

Prace Naukowe Instytutu Inżynierii Ochrony Środowiska
Politechniki Wrocławskiej

87

Seria: Monografie

52

Katarzyna Piekarska

Modyfikacje testu *Salmonella* do oceny mutagenności pyłowych zanieczyszczeń powietrza atmosferycznego

Wrocław 2008

Biblioteka Główna i OINT
Politechniki Wrocławskiej



100100228273



Katarzyna PIEKARSKA

Modified *Salmonella* assays for mutagenicity assessment
of atmospheric dust pollutants



Katarzyna Piekarska

**Modyfikacje testu *Salmonella*
do oceny mutagenności
pyłowych zanieczyszczeń
powietrza atmosferycznego**



Recenzenci

Renata KOCWA-HALUCH
Teodora M. TRACZEWSKA

Opracowanie redakcyjne
Alina KACZAK



337103 L/1

Wszelkie prawa zastrzeżone. Żadna część niniejszej książki, zarówno w całości, jak i we fragmentach, nie może być reprodukowana w sposób elektroniczny, fotograficzny i inny bez pisemnej zgody wydawcy i właścicieli praw autorskich.

© Copyright by Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2008

OFICyna WYDAWNICZA POLITECHNIKI WROCŁAWSKIEJ
Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław
<http://www.oficwyd.pwr.wroc.pl>
e-mail: oficwyd@pwr.wroc.pl

ISSN 0084-2869

Drukarnia Oficyny Wydawniczej Politechniki Wrocławskiej. Zam nr 392/2008.

Mojej Mamie

*frakcja PM10, ekstrakty pyłu zawieszonego,
aglomeracja miejska, test Salmonella,
test preinkubacyjny, test w modyfikacji Kado,
test w formie Mini, NADP, Aroclor 1254, fenobarbital,
Salmonella typhimurium TA 98, TA 100, YG 1041, YG 1042*

Katarzyna PIEKARSKA*

MODYFIKACJE TESTU *SALMONELLA* DO OCENY MUTAGENNOŚCI PYŁOWYCH ZANIECZYSZCZEŃ POWIETRZA ATMOSFERYCZNEGO

Celem pracy było wytypowanie procedury testu *Salmonella*, która pozwoliłaby wykrywać z dużą czułością obecność mutagennych zanieczyszczeń zaadsorbowanych na pyłach zawieszonych w powietrzu atmosferycznym aglomeracji miejskiej. Zwiększenie czułości testu jest niezwykle ważne, ponieważ w celu wykrycia aktywności mutagennej organicznych zanieczyszczeń powietrza należy pobrać znaczne jego objętości, co stanowi utrudnienie w wprowadzeniu testu do rutynowego monitoringu zanieczyszczeń powietrza.

Praca obejmowała pobór próbek pyłu zawieszonego na terenie Wrocławia, jego ekstrakcję, analizę chromatograficzną i biologiczną. Badania prowadzono według klasycznego testu *Salmonella*, testu klasycznego bez udziału NADP jako składnika S9-mix, testu z 10-krotnie zwiększoną ilością bakterii, testu preinkubacyjnego prowadzonego w temperaturze 30 i 37 °C, testu w modyfikacji Kado oraz testu Mini, będącego kompilacją testu klasycznego i testu w modyfikacji Kado. Przeprowadzono porównanie przydatności frakcji mikrosomalnej aktywowanej standardowym induktorem, jakim jest bardzo niebezpieczny Aroclor 1254, z frakcją indukowaną fenobarbitem oraz z frakcją mikrosomalną niepoddaną uprzedniej indukcji.

Rezultaty uzyskanych badań wykazały przydatność testu *Salmonella* w monitoringu zanieczyszczeń powietrza atmosferycznego aglomeracji miejskiej. Badane ekstrakty zanieczyszczeń powietrza różniły się między sobą sumaryczną zawartością oraz procentowym udziałem poszczególnych związków w zależności od miejsca i od sezonu poboru próbki. Zarówno sumaryczna zawartość WWA i nitroWWA w badanych próbkach, jak i ich spektrum było największe w okresie zimowym. Największą mutagennością odznaczały się próbki pobrane w zimie. Uzyskano duże współczynniki mutagenności w testach przeprowadzanych zarówno z aktywacją metaboliczną, jak i bez niej, świadczące o obecności promutagenów i mutagenów bezpośrednich. Mutageny zawarte w ekstraktach pyłów zawieszonych wywoływały silniejszą odpowiedź ze strony szczepów TA98 i YG1041, w porównaniu do szczepów TA100 i YG1042, co oznacza, że były to głównie związki

* Zakład Biologii i Ekologii Instytutu Inżynierii Ochrony Środowiska Politechniki Wrocławskiej, Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław.

wywołujące mutacje typu zmiany fazy odczytu. Największą przydatnością w wykrywaniu mutagenności ekstraktów pyłów zawieszonych odznaczał się szczep YG1041, szczególnie wrażliwy na nitrowe związki aromatyczne. Rezultaty badań wskazały na przydatność testu klasycznego przeprowadzanego z frakcją mikrosomalną indukowaną fenobarbitalem, bez wprowadzania do testu NADP w wykrywaniu promutagenów szczepem TA98. W przypadku szczepu YG1041 dobre wyniki uzyskano w teście klasycznym z 10-krotnie większą ilością bakterii bez udziału NADP. Dla obu tych szczepów wykazano także dużą przydatność testu *Salmonella* w modyfikacji Kado oraz testu preinkubacyjnego. Badania porównawcze frakcji mikrosomalnych stosowanych w testach wskazały, iż możliwe jest zastąpienie frakcji mikrosomalnej aktywowanej Aroclorem 1254 frakcją indukowaną fenobarbitalem oraz frakcją niepoddaną indukcji w badaniach nad mutagennymi zanieczyszczeniami powietrza aglomeracji miejskiej. Aroclor jest preparatem bardzo drogim, bardzo stabilnym chemicznie, który w śladowych ilościach powoduje mutacje wywołujące zmiany nowotworowe. Fenobarbital jest preparatem bezpieczniejszym i wielokrotnie tańszym. Wyniki badań wykazały konieczność każdorazowego doboru optymalnego stężenia frakcji mikrosomalnej wobec próbki środowiskowej, a nie wobec mutagenu standardowego. Należy także, prowadząc test z preinkubacją, każdorazowo, przed przystąpieniem do badań dobierać właściwy czas jej trwania. Wykazano bowiem, iż optymalny czas preinkubacji jest różny w zależności od rodzaju szczepu, temperatury preinkubacji i rodzaju frakcji mikrosomalnej.

Wykaz stosowanych skrótów, oznaczeń i określeń

PM	– pył zawieszony (ang. <i>particulate matter</i>)
TSP	– całkowity pył zawieszony, czyli całkowita zawartość pyłu w powietrzu (ang. <i>total suspended particulates</i>)
PM10	– pył drobny PM10, oznacza frakcję pyłu zawieszonego, którego cząstki mają średnice mniejsze od 10 µm (ang. <i>particulate matter</i>)
PM2,5	– pył bardzo drobny, czyli frakcja pyłu zawieszonego, o rozdrobnieniu koloidalnym, w której cząstki mają średnice mniejsze od 2,5 µm
UFP	– pył ultradrobny, frakcja pyłu, którego cząstki mają średnicę mniejszą od 100 nm (ang. <i>ultrafine particles</i>).
DEP	– cząstki pyłów powstające pod wpływem spalin z silników diesla (ang. <i>diesel exhaust particles</i>)
VOC	– lotne substancje organiczne (ang. <i>volatile organic compounds</i>)
HAP	– szkodliwe zanieczyszczenia powietrza (ang. <i>Hazardous Air Pollutants</i>)
ROS	– aktywne formy tlenu (ang. <i>reactive oxygen species</i>)
LR	– liczba rewertantów
MR	– współczynnik mutagenności
M	– mutagenność
–F	– badanie prowadzone bez udziału frakcji mikrosomalnej
FA	– frakcja S9 aktywowana Aroclorem 1254
FB	– frakcja S9 aktywowana fenobarbitem
F0	– frakcja S9 nieaktywowana
+ FA	– badanie prowadzone z udziałem frakcji mikrosomalnej aktywowanej Aroclorem 1254
+ FB	– badanie prowadzone z udziałem frakcji mikrosomalnej aktywowanej fenobarbitem
+ F0	– badanie prowadzone z udziałem frakcji mikrosomalnej nieaktywowanej
WWA	– wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne
1-NP	– 1-nitropiren
2-AF	– 2-aminofluoren
NQNO	– 4-nitrocholino-N-tlenek
2-AA	– 2- aminoantracen
2,4,7	– TNFon-2,4,7-trinitro-9-fluorenon
2,4-DNT	– 2,4-dinitrotoluen
2,6-DNT	– 2,6-dinitrotoluen
stężenie progowe	– najmniejsze stężenie badanych ekstraktów pyłów, które wywołuje powstawanie co najmniej dwukrotnie większej liczby rewertantów w stosunku do liczby rewertantów powstających spontanicznie
efekt toksyczny	– efekt, w którym obserwuje się zmniejszenie współczynnika <i>MR</i> na krzywej dawka–odpowiedź w stosunku do współczynnika <i>MR</i> otrzymanego dla badanego mniejszego stężenia ekstraktu pyłów

1. Wstęp

Obserwuje się stałe zwiększenie zachorowalności na choroby nowotworowe. Zjawisko to łączy się z pogarszaniem warunków środowiskowych, które wywierają niekorzystny wpływ na rośliny, zwierzęta i ludzi. Dane epidemiologiczne wskazują, że 70–90% wszystkich przypadków chorób nowotworowych jest uwarunkowana środowiskowo [187]. Wobec tego podejmowane są w skali międzynarodowej badania epidemiologiczne i doświadczalne w celu wykrycia czynników ryzyka chorób nowotworowych. Pełny wykaz czynników chemicznych, które mogą działać lub działają rakotwórczo publikuje i weryfikuje Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (IARC) w Lyonie.

Jakość powietrza jest podstawowym elementem dobrej jakości życia. Od lat dostrzegany jest problem zdrowotnych i ekologicznych skutków zanieczyszczenia atmosfery. Szczególnie silnie występują te problemy na obszarach dużych aglomeracji miejskich, w których obserwuje się kilkuset razy większą koncentrację zanieczyszczeń w stosunku do obszarów niezanieczyszczonych [37, 176, 220]. Tak znaczna ich koncentracja jest niebezpieczna, ponieważ zanieczyszczenia te po wnikięciu do organizmu mogą działać na kilka sposobów: niezależnie, synergistycznie lub antagonistycznie [53, 194]. Dotyczy to zarówno zanieczyszczeń pochodzenia naturalnego, jak i antropogenicznego. Zanieczyszczenia mutagenne w powietrzu dużych miast pochodzą w większości ze źródeł antropogenicznych (zwłaszcza z procesów spalania) oraz stanowią produkt reakcji chemicznych zachodzących w atmosferze. Ocenia się, że obecnie w atmosferze znajduje się ponad 2000 różnych związków chemicznych, organicznych i nieorganicznych, stanowiących zanieczyszczenia [37].

Istotne znaczenie w całkowitej puli zanieczyszczeń, które wnikają do organizmu człowieka, mają zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego dostające się do organizmu drogą oddechową. Wiele z tych zanieczyszczeń adsorbuje się na różnej wielkości cząstkach pyłów zawieszonych. Od średnicy cząstek pyłu zależy ich szkodliwość dla organizmu. Frakcja drobnocząstkowych pyłów, o wielkości poniżej 5 μm , wykazuje największą aktywność biologiczną, ponieważ ma zdolność przenikania do pęcherzyków płucnych układu oddechowego ludzi i zwierząt. Z zalegających w pęcherzykach płucnych pyłów są uwalniane stopniowo między innymi rozpuszczalne – mutagenne, zanieczyszczenia działające na komórki nabłonkowe pęcherzyków płucnych. Nastę-

nie przez pęcherzyki płucne przedostają się one do układu krwionośnego i tą drogą rozprzestrzeniają się po całym organizmie [31, 78]. Wśród nich ważną grupę, stosunkowo dobrze poznaną, stanowią wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) – związki o działaniu mutagennym i kancerogennym. Są one przede wszystkim produkowane przez rafinerie ropy naftowej, gazownie, koksownie, fabryki chemiczne, pojazdy samochodowe, ciepłownie oraz występujące jeszcze bardzo licznie węglowe piece domowe. Jak wykazały badania, węglowodory aromatyczne nie są jedynymi związkami pierścieniowymi o działaniu mutagennym, adsorbującymi się na cząstkach pyłów. Dużą aktywnością mutageną charakteryzują się także nitrowe, chlorowe i tlenowe pochodne WWA oraz inne niezidentyfikowane jeszcze związki chemiczne [7, 42, 69, 71, 76, 148, 173, 190, 191, 198, 202]. Substancje te mogą powstać również w wyniku reakcji chemicznych między zanieczyszczeniami pierwotnymi oraz w wyniku reakcji fotochemicznych zachodzących w atmosferze [5, 8, 9, 46, 53, 216, 221].

Ze względu na to, że powietrze atmosferyczne ma ograniczone możliwości samooczyszczania, a zanieczyszczenia powietrza należą do szczególnie niebezpiecznych z powodu wyjątkowej łatwości rozprzestrzeniania się w środowisku, niezbędne jest podejmowanie działań chroniących je przed nadmiernym zanieczyszczeniem na podstawie kontroli stanu jego czystości [6]. Standardowe badania powietrza nie obejmują, jak dotychczas, określania aktywności mutagennej występujących w nim wszystkich zanieczyszczeń. Oceny stopnia zanieczyszczenia powietrza, w aspekcie zagrożenia zdrowotnego, dokonuje się jedynie przez określenie stężenia pyłu zawieszonego oraz WWA z listy USEPA (*United State Envirinmental Protection Agency*). Następnie porównuje się te wartości z dopuszczalnymi wartościami określonymi przepisami prawa. Postępowanie takie pozwala jedynie na ocenę aktualnego stanu środowiska, a nic nie mówi na temat oddziaływania zanieczyszczeń na organizmy żywe. Ponadto spektrum zanieczyszczeń mutagennych obecnych w powietrzu atmosferycznym jest dużo szersze niż lista USEPA [43, 92, 98, 176, 194].

Pełna analiza chemiczna zanieczyszczeń powietrza jest nierealna ze względu na złożoność ich składu oraz na wzajemne oddziaływania poszczególnych zanieczyszczeń w mieszaninie. Ponadto, wykrycie oraz identyfikacja substancji na podstawie analizy chemicznej jest kosztowna i wymaga zastosowania nowoczesnych technik analitycznych. Nie wszystkie występujące w powietrzu związki chemiczne zostały poznane lub występują w ilościach śladowych, znajdują się więc poza możliwościami analitycznymi metod instrumentalnych. Analiza chemiczna nie może więc być podstawą do prognozowania biologicznych skutków, jakie mogą zanieczyszczenia wywołać w stosunku do ludzi i zwierząt. Dotyczy to również ich mutagennego działania. Stąd też konieczność zastosowania w kontroli jakości środowiska atmosferycznego badań bioindykacyjnych, oprócz metod analitycznych. Na podstawie testów bioindykacyjnych można oceniać sumaryczną genotoksyczność wszystkich substancji znajdujących się w określonej próbce. Jest to istotne, ponieważ związki te w wielu przypadkach działają synergistycznie [141, 177, 194]. Wśród metod biologicznych do

oceny mutagennego i rakotwórczego działania związków chemicznych można wyróżnić: krótkoterminowe testy, długoterminowe badania prowadzone na zwierzętach eksperymentalnych i badania epidemiologiczne [111].

Przeprowadzone już w latach 40. XX wieku badania na myszach wykazały, że pyły zawieszone w powietrzu są przyczyną chorób nowotworowych [37, 38]. Jednak do połowy lat 70. ubiegłego wieku zajmowano się tylko oceną zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego opartą na technice chemiczno-analitycznej. Badania miały na celu identyfikację zanieczyszczeń obecnych w powietrzu oraz określenie ich stężenia. Na podstawie tych badań próbowano szacować ryzyko zdrowotne związane z obecnością w nim poszczególnych substancji toksycznych i genotoksycznych. W 1975 r. Pitts i współpracownicy [164] pierwsi przeprowadzili badania zanieczyszczeń organicznych zaadsorbowanych na cząstkach pyłów zawieszonych zebranych w basenie Los Angeles, bakteryjnym, krótkoterminowym testem *Salmonella* (Amesa). Od tego czasu test ten był wielokrotnie stosowany do wykrywania efektu mutagennego organicznych ekstraktów z pyłów zawieszonych pobranych w różnych rejonach świata [2, 21, 27, 37, 48, 73, 93, 101, 111]. W Polsce badania genotoksyczności zanieczyszczeń powietrza prowadzono przede wszystkim na obszarze Górnego Śląska oraz na terenie Warszawy i Wrocławia [32, 90, 92, 105, 107, 112, 115, 141, 158–160, 222].

Bakteryjny test *Salmonella* okazał się najbardziej przydatnym skринingowym testem, alternatywnym w stosunku do testów prowadzonych na zwierzętach, w kierunku wykrywania obecności substancji mutagennych i potencjalnie kancerogennych w powietrzu atmosferycznym. Wyniki badań przeprowadzonych tym testem umożliwiły porównanie aktywności mutagennej zanieczyszczeń powietrza w zależności od miejsca poboru próbek, źródeł zanieczyszczeń i warunków meteorologicznych. Kiedy potwierdzono, że czynniki mutagenne stanowią część zanieczyszczeń znajdujących się w powietrzu, badacze stopniowo zaczęli zadawać sobie inne pytania. Jakie czynniki mutagenne znajdują się w otaczającym powietrzu? Jakie są źródła tych czynników? Czy liczba czynników mutagennych i ich poziom w powietrzu są podobne w różnych miastach? Jakie parametry (klimatyczne, inne zanieczyszczenia, reakcje zachodzące w atmosferze) mają wpływ na rodzaj i stężenie czynników mutagennych? Jakimi metodami najlepiej oceniać ich działanie mutagenne i kancerogenne [37]? O randze testu Amesa świadczy propozycja Instytutu Zdrowia Środowiskowego w Sztokholmie, aby badanie mutagenności zanieczyszczeń pyłowych prowadzone tym testem włączyć do rutynowego monitoringu zanieczyszczeń atmosfery [92, 194]. Badania epidemiologiczne potwierdziły istnienie zależności między zachorowalnością na choroby nowotworowe a jakością powietrza atmosferycznego [22, 38, 43, 98, 194]. Biorąc po uwagę fakt, że powietrzem oddychamy w sposób niezamierzony przez całą dobę, pobierając w tym czasie około 11 m³ powietrza, badania aktywności genotoksycznej pyłowych zanieczyszczeń powietrza mogą stanowić podstawę do szacowania ryzyka zachorowalności na choroby nowotworowe oraz do wprowadzenia działań profilaktycznych [24, 112, 220].

2. Założenia i cel pracy

Problem genotoksycznego działania pyłowych zanieczyszczeń powietrza atmosferycznego jest przedmiotem wielu badań naukowych. Mimo dużej liczby opracowań, dotyczących stosowania testu *Salmonella* w ocenie mutagenności zanieczyszczeń powietrza, badacze ograniczają się w nich zwykle do procedury klasycznej i do wykorzystania jednego lub dwóch szczepów testowych. Uzasadnione wydawało się więc przeprowadzenie wielu testów różniących się protokołem wykonania na jednym materiale badawczym z zastosowaniem szerszego zestawu szczepów testowych.

Za główny cel pracy przyjęto wytypowanie procedury testu *Salmonella*, która pozwoliłaby wykrywać z dużą czułością obecność mutagennych zanieczyszczeń zaadsorbowanych na pyłach zawieszonych frakcji PM10 w powietrzu atmosferycznym aglomeracji miejskiej na przykładzie miasta Wrocławia.

Założono, że wytypowanie procedury testu *Salmonella*, przez jej modyfikację, będzie prowadzone w następujących kierunkach:

- doboru właściwego induktora mikrosomalnej frakcji enzymatycznej (S9),
- określenia optymalnego stężenia frakcji S9,
- ustalenia właściwej techniki preinkubacji,
- ustalenia optymalnego składu mieszaniny reakcyjnej.

Uznano bowiem, na podstawie przeprowadzonych studiów literaturowych, za konieczne zwrócenie uwagi w badaniach nad poszukiwaniem optymalnej procedury testu na:

1. *Poziom enzymów indukowanych frakcji mikrosomalnej*

Istotnym elementem procedury bakteryjnego testu *Salmonella* jest aktywacja występujących w próbie promutagenów do mutagenów bezpośrednich, za pomocą wątrobowej frakcji mikrosomalnej. Uzyskuje się ją z wątroby szczurzej po uprzedniej indukcji, która ma na celu zwiększenie poziomu enzymów odpowiedzialnych za aktywację metaboliczną. Obecnie najczęściej stosowanym induktorem enzymów wątrobowych jest Aroclor 1254, który jest silną i trudno rozkładalną trucizną środowiskową z grupy PCBs. Jak wykazały badania, substancją o porównywalnej aktywności indukcyjnej jest znacznie mniej toksyczny roztwór fenobarbitalu. Frakcja mikrosomalna otrzymana po indukcji tym związkiem była stosowana do aktywacji pojedynczych związków promutagennych. Brak jest jednak badań możliwości aktywacyjnych

tej frakcji wobec próbek środowiskowych. Dlatego też uzasadnione jest zbadanie aktywności frakcji indukowanej fenobarbitem w stosunku do ekstraktu pyłu zawieszonego oraz porównanie jej aktywności z frakcją indukowaną Aroclorem. W badaniach podjęto także próbę zastosowania frakcji mikrosomalnej niepodanej indukcji, zawierającej naturalny poziom enzymów mikrosomalnych.

2. *Dobór stężenia frakcji mikrosomalnej*

Niezwykle istotną sprawą jest także dobór odpowiedniego stężenia frakcji mikrosomalnej stosowanej do badań. W procedurze klasycznej, zalecanej przez autorów testu, jest mowa o dwóch stężeniach S9 w S9-mix standardowym (4%, v/v) i dużym (10%, v/v). Ponieważ różne związki chemiczne do swojej metabolicznej konwersji potrzebują różnego optymalnego stężenia S9, w badaniach używa się szerokiego zakresu stężeń frakcji mikrosomalnej, od 4% do 30%. Niektórzy badacze najpierw używają małego stężenia frakcji (np. 5% lub 10%), a jeżeli uzyskują wynik negatywny, to badania powtarzają z dużym stężeniem frakcji (np. 30%). Z kolei inni zaczynają badania od dużego stężenia frakcji mikrosomalnej. Oryginalna metoda zaleca także dobieranie stężenia frakcji według stosowanego mutagenu diagnostycznego. Ze względu na to, że ekstrakty pyłów zawieszonych zawierają w swoim składzie zanieczyszczenia o różnym składzie ilościowym i jakościowym, celowe wydaje się zaproponowanie innego podejścia, a mianowicie dobór optymalnego stężenia frakcji wobec jednego wytypowanego rozcieńczenia ekstraktu pyłów, które zostałoby wytypowane na podstawie badań pilotowych z zastosowaniem stężenia frakcji mikrosomalnej 4% (v/v) w S9-mix. Takie rozcieńczenie ekstraktu powinno w teście wywoływać efekt mutageny, ale nie wywoływać jeszcze efektu toksycznego. Następnie należy wykonać na tym rozcieńczeniu test z zastosowaniem szerokiego spektrum stężeń badanej frakcji mikrosomalnej i wybrać do dalszych badań jej stężenie optymalne.

3. *Czas i temperatura kontaktu*

Następnym zagadnieniem, na które zwrócono uwagę była preinkubacja, polegająca na przedłużeniu kontaktu badanej próbki ze szczepami testowymi i ewentualnie z frakcją mikrosomalną, przed właściwą inkubacją testu. Preinkubacja umożliwia bowiem dłuższy kontakt badanych zanieczyszczeń ze szczepami testowymi w małej objętości mieszaniny reakcyjnej. Istotnym czynnikiem jest jednak właściwy dobór czasu preinkubacji ze względu na złożoność badanych mieszanin i możliwość wystąpienia efektu toksycznego. O efektach mutagennych testowanego związku decyduje bowiem w dużej mierze stężenie i czas jego działania. Dane literaturowe na ten temat opierają się głównie na badaniach mutagennego działania pojedynczych związków. W celu uzyskania odpowiedzi na pytanie czy preinkubacja w sposób istotny wpłynie na obniżenie progu wykrywalności złożonej mieszaniny zanieczyszczeń powietrza o charakterze mutagennym przeprowadzono badania z różnym czasem preinkubacji w dwóch temperaturach (30 °C i 37 °C). Wprawdzie dla enzymów zwierzęcych optimum termiczne wynosi 37 °C, interesujące było określenie zachowania się enzymów frakcji mikrosomalnej w temperaturze 30 °C, zalecanej do wyznaczania międzynarodowej jednostki enzymatycznej (U). Testy prowadzone z preinkubacją powinny posłużyć

także do wyznaczenia optymalnego stężenia mutagenu kontrolnego, którym należy posługiwać się w takich badaniach.

4. Obecność NADP w składzie S9-mix

W pracy zwrócono także uwagę na skład mieszaniny reakcyjnej. Jednym z jej składników jest NADP (fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego). Po raz pierwszy został on dodatkowo wprowadzony do frakcji mikrosomalnej pod koniec lat 70. XX wieku w badaniach prowadzonych w Japonii. Enzymy katalizujące utlenianie ksenobiotyków są zaliczane do monooksygenaz (kiedyś oksydazy o funkcji mieszanej). Utlenianie zachodzi z udziałem tlenu cząsteczkowego oraz donoru wodoru w postaci NADPH lub NADH. Reakcje redukcji wymagają jedynie czynnika redukcyjnego. W wyniku reakcji jeden z atomów cząsteczki tlenu zostaje wprowadzony do substratu, a drugi – kosztem donoru wodoru – redukuje się, tworząc cząsteczkę wody. We frakcji mikrosomalnej występuje łańcuch transportu elektronów, składający się z cytochromu P-450, reduktazy NADPH – cytochrom P-450 oraz czynnika lipidowego. Aktywność monooksygenaz, zawierających cytochrom P-450, pojawia się w ciągu pierwszych dni po urodzeniu, po czym wzrasta ona, osiągając maksimum około 30. dnia życia szczurów. Podobnie po urodzeniu się zwierzęcia zwiększa się zawartość NADPH w wątrobie, który jest niezbędnym koenzymem w mikrosomalnych metabolizmach wielu ksenobiotyków. Poziom występujący u dorosłego zwierzęcia osiągany jest w przypadku tego koenzymu w ciągu około dwóch dni. Celowe więc wydaje się przebadanie próbek zanieczyszczeń powietrza w testach z frakcją mikrosomalną pozbawioną dodatkowego źródła NADPH. Testy takie pozwolą odpowiedzieć na pytanie, w jaki sposób wpłynie to na próg wykrywalności aktywności mutagennej zanieczyszczeń powietrza, a tym samym czy jest możliwe obniżenie kosztów ich wykonania, ze względu na bardzo wysoką cenę tego składnika S9-mix.

5. Ilość materiału badawczego

Badanie aktywności mutagennej powietrza wymaga także odpowiedniej ilości materiału badawczego. W celu zmniejszenia jego ilości stosowana jest przez niektórych badaczy testu klasycznego, wprowadzona modyfikacja przez Kado, w której używa się 20 razy mniejszą objętość próbki przy 10-krotnie zwiększonej ilości bakterii testowych z zastosowaniem 90-minutowej preinkubacji. Niektórzy badacze donoszą o dużej czułości tego testu w porównaniu do metody klasycznej, ale istnieją też doniesienia o braku powtarzalności wyników uzyskanych tym testem i mniejszej korelacji wyników ze stężeniami związków mutagennych obecnych w badanych próbkach. W związku z tym w pracy zaproponowano procedurę będącą kompilacją klasycznego testu Ames z modyfikacją zaproponowaną przez Kado. W teście tym mieszanina reakcyjna zawierała wszystkie składniki w proporcjach takich samych jak w teście klasycznym, lecz zmieniono ich objętość, tak aby końcowa objętość mieszaniny wynosiła 0,205 cm³, jak w modyfikacji Kado. Wprowadzono również 90-minutową preinkubację w temperaturze 37 °C.

Efekty uzyskane w testach przeprowadzanych według zmodyfikowanych procedur zostały następnie porównane z wynikami badań otrzymanych w testach wykonywa-

nych najczęściej stosowaną klasyczną metodą testu. Wszystkie badania porównawcze były prowadzone na tych samych dwóch próbkach (pobranymi latem i zimą na Starym Mieście) z zastosowaniem czterech szczepów testowych (TA98, TA100, YG1041 i YG1042). Dzięki tak szeroko zaplanowanemu eksperymentowi, przeprowadzonemu na tych samych próbkach, udało się porównać wszystkie wytypowane do badań procedury badawcze i szczepy testowe. Możliwa więc była weryfikacja uzyskanych efektów na podstawie pięciu dodatkowych próbek pyłów pobranych w trzech innych punktach miasta i w różnych sezonach grzewczych. Do tej weryfikacji wybrano trzy procedury badawcze, trzy rodzaje frakcji mikrosomalnej i dwa szczepy testowe.

Przeprowadzone badania mogą przyczynić się do postępu na drodze ustalenia standardowej, optymalnej procedury testu *Salmonella* niezbędnej w badaniach zanieczyszczeń powietrza. Zmodyfikowana metoda testu może w przyszłości stanowić jedno z kryteriów oceny ryzyka narażenia na choroby nowotworowe populacji zamieszkującej badany teren i wchodzić w zakres systemu monitorowania powietrza do celów zdrowotnych. Standardowe badania powietrza nie obejmują bowiem, jak dotąd, wykrywania aktywności mutagennej występujących w nim zanieczyszczeń. Na podstawie analizy fizyczno-chemicznej można, co prawda, stwierdzić obecność w powietrzu niektórych związków znanych z aktywności genotoksycznej, nie można jednak określić rzeczywistej wypadkowej aktywności biologicznej próbki jako całości. Umożliwiają to tylko testy biologiczne, do których należy najpowszechniej stosowany test *Salmonella*.

3. Stan zagadnienia

3.1. Pyłowe zanieczyszczenia powietrza

Zanieczyszczeniem powietrza jest każda substancja stała, ciekła lub gazowa, która znajduje się w nim w ilości większej od jej zawartości naturalnej. Większość zanieczyszczeń powietrza to zanieczyszczenia gazowe – organiczne (VOC) i nieorganiczne (np. SO_2 , O_3 , NO_2 , CO). Drugą grupę zanieczyszczeń powietrza stanowią zanieczyszczenia pyłowe (PM). Wszystkie płynne i stałe cząstki znajdujące się w powietrzu, a nie będące cząstkami wody, nazywamy aerozolami (cząstki zawieszone w powietrzu). Aerosol to układ dwu- lub trójfazowy składający się z gazowej fazy rozpraszającej oraz stałej lub ciekłej, lub stałej i ciekłej fazy rozproszonej. W przypadku aerozolu atmosferycznego fazą rozpraszającą jest powietrze. W literaturze anglosaskiej definiuje się aerozole jako zawiesiny cząstek stałych i/lub ciekłych w powietrzu, których średnica ma rozmiar od kilku nanometrów do dziesiątek mikrometrów [98].

Pyłem (ang. *air particles*) nazywamy mieszaninę małych cząstek stałych zawieszonych w powietrzu. Mogą one przyjmować postać od submikrocząstkowych aerozoli do widocznych cząstek pyłów. Większe cząstki (grubsza frakcja) powstają w rezultacie działania sił mechanicznych przez ścieranie się. Mniejsze cząstki ($< 1 \mu\text{m}$) pochodzą z kondensacji jeszcze mniejszych cząstek i molekuł w fazie gazowej. W zależności od rozmiaru cząstek dzielimy go na pył o średnicach mniejszych niż $10 \mu\text{m}$ (PM10), mniejszych od $5 \mu\text{m}$ (PM5), mniejszych od $2,5 \mu\text{m}$ (PM2,5) i mniejszych od $1 \mu\text{m}$ (PM1) [22, 37, 98].

Stężenie aerozolu miejskiego jest około dwukrotnie większe niż w innych rejonach [44, 45]. Ponieważ temperatura, ciśnienie, promieniowanie i warunki pogodowe (opady, zachmurzenie itp.) są niejednolite i ulegają ciągłym zmianom, stąd też mamy do czynienia z bardzo dynamicznym systemem, w którym zarówno rozkład wielkości cząstek, jak i ich żywotność jest bardzo zmienna. Głównym składnikiem aerozolu miejskiego jest węgiel elementarny i organiczny, stanowiący około 40% całkowitej masy aerozolu. W aerozolach pochodzących z innych terenów związki te stanowią około 15–25%. Badania prowadzone w Los Angeles wykazały, że na wtórny aerosol organiczny w tym mieście składały się związki aromatyczne (58–65%),

alkany (15–21%), związki biogenne (10–16%) i olefiny (4–11%). Oprócz frakcji węglowej istotnym składnikiem aerozolu miejskiego są związki nieorganiczne, a wśród nich: jony siarczanowe (ok. 28%), amonowe (ok. 10%) i azotanowe (ok. 5%) oraz związki metali (As, Pb, Cd, Ni, Hg, Zn, Cr, Mn, Fe, Cu, Ni) [223].

Zapylenie powietrza jest jednym z podstawowych parametrów charakteryzujących stopień zanieczyszczenia atmosfery. W wielu krajach zaleca się stężenia dopuszczalne pyłów w powietrzu. W Polsce obowiązuje rozporządzenie Ministra Ochrony Środowiska, Zasobów Naturalnych i Leśnictwa (1998 r.), w którym dopuszczalne stężenia pyłów są następujące:

- 150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ dla TSP (całkowity pył zawieszony) oraz 125 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ dla PM10 (50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ od 2005 r.), jako średnia 24 h,
- 75 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ dla TSP oraz 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ dla PM10 (30 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ od 2005 r. i 20 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ od 2010 r.), jako wartość średnioroczna.

W Europie obowiązują stężenia ustalone przez UE. Są one następujące:

- 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ dla PM10, jako średnia 24 h,
- 80 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ dla TSP oraz 20 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ dla PM10, jako wartość średnioroczna,
- 130 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ dla TSP, jako wartość średnia dla półroczia zimowego.

Ze względu na większe znaczenie cząstek o mniejszym rozmiarze, w badaniach nad negatywnym wpływem pyłu zawieszonego na zdrowie człowieka, w Stanach Zjednoczonych w 1997 roku wprowadzono normowanie stężeń PM_{2,5}. Podaje się je jako AAQS (*Ambient Air Quality Standards*), czyli standardy jakości powietrza. Średnioroczna wartość AAQS dla PM_{2,5} wynosi 15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, a wartość średniodobowa 65 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ [98].

Rozkład średniorocznych stężeń TSP w Europie wskazuje na duże zagrożenie zdrowotne mieszkańców Europy środkowopółnocnej. Największe stężenia TSP zaobserwowano w Polsce południowo-zachodniej (zwłaszcza na Górnym Śląsku), Czechach i Niemczech [98]. Z kolei średnie roczne stężenie frakcji pyłu PM10 wynosiło, pod koniec lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku, 21,8 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ w Londynie, 29,5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ w Budapeszcie, 43,3 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ w Rzymie, 44,4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ w Sewilli i 45,5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ w Krakowie. Głównym źródłem emisji PM10 jest ruch uliczny (10–25%), procesy spalania (40–55%) i procesy przemysłowe (15–10%). Ze względu na swoją szkodliwość zanieczyszczenia pyłowe trafiły na drugie miejsce na liście priorytetowych trucizn środowiskowych. Najczęściej zainteresowania badaczy skupiają się na cząstkach pyłów: TSP, PM10 i PM_{2,5}. Ostatnio coraz częściej zwraca się uwagę na cząstki pyłu ultradrobne, UFP (cząstki pyłu o średnicy poniżej 100 nm) [22, 37, 44, 45, 171]. Zawartość tej frakcji w powietrzu miejskim waha się od 1,7 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ do 3,6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ [171].

Od średnicy cząstek pyłu zawieszonego zależy ich szkodliwość dla organizmu. Cząstki respirabilne (inhalacyjne), o średnicy < 10 μm , mają specjalne znaczenie biologiczne, ponieważ utrzymują się przez dłuższy czas w atmosferze, co warunkuje większe prawdopodobieństwo przedostania się ich do układu oddechowego człowieka. Układ oddechowy można podzielić na kilka odcinków. Do górnego odcinka dróg oddechowych zaliczamy: nos, jamę nosową, gardziel i krtań. Środkowy odcinek sta-

nowią: tchawica i większe oskrzeliki. Dolny odcinek obejmuje: oskrzeliki i pęcherzyki płucne. Miejsce depozycji cząstek w układzie oddechowym zależy przede wszystkim od mechanizmu oddychania, szybkości przepływu powietrza i od ich rozmiarów. Część wchłanianego aerozolu jest deponowana na powierzchni dróg oddechowych, a pozostała wydychana. Podczas oddychania nosem duże cząstki (10 μm i powyżej) osadzają się przede wszystkim w górnych odcinkach układu oddechowego, natomiast cząstki o rozmiarze 5–10 μm w dolnym odcinku układu oddechowego, w oskrzelikach. Przy oddychaniu ustami cząsteczki o średnicy poniżej 2,5 μm odkładają się głównie w rejonie płuc, cząsteczki większe o średnicy 3–5 μm w rejonie płuc i w części tchawiczno-oskrzelowej, natomiast cząsteczki o średnicy 7–15 μm w części tchawiczno-oskrzelowej układu oddechowego. Przy spokojnym oddychaniu znaczna część zanieczyszczeń zostaje usunięta z wydychanym powietrzem. Przy zwiększonym wysiłku fizycznym zwiększa się zatrzymana w płucach ilość aerozolu. Czynnikiem decydującym o miejscu zatrzymania cząstek w układzie oddechowym jest ich wielkość. Cząstki o bardzo małych rozmiarach ziaren od 0,1 μm do 0,01 μm deponują się głównie w 5–30% w tchawicy i oskrzelach oraz w 45–60% w pęcherzykach płucnych. Z kolei frakcje aerozolu o rozmiarach ziaren od 10 μm do 1 μm odkładają się w 90–30% w jamie nosowo-gardłowej, w 20–30% w pęcherzykach płucnych i w około 5–7% w tchawicy i oskrzelach. W zależności od miejsca osadzenia oraz rozpuszczalności substancji znajdujących się na powierzchni lub wewnątrz cząstek komórki układu oddechowego mogą być narażone na dłuższy kontakt ze związkami zaadsorbowanymi na ich powierzchni. Zanieczyszczenia dobrze rozpuszczalne w wodzie wchłaniają się z różnych odcinków dróg oddechowych. Ze względu na znaczną powierzchnię czynną płuc resorpcja związków chemicznych zachodzi z dużą intensywnością zwłaszcza w pęcherzykach płucnych. Cienka (1–4 μm), delikatna natura tej tkanki czyni ją podatną na absorpcję substancji mutagennych i na uszkodzenia przez nie spowodowane. Te zanieczyszczenia które znajdują się na powierzchni pęcherzyków płucnych mogą przeniknąć bezpośrednio do układu krwionośnego i spowodować ekspozycję na związki mutagenne innych tkanek [44, 98, 141, 187, 220].

Stwierdzono wzrost mutagenności wraz ze zmniejszaniem się aerodynamicznej średnicy cząstek. Między innymi zaobserwowano wzrost stężenia 1-nitropirenu wraz ze zmniejszaniem się średnicy cząstek [73]. To oznacza, że pył ultradrobny UFP zawiera największą ilość zaadsorbowanych związków organicznych. Dzieje się tak, ponieważ mniejsze cząstki ze względu na większą powierzchnię absorbują więcej zanieczyszczeń organicznych w przeliczeniu na masę pyłu [86]. Wykorzystanie wartości TSP lub PM₁₀ jako wskaźnika jakości powietrza może jednak nie być wystarczająco reprezentatywne i nie musi korelować z mutagenną aktywnością cząsteczek docierających do pęcherzyków płucnych.

Istnieje wiele potencjalnych wytłumaczeń dla wzrostu aktywności małych cząstek. Po pierwsze, mniejsze aerozole mogą powstawać ze źródeł, które emitują większe ilości związków mutagennych. Na przykład wiele emisji zanieczyszczeń pochodzących ze spalania zawiera cząstki o niewielkich rozmiarach aerodynamicznych, które mogą

zawierać większe ilości związków o charakterze mutagennym. Związki o charakterze mutagennym powstają także w rezultacie reakcji zachodzących w atmosferze. Kondensują one na małych cząstkach albo łączą się, tworząc płynne aerozole, które z kolei łączą się tworząc najpierw ultradrobne cząstki, a potem większe. Z kolei większe cząstki, które zawierają niewielkie ilości materii organicznej najczęściej powstają w rezultacie działania sił mechanicznych [37].

Skutki zdrowotne, jakie pył zawieszony może wywołać u ludzi, zależą więc od jego składu, stężenia i wielkości cząstek [44, 98].

3.2. Czynniki mutagenne i rakotwórcze w powietrzu atmosferycznym

W zanieczyszczonym powietrzu atmosferycznym występuje ogromna liczba związków z różnych klas chemicznych, które tworzą bardzo złożone mieszaniny o nieznanych właściwościach biologicznych [141]. W 1986 roku Graedel i inni [37] udokumentowali, na podstawie literatury naukowej, fakt odkrycia około 2800 związków w powietrzu atmosferycznym i powietrzu pomieszczeń. Z puli tych związków przebadano pod kątem mutagenności 206 związków organicznych, z czego 67 z nich wykazało właściwości mutagenne. Do USEPA *Toxics Release Inventory* (TRI) zostało zgłoszonych 507 związków obecnych w powietrzu atmosferycznym. Z 507 związków, 276 (~54%) zostało poddane badaniom w testach bakteryjnych, głównie za pomocą krótkoterminowego testu *Salmonella*. Około 48,6% z nich, czyli około 26,4% wszystkich zidentyfikowanych związków, wykazało się potencjalną mutagennością. Claxton i inni [37] przedstawili poszczególne klasy związków chemicznych obecnych w powietrzu atmosferycznym w powiązaniu z ich mutagennością w teście *Salmonella*. Węglowodory zostały podzielone na cztery podgrupy: związki alifatyczne, cykloalkany, mono- i dwupierścieniowe areny oraz wielopierścieniowe areny. Następne klasy związków to związki zawierające tlen (podzielone na siedem podgrup), związki zawierające azot (podzielone na osiem grup), związki zawierające siarkę, związki zawierające halogen i związki organometaliczne. Liczba udokumentowanych związków wykazujących właściwości mutagenne w poszczególnych klasach jest bardzo różna. Wśród węglowodorów z 89% związków poddanych testom bakteryjnym na mutagenność w 47,7% przypadków otrzymano wyniki pozytywne. Wśród nich są powstające w procesach spalania i przemysłowego wykorzystania węgla i ropy naftowej, znane z karcenogenności takie WWA, jak: benzo[a]antracen, benzo[k]fluoranten, benzo[a]piren, benzo[b]fluoranten, indeno[1,2,3-c,d]piren i dibenzo[a,h]antracen. Frakcje alifatycznych węglowodorów nie wykazują działania mutagennego. Z tej grupy wykazano mutagenność tylko jednego związku obecnego w powietrzu atmosferycznym. Tym związkiem jest 1,3-butadien. Nie stwierdzono także działania mutagennego w przypadku

większości cykloalkanów i mono- i bicyklicznych arenów. WWA dodatkowo na skutek reakcji kondensacji, działania promieniowania słonecznego, ozonu i NO_3 tworzą związki nitrowe. Wiele z tych nitrowych pochodnych wykazuje działanie mutagenne. Takie związki jak 1-nitropiren, 3-nitrofluoranten, 2,4-dinitrotoluen czy 2,6- dinitrotoluen odznaczają się silnymi właściwościami mutagennymi. Za najbardziej mutagenny uważany jest obecnie 3-nitro-7H-benzo[d,e]antracen-7-on, powstający w trakcie spalania paliw płynnych w silnikach spalinowych oraz w wyniku reakcji nitrowania zachodzących w atmosferze. Bardzo reaktywne są również alifatyczne pochodne nitrowe znajdujące się głównie w fazie gazowej. Wśród związków zawierających tlen jedynie 16% znajdujących się w bazie TRI ma działanie mutagenne, przy czym większość z nich należy do grupy związków heterocyklicznych, w których jeden lub dwa atomy tlenu zastępują atomy węgla w pierścieniu. W przypadku związków zawierających siarkę dane o działaniu mutagennym znaleziono dla 18% z nich. W klasie związków zawierających halogen 40% z nich zostało poddane testom na mutagenność w testach bakteryjnych, z czego otrzymano 54% wyników pozytywnych. Jednak krótkotermiновый test *Salmonella* nie jest w stanie wykryć wszystkich związków działających mutagenie w obrębie tej klasy.

Większość badań pokazuje, że za efekt mutagenny pyłów zawieszonych przede wszystkim odpowiadają umiarkowane polarne i wysokopolarne klasy związków. Bardziej polarne frakcje zazwyczaj zawierają nitrowe i tlenowe pochodne WWA niż WWA nie podstawione [150, 151, 174]. Związki mutagenne mogą również powstawać w atmosferze także wtedy gdy obecne są tam substancje nie wykazujące takiego działania. Atmosferyczne reakcje chemiczne powodują powstawanie produktów mutagennych, niezależnie od tego, czy zaczynają się od pojedynczego, nie mutagennego związku organicznego (np. toluenu), czy od źródła emisji (np. spaliny silnikowe) [29, 37, 42, 62, 141, 164, 179].

3.3. Zanieczyszczenia powietrza a skutki zdrowotne

Już w roku 1661 Evelyn i Graunt opisali negatywne skutki zanieczyszczenia powietrza. W 1775 roku Pott zaobserwował przypadki raka moszny u londyńskich kominarzy, co powiązał z ich ekspozycją na sadzę i smołę ze spalanego węgla bitumicznego. Następnie w roku 1942 Leiter i współpracownicy stwierdzili, że próbki cząstek powietrza zebrane na obszarach miejskich są rakotwórcze dla myszy [154]. W ciągu następnych lat potwierdzono ten fakt dla próbek pochodzących z wielu miast na świecie [137, 147, 208, 214]. Porównawcza analiza ryzyka przypisuje zwiększone jego wartości mieszkańcom narażonym na działanie substancji emitowanych do otaczającego powietrza będących rezultatem spalania [37, 49, 82]. Badania prowadzone w Kopenhadze nad rozkładem wielkości cząstek pyłu zawieszonego w miejscach na-

silonego ruchu samochodowego pokazały iż stosunek PM_{2,5} do PM₁₀ wynosił jak 13:32%. Inne badania, prowadzone we Włoszech, Holandii, Chorwacji i w Tajlandii, donoszą o zawartości PM_{2,5} powyżej 50%, którego źródłem jest rozwój motoryzacji i procesy spalania na cele grzewcze [44, 45]. W 1982 Walker [98] powiązał mutagenność, w badaniach krótkoterminowym testem *Salmonella*, cząsteczek organicznych przenoszonych przez powietrze ze wskaźnikiem śmiertelności z powodu raka płuc. Obserwacje te zostały poparte badaniami laboratoryjnymi na zwierzętach, które wykazały aktywność rakotwórczą pyłów zawieszonych w powietrzu [33, 120, 154, 215] oraz badaniami epidemiologicznymi, które potwierdziły związek między liczbą nowotworów płuc a wielkością efektu mutagennego ekstraktów pyłowych zanieczyszczeń powietrza [78, 124, 137, 201].

Badania prowadzone w ciągu ostatnich 10–20 lat potwierdziły, że zanieczyszczenia powietrza przyczyniają się do zwiększonej zachorowalności i śmiertelności ludzi. Niektóre skutki zdrowotne są związane z krótką ekspozycją na te zanieczyszczenia, a inne wiążą się z długotrwałym narażeniem na nie [22, 117]. Długotrwała ekspozycja na duże stężenia pyłowych zanieczyszczeń powietrza zwiększa ryzyko raka płuc, chorób układu oddechowego, arteriosklerozy, zmian neurobehavioralnych i chorób serca oraz układu krążenia, podczas gdy krótkotrwała ekspozycja może powodować nasilenie chorób układu oddechowego, takich jak: astma, bronchit oraz zaburzenia rytmu serca i reakcje alergiczne [39, 44]. Bardzo duże stężenia substancji gazowych są trujące dla ludzi i zwierząt oraz szkodliwe dla roślin [141]. Zanieczyszczenia powietrza są przyczyną 6% zgonów, co stanowi około 40 000 przypadków zgonów w świecie w skali roku. Połowę tych przypadków wiąże się z zanieczyszczeniem powietrza na skutek rozwoju motoryzacji. Ponadto, odnotowuje się rocznie, około 25 000 nowych przypadków chronicznego bronchitu u dorosłych oraz ponad 290 000 epizodów bronchitu u dzieci i 0,5 miliona ataków astmy. Średnio ryzyko śmierci może wzrosnąć w ciągu dnia o 1%, jeżeli stężenie frakcji pyłu PM₁₀ wzrośnie o 10 µg/m³ [117].

Istotny wpływ zanieczyszczenia powietrza na zdrowie człowieka zauważono w 1952 roku, podczas czarnego smogu, jaki wystąpił w Londynie. Warunki atmosferyczne jakie wtedy panowały, spowodowały bardzo duży wzrost stężenia zanieczyszczeń powietrza, przede wszystkim SO₂ i drobnego pyłu. Maksymalne wartości stężeń średniodobowych dla tych zanieczyszczeń osiągnęły wtedy nienotowany do tej pory poziom 5000 µg/m³. Zjawisko trwało wyjątkowo długo, bo aż dwa tygodnie, i spowodowało śmierć wielu mieszkańców oraz wzrost liczby zgonów o 4 tysiące w porównaniu do średniej z poprzednich lat [22, 98, 141]. Nie był to odosobniony przypadek, podobne epizody czarnego smogu wystąpiły w 1930 roku w Meuse Valley (Belgia), w Europie Wschodniej w 1989 roku na obszarze byłej NRD i w 1993 roku na obszarze północnej Bohemii w Czechach. W Europie Zachodniej odnotowywano także duże stężenia SO₂ i drobnego pyłu na skutek przemieszczania się zanieczyszczeń powietrza ze wschodu. Takie przypadki wystąpiły w 1980 roku oraz w 1985 roku w Niemczech i Holandii, gdzie odnotowano wzrost śmiertelności i zachorowalności na choroby układu oddechowego i układu krążenia [22, 141].

Od czasu czarnego smogu w Londynie dużo się zmieniło. Wprowadzono wiele unormowań legislacyjnych, jednak londyński smog stał się punktem wyjścia dla wielu krótko- i długoterminowych badań. Tworzone są bazy danych epidemiologicznych, na podstawie których próbuje się powiązać występujące w ciągu dnia przypadki śmierci lub przyjęć do szpitala ze średnimi dziennymi stężeniami takich zanieczyszczeń, jak pył zawieszony, O_3 , NO_2 , SO_2 i CO oraz wpływ na nie sezonu, temperatury i dnia tygodnia [141]. Badania epidemiologiczne na dużą skalę prowadzono w Europie i Stanach Zjednoczonych. W Europie, w ramach APHEA (*Air Pollution and Health: a European Approach*), prowadzono badania na podstawie wcześniej zebranych danych oraz danych zebranych w ciągu 5–9 lat w latach dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku. Badaniami objęto populację 43 milionów ludzi żyjących w 21 miastach. Wykazano, że dzienna śmiertelność wzrasta o 0,6%, gdy stężenie frakcji pyłu PM_{10} wzrośnie o $10 \mu g/m^3$. Z kolei liczba przyjęć do szpitala z powodu astmy i obturacyjnej choroby płuc ludzi powyżej 65 roku życia wzrastała o 1% na każde $10 \mu g/m^3$ PM_{10} , a z powodu chorób układu krążenia o 0,5% na $10 \mu g/m^3$ PM_{10} i o 1,1% na $10 \mu g/m^3$ czarnego smogu. Analiza danych zebranych wcześniej wykazała wzrost dziennej śmiertelności w sześciu miastach o 2,9% na każdy wzrost o $50 \mu g/m^3$ O_3 w ciągu jednej godziny. W USA (NMMAPS – *National Mortality, Morbidity and Air Pollution Studies*) badania objęły 20 dużych metropolii (50 milionów ludzi) w latach 1987–1994. Wyniki były bardzo zbliżone do europejskich, śmiertelność wzrastała o 0,5% na każdy wzrost stężenia frakcji pyłu PM_{10} o $10 \mu g/m^3$. Innym przykładem badań na dużą skalę były badania dotyczące dzieci z 28 regionów Europy. Przeprowadzone przez PEACE (*Pollution Effects on Asthmatic Children in Europe*) wykazały wpływ pyłu zawieszonego i dwutlenku azotu na zaburzenia funkcji płuc i ostre infekcje dróg oddechowych [22]. Istnieje także wiele doniesień literaturowych dotyczących wyników badań przeprowadzonych w mniejszej skali na ten temat [60, 127]. Wiadomo także, że długotrwałe narażenie na zanieczyszczone powietrze powoduje chroniczne skutki zdrowotne. Przede wszystkim zwiększa ryzyko rozwoju przewlekłego zapalenia oskrzeli i wcześniejszej śmierci z tego powodu. Długotrwałe narażenie na stosunkowo niewielkie stężenia PM w powietrzu atmosferycznym może skracać średnią długość życia o 2–3 lata. Wystarczające jest stężenie poniżej $100 \mu g/m^3$ wyrażone jako średnia dobową PM_{10} [141].

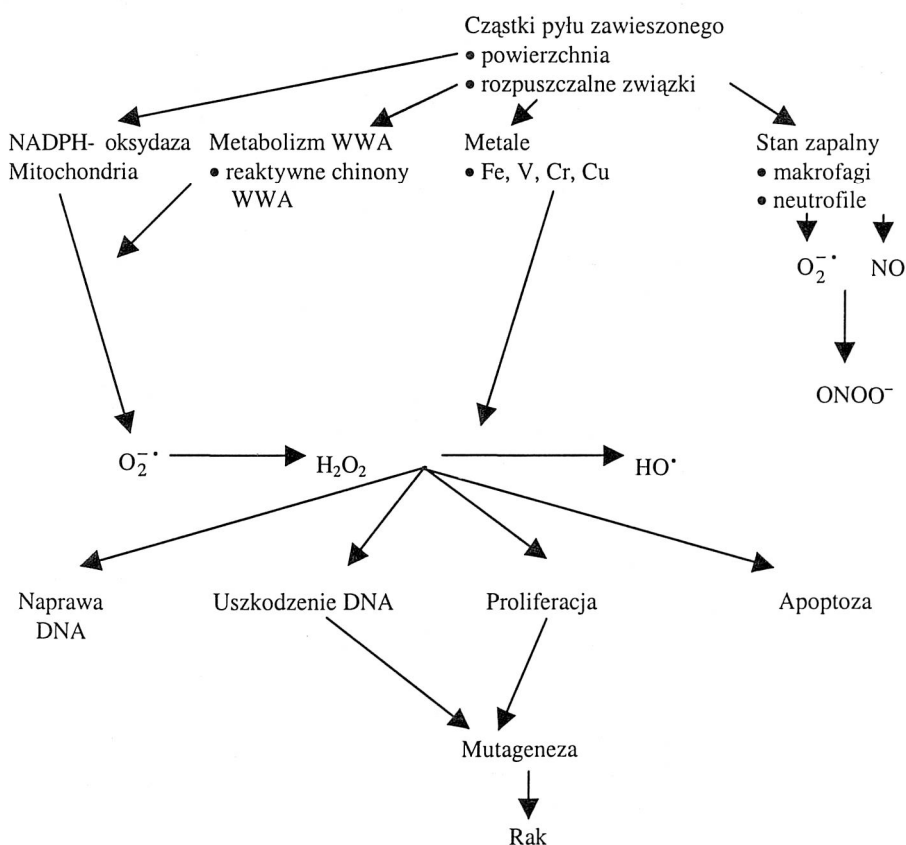
Badania prowadzone *in vitro* i *in vivo* nad mechanizmem wpływu pyłu zawieszonego na organizm żywy dowiodły, iż pył zawieszony indukuje stan zapalny i oksydacyjny stres (ang. *oxidative stress*) [171]. W pierwszym etapie mamy do czynienia z silnym efektem zapalnym, na skutek którego uaktywniane są szlaki utleniania w komórkach. Następnie pojawiają się w komórkach cytokiny i mediatory reakcji immunologicznych, w konsekwencji czego rozwija się stres oksydacyjny [22]. Stres oksydacyjny może być przyczyną wielu groźnych chorób. Polega na tym, że katalizowane są reakcje chemiczne, w wyniku których powstają aktywne formy tlenu (ROS) (rodniki tlenowe). Niszczą one to co spotkają na swojej drodze. Prowadzą do poważnych uszkodzeń białeczek, uszkodzenie DNA prowadzi m.in. do nowotworów,

a uszkodzenie białek do różnych chorób, włączając choroby centralnego układu nerwowego, czyli choroby neurodegeneracyjne. [187]. Inaczej jest to brak równowagi między prooksydantami a antyoksydantami. W przypadku pyłów zawieszonych oksydacyjny stres powoduje między innymi choroby układu oddechowego, układu krążenia, degenerację rogówki, zapalenie trzustki i raka. Oksydacyjny stres pojawić się może pod wpływem bardzo różnych mechanizmów, np. w trakcie oddychania mitochondrialnego, niedokrwienia, stanu zapalnego czy podczas metabolizowania obcych dla organizmu związków chemicznych (ksenobiotyków). W procesie tym prawie zawsze cząsteczki DNA są celem ataku powstających form aktywnych tlenu. Oksydacyjne uszkodzenie cząsteczek DNA zwiększa ryzyko chorób nowotworowych i może posłużyć jako marker pojawienia się oksydacyjnego stresu związanego z innymi dolegliwościami spowodowanymi zanieczyszczeniami powietrza [44, 171]. Te dolegliwości to nasilenie się chorób układu oddechowego i uszkodzenia funkcji komórek nabłonka układu oddechowego i pęcherzyków płucnych, które mogą zwiększyć ryzyko infekcji płuc. Może także uwydatnić się odpowiedź organizmu na alergen i inne substancje wywołujące astmę. Udowodniono, że ozon i spaliny emitowane przez silniki wysokoprężne zwiększają syntezę immunoglobuliny IgE u zwierząt i ludzi, która z kolei zwiększa wrażliwość organizmu na inne powszechne alergen [22, 79].

Tak więc produkcja ROS wydaje się odgrywać ważną rolę w efekcie cytotoksycznym wywołanym obecnością cząstek pyłu emitowanych przez silniki samochodowe (DEP) i inne procesy spalania. Powoduje powstawanie rodników wodorotlenowych, które zostały wykryte w badaniach kultur tkankowych oraz w komórkach płucnych myszy (rys. 1). Źródłem oksydacyjnego stresu wywołanego przez PM może być sama obecność cząstek pyłów w układzie oddechowym, mogą być zaadsorbowane na cząstkach rozpuszczalne związki organiczne czy metale (Fe, V, Cr, Cu) oraz zmiana w funkcjonowaniu mitochondriów lub NADPH – oksydazy, czy też aktywacja stanu zapalnego komórek zdolnego do produkcji ROS i reaktywnych tlenków azotu. Duża liczba podstawionych i niepodstawionych WWA i innych organicznych związków adsorbuje się na cząstkach pyłów zawieszonych. Wiadomo, że organiczna frakcja DEP i organiczna frakcja pyłów miejskich indukuje oksydacyjny stres. Cząstki zawierające benzo[a]piren są także zdolne do nie-oksydacyjnego działania genotoksycznego poprzez tworzenie adduktów DNA. W badaniach kultur tkankowych wykazano, że UFP powoduje powstawanie ROS w ilości proporcjonalnej do zawartości WWA. Organiczna frakcja pyłów miejskich zawiera reaktywne chinony, które poddawane są cyklicznym reakcją redox produkującym rodniki wodorotlenowe. Wiadomo także, że organiczne składniki DEP poddawane reakcją metabolicznym w płucach i w wątrobie powodują indukcję enzymów cytochromu P450, w wyniku czego następuje produkcja ROS i reaktywnych chinonów WWA. Z kolei w komórkach nabłonkowych układu oddechowego organiczne związki zaadsorbowane na cząstkach pyłów są odpowiedzialne za wywoływanie stanu zapalnego, który generuje wytwarzanie ROS. Tak powstające rodniki tlenowe aktywują procesy transkrypcji i powodują w ten sposób wydzielanie cytokin. Ozon, dwutlenek azotu

i lotne substancje organiczne (VOC) występują zwykle razem z PM i efekty ich działania w organizmie są podobne [171].

Nie wszystkie mechanizmy działania pyłu zawieszonego na organizmy żywe są jeszcze w pełni poznane. Badania prowadzi się najczęściej na zwierzęcych organizmach testowych i hodowlach kultur tkankowych. Brakuje także dokładnych badań nad zależnością pomiędzy dawką a odpowiedzią organizmu testowego. Prowadzone badania pozwoliły jednak na ustalenie ogólnego mechanizmu wyjaśniającego pojawianie się uszkodzeń DNA w komórkach. Przedstawia się on następująco: (1) cząsteczki związków chemicznych dostają się do jądra komórkowego, (2) zewnątrzkomórkowe ROS inicjują łańcuch reakcji, którego produkty dostają się do jądra i niszczą DNA [79, 171].



Rys. 1. Prawdopodobny mechanizm indukcji oksydacyjnego stresu i uszkodzenia cząsteczek DNA przez cząstki pyłu zawieszonego i ich rola w karcenogenezie [171]

Pomimo dużego postępu w dziedzinie obniżania stężeń zanieczyszczeń powietrza, wiele dużych aglomeracji miejskich w dalszym ciągu stoi wobec wyzwania, jakim jest nieodpowiednia jakość powietrza [49, 141, 193]. Ponadto, ochrona środowiska po-

szczególnych państw przed zanieczyszczeniami powietrza atmosferycznego musi być realizowana we współpracy z innymi krajami, substancje chemiczne bowiem mogą się przemieszczać na duże odległości od źródła ich powstania. Dane o stężeniach poszczególnych zanieczyszczeń powietrza zbierane są w Systemie Informacji o Zarządzaniu Powietrzem – AMIS (ang. *Air Management Information System*). System ten tworzony jest przez Światową Organizację Zdrowia – WHO (*World Health Organization*) na podstawie informacji dostarczanych przez państwa członkowskie. Zbierane są tam dane o średniorocznych, maksymalnych i średnio 24 h stężeniach takich zanieczyszczeń, jak: CO, SO₂, NO₂, O₃, pył zawieszony i Pb. Badania jakości powietrza w Polsce są prowadzone według Narodowego Systemu Badania Środowiska na poziomie sieci punktów pomiarowych państwowych, regionalnych i lokalnych. Istnieją dwie ogólnokrajowe sieci: ogólnokrajowa sieć stacji pomiarowych zarządzana przez Państwową Inspekcję Ochrony Środowiska (PIOŚ), nadzorowana przez Instytut Ochrony Środowiska oraz sieć podległa Państwowym Inspektoratom Pracy (PIP), nadzorowana przez Instytut Medycyny Pracy w Łodzi [98, 141, 177].

3.4. Biologiczne metody oceny aktywności mutagennej pyłowych zanieczyszczeń powietrza

Przed 1980 rokiem zagrożeniami związanymi z zanieczyszczeniem powietrza zajmowano się jedynie na podstawie monitoringu fizyczno-chemicznego. Podejście takie pozwalało tylko na określenie stężenia wybranych, znanych związków chemicznych występujących w powietrzu i umożliwiało przybliżoną ocenę zagrożenia zdrowotnego. W ten sposób nie można było bowiem określić wypadkowego działania złożonej mieszaniny zanieczyszczeń powietrza na organizm żywy. Najlepszym rozwiązaniem jest zastosowanie monitoringu biologicznego. Za pomocą monitoringu można wykazać działanie synergistyczne (łączny efekt działania mieszaniny jest większy od sumy działania jej składników), addytywne (łączny efekt działania mieszaniny jest równy sumie efektów działania poszczególnych składników) lub antagonistyczne (łączny efekt działania mieszaniny jest mniejszy od sumy działania poszczególnych składników) wieloskładnikowej mieszaniny związków chemicznych. Wśród metod biologicznych wyróżniamy: testy krótkoterminowe, długoterminowe badania prowadzone na zwierzętach eksperymentalnych i badania epidemiologiczne. Badania epidemiologiczne są najbliższe rzeczywistemu efektowi działania zanieczyszczeń. Za pomocą tych badań można ustalić, czy wśród ludzi narażonych na dany związek chemiczny stwierdza się większą zachorowalność i umieralność na nowotwory. Badania te są wiarygodne w przypadku obserwacji odpowiednio licznych populacji, narażonych na stosunkowo duże stężenia badanych związków w odniesieniu do populacji nienarażonych na badane zanieczyszczenia. Muszą też uwzględniać odpowiednio długi czas od

początku ekspozycji do pojawienia się nowotworu, który w pewnych przypadkach wynosi nawet 20–30 lat. W badaniach z udziałem zwierząt laboratoryjnych aktywność rakotwórcza określana jest przez zdolność wywoływania nowotworów przez badane związki w ciągu życia zwierząt laboratoryjnych. Badania te, bardzo przydatne, są jednak kosztowne i czasochłonne. Mogą trwać przez dwa, trzy lata i wymagają użycia kilkuset zwierząt doświadczalnych (myszy, szczury), przez co budzą kontrowersje natury etycznej. Wobec wprowadzania, przez człowieka, do środowiska naturalnego setek nowych substancji rocznie, jedynie mała część z nich może być przebadana na zwierzętach. Stąd też do wstępnej oceny genotoksyczności związków chemicznych stosuje się testy przesiewowe (krótkoterminowe), które nie wymagają wykorzystywania zwierząt doświadczalnych [87, 88, 111].

Podstawową rolę w wywoływaniu nowotworów u ludzi przez związki chemiczne odgrywają zaburzenia w strukturze i funkcjonowaniu DNA. Jest to proces wieloetapowy, trwający wiele lat, na który ma wpływ dużo czynników. Końcowy wynik działania związku rakotwórczego, powstanie nowotworu, obejmuje dwie sekwencje zdarzeń: konwersję nowotworową i rozwój nowotworu. W pierwszym etapie dochodzi do zaburzenia ekspresji cech komórki na skutek interakcji związku chemicznego lub jego reaktywnego metabolitu z materiałem genetycznym, a w drugim etapie komórka zmieniona nowotworowo ulega progersji pod wpływem działania czynników modyfikujących i proliferacji do formy nowotworu złośliwego. Związki rakotwórcze dzieli się na dwie główne grupy: genotoksyczne i epigenetyczne. Związki genotoksyczne mają zdolność do wiązania się z DNA komórki, naruszania jego struktury i funkcji lub systemów jego naprawy. Powodują różnego typu uszkodzenia materiału genetycznego komórek w postaci mutacji genowych, chromosomowych i genomowych. Mają one charakter mutacji indukowanych, w odróżnieniu od naturalnych mutacji spontanicznych. Uszkodzenia te, jeśli nie zostaną naprawione, mogą prowadzić do rozwoju chorób nowotworowych. Natomiast związki epigenetyczne, których działanie związane jest z drugą fazą procesu nowotworowego, nie łączą się z materiałem genetycznym, a podstawą ich rakotwórczego działania są takie procesy jak: cytotoksyczność, chroniczne uszkodzanie tkanek, zaburzenia hormonalne, immunologiczne czy aktywność promocyjna [187]. Wszystkie związki chemiczne, które powodują uszkodzenia DNA, prowadzące do mutacji czy rozwoju nowotworów, określane są jako genotoksyczne. Genotoksyczność utożsamiana ze szkodliwym działaniem na materiał genetyczny niekoniecznie musi być związana z działaniem mutagennym. Może prowadzić do uszkodzeń DNA przy braku bezpośrednich dowodów na powstanie mutacji. Z kolei mutagenność oznacza wywoływanie trwałych i dziedzicznych zmian w ilości lub budowie materiału genetycznego komórki [88].

Prawie wszystkie testy krótkoterminowe oparte są na wykrywaniu mutacji genowych, uszkodzeń chromosomów, czy uszkodzeń lub zaburzeń naprawy DNA, a także powstawania adduktów (trwałych wiązań substancji chemicznych lub ich metabolitów z DNA). Znanych jest kilkadziesiąt testów pozwalających praktycznie na wykrycie wszystkich typów uszkodzeń materiału genetycznego [41, 88, 177]. Za pomocą testów

krótkoterminowych można przeprowadzić badania w krótkim czasie i szybko oszacować wyniki. Testy te prowadzi się w układach *in vitro* (hodowle komórek roślinnych, zwierzęcych i ludzkich, czy też makromolekuł, takich jak białko czy DNA) oraz w układach *in vivo*, za pomocą organizmów o różnej złożoności biologicznej: od bakterii po rośliny wyższe i zwierzęta. Jest to możliwe dzięki uniwersalności DNA jako materiału genetycznego. Dlatego stwierdzenie genotoksycznego działania związku chemicznego w stosunku do jednego gatunku może sugerować podobny efekt w stosunku do innych gatunków [177]. Wiadomo, że istnieje duża korelacja między aktywnością genotoksyczną związków chemicznych w testach krótkoterminowych a ich potencjalną aktywnością rakotwórczą w odniesieniu do ssaków [141]. Żadna metoda nie jest jednak idealnym systemem badawczym. Krótkoterminowe testy nie zastępują badań długoterminowych na zwierzętach doświadczalnych i analiz epidemiologicznych. Powinny one służyć do wstępnej selekcji związków chemicznych do dalszych badań. Istnieją także związki chemiczne, które nie mogą zostać wykryte testami na mutagenność, mechanizm bowiem ich działania jest inny niż związków mutagennych. Należy o tym pamiętać w ocenie wyników testów krótkoterminowych. Zestawy testów przeznaczonych do oceny potencjalnej mutagenności i rakotwórczości substancji chemicznych powinny uwzględniać badanie możliwie największej liczby końcowych efektów genetycznych. Tylko wyniki uzyskane w doświadczeniach wielotestowych pozwalają na dokładną identyfikację większości związków o działaniu mutagennym i kancerogennym [41]. Minimalne zestawy testów krótkoterminowych muszą być złożone z testu na mutacje, np. w bakteriach oraz testu na uszkodzenia materiału genetycznego w komórkach somatycznych ssaków. Podstawowy zestaw testów polecany przez Organizację Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (OECD – *Organization for Economic Cooperation and Development*) składa się z pięciu testów, których wiarygodność została potwierdzona doświadczalnie. W zestawie takim powinien znaleźć się test bakteryjny (np. *Salmonella*) oraz test do oceny indukcji strukturalnych aberracji chromosomowych (np. test mikrojądrowy na komórkach szpiku kostnego czy test analizy chromosomów w hodowlach komórek ssaków) [177].

3.4.1. Testy z użyciem bakterii

Bakterie okazały się najbardziej odpowiednie do oceny mutagennego działania związków chemicznych i próbek środowiskowych. Bakterie charakteryzują się niskim poziomem mutacji spontanicznych; ulegają częstym podziałom, przez co mogą w ciągu kilku godzin namnożyć się w dużej ilości; mają prostą budowę; pojedynczą kolistą cząsteczkę DNA, która jest łatwo dostępna dla związków chemicznych. Procesy biochemiczne i genetyczne bakterii są bardzo dobrze poznane, przez co możliwe jest wyhodowanie lub skonstruowanie, na drodze inżynierii genetycznej, odpowiednio wrażliwych na badane mutageny szczepów testowych. Bakterie nie mają jednak enzymów zdolnych do aktywacji metabolicznej związków chemicznych, cha-

rakterystycznej dla organizmów ssaków. W celu stworzenia warunków zbliżonych do tych, jakie istnieją w tych organizmach, do testów dodaje się najczęściej frakcję S9 zawierającą enzymy mikrosomalne wyizolowane z wątroby szczura indukowanego mieszaniną węglowodorów aromatycznych. Wątroba jest podstawowym organem uczestniczącym w aktywacji i detoksykacji związków chemicznych. Związki chemiczne ulegają w organizmie różnym przemianom, w wyniku których tworzy się kilka, a nawet kilkanaście metabolitów. Przemiany te mogą prowadzić zarówno do detoksykacji, czyli do pozbawienia właściwości toksycznych, jak i do aktywacji, w wyniku której dochodzi do powstania aktywnych metabolitów mogących reagować z materiałem genetycznym, powodując mutacje. Działanie nowotworowe promutagenów jest więc wypadkową procesów aktywacji i detoksykacji, jakim ulegają one w organizmie [41, 55, 68, 80, 97, 162, 163, 177, 187, 195, 217]. Tak więc wszystkie testy bakteryjne składają się z dwóch elementów: docelowej komórki bakteryjnej oraz układu metabolizującego [41].

Odnoszenie wyników badań z modeli bakteryjnych na ludzi jest dużym uproszczeniem, jednak istnieje na ogół duża korelacja między kancerogennością stwierdzoną w bezpośrednich badaniach na zwierzętach a mutagennością wykazywaną przez testy bakteryjne [88, 95, 135, 183].

3.4.1.1. Test *Salmonella* (Amesa)

W badaniach nad oceną mutagenności zanieczyszczeń środowiskowych najszerze zastosowanie znalazł bakteryjny test *Salmonella* (test Ames), opracowany w latach 70. XX wieku przez amerykańskiego profesora Bruca Ames. Test Ames opiera się na sprawdzeniu, czy badany materiał powoduje mutację powrotną (rewersję) specjalnych histydynozależnych (his^-) szczepów bakterii *Salmonella typhimurium* LT2. Test ten jest szybką, ekonomiczną i dającą wiarygodne wyniki metodą *in vitro* stosowaną do wykrywania właściwości mutagennych za pomocą dobrze scharakteryzowanych genetycznie bakteryjnych organizmów testowych. Prognozowanie potencjalnie rakotwórczych substancji chemicznych w teście *Salmonella* jest określone na ok. 90% [74, 87, 88, 142, 143].

Bakterie *Salmonella typhimurium*, w naturze, wywołują choroby zakaźne u zwierząt i zatrucia pokarmowe u człowieka. Szczepy używane w teście są zmutowane w kilku miejscach genomu, przez co:

- mają mniejszą zjadliwość, czyli zdolność do wywoływania chorób,
- mają uszkodzoną ścianę komórkową, co czyni ją bardziej przepuszczalną dla dużych cząsteczek,
- mają ograniczoną zdolność do naprawy uszkodzeń w DNA, co znacznie zwiększa ich czułość na działanie mutagenne,
- są mutantami pokarmowymi wymagającymi do wzrostu obecności histydyny i biotyny,

- szczepy te pozwalają dokładnie określić zmiany indukowane w DNA w wyniku działania badanego związku chemicznego [87, 88].

Wprowadzenie mutacji do operonu histydyny szczepu wyjściowego LT2 pozbawiło szczepy testowe zdolności do syntezy tego aminokwasu. Są one więc histydynozależnymi (*his⁻*) auktotrofami. Do swojego wzrostu potrzebują obecności w podłożu hodowlanym histydyny i biotyny. Pod wpływem obecności czynnika mutagennego mogą jednak ulec mutacji powrotnej (rewersji), która przywróci im zdolność do syntezy tego aminokwasu. Wzrost szczepów testowych w obecności badanej próbki, na podłożu bez histydyny, świadczy więc o obecności w niej związków o charakterze mutagennym. Szczepy testowe różnią się typem mutacji w operonie histydynowym, dzięki temu możemy stwierdzić, jakiego typu zmiany w DNA powoduje badana próbka. Spośród wielu szczepów testowych najczęściej używane są *Salmonella typhimurium*: TA97, TA98, TA100, TA102, TA104, TA1535 i TA1538. Szczepy TA98 i TA1538 mają mutację *hisD3052*, szczep TA1537 *hisC3076*, a szczep TA97 *hisD6610*. Mutacje te związane są ze zmianą ramki odczytu (ang. *frameshifts*). Za ich pomocą można wykryć mutageny powodujące wypadnięcie pary zasad (delecja) lub wstawienie pary zasad (insercja). Takie zmiany w DNA zmieniają fazę odczytu podczas translacji i w efekcie mogą wywołać zmiany w syntetyzowanych białkach. Mutacja *hisD3052* umożliwia na przykład wykrycie takich mutagenów, jak 2-nitrofluoren i różnych aromatycznych nitrozowych i aminowych pochodnych. Z kolei szczepy TA100 i TA1535 (*hisG46*) wykrywają substancje mutagenne powodujące zamianę jednej pary zasad na inną (ang. *base-pair substitution*). W pozostałych dwóch szczepach, TA102 i TA104, wprowadzono mutację *hisG428* (mutacja ochre), wykrywającą mutacje typu tranzycji i transwersji. Mutacja ta została wprowadzona do genomu szczepu TA104, natomiast do szczepu TA102 została wprowadzona na plazmidzie pAQ1. Szczepy te są bardziej wrażliwe na działanie związków utleniających. Dodatkowo szczep TA102 pozwala wykryć związki wprowadzające wiązania krzyżowe w DNA. Szczepy *Salmonella typhimurium*, oprócz mutacji w genach operonu histydynowego, mają dodatkowe mutacje zwiększające ich wrażliwość. Większą wrażliwość testu otrzymano po wprowadzeniu do genomu bakterii *rfa* mutacji powodującej zwiększenie przepuszczalności ściany komórkowej dla związków chemicznych o dużych cząsteczkach, np. benzo[a]pirenu. Z kolei delecja *uvrB*, u szczepów TA97, TA98 i TA100, powoduje zmniejszenie zdolności naprawy uszkodzeń DNA poprzez wycinanie uszkodzonych fragmentów i wstawianie prawidłowych (system reperacji, który działa bezbłędnie). Pozwalają więc na stwierdzenie indukcji uszkodzeń usuwanych przez system naprawy przez wycinanie. Z przyczyn technicznych, oprócz genu B, wycięto także gen kodujący syntezę biotyny. Szczepy testowe mają także uwydatniony system dopełniający błędy (tzw. system SOS) oraz są odporne na ampicylinę. Cechy te osiągnięto po wprowadzeniu do komórek bakterii plazmidy pKM101 (czynnik R) [24, 41, 88, 131, 142, 143].

Testowe szczepy bakterii powinny być regularnie sprawdzane czy zachowują swoje charakterystyczne cechy genetyczne: wymagania, jeżeli chodzi o aminokwasy, stopień spontanicznej reversji (kontrola negatywna), wrażliwość na mutageny diagno-

styczne (kontrola pozytywna), obecność plazmidów, obecność błony komórkowej i mutacji dotyczącej reperacji DNA [88].

Na bazie szczepów macierzystych, metodami inżynierii genetycznej, konstruuje się wiele ich pochodnych, w celu bardziej selektywnego wykrywania określonych grup chemicznych związków mutagennych. Do komórek bakterii najczęściej wprowadza się dodatkowe geny za pomocą plazmidów. W ten sposób do badań wprowadzono szczepy będące pochodnymi szczepu TA98-YG1021, YG1024 i YG1041 oraz szczepy wywodzące się z TA100-YG1026, YG1029 i YG1042. Do szczepów tych wprowadzono plazmidy niosące zwielokrotnione kopie enzymów biorących udział w metabolizmie nitroarenów i amin aromatycznych. Do szczepów YG1021 i YG1026 wprowadzono plazmidy pYG216 związane z nadprodukcją nitroreduktazy. Mają więc one zwiększoną wrażliwość na nitrowe pochodne WWA, zanieczyszczenia powstające w procesach niepełnego spalania paliw. Istnieją jeszcze szczepy pozbawione nitroreduktazy, np. TA98NR, które są nieczułe na nitroareny. Szczepy YG1024 i YG1029 mają plazmidy pYG219 z genem na O-acetylotransferazę. Enzym ten ma zdolność aktywacji aminowych pochodnych WWA i nitroarenów. Odmianną jest szczep TA98/1,8-DNP₆, pozbawiony aktywności O-acetylotransferazowej, przez co niewrażliwy na nitrowe i aminowe pochodne WWA. Z kolei do szczepów YG1041 i YG1042 wprowadzono plazmidy pYG233 związane zarówno z nadprodukcją nitroreduktazy i O-acetylotransferazy [65, 142, 143, 195, 204–207]. Na bazie szczepu testowego TA100 powstał także zbiór sześciu szczepów TA7001-TA7006 (TA700x – Amess II Assay), przydatnych w badaniach nitrowe WWA, udoskonalonych pod kątem wykrywania mutagenów powodujących zamianę jednej pary zasad na inną [52, 143].

Większość tych szczepów stosuje się w badaniach dotyczących działania mutagennego zanieczyszczeń pyłowych powietrza atmosferycznego, mają bowiem one zwiększoną wrażliwość na związki chemiczne obecne w tym środowisku [1, 21, 23, 111, 180]. Badania przeprowadzone przez wielu badaczy testem *Salmonella* wskazują na zgodność jego wyników z innymi testami, na dużą korelację pomiędzy stężeniami związków z grupy WWA w powietrzu a efektem mutagennym w tym teście oraz na zależność między wynikami testu a zachorowalnością i śmiertelnością szczurów z powodu nowotworów płuc [22, 24, 59, 60, 73, 133, 194, 196].

W badaniach próbek powietrza, rzadko, wykorzystuje się też szczep *Salmonella typhimurium* TM677 niezdolny do wzrostu w obecności 8-azaguaniny (8-AG). Pod wpływem związków o działaniu mutagennym dochodzi w nim do mutacji postępowej w genie transferazy fosforybozylo-ksantynoguaninowej. Wtedy szczep staje się odporny na działanie 8-AG i może rosnąć w obecności tego związku. Szczep ten stosuje się do wykrywania obecności mutagenów działających utleniająco i nitro- pochodnych [24, 69, 192].

Według wytycznych OECD (1997) wyniki testu *Salmonella* uważa się za pozytywne, jeżeli występuje zależny od stężenia w badanym zakresie lub powtarzalny w jednej lub kilku badanych dawkach wzrost liczby kolonii rewertantów na płytkę

[88, 141]. W analizie wyników uzyskanych testem Amesa określa się więc liniową zależność dawka–odpowiedź, a określone testem działanie mutagenne może być przedstawione jako: MR – współczynnik mutagenności, AM – aktywność mutagenna lub M – mutagenność [88, 167, 199].

- *Współczynnik mutagenności MR* , określaný jest jako stosunek średniej liczby rewertantów szczepu testowego *Salmonella typhimurium* indukowanych przez czynniki mutagenne zawarte w dawce (di) do średniej liczby rewertantów spontanicznych. W analizie uzyskanych wyników za pozytywny dla danej próbki uznaje się każdy przypadek pojawienia się co najmniej dwukrotnie większej od spontanicznej rewersji indukowanej do prototrofii mutagenów żywieniowych *Salmonella typhimurium*, tzn. gdy współczynnik mutagenności MR jest większy bądź równy 2 [88, 200].

- *Aktywność mutagenna AM* , tzw. względny współczynnik aktywności mutagennej oznacza aktywność mutagenną indukowaną przez określoną zależną od rodzaju próbki objętość, dla powietrza jest to 1 m^3 . AM/m^3 jest to iloraz różnicy liczby rewertantów w 1 m^3 badanej próbki powietrza i liczby rewertantów w kontroli negatywnej do liczby rewertantów w kontroli negatywnej. Próba jest mutagenna, jeśli $AM \geq 2$, niemutagenna, gdy $AM \leq 2$ i słabo mutagenna, jeśli AM znajduje się w przedziale między wartością 1 a 2 [141].

- *Mutagenność M* , liczba rewertantów indukowana przez 1 m^3 badanej próbki powietrza [141, 200].

W wielu opublikowanych pracach, opisujących wyniki testu Amesa, autorzy na podstawie statystycznych analiz wykorzystują modele matematyczne do aproksymacji krzywej zależności dawka–odpowiedź [14, 19, 39, 40, 113, 130]. Przed przystąpieniem do analizy wyników, czyli jeszcze na etapie badań, ocenia się, czy uzyskane dane układają się w postaci charakterystycznej krzywej zależności dawka–odpowiedź, która ma następujący przebieg:

- małe dawki badanej próbki (małe stężenie próbki) – krzywa dawka–odpowiedź rośnie liniowo, wraz ze wzrostem dawki (większe stężenie badanej próbki) zwiększa się mutagenność;

- duże dawki (stężenia) – w pewnym momencie wraz ze wzrostem dawki (stężenia) następuje załamanie krzywej i od tego momentu maleje ona wraz ze wzrostem dawki (stężenia) – konsekwencja wpływu toksycznego badanej próbki (efekt toksyczny) [131].

Określając liczbę rewertantów w 1 m^3 (M), należy określić czy do analizy będą brane wszystkie punkty tworzące krzywą zależności dawka–odpowiedź, czy też tylko początkowa część tej krzywej – odcinek prostoliniowy. Według większości autorów do analizy wyników uzyskanych testem Amesa należy brać wszystkie punkty tworzące krzywą. Tylko nieliczni autorzy biorą pod uwagę początkową liniową część krzywej i ograniczają analizę statystyczną wyłącznie do małych dawek (małych stężeń) badanej próbki [14, 130]. Ocenę dopasowania otrzymanych wyników do założonego modelu liniowej zależności dawka–odpowiedź można przeprowadzić metodą najmniejszych kwadratów, wykorzystując analizę regresji oraz analizę wariancji lub me-

tość maksymalnego prawdopodobieństwa zaproponowaną przez Bernstein i in. [14, 131, 141], z założonym ryzykiem błędu p równym lub poniżej 0,05. Na podstawie parametru równania oblicza się liczbę rewertantów indukowanych przez 1 m³ badanej próbki powietrza.

Wyniki testu powinno przedstawiać się w postaci współczynnika mutagenności MR (jest to prostszy i bardziej czytelny sposób) lub jako aktywność mutagenna AM i dodatkowo jako mutagenność M . Podanie wyników jedynie w postaci liczby rewertantów w 1 m³ nie informuje czy w badanej próbce znajdują się związki, które wykazują charakter mutageny, jak również nie wiadomo, jakie stężenie tej próbki (dawka) wykazuje takie właściwości, a o tym właśnie informują wskaźniki MR lub AM . W przedstawieniu wyników testu Amesa należy pamiętać również o podaniu średniej wartości rewersji spontanicznej danego szczepu *Salmonella typhimurium* oraz o średniej liczbie rewertantów uzyskanych po zastosowaniu odpowiednich mutagenów diagnostycznych charakterystycznych dla danego szczepu testowego [200].

3.4.1.2. Inne testy z wykorzystaniem bakterii

1. SOS-chromotest i test Umu. Zasada testu opiera się na uruchomieniu procesu naprawy DNA, zwanego systemem SOS, w komórkach bakterii *Escherichia coli* K12 PQ37. Jego uruchomienie wskazuje na uszkodzenie DNA. Następuje to w momencie pojawienia się sygnału indukującego odpowiedź SOS. W tym momencie określony rodzaj uszkodzenia w DNA utrudnia lub zatrzymuje jego replikację. W szczepach testowych gen operatora systemu SOS połączono z genem strukturalnym enzymu β -galaktozydazy. W teście mierzy się ekspresję genów systemu SOS w kontakcie z badaną próbką. Miarą ich działania jest aktywność β -galaktozydazy. Dodatkowo szczep testowy pozbawiony jest systemu naprawy uszkodzeń przez wycinanie (*uvrA*) oraz ma mutację *rfa*, związaną z uszkodzeniem ściany komórkowej.

Odmianą SOS-chromotestu jest test Umu. W teście tym wykorzystuje się szczep *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002. Zasada jest podobna do SOS-chromotestu. Czynniki mutagenne włączają gen Umu. Gen ten jest częścią systemu SOS. Aktywność β -galaktozydazy, enzymu niezwiązanego z systemem SOS, decyduje o obecności w badanej próbce czynników genotoksycznych.

Stwierdzono dużą korelację między wynikami otrzymanymi w badaniach SOS-chromotestem a wynikami otrzymanymi w teście *Salmonella* [24, 41, 93, 153, 177].

2. Test MUTATOXTM. Alternatywny w stosunku do testu Ames, należący do grupy mikrobiotestów, MutatoxTM (Microbics Corp., Carlsbad, CA, USA) [139] znalazł zastosowanie przede wszystkim w badaniach dotyczących stopnia zanieczyszczenia wód, osadów dennych i gleb [94]. Niewiele jest doniesień literaturowych dotyczących jego zastosowania w badaniach genotoksyczności pyłowych zanieczyszczeń powietrza [72, 85, 89].

W teście tym używane są mutanty morskich bakterii luminescencyjnych *Vibrio fischeri*, które w trakcie swoich normalnych procesów metabolicznych emitują światło w zakresie widzialnym (zjawisko bioluminescencji). Szczepy testowe w wyniku mu-

tacji zostały pozbawione możliwości emisji światła na skutek represji operonu luminescencyjnego (genów *lux*). Pod wpływem czynnika mutagennego, jaki może się znajdować w badanej próbce środowiskowej, bakterie te mogą ulec mutacji powrotnej, która przywróci im pierwotną zdolność do emisji światła [139].

3.4.2. Metody cytogenetyczne

Za pomocą testów cytogenetycznych wykrywa się uszkodzenia DNA wywoływane działaniem większości mutagenów i kancerogenów prowadzące w efekcie końcowym do różnego rodzaju anomalii chromosomowych [41].

3.4.2.1. Test na wykrywanie adduktów w DNA

Test ten pozwala na wykrycie i ilościowe oznaczenie adduktów, czyli trwałych wiązań badanych zanieczyszczeń lub ich metabolitów z DNA lub białkami (*in vivo* i *in vitro*). Większość genotoksycznych związków chemicznych ma naturę elektrofilową lub ulega transformacji w organizmie do elektrofilowych metabolitów. Związki takie wiążą się kowalencyjnie do zasad w DNA i jeżeli nie zostaną usunięte w wyniku działania mechanizmów naprawczych komórki, mogą spowodować powstanie punktowych mutacji genowych, które mogą być inicjatorami przekształcenia normalnych komórek somatycznych w komórki nowotworowe. U eksponowanych na zanieczyszczenia osób i zwierząt addukty DNA mogą być wykrywane w tkankach i komórkach krwi oraz w produktach degradacji wydalanych w moczu. Oznaczenia powstałych adduktów przeprowadza się metodami immunologicznymi (testy ELISA, RIA, USERIA; opierające się na współzawodnictwie o miejsce wiążące między kontrolnym adduktem a adduktem pochodzącym z badanej próbki materiału biologicznego), radioizotopowymi (metoda znakowania ^{32}P w pozycji 5',3'-nukleotydów uzyskanych po enzymatycznej hydrolizie badanego DNA), fizykochemicznymi (testy fluorescencyjne lub HPLC, najpierw przeprowadza się hydrolizę kwaśną lub enzymatyczną zmodyfikowanego DNA, a następnie rozdziela produkty za pomocą HPLC i wykrywa, wykorzystując UV lub fluorescencję adduktów) [41, 177]. *In vitro* przeprowadza się inkubację DNA (np. z grasicy cielęcej) z ekstraktem zanieczyszczeń powietrza w warunkach tlenowych w obecności lub w nieobecności frakcji S9 oraz w warunkach beztlenowych, w atmosferze azotu, w obecności systemu redukcyjnego zależnego od oksydazy ksantynowej [26].

Badania pyłowych zanieczyszczeń powietrza przeprowadzane tym testem wykazały powstawanie większej liczby adduktów DNA w okresie zimowym na terenach aglomeracji miejskich w porównaniu do okresu letniego na terenach nieuprzemysłowionych [10, 15, 45, 77]. Zaobserwowano tworzenie się adduktów z wieloma związkami występującymi w powietrzu atmosferycznym i ich metabolitami, takimi jak: 9-hydroksybenzo[a]piren, benzo[a]piren-r-7,t-8dihydrodiol-t-9,10-epoksyd($\pm$), benzo(b,j,k)fluoranten, chryzen, benz[a]antracen, indeno[c,d]piren, 1-nitropiren, 9-nitroantracen i 3-nitrofluoranten [24].

Badania przeprowadzone na Górnym Śląsku wykazały także, iż liczba aromatycznych adduktów wykrytych w komórkach krwi, u ludzi tam mieszkających, korelowała z wynikami takich testów, jak: test na aberracje chromosomowe czy test wymiany chromatyd siostrzanych [17]. Badania wykazały przydatność oznaczania obecności adduktów DNA jako biomarkerów procesów kancerogenezy [177, 212].

3.4.2.2. Test na wykrywanie aberracji chromosomowych (CA)

Test polega na wykrywaniu aberracji chromosomowych (złamania, translokacje, delecje, powstawanie fragmentów acentrycznych, chromosomów policentrycznych), które prowadzą do powstania przerw w podwójnych niciach DNA. Brak ciągłości DNA może zostać utrwalony. Dochodzi wtedy do wystąpienia złamań chromosomów w metafazie, może dochodzić także do interakcji złamanych zakończeń i powstawania zmienionych konfiguracji, przejawiających się zmianą ułożenia genów w chromosomach. Test polega na ocenie komórek w stadium metafazy. W tym stadium podziału DNA występuje w postaci skondensowanej, dając w mikroskopie świetlnym wyraźny obraz chromosomów ułożonych w płaszczyźnie równikowej wrzeciona podziałowego. Do wykonania testu stosuje się ludzkie limfocyty krwi obwodowej, fibroblasty płuc chomika czy komórki jajowe chomika chińskiego. Związki genotoksyczne powodują aberracje tylko wtedy, gdy w komórce następuje replikacja DNA. Testowe komórki ekspozuje się więc na badane próbki przez okres 1 lub 2 cykli komórkowych, następnie barwi i obserwuje w mikroskopie świetlnym. Aberracje klasyfikuje się na chromatydowe, gdy obejmują jedną chromatydę lub na chromosomowe, gdy obejmują obie chromatydy [24, 41, 88, 177]. Test na aberracje nie jest często stosowany w badaniach mutagenności powietrza [11, 17, 24, 63, 64, 146].

3.4.2.3. Test na wykrywanie wymiany chromatyd siostrzanych (SCE)

W teście obserwuje się wzajemne, symetryczne wymiany fragmentów pomiędzy identycznymi sekwencjami DNA obu chromatyd w chromosomie. Wymiana siostrzanych chromatyd zachodzi w miejscach replikacji DNA i może być indukowana przez związki mutagenne wiążące się kowalencyjnie z DNA i zaburzające proces replikacji. Wzrost częstości wymiany chromatyd siostrzanych jest wskaźnikiem genotoksyczności badanych substancji. Dodanie do hodowli bromodezoksyurydyny (BrdU), która wbudowuje się zamiast tymidyny do nowo syntetyzowanej nici DNA i przeprowadzenie odpowiedniego barwienia umożliwia obserwowanie SCE pod mikroskopem. Najczęściej stosuje się dwa modele SCE: *in vitro* w limfocytach ludzkich i *in vivo* w komórkach szpiku kostnego myszy [24, 88, 177]. W badaniach zanieczyszczeń powietrza najczęściej wykorzystuje się linie komórkowe pochodzące z różnych części układu oddechowego ssaków i człowieka (komórki nabłonka tchawicy lub oskrzeli), świeże limfocyty krwi obwodowej, rzadziej wykorzystuje komórki jajowe chomika chińskiego czy rośliny [24]. Wielu badaczy dokonuje oceny czynników genotoksycznych występujących w powietrzu atmosferycznym testem SCE, porównując otrzymane wyniki

z testem CA, testem mikrojądrowym i testem *Salmonella*. Test wymiany chromatyd siostrzanych jest rekomendowany do zestawu biotestów badających efekty genotoksyczne pyłów zawieszonych [11, 17, 47, 64, 93, 114, 140, 184, 185, 186]. Tego typu badania prowadzono w kilku miastach śląskich, stosując linie komórek płucnych V79 chomika. Pod wpływem badanych zanieczyszczeń wzrastała liczba indukowanych wymian chromatyd siostrzanych, a ich wzrost zależał od stężenia ekstraktów. Stwierdzono najsilniejszy efekt cytotoksyczny pod wpływem próbek pochodzących z miejscowości najsilniej uprzemysłowionych (Katowice, Dąbrowa Górnicza, Sosnowiec) [177].

3.4.2.4. Test mikrojądrowy

Test mikrojądrowy jest metodą stosowaną w warunkach *in vivo* i *in vitro*. Wykrywa pęknięcia chromosomów i uszkodzenia wrzeciona podziałowego. Materiał do badań stanowią populacje dzielących się komórek, np. erytrocyty szpiku kostnego czy śledziony albo erytrocyty krwi obwodowej myszy, chomików czy szczurów. Uszkodzenia wrzeciona podziałowego prowadzą do powstania mikrojąder zawierających fragmenty chromosomów lub całych chromosomów, które są wbudowywane do powstających w telofazie jąder potomnych. W przypadku badań *in vivo* podaje się testowaną próbkę zwierzętom drogą doustną, dootrzewną lub inhalacyjną. Po określonym czasie (24, 48 i 72 h) pobiera się szpik i wykonuje rozmazy komórkowe, barwi i analizuje erytrocyty pod mikroskopem. Do testów przeprowadzanych *in vitro* wprowadza się dodatkowo enzymy mikrosomalne (frakcja S9), aby warunki przeprowadzania testu były zbliżone do tych zachodzących w organizmach ssaków [41, 177]. Ekstrakty z pyłów zawieszonych powodowały wzrost częstości powstawania mikrojąder w szpiku kostnym myszy BALB/c *in vivo*, natomiast test ten przeprowadzany, *in vitro*, w hodowlanych limfocytach krwi obwodowej człowieka dla ekstraktów spalin z silników wysokoprężnych pokazał, iż zanieczyszczenia te wywoływały utratę całego chromosomu [18, 24, 93, 125, 218]. Wykazano również, że prekursor fenoli (np. polifenole) występujące w dymie tytoniowym wykazują większy poziom genotoksyczności w porównaniu do innych składników [166]. Z kolei badania na Górnym Śląsku wykazały indukcję cytogenetycznego efektu w limfocytach u 74 dzieci narażonych na środowiskową ekspozycję na WWA i Pb [140].

3.4.2.5. Testy na badanie częstości mutacji w hodowlach komórek ssaków *in vitro*

Testy te umożliwiają określenie częstości występowania mutacji punktowych w określonych genach w różnych komórkach ssaków. Zasada polega na tym, że efekt genetyczny jest następstwem mutacji w specyficznym locus genu. Do badań substancji chemicznych stosowane są trzy linie komórek ssaków: V79 (komórki nabłonkowe płuc) i CHO (komórki nabłonkowe zarodków) pochodzące z chomika chińskiego oraz L5178 (komórki chłoniaka) z myszy. Najczęściej w tych komórkach

bada się częstość mutacji w loci kinazy tymidynowej (TK), transferazy hipoksantyno-guanino-fosforybozylowej (HPRT) i ATP-azy Na^+/K^+ . Wykorzystuje się hodowle komórek rosnących na podłożach selekjonujących mutanty, zawierających czynnik działający toksycznie na wszystkie komórki nie będące mutantami. W końcowym efekcie przeżywają tylko zmutowane komórki, tworząc kolonie. Systemy identyfikujące TK i HPRT pozwalają wykrywać mutacje typu zmiany zasady, zmiany ramki odczytu oraz delecje, natomiast system ATP-azy Na^+/K^+ identyfikuje mutacje typu zmiany zasady [24, 41, 88].

Tego typu testami badano produkty reakcji naftalenu i fenantrenu zachodzące w atmosferze. Okazało się, iż nitrowe pochodne tych związków były bardziej mutagenne od związków macierzystych. Indukowały one większą częstość mutacji TK w badaniach z wykorzystaniem ludzkich komórek linii B-limfoblastoidalnych MCL-5. [24, 58, 81].

3.4.3. Testy na organizmach eukariotycznych

3.4.3.1. Testy z zastosowaniem drożdży

Najczęściej stosowane w badaniach mutagenności zanieczyszczeń są szczepy drożdży piekarskich *Saccharomyces cerevisiae* i *Saccharomyces pombe*. Komórki drożdży wykazują duże podobieństwo do komórek organizmów wyższych pod względem wewnętrznej struktury komórkowej. Szczepy drożdży pozwalają określić, czy badane zanieczyszczenia indukują mutacje punktowe w DNA jądrowym i mitochondrialnym, czy powodują aneuploidie chromosomowe podczas mitozy i mejozy lub rekombinacje w obrębie genów i między nimi [41, 88, 177]. Do oceny mutagennego działania zanieczyszczeń powietrza używa się szczepy *Saccharomyces cerevisiae* XV185-14C i D7. Pierwszy umożliwia wykrywanie mutacji genowych, a drugi badanie mitotycznego *crossing-over*, konwersji genowej i mutacji punktowych [24]. Badania prowadzone we Włoszech wykazały występowanie sporadycznych mutacji punktowych w mitochondrialnym DNA, mitotycznej konwersji genowej i rewersji mutacji pod wpływem działania zanieczyszczeń zaadsorbowanych na pyłach zawieszonych [175]. Test drożdżowy bywa także używany jako uzupełnienie testu Ames, w którym nie uzyskuje się wyników dodatnich. Badania przeprowadzone z pyłami, pobranymi na terenie Wrocławia, wywołującymi efekt mutageny w teście Ames, nie wykazały rewersji mutacji w teście drożdżowym [91, 93].

3.4.3.2. Test SMART

Test ten, wykorzystujący somatyczne komórki muszki owocowej *Drosophila melanogaster*, wykrywa mitotyczne rekombinacje i konwersję genów. Objawiają się one deformacjami włosków na skrzydłach. Stanowi on, najczęściej, uzupełnienie testów bak-

teryjnych. Muszki owocowe mają enzymy związane z cytochromem P-450 (np. oksygenazę zależną od cytochromu P-450), mają więc zdolność do metabolizowania promutagenów do związków aktywnych genetycznie. Stwarza to możliwość przeniesienia wyników uzyskanych w tym teście, z dużym prawdopodobieństwem na ssaki. Efekty rekombinacji somatycznych, zachodzących podczas przeobrażania się larw muszki, obserwuje się na skrzydłach muszki jako „plamki” o podwójnym fenotypie mwh (obserwacja komórek, z których wyrasta po kilka włosów) i flr (obserwacja komórek, z których wyrasta pojedynczy zdeformowany włos) lub pojedynczym mwh, w zależności od miejsca, w którym wystąpiła rekombinacja [41, 88, 93, 115, 116, 177]. Test SMART był wykorzystywany do badania mutagenności WWA, ich nitrowych pochodnych i ekstraktów próbek pyłów znajdujących się w powietrzu atmosferycznym pochodzących z różnych źródeł [26]. Badania prowadzone w Warszawie potwierdziły większą aktywność mutagenną pyłów zawieszonych w okresie zimowym w centrum miasta. Jednak przeważająca część mutacji wywoływana przez badane substancje smołowe nie była efektem działania silnych promutagenów spośród badanych WWA. Nie stwierdzono także działania synergistycznego ani sumowania aktywności mutagennej dwu lub większej liczby badanych substancji. Mieszanki substancji wykazywały mniejszą aktywność mutagenną niż podany osobno silny mutagen, jakim był benzo[a]piren [115, 116]. Wadą testu SMART jest konieczność podawania larwom muszek stosunkowo dużej ilości badanej próby, nie naturalną, w przypadku badania zanieczyszczeń powietrza, drogą pokarmową [24] oraz konieczność stosowania szczepów o wysokim poziomie enzymów aktywujących promutageny [116].

3.4.3.3. Testy z zastosowaniem roślin wyższych

Rośliny wykorzystuje się najczęściej do oceny końcowych efektów działania związków obecnych w powietrzu atmosferycznym. Pozwalają one na obserwację strukturalnych uszkodzeń chromosomów, wymianę chromatyd siostrzanych, oddziaływanie na segregację chromosomów i ogólne funkcje mitotyczne. Testy są proste w wykonaniu, a wyniki uzyskuje się w krótkim czasie, jeżeli wykonuje się je w warunkach *in vitro*, omijając ograniczenia związane z cyklem życiowym roślin. Nie można jednak porównywać wyników tych testów z wynikami testów z udziałem ssaków, ze względu na różnice w budowie komórek roślinnych i zwierzęcych. Testy te, przeprowadzane *in situ*, pozwalają jedynie na ocenę przestrzennego zróżnicowania mutagenności zanieczyszczeń powietrza w zależności od odległości od punktowych źródeł emisji [24, 41, 89, 93, 109, 128, 138].

Idealną rośliną, najczęściej stosowaną w badaniach mutagenności pyłowych zanieczyszczeń powietrza, jest trzykrotka – *Tradescantia paludosa* [61]. Test z tą rośliną od 1988 roku jest rekomendowany przez *Environmental Protection Agency*, a od 1991 roku przez *International Program of Chemical Safety* (WHO) do wykrywania czynników mutagennych w powietrzu atmosferycznym [177]. Testy polegają na indukcji mikrojąder w komórkach macierzystych pyłku i wykrywaniu mutacji genu odpowie-

działnego za barwę włosków pręcików *Tradescantia paludosa* BNL 4430 oraz powstawanie mutacji letalnych pyłków roślin rosnących na badanym terenie. Badania porównawcze wykazały stosunkowo dużą korelację powstawania mikrojąder w komórkach macierzystych pyłku w porównaniu z uszkodzeniami w limfocytach ludzkich [177]. Jest to jednak roślina ciepłolubna, dlatego za jej pomocą nie można badać sezonowej zmienności mutagenności zanieczyszczeń pyłowych powietrza [93, 128, 209]. Testy z wykorzystaniem trzykrotki były z powodzeniem stosowane do określenia genotoksyczności zanieczyszczeń powietrza w wielu miastach Polski. Największą częstość powstawania mikrojąder w kwiatach trzykrotki (test TRAD-MCN) obserwowano w miastach Górnośląskiego Okręgu Przemysłowego w latach 1993–1995 (Katowice, Dąbrowa Górnicza, Sosnowiec). Stwierdzono także, że zanieczyszczenie powietrza, w wybranych punktach znajdujących się w pobliżu ruchliwych ulic, jest porównywalne, a czasem nawet większe niż w bliskim sąsiedztwie zakładów przemysłowych. Dane te pochodziły z takich miast, jak Warszawa, Poznań, Płock i Włocławek. Badania prowadzone w latach 1996–1998 wykazały także przydatność tego testu w monitorowaniu powietrza atmosferycznego w pobliżu takich obiektów, jak wysypiska śmieci. Największy procent mikrojąder zauważono w kwiatach trzykrotek rosnących na wysypisku odpadów komunalnych w Cour-au-bois w Belgii i w jego najbliższym sąsiedztwie. Z kolei test polegający na powstawaniu genowych mutacji somatycznych w komórkach włosków pręcików w kwiatach trzykrotki (test TRAD-SHM) był wykorzystywany do oceny genotoksycznego działania zanieczyszczenia powietrza na ruchliwych skrzyżowaniach w Płocku i jego okolicach. Badania wskazały na wyraźne, statystycznie istotną, częstość występowania mutacji genowych we włoskach pręcików kwiatowych u roślin eksponowanych na zanieczyszczenia w punktach znacznie obciążonych ruchem samochodowym [177]. W 2003 roku Carvalho-Oliveira i inni przeprowadzili badania z *Tradescantia pallida* w okresie trzech dni strajku, który sparaliżował São Paulo w Brazylii. Zaobserwowali znaczące zmniejszenie indukcji mikrojąder w komórkach macierzystych pyłku w tym okresie [27].

3.5. Test *Salmonella* w badaniach nad mutagennością pyłowych zanieczyszczeń powietrza atmosferycznego

Mutagenna aktywność rozpuszczonych ekstraktów pyłów zawartych w powietrzu atmosferycznym była badana przez wielu badaczy. Przeprowadzono wiele badań zarówno w Azji, Europie, jak i w obu Amerykach oraz Nowej Zelandii. Na podstawie studiów literaturowych na ten temat można wyciągnąć wnioski dotyczące sposobów pozyskania próbek pyłów zawieszonych do testu *Salmonella*, porównania aktywności mutagennej zanieczyszczeń powietrza w różnych częściach świata, reakcji poszczególnych szczepów testowych na te zanieczyszczenia oraz skuteczności stosowanych

procedur testu. Badacze podejmowali także próby oceny wpływu na mutagenność powietrza transportu zanieczyszczeń, transformacji atmosferycznej zanieczyszczeń oraz identyfikacji ich źródeł [37].

Podstawowym problemem, z powodu którego trudno porównywać poszczególne badania, jest sposób przygotowania próbek. Zanieczyszczenia pyłowe powietrza zbiera się na odpowiednich filtrach, które następnie są poddawane ekstrakcji za pomocą rozpuszczalników organicznych. Najczęściej stosuje się dichlorometan [1, 13, 16, 30, 47, 70, 101, 106, 108, 119, 160, 197, 213], metanol [4], aceton [2, 26, 28, 49, 105, 125], heksan [149], benzen [54, 73, 144], toluen [26] lub cykloheksan [47, 89]. Niektórzy badacze wykorzystują systemy rozpuszczalników [20, 53, 104, 210]. Pojedyncze rozpuszczalniki stosuje się do ekstrakcji szerokiego zakresu związków, a ich kombinacje do pozyskania poszczególnych klas związków [48, 73, 121, 169]. Dichlorometan wybierany jest najczęściej, gdyż za jego pomocą można pozyskać jedynie frakcję organiczną zanieczyszczeń [37]. Dzięki rozdzielaniu ekstraktów organicznych na poszczególne frakcje można przeprowadzać identyfikację klas związków odpowiedzialnych za efekt mutageny. Barale i inni [12] przeprowadzili frakcjonowanie surowych ekstraktów organicznych pochodzących z cząstek obecnych w powietrzu 17 włoskich miast na pięć frakcji. Każdą z nich przebadali, stosując szczep TA98. Największą mutagenność wykazywała frakcja polarna, prawdopodobnie zawierająca nitroareny, a najmniejszą mutagennością odznaczała się niepolarna frakcja neutralna. Dodanie do testu frakcji S9 zwiększało mutagenność z 6 do 20%. Z kolei badania przeprowadzone w Czechach (Teplice, Prachaticze) [30] nie wykazały działania mutagennego frakcji alifatycznej, natomiast frakcja polarna, zawierająca nitroWWA, aromatyczne aminy i ketony oraz aromatyczne nitryle, przyczyniała się do znacznej mutagenności próbek. Zauważono także, że względny udział różnych frakcji w znacznym stopniu zależy od analitycznego schematu frakcjonowania, a dystrybucja „efektu mutagennego” zależy od zastosowanego szczepu, protokołu testu oraz od czasu i miejsca poboru próby [3, 37].

Testem *Salmonella* zbadano również próbki materiałów filtracyjnych służących do poboru zanieczyszczeń powietrza. Stwierdzono działanie mutagenne w stosunku do szczepu TA98 jedynie w przypadku filtrów pokrytych teflonem. Dla filtrów wykonanych z włókna szklanego, polistyrenu i azotanu celulozy nie znaleziono dowodu na ich mutagenność [37].

Drugą przeszkodą, która ma wpływ na porównywalność badań, jest rozmiar analizowanych cząstek. Rozmiary badanych cząstek różnią się w zależności od rodzaju stosowanych filtrów i rodzaju próbnika [37]. Część badań prezentuje wyniki dotyczące wszystkich cząstek przenoszonych przez powietrze, czyli dotyczące frakcji TSP [1, 48, 75, 112, 149, 166, 210, 222], inne dotyczą frakcji PM10 [21, 20, 30, 49, 159, 211, 213] i PM2,5 [28, 45, 59, 157, 213], a najmniej jest doniesień na temat mutagenności frakcji UFP [44]. Są także opracowania nieokreślające rozmiaru zebranych cząstek [2, 53, 89, 104]. Niektórzy badacze posługiwali się próbnikami rozdzielającymi przenoszone przez powietrze cząstki poszczególnych frakcji i badali każdą frakcję osobno.

Okazało się, mimo że masa cząstek pyłu w poszczególnych frakcjach rozmiarowych była podobna w różnych okresach pomiarowych, to ich aktywność mutagenna znacznie się różniła [37]. Wykazano także, że wraz ze zmniejszaniem rozmiaru cząstek zwiększa się mutagenność, osiągając znaczny poziom w przypadku cząstek o średnicy $< 0,4$ mm [73].

Badania różnią się także sposobem prezentacji wyników. Część z nich przedstawia wyniki w postaci mutagenności (M), czyli liczby rewertantów indukowanej przez 1 m^3 powietrza. W publikacji Claxton i inni [37] zebrano badania prowadzone na różnych kontynentach, których wyniki przedstawiono w postaci M . Największą liczbę rewertantów otrzymano w badaniach prowadzonych w Ameryce Łacińskiej (São Paul, Mexico City, Santiago, La Plata, Porto Alegre) [37, 48, 132, 149, 210, 211]. Aktywność mutagenna zanieczyszczeń powietrza w Mexico City i Santiago wahała się w granicach od 1 do 779 rewertantów/ m^3 powietrza [132]. Badania w Azji (Ohmuta, Sagamihara, Tokyo, Sapporo, Kaohsiung, Osaka, Chiang Mai i Taichung) [37, 73, 104, 118, 213] również wykazały szeroki przedział wyników, np. w Taichung City na Tajwanie liczba rewertantów wahała się od 120 do 640 na m^3 , a w Ohmuta w Japonii od 5 do 450 rewertantów/ m^3 [133]. Również w wielu krajach europejskich przeprowadzono badania zanieczyszczeń powietrza testem *Salmonella* (Włochy, Hiszpania, Czechy, Belgia, Niemcy, Skandynawia, Polska) [2, 16, 20, 28, 37, 49, 50, 51, 53, 59, 132, 145, 172, 175, 181]. Liczba rewertantów/ m^3 powietrza uzyskana w Europie była zbliżona do tych otrzymanych w Azji. Największą liczbę rewertantów otrzymano w badaniach przeprowadzonych w Czechach, od 1 do 320 rewertantów/ m^3 powietrza [16]. Najmniejszą liczbę rewertantów wykryto na terenie USA (Morgantown, Houston, Berkeley, Buffalo, Boise, Boston) [35, 37, 123, 157]. Największy zakres obserwowano w Boise, Idaho, od 5 do 200 rewertantów/ m^3 powietrza. W pozostałych badaniach nie przekraczały 50 rewertantów/ m^3 powietrza [37]. Wszystkie przytoczone badania prowadzono za pomocą jednego szczepu testowego TA98, ze względu na jego małą rewersję spontaniczną oraz dużą wrażliwość na WWA. Wyniki badań sugerują, że najbardziej zanieczyszczone regiony znajdują się w Ameryce Łacińskiej, a najmniej w Stanach Zjednoczonych. Jednak przy takiej ocenie należy uwzględnić typ regionu, zakres i czas prowadzonych badań, temperaturę otoczenia, porę roku, metodykę testu i przygotowania próbki oraz szczepy testowe wykorzystywane w badaniach [37, 51]. Widać to na przykładzie dwuletnich badań ośmiu punktów pomiarowych Erdingera i innych [51] na terenie Baden-Wuerttemberg w Niemczech. Średnia roczna aktywność mutagenna badanych prób wynosiła od 1 do 27 rewertantów/ m^3 powietrza. Natomiast największą mutagenność zaobserwowano w miejscach najbardziej zaludnionych, uprzemysłowionych i o bardzo dużym natężeniu ruchu, np. w Karlsruhe powyżej 100 rewertantów/ m^3 powietrza.

Następną trudnością w porównywaniu poszczególnych badań jest zastosowana metoda wykonywania testu *Salmonella* oraz rodzaj użytych szczepów testowych. Opracowano wiele modyfikacji procedury standardowego testu Ames. Wiązało się to głównie ze zwiększeniem czułości testu na badane zanieczyszczenia oraz z konieczno-

ścią pozyskania dużej ilości próbki do wykonania standardowej procedury testu. Poszukiwano także zestawu szczepów testowych najbardziej wrażliwych na związki chemiczne obecne w zanieczyszczeniach powietrza.

Najczęściej stosowanymi procedurami testu, oprócz standardowej, procedury płytkowej (ang. *plate incorporation assay procedure*) [131], są test preinkubacyjny (ang. *the preincubation assay*) [102] i test w mikrozawiesinie (ang. *the Kado Salmonella microsuspension assay*) [101]. W użyciu jest także spiralny test Amesa (ang. *the spiral Ames assay*), zautomatyzowana wersja testu *Salmonella* [36]. W teście preinkubacyjnym szczepy testowe są ekspozowane na badane zanieczyszczenia przez okres od 20 do 30 minut w temperaturze 37 °C [142, 143, 189]. Z kolei procedura w mikrozawiesinie, stanowi modyfikację płynnej preinkubacji. Modyfikacja ta pierwotnie została zastosowana do wykrywania obecności substancji mutagennych w moczu zwierząt i ludzi ekspozowanych na badane związki chemiczne [99, 100, 101, 102, 103]. Test ten wykrywa substancje mutagenne w małej ilości próbki, wykorzystując 10 razy więcej bakterii testowych z zużyciem od 5–10 razy mniejszej ilości enzymów metabolizujących. Korzystając z tej procedury, Kado i inni [101] wykryli aktywność mutagenną w 17 mg ekstraktu substancji smołowych, podczas gdy standardowa procedura wymaga około 10 razy większej ilości próbki. W niektórych doniesieniach literaturowych porównywano skuteczność poszczególnych modyfikacji testu. Na ich podstawie można stwierdzić, że procedury płynnej preinkubacji i badań spiralnych są bardziej czułe w badaniach mutagenności zanieczyszczeń powietrza niż płytkowy test standardowy, lecz ten ostatni daje bardziej powtarzalne wyniki i jego rezultaty lepiej korelują ze stężeniami związków mutagennych obecnych w badanych próbkach [30, 37, 46, 48, 83, 84, 108, 124, 134, 161, 204].

W badaniach organicznych ekstraktów zanieczyszczeń powietrza de Flora i innych [37] wykazano, że szczepy TA1535, TA102, TA104 i TA97 dają wynik negatywny. Natomiast szczep TA98 daje wynik dodatni zarówno w obecności frakcji S9, jak i bez niej. Z kolei szczep TA 100 dawał wynik dodatni w obecności frakcji S9. Badania prowadzone ze szczepami z serii YG wykazały, że były one bardziej wrażliwe na zanieczyszczenia obecne w powietrzu niż szczepy serii TA. Wyniki badań potwierdziły pogląd, że za mutagenność powietrza atmosferycznego odpowiadają głównie nitrowe pochodne WWA [1, 16, 49, 53, 152, 210, 211]. Wykazano także, że jeżeli w badanych próbkach powietrza obecne są nitrowe pochodne WWA, lepsze rezultaty uzyskuje się, stosując do badań szczepy z serii YG i procedurę płynnej preinkubacji. Badacze zalecają więc stosowanie standardowego testu oraz szczepów TA98 i TA100 do monitoringu obszarów wiejskich i miejskich, natomiast szczepów serii YG i badań preinkubacyjnych, w mikrozawiesinie bądź spiralnych do badań mających na celu stwierdzenie czy w badanych próbkach są obecne nitrowe pochodne WWA [23, 28, 37, 59, 182, 210].

Na podstawie studiów literaturowych, dotyczących zanieczyszczeń powietrza z zastosowaniem szczepów TA98 i z serii YG, można stwierdzić:

- występowanie w próbkach WWA, jeżeli otrzymamy większe współczynniki *AM* lub *MR* w badaniach z udziałem frakcji S9,
- obecność nitroarenów, jeżeli otrzymamy większe współczynniki *AM* lub *MR* w badaniach bez udziału frakcji S9 dla szczepów YG1021, YG1024 i YG1041 niż dla szczepu TA98, oraz słabsze odpowiedzi ze strony tych szczepów w testach z zastosowaniem frakcji S9,
- obecność amin aromatycznych i hydroksyloamin, jeżeli otrzymamy większe wartości *AM* lub *MR* dla szczepów YG1024 i YG 1041 w badaniach z udziałem frakcji S9 w porównaniu do badań bez frakcji S9 oraz w porównaniu do badań dla szczepu TA98 z udziałem S9 [24].

Test *Salmonella* stosowany był także do oceny wpływu transportu zanieczyszczeń i ich przemian zachodzących w atmosferze oraz identyfikacji źródeł mutagennych zanieczyszczeń atmosfery. Bakteryjne testy mutacyjne dobrze nadają się do tych celów, tego typu bowiem badania nie mogą być przeprowadzane *in vivo* czy obserwacjami epidemiologicznymi. Drobnocząstkowe zanieczyszczenia powietrza mogą być przenoszone na odległość wielu tysięcy kilometrów od źródła, pozostawać w powietrzu przez długi czas i w tym czasie podlegać transformacji chemicznej i fotochemicznej [37, 53]. Wykazano np., że ekstrakty z filtrów zawierających benzo[a]piren, który ma charakter mutagenu pośredniego, poddane w ciemności działaniu NO₂ lub ozonu lub PAN (azotan nadtlenoacetylowy) miały działanie mutagenne w stosunku do szczepów TA98, TA100 i TA1538 w testach wykonywanych bez frakcji [165]. Wiele badań przeprowadza się także w komorach dymnych. Claxton i Barnes [34] poddali spaliny pochodzące z silnika diesla wraz innymi substancjami zanieczyszczającymi atmosferę (NO_x, NO i SO₂) ekspozycji ciemnej i fotochemicznej. Stwierdzili, że w zależności od warunków ekspozycji (czas, stężenie, współzanieczyszczenia) można zmniejszyć lub zwiększyć działanie mutagenne substancji organicznych obecnych w spalinach. Wykazano również, za pomocą testu *Salmonella*, że pojedyncze, niemutagenne związki organiczne (etylen, propylen, toluen), poddane działaniu NO_x i O₃ oraz promieniowaniu UV tworzą mutagenną mieszaninę. Test dostarczył także wiele wskazówek dotyczących źródeł zanieczyszczenia powietrza. Niektóre badania koncentrowały się na mobilnych źródłach, czyli na ruchu samochodowym [13, 25, 27, 44, 45, 96, 104, 110, 211]. Badania przeprowadzone w Taichung City na Tajwanie [118] pokazały współzależność pomiędzy stężeniem benzo[g,h,i]peryleny, który jest wskaźnikiem związków mutagennych emitowanych z silników diesla i silników benzynowych a działaniem mutagennym świadczącym o obecności promutagenów w badanych zanieczyszczeniach. Z kolei Villalobos-Pietrini i inni [211] stwierdzili w powietrzu Mexico City obecność benzo[g,h,i]peryleny, koronenu i indeno[1,2,3-c,d]pirenu pochodzących z emisji silników benzynowych i diesla, a nie z procesów spalania drewna. Zaobserwowano także zwiększenie stężenia WWA w okresie grzewczym, z wyjątkiem koronenu i peryleny, co sugeruje, że te dwa węglowodory nie pochodzą z procesów spalania. Z kolei wyniki testu *Salmonella*, dotyczące mutagenów pośrednich, nie korelowały ze stężeniem pyłów frakcji PM10, podczas gdy mutagenność związków

działających bezpośrednio z DNA korelowała. Stwierdzono także korelację pomiędzy mutagennością a zwiększoną emisją nitroarenów z silników spalinowych podczas trwania smogu. Najczęściej badanymi źródłami zanieczyszczeń powietrza za pomocą testu *Salmonella* były spaliny z silników, emisje pochodzące z systemów ogrzewania domów, pył węglowy, emisje przemysłowe i dym z papierosów [44, 56, 57, 122, 126, 152, 182, 190]. Lewis i inni [122] przeanalizowali ekstrakty organiczne pochodzące z obszaru mieszkalnego Albuquerque za pomocą szczepu TA98. Okazało się, że wyekstrahowane substancje organiczne pochodziły w 78% ($14,8 \text{ ng/m}^3$) ze spalania drewna, w 6% ($3,0 \text{ ng/m}^3$) z emisji spalin z silników samochodowych, a w 6% ($1,1 \text{ ng/m}^3$) pochodziły z innych niezidentyfikowanych źródeł. Aktywność mutagenna tych źródeł emisji była następująca: dym powstający podczas spalania drewna 58% ($18,8 \text{ rewertantów/m}^3$), emisje spalin z silników samochodowych 34% ($11 \text{ rewertantów/m}^3$) i emisje z innych źródeł 8% ($2,5 \text{ rewertantów/m}^3$). Inne badania potwierdziły te obserwacje [4, 44, 49, 152]. W każdym przypadku dym powstający podczas spalania drewna stanowił największą część ekstrahowanej materii organicznej, a emisje z silników spalinowych stanowiły relatywnie niewielką część masy organicznej, to jednak znacznie przyczyniają się do działania mutagennego próbek.

Jak widać test *Salmonella* ma bardzo duże zastosowanie w identyfikacji i analizie mutagennego działania zanieczyszczeń powietrza. Test ten stosowany jest z powodzeniem w wielu laboratoriach na świecie. Może być wykonywany z niewielką ilością próby, stosuje się szczepy testowe o ściśle scharakteryzowanych cechach genetycznych oraz dokładnie określonych procedurach badawczych, daje szybkie wyniki i jest niedrogi w porównaniu z innymi badaniami i metodami analitycznymi. Współczesne badania koncentrują się na integracji krótkoterminowych testów z testami długoterminowymi, badaniami epidemiologicznymi, badaniami z zakresu chemii analitycznej i metodami poboru oraz przygotowania próbek do badań.

4. Przedmiot i zakres badań

Przedmiotem badań była modyfikacja klasycznej procedury testu *Salmonella* w celu zwiększenia czułości testu na obecne w powietrzu atmosferycznym aglomeracji miejskiej zanieczyszczenia o charakterze mutagennym. Zwiększenie czułości testu i obniżenie kosztów jego wykonania jest niezwykle ważne, wykrycie bowiem aktywności mutagennej organicznych zanieczyszczeń powietrza wymaga pobierania próbek w ilościach znacznie większych niż w przypadku analiz fizykochemicznych, co stanowi utrudnienie w wprowadzeniu testu do rutynowego monitoringu zanieczyszczeń powietrza.

W celu pełnego wykorzystania możliwości detekcyjnych szczepów bakteryjnych stosowanych w teście *Salmonella* konieczne było określenie optymalnych warunków prowadzenia testu dla poszczególnych szczepów testowych. Wykazano znaczne różnice pomiędzy poszczególnymi szczepami dotyczące optymalnego czasu i temperatury preinkubacji, stężenia i rodzaju frakcji mikrosomalnej, obecności NADP w składzie S9-mix oraz ilości materiału badawczego. Do tej pory nie znaleziono w piśmiennictwie opracowania, które pozwoliłoby porównać wyniki różnych modyfikacji procedury testu *Salmonella*. Było to możliwe dzięki przeprowadzeniu, w niniejszej pracy, ośmiu zmodyfikowanych testów na tych samych dwóch mieszaninach pyłowych zanieczyszczeń powietrza. Ze względu na to, że istnieją znaczne różnice w składzie ilościowym i jakościowym zanieczyszczeń atmosfery w zależności od sezonu poboru próbek, badania przeprowadzono na ekstraktach pyłów pobranych w okresie letnim i zimowym. Uzyskane informacje, w tak szeroko zakrojonych badaniach, pozwoliły na wybór najlepszych procedur testu i szczepów testowych oraz na weryfikację otrzymanych rezultatów na dodatkowo pobranym materiale badawczym.

Temat pracy realizowano w trzech kolejnych etapach:

Etap pierwszy

Prace wstępne obejmowały:

1. Pobór próbek pyłów zawieszonych w okresie zimowym na Starym Mieście,
2. Pobór próbek pyłów zawieszonych w okresie letnim na Starym Mieście,
3. Ekstrakcję próbek pyłów pobranych w okresie zimowym i letnim,
4. Badanie zawartości WWA, nitro- i dinitroWWA w ekstraktach pyłów zawieszonych,

5. Sprawdzenie szczepów testowych,
6. Przygotowanie frakcji mikrosomalnych,
7. Oznaczenie optymalnego stężenia frakcji dla klasycznej metody testu *Salmonella*,
8. Oznaczenie optymalnego stężenia frakcji dla metody testu *Salmonella* w modyfikacji Kado.

Etap drugi

Wytypowanie procedury, która pozwoliłaby na **zwiększenie czułości testu *Salmonella* i obniżenie kosztów jego wykonania**. Badania realizowano z udziałem pyłów pobranych na Starym Mieście, na 4 szczepach testowych w obecności frakcji mikrosomalnej indukowanej Aroclorem 1254 i fenobarbitem.

W ramach tego etapu przeprowadzono określenie mutagenności ekstraktów pyłów pobranych w okresie zimowym i letnim:

- klasycznym testem *Salmonella* (I),
- klasycznym testem *Salmonella* bez udziału koenzymu NADP (II),
- klasycznym testem *Salmonella* bez udziału koenzymu NADP z 10-krotnie większą ilością bakterii (III),
- klasycznym testem *Salmonella* z 10-krotnie większą ilością bakterii (IV),
- klasycznym testem *Salmonella* z zastosowaniem dodatkowo preinkubacji prowadzonej w temperaturze 37 °C (V),
- klasycznym testem *Salmonella* z zastosowaniem dodatkowo preinkubacji prowadzonej w temperaturze 30 °C (VI),
- testem *Salmonella* w modyfikacji Kado (VII).
- klasycznym testem *Salmonella* z zastosowaniem dodatkowo preinkubacji prowadzonej w temperaturze 37 °C w formie Mini (VIII).

Etap trzeci

Weryfikacja wybranych procedur testu, na podstawie wyników uzyskanych w drugim etapie pracy, na ekstraktach pyłów pobranych w zimie, lecie i na wiosnę w trzech wybranych punktach miasta (ul. Strachocińska, pl. Grunwaldzki, ul. Norwida).

W badaniach zastosowano następujące procedury testu:

- klasyczny test *Salmonella* (I),
- klasyczny test *Salmonella* z zastosowaniem dodatkowo preinkubacji prowadzonej w temperaturze 37 °C (V),
- test *Salmonella* w modyfikacji Kado (VII).

W testach wykorzystano dwa szczepy testowe (TA98 i YG1041), które w drugim etapie badań były bardziej skuteczne w wykrywaniu efektu mutagennego pyłowych zanieczyszczeń powietrza oraz frakcję mikrosomalną indukowaną Aroclorem 1254, fenobarbitem i frakcję niepoddaną indukcji.

5. Metody badań

5.1. Pobór próbek pyłów zawieszonych

Materiał do badań stanowiły pyły zawieszone w powietrzu atmosferycznym miasta Wrocławia, czwartym pod względem liczby ludności (ok. 635 tys. mieszkańców, ok. 2,1 tys. os./km²) mieście, w Polsce.

Próbki powietrza pobierano za pomocą wysokoprzepływowego aspiratora powietrza firmy Staplex (rys. 2 i 3) na filtry z włókna szklanego. Filtry w aparacie zmieniano co 24 godziny, tak długo, aż zebrano cały potrzebny materiał badawczy. Dokładne zestawienie danych dotyczących poboru próbek pyłów powietrza podano w tabeli 9.

Próbki pyłów do pierwszego i drugiego etapu badań pobierano na stanowisku usytuowanym w dzielnicy Stare Miasto przy placu Nowy Targ, w miejscu o natężonym ruchu samochodowym. Próbki pobierano w sezonie letnim (od maja do września 2002 r.) i w sezonie zimowym (od listopada do marca 2002/2003). Całkowita liczba godzin poboru pyłów w okresie zimowym wynosiła 960, a w okresie letnim 1669.

Trzeci etap pracy był prowadzony na podstawie próbek powietrza pobieranych w trzech różnych punktach miasta w następujących okresach:

- latem na przełomie lipca i sierpnia 2005 r. (próbki 1 i 2),
- zimą, w lutym 2006 r. (próbki 3 i 4),
- wiosną na przełomie marca i kwietnia 2007 r. (próbka 5).

Pierwsze stanowisko usytuowane było na obrzeżu Wrocławia (ul. Strachocińska – próbki 1 i 3), na obszarze indywidualnej niskiej zabudowy, przy znacznie obciążonej trasie wylotowej w kierunku Jelcza. Teren ten nie jest zgazyfikowany i w związku z tym przez cały rok w wielu zabudowaniach używane są paleniska domowe. Na stanowisku tym pyły pobierano przez 67 godzin w lecie (1) i przez 119 godzin w zimie (3).

Drugie stanowisko zlokalizowano w centrum miasta, na pl. Grunwaldzkim (próbki 2 i 4), przez który prowadzi jedyna droga tranzytowa w kierunku Warszawy. W miejscu tym panuje wzmożony ruch samochodowy przez całą dobę. W tym punkcie miasta pobierano zanieczyszczenia powietrza przez 96 godzin w lecie (2) i przez 105 godzin w zimie (4).

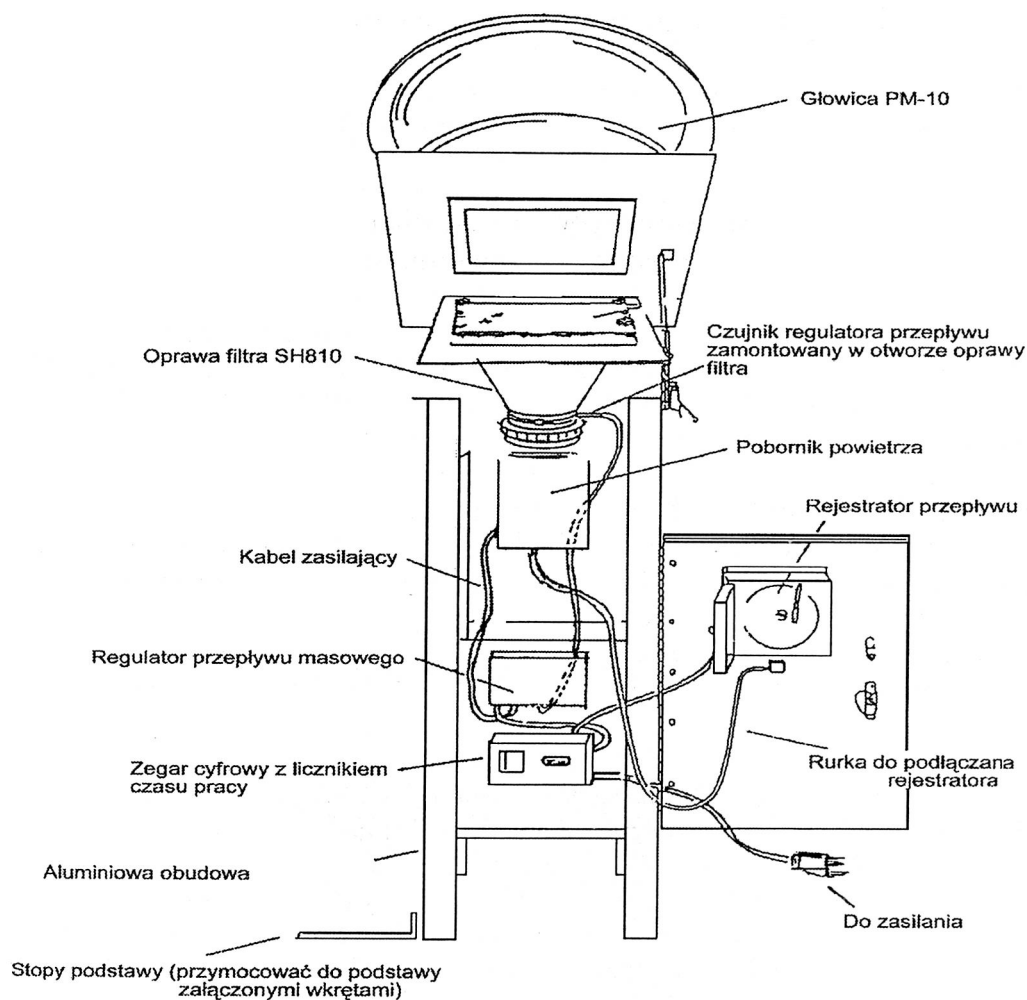
Trzecie stanowisko usytuowane było w miejscu o mniejszym natężeniu ruchu samochodowego, na terenie kampusu Politechniki Wrocławskiej (skrzyżowanie ul. Norwida i Wybrzeże Wyspiańskiego – próbka 5), na dachu na wysokości drugiego piętra. Czas poboru próbki w tym miejscu wynosił 192 godziny.

5.1.1. Wysokoprzepływowy aspirator powietrza stosowany w badaniach

Na rysunkach 2 i 3 zamieszczono zdjęcie i schemat stosowanego w badaniach wysokoprzepływowego aspiratora powietrza firmy Staplex model FC-2ETM, spełniającego wszystkie wymagania EPA PM10 zawarte w *Federal Reference Method*. Urządzenie to zapewnia pobór dużych ilości powietrza i wychwytywanie cząstek od $10\text{ }\mu\text{m}$ do $0,01\text{ }\mu\text{m}$ za pomocą filtrów. Cząstki zawieszone w powietrzu zasysane są za pomocą wysokoobrotowego wentylatora z prędkością $1,13\text{ m}^3/\text{min}$ poprzez obwodowy wlot głowicy separatora. Budowa aparatu zapewnia stałą wydajność poboru powietrza, niezależnie od prędkości wiatru w zakresie od 0 do 36 km/h. Cząstki o wielkości powyżej $10\text{ }\mu\text{m}$ zatrzymywane są na powierzchni separatora, a cząstki mniejsze poniżej $10\text{ }\mu\text{m}$, określane jako PM-10, unoszone są strumieniem powietrza przez rurki doprowadzające powietrze aż do powierzchni filtra z włókna szklanego.



Rys. 2. Wysokoprzepływowy aspirator powietrza firmy Staplex PM10 model FC-2ETM



Rys. 3. Schemat wysokoprzepływowego aspiratora powietrza firmy Staplex PM10 model FC- 2ETM

W badaniach zastosowano filtry kwarcowe, antyhigroskopijne Staplex typ TFAGF810 o wymiarach 20×25 cm, utrzymujące stałą masę w dużym zakresie zmian wilgotności. Filtry zmieniano co 24 godziny. Skuteczność zastosowanych filtrów, przy umiarkowanym przepływie powietrza, dla cząstek o wielkości 0,3 μm kształtuje się na poziomie 99,98%. Filtry te mogą być wykorzystywane w dużym zakresie temperatury.

Regulator przepływu zapewnia stałość przepływu powietrza bez względu na stopień zapełnienia filtra, warunki atmosferyczne (ciśnienie, temperatura) oraz wahania napięcia zasilającego. Objętość próbki powietrza pobierana jest z dokładnością około 2,5% na dobę przy przepływie wynoszącym 1,13 m^3/min .

5.2. Ekstrakcja próbek pyłów zawieszonych

Antyhigroskopijne filtry szklane, bezpośrednio po poborze próbek, ważono w celu oznaczenia masy pyłów i umieszczano do czasu ekstrakcji w temperaturze -18°C . Filtry wraz z pyłami z poszczególnych poborów łączono w jedną próbkę, cięto i wkładano do aparatów Soxhleta. Następnie ekstrahowano dichlorometanem (*Lab-Scan*) bez dostępu światła, przez 16 godzin, z 15-minutowym refluksiem. Po zakończonej ekstrakcji otrzymany ekstrakt wyjściowy dzielono na dwie porcje, do analiz chemicznych i biologicznych. Następnie ekstrakty zagęszczano do sucha w wyparce próżniowej, na koniec przedmuchiowano azotem i ważono suchą pozostałość w celu określenia ilości substancji smołowych w próbkach. Suchy ekstrakt zamrażano i przechowywano w temperaturze -18°C do czasu analizy [16, 121, 156, 168].

Uzyskane tą drogą suche ekstrakty poddawane były analizie w celu oznaczenia w nich zawartości WWA, nitroWWA i dinitroWWA oraz wykorzystywane były jako materiał do testów na mutagenność (*Salmonella*).

5.3. Metody analityczne

Badania zawartości WWA, nitro- i dinitroWWA w ekstraktach pyłów zawieszonych przeprowadzono w Zakładzie Szkodliwości Chemicznych Instytutu Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego w Sosnowcu. Wyniki badań przeliczano na ng/m^3 powietrza [124, 121, 156, 168, 203, 219].

Surowy ekstrakt frakcjonowano na kolumnach szklanych wypełnionych żelem krzemionkowym (60, średnica cząstek 0,063–0,200 nm) suszonym w temperaturze 150°C przez 16 godzin, a następnie dezaktywowanym wodą destylowaną. Kolumnę najpierw kondycjonowano cykloheksanem, a następnie наносzono na jej czoło zatężony surowy ekstrakt.

Cztery kolejne frakcje, po usunięciu węglowodorów alifatycznych wymywanych z kolumny 20 cm^3 cykloheksanu, zbierano następująco:

- Frakcja I – WWA, wymywane 50 cm^3 cykloheksanu, a następnie 30 cm^3 25% roztworu dichlorometanu w cykloheksanie.

- Frakcja II – nitroWWA, wymywane 20 cm^3 dichlorometanu.

- Frakcja III – dinitroWWA, wymywane 10 cm^3 dichlorometanu.

Poszczególne frakcje odparowywano w wyparce próżniowej do objętości 10 cm^3 , a następnie do sucha w atmosferze azotu.

WWA wchodzące w skład badanych próbek (I frakcja) oznaczano techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej z wykorzystaniem chromatografu cieczowego HP 1090 firmy Hewlett-Packard z detektorem fluorescencyjnym 1046 A. W tym celu suchą pozostałość zalewano 1 cm^3 acetonitrylu i poddawano analizie chromatograficznej.

Warunki pracy chromatografu cieczowego: rozdział na kolumnie chromatograficznej C-18 BAKERBOND PAH-16 PLUS, elucja gradientowa acetonitryl/woda, temperatura kolumny: 30 °C, czas trwania analizy: 45 minut, przepływ fazy ruchomej: 0,5 ml/minutę.

Nitro- oraz dinitroWWA (frakcja II i III) oznaczano z zastosowaniem chromatografu gazowego firmy Hewlett-Packard 5890 Seria II Plus z detektorem mas 5972A z jonizacją elektronami (EI).

Warunki pracy chromatografu gazowego GC/MS: stosowana kolumna kapilarna HP-5 MS; 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, gaz nośny: hel, program temperaturowy kolumny, 50 °C przez 2 minuty, przyrost temperatury 10 °C/minutę do 280 °C, temperatura dozownika: 290 °C, temperatura detektora: 280 °C, czas analizy: 40 minut.

W tabelach 1 i 2 przedstawiono granicę oznaczalności poszczególnych WWA, nitro- i dinitroWWA.

Tabela 1. Granica oznaczalności WWA metodą HPLC

Lp.	Związek chemiczny	Skrót	Oznaczalność [µg/cm ³ ekstraktu]
1	Fenantren	Fen	0,005
2	Antracen	A	0,005
3	Fluoranten	Flu	0,005
4	Piren	Pyr	0,002
5	Benzo[a]antracen	B[a]A	0,002
6	Chryzen	Chr	0,005
7	Benzo[b]fluoranten	B[b]F	0,002
8	Benzo[k]fluoranten	B[k]F	0,002
9	Benzo[a]piren	B[a]P	0,002
10	Dibenzo[a,h]antracen	D[a,h]A	0,005
11	Benzo[g,h,i]perylene	B[g,h,i]P	0,005
12	Indeno[1,2,3-c,d]piren	I[1,2,3-c,d]P	0,005

Tabela 2. Granica oznaczalności nitropochodnych WWA techniką GC/MS

Nazwa związku	Oznaczalność [µg/cm ³ ekstraktu]
1-nitronaftalen	0,014
2-nitrofluoren	0,013
9-nitroantracen	0,013
3-nitrofluoranten	0,013
1-nitropiren	0,013
1,3-dinitropiren	0,067
1,6-dinitropiren	0,068
1,8-dinitropiren	0,067

5.4. Metody biologiczne

5.4.1. Przygotowanie ekstraktów pyłów do badania mutagenności

Suchą pozostałość ekstraktów pyłów, przeznaczoną do badań biologicznych, rozpuszczano w sterylnym DMSO (dimetylosulfotlenek) (Fluca) w taki sposób, by w 1 cm³ roztworu podstawowego znajdowały się zanieczyszczenia pochodzące z 1000 m³ powietrza. Tak przygotowane próbki, uprzednio rozcieńczone zgodnie z postępowaniem geometrycznym o ilorazie $q = 1/2$, wprowadzano do różnych wariantów testu *Salmonella*. Na płytkę nanoszono w poszczególnych testach różne ilości badanych ekstraktów. Zakresy stężeń ekstraktów zanieczyszczeń powietrza podano na rysunkach przedstawiających wyniki badań.

5.4.2. Sprawdzenie szczepów testowych

W badaniach stosowano cztery szczepy testowe *Salmonella typhimurium*: TA98, TA100, YG1041 i YG1042 (tab. 3). Testowe szczepy *Salmonella* otrzymano od doktor T. Nohmi z *Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Hygienic Sciences, Tokyo, Japan*. Szczep TA98 wykrywa mutageny typu zmiany fazy odczytu, podczas gdy szczep TA100 ulega rewersji powrotnej głównie pod wpływem mutagenów powodujących zamianę jednej pary zasad na inną. Szczep YG1041 jest pochodną szczepu TA98, natomiast szczep YG1042 pochodną szczepu TA100. Dodatkowo szczepy *Salmonella typhimurium*: YG1041 i YG1042 charakteryzują się zwiększoną wrażliwością, w stosunku do szczepów macierzystych, na nitrowe, aminowe i hydroksyloaminowe pochodne WWA. Jest to wynikiem wprowadzenia do ich komórek plazmidów zawierających dodatkową pulę informacji genetycznej dotyczącą aktywności nitroreduktazowej i O-acetylotransferazowej [131, 204–206].

Tabela 3. Charakterystyka genotypów szczepów testowych

Szczep	Opis
TA98	TA 1538 his D3052 (pKM101)
TA100	TA 1535 his G46 (pKM101)
YG1041	TA 98 (pYG233): szczep o zwiększonej aktywności nitroreduktazy i O-acetylotransferazy (pYG233)
YG1042	TA100(pYG233): szczep o zwiększonej aktywności nitroreduktazy i O-acetylotransferazy (pYG233)

Tabela 4. Zakres liczby rewertantów spontanicznych i indukowanych uzyskanych w trakcie badań

Szczep	<i>LR</i> spontanicznych	Mutagen kontrolny (-F)	Stężenie mutagenu kontrolnego [μg/ płytkę] (-F)	<i>LR</i> indukowanych (-F)	Mutagen kontrolny (+F)	Stężenie mutagenu kontrolnego [μg/ płytkę] (+F)	<i>LR</i> indukowanych		
							FA	FB	F0
TA 98	22–36 (-F) 26–42 (+FA) 20–39 (+FB) 18–34 (+F0)	2,4,7- TNFON	0,2	3242–4552	2-AF	5	1645–2886	1728–2051	552–974
TA 100	98–179 (-F) 121–194 (+FA) 105–182 (+FB)	NQNO	0,5	962–1616	2-AF	5	848– 869	890–1041	
YG 1041	128–179 (-F) 145–228 (+FA) 109–144 (+FB) 159–209 (+F0)	2,6-DNT	50	1165–1396	2-AF	5	1126–2756	726–1265	531–970
YG 1042	122–179 (-F) 141–198 (+FA) 121–189 (+FB)	2,4-DNT	100	985–1024	2-AA	5	615–1126	705–908	

Przed przystąpieniem do badań, każdorazowo, sprawdzano genotypy szczepów testowych. Zgodnie z zaleceniami autorów testu [131] sprawdzano obecność mutacji w operonie histydynowym (wzrost na agarze minimalnym z dodatkiem L-histydyny oraz brak wzrostu na agarze minimalnym z dodatkiem biotyny), mutacji *rfa* związanej z przepuszczalnością ściany komórkowej (brak wzrostu na agarze odżywcym wokół krążka nasyczonego fioletem krystalicznym), mutacji *uvrB* polegającej na usunięciu genu związanego z naprawą uszkodzeń DNA (brak wzrostu na agarze odżywcym po naświetleniu promieniami UV z odległości 33 cm przez 8 s) oraz obecność plazmidu pKM101 (czynniki *R*) (wzrost na agarze odżywcym z dodatkiem ampicyliny) stymulującego system błędnej naprawy DNA i warunkującego odporność bakterii na ampicylinę. Dodatkowo dla szczepów YG1041 i YG1042 obecność plazmidu pYG233 (wzrost na agarze odżywcym z dodatkiem kanamycyny) warunkującego podwyższony poziom nitroreduktazy i O-acetylotransferazy. Każdorazowo określano także liczbę rewertantów indukowanych spontanicznie (kontrola negatywna) oraz liczbę rewertantów indukowanych pod wpływem mutagenów diagnostycznych (kontrola pozytywna). Liczba kolonii rewertantów spontanicznych powinna mieścić się w zakresie podanym w piśmiennictwie lub powinna być porównywalna z wynikami uzyskanymi w danym laboratorium przez dłuższy czas [141]. Kontrolne związki mutagenne powinny mieć strukturę chemiczną zbliżoną do badanych związków. Mutagenami diagnostycznymi dla badań prowadzonych bez aktywacji metabolicznej frakcją S9 były: 2,4,7-TNFon (TA98), NQNO (TA100), 2,6-DNT (YG1041) i 2,4-DNT (YG1042), a dla badań prowadzonych w obecności frakcji S9 2-AF (TA98, TA100, YG1041) oraz 2-AA (YG1042). Wszystkie związki zostały zakupione w firmie Sigma. W tabeli 4 przedstawiono otrzymane zakresy liczby rewertantów spontanicznych i indukowanych, jakimi charakteryzowały się testowe szczepy bakterii w trakcie badań.

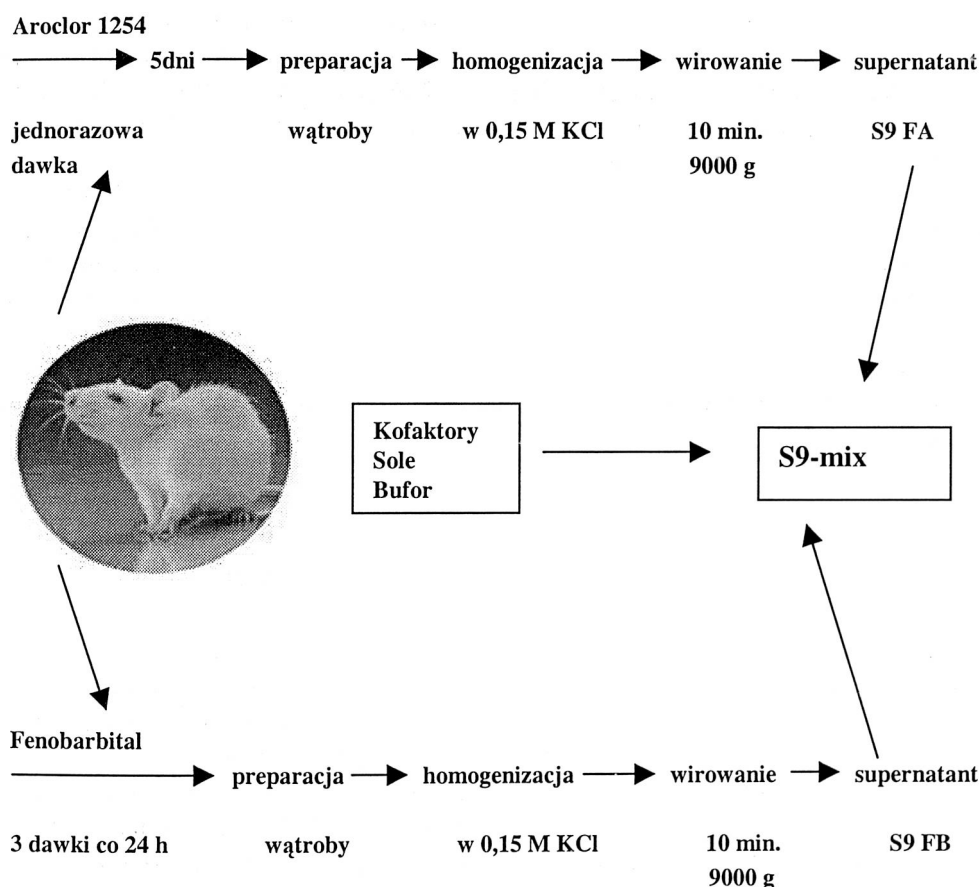
5.4.3. Przygotowanie frakcji mikrosomalnych

Istotnym elementem procedury bakteryjnego testu *Salmonella* jest aktywacja występujących w próbce promutagenów do mutagenów bezpośrednich za pomocą wątrobowej frakcji mikrosomalnej. Uzyskuje się ją z wątroby szczurzej po uprzedniej indukcji.

W badaniach stosowano trzy rodzaje frakcji mikrosomalnej uzyskanej ze szczurzej wątroby samców rasy Wistar. Masa szczurów, z których otrzymano frakcje mikrosomalne, wahała się w granicach 170–230 g, a masa ich wątroby 7,2–9,79 g. Do aktywacji enzymatycznej jednej frakcji mikrosomalnej zastosowano powszechnie stosowaną mieszaninę polichlorowanych bifenyli występującą pod nazwą Aroclor 1254, natomiast drugą aktywowano fenobarbitalem. Trzecia frakcja została pozyskana z wątroby szczurów bez uprzedniej aktywacji (F0). Frakcję indukowaną Aroclorem (FA) uzyskano, postępując zgodnie z metodyką podaną przez Maron i Ames [131],

natomiast aktywację fenobarbitem (FB) przeprowadzono według metody podanej przez Ong i in. [155].

W jednym i drugim przypadku podawano szczurom dootrzewnowo w postaci iniekcji odpowiedni induktor (rys. 4). Jednorazowo podawano rozpuszczony w oleju kukurydzianym Aroclor o stężeniu 200 mg/cm³ w dawce 500 mg/kg masy ciała szczura na 5 dni przed dekapitacją. Fenobarbital podawano w ilości 50 mg/kg masy ciała w trzykrotnie podzielonej dawce przez trzy kolejne dni przed zabiciem. Frakcję mikrosomalną przygotowano według procedury podanej przez Garner i in. [36]. Eutanazje u szczurów przeprowadzono przez podanie domięśniowe preparatu Bioketan 10%, a następnie po upływie 30 minut wykonano dekapitację przez dyslokację kręgów szyjnych.



Rys. 4. Preparacja frakcji mikrosomalnej wątroby S9

Wątrobę wypreparowano w warunkach aseptycznych. Całą procedurę przeprowadzono w sterylnej komorze chłodniczej w temperaturze 2 °C, używając sterylnych, schłodzonych narzędzi chirurgicznych, KCl i szkła laboratoryjnego. Po zważeniu

i kilkukrotnym przemyciu wątroby roztworem 0,15 M KCL w celu usunięcia hemoglobiny, wątrobę przenoszono do roztworu KCl w proporcji 3 ml KCl na 1 gram wątroby. Następnie wątrobę rozdrabniano za pomocą nożyczek chirurgicznych. Tak przygotowaną wątrobę homogenizowano w zlewce obłożonej lodem z dodatkiem alkoholu. Homogenat wirowano w sterylnych probówkach w temperaturze 4 °C przez 10 min, przy 9 tys. g. Uzyskany supernatant rozlano aseptycznie po 1,2 cm³ do sterylnych, zamykanych probówek Eppendorfa o objętości 1,5 cm³. Natychmiast schładzano je w suchym lodzie i następnie umieszczono całą porcję uzyskanej frakcji w zamrażarce o temperaturze -80 °C. Sterylność pozyskanych frakcji sprawdzano przez posiadanie 0,1 cm³ homogenatu na podłożu minimalne z glukozą z dodatkiem biotyny i histydyny oraz na podłożu z agarem odżywczym. Zawartość białka w otrzymanych frakcjach oznaczano metodą Lowry'ego [136, 143], rozcieńczając badaną próbę 10-krotnie. Do sporządzenia krzywej standardowej wykorzystano albuminę wołową. Stężenie białka w homogenacie frakcji FA wynosiło 61,29 mg/cm³, homogenat FB zawierał 60,83 białka w 1 cm³, a homogenat F0 zawierał 56,22 mg białka w 1 cm³. We wszystkich badaniach, które prowadzono z użyciem S9-mix stosowano zawsze frakcję A, B i 0 o identycznej zawartości białka.

Przed każdym testem wyjmowano odpowiednią objętość frakcji mikrosomalnej w ilości niezbędnej do wykonania zaplanowanych badań. Bezpośrednio przed wykonaniem testu homogenat rozmrażano w temperaturze pokojowej i natychmiast przygotowywano frakcje mikrosomalną S9 (S9-mix). Po przygotowaniu trzymano ją w łaźni z lodem. Standardowa mieszanina S9-mix powinna zawierać: 8 mM MgCl₂, 33 mM KCL, 5 mM glukozo-6-fosforanu, 4 mM NADP, 100 mM buforu fosforanowego o pH 7,4 oraz frakcję mikrosomalną (4%, v/v) w ilości zależnej od zawartości w niej białka [131].

5.4.4. Oznaczenie optymalnego stężenia frakcji mikrosomalnych do testu *Salmonella*

Optymalne stężenia frakcji mikrosomalnych (FA, FB) określano wobec badanych ekstraktów pyłów, a nie jak podaje oryginalna metoda wobec wybranego mutagenu diagnostycznego. Takie podejście wydaje się być uzasadnione przy badaniu próbek środowiskowych o zmiennym składzie ilościowym i jakościowym.

W badaniach zastosowano 0%, 3%, 6%, 9% i 12% (v/v) roztwory frakcji uwzględniając różnice w zawartości białka w homogenatach. Optymalne stężenia frakcji dla poszczególnych szczepów oznaczono wobec jednego wytypowanego rozcieńczenia ekstraktu pyłów pobranych w okresie zimowym i letnim na Starym Mieście. Stężenia te zostały wybrane na podstawie wyników, które uzyskano stosując 4% (v/v) zawartość S9 w S9-mix w badaniach pilotowych. Wytypowano takie stężenia ekstraktów, które dawały dla danego szczepu duże liczby rewertantów, ale nie powodowały jeszcze efektu toksycznego. Określenie optymalnego stężenia frakcji prowadzono, stosu-

jąc klasyczną procedurę testu *Salmonella* oraz test *Salmonella* w modyfikacji Kado, opisane w dalszej części pracy. Wybrane stężenia ekstraktów w badaniach pilotowych podano w tabelach 5 i 6.

Tabela 5. Stężenia ekstraktów próbek, dla których określano optymalne stężenia frakcji w teście klasycznym

Rodzaj frakcji	FA	FA	FB	FB
Szczep	Zima	Lato	Zima	Lato
	m ³ /plytę	m ³ /plytę	m ³ /plytę	m ³ /plytę
TA98	1,56	12,5	1,56	12,5
TA100	25	50	25	50
YG1041	0,195	1,56	0,195	1,56
YG1042	0,195	25	0,195	25

Tabela 6. Stężenia ekstraktów próbek, dla których określano optymalne stężenia frakcji w teście w modyfikacji Kado

Rodzaj frakcji	FA	FA	FB	FB
Szczep	Zima	Lato	Zima	Lato
	m ³ /plytę	m ³ /plytę	m ³ /plytę	m ³ /plytę
TA98	1,26	5	1,26	5
TA100	5	5	5	5
YG1041	0,078	0,3125	0,078	0,3125
YG1042	0,165	2,6	0,165	2,5

5.4.5. Opis klasycznej procedury testu *Salmonella* i jej modyfikacji

Podstawą realizacji badań był test *Salmonella*, zwany potocznie testem Ames, [131] oraz jego modyfikacje. Test ten oparty jest na ocenie zdolności bakterii *Salmonella typhimurium* do mutacji powrotnych (rewersji) pod wpływem obecności w badanej próbce czynników mutagennych. Czynniki mutagenne powodują odzyskanie przez badane szczepy zdolności do syntezy histydyny, co automatycznie umożliwia ich wzrost na podłożu pozbawionym tego aminokwasu. Liczba powstałych kolonii rewertantów przyjęto uznawać za miarę aktywności mutagennej badanej próby.

W ramach badań przeprowadzono wiele testów na szerokim zakresie stężeń ekstraktów pyłów. Zestawienie danych dotyczących wykonania poszczególnych testów umieszczono w tabeli 8. Liczbę kolonii rewertantów (his⁺) określano po 48 godzinach (TA98 i TA100) i po 72 godzinach (YG1041 i YG1042) inkubacji w temperaturze 37 °C. Testy prowadzono w obecności buforu albo z wątrobową frakcją mikrosomalną S9 indukowaną Aroclorem (FA), fenobarbitem (FB) oraz frakcją niepoddaną działaniu induktora (F0). Wszystkie analizy prowadzono w pięciu powtórzeniach. Jeśli w przeprowadzanych procedurach testu stosowano zagęszczane zawiesiny bakterii, to zagęszczano całonocną ich hodowlę zawierającą 1·10⁹ komórek w 1 cm³

do $1 \cdot 10^{10}$ komórek w 1 cm^3 , przez wirowanie (10 min, 10 000 g, 4°C), a następnie zawieszenie w 10-krotnie mniejszej objętości schłodzonego 0,2 M buforu fosforanowego o pH 7,4.

5.4.5.1. Klasyczny test *Salmonella* (test Ames) (I)

W badaniach stosowano procedurę oraz podłoża mikrobiologiczne i roztwory opisane przez Maron i Ames [131].

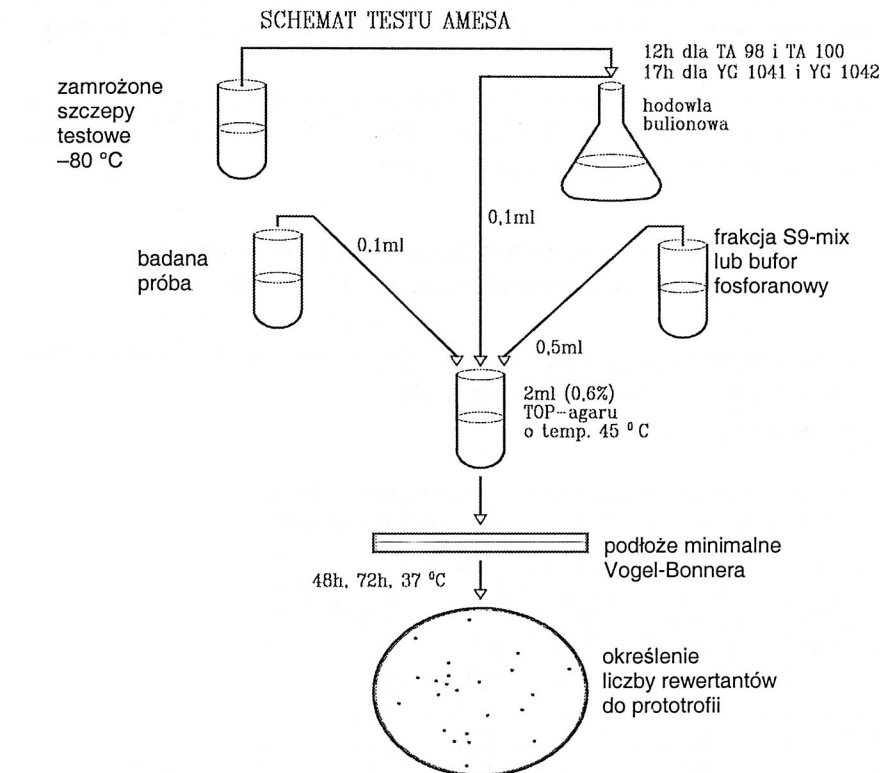
Płytkowy test *Salmonella* przeprowadzano w następujący sposób (rys. 5): do sterylnej probówki wlewano $0,5 \text{ cm}^3$ 0,2 M buforu fosforanowego o pH 7,4 albo taką samą ilość frakcji S9-mix (jej przygotowanie opisano w p. 5.4.3.), następnie dodawano $0,1 \text{ cm}^3$ badanej próbki rozpuszczonej w DMSO i $0,1 \text{ cm}^3$ całonocnej hodowli bulionowej szczepu testowego ($1 \cdot 10^8$ komórek/ $0,1 \text{ cm}^3$). W badaniach stosowano optymalne stężenia frakcji FA, FB i F0. Hodowlę bulionową szczepów prowadzono przez 12 godzin dla szczepów TA98 i TA100, a dla szczepów YG1041 i YG1042 przez 17 godzin. Hodowlę szczepów przeprowadzano z dodatkiem ampicyliny ($25 \mu\text{g}/\text{cm}^3$), a w przypadku szczepów YG dodawano jeszcze kanamycyny ($25 \mu\text{g}/\text{cm}^3$). Całonocna hodowla szczepów powinna zawierać $1 \cdot 10^9$ bakterii w 1 cm^3 . Następnie do probówki dodawano 2 cm^3 TOP-agaru (agar miękki) o temperaturze 45°C , uzupełnionego śladowymi ilościami histydyny i biotyny, co umożliwia bakteriom kilka podziałów, zanim wyczerpie się histydyna, w czasie których może dojść do mutacji. Zawartość probówki, po dokładnym wymieszaniu, wylewano na powierzchnię płytki Petriego z podłożem minimalnym Vogel-Bonnera (agar minimalny uzupełniony solami mineralnymi i glukozą). Po odpowiednim czasie inkubacji liczono liczbę kolonii rewertantów rosnących na płytkach za pomocą ręcznego licznika kolonii, określając liczbę rewertantów spontanicznych, pozytywnych i badanych.

Badaniom poddano także ekstrakty pochodzące z samych czystych filtrów (ślepa próbka). Ekstrakty te uzyskano taką samą metodą jak w przypadku filtrów z pyłami zawieszonymi.

5.4.5.2. Klasyczny test *Salmonella* bez udziału NADP (II)

Monoooksygenazy współpracując z NADPH (fosforan dinukleotydu nikotynamido-adeninowego) i tlenem wprowadzają jeden atom tlenu do substratu. Mikrosomalny układ monoooksygenaz stanowi kompleks enzymatyczny, w skład którego wchodzi reduktaza NADPH-cytochrom P-450 i cytochrom P-450. Są to enzymy występujące u bakterii, roślin oraz u wszystkich zwierząt [183, 195]. Ze względu na duży koszt NADP postanowiono sprawdzić, jaka będzie aktywność frakcji mikrosomalnej FA i frakcji FB w przekształcaniu substancji promutagennych w aktywne mutageny, bazując jedynie na naturalnym poziomie tego koenzymu występującego we frakcji, czyli bez dodatkowego wprowadzania NADP do frakcji S9-mix.

Badania prowadzono zgodnie z procedurą klasyczną testu *Salmonella*, a jedynie frakcja S9-mix nie zawierała NADP w swoim składzie.



Wskaźnik mutagenności

$$MR = \frac{\text{liczba rewertantów indukowanych}}{\text{liczba rewertantów spontanicznych}}$$

Rys. 5. Schemat wykonania testu *Salmonella*

5.4.5.3. Klasyczny test *Salmonella* bez udziału NADP ze zwiększoną ilością bakterii (III)

Przypuszczano, że znaczne zwiększenie ilości bakterii w mieszaninie inkubacyjnej spowoduje zwiększenie stężenia NADP, bez dodatkowego wprowadzania tego koenzymu, co umożliwi przekształcenie promutagenów obecnych w ekstraktach pyłów w aktywne mutageny.

Test ten wykonano podobnie do testu II, z tą różnicą, że wprowadzono do niego 0,1 cm³ zawiesiny bakterii 10-krotnie zagęszczonych (1·10⁹ komórek/0,1 cm³).

5.4.5.4. Klasyczny test *Salmonella* ze zwiększoną ilością bakterii (IV)

Wprowadzenie większej ilości komórek bakteryjnych do testu może przyczynić się do zwiększenia jego czułości na obecne w badanych próbkach zanieczyszczenia o charakterze mutagennym.

Modyfikacja tego testu, w stosunku do metody klasycznej (I), polegała na wprowadzaniu 10-krotnie zagęszczonych bakterii w ilości $0,1 \text{ cm}^3$ ($1 \cdot 10^9$ komórek/ $0,1 \text{ cm}^3$). Test wykonywano zgodnie z procedurą klasyczną.

5.4.5.5. Klasyczny test *Salmonella* z preinkubacją prowadzoną w temperaturze 37°C (V) i 30°C (VI)

Określano wpływ czasu preinkubacji na efekt mutageny ekstraktów pyłów zawieszonych. Badania prowadzono na jednym wybranym stężeniu próbki pobranej w lecie i zimą, stężenia te podano w tabeli 7.

Tabela 7. Stężenia prób letnich i zimowych dla poszczególnych szczepów oraz stężenia frakcji FA i FB stosowane w teście preinkubacyjnym prowadzonym w temperaturze 37°C i 30°C

Szczep	Zima		Lato		Zima		Lato	
	FA [%]	Stężenie próbki [$\text{m}^3/\text{płytkę}$]	FA [%]	Stężenie próbki [$\text{m}^3/\text{płytkę}$]	FB [%]	Stężenie próbki [$\text{m}^3/\text{płytkę}$]	FB [%]	Stężenie próbki [$\text{m}^3/\text{płytkę}$]
TA98	6	1,56	6	12,5	9	1,56	9	12,5
T 100	6	25	3	100	9	25	9	100
YG1041	3	0,195	3	1,56	6	0,195	6	1,56
YG1042	3	0,78	3	25	6	0,78	6	25

Na płytkę nanoszono taką ilość ekstraktu, która w badaniach prowadzonych z buforem w klasycznym teście *Salmonella* dawała około dwukrotnie większą liczbę rewertantów w stosunku do liczby rewertantów otrzymanych w drodze mutacji spontanicznej.

W klasycznej procedurze testu (bez preinkubacji) wprowadza się od razu wszystkie składniki próby, co powoduje natychmiastowe rozcieńczenie badanego materiału. Natomiast w teście preinkubacyjnym rozcieńczenie badanych związków następuje dopiero po określonym czasie inkubacji. Testowe szczepy są więc ekspozowane na związki chemiczne w małej objętości buforu lub frakcji S9-mix przez określony czas, zanim dodany zostanie do nich Top-agar i zanim zostaną wylane na podłoże minimalne Vogel-Bonnera. Ponadto, test ten może być bardziej wrażliwy na nietrwałe mutagenne metabolity, które mają większą szansę na reakcje z DNA testowych szczepów w małej objętości mieszaniny reakcyjnej i w większym stężeniu frakcji mikrosomalnej niż na płycie Petriego [143].

Testy z preinkubacją prowadzono zgodnie z metodą opisaną przez Matsushima i in. [134], stosując różny czas preinkubacji: 10, 20, 30 i 40 minut. Preinkubację prowadzono w łaźni wodnej w temperaturze 37 °C lub 30 °C, mieszając próby z częstotliwością 240 wahań/minutę. Jednocześnie z badanymi próbami przeprowadzono badania kontrolne, które uwzględniały zmiany liczby rewertantów spontanicznych w trakcie preinkubacji.

Za mutagenne uznawano takie stężenie próby, które powodują co najmniej dwukrotny wzrost poziomu mutacji (współczynnik *MR*) w stosunku do poziomu mutacji spontanicznej charakterystycznej dla badanych szczepów i odpowiedniego czasu preinkubacji.

5.4.5.6. Test *Salmonella* w modyfikacji Kado (VII)

Test ten daje możliwość określenia mutagenności ekstraktów pyłów z wykorzystaniem niewielkiej ilości badanego materiału (do testu wprowadza się 20 razy mniej badanej próbki). Skład mieszaniny reakcyjnej jest taki sam jak w klasycznym teście (I), natomiast zmienione są proporcje między poszczególnymi składnikami. Do próbki wprowadza się 0,1 cm³ buforu fosforanowego lub frakcji mikrosomalnej, 0,1 cm³ 10-krotnie zagęszczonych bakterii ($1 \cdot 10^9$ komórek/0,1 cm³) i 0,005 cm³ badanego ekstraktu. Całkowita objętość mieszaniny wynosi 0,205 cm³. Dodatkowo testowe szczepy bakterii eksponowane są na badane związki chemiczne w małej objętości przez 90 minut w temperaturze 37 °C i mieszane w łaźni wodnej z częstotliwością 240 wahań/minutę. Modyfikacja ta jest bardzo ekonomiczna nie tylko ze względu na możliwość korzystania z niewielkiej ilości badanej próbki, ale również ze względu na 5-krotnie mniejsze zużycie homogenatu wątroby, w tym kosztownego NADP wchodzącego w skład frakcji mikrosomalnej. Testy prowadzono zgodnie z metodą opisaną przez Kado i in. [101].

5.4.5.7. Klasyczny test *Salmonella* w formie Mini z preinkubacją prowadzoną w temperaturze 37 °C (VIII)

Test ten został tak nazwany przez autora pracy. Jest on kompilacją klasycznego testu Amesa z modyfikacją zaproponowaną przez Kado. Mieszanina reakcyjna zawierała wszystkie składniki w takim samym składzie i w takich samych proporcjach jak w teście klasycznym (I), natomiast różniła się od niego końcową objętością, która wynosiła 0,205 cm³, jak w modyfikacji Kado. Objętość badanego ekstraktu pyłów wynosiła 0,03 cm³, objętość frakcji mikrosomalnej lub buforu 0,145 cm³. Do mieszaniny reakcyjnej dodawano 0,03 cm³ niezagęszczonych bakterii. Próby, przed dodaniem Top-agaru, inkubowano w łaźni wodnej przez 90 minut, zgodnie z modyfikacją Kado, intensywnie mieszając z częstotliwością 240 wahań/minutę.

5.4.6. Sposób przedstawienia wyników

Badaną próbkę uznajemy za mutagenną, a więc i potencjalnie kancerogenną, gdy występuje liniowa zależność dawka–odpowiedź (objętość powietrza–liczba kolonii rewertantów) i co najmniej dwukrotny wzrost liczby rewertantów indukowanych w stosunku do liczby rewertantów spontanicznych. Uzyskanie efektu toksycznego na krzywej dawka–odpowiedź w pełni ilustruje biologiczne działanie zanieczyszczeń obecnych w próbce w zależności od jej stężenia [87].

Ze względu na bardzo dużą liczbę danych uzyskanych w trakcie realizacji badań niemożliwe było zaprezentowanie ich wszystkich w niniejszej pracy. Dlatego też zdecydowano się na przedstawienie oceny efektu mutagennego pyłów zawieszonych w postaci współczynnika mutagenności (MR) oraz w postaci mutagenności (M), czyli liczby rewertantów indukowanych przez 1 m³ badanego powietrza.

Współczynnik mutagenności obliczano ze wzoru [143, 200]:

$$MR = \frac{\text{średnia liczba rewertantów indukowanych}}{\text{średnia liczba rewertantów spontanicznych}}$$

Następnie uzyskane współczynniki MR dla zanieczyszczeń obecnych w poszczególnych stężeniach badanego ekstraktu powietrza, zgodnie z kolejnością, z jaką wykonywano rozcieńczenia badanych próbek, przedstawiano w postaci wykresu kolumnowego.

Z kolei mutagenność (M) określano na podstawie najczęściej opisywanej w piśmiennictwie metody Bernstein i in. [14] opartej na maksymalnym prawdopodobieństwie, które zakłada, że efekt mutageny wyrażany jako liczba kolonii rewertantów, dla małych dawek badanych substancji lub ich mieszanin, jest w przybliżeniu liniowy. W doniesieniach literaturowych brak jest jednoznacznej opinii, do jakich danych należy dopasowywać rozkłady, czy dla wyników testu pochodzących ze wszystkich stężeń badanej próbki, czy tylko dla wyników dodatnich. Jednak, ze względu na to, że test *Salmonella* jest testem określającym mutagenność badanej próbki, w który pomija się efekt toksyczny, w badaniach ograniczono się do analizy wyników, pochodzących z początkowej liniowej części krzywej dawka–odpowiedź.

Do wyboru stężeń, dla których otrzymane wyniki liczby kolonii rewertantów na płytkę mają charakter liniowy, zastosowano metodę odrzucania kolejnych danych (ang. *point rejection*), poczynając od wyników uzyskanych dla wszystkich zastosowanych stężeń badanego ekstraktu. Do oceny dopasowania otrzymanych wyników do założonego modelu liniowej zależności dawka–odpowiedź zastosowano metodę najmniejszych kwadratów. Dla każdego ekstraktu obliczano równanie wyrażone funkcją:

$$y = B_0 + B_1x$$

gdzie: y – oczekiwana liczba rewertantów, x – badane stężenia ekstraktu powietrza, B_0 – liczba rewertantów w kontroli negatywnej, B_1 – nachylenie krzywej badanej zależności.

Tabela 8. Charakterystyka przeprowadzonych testów

Nr testu	Nazwa testu	Mieszanina reakcyjna						Czas preinkubacji [min]					
		Objętość mieszaniny reakcyjnej [μl]	Objętość ekstraktu pyłów [μl]	Objętość frakcji S9-mix lub buforu [μl]	Obecność NADP	Objętość bakterii [μl]		0	10	20	30	40	90
						1·10 ⁹ / cm ³	1·10 ¹⁰ / cm ³						
I	Klasyczny	700	100	500	+	100							
II	Klasyczny bez NADP	700	100	500		100							
III	Klasyczny bez NADP ze zwiększoną ilością bakterii	700	100	500			100						
IV	Klasyczny ze zwiększoną ilością bakterii	700	100	500	+		100						
V	Klasyczny z preinkubacją w 37 °C	700	100	500	+	100		+	+	+	+	+	
VI	Klasyczny z preinkubacją w 30 °C	700	100	500	+	100		+	+	+	+	+	
VII	Klasyczny w modyfikacji Kado	205	5	100	+		100						+
VIII	Klasyczny z preinkubacją w formie Mini	205	30	145	+	30							+

Na podstawie parametrów równania obliczano przewidywaną liczbę kolonii rewertantów indukowanych przez 1 m³ powietrza. W pierwszym kroku dopasowywano prostą regersji do wszystkich wyników. Jeżeli współczynnik B_1 był ujemny, to odrzucano kolejne wyniki, poczynawszy od największych badanych stężeń aż do momentu kiedy wartość współczynnika B_1 była dodatnia. Wyniki przedstawiono w postaci tabel, w których oprócz mutagenności (M) podano otrzymane równania prostej regresji i wartości statystyki R^2 informujące o stopniu dopasowania prostych regresji do danych doświadczalnych.

Współczynniki korelacji pomiędzy wartościami poszczególnych badanych parametrów obliczano na podstawie nieparametrycznego testu Spearmana [49, 50, 51].

Wszystkie analizy, obliczenia i wykresy zostały wykonane za pomocą programu OriginPro 7,5 i Statistica 6.

5.5. Porównanie wybranych procedur testu na ekstraktach pyłów pobranych w trzech punktach miasta

Badano próbki pyłów 1, 2, 3, 4 i 5, stosując klasyczny test *Salmonella*, test preinkubacyjny w temperaturze 37 °C z 20-minutową preinkubacją oraz test w modyfikacji Kado. Badania te (trzeci etap pracy) prowadzono w celu porównania przydatności wybranych procedur testu do określania mutagenności pyłowych zanieczyszczeń powietrza. Badania prowadzono na szczepach TA98 i YG1041. Zarówno wymienione testy, jak i szczepy dawały najlepsze wyniki w badaniach nad mutagennością pyłowych zanieczyszczeń powietrza pobranych zimą i latem na Starym Mieście (pierwszy i drugi etap pracy).

6. Omówienie wyników badań

6.1. Pobór i analiza chemiczna próbek pyłów

Stężenia pyłu zawieszonego frakcji PM₁₀ stwierdzone na wybranych, czterech stanowiskach badawczych we Wrocławiu w latach 2002–2007 wahały się w zakresie od 38,33 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ do 138,93 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, natomiast stężenia zaadsorbowanych na pyłe zawieszonym związków organicznych (substancje smołowe) wahały się w zakresie od 7,56 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ do 145,15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (tab.9). Stężenia pyłu zawieszonego i zaadsorbowanych na nim zanieczyszczeń organicznych były znacznie większe zimą niż latem i wiosną. Wartości odniesienia dla okresu 24 godzinowego wynoszą 125 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ w przypadku stężenia pyłu PM₁₀ i 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ dla substancji smołowych (DzU 55/98, poz. 355).

Tabela 9. Zestawienie danych dotyczących poboru próbek pyłów frakcji PM₁₀

Rodzaj próbki	Czas poboru [h]	Objętość powietrza [m ³]	Masa pyłów [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]	Masa substancji smołowych [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]
Zima (Stare Miasto)	960	122 326,0	57,8428	17,57
Lato (Stare Miasto)	1669	161 004,0	43,737	7,56
Lato (ul. Strachocińska) (1)	67	4 542,6	57,17	19,90
Lato (pl. Grunwaldzki) (2)	96	6 474,9	38,33	26,68
Zima (ul. Strachocińska) (3)	119	8 035,0	138,93	145,15
Zima (pl. Grunwaldzki) (4)	105	7 069,0	87,32	51,04
Wiosna (ul. Norwida) (5)	192	13 119,9	46,99	34,76

Zestawienie danych dotyczących próbek pyłów pobieranych w okresie zimowym i letnim na Starym Mieście wskazują na różnicę w ilości uzyskanych pyłów i wyekstrahowanych substancji smołowych. Ilość uzyskanych pyłów w okresie zimowym stanowiła 132% w stosunku do ilości pyłów pobranych w okresie letnim, natomiast ilość substancji smołowych w próbce pobranej zimą wynosiła 232% w stosunku do próbki pobranej latem. Z kolei w przypadku próbek badanych w trzecim etapie pracy stwierdzono ok. 2,5 razy więcej ilości pyłów w próbkach pobranych zimą niż w próbkach

pobieranych, na tych samych stanowiskach, w lecie. Ilości oznaczonych pyłów mieściły się w granicach $38,33 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (2) – $138,93 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (3). Z kolei ilości substancji smołowych wahały się od $19,9 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (1) do $145,15 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (3). Na stanowisku trzecim stwierdzono największe ilości zanieczyszczeń pyłowych i substancji smołowych, wynosiły one w zimie $138,93 \mu\text{g}/\text{m}^3$ i $145,15 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Stanowisko to zlokalizowane było na peryferiach miasta w miejscu o natężonym ruchu komunikacyjnym, gdzie przez cały rok stosuje się w dużym stopniu paleniska domowe. Próbkę pyłów pobierana w okresie wiosennym na wysokości drugiego piętra zawierała $46,99 \mu\text{g}/\text{m}^3$ zanieczyszczeń pyłowych i $34,76 \mu\text{g}/\text{m}^3$ substancji smołowych.

Ogółem w ekstraktach pyłowych zanieczyszczeń powietrza stwierdzono obecność 16 WWA i ich nitrowych pochodnych (tab. 11 i 12) z 20 (tab. 10) wytypowanych do analizy na podstawie danych z piśmiennictwa i możliwości badawczych. Wybrano takie związki chemiczne, które są najczęstszym składnikiem zanieczyszczeń powietrza i mają niekorzystny wpływ na zdrowie ludzi [178, 188, 219].

Tabela 10. Kancerogenność analizowanych WWA i nitroWWA

Związek chemiczny	Skrót	Numer CAS ^a	Kancerogenność ^b	Względny współczynnik kancerogenności k^c
Fenantren	Fen	85-01-8	3	0,001
Antracen	A	120-12-7	3	0,01
Fluoranten	Flu	86-73-7	3	0,001
Piren	Pyr	129-00-0	3	0,001
Benzo[a]antracen	B[a]A	56-55-3	2A	0,1
Chryzen	Chr	218-01-9	3	0,01
Benzo[b]fluoranten	B[b]F	205-99-2	2B	0,1
Benzo[k]fluoranten	B[k]F	207-08-9	2B	0,1
Benzo[a]piren	B[a]P	50-32-8	2A	1
Dibenzo[a,h]antracen	D[a,h]A	53-70-3	2A	5
Benzo[g,h,i]perylen	B[g,h,i]P	191-24-2	3	0,01
Indeno[1,2,3-c,d]piren	I[1,2,3-c,d]P	193-39-5	2B	0,1
1-nitronaftalen	–	86-57-7	3	–
2-nitrofluoren	–	607-57-8	2B	–
9-nitroantracen	–	602-60-8	3	–
3-nitrofluoranten	–	892-21-7	3	–
1-nitropiren	–	5522-43-0	2B	–
1,3-dinitropiren	–	75321-20-9	3	–
1,6-dinitropiren	–	42397-64-8	2B	–
1,8-dinitropiren	–	42397-65-9	2B	–

^a Chemical Abstract Service registry number.

^b Według IARC: grupa 2A – prawdopodobny kancerogen, grupa 2B – możliwy kancerogen, grupa 3 – niesklasyfikowany jako kancerogen dla ludzi.

^c Względne współczynniki kancerogenności (wg Nisbet i LaGoy) dla poszczególnych WWA w stosunku do B[a]P [178, 188].

Największą ilość zaadsorbowanych na pyłach WWA odnotowano w zimie (tab. 11). Suma wykrytych WWA w tym okresie wahała się w zakresie od 25,824 ng/m³ do 44,192 ng/m³. Z kolei w próbkach pyłów pobranych latem od 2,342 ng/m³ do 7,447 ng/m³, a w próbce pobranej w okresie wiosennym wynosiła 9,778 ng/m³. Wśród obecnych w ekstraktach WWA były trzy (benzo[a]antracen, benzo[a]piren, dibenzo[a,h]antracen) klasyfikowane przez IARC (Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem) jako należące do grupy węglowodorów prawdopodobnie rakotwórczych dla ludzi (2A) (tab. 10) oraz trzy (beno[b]fluoranten, benzo[k]fluoranten], indeno[1,2,3-c,d]piren) zaklasyfikowane do grupy 2B, przypuszczalnie rakotwórczej dla ludzi.

We wszystkich próbkach pyłu stwierdzono obecność benzo[a]pirenu, którego stężenia wahały się w zakresie od 7,98 ng/m³ (zima, Stare Miasto) do 0,438 (2) ng/m³. Dopuszczalne stężenie dla tego węglowodoru dla okresu 24-godzinnego wynosi w Polsce 5 ng/m³ (DzU 55/98, poz. 355). Benzo[a]piren jest związkiem wskaźnikowym, wobec którego oceniana jest siła działania kancerogennego innych WWA [188]. Dla tego związku przyjęto względny współczynnik kancerogenności $k = 1$ (tab. 10). Większą siłą działania kancerogennego odznacza się tylko benzo[a]antracen ($k = 5$), którego obecność stwierdzono również w badanych próbkach. Zawartość benzo[a]pirenu kształtowała się na poziomie 1/5–1/10 sumy zawartości wszystkich WWA. Stanowiło to od 10,26% (4) do 21,9% (1) całkowitego stężenia WWA w badanych ekstraktach.

Tabela 11. Stężenie WWA w organicznych ekstraktach pyłów zawieszonych frakcji PM10

Badany WWA	Stężenie WWA w ekstraktach pyłów [ng/m ³]						
	Zima (Stare Miasto)	Lato (Stare Miasto)	Lato (1)	Lato (2)	Zima (3)	Zima (4)	Wiosna (5)
Fen	3,127	0,855	0,106	0,374	6,252	3,792	1,001
A	0,360	0,044	0,016	0,034	0,856	0,562	0,109
Flu	7,488	1,069	0,270	0,574	4,336	5,314	1,664
Pyr	8,340	0,988	0,150	0,360	11,244	4,58	1,410
B[a]A	3,144	0,286	0,088	0,174	4,24	1,32	0,638
Chr	1,911	0,343	0,120	0,220	3,1	2,28	0,432
B[b]F	2,832	0,955	0,518	0,654	2,8	0,372	0,820
B[k]F	1,702	0,267	0,164	0,222	1,844	0,85	0,300
B[a]P	7,980	0,765	0,514	0,438	7,788	2,65	1,870
D[a,h]A	0,284	0,112	0,242	0,194	0,364	0,224	0,035
B[g,h,i]P	1,776	1,233	0,154	0,366	0,984	2,19	0,762
I[1,2,3-c,d]P	1,726	0,530	n.w.	n.w.	0,384	1,69	0,733
SUMA	40,670	7,447	2,342	3,610	44,192	25,824	9,778

n.w. – nie wykryto

W ekstraktach pyłów określano również zawartość nitrowych pochodnych WWA (tab. 12). Suma stężeń tych związków wahała się w granicach od 7,05 ng/m³ (3) do 0,29 ng/m³ (2). W próbkach nie stwierdzono występowania badanych dinitrowy WWA w granicach ich oznaczalności (tab. 2). Stwierdzono natomiast występowanie mono-

nitropochodnych WWA, wśród których obecne były należące do grupy 2B (tab. 10) 2-nitrofluoren i 1-nitopiren, 2-nitrofluoren występował we wszystkich badanych ekstraktach natomiast obecność 1-nitopirenu stwierdzono tylko w próbkach pobranych zimą i wiosną. Duże ilości 2-nitrofluorenu wykryto w próbkach pobranych w zimie. W tych ekstraktach pyłu stanowił on około połowę zawartości nitroWWA. W próbkach pobranych wiosną (5) i latem (1) jego ilość stanowiła około 38%. W próbce 2, pobranej latem, była to jedyna mononitropochodna wykryta na tym stanowisku. Najwięcej rodzajów związków należących do nitropochodnych WWA wykryto w ekstraktach pyłów pobranych zimą i wiosną. Największe ich stężenie stwierdzono w próbce 3 pobranej zimą na ul. Strachocińskiej. Wynosiło ono 7,05 ng/m³.

Tabela 12. Stężenie nitroWWA w organicznych ekstraktach pyłów zawieszonych frakcji PM10

Badany nitroWWA	Stężenie nitroWWA w ekstraktach pyłów [ng/m ³]						
	Zima (Stare Miasto)	Lato (Stare Miasto)	Lato (1)	Lato (2)	Zima (3)	Zima (4)	Wiosna (5)
1-nitronaftalen	0,58	0,47	0,45	n.w.	0,83	0,45	0,11
2-nitrofluoren	1,88	0,31	0,28	0,29	3,36	1,41	0,24
9-nitroantracen	0,87	0,52	n.w.	n.w.	1,84	0,74	0,12
3-nitrofluoranten	0,5	n.w.	n.w.	n.w.	0,6	0,3	0,11
1-nitopiren	0,48	n.w.	n.w.	n.w.	0,42	0,26	0,05
1,3-dinitropiren	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.
1,6-dinitropiren	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.
1,8-dinitropiren	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.
SUMA	3,43	1,6	0,73	0,29	7,05	3,16	0,63

n.w. – nie wykryto

Poszczególne ekstrakty różniły się między sobą zarówno sumaryczną zawartością, jak i procentowym udziałem poszczególnych WWA i nitroWWA. Na podstawie uzyskanych wyników należy się spodziewać mutagennego działania ekstraktów zanieczyszczeń pyłowych. Ze względu na duże stężenia WWA i nitroWWA stwierdzone w ekstraktach próbek pyłów pobieranych w okresie zimowym próbki te powinny wykazywać większe działanie mutagenne niż ekstrakty pyłów pobranych w lecie.

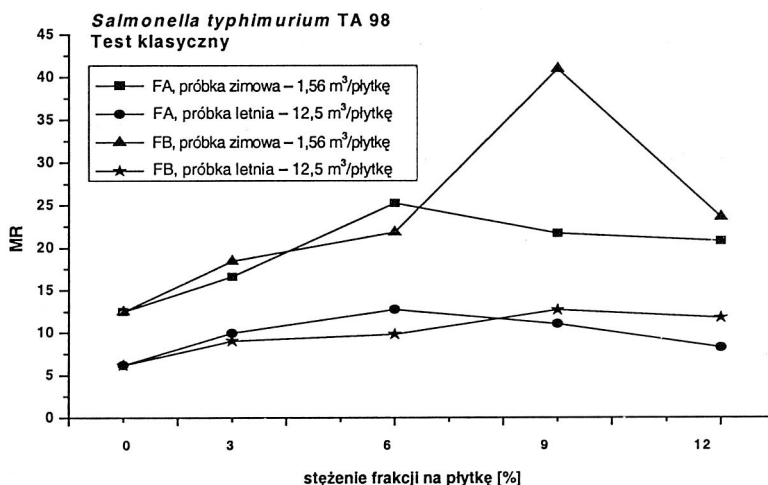
6.2. Ustalenie optymalnego stężenia frakcji dla klasycznej metody testu *Salmonella* i testu w modyfikacji Kado

Ustalano optymalne stężenia frakcji FA i FB w S9-mix wobec wybranych stężeń próbek pobranych zimą i latem na Starym Mieście (tab. 5 i 6). Badania prowadzono testem klasycznym i testem w modyfikacji Kado na czterech szczepach testowych.

W teście klasycznym, w mieszaninie reakcyjnej, badane zanieczyszczenia stanowią 1/5 objętości frakcji S9-mix. W teście Kado wprowadza się 1/20 objętości ekstraktów w stosunku do objętości S9-mix. Dlatego spodziewano się innego optymalnego stężenia frakcji S9 w S9-mix potrzebnego do przeprowadzenia obu tych testów.

Wyniki badań otrzymane dla testu klasycznego przedstawiają rysunki 6, 9, 12 i 15. Na podstawie tych wyników można stwierdzić, iż liczby uzyskiwanych rewertantów poszczególnych szczepów testowych były zależne od stężenia frakcji FA i FB.

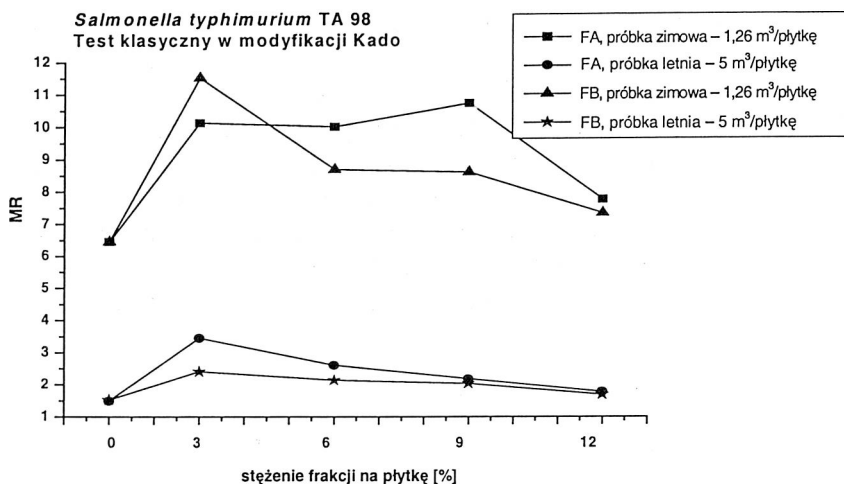
W przypadku szczepu TA98 największą liczbę rewertantów zaobserwowano dla stężenia frakcji FA 6% i dla stężenia frakcji FB 9%, zarówno w testach z ekstraktami pobranymi latem, jak i zimą (rys. 6).



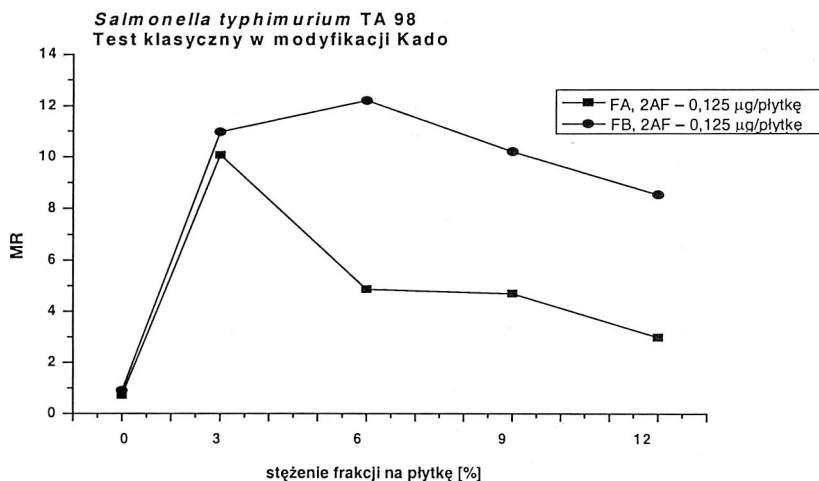
Rys. 6. Zależność *MR* od stężenia FA i FB dla szczepu TA98 (test klasyczny)

Dla szczepu TA100 (rys. 9) badanego w obecności próbki pobranej latem i różnych stężeń frakcji FA otrzymano ciągły wzrost wartości *MR* w badanym zakresie stężeń tej frakcji. Jednak wzrost stężenia tej frakcji powyżej 3% skutkował już niewielkimi zmianami liczby rewertantów (*MR* w granicach od 1,73 dla 3% do 2,11 dla 12%). W przypadku pozostałych ekstraktów obserwowano, podobnie jak w badaniach ze szczepem TA98, występowanie wyraźnego optimum wartości współczynnika *MR* przypadającego na te same stężenia FA (6%) i FB (9%).

Z kolei dla szczepów testowych YG1041 i YG1042 (rys. 12, 15), pomimo znacznych różnic w liczbie uzyskiwanych rewertantów, maksimum *MR* przypadało na mniejsze stężenia frakcji FA, w porównaniu do wyników uzyskanych dla szczepów TA98 i TA100. Wynosiło ono 3% zarówno dla próbki pobranej latem, jak i zimą. Optymalne stężenie frakcji FB, w przypadku obu tych próbek, dla szczepu YG1041 wynosiło 9%, a dla szczepu YG1042 6%. Ze względu na to, iż uzyskiwane współczynniki *MR* dla szczepu YG1041 w obecności 6% i 9% FB nie różniły się aż tak wyraźnie, w dalszych badaniach, ze względów ekonomicznych, stosowano dla tego szczepu 6% stężenie FB.



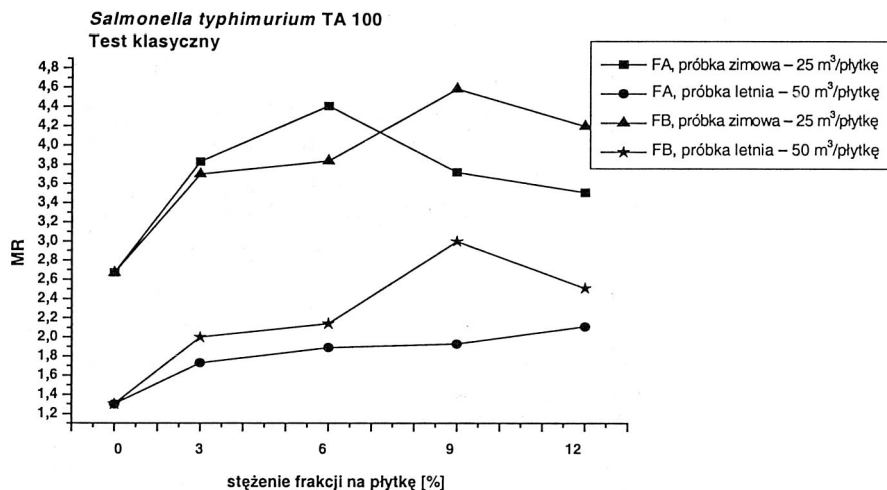
Rys. 7. Zależność *MR* od stężenia FA i FB dla szczepu TA98 (test w modyfikacji Kado)



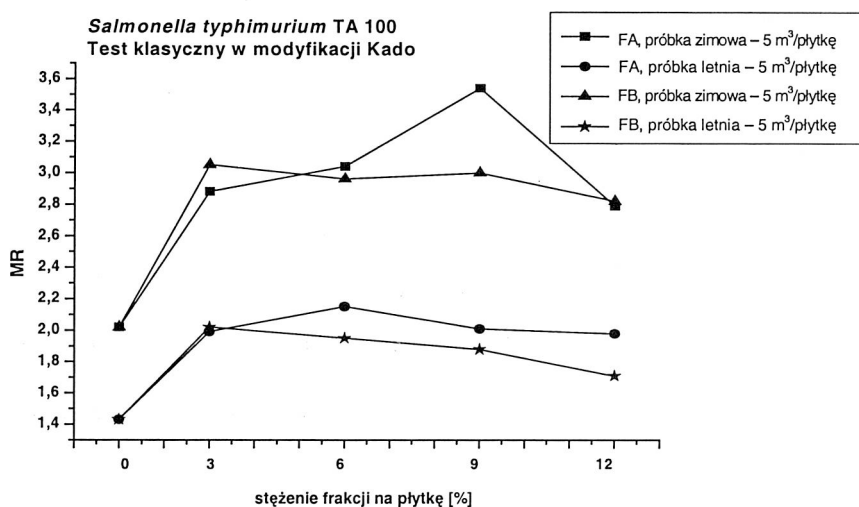
Rys. 8. Zależność *MR* od stężenia FA i FB dla szczepu TA98 w obecności mutagenu pozytywnego

Wyniki badań uzyskane w teście prowadzonym w modyfikacji Kado zamieszczono na rysunkach 7, 10, 13 i 16. Również w tych badaniach liczba uzyskiwanych rewertantów dla poszczególnych szczepów testowych była zależna od stężenia frakcji FA i FB i wykazywała mniej lub bardziej wyraźne maksimum.

W większości przypadków 3% stężenie frakcji FA i FB okazało się wystarczające do przeprowadzenia promutagenów w mutageny bezpośrednie. Tak było dla szczepów TA98, TA100 i YG1041 w badaniach prowadzonych z frakcją FB. Jedynie dla szczepu TA98 (rys. 7), w przypadku próbki pobranej zimą, największy współczynnik *MR* dla frakcji FA uzyskano przy jej 9% stężeniu. Jednak różnica *MR* pomiędzy stężeniem 3% a 9% była bardzo niewielka (*MR* równe odpowiednio 10,2



Rys. 9. Zależność *MR* od stężenia FA i FB dla szczepu TA100 (test klasyczny)



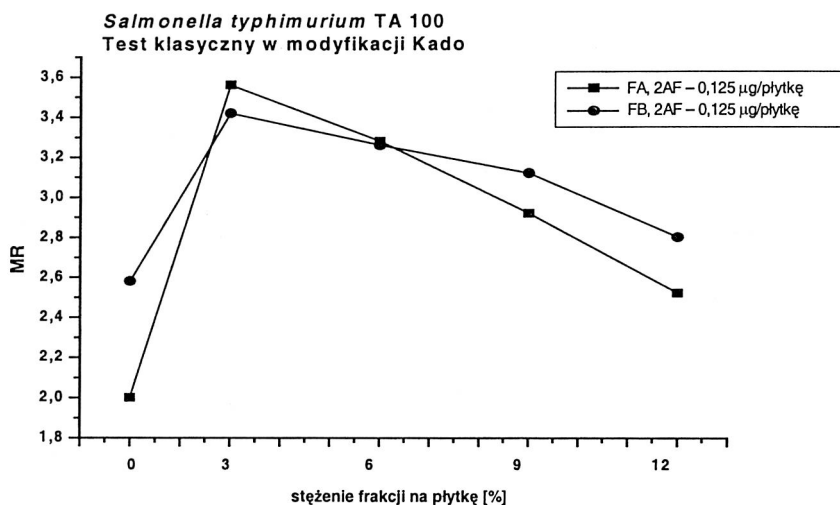
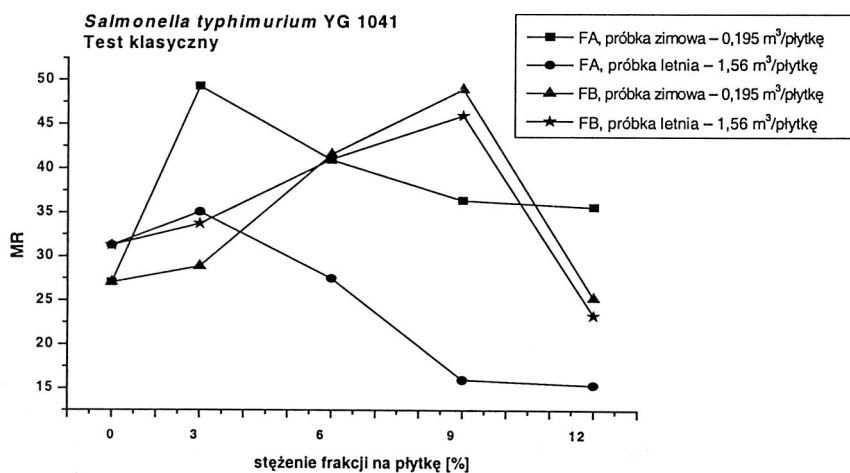
Rys. 10. Zależność *MR* od stężenia FA i FB dla szczepu TA100 (test w modyfikacji Kado)

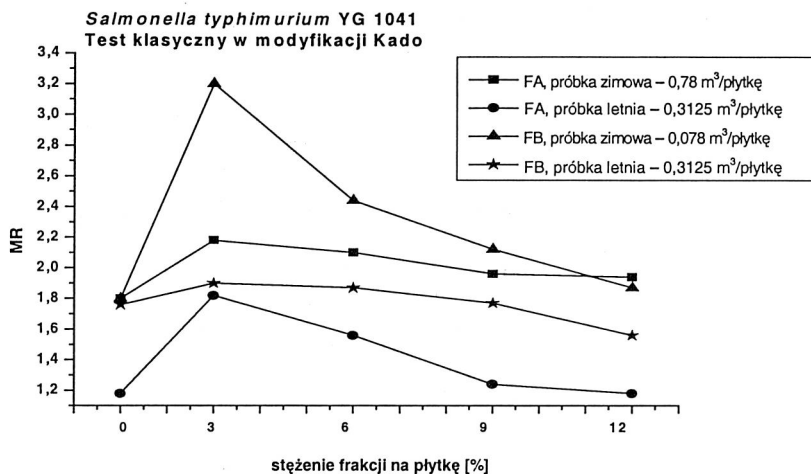
i 10,6). Z kolei w badaniach próbki pobranej zimą ze szczepem TA100 (rys. 10) najlepszym okazało się stężenie 9% frakcji FA, a dla próbki pobranej latem 6% FA. W przypadku szczepu YG1041 (rys. 13) dla obu badanych frakcji optymalne było stężenie 3%. Natomiast w badaniach z frakcją FB ekstraktów zanieczyszczeń pobranych latem i zimą szczepem YG1042 (rys. 16) uzyskano największe wartości współczynnika *MR* dla stężenia wynoszącego 9%. Z kolei dla próbki pobranej w lecie, badanej w obecności frakcji FA, najbardziej optymalne było jej 6% stężenie. Jednak dla tej ostatniej frakcji różnica pomiędzy *MR* dla stężenia 6% ($MR = 1,28$) i 3% ($MR = 1,25$) była niewielka.

W tabeli 13 podano wartości stężeń frakcji FA i FB wybrane do dalszych badań.

Tabela 13. Stężenia frakcji FA i FB wybrane do dalszych badań

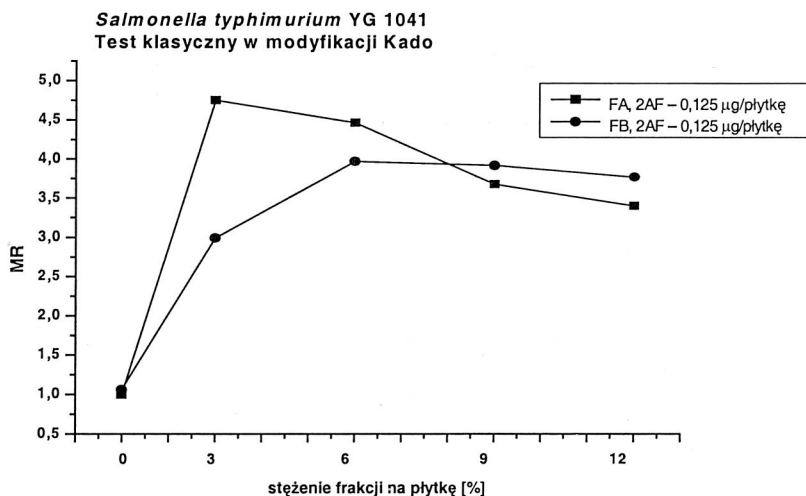
Szczep	Zima Stare Miasto		Lato Stare Miasto		Zima Stare Miasto		Lato Stare Miasto	
	FA [%]	FA [%]	FA [%]	FA [%]	FB [%]	FB [%]	FB [%]	FB [%]
	Klasyczny	Kado	Klasyczny	Kado	Klasyczny	Kado	Klasyczny	Kado
TA98	6	3	6	3	9	3	9	3
T100	6	9	3	6	9	3	9	3
YG1041	3	3	3	3	6	3	6	3
YG1042	3	3	3	3	6	9	6	9

Rys. 11. Zależność *MR* od stężenia FA i FB dla szczepu TA100 w obecności mutagenu pozytywnegoRys. 12. Zależność *MR* od stężenia FA i FB dla szczepu YG1041 (test klasyczny)



Rys. 13. Zależność *MR* od stężenia FA i FB dla szczepu YG1041 (test w modyfikacji Kado)

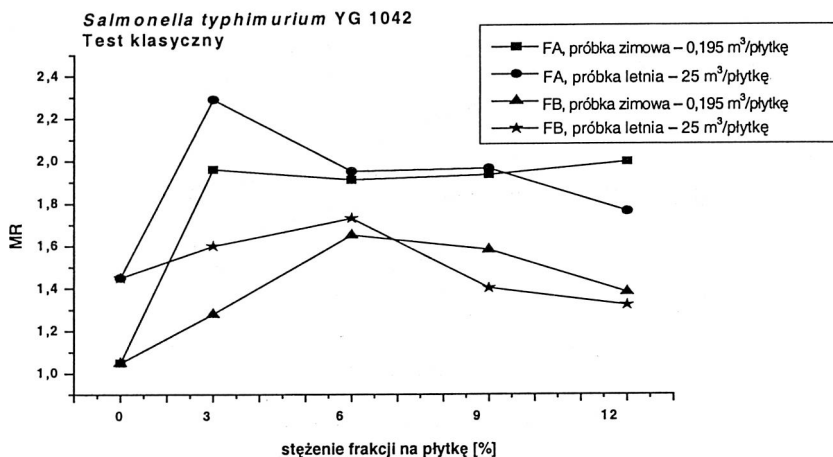
Jednocześnie prowadzono badania testem w modyfikacji Kado zależności liczby rewertantów od stężenia frakcji FA i FB dla następujących, wybranych, mutagenów diagnostycznych: 2AF dla szczepów TA98, TA100 i YG1041 oraz 2AA dla szczepu YG1042 w stężeniu 0,125 µg na płytke (rys. 8, 11, 14, 17).



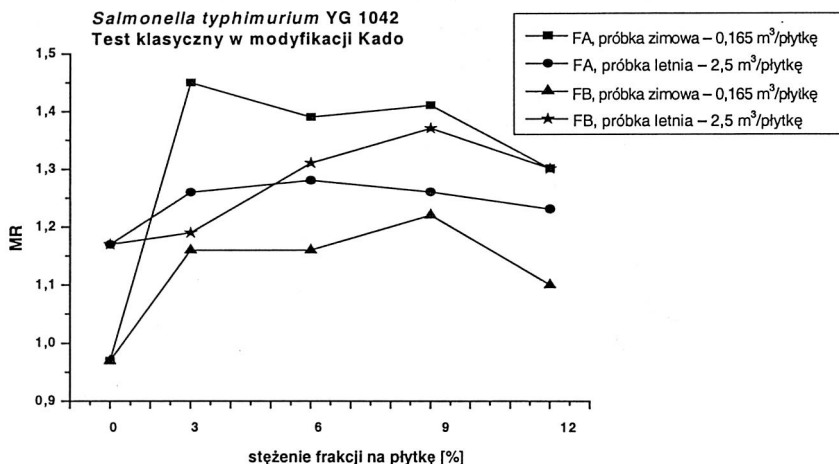
Rys. 14. Zależność *MR* od stężenia FA i FB dla szczepu YG1041 w obecności mutagenu pozytywnego

Wyniki uzyskane dla frakcji FA wykazały istnienie wyraźnego maksimum współczynnika *MR* dla stężenia frakcji wynoszącego 3%. Dalsze zwiększanie stężenia tej frakcji mikrosomalnej w teście wpływało na wyraźne zmniejszenie współczynnika

MR. W przypadku frakcji FB maksimum *MR* osiągano dla różnych stężeń: szczep TA98 – 6%, TA100 – 3%, YG1041 – 6%, a YG1042 – 9%.

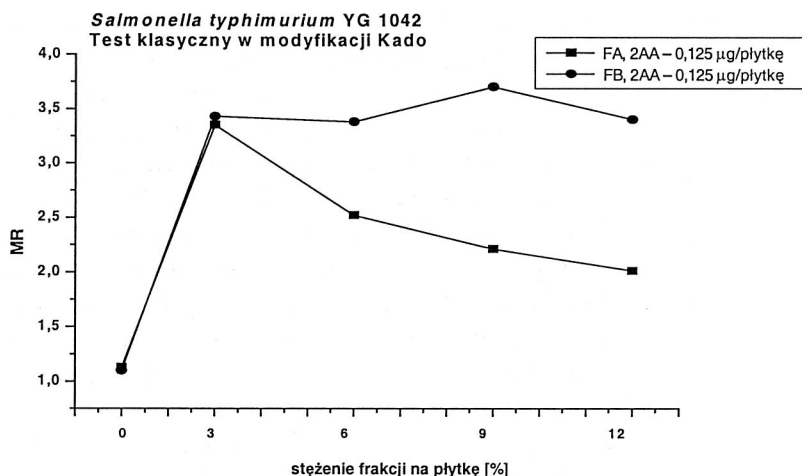


Rys. 15. Zależność *MR* od stężenia FA i FB dla szczepu YG1042 (test klasyczny)



Rys.16. Zależność *MR* od stężenia FA i FB dla szczepu TAYG1042 (test w modyfikacji Kado)

Uzyskane wyniki wskazują na konieczność każdorazowego doboru optymalnego stężenia frakcji mikrosomalnej wprowadzanej do testu. W przypadku frakcji FA dobór ten można prowadzić na podstawie mutagenu pozytywnego, ponieważ wyznaczone optymalne stężenie FA dla 2AF i 2AA pokryło się z optymalnym stężeniem FA wyznaczonym dla badanych ekstraktów pyłowych zanieczyszczeń. Jednak w przypadku frakcji FB należy wyznaczać jej optymalne stężenie wprowadzane do testu na podstawie badanej próby lub innego mutagenu diagnostycznego.



Rys.17. Zależność MR od stężenia FA i FB dla szczepu YG1042 w obecności mutagenu pozytywnego

6.3. Wpływ modyfikacji klasycznego testu *Salmonella* na rezultaty badań

Badania prowadzono z udziałem pyłowych zanieczyszczeń powietrza pobranych zimą i latem na Starym Mieście. Testy wykonano na czterech szczepach bez aktywacji metabolicznej i z aktywacją metaboliczną frakcją mikrosomalną FA i FB. Wyjściowe ekstrakty pyłów stosowano w testach tak, aby na płytce wprowadzić ilości ekstraktów pochodzące z różnych objętości badanego powietrza, w zależności od wprowadzonej modyfikacji. Ekstrakty zanieczyszczeń przebadano w ośmiu testach różniących się procedurą badawczą:

- Test I – test klasyczny *Salmonella* stanowiący punkt odniesienia dla rezultatów uzyskanych w innych testach.

- Test II – test klasyczny *Salmonella* bez udziału NADP w składzie frakcji S9-mix miał odpowiedzieć na pytanie czy do transformacji promutagenów w aktywne mutageny wystarczający jest naturalny poziom tego koenzymu występujący we frakcji mikrosomalnej.

- Testy ze zwiększoną ilością bakterii: test III – test klasyczny *Salmonella* bez udziału NADP z 10-krotnie zwiększoną ilością bakterii i test IV – test klasyczny *Salmonella* z 10-krotnie zwiększoną ilością bakterii prowadzono w celu sprawdzenia czy zwiększenie ilości komórek bakteryjnych w mieszaninie reakcyjnej, w stosunku do ilości zanieczyszczeń obecnych w badanych ekstraktach, wpłynie na zwiększenie jego czułości.

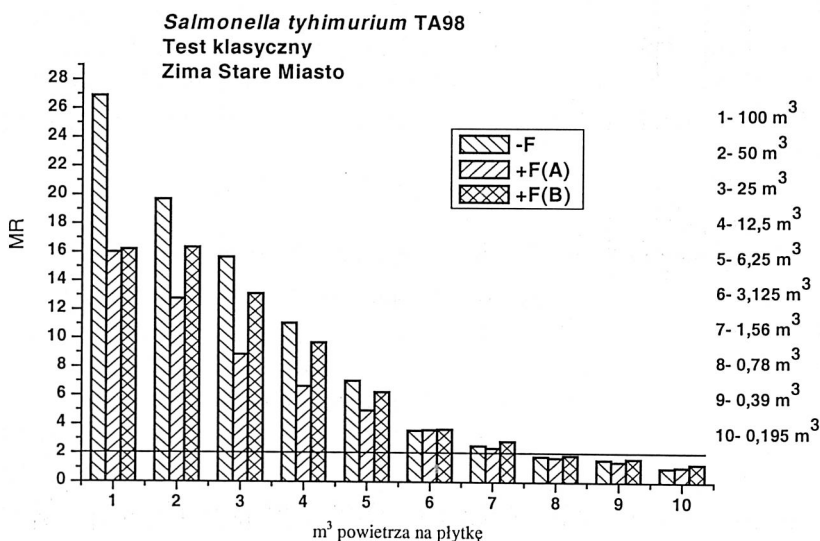
• Testy z preinkubacją: test V – test klasyczny *Salmonella* z preinkubacją w 37 °C i test VI – test klasyczny *Salmonella* z preinkubacją w 30 °C miały na celu odpowiedzieć na pytanie, jaka temperatura i jaki czas kontaktu badanych zanieczyszczeń ze szczepami testowymi w małej objętości mieszaniny reakcyjnej będą najbardziej optymalne w wykrywaniu mutagennego działania pyłowych zanieczyszczeń powietrza.

• Testy ze zmniejszoną ilością materiału badawczego: test VII – test klasyczny *Salmonella* w modyfikacji Kado i test VIII – test klasyczny *Salmonella* z preinkubacją w formie Mini. Test w modyfikacji Kado pozwala wykrywać efekt mutagenny w małej objętości badanej próbki przy 10-krotnie zwiększonej ilości bakterii oraz przy zmienionych proporcjach pomiędzy poszczególnymi składnikami mieszaniny reakcyjnej. Wprowadzenie własnej modyfikacji testu klasycznego w formie Mini miało na celu uzyskanie informacji czy zmniejszenie ilości materiału badawczego, z zachowaniem takiej samej proporcji między wszystkimi składnikami mieszaniny reakcyjnej jak w teście klasycznym i wprowadzeniu dodatkowej 90-minutowej preinkubacji w temperaturze 37 °C, wpłynie na skuteczniejsze wykrywanie efektu mutagennego zanieczyszczeń pyłowych.

6.3.1. Wyniki testów z udziałem szczepu *Salmonella typhimurium* TA98

Test klasyczny *Salmonella* (test I)

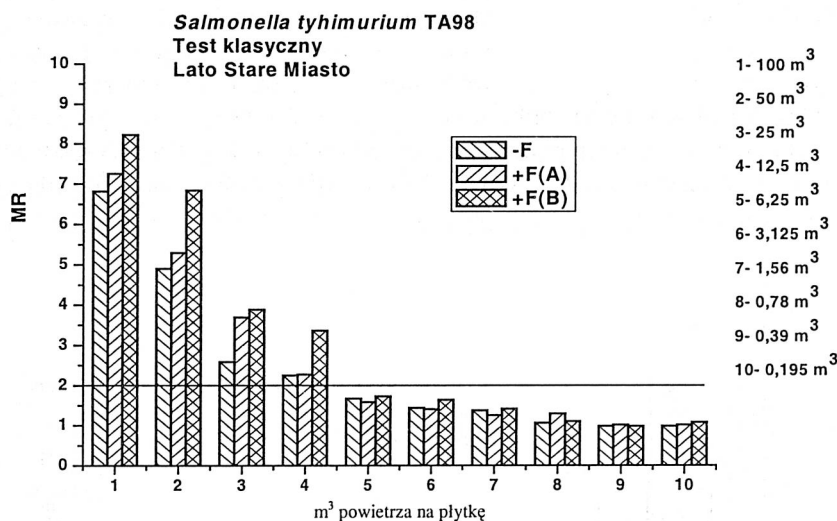
Badania prowadzono, dodając na płytki ekstrakty zanieczyszczeń pochodzące z zakresu od 100 m³ do 0,195 m³ powietrza. W teście tym nie uzyskano efektu toksycznego



Rys. 18. Współczynniki MR dla szczepu TA98 uzyskane w teście klasycznym dla próbki pobranej zimą

w największym badanym stężeniu zanieczyszczeń powietrza. Zaobserwowano jedynie zwiększone liczby rewertantów (*LR*) wraz ze zwiększeniem stężenia związków chemicznych obecnych w badanych próbkach. Większe *MR* uzyskano w badaniach w obecności frakcji FB w porównaniu do badań w obecności frakcji FA (rys. 18, 19).

Największe wartości współczynnika *MR* ($MR = 26,88$ przy $100 \text{ m}^3/\text{płytkę}$) uzyskano dla ekstraktu próbki pobieranej w okresie zimowym badanej bez udziału frakcji (–F). Ekstrakt ten zawierał więc większą liczbę mutagenów bezpośrednich typu zmiany fazy odczytu niż mutagenów pośrednich. Zdecydowanie mniejsze ($MR = 16,01$ dla FA i $MR = 16,19$ dla FB przy $100 \text{ m}^3/\text{płytkę}$), lecz zbliżone do siebie wartości *MR*, choć większe dla frakcji FB, uzyskano w testach przeprowadzonych w obecności obu frakcji mikrosomalnych. Dowodzi to, że enzymy obu frakcji wykazywały podobną aktywność w przekształcaniu promutagenów w mutageny bezpośrednie. Najmniejsze stężenie ekstraktu próbki zimowej, które we wszystkich testach (–F, FA, FB) wywołało efekt mutageny ($MR \geq 2$), wynosiło $1,56 \text{ m}^3/\text{płytkę}$. Z kolei wartości mutagenności *M* (tab. 14), czyli liczby rewertantów indukowanych przez 1 m^3 badanego powietrza, były największe w obecności frakcji FB ($M = 89 \text{ rew./m}^3$) i frakcji FA ($M = 83 \text{ rew./m}^3$) w porównaniu do badań wykonywanych bez udziału frakcji S9 ($M = 69 \text{ rew./m}^3$).



Rys. 19. Współczynniki *MR* dla szczepu TA98 uzyskane w teście klasycznym dla próbki pobranej latem

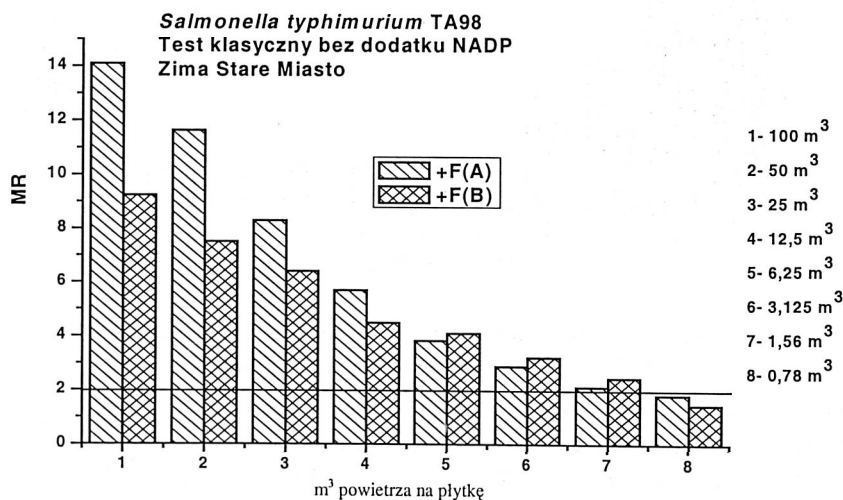
Ekstrakt próbki pobranej w okresie letnim charakteryzował się mniejszym współczynnikiem *MR* w stosunku do wyników, jakie uzyskano dla próbki pobranej w zimie. Dotyczyło to zwłaszcza współczynnika *MR* ($MR = 6,81$ przy $100 \text{ m}^3/\text{płytkę}$) uzyskanego w teście bez frakcji (–F). Jest to uzasadnione, ponieważ w próbce pobranej w okresie letnim stwierdzono mniejszą koncentrację pyłów i mniejsze ilości badanych

WWA oraz ich nitrowych pochodnych (tab. 9, 11, 12). W przypadku tego ekstraktu większy współczynnik MR ($MR = 7,25$ dla FA i $MR = 8,22$ dla FB przy $100 \text{ m}^3/\text{płytkę}$) uzyskano w badaniach z frakcją mikrosomalną, świadczące o przewadze związków o charakterze promutagenów. Podobnie jak dla próbki pobranej zimą współczynnik MR był większy dla frakcji FB. Najmniejsze stężenie ekstraktu pyłów pobieranych w lecie, które wywoływało efekt mutageny, w badaniach prowadzonych bez frakcji i z obu frakcjami, zawierało zanieczyszczenia pochodzące z $12,5 \text{ m}^3$ powietrza. Wyniki badań przedstawione w postaci mutagenności dla próbki pobranej latem były zbliżone (tab. 14). Największą mutagenność otrzymano w rezultacie badań prowadzonych z frakcją FA ($M = 54 \text{ rew./m}^3$) i FB ($M = 48 \text{ rew./m}^3$). W przypadku testu prowadzonego bez udziału frakcji mutagenność wynosiła 41 rew./m^3 .

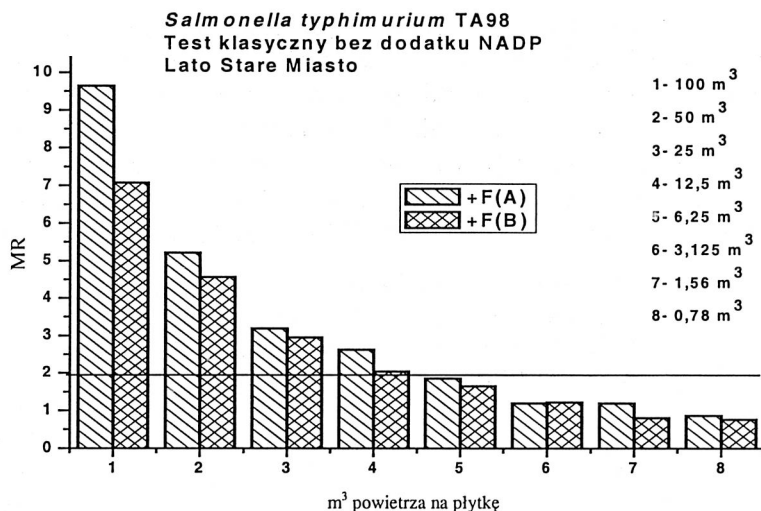
Test klasyczny *Salmonella* bez udziału NADP (test II)

Test klasyczny bez obecności NADP prowadzono, dodając na płytki ekstrakty zanieczyszczeń pochodzące z zakresu od 100 m^3 do $0,78 \text{ m}^3$ powietrza. W badanym zakresie stężeń zanieczyszczeń, z wyjątkiem próbki pobranej w lecie, w teście przeprowadzonym z aktywacją metaboliczną frakcją FA, otrzymano nieco mniejszą liczbę rewertantów niż w teście klasycznym (rys. 20, 21).

Zarówno dla próbki pobranej zimą, jak i latem nie stwierdzono efektu toksycznego w największym badanym stężeniu zanieczyszczeń powietrza. Obserwowano jedynie zmniejszenie się współczynnika MR wraz ze zmniejszeniem stężenia badanych próbek. Zdecydowanie większą liczbę rewertantów stwierdzono dla ekstraktu próbki pobranej zimą w porównaniu do próbki pobranej latem. Większy współczynnik MR uzyskano w badaniach prowadzonych z udziałem enzymów frakcji FA. Wartość MR , przy stężeniu zanieczyszczeń pochodzącym ze 100 m^3 , dla próbki pobranej zimą w teście z tą frakcją wynosiła $14,09$, a dla próbki pobranej latem $9,64$. W przypadku testów



Rys. 20. Współczynniki MR dla szczepu TA98 uzyskane w teście klasycznym bez NADP dla próbki pobranej zimą



Rys. 21. Współczynniki *MR* dla szczepu TA98 uzyskane w teście klasycznym bez NADP dla próbki pobranej latem

z frakcją FB współczynnik *MR* wynosił odpowiednio 9,23 i 7,07. Wynika z tego, że do pełnej aktywności enzymów mikrosomalnych frakcji FB potrzebna jest w większym stopniu obecność koenzymu NADP. Dla próbki pobranej zimą, badanej w obecności FA, mutagenność *M* wynosiła 53 rew./m³, a w obecności FB 88 rew./m³. Z kolei w przypadku próbki pobranej w lecie mutagenność wynosiła odpowiednio 33 rew./m³ i 49 rew./m³ (tab. 14). Liczba rewertantów indukowanych przez 1 m³ badanego powietrza była więc większa w przypadku badań prowadzonych z enzymami frakcji FB.

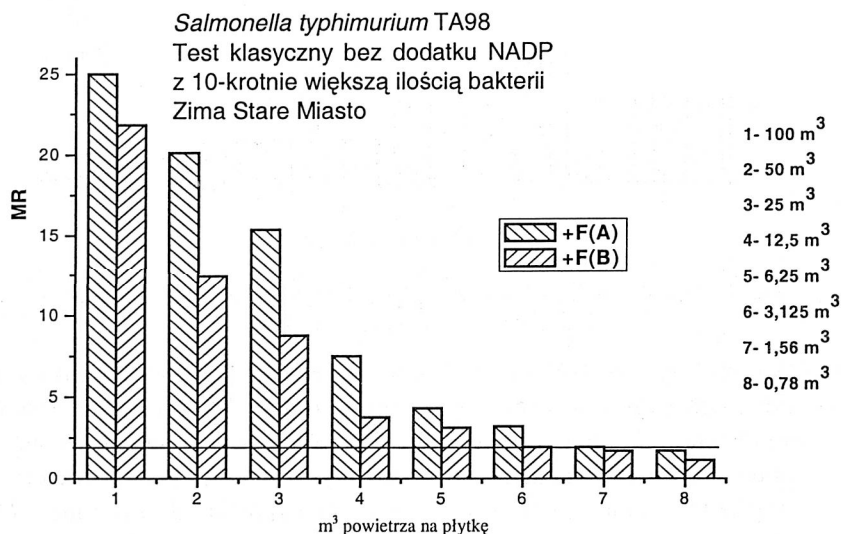
Najmniejsze stężenia, które dawały efekt mutageny ($MR \geq 2$), dla ekstraktu próbki pobieranej zimą, wynosiły zarówno dla frakcji FA, jak i dla frakcji FB 1,56 m³/płytkę (tak jak w teście I). Dla próbki pobieranej latem stężenie progowe wynosiło 12,5 m³/płytkę, dla badań w obecności obu frakcji. Było więc takie samo jak w przypadku testu klasycznego (I).

Test klasyczny *Salmonella* bez udziału NADP ze zwiększoną ilością bakterii (III)

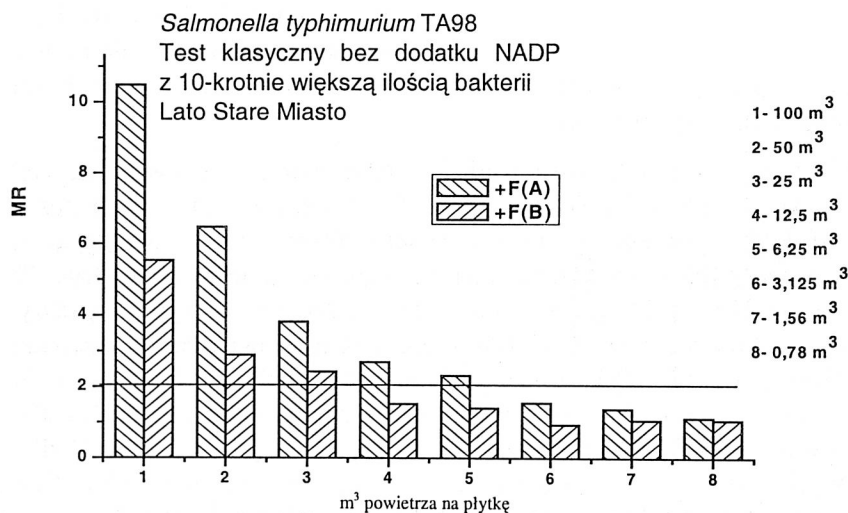
Wyniki uzyskane dla klasycznego testu *Salmonella* prowadzonego bez udziału NADP z 10-krotnie zwiększoną ilością bakterii również nie pozwoliły wyznaczyć efektu toksycznego dla największego badanego stężenia zanieczyszczeń (rys. 22, 23).

Test ten, podobnie jak poprzedni, prowadzono, dodając na płytki ekstrakty zanieczyszczeń pochodzące z zakresu od 100 m³ do 0,78 m³ powietrza. W przypadku tego testu uzyskano również mniejszą liczbę *LR* dla próbki pobranej latem w porównaniu do próbki pobranej zimą. Wartości współczynnika *MR*, jakie otrzymano dla badań prowadzonych z frakcją FA, podobnie jak w teście II, były większe niż dla badań prowadzonych z frakcją FB. Co potwierdza spostrzeżenie, że w składzie frakcji FB bardziej potrzebny jest NADP. Może to wynikać z większej aktywności enzymów wchodzących w skład tej frakcji. Dodanie większej ilości bakterii spowodowało

znaczny wzrost wartości współczynnika MR w przypadku próbki zimowej i nieznaczny w przypadku próbki letniej, badanej w obecności frakcji FA, w porównaniu do testu I i II. Z kolei test przeprowadzany z frakcją FB w obecności ekstraktu zanieczyszczeń pobranych w lecie wykazał zmniejszenie MR w porównaniu do poprzednich testów. Otrzymano również dużo większą mutagenność M (tab. 14). Liczba rewertantów indukowanych przez 1 m^3 badanego powietrza wynosiła 1227 (FA) i 1504 (FB) w przypadku próbki pobranej zimą oraz 337 (FA) i 303 (FB) w obecności próbki pobranej latem.



Rys. 22. Współczynniki MR dla szczepu TA98 uzyskane w teście klasycznym bez NADP z 10-krotnie większą ilością bakterii dla próbki pobranej zimą



Rys. 23. Współczynniki MR dla szczepu TA98 uzyskane w teście klasycznym bez NADP z 10-krotnie większą ilością bakterii dla próbki pobranej latem

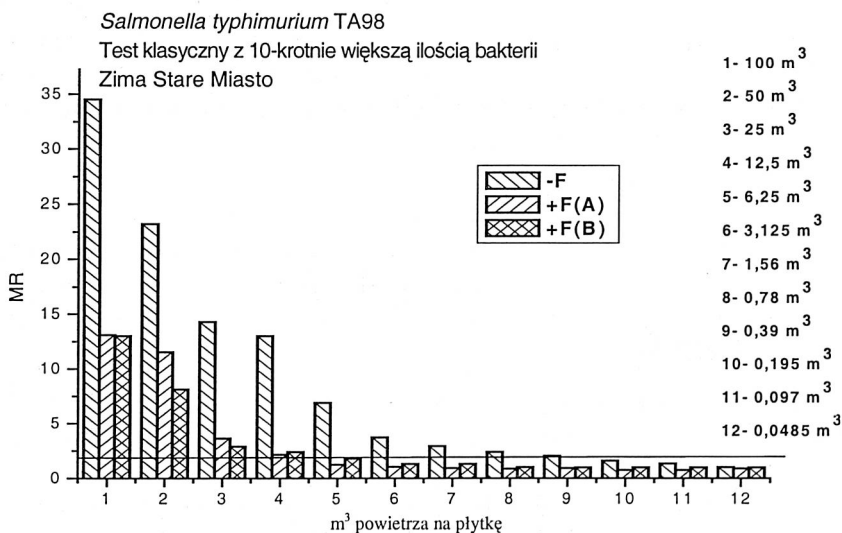
Stężenia progowe, dla których uzyskano $MR \geq 2$, wynosiły dla próbki pobranej zimą w przypadku badań prowadzonych z FA $3,125 \text{ m}^3/\text{płytkę}$, a dla badań prowadzonych z FB $6,25 \text{ m}^3/\text{płytkę}$. Natomiast dla ekstraktu próbki pobranej latem dla badań z FA $6,25 \text{ m}^3/\text{płytkę}$, a dla badań z FB aż $25 \text{ m}^3/\text{płytkę}$.

Uzyskane wyniki wskazują, że 10-krotne zwiększenie ilości bakterii *Salmonella typhimurium* TA98 powoduje wyraźne zwiększenie stężenia wywołującego efekt mutageny badanych ekstraktów (z wyjątkiem badań prowadzonych dla próbki pobranej latem z frakcją FA).

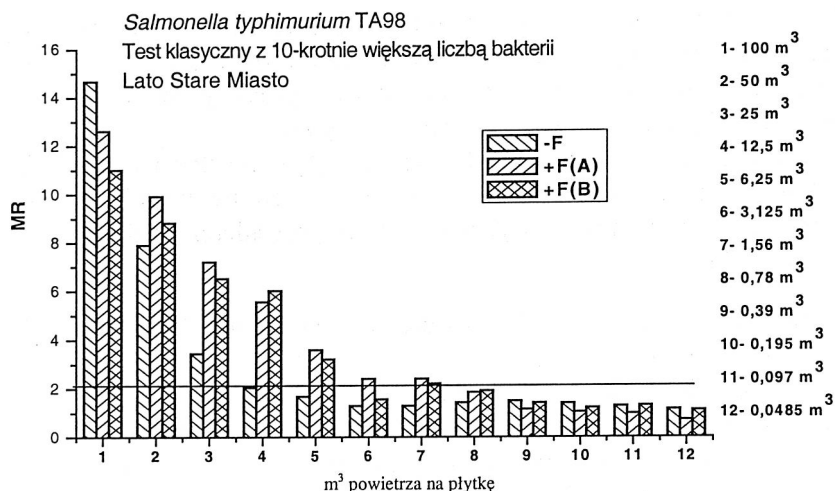
Test klasyczny *Salmonella* z 10-krotnie zwiększoną ilością bakterii (IV)

W teście klasycznym, który zmodyfikowano przez wprowadzenie 10-krotnie większej ilości bakterii, zaobserwowano w całym badanym zakresie stężeń ekstraktów powietrza ($100\text{--}0,0485 \text{ m}^3$) jedynie zwiększenie LR wraz ze wzrostem stężenia zanieczyszczeń wprowadzanych na płytkę (rys. 24, 25). Tak jak w poprzednich testach, liczba rewertantów uzyskanych dla próbki pobranej w lecie była zdecydowanie mniejsza w stosunku do liczby rewertantów, jakie uzyskano dla próbki pobranej zimą.

Dla ekstraktu próbki pobranej zimą badanej w obecności buforu (–F) uzyskano zdecydowanie większy współczynnik MR ($MR = 34,50$ przy $100 \text{ m}^3/\text{płytkę}$) w porównaniu do testu klasycznego (I) ($MR = 26,88$ przy $100 \text{ m}^3/\text{płytkę}$). W badaniach prowadzonych z frakcją mikrosomalną FA i FB wartości te nieznacznie się zmniejszyły. Ponadto, współczynnik MR dla badań bez frakcji był większy niż dla badań w obecności frakcji mikrosomalnych, tak jak w teście I (przewaga mutagenów bezpośrednich). Stężenie ekstraktu zimowego, dla którego stwierdzono efekt mutageny



Rys. 24. Współczynniki MR dla szczepu TA98 uzyskane w teście klasycznym z 10-krotnie większą ilością bakterii dla próbki pobranej zimą



Rys. 25. Współczynniki *MR* dla szczepu TA98 uzyskane w teście klasycznym z 10-krotnie większą ilością bakterii dla próbki pobranej latem

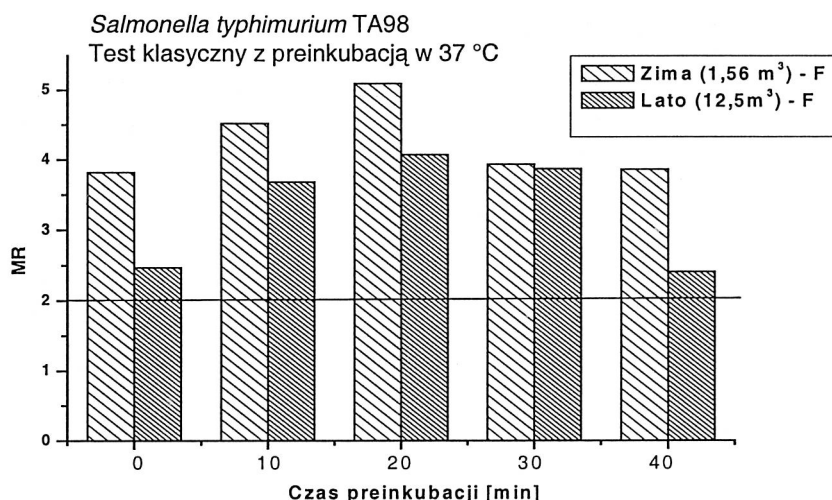
wynosiło: dla badań prowadzonych bez frakcji 0,39 m^3 (mniejsze niż w teście klasycznym), a dla FA i FB 12,5 m^3 (większe niż w teście klasycznym). Mutagenność *M* wynosiła: 93 rew./ m^3 w badaniach bez frakcji, 25 rew./ m^3 w badaniach z frakcją FA i 39 rew./ m^3 z frakcją FB (tab. 14).

W przypadku próbki pobranej latem współczynnik *MR* dla wszystkich badań (-F, FA, FB) nieznacznie zwiększył się w porównaniu do testu klasycznego. Ponadto, w razie największego stężenia zanieczyszczeń wprowadzanych na płytkę, pochodzącego z 100 m^3 powietrza, otrzymano większy współczynnik *MR* w badaniach bez frakcji, odwrotnie niż w teście I. Świadczy to o ujawnieniu się w tym stężeniu większego działania mutagenów bezpośrednich. Liczba rewertantów indukowanych przez 1 m^3 badanego powietrza (*M*) wynosiła 23 dla badań bez frakcji, 41 w obecności FA i 66 w obecności FB (tab. 14).

W przypadku tego testu stężenie zanieczyszczeń pochodzące z 1,56 m^3 (zmniejszenie stężenia progowego w stosunku do testu klasycznego) pozwoliło wykryć obecność mutagenów bezpośrednich w ekstrakcie letnim, natomiast dla próbek badanych w obecności frakcji A i B efekt ten zaobserwowano dla zanieczyszczeń pochodzących, tak jak w teście I, z 12,5 m^3 .

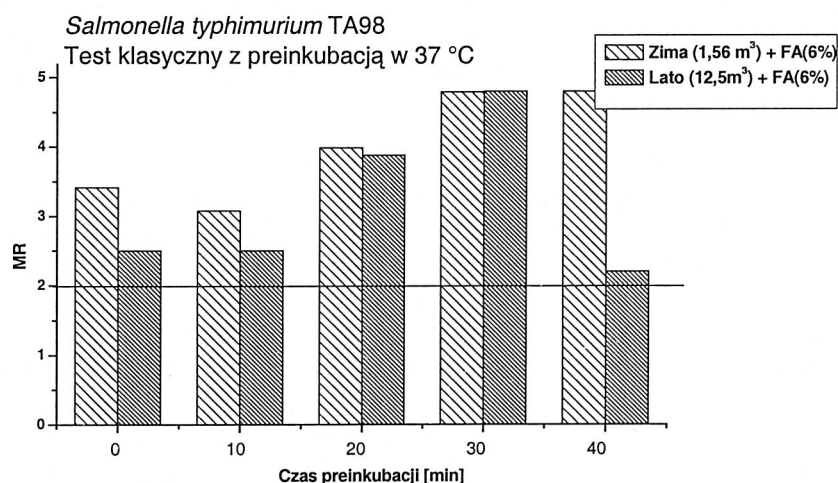
Test klasyczny *Salmonella* z preinkubacją w 37 °C (V)

Wyniki uzyskane dla testu klasycznego, prowadzonego z preinkubacją prowadzoną w czasie 10, 20, 30 i 40 minut w 37 °C, wykazały zmiany *LR* w zależności od czasu preinkubacji. Wpływ preinkubacji na liczbę powstających rewertantów szczepu TA98 badany był w obecności ekstraktu zanieczyszczeń pobranych zimą pochodzących z 1,56 m^3 powietrza i ekstraktu zanieczyszczeń pobranych latem pochodzących z 12,5 m^3 powietrza (tab. 7).

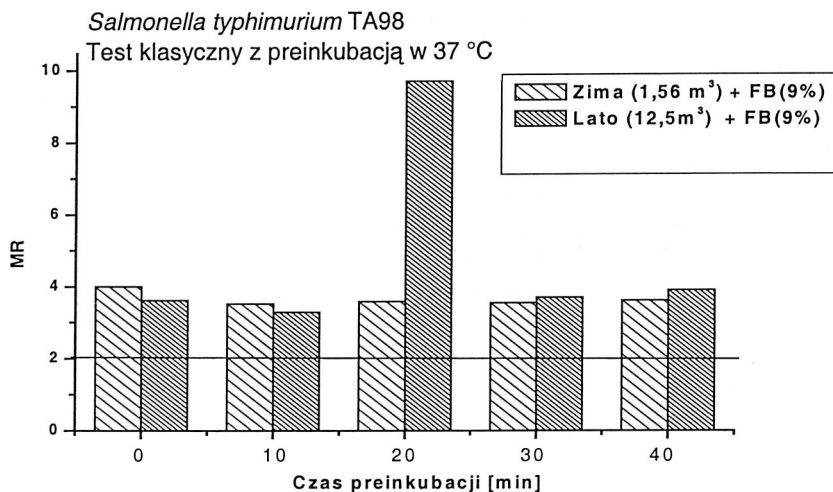


Rys. 26. Współczynniki *MR* dla szczepu TA98 uzyskane w teście preinkubacyjnym prowadzonym bez frakcji w temperaturze 37 °C

W badaniach bez udziału frakcji (rys. 26) otrzymano wyraźnie większe współczynniki mutagenności dla próbek inkubowanych przez 20 minut ($MR = 5,1$ dla próbki zimowej i $MR = 4,2$ dla próbki letniej) w stosunku do pozostałych. Dalsza preinkubacja powodowała zmniejszenie liczby rewertantów do poziomu zbliżonego, jaki uzyskano dla prób nieinkubowanych. Po 20 minutach preinkubacji uzyskane współczynniki *MR* stanowiły dla próbki pobranej zimą 133%, a dla próbki pobranej latem 165% wartości współczynnika *MR* uzyskanej dla próbek niepreinkubowanych (100%).



Rys. 27. Współczynniki *MR* dla szczepu TA98 uzyskane w teście preinkubacyjnym prowadzonym z FA w temperaturze 37 °C



Rys. 28. Współczynniki MR dla szczepu TA98 uzyskane w teście preinkubacyjnym prowadzonym z FB w temperaturze 37 °C

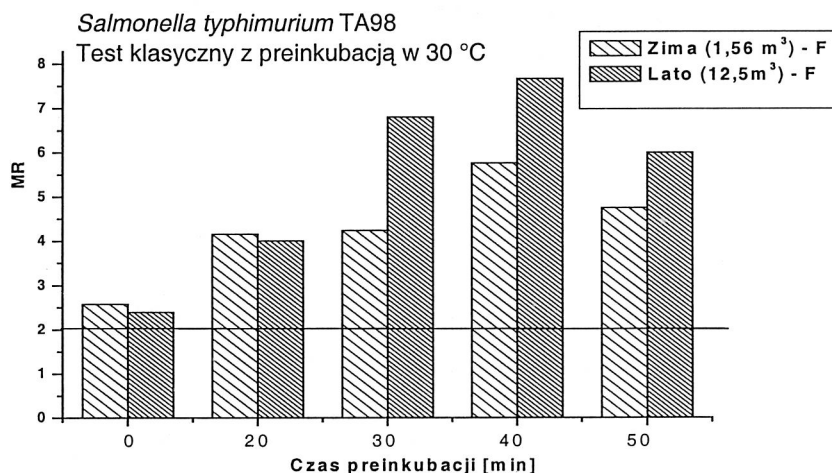
Preinkubacja szczepu w obecności ekstraktu pyłów pobieranych zimą i latem w obecności FA (rys. 27) powodowała również zmiany współczynnika mutagenności. Największe jego wartości uzyskano dla prób preinkubowanych przez 30 minut ($MR = 4,8$ dla próbki zimowej i letniej). Tak długo prowadzona preinkubacja spowodowała zwiększenie współczynnika mutagenności uzyskanego dla próbki zimowej do 140%, a dla próbki letniej do 192% w stosunku do próbek niepreinkubowanych.

Badania prowadzone w obecności ekstraktu pyłów pobranych w okresie zimowym z udziałem FB (rys. 28) wykazywały brak istotnego wpływu preinkubacji na współczynnik MR, natomiast preinkubacja w obecności ekstraktów pyłów pobranych w okresie letnim ujawniła wyraźne zwiększenie liczby rewertantów po 20-minutowej preinkubacji ($MR = 9,7$). Uzyskany współczynnik MR stanowił 269% MR, jaką uzyskano klasyczną metodą testu (bez preinkubacji).

Test klasyczny *Salmonella* z preinkubacją w 30 °C (VI)

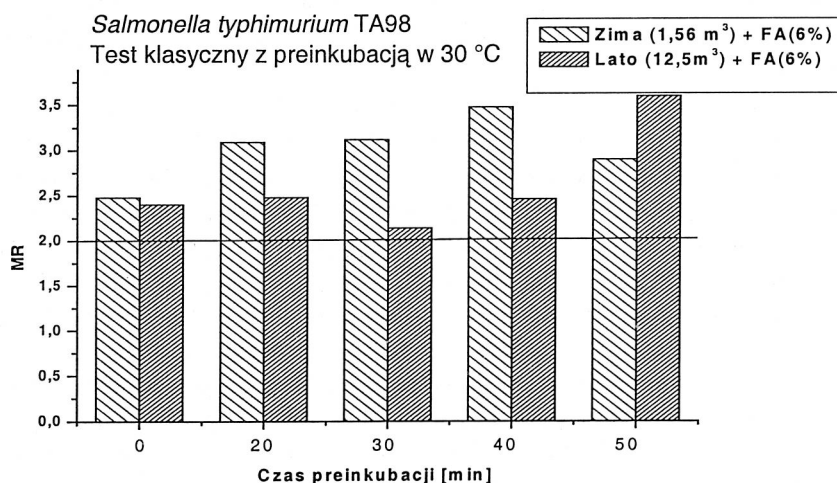
Test klasyczny z preinkubacją w temperaturze 30 °C prowadzono w wariantach 20, 30, 40 i 50-minutowej preinkubacji. Wpływ preinkubacji na liczbę powstających rewertantów szczepu TA98 badany był w obecności ekstraktów pyłów pobranych zimą i latem, dla takiego samego stężenia jak w teście V.

W badaniach bez udziału frakcji (rys. 29) zarówno dla próbki pobranej zimą, jak i latem zaobserwowano zwiększenie liczby rewertantów w ciągu 40-minutowej preinkubacji ($MR = 5,76$ dla próbki zimowej i $MR = 7,67$ dla próbki letniej). Po 40 minutach uzyskane współczynniki mutagenności stanowiły dla próbki pobranej zimą 223%, a dla próbki pobranej latem 320% w stosunku do współczynnika MR dla próbek niepoddanych inkubacji. Po 50 minutach odnotowano zmniejszenie MR dla tych ekstraktów, odpowiednio do 173% i 250% w porównaniu do próbek niepreinkubowanych.

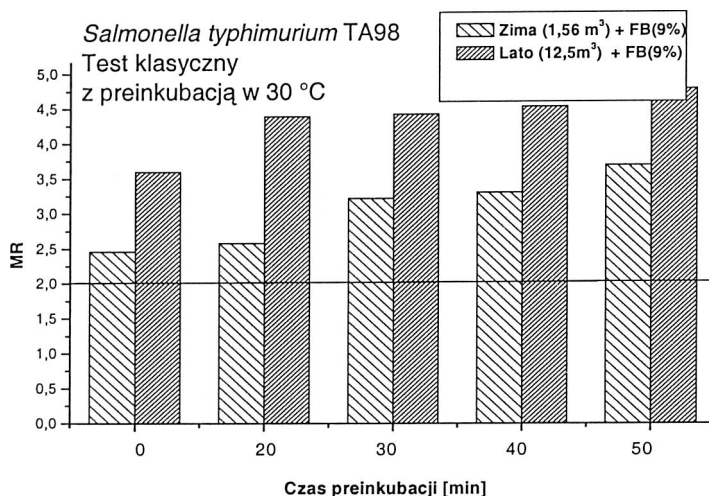


Rys. 29. Współczynniki *MR* dla szczepu TA98 uzyskane w teście preinkubacyjnym prowadzonym bez frakcji w temperaturze 30 °C

Podobny efekt dawała preinkubacja próbki pobranej zimą, badanej w obecności frakcji FA (rys. 30). Maksimum liczby rewertantów dla tej próbki zaobserwowano po 40 minutach inkubacji ($MR = 3,48$). Współczynnik *MR* stanowił wtedy 140% wartości współczynnika *MR* dla próbki nieinkubowanej, a po 50 minutach zaobserwowano zmniejszenie jego wartości do 117%. W przypadku ekstraktu próbki pobranej latem obserwowano stopniowy przyrost liczby rewertantów w czasie. Maksimum wartości współczynnika *MR* ($MR = 3,6$) otrzymano dla tej próbki dopiero po 50 minutach inkubacji i wynosiło ono 150% wartości *MR* w porównaniu do próbki nieinkubowanej.



Rys. 30. Współczynniki *MR* dla szczepu TA98 uzyskane w teście preinkubacyjnym prowadzonym z FA w temperaturze 30 °C



Rys. 31. Współczynniki *MR* dla szczepu TA98 uzyskane w teście preinkubacyjnym prowadzonym z FB w temperaturze 30 °C

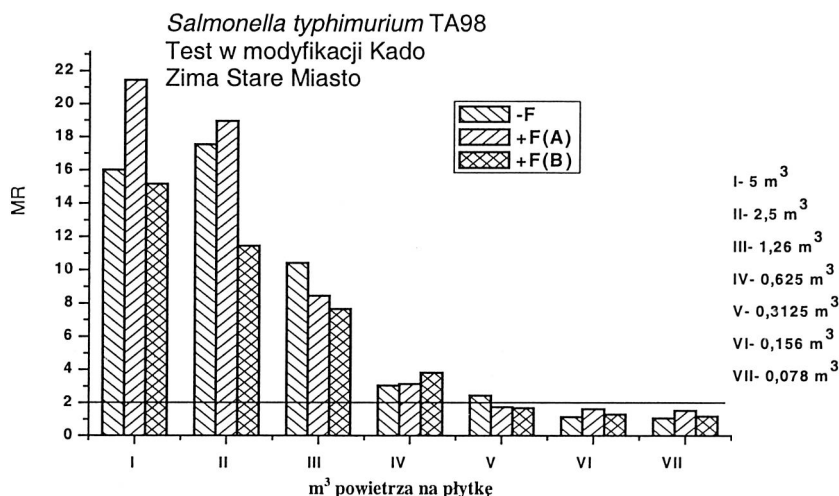
Preinkubacja ekstraktów pobranych zimą i latem w obecności frakcji FB (rys. 31) spowodowała również stopniowe zwiększenie *LR* w czasie. Po 50 minutach uzyskano *MR* o 50% i 33% większe w stosunku do *MR* dla próbek nieinkubowanych (*MR* = 3,69 dla próbki zimowej i *MR* = 4,78 dla próbki letniej). Jednak wpływ preinkubacji był niewielki dla ekstraktu próbki pobranej latem, po 20 minutach bowiem współczynnik *MR* był na poziomie 123% *MR* próby nieinkubowanej.

Test klasyczny *Salmonella* w modyfikacji Kado (VII)

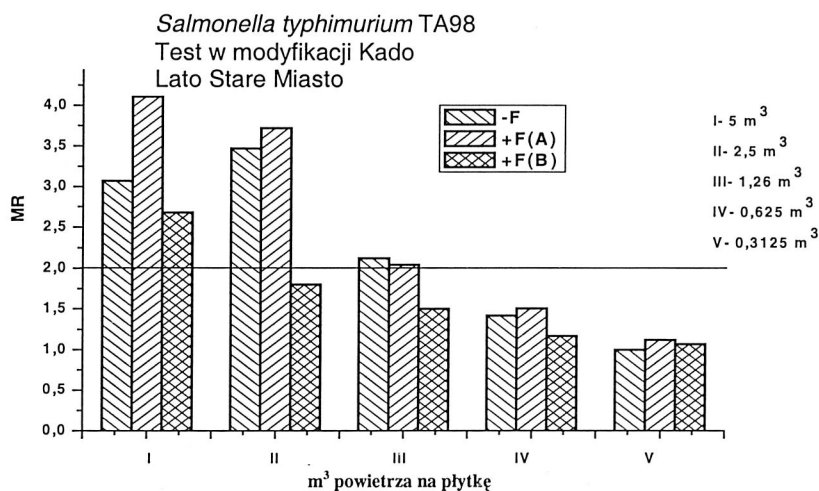
Badania za pomocą testu *Salmonella* w modyfikacji Kado prowadzono, dodając na płytki ekstrakty zanieczyszczeń pochodzące z zakresu 0,078–5 m³ powietrza w przypadku próbki pobranej zimą i od 5 m³ do 0,3125 m³ powietrza w przypadku próbki pobranej latem.

Dla tego testu również zaobserwowano powstawanie większej liczby *LR* dla ekstraktów próbki pobranej zimą w porównaniu do próbki pobranej latem (rys. 32, 33). Jedynie ekstrakty pyłów pochodzące z 5 m³ powietrza, badane bez aktywacji metabolicznej (–F), spowodowały załamanie krzywej dawka–odpowiedź (efekt toksyczny). Dla zanieczyszczeń pochodzących z 5 m³ i z 2,5 m³ powietrza uzyskano większe współczynniki *MR* w badaniach prowadzonych w obecności frakcji mikrosomalnej FA (*MR* = 21,42 i 18,96 dla próbki zimowej oraz *MR* = 4,11 i 3,72 dla próbki letniej). W testach prowadzonych z tymi stężeniami ekstraktów, w obecności frakcji FB, uzyskano najmniejsze współczynniki *MR*, mniejsze nawet od tych, jakie uzyskano w badaniach bez frakcji (*MR* = 15,14 i 11,44 dla próbki zimowej oraz *MR* = 2,68 i 1,80 dla próbki letniej). Z kolei w testach z ekstraktami pochodzącymi z 1,26 m³ powietrza największą wartość współczynnika *MR* uzyskano dla badań bez frakcji. Wynika z tego, że dla większych stężeń zanieczyszczeń powietrza badanych testem Kado ujawniło się działanie mutagenów pośrednich, a dla stężeń mniejszych,

bezpośrednich, typu zmiany fazy odczytu. Bardziej przydatna w badaniach okazała się też frakcja FA. Mutagenności (M) w przypadku próbki pobranej zimą wynosiła: 109 rew./m³ (-F), 101 rew./m³ (FA) i 88 rew./m³ (FB), oraz 45 rew./m³ (-F), 47 rew./m³ (FA) i 37 rew./m³ (FB) dla próbki pobranej latem (tab. 14).



Rys. 32. Współczynniki MR dla szczepu TA98 uzyskane w teście klasycznym w modyfikacji Kado dla próbki pobranej zimą



Rys. 33. Współczynniki MR dla szczepu TA98 uzyskane w teście klasycznym w modyfikacji Kado dla próbki pobranej latem

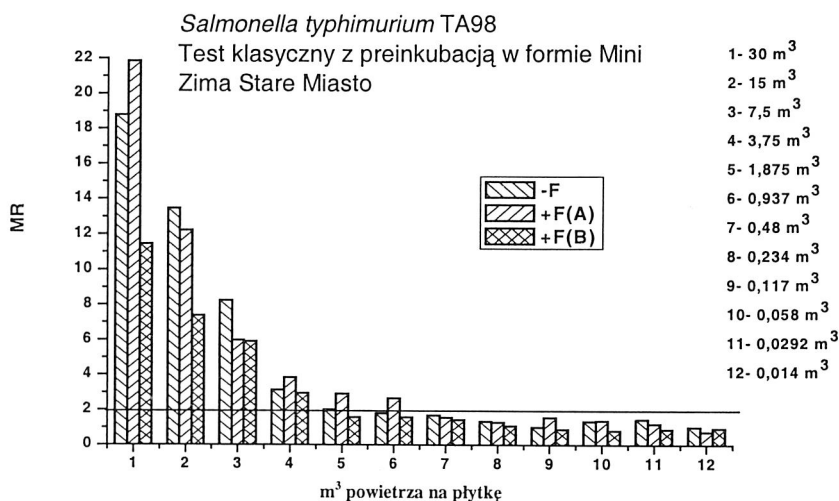
Najmniejsze stężenie próbki pobranej zimą, dla której stwierdzono efekt mutageny wynosiło: dla badań prowadzonych bez frakcji – 0,3125 m³/płytkę, a dla badań z FA i FB – 0,625 m³/płytkę. Było więc mniejsze niż w teście klasycznym. Z kolei

w przypadku próbki pobranej latem mutagenne okazały się stężenia zanieczyszczeń pochodzące z $1,26 \text{ m}^3$ powietrza w testach przeprowadzonych bez aktywacji metabolicznej i z aktywacją frakcją FA, natomiast w obecności frakcji FB mutagenne okazały się zanieczyszczenia pochodzące z 5 m^3 . Czyli również stężenia progowe ekstraktów były mniejsze niż w teście I.

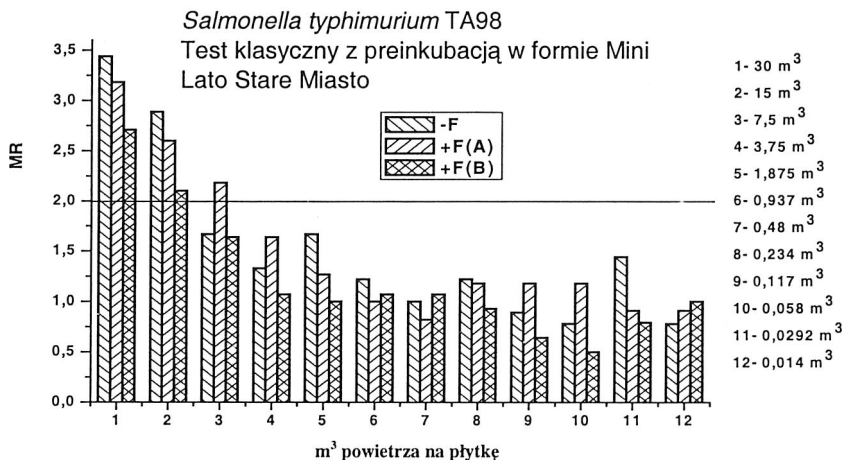
Test klasyczny *Salmonella* z preinkubacją w formie Mini (VIII)

W teście klasycznym z preinkubacją w formie Mini największe badane stężenie zanieczyszczeń pochodziło z 30 m^3 powietrza. Ilość ta jest około trzykrotnie mniejsza od ilości badanej próbki wprowadzanej do testu klasycznego oraz sześć razy większa niż stosowana w teście w modyfikacji Kado.

W przypadku tego testu nie zaobserwowano efektu toksycznego na krzywej dawka–odpowieź (rys. 34, 35). Uzyskane wartości współczynnika *MR* były również większe dla próbki pobranej zimą, w porównaniu z próbką pobraną latem. Najmniejszą liczbę rewertantów stwierdzono w badaniach prowadzonych z frakcją FB dla zanieczyszczeń pochodzących z ekstraktów obu próbek. Było to najbardziej widoczne w dużych stężeniach zanieczyszczeń powietrza wprowadzanych na płytkę. W przypadku próbki pobranej zimą w stężeniach ekstraktu, pochodzącego z 30 m^3 , $3,75 \text{ m}^3$, $1,875 \text{ m}^3$ i $0,937 \text{ m}^3$ powietrza, największy współczynnik *MR* uzyskano dla badań z frakcją FA, podobnie jak w teście Kado. Jedynie w stężeniu zanieczyszczeń znajdujących się w $7,5 \text{ m}^3$ powietrza większe *MR* uzyskano dla mutagenów bezpośrednich (–F). Większe współczynniki *MR* w badaniach prowadzonych bez aktywacji metabolicznej uzyskano także w największych stężeniach zanieczyszczeń (30 m^3 , 15 m^3) wprowadzanych na płytkę w przypadku próbki pobranej latem.



Rys. 34. Współczynniki *MR* dla szczepu TA98 uzyskane w teście klasycznym z preinkubacją w formie Mini dla próbki pobranej zimą



Rys. 35. Współczynniki *MR* dla szczepu TA98 uzyskane w teście klasycznym z preinkubacją w formie Mini dla próbki pobranej latem

Największą mutagenność (*M*) stwierdzono w badaniach próbki pobranej zimą prowadzonych z FB (115 rew./m³) i z FA (80 rew./m³), a najmniejszą w badaniach bez frakcji (61 rew./m³). Dla próbki pobranej latem mutagenność *M* była zbliżona i wynosiła odpowiednio 45 rew./m³ (–F), 47 rew./m³ (FA) i 37 rew./m³ (FB) (tab. 14).

Najmniejsze stężenie ekstraktu pyłów pobranych zimą, które powodowało efekt mutageny w tym teście, zawierało zanieczyszczenia pochodzące z 1,875 m³ powietrza w przypadku badań prowadzonych bez aktywacji metabolicznej, 0,937 m³ w obecności FA i 3,75 m³ w obecności FB. Stężenia progowe były więc większe niż w teście Kado, ale mniejsze w porównaniu do testu klasycznego w badaniach mutagenów pośrednich z frakcją FA. Z kolei najmniejsze stężenie ekstraktu pyłów pobranych latem, wywołujące efekt mutageny w badaniach prowadzonych bez frakcji i z frakcją FB, wynosiło 15 m³, a w badaniach prowadzonych z aktywacją metaboliczną frakcją FA wynosiło 7,5 m³/płytkę. Było więc większe w porównaniu do testu klasycznego i Kado, z wyjątkiem badań z frakcją FA, w porównaniu do testu klasycznego.

Z porównania wyników badań otrzymanych dla testu klasycznego (I) i dla testu klasycznego bez udziału NADP (II), prowadzonych w obecności obu frakcji mikrosomalnych, widać dużą przydatność frakcji FB w wykrywaniu mutagenów pośrednich typu zmiany fazy odczytu, obecnych zarówno w próbkach pobranych zimą, jak i latem. Mimo iż w teście II, prowadzonym z udziałem tej frakcji, zaobserwowano mniejsze liczby powstających rewertantów, nie miało to wpływu na stężenia progowe testu. Również brak obecności dodatkowej puli NADP w składzie frakcji mikrosomalnych nie miał wpływu na najmniejsze stężenia badanych ekstraktów wywołujące efekt mutageny. Uzyskano jedynie mniejszy współczynnik *MR* w badaniach z frakcją FB w porównaniu do badań z frakcją FA. Co wskazuje na to, iż frakcja FB do pełnej ak-

tywności metabolicznej potrzebuje w większym stopniu dodatkowej puli koenzymu NADP. Wynika z tego, że w badaniach prowadzonych w obecności szczepu TA98 nie jest konieczne wprowadzanie NADP do składu S9-mix, jak również można je prowadzić z frakcją FB.

Tabela 14. Mutagenność (M) otrzymana dla poszczególnych testów przeprowadzonych dla ekstraktów próbki zimowej i letniej pobranych na Starym Mieście w obecności szczepu TA98

Pora roku	Rodzaj testu	Obecność frakcji S9	Równanie prostej regresji	R^2	Mutagenność (M) rew./m ³
Zima	I	–F	$y=33,6+34,9x$	0,99	69
		FA	$y=45,7+37,4x$	0,99	83
		FB	$y=42,7+46x$	0,99	89
Lato	I	–F	$y=36,6+4,5x$	0,96	41
		FA	$y=45,3+8,5x$	0,93	54
		FB	$y=41,2+7,3x$	0,96	48
Zima	II	FA	$y=35,6+17,9x$	0,94	53
		FB	$y=51,2+36,4x$	0,96	88
Lato	II	FA	$y=28,6+4,5x$	0,97	33
		FB	$y=44,2+4,3x$	0,96	49
Zima	III	FA	$y=178,5+1048,7x$	0,99	1227
		FB	$y=150+1353,9x$	1,0	1504
Lato	III	FA	$y=155,1+181,8x$	0,98	337
		FB	$y=144,3+158,4x$	0,99	303
Zima	IV	–F	$y=34,6+58,4x$	0,93	93
		FA	$y=22+3,2x$	0,98	25
		FB	$y=36,3+2,9x$	0,94	39
Lato	IV	–F	$y=21,3+1,23x$	0,83	23
		FA	$y=29,1+12,4x$	0,94	41
		FB	$y=38,6+27,6x$	0,93	66
Zima	VII	–F	$y=20,9+87,7x$	0,91	109
		FA	$y=25,7+74,9x$	0,94	101
		FB	$y=27,8+60x$	0,99	88
Lato	VII	–F	$y=19,8+24,9x$	0,99	45
		FA	$y=20,1+26,5x$	0,98	47
		FB	$y=27,8+9,4x$	0,99	37
Zima	VIII	–F	$y=42,6+18,4x$	0,92	61
		FA	$y=45,7+69,8x$	0,83	115
		FB	$y=51,2+28,9x$	0,93	80
Lato	VIII	–F	$y=37,1+4,2x$	0,83	41
		FA	$y=45,5+5,1x$	0,90	51
		FB	$y=49,7+3,7x$	0,90	53

Wprowadzenie do testu III, realizowanego bez udziału koenzymu NADP, 10-krotnie większej ilości bakterii spowodowało zwiększenie współczynnika MR , szczególnie widoczny w przypadku próbki pobranej zimą. Nastąpiło jednak przesu-

nięcie progu wykrywalności obecności zanieczyszczeń mutagennych w stosunku do testu I i II w stronę większych stężeń badanych ekstraktów (z wyjątkiem badań z FA próbki pobranej latem).

Porównanie testu IV z testem I wskazuje, że wprowadzenie 10-krotnie większej ilości bakterii do testu klasycznego powoduje wyraźne zwiększenie współczynnika *MR*, w większych stężeniach ekstraktów zanieczyszczeń wprowadzonych na płytkę w badaniach prowadzonych bez aktywacji metabolicznej próbki pobranej w zimie i w mniejszym stopniu próbki pobranej w lecie. Z kolei obecność zwiększonej ilości bakterii w badaniach prowadzonych z aktywacją metaboliczną spowodowała zmniejszenie współczynnika *MR* w przypadku badań z próbką pobraną w zimie i zwiększenie współczynnika *MR* w badaniach z próbką pobraną w lecie. Niezwykle istotną sprawą jest więc stężenie zanieczyszczeń obecnych w badanych ekstraktach przypadających na pojedynczą komórkę oraz odpowiednia liczba enzymów metabolizujących obecnych w mieszaninie reakcyjnej. Miało to swoje odzwierciedlenie w stężeniach progowych testu. W badaniach próbki pobranej zimą bez frakcji oraz w badaniach próbki pobranej latem z frakcjami uzyskano wyraźne obniżenie progów wykrywalności. To przesunięcie progu wykrywalności mutagenów pośrednich w obecności zwiększonej ilości bakterii może sugerować, że enzymy bakteryjne wraz z enzymami frakcji mikrosomalnych współuczestniczą w przekształcaniu mutagenów pośrednich w bezpośrednie.

Testy V i VI wykazały duży wpływ preinkubacji na liczbę uzyskiwanych rewerwantów. Z przeprowadzonych badań wynika, że szczep TA98 dawał zdecydowanie różną odpowiedź mutageną w zależności od temperatury i czasu preinkubacji. Dla tego szczepu 40–50-minutowa preinkubacja w temperaturze 30 °C i 20-minutowa w temperaturze 37 °C wydaje się być optymalna, ponieważ dalsze przedłużanie czasu preinkubacji dla niektórych próbek powodowało wyraźne zmniejszenie obserwowanego efektu mutagennego. Wyniki uzyskane w badaniach nad wpływem czasu i temperatury preinkubacji dowodzą, że testy, które w swej procedurze zawierają preinkubację, muszą być prowadzone z bardzo dużą dyscypliną czasową, ponieważ stosunkowo niewielkie odstępstwo od ustalonego czasu preinkubacji może doprowadzić do uzyskania niepowtarzalnych wyników.

W teście klasycznym w modyfikacji Kado (VII) uzyskano bardzo znaczące przesunięcie progów wykrywalności substancji mutagennych w stronę mniejszych stężeń zanieczyszczeń wprowadzanych na płytkę w porównaniu z testem klasycznym (I). Test ten wykrywa więc obecność mutagenów pośrednich i bezpośrednich w mniejszej objętości próbki. Ponadto, w badanych większych stężeniach w teście Kado ujawniło się działanie mutagenów pośrednich, a w stężeniach mniejszych bezpośrednich. Bardziej przydatna okazała się też frakcja FA niż FB.

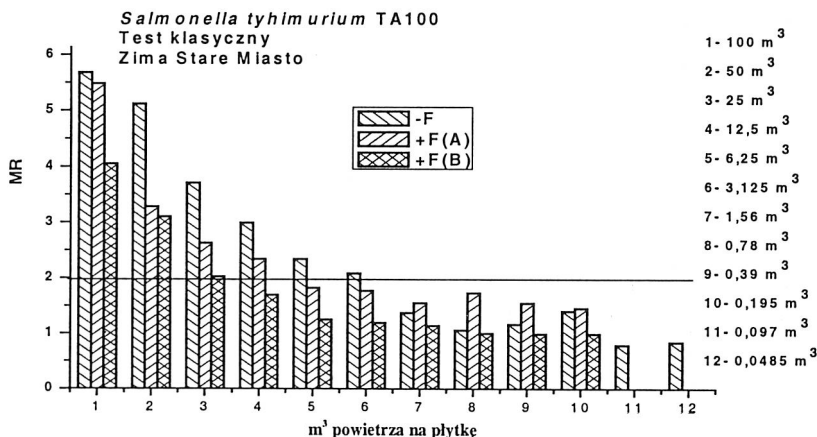
Zmniejszenie objętości badanej próbki z zachowaniem proporcji w mieszaninie inkubacyjnej, takich samych jak w teście klasycznym (I), i wprowadzenie dodatkowej preinkubacji, spowodowało zmniejszenie czułości testu w formie Mini (VIII) oraz zmniejszenie współczynników *MR*. Jedynie w przypadku próbek badanych

w obecności frakcji FA stężenia zanieczyszczeń wywołujące efekt mutageny były przesunięte w kierunku mniejszych wartości w porównaniu do testu klasycznego.

6.3.2. Wyniki testów z udziałem szczepu *Salmonella typhimurium* TA100

Test klasyczny *Salmonella* (test I)

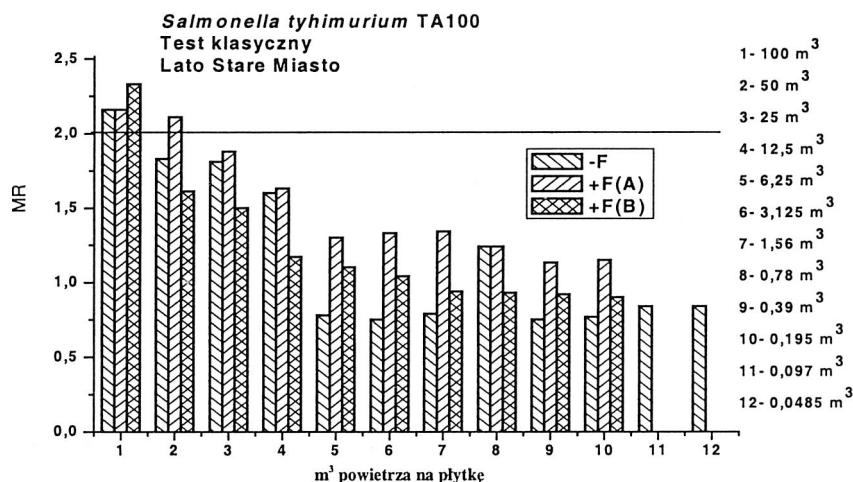
Badania prowadzono, dodając na płytki ekstrakty zanieczyszczeń pochodzące z zakresu od 100 m³ do 0,0485 m³ powietrza (rys. 36, 37). Mutageny zawarte w badanych ekstraktach zanieczyszczeń wywoływały mniejszą odpowiedź ze strony szczepu TA100, w porównaniu ze szczepem TA98. W całym badanym zakresie stężeń ekstraktów obserwowano zwiększenie liczby rewertantów wraz ze wzrostem ilości zanieczyszczeń, pobranych zimą i latem, wprowadzanych na płytkę. W przypadku ekstraktu próbki pobranej zimą największe wartości współczynnika *MR* (*MR* = 5,68 przy 100 m³ powietrza/płytkę) uzyskano w teście wykonywanym bez aktywacji metabolicznej. W wyniku badań prowadzonych z aktywacją metaboliczną tego ekstraktu większe wartości współczynnika *MR* uzyskano dla frakcji FA (*MR* = 5,48 dla FA i *MR* = 4,05 dla FB przy 100 m³/płytkę). Z kolei w próbce pobranej latem silniejszą odpowiedź mutageną uzyskano w obecności frakcji mikrosomalnych. W testach z frakcją mikrosomalną FA uzyskano nieco większe współczynniki *MR* niż w badaniach z frakcją FB, z wyjątkiem badanego największego stężenia ekstraktu tej próbki.



Rys. 36. Współczynniki *MR* dla szczepu TA100 uzyskane w teście klasycznym dla próbki pobranej zimą

Liczba rewertantów indukowanych przez 1 m³ powietrza pobranego zimą była największa w badaniach prowadzonych z FA (197), natomiast w badaniach z FB i bez frakcji wartości były zbliżone i wynosiły odpowiednio: 171 i 169. W przypadku prób-

ki pobranej latem największe wartości mutagenności (M) uzyskano w badaniach z frakcją FA (165 rew./m³) i frakcją FB (159 rew./m³), a najmniejsze w badaniach bez frakcji (111 rew./m³) (tab. 15).



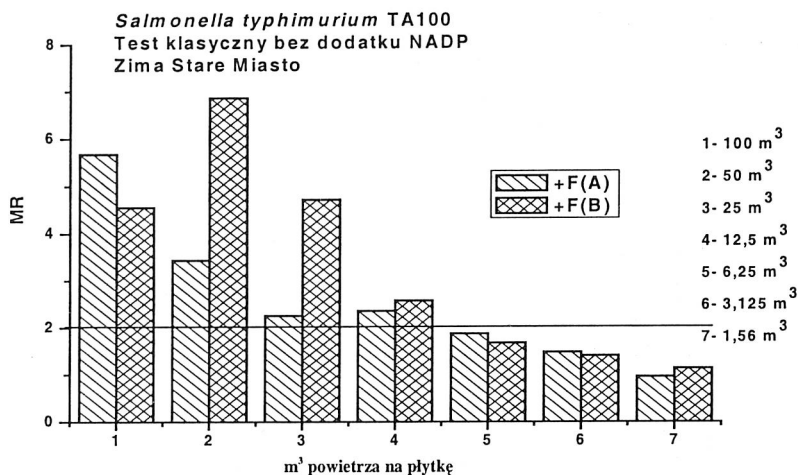
Rys. 37. Współczynniki MR dla szczepu TA100 uzyskane w teście klasycznym dla próbki pobranej latem

Dla próbki pobranej zimą najmniejsze stężenie, wykazujące obecność mutagenów bezpośrednich, pochodziło z 3,125 m³ powietrza. W badaniach z frakcją FA były to zanieczyszczenia pochodzące z 12,5 m³, a dla badań z frakcją FB aż z 25 m³/płytkę. Natomiast w przypadku próbki pobranej latem, w badaniach bez frakcji i z frakcją FB, mutageny efekt zaobserwowano dopiero po wprowadzeniu na płytkę ekstraktu zanieczyszczeń pochodzących aż ze 100 m³ powietrza. Z kolei w badaniach z frakcją FA po wprowadzeniu 50 m³/płytkę.

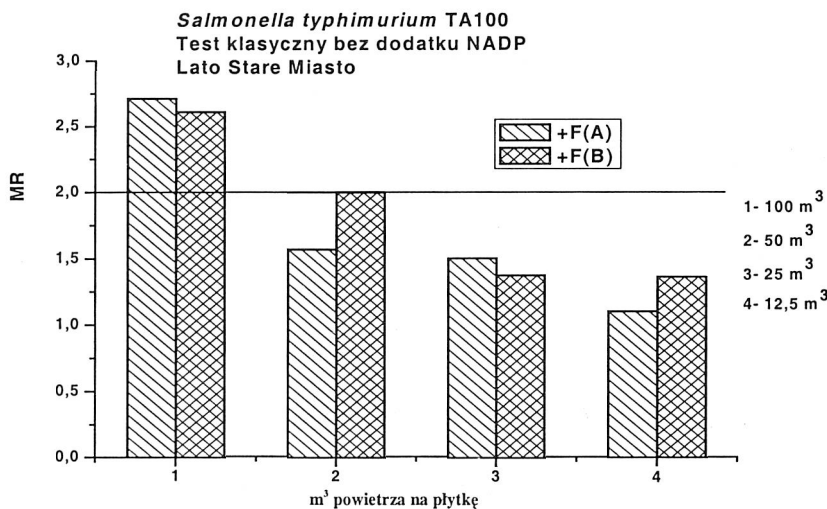
Test klasyczny *Salmonella* bez udziału NADP (test II)

W teście klasycznym prowadzonym bez dodatku NADP, jako składnika frakcji S9-mix, uzyskano zbliżone wartości współczynnika MR , jak w teście I (rys. 38, 39). W przypadku badań próbki pobranej zimą z frakcją FB otrzymano efekt toksyczny na krzywej dawka-odpowiedź. W tym teście zanieczyszczenia mutagenne wykryto dla próbki pobranej zimą w stężeniu 12,5 m³ dla badań z FA i FB, a dla próbki pobranej latem w stężeniu 100 m³ dla frakcji FA i 50 m³ dla frakcji FB. Brak dodatkowej puli NADP w środowisku reakcji nie wpływał w sposób zasadniczy na czułość testu i liczby uzyskiwanych rewertantów.

Otrzymano większą mutagenność (M) w badaniach prowadzonych z frakcją FA w porównaniu do badań z frakcją FB zarówno dla próbki pobranej zimą, jak i latem (tab. 15). Liczba rewertantów indukowanych przez 1 m³ powietrza pobranego zimą wynosiła 121 (FA) i 100 (FB), a w przypadku próbki pobranej latem 92 (FA) i 78 (FB).



Rys. 38. Współczynniki *MR* dla szczepu TA100 uzyskane w teście klasycznym bez NADP dla próbki pobranej zimą

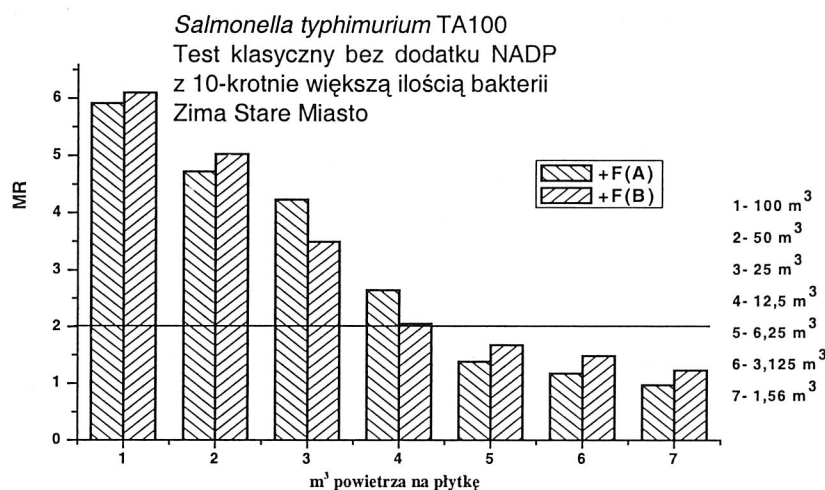


Rys. 39. Współczynniki *MR* dla szczepu TA100 uzyskane w teście klasycznym bez NADP dla próbki pobranej latem

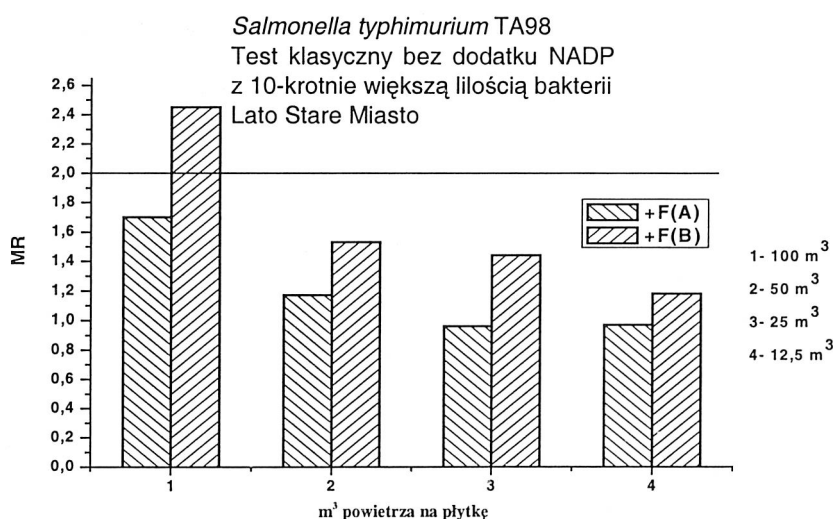
Test klasyczny *Salmonella* bez udziału NADP ze zwiększoną ilością bakterii (III)

W teście prowadzonym bez dodatku NADP z 10-krotnie większą ilością bakterii otrzymano większe współczynniki *MR* dla próbki pobranej zimą (rys. 40, 41) w stosunku do testu II. Ponadto, w przypadku ekstraktów tej próbki, uzyskano nieco większe *MR* w obecności frakcji FB w teście, do którego wprowadzano zanieczyszczenia pochodzące ze 100 m³ (*MR* = 6,2 dla FB i *MR* = 5,9 dla FA) i 50 m³ (*MR* = 5,02 dla FB i *MR* = 4,7 dla FA) powietrza. Dla ekstraktów zanieczyszczeń pobranych latem uzyskano zdecydowanie większy współczynnik *MR* dla tej frakcji w ca-

łym zakresie stężeń badanych zanieczyszczeń. Otrzymano również większą mutagenność (M) w badaniach prowadzonych z frakcją FB w porównaniu do badań z frakcją FA zarówno dla próbki pobranej zimą, jak i latem (tab. 15). Liczba rewerwantów indukowanych przez 1 m^3 powietrza pobranego zimą wynosiła 147 (FB) i 126 (FA), a w przypadku próbki pobranej latem 122 (FB) i 115 (FA).



Rys. 40. Współczynniki MR dla szczepu TA100 uzyskane w teście klasycznym bez NADP z 10-krotnie większą ilością bakterii dla próbki pobranej zimą



Rys. 41. Współczynniki MR dla szczepu TA100 uzyskane w teście klasycznym bez NADP z 10-krotnie większą ilością bakterii dla próbki pobranej latem

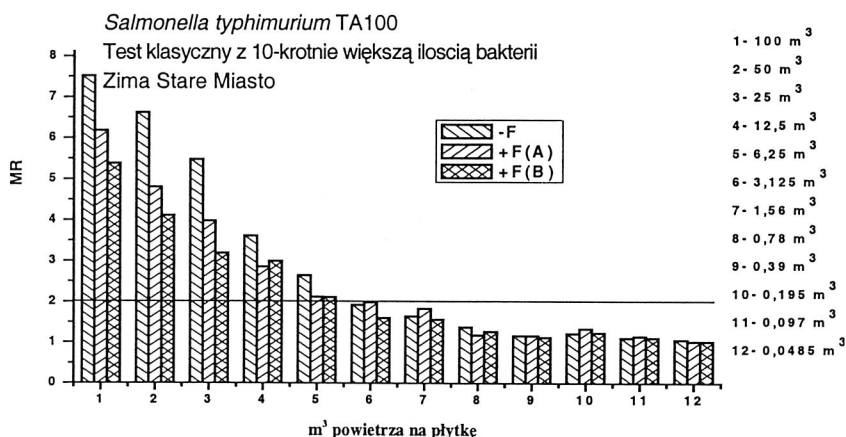
Zwiększenie ilości bakterii nie wpłynęło na zmianę progu wykrywalności substancji mutagennych w przypadku próbki pobranej zimą w porównaniu do testu II. Wyn-

siło ono 12,5 m³ powietrza na płytkę w obecności obu frakcji. W przypadku próbki pobranej latem nie stwierdzono efektu mutagennego w badaniach prowadzonych z frakcją FA. W przypadku badań z frakcją FB wartość $MR > 2$ stwierdzono tylko dla stężenia zanieczyszczeń pochodzących z 100 m³ powietrza.

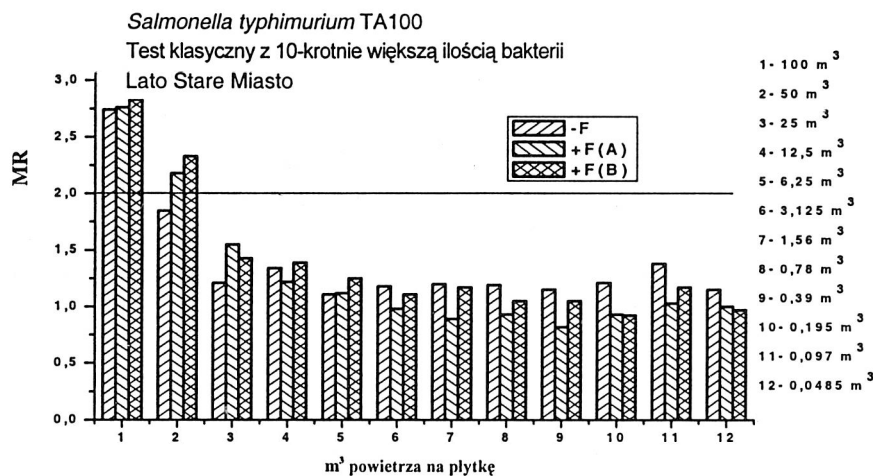
Test klasyczny *Salmonella* z 10-krotnie zwiększoną ilością bakterii (IV)

W teście klasycznym z 10-krotnie większą ilością bakterii, prowadzonym w obecności ekstraktów zanieczyszczeń dodawanych na płytkę pochodzących z zakresu od 100 m³ do 0,0485 m³ powietrza, nie zaobserwowano, tak jak w poprzednich testach, efektu toksycznego na krzywej dawka–odpowiedź (rys. 42, 43). Uzyskane wartości współczynnika MR były zbliżone do otrzymanych w teście klasycznym (I), większe w badaniach bez frakcji ($MR = 7,51$ dla –F, $MR = 6,18$ dla FA i $MR = 5,38$ dla FB przy 100 m³/płytkę) w przypadku próbki pobranej zimą oraz w badaniach z frakcją mikrosomalną w przypadku próbki pobranej latem ($MR = 2,74$ dla –F, $MR = 2,76$ dla FA i $MR = 2,83$ dla FB przy 100 m³/płytkę). Podobnie jak w teście klasycznym większe wartości MR uzyskano dla frakcji FA w testach z próbką zimową, a dla frakcji FB w badaniach z próbką pobraną latem. Wartości mutagenności w przypadku próbki pobranej zimą wynosiły 135 rew./m³ (FA), 133 rew./m³ (–F) i 129 rew./m³ (FB), a dla próbki pobranej latem 120 rew./m³ (FB), 115 rew./m³ (FA) i 112 rew./m³ (–F) (tab. 15).

Stężenie zanieczyszczeń pochodzące z 6,25 m³ powietrza pobranego zimą okazało się mutagenne w badaniach prowadzonych bez frakcji, jak i z frakcją FA i FB. Wzrost ilości bakterii testowych spowodował zwiększenie stężenia progowego testu w stosunku do testu klasycznego jedynie w badaniach bez frakcji. Z kolei zwiększenie ilości bakterii wpłynęło na zwiększenie czułości testu w badaniach próbki zimowej w obecności frakcji FA i FB. Dla próbki pobranej latem stężenie progowe dla mutagenów bezpośrednich było takie same jak w teście klasycznym i wynosiło 100 m³ powietrza na płytkę, a dla mutagenów pośrednich 50 m³/płytkę (mniejsze tylko dla badań z frakcją FB).



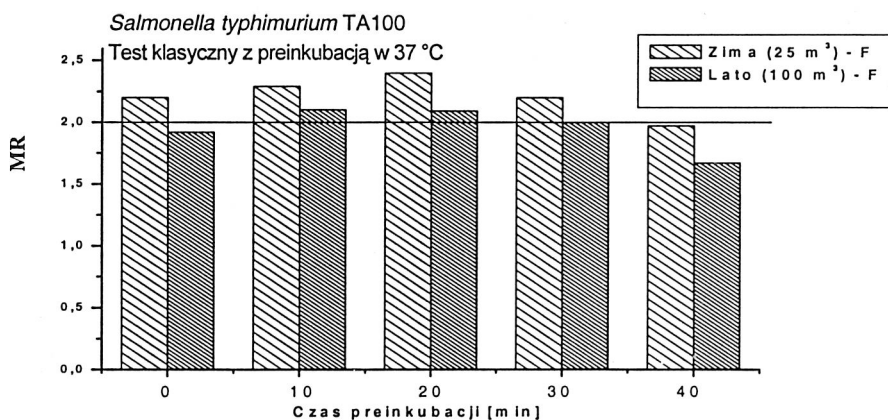
Rys. 42. Współczynniki MR dla szczepu TA100 uzyskane w teście klasycznym z 10-krotnie większą ilością bakterii dla próbki pobranej zimą



Rys. 43. Współczynniki *MR* dla szczepu TA100 uzyskane w teście klasycznym z 10-krotnie większą ilością bakterii dla próbek pobranej latem

Test klasyczny *Salmonella* z preinkubacją w 37 °C (V)

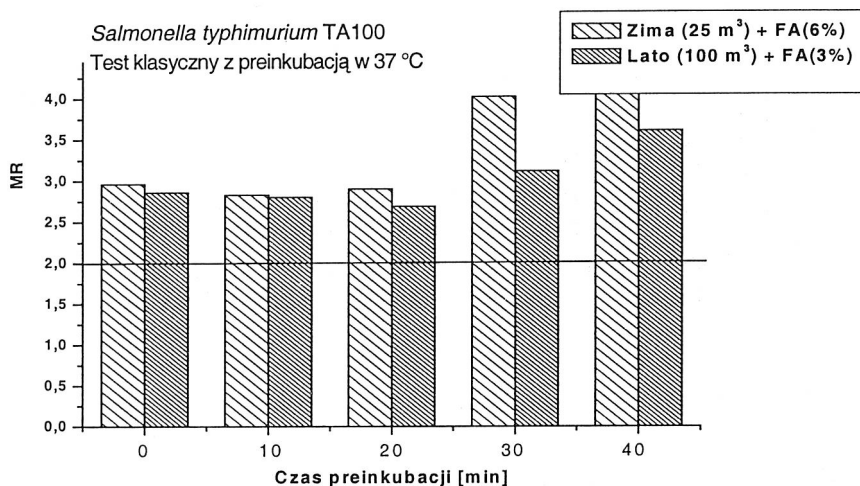
W rezultacie badań prowadzonych testem klasycznym z preinkubacją w 37 °C otrzymano zmianę liczby rewertantów w zależności od czasu preinkubacji (rys. 44, 45, 46). Badania ze szczepem TA100 prowadzono na zdecydowanie większych stężeniach ekstraktów zanieczyszczeń powietrza (tab. 7), ponieważ szczep ten dawał znacznie mniejsze współczynniki *MR* w obecności badanych próbek w porównaniu do otrzymanych dla szczepu TA98. Dla próbki pobranej zimą stosowano stężenie zanieczyszczeń pochodzące z 25 m³ powietrza, a dla próbki pobranej latem z 100 m³ powietrza.



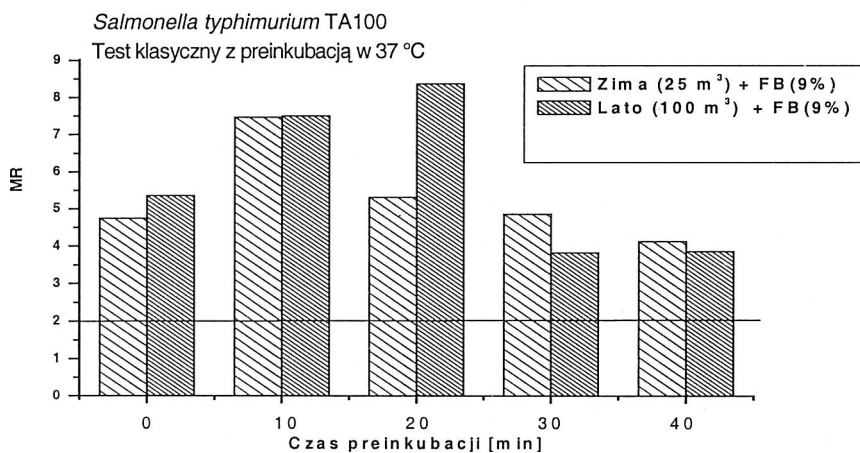
Rys. 44. Współczynniki *MR* dla szczepu TA100 uzyskane w teście preinkubacyjnym prowadzonym bez frakcji w temperaturze 37 °C

Badania prowadzone bez frakcji (rys. 44) wykazały niewielki wpływ czasu preinkubacji na liczbę powstających rewertantów. Dla próbki pobranej zimą maksymalny współczynnik *MR* (2,3) uzyskano po 20 minutach, a dla próbki pobranej latem po 10

minutach ($MR = 2,1$). Po czasie preinkubacji stanowiły one, dla obu prób, 109% wartości MR uzyskanych dla próbek nieinkubowanych.



Rys. 45. Współczynniki MR dla szczepu TA100 uzyskane w teście preinkubacyjnym prowadzonym z frakcją FA w temperaturze 37 °C



Rys. 46. Współczynniki MR dla szczepu TA100 uzyskane w teście preinkubacyjnym prowadzonym z frakcją FB w temperaturze 37 °C

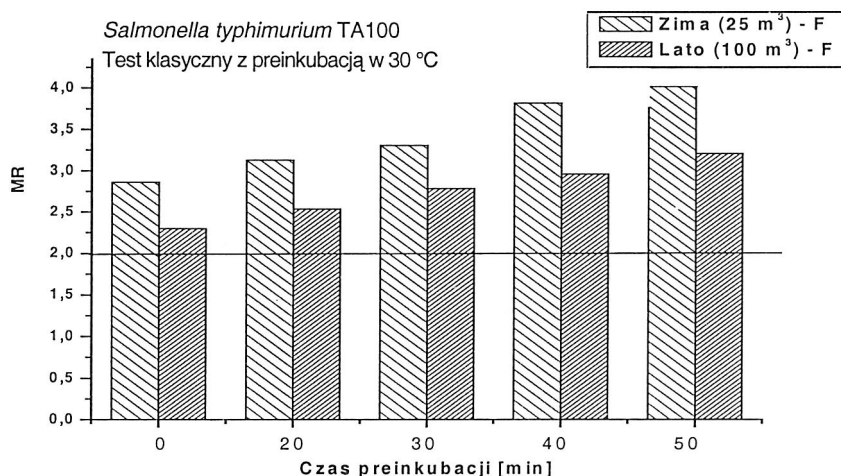
Preinkubacja prowadzona w obecności frakcji FA (rys. 45) wykazała również nieznaczne zwiększenie współczynnika MR w czasie. Po 30 minutach stwierdzono zwiększenie MR do 136%, a po 40 minutach do 139% w badaniach z próbką pobraną zimą w stosunku do wyników, jakie uzyskano dla tych próbek bez preinkubacji. Z kolei największy współczynnik MR (126%), w stosunku do wartości dla ekstraktu niepreinkubowanego, w teście z próbką pobraną w lecie uzyskano po 40-minutowej preinkubacji.

Preinkubacja z frakcją FB (rys. 46) dała wyraźnie lepszy efekt. Uzyskano większy współczynnik *MR* po krótkim czasie preinkubacji. Dla próbki pobranej zimą już po 10 minutach ($MR = 7,51$), a dla próbki pobranej latem po 20 minutach ($MR = 8,5$) stwierdzono zwiększenie współczynnika *MR* do 157% i 156% w stosunku do próby niepreinkubowanej. Dalsze przedłużanie czasu inkubacji spowodowało stopniowe zwiększanie liczby uzyskanych rewertantów. Po 40 minutach wartość współczynnika *MR* dla próbki zimowej wynosiła 87%, a dla letniej 72% wartości, jakie uzyskano dla próbek badanych metodą klasyczną testu (czas 0 minut).

Test klasyczny *Salmonella* z preinkubacją w 30 °C (VI)

Wpływ preinkubacji na liczbę powstających rewertantów szczepu TA100 w teście klasycznym z preinkubacją w temperaturze 30 °C badany był w obecności takich samych stężeń ekstraktów próbek pobranych zimą i latem, jak w teście V (tab. 7).

Badania prowadzone bez aktywacji metabolicznej (rys. 47) wykazały stopniowe zwiększanie liczby rewertantów wraz z czasem preinkubacji. 50-minutowa preinkubacja próbki pobranej zimą i latem dała około 40% zwiększenie współczynnika *MR* w stosunku do próbek niepreinkubowanych.

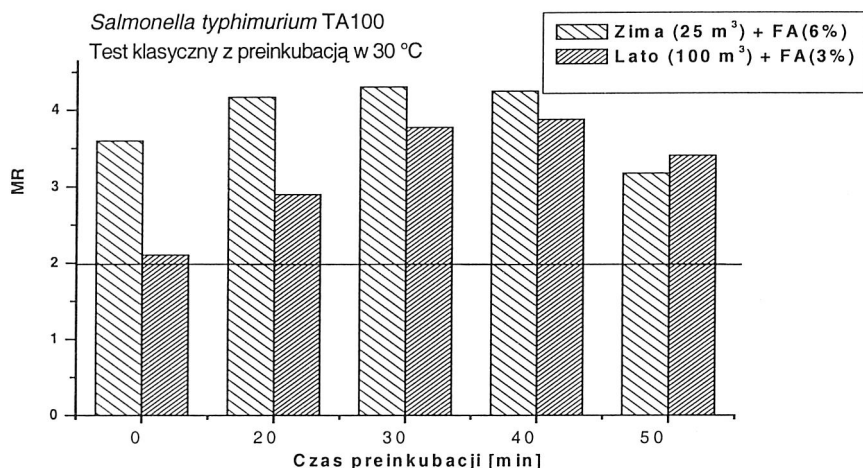


Rys. 47. Współczynniki *MR* dla szczepu TA100 uzyskane w teście preinkubacyjnym prowadzonym bez frakcji w temperaturze 30 °C

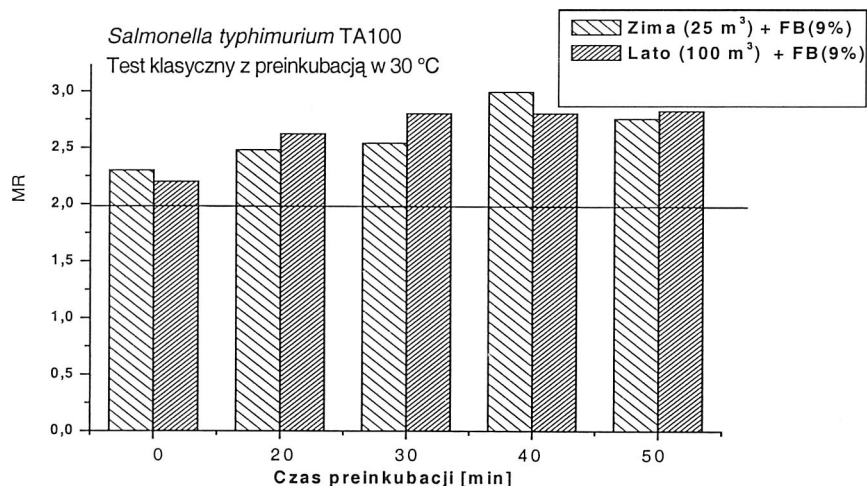
Liczba *LR* uzyskana w badaniach próbek pobranych zimą i latem w testach prowadzonych dla frakcji FA (rys. 48) była największa po 30–40-minutowej preinkubacji. Dla próbki pobranej latem wzrost ten był najbardziej widoczny i po 40 minutach ($MR = 3,94$) wynosił aż 183% wartości współczynnika *MR* uzyskanej dla próby niepoddanej inkubacji. Z kolei dla próbki pobranej zimą po 30-minutowej preinkubacji ($MR = 4,25$) wynosił 119% w stosunku do wartości współczynnika *MR*, jaką uzyskano dla próbki badanej metodą klasyczną (czas 0 minut).

W przypadku frakcji FB (rys. 49) stwierdzono dużo mniejszy wpływ czasu preinkubacji na zmianę liczby rewertantów. Wartość współczynnika *MR* po 40 minutach

($MR = 3,08$) dla próbki pobranej zimą zwiększyła się o 30%, a po 50 minutach ($MR = 2,91$) o 28% dla próbki pobranej latem w stosunku do wartości uzyskanych dla próbek niepoddanych preinkubacji.



Rys. 48. Współczynniki MR dla szczepu TA100 uzyskane w teście preinkubacyjnym prowadzonym z frakcją FA w temperaturze 30 °C

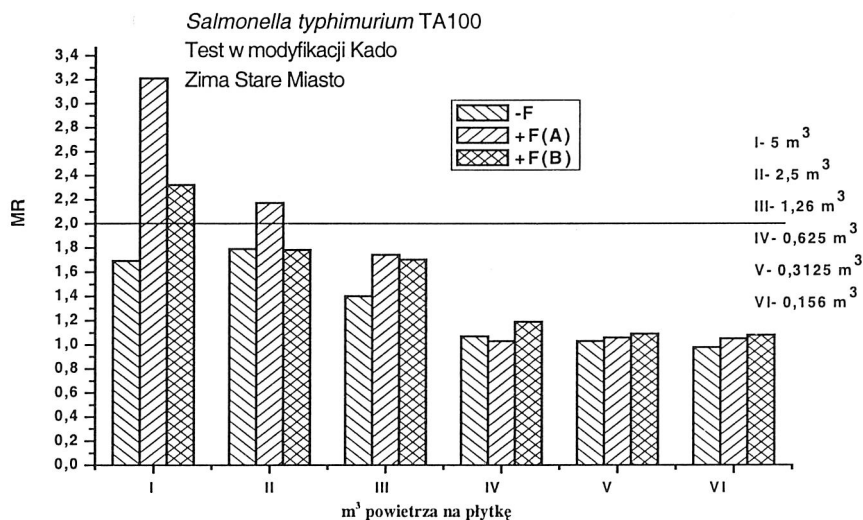


Rys. 49. Współczynniki MR dla szczepu TA100 uzyskane w teście preinkubacyjnym prowadzonym z frakcją FB w temperaturze 30 °C

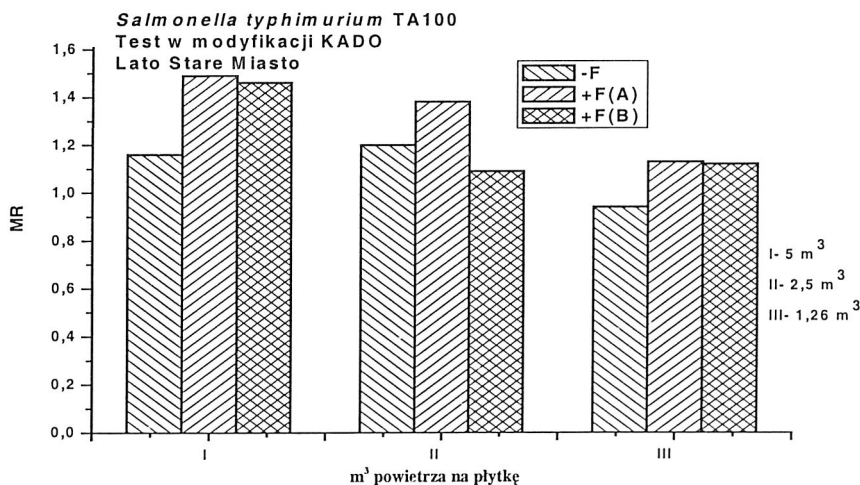
Test klasyczny *Salmonella* w modyfikacji Kado (VII)

Badania prowadzone testem klasycznym w modyfikacji Kado wykazały niewielką jego przydatność w wykrywaniu obecności mutagenów typu podstawienia pary zasad szczepem TA100 (rys. 50, 51). Największą liczbę rewertantów otrzymano w teście z próbką pobraną w zimie w obecności frakcji FA ($MR = 3,21$). Największy współczynnik MR w testach przeprowadzonych z ekstraktami pyłów pobranych zimą i latem uzyskano

dla frakcji FA. Z kolei dla obu próbek nie otrzymano wyniku dodatniego w badaniach prowadzonych bez aktywacji metabolicznej. W przypadku próbki pobranej zimą największą mutagenność (M) otrzymano w badaniach prowadzonych z frakcją mikrosomalną. Dla badań z frakcją FA wynosiła ona 281 rew./m³, a dla badań z frakcją FB 266 rew./m³. Natomiast w teście bez frakcji 234 rew./m³. W badaniach próbki pobranej latem największą mutagenność otrzymano w teście bez frakcji (249 rew./m³), a w testach z frakcją FA i FB wynosiła ona odpowiednio 224 rew./m³ i 211 rew./m³ (tab. 15).



Rys. 50. Współczynniki MR dla szczepu TA100 uzyskane w teście klasycznym w modyfikacji Kado dla próbki pobranej zimą



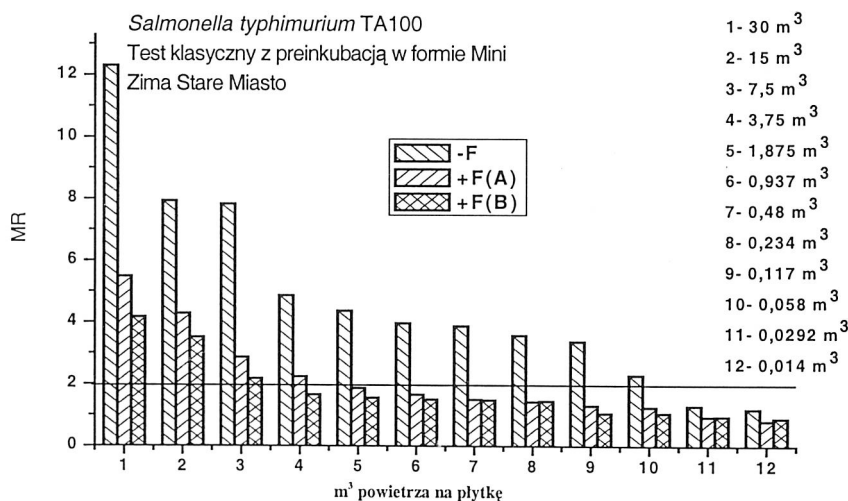
Rys. 51. Współczynniki MR dla szczepu TA100 uzyskane w teście klasycznym w modyfikacji Kado dla próbki pobranej latem

Zanieczyszczenia pobrane zimą, pochodzące z $2,5 \text{ m}^3$ powietrza, spowodowały efekt mutageny w teście przeprowadzanym z frakcją FA. Natomiast badania z frakcją FB dały efekt pozytywny przy stężeniu zanieczyszczeń pochodzących z 5 m^3 . Z kolei badane największe stężenie ekstraktu, wynoszące 5 m^3 , nie dało współczynnika $MR \geq 2$ w badaniach prowadzonych z próbką pobraną w okresie letnim. Testem tym wykryto jedynie, z większą czułością w porównaniu do testu klasycznego, obecność mutagenów pośrednich w próbce pobranej zimą.

Test klasyczny *Salmonella* z preinkubacją w formie Mini (VIII)

W badaniach prowadzonych bez frakcji za pomocą testu klasycznego z preinkubacją w formie Mini z próbką pobraną zimą uzyskano dużo większe współczynniki MR w porównaniu do testu klasycznego. Współczynnik $MR \geq 2$ w badaniach bez frakcji otrzymano dla zanieczyszczeń pochodzących z $0,058 \text{ m}^3$ powietrza. W teście klasycznym współczynnik ten wynosił $3,125 \text{ m}^3$. Również w badaniach próbki pobranej latem uzyskano dużo mniejsze stężenie progowe wykrywające obecność mutagenów bezpośrednich, wynoszące $0,937 \text{ m}^3$. Ponadto, w badaniach tej próby, otrzymano efekt toksyczny na krzywej dawka–odpowieź.

W przypadku badań prowadzonych w obecności frakcji mikrosomalnych próbki pobranej zimą również uzyskano przesunięcie stężenia progowego, wykrywającego obecność mutagenów pośrednich, w stronę mniejszych wartości. W badaniach prowadzonych z frakcją FA wynosiło ono $3,75 \text{ m}^3$ powietrza, a w badaniach z frakcją FB $7,5 \text{ m}^3$. Z kolei dla próbki pobranej latem nie uzyskano wyniku dodatniego testu przeprowadzonego w obecności frakcji FA, a w obecności frakcji FB obecność mutagenów wykryto w stężeniu 30 m^3 powietrza, czyli w stężeniu mniejszym niż w teście I.



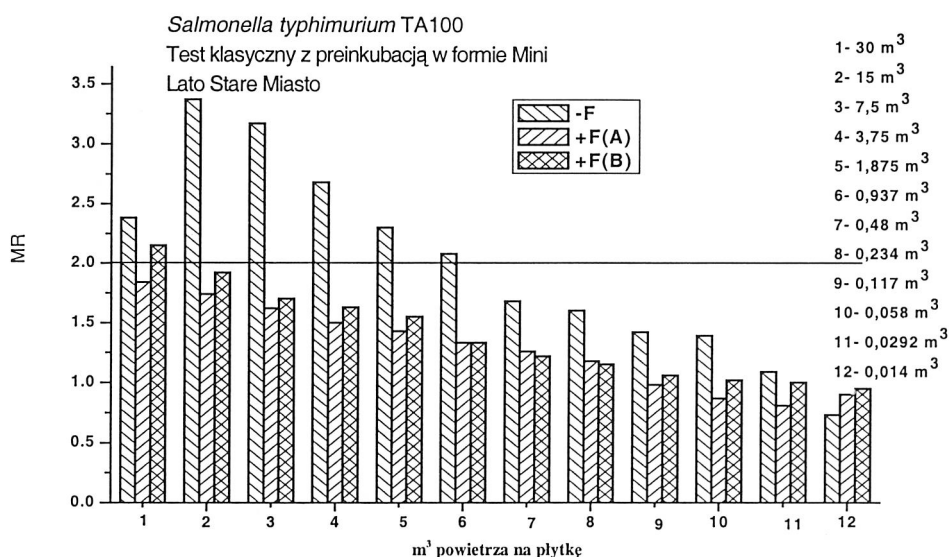
Rys. 52. Współczynniki MR dla szczepu TA100 uzyskane w teście klasycznym z preinkubacją w formie Mini dla próbki pobranej zimą

Największą mutagenność (M), dla próbki pobranej zimą, uzyskano w badaniach bez frakcji. Wynosiła ona 366 rew./m³. W teście prowadzonym z udziałem frakcji FB 224 rew./m³, a w teście z frakcją FA 212 rew./m³. W przypadku próbki pobranej latem największą liczbę rewertantów indukowanych przez 1 m³ otrzymano w badaniach z frakcją FB (212) i FA (196). W badaniach bez frakcji mutagenność wynosiła 175 rew./m³ (tab. 15).

Uzyskane wyniki w omawianym teście świadczą o przydatności proponowanej modyfikacji w przypadku szczepu TA100.

Uzyskane wyniki badań ze szczepem TA100 świadczą o tym, że w badanych próbkach pyłów obecnych było mniej mutagenów typu podstawienia pary zasad.

Z porównania wyników uzyskanych dla testu klasycznego (I), testu prowadzonego bez udziału NADP (II) i testu bez NADP z 10-krotnie większą ilością bakterii (III) wynika, że dodatkowa obecność tego kofaktora i większej ilości bakterii w mieszaninie reakcyjnej w nieznacznym stopniu wpłynęła na odpowiedź mutagenną omawianego szczepu. W testach tych wykazano również dużą przydatność frakcji mikrosomalnej indukowanej fenobarbitem (FB). Można więc prowadzić badania z zastosowaniem szczepu TA100, nie dodając kosztownego NADP do frakcji S9-mix.



Rys. 53. Współczynniki MR dla szczepu TA 100 uzyskane w teście klasycznym z preinkubacją w formie MINI dla próbki pobranej zimą

10-krotne zwiększenie ilości bakterii w teście klasycznym (IV) spowodowało obniżenie progu wykrywalności zanieczyszczeń mutagennych pobranych zimą jedynie w badaniach z frakcją FA i FB w stosunku do testu klasycznego. Zwiększenie ilości bakterii spowodowało także zwiększenie czułości testu w przypadku frakcji FB w badaniach ekstraktu próbki pobranej latem. Modyfikacja ta nie miała wpływu na wykrywanie mutagenów bezpośrednich (badania bez aktywacji metabolicznej).

Test V i VI wykazał wpływ preinkubacji na liczbę uzyskiwanych rewertantów. Szczep TA100 dawał różną odpowiedź mutagenną w zależności od temperatury i czasu preinkubacji. Największe współczynniki *MR* otrzymano w czasie inkubacji trwającej 10–40 minut w temperaturze 37 °C. Z kolei maksima wartości współczynnika *MR* w temperaturze 30 °C otrzymywano po 30–50-minutowej preinkubacji.

Tabela 15. Mutagenność (*M*) otrzymana dla poszczególnych testów przeprowadzonych dla ekstraktów próbki zimowej i letniej pobranych na Starym Mieście w obecności szczepu TA100

Pora roku	Rodzaj testu	Obecność frakcji S9	Równanie prostej regresji	R^2	Mutagenność (<i>M</i>) rew./m ³
Zima	I	–F	$y=158,5+10,5x$	0,90	169
		FA	$y=192,2+4,8x$	0,98	197
		FB	$y=164,4+6,8x$	0,99	171
Lato	I	–F	$y=109,4+1,8x$	0,74	111
		FA	$y=163,5+1,3x$	0,78	165
		FB	$y=156,5+2,2x$	0,97	159
Zima	II	FA	$y=116,5+4x$	0,93	121
		FB	$y=97,9+2,5x$	0,95	100
Lato	II	FA	$y=90,9+1,6x$	0,96	92
		FB	$y=77,2+1,1x$	0,78	78
Zima	III	FA	$y=110,3+15,4x$	0,98	126
		FB	$y=116+31,4x$	0,99	147
Lato	III	FA	$y=110,3+5,1x$	0,99	115
		FB	$y=116+6,4x$	0,98	122
Zima	IV	–F	$y=108,5+24,8x$	0,98	133
		FA	$y=126,9+8x$	0,85	135
		FB	$y=124,6+4,6x$	0,93	129
Lato	IV	–F	$y=110,9+1,5x$	0,92	112
		FA	$y=112,8+2,3x$	0,97	115
		FB	$y=116,9+2,7x$	0,94	120
Zima	VII	–F	$y=233,9+72,6x$	0,99	234
		FA	$y=189,7+91,5x$	0,98	281
		FB	$y=214,2+52,2x$	0,93	266
Lato	VII	–F	$y=230+19,1x$	0,53	249
		FA	$y=204,1+18,7x$	0,91	224
		FB	$y=193,3+17,7x$	0,88	211
Zima	VIII	–F	$y=212,6+153,1x$	0,52	366
		FA	$y=145,7+66,7x$	0,71	212
		FB	$y=171,1+53x$	0,30	224
Lato	VIII	–F	$y=143,6+31,7x$	0,13	175
		FA	$y=168,9+26,6x$	0,12	196
		FB	$y=145,7+66,7x$	0,71	212

Porównanie wyników uzyskanych dla testu klasycznego (I) i Kado (VII) wykazało obniżenie progów wykrywalności tylko w przypadku mutagenów pośrednich obec-

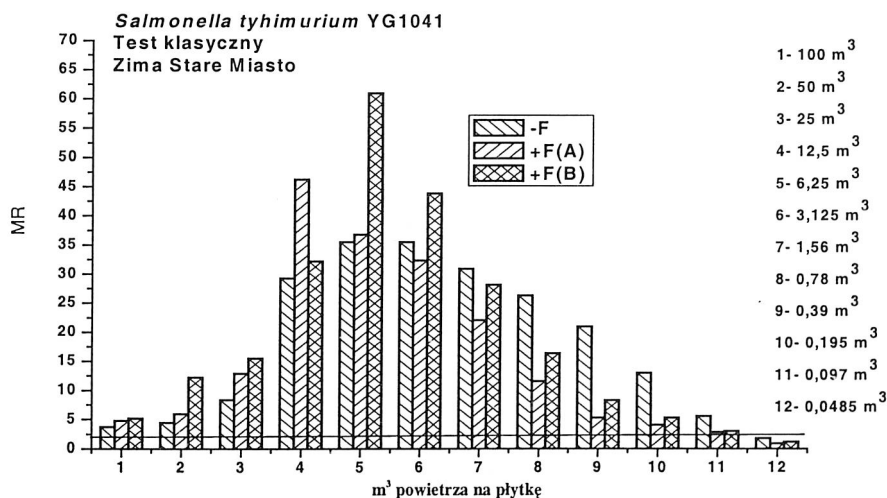
nych w próbce pobranej zimą. W pozostałych badaniach nie uzyskano w tym teście wyników dodatnich.

Test Mini (VIII) okazał się być najlepszy w badaniach nad obecnością mutagenów bezpośrednich i pośrednich zarówno dla ekstraktów próbki pobranej zimą, jak i latem. Świadczą o tym zdecydowanie mniejsze stężenia progowe uzyskane w tym teście dla obu badanych próbek. Jedynie w przypadku próbki pobranej latem badanej w obecności frakcji FA nie uzyskano, w badanym zakresie stężeń ekstraktów, wyniku dodatniego w teście.

6.3.3. Wyniki testów z udziałem szczepu *Salmonella typhimurium* YG1041

Test klasyczny *Salmonella* (test I)

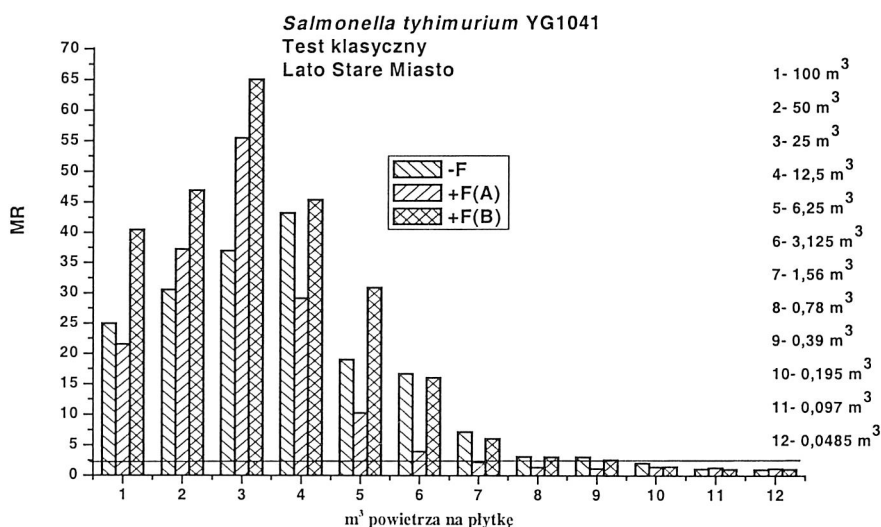
W przypadku badań prowadzonych ze szczepem *Salmonella typhimurium* YG1041, w klasycznym teście, uzyskano bardzo duże wartości współczynnika *MR* (rys. 54, 55). Świadczy to o tym, że zarówno w próbce pobranej zimą, jak i latem obecne były zanieczyszczenia mutagenne typu zmiany fazy odczytu, zwłaszcza nitrowe związki aromatyczne, na które szczep ten jest wrażliwy. Maksymalna liczba rewertantów uzyskano w przypadku mniejszych stężeń badanych ekstraktów w porównaniu do liczby rewertantów uzyskanych dla szczepów TA98 i TA100. Maksymalną wartość współczynnika *MR* (35,50) w badaniach bez aktywacji metabolicznej uzyskano po wprowadzeniu na płytkę ekstraktu zanieczyszczeń pobranych zimą pochodzących z 3,125 m³ powietrza. W badaniach tej próbki prowadzonych z aktywacją metaboliczną frakcją FA i FB maksymalną wartość współczynnika *MR* (*MR* = 36,21 dla FA i *MR* = 63,83 dla



Rys. 54. Współczynniki *MR* dla szczepu YG1041 uzyskane w teście klasycznym dla próbki pobranej zimą

FB) uzyskano po wprowadzeniu do testu zanieczyszczeń pochodzących z $6,25 \text{ m}^3$ powietrza. Z kolei dla próbki pobranej latem maksymalną wartość współczynnika MR (43,14) w badaniach $-F$ uzyskano dla $12,5 \text{ m}^3$ powietrza na płytkę, a dla badań z FA i FB dla 25 m^3 powietrza na płytkę ($MR = 54,95$ dla FA i $MR = 65,01$ dla FB). We wszystkich przypadkach stwierdzono występowanie efektu toksycznego na krzywej dawka–odpowiedź. We wszystkich przeprowadzonych testach uzyskano również większe współczynniki MR w badaniach z frakcją FB w porównaniu do badań z frakcją FA. Wartości współczynnika MR , uzyskane w badaniach bez frakcji, były większe w porównaniu do wartości uzyskanych dla frakcji FA.

Dla próbki pobranej zimą uzyskano największą mutagenność (M) w badaniach z frakcją FB (tab. 16). Wynosiła ona 2765 rew./m^3 . W testach z udziałem frakcji FA mutagenność wynosiła 2194 rew./m^3 , a w badaniach bez frakcji 2169 rew./m^3 . W przypadku próbki pobranej latem największą liczbę rewertantów indukowanych przez 1 m^3 powietrza, wynoszącą 728, uzyskano również w teście z udziałem frakcji FB. Podobną liczbę rewertantów otrzymano w teście bez frakcji (704 rew./m^3), a najmniejszą w teście z frakcją FA (281 rew./m^3).

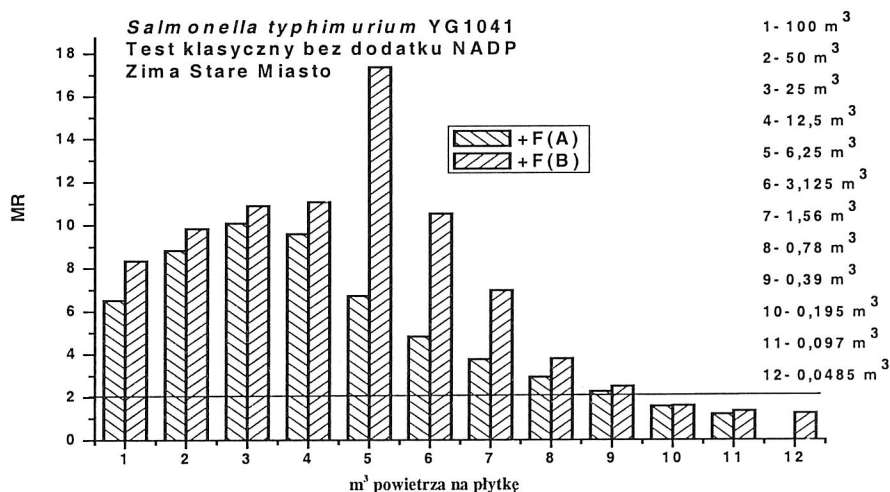


Rys. 55. Współczynniki MR dla szczepu YG1041 uzyskane w teście klasycznym dla próbki pobranej latem

Stężenie progowe, zarówno dla mutagenów pośrednich, jak i bezpośrednich obecnych w próbce pobranej zimą, stwierdzono przy bardzo małym stężeniu ekstraktu zanieczyszczeń pyłowych wynoszącym $0,097 \text{ m}^3/\text{płytkę}$. Stężenia, które dawały $MR \geq 2$, w przypadku ekstraktu próbki letniej, były różne dla badań $-F$, FA i FB. Dla testów przeprowadzonych bez frakcji stwierdzono, że zanieczyszczenia pochodzące z $0,195 \text{ m}^3$ powietrza były mutagenne, dla FA z $1,65 \text{ m}^3$, a dla FB z $0,39 \text{ m}^3$ powietrza.

Test klasyczny *Salmonella* bez udziału NADP (test II)

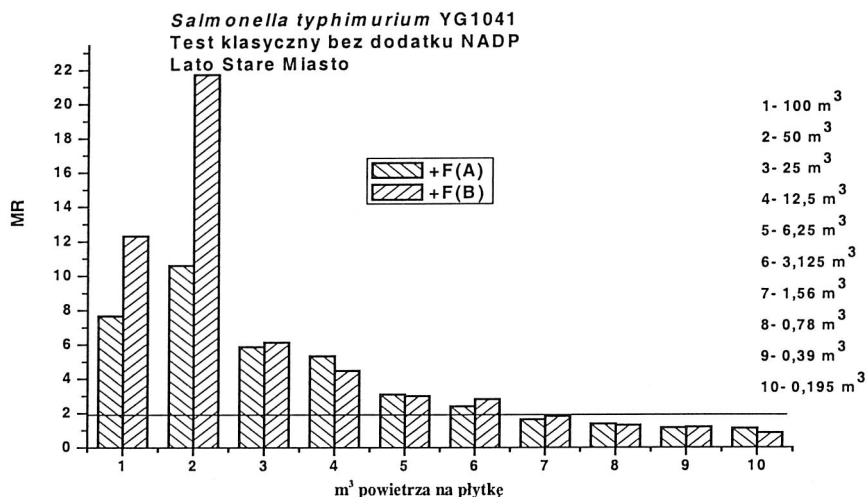
Liczba rewertantów uzyskane w teście klasycznym bez udziału NADP umożliwiła obliczenie współczynnika *MR* mniejszego w porównaniu do tych, jakie otrzymano w teście I dla tego szczepu (rys. 56, 57). W przypadku tego testu również zaobserwowano efekt toksyczny na krzywej dawka–odpowieź, zarówno dla próbki pobranej zimą, jak i latem. W przypadku badań próbki zimowej dużo lepsze wyniki uzyskano w testach z frakcją FB. Największy współczynnik *MR* (17,36) w badaniach z tą frakcją otrzymano, wprowadzając na płytkę zanieczyszczenia pochodzące z 6,25 m³ powietrza, a w przypadku frakcji FA z 25 m³ powietrza (*MR* = 10,08). W testach przeprowadzanych z próbką pobraną latem największą wartość *MR* (*MR* = 10,6 dla FA i *MR* = 21,71 dla FB), dla obu frakcji otrzymano, wprowadzając na płytkę zanieczyszczenia znajdujące się w 50 m³ powietrza. Otrzymano również większą mutagenność (*M*) w testach z frakcją FB. Dla próbki pobranej zimą wartość *M* wynosiła 650 rew./m³ w badaniach z FB i 468 rew./m³ w teście z FA. Z kolei dla próbki pobranej latem otrzymano 203 rew./m³ w teście z frakcją FB i 163 rew./m³ w obecności frakcji FA (tab. 16).



Rys. 56. Współczynniki *MR* dla szczepu YG1041 uzyskane w teście klasycznym bez NADP dla próbki pobranej zimą

Próg wykrywalności zanieczyszczeń mutagennych dla frakcji FA i FB w przypadku próbki pobranej zimą uzyskano dla stężenia zanieczyszczeń pochodzących z 0,39 m³ powietrza, natomiast dla ekstraktu próbki pobranej latem dla stężenia zanieczyszczeń pochodzących z 3,125 m³/płytkę.

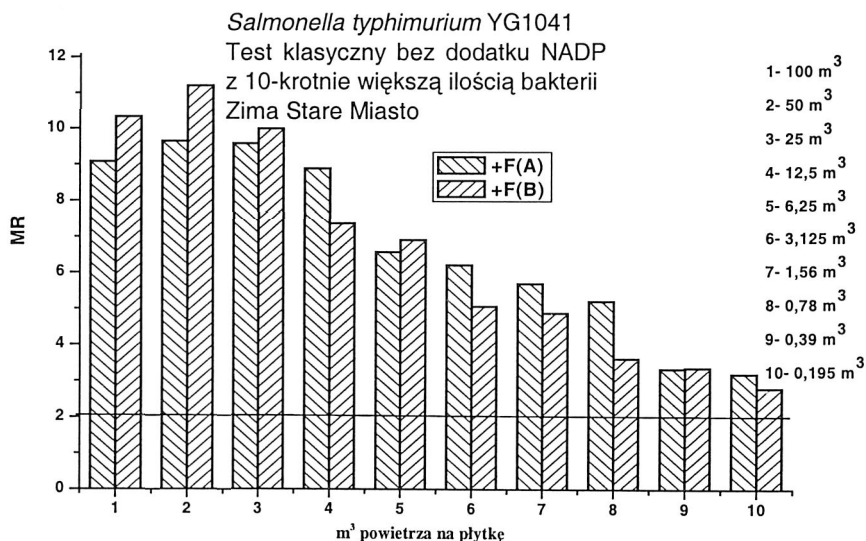
Jak widać, brak dodatkowej puli kofaktora wpływał na pogorszenie uzyskanych wyników w przypadku omawianego szczepu, ale należałoby się zastanowić czy ten test nie mógłby być zastosowany w badaniach skriningowych.



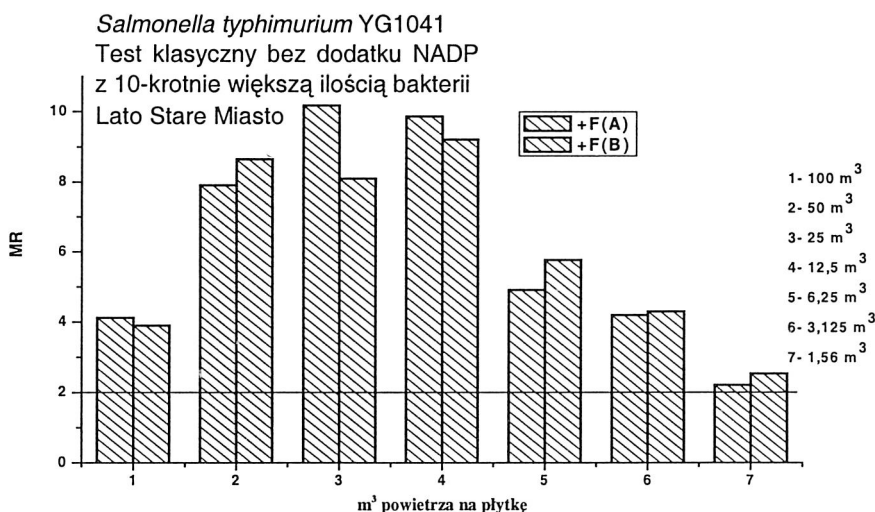
Rys. 57. Współczynniki *MR* dla szczepu YG1041 uzyskane w teście klasycznym bez NADP dla próbki pobranej latem

Test klasyczny *Salmonella* bez udziału NADP ze zwiększoną ilością bakterii (III)

W teście klasycznym bez NADP z 10-krotnie większą ilością bakterii otrzymano mniejsze współczynniki *MR* w porównaniu do testu II (rys. 58, 59). We wszystkich badaniach stwierdzono również efekt toksyczny na krzywej dawka–odpowiedź. W badanych najmniejszych stężeniach zanieczyszczeń powietrza wynoszących 0,195 m³/płytkę w przypadku próbki pobranej zimą i 1,56 m³/płytkę dla próbki



Rys. 58. Współczynniki *MR* dla szczepu YG1041 uzyskane w teście klasycznym bez NADP z 10-krotnie większą ilością bakterii dla próbki pobranej zimą



Rys. 59. Współczynniki *MR* dla szczepu YG1041 uzyskane w teście klasycznym bez NADP z 10-krotnie większą ilością bakterii dla próby pobranej latem

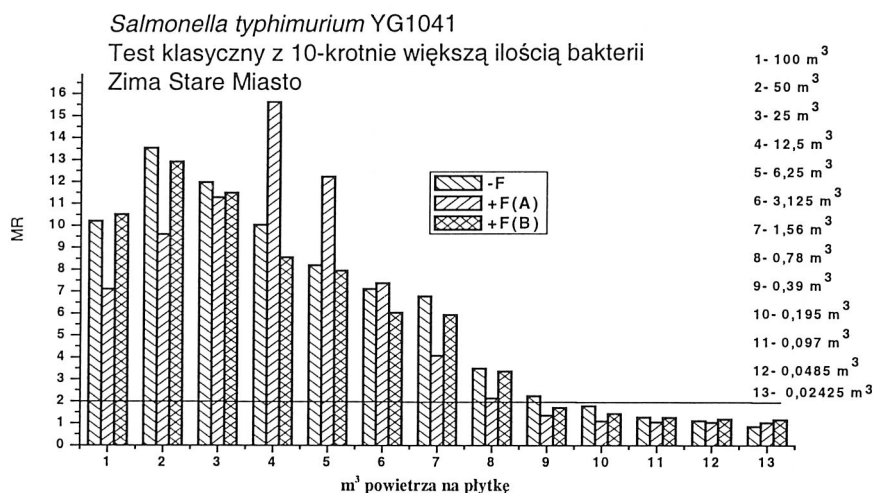
pobranej latem otrzymano odpowiedź pozytywną w teście. Wynika z tego, że dziesięciokrotny wzrost ilości bakterii przy braku dodatkowej puli NADP w mieszaninie reakcyjnej spowodował obniżenie progu wykrywalności substancji mutagennych występujących w badanych próbkach. Współczynniki *MR*, w badaniach z próbką pobraną zimą, uzyskane dla obu frakcji mikrosomalnych były podobne, większe dla frakcji FA dla badanych mniejszych stężeń zanieczyszczeń. Natomiast w przypadku próbki pobranej latem w badanych mniejszych stężeniach ekstraktów uzyskano większe współczynniki *MR* dla testu z frakcją FB. Największą liczbę rewertantów indukowanych przez 1 m³ badanego powietrza uzyskano w obecności frakcji FA (tab. 16). Dla próbki pobranej w zimie mutagenność *M* wynosiła 1144 rew./m³ w teście z FA i 1077 rew./m³ w obecności FB. W przypadku próbki pobranej latem otrzymano odpowiednio 337 rew./m³ i 303 rew./m³.

Test klasyczny *Salmonella* z 10-krotnie zwiększoną ilością bakterii (IV)

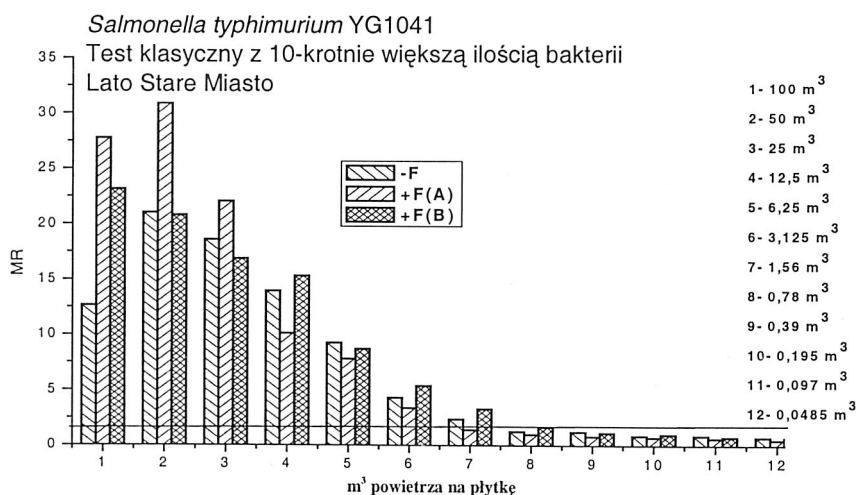
W teście klasycznym z 10-krotnie większą ilością bakterii otrzymano mniejsze współczynniki *MR* w stosunku do testu I (rys. 60, 61). Stosunkowo duże liczby rewertantów uzyskano dla próbki pobranej latem w porównaniu do próbki pobranej zimą.

W teście tym zaobserwowano również efekt toksyczny na krzywych dawka–odpowiedź, z wyjątkiem badań z próbką pobraną latem w obecności frakcji FB. Maksymalną wartość współczynnika *MR* w badaniach bez aktywacji metabolicznej (*MR* = 13,54) i z aktywacją metaboliczną frakcją FB (*MR* = 12,91) uzyskano po wprowadzeniu na płytkę ekstraktu zanieczyszczeń pobranych zimą pochodzących z 50 m³ powietrza. W badaniach tej próbki, prowadzonych z aktywacją metaboliczną frakcją FA, maksymalną wartość współczynnika *MR* (15,62) uzyskano po wprowadzeniu do testu zanieczyszczeń pochodzących z 12,5 m³ powietrza. Z kolei dla próbki pobranej latem maksymalną wartość *MR* w badaniach bez frakcji –F (21,03) i z frakcją FA

(30,89) uzyskano dla 50 m³ powietrza na płytkę, a w badaniach w obecności FB (23,13) dla 100 m³ powietrza na płytkę. W przypadku próbki pobranej zimą największe współczynniki *MR* otrzymano w teście z frakcją FB dla większych badanych stężeń ekstraktów, natomiast dla stężeń mniejszych największe wartości *MR* uzyskano w teście bez frakcji S9. Z kolei w testach prowadzonych z próbką pobraną latem największe wartości współczynnika *MR* zaobserwowano w badaniach z frakcją, w stężeniach większych dla FA, a w stężeniach mniejszych dla FB.



Rys. 60. Współczynniki *MR* dla szczepu YG1041 uzyskane w teście klasycznym z 10-krotnie większą ilością bakterii dla próbki pobranej zimą



Rys. 61. Współczynniki *MR* dla szczepu YG1041 uzyskane w teście klasycznym z 10-krotnie zwiększoną ilością bakterii dla próbki pobranej latem

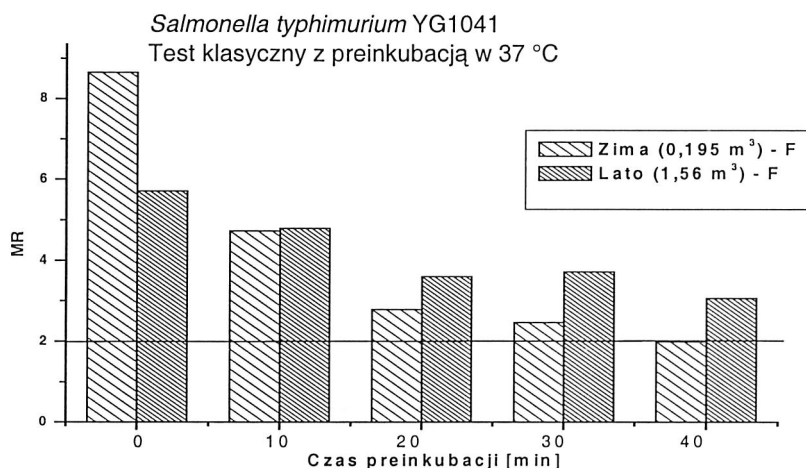
Mutagenność (*M*) kształtowała się dla próbki pobranej zimą następująco: 748 rew./m³ (–F), 663 rew./m³ (FB) i 512 rew./m³ (FA), a dla próbki pobranej latem: 328 rew./m³ (FB), 255 rew./m³ (–F) i 157 rew./m³ (FA) (tab. 16).

W przypadku próbki pobranej zimą zanieczyszczenia obecne w 0,78 m³ powietrza dawały efekt mutageny w badaniach z FA i z FB, natomiast przy stężeniu 0,39 m³/płytkę efekt ten obserwowano dla próbki badanej bez frakcji. Zanieczyszczenia letnie pochodzące z 1,56 m³ okazały się mutagenne w badaniach prowadzonych bez frakcji i z frakcją FB, natomiast efekt ten w badaniach z FA dało stężenie 3,125 m³/płytkę.

Jak widać, dziesięciokrotne zwiększenie ilości bakterii w teście klasycznym spowodowało przesunięcie wartości stężeń progowych wykrywających obecność związków mutagennych w stronę większych wartości w porównaniu do testu I.

Test klasyczny *Salmonella* z preinkubacją w 37 °C (V)

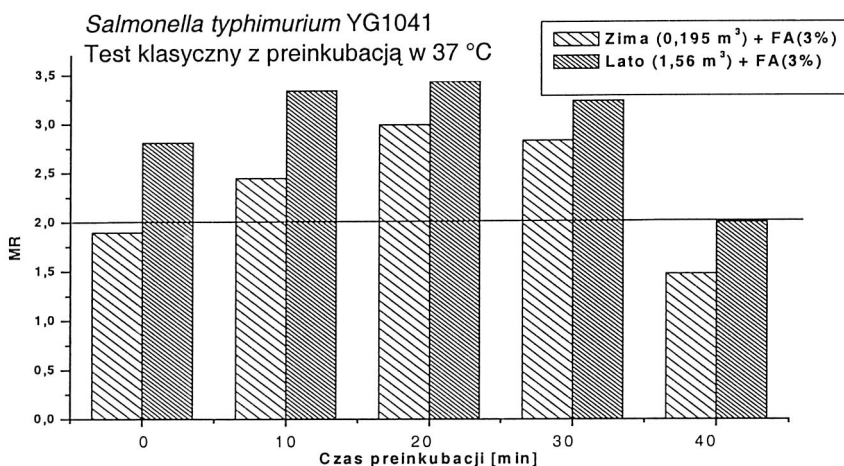
Wyniki uzyskane dla testu klasycznego, prowadzonego z preinkubacją w 37 °C, wykazały zmiany liczby rewertantów w zależności od czasu preinkubacji. Wpływ preinkubacji na liczbę powstających rewertantów szczepu YG1041 badany był w obecności ekstraktu próbki pobranej zimą, pochodzącego z 0,195 m³ powietrza i w obecności ekstraktu próbki letniej w stężeniu 1,56 m³ powietrza na płytkę (tab. 7).



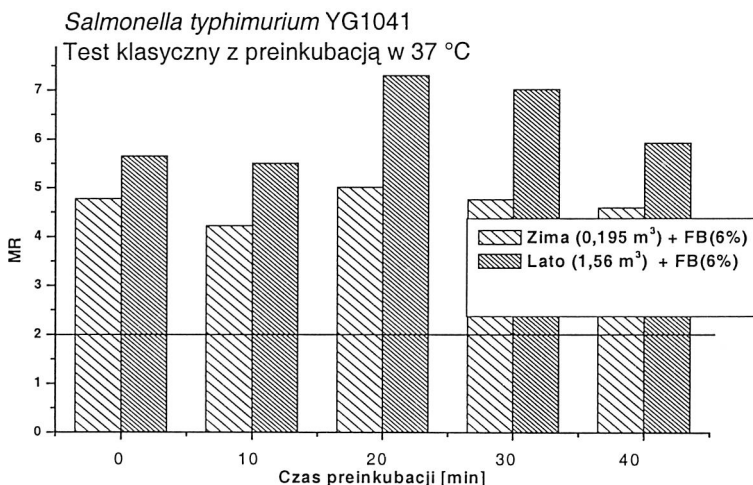
Rys. 62. Współczynniki MR dla szczepu YG1041 uzyskane w teście preinkubacyjnym prowadzonym bez frakcji w temperaturze 37 °C

Wyniki uzyskane w badaniach prowadzonych bez frakcji mikrosomalnej (rys. 62), zarówno z ekstraktem uzyskanym z zimowych, jak i letnich zanieczyszczeń pyłowych, nie wykazały wpływu preinkubacji na zwiększenie współczynnika MR. W tym przypadku obserwowano stopniowe zmniejszenie liczby rewertantów wraz z wydłużaniem czasu preinkubacji. Po 40 minutach MR stanowiła dla próbki pobranej zimą tylko 22%, a dla próbki letniej 52% MR uzyskanych dla prób niepreinkubowanych.

W badaniach z aktywacją metaboliczną frakcją FA (rys. 63) zaobserwowano największy współczynnik *MR* po 20-minutowej preinkubacji w przypadku obu próbek (*MR* = 3,1 dla zimowej i *MR* = 3,4 dla letniej). Po tym czasie otrzymano 57% zwiększenie współczynnika *MR* dla próbki pobranej zimą i 22% dla próbki pobranej latem, w porównaniu do próbek badanych metodą klasyczną (czas 0).



Rys. 63. Współczynniki *MR* dla szczepu YG1041 uzyskane w teście preinkubacyjnym prowadzonym z frakcją FA w temperaturze 37 °C



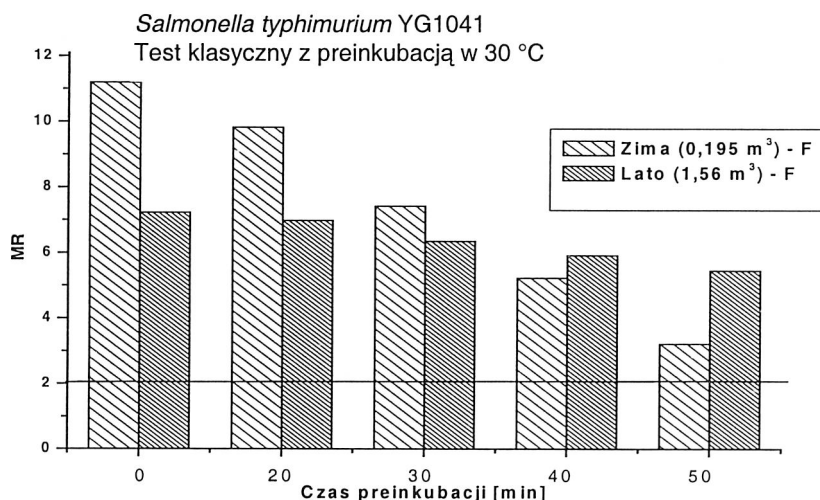
Rys. 64. Współczynniki *MR* dla szczepu YG1041 uzyskane w teście preinkubacyjnym prowadzonym z frakcją FB w temperaturze 37 °C

Stwierdzono mniejszy wpływ preinkubacji na liczbę powstających rewertantów w obecności frakcji FB, zwłaszcza dla próbki pobranej zimą (rys. 64). Zarówno dla ekstraktów próbki zimowej, jak i letniej maksimum *MR* otrzymano, podobnie jak dla frak-

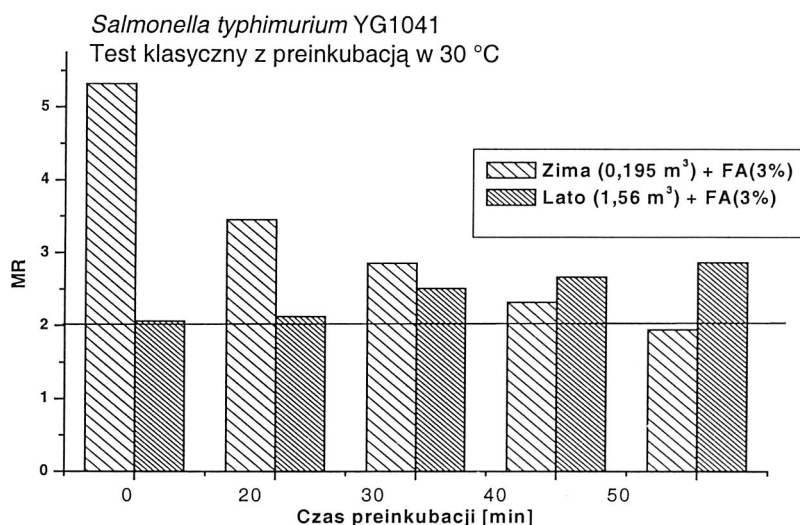
cji FA, po 20 minutach ($MR = 4,8$ dla zimowej i $MR = 7,2$ dla letniej). W porównaniu do prób niepreinkubowanych wartości te były większe po tym czasie o 5% i 29%.

Test klasyczny *Salmonella* z preinkubacją w 30 °C (VI)

Test klasyczny z preinkubacją w 30 °C prowadzono dla stężeń takich samych jak w teście V w przypadku ekstraktów próbek pobranych zimą i latem (tab. 7).



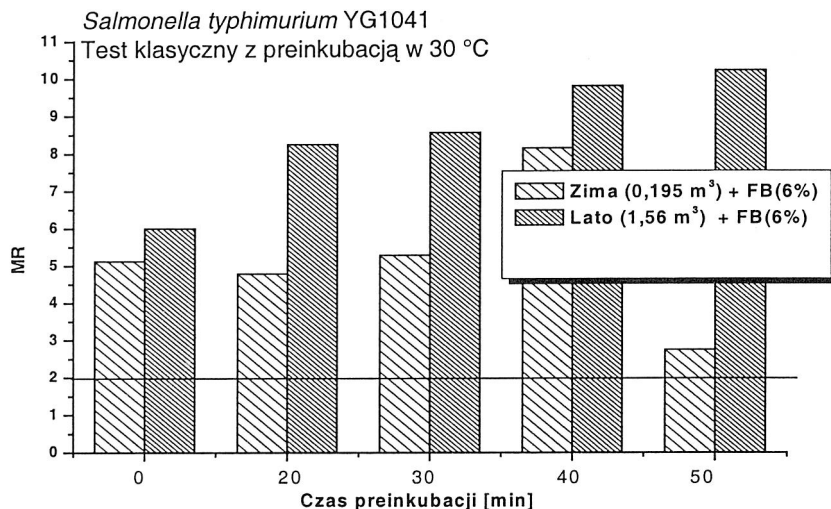
Rys. 65. Współczynniki MR dla szczepu YG1041 uzyskane w teście preinkubacyjnym prowadzonym bez frakcji w temperaturze 30 °C



Rys. 66. Współczynniki MR dla szczepu YG1041 uzyskane w teście preinkubacyjnym prowadzonym z frakcją FA w temperaturze 30 °C

W badaniach bez aktywacji metabolicznej (rys. 65), podobnie jak w poprzednim teście, stwierdzono stopniowe zmniejszanie LR w czasie 50-minutowej preinkubacji. Po tym cza-

się preinkubacja próbki pobranej zimą spowodowała zmniejszenie współczynnika *MR* aż do 29%, a próbki pobranej latem do 76% *MR* otrzymanych w badaniach bez preinkubacji.



Rys. 67. Współczynniki *MR* dla szczepu YG1041 uzyskane w teście preinkubacyjnym prowadzonym z frakcją FB w temperaturze 30 °C

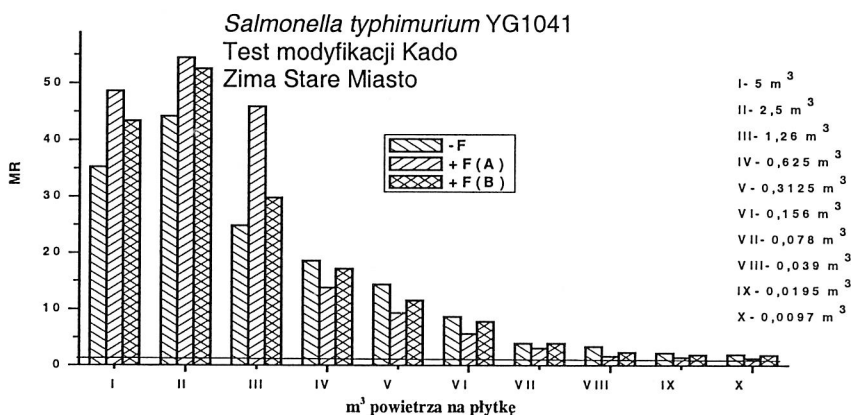
Zmniejszenie współczynnika mutagenności *MR* zaobserwowano również w przypadku badań ekstraktu próbki zimowej inkubowanej w obecności frakcji FA (rys. 66). Po 50 minutach współczynnik *MR* wynosił 36% wartości uzyskanej dla próbki nieinkubowanej. Z kolei po tym samym czasie otrzymano maksymalną wartość współczynnika *MR* (2,86) dla próbki pobranej w okresie letnim. Wzrósł on o 39% w porównaniu do wartości *MR* otrzymanej dla tej próbki w badaniach bez preinkubacji.

W wyniku badań prowadzonych w obecności frakcji FB (rys. 67) maksymalne wartości współczynnik *MR* otrzymano dla próbki zimowej po 40 minutach (8,13), a dla próbki letniej po 50 minutach (10,19). Wynosiły one odpowiednio 159% i 170% wartości *MR* otrzymanych dla prób niepoddanych preinkubacji.

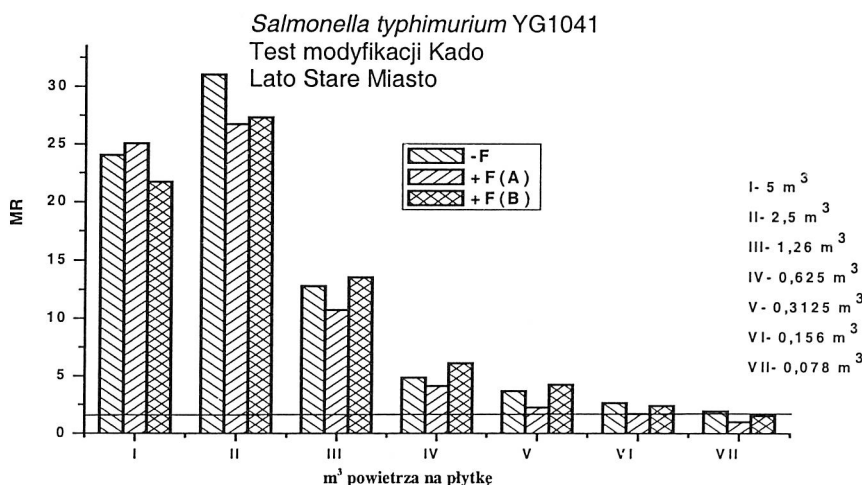
Test klasyczny *Salmonella* w modyfikacji Kado (VII)

W teście *Salmonella*, przeprowadzanym w modyfikacji Kado ze szczepem YG1041, uzyskano duże współczynniki *MR*, tak jak w teście klasycznym (rys. 68, 69). W badanym zakresie stężeń zanieczyszczeń powietrza, 20 razy mniejszym niż w teście I, uzyskano również efekt toksyczny na krzywych dawka–odpowiedź. Większe współczynniki *MR*, w przypadku próbki pobranej zimą, uzyskano w badaniach z frakcjami mikrosomalnymi dla większych stężeń ekstraktów tej próbki. W przypadku stężeń mniejszych uzyskano więcej rewertantów w badaniach prowadzonych bez frakcji. W przypadku obu próbek stwierdzono również, podobnie jak w teście I, występowanie większej liczby mutagenów pośrednich w teście wykonywanym z frakcją FB, a współczynniki *MR* uzyskane w badaniach bez frakcji –F były większe w porównaniu do uzyskanych dla frakcji FA. Maksymalne wartości współ-

czynnika *MR* we wszystkich testach uzyskano w stężeniu zanieczyszczeń pochodzących z 2,5 m³ powietrza. Wynosiły one 44,17 w badaniach bez aktywacji metabolicznej oraz 54,51 (FA) i 52,55 (FB) w badaniach z aktywacją metaboliczną ekstraktów zanieczyszczeń pobranych zimą. W przypadku zanieczyszczeń pobranych latem w teście bez frakcji mikrosomalnej wartość współczynnika *MR* uzyskana dla ekstraktu pochodzącego ze stężenia 2,5 m³ powietrza wynosiła 31,03. Z kolei w testach z aktywacją metaboliczną frakcją FA 26,73 i frakcją FB 27,32.



Rys. 68. Współczynniki *MR* dla szczepu YG1041 uzyskane w teście klasycznym w modyfikacji Kado dla próbki pobranej zimą



Rys. 69. Współczynniki *MR* dla szczepu YG1041 uzyskane w teście klasycznym w modyfikacji Kado dla próbki pobranej latem

Dla próbki pobranej zimą uzyskano największą mutagenność *M* (6696 rew./m³) w teście wykonywanym bez frakcji, następnie w teście z frakcją FB (5152 rew./m³) i z frakcją FA (3726 rew./m³). Największą *LR* indukowaną przez 1 m³ powietrza po-

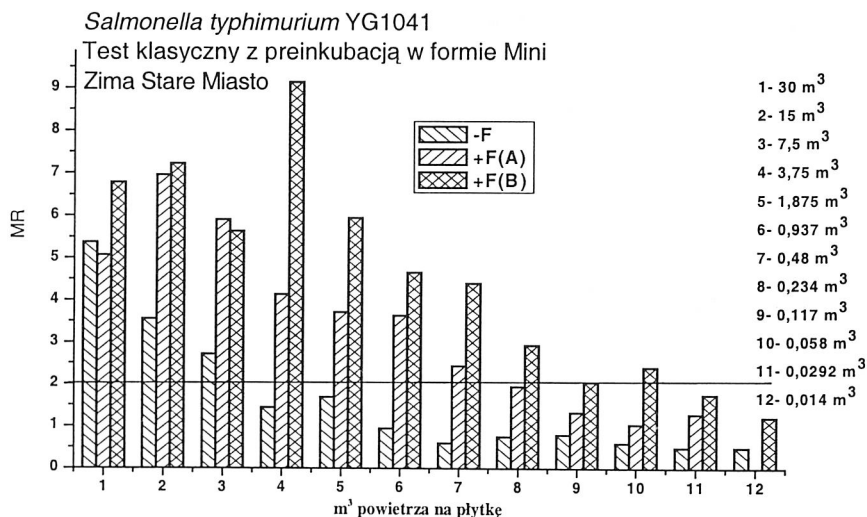
branego latem otrzymano w teście z frakcją FB (1535 rew./m³), następnie w badaniach bez frakcji (1406 rew./m³) i z frakcją FA (985 rew./m³) (tab. 16).

Najmniejsze stężenie powietrza wywołujące efekt mutageny w przypadku próbki pobranej zimą, w badaniach prowadzonych bez frakcji, wynosiło 0,0195 m³, w badaniach prowadzonych z frakcją FA – 0,078 m³, a w badaniach przeprowadzanych z frakcją FB – 0,039 m³. Stężenia progowe ekstraktów powietrza w testach z próbką pobraną w lecie przedstawiały się następująco: dla testów bez frakcji i z frakcją FB – 0,156 m³, a dla testu z frakcją FA – 0,3125 m³. Tak więc stężenia progowe dla obu badanych próbek były mniejsze niż w teście klasycznym.

Test klasyczny *Salmonella* z preinkubacją w formie Mini (VIII)

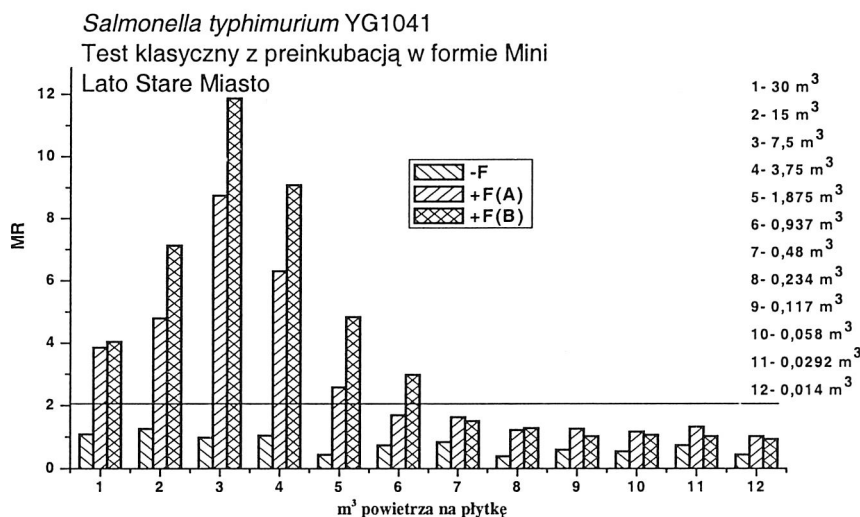
W teście klasycznym z preinkubacją w formie Mini otrzymano w całym zakresie badanych stężeń ekstraktów pyłów małe współczynniki *MR*, zwłaszcza dla próbki pobranej latem (rys. 70, 71). W tej próbce nie wykryto również obecności mutagenów bezpośrednich (–F). Z kolei w przypadku próbki pobranej zimą, w badaniach bez frakcji, otrzymano najmniejsze wartości współczynnika *MR*. Największe *MR* uzyskano w badaniach z frakcją FB. W obecności tej frakcji uzyskano także największą mutagenność *M* (tab. 16). Dla próbki pobranej w zimie uzyskano następującą liczbę rewertantów indukowanych przez 1 m³: 718 (FB), 572 (FA) i 144 (–F), a dla próbki pobranej w lecie: 328 (FB), 271 (FA) i 103 (–F).

Stężenie progowe wykrywające obecność mutagenów bezpośrednich dla próbki zimowej wynosiło 7,5 m³, dla mutagenów pośrednich badanych z frakcją FA – 0,48 m³, a z frakcją FB – 0,058 m³ powietrza. W przypadku próbki pobranej latem w obecności FA – 1,875 m³, natomiast w obecności FB – 0,937 m³ powietrza.



Rys. 70. Współczynniki *MR* dla szczepu YG1041 uzyskane w teście klasycznym z preinkubacją w formie Mini dla próbki pobranej zimą

Z porównania testu I i II wynika, że do osiągnięcia pełnej wrażliwości szczepu na obecne w badanych próbkach mutageny bezpośrednie i pośrednie, zwłaszcza nitrowe związki aromatyczne, niezbędna jest dodatkowa pula NADP. Koenzym w składzie S9-mix wyraźnie zwiększa liczbę *LR* i wpływa na zmniejszenie stężenia powietrza wywołującego efekt mutageny.



Rys. 71. Współczynniki *MR* dla szczepu YG1041 uzyskane w teście klasycznym z preinkubacją w formie Mini dla próbki pobranej latem

10-krotne zwiększenie ilości bakterii (III) wprowadzanych do testu klasycznego bez udziału NADP w niewielkim stopniu wpłynęło na zwiększenie wartości współczynnika *MR*. Powodowało natomiast zmniejszenie stężenia próbki wywołującej efekt mutageny w porównaniu z testem II. Jednak w porównaniu do klasycznego testu I w teście tym uzyskano gorsze wyniki.

Porównanie testu klasycznego I z testem klasycznym z 10-krotnie większą ilością bakterii (IV) pokazuje, że zwiększenie ilości bakterii w klasycznym teście powoduje zdecydowane zmniejszenie współczynnika *MR*. Wynika to prawdopodobnie z tego, iż na materiał genetyczny każdej komórki przypada 10-krotnie mniejsza ilość substancji mutagennych niż w teście klasycznym, co nie jest rekompensowane przez zwiększoną pulę enzymów wprowadzanych do testu.

Testy V i VI, prowadzone z preinkubacją w 37 °C i 30 °C, nie zwiększały czułości testu w wykrywaniu mutagenów bezpośrednich, zarówno w przypadku próbki pobranej zimą, jak i latem oraz w przypadku badań próbki pobranej zimą w przypadku frakcji FA w temperaturze 37 °C. W pozostałych badaniach najkorzystniejszy czas preinkubacji prowadzonej w temperaturze 37 °C, dla tego szczepu, wynosił 20 minut, a w temperaturze 30 °C – 40–50 minut. Dalsze przedłużenie czasu preinkubacji prowadziło do ujawnienia się efektów toksycznych.

Tabela 16. Mutagenność (M) otrzymana dla poszczególnych testów przeprowadzonych dla ekstraktów próbki zimowej i letniej pobranych na Starym Mieście w obecności szczepu YG1041

Pora roku	Rodzaj testu	Obecność frakcji S9	Równanie prostej regresji	R^2	Mutagenność (M) rew./m ³
Zima	I	–F	$y=128+2041,2x$	1,0	2169
		FA	$y=167+2027x$	0,99	2194
		FB	$y=182,2+2582,8x$	0,99	2765
Lato	I	–F	$y=139,6+564,2x$	0,95	704
		FA	$y=176,8+104x$	0,81	281
		FB	$y=156,1+572,4x$	0,98	728
Zima	II	FA	$y=183,4+284,6x$	0,94	468
		FB	$y=131,1+518,5x$	0,99	650
Lato	II	FA	$y=160,1+3,5x$	0,98	163
		FB	$y=122+80,8x$	0,92	203
Zima	III	FA	$y=193,4+950,5x$	0,99	1144
		FB	$y=179,7+897,4x$	0,92	1077
Lato	III	FA	$y=155,1+181,8x$	0,98	337
		FB	$y=144,3+158,4x$	0,99	303
Zima	IV	–F	$y=144,2+604x$	0,99	748
		FA	$y=152,8+359,1x$	0,97	512
		FB	$y=149,1+514x$	0,98	663
Lato	IV	–F	$y=116,6+138,7x$	0,92	255
		FA	$y=95,7+61,3x$	0,69	157
		FB	$y=97,1+231,1x$	0,95	328
Zima	VII	–F	$y=184+6512,4x$	0,96	6696
		FA	$y=219,7+3506,3x$	0,97	3726
		FB	$y=190+4962x$	0,98	5152
Lato	VII	–F	$y=127+1279,1x$	0,96	1406
		FA	$y=133,1+852,4x$	0,98	985
		FB	$y=117,5+1417,6x$	0,99	1535
Zima	VIII	–F	$y=88,4+55,4x$	0,65	144
		FA	$y=160,2+411,8x$	0,98	572
		FB	$y=183,1+535,4x$	0,89	718
Lato	VIII	–F	$y=86,7+16,3x$	0,66	103
		FA	$y=168,9+102,3x$	0,77	271
		FB	$y=153,1+174,4x$	0,98	328

W zbliżonych stężeniach ekstraktów powietrza wprowadzanych do testu w modyfikacji Kado (VII) otrzymano podobne wartości współczynnika MR w porównaniu do otrzymanych w teście klasycznym (I). W teście tym zaobserwowano także wyraźne zmniejszenie stężenia zanieczyszczeń wywołujących efekt mutageny we wszystkich badaniach. Z porównania stężeń ekstraktów powietrza wywołujących efekt mutageny w tym teście widać, że może on być stosowany z dużym powodzeniem dla tego szczepu.

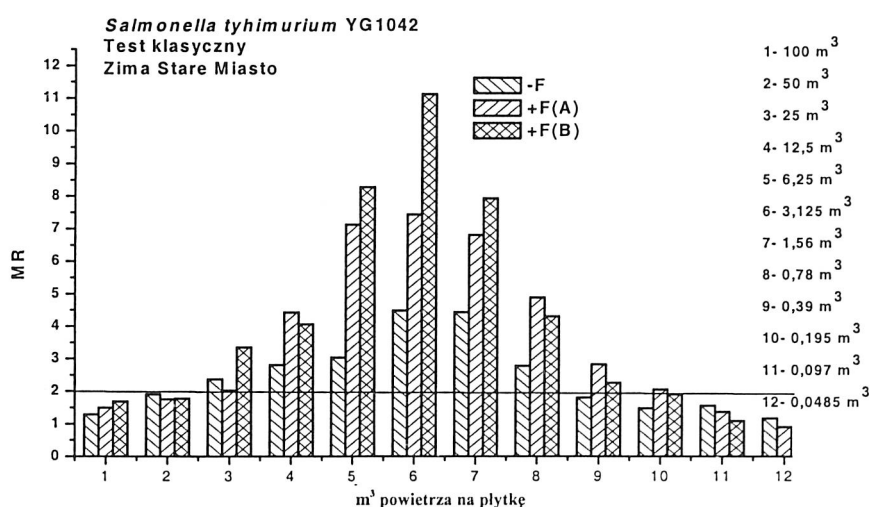
W teście klasycznym, z preinkubacją w formie MINI (VIII), otrzymano mniej rewertantów w porównaniu zarówno z testem klasycznym (I), jak i z testem w modyfikacji Kado (VII). Ujawnił się w nim najprawdopodobniej toksyczny efekt działania składników ekstraktów wynikający z długiego czasu kontaktu stosunkowo dużego stężenia zanieczyszczeń, z jakim mamy do czynienia w tym teście.

We wszystkich testach prowadzonych z frakcji FB uzyskano lepsze lub porównywalne wyniki do rezultatów otrzymanych w badaniach z frakcją FA, co świadczy o dużej przydatności frakcji indukowanej fenobarbitem w badaniach prowadzonych z udziałem tego szczepu.

6.3.4. Wyniki testów z udziałem szczepu *Salmonella typhimurium* YG1042

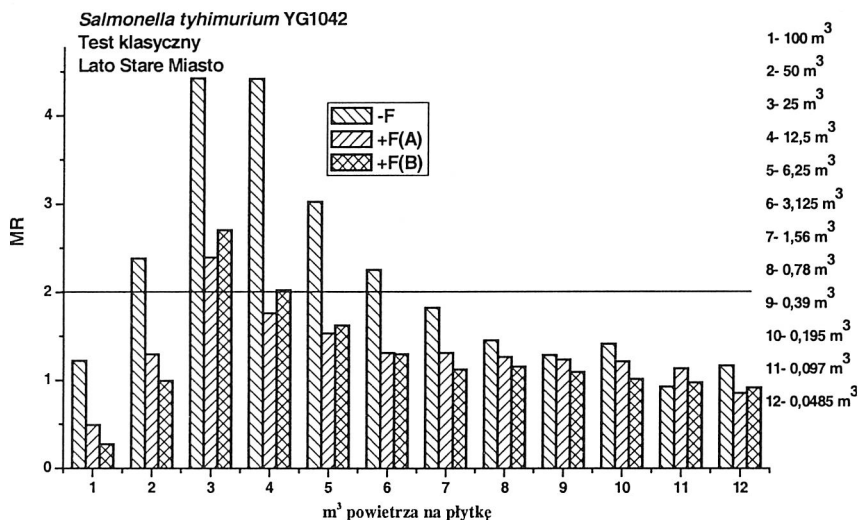
Test klasyczny *Salmonella* (test I)

W teście klasycznym, prowadzonym ze szczepem YG1042, otrzymano mniejsze wartości współczynnika *MR* w całym zakresie badanych stężeń ekstraktów zanieczyszczeń powietrza (rys. 72, 73), w porównaniu do współczynnika *MR* otrzymanego z udziałem szczepu YG1041. Odpowiedź dodatnia w teście dla tego szczepu świadczyła o występowaniu w badanych próbkach zanieczyszczeń mutagennych typu podstawienia pary zasad, zwłaszcza o charakterze nitrowych związków aromatycznych, na które szczep ten jest wrażliwy. W ekstrakcie pyłów pobranych zimą największą wartość *MR* uzyskano w stężeniu 3,125 m³ powietrza/plytkę, zarówno w badaniach bez aktywacji metabolicznej (*MR* = 4,48), jak i z aktywacją metaboliczną frakcją FA (*MR* = 7,44) i frakcją FB (*MR* = 11,13). We wszystkich badanych stężeniach zanieczyszczeń uzyskano większe *MR* w badaniach z aktywacją metaboliczną.



Rys. 72. Współczynniki *MR* dla szczepu YG1042 uzyskane w teście klasycznym próbki pobranej zimą

Tak więc, ekstrakt tych pyłów zawierał więcej mutagenów pośrednich. Maksymalne wartości współczynnika *MR* w przypadku próbki pobranej latem uzyskano w stężeniu ekstraktu pochodzącego z 25 m³ powietrza i wynosiły one 4,41 w badaniach bez frakcji oraz 2,45 w teście z FA i 2,68 z FB. W testach z tą próbką uzyskano większe współczynniki *MR* w badaniach bez aktywacji metabolicznej świadczące o przewadze mutagenów bezpośrednich.



Rys. 73. Współczynniki *MR* dla szczepu YG1042 uzyskane w teście klasycznym próbki pobranej latem

Mutagenność *M* (tab. 17), w przypadku próbki pobranej zimą, przedstawiała się następująco: 896 rew./m³ (FA), 553 rew./m³ (FB) i 219 rew./m³ (–F); a dla próbki pobranej latem: 215 rew./m³ (FA), 208 rew./m³ (–F) i 194 rew./m³ (FB).

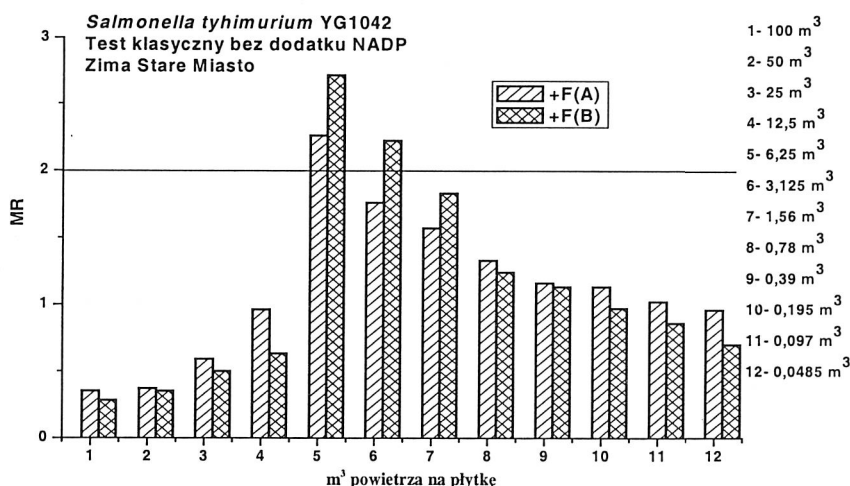
Najmniejsze stężenia wywołujące efekt mutageny wynosiły dla ekstraktu próbki zimowej w badaniach bez udziału frakcji 0,78 m³, dla FA 0,195 m³, a dla FB 0,39 m³ powietrza na płytkę. W przypadku ekstraktu pyłów pobranych latem w badaniach bez frakcji 3,125 m³, z FA 25 m³ i z FB 12,5 m³.

Test klasyczny *Salmonella* bez udziału NADP (test II)

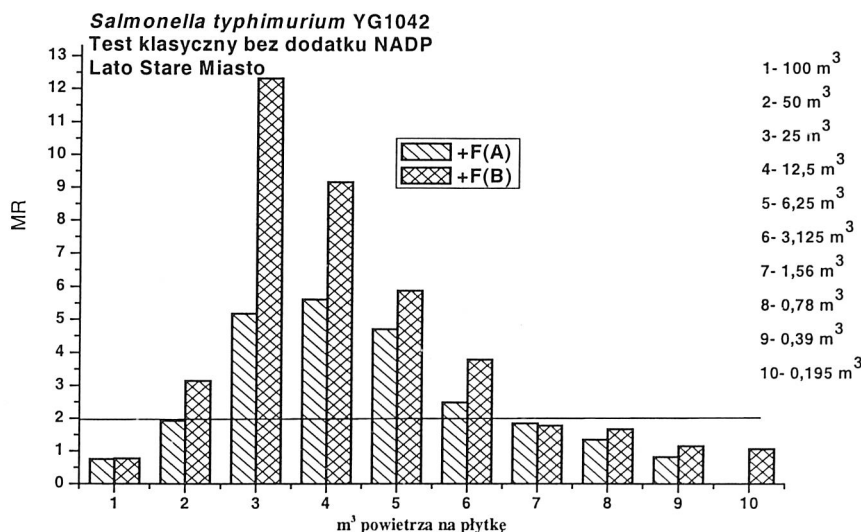
W teście klasycznym, prowadzonym bez udziału NADP, uzyskano mniejszą liczbę rewertantów w badaniach z próbką pobraną zimą oraz większą w badaniach z próbką pobraną latem w porównaniu do testu klasycznego (rys. 74, 75). W przypadku obu ekstraktów uzyskano większy współczynnik *MR* w testach z frakcją FB w porównaniu do wartości *MR* uzyskanych w testach z frakcją FA. W badaniach z próbką pobraną w zimie maksymalną wartość współczynnika *MR* uzyskano w stężeniu ekstraktu pochodzącego z 6,25 m³ powietrza zarówno w badaniach z frakcją FA (*MR* = 2,26), jak i z FB (*MR* = 2,71). Z kolei w ekstrakcie próbki pobranej w lecie maksymalne wartości współczynnika *MR* uzyskano dla stężenia 12,5 m³ powietrza/płytkę w teście z FA (*MR* = 5,51) i stężenia 25 m³ powietrza/płytkę w teście z FB (*MR* = 12,47).

Liczba rewertantów indukowanych przez 1 m³ badanego powietrza była bardzo zbliżona (tab. 17). Dla próbki pobranej zimą wynosiła 292 rew./m³ (FB) i 268 rew./m³ (FA), a dla próbki pobranej latem 256 rew./m³ (FA) i 247 rew./m³ (FB).

Stężenia ekstraktów, wywołujące efekt mutageny, były zarówno duże dla próbki pobranej latem, jak i zimą. Wynosiły one dla ekstraktu próbki pobranej zimą badanej z FA 6,25 m³, a z FB 3,125 m³/płytkę. Z kolei dla próbki pobranej latem 3,125 m³/płytkę zarówno w badaniach z frakcją FA, jak i FB, czyli były mniejsze w porównaniu do uzyskanych w teście klasycznym.



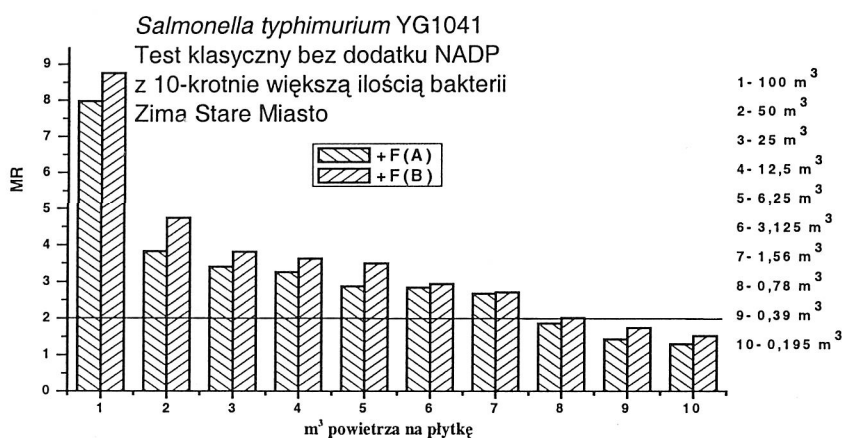
Rys. 74. Współczynniki *MR* dla szczepu YG1042 uzyskane w teście klasycznym bez NADP próbki pobranej zimą



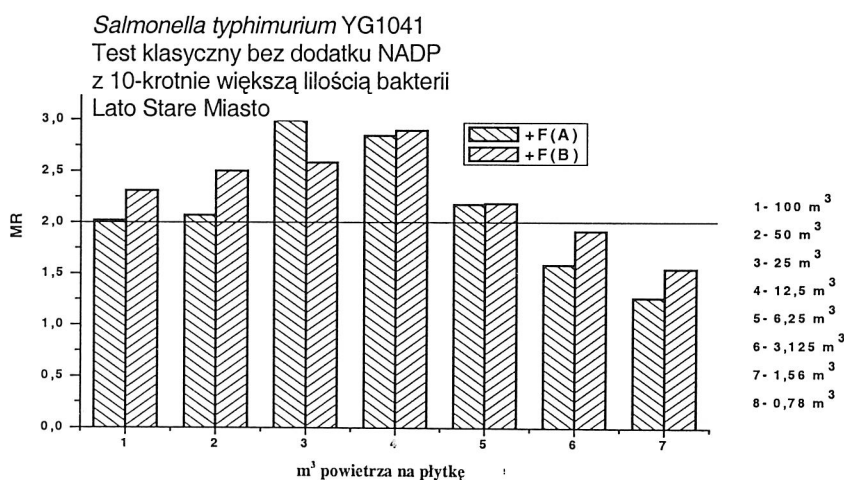
Rys. 75. Współczynniki *MR* dla szczepu YG1042 uzyskane w teście klasycznym bez NADP próbki pobranej latem

Test klasyczny *Salmonella* bez udziału NADP ze zwiększoną ilością bakterii (III)

Wprowadzenie do mieszaniny reakcyjnej pozbawionej dodatkowej puli NADP 10-krotnie większej ilości bakterii spowodowało zwiększenie współczynnika *MR* w przypadku próbki pobranej zimą oraz zmniejszenie dla próbki pobranej latem, w porównaniu do wyników uzyskanych w teście II (rys. 76, 77). W badaniach z ekstraktem pyłów pobranych zimą nie stwierdzono efektu toksycznego na krzywej dawka–odpowieź. W przypadku tej próbki uzyskano większy współczynnik *MR* w badaniach z frakcją FB ($MR = 8,75\text{--}100\text{ m}^3/\text{płytkę}$) w porównaniu do wartości otrzymanych w teście z frakcją FA ($MR = 7,98\text{--}100\text{ m}^3/\text{płytkę}$). W testach z próbką pobraną



Rys. 76. Współczynniki *MR* dla szczepu YG1042 uzyskane w teście klasycznym bez NADP z 10-krotnie większą ilością bakterii próbki pobranej zimą



Rys. 77. Współczynniki *MR* dla szczepu YG1042 uzyskane w teście klasycznym bez NADP z 10-krotnie większą ilością bakterii próbki pobranej latem

latem uzyskano maksymalną MR (2,99) w badaniach z FA dla stężenia ekstraktu pochodzącego z 25 m³ powietrza, a w przypadku testu z FB ($MR = 2,89$) – 12,5 m³ powietrza/płytkę. w badaniach z frakcją FB ($MR = 8,75$ –100 m³/płytkę) w porównaniu do wartości otrzymanych w teście z frakcją FA ($MR = 7,98$ –100 m³/płytkę). W testach z próbką pobraną latem uzyskano maksymalną MR (2,99) w badaniach z FA dla stężenia ekstraktu pochodzącego z 25 m³ powietrza, a w przypadku testu z FB ($MR = 2,89$) – 12,5 m³ powietrza/płytkę.

Mutagenność (M) w przypadku próbki pobranej zimą wynosiła w badaniach z FA 366 rew./m³, a w badaniach z FB 340 rew./m³. Dla próbki pobranej latem otrzymano 225 rew./m³ w badaniach z FB i 208 rew./m³ w teście z FA (tab. 17).

Najmniejsze stężenie wywołujące efekt mutageny uzyskano dla zanieczyszczeń pobranych zimą pochodzących z 1,56 m³ powietrza w badaniach z frakcją FA i z 0,78 m³ powietrza z frakcją FB. Natomiast w testach z próbką pobraną latem stężenie powietrza, dla którego otrzymano $MR \geq 2$, wynosiło 6,25 m³, zarówno w badaniach z FA, jak i FB. Zwiększenie ilości bakterii w teście III spowodowało zmniejszenie stężenia ekstraktu dającego efekt mutageny w stosunku do testu prowadzonego bez dodatkowej puli NADP (II) w badaniach próbki zimowej, natomiast w przypadku próbki letniej stężenia progowe były większe.

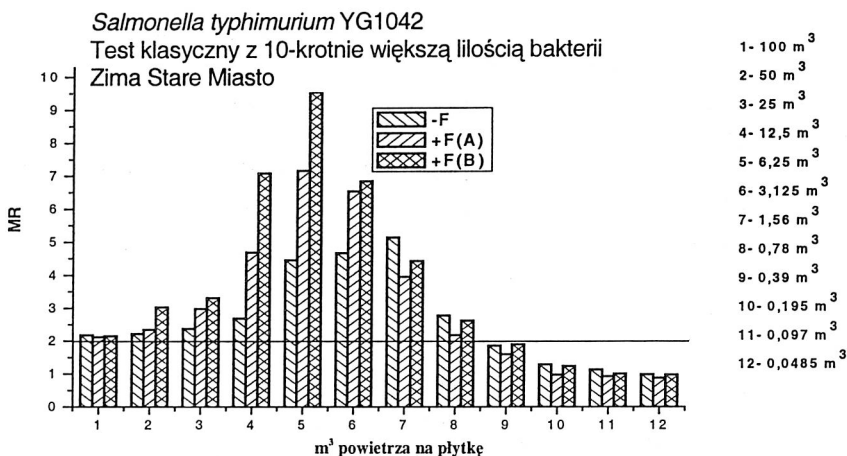
Test klasyczny *Salmonella* z 10-krotnie zwiększoną ilością bakterii (IV)

Dziesięciokrotne zwiększenie ilości bakterii w stosunku do ilości, jakie wprowadza się w teście klasycznym spowodowało zmniejszenie współczynnika MR w przypadku próbki pobranej zimą i zwiększenie MR dla próbki pobranej latem w stosunku do wyników uzyskanych w teście I (rys. 78, 79). Zarówno w badaniach prowadzonych z ekstraktem próbki letniej, jak i zimowej większy współczynnik MR otrzymano w testach z frakcją FB w porównaniu do współczynnika MR otrzymanego w testach z frakcją FA. W próbce pobranej zimą więcej było mutagenów pośrednich. Takie same wyniki otrzymano w teście klasycznym. Z kolei w próbce pobranej latem większy współczynnik MR otrzymano dla mutagenów pośrednich w teście z frakcją FB, a współczynniki MR otrzymane dla frakcji FA były mniejsze od otrzymanych w badaniach bez frakcji. Otrzymano więc odmienne rezultaty niż w teście klasycznym, w którym więcej było mutagenów bezpośrednich. Maksymalną wartość współczynnika MR (5,13) w badaniach ekstraktu zanieczyszczeń pobranych zimą bez aktywacji metabolicznej otrzymano w stężeniu 1,56 m³ powietrza/płytkę, a w przypadku badań z frakcją FA ($MR = 7,16$) i z frakcją FB ($MR = 9,53$) w stężeniu 6,25 m³ powietrza/płytkę. Natomiast w stężeniu zanieczyszczeń pobranych latem pochodzących z 50 m³ powietrza, otrzymano maksymalny współczynnik MR w badaniach bez frakcji ($MR = 6,08$) oraz z frakcją FA ($MR = 4,37$) i z frakcją FB ($MR = 7,74$).

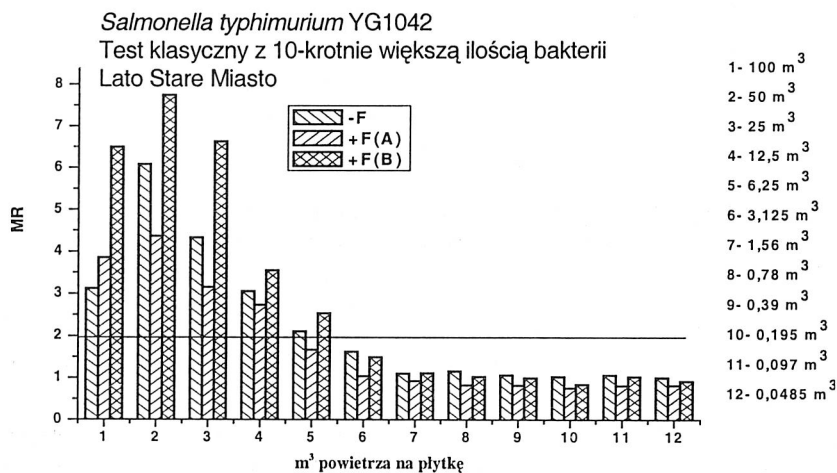
Liczba rewertantów indukowana przez 1 m³ powietrza pobranego zimą wynosiła 501 (FA), 458 (–F) i 393 (FB), natomiast w przypadku powietrza pobranego latem 178 (FB), 173 (FA) i 165 (–F) (tab. 17).

W przypadku próbki pobranej zimą stężenie zanieczyszczeń pochodzące z 0,78 m³ powietrza wywoływało efekt mutageny zarówno w badaniach prowadzonych bez frakcji, jak i z FA oraz z FB. Zanieczyszczenia powietrza w ekstrakcie próbki letniej,

pochodzące z $12,5 \text{ m}^3$, wykazywały właściwości mutagenne w badaniach z FA, natomiast z $6,25 \text{ m}^3$ w badaniach prowadzonych bez frakcji i z frakcją FB.



Rys. 78. Współczynniki MR dla szczepu YG1042 uzyskane w teście klasycznym z 10-krotnie większą ilością bakterii próbki pobranej zimą

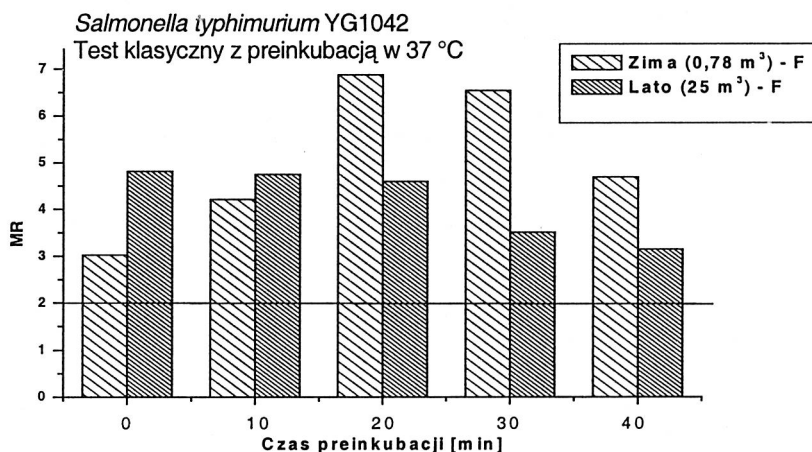


Rys. 79. Współczynniki MR dla szczepu YG1042 uzyskane w teście klasycznym z 10-krotnie większą ilością bakterii próbki pobranej latem

Test klasyczny *Salmonella* z preinkubacją w 37°C (V)

W badaniach ekstraktów próbek powietrza klasycznym testem z preinkubacją w 37°C stwierdzono zmiany liczby rewertantów w zależności od czasu preinkubacji. W testach prowadzonych dla szczepu YG1042 zastosowano ekstrakt próbki zimowej zawierający zanieczyszczenia pochodzące z $6,25 \text{ m}^3/\text{płytkę}$ i ekstrakt próbki letniej zawierający zanieczyszczenia powietrza pochodzące z $25 \text{ m}^3/\text{płytkę}$ (tab. 7).

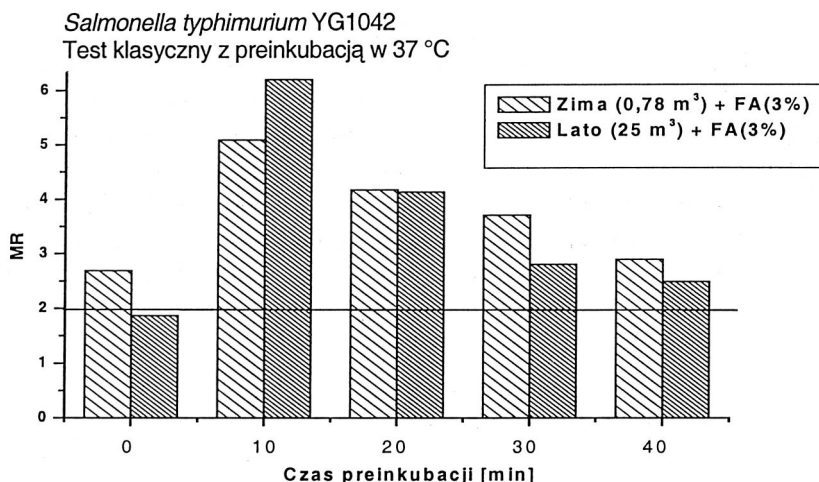
Badania bez aktywacji metabolicznej (rys. 80) wykazały wpływ czasu preinkubacji na wyniki testu prowadzonego z próbką pobraną zimą. Po 20-minutowej preinkubacji nastąpił 227% ($MR = 6,75$) wzrost MR w stosunku do współczynnika MR uzyskanego dla próbki badanej bez preinkubacji. Dalsze przedłużanie czasu inkubacji spowodowało zmniejszenie wartości współczynnika MR . Po 40 minutach wynosił on 155% w stosunku do próbki nieinkubowanej. W teście z próbką pobraną latem uzyskano stopniowe zmniejszenie liczby rewertantów w czasie. Po 20 minutach współczynnik MR wynosił 95% ($MR = 4,63$), a po 40 minutach 65% ($MR = 3,21$) wartości współczynnika MR uzyskanego dla próbki badanej klasyczną metodą testu (czas 0).



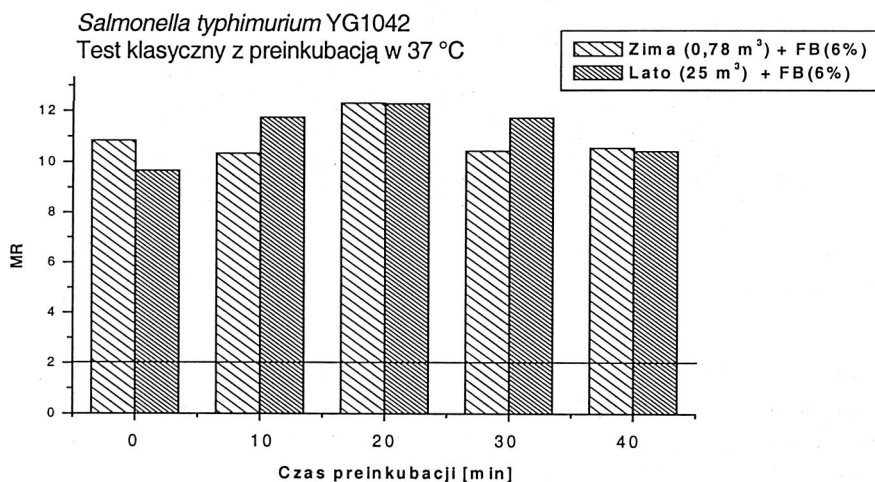
Rys. 80. Współczynniki MR dla szczepu YG1042 uzyskane w teście preinkubacyjnym prowadzonym bez frakcji w temperaturze 37 °C

Wyniki uzyskane w badaniach z frakcją FA (rys. 81) wykazały znaczny wpływ czasu preinkubacji w przypadku obu próbek. Już po 10 minutach preinkubacji zaobserwowano największe wartości współczynnika MR . Wynosiły one dla próbki pobranej zimą 189% ($MR = 5,09$), a dla próbki pobranej latem 331% ($MR = 6,21$) w stosunku wartości MR uzyskanej dla próbek nieinkubowanych. Dalsza preinkubacja spowodowała stopniowe zmniejszenie MR . Jednak po 40 minutach uzyskana liczba rewertantów była jeszcze większa w porównaniu do liczby rewertantów uzyskanych w badaniach klasyczną metodą (czas 0).

Preinkubacja ekstraktów próbek powietrza z frakcją FB (rys. 82) w znaczenie mniejszym stopniu wpływała na wartość współczynnika MR niż w przypadku badań z frakcją FA. Największe MR stwierdzono po 20 minutach i wynosiły one 113% ($MR = 12,33$) dla próbki zimowej i 127 % ($MR = 12,18$) dla próbki letniej w porównaniu do współczynnika MR uzyskanego bez preinkubacji. Po 40 minutach preinkubacji współczynnik MR wynosił dla próbki zimowej 97% ($MR = 10,28$), a dla letniej 108% ($MR = 10,14$), czyli były zbliżone do wartości współczynników uzyskanych bez preinkubacji.



Rys. 81. Współczynniki *MR* dla szczepu YG1042 uzyskane w teście preinkubacyjnym prowadzonym z frakcją FA w temperaturze 37 °C



Rys. 82. Współczynniki *MR* dla szczepu YG1042 uzyskane w teście preinkubacyjnym prowadzonym z frakcją FB w temperaturze 37 °C

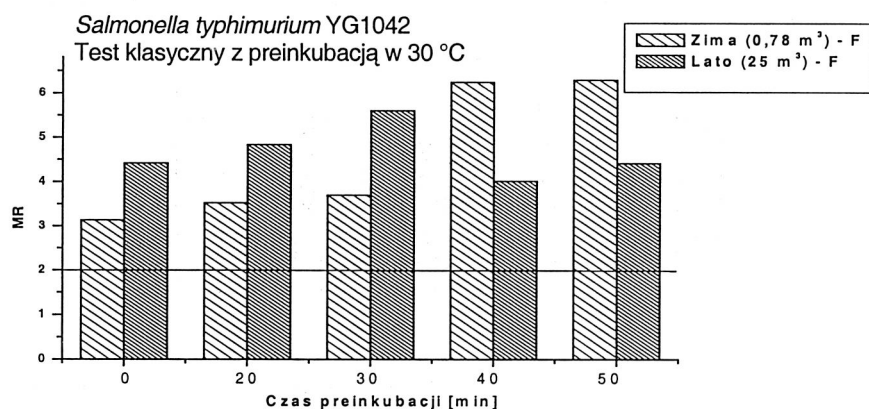
Test klasyczny *Salmonella* z preinkubacją w 30 °C (VI)

Wpływ preinkubacji na liczbę powstających rewertantów szczepu YG1042 badany był w obecności ekstraktów próbki zimowej i letniej w stężeniach takich samych jak w teście V.

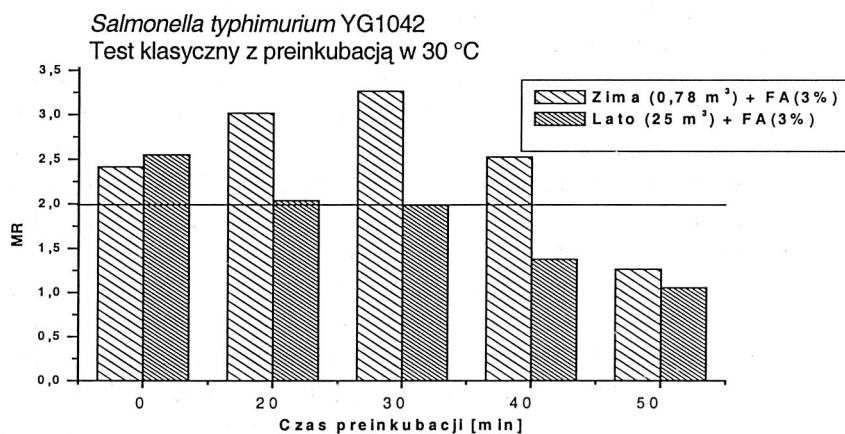
Badania bez udziału frakcji (rys. 83), w obecności ekstraktu próbki pobranej zimą, wykazały stopniowe zwiększanie *LR* w czasie. Po 50 minutach współczynnik *MR* wzrósł do 201% ($MR = 6,25$) w stosunku do *MR*, jaki uzyskano bez inkubacji. W przypadku próbki pobranej latem po 30-minutowej inkubacji stwierdzono największą wartość współczynnika *MR*. Wynosiła ona 127% ($MR = 5,61$) wartości współ-

czynnika *MR* uzyskanej dla próbki nieinkubowanej. Dalsza preinkubacja tej próbki spowodowała zmniejszenie *MR* do poziomu 91% ($MR = 4,42$).

30-minutowa preinkubacja próbki pobranej zimą, z frakcją FA (rys. 84), spowodowała największy wzrost *LR* ($MR = 3,27$). Dalsze przedłużanie czasu preinkubacji spowodowało wyraźne zmniejszenie ich liczby, która po 50 minutach wynosiła 52% współczynnika *MR* uzyskanego dla próbki niepoddanej inkubacji. Z kolei dla próbki pobranej latem największą wartość współczynnika *MR* (2,55) uzyskano bez inkubacji. Preinkubacja spowodowała dla tej próbki stopniowe zmniejszenie wartości *MR* aż do 42% ($MR = 1,06$) po czasie 50 minut.



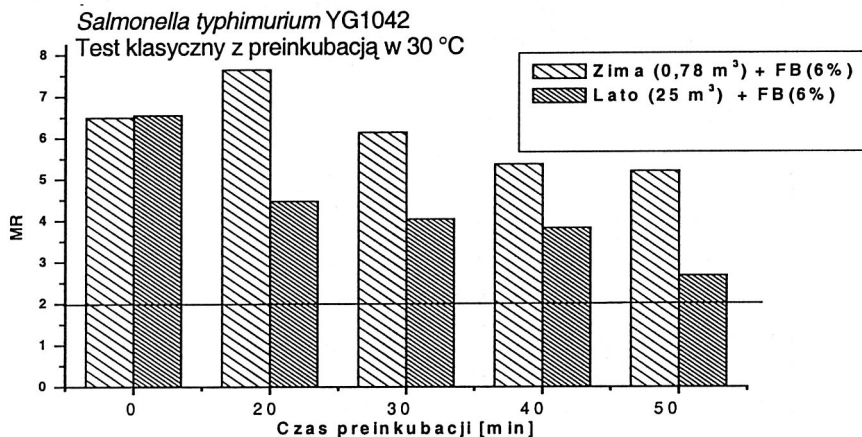
Rys. 83. Współczynniki *MR* dla szczepu YG1042 uzyskane w teście preinkubacyjnym prowadzonym bez frakcji w temperaturze 30 °C



Rys. 84. Współczynniki *MR* dla szczepu YG1042 uzyskane w teście preinkubacyjnym prowadzonym z frakcją FA w temperaturze 30 °C

Podobny przebieg zależności *MR* od czasu preinkubacji otrzymano podczas badań w obecności frakcji FB (rys. 85). Maksimum *LR* indukowanych przez zanieczyszczenia obecne w próbce pobranej w zimie uzyskano po 20 minutach ($MR = 7,64$). Współ-

czynnik *MR* wynosił wtedy 118% w porównaniu do współczynnika *MR* uzyskanego dla próbki niepoddanej inkubacji. Natomiast po 50 minutach *MR* (5,19) stanowił już tylko 80% w porównaniu do *MR* uzyskanego dla próbki nieinkubowanej. Z kolei w teście z ekstraktem próbki pobranej w lecie otrzymano największy współczynnik *MR* (6,55) bez inkubacji. Po 50 minutach *MR* zmniejszył się do 41% w stosunku do *MR* uzyskanego w czasie 0.

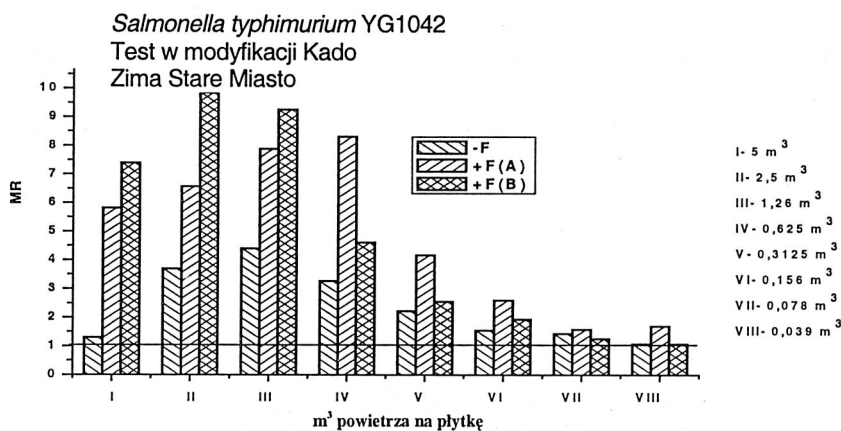


Rys. 85. Współczynniki *MR* dla szczepu YG1042 uzyskane w teście preinkubacyjnym prowadzonym z frakcją FB w temperaturze 30 °C

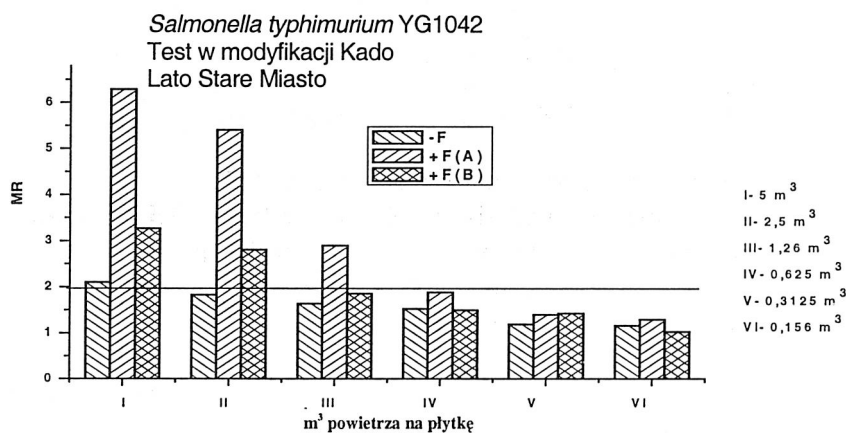
Test klasyczny *Salmonella* w modyfikacji Kado (VII)

W teście klasycznym w modyfikacji Kado uzyskano większe wartości współczynnika *MR* dla próbki pobranej w zimie niż dla próbki pobranej w lecie (rys. 86, 87). Silniejszą odpowiedź mutagenną otrzymano w testach prowadzonych z aktywacją metaboliczną w porównaniu do testów bez aktywacji metabolicznej. W badaniach prowadzonych z ekstraktem zawierającym zanieczyszczenia pobrane w zimie największą wartość współczynnika *MR* (9,86) otrzymano w badaniach z frakcją FB dla stężenia zanieczyszczeń pochodzących z 2,5 m³ powietrza. Z kolei maksymalną wartość współczynnika *MR* (8,31) w teście z frakcją FA uzyskano dla stężenia ekstraktu pochodzącego z 0,625 m³, natomiast w badaniach bez frakcji (*MR* = 4,41) z 1,26 m³ powietrza. Większe wartości współczynnika *MR* otrzymano dla frakcji FB w porównaniu do *MR* otrzymanych dla frakcji FA dla większych stężeń badanych zanieczyszczeń. W przypadku małych stężeń wartości *MR* były większe dla frakcji FA. Otrzymane wyniki były więc zbliżone do wyników uzyskanych w teście klasycznym. W przypadku próbki pobranej w lecie nie otrzymano efektu toksycznego na krzywej dawka–odpowiedź w badanym zakresie stężeń zanieczyszczeń. Największe wartości współczynnika *MR* (6,29–5 m³/płytkę) otrzymano w badaniach z frakcją FA. Dla próbki letniej otrzymano więc inne wyniki niż w teście klasycznym, w którym większe *MR* uzyskano w teście prowadzonym bez frakcji.

Mutagenność (M) w przypadku próbki pobranej zimą wynosiła: 1641 rew./m³ (FB), 1251 rew./m³ (FA) i 533 rew./m³ (–F), natomiast dla próbki pobranej latem 307 rew./m³ (FB), 294 rew./m³ (FA) i 193 rew./m³ (–F) (tab. 17).



Rys. 86. Współczynniki MR dla szczepu YG1042 uzyskane w teście klasycznym w modyfikacji Kado próbki pobranej zimą

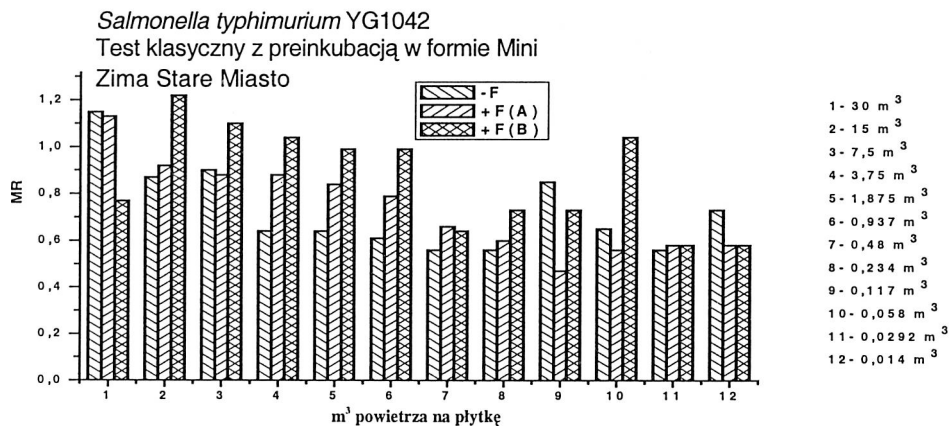


Rys. 87. Współczynniki MR dla szczepu YG1042 uzyskane w teście klasycznym w modyfikacji Kado próbki pobranej latem

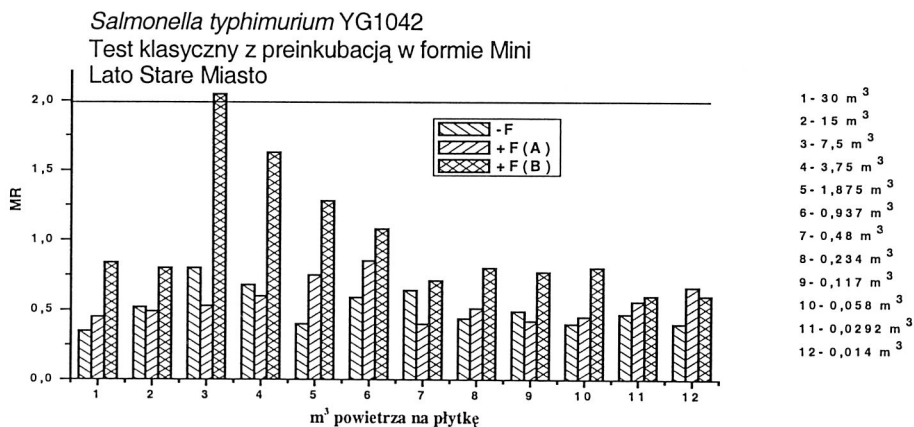
Najmniejsze stężenie zanieczyszczeń obecnych w próbce pobranej w zimie, wywołujące efekt mutageny w badaniach prowadzonych bez frakcji i z obu frakcjami, wynosiło 0,039 m³/płytkę. Natomiast w badaniach próbki pobranej latem efekt mutageny ujawnił się w stężeniu 1,26 m³/płytkę z frakcją FA, w stężeniu 2,5 m³/płytkę w obecności FB oraz w stężeniu 5 m³/płytkę w badaniach bez udziału frakcji. Zdecydowanie mniejsze więc stężenia próbki zimowej i letniej (tylko w obecności obu frakcji) wywoływały efekt mutageny w porównaniu do wyników otrzymanych w teście klasycznym.

Test klasyczny *Salmonella* z preinkubacją w formie Mini (VIII)

W teście klasycznym w formie Mini tylko w przypadku jednego stężenia zanieczyszczeń powietrza pobranych latem ($7,5 \text{ m}^3/\text{płytkę}$), z frakcją FB, otrzymano współczynnik $MR(2,05)$ wskazujący na ich mutagenne działanie (rys. 88, 89). We wszystkich pozostałych badaniach uzyskano liczby rewertantów zbliżoną do poziomu mutacji spontanicznej, a nawet mniejszą. Wyniki dotyczące liczby rewertantów indukowanych przez 1 m^3 badanego powietrza (tab. 17) były następujące: dla próbek pobranej zimą – 173 rew./m^3 w badaniach –F, 154 rew./m^3 w badaniach z FB i 133 rew./m^3 w badaniach z FA, natomiast w przypadku próbki pobranej latem – 175 rew./m^3 (FB), 123 rew./m^3 (FA) i 94 rew./m^3 (–F).



Rys. 88. Współczynniki MR dla szczepu YG1042 uzyskane w teście klasycznym z preinkubacją w formie Mini próbki pobranej zimą



Rys. 89. Współczynniki MR dla szczepu YG1042 uzyskane w teście klasycznym z preinkubacją w formie Mini próbki pobranej latem

Szczep *Salmonella typhimurium* YG1042 w niewielkim stopniu reagował na występujące w badanych ekstraktach pyłów zanieczyszczenia, podobnie jak szczep TA100, którego jest pochodną. Otrzymane wyniki świadczą o tym, że w badanych próbkach było mniej mutagenów typu podstawienia pary zasad o charakterze nitrowych związków aromatycznych.

Najlepsze wyniki dla tego szczepu uzyskano w badaniach z zastosowaniem metody klasycznej testu *Salmonella* i w teście w modyfikacji Kado. W tych testach otrzymano największą liczbę rewertantów oraz najmniejsze stężenia badanych ekstraktów pyłów wywołujących efekt mutageny.

Tabela 17. Mutagenność (M) otrzymana dla poszczególnych testów przeprowadzonych dla ekstraktów próbek zimowej i letniej pobranych na Starym Mieście w obecności szczepu YG1042

Pora roku	Rodzaj testu	Obecność frakcji S9	Równanie prostej regresji	R^2	Mutagenność (M) rew./m ³
Zima	I	-F	$y=173,9+44,7x$	0,92	219
		FA	$y=131,5+764x$	0,99	896
		FB	$y=93,7+459x$	0,98	553
Lato	I	-F	$y=181,2+26,5x$	0,93	208
		FA	$y=123,4+92,1x$	0,84	215
		FB	$y=101,3+92,3x$	0,91	194
Zima	II	FA	$y=176,5+91,3x$	0,9	268
		FB	$y=167,5+124,8x$	0,92	292
Lato	II	FA	$y=184,4+72,1x$	0,54	256
		FB	$y=193,2+53,6x$	0,81	247
Zima	III	FA	$y=185,3+181x$	0,99	366
		FB	$y=195,6+204,1x$	0,89	340
Lato	III	FA	$y=178+30,1x$	0,99	208
		FB	$y=174,7+50x$	0,98	225
Zima	IV	-F	$y=126+331,6x$	0,99	458
		FA	$y=161,7+339x$	0,94	501
		FB	$y=169,5+223,2x$	0,81	393
Lato	IV	-F	$y=140,4+25,1x$	0,87	165
		FA	$y=158,6+13,9x$	0,55	173
		FB	$y=160,7+17,6x$	0,56	178
Zima	VII	-F	$y=157,2+375,8x$	0,97	533
		FA	$y=118,1+1522,9x$	0,99	1641
		FB	$y=131,7+1118,9x$	0,99	1251
Lato	VII	-F	$y=142,1+50,8x$	0,93	193
		FA	$y=137,4+169,5x$	0,99	307
		FB	$y=177,9+115,8x$	0,9	294
Zima	VIII	-F	$y=120,5+52,1x$	0,43	173
		FA	$y=111,5+21,3x$	0,54	133
		FB	$y=130,2+23,9x$	0,52	154
Lato	VIII	-F	$y=88,6+5,1x$	0,26	94
		FA	$y=103,5+19,1x$	0,25	123
		FB	$y=124,9+50,3x$	0,35	175

Porównując wyniki uzyskane w teście klasycznym do wyników uzyskanych dla zbliżonych stężeń ekstraktów w teście Kado, można stwierdzić, że ten ostatni okazał się bardziej czuły na obecne w próbkach zanieczyszczenia. W tym ostatnim uzyskano bowiem dla mniejszych stężeń badanych ekstraktów $MR \geq 2$. Jedynie w przypadku badań prowadzonych bez aktywacji metabolicznej w obecności ekstraktu próbki pobranej w lecie uzyskano gorsze wyniki. W teście klasycznym stężenie zanieczyszczeń, pochodzące z $3,125 \text{ m}^3$ powietrza, a w teście w modyfikacji Kado z 5 m^3 powietrza okazało się mutagenne.

Zwiększenie ilości bakterii wprowadzonych do testu klasycznego spowodowało wyraźne przesunięcie krzywych dawka–odpowiedź w kierunku badanych większych stężeń. Wprowadzenie do testu większej ilości bakterii spowodowało więc zmniejszenie jego czułości. Z kolei LR uzyskane w badaniach prowadzonych w obecności frakcji FA i FB wskazywały, że w większości testów lepsze wyniki uzyskano dla frakcji FB.

6.4. Porównanie wybranych procedur testu na ekstraktach pyłów pobranych w trzech punktach miasta

Na podstawie rezultatów uzyskanych w drugim etapie badań do weryfikacji wytypowano trzy procedury testu *Salmonella*: klasyczny test *Salmonella* (I), klasyczny test *Salmonella* z zastosowaniem dodatkowej preinkubacji prowadzonej w temperaturze 37°C (V) oraz test *Salmonella* w modyfikacji Kado (VII).

W trzecim etapie badań testy przeprowadzono na podstawie pięciu ekstraktów pyłów zawieszonych pobranych w lecie, w zimie i na wiosnę w trzech wybranych punktach miasta (ul. Strachocińska, pl. Grunwaldzki, ul. Norwida). Na ul. Strachocińskiej, położonej na obrzeżu miasta, oraz na pl. Grunwaldzkim, usytuowanym w centrum miasta, próbki powietrza pobierano, podobnie jak do drugiego etapu badań, latem i zimą. Ze względu na istniejące różnice w składzie ilościowym i jakościowym pyłowych zanieczyszczeń zależne od pory roku do badań pobrano dodatkowo jeszcze jedną próbkę powietrza w okresie wiosennym. Próbką ta została pobrana na ul. Norwida, w miejscu o mniejszym natężeniu ruchu samochodowego w porównaniu do dwóch poprzednich stanowisk badawczych, nie tylko w innej porze roku, ale też w odmiennych warunkach, czyli na dachu budynku, na wysokości drugiego piętra.

W badaniach zastosowano dwa zakresy stężeń ekstraktów pyłowych zanieczyszczeń powietrza. Na płytkę dodawano ekstrakty pochodzące z zakresu od 50 m^3 do $0,0245 \text{ m}^3$ powietrza w testach I i V oraz od 5 m^3 do $0,0097 \text{ m}^3$ powietrza w teście VII. Testy prowadzono dla dwóch szczepów *Salmonella typhimurium* TA98 i YG1041. Szczepy te okazały się najbardziej wrażliwe w drugim etapie badań na obecne w badanych pyłach zanieczyszczenia. Testy prowadzono bez aktywacji metabolicznej oraz z aktywacją metaboliczną frakcją mikrosomalną indukowaną Aroclorem 1254 (FA), fenobarbitalem (FB) oraz frakcją niepoddaną uprzedniej indukcji (F0). Ponieważ

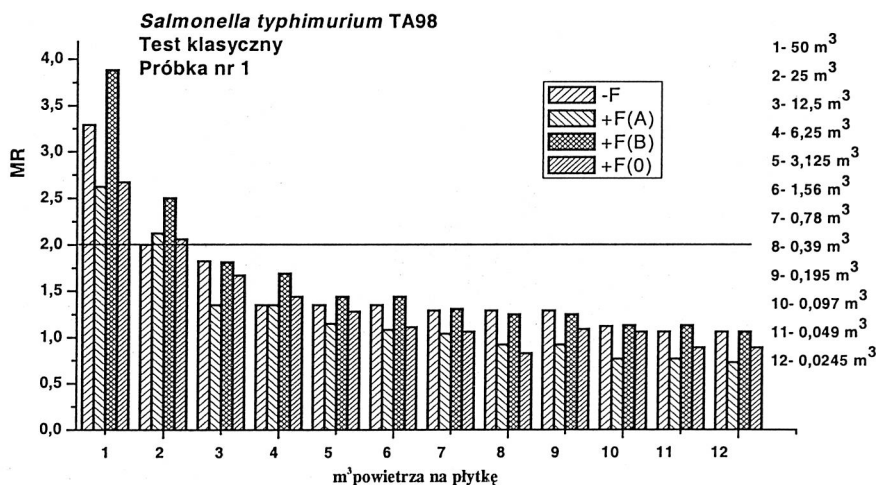
w drugim etapie badań uzyskano porównywalny efekt mutageny z zastosowaniem frakcji FA i FB oraz uzyskano dobre rezultaty w testach, do których nie wprowadzano dodatkowej puli NADP, uznano za uzasadnione wprowadzenie do badań frakcji F0, zawierającej naturalny poziom enzymów mikrosomalnych.

6.4.1. Wyniki testów z udziałem próbki pyłów (1) pobranej latem na ul. Strachocińskiej

Salmonella typhimurium TA98

Testy prowadzone w obecności szczepu TA98 i zanieczyszczeń w próbce 1, w badanych zakresach stężeń ekstraktów powietrza, nie pozwoliły wyznaczyć efektu toksycznego na krzywej dawka–odpowieź.

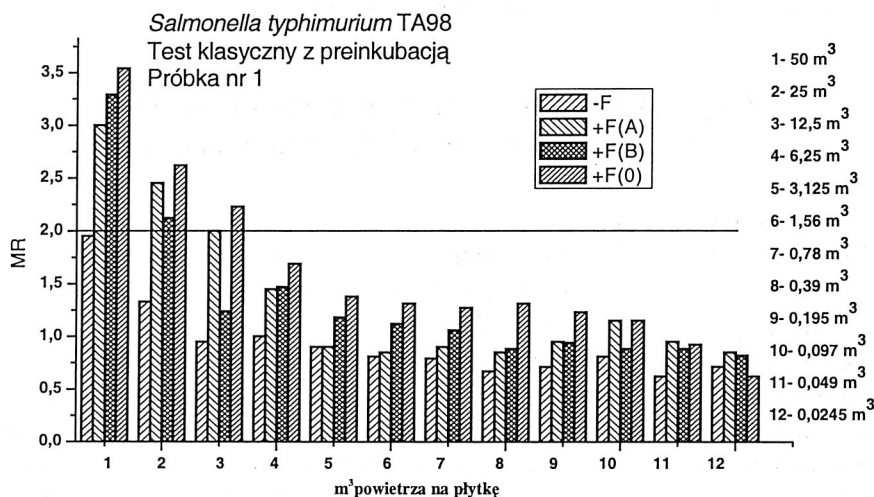
W teście klasycznym (rys. 90) wynik dodatni uzyskano po wprowadzeniu na płytkę zanieczyszczeń pochodzących z 25 m³ powietrza, zarówno w badaniach prowadzonych bez aktywacji metabolicznej, jak i z aktywacją metaboliczną frakcją FA, FB i F0. W tym stężeniu ekstraktu uzyskano większe wartości współczynnika *MR* w testach z udziałem wszystkich frakcji (*MR* = 2,12 dla FA, *MR* = 2,5 dla FB i *MR* = 2,06 dla F0) w porównaniu do wartości współczynnika *MR* uzyskanego w badaniu bez frakcji (*MR* = 2). Natomiast w stężeniu ekstraktu 50 m³/płytkę największą wartość *MR* zaobserwowano w badaniach z frakcją FB (*MR* = 3,88) i bez frakcji (*MR* = 3,29). Liczba rewertantów indukowanych przez 1 m³ powietrza we wszystkich testach wahała się od 19 do 26 (tab. 18).



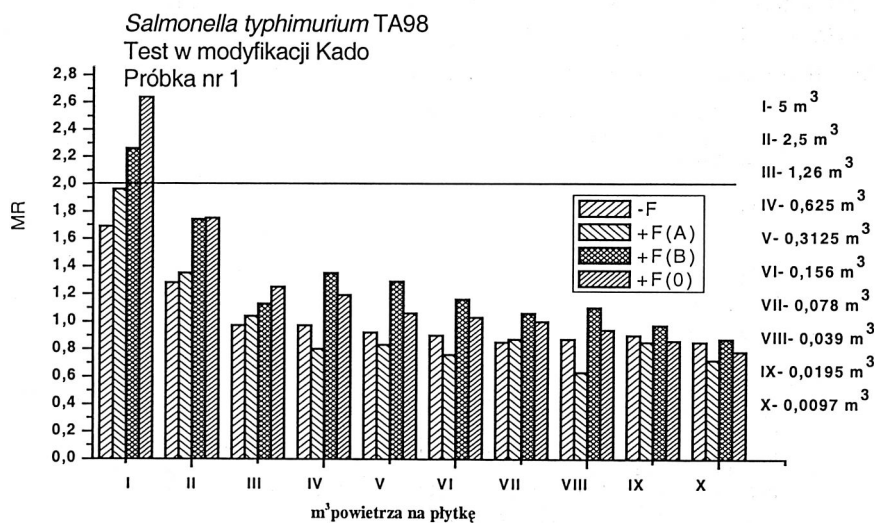
Rys. 90. Współczynniki *MR* dla szczepu TA98 uzyskane w teście klasycznym próbki

W teście preinkubacyjnym (rys. 91) uzyskano większe wartości współczynnika *MR* w badaniach z udziałem wszystkich frakcji mikrosomalnych w porównaniu do *MR* uzyskanych w badaniach bez aktywacji metabolicznej. W teście prowadzonym bez frakcji nie uzyskano również wyniku dodatniego. Z kolei zanieczyszczenia po-

wietrza pochodzące z $12,5 \text{ m}^3$ wywołały efekt mutageny w badaniach z frakcją FA ($MR = 2$) i F0 ($MR = 2,23$), a pochodzące z 25 m^3 powietrza z frakcją FB ($MR = 2,12$). Mutagenność (M) w tym teście mieściła się w granicach 16–23 rew./ m^3 (tab. 18).



Rys. 91. Współczynniki MR dla szczepu TA98 uzyskane w teście preinkubacyjnym próbki 1



Rys. 92. Współczynniki MR dla szczepu TA98 uzyskane w teście w modyfikacji Kado próbki 1

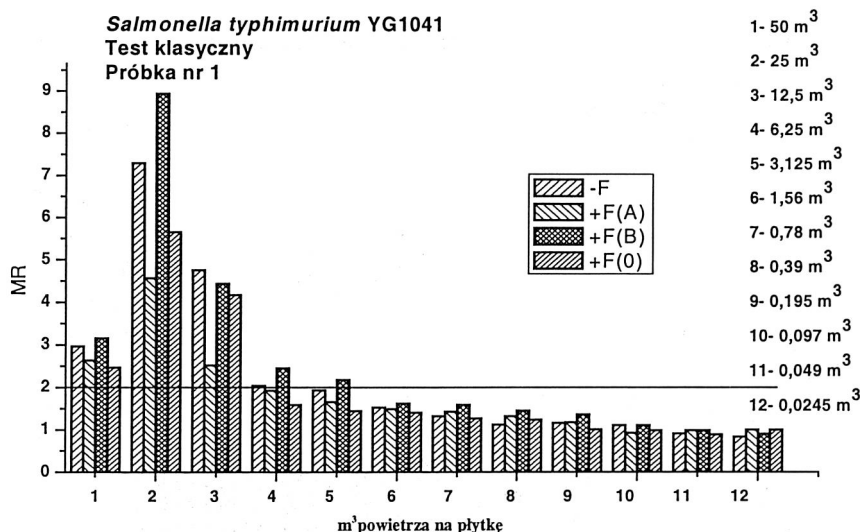
W przypadku testu w modyfikacji Kado (rys. 92) również uzyskano większą liczbę rewertantów w obecności frakcji mikrosomalnych. Wynik dodatni testu otrzymano jedynie w badaniach z aktywacją metaboliczną frakcją FB ($MR = 2,26$) i F0 ($MR = 2,64$) w stężeniu ekstraktu 5 m^3 powietrza na płytkę, czyli dużo mniejszym w porównaniu do dwóch poprzednich testów. Test ten przeprowadzano w dużo mniejszym zakresie stężeń zanieczyszczeń powietrza, ponieważ wprowadza się do niego 20 razy

mniejszą ilość badanej próbki. Dzięki temu możliwe było obniżenie progu wykrywalności mutagenów pośrednich. Mutagenność (M) w tym teście była zbliżona do liczby rewertantów spontanicznych i mieściła się w granicach 40–56 rew./m³ (tab. 18).

Salmonella typhimurium YG1041

W testach prowadzonych ze szczepem YG1041 stwierdzono inny przebieg zależności współczynnika MR od stężenia zanieczyszczeń obecnych w próbce 1. Zarówno w teście klasycznym, jak i w teście z preinkubacją uzyskano efekty toksyczne na krzywej dawka–odpowiedź. Otrzymano również większe współczynniki MR dla mniejszych stężeń badanych ekstraktów zanieczyszczeń w porównaniu do testów prowadzonych ze szczepem TA98. W badanej próbce były więc mutageny typu zmiany fazy odczytu o charakterze nitrowych związków aromatycznych.

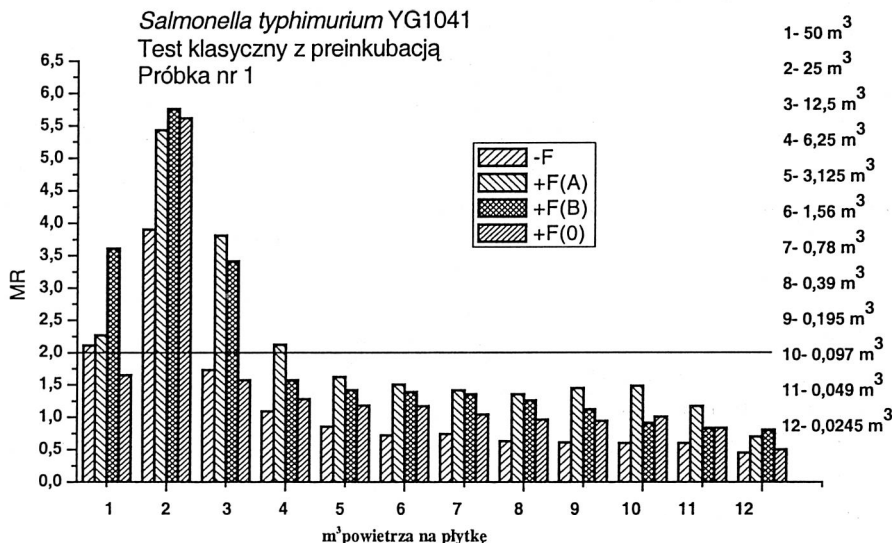
W teście klasycznym (rys. 93) najmniejsze stężenie ekstraktu, wywołujące efekt mutageny w badaniach z frakcją FB ($MR = 2,17$) pochodziło z 3,125 m³ powietrza, w badaniach bez frakcji ($MR = 2,04$) z 6,25 m³, a w badaniach z frakcją FA ($MR = 2,52$) i z frakcją F0 ($MR = 4,16$) z 12,5 m³ powietrza. Z kolei maksymalne wartości współczynnika MR uzyskano we wszystkich testach po wprowadzeniu na płytkę zanieczyszczeń pochodzących z 25 m³ powietrza. Mutagenność (M) była zbliżona do liczby rewertantów powstałych w sposób spontaniczny i mieściła się w granicy od 151 rew./m³ do 193 rew./m³ (tab. 18).



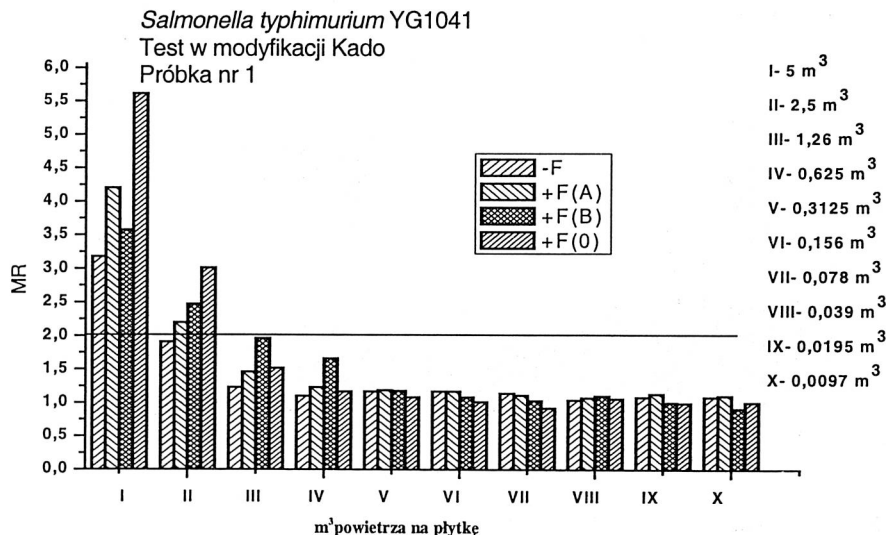
Rys. 93. Współczynniki MR dla szczepu YG1041 uzyskane w teście klasycznym próbki 1

W teście z preinkubacją (rys. 94) uzyskano mniejsze współczynniki MR w porównaniu do testu klasycznego. Najmniejsze stężenie badanego ekstraktu, wywołujące efekt mutageny, wynoszące 6,25 m³/płytkę, uzyskano w obecności frakcji FA ($MR = 2,12$). W badaniach z frakcją FB wynik dodatni testu ($MR = 3,41$) uzyskano w stężeniu ekstraktu 12,5 m³/płytkę, natomiast w przypadku badań w obecności frakcji F0 ($MR = 5,61$) i bez aktywacji metabo-

licznej ($MR = 3,90$) w stężeniu 25 m^3 powietrza na płytkę. Zanieczyszczenia znajdujące się w 50 m^3 badanej próbki wykazywały już działanie toksyczne w omawianym teście. Liczba rewertantów indukowana przez zanieczyszczenia występujące w 1 m^3 badanego powietrza mieściła się w granicach od 106 rew./m^3 do 220 rew./m^3 (tab. 18).



Rys. 94. Współczynniki MR dla szczepu YG1041 uzyskane w teście preinkubacyjnym próbki 1



Rys. 95. Współczynniki MR dla szczepu YG1041 uzyskane w teście w modyfikacji Kado próbki 1

W teście Kado (rys. 95) uzyskano większe współczynniki MR w testach z aktywacją metaboliczną w obecności wszystkich frakcji mikrosomalnych w porównaniu do badań bez frakcji. Tak samo w obecności wszystkich frakcji mikrosomalnych stężenie zanieczyszczeń pochodzące z $2,5 \text{ m}^3$ powietrza wywołało efekt mutagenny w teście

($MR = 2,2$ dla FA, $MR = 2,47$ dla FB i $MR = 3,01$ dla F0). Z kolei w przypadku badań bez aktywacji metabolicznej efekt ten uzyskano w stężeniu ekstraktu pochodzącego z 5 m^3 powietrza ($MR = 3,18$). W teście uzyskano również większe współczynniki MR niż te, które uzyskano w analogicznych stężeniach w dwóch pozostałych testach. Mutagenność M mieściła się w granicach od 256 rew./ m^3 do 346 rew./ m^3 (tab. 18).

Tabela 18. Mutagenność (M) otrzymana dla poszczególnych testów przeprowadzonych dla ekstraktu próbki 1

Szczep	Rodzaj testu	Obecność frakcji S9	Równanie prostej regresji	R^2	Mutagenność (M) rew./ m^3
TA98	Klasyczny	–F	$y=18,5+3,6x$	0,62	22
		FA	$y=21,7+4,6x$	0,62	26
		FB	$y=17,7+3,8x$	0,81	21
		F0	$y=17,1+1,8x$	0,52	19
	Klasyczny z preinkubacją	–F	$y=22,2+0,5x$	0,72	23
		FA	$y=19,6+0,9x$	0,9	20
		FB	$y=18+0,8x$	0,97	19
		F0	$y=15,6+0,7x$	0,94	16
	W modyfikacji Kado	–F	$y=34,1+6,2x$	0,95	40
		FA	$y=45,5+10,7x$	0,93	56
		FB	$y=32,3+7,6x$	0,90	40
		F0	$y=37,1+12,2x$	0,98	49
YG1041	Klasyczny	–F	$y=154,9+35,9x$	0,97	191
		FA	$y=165,9+19,2x$	0,95	185
		FB	$y=117,7+32,9x$	0,99	151
		F0	$y=158,8+34,6x$	0,95	193
	Klasyczny z preinkubacją	–F	$y=86,9+19,1x$	0,95	106
		FA	$y=173,8+25,1x$	0,97	199
		FB	$y=119,7+25x$	0,97	145
		F0	$y=211,6+8,8x$	0,75	220
	W modyfikacji Kado	–F	$y=181,4+74,4x$	0,96	256
		FA	$y=172,3+103,9x$	0,97	276
		FB	$y=189,2+94,2x$	0,97	283
		F0	$y=187,8+158x$	0,93	346

6.4.2. Wyniki testów z udziałem próbki pyłów (2) pobranej latem na pl. Grunwaldzkim

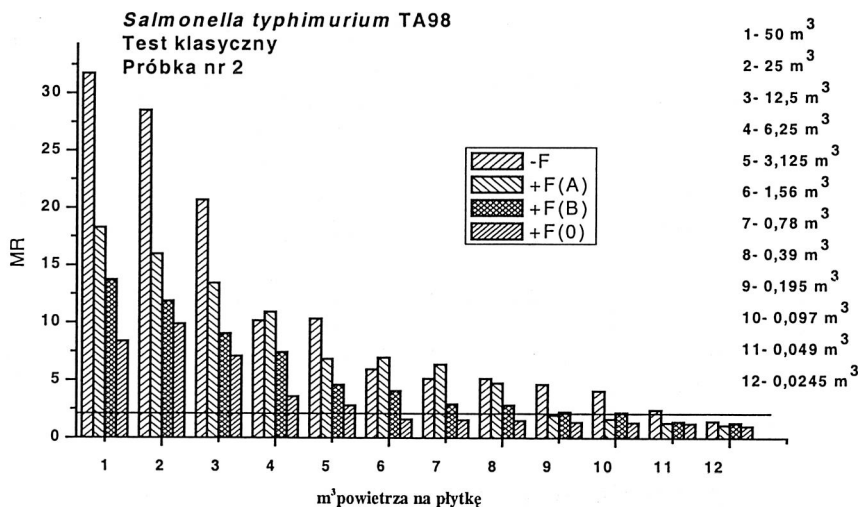
Salmonella typhimurium TA98

W testach prowadzonych z udziałem próbki 2 na szczepie TA98 największe współczynniki MR zaobserwowano w teście klasycznym, a najmniejsze w teście preinkubacyjnym.

W teście klasycznym (rys. 96) nie uzyskano efektu toksycznego na krzywych dawka–odpowiedź, z wyjątkiem testu prowadzonego z frakcją F0. Największą liczbę

rewertantów otrzymano w badaniach bez aktywacji metabolicznej ($MR = 31,73$ przy $50 \text{ m}^3/\text{płytkę}$), a najmniejszą w badaniach z frakcją F0 ($MR = 9,87$ przy $25 \text{ m}^3/\text{płytkę}$). Stężenie progowe badanego ekstraktu pyłów wynosiło w badaniach bez frakcji – $0,049 \text{ m}^3/\text{płytkę}$, z frakcją – FB $0,097 \text{ m}^3/\text{płytkę}$, z frakcją FA – $0,39 \text{ m}^3/\text{płytkę}$, a w teście z frakcją F0 – $3,125 \text{ m}^3/\text{płytkę}$. Mutagenność (M) była dużo większa od liczby rewertantów powstałych w sposób spontaniczny i mieściła się w granicy od 144 rew./m^3 do 189 rew./m^3 (tab. 19).

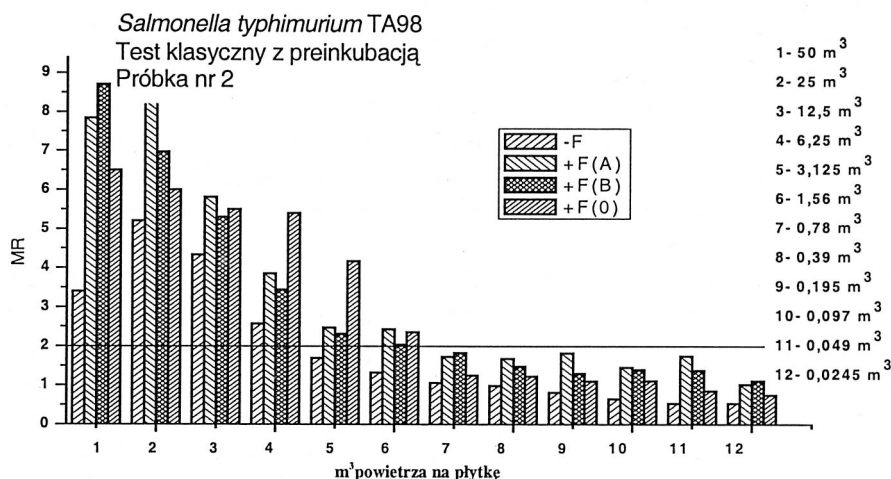
W teście klasycznym z preinkubacją (rys. 97) maksymalne wartości współczynnika MR bez aktywacji metabolicznej ($MR = 5,20$) i z aktywacją metaboliczną frakcją FA ($MR = 8,44$) uzyskano w stężeniu ekstraktu pochodzącego z 25 m^3 powietrza. Natomiast w badaniach z frakcją FA ($MR = 8,70$) i z frakcją FB ($MR = 6,0$) w stężeniu ekstraktów zawierających zanieczyszczenia obecne w 50 m^3 powietrza. W teście tym otrzymano większe współczynniki MR w badaniach ze wszystkimi frakcjami mikrosomalnymi w porównaniu do badań bez aktywacji metabolicznej. Preinkubacja pozwoliła więc na ujawnienie się działania mutagennego zanieczyszczeń o charakterze promutagenów. Najmniejsze stężenie powietrza wywołujące efekt mutageny w badaniach z aktywacją metaboliczną wynosiło $1,56 \text{ m}^3/\text{płytkę}$, a w teście bez aktywacji metabolicznej $6,25 \text{ m}^3/\text{płytkę}$. Mutagenność była mniejsza niż w teście klasycznym i wynosiła od 76 rew./m^3 do 104 rew./m^3 (tab. 19).



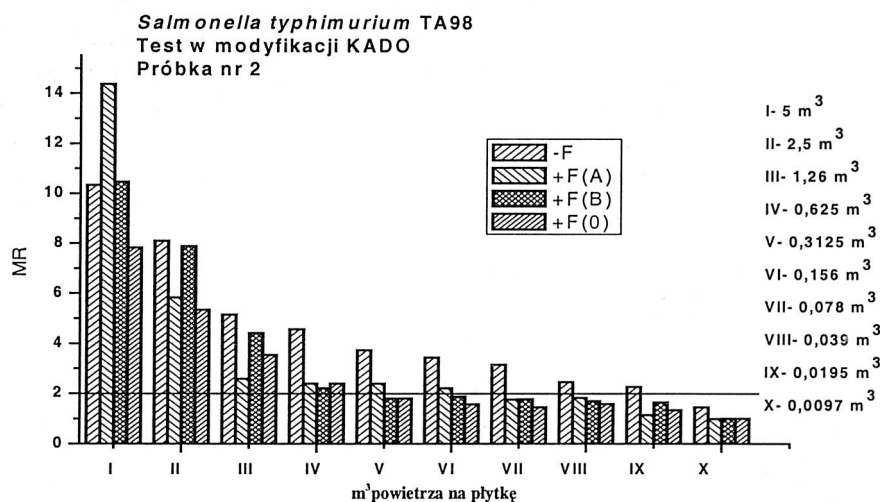
Rys. 96. Współczynniki MR dla szczepu TA98 uzyskane w teście klasycznym próbki 2

Liczba rewertantów uzyskana w teście Kado (rys. 98) była większa od LR uzyskanej dla analogicznych stężeń ekstraktów w metodzie klasycznej testu. Stężenie progowe badanego ekstraktu wynosiło dla testu bez frakcji – $0,0195 \text{ m}^3/\text{płytkę}$, dla testu z frakcją FA – $0,156 \text{ m}^3/\text{płytkę}$ i $0,625 \text{ m}^3/\text{płytkę}$ dla pozostałych frakcji FB i F0. Tak więc stężenia ekstraktu zanieczyszczeń powietrza wywołujących efekt mutageny, w tym teście, były mniejsze w porównaniu do testu z preinkubacją i do testu klasycz-

nego (z wyjątkiem badań z frakcją FB). Mutagenność (M), podobnie jak w teście klasycznym, była dużo większa od liczby rewertantów powstałych w sposób spontaniczny i mieściła się w granicy od 88 rew./m³ do 137 rew./m³ (tab. 19).



Rys. 97. Współczynniki MR dla szczepu TA98 uzyskane w teście preinkubacyjnym próbki 2



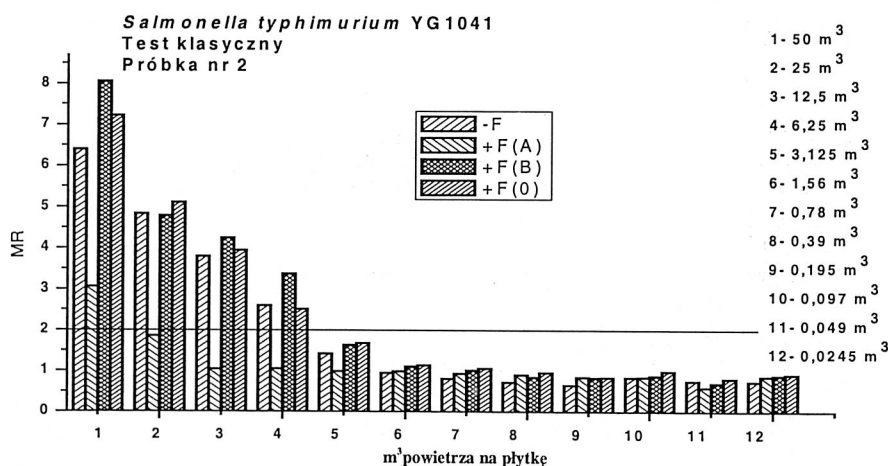
Rys. 98. Współczynniki MR dla szczepu TA98 uzyskane w teście w modyfikacji Kado próbki 2

Salmonella typhimurium YG1041

W badaniach z udziałem szczepu YG1041 uzyskano mniejsze wartości współczynnika MR w porównaniu do badań ze szczepem TA98. W badanym ekstrakcie zanieczyszczeń powietrza mniej więc było mutagenów typu zmiany fazy odczytu o charakterze nitrowych związków aromatycznych. W żadnym z prowadzonych testów, w badanym zakresie stężeń zanieczyszczeń, nie uzyskano efektu toksycznego na krzywej dawka–odpowiedź.

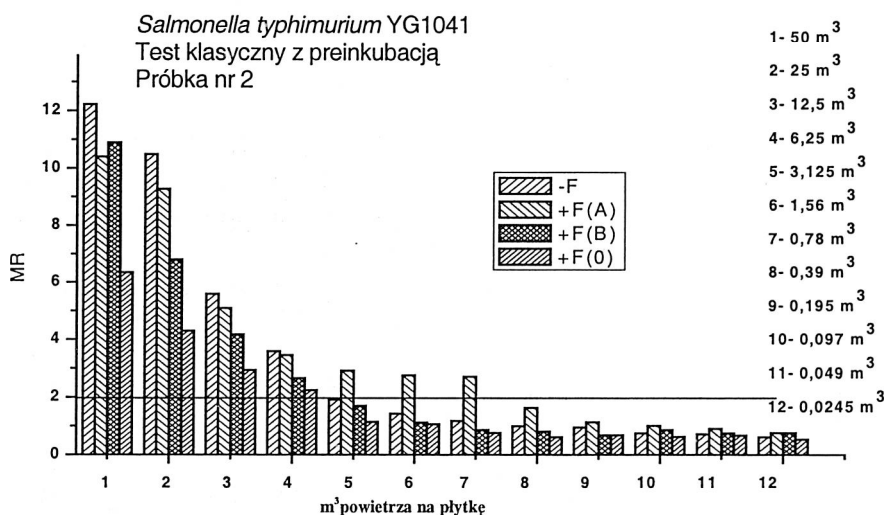
W przypadku testu klasycznego (rys. 99) bez aktywacji metabolicznej i z aktywacją metaboliczną frakcją FB i frakcją F0 stężenie progowe badanego ekstraktu pochodziło z 6,25 m³ powietrza. W teście prowadzonym w obecności frakcji FA uzyskano najmniejsze wartości współczynnika *MR* (*MR* = 3,06 przy 50 m³/płytkę). Stężenie progowe ekstraktu zanieczyszczeń w obecności tej frakcji było także przesunięte w kierunku większych wartości i wynosiło 50 m³/płytkę. Jedynie w badanym największym stężeniu ekstraktu powietrza, które wynosiło 50 m³/płytkę, wartości *MR* były większe w badaniach z frakcją FB (*MR* = 8,05) i z frakcją F0 (*MR* = 7,22) w porównaniu do *MR* uzyskanych w badaniach bez frakcji (*MR* = 6,40). W pozostałych stężeniach ekstraktu uzyskano zbliżone wartości współczynników mutagenności. Mutagenność (*M*) była zbliżona do liczby rewertantów powstałych w sposób spontaniczny i mieściła się w granicy od 126 rew./m³ do 202 rew./m³ (tab. 19).

W teście klasycznym z preinkubacją (rys. 100) uzyskano większe wartości współczynnika *MR* w porównaniu do testu klasycznego (*MR* = 12,21 dla -F, *MR* = 10,39 dla FA, *MR* = 10,89 dla FB i *MR* = 6,34 dla F0 – 50 m³/płytkę). W tym teście najmniejsze wartości współczynnika mutagenności uzyskano w badaniach z frakcją F0. W badanych większych stężeniach zanieczyszczeń powietrza największe wartości współczynnika *MR* otrzymano w badaniach prowadzonych bez frakcji mikrosomalnej, a w mniejszych stężeniach w testach z frakcją FA. Najmniejsze stężenie ekstraktu powietrza wywołujące efekt mutageny w badaniach z frakcją FA wynosiło 0,78 m³/płytkę, a w pozostałych badaniach 6,25 m³ powietrza na płytkę. Mutagenność (*M*) była zbliżona do liczby rewertantów powstałych w sposób spontaniczny w teście prowadzonym bez frakcji mikrosomalnej (212 rew./m³) i w testach wykonywanych w obecności frakcji FB i frakcji F0 (248 rew./m³ i 242 rew./m³). W przypadku badań z aktywacją metaboliczną frakcją FA liczba rewertantów indukowana przez 1 m³ badanego powietrza była dużo większa i wynosiła 449 (tab. 19).

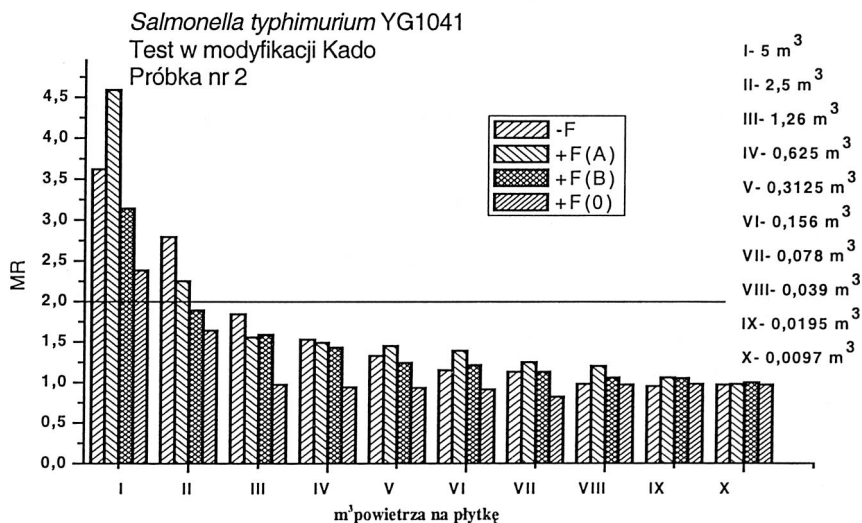


Rys. 99. Współczynniki *MR* dla szczepu YG1041 uzyskane w teście klasycznym próbki 2

W teście w modyfikacji Kado (rys. 101), w największym badanym stężeniu zanieczyszczeń powietrza (5 m^3), uzyskano największy współczynnik *MR* (4,59) w badaniach z frakcją FA. Stężenie progowe ekstraktu pyłów uzyskane w tym teście pochodziło z $2,5 \text{ m}^3$ powietrza w badaniach bez frakcji i w obecności frakcji FA oraz 5 m^3 powietrza w obecności frakcji FB i F0. Test ten charakteryzował się więc najniższym progiem wykrywalności substancji mutagennych w przypadku badań wykonywanych bez aktywacji metabolicznej i z aktywacją metaboliczną frakcją FB i F0. Wszystkie wartości mutagenności (*M*) uzyskane w tych badaniach były zbliżone do liczby rewertantów powstałych w sposób spontaniczny i mieściły się w granicy od 268 rew./ m^3 do 336 rew./ m^3 (tab. 19).



Rys. 100. Współczynniki *MR* dla szczepu YG1041 uzyskane w teście preinkubacyjnym próbki 2



Rys. 101. Współczynniki *MR* dla szczepu YG1041 uzyskane w teście w modyfikacji Kado próbki 2

Tabela 19. Mutagenność (M) otrzymana dla poszczególnych testów przeprowadzonych dla ekstraktu próbki 2

Szczep	Rodzaj testu	Obecność frakcji S9	Równanie prostej regresji	R^2	Mutagenność (M) rew./m ³
TA98	Klasyczny	–F	$y=29,1+115,2x$	0,75	144
		FA	$y=49,3+139,7x$	0,84	189
		FB	$y=41,8+125,2x$	0,84	167
		F0	$y=50,5+130,3x$	0,71	181
	Klasyczny z preinkubacją	–F	$y=51,3+24,7x$	0,67	76
		FA	$y=48,4+40,6x$	0,66	89
		FB	$y=59,3+38,3x$	0,85	98
		F0	$y=53,1+51,4x$	0,89	104
	W modyfikacji Kado	–F	$y=25,2+62,5x$	0,90	88
		FA	$y=28,7+64,6x$	0,95	93
		FB	$y=34,8+95,6x$	0,93	130
		F0	$y=41,7+95,6x$	0,82	137
YG1041	Klasyczny	–F	$y=103,7+21,9x$	0,98	126
		FA	$y=192,7+8,2x$	0,82	201
		FB	$y=162,8+21,4x$	0,93	184
		F0	$y=180,3+21,5x$	0,94	202
	Klasyczny z preinkubacją	–F	$y=174,8+36,8x$	0,92	212
		FA	$y=213,8+235x$	0,71	449
		FB	$y=194,4+53,4x$	0,87	248
		F0	$y=183,4+58,2x$	0,85	242
	W modyfikacji Kado	–F	$y=174,7+93,3x$	0,91	268
		FA	$y=177,4+107,1x$	0,91	284
		FB	$y=241,2+95x$	0,96	336
		F0	$y=242,6+78,3x$	0,93	321

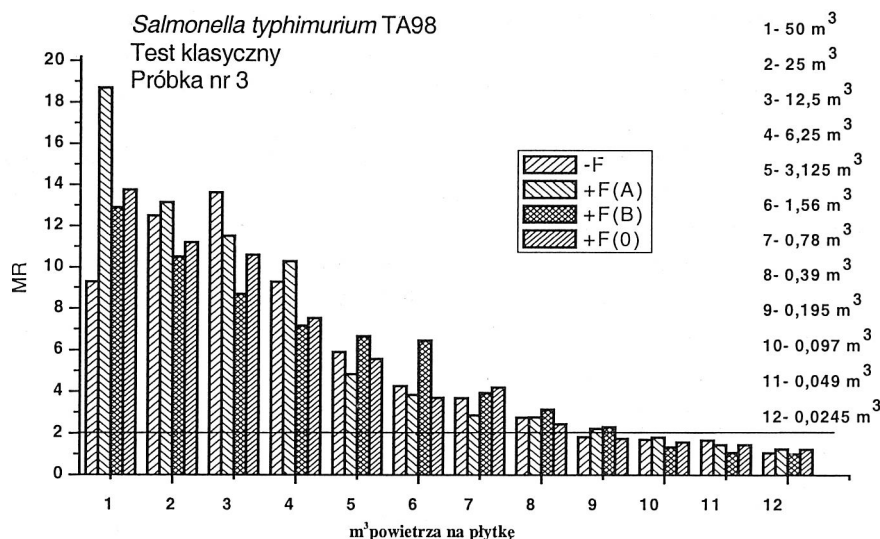
6.4.3. Wyniki testów z udziałem próbki pyłów (3) pobranej zimą na ul. Strachocińskiej

Salmonella typhimurium TA98

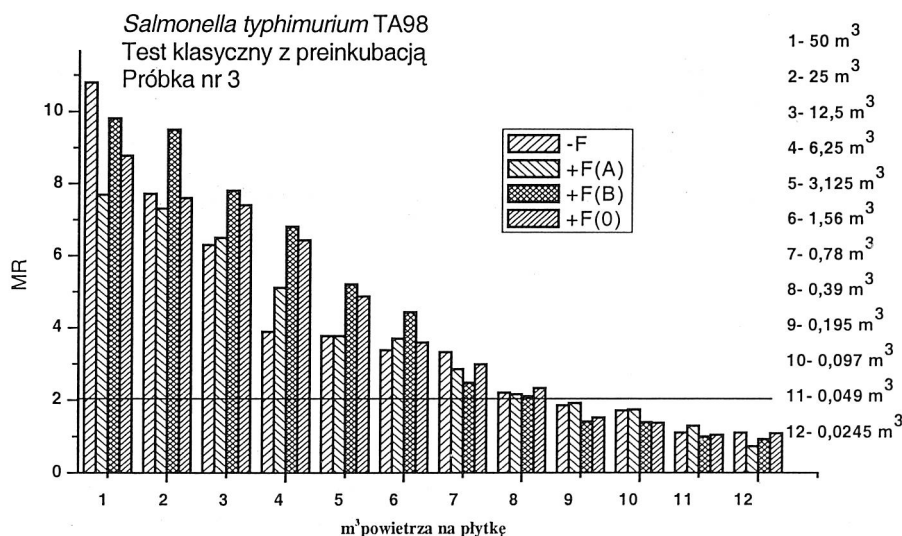
W testach z próbką 3 na szczepie TA98 uzyskano większe wartości współczynnika MR w porównaniu do współczynnika MR otrzymanego w badaniach ekstraktu próbki 1, pobranej w tym samym punkcie miasta w lecie. Największy współczynnik otrzymano w teście Kado prowadzonym z aktywacją metaboliczną.

W przypadku testu wykonywanego zgodnie z procedurą klasyczną (rys. 102), w badanym zakresie stężeń ekstraktu, efekt toksyczny na krzywej dawka–odpowiedź uzyskano jedynie w badaniach bez frakcji. W stężeniu zanieczyszczeń znajdujących się w 12,5 m³ powietrza uzyskano maksymalną wartość współczynnika MR , w badaniach bez aktywacji metabolicznej, wynoszącą 13,63. Najmniejsze stężenie ekstraktu wywołujące efekt mutageny pochodziło z 0,195 m³ powietrza w badaniach z frakcją

FA i FB, a w badaniach bez frakcji i z frakcją F0 z 0,39 m³ powietrza. Mutagenność (*M*) była dużo większa od liczby rewertantów powstałych w sposób spontaniczny i mieściła się w granicy od 97 rew./m³ do 125 rew./m³ (tab. 20).



Rys. 102. Współczynniki *MR* dla szczepu TA98 uzyskane w teście klasycznym próbki 3

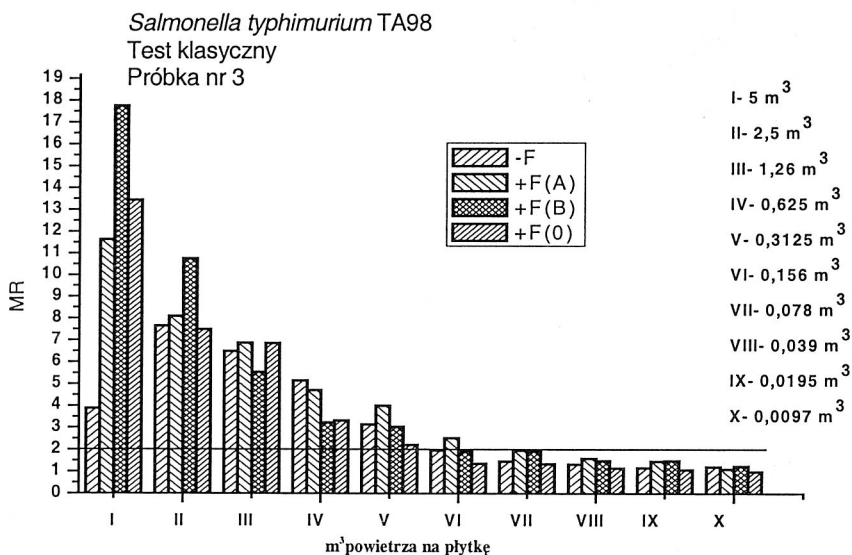


Rys. 103. Współczynniki *MR* dla szczepu TA98 uzyskane w teście preinkubacyjnym próbki 3

W teście preinkubacyjnym (rys. 103) w większości badanych stężeń ekstraktu używano większe wartości *MR* w testach prowadzonych z aktywacją metaboliczną. Stężenie progowe badanych zanieczyszczeń powietrza we wszystkich testach wynosiło

0,39 m³. Liczba rewertantów indukowana przez 1 m³ powietrza również była dużo większa niż liczba rewertantów powstających w sposób spontaniczny i wynosiła od 92 do 123 (tab. 20).

W teście w modyfikacji Kado (rys. 104) uzyskano, podobnie jak w teście klasycznym, efekt toksyczny na krzywej dawka–odpowiedź jedynie w badaniach bez frakcji. Zaobserwowano także większe wartości *MR*, w zbliżonych stężeniach badanego ekstraktu, w porównaniu z wartościami *MR* uzyskanymi w pozostałych testach. Mimo to czułość tego testu okazała się zbliżona do testu klasycznego i preinkubacyjnego, ponieważ podobne stężenia badanej próbki wywoływały efekt mutageny. Najmniejsze stężenie powietrza wywołujące efekt mutageny wynosiło 0,156 m³/płytkę w badaniach bez frakcji i w badaniach z frakcją FA i FB, natomiast w teście z frakcją F0 stężenie progowe wynosiło 0,3125 m³/płytkę. Liczba rewertantów indukowana przez 1 m³ powietrza, tak jak w pozostałych testach, była dużo większa od liczby rewertantów powstających w sposób spontaniczny i wahała się w granicach od 220 do 341 (tab. 20).



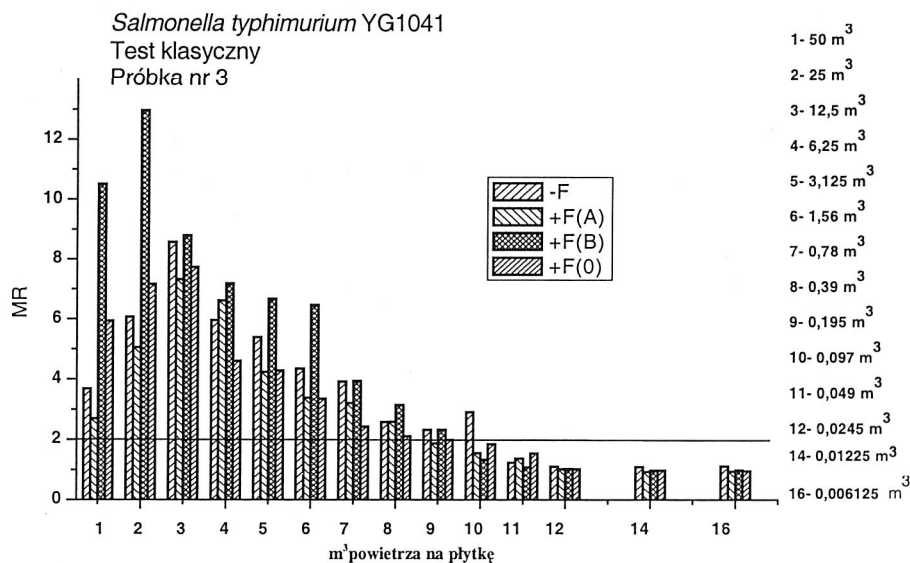
Rys. 104. Współczynniki *MR* dla szczepu TA98 uzyskane w teście w modyfikacji Kado próbki 3

Salmonella typhimurium YG1041

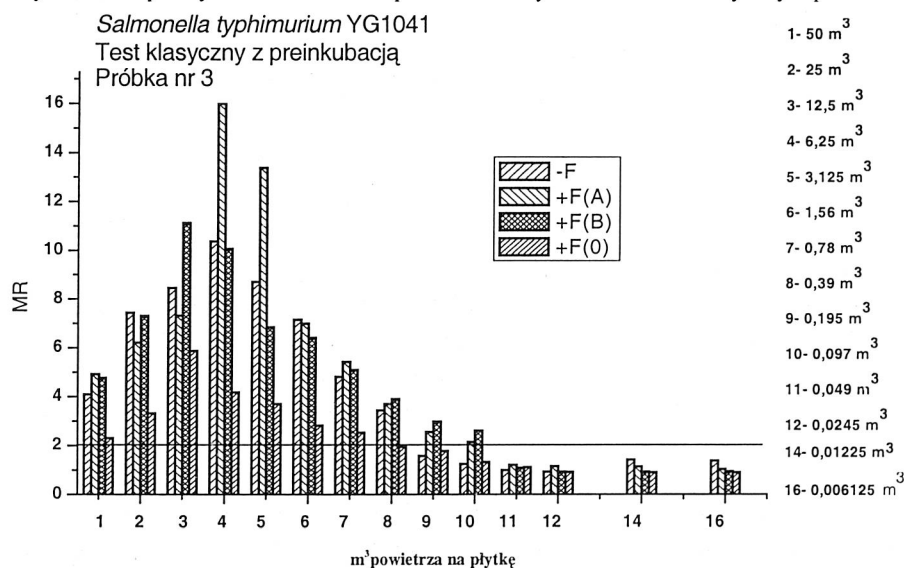
Badania mutagenności w obecności próbki 3 oraz szczepu YG1041 prowadzono w rozszerzonym zakresie stężeń ekstraktu zanieczyszczeń powietrza: od 50 m³/płytkę do 0,006125 m³/płytkę w teście klasycznym i preinkubacyjnym oraz od 5 m³/płytkę do 0,0006 m³/płytkę w teście Kado. Do testów wprowadzano bardziej rozcieńczony ekstrakt pyłów, ponieważ w próbce tej stwierdzono obecność większej ilości zanieczyszczeń o charakterze mutagennym w badaniach chromatograficznych.

W przypadku testów z udziałem szczepu YG1041 uzyskano większą liczbę rewertantów w porównaniu do testów prowadzonych na tym szczepie z próbką 1 pobraną latem w tym samym punkcie miasta. W przypadku tego szczepu we wszystkich

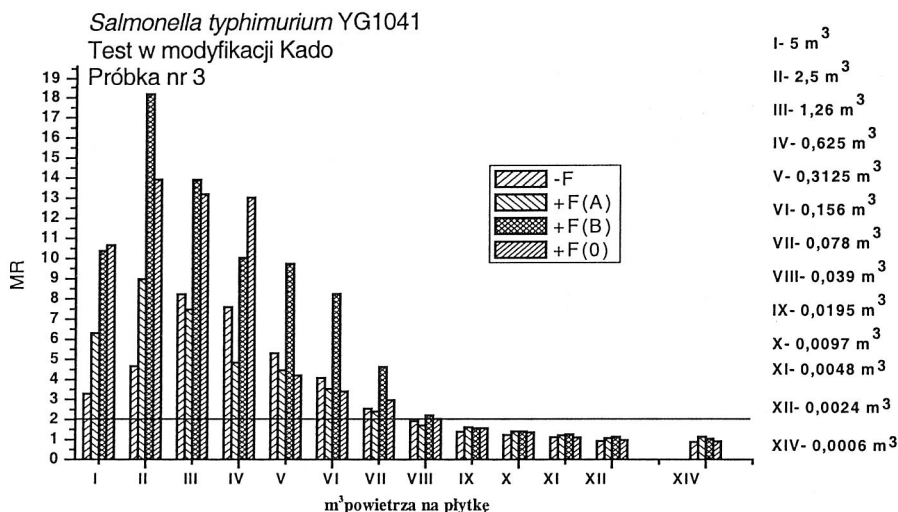
badaniach stwierdzono efekt toksyczny na krzywej zależności dawka–odpowiedź. W większości prowadzonych testów otrzymano większe wartości współczynnika *MR* w badaniach z aktywacją metaboliczną w porównaniu do badań bez frakcji lub uzyskane *MR* w badaniach z i bez aktywacji metabolicznej były zbliżone. W teście klasycznym i w teście prowadzonym w modyfikacji Kado uzyskano większe współczynniki *MR* w badaniach z frakcją FB, natomiast w teście prowadzonym z preinkubacją lepsze rezultaty otrzymano w obecności frakcji FA.



Rys. 105. Współczynniki *MR* dla szczepu YG1041 uzyskane w teście klasycznym próbki 3



Rys. 106. Współczynniki *MR* dla szczepu YG1041 uzyskane w teście preinkubacyjnym próbki 3



Rys. 107. Współczynniki MR dla szczepu YG1041 uzyskane w teście w modyfikacji Kado próbki 3

Tabela 20. Mutagenność (M) otrzymana dla poszczególnych testów przeprowadzonych dla ekstraktu próbki 3

Szczep	Rodzaj testu	Obecność frakcji S9	Równanie prostej regresji	R ²	Mutagenność (M) rew./m ³
TA98	Klasyczny	-F	y=30,4+66,6x	0,95	97
		FA	y=45,3+71x	0,86	116
		FB	y=36,5+63,4x	0,95	100
		F0	y=48,1+76,9x	0,75	125
	Klasyczny z preinkubacją	-F	y=31,4+79,2x	0,96	111
		FA	y=39,9+82,6x	0,88	123
		FB	y=29,1+62,5x	0,98	92
		F0	y=37,2+54,3x	0,91	92
	W modyfikacji Kado	-F	y=42,8+273,1x	0,99	316
		FA	y=46,7+294,2x	0,98	341
		FB	y=42,9+202,5x	0,96	246
		F0	y=35,9+184,5x	0,98	220
YG1041	Klasyczny	-F	y=174,6+474,1x	0,76	649
		FA	y=249,4+696,5x	0,94	946
		FB	y=194,6+573,4x	0,84	768
		F0	y=236,2+474,1x	0,84	710
	Klasyczny z preinkubacją	-F	y=85,6+308,3x	0,96	394
		FA	y=167,7+501,5x	0,94	669
		FB	y=163,1+414,7x	0,86	578
		F0	y=234,2+285,2x	0,82	519
	W modyfikacji Kado	-F	y=233,2+894,9x	0,83	1128
		FA	y=329,2+1056,3x	0,9	1386
		FB	y=223,5+1277,3x	0,87	1501
		F0	y=216,2+1254,5x	0,74	1471

W teście klasycznym (rys. 105) stężenie progowe zanieczyszczeń powietrza wywołujące efekt mutageny wynosiło $0,097 \text{ m}^3/\text{płytkę}$ w badaniach bez frakcji; $0,195 \text{ m}^3/\text{płytkę}$ w badaniach z frakcją FB i $0,39 \text{ m}^3/\text{płytkę}$ w testach z frakcjami FA i F0. Mutagenność (M) była dużo większa od liczby rewertantów powstałych w sposób spontaniczny i mieściła się w granicy od 649 rew./m^3 do 946 rew./m^3 (tab. 20).

W przypadku testu preinkubacyjnego (rys. 106) w badaniach z frakcją FA i FB stężenie zanieczyszczeń pochodzące z $0,097 \text{ m}^3$ powietrza wywoływało efekt mutageny, natomiast stężenie pochodzące z $0,39 \text{ m}^3$ było odpowiedzialne za ten efekt w badaniach bez frakcji i z frakcją F0. Liczba rewertantów indukowana przez 1 m^3 powietrza była wysoka i wahała się w granicach 394–669 (tab. 20).

Test w modyfikacji Kado (rys. 107) był najbardziej czuły na obecne w badanym ekstrakcie zanieczyszczenia powietrza, ponieważ dawał efekt mutageny w mniejszych stężeniach ekstraktu wprowadzanych na płytkę w porównaniu z dwoma pozostałymi testami. W badaniach z frakcją FB i F0 stężenie to wynosiło $0,039 \text{ m}^3/\text{płytkę}$, a w badaniach bez frakcji i z frakcją FB – $0,078 \text{ m}^3/\text{płytkę}$. W teście tym mutagenność również była duża i wynosiła od 1128 rew./m^3 do 1501 rew./m^3 (tab. 20).

6.4.4. Wyniki testów z udziałem próbki pyłów (4) pobranej zimą na pl. Grunwaldzkim

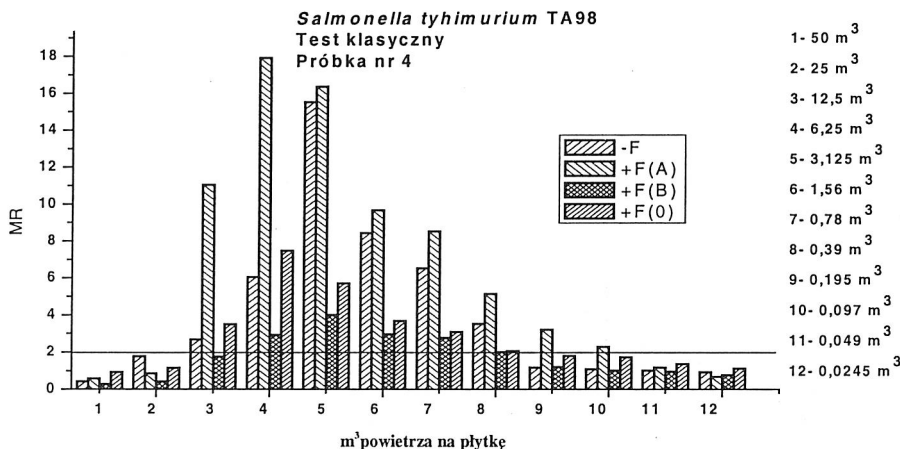
Salmonella typhimurium TA98

We wszystkich testach z udziałem próbki 4 na szczepie TA98 stwierdzono występowanie efektu toksycznego na krzywej dawka–odpowiedź. Uzyskano również większe wartości współczynnika MR w badanych mniejszych stężeniach zanieczyszczeń powietrza w porównaniu do MR otrzymanych dla próbki 2 pobranej w lecie na tym samym stanowisku badawczym. Świadczy to o większej liczbie mutagenów typu zmiany fazy odczytu w ekstrakcie zanieczyszczeń pobranych zimą.

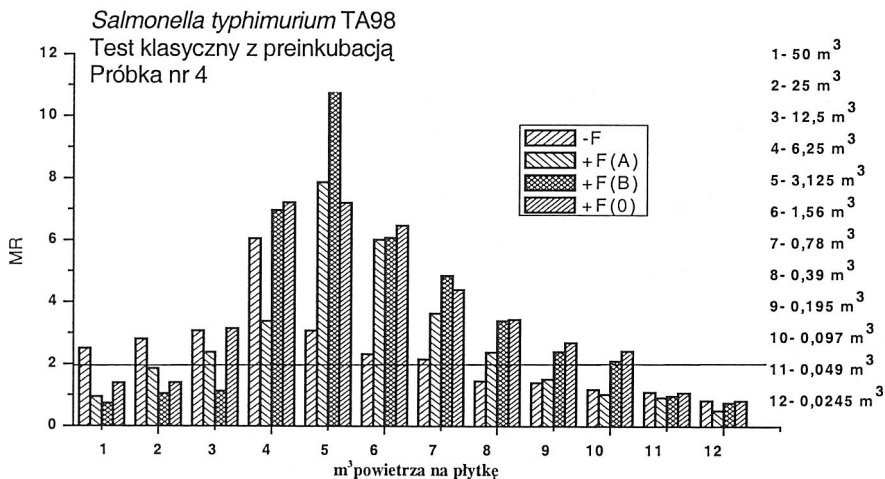
W teście klasycznym (rys. 108) uzyskano największe wartości współczynnika MR z frakcją FA, w porównaniu do testów bez aktywacji metabolicznej i z aktywacją metaboliczną pozostałymi frakcjami. Maksymalne wartości współczynnika MR uzyskano w przypadku badań bez frakcji ($MR = 15,5$) i z frakcją FB ($MR = 4,0$) w stężeniu zanieczyszczeń pochodzących z $3,125 \text{ m}^3$ powietrza, a w przypadku testów z frakcją FA ($MR = 17,9$) i F0 ($MR = 7,47$) w stężeniu ekstraktu $6,25 \text{ m}^3/\text{płytkę}$. Stężenie progowe badanych zanieczyszczeń wynosiło $0,097 \text{ m}^3/\text{płytkę}$ w testach przeprowadzonych z udziałem frakcji FA i $0,39 \text{ m}^3/\text{płytkę}$ w pozostałych badaniach. Mutagenność (M) wahała się w granicach od 101 rew./m^3 do 186 rew./m^3 i była dużo większa niż liczba rewertantów indukowanych w sposób spontaniczny (tab. 21).

W teście preinkubacyjnym (rys. 109) otrzymano mniejszą liczbę rewertantów w porównaniu do liczby rewertantów uzyskanych w teście klasycznym. Największe wartości współczynnika MR uzyskano w badaniach ze wszystkimi frakcjami mikrosomalnymi. Preinkubacja poprawiła więc skuteczność wykrywania efektu mutagenne-

go z frakcją FB i F0. W teście tym próg wykrywalności stwierdzono dla następujących stężeń ekstraktu powietrza dodawanego na płytkę: $0,097 \text{ m}^3$ w badaniach z frakcjami FB i F0, $0,39 \text{ m}^3$ w badaniach z frakcją FA i $0,78 \text{ m}^3$ w badaniach bez frakcji –F. Liczba rewertantów indukowana przez 1 m^3 badanej próbki powietrza była również większa niż liczba rewertantów powstających w sposób spontaniczny i wynosiła od 76 do 208 (tab. 21).



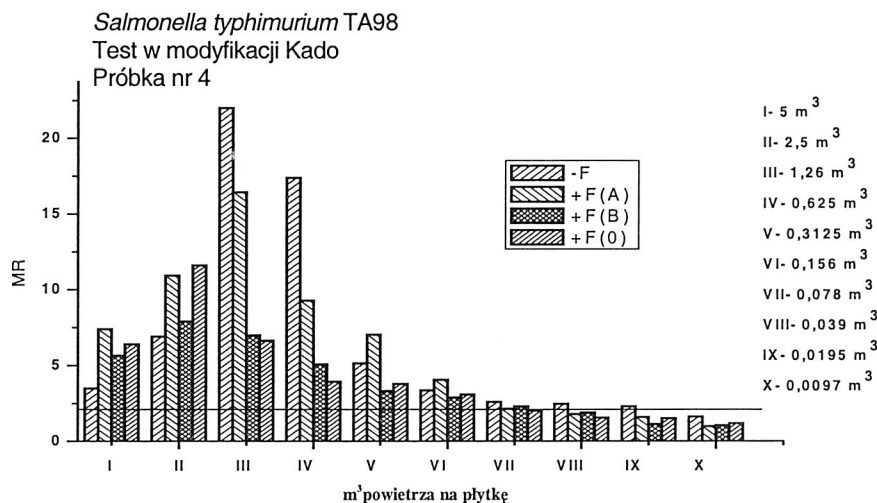
Rys. 108. Współczynniki MR dla szczepu TA98 uzyskane w teście klasycznym próbki 4



Rys. 109. Współczynniki MR dla szczepu TA98 uzyskane w teście preinkubacyjnym próbki 4

W przypadku testu w modyfikacji Kado (rys. 110) uzyskano większe wartości współczynnika MR w teście wykonywanym bez frakcji w większych stężeniach badanego ekstraktu powietrza, a w mniejszych stężeniach w teście wykonywanym z frakcją FA. Test ten okazał się najbardziej czuły na obecne w badanej próbce zanieczyszczenia, efekt mutageny bowiem uzyskano w mniejszych stężeniach ekstraktu

powietrza wprowadzanych na płytkę w porównaniu do poprzednich procedur. Aktywność mutagenną w badaniach bez frakcji wykryto w stężeniu ekstraktu powietrza wynoszącym $0,0195 \text{ m}^3/\text{płytkę}$, a w stężeniu $0,078 \text{ m}^3/\text{płytkę}$ w badaniach z frakcjami mikrosomalnymi. Liczba rewertantów indukowana przez 1 m^3 badanej próby powietrza była taka sama jak w poprzednich testach, większa niż liczba rewertantów powstających w sposób spontaniczny i wynosiła od 311 do 389 (tab. 21).



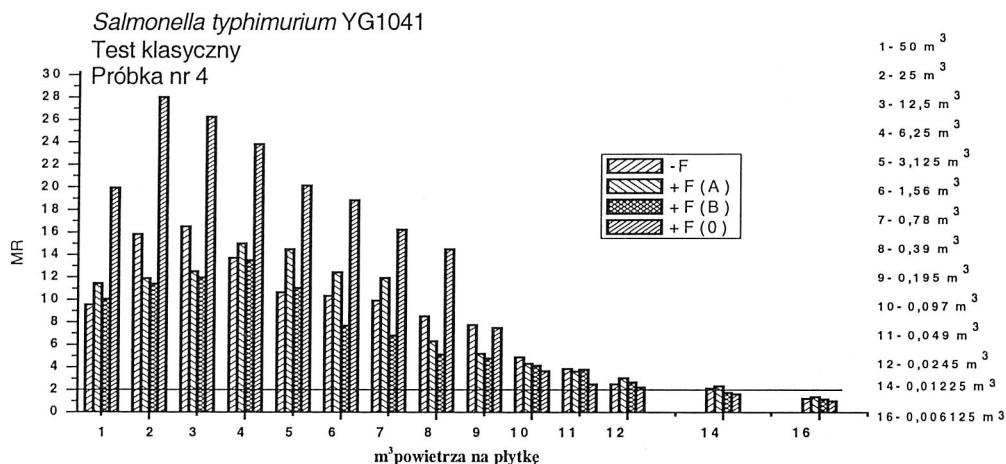
Rys. 110. Współczynniki *MR* dla szczepu TA98 uzyskane w teście w modyfikacji Kado próbki 4

Salmonella typhimurium YG1041

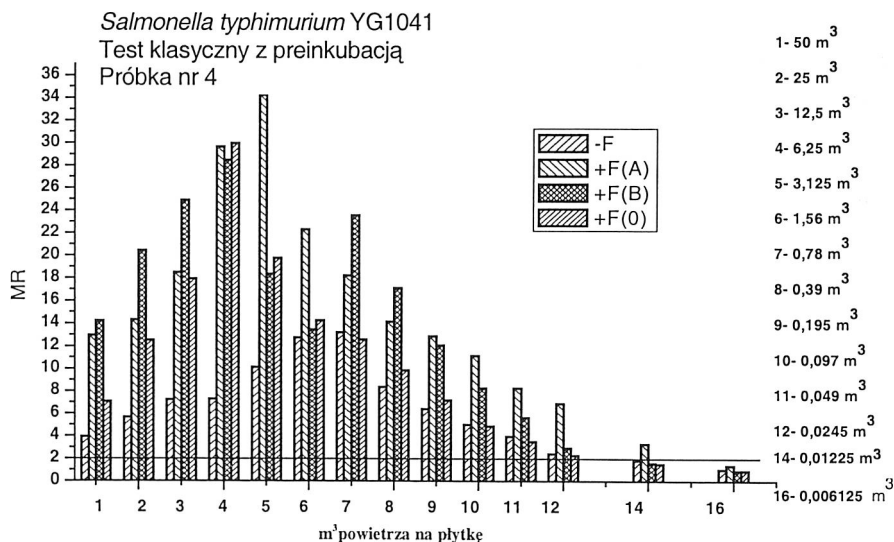
Badania mutagenności w obecności tego szczepu prowadzono w rozszerzonym zakresie stężeń ekstraktów powietrza, takim samym jak w przypadku próbki 3. W większości testów z udziałem próbki 4 na szczepie YG1041 stwierdzono efekt toksyczny na krzywej dawka–odpowieź. Jedynie w badaniach w obecności frakcji FB w teście Kado nie otrzymano pełnego biologicznego obrazu działania zanieczyszczeń w zależności od ich stężenia. Otrzymano bardzo duże wartości współczynnika *MR* (nawet ok. 45), dużo większe w porównaniu do *MR* uzyskanych dla próbki 2 pobranej w lecie, w tym samym punkcie miasta i to w badanych mniejszych stężeniach ekstraktu zanieczyszczeń powietrza. Stwierdzono także dużo mniejsze stężenia progowe badanych zanieczyszczeń w poszczególnych testach oraz bardzo dużą liczbę rewertantów indukowanych przez 1 m^3 powietrza w porównaniu do liczby rewertantów powstających w sposób spontaniczny. Świadczyło to o większej liczbie mutagenów typu zmiany fazy odczytu o charakterze nitrowych związków aromatycznych w próbce pobranej zimą.

W teście klasycznym (rys. 111) największe współczynniki *MR* uzyskano w badaniach wykonywanych z frakcją F0 i FA. Maksymalne współczynniki *MR* otrzymano w stężeniu ekstraktu wynoszącym $25 \text{ m}^3/\text{płytkę}$ w badaniach z F0 ($MR = 27,99$), w stężeniu $12,5 \text{ m}^3/\text{płytkę}$ w badaniach bez frakcji ($MR = 16,48$) oraz w stężeniu $6,25 \text{ m}^3/\text{płytkę}$ w obecności frakcji FA ($MR = 15,0$) i FB ($13,52$). Z kolei obecność

zanieczyszczeń o działaniu mutagennym stwierdzono w stężeniu $0,01225 \text{ m}^3/\text{płytkę}$ powietrza w testach wykonywanych bez frakcji i z frakcją FA. Natomiast w badaniach z frakcją FB i F0 w stężeniu $0,0245 \text{ m}^3$ powietrza wprowadzanego na płytkę. Liczba rewertantów indukowanych przez 1 m^3 powietrza mieściła się w granicach od 1091 do 1930 (tab. 21).



Rys. 111. Współczynniki MR dla szczepu YG1041 uzyskane w teście klasycznym próbki 4

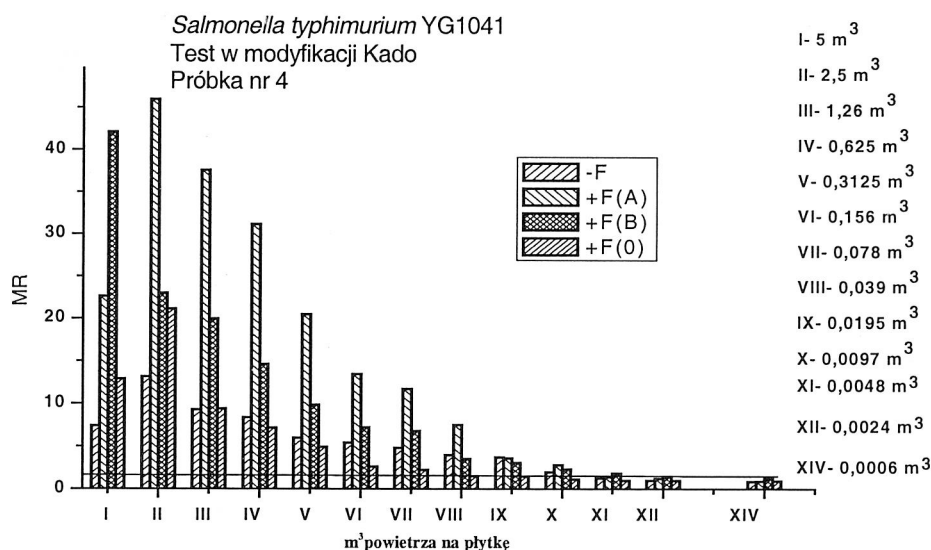


Rys. 112. Współczynniki MR dla szczepu YG1041 uzyskane w teście preinkubacyjnym próbki 4

W przypadku testu z preinkubacją (rys. 112) otrzymano największe współczynniki MR w badaniach prowadzonych z frakcją FA i FB. Stężenie progowe ekstrak-

tów zanieczyszczeń powietrza w teście z frakcją FA wynosiło $0,01225 \text{ m}^3/\text{płytkę}$, a w pozostałych testach $0,0245 \text{ m}^3/\text{płytkę}$. Mutagenność wynosiła od 2126 rew./ m^3 do 2947 rew./ m^3 (tab. 21).

W badaniach zanieczyszczeń powietrza testem w modyfikacji Kado (rys. 113) największą wartość współczynnika *MR* uzyskano w badaniach z frakcją FA i FB. Progi wykrywalności dla tego testu były na poziomie $0,0097 \text{ m}^3/\text{płytkę}$ w badaniach z FA i FB, na poziomie $0,0195 \text{ m}^3/\text{płytkę}$ w badaniach bez frakcji oraz $0,078 \text{ m}^3/\text{płytkę}$ w teście z frakcją F0. W przypadku tego testu liczba rewertantów indukowanych przez 1 m^3 powietrza była w granicach od 1078 do 3883 (tab. 21).



Rys. 113. Współczynniki *MR* dla szczepu YG1041 uzyskane w teście w modyfikacji Kado próbki 4

W przypadku szczepu testowego YG1041, dla omawianej próbki, uzyskano podobne zależności współczynnika *MR* od stężenia ekstraktu zanieczyszczeń, jak dla szczepu TA98. Również jedynie w badaniach prowadzonych w modyfikacji Kado w obecności frakcji FB nie uzyskano efektu toksycznego na krzywej dawka–odpowiedź. W tym przypadku w badanym największym stężeniu próby (5 m^3 powietrza/płytkę) współczynnik *MR* wynosił aż 42,06. W teście preinkubacyjnym stwierdzono większą *LR* w porównaniu do testu klasycznego i zaobserwowano wyraźne zmniejszenie stężeń, w których zaobserwowano maksymalne współczynniki *MR*. Otrzymany duży współczynnik *MR* w tym teście i niskie progi wykrywalności zanieczyszczeń mutagennych wskazują na znaczną przewagę testu w modyfikacji Kado w badaniach tej próbki.

Tabela 21. Mutagenność (M) otrzymana dla poszczególnych testów przeprowadzonych dla ekstraktu próbki 4

Szczep	Rodzaj testu	Obecność frakcji S9	Równanie prostej regresji	R^2	Mutagenność (M) rew./m ³
TA98	Klasyczny	–F	$y=19,6+81,6x$	0,82	101
		FA	$y=33,2+153,1x$	0,88	186
		FB	$y=45,9+74,5x$	0,85	120
		F0	$y=40,6+71x$	0,92	112
	Klasyczny z preinkubacją	–F	$y=24,5+51,1x$	0,87	76
		FA	$y=33,5+101,4x$	0,98	135
		FB	$y=41,4+144,1x$	0,97	185
		F0	$y=29,7+178,3x$	0,92	208
	W modyfikacji Kado	–F	$y=24,1+364,5x$	0,93	389
		FA	$y=36,1+300,3x$	0,97	336
		FB	$y=40,3+319,4x$	0,96	359
		F0	$y=45,5+266x$	0,94	311
YG1041	Klasyczny	–F	$y=155,4+936x$	0,83	1091
		FA	$y=201,7+1042,4x$	0,85	1244
		FB	$y=235,8+931,4x$	0,74	1167
		F0	$y=215+1715x$	0,80	1930
	Klasyczny z preinkubacją	–F	$y=175+1951,2x$	0,94	2126
		FA	$y=235+2525x$	0,83	2760
		FB	$y=280+2666,9x$	0,91	2947
		F0	$y=209,3+2478x$	0,89	2687
	W modyfikacji Kado	–F	$y=137,9+940,5x$	0,91	1078
		FA	$y=172,8+3709,9x$	0,87	3883
		FB	$y=162,3+2330,9x$	0,89	2493
		F0	$y=219,3+1182,9x$	0,94	1402

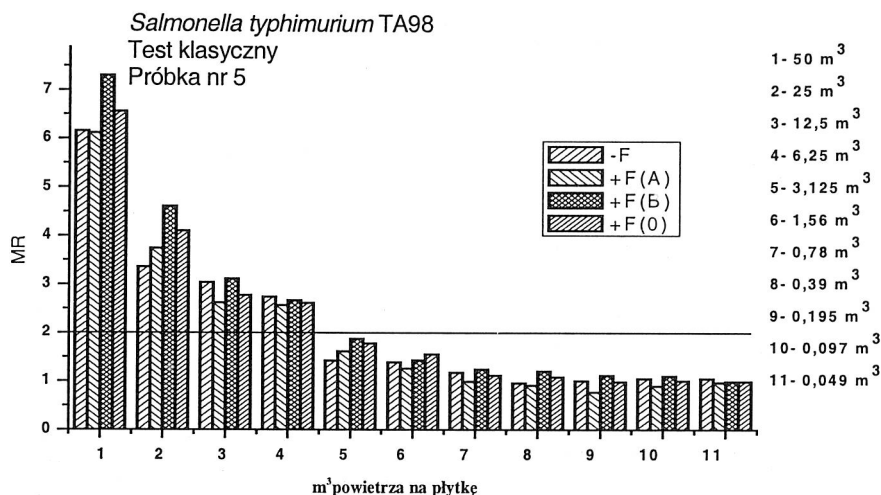
6.4.5. Wyniki testów z udziałem próbki pyłów (5) pobranej wiosną na ul. Norwida

Salmonella typhimurium TA98

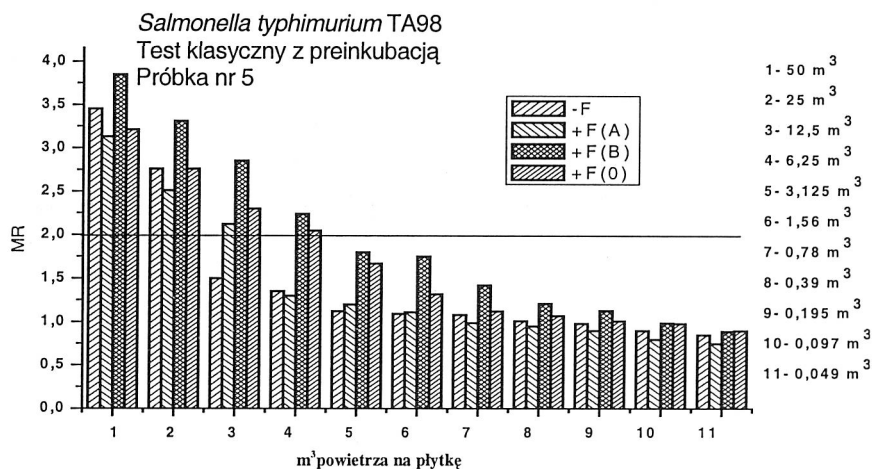
We wszystkich testach z udziałem próbki powietrza pobranej wiosną na szczepie TA98 nie stwierdzono efektu toksycznego na krzywych dawka–odpowieź. Współczynniki MR uzyskane w tych testach były większe niż otrzymane w badaniach z udziałem próbki 1 pobranej w lecie na ul. Strachocińskiej oraz mniejsze w porównaniu do uzyskanych dla próbki 2 pobranej w lecie na pl. Grunwaldzkim.

W teście klasycznym (rys. 114) największe współczynniki MR uzyskano w badaniach z frakcją FB ($MR = 7,21$ i $4,52$) i F0 ($MR = 6,53$ i $4,11$) w stężeniach ekstraktu zanieczyszczeń pochodzących z 50 m^3 i 25 m^3 powietrza. W pozostałych stężeniach MR uzyskane w testach bez frakcji i z jej udziałem były zbliżone. Stężenie progowe

ekstraktu powietrza we wszystkich testach wynosiło $6,25 \text{ m}^3/\text{płytkę}$. Mutagenność (M) była mała i zawierała się w granicy od 26 rew./ m^3 do 47 rew./ m^3 (tab. 22).



Rys. 114. Współczynniki MR dla szczepu TA98 uzyskane w teście klasycznym próbki 5

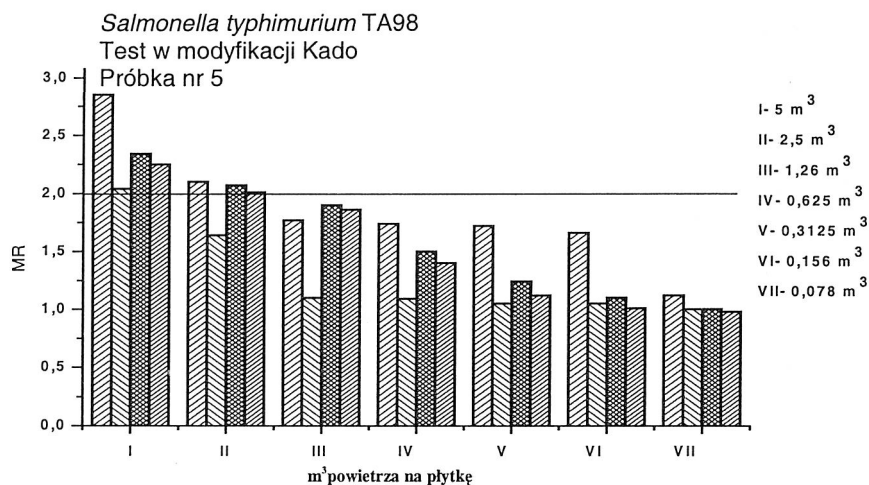


Rys. 115. Współczynniki MR dla szczepu TA98 uzyskane w teście preinkubacyjnym próbki 5

W przypadku testu z preinkubacją (rys. 115) największe współczynniki MR uzyskano w badaniach z frakcją FB ($MR = 2,78$ przy $50 \text{ m}^3/\text{płytkę}$). Stężenie ekstraktu zanieczyszczeń powietrza wywołujące efekt mutageny wynosiło $6,25 \text{ m}^3/\text{płytkę}$ w testach z frakcją FB i F0, $12,5 \text{ m}^3/\text{płytkę}$ w obecności frakcji FA i $25 \text{ m}^3/\text{płytkę}$ w badaniach bez frakcji. Mutagenność (M) mieściła się w granicy od 34 rew./ m^3 do 52 rew./ m^3 (tab. 22).

W teście Kado (rys. 116), w stężeniu ekstraktu zanieczyszczeń pyłowych pochodzących z 5 m^3 powietrza, największą wartość MR (2,8) uzyskano w badaniach bez frakcji. Stężenie progowe ekstraktu zanieczyszczeń powietrza wynosiło $25 \text{ m}^3/\text{płytkę}$

w badaniach bez frakcji i z frakcją FB i F0. W teście przeprowadzonym z frakcją FA stężenie to równe było 5 m³/płytkę. Liczba rewertantów indukowanych przez 1 m³ powietrza również była mała i wynosiła od 28 do 53 (tab. 22).



Rys. 116. Współczynniki *MR* dla szczepu TA98 uzyskane w teście w modyfikacji Kado próbki 5

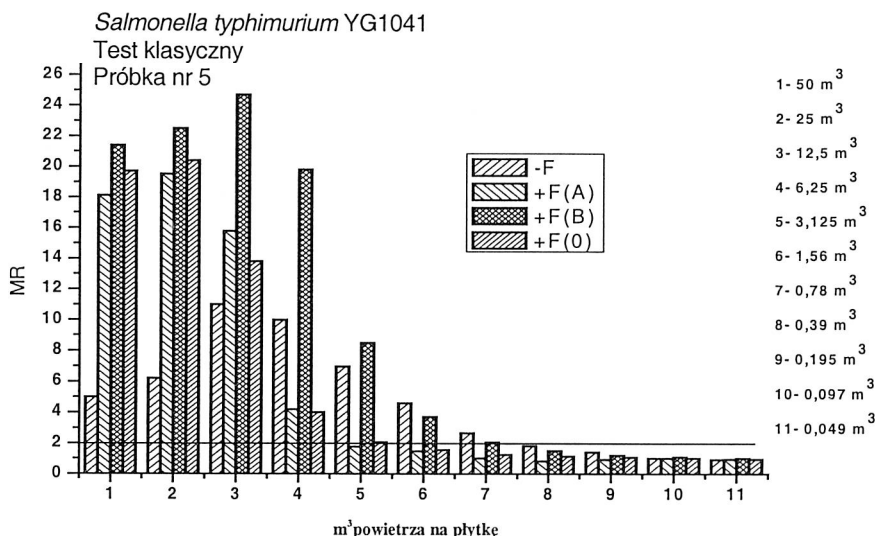
Salmonella typhimurium YG1041

W testach prowadzonych metodą klasyczną i z preinkubacją na szczepie YG1041 stwierdzono efekty toksyczne na krzywych dawka-odpowiedź. Liczba rewertantów indukowana przez 1 m³ powietrza w większości testów była zbliżona do liczby rewertantów powstających w sposób spontaniczny. Jedynie w pięciu testach (klasyczny bez frakcji i z frakcją FB, w modyfikacji Kado bez frakcji oraz z frakcją FB i F0) otrzymano większą mutagenność (*M*) (tab. 22). W przypadku badań testem klasycznym z udziałem tego szczepu otrzymano większe współczynniki *MR* niż w testach prowadzonych na próbkach pobranych latem (1 i 2).

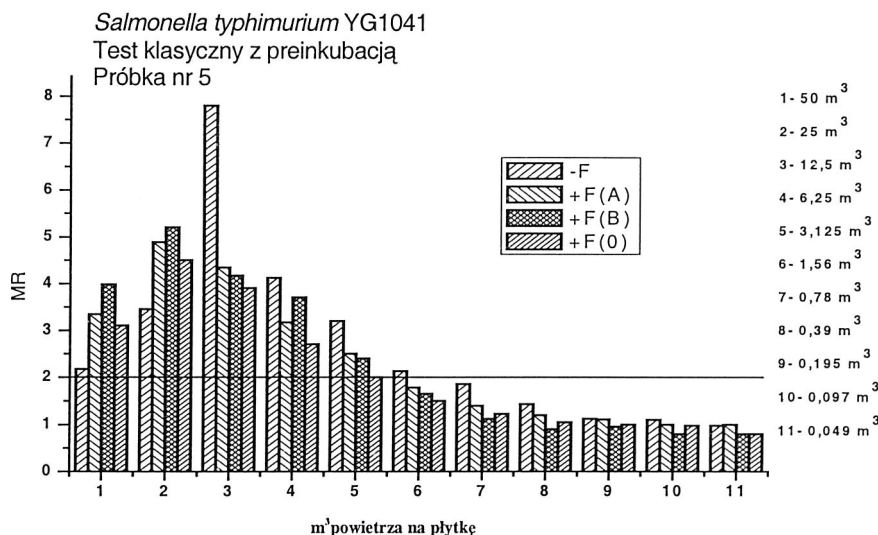
W teście klasycznym (rys. 117) wynik dodatni uzyskano po wprowadzeniu na płytkę ekstraktu zanieczyszczeń pochodzących z 0,78 m³ powietrza w badaniach bez udziału frakcji i z frakcją FB, z 3,125 m³ powietrza w teście z udziałem frakcji F0 oraz z 6,25 m³ powietrza w badaniach z frakcją FA. Uzyskano największe *MR* (24,15 przy 12,5 m³/płytkę) w teście z udziałem frakcji FB. Liczba rewertantów indukowanych przez 1 m³ powietrza we wszystkich testach wahała się od 188 do 430 (tab. 22).

W teście preinkubacyjnym (rys. 118) uzyskano największe *MR* (7,62 przy 12,5 m³/płytkę) w badaniach bez aktywacji metabolicznej. Zanieczyszczenia pochodzące z 1,56 m³ powietrza wywołały efekt mutageny w badaniach bez frakcji, a z 3,125 m³ powietrza w badaniach z aktywacją metaboliczną. Mutagenność (*M*) mieściła się w granicy 248–285 rew./m³ (tab. 22).

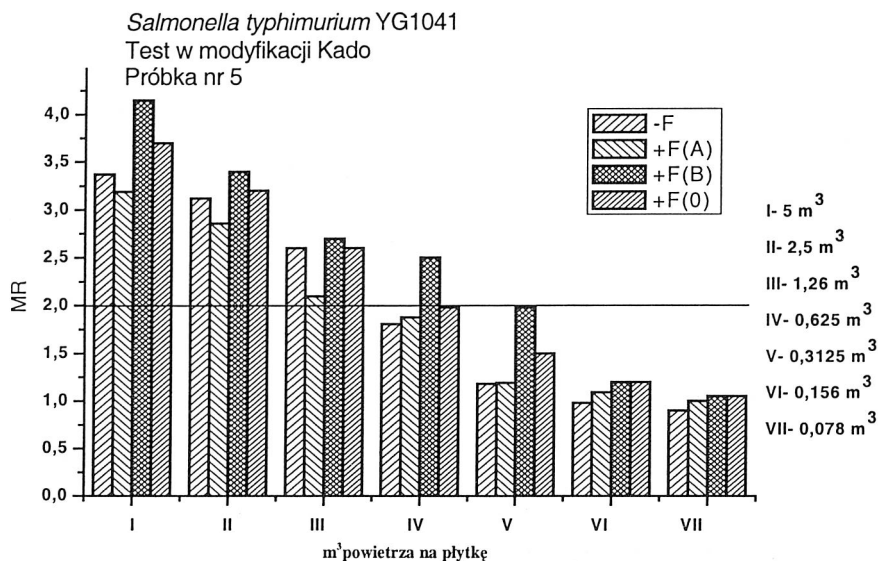
W przypadku testu w modyfikacji Kado (rys. 119) uzyskano największe liczby rewertantów w badaniach z frakcjami FB ($MR = 4,15$ przy $5 \text{ m}^3/\text{płytkę}$) i F0 ($MR = 3,68$ przy $5 \text{ m}^3/\text{płytkę}$). Wynik dodatni testu otrzymano w badaniach z frakcją FB w stężeniu ekstraktu wynoszącym $0,625 \text{ m}^3$ powietrza na płytkę, a w stężeniu $1,26 \text{ m}^3/\text{płytkę}$ w pozostałych badaniach. Mutagenność (M) mieściła się w granicy 327–468 rew./ m^3 (tab. 22).



Rys. 117. Współczynniki MR dla szczepu YG1041 uzyskane w teście klasycznym próbki 5



Rys. 118. Współczynniki MR dla szczepu YG1041 uzyskane w teście preinkubacyjnym próbki 5

Rys. 119. Współczynniki *MR* dla szczepu YG1041 uzyskane w teście w modyfikacji Kado próbki 5Tabela 22. Mutagenność (*M*) otrzymana dla poszczególnych testów przeprowadzonych dla ekstraktu próbki 5

Szczep	Rodzaj testu	Obecność frakcji S9	Równanie prostej regresji	R^2	Mutagenność (<i>M</i>) rew./m ³
TA98	Klasyczny	-F	$y=20,7+5,1x$	0,85	26
		FA	$y=29,1+6,9x$	0,89	36
		FB	$y=27+6,8x$	0,92	34
		F0	$y=34,2+12,6x$	0,93	47
	Klasyczny z preinkubacją	-F	$y=29,9+3,8x$	0,87	34
		FA	$y=32,5+6,3x$	0,86	39
		FB	$y=34+18,2x$	0,96	52
		F0	$y=39,2+9,5x$	0,93	49
	W modyfikacji Kado	-F	$y=26,1+9,8x$	0,85	36
		FA	$y=26,4+2x$	0,86	28
		FB	$y=28,7+21,5x$	0,99	50
		F0	$y=29,9+23,3x$	0,98	53
YG1041	Klasyczny	-F	$y=116,7+313,4x$	0,99	430
		FA	$y=139,1+48,6x$	0,89	188
		FB	$y=128,1+249,2x$	0,98	377
		F0	$y=155,3+59,3x$	0,98	214
	Klasyczny z preinkubacją	-F	$y=141,3+107,2x$	0,93	248
		FA	$y=185,7+96,6x$	0,99	282
		FB	$y=187,2+88,3x$	0,97	275
		F0	$y=200,9+83,7x$	0,91	285
	W modyfikacji Kado	-F	$y=134,4+222,2x$	0,98	357
		FA	$y=163,9+162,9x$	0,91	327
		FB	$y=207,1+261x$	0,82	468
		F0	$y=176+225,6x$	0,98	402

7. Dyskusja wyników

Zanieczyszczenie powietrza atmosferycznego jest problemem ogólnoswiatowym, ponieważ stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia ludzi i innych organizmów żywych. Obecne w powietrzu miejskim zanieczyszczenia zawierają wiele różnych lotnych i cząsteczkowych substancji organicznych, które wykazują, między innymi, właściwości mutagenne. Ich ilość i rodzaj jest uzależniony od źródeł emisji, trwałości chemicznej i warunków atmosferycznych [98, 140, 188]. Badania epidemiologiczne dostarczyły wielu pozytywnych przykładów korelacji pomiędzy ekspozycją na pył zawieszony (PM) a pojawianiem się wielu poważnych skutków zdrowotnych [45]. Wraz z odkryciem, że mutacje odgrywają rolę w procesach rakotwórczych, zaczęto stosować krótkoterminowe testy w badaniach określających potencjał mutageny prób środowiskowych. Aktywność mutagenna jest wstępnym wskaźnikiem narażenia na potencjalne kancerogeny i może być pomocna w chemicznej charakterystyce i identyfikacji mutagenów oraz określania ich źródeł emisji. Bakteryjny test *Salmonella* jest jednym z najczęściej stosowanych testów krótkoterminowych do oceny mutagennego i potencjalnie rakotwórczego oddziaływania złożonych mieszanin związków chemicznych stanowiących zanieczyszczenia powietrza. Wielu badaczy postuluje, aby znalazł się on w rutynowym monitoringu zanieczyszczeń atmosfery, stanowiąc system skринingowy zdolny do wykrycia różnych mutacji na poziomie molekularnym [37].

Ten ważny problem ekologiczny i jego aspekt użytkowy stał się powodem do podjęcia badań, których przedmiotem było przeprowadzenie wielu testów *Salmonella* różniących się protokołem wykonania, na jednym materiale badawczym, w celu wytypowania procedury pozwalającej wykrywać z dużą czułością obecność mutagennych zanieczyszczeń powietrza atmosferycznego. Modyfikacja klasycznej procedury testu dotyczyła doboru induktora frakcji mikrosomalnej, określenia optymalnego stężenia i składu frakcji stosowanej w teście, określenia optymalnego czasu kontaktu bakterii testowych z badaną próbką (preinkubacji) oraz ustalenia optymalnego składu mieszaniny reakcyjnej. Zwiększenie czułości testu jest niezwykle ważne, wykrycie bowiem aktywności mutagennej organicznych zanieczyszczeń powietrza wymaga pobierania próbek w ilościach znacznie większych niż w przypadku analiz fizykochemicznych, co stanowi utrudnienie w wprowadzeniu testu do rutynowego monitoringu zanieczyszczeń powietrza.

Badania efektu mutagennego organicznych ekstraktów pyłów zawieszonych w powietrzu przeprowadzano w różnych miastach na świecie [37]. W Polsce badania genotoksyczności zanieczyszczeń prowadzono przede wszystkim na obszarze Górnego Śląska oraz na terenie Warszawy i Wrocławia. Wrocław zajmuje drugie miejsce, po Elektrowni „Turów”, na terenie województwa dolnośląskiego pod względem emisji zanieczyszczeń gazowych i pyłowych [170]. W powietrzu miejskim Wrocławia występuje więc duża ilość zanieczyszczeń, dlatego też pyły zawieszone pobrane w tym miejscu stanowią dobry materiał badawczy.

W pierwszym etapie pracy dokonano poboru próbek pyłów zawieszonych ich ekstrakcji i określenia zawartości WWA i nitropochodnych WWA w otrzymanych ekstraktach.

Uzyskane ilości pyłów zawieszonych na wszystkich badanych stanowiskach przekraczały ilości oznaczane przez Wojewódzki Inspektorat Ochrony Środowiska i Wojewódzką Stację Sanitarno-Epidemiologiczną w innych punktach Wrocławia [170]. Stężenia frakcji PM₁₀ pyłu zawieszonego we Wrocławiu były duże i wykazywały zmienność sezonową. W próbkach pobranych w okresie zimowym stwierdzono ok. 2-krotnie więcej pyłów w porównaniu do próbek pobieranych w okresie letnim, z wyjątkiem próbek pobranych na Starym Mieście. W przypadku tego stanowiska ilości pyłów pobrane zimą były niewiele większe od pobranych latem. Stężenia pyłów mieściły się w granicach od 38,33 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (nr 2) do 138,93 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (nr 3). W próbkach pobranych zimą wartości te wynosiły od 57,8 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Stare Miasto) do 138,9 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (nr 3), w próbkach pobranych latem od 38,33 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (nr 2) do 57,17 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (nr 1), a w ekstrakcie wiosennym 46,99 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (nr 5). Dopuszczalne wartości stężeń dla okresu 24-godzinnego wynoszą w Polsce 125 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, w Unii Europejskiej 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, a według US EPA 150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ [98, 178, 213]. Podobne ilości pyłów podają inni autorzy. Otrzymana ilość pyłu frakcji PM₁₀ była zbliżona do wartości zmierzonych w okresach wiosenno-letnich i jesienno-zimowych w różnych miastach europejskich (Czechy, Włochy, Belgia, Polska) [16, 20, 26, 30, 32, 50, 60, 92, 141]. Z kolei uzyskane ilości substancji smołowych mieściły się w granicach od 7,56 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Stare Miasto, lato) do 145,15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (nr 3). Stwierdzone sezonowe różnice pomiędzy zawartością pyłów i ekstraktów smołowych pokrywają się także z doniesieniami literaturowymi. Różnice te wynikają przede wszystkim ze zwiększonej emisji pyłów w okresie zimowym na terenie aglomeracji miejskich, pochodzących z procesów spalania na cele grzewcze. Także ważnym czynnikiem decydującym o poziomie mutagenności pyłów jest temperatura. Stwierdzono, iż mutagenność jest odwrotnie powiązana z temperaturą otoczenia i osiąga maksymalne wartości w zimowych warunkach [37, 179]. Jest to związane ze zwiększoną inwersją atmosferyczną, która utrzymuje zanieczyszczenia blisko powierzchni ziemi, co powoduje zwiększenie osadzania się substancji mutagennych na cząstkach pyłu w miesiącach zimowych. W okresie zimowym dochodzi także do zmian w procesach chemicznych zachodzących w atmosferze spowodowanych zmianami w ilości ozonu i NO_x [11, 37, 45, 98, 134]. Wykazano, że w miarę wzrostu zawartości NO₂ w powietrzu, zwiększa się zawartość nitrowych pochodnych WWA, uznawanych za kancerogeny [147].

W pobranych próbkach zbadano poziomy stężeń, najczęściej występujących w powietrzu atmosferycznym, dwunastu WWA i ośmiu nitrowych pochodnych WWA. Aktywność rakotwórczą wykazują szczególnie węglowodory poliaromatyczne, zawierające od 3 do 6 skondensowanych pierścieni, zaadsorbowane na cząstkach pyłu. Z kolei lotne WWA, takie jak: antracen, fenantren, fluoren, fluoranten czy też piren są również obecne w powietrzu w fazie gazowej [193]. O wysokim stopniu toksyczności i kancerogenności WWA świadczy fakt, że dopuszczalne stężenia poszczególnych związków w powietrzu atmosferycznym wyrażane są w ng/m^3 oraz to, iż WHO nie ustanowiło dla nich wartości sumarycznego stężenia zalecanego w powietrzu atmosferycznym [98]. Nitrowe pochodne WWA również wykazują działanie mutagenne i rakotwórcze. Niektóre nitroWWA mogą tworzyć się podczas procesów spalania. Są one obecne między innymi w ekstraktach z cząstek spalin Diesla (np. nitrofluoren, nitroantracen, nitrofluoranten, nitrobenzo[a]piren). Jednak większość z nich powstaje w atmosferze w wyniku reakcji WWA w fazie gazowej. Transformacja WWA w nitroWWA jest reakcją nieodwracalną. WWA znajdujące się w fazie gazowej reagują z występującymi w powietrzu hydroksylowymi i azotanowymi rodnikami. W ten sposób powstaje wiele różnorodnych związków pochodnych, między innymi nitroWWA. Mimo iż nitroWWA występują w mniejszych stężeniach w porównaniu do niepodstawionych węglowodorów aromatycznych, to cechuje je duża trwałość w fazie stałej i większa mutagenność ($2 \cdot 10^5$ razy) oraz kancerogenność (10 razy), niektórych z nich, w porównaniu z WWA. Nitrowe pochodne WWA powinny więc być uwzględniane podczas dokonywania oceny ryzyka związanego z zanieczyszczeniami powietrza. Jednak małe ich stężenia w tym środowisku nastroczają problemy analityczne [7, 9, 76, 79, 129, 173, 219].

Udział poszczególnych WWA i ich nitrowych pochodnych zależał zarówno od miejsca, jak i od sezonu poboru próbki. Suma wykrytych w ekstraktach WWA wahała się w zakresie od $2,342 \text{ ng/m}^3$ (nr 1) do $44,192 \text{ ng/m}^3$ (nr 3). Z kolei suma nitrowych pochodnych w granicach od $0,29 \text{ ng/m}^3$ (nr 2) do $7,05 \text{ ng/m}^3$ (nr 3). Stwierdzono wyraźną sezonową zmienność stężeń badanych związków. Największe stężenia WWA i ich nitrowych pochodnych odnotowano w okresie zimowym (sezon grzewczy). Przyrost ten był szczególnie wysoki na obrzeżu miasta (ul. Strachocińska) i w obrębie Starego Miasta. Mogłoby to świadczyć o większym zużyciu węgla kamiennego lub drewna do celów grzewczych w paleniskach domowych. **Zarówno sumaryczna zawartość WWA w badanych próbkach, jak i też ich profil był zgodny z doniesieniami literaturowymi dotyczącymi innych miast europejskich** [16, 20, 26, 49, 193]. Ekstrakty pyłowych zanieczyszczeń powietrza charakteryzowały się bowiem dużym procentowym udziałem WWA o małym ciężarze cząsteczkowym (fenantren, antracen, fluoranten, piren). Z kolei stężenie cięższych WWA, zawierających od 5 do 6 pierścieni aromatycznych, było dużo mniejsze. Wśród obecnych w próbkach WWA były trzy (benzo[a]antracen, benzo[a]piren, dibenzo[a,h]antracen) klasyfikowane przez IARC do grupy 2A (prawdopodobnie rakotwórcze dla ludzi)

oraz trzy (beno[b]fluoranten, benzo[k]fluoranten], indeno[1,2,3-c,d]piren) zaklasyfikowane do grupy 2B (przypuszczalnie rakotwórcze dla ludzi).

Na wszystkich badanych stanowiskach stwierdzono występowanie dużych stężeń benzo(a)pirenu (10–22% sumy WWA), który należy do najbardziej mutagennych WWA. Dla tego związku wartość względna współczynnika kancerogenności (k) została przyjęta za 1 [150]. W wielu pracach B[a]P traktowany jest jako związek wskaźnikowy narażenia na WWA, ze względu na jego silne działanie kancerogenne i dużą korelację ze stężeniem innych WWA obecnych w ekstraktach zanieczyszczeń powietrza [49]. Stwierdzone średnie ilości benzo[a]pirenu, w zależności od pory roku i stanowiska, wahały się w granicach od 6,14 ng/m³ (7,98–2,65) w zimie do 0,57 ng/m³ (0,765–0,438) w lecie. Natomiast wiosną oznaczono jego zawartość na poziomie 1,87 ng/m³. Wartość odniesienia dla B[a]P dla okresu 1 godziny wynosi w Polsce 12 ng/m³, dla doby 5 ng/m³, natomiast dla roku kalendarzowego 1 ng/m³ [98]. Stężenia B[a]P otrzymane w badaniach mieściły się w górnych granicach stężeń uzyskiwanych w miastach Europejskich [49]. Podobne jego ilości oznaczano w miastach czeskich [16, 30] i belgijskich [20]. Duże stężenia tego węglowodoru badacze zwykle odnotowują w okresach zimowych. Większe stężenia tego węglowodoru, rzędu kilkudziesięciu ng/m³, odnotowywano w Polsce na Górnym Śląsku [141, 193]. W próbach obecne były także, w mniejszych stężeniach, odznaczający się większą siłą działania kancerogennego dibenzo[a,h]antracen ($k = 5$) oraz mniejszą benzo[g,h,i]perylen ($k = 0,01$). Ten ostatni uznawany jest za wskaźnik narażenia na węglowodory aromatyczne emitowane z silników wysokoprężnych [118].

W badanych ekstraktach pyłów suma stężeń nitrowych pochodnych WWA zawierała się w granicach od 7,05 ng/m³ (nr 3) do 0,29 ng/m³ (nr 2). Najbardziej bogaty profil tych związków uzyskano w próbkach pobranych zimą i wiosną. Natomiast w próbce 2, pobranej latem na pl. Grunwaldzkim, stwierdzono występowanie tylko jednej nitrowej pochodnej WWA-2-nitrofluorenu. **W ekstraktach nie stwierdzono występowania badanych dinitropochodnych WWA w granicach ich oznaczalności. Stwierdzono natomiast występowanie mononitropochodnych WWA, wśród których obecne były należące do grupy 2B 2-nitrofluoren i 1-nitopiren** [129]. 2-nitrofluoren występował we wszystkich badanych próbkach, natomiast obecność 1-nitopirenu stwierdzono tylko w próbkach pobranych zimą i wiosną. W ekstraktach zimowych i wiosennych stwierdzono także obecność 3-nitrofluorantenu. 1-nitopiren i 3-nitrofluoranten są charakterystycznymi produktami spalania paliwa w silniku Diesla. Związki te nie są obserwowane w żadnych innych reakcjach zachodzących w fazie gazowej [219]. Większość badaczy koncentruje się na badaniu obecności nitrowych WWA w spalinach silników wysokoprężnych. Niewiele jest doniesień literaturowych dotyczących analizy zawartości nitrowych pochodnych WWA w powietrzu atmosferycznym. Badania prowadzono, między innymi, w Birmingham (Wielka Brytania), w Damaszku (Syria), w Kanazawa (Japonia), w Sosnowcu (Polska) i w innych rejonach Górnego Śląska [73, 129, 203, 219]. Stężenia 1-nitopirenu otrzymane w powietrzu Wrocławia były zbliżone do tych oznaczonych w Birmingham

i Damaszk (0,019 ng/m³–0,387 ng/m³), oraz były mniejsze od otrzymanych w Sosnowcu (0,68 ng/m³–1,81 ng/m³) [129, 219].

W tabeli 23 przedstawiono współczynniki korelacji pomiędzy uzyskanymi w badaniach masami pyłów i masami substancji smołowych a stężeniami WWA i nitroWWA. Do obliczeń wybrano sumę stężeń WWA i nitroWWA uzyskanych na poszczególnych stanowiskach oraz stężenia wybranych węglowodorów i ich nitrowych pochodnych. Przy wyborze kierowano się siłą działania mutagennego węglowodorów, ich charakterem wskaźnikowym i obecnością w badanych próbkach. **Stwierdzono większą zależność pomiędzy stężeniem pyłu zawieszonego a stężeniami WWA i nitroWWA, w porównaniu do zależności pomiędzy tymi parametrami a uzyskanymi masami substancji smołowych.** Współczynniki korelacji w tych analizach były duże i zawierały się pomiędzy 0,464 (B[g,h,i]P) a 0,857 (suma nitroWWA). Z kolei z uzyskaną masą substancji smołowych w próbkach najlepiej korelowała zawartość B[a]A ($r = 0,464$), a najgorzej zawartość B[g,h,i]P ($r = 0,0358$).

Tabela 23. Korelacje pomiędzy stężeniem pyłów [$\mu\text{g}/\text{m}^3$] i substancji smołowych [$\mu\text{g}/\text{m}^3$] w badanych próbkach a zawartością WWA [ng/m^3] i nitroWWA [ng/m^3]

Badany parametr	Masa pyłów	Masa substancji smołowych
	Współczynnik korelacji porządku rang Spearmana (poziom p)	
B[a]P	0,786 (0,036)	0,250 (0,589)
B[a]A	0,750 (0,052)	0,464 (0,294)
D[a,h]A	0,750 (0,052)	0,250 (0,589)
B[g,h,i]P	0,464 (0,294)	0,0358 (0,939)
2-nitrofluoren	0,679 (0,094)	0,214 (0,645)
Suma WWA	0,750 (0,052)	0,464 (0,294)
Suma nitroWWA	0,857 (0,014)	0,214 (0,645)

Należy jednak zdać sobie sprawę z tego, że badane ekstrakty pyłowych zanieczyszczeń powietrza mogą być mieszaniną ponad 500 związków chemicznych. Takie złożone mieszaniny substancji podlegają różnym interakcją, co może prowadzić do zwiększenia lub zmniejszenia ich aktywności mutagennej. Wypadkowa aktywność jest bowiem efektem synergizmu i antagonizmu poszczególnych substancji występujących w mieszaninie. **Ze względu na złożony skład chemiczny pyłowych zanieczyszczeń powietrza wykrycie i identyfikacja poszczególnych związków, a co za tym idzie określenie substancji odpowiedzialnych za mutagenność ekstraktów próbek powietrza jest niezwykle trudna.** Wobec tego bardziej przydatna od chemicznej analizy poszczególnych związków jest ocena genotoksyczności wszystkich zanieczyszczeń obecnych w badanych próbkach [140, 147, 193].

Badania mutagenności organicznych ekstraktów pyłowych zanieczyszczeń powietrza testem *Salmonella* podzielono na dwie części. W pierwszej części przeprowadzono 8 rodzajów testów różniących się protokołem badawczym na dwóch próbkach pobranych w lecie i w zimie na jednym stanowisku (Stare Miasto). W badaniach tych stosowano cztery szczepy testowe TA98, TA100, YG1041 i YG1042. Szczep TA98

jest powszechnie używany do badania mutagenności związków zaadsorbowanych na cząstkach pyłów. Wykrywa mutageny typu zmiany fazy odczytu. Z kolei szczep TA100 ulega rewersji powrotnej pod wpływem mutagenów typu podstawienia pary zasad. Oprócz szczepów standardowych zastosowano ich pochodne, YG1041 (TA98) i YG1042 (TA100), wrażliwe na działanie nitrowych związków aromatycznych dzięki wyższemu, w porównaniu z fizjologicznym, poziomom dwóch enzymów nitroreduktazy i O-acetylotransferazy. Testy przeprowadzano także z udziałem dwóch rodzajów frakcji mikrosomalnej: FA – indukowanej Aroclorem 1254 i FB – indukowanej fenobarbitem. Celem tego etapu było wytypowanie procedury, która zwiększyłaby czułość testu na obecne w powietrzu zanieczyszczenia i obniżyła koszty jego wykonania. Z kolei druga część badań miała na celu weryfikację wybranych procedur i szczepów testowych na dodatkowych pięciu próbkach pobranych w trzech innych punktach miasta. W tym etapie badań zastosowano również frakcję F0 – nie poddaną uprzedniej indukcji, zawierającej naturalny poziom enzymów mikrosomalnych.

Badania rozpoczęto od określenia optymalnego stężenia frakcji mikrosomalnych S9, które miały być stosowane w dalszych testach. Ekstrakty pyłów zawieszonych są złożoną mieszaniną związków chemicznych różniących się składem ilościowym i jakościowym. Z tego względu **zaproponowano sposób dobierania optymalnego stężenia S9 w S9-mix na podstawie jednego wytypowanego stężenia ekstraktu badanej próbki**. W tym celu przeprowadzono badania pilotowe [108] ekstraktów w obecności 4% (v/v) zawartości S9 w S9-mix. Wybrano takie stężenie ekstraktów zanieczyszczeń powietrza na płytkę, które dawało efekt mutageny, ale nie powodowało jeszcze efektów toksycznych. Następnie wykonano na tym stężeniu zanieczyszczeń test klasyczny i test w modyfikacji Kado, z zastosowaniem szerokiego spektrum stężeń badanej frakcji mikrosomalnej. W ten sposób wybrano do dalszych badań najbardziej optymalne stężenia frakcji FA i FB. Oryginalna metoda zaleca stosowanie 4% lub 10% stężenia S9 w S9-mix lub dobór stężenia frakcji mikrosomalnej wobec wybranego mutagenu diagnostycznego [131]. Niektóre laboratoria, w doborze stężenia frakcji, stosują najpierw małe stężenia S9, a w przypadku wyniku negatywnego powtarzają testy na dużym jego stężeniu lub przeprowadzają testy od razu na wysokim stężeniu frakcji [143]. W wyniku przeprowadzonych badań, tak jak się spodziewano, uzyskano różne optymalne stężenia frakcji konieczne do przeprowadzenia promutagenów w mutageny bezpośrednie. W przypadku szczepów serii YG wymagane było dużo mniejsze stężenie frakcji FA, zarówno w teście klasycznym, jak i w teście w modyfikacji Kado, w porównaniu do badań ze szczepami serii TA. W przypadku badań z frakcją FB w większości testów było podobnie. Maksymalne współczynniki *MR* uzyskiwano najczęściej w stężeniu frakcji wynoszącym 3% (szczepy serii YG) oraz 6% i 9% (szczepy serii TA). Stwierdzono także, dla badanych ekstraktów, konieczność wprowadzania do testów większych stężeń frakcji FB niż FA. Jednocześnie prowadzono badania zależności współczynnika *MR* od stężenia frakcji FA i FB dla mutagenów diagnostycznych. W badaniach zastosowano 2AF dla szczepów serii TA i dla szczepu YG1041 oraz 2AA dla szczepu YG1042 w stężeniu 0,125 µg/płytkę [65, 205,

206]. Wyznaczone optymalne stężenia frakcji FA dla próbki pobranej zimą i latem pokrywały się z optymalnym stężeniem wyznaczonym dla wybranych mutagenów diagnostycznych. Inaczej było w przypadku frakcji FB. **Wyniki te sugerują potrzebę każdorazowego doboru optymalnego stężenia frakcji wobec próbki środowiskowej, zwłaszcza w przypadku frakcji indukowanej fenobarbitem, a nie wobec mutagenu standardowego, jak zalecane jest to w procedurze klasycznej [131].** Za takim podejściem do zagadnienia przemawiają wyniki licznych prac prowadzonych na czystych związkach chemicznych pokazujące zróżnicowaną wrażliwość szczepów na poszczególne substancje mutagenne i ich stężenia [65, 99, 155].

Następnie przeprowadzono testy różniące się protokołem badawczym na szerokim zakresie stężeń zanieczyszczeń powietrza pobranych w okresie letnim i zimowym na Starym Mieście. W badaniach tych zwrócono uwagę na:

- przydatność frakcji mikrosomalnej indukowanej fenobarbitem (FB) w porównaniu do powszechnie stosowanej frakcji indukowanej Aroclorem 1254 (FA),
- określenie wpływu preinkubacji na wielkość odpowiedzi mutagennej ze strony szczepów testowych,
- ustalenie optymalnego składu mieszaniny reakcyjnej.

We wszystkich testach największe wartości współczynnika mutagenności (*MR*) i mutagenność (*M*) uzyskano dla próbki pobranej w okresie zimowym. Taką samą zmienność sezonową obserwuje się w innych krajach. Mutagenność pyłów zanieczyszczających powietrze wzrasta w sezonie grzewczym i zmniejsza się w lecie [30, 140, 222]. **Mutageny zawarte w ekstraktach pyłów zawieszonych wywoływały większą odpowiedź ze strony szczepów TA98 i YG1041, w porównaniu do szczepów TA100 i YG1042, co oznacza, że były to przede wszystkim związki wywołujące mutacje typu zmiany fazy odczytu.** W badanym zakresie stężeń ekstraktów zanieczyszczeń wprowadzanych na płytkę ($100 \text{ m}^3/\text{płytkę}$ – $0,195 \text{ m}^3/\text{płytkę}$) uzyskano efekt toksyczny na krzywej dawka–odpowiedź jedynie w przypadku szczepów serii YG. Taki przebieg krzywej w pełni ilustruje biologiczny efekt działania zanieczyszczeń obecnych w próbce w zależności od ich stężenia.

W testach wykonywanych zgodnie z procedurą klasyczną najmniejsze stężenie ekstraktów zanieczyszczeń wywołujące efekt mutagenny uzyskano w badaniach z udziałem szczepu YG1041. Pochodziło ono dla próbki pobranej zimą z $0,097 \text{ m}^3$ powietrza we wszystkich testach (–F, FA, FB) oraz z $0,195 \text{ m}^3$ (–F), $1,56 \text{ m}^3$ (FA) i $0,39 \text{ m}^3$ (FB) w przypadku próbki pobranej latem. We wszystkich testach ze szczepem TA98 stężenie progowe dla zanieczyszczeń obecnych w próbce zimowej wynosiło $1,56 \text{ m}^3$, natomiast w próbce letniej $12,5 \text{ m}^3$. Największe stężenie ekstraktu powietrza działające mutagennie uzyskano w badaniach ze szczepem TA100 (w zimie $3,125 \text{ m}^3$ – 25 m^3 , w lecie 50 m^3 – 100 m^3). W przypadku badań próbki pobranej zimą ze szczepami serii TA największe współczynniki *MR* uzyskano w badaniach bez frakcji (–F). Z kolei dla próbki pobranej latem w badaniach w obecności frakcji mikrosomalnych. **Można więc stwierdzić, że ekstrakt zimowy zawierał większą liczbę mutagenów bezpośrednich typu zmiany fazy odczytu i podstawienia pary**

zasad, a ekstrakt letni mutagenów pośrednich (np. niepodstawionych WWA). W piśmiennictwie możemy znaleźć przykłady podobnych wyników, w których aktywność mutagenna pyłów pobranych w lecie, badana w obecności tych szczepów, wzrastała po dodaniu mieszaniny S9 [16, 140, 144]. Istnieją jednak takie badania, w których aktywacja za pomocą enzymów mikrosomalnych powodowała wzrost odpowiedzi mutagennej w stosunku do próbek pobranych zimą oraz zmniejszenie mutagenności ekstraktów próbek pobranych w lecie [30, 49, 140]. W przypadku szczepów serii YG, dla których otrzymano pełny obraz biologicznego działania zanieczyszczeń oraz przesunięcie maksymalnych wartości współczynników *MR* i progów wykrywalności substancji mutagennych w kierunku mniejszych stężeń badanych ekstraktów otrzymano inne wyniki. Dla szczepu YG1041, dla mniejszych stężeń ekstraktu zimowego, ujawniło się działanie mutagenów pośrednich wykrywanych w obecności frakcji FB, natomiast w testach ze szczepem YG1042 współczynniki *MR* zarówno w obecności frakcji FA, jak i FB były zdecydowanie większe w porównaniu do współczynników *MR* uzyskanych bez frakcji. W testach z udziałem próbki pobranej latem, badanej szczepem YG1041, również uzyskano duże współczynniki *MR* w badaniach z frakcją FB, a z udziałem szczepu YG1042 zdecydowanie większe wartości *MR* uzyskano w badaniach bez frakcji (–F). **Ekstrakt zimowy zawierał więc dużą liczbę mutagenów pośrednich, o charakterze nitrowych związków aromatycznych, typu zmiany fazy odczytu i podstawienia pary zasad, natomiast ekstrakt letni duże ilości nitrowych pochodnych WWA oddziałujących zarówno bezpośrednio, jak i pośrednio z materiałem genetycznym.** Podobne spostrzeżenia można znaleźć w innych pracach, w których stwierdzono dodatni wpływ aktywacji metabolicznej w próbkach pobranych w zimie, podczas gdy w próbkach letnich, dodanie S9 nie powodowało zwiększenia efektu mutagennego pyłów zawieszonych [43, 141, 222].

Wyniki badań przedstawiono również w postaci mutagenności (*M*), czyli liczby rewertantów indukowanych przez 1 m³ badanego powietrza. Pewna część badaczy stosuje ten sposób prezentacji wyników, który zakłada, że efekt mutageny wyrażany jako liczba kolonii rewertantów, dla małych dawek badanych substancji lub ich mieszanin, jest w przybliżeniu liniowy. W przypadku takiej prezentacji wyników szczepy serii TA dawały większą odpowiedź mutagenną w obecności frakcji FA i FB, zarówno dla próbki pobranej zimą, jak i latem, w porównaniu do badań bez aktywacji metabolicznej. Takie same wyniki otrzymano dla ekstraktu próbki pobranej zimą w obecności szczepów serii YG. Natomiast zanieczyszczenia pobrane latem odznaczały się większą aktywnością mutagenną w badaniach z frakcją FB i bez frakcji w obecności szczepu YG1041 oraz bardzo zbliżoną mutagennością we wszystkich badaniach ze szczepem YG1042 (tab. 24). Niektórzy badacze prezentują wyniki testu *Salmonella* w postaci mutagenności, porównując je z wynikami uzyskanymi przez innych autorów. Najczęściej dotyczą one badań prowadzonych z udziałem szczepu TA98, rzadziej TA100 i YG1041. W pracy przeglądowej Claxton i inni [37] zebrano wyniki badań prowadzonych na różnych kontynentach z zastosowaniem

szczepu TA98. Największą liczbę rewertantów otrzymano w badaniach prowadzonych w Ameryce Łacińskiej (1–779 rew./m³) i w Azji (5–640 rew./m³). Najmniejszą liczbę rewertantów wykryto na terenie USA – od 5 do 200 rew./m³ powietrza. W badaniach na terenie Europy, w Czechach, zanotowano od 2 do 107 rew./m³ w zimie i od 2 do 23 rew./m³ w lecie. Natomiast w Niemczech na terenach gęsto zaludnionych, o dużym natężeniu ruchu i uprzemysłowieniu, zanotowano powyżej 100 rew./m³ powietrza [30]. W tabeli 24 przedstawiono wyniki uzyskane w niniejszej pracy i w niektórych miastach na świecie [16, 30, 49, 141]. W porównaniu do tych danych na terenie Wrocławia otrzymano większą liczbę rewertantów w 1 m³ powietrza. Jednak należy pamiętać, że przy takim sposobie analizy wyników należy wziąć pod uwagę region, w którym były prowadzone badania (warunki meteorologiczne i geograficzne), ich zakres i czas trwania. Nie bez znaczenia jest także sposób pobierania próbek i przygotowania jej do testu, sama metoda testu oraz zakres mutacji spontanicznej charakterystycznej dla danego szczepu oraz wrażliwość stosowanego szczepu na badane zanieczyszczenia [37, 141]. Autorzy stosują także różne metody obliczania mutagenności [14, 113, 130]. Biorąc to wszystko pod uwagę, **należy tak zaplanować badania pyłowych zanieczyszczeń powietrza testem *Salmonella*, aby możliwe było przedstawienie pełnego biologicznego efektu ich działania w zależności od stężenia z podaniem najmniejszego ich stężenia wywołującego efekt mutagenny, a nie jedynie liczby rewertantów indukowanych przez 1 m³ powietrza.**

Zazwyczaj każda substancja ulega w organizmie różnym przemianom, w wyniku których tworzy się kilka, a nawet kilkanaście metabolitów. Przemiany te mogą prowadzić do detoksykacji, czyli do pozbawienia właściwości toksycznych, lub też do aktywacji, w wyniku której dochodzi do powstania aktywnych metabolitów mogących reagować z materiałem genetycznym, powodując mutacje. Uszkodzenia te, jeśli nie zostaną naprawione, mogą prowadzić do rozwoju chorób nowotworowych [187]. Związki chemiczne występujące w powietrzu atmosferycznym mają zarówno naturę mutagenów bezpośrednich (np. nitroWWA czy oksyWWA), jak i pośrednich (np. WWA), które wymagają uprzedniej aktywacji metabolicznej. Aby stworzyć w teście warunki zbliżone do panujących w organizmie ssaka, co umożliwia przeniesienie wyników uzyskanych w teście bakteryjnym na organizm ludzki, wprowadza się do niego postmitochondrialny supernatant (określany jako frakcja S9) uzyskiwany z wątroby szczura. W składzie S9-mix, oprócz S9, znajduje się glukozo-6-fosforan, sole potasu i magnezu i NADP. Ze względu na duży koszt NADP postanowiono sprawdzić, jaka będzie aktywność frakcji mikrosomalnej w przekształcaniu substancji promutagennych w aktywne mutageny bez dodatkowego wprowadzania NADP do frakcji S9-mix [66, 67]. W pracy zwrócono również uwagę na rodzaj induktora enzymów wątrobowych. W celu pozyskania odpowiednio aktywnej frakcji mikrosomalnej szczurom podaje się związki chemiczne, które zwiększają poziom enzymów odpowiedzialnych za aktywację metaboliczną w wątrobie. Najczęściej stosowanym induktorem enzymów wątrobowych jest Aroclor 1254 (będący mieszaniną polichlorowanych bifenili), który jest silną i trudno rozkładalną trucizną środowiskową.

Związkiem o porównywalnej aktywności indukcyjnej, zwiększającym aktywność monooksygenaz zależnych od cytochromu P-450, jest znacznie mniej toksyczny fenobarbital. Frakcja S-9 uzyskana po indukcji tym związkiem była stosowana jedynie do aktywacji czystych związków promutagenów, a nie złożonych mieszanin prób środowiskowych [155]. Ponadto, podczas aktywacji tymi związkami enzymów mikrosomalnych, prowadzącej do zwiększenia ich ilości, dochodzi do uaktywnienia różnych form cytochromu P-450, a tym samym uzyskania zróżnicowanego poziomu poszczególnych enzymów we frakcji FA i FB [187].

Brak dodatkowej puli NADP we frakcji mikrosomalnej spowodował wyraźne zmniejszenie współczynnika *MR*, zwłaszcza w przypadku szczepu YG1041. Nie wpłynęło to jednak na wygląd krzywych zależności dawka–odpowiedź. W badaniach ze szczepem TA98 stężenia progowe, wykrywające obecność zanieczyszczeń mutagennych w ekstraktach pobranych w zimie i w lecie, były takie same jak w teście klasycznym. W badaniach z tym szczepem większe współczynniki *MR* uzyskano dla frakcji indukowanej Aroclorem 1254 (FA). W przypadku testów przeprowadzanych z pozostałymi szczepami lepsza okazała się frakcja indukowana fenobarbitem (FB). W obecności szczepu TA100 progi wykrywalności w badaniach z frakcją FB przesunęły się w kierunku mniejszych stężeń ekstraktów wprowadzanych na płytkę. Jedynie w badaniach prowadzonych ze szczepami serii YG zaobserwowano zwiększenie najmniejszych stężeń powietrza wywołujących efekt mutageny, choć nadal był on wykrywalny. **Można więc prowadzić test *Salmonella* z zastosowaniem szczepów TA98 i TA100 bez udziału kosztownego NADP w składzie S9-mix. Z kolei szczepy serii YG, bardziej wrażliwe na obecne w ekstraktach powietrza zanieczyszczenia oraz mające duży poziom mutacji spontanicznych, wymagają większego stężenia NADP potrzebnego do przekształcania dużej ilości zanieczyszczeń w mutageny bezpośrednio. Jednak z ich udziałem można również z powodzeniem wykrywać substancje mutagenne testem klasycznym bez wprowadzania dodatkowej puli NADP.**

Przypuszczano, że znaczne zwiększenie ilości bakterii w mieszaninie inkubacyjnej spowoduje zwiększenie aktywności enzymów bakteryjnych, co umożliwi przekształcenie promutagenów w aktywne mutageny, bez dodatkowego wprowadzania NADP. W teście klasycznym bez dodatku NADP, z 10-krotnie zwiększoną ilością bakterii, zauważono, że zwiększenie ilości bakterii bez dodatku tego koenzymu, wbrew oczekiwaniom, nie powoduje poprawy czułości testów dla wszystkich badanych szczepów. Zauważono wprawdzie zwiększenie współczynnika *MR*, szczególnie widoczne w przypadku próbki pobranej zimą, w porównaniu do testu *Salmonella* bez dodatku NADP. Mimo to w większości badań stężenie progowe zanieczyszczeń powietrza wywołujące efekt mutageny przesunęło się w kierunku wartości większych. Jedynie w przypadku szczepu YG1041 zaobserwowano wyraźne zwiększenie progu wykrywalności zarówno dla ekstraktu zimowego, jak i letniego oraz dla obu frakcji mikrosomalnych. Takie same spostrzeżenia uczyniono w przypadku badań ze szcze-

pem YG1042 i próbką pobraną zimą. **Należy więc polecić prowadzenie testu *Salmonella* z 10-krotnie zwiększoną ilością bakterii YG1041 bez dodatku NADP.**

W pracy starano się także odpowiedzieć na pytanie czy wprowadzenie do składu mieszaniny reakcyjnej klasycznej procedury testu 10-krotnie większej ilości bakterii wpłynie na poprawę jego czułości? Dla szczepu TA98 zauważono zmniejszenie się stężenia progowego zanieczyszczeń w badaniach bez frakcji (mutageny bezpośrednie), z jednoczesnym zmniejszeniem czułości w wykrywaniu mutagenów pośrednich dla ekstraktu zimowego. Z kolei dla ekstraktu letniego czułość testu poprawiła się w badaniach z frakcjami mikrosomalnymi (mutageny pośrednie). Obserwowano przy tym, wyraźne zwiększenie się współczynnika *MR* w tych badaniach, gdzie czułość testu była lepsza, oraz zmniejszenie współczynnika *MR* w pozostałych testach. Z kolei obecność większej ilości bakterii YG1041 w teście powodowała wyraźny zmniejszenie współczynnika *MR* oraz pogorszenie czułości testu we wszystkich badaniach. Obecność większej ilości bakterii nie wpływała w znaczący sposób na otrzymane wyniki w porównaniu do testu klasycznego w badaniach ze szczepami TA100 i YG1042. **Wynika z tego, iż obecność w badanych ekstraktach większej ilości zanieczyszczeń o charakterze mutagenów pośrednich, na które badany szczep jest wrażliwy, powoduje zmniejszenie czułości testu klasycznego ze zwiększoną ilością bakterii. Niewystarczające było więc w tym teście stężenie enzymów metabolizujących w stosunku do ilości substancji mutagennych przypadających na DNA pojedynczej komórki bakteryjnej. Wpłynęło to na zmniejszenie odpowiedzi, mimo że w mieszaninie inkubacyjnej znajdowała się 10-krotnie większa pula bakterii. Test ten można jedynie polecić do wykrywania mutagenów bezpośrednich szczepem TA98.**

Następnym zagadnieniem, na które zwrócono uwagę w niniejszej pracy było badanie wpływu preinkubacji na wielkość odpowiedzi mutagennej związanej z obecnością zanieczyszczeń pyłowych w badanych ekstraktach. **Badania te wykazały, iż optymalny czas preinkubacji jest różny w zależności od rodzaju szczepu, temperatury preinkubacji i rodzaju frakcji mikrosomalnej. Każdorazowo, przed przystąpieniem do badań, należy dobierać odpowiedni czas preinkubacji dla określonej temperatury oraz takie stężenie ekstraktu, które w badaniach prowadzonych testem klasycznym *Salmonella* dawało dwukrotnie większą liczbę rewertantów w stosunku do liczby rewertantów otrzymanych w drodze mutacji spontanicznej.** Spostrzeżenia te pokrywają się z doniesieniami literaturowymi, w których autorzy, wykonując test preinkubacyjny, stosują różny czas preinkubacji w zależności od temperatury i rodzaju badanej próbki, którymi najczęściej są pojedyncze związki chemiczne [65]. Zwykle stosuje się dłuższy czas preinkubacji w niższej temperaturze. Potwierdziły to również przedstawione w pracy wyniki badań. Pozwoliły one dobrać optymalny czas preinkubacji zastosowany w dalszej części badań. Dla szczepu TA98 i YG1041 czas ten wynosił 20 minut.

Klasyczna procedura testu *Salmonella* wymaga pobierania dużej ilości materiału badawczego. Dlatego też opracowano protokoły, które wymagają mniejszej ilości ba-

danej próbki niż test klasyczny. W 1986 Kado i inni [101] opublikowali procedurę testu w mikrozawieszynie, stanowiącą modyfikację metody płynnej preinkubacji. Procedura ta wykorzystuje 20 razy mniejszą objętość próbki przy 10-krotnie zwiększonej ilości bakterii i 5 razy mniejszej ilości enzymów metabolizujących. Dodatkowo testowe szczepy bakterii ekspozowane są na badane związki chemiczne w warunkach hodowli wstrząsanej, w małej objętości przez 90 minut w temperaturze 37 °C. Analiza ekstraktów pyłów przeprowadzona testem Kado, w zakresie stężeń od 0,0039 m³/płytkę do 5 m³/płytkę, wykazała iż test ten w różnym stopniu zmieniał progi wykrywalności substancji mutagennych obecnych w badanych ekstraktach w zależności od zastosowanych szczepów testowych. W przypadku szczepu TA98 uzyskano bardzo duże obniżenie progów wykrywalności zanieczyszczeń mutagennych w porównaniu do testu klasycznego. Większy współczynnik *MR* uzyskano w badaniach z udziałem frakcji FA niż FB (w teście klasycznym było odwrotnie). W badanych większych stężeniach ekstraktów ujawniło się działanie mutagenów pośrednich, a w stężeniach mniejszych bezpośrednich. Najgorsze wyniki uzyskano w badaniach ze szczepem TA100. Wynik dodatni testu uzyskano tylko w badaniach z frakcjami mikrosomalnymi FA i FB w przypadku próbki pobranej zimą. Jest to zgodne z doniesieniami innych autorów [37], którzy zauważyli, że szczep TA100 daje wyniki negatywne w tym teście w badaniach bez frakcji, a szczep TA98 wykazuje mutagenność zarówno w obecności, jak i w nieobecności frakcji S9. W przypadku szczepów serii YG otrzymano, tak jak w teście klasycznym, pełny obraz biologicznego działania pyłowych zanieczyszczeń powietrza oraz duży współczynnik *MR*. Użytkano również wyraźne zmniejszenie stężenia zanieczyszczeń wywołujących efekt mutagenny, wyjątkiem był test przeprowadzony bez udziału frakcji na ekstrakcie letnim, w obecności szczepu YG1042. Badania dotyczące porównania testu klasycznego i testu w modyfikacji Kado dla szczepów TA98 i YG1041 prowadzono w Czechach i w USA [30, 35]. W badaniach tych również stwierdzono dużą wrażliwość tych szczepów w obu testach.

Odpowiedź szczepów testowych na zawarte w próbkach powietrza zanieczyszczenia, zarówno w teście klasycznym, jak i w teście w modyfikacji Kado, jest zgodna z poglądem, że kluczową klasą czynników mutagennych w powietrzu atmosferycznym są nitropochodne WWA. Test w modyfikacji Kado jest więc godny polecenia, w badaniach ze szczepami TA98, YG1041 i YG1042, ponieważ do przeprowadzenia tego testu potrzebna jest 1/20 objętości badanej próbki i 1/5 objętości frakcji w porównaniu do testu klasycznego. Tak wyraźne zmniejszenie zużycia S9-mix wpływa na znaczne obniżenie kosztów wykonania testu z powodu zużycia mniejszej ilości kosztownego NADP, jak również wykorzystania mniejszej objętości homogenatu pozyskiwanego z wątroby szczura. Tym bardziej że w wielu pracach dotyczących procedury preinkubacyjnej wykazano, że dodatek NADP nie wpływa znacząco na wynik testu [131, 134]. Spostrzeżenia te zostały potwierdzone także w badaniach w teście klasycznym bez NADP i w teście klasycznym bez NADP z 10-krotnie większą ilością bakterii.

W niniejszej pracy zaproponowano procedurę testu klasycznego z preinkubacją w formie Mini jako kompilację testu klasycznego z testem Kado. Modyfikację tę wprowadzono celem zmniejszenia ilości próbki oraz frakcji mikrosomalnej stosowanej w teście. Mieszanina reakcyjna zawierała wszystkie składniki w takim samym składzie i w takich samych proporcjach jak w teście klasycznym, natomiast różniła się od niego końcową objętością, która wynosiła $0,205 \text{ cm}^3$ jak w modyfikacji Kado. Wprowadzono także 90-minutową preinkubację w 37°C . Próbkę pobraną na Starym Mieście badano więc w zakresie stężeń zanieczyszczeń pochodzących z zakresu $30 \text{ m}^3\text{--}0,014 \text{ m}^3$ powietrza. W metodzie tej uzyskano zdecydowanie mniejsze współczynniki *MR* niż w metodzie klasycznej i Kado, najprawdopodobniej z powodu ujawnienia toksycznego efektu działania składników ekstraktów zanieczyszczeń w czasie preinkubacji. W badaniach przeprowadzonych z udziałem szczepu TA98, w obecności próbek pobranych zimą i latem, uzyskano bardzo zbliżone wyniki z testem klasycznym, choć progi wykrywalności substancji mutagennych pogorszyły się w poszczególnych testach, z wyjątkiem badań z frakcją FA. Test ten okazał się bardzo przydatny w badaniach ze szczepem TA100. Uzyskano znaczące zmniejszenie wykrywalności mutagenów bezpośrednich, obecnych w ekstraktach zimowych i letnich, oraz mutagenów pośrednich, z wyjątkiem badań ekstraktu letniego w obecności frakcji FA. W badaniach prowadzonych ze szczepem YG1041, podobnie jak dla szczepu TA98, uzyskano pogorszenie wykrywalności zanieczyszczeń mutagennych. Najgorsze wyniki uzyskano w obecności szczepu YG1042. W przypadku tego szczepu wynik dodatni otrzymano jedynie dla ekstraktu letniego badanego w obecności FB. **Test z preinkubacją w formie Mini można więc stosować z powodzeniem w obecności szczepu TA100 oraz, w mniejszym stopniu, w obecności szczepów TA98 i YG1041.**

W tabeli 25 umieszczono współczynniki korelacji obliczone pomiędzy współczynnikami *MR* uzyskanymi dla frakcji mikrosomalnych FA i FB zastosowanych we wszystkich rodzajach testów. W większości przeprowadzonych testów współczynniki *MR* uzyskane dla frakcji FB dobrze korelowały z współczynnikami *MR* uzyskanymi dla frakcji FA ($r = 0,549\text{--}1,0$; w większości przypadków $r = 0,828\text{--}1,0$). Mniejsze współczynniki korelacji, około $0,332\text{--}0,557$, zaobserwowano w przypadku badań w obecności szczepów TA100 i YG1042. **Przeprowadzone badania mogą być podstawą do stwierdzenia, że frakcja mikrosomalna aktywowana fenobarbitem z dużym powodzeniem może być stosowana w badaniach nad mutagennością zanieczyszczeń zaadsorbowanych na pyłach zawieszonych w powietrzu aglomeracji miejskiej.** Zastąpienie Arocloru 1254, jako aktywatora enzymów wątrobowych, fenobarbitem niesie za sobą wiele korzyści. Aroclor jest bardzo stabilnym, toksycznym i trudno biodegradowalnym preparatem, który w śladowych ilościach powoduje mutacje nowotworowe, a tym samym stanowi duże zagrożenie dla osób zaangażowanych w pracę w laboratorium. Dodatkowo jest to preparat bardzo drogi i z racji swojej dużej lepkości niewygodny w pracy. W postaci iniekcji podawany jest szczurom w oleju kukurydzianym. Fenobarbital jest preparatem bezpieczniejszym, wielokrotnie tań-

szym, łatwo rozpuszczalnym w wodzie i z tego powodu może być podawany szczurom w postaci iniekcji w 0,9% roztworze NaCl lub, czasami, wraz z wodą do picia.

Tabela 25. Korelacje pomiędzy współczynnikami *MR* uzyskanymi dla frakcji FA i FB (pierwsza część badań)

Pora roku	Rodzaj testu	TA98	TA100	YG1041	YG1042
		FA x FB	FA x FB	FA x FB	FA x FB
		Współczynnik korelacji porządku rang Spearmana (poziom <i>p</i>)			
Zima	I	0,991 (0,000004)	0,991 (0,000004)	0,972 (0,000002)	0,983 (0,000002)
Lato	I	0,956 (0,000004)	0,965 (0,000004)	0,953 (0,000002)	0,950 (0,000002)
Zima	II	0,996 (0,000014)	1,0 (<0,05)	0,996 (0,000014)	0,988 (0,000004)
Lato	II	0,971 (0,000014)	0,385 (0,394)	0,971 (0,000014)	0,944 (0,000004)
Zima	III	0,989 (0,000008)	1,0 (<0,05)	0,988 (0,000008)	0,976 (0,000001)
Lato	III	0,963 (0,000008)	0,385 (0,394)	0,963 (0,000008)	0,938 (0,000006)
Zima	IV	0,899 (0,000068)	0,993 (0,00089)	0,925 (0,000017)	0,981 (0,000001)
Lato	IV	0,981 (0,000068)	0,828 (0,00089)	0,989 (0,000017)	0,961 (0,000001)
Zima	VII	1,0 (<0,05)	0,828 (0,0416)	1,0 (<0,05)	0,762 (0,028)
Lato	VII	1,0 (<0,05)	0,935 (0,0061)	1,0 (<0,05)	1,0 (<0,05)
Zima	VIII	0,888 (0,000117)	0,825 (0,000945)	0,909 (0,000042)	0,557 (0,06)
Lato	VIII	0,549 (0,064)	0,4205 (0,173)	0,935 (0,000008)	0,332 (0,29)

Wyniki uzyskane w pierwszej części pracy posłużyły do weryfikacji wybranych modyfikacji testu *Salmonella*. Na ich podstawie zdecydowano się prowadzić dalsze badania według testu klasycznego, testu preinkubacyjnego prowadzonego w temperaturze 37 °C i testu w modyfikacji zaproponowanej przez Kado. Testy przeprowadzano z dwoma szczepami testowymi TA98 i YG1041. Badania prowadzono, wprowadzając do wymienionych testów pięć dodatkowo pobranych próbek powietrza w trzech punktach miasta. Dwie próbki zostały pobrane w lecie, dwie w okresie zimowym i jedna na wiosnę. Próbką wiosenną została pobrana w miejscu o mniejszym natężeniu ruchu samochodowego w porównaniu do stanowisk, w których pobierano próbki latem i zimą, nie tylko w innej porze roku, ale też w odmiennych warunkach, czyli na dachu budynku, na wysokości drugiego piętra. W badaniach zastosowano dwa zakresy stężeń ekstraktów zanieczyszczeń powietrza na płytkę: od 50 m³ do

0,0245 m³ (dla testu klasycznego i z preinkubacją) oraz od 5 m³ do 0,0097 m³ (dla testu w modyfikacji Kado). W tym etapie pracy, oprócz frakcji mikrosomalnej indukowanej Aroclorem 1254 (FA) i fenobarbitem (FB), podjęto próbę wprowadzenia do składu mieszaniny S9-mix frakcji niepoddanej uprzedniej indukcji (F0). Wymienione testy oraz szczepy testowe dawały najlepsze wyniki w badaniach nad mutagennością pyłowych zanieczyszczeń powietrza pobranych zimą i latem na Starym Mieście.

We wszystkich testach uzyskano większe współczynniki *MR* dla ekstraktów próbek powietrza pobranych w zimie, w porównaniu do badań z próbkami pobranymi wiosną i latem. W badanych ekstraktach obecne były zarówno zanieczyszczenia mogące oddziaływać pośrednio z materiałem genetycznym, jak i bezpośrednio. Świadczył o tym duży współczynnik mutagenności (*MR*) otrzymany zarówno dla testów przeprowadzanych z udziałem frakcji mikrosomalnych, jak i bez nich. Najmniejsza objętość zanieczyszczonego powietrza, wywołująca efekt mutagenny w stosunku do zastosowanych w badaniach szczepów testowych, była bardzo różnicowana, tak samo jak liczba rewertantów indukowana przez 1 m³ powietrza. Wartości mutagenności w badaniach prowadzonych w obecności obu szczepów, we wszystkich przeprowadzonych testach na próbkach pobranych zimą, wskazywały na mutagenne działanie zanieczyszczeń znajdujących się w 1 m³ powietrza.

W badaniach prowadzonych ze szczepem TA98 większe współczynniki *MR* uzyskano dla próbek pobranych w centrum miasta niż dla próbek pobranych na jego obrzeżu. W ekstraktach zanieczyszczeń powietrza pobranych zimą i latem na pl. Grunwaldzkim, w miejscu, w którym panuje wzmożony ruch samochodowy przez całą dobę, znajdowało się bardzo dużo związków mutagennych powodujących zmianę fazy odczytu. Dla tych ekstraktów uzyskano bowiem bardzo duży współczynnik mutagenności, a w przypadku ekstraktu próbki zimowej uzyskano dodatkowo efekt toksyczny na krzywej dawka–odpowiedź we wszystkich testach. W próbce pobranej zimą więcej było zanieczyszczeń o charakterze promutagenów, a w ekstrakcie próbki letniej związków o charakterze mutagenów bezpośrednich. Duże współczynniki *MR* uzyskano także dla ekstraktu próbki zimowej pobranej na peryferiach miasta na ul. Strachocińskiej. W przypadku tej próbki w badanych większych stężeniach ekstraktu powietrza duży współczynnik *MR* uzyskano w badaniach bez frakcji, a w mniejszych stężeniach w badaniach z frakcją. Stanowisko to umiejscowione było na obszarze indywidualnej niskiej zabudowy przy znacznie obciążonej trasie wylotowej w kierunku Jelcza. Współczynniki *MR* uzyskane dla ekstraktu próbki pobranej wiosną (teren kampusu Politechniki Wrocławskiej, dach na wysokości II piętra) były niewiele większe od wartości *MR* obliczonych dla ekstraktu próbki pobranej latem na ul. Strachocińskiej, dla której w lecie uzyskano najmniejsze wartości współczynnika *MR*. Zarówno w jednej, jak i w drugiej próbce współczynniki *MR* były zbliżone w badaniach bez frakcji i z frakcją, choć obserwowano pewną przewagę mutagenów pośrednich. Szczep TA98 odznaczał się progiem wykrywalności w zimie na poziomie 0,097–0,39 m³/płytkę, w lecie 0,049–25 m³/płytkę, a wiosną na poziomie 6,25 m³/płytkę. W teście preinkubacyjnym uzyskano zmniej-

szenie współczynnika *MR* dla wszystkich próbek. Zaobserwowano także niewielkie pogorszenie progów wykrywalności w przypadku próbek zawierających mniejszą ilość mutagennych zanieczyszczeń. Natomiast w przypadku próbek pobranych zimą i latem na pl. Grunwaldzkim stężenie zanieczyszczeń wywołujące efekt mutageny wyraźnie przesunęło się w kierunku większych stężeń ekstraktów. W teście Kado, przeprowadzanym z ekstraktem zanieczyszczeń pobranych w zimie na pl. Grunwaldzkim, uzyskano większe współczynniki *MR* oraz znaczne poprawienie progu wykrywalności substancji mutagennych w porównaniu do testu klasycznego. W przypadku pozostałych ekstraktów zaobserwowano zmniejszenie się współczynnika *MR* oraz zwiększenie stężeń progowych. Nie wpłynęło to jednak na możliwość wykrywania zanieczyszczeń o działaniu mutagennym tym testem.

Szeroki zakres badanych stężeń zanieczyszczeń powietrza w przypadku szczepu YG1041, szczególnie wrażliwego na nitrowe związki aromatyczne wywołujące zmianę fazy odczytu, pozwolił wyznaczyć efekty toksyczne na krzywej dawka–odpowiedź dla wszystkich ekstraktów, z wyjątkiem zanieczyszczeń pobranych latem na pl. Grunwaldzkim. Zdecydowanie największy współczynnik *MR* w badaniach z tym szczepem uzyskano dla próbki pobranej zimą na pl. Grunwaldzkim. W próbce tej zdecydowanie najwięcej było związków o charakterze promutagenów. Również duży współczynnik *MR*, dużo większy w badaniach z aktywacją metaboliczną, uzyskano dla próbki pobranej wiosną.

W przypadku ekstraktów uzyskanych z pozostałych próbek współczynniki *MR* były dużo mniejsze i zbliżone do siebie, nawet w przypadku próbki pobranej zimą na obrzeżach miasta. Zaskakująco duże współczynniki *MR* otrzymano na tym stanowisku badawczym dla próbki pobranej w lecie. Przyczyną tego wyniku mogło być to, iż teren ten nie jest zgazyfikowany i w związku z tym przez cały rok w wielu zabudowaniach używane są paleniska domowe. Próg wykrywalności związków mutagennych dla szczepu YG1041 wynosił w okresie zimy 0,01225–0,39 m³/płytkę, w okresie lata 3,125–50 m³/płytkę, a wiosną 0,78–6,25 m³/płytkę. Najniższy próg był w przypadku próbki pobranej zimą na pl. Grunwaldzkim. Zależność współczynnika *MR* od stężenia ekstraktu powietrza wprowadzanego na płytkę dla tej próbki w teście klasycznym, prowadzonym z preinkubacją, niewiele różniła się od zależności otrzymanej w teście klasycznym. Zwiększeniu uległy współczynniki *MR*, ale stężenia progowe pozostały podobne. Z kolei w teście Kado przeprowadzonym dla tej próbki uzyskano największe współczynniki *MR* oraz zmniejszenie stężenia progowego w badaniach bez aktywacji metabolicznej i z aktywacją frakcjami FA i FB. Podobną tendencję zaobserwowano dla próbki pobranej zimą na ul. Strachocińskiej. Zwiększenie współczynnika *MR* w testach preinkubacyjnych może sugerować występowanie w tych próbkach pewnych klas mutagenów, np. alifatycznych związków N-nitrozowych [88, 215], z którymi ta modyfikacja może dawać lepsze wyniki. W przypadku próbki pobranej latem na tej ulicy i próbki pobranej wiosną, w teście preinkubacyjnym i w teście Kado, obserwowano zmniejszenie współczynnika *MR* i nieznaczne pogorszenie progów wykrywalności substancji mutagennych.

Tabela 26. Korelacje pomiędzy współczynnikiem *MR* uzyskanym dla frakcji FA, FB i F0 (druga część badań)

Numer próbki	Rodzaj testu	TA98			YG1041		
		FAxFB	FAxF0	FBxF0	FAxFB	FAxF0	FBxF0
		Współczynnik korelacji porządku rang Spearmana (poziom <i>p</i>)					
1	Klasyczny	0,996 (0,000022)	0,920 (0,000022)	0,920 (0,000022)	0,949 (0,000002)	0,949 (0,000002)	1,0 (<0,05)
	Preinkubacyjny	0,705 (0,01)	0,616 (0,03)	0,936 (0,000007)	0,93 (0,000012)	0,862 (0,000315)	0,883 (0,000143)
	Kado	0,515 (0,128)	0,733 (0,016)	0,915 (0,0002)	0,867 (0,0012)	0,842 (0,0022)	0,952 (0,000023)
2	Klasyczny	0,993 (0,00001)	0,986 (0,00006)	0,993 (0,00001)	0,97 (0,000002)	0,97 (0,000002)	0,979 (0,000002)
	Preinkubacyjny	0,893 (0,000091)	0,911 (0,000038)	0,958 (0,000001)	0,937 (0,000007)	0,951 (0,000002)	0,888 (0,000114)
	Kado	0,948 (0,000029)	0,902 (0,00035)	0,912 (0,00024)	0,418 (0,229)	0,661 (0,0375)	0,588 (0,074)
3	Klasyczny	0,993 (0,00001)	0,979 (0,00001)	0,965 (0,00001)	0,797 (0,00063)	0,819 (0,000331)	0,982 (0,00001)
	Preinkubacyjny	0,993 (0,00001)	0,986 (0,00001)	0,993 (0,00001)	0,955 (0,00001)	0,965 (0,00001)	0,995 (0,00001)
	Kado	0,994 (0,00001)	1,0 (<0,05)	0,994 (0,00001)	0,995 (0,00001)	0,945 (0,00001)	0,951 (0,00001)
4	Klasyczny	0,909 (0,000042)	0,986 (0,000042)	0,930 (0,000012)	0,943 (0,00001)	0,898 (0,000012)	0,982 (0,000012)
	Preinkubacyjny	0,83 (0,00083)	0,768 (0,0035)	0,781 (0,0027)	0,877 (0,000038)	0,987 (0,00001)	0,912 (0,000006)
	Kado	0,948 (0,000029)	0,952 (0,000023)	0,967 (0,000005)	0,896 (0,000035)	0,984 (0,00001)	0,934 (0,000003)
5	Klasyczny	0,936 (0,000022)	0,973 (0,000001)	0,973 (0,000001)	0,891 (0,000233)	0,918 (0,000067)	0,973 (0,000001)
	Preinkubacyjny	1,0 (<0,05)	1,0 (<0,05)	1,0 (<0,05)	0,991 (0,00009)	0,997 (0,00003)	0,988 (0,00012)
	Kado	0,991 (0,000015)	0,991 (0,000015)	1,0 (<0,05)	1,0 (<0,05)	1,0 (<0,05)	1,0 (<0,05)

W tabeli 26 umieszczono współczynniki korelacji obliczone pomiędzy wartościami *MR* uzyskanymi w badaniach z frakcjami mikrosomalnymi FA, FB i F0 stosowanymi we wszystkich rodzajach testów w drugiej części badań. Współczynniki *MR* uzyskane dla poszczególnych frakcji dobrze korelowały ze sobą zarówno w testach przeprowadzanych ze szczepem TA98, jak i ze szczepem YG1041. Współczynniki korelacji pomiędzy współczynnikami *MR* uzyskanymi dla szczepu TA98 w badaniach z FA i z FB zawierały się pomiędzy 0,515–1,0; w badaniach z FA i z F0 pomiędzy 0,616–1,0, a w badaniach z FB i z F0 pomiędzy 0,781–1,0. Z kolei w testach z udziałem szczepu YG1041 współczynniki te były w granicach: 0,418–1,0 (FAxFB), 0,661–1,0 (FAxF0) i 0,588–1,0 (FBxF0). Wyniki badań tego etapu potwierdziły możli-

wość zastąpienia bardzo toksycznego i stabilnego w środowisku Arochloru 1254 mniej toksycznym fenobarbitem w celu zwiększania poziomu enzymów odpowiedzialnych za aktywację metaboliczną w wątrobie. Stwierdzono także, że istnieje możliwość zastosowania w badaniach mutagenności pyłowych zanieczyszczeń powietrza frakcji mikrosomalnej niepoddanej uprzedniej indukcji. Wynika to najprawdopodobniej z faktu, iż zanieczyszczenia powietrza stanowią bardzo złożoną mieszaninę substancji należących do różnych klas związków chemicznych. Rodzaj induktora frakcji mikrosomalnej decyduje o uaktywnieniu określonej grupy monooksygenaz cytochromu P-450. Stąd też, w zależności od rodzaju występujących promutagenów w badanej próbce, określona frakcja staje się bardziej przydatna [155].

W tabelach 27 i 28 umieszczono współczynniki korelacji, jakie uzyskano pomiędzy liczbą rewertantów indukowaną przez 1 m³ badanych próbek powietrza (*M*) a stężeniem oznaczanych parametrów. Pod uwagę wzięto stężenie pyłów na poszczególnych stanowiskach badawczych, stężenie substancji smołowych, stężenie sumy WWA i nitroWWA oraz stężenia niektórych oznaczanych w badanych ekstraktach związków chemicznych. Przy wyborze kierowano się siłą działania mutagennego węglowodórów, ich charakterem wskaźnikowym i obecnością w badanych próbkach. Benzo[a]piren jest związkiem o silnym działaniu kancerogennym i jest uważany za wskaźnik narażenia na WWA występujące w powietrzu atmosferycznym. Z kolei dibenzo[a,h]antracen ($k = 5$) jest związkiem o silniejszym działaniu kancerogennym w porównaniu do benzo[a]pirenu ($k = 1$), a benzo[g,h,i]perylen, dla którego względny współczynnik kancerogenności wynosi $k = 0,01$, jest uważany za wskaźnik narażenia na WWA emitowane z silników wysokoprężnych. Natomiast 2-nitrofluoren był jedynym związkiem z grupy nitroWWA, którego obecność oznaczono we wszystkich badanych ekstraktach pyłów zawieszonych.

W przypadku testów wykonywanych ze szczepem TA98 (tab. 27) największe współczynniki korelacji stwierdzono pomiędzy mutagennością a masą substancji smołowych ($r = 0,393\text{--}0,414$ test klasyczny, $r = 0,5\text{--}0,821$ test preinkubacyjny i $r = 0,428\text{--}0,785$ test Kado), stężeniem B[g,h,i]P ($r = 0,234\text{--}0,357$ test klasyczny, $r = 0,667\text{--}0,9$ test preinkubacyjny i $r = 0,392\text{--}0,679$ test Kado), stężeniem 2-nitrofluorenu ($r = 0,5\text{--}0,54$ test klasyczny, $r = 0,6\text{--}0,872$ test preinkubacyjny i $r = 0,536\text{--}0,857$ test Kado) i sumą stężeń WWA ($r = 0,321\text{--}0,4$ test klasyczny, $r = 0,5\text{--}0,8$ test preinkubacyjny i $r = 0,571\text{--}0,8$ test Kado). Najmniejsze korelacje uzyskano, w teście klasycznym, pomiędzy mutagennością a stężeniami pyłów zawieszonych ($r = 0,054\text{--}0,071$), stężeniem B[a]P ($r = 0,0\text{--}0,0714$), stężeniem D[a,h]A ($r = -0,054$) i sumą stężeń nitroWWA ($r = -0,1\text{--}0,0$). W przypadku tych zależności zauważono zwiększenie współczynnika korelacji w przypadku pozostałych testów, zwłaszcza w teście Kado.

W badaniach ze szczepem YG1041 (tab. 28) uzyskano największą zależność pomiędzy mutagennością a masą pyłów ($r = 0,487\text{--}0,607$ test klasyczny, $r = 0,6$ test preinkubacyjny i $r = 0,321\text{--}0,643$ test Kado), stężeniem B[a]P ($r = 0,786\text{--}0,821$ test klasyczny, $r = 0,6\text{--}0,8$ test preinkubacyjny i $r = 0,75\text{--}1,0$ test Kado), stężeniem B[g,h,i]P

Tabela. 27. Korelacje pomiędzy mutagennością (M) dla szczepu TA98 a stężeniem wybranych parametrów

Rodzaj testu	Rodzaj badania	Masa pyłów	Masa substancji smołowych	B[a]P	D[a,h]A	B[g,h,i]P	2-nitrofluoren	Suma WWA	Suma nitro WWA
		Współczynnik korelacji porządku rang Spearmana (poziom p)							
Klasyczny	TA98 –F	0,071 (0,879)	0,393 (0,383)	0,0714 (0,879)	–0,054 (0,908)	0,357 (0,432)	0,5 (0,253)	0,321 (0,482)	0,0 (1,0)
	TA98 +FA	0,071 (0,879)	0,393 (0,383)	0,0714 (0,879)	–0,054 (0,908)	0,357 (0,432)	0,5 (0,253)	0,321 (0,482)	0,0 (1,0)
	TA98 +FB	0,071 (0,879)	0,393 (0,383)	0,0714 (0,879)	–0,054 (0,908)	0,357 (0,432)	0,5 (0,253)	0,321 (0,482)	0,0 (1,0)
	TA98 +F0	0,054 (0,908)	0,414 (0,355)	0,0 (1,0)	0,0 (1,0)	0,234 (0,613)	0,54 (0,21)	0,4 (0,504)	–0,1 (0,873)
Preinkubacyjny	TA98 –F	0,462 (0,434)	0,821 (0,089)	0,564 (0,322)	0,359 (0,553)	0,667 (0,219)	0,872 (0,054)	0,8 (0,089)	0,902 (0,433)
	TA98 +FA	0,5 (0,391)	0,8 (0,104)	0,61 (0,285)	0,2 (0,747)	0,9 (0,037)	0,8 (0,104)	0,8 (0,089)	0,5 (0,391)
	TA98 +FB	0,1 (0,873)	0,5 (0,391)	0,2 (0,747)	–0,1 (0,873)	0,7 (0,188)	0,6 (0,285)	0,5 (0,391)	0,1 (0,873)
	TA98 +F0	0,1 (0,873)	0,5 (0,391)	0,2 (0,747)	–0,1 (0,873)	0,7 (0,188)	0,6 (0,285)	0,5 (0,391)	0,1 (0,873)
Kado	TA98 –F	0,643 (0,119)	0,428 (0,337)	0,536 (0,215)	0,607 (0,148)	0,679 (0,093)	0,857 (0,014)	0,6 (0,119)	0,679 (0,094)
	TA98 +FA	0,75 (0,052)	0,536 (0,215)	0,536 (0,215)	0,821 (0,023)	0,429 (0,337)	0,857 (0,014)	0,643 (0,119)	0,714 (0,071)
	TA98 +FB	0,571 (0,19)	0,785 (0,036)	0,393 (0,383)	0,429 (0,337)	0,392 (0,383)	0,536 (0,215)	0,571 (0,18)	0,357 (0,432)
	TA98 +F0	0,414 (0,355)	0,559 (0,192)	0,6 (0,285)	0,2 (0,747)	0,595 (0,159)	0,685 (0,089)	0,8 (0,1)	0,5 (0,39)

Tabela 28. Korelacje pomiędzy mutagennością (*M*) dla szczepu YG1041 a stężeniem wybranych parametrów

Rodzaj testu	Rodzaj badania	Masa pyłów	Masa substancji smołowych	B[a]P	D[a,h]A	B[g,h,i]P	2-nitrofluoren	Suma WWA	Suma nitro WWA
		Współczynnik korelacji porządku rang Spearmana (poziom <i>p</i>)							
Klasyczny	YG1041 –F	0,536 (0,215)	–0,143 (0,759)	0,821 (0,023)	0,523 (0,229)	0,929 (0,003)	0,643 (0,119)	0,857 (0,014)	0,714 (0,071)
	YG1041 +FA	0,536 (0,215)	0,071 (0,879)	0,786 (0,036)	0,541 (0,21)	0,893 (0,007)	0,857 (0,014)	0,929 (0,003)	0,679 (0,0937)
	YG1041 +FB	0,607 (0,148)	0,107 (0,819)	0,893 (0,0068)	0,505 (0,248)	0,929 (0,003)	0,786 (0,036)	0,964 (0,0004)	0,714 (0,071)
	YG1041 +F0	0,487 (0,268)	0,955 (0,0008)	0,8 (0,104)	0,1 (0,873)	0,126 (0,788)	0,108 (0,817)	0,9 (0,037)	0,6 (0,285)
Preinkubacyjny	YG1041 –F	0,6 (0,285)	0,9 (0,037)	0,8 (0,104)	0,1 (0,873)	1,0 (<0,05)	0,6 (0,285)	0,9 (0,037)	0,6 (0,285)
	YG1041+ FA	0,6 (0,285)	0,9 (0,037)	0,6 (0,285)	0,2 (0,747)	0,9 (0,037)	0,8 (0,104)	0,8 (0,104)	0,5 (0,39)
	YG1041 +FB	0,6 (0,285)	0,9 (0,037)	0,8 (0,104)	0,1 (0,873)	1,0 (<0,05)	0,6 (0,285)	0,9 (0,037)	0,6 (0,285)
	YG1041 +F0	0,6 (0,285)	0,9 (0,037)	0,8 (0,104)	0,1 (0,747)	1,0 (<0,05)	0,6 (0,285)	0,9 (0,037)	0,6 (0,285)
Kado	YG1041 –F	0,321 (0,482)	–0,25 (0,589)	0,75 (0,052)	0,25 (0,589)	0,786 (0,0362)	0,714 (0,0713)	0,714 (0,0713)	0,714 (0,0713)
	YG1041 +FA	0,643 (0,119)	0,25 (0,589)	0,82 (0,023)	0,32 (0,482)	0,964 (0,0005)	0,75 (0,052)	0,82 (0,023)	0,75 (0,0522)
	YG1041 +FB	0,429 (0,337)	–0,24 (0,819)	0,79 (0,0362)	0,214 (0,645)	0,964 (0,0005)	0,679 (0,094)	0,71 (0,073)	0,678 (0,0937)
	YG1041 +F0	0,63 (0,129)	0,955 (0,023)	1,0 (<0,05)	0,5 (0,391)	–0,018 (0,969)	0,144 (0,758)	0,9 (0,037)	0,9 (0,037)

($r = 0,126-0,929$ test klasyczny, $r = 0,9-1,0$ test preinkubacyjny i $r = -0,018-0,964$ test Kado), stężeniem 2-nitrofluorenu ($r = 0,108-0,857$ test klasyczny, $r = 0,6-0,8$ test preinkubacyjny i $r = 0,144-0,75$ test Kado), sumą stężeń WWA ($r = 0,857-0,964$ test klasyczny, $r = 0,8-0,9$ test preinkubacyjny i $r = 0,71-0,9$ test Kado) i sumą stężeń nitroWWA ($r = 0,6-0,714$ test klasyczny, $r = 0,5-0,6$ test preinkubacyjny i $r = 0,75-0,9$ test Kado). W przypadku korelacji pomiędzy M a stężeniem B[g,h,i]P i 2-nitrofluorenem najmniejsze współczynniki korelacji uzyskano w badaniach z frakcją mikrosomalną F0. Z kolei mniejsze korelacje stwierdzono pomiędzy mutagennością a stężeniem D[a,h]A ($r = 0,1-0,541$ test klasyczny, $r = 0,1-0,2$ test preinkubacyjny i $r = 0,32-0,5$ test Kado), a najmniejsze z masą substancji smołowych w teście klasycznym ($r = -0,143-0,107$; tylko dla F0 $r = 0,955$) i Kado ($r = -0,24-0,25$; tylko dla F0 $0,955$). W przypadku tej ostatniej zależności współczynniki korelacji wzrastały w teście preinkubacyjnym.

Więcej pozytywnych korelacji pomiędzy liczbą rewertantów indukowaną przez 1 m^3 badanych próbek powietrza (M) a stężeniem wybranych parametrów stwierdzono w przypadku testów wykonywanych ze szczepem YG1041. **Dobrymi wskaźnikami zagrożenia zdrowotnego, spowodowanego przez mutageny zaadsorbowane na pyłach zawieszonych w środowisku miejskim, mogą być, w przypadku obu szczepów TA98 i YG1041, B[g,h,i]P, 2-nitrofluoren i suma stężeń WWA.**

8. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań można sformułować wnioski o charakterze podstawowym i utylitarnym istotne ze względu na ochronę powietrza atmosferycznego i zagrożenie zdrowotne związane z mutagenami i potencjalnymi kancerogenami zaadsorbowanymi na pyłe zawieszonym:

1. Ekstrakty pyłowych zanieczyszczeń powietrza różniły się między sobą zarówno sumaryczną zawartością, jak i procentowym udziałem poszczególnych związków w zależności od miejsca oraz od sezonu poboru próbki. Zarówno sumaryczna zawartość WWA i nitroWWA w badanych ekstraktach, jak i też ich profil był największy w okresie zimowym (sezon grzewczy). Wszystkie ekstrakty charakteryzowały się dużym procentowym udziałem WWA o małym ciężarze cząsteczkowym, z kolei stężenie cięższych WWA, zawierających od 5 do 6 pierścieni aromatycznych, było w nich dużo mniejsze.

2. We wszystkich testach *Salmonella* największe współczynniki mutagenności (MR) i mutagenność (M) uzyskano dla próbek pobranych zimą. Mutagenność ekstraktów pyłów zawieszonych wzrasta więc w sezonie grzewczym i maleje w lecie.

3. Mutageny obecne w ekstraktach pyłów zawieszonych wywoływały większą odpowiedź ze strony szczepów TA98 i YG1041, w porównaniu do szczepów TA100 i YG1042, co oznacza, że były to głównie związki wywołujące mutacje typu zmiany fazy odczytu. Największą czułością odznaczał się szczep YG1041, co wskazuje na obecność w badanych próbkach dużych ilości nitrowych związków aromatycznych.

4. Duże współczynniki mutagenności (MR) otrzymane zarówno w testach przeprowadzanych z udziałem frakcji mikrosomalnej S9, jak i bez niej świadczyły o obecności w badanych ekstraktach zanieczyszczeń mogących oddziaływać pośrednio (promutageny), jak i bezpośrednio (mutageny bezpośrednie) z materiałem genetycznym.

5. Wykazano konieczność każdorazowego doboru optymalnego stężenia frakcji mikrosomalnej S9 wobec próbki środowiskowej, a nie wobec mutagenu standardowego. Zaproponowano jego dobór na podstawie jednego wytypowanego stężenia ekstraktu badanej próbki, zawierającego takie stężenie zanieczyszczeń powietrza, które w teście wstępnym w obecności 4% (v/v) zawartości S9 w S9-mix daje efekt mutageny, ale nie powoduje jeszcze efektów toksycznych.

6. W celu zwiększenia poziomu enzymów mikrosomalnych wątroby, odpowiedzialnych za transformację szerokiego spektrum związków o działaniu mutagennym, można zastąpić bardzo toksyczny i stabilny w środowisku Aroclor 1254 mniej toksycznym fenobarbitem.

7. Badania mutagenności pyłowych zanieczyszczeń powietrza można prowadzić w obecności frakcji mikrosomalnej S9 niepoddanej uprzedniej aktywacji, zawierającej naturalny poziom enzymów mikrosomalnych.

8. Mutagenność pyłowych zanieczyszczeń powietrza można określać testem *Salmonella* z zastosowaniem szczepów TA98 i TA100 bez udziału kosztownego NADP w składzie S9-mix.

9. Test *Salmonella* z 10-krotnie zwiększoną ilością bakterii bez dodatku NADP można przeprowadzać w obecności szczepu YG1041, najbardziej wrażliwego na obecne w ekstraktach powietrza zanieczyszczenia.

10. Procedurę klasyczną testu z 10-krotnie zwiększoną ilością bakterii można jedynie stosować do wykrywania mutagenów bezpośrednich szczepem TA98.

11. Wykazano, iż optymalny czas preinkubacji jest różny w zależności od rodzaju szczepu, temperatury preinkubacji i rodzaju frakcji mikrosomalnej. Zaproponowano, aby przed przystąpieniem do badań testem *Salmonella* z preinkubacją dobierać odpowiedni jej czas dla określonej temperatury na podstawie stężenia ekstraktu, które w badaniach prowadzonych klasycznym testem płytkowym daje dwukrotnie większą liczbę rewertantów w stosunku do liczby rewertantów otrzymanych w drodze mutacji spontanicznej.

12. Test w modyfikacji Kado jest godny polecenia w badaniach ze szczepami TA98, YG1041 i YG1042. W teście tym uzyskano duże współczynniki *MR* oraz małe stężenia progowe. Duża czułość tego testu, zwłaszcza w badaniach ze szczepem YG1041, jest zgodna z poglądem, że kluczową klasą czynników mutagennych w powietrzu atmosferycznym są nitro pochodne WWA.

13. Test z preinkubacją w formie Mini, którego procedurę będącą kompilacją testu klasycznego z testem Kado zaproponowano w pracy, dał dobre wyniki w obecności szczepu TA100 oraz, w mniejszym stopniu, w obecności szczepów TA98 i YG1041. Do przeprowadzenia tego testu potrzebna jest 1/3 objętości badanego ekstraktu i frakcji S9 w porównaniu do testu klasycznego.

14. Badania testem *Salmonella* należy tak zaplanować, aby możliwe było przedstawienie pełnego biologicznego efektu działania zanieczyszczeń w zależności od ich stężenia z podaniem najmniejszego stężenia wywołującego efekt mutageny. Wyniki testu można wtedy przedstawić w postaci współczynnika mutagenności (*MR*) i liczby rewertantów indukowanych przez 1 m³ powietrza (*M*).

15. Dobrymi wskaźnikami zagrożenia zdrowotnego okazały się w przedstawionych badaniach, w przypadku szczepów TA98 i YG1041, B[g,h,i]P, 2-nitrofluoren oraz suma stężeń WWA. Natomiast stężenie pyłu zawieszonego w niewielkim stopniu odzwierciedlało zagrożenie zdrowotne spowodowane obecnością zaadsorbowanych na nim mutagenów. W przypadku niektórych próbek otrzymano duże stężenie pyłu, na-

tomiast stężenie zaadsorbowanych na nim związków mutagennych było małe i odwrotnie.

16. Fizykochemiczny monitoring zanieczyszczeń atmosfery, polegający na określeniu stężenia pyłu zawieszonego i stężeń WWA z listy USEPA, tylko w przybliżeniu informuje nas o zagrożeniu zdrowotnym. Należałoby więc uzupełnić go o badanie aktywności mutagennej zanieczyszczeń organicznych krótkoterminowym testem *Salmonella*. Na pyłe zawieszonym zaadsorbowanych jest bowiem szereg związków aktywnych biologicznie, których działanie może się nawzajem wzmacniać lub osłabiać. Odpowiedź uzyskiwana w teście *Salmonella* jest wypadkową tych procesów.

17. Jak wykazano, w monitoringu jakości powietrza należy uwzględnić ocenę mutagenności organicznych zanieczyszczeń jedną z podanych modyfikacji testu *Salmonella*. W testach przeprowadzanych w obecności szczepu TA98 można stosować frakcję mikrosomalną indukowaną fenobarbitem bez wprowadzania dodatkowej puli kosztownego NADP. Taki monitoring należy uzupełnić o szczep YG1041. Pozwoli to na stwierdzenie czy w badanych próbkach obecne są zanieczyszczenia odpowiadające w dużej mierze za aktywność mutageną powietrza, czyli nitrowe związki aromatyczne. Dla tego szczepu można przeprowadzać testy w sposób podobny jak dla szczepu TA98, czyli bez NADP w składzie S9-mix, zwiększając jedynie 10-krotnie ilość bakterii. Bardzo dobre wyniki, dla tego szczepu, daje także procedura w modyfikacji Kado oraz test preinkubacyjny z odpowiednio dobranym czasem inkubacji. Do testów tych można wprowadzać również frakcję mikrosomalną niepoddaną uprzedniej indukcji.

Literatura

- [1] Adamiak W., Jadczyk P., Kucharczyk J., 1999. *Application of Salmonella strain with altered nitroreductase and O-acetyltransferase activities to the evaluation of the mutagenicity of airborne particles.* Acta Microbiologica Polonica, 2, 131–14.
- [2] Alfheim I., Löfroth G., Møller M., 1983. *Bioassay of extracts of ambient particulate matter.* Environmental Health Perspectives, 47, 227–238.
- [3] Alfheim I., Lindskog A., 1984. *A comparison between different high volume sampling systems for collecting ambient airborne particles for mutagenicity testing and for analysis of organic compounds.* Sci. Total Environ. 34, 203–222.
- [4] Alink G.M., Smith H.A., Van Houdt J.J., Kolkman J.R., Boleu J.S.M., 1983. *Mutagenic activity of airborne particulates at non-industrial locations.* Mutation Res., 116, 21–34.
- [5] Al-Khodairy F., Hannan A., 1997. *Exposure of organic extracts of air particulates to sunlight leads to metabolic activation independence for mutagenicity.* Mutat. Res., 391, 71–77.
- [6] Alloway B., Ayres D.C., 1999. *Chemiczne podstawy zanieczyszczania środowiska.* Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- [7] Arey J., Zielińska B., Harger W.P., Atkinson R., Winer A.M., 1988. *The contribution of nitrofluoranthenes and nitropyrenes to the mutagenic activity of ambient particulate organic matter collected in southern California.* Mutat. Res., 207, 45–51.
- [8] Arey J., Harger W. P., Hemig D. and Atkinson R., 1992. *Bioassay-directed fractionation of mutagenic PAH atmospheric photooxidation products and ambient particulate extracts.* Mutat. Res., 281, 67–76.
- [9] Atkinson R., Arey J., 1994. *Atmospheric chemistry of gas-phase polycyclic aromatic hydrocarbons: formation of atmospheric mutagens.* Envir. Helth Perspect., 102, 117–126.
- [10] Autrup H., Daneshvar B., Dragsted L.O., Gamborg M., Hansen A.M., Loft S., Okkels H., Nielsen F., Nielsen P.S., Raffn E., Wallin H., Knudsen L.E., 1999. *Biomarkers for exposure to ambient air pollution- comparison of carcinogen- DNA adducts levels with other exposure markers and markers for oxidative stress.* Environmental Health Perspectives 107, 233–238.
- [11] Barale R., Migliore L., Cellini B., Franconi L., Giogelli F., Barrai N., Loprieno N., 1990. *Genetic Toxicology of airborne particulate matter using cytogenetic assays and microbial mutagenicity assay.* Genetic Toxicol. of Complex Mixtures (Plenum), 57–72.
- [12] Barale R., Giromini L., Del Ry S., Barnini B., Bulleri M., Barrai I., Valerio F., Pala M., He J., 1994. *Chemical and mutagenic patterns of airborne particulate matter collected in 17 Italian towns.* Environ. Health Perspect. 102(4), 67–73.
- [13] Bayona J.M., Casellas M., Fernandez P.P., Solanas A.M., Albaiges J., 1994. *Sources and seasonal variability of mutagenic in the Barcelona city aerosol.* Chemosphere, 29, 441–450.
- [14] Berstein L., Kaldor J., Mccann J., Pike M.C., 1982. *An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the Salmonella test.* Mutation Res., 97, 267–281.

- [15] Binková B., Vesely D., Vesela D., Jelínek R., Šram R.J., 1999. *Genotoxicity and embryotoxicity of urban air particulate matter collected during winter and summer period in two different districts of the Czech Republic*. Mutation Res., 440, 45–58.
- [16] Binková B., Černa B., Pastorková A., Jelínek R., Beneš I., Novák J., Šram R.J., 2003. *Biological activities of organic compounds adsorbed onto ambient air particles: comparison between the cities of Teplice and Prague during the summer winter seasons 2000–2001*. Mutation Research., 525, 43–59.
- [17] Blaner W., Tsai W.Y., Chorąży M., Motykiewicz G., Michalska J., Santella R.M., Young T.L., 1992. *Molecular and genetic damage in humans from environmental pollution in Poland*. Nature, 360, 256–258.
- [18] Bolognesi G., Merlo F., Rabboni R., Valerio F., Abbondandolo A., 1997. *Cytogenetic biomonitoring in traffic police workers- micronucleus test in peripheral blood lymphocytes*. Environ. Molecular Mutagenesis, 30, 396–402.
- [19] Breslow N. E., 1984. *Extra-Poisson variation in log-linear models*. Appl. Stat., 33, 38–44.
- [20] Brits E., Schoeters G., Verschaeve L., 2004. *Genotoxicity of PM 10 and extracted organic collected in an industrial, urban and rural area in Flanders, Belgium*. Environ. Res., 96, 109–118.
- [21] Brown L.E., Trought K.R., Bailey C.I., Clemons J.H., 2005. *2,3,7,8-TCDD equivalence and mutagenic activity associated with PM sub(10) from three urban locations in New Zealand*. Sci.Total.Environ., 349 (1–3), 161–174.
- [22] Brunekreef B., Holgate S.T., 2002. *Air pollution and health*. The Lancet, 360, 1233–1242.
- [23] Bubak A., 1998. *Szczepki Salmonella typhimurium o zróżnicowanym poziomie enzymów nitroreduktazy i o-acetylotransferazy jako indykatory efektu mutagennego wywołanego przez zanieczyszczenia powietrza*. Rozprawa doktorska, Wydział Farmaceutyczny w Sosnowcu, Biblioteka Główna Śląskiej Akademii Medycznej, AZ-858/17.
- [24] Bubak A., *Biomonitoring mutagenności powietrza atmosferycznego i wody*.
http://www.ietu.katowice.pl/wpr/Dokumenty/Materialy_szkoleniowe/Skol2/18.
- [25] Bünger J., Krahl J., Baum K., Schröder O., Müller M., Westphal G., Ruhnau P., Schulz T.G., Hallier E., 2000. *Cytotoxic and mutagenic effects, particle size and concentration analysis of diesel engine emissions using biodiesel and petrol diesel as fuel*. Arch. Toxicol., 74, 490–498.
- [26] Buschini A., Cassoni F., Anceschi E., Pasini L., Poli P., Rossi C., 2001. *Urban airborne particulate: genotoxicity evaluation of different size fractions by mutagenesis tests on microorganisms and comet assay*. Chemosphere, 44, 1723–1736.
- [27] Carvalho-Oliveira R., Pozo R.M.K., Lobo D.J.A., Lichtenfels A.J.F.C., Martins-Junior H.A., Bustilho J.O.W.V., Saiki M., Sato I.M., Saldiva P.H.N., 2005. *Diesel emissions significantly influence composition and mutagenicity of ambient particles: a case study in Sao Paulo, Brazil*. Environ. Res. 98 (1), 1–7.
- [28] Cassoni F., Bocchi C., Martino A., Pinto G., Fontana F., Buschini A., 2004. *The Salmonella mutagenicity of urban airborne particulate matter (PM 2,5) from eight sites of the Emilia- Romagna regional monitoring network (Italy)*. Science of the Total Environment, 324, 79–90.
- [29] Cecinato A., 2003. *Nitrated polynuclear aromatic hydrocarbons in ambient air in Italy. A brief overview*. J. Sep. Sci., 26, 402–408.
- [30] Černa M., Pochamanova D., Pastorková, Beneš I., Leníček J., Topinka J., Binková B., 2000. *Genotoxicity of urban air pollutants in Czech Republic. Part I. Bacterial mutagenic potencies of organic compounds adsorbed on PM 10 particulates*. Mutation. Res., 469, 71–82.
- [31] Cerniglia C. E., Howard P. C., Fu P. P., Franklin W., 1984. *Metabolism of nitropolycyclic aromatic hydrocarbons by human intestinal microflora*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 123, 262–270.
- [32] Chorąży M., Szeliga J., Stróżyk M., Cimander B., 1994. *Ambient air pollutants in Upper Silesia: partial chemical composition and biological activity*. Environmental Health Perspectives 102, Supplement 4, 61–66.
- [33] Chouroulou I., 1991. *Carcinogenicity of complex mixtures in air using in vitro and in vivo assays*. Genetic Toxicol. of Complex Mixtures (Plenum), 113–126.

- [34] Claxton L.D., Barnes H.H., 1981. *The mutagenicity of diesel exhaust particle extracts collected under smog-chamber conditions using Salmonella typhimurium test system*. Mutat.Res., 88, 879–893.
- [35] Claxton L.D., Warren S.H., Zweidinger R., Creason J., 2001. *A comparative assessment of Boise, Idaho, ambient air fine particle samples using the plate and microinjection Salmonella mutagenicity assays*. The Science of the Total Environment, 275, 95–108.
- [36] Claxton L.D., Houk V.S., Warren S.H., 2001. *Methods for the spiral Salmonella mutagenicity assay including specialized applications*. Mutat. Res., 488, 239–255.
- [37] Claxton L.D., Matthews P.P., Warren S.H., 2004. *The genotoxicity of ambient outdoor air, a review: Salmonella mutagenicity*. Mutation Research, 567, 347–399.
- [38] Cohen A.J., 2000. *Outdoor air pollution and lung cancer*. Environmental Health Perspectives, 108 (4), 743–750.
- [39] Cologne J.B., Breslow E., 1994. *Nonparametric regression analysis of data from the Ames mutagenicity assay*. Environmental Health Perspectives Supplements, 102 (1), 61–70.
- [40] Crebelli R., Fuselli S., Baldassarri L.T., Ziemacki G., Carere A., Banigni R., 1995. *Genotoxicity of urban air particulate matter: correlations between data, airborne micropollutants and meteorological parameters*. Int. J. Environment. Health Res., 5, 19–34.
- [41] Czacot H., Rahden-Stradoń J., 1997. *Wybrane krótkoterminowe testy bakteryjne i na organizmach eukariotycznych, stosowane do oceny genotoksyczności środowiskowych zanieczyszczeń chemicznych*. Roczn.PZH, 48, 317–336.
- [42] De Flora S., Bagnasco M., Izzotti A., D'Agostini F., Pala M., Valerio F., 1989. *Mutagenicity of polycyclic aromatic hydrocarbon fractions extracted from urban air particulates*. Mutat.Res., 224, 305–318.
- [43] Dehnen W., Pitz N., Tomingas R., 1997. *The mutagenicity of airborne particulate pollutants*. Cancer Lett., 4, 5–12.
- [44] De Kok T.M.C.M., Driece H.A.L., Hogervorst J.G.F., Briede J.J., 2006. *Toxicological assessment of ambient and traffic-related particulate matter: A review of recent studies*. Mutat.Res.-Rev.Mut.Res., 613 (2–3), 103–122.
- [45] De Kok T.M., Hogervorst J.G., Briede J.J., van Herwijnen M.H., Mass L.M., Moonen E.J., Driece H.A., Kleinjans J.C., 2005. *Genotoxicity and physicochemical characteristics of traffic-related ambient particulate matter*. Environ Mol. Mutag., 46 (2), 71–80.
- [46] De Marini D. M., Lemieux P. M., Ryan J. V., Brooks L. R., Williams R. W., 1994. *Mutagenicity and chemical analysis of emissions from the open burning of scrap rubber tires*. Envir. Sci. Technol. 28,136–141.
- [47] De Raat W.K., 1983. *Genotoxicity of aerosol extracts. Some methodological aspects and the contribution of urban and industrial locations*. Mutation Res. 116, 47–63.
- [48] Ducatti A., Vargas V.M.F., 2003. *Mutagenic activity of airborne particulate matter as an indicative measure of atmospheric pollution*. Mutation Res., 540, 67–77.
- [49] Du Four V.A., Janssen C.R., Brits E., Larebeke N.V., 2005. *Genotoxic and mutagenic activity of environmental air samples from different rural, urban and industrial sites in Flanders,Belgium*. Mutat.Res.-Genet.Toxicol.Environ.Mutag., 588 (2), 106–117.
- [50] Du Four V.A., Van Larebeke N., Janssen C.R., 2004. *Genotoxic and mutagenic activity of environmental air samples in Flanders, Belgium*. Mutation Research, 558, 155–167.
- [51] Erdinger L., Duerr M., Hoepker K.A., 2005. *Correlations between mutagenic activity of organic extracts of airborne particulate matter, NO_x and sulphur dioxide in southern Germany. Results of a two-year study*. Environ. Sci. Pollut. Res. Int., 12 (1), 10–20.
- [52] Erdinger L., Dorr I., Durr I., Hopker K.A., 2004. *Analysis of mutagenic activity of airborne particulate matter, standard reference materials and reference compounds using base pair-specific Salmonella typhimurium tester strains*. Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag., 564 (2), 149–157.
- [53] Feilberg A., Nielsen T., Binderup M.L., Skov H., Poulsen M.W.B., 2002. *Observations of the effect of atmospheric processes on the genotoxic potency of airborne particulate matter*. Atmospheric Environment, 36, 4617–4625.

- [54] Fukino H., Mimura S., Inoue K., Yamane Y., 1982. *Mutagenicity of airborne particles*. Mutation Res., 102, 237–247.
- [55] Garner, R.C., Miller, E.C., Miller J.A., 1972. *Liver microsomal metabolism of aflatoxin B1 to a reactive derivative toxic to Salmonella typhimurium TA1530*. Cancer Res. 32, 2058–2066.
- [56] Gąsiorowski K., Szyba K., Sawicka J., Gulanowski B., Prochowicz Z., 1998. *Mutagenicity testing of air pollutions in a non-ferrous metal foundry*. Pol. J. Occup. Med., 1(3), 213–221.
- [57] Gąsiorowski K. i in., 1989. *Genotoxicity of air pollution in a non-ferrous metal foundry in three bacterial tests and a micronucleus test – a comparative study*. Pol. J. Occup. Med., 2(2), 70–161.
- [58] Gordon R.J., Bryan R.J., Rhim J.S., Demoise C., Wolford R.G., Freeman A.E., Huebner R.J., 1973. *Transformation of rat and mouse embryo cells by a new of carcinogenic compounds isolated from particles in city air*. Int. J. Cancer, 12, 223–232.
- [59] Gilli G., Pignata C., Schiliro T., Bono R., La Rosa A., Traversi D., 2007. *The mutagenic hazards of environmental PM2.5 in Turin*. Environ. Res., 103 (2), 168–175.
- [60] Gilli G., Traversi D., Rovere R., Pignata C., Schiliro T., 2007. *Airborne particulate matter: ionic species role in different Italian sites*. Environ. Res., 103 (1), 1–8.
- [61] Grant W.F., 1998. *Higher plant assay for the detection of genotoxicity in air polluted environments*. Ecosystem Health, 4, 210–229.
- [62] Gupta P., Harger W. P., Arey J., 1996. *The contribution of nitro- and methylnitronaphthalenes to the vapor-phase mutagenicity of ambient air samples*. Atmospheric Environment, 18:3157–3166.
- [63] Hadnagy W., Seemayer N.H., Tomingas R., 1986. *Cytogenetic effects of airborne particulate matter in human lymphocytes in vitro*. Mutation Res., 175, 97–101.
- [64] Hadnagy W., Seemayer N.H., Tomingas R., Ivanfy K., 1986. *Comparative study of sister- chromatid exchanges and chromosomal aberrations induced by airborne particulate from an urban and a highly industrialized location in human lymphocyte cultures*. Mutation Res., 225, 27–32.
- [65] Hagiwara Y., Watanabe M., Oda Y., Sofuni T., Nohmi T., 1993. *Specificity and sensitivity of Salmonella typhimurium YG1041 and YG1042 strains possessing elevated levels of both nitroreductase and acetyltransferase activity*. Mutation Research, 291, 171–180.
- [66] Hajos A.K., Winston G.W., 1991. *Dinitropyrene nitroreductase activity of purified NAD(P)H-quinone oxidoreductase: role in rat liver cytosol and induction by Aroclor-1254 pretreatment*. Carcinogenesis, 12(4), 697–702.
- [67] Hajos A.K., Winston G.W., 1991. *Purified NAD(P)H-quinone oxidoreductase enhances the mutagenicity of dinitropyrenes in vitro*. J.Biochem. Toxicol., 6(4), 277–282.
- [68] Hakura A., Satoshi S., Shigeki S., Satoru M., Satoh T., 2002. *An improvement of the Ames test using modified human liver S9 preparation*. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 46, 169–172.
- [69] Hannigan M.P., Busby W.F. Jr, Cass G.R., 2005. *Source contribution to the mutagenicity of urban particulate air pollution*. J. Air Waste Manage. Assoc., 55 (4), 399–410.
- [70] Hannigan M.P., Cass G.R., Penman B.W., Crespi Ch. L., Lafleur A.L., Busby W.F., Thilly W.G., 1997. *Human cell mutagens in Los Angeles air*. Environ.Sci.Technol., 31, 438–447.
- [71] Harger W. P., Arey J., Atkinson R., 1992. *The mutagenicity of HPLC-separated vapor-phase and particulate organics in ambient air*. Atmospheric Environment, 26A, 2463–2466.
- [72] Hauser B., Schrader G., Bahadir M., 1997. *Dependence of genotoxicity of benzo(a)pyrene suspensions in Mutatox test on dissolved concentration and S9 addition*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 38, 224–226.
- [73] Hayakawa K., Kawaguchi Y., Murahashi T., Miyazaki M., 1995. *Distributions of nitropyrenes and mutagenicity in airborne particulates collected with Anderson sampler*. Mutation Res. 348, 57–61.
- [74] Hayashi M., Kamata E., Hirose A., Takahashi M., Morita T., Ema M., 2005. *Insilico assessment of chemical mutagenesis in comparison with results of Salmonella microsome assay on 909 chemicals*. Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag., 588 (2), 129–135.

- [75] Healey K., Smith E.C., Wild C.P., Routledge M.N., 2006. *The mutagenicity of urban particulate matter in an enzyme free system is associated with the generation of reactive oxygen species*. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutag.*, 602 (1–2), 1–6.
- [76] Helming D., Arey J., Harger W. P., Atkinson R., Lopez-Cancio J., 1992. *Formation of mutagenic nitrodibenzopyranones and their occurrence in ambient air*. *Envir. Sci. Technol.*, 26, 622–624.
- [77] Hemminki K., Kumar R., Bykov V.J., Louhelainen J., Vodicka P., 1996. *Future research directions in the use of biomarkers*. *Environ. Health Persp.* 104, 459–463.
- [78] Hites M., 1968. *Epidemiological study of lung cancer with special reference to the effect of air pollution and smoking habits*. *Inst. Health Bull.*, 17, 237–256.
- [79] Howard P.C., Heflich R.H., Evans F.E., Beland F.A., 1983a. *Formation of DNA adducts in vitro and in Salmonella typhimurium upon metabolic reduction of the environmental mutagen 1-nitropyrene*. *Cancer Res.*, 43, 2052–2058.
- [80] Howard P.C., Beland F.A., Cerniglia C.E., 1983b. *Reduction of the carcinogen 1-nitropyrene to 1-aminopyrene by rat intestinal bacteria*. *Carcinogenesis*, 4, 985–990.
- [81] Hornberg C., Maciuleviciute L., Seemayer N.H., 1997. *Comparative analysis of cyto- and genotoxic effects of airborne particulates on Human and Rodent Respiratory Cells in vitro*. *Toxic. In Vitro*, 11, 711–715.
- [82] Hornberg C., Seemayer N.H., 1995. *Tracheal Epithelial Cells in vitro a model to study genotoxicity of airborne particulates*. *Toxic. In Vitro*, 9, 397–402.
- [83] Houk V.S., Goto S., Endo O., Claxton L.D., Lewtas J., Matsushita H., 1995. *Detection of direct-acting mutagens in ambient air: a comparison of two highly sensitive mutagenicity assays*. *Environ. Mol. Mutagen.*, 20, 19–28.
- [84] Houk V.S., Warren S., Claxton L.D., 1996. *Comparative mutagenicity of a standard reference material in three Salmonella assays: plate-incorporation, microsuspension, and spiral*. In: *Proceedings of the 27th Annual Meeting of Environmental Mutagen Society*.
- [85] Huang Y., Nishikawa M., Shiraishi F., Quan H., Mori I., 1999. *Genotoxic assay bioluminescent bacteria for urban aerosols in China and Japan and pollutant determination by GC-MS*. *J. Aerosol Sci.*, 30, 651–652.
- [86] Hughes T.J., Lewtas J., Claxton L.D., 1997. *Development of a standard reference material for diesel mutagenicity in the Salmonella incorporation assay*. *Mutation Res.*, 391, 243–258.
- [87] Indulski J. i inni, 1986. *Zasady i metody oceny toksyczności związków chemicznych*. Kryteria Zdrowotne Środowiska, t. 6, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa.
- [88] Indulski J. i inni, 1993. *Przewodnik do testów krótkoterminowych przeznaczonych do wykrywania mutagennych i rakotwórczych substancji chemicznych*. Kryteria Zdrowotne Środowiska, t. 51, Instytut Medycyny Pracy, Łódź.
- [89] Isidori M., Ferrara M., Lavorgna M., Nardelli, Parrella A., 2003. *In situ monitoring of urban air in Southern Italy with the tradescantia micronucleus bioassay and semipermeable membrane devices (SPMDs)*. *Chemosphere*, 52, 121–126.
- [90] Jadczyk P., Kucharczyk J., 2005. *Mutagenicity of pollutants and their fractions adsorbed on airborne particulate in the centre of Wrocław (Poland)*. *Environment Protection Engineering*, 2.
- [91] Jadczyk P., Kucharczyk J., 2000. *Seasonal variability of the mutagenicity of airborne particles for Salmonella typhimurium TA 98 and Saccharomyces cerevisiae XV 185- 14C*. *Environment Protection Engineering* 26, 89–102.
- [92] Jadczyk P., 2001. *Effect of traffic in Wrocław town centre on mutagenicity of airborne particulate matter*. *Acta Pol. Toxicol.*, 9, 57–67.
- [93] Jadczyk P., 2003. *Methods of examination of genotoxicity of atmospheric pollutants*. *Environment Protection Engineering*, 29 (3–4), 97–111.
- [94] Jarvis A.S., Honeycutt M.E., McFarland V.A., Bulich A.A., Bounds H.C., 1996. *A comparison of the Ames assay and Mutatox of contaminated dredged sediment*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 33, 193–200.

- [95] Jenek J., 1988. *Selected bacterial assays used for detection of genotoxic properties of chemical compounds*. Roczn. PZH, 29 (6), 475–484.
- [96] Johnsen A.R., de Liphay J.R., Reichenberg F., Soerensen S.J., Andersen O., Christensen P., Binderup M.L., Jacobsen C.S., 2006. *Biodegradation, bioaccessibility, and genotoxicity of diffuse polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) pollution at a motorway site*. Environ. Sci. Technol., 40 (10), 3293–3298.
- [97] Johnson, B.T., 1991. *An evaluation of a genotoxicity assay with liver S9 for activation and luminescent bacteria for detection*. Env.Tox. and Chem., 11, 473–480.
- [98] Juda-Rezler K., 2000. *Oddziaływanie zanieczyszczeń powietrza na środowisko*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa.
- [99] Kado N.Y., Langley D., Eisenstadt E., 1983. *A simple modification of the Salmonella liquid incubation assay. Increased sensitivity for detecting mutagens in human urine*. Mutat. Res., 121, 25–32.
- [100] Kado N.Y., Manson C., Eisenstadt E., Hsieh D.P.H., 1985. *The kinetics of mutagen excretion in the urine of cigarette smokers*. Mutat. Res., 157, 227–233.
- [101] Kado N.Y., Guirguis G.N., Flessel C.N., Chan R.G., Chang K., Wesolowski J.J., 1986. *Mutagenicity of fine (less than 2.5 microns) airborne particles: diurnal variation in community air determined by a Salmonella micro pre-incubation (microsuspension) procedure*. Environ. Mutagen., 8, 53–66.
- [102] Kado N.Y., Tesluk S.J., Hammond S.K., Woskie S.R., Samuels S.J., Schenker M.B., 1987. *Use of a Salmonella micro pre-incubation procedure for studying personal exposure to mutagens in environmental tobacco smoke: Pilot study of urine and airborne mutagenicity from passive smoking*. In Short-term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures V, eds. S. S. Sandhu, D.M. DeMarini, M. J. Mass, M. M. Moore, and J. L. Mumford, 375–390. New York: Plenum Press.
- [103] Kado N.Y., Wong J.M., Kuzmicky P.A., Woodrow J.E., Ning H., Seiber J.N. Hsieh D.P.H., 1992. *Quantitative integration of the Salmonella microsuspension assay with supercritical fluid extraction of model airborne vapor-phase mutagens*. Mutat. Res., 271, 253–260.
- [104] Kameda T., Inazu K., Bandow H., Sanukida S., Maeda Y., 2004. *Diurnal change of direct-acting mutagenicity of soluble organic fraction of airborne particles collected at Southern Osaka: correlation between the mutagenicity, particles-associated nitroarenes, and gaseous emission*. Atmospheric Environment, 38, 1903–1912.
- [105] Karpińska-Smulikowska J., Piekarska K., Moskal J., Czarny A., 2000. *Evaluation of air pollution by bioindication tests*. Acta Poloniae Toxicologica, 8 (1), 147–159.
- [106] Karpińska-Smulikowska J., Moskal J., Piekarska K., Czarny A., 1998. *Ocena przydatności żywca Amberlit do badania obecności zanieczyszczeń genotoksycznych i cytotoksycznych w powietrzu*. W: Degradacja środowiska przyrodniczego a zdrowie człowieka. Tarnowska Agencja Rozwoju Regionalnego, 243–253.
- [107] Karpińska-Smulikowska J., Piekarska K., 2004. *Obecność zanieczyszczeń genotoksycznych w powietrzu atmosferycznym na terenie miasta Wrocławia*. Med. Śr., 7 (1), 33–40.
- [108] Karpińska-Smulikowska J., Piekarska K., 2006. *Zastosowanie alternatywnych procedur testu Ames do oceny aktywności mutagennej zanieczyszczeń powietrza*. Raporty Instytutu Inżynierii Ochrony Środowiska Politechniki Wrocławskiej, SPR 18.
- [109] Klumpp A., Ansel W., Klumpp G., Calatayud V., Garrec J.P., He S., Penuelas J., Ribas A., Ro-Poulsen H., Rasmussen S., Sanz M.J., Vergne P., 2006. *Tradescantia micronucleus test indicates genotoxic potential of traffic emission in European cities*. Environ. Pollut., 139 (3), 515–522.
- [110] Kohan M., Claxton L., 1983. *Mutagenicity of diesel-exhaust particle extract, 1-nitropyrene, and 2,7-dinitrofluorenone in Salmonella typhimurium under various metabolic activation conditions*. Mutat. Res., 124(3–4), 191–200.

- [111] Kołwzan B., Pawlaczyk-Szpilowa M., Adamiak W., 2002. *Bioindykacja zanieczyszczeń mutagennych i rakotwórczych w próbach środowiskowych*. W: Człowiek Środowisko Zagrożenie, pod red. Jerzego Zwoździaka, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 166–181.
- [112] Kołwzan B., Piekarska K., Karpińska-Smulikowska J., 2005. *Bioindication of air and soil environmental samples using Ames test*. *Pestycydy*, 1–2, 25–34.
- [113] Krewski D., Leroux S. R., Bleuer L. H., Broekhaven L.H., 1993. *Modelling the Ames Salmonella/microsome assay*. *Biometric* 49, 499–510.
- [114] Krishna G., Nath J., Ong T., 1984. *Correlative genotoxicity studies of airborne particles in Salmonella typhimurium and cultured lymphocytes*. *Environ. Mutagen.*, 6: 584–592.
- [115] Krogulski A., Borkowska M., Strusiński A., 1997. *Mutagenic activity of atmospheric dust in Warsaw*. *Roczn.PZH*, 48, 31–35.
- [116] Krogulski A., Borkowska M., Strusiński A., 1998. *Determination of the mutagenic activity of cyclohexane extract of atmospheric air dust and polycyclic aromatic hydrocarbons on various strains of Drosophila melanogaster*. *Roczn.PZH*, 49, 279–283.
- [117] Künzli N., Kaiser R., Medina S., Studnicka M., Chanel O., Filliger P., Herry M., Horak Jr F., Puybonnieux-Textier V., Quénel P., Schneider J., Seethaler R., Vergnaud J.C., Sommer H., 2000. *Public-health impact of outdoor and traffic-related air pollution: a European assessment*. *The Lancet*, 356, 795–801.
- [118] Kuo C.Y., Cheng Y.W., Chen C.Y., Lee H., 1998. *Correlation between the amounts of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and mutagenicity of airborne particulate samples from Taichung City, Taiwan*. *Envariomental Research, section A*, 78, 43–49.
- [119] Lapin C.A., Gautam M., Zielińska B., Wagner V.O., McClellan R.O., 2002. *Mutagenicity of emission from a natural gas fueled truck*. *Mutat. Res.* 519, 205–209.
- [120] Leiteri J.M.B., Shimkin M.J., Shear K., 1942. *Production of subcutaneous sarcomas in mice with tars extracted from atmospheric dust*. *J. Natl.Cancer Inst.*, 3, 155–165.
- [121] Lenicek J., Sekyra M., Badnarkova K., Benes I., Sipek F., 2000. *Fractionation and chemical analysis of urban air particulate extracts*. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 77(4), 269–288.
- [122] Lewis C.W., Baumgardner R.E., Stevens R.K., Stevens R.K., Claxton L.D., Lewtas J., 1988. *Contribution of woodsmoke and motor vehicle emissions to ambient aerosol mutagenicity*. *Environ. Sci. Technol.*, 22, 968–971.
- [123] Lewis C.W., Stevens R.K., Zweidinger R.B., Claxton L.D., Barraclough D., Klouda G.A., 1991. *Source apportionment of mutagenic activity of fine particle organic in Boise, Idaho*. In: *Air and Waste Management Association Meeting Proceedings (AWMA)*, Vancouver, Canada, 1–12.
- [124] Lewtas J. 1990. *Experimental evidence for the carcinogenicity of air pollutants*. In: L. Tomatis (Ed.) *Air Pollution and Human Cancer*, Heidelberg, Springer-Verlag, 49–61.
- [125] Liu Yu-Qing, Keane M., Ensell M., Miller W., Kashon M., Ong T.M., Mauderly J., Lawson D., Gautam M., Zielińska B., Whitney K., Eberhardt J., Wallace W., 2005. *In vitro genotoxicity of exhaust emissions of diesel and gasoline engine vehicles operated on a unified driving cycle*. *J.Environ.Monit.*, 7 (1), 60–66.
- [126] Löfroth G., Hefner E., Alfheim I. Moller M., 1980. *Mutagenic activity of photocopies*. *Science*, 209, 1037–1039.
- [127] Lubiński W., Toczyska I., Chciałowski A., Płusa T., 2005. *Influence of air pollution on pulmonary function in healthy young men from different regions of Poland*. *Ann. Agric. Environ. Med.*, 12, 1–4.
- [128] Ma T.H., Xu C., Liao S., McConnell H., Jeong B.S., Won C.D., 1996. *In situ monitoring with the Tradescantia bioassays on the genotoxicity of gaseous emissions from a closed landfill site and incinerator*. *Mutation Res.*, 359, 39–52.
- [129] Makhniasvili I., 2003. *Nitrowe pochodne wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w środowisku*. *Bezpieczeństwo pracy* 3, 17–20.
- [130] Margolin B., Kaplan N., Zeiger E., 1981. *Statistical analysis of the Ames Salmonella/microsome test*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78, 37–79.

- [131] Maron D.M., Ames B.N., 1983. *Revised methods for the Salmonella mutagenicity test*. Mutation Res., 113, 173–215.
- [132] Massolo L., Müller A., Tueros M., Rehwagen M., Franck U., Ronco A., Herbarth O., 2002. *Assessment of mutagenicity and toxicity of different-size fractions of air particulates from La Plata, Argentina, and Leipzig, Germany*. Environ.Toxicol. 17, 219–231.
- [133] Matsumoto Y., Sakai S., Kato T., Nakajima T., Satoh H., 1998. *Long-term trends of particulate mutagenic activity in the atmosphere of Sapporo. Determination of mutagenic activity by the conventional tester strains TA 98 and TA 100 during an 18-year period (1974–1992)*. Environ.Sci.Technol., 32, 2665–2671.
- [134] Matsushima T., Sugimura M., Nagao T., Yahagi A., Shurai A., Sawamura M., 1980. *Factors modulating mutagenicity in microbial tests*. In: Norpoth K.H., Garner R.C. Eds: Short-Term Test Systems o Detecting Carcinogens, Springer, Berlin, 273–285.
- [135] McCann J., Ames B., 1976. *Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella test: Assay of 300 chemicals: Discussion*. Proc.Nat.Acad.Sci., 73(3), 950–954.
- [136] Mejbaum-Katzenellenbogen W., Mochnacka I., 1969. *Practical course of biochemistry* (in Polish), PWN, Warszawa.
- [137] Menck H.R., Casagrande J.T., Henderson B.E., 1974. *Industrial air pollution: possible effect on lung cancer*. Science, 183, 210–212.
- [138] Mičičeta K., Murín G., 1998. *Three species of genus Pinus suitable as bioindicators of polluted environment*. Water, Air, Soil Poll., 104, 413–422.
- [139] Microbs 1995. Microbs Mutatox™, Manual Genotoxicity Test System, Azur Environmental, UK.
- [140] Mielżyńska D., Siwińska E., Kapka L., Szyfter K., Knudsen L.E., Merlo D.F., 2006. *The influence of environmental exposure to complex mixtures including PAHs and lead on genotoxic effects in children living in Upper Silesia, Poland*. Mutagenesis 21 (5), 295–304.
- [141] Mielżyńska D., Siwińska E., Kapka L., 2002. *Efekt mutageny pyłów zawieszonych w powietrzu jako wskaźnik jakości powietrza*. Instytut Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego, Sosnowiec, ISBN-83-909595-5-9.
- [142] Mohin G.R., 1981. *Bacterial systems for carcinogenicity testing*. Mutation Research. 87, 191–210.
- [143] Mortelmans K., Zeiger E., 2000. *The Ames Salmonella/microsome mutagenicity test*. Mutation Research, 455, 29–60.
- [144] Motykiewicz G., Szeliga J., Cimander B., Choraży M., 1989. *Seasonal variations in mutagenic activity of air pollutants at an industrial district of Silesia*. Mutation Res. 223, 243–251.
- [145] Motykiewicz G., Cimander B., Szeliga J., Tkocz A., Choraży M., 1990. *Mutagenic activity of complex air pollutants in Silesia*. Complex Mixtures and Cancer Risk, 261–268.
- [146] Motykiewicz G., Hadnagy W., Seemayer N.H., Szeliga J., Tkocz A., Choraży M., 1991. *Influence of airborne suspended matter on mitotic cell division*. Mutation Res., 260, 195–202.
- [147] Motykiewicz G., Pendzich J., 1991. *Genotoxic activity of air pollutants*. Biotechnologia. 13–14, 112–119.
- [148] Möller L., Lax I., Torndal U., Eriksson L.C., 1993. *Risk assessment of nitrated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. Risk Analysis, 3, 291–299.
- [149] Müller A., Azuet P., Herbarth O., Ronco A., 2001. *Assessment of toxicity and mutagenicity in air particulate matter from an urban industrial area in the coast of the Rio de la Plata*. Inc. Environ. Toxicol., 16, 151–157.
- [150] Nisbet I.C.T., LaGgy P.K., 1992. *Toxic (TETs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)*. Reg. Toxicol. Pharmacol., 16, 290–300.
- [151] Nishioka M.G., Howard C.C., Lewtas J., 1988. *Detection of hydroxylated nitro polycyclic aromatic compounds in an ambient air particulate extract using bioassay-directed fractionation*. Environ. Sci. Technol., 22, 908–915.

- [152] Nikoyan A., De Meo M., Sari- Minodier I., Chaspoul F., Gallice P., Botta A., 2007. Evaluation of a battery of Salmonella typhimurium tester strains for biomonitoring of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons, nitroarenes and aromatic amines. *Toxicol. Environ. Mutag.*, 626 (1–2), 88–101.
- [153] Nylund L., Hakala E., Sorsa M., 1992. *Application of a semi- automate SOS chromotest for measuring genotoxicities of complex enviromental mixtures containing polycyclic aromatic hydrocarbons*. *Mutation Res.* 276, 125–132.
- [154] Ohgake H., Matsukura K., Morino K., Kawachi T., Sugimura T., Morita K., Tokiwa H., Hirota T., 1982. *Carcinogenicity in rats of the mutagenic comounds 1-nitropyrene and 3-nitrofluoranthene*. *Cancer Lett.* 15, 11–7.
- [155] Ong T., Mukhtar M., Wolf C.R., Zeiger E., 1980. *Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S9 from rat liver*. *J. of Environ. Pathol. Toxicol.*, 4, 55–65.
- [156] Østby L., Engen S., Melbye A., Eide I., 1997. *Mutagenicity testing of organic extracts of diesel exhaust particles after fractionation and recombination*. *Arch.Toxicol.*, 71, 314–319.
- [157] Pedersen D.U., Durant J.L., Taghizadeh K., Hemond H.F., Lafleur A.L., Cass G.R., 2005. *Human cell mutagens in respirable airborne particles from the northeastern United States. 2. Quantification of mutagens and other organic compounds*. *Environ. Sci. Technol.*, 39 (24), 9547–9560.
- [158] Piekarska K., Karpińska-Smulikowska J., 2005. *Aktywność mutagenna prób powietrza pochodzących z terenu miasta Wrocławia*. II Kongres Inżynierii Środowiska, Monografie Komitetu Inżynierii Środowiska PAN, 33, 675–682.
- [159] Piekarska K., Karpińska-Smulikowska J., 2007. *Mutagenic activity of environmental air samples from the area of Wrocław*. *Polish Journal of Environmental Studies*, 16 (5), 757–764.
- [160] Piekarska K., Karpińska-Smulikowska J., 2007. *Sezonal variability in mutagenicity of airborne particulate pollution in Wrocław urban area*. *Polish Journal of Environmental Studies*, 16 (3B), 408–413.
- [161] Piekarska K., Karpińska-Smulikowska J., 2006. *Zastosowanie testu preinkubacyjnego jako metody zwiększenia wykrywalności mutagennych zanieczyszczeń w powietrzu aglomeracji miejskiej bakterieryjnym testem Ames (testem Salmonella)*. *Medycyna Środowiskowa*, 9(2), 87–95.
- [162] Piekarska K., Karpińska-Smulikowska J., 2006. *Effect of microsomal fraction induction on the detectability of mutagenic air pollutants by means of the Ames bacterial mutagenicity test*. *Environment Protection Engineering* 32(4), 15–23.
- [163] Piekarska K., Karpińska-Smulikowska J., 2006. *Wpływ indukcji frakcji mikrosomalnej na wykrywalność mutagennych zanieczyszczeń powietrza frakcji PM10 bakterieryjnym testem Ames*. W: *Ochrona powietrza atmosferycznego. Osiągnięcia w nauce, energetyce i przemyśle*. Praca zbiorowa pod red. A. Musialik-Piotrowskiej i J.D. Rutkowskiego. Wrocław: PZITS Sekcja Główna Inżynierii Ochrony Atmosfery, 175–180.
- [164] Pitts Jr. J.N., Van Cauwenberghe K.A., Grosjean D., Schmid J.P., Fitz D.R., Belser Jr. W.L., Knudson G.B., Hynds P.M., 1978. *Atmospheric reactions of polycyclic aromatic hydrocarbons: facile formation of mutagenic nitro derivatives*. *Science*, 202, 515–519.
- [165] Pitts Jr. J.N., Van Cauwenberghe K.A., Grosjean D., Belsar Jr. W.L., Knudson G.B., Hynds P.M., 1978. *Chemical and microbiological studies of mutagenic pollutants in real and simulated atmospheres*. In: *Applications of Short-term Bioassays in the Fractionation and Analysis of Complex Environmental Mixtures*. Ed by Waters M.D., Nesnow S., Huisinigh J.L., Sandhu S.S., Claxton L., Plenum Press, New York, NY, 353–380.
- [166] Prefontaine D., Morin A., Jumarie C., Porter A., 2006. *In vitro bioactivity of combustion products from 12 tobacco constituents*. *Food Chem.Toxicol.*, 44 (5), 724–738.
- [167] Prepared for the IPCS by the International Commision for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. *Guide to short-term tests detecting mutagenic and carcinogenic chemicals*, Environmental Health Criteria 51, WHO, Geneva, 1985.

- [168] Pryček J., Ciganek M., Šimek Z., 2004. *Development of an analytical method for polycyclic aromatic hydrocarbons and their derivatives*. Journal of Chromatography, 1030, 103–107.
- [169] Pyysalo H., Tuominen J., Wickström K., Skyttä E., Tikkanen L., Salomaa S., Sorsa M., Nurmela T., Mattila T., Pohjola V., 1987. *Polycyclic organic material (POM) in urban air. Fractionation, chemical analysis and genotoxicity of particulate and vapour phases in an industrial town in Finland*. Atmos. Environ. 21, 1167–1180.
- [170] *Raport o stanie środowiska w Województwie Dolnośląskim 2002 r.* Biblioteka Monitoringu Środowiska 2003. Wydanie I. Redakcja WIOŚ.
- [171] Risom L., Møller P., Loft S., 2005. *Oxidative stress- induced DNA damage by particulate air pollution*. Mutat. Res. 592, 119–137.
- [172] Roepstorff V., Ostefeld N., Autrup H., 1990. *Extracts of airborne particulates collected at different locations in the Copenhagen area induce the expression of cytochrome P-450IA1*. J. Toxicol. Environ. Health, 30, 225–237.
- [173] Rosenkranz H. S., Mermelstein R., 1983. *Mutagenicity and genotoxicity of nitroarenes: all nitro-containing chemicals were not created equal*. Mutat. Res. 114, 217–267.
- [174] Rosenkranz H. S., McCoy E.C., Sanders D. R., Butler M., Kiriazides D. K., Mermelstein R., 1980. *Nitropyrenes: Isolation, identification and reduction of mutagenic impurities in carbon black and toner*. Science 209, 1039–1043.
- [175] Rossi C., Poli P., Buschini A., Cassoni F., Cattani S., De Munari E., 1995. *Comparative investigations among meteorological conditions, air chemical- physical pollutants and airborne particulate mutagenicity: a long- term study (1990–1994) from a northern Italian town*. Chemosphere, 30, 1829–1845.
- [176] Rutkowski J.D., 1989. *Źródła zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego*. Oficyna Politechniki Wrocławskiej, Wrocław.
- [177] Sadowska A., Obidowska G., Rumowska M., 2000. *Ekotoksykologia. Toksyczne czynniki środowiskowe i metody ich wykrywania*. Wydawnictwo SGGW, Warszawa.
- [178] Sapota A., 2002. *Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (substancje smołowe rozpuszczalne w cykloheksanie). Dokumentacja proponowanych wartości dopuszczalnych poziomów narażenia zawodowego*. Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy, R. 18, 2(32), 179–208.
- [179] Sasaki J., Arey J., Harger W. P., 1995. *Formation of mutagens from the photooxidations of 2-4-ring PAH*. Envir. Sci. Technol. 29, 1324–1335.
- [180] Sayama M., Mori M., Shoi M., 1998. *Mutagenicities of 2,6-dinitrotoluenes and their reduced products in Salmonella typhimurium nitroreductase- and O-acetyltransferase- overproducing Ames test strains*. Mutation Research 420, 27–32.
- [181] Scarpato R., Di Marino F., Strano A., Curti A., Campagna R., Loprieno N., Barrai I., Barale R., 1993. *Two years' air mutagenesis monitoring in a northwestern rural area of Italy with an industrial plant*. Mutation Res. 319, 293–301.
- [182] Scheepers P.T., Martens M.H., Velders D.D., Fijneman P., van Kerkhoven M., 1995. *1-Nitropyrene as a marker for the mutagenicity of diesel exhaust-derived particulate matter in workplace atmospheres*. Environ. Mol. Mutagen. 25(2), 134–147.
- [183] Schlegel H.G., 2003. *Mikrobiologia ogólna*. PWN, Warszawa.
- [184] Schürer C.C., Seemayer N.H., Manojlovic N., 1983. *Induction of sister chromatid exchange in human lymphocytes in vitro by extracts of airborne particulate matter: comparison of samples from highly industrialized area followed up for several years*. Mutation Res. 113, 347–351.
- [185] Seemayer N.H., Manojlovic N., Schürer C.C., Tomingas R., 1984. *Cell cultures as tool for detection of cytotoxic, mutagenic and carcinogenic activity of airborne particulate matter*. J. Aerosol Sci. 15, 426–430.
- [186] Seemayer N.H., Schürer C.C., König H., Manojlovic N., 1985. *Mutagenicity of airborne pollutants: induction of point mutations and sister chromatid exchanges in tissue culture cells*. Mutation Res. 147, 134–135.
- [187] Seńczuk W. i in., 1994. *Toksykologia*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.

- [188] Smolik E., *Wielopięścieniowe węglowodory aromatyczne*.
http://www.ietu.katowice.pl/wpr/Dokumenty/Materialy_szkoleniowe/Szkol2/10-smolik.pdf
- [189] Stead A., Hasselblad V., Creason J., Claxton L., 1981. *Modeling the Ames test*. Mutation Res., 85, 13–27.
- [190] Strandell M., Zakrisson S., Alsberg T., Westerholm R., Winquist L., Rannug U., 1994. *Chemical analysis and biological testing of polar fraction of ambient air, diesel engine, and gasoline engine particulate extracts*. Environmental Health Perspectives 102, Supplement 4, 85–92.
- [191] Sugimura T., Takayama S., 1983. *Biological action of Nitroarenes in Short-Term Tests on Salmonella, Cultured Mammalian Cells and Cultured Human Tracheal Tissues: possible basis for regulatory control*. Environmental Health Perspectives 47, 171–176.
- [192] Suzuki M., Matsui K., Yamada M., 1997. *Construction of mutants of Salmonella typhimurium deficient in 8-hydroxyguanine DNA glycosylase and their sensitivities to oxidative mutagens and nitro compounds*. Mutation Res., 393, 233–246.
- [193] Szeliga J., Chorąży M., Cimander B., 1991. *Ilościowa i jakościowa analiza chemiczna ekstraktów pyłu zawieszonego w powietrzu na terenie województwa katowickiego*. Biotechnologia, 3–4 (13–14), 103–114.
- [194] Szeszenia-Dabrowska M., 1994. *Skutki zdrowotne zanieczyszczenia środowiska*. Biblioteka Monitoringu Środowiska, PIOŚ, Warszawa.
- [195] *The desk encyclopedia of microbiology*, 2004. Edited by Moselio Schaechter, Elsevier Academic Press.
- [196] Szymańska K., Kołakowski T., Sarafin M., Waszczyk T., 2005. *Stan zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego w aglomeracji gdańskiej w roku 2004 i informacja o działalności fundacji ARMAAG*. Agencja Regionalnego Monitoringu Atmosfery Aglomeracji Gdańskiej.
- [197] Tokiwa H., 1983. *Demonstration of powerful mutagenic dinitropyrene in airborne particulate matter*. Mutat. Res., 121(2), 107–116.
- [198] Tokiwa H., Ohnishi Y., 1986. *Mutagenicity and carcinogenicity of nitroarenes and their sources in the environment*. CRC Crit. Rev. Toxicol., 17, 23–60.
- [199] Traczewska T.M., Piekarska K., 2004. *Mutagenic activity of chlorine by-products of water micro-contaminants-model research*. W: European Symposium on Environmental Biotechnology. Ed. by W. Verstraete. Oostende, Belgium, 25–28 April 2004. Leiden [i in.]: A.A. Balkema, cop., 463–466, ESEB.
- [200] Trusz-Zdybek A., Chmielecka A., Traczewska T., Piekarska K., 2007. *Methods applied in assessment of drinking water mutagenicity results*. Polish Journal of Environmental Studies. 16, nr 2A, pt. 2, 227–233.
- [201] Walker R.D., Connor T.H., MacDonald E.J., Trieff N.M., Legator M.S., MacKenzie K.W., Dobbins J.G., 1982. *Correlation of mutagenic assessment of Houston air particulate extracts in relation to lung cancer mortality rates*. 28, 303–312.
- [202] Wang C.Y., Lee M.S., King C.M., Warner P.O., 1980. *Evidence for nitroaromatics as direct acting mutagens of airborne particulates*. Chemosphere 9, 83–87.
- [203] Warzecha L., Stróżyk M., 1998. *Application of high performance liquid chromatography with fluorescence for determination of nitroarenes, after their reduction to aromatic amines*. Chemia Analityczna, 43(5), 807–816.
- [204] Watanabe M., Sofuni T., Nohmi T., 1993. *Comparison of the sensitivity of Salmonella typhimurium strains YG 1024 and YG 1012 for detecting the mutagenicity of aromatic amines and nitroarenes*. Mutat. Res. 301, 7–12.
- [205] Watanabe M., Ishidate M. Jr., Nohmi T., 1990. *Sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes and aromatic amines: new derivatives of Salmonella typhimurium tester strains possessing elevated O-acetyltransferase levels*. Mutat. Res. 234, 337–348.
- [206] Watanabe M., Ishidate M. Jr., Nohmi T., 1989. *A sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes: construction of nitroreductase-overproducing derivatives of Salmonella typhimurium strains TA 98 i TA 100*. Mutat. Res. 216, 211–220.

- [207] Watanabe T., Kohan M.J., Walsh D., Ball L.M., DeMarini D.M., Lewtas J., 1995. *Mutagenicity of nitrodibenzopyranones in the Salmonella plate-incorporation and microsuspension assays*. Mutation Res., 345, 1–9.
- [208] Weisburger E., Russfield A. B., Homburger F., Weisburger J. H., Boger E., van Dongen C.G., Chu K.O., 1978. *Testing of twenty-one environmental aromatic amines or derivatives for long-term toxicity or carcinogenicity*. J. Environ. Pathol. Toxicol. 2, 325–356.
- [209] Van't Hof J., Schreier L.A., 1982. *Tradescantia assay system for gaseous mutagens, a report of U.S EPA Gene-Tox Program*. Mutation Res., 99, 303–315.
- [220] Vargas V.M.F., 2003. *Mutagenic activity as a parameter to assess ambient air quality for protection of the environment and human health*. Mutat. Res. 544, 313–319.
- [211] Villalobos-Pietrini R., Amador-Munoz O., Waliszewski S., Hernandez-Mena L., Munive-Colin Z., Gomez-Arroyo S., Bravo-Cabrera J.L., Frias-Vellegas A., 2006. *Mutagenicity and polycyclic aromatic hydrocarbons associated with extractable organic matter from airborne particles 10 µm in southwest Mexico City*. Atmos. Environ., 40 (30), 5845–5857.
- [212] Vineis P., Husgafvel-Pursiainen K., 2005. *Air pollution and cancer: biomarker studies in human populations*. Carcinogenesis, 26 (11), 1846–1855.
- [213] Vinitketkumnuen U., Kalayanamitra K., Chewonarin T., Kamens R., 2002. *Particulate matter, PM 10 and PM 2,5 levels, and airborne mutagenicity in Chiang Mai, Thailand*. Mutation Research. 519, 121–131.
- [214] Yahagi T., Degawa M., Seino Y., Matsushima T., Nagao M., Sugimura T., Hashimoto Y., 1975. *Mutagenicity of carcinogenic azo dyes and their derivatives*. Cancer Lett. 1, 91–96.
- [215] Yahagi T., Nagao M., Seino Y., Matsushima T., Sugimura T., Okada M., 1977. *Mutagenicities of N-Nitrosamines on Salmonella*. Mutat. Res., 48, 121–130.
- [216] Yan J., Wang L., Fu P.P., Yu H., 2004. *Photomutagenicity of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons from the US EPA priority pollutant list*. Mutat. Res., 557, 99–108.
- [217] Yamanaka H., Nago M., Sugimura T., Furuya T., Shirai A., Matsushima T., 1979. *Mutagenicity of pyrrolizidine alkaloids in the Salmonella/mammalian-microsome test*. Mutat. Res., 68(3), 211–216.
- [218] Yuan F.S., Ma Y.P., Zhao W.H., 2005. *Effects of airborne particles on micronuclear frequency of human binucleate lymphocytes*. J. Environ. Health, 22 (4), 277–278.
- [219] Zaciera M., 2006. *Metoda oznaczania nitrowych pochodnych WWA w powietrzu*. W: Ochrona powietrza w teorii i praktyce. pod red. J. Konieczynskiego. Instytut Podstaw Inżynierii Środowiska Polskiej Akademii Nauk w Zabrzu.
- [220] Zakrzewski S.F., 2001. *Podstawy toksykologii środowiska*, PWN, Warszawa.
- [221] Zielinska B., Arey J., Atkinson R., McElroy P.A., 1989. *Formation of methylnitronaphthalenes from the gas-phase reactions of 1- and 2-methylnaphthalene with OH radicals and N₂O₅ and their occurrence in ambient air*. Envir. Sci. Technol. 23, 723–729.
- [222] Zwoździak J., Jadczyk P., Kucharczyk J., 2001. *Seasonal variability of the mutagenicity of airborne particles in the town center*. J. Aerosol Sci. 32, 409–423.
- [223] Zwoździak J., Sówka I., Zwoździak A., 2002. *Specyfika aerozolu miejskiego*. W: Człowiek Środowisko Zagrożenie, pod red. Jerzego Zwoździaka, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 111–115.

Modified *Salmonella* assays for mutagenicity assessment of atmospheric dust pollutants

The aim of this work was to select such a procedure of the *Salmonella* assay that would lead to a highly sensitive detection of mutagenic contaminants adsorbed on dust particles suspended in the atmospheric air within urban agglomerations. Increased sensitivity of the assay is extremely important, as in order to detect a mutagenic activity of airborne organic pollutants, considerable air volumes have to be collected, which is a hindrance to introduction of the assay in a routine monitoring the atmospheric pollution.

The study included: sampling suspended dust from the Wrocław urban area, extraction of the dust collected, chromatographic and biological analyses. Investigations were based on a classical *Salmonella* assay, classical assay without NADP as an S9-mix component, assay using 10-fold higher bacteria count, preincubation assay at a the temperature of 30 °C and 37 °C, Kado-modified assay and the Mini assay – a sort of compiled classical assay and the Kado-modified assay. Suitability comparison was made between a microsomal fraction previously activated with a standard inductor such as the extremely dangerous Aroclor 1254, a phenobarbital-induced fraction, and a microsomal fraction, that had not been previously induced.

The results obtained confirmed the *Salmonella* assay usability for the purpose of the atmospheric pollution monitoring within urban agglomeration. The extracts of atmospheric pollutants under examination differed in a total content and a percentage of individual compounds, depending on the place and the season of sampling. The highest total PAH content and the highest nitro-PAH content in the samples tested as well as the most extensive range of the compounds detected were found in winter season. The highest mutagenicity was noted for the samples collected in wintertime. High values of mutagenicity ratios were obtained from assays carried out both with and without metabolic activation, which testifies to the presence of both promutagens and direct mutagens. The mutagens contained in suspended dust extracts evoked a stronger response of the TA 98 and YG 1041 strains, compared to the TA 100 and YG 1042 strains, which means that to the most part those were compounds able to induce such mutations as the reading phase changes. The YG 1041 strain proved to be the most effective in the detection of mutagenicity of the suspended dust extracts, due to its

notably high sensitivity to nitro-aromatic compounds. Ther results obtained from the investigations are indicative of the effectiveness of a classical assay performed by using a phenobarbital-induced microsomal fraction, with no NADP introduced in the assay for the detection of promutagens by the TA 98 strain. In the case of the YG 1041 strain, good results were obtained when performing a classical assay at 10-fold higher bacteria count, without NADP addition. The *Salmonella* assay as modified by Kado and the preincubation assay proved to be highly effective for both strains. Comparative examination of microsomal fractions used in assays has shown that the Aroclor 1254-activated microsomal fraction can be substituted by a phenobarbital-induced fraction or for a non-induced fraction in the investigations on mutagenic airborne pollutants in urban agglomerations. Aroclor is a very expensive preparation of excellent chemical stability, and its trace amounts cause cancer-linked mutations. Phenobarbital is a safe and far cheaper preparation. According to the study results, each time the optimal concentration of a microsomal fraction has to be selected in relation to an environmental sample, and not to a standard mutagen. Also, if an assay includes a preincubation step, each time before starting experiments, a suitable duration of the preincubation step has to be selected. It was proved namely that the optimum preincubation time would be different, depending on the type of a strain, preincubation temperature and the type of a microsomal fraction.



Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów, oznaczeń i określeń	7
1. Wstęp	8
2. Założenia i cel pracy	11
3. Stan zagadnienia	15
3.1. Pyłowe zanieczyszczenia powietrza	15
3.2. Czynniki mutagenne i rakotwórcze w powietrzu atmosferycznym	18
3.3. Zanieczyszczenia powietrza a skutki zdrowotne	19
3.4. Biologiczne metody oceny aktywności mutagennej pyłowych zanieczyszczeń powietrza ...	24
3.4.1. Testy z użyciem bakterii	26
3.4.1.1. Test <i>Salmonella</i> (Amesa)	27
3.4.1.2. Inne testy z wykorzystaniem bakterii	31
3.4.2. Metody cytogenetyczne	32
3.4.2.1. Test na wykrywanie adduktów w DNA	32
3.4.2.2. Test na wykrywanie aberracji chromosomowych (CA)	33
3.4.2.3. Test na wykrywanie wymiany chromatyd siostrzanych (SCE)	33
3.4.2.4. Test mikrojądrowy	34
3.4.2.5. Testy na badanie częstości mutacji w hodowlach komórek ssaków <i>in vitro</i> ..	34
3.4.3. Testy na organizmach eukariotycznych	35
3.4.3.1. Testy z zastosowaniem drożdży	35
3.4.3.2. Test SMART	35
3.4.3.3. Testy z zastosowaniem roślin wyższych	36
3.5. Test <i>Salmonella</i> w badaniach nad mutagennością pyłowych zanieczyszczeń powietrza atmosferycznego	37
4. Przedmiot i zakres badań	43
5. Metody badań	45
5.1. Pobór próbek pyłów zawieszonych	45
5.1.1. Wysokoprzepływowo aspirator powietrza stosowany w badaniach	46
5.2. Ekstrakcja próbek pyłów zawieszonych	48
5.3. Metody analityczne	48
5.4. Metody biologiczne	50
5.4.1. Przygotowanie ekstraktów pyłów do badania mutagenności	50
5.4.2. Sprawdzenie szczepów testowych	50
5.4.3. Przygotowanie frakcji mikrosomalnych	52
5.4.4. Oznaczenie optymalnego stężenia frakcji mikrosomalnych do testu <i>Salmonella</i>	54
5.4.5. Opis klasycznej procedury testu <i>Salmonella</i> i jej modyfikacji	55
5.4.5.1. Klasyczny test <i>Salmonella</i> (test Ames) (I)	56
5.4.5.2. Klasyczny test <i>Salmonella</i> bez udziału NADP (II)	56

5.4.5.3. Klasyczny test <i>Salmonella</i> bez udziału NADP ze zwiększoną ilością bakterii (III)	57
5.4.5.4. Klasyczny test <i>Salmonella</i> ze zwiększoną ilością bakterii (IV)	58
5.4.5.5. Klasyczny test <i>Salmonella</i> z preinkubacją prowadzoną w temperaturze 37 °C (V) i 30 °C (VI)	58
5.4.5.6. Test <i>Salmonella</i> w modyfikacji Kado (VII)	59
5.4.5.7. Klasyczny test <i>Salmonella</i> w formie Mini z preinkubacją prowadzoną w temperaturze 37 °C (VIII)	59
5.4.6. Sposób przedstawienia wyników	60
5.5. Porównanie wybranych procedur testu na ekstraktach pyłów pobranych w trzech punktach miasta	62
6. Omówienie wyników badań	63
6.1. Pobór i analiza chemiczna próbek pyłów	63
6.2. Ustalenie optymalnego stężenia frakcji dla klasycznej metody testu <i>Salmonella</i> i testu w modyfikacji Kado	66
6.3. Wpływ modyfikacji klasycznego testu <i>Salmonella</i> na rezultaty badań	73
6.3.1. Wyniki testów z udziałem szczepu <i>Salmonella typhimurium</i> TA98	74
6.3.2. Wyniki testów z udziałem szczepu <i>Salmonella typhimurium</i> TA100	90
6.3.3. Wyniki testów z udziałem szczepu <i>Salmonella typhimurium</i> YG1041	103
6.3.4. Wyniki testów z udziałem szczepu <i>Salmonella typhimurium</i> YG1042	117
6.4. Porównanie wybranych procedur testu na ekstraktach pyłów pobranych w trzech punktach miasta	130
6.4.1. Wyniki testów z udziałem próbki pyłów (1) pobranej latem na ul. Strachocińskiej	131
6.4.2. Wyniki testów z udziałem próbki pyłów (2) pobranej latem na pl. Grunwaldzkim	135
6.4.3. Wyniki testów z udziałem próbki pyłów (3) pobranej zimą na ul. Strachocińskiej	140
6.4.4. Wyniki testów z udziałem próbki pyłów (4) pobranej zimą na pl. Grunwaldzkim	145
6.4.5. Wyniki testów z udziałem próbki pyłów (5) pobranej wiosną na ul. Norwida	150
7. Dyskusja wyników	155
8. Wnioski	177
Literatura	180

PRACE NAUKOWE INSTYTUTU INŻYNIERII OCHRONY ŚRODOWISKA
(wydane w latach 1993–2008)

- Nr 69, Monografie nr 36, S. Hławiczka, *Uciążliwości zapachowe jako element ocen oddziaływania na środowisko*, Wrocław 1993
- Nr 70, Monografie nr 37, A. Mika, *Fotochemiczna konwersja energii*, Wrocław 1994
- Nr 71, Monografie nr 38, A. Kotowski, *Podstawy wymiarowania bocznych przelewów burzowych z rurą dławiącą*, Wrocław 1998
- Nr 72, Monografie nr 39, J. Bednarski, *Pośrednie chłodzenie wyparne w klimatyzacji*, Wrocław 1999
- Nr 73, Monografie nr 40, J.S. Pastuszka, *Narażenie na aerozole ziarniste, włókniste i biologiczne (bakterie i grzyby mikroskopijne) populacji generalnej Górnośląskiego Okręgu Przemysłowego*, Wrocław 2001
- Nr 74, Monografie nr 41, J. Danielewicz, *Rury cieplne w inżynierii środowiska*, Wrocław 2002
- Nr 75, Monografie nr 42, T.M. Traczewska, *Biotoksyczność produktów mikrobiologicznych przemian antracenu i fenantrenu w wodzie oraz możliwości ich usuwania*, Wrocław 2003
- Nr 76, Monografie nr 43, T. Marcinkowski, *Alkaliczna stabilizacja komunalnych osadów ściekowych*, Wrocław 2004
- Nr 77, Monografie nr 44, B. Kołwzan, *Bioremediacja gleb skażonych produktami naftowymi wraz z oceną ekotoksykologiczną*, Wrocław 2005
- Nr 78, Monografie nr 45, M. Głomba, *Oczyszczanie gazów odlotowych w poziomych skrubarach natryskowych*, Wrocław 2005
- Nr 79, Monografie nr 46, K. Grabas, *Zagrożenia środowiska na terenach poeksploatacyjnych rud uranu oraz ich likwidacja*, Wrocław 2006
- Nr 80, Monografie nr 47, G. Płaza, *Bioremediacja gruntów zanieczyszczonych związkami ropopochodnymi*, Wrocław 2006
- Nr 81, Konferencje nr 12, *Recykling i odzysk materiałów polimerowych*, Wrocław 2006
- Nr 82, Studia i Materiały nr 22, *Interdyscyplinarne zagadnienia w inżynierii i ochronie środowiska*, Wrocław 2006
- Nr 83, Monografie nr 48, A. Kmiec, S. Englart, A. Ludwińska, *Teoria i technika fluidyzacji*, Wrocław 2007
- Nr 84, Monografie nr 49, H. Hotłoś, *Ilościowa ocena wpływu wybranych czynników na parametry i koszty eksploatacyjne sieci wodociagowych*, Wrocław 2007
- Nr 85, Monografie nr 50, E. Przydróżny, *Wysokosprawne systemy wentylacji i klimatyzacji – technologia i projektowanie*, Wrocław 2007
- Nr 86, Monografie nr 51, A. Szymanek, *Odsiarczanie spalin aktywowanymi mechanicznie odpadami wapniowymi*, Wrocław 2008



BIBLIOTEKA GŁÓWNA

337103 L/1

Wydawnictwa Politechniki Wrocławskiej
są do nabycia w księgarni
„Tech”
plac Grunwaldzki 13, 50-377 Wrocław
budynek D-1 PWr., tel. 071 320 29 35
Prowadzimy sprzedaż wysyłkową

ISSN 0084-2869