

ZASTOSOWANIE TESTÓW KRÓTKOTERMINOWYCH DO OCENY STOPNIA SKAŻENIA POWIETRZA ATMOSFERYCZNEGO

Katarzyna PIEKARSKA*, Marzena ZACIERA**, Anna CZARNY***
Ewa ZACZYŃSKA***

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

** Zakład Szkodliwości Chemicznych, Instytut Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego,
ul. Kościelna 13, 41- 200 Sosnowiec

*** Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. Weigla 12, 53- 114 Wrocław
katarzyna.piekarska@pwr.wroc.pl

STRESZCZENIE

Przedstawiono wyniki analiz pyłu zawieszonego w dwóch punktach Wrocławia (centrum i peryferie) w okresie zimowym i letnim. Próbkę pyłu pobierano na filtry szklane przy pomocy wysoko-przepływowego aspiratora powietrza Staplex-PM10. Ekstrakcję prowadzono dichlorometanem w aparacie Soxhleta. Badania mutagenności dichlorometanowych ekstraktów prowadzono w oparciu o klasyczny test *Salmonella*. W teście stosowano dwa szczepy *Salmonella typhimurium* TA98 i YG1041. Genotoksyczność organicznych zanieczyszczeń powietrza wykrywano przy użyciu zminiaturyzowanego SOS chromotestu pozyskanego z EBPI (Brampton, Ontario, Canada). Testy bakteryjne wykonywano bez i z aktywacją metaboliczną frakcją mikrosomalną S9. Badania cytotoksycznego działania ekstraktów pyłów przeprowadzono metodą bezpośredniego ich kontaktu z jednowarstwową hodowlą komórek nabłonkopodobnych ludzkiego raka płuc – A549.

1. Wstęp

Obserwuje się stały wzrost zachorowalności na choroby nowotworowe. Zjawisko to łączy się z pogarszaniem warunków środowiskowych, które wywierają niekorzystny wpływ na organizmy żywe [1]. Istotne znaczenie w całkowitej puli zanieczyszczeń, które wnikają do organizmu człowieka, mają zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego. Powietrze stanowi nośnik ksenobiotyków na które narażony jest organizm człowieka drogą oddechową [2]. W zanieczyszczonym powietrzu atmosferycznym występuje ponad 2000 związków z różnych klas chemicznych, które tworzą bardzo złożone mieszaniny o nieznanymi właściwościami biologicznymi [3]. Większość zanieczyszczeń powietrza to zanieczyszczenia gazowe. Drugą grupę zanieczyszczeń stanowią zanieczyszczenia pyłowe (PM, ang. particulate matter), będące złożoną mieszaniną substancji organicznych i nieorganicznych. Mogą one przyjmować postać od submikrocząstkowych aerozoli do widocznych cząstek pyłów. W zależności od rozmiaru cząstek dzielimy go na pył o średnicach mniejszych niż 10 µm (PM10), mniejszych od 5 µm (PM5), mniejszych od 2,5 µm (PM2,5) i mniejszych od 1 µm (PM1) [4]. Zanieczyszczenia obecne w powietrzu atmosferycznym adsorbują 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 uwalniane są stopniowo związki chemiczne działające na komórki nabłonkowe pęcherzyków płucnych. Następnie przez pęcherzyki płucne przedostają się one do układu

krwionośnego i tą drogą rozprzestrzeniają się po całym organizmie [2]. Wśród nich poważną grupę, stosunkowo dobrze poznaną, stanowią wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA)– związki o działaniu mutagennym i kancerogennym. Źródłem ich emisji są głównie 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 genotoksycznym adsorbującymi się na cząstkach pyłów. Dużą aktywnością mutagenną charakteryzują się także nitrowe, chlorowe i tlenowe pochodne WWA oraz inne niezidentyfikowane jeszcze substancje chemiczne [5, 6].

Standardowe badania powietrza nie obejmują, jak dotąd, określania aktywności biologicznej występujących w nim zanieczyszczeń. Oceny stopnia zanieczyszczenia powietrza dokonuje się poprzez określenie stężenia pyłu zawieszonego oraz WWA z listy USEPA (United State Environmental Protection Agency), a następnie porównanie ich 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. Pełna analiza chemiczna zanieczyszczeń powietrza jest nierealna ze względu na złożoność ich składu oraz ze względu na wzajemne oddziaływania poszczególnych zanieczyszczeń w mieszaninie. Analiza chemiczna nie może więc być podstawą do prognozowania biologicznych skutków jakie mogą zanieczyszczenia wywołać w stosunku do ludzi i zwierząt [7]. Badanie pyłowych zanieczyszczeń powietrza atmosferycznego z zastosowaniem testów krótkoterminowych może stanowić więc bardzo dobre narzędzie w analizie zagrożenia zdrowotnego związanego z obecnością związków chemicznych zaadsorbowanych na pyłach zawieszonych [8].

Celem niniejszej pracy było określenie genotoksyczności i cytotoksyczności zanieczyszczeń chemicznych zaadsorbowanych na cząstkach pyłu zawieszonego PM10 pobranego na terenie Wrocławia. Wrocław to aglomeracja miejsko-przemysłowa w której zanieczyszczenia powietrza pochodzą głównie z trzech źródeł: tzw. niskiej emisji, uciążliwości przemysłowych oraz osobowego i ciężarowego transportu samochodowego. W badaniach stosowano płytkowy test *Salmonella* (test Ames), który ma wysoką zdolność prognozowania czynników mutagennych i potencjalnie kancerogennych oraz został uznany, jako pierwszy test krótkoterminowy, w zestawie metod stosowanych w toksykologii genetycznej [9]. Jest on najpowszechniej stosowanym biotestem w badaniach nad mutagennością pyłowych zanieczyszczeń powietrza atmosferycznego [3, 7, 8]. Genotoksyczność organicznych zanieczyszczeń powietrza wykrywano przy użyciu SOS chromotestu. W literaturze niewiele jest doniesień na temat badań ekstraktów pyłów zawieszonych przy pomocy SOS chromotestu oraz porównania uzyskanych w nich wyników z wynikami testu *Salmonella* [10]. Z kolei badania cytotoksycznego działania ekstraktów pyłów przeprowadzono metodą bezpośredniego ich kontaktu z jednowarstwową hodowlą komórek nabłonkopodobnych ludzkiego raka płuc – A549. Komórki tkanki nabłonkowej płuc stanowią pierwszą linię obronną organizmu w usuwaniu pyłów i bakterii z układu oddechowego. Przydatność linii komórkowych do oceny właściwości cytotoksycznych cząstek respirabilnych została potwierdzona w wielu badaniach [11, 12], przy czym najnowsze badania przeprowadzone w Europie wskazują na zwiększanie się efektu cytotoksycznego, a tym samym roli w powstawaniu oksydacyjnych uszkodzeń DNA, wraz z zmniejszaniem średnicy analizowanych cząstek. Największy efekt cytotoksyczny obserwuje się w przypadku cząstek PM_{0,2}, następnie PM_{2,5-0,2}, a w przypadku cząstek PM_{10-2,5} efekt ten jest najmniejszy [8].

2. Materiały i metody

Materiał do badań stanowiły pyły zawieszone w powietrzu atmosferycznym Wrocławia. Próbki powietrza pobierano za pomocą wysoko-przepływowego pobornika powietrza firmy Staplex PM-10 model FC- 2ETM. Próbki pobierano w okresie letnim (I i II) i zimowym (III i IV) 2007 r. w dwóch punktach miasta. Pierwsze stanowisko usytuowane było na obrzeżu Wrocławia, przy ul. Strachocińskiej (I i III) 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. Drugie stanowisko zlokalizowano w centrum miasta, na Placu Grunwaldzkim (II i IV), przez który prowadzi jedyna droga tranzytowa w kierunku Warszawy. W miejscu tym panuje wzmożony ruch samochodowy przez całą dobę. Czas poboru i objętości pobranych próbek powietrza podano w tabeli 1.

Antyhygroskopijne filtry szklane wraz z pyłami poszczególnych serii badań łączono w jedną próbkę, cięto i wkładano do aparatu Soxhleta. Następnie ekstrahowano dichlorometanem, bez dostępu światła, przez 16 godzin z 15 minutowym refluksiem. Ekstrakty zagęszczano do sucha w wyparce próżniowej i wazono suchą pozostałość w celu określenia ilości substancji smołowych w próbkach. Uzyskane tą drogą suche ekstrakty poddawane były analizie w celu oznaczenia w nich zawartości WWA, nitro-WWA i dinitro-WWA oraz wykorzystywane były jako materiał do testów biologicznych [7].

WWA wchodzące w skład próbek oznaczano techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną, natomiast zawartość nitro-WWA techniką chromatografii gazowej z detekcją mas [3, 13, 14].

Mutagenność pyłów określano w oparciu o bakteryjny test *Salmonella* (test Ames) [15]. Test ten opiera się na sprawdzeniu, czy badany materiał powoduje mutację powrotną (rewersję) specjalnych histydynozależnych (*his⁻*) szczepów bakterii *Salmonella typhimurium* LT2. W badaniach stosowano dwa szczepy testowe *Salmonella typhimurium*: TA98 i YG1041. 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. Szczep YG1041 jest pochodną szczepu TA98 i charakteryzuje się podwyższoną wrażliwością na nitrowe, aminowe i hydroksyloaminowe pochodne WWA [7, 16]. Test wykonywano w wariantach bez i z aktywacją metaboliczną frakcją mikrosomalną S9, aktywowaną Aroclorem 1254, pochodzącą z wątroby szczura rasy Wistar. Mikrosomalna frakcja S9 stosowana była w teście w celu metabolicznej aktywacji promutagenów. Zawartość białka, oznaczana metodą Lowry'ego, we frakcji wynosiła 64,44 mg/cm³. W badaniach stosowano 4% obj. zawartość S9 w mieszaninie S9-mix. Przed przystąpieniem do badań, każdorazowo sprawdzano genotypy szczepów testowych. Określano także liczbę rewertantów indukowanych spontanicznie (kontrola negatywna) oraz liczbę rewertantów indukowanych pod wpływem mutagenów diagnostycznych (kontrola pozytywna). Mutagenami diagnostycznymi dla badań prowadzonych bez aktywacji metabolicznej frakcją S9 były: 2,4,7-trinitro-9-fluorenon (TA98) i 2,6-dinitrotoluen (YG1041), a dla badań prowadzonych w obecności frakcji S9 2-aminofluoren (TA98, YG1041).

Ocenę efektu mutagennego pyłów zawieszonych przedstawiano w postaci współczynnika mutagenności (MR) i mutagenności (M). Współczynnik mutagenności obliczano ze wzoru:

$$MR = \frac{n_i}{n_s}$$

gdzie: n_i i n_s odpowiednio liczba rewertantów indukowanych i rewertantów spontanicznych.

Za mutagenne uznawano próbki, dla których współczynnik mutagenności MR był ≥ 2 . Z kolei mutagenność (M) określano na podstawie najczęściej opisywanej w piśmiennictwie metody Bernstein i inni [17].

Genotoksyczność organicznych zanieczyszczeń powietrza wykrywano przy użyciu zminiaturyzowanego SOS chromotestu pozyskanego z EBPI (Brampton, Ontario, Canada). 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. 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 [18]. Poszczególne rozcieńczenia organicznych ekstraktów zanieczyszczeń powietrza, rozpuszczone w DMSO, wprowadzono do mikrodołków płytek testowych testu, który wykonywano zgodnie z instrukcją dołączoną do zestawu. Badania prowadzono w dwóch powtórzeniach, z i bez aktywacji metabolicznej frakcją mikrosomalną S9. Mutagenami diagnostycznymi były 4-nitrocholino N-tlenek i 2-aminoantracen. Pomiaru absorbancji dokonywano przy długości fali 615 nm (aktywność genotoksyczna) i 405 nm (przeżywalność bakterii) za pomocą spektrofotometrycznego czytnika płytek Sunrise (Tecan, Austria). Ocenę efektu genotoksycznego pyłów zawieszonych przedstawiano w postaci współczynnika indukcji (IF). Współczynnik indukcji obliczano ze wzoru:

$$IF = \frac{R(C)}{R(0)}$$

gdzie: R(C) - specyficzna aktywność β -galaktozydazy dla danego stężenia c badanej próbki,

R(0) - specyficzna aktywność β -galaktozydazy dla kontroli negatywnej.

Badana próbka uznawana była za genotoksyczną jeżeli IF był większy od 1,5.

Badania cytotoksycznego działania ekstraktów pyłów przeprowadzono metodą bezpośredniego kontaktu z jednowarstwową hodowlą komórek nabłonkopodobnych ludzkiego raka płuc – A549 (American Type Culture Collection, Cell Culture Line-ATCC CCL 185). Hodowle komórek A549 prowadzono w płynie hodowlanym Dulbecco z dodatkiem 10% inaktywowanej (30min, 56°C) surowicy cielęcej oraz 100 j/cm³ penicyliny, 100 μ g/cm³ streptomycyny i 2 mM L-glutaminy Na plastikowych, 96-dołkowych płytkach założono jednowarstwową hodowlę komórek A549 o gęstości 2x10⁶/cm³ i inkubowano 24 godziny w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO₂. Po tym czasie usuwano płyn z nad komórek, a na jednowarstwową hodowlę komórek A549 nanoszono odpowiednie stężenia badanych ekstraktów i inkubowano 24, 48 i 72 godziny w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO₂. Kontrolę stanowiły hodowle komórek bez dodatku badanych próbek oraz hodowle komórek z dodatkiem DMSO w takiej samej ilości jak w próbkach badanych. Zmiany ilościowe i morfologiczne, pod wpływem badanych ekstraktów, oceniono po 24, 48 i 72 godzinach w odwróconym mikroskopie. Minimalne stężenie badanych próbek, które powodowało degenerację 50% komórek uznawano za dawkę toksyczną (TCCD₅₀-Tissue Culture Cytotoxic Dose) [19]. Wyniki testu cytotoksycznego przedstawiono w postaci ilości m³ badanego powietrza z którego uzyskany ekstrakt wywoływał jeszcze efekt toksyczny.

3. Dyskusja wyników badań

Stężenia pyłu zawieszonego na wybranych stanowiskach badawczych mieściły się w granicach 38,33 μ g/m³ (II)-138,93 μ g/m³ (III). Z kolei ilości substancji smołowych wahały się od 19,9 μ g/m³ (I) do 145,15 μ g/m³ (III). Na stanowisku III stwierdzono najwyższe ilości zanieczyszczeń pyłowych i substancji smołowych, wynosiły one w zimie 138,93 i 145,15 μ g/m³. Stanowisko to zlokalizowane było na peryferiach miasta w miejscu o natężonym ruchu

komunikacyjnym gdzie przez cały rok wykorzystywane są w dużym stopniu paleniska domowe (tabela 1). Stwierdzone sezonowe różnice pomiędzy ich zawartością pokrywają się z doniesieniami literaturowymi [3, 20]. Różnice te wynikają głównie z faktu zwiększonej emisji pyłów w okresie zimowym na terenie aglomeracji miejskich, pochodzących z procesów spalania na cele grzewcze. Otrzymana ilość pyłu PM10 (38,33-57,17 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ latem i 87,32-138,93 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ zimą) była zbliżona do wartości zmierzonych w okresach wiosenno-letnich i jesienno-zimowych w różnych miastach europejskich (Czechy, Włochy, Belgia, Polska) [7, 11, 21, 22, 23].

Tabela 1. Zestawienie danych dotyczących poboru próbek pyłów PM10

Rodzaj próbki	Czas poboru [h]	Objętość powietrza [m^3]	Masa Pyłów [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]	Masa substancji smołowych [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]
I- Lato (ul. Strachocińska)	67	4 542,6	57.17	19.90
II- Lato (Plac Grunwaldzki)	96	6 474,9	38.33	26.68
III- Zima (ul. Strachocińska)	119	8 035,0	138.93	145.15
IV- Zima (Plac Grunwaldzki)	105	7 069,0	87.32	51.04

Aktywność rakotwórczą wykazują szczególnie węglowodory poliaromatyczne, zawierające od 3 do 6 skondensowanych pierścieni, zaadsorbowane na cząstkach pyłu [4]. W badanych próbkach (tabela 2) stwierdzono obecność tych samych dwunastu WWA z listy normowanych węglowodorów aromatycznych. Największą ilość zaadsorbowanych na pyłach WWA odnotowano w okresie zimowym. Suma wykrytych WWA w tym okresie wahała się w zakresie od 25,824 ng/m^3 do 44,192 ng/m^3 . Z kolei w próbkach pyłów pobranych latem od 2,342 ng/m^3 do 3,61 ng/m^3 . Wśród obecnych w próbkach 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) oraz trzy (beno[b]fluoranten, benzo[k]fluoranten, indeno[1,2,3-c,d]piren) zaklasyfikowane do grupy 2B, przypuszczalnie rakotwórczej dla ludzi [24]. We wszystkich próbkach pyłu stwierdzono duży procentowy udział benzo[a]pirenu, którego stężenia wahały się w zakresie od 0,438 ng/m^3 (II) do 7,788 (III) ng/m^3 . Benzo[a]piren jest związkami wskaźnikowym wobec którego oceniana jest siła działania kancerogennego innych WWA [7]. Dla tego związku przyjęto względny współczynnik kancerogenności 1, większą siłą działania kancerogennego odznacza się tylko benzo[a]antracen ($k = 5$), którego obecność stwierdzono również w badanych ekstraktach. Zawartość benzo[a]pirenu kształtowała się na poziomie 1/5-1/10 sumy zawartości wszystkich WWA. Stanowiło to od 10,3% (IV) do 21,9% (I) całkowitego stężenia WWA w badanych ekstraktach. Stwierdzone stężenia poszczególnych WWA mieściły się w granicach podawanych w literaturze i były najbardziej zbliżone do stężeń wykrywanych na terenach miejskich w Belgii i w Pradze [11, 21, 25, 26].

W badanych próbkach pyłów określano także zawartość nitrowych pochodnych WWA (tabela 3). Nitrowe pochodne WWA ze względu na ich aktywność mutageną należą do najbardziej niebezpiecznych substancji chemicznych stanowiących zagrożenie dla zdrowia człowieka. Przeprowadzone dotąd badania wskazują na niskie stężenia nitro-WWA w powietrzu, stanowiące duże problemy analityczne [14]. Niektóre nitro-WWA 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 z tlenkami azotu w fazie gazowej. Mimo iż nitro-WWA występują w niższych stężeniach w porównaniu do niepodstawionych

węglowodorów aromatycznych, to cechuje je duża trwałość w fazie stałej i wyższa mutagenność (2×10^5 razy) oraz kancerogenność (10 razy), niektórych z nich, w porównaniu z WWA [6]. Suma stężeń tych związków w badanych próbkach wahała się w granicach od 0,29 ng/m^3 (II) do 7,05 ng/m^3 (III). W ekstraktach nie stwierdzono występowania badanych dinitro-WWA w granicach ich oznaczalności. Stwierdzono natomiast występowanie mononitro- pochodnych WWA, wśród których obecne były należące do grupy 2B 2-nitrofluoren i 1-nitopiren. 2-nitrofluoren występował we wszystkich badanych próbkach natomiast obecność 1-nitropirenu stwierdzono tylko w próbkach pobranych zimą. Duże ilości 2-nitrofluorenu wykryto w próbkach pobranych w zimie. W tych ekstraktach pyłu stanowił on około połowę zawartości nitro-WWA. W próbce pobranej latem (I) jego ilość stanowiła około 38%. Najwięcej go było w próbce II (lato), bo aż 100%, ponieważ była to jedyna mononitropochodna wykryta na tym stanowisku. Najwięcej rodzajów związków należących do nitropochodnych WWA wykryto w próbkach pyłów pobranych zimą. Największe ich stężenie stwierdzono w III próbce pobranej zimą na ulicy Strachocińskiej. Wynosiło ono 7,05 ng/m^3 .

Tabela 2. Stężenie WWA w organicznych ekstraktach pyłów PM10

Badany WWA	Stężenie WWA w ekstraktach pyłów [ng/m^3]			
	Lato (I)	Lato (II)	Zima (III)	Zima (IV)
Fen	0,106	0,374	6,252	3,792
A	0,016	0,034	0,856	0,562
Flu	0,270	0,574	4,336	5,314
Pyr	0,150	0,360	11,244	4,58
B[a]A	0,088	0,174	4,24	1,32
Chr	0,120	0,220	3,1	2,28
B[b]F	0,518	0,654	2,8	0,372
B[k]F	0,164	0,222	1,844	0,85
B[a]P	0,514	0,438	7,788	2,65
D[a,h]A	0,242	0,194	0,364	0,224
B[g,h,i]P	0,154	0,366	0,984	2,19
I[1,2,3-c,d]P	n.w.	n.w.	0,384	1,69
SUMA	2,342	3,610	44,192	25,824

n.w.- nie wykryto

Tabela 3. Stężenie nitro- WWA w organicznych ekstraktach pyłów PM10

Badany nitro-WWA	Stężenie nitro- WWA w ekstraktach pyłów [ng/m^3]			
	Lato (I)	Lato (II)	Zima (III)	Zima (IV)
1-nitronaftalen	0,45	n.w.	0,83	0,45
2-nitrofluoren	0,28	0,29	3,36	1,41
9-nitroantracen	n.w.	n.w.	1,84	0,74
3-nitrofluoranten	n.w.	n.w.	0,6	0,3
1-nitropiren	n.w.	n.w.	0,42	0,26
1,3-dinitropiren	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.
1,6-dinitropiren	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.
1,8-dinitropiren	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.
SUMA	0,73	0,29	7,05	3,16

n.w.- nie wykryto

Mimo dużej liczby opracowań, dotyczących stosowania testu *Salmonella* w ocenie mutagenności zanieczyszczeń powietrza, badacze ograniczają się w nich do wykorzystania jednego (TA98) lub dwóch szczepów testowych (TA98 i TA100) [3,8]. W badaniach rozszerzono więc zestaw szczepów testowych o szczep YG1041, rzadziej wykorzystywany w tego typu opracowaniach, charakteryzujący się zwiększoną wrażliwością na związki nitroaromatyczne.

Badane ekstrakty wywoływały efekt mutageny u obu zastosowanych szczepów (tabele 4 i 5). Próbkę pyłu pobranego zimą były bardziej aktywne mutagennie od próbek pyłu pobranego latem, co pokrywa się z badaniami innych autorów [3, 8]. W badanych próbkach obecne były zarówno zanieczyszczenia mogące oddziaływać pośrednio z materiałem genetyczny jak i bezpośrednio. Świadczyły o tym wysokie współczynniki mutagenności (MR) otrzymane zarówno dla testów przeprowadzanych z udziałem frakcji mikrosomalnej S9 jak i bez niej. W przypadku szczepu YG1041 uzyskano większe wartości MR w testach wykonywanych bez frakcji S9. Szczep ten był więc najbardziej wrażliwy na występujące w badanych próbkach mutageny bezpośrednio. Wyższe wartości MR uzyskano dla próbek pobranych w centrum miasta niż dla próbek pobranych na jego obrzeżu. Jedynie w przypadku badań zanieczyszczeń pobranych latem prowadzonych z udziałem szczepu YG1041 wyższe wartości MR uzyskano dla próbki pobranej na obrzeżu miasta (I). Najwyższe wartości MR uzyskano dla ekstraktów pyłów pobranych w zimie w centrum miasta badanych przy udziale szczepu TA98. Wynosiły one $31,73 \pm 0,6$ dla badań prowadzonych bez frakcji S9 i $18,28 \pm 0,4$ w badaniach w obecności frakcji S9. Dla tej próbki badanej z udziałem szczepu YG1041 również uzyskano najwyższe wartości MR, wynoszące odpowiednio $16,48 \pm 0,4$ (-S9) i $15,0 \pm 0,2$ (+S9). Maksymalną wartość współczynnika MR dla poszczególnych szczepów testowych uzyskano dla różnych stężeń zanieczyszczeń wprowadzanych do testu, co świadczy o ich zróżnicowanej czułości na badane związki. W badanym zakresie stężeń ekstraktów powietrza ($50-0,0015 \text{ m}^3/\text{płytkę}$) zaobserwowano wyraźną krzywą dawka-odpowiedź, co w pełni ilustruje biologiczny efekt działania zanieczyszczeń obecnych w ekstraktach w zależności od ich stężenia. Szeroki zakres badanych stężeń próbek powietrza w przypadku szczepu YG1041 (tabela 6) pozwolił wyznaczyć punkt przegięcia krzywej dawka-odpowiedź (efekt toksyczny). Dla szczepu TA98 taki efekt uzyskano w przypadku próbki II (lato – centrum miasta) oraz w przypadku próbki III (zima – obrzeża miasta) w badaniach prowadzonych bez frakcji S9. Dla pozostałych ekstraktów nawet stężenie zanieczyszczeń pochodzące z 50 m^3 powietrza nie pozwoliło uchwycić progu ich toksycznego działania, a tym samym objętości powietrza dającego maksymalny efekt mutageny. Najmniejsza objętość zanieczyszczonego powietrza wywołująca efekt mutageny w stosunku do zastosowanych w badaniach szczepów była bardzo zróżnicowana. Szczep TA98 odznaczał się progiem wykrywalności dla zimy na poziomie $0,049-0,39 \text{ m}^3$ a dla lata $0,097-25 \text{ m}^3$. Z kolei próg wykrywalności związków mutagennych dla szczepu YG1041 wynosił dla zimy $0,0061-0,39 \text{ m}^3$ i dla lata $3,125-12,5 \text{ m}^3$. Zależność pomiędzy stężeniem pyłu zawieszonego a objętością zanieczyszczonego powietrza wywołującego efekt mutageny była niewielka. Największe stężenie pyłu zawieszonego uzyskano dla próbki III (zima – obrzeża miasta) $138,93 \mu\text{m}^3$, natomiast stężenie zaadsorbowanych związków mutagennych było największe dla próbki IV (zima – centrum miasta). Dla tej próbki stężenie pyłu było 1,5 razy mniejsze i wynosiło $87,32 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Tak samo przedstawiała się sytuacja dla zanieczyszczeń pobranych latem. Największe stężenie pyłu uzyskano dla próbki I (lato – obrzeża miasta) $57,17 \mu\text{g}/\text{m}^3$, natomiast objętość zanieczyszczonego powietrza wywołująca efekt mutageny była najmniejsza dla próbki II (lato – centrum miasta). Dla tej próbki stężenie pyłu było także około 1,5 razy mniejsze i wynosiło $38,33 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Pyły pobrane w centrum miasta (II i IV)

charakteryzowały się większą sumaryczną zawartością WWA, mimo iż procentowy udział w nich poszczególnych WWA był bardzo zróżnicowany.

Tabela 4. Zależność $MR \pm S.D.$ od stężenia ekstraktów pyłów badanych próbek powietrza określana testem *Salmonella* bez udziału frakcji S9 i z jej udziałem dla szczepu TA 98

Stężenie próbek [m^3 /płytkę]	Rodzaj próbki							
	I (LATO)		II (LATO)		III (ZIMA)		IV (ZIMA)	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
50	3.49±0.2	2.62±0.2	0.43±0.2	0.57±0.1	9.29±0.3	17.7±0.4	31.73±0.6	18.28±0.4
25	2.2±0.2	2.32±0.2	1.78±0.3	0.85±0.2	12.49±0.5	13.14±0.2	28.52±0.5	15.98±0.5
12.5	1.82±0.1	1.35±0.1	2.05±0.1	11.04±0.2	13.63±0.4	11.52±0.2	20.68±0.7	13.41±0.3
6.25	1.55±0.2	1.35±0.2	2.67±0.2	17.9±0.3	9.19±0.3	10.29±0.3	10.31±0.4	10.9±0.4
3.125	1.45±0.2	1.15±0.2	15.5±0.3	16.34±0.4	5.91±0.3	4.85±0.4	10.15±0.4	6.95±0.2
1.56	1.35±0.1	1.08±0.2	8.41±0.2	9.64±0.2	4.27±0.2	3.85±0.2	5.93±0.2	6.8±0.1
0.78	1.29±0.1	1.04±0.3	2.94±0.4	8.5±0.2	3.7±0.3	2.87±0.2	5.1±0.2	6.34±0.3
0.39	1.25±0.1	0.92±0.2	1.43±0.1	5.12±0.2	2.76±0.2	2.77±0.2	5.09±0.3	4.73±0.4
0.195	1.19±0.2	0.92±0.2	1.16±0.1	3.13±0.1	1.83±0.2	2.23±0.1	4.6±0.1	2.94±0.2
0.097	1.12±0.2	0.77±0.3	1.09±0.1	2.27±0.1	1.71±0.2	1.81±0.1	4.04±0.2	1.6±0.2
0.049	1.06±0.1	0.77±0.2	1.01±0.1	1.16±0.1	1.67±0.1	1.45±0.1	2.41±0.2	1.29±0.1
0.0245	1.06±0.3	0.73±0.2	0.93±0.1	0.67±0.1	1.07±0.1	1.25±0.1	1.42±0.1	1.08±0.1

kontrola negatywna 22-36 rewertantów na płytkę

kontrola pozytywna 3242-4552 rewertantów na płytkę (-S9), 1645-1886 rewertantów na płytkę (+S9)

Tabela 5. Zależność $MR \pm S.D.$ od stężenia ekstraktów pyłów badanych próbek powietrza określana testem *Salmonella* bez udziału frakcji S9 i z jej udziałem dla szczepu YG 1041

Stężenie próbek [m^3 /płytkę]	Rodzaj próbki							
	I (LATO)		II (LATO)		III (ZIMA)		IV (ZIMA)	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
50	2.96±0.4	2.63±0.4	2.85±0.2	2.34±0.1	3.69±0.3	1.16±0.1	9.54±0.4	10.45±0.3
25	7.29±0.2	4.56±0.2	4.84±0.3	2.86±0.3	6.06±0.2	5.06±0.2	15.81±0.5	11.9±0.4
12.5	4.75±0.3	2.52±0.3	6.4±0.4	3.66±0.2	8.57±0.4	7.33±0.4	16.48±0.4	12.52±0.3
6.25	2.34±0.2	1.92±0.2	3.21±0.1	1.05±0.1	5.96±0.3	6.61±0.3	13.71±0.3	15.0±0.2
3.125	1.93±0.1	1.66±0.2	2.42±0.1	0.99±0.1	5.39±0.2	4.25±0.3	10.64±0.2	14.49±0.3
1.56	1.53±0.2	1.49±0.1	1.95±0.1	0.99±0.2	4.35±0.2	3.58±0.2	10.36±0.2	12.43±0.2
0.78	1.32±0.2	1.43±0.1	1.51±0.1	0.93±0.1	3.92±0.2	3.41±0.2	10.33±0.2	11.92±0.3
0.39	1.16±0.1	1.32±0.1	1.22±0.1	0.9±0.1	2.91±0.2	2.39±0.2	9.23±0.3	6.3±0.2
0.195	1.14±0.1	1.18±0.1	0.95±0.2	0.85±0.2	2.58±0.1	1.87±0.1	7.75±0.4	5.2±0.2
0.097	1.11±0.1	0.92±0.1	0.84±0.1	0.85±0.1	2.41±0.1	1.55±0.1	4.89±0.2	4.3±0.2
0.049	0.91±0.1	0.99±0.1	0.75±0.1	0.8±0.1	1.22±0.1	1.37±0.1	3.87±0.2	3.64±0.2
0.0245	0.83±0.1	1.00±0.1	0.74±0.2	0.86±0.1	1.10±0.1	1.01±0.1	2.51±0.2	3.05±0.2
0.0061	0.95±0.1	0.97±0.1	0.8±0.1	0.89±0.1	1.09±0.1	0.93±0.1	2.11±0.1	2.32±0.1
0.0015	0.97±0.1	1.00±0.1	0.9±0.1	0.91±0.1	1.11±0.1	0.94±0.1	1.23±0.1	1.36±0.1

kontrola negatywna 128-179 rewertantów na płytkę

kontrola pozytywna 1165-1396 rewertantów na płytkę (-S9), 1126-1216 rewertantów na płytkę (+S9)

W tabeli 6 przedstawiono wyniki dotyczące uzyskanych wartości mutagenności (M) w poszczególnych testach *Salmonella*. W badaniach ze szczepem TA98 jedynie dla próbki I

(lato – obrzeże miasta) uzyskano niskie wartości mutagenności, zbliżone do ilości rewertantów spontanicznych, które wynosiły 22-26 rew./m³. W przypadku pozostałych próbek ilość rewertantów indukowanych przez 1m³ powietrza w testach wahała się od 97 do 189 rew./m³. W przypadku testów przeprowadzonych ze szczepem YG1041 wartości M zbliżone do ilości rewertantów spontanicznych (126-201 rew./m³) uzyskano dla pyłów pobranych w lecie na obu stanowiskach badawczych (próbki I i II). Z kolei ilość rewertantów indukowanych przez 1m³ powietrza w próbkach pobranych zimą była wysoka i wahała się od 649 do 1244 rew./m³.

Tabela 6. Mutagenność (M) otrzymana dla poszczególnych testów *Salmonella* przeprowadzonych z badanymi ekstraktami

Szczep	Próbka	Obecność frakcji S9	Równanie prostej regresji	R ²	Mutagenność (M) Rew./m ³
TA 98	I	-S9	$y=18,5+3,6x$	0,62	22
		+S9	$y=21,7+4,6x$	0,62	26
	II	-S9	$y=29,1+115,2x$	0,75	144
		+S9	$y=49,3+139,7x$	0,84	189
	III	-S9	$y=30,4+66,6x$	0,95	97
		+S9	$y=45,3+71x$	0,86	116
	IV	-S9	$y=19,6+81,6x$	0,82	101
		+S9	$y=33,2+153,1x$	0,88	186
YG 1041	I	-S9	$y=154,9+35,9x$	0,97	191
		+S9	$y=165,9+19,2x$	0,95	185
	II	-S9	$y=103,7+21,9x$	0,98	126
		+S9	$y=192,7+8,2x$	0,82	201
	III	-S9	$y=174,6+474,1x$	0,76	649
		+S9	$y=249,4+696,5x$	0,94	946
	IV	-S9	$y=155,4+936x$	0,83	1091
		+S9	$y=201,7+1042,4x$	0,85	1244

W tabeli 7 zamieszczono wyniki badań nad genotoksycznością pyłowych ekstraktów powietrza przeprowadzonych zminiaturyzowanym testem SOS Chromotest. Badane ekstrakty wykazywały właściwości genotoksyczne w stosunku do stosowanego w teście szczepu *Escherichia coli* K12 PQ37. We wszystkich przeprowadzonych testach, zarówno dla próbek pobranych latem jak i zimą (za wyjątkiem próbki I pobranej latem w teście z aktywacją metaboliczną) uzyskano wartości współczynnika IF większe od 1,5 oraz liniową zależność dawka-odpowiedź. Zanieczyszczenia obecne w badanych ekstraktach dały wyższe wartości współczynnika IF w badaniach przeprowadzonych bez aktywacji metabolicznej, przy czym uzyskane wartości tego współczynnika były wyższe dla próbek pobranych zimą w porównaniu do wartości IF uzyskanych dla próbek pobranych latem. Otrzymane wyniki wskazują więc na przewagę związków chemicznych działających bezpośrednio na materiał genetyczny w badanych ekstraktach. Bezpośrednia genotoksyczność organicznych zanieczyszczeń powietrza związana jest z obecnością, między innymi, nitro-, hydroksy- i tlenowych pochodnych WWA w badanych ekstraktach [3, 7]. Ponadto, uzyskano wyższe wartości IF dla ekstraktów pyłów pobranych w centrum miasta (II, IV- Plac Grunwaldzki) w porównaniu do wartości IF uzyskanych dla próbek pobranych na obrzeżu miasta (I, III- ul. Strachocińska). Objętości zanieczyszczonego powietrza wywołujące efekt genotoksyczny, były większe od uzyskanych w teście *Salmonella*. Wahały się w zakresie 3,125-25 m³ latem i 0,195-1,56 m³ zimą.

Doniesień literaturowych na temat badań organicznych zanieczyszczeń powietrza SOS chromotestem jest dużo mniej w porównaniu do przeprowadzanych testem *Salmonella*. Wszystkie one jednak podkreślają dużą przydatności tego testu w monitoringu zanieczyszczeń powietrza. Badania prowadzone na terenie Czech oraz Bośni i Hercegowiny przez Škarek i inni [10, 27] pokazują duże zróżnicowanie uzyskanych wyników w tym teście. Na terenie Czech pyły pobierano w lipcu 2002 na terenach silnie (2 lokalizacje) i słabo zurbanizowanych (2 lokalizacje). Dodatkowo wyniki testu uzyskano jedynie w badaniach bez aktywacji metabolicznej na dwóch terenach miejskich. Z kolei w badaniach prowadzonych z pyłami pobranymi w maju 2004 roku w słabo zindustrializowanym Sarajewie i mocno uprzemysłowionej Tuzli dodatkowo wyniki uzyskano we wszystkich testach, zarówno w wariancie z jak i bez frakcji S9. Podobnie jednak jak w prezentowanych badaniach większą siłą genotoksycznego działania odznaczały się próbki badane bez aktywacji metabolicznej, pobrane na terenie silnie zindustrializowanym.

Tabela 7. Wartości IF dla ekstraktów pyłowych zanieczyszczeń powietrza uzyskane w SOS Chromoteście

Stężenie próbki [m ³ /dołek]	Rodzaj próbki							
	I (LATO)		II (LATO)		III (ZIMA)		IV (ZIMA)	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
50	1,89	1,32	4,12	3,80	TOX	TOX	TOX	TOX
25	1,56	1,24	3,90	2,50	TOX	3,78	TOX	5,27
12.5	1,40	1,14	3,20	1,95	5,12	3,46	TOX	5,01
6.25	1,32	1,09	2,45	1,54	4,97	2,57	9,34	4,56
3.125	1,27	1,12	1,65	1,40	3,20	1,80	7,17	3,12
1.56	1,20	1,08	1,30	1,38	2,69	1,65	5,61	2,01
0.78	1,17	1,00	1,21	1,25	1,68	1,45	3,98	1,76
0.39	1,12	0,98	1,15	1,20	1,54	1,21	2,19	1,40
0.195	1,10	1,05	1,05	1,15	1,40	1,19	1,63	1,32
0.097	1,00	0,95	0,95	1,05	1,34	1,13	1,42	1,30
0.049	1,05	0,91	1,10	0,95	1,25	1,17	1,41	1,23
0.0245	1,10	1,03	1,00	1,00	1,19	1,08	1,32	1,10
0.0061	0,97	1,11	0,89	1,00	1,05	1,00	1,11	1,07
0.0015	1,00	1,00	0,95	1,05	0,97	1,05	1,02	1,01

TOX- próbka toksyczna

W tabeli 8 umieszczono wyniki badań dotyczące wpływu badanych ekstraktów pyłów na komórki nowotworowe raka płuc A549. Wielu badaczy zwraca uwagę na to, że przy ocenie szkodliwego działania związków chemicznych na organizm ludzki konieczne jest rozpatrywanie wyników testów na mutagenność i genotoksyczność w powiązaniu z wynikami oceny ich toksyczności. W badaniach substancji wnikających do organizmu przez układ oddechowy wykorzystuje się linie wyprowadzone z komórek nabłonkowych pęcherzyków płucnych oraz linie wyprowadzane z makrofagów. Komórki nabłonkowe układu oddechowego, obok makrofagów pęcherzyków płucnych, stanowią obronę organizmu przed wnikającymi zanieczyszczeniami, ze względu na zachodzącą fagocytozę cząstek respirabilnych. Przydatność linii komórek ludzkich A549 uzyskanych z komórek nowotworowych raka płuc do oceny właściwości cząstek respirabilnych została potwierdzona w badaniach cytotoksyczności oraz mutagenności *in vitro* [8, 28, 29]. Istotą mutacji są nieodwracalne uszkodzenia w materiale genetycznym komórki, prowadzące do zmiany jej

funkcjonowania, w wyniku czego komórka staje się niepodatna na mechanizmy regulacyjne dotyczące tempa podziałów, wzrostu i różnicowania. Zmodyfikowane komórki budujące ludzki organizm, jeżeli nie zostaną wyeliminowane we wczesnej fazie przez układ immunologiczny, zaczynają proliferować, co w efekcie może prowadzić do powstania nowotworu [12].

W prezentowanych badaniach stwierdzono toksyczne oddziaływanie zanieczyszczeń organicznych zaadsorbowanych na pyłach pobranych zarówno w zimie jak i w lecie na komórki linii A549 w warunkach *in vitro*. Stężenia powietrza wywołujące efekt toksyczny kształtowały się różnie w zależności od sezonu poboru próbki i czasu kontaktu badanych zanieczyszczeń z linią komórkową. Otrzymano silniejszy efekt toksyczny dla ekstraktów pyłów pobranych zimą w porównaniu do efektu otrzymanego dla ekstraktów pyłów pobranych latem. Podobną zmienność sezonową efektu cytotoksycznego obserwowano w innych miastach [8]. Zarówno po 24, 48 i 72 godzinach obserwacji mniejsze dawki powietrza pobranego zimą wywoływały efekt letalny 50% badanych komórek w stosunku do dawek powietrza pobranego latem. W przypadku ekstraktów pyłów pobranych zimą wynosiły one 1,56m³ (IV – Plac Grunwaldzki) i 3,13 m³ (III – ul. Strachocińska) po 24 i 48 godzinach kontaktu, oraz 0,78m³ dla obu próbek po 72 godzinach badań. Z kolei dla próbek pobranych latem efekt toksyczny oznaczony na komórkach A549 stwierdzono po 24 i 48 godzinach oddziaływania zanieczyszczeń pochodzących z 12,5m³ pobranych na Placu Grunwaldzkim (II) i z 25m³ pobranych na ul. Strachocińskiej (I). Najsilniejszy efekt toksyczny stwierdzony dla próbek letnich zaobserwowano po 72 godzinach dla próbki II. Po tym czasie dawka powietrza wywołująca ten efekt wynosiła 6,25 m³. Z kolei dawka zanieczyszczeń pyłowych pobranych na ulicy Strachocińskiej wywołująca efekt toksyczny wynosiła 25m³, czyli była taka sama jak po 24 i 48 godzinach.

Tabela 8. Działanie ekstraktów pyłowych zanieczyszczeń powietrza na ludzkie komórki płuc linii A549 w warunkach *in vitro*

Czas Kontaktu	Rodzaj próbki	Efekt toksyczny [m ³]							
		50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39
24	I (Lato)	t	t	n	n	n	n	n	n
	II (Lato)	t	t	t	n	n	n	n	n
	III (Zima)	t	t	t	t	t	n	n	n
	IV (Zima)	t	t	t	t	t	t	n	n
	Kontrola A549	n	n	n	n	n	n	n	n
48	I (Lato)	t	t	n	n	n	n	n	n
	II (Lato)	t	t	t	n	n	n	n	n
	III (Zima)	t	t	t	t	t	n	n	n
	IV (Zima)	t	t	t	t	t	t	n	n
	Kontrola A549	n	n	n	n	n	n	n	n
72	I (Lato)	t	t	n	n	n	n	n	n
	II (Lato)	t	t	t	t	n	n	n	n
	III (Zima)	t	t	t	t	t	t	t	n
	IV (Zima)	t	t	t	t	t	t	t	n
	Kontrola A549	n	n	n	n	n	n	n	n

n- próbka nietoksyczna; t- próbka toksyczna

5. Podsumowanie

Badania potwierdziły wysoką wrażliwość na zanieczyszczenia organiczne, zaadsorbowane na pyłach PM10, zastosowanych szczepów testowych *Salmonella tyhimurium* TA98 i YG1041 oraz *Escherichia coli* K12 PQ37, co świadczy o obecności w powietrzu atmosferycznym WWA i ich nitrowych, aminowych i hydroksyloaminowych pochodnych. Uzyskane wartości współczynników MR i IF w obu testach bakteryjnych wskazywały na obecność w badanych próbkach związków chemicznych zarówno o charakterze promutagenów jak i mutagenów bezpośrednich, przy czym w teście *Salmonella* uzyskano zbliżone wartości MR w badaniach bez i z aktywacją metaboliczną frakcją mikrosomalą S9. Wprowadzenie do badań szczepu serii YG pozwoliło, oprócz potwierdzenia, że za efekt mutageny zanieczyszczeń powietrza głównie odpowiadają umiarkowanie polarne i wysoko polarne klasy związków, na wykrycie obecności mutagenów w bardzo małych dawkach badanego powietrza, rzędu 0,0061-0,049m³. Z kolei w badaniach przeprowadzonych SOS chromotestem uzyskano wyższą genotoksyczność w testach bez aktywacji metabolicznej w porównaniu do wyników badań prowadzonych w obecności frakcji mikrosomalnej S9. Związki chemiczne o takim działaniu to nitrowe i aminowe pochodne WWA, polarne związki aromatyczne, związki heterocykliczne i fenole.

W prezentowanych badaniach stwierdzono także toksyczne oddziaływanie zanieczyszczeń organicznych zaadsorbowanych na pyłach, pobranych zarówno w zimie jak i w lecie, na komórki linii A549 w warunkach *in vitro*. Zarówno po 24, 48 i 72 godzinach obserwacji mniejsze dawki powietrza pobranego zimą wywoływały efekt letalny 50% badanych komórek w stosunku do dawek powietrza pobranego latem.

Tak więc, jedyną drogą kompleksowej, szybkiej oceny narażenia ludzi na związki chemiczne zaadsorbowane na cząstkach pyłu zawieszzonego jest zastosowanie monitoringu biologicznego. Ze względu na złożoność procesu karcynogenezy niezbędne jest dopasowanie odpowiednich organizmów, komórek oraz zestawów testów krótkoterminowych. Zastosowanie hodowli komórek ludzkich do badań, obok testów bakteryjnych, stwarza możliwość otrzymania prawidłowej odpowiedzi dotyczącej reakcji komórek ssaków na związki organiczne zanieczyszczające powietrze atmosferyczne.

Literatura

1. Brunekreef B., Holgate S.T.: Air pollution and health. *The Lancet*, 2002, 360, 1233-1242
2. Cohen A.J. 2000. Outdoor air pollution and lung cancer. *Environmental Health Perspectives*, 108 (4): 743-750
3. Claxton L.D., Matthews P.P., Warren S.H.: The genotoxicity of ambient outdoor air, a review: *Salmonella* mutagenicity. 2004, *Mutation Research*, 567, 347-399
4. De Kok T.M.C.M., Drieste H.A.L., Hogervorst J.G.F., Briede J.J.: Toxicological assessment of ambient and traffic-related particulate matter: A review of recent studies. *Mutat.Res.-Rev.Mut.Res.*, 2006, 613 (2-3), 103-122
5. Atkinson R. and Arey J.: Atmospheric chemistry of gas-phase polycyclic aromatic hydrocarbons: formation of atmospheric mutagens. *Envir. Health Perspect.*, 1994, 102, 117-126
6. Bamford H.A.; Bezabeh D.Z.; Schantz M.M.; Wise S.A.; Baker J.E.: Determination and comparison of nitrated-polycyclic aromatic hydrocarbons measured in air and diesel particulate reference materials. *Chemosphere*, 2003, 50, 575-587

7. Piekarska K.: Modyfikacje testu Salmonella do oceny mutagenności pyłowych zanieczyszczeń powietrza atmosferycznego. Oficyna Wydaw. PWroc., Prace Naukowe Instytutu Inżynierii Ochrony Środowiska Politechniki Wrocławskiej, Monografie, ISSN 0084-2869 ; nr 52, W serii gł.: nr 77, 2008
8. Cohen A.J.: Outdoor air pollution and lung cancer. *Environmental Health Perspectives*, 2000, 108 (4), 743-750
9. Mortelmans K., Zeiger E.: The Ames Salmonella/microsome mutagenicity test. *Mutation Research*, 2000, 455, 29-60
10. Škarek, M.; Janošek, J.; Čupr, P.; Kohoutek, J.; Novotná-Rychetská, A.; Holoubek, I.: Evaluation of genotoxic and non-genotoxic effects of organic air pollution using in vitro bioassays. *Environ. Int.*, 2007, 33, 859-866
11. Brits E., Schoeters G., Verschaeve L.: Genotoxicity of PM 10 and extracted organic collected in an industrial, urban and rural area in Flanders, Belgium. *Environ. Res.*, 2004, 96, 109-118
12. Risom L., Møller P., Loft S.: Oxidative stress- induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutat. Res.*, 2005, 592, 119-137
13. Pryček J., Ciganek M., Šimek Z.: Development of an analytical method for polycyclic aromatic hydrocarbons and their derivatives. *Journal of Chromatography*, 2004, 1030, 103-107
14. Zaciera M.: 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 Zabrze, 2006
15. Maron D.M., Ames B.N.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res.*, 1983, 113, 173-215
16. Hagiwara Y., Watanabe M., Oda Y., Sofuni T., Nohmi T.: Specificity and sensitivity of Salmonella typhimurium YG1041 and YG1042 strains possessing elevated levels of both nitroreductase and acetyltransferase activity. *Mutation Research*, 1993, 291, 171-180
17. Stead A., Hasselblad V., Creason J., Claxton L.: Modeling the Ames test. *Mutation Res.*, 1981, 85, 13-27
18. Quillardet P.; Hofnung M.: The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutat. Res.*, 1985, 147, 65-78
19. Mendyka B., Radek P., Wargacka A., Czarny A., Zaczyńska E., Pawlik M.: Cytotoksyczność i mutagenność preparatów zawierających domieszkę estru metylowego oleju rzepakowego. *Medycyna Środowiskowa*, 2005, 8 (2), 139-145
20. Crebelli R.; Fuselli S.; Baldassarri L.T.; Ziemacki G.; Carere A.; Banigni R.: Genotoxicity of urban air particulate matter: correlations between data, airborne micropollutants and meteorological parameters. *Int. J. Environ. Health Res.*, 1995, 5, 19- 34
21. Binková B., Černa B., Pastorková A., Jelínek R., Beneš I., Novák J., Šrám R.J.: 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*, 2003, 525, 43-59
22. Du Four V.A., Janssen C.R., Brits E., Larebeke N.V.: Genotoxic and mutagenic activity of environmental air samples from different rural, urban and industrial sites in Flanders, Belgium. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag.*, 2005, 588 (2), 106-117
23. Gilli G., Traversi D., Rovere R., Pignata C., Schiliro T.: Airborne particulate matter: ionic species role in different Italian sites. *Environ. Res.*, 2007, 103 (1), 1-8

24. Nisbet I.C.T., LaGgy P.K.: Toxic (TETs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 1992, 16, 290- 300
25. Černa M., Pochamanova D., Pastorková, Beneš I., Leniček J., Topinka J., Binková B.: Genotoxicity of urban air pollutants in Czech Republic. Part I. Bacterial mutagenic potencies of organic compounds adsorbed on PM 10 particulates. *Mutation Res.*, 2000, 469, 71-82
26. Du Four V.A., Van Larebeke N., Janssen C.R.: Genotoxic and mutagenic activity of environmental air samples in Flanders, Belgium. *Mutation Research*, 2004, 558, 155-167
27. Škarek, M.; Čupr, P.; Bartoš, J.; Kohoutek, J.; Klánová, J.; Holoubek, I.: A combined approach to the evaluation of organic air pollution- A case study of urban air in Sarajevo and Tuzla (Bosnia and Herzegovina); *Sci. Total Environ.*, 2007, 384, 182-193
28. Gábelová A., Valovicová Z., Bacová G., Lábaj J., Binková B., Topinka J., Sevastyanova O, Šrám R.J., Kalina I., Habalová V., Popov T.A., Panev T., Farmer P.B.: Sensitivity of different endpoints for in vitro measurement of genotoxicity of extractable organic matter associated with ambient airborne particles (PM10). *Mutation Res.*, 2007, 620, 103-13
29. Gábelová A., Valovicová Z., Horváthová E., Slameňová D., Binkova B., Šrám R.J., Farmer P.B.: Genotoxicity of environmental air pollution in three European cities: Prague, Košice and Sofia. *Mutation Res.*, 2004, 563, 49-59