoksyczności, a test Ames po 90 minutowej ekspozycji wykazał mutagenne działanie jedynie 2 spośród badanych próbek. Natomiast wszystkie próbki odcieków wpłynęły na podziały komórek cebuli, a połowa z sześciu zbadanych pod względem genotoksyczności dała wynik pozytywny. Autorzy przyznają jednak, że w celu uzyskania pełnego obrazu ryzyka środowiskowego biotesty należy wspomagać analizami składu chemicznego odcieków.

Koshy i wsp. (2007) badali potencjalne oddziaływanie na materiał genetyczny, odcieków pochodzących ze starych składowisk użytkowanych w odmiennych warunkach: aktywnych, zamkniętych i rekultywowanych, uszczelnionych i niezabezpieczonych, na których przez okres około 30 lat gromadzono stałe odpady komunalne z dodatkiem zmieszanych odpadów przemysłowych, chemicznych, wielkogabarytowych, metalurgicznych czy placków filtracyjnych [25]. Przyjęta przez tych autorów metoda polegała na ocenie zmian w strukturze 3 rzędowej DNA plazmidu *ΦX174* (*plasmid scission assay* - PSA) inkubowanego w rozcieńczeniach odcieków. Zmiany te polegają na rozluźnieniu struktury superhelisy, a następnie pęknięciu kolistej cząsteczki plazmidu, co można obserwować w prędkości elektroforezy. Genotoksyczność badanych odcieków wahała się w bardzo szerokim zakresie pomiędzy stanowiskami i w poszczególnych miesiącach próbkowania, od  $TD_{25}=85$  do  $TD_{50}=1\%$  koncentracji odcieków. Nie wykazano związku pomiędzy toksycznością, a wartościami pomiarów pochodzących z analiz chemicznych jak CHZT, BZT5, czy zawartością metali ciężkich. Stwierdzono jednak związek pomiędzy wartością parametru  $TD_{50}$ , a koncentracją produktów degradacji pestycydów, oraz obecnością reaktywnych form utleniaczy.

Uważa się, że na ogólną toksyczność odcieków duży wpływ mogą mieć wysokie stężenia  $N_{NH_4}$ . Pivato i Gaspari (2006) przeanalizowali próbki odcieków pochodzące z 10 składowisk, eksponując przez 30 min mikroorganizmy mające zdolność luminescencji. Doszli do wniosku, że oprócz CHZT najważniejszym czynnikiem toksycznym są jest amoniak. Może on brać się w odciekach z uwalniania z odpadów zawierających amoniak lub związki amonowe oraz mineralizacji materii organicznej (głównie amonifikacji białek). Tylko niewielka część amoniaku jest wypłukiwana bezpośrednio z odpadów do odcieków [26]. Przy wysokich wartościach pH w fazie metanogenicznej, amoniak może być emitowany jako składnik biogazu, może być też zużywany jako źródło azotu przez mikroorganizmy oraz wiązany na negatywnie naładowanych składnikach odpadów w fazie kwasowej. Dopiero w tej formie może być wypłukiwany do odcieków po wymianie jonowej z wodorem lub sodem i potasem.

#### 4. Podsumowanie i wnioski

Genotoksyczność jest właściwością substancji polegającą na indukowaniu uszkodzeń w materiale genetycznym. Jak wskazują dane literaturowe odcieki składowiskowe są mieszaniną potencjalnie genotoksyczną, a jako główny mechanizm wymienia się działanie reaktywnych utleniaczy. Uzyskane w pracy wyniki zdają się potwierdzać tę tezę, jednak w celu uzyskania bardziej szczegółowych danych, należy rozszerzyć dalsze badania o próbki pobierane w różnych porach roku, oraz dłuższe ekspozycje w podobnych niskich stężeniach *in vivo* i wyższych stężeniach *in vitro*.

#### Literatura

1. Cossu R., Technical evolution of landfilling, Waste Management, 2010, 30, 947-948.
2. Rosik-Dulewska Cz. Podstawy gospodarki odpadami. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa. 2007.
3. Aziz S.Q., Aziz H.A., Yusoff M.S., Bashir M.J.K., Umar M., Leachate characterization in semi-aerobic and anaerobic sanitary landfills: A comparative study, Journal of Environmental Management, 2010, 91, 2608-2614.
4. Eggen T., Moeder M., Arukwe A., Municipal landfill leachates: A significant source for new and emerging pollutants, Science of The Total Environment, 2010, 408, 21, 5147-5157.
5. Maggionia S., Boriania E., Gemmab S., Moltenib M., Lombardoa A., Colomboa A., Bordonalia S., Rotellaa G, Lodia M., Benfenatia E. Baderna D. 2011. A combined approach to investigate the toxicity of an industrial landfill's leachate: Chemical analyses, risk assessment and in vitro assays. Pages Environmental Research. 111, 4, 603-613.

6. Sukumaran S, Grant A. 2013. Effects of genotoxicity and its consequences at the population level in sexual and asexual *Artemia* assessed by analysis of inter-simple sequence repeats (ISSR). *Mutation Research*, 757, 8–14
7. Manier N., Brulle F., Le Curieux F., Vandebulcke F., Deram A., 2012. Biomarker measurements in *Trifolium repens* and *Eisenia fetida* to assess the toxicity of soil contaminated with landfill leachate: A microcosm study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 80, 339-348.
8. Brulle F., Cocquerelle C., Mitta G., Castric V., Douay F., Leprêtre A., Vandebulcke F. 2008. Identification and expression profile of gene transcripts differentially expressed during metallic exposure in *Eisenia fetida* coelomocytes. *Developmental & Comparative Immunology*, 32, 12, 1441-1453.
9. Adamowicz A. 2005 Morphology and ultrastructure of the earthworm *Dendrobaena veneta* (Lumbricidae) coelomocytes. *Tissue Cell*. 37, 2, 125-33.
10. Końca K., Lankoff A., Banasik A., Lisowska H., Kuszewski T., Gózdź S., Koza Z., Wojcik A.. 2003. A cross platform public domain PC image analysis program for the comet assay. *Mutation Research* 534:15-20.
11. SOFA Statistics version 1.3.5. Paton-Simpson & Associates Ltd, Auckland, New Zealand.
12. Rojas E, Lopez M.C, Valverde M. 1999. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications *Journal of Chromatography*. 722, 1–2, 225-254.
13. Lovell D.P., Omori T. 2008. Statistical issues in the use of the comet assay *Mutagenesis*. 23, 3, 171–182.
14. Ahmed F.N., Lan C.Q., Treatment of landfill leachate using membrane bioreactors: A review, *Desalination*, 2012, 287, 41-54
15. Banel A., Zygmunt B., Lotne kwasy tłuszczowe na składowisku odpadów – występowanie i oznaczanie, *Ecological Chemistry and Engineering S*, 2009, 16, 193-206.
16. Foo K.Y., Hameed B.H., An overview of landfill leachate treatment via activated carbon adsorption process, *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 171, 54-60.
17. Janosz-Rajczyk M. [red.], *Badania wybranych procesów oczyszczania ścieków*, Wydawnictwo Politechniki Częstochowskiej, Częstochowa 2008.
18. Slack, R.J.; Gronow, J.R.; Voulvoulis, N. (2005) Household hazardous waste in municipal landfills: contaminants in leachate. *Science of the Total Environment*, 337, 119 - 137.
19. Szymańska-Pulikowska A., *Jakość wód podziemnych w obszarze potencjalnego oddziaływania składowisk odpadów komunalnych*, Monografie Wydawnictwa Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, 2009.
20. Matejczyk, M., Płaza, G.A., Nałęcz-Jawecki, G., Ulfig, K., Markowska-Szczupak, A. 2011. Estimation of the environmental risk posed by landfills using chemical, microbiological and ecotoxicological testing of leachates. *Chemosphere*. 82, 1017–1023.
21. Jomova K., Valko M. 2011. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283, 2–3, 65-87.
22. Gajski G., Orešćanin V., Garaj-Vrhovac V. 2012. Chemical composition and genotoxicity assessment of sanitary landfill leachate from Rovinj, Croatia. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 78, 1, 253-259
23. Sang N., Li G. 2005. Chromosomal aberrations induced in mouse bone marrow cells by municipal landfill leachate. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 20, 219–224
24. Kwasniewska J., Nałęcz-Jawecki G., Skrzypczak A., Płaza G.A., Matejczyk M. 2012. An assessment of the genotoxic effects of landfill leachates using bacterial and plant tests *Original Research Article. Ecotoxicology and Environmental Safety*, 75, 55-62.
25. Koshy L., Paris E., Ling S., Jones T., BéruBé K. 2007. Bioreactivity of leachate from municipal solid waste landfills — assessment of toxicity. *Science of the Total Environment* 384, 171–181.
26. Pivato A, Gaspari L. 2006. Acute toxicity test of leachates from traditional and sustainable landfills using luminescent bacteria *Waste Management* 26 1148–1155.