

ZASTOSOWANIE TESTU *SALMONELLA* Z PREINKUBACJĄ DO WYKRYWANIA MUTAGENNEGO DZIAŁANIA PYŁOWYCH ZANIECZYSZCZEŃ POWIETRZA ATMOSFERYCZNEGO

Katarzyna PIEKARSKA

Instytut Inżynierii Ochrony Środowiska, Politechnika Wrocławska,
ul. Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław.
katarzyna.piekarska@pwr.wroc.pl

STRESZCZENIE

W badaniach zastosowano test *Salmonella* oraz test *Salmonella* z dodatkową 20-minutową preinkubacją prowadzoną w temperaturze 37°C. Testy przeprowadzono w oparciu o dwa ekstrakty pyłów zawieszonych PM10 pobranych latem i zimą we Wrocławiu. Testy prowadzono w obecności dwóch szczepów *Salmonella typhimurium*: TA98 i YG1041, bez aktywacji metabolicznej oraz z aktywacją metaboliczną frakcją mikrosomalną S-9 indukowaną Aroclorem 1254, fenobarbitalem i nie poddaną uprzedniej indukcji. We wszystkich testach uzyskano wyższe wartości MR dla ekstraktu próbki powietrza pobranej w zimie, w porównaniu do badań z próbką pobraną latem. W badanych ekstraktach obecne były zarówno zanieczyszczenia mogące oddziaływać pośrednio z materiałem genetycznym jak i bezpośrednio. Test preinkubacyjny pozwolił na zwiększenie progów wykrywalności testem *Salmonella* zanieczyszczeń mutagennych pobranych latem. Stwierdzono przydatność wszystkich zastosowanych frakcji mikrosomalnych w badaniach mutagenności pyłowych zanieczyszczeń powietrza.

1. Wstęp

Od lat dostrzegany jest problem zdrowotnych i ekologicznych skutków zanieczyszczenia atmosfery. Koncentracja, skład chemiczny, ilość i rodzaj zanieczyszczeń występujących w powietrzu uzależniony jest od szeregu czynników zarówno o charakterze lokalnym jak i globalnym. Szczególnie silnie występują te problemy na obszarach dużych aglomeracji miejskich, w których obserwuje się kilkuset razy większą koncentrację zanieczyszczeń w stosunku do obszarów nie zanieczyszczonych [1]. Wiele z tych zanieczyszczeń charakteryzuje się działaniem genotoksycznym, powodując różnego rodzaju uszkodzenia materiału genetycznego komórek. Dostają się one drogą oddechową do pęcherzyków płucnych w postaci zaadsorbowanej na różnej wielkości cząstkach pyłów zawieszonych. Następnie przez pęcherzyki płucne przedostają się do układu krwionośnego i tą drogą rozprzestrzeniają się po całym organizmie. Specjalne znaczenie biologiczne mają pyły o dużym stopniu rozdrobnienia (<10 µm), ponieważ utrzymują się przez dłuższy czas w atmosferze, co warunkuje większe prawdopodobieństwo przedostania się ich do układu oddechowego człowieka (cząstki respirabilne). Analiza literatury wskazuje, że za efekt mutageny pyłów zawieszonych głównie odpowiadają bardziej polarne WWA, czyli ich nitrowe i tlenowe pochodne, niż WWA niepodstawione [2, 3].

W badaniach nad oceną mutagenności organicznych ekstraktów z pyłów zawieszonych znalazł zastosowanie krótkoterminowy bakteryjny test *Salmonella*, opracowany w latach 70. XX wieku przez amerykańskiego profesora Bruca Amesa. Test ten określa poziom mutacji powrotnych z histydynowej aukstotrofii do prototrofii u specjalnie skonstruowanych mutantów szczepów *Salmonella typhimurium* LT2 [4].

Problem mutagennego 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. Zwiększenie czułości testu jest niezwykle ważne bowiem wykrycie aktywności mutagennej organicznych zanieczyszczeń powietrza wymaga pobierania próbek w ilościach znacznie większych niż w przypadku analiz fizyko-chemicznych, co stanowi utrudnienie w wprowadzeniu testu do rutynowego monitoringu zanieczyszczeń powietrza [5]. O efektach mutagennych testowanego związku decyduje w dużej mierze jego stężenie i czas jego działania. Ponadto, 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, 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 fenobarbital. Dlatego też uzasadnione jest zbadanie aktywności frakcji indukowanej fenobarbitalem w stosunku do ekstraktu pyłu zawieszonego oraz porównanie jej aktywności z frakcją indukowaną Aroclorem [6].

Celem pracy było uzyskanie odpowiedzi na pytanie czy preinkubacja w sposób istotny wpływa na obniżenie progu wykrywalności występujących w miejskim powietrzu zanieczyszczeń o charakterze mutagenów bezpośrednich i pośrednich wykrywanych testem Ames. Przeprowadzono także porównanie przydatności frakcji mikrosomalnej aktywowanej standardowym induktorem, jakim jest Aroclor 1254, z frakcją indukowaną fenobarbitalem. W badaniach podjęto także próbę zastosowania frakcji mikrosomalnej nie podanej indukcji, zawierającej naturalny poziom enzymów mikrosomalnych.

2. Materiały i metody

Materiał do badań stanowiły pyły zawieszone w powietrzu atmosferycznym miasta 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 [7]. Stanowisko badawcze zlokalizowano w centrum miasta, na Placu Grunwaldzkim, przez który prowadzi droga tranzytowa w kierunku Warszawy. W miejscu tym panuje wzmożony ruch samochodowy przez całą dobę. Próbkę pyłu PM₁₀ pobierano na filtry szklane przy pomocy wysoko-przepływowego aspiratora powietrza typu Staplex. Filtry w aparacie zmieniano co 24 godziny. Zanieczyszczenia powietrza pobierano przez 96 h w lecie i przez 105 h w zimie. Filtry wraz z pyłami z poszczególnych poborów łączono w jedną próbkę, cięto i wkładano do aparatów Soxhleta. Następnie ekstrahowano dichlorometanem bez dostępu światła, przez 16 h z 15 minutowym refluksiem [8]. Po zakończonej ekstrakcji otrzymane ekstrakty wyjściowe zagęszczano do sucha w wyparce próżniowej. Suchą pozostałość ekstraktów pyłów rozpuszczano w sterylnym dimetylosulfotlenku (DMSO) w taki sposób by w 1 cm³ roztworu podstawowego znajdowały się zanieczyszczenia pochodzące z 1000 m³ powietrza. Do testu *Salmonella* wprowadzano ekstrakty pochodzące z zakresu od 50 m³ do 0,006125 m³ powietrza. Badania prowadzono bez aktywacji metabolicznej oraz z aktywacją metaboliczną frakcją mikrosomalną indukowaną Aroclorem 1254 (FA), indukowaną fenobarbitalem (FB), oraz frakcją nie poddawaną uprzedniej indukcji (F0) [6, 9].

W teście *Salmonella*, wykonywanym zgodnie z zaleceniami autorów [9], stosowano dwa szczepy testowe *Salmonella typhimurium*: TA98 i YG1041 (tabela 1).

Tabela 1. Charakterystyka genotypów szczepów testowych

Szczep	Opis
TA 98	TA 1538 his D3052 (p KM101)
YG 1041	TA 98 (pYG233): szczep o podwyższonej aktywności nitroreduktazy i O-acetylotransferazy (pYG233)

Testowe szczepy *Salmonella* otrzymano od dr T. Nohmi z Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Hygienic Sciences, Tokyo, Japan. Szczep TA98 wykrywa mutageny typu zmiany fazy odczytu, natomiast jego pochodna – szczep YG1041 charakteryzuje się dodatkowo podwyższoną wrażliwością 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 [10].

Dodatkowo określano wpływ czasu preinkubacji na efekt mutageny ekstraktów pyłów zawieszonych. W tym celu przeprowadzono klasyczny test *Salmonella* z zastosowaniem dodatkowej 20-minutowej preinkubacji prowadzonej z wytrząsaniem (240 wahnięć/min) w temperaturze 37°C. Testy z preinkubacją prowadzono zgodnie z metodyką opisaną przez Matsushima i in. [11]. W klasycznej procedurze testu (bez preinkubacji) wprowadza się od razu wszystkie składniki próbki, 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 S-9 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 reakcję z DNA testowych szczepów w małej objętości mieszaniny reakcyjnej i w większym stężeniu frakcji mikrosomalnej niż na płycie Petriego.

Efekt mutageny pyłów zawieszonych przedstawiono w postaci współczynnika mutagenności (MR), czyli ilorazu średniej liczby rewertantów wyrosłych w obecności badanej próbki i średniej liczby rewertantów spontanicznych. Za mutagenne uznawano próbki dla których współczynnik mutagenności MR był ≥ 2 .

3. Omówienie wyników badań

Na wybranym stanowisku badawczym zebrano następujące ilości pyłów PM10: 38,33 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ latem i 87,32 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ zimą. Objętość pobranych próbek powietrza wynosiła 6 474,9 m^3 (lato) i 7 069,0 m^3 (zima). Uzyskane stężenia pyłów zawieszonych były zbliżone do ilości oznaczanych przez Wojewódzki Inspektorat Ochrony Środowiska i Wojewódzką Stację Sanitarno-Epidemiologiczną w innych punktach Wrocławia [7]. Otrzymana ilość pyłu frakcji PM10 była podobna także do wartości mierzonych w okresach wiosenno-letnich i jesienno-zimowych w różnych miastach europejskich (Czechy, Włochy, Belgia, Wielka Brytania) [12-15]. Dopuszczalne wartości stężeń PM10 dla okresu 24-godzinnego wynoszą w Polsce i w Unii Europejskiej 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (dopuszczalna częstość przekraczania stężenia 24-godzinnego w roku – 35 razy) [7]. Stwierdzone sezonowe różnice pomiędzy zawartością pyłów w powietrzu pokrywają się także z doniesieniami literaturowymi. Różnice te wynikają głównie z faktu

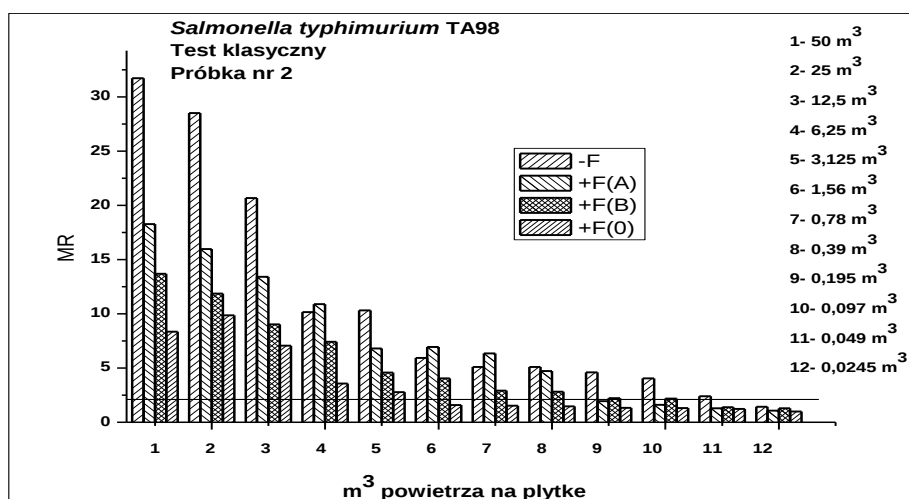
zwiększonej emisji pyłów w okresie zimowym na terenie aglomeracji miejskich, pochodzących z procesów spalania na cele grzewcze [2, 3].

We wszystkich testach uzyskano wyższe wartości MR dla ekstraktu próbki powietrza pobranej w zimie, w porównaniu do badań z próbką pobraną latem. W badanych ekstraktach obecne były zarówno zanieczyszczenia mogące oddziaływać pośrednio z materiałem genetycznym jak i bezpośrednio. Świadczyły o tym wysokie współczynniki mutagenności (MR) otrzymane zarówno dla testów przeprowadzanych z udziałem frakcji mikrosomalnych jak i bez nich.

3.1. Wyniki testów przeprowadzonych z udziałem próbki pyłów pobranej latem

W testach przeprowadzonych w obecności próbki pobranej latem na szczepie TA98 najwyższe wartości MR zaobserwowano w teście klasycznym, a najniższe w teście preinkubacyjnym.

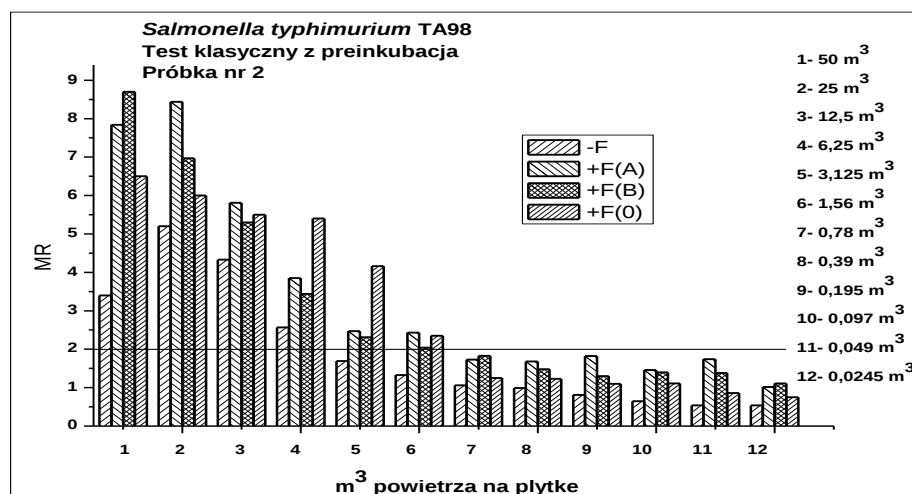
W teście klasycznym (rys.1) nie uzyskano efektu toksycznego na krzywych dawka-odpowieź, za wyjątkiem testu przeprowadzonego z frakcją F0. Największą liczbę rewertantów otrzymano w badaniach bez aktywacji metabolicznej (MR = 31,73 przy 50 m³/płytkę), a najmniejszą w badaniach z frakcją F0 (MR = 9,87 przy 25 m³/płytkę). Stężenie progu badanego ekstraktu pyłów wynosiło w badaniach bez frakcji 0,049 m³/płytkę, z frakcją FB 0,097 m³/płytkę, z frakcją FA 0,39 m³/płytkę, a w teście z frakcją F0 3,125 m³/płytkę.



Rys. 1. Wartości MR dla szczepu TA 98 uzyskane w teście klasycznym dla próbki pobranej latem

W teście klasycznym prowadzonym z preinkubacją (rys. 2) maksymalne wartości MR w testach prowadzonych bez aktywacji metabolicznej (MR = 5,20) i z aktywacją metaboliczną frakcją FA (MR = 8,44) uzyskano w stężeniu ekstraktu pochodzącego z 25 m³ 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 m³ powietrza. W teście tym otrzymano wyższe wartości 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. Najniższe stężenie powietrza wywołujące efekt mutageny w badaniach z aktywacją

metaboliczną wynosiło 1,56 m³/płytkę, a w teście bez aktywacji metabolicznej 6,25 m³/płytkę.

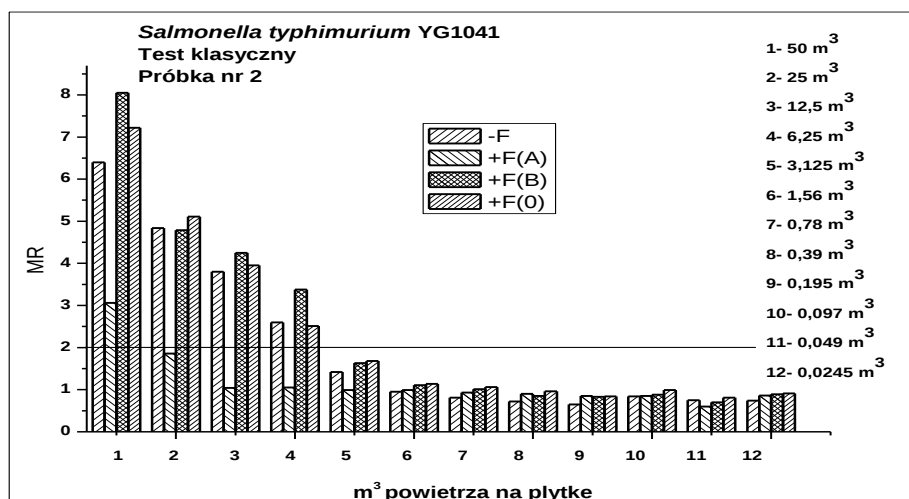


Rys. 2. Wartości MR dla szczepu TA 98 uzyskane w teście preinkubacyjnym dla próbki pobranej latem

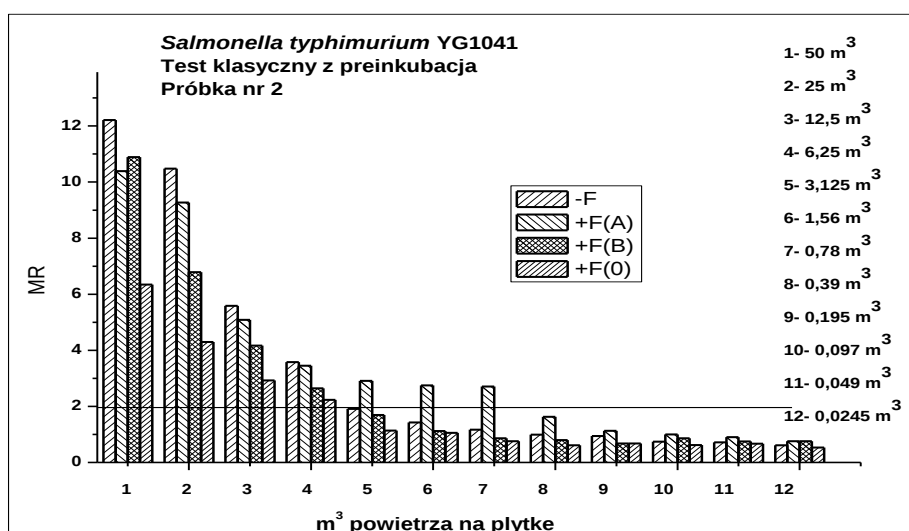
W badaniach prowadzonych z udziałem szczepu YG1041 uzyskano niższe wartości MR w porównaniu do badań ze szczepem TA98. W ekstrakcie zanieczyszczeń pobranych latem mniej więc było mutagenów typu zmiany fazy odczytu o charakterze nitrowych związków aromatycznych. W żadnym z przeprowadzonych testów, w badanym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

W przypadku testu klasycznego (rys. 3) przeprowadzanego 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 najniższe wartości MR (MR = 3,06 przy 50 m³/płytkę). Stężenie progowe ekstraktu zanieczyszczeń w obecności tej frakcji było także przesunięte w kierunku wyższych wartości i wynosiło 50 m³/płytkę. Jedynie w najwyższym badanym stężeniu ekstraktu powietrza, które wynosiło 50 m³/płytkę, wartości MR były wyższe w badaniach z frakcją FB (MR = 8,05) i z frakcją F0 (MR = 7,22) w porównaniu do wartości MR uzyskanych w badaniach bez frakcji (MR = 6,40). W pozostałych stężeniach ekstraktu uzyskano zbliżone wartości współczynników mutagenności.

W teście klasycznym z preinkubacją (rys. 4) uzyskano wyższe wartości 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 przy 50 m³/płytkę). W tym teście najniższe wartości współczynnika mutagenności uzyskano w badaniach z frakcją F0. W wyższych badanych stężeniach zanieczyszczeń powietrza największe wartości MR otrzymano w badaniach prowadzonych bez frakcji mikrosomalnej, a w niższych stężeniach w testach z frakcją FA. Najniższe 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.



Rys. 3. Wartości MR dla szczepu YG 1041 uzyskane w teście klasycznym dla próbki pobranej latem

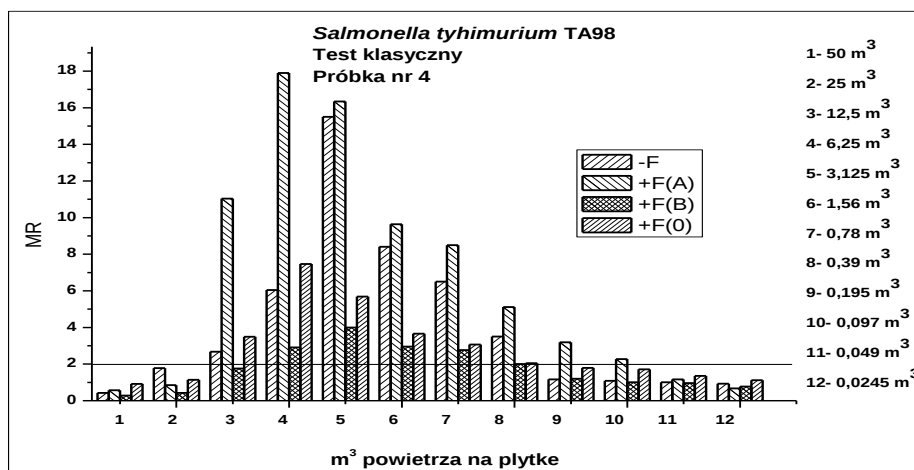


Rys. 4. Wartości MR dla szczepu YG 1041 uzyskane w teście preinkubacyjnym dla próbki pobranej latem

3.2. Wyniki testów przeprowadzonych z udziałem próbki pyłów pobranej zimą

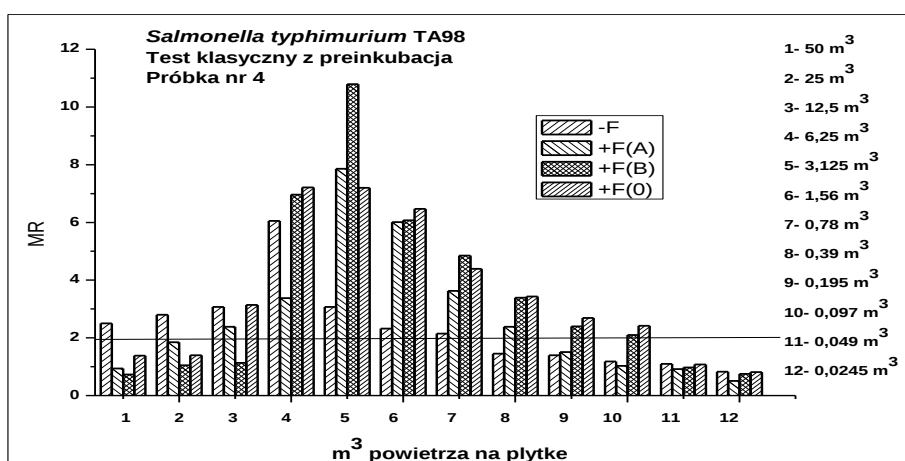
We wszystkich testach przeprowadzonych z udziałem próbki pobranej zimą na szczepie TA98 stwierdzono występowanie efektu toksycznego na krzywej dawka – odpowiedź. Uzyskano również wyższe wartości MR w niższych badanych stężeniach zanieczyszczeń powietrza w porównaniu do wartości MR otrzymanych dla próbki pobranej w lecie. Świadczy to o obecności większej ilości mutagenów typu zmiany fazy odczytu w ekstrakcie zanieczyszczeń pobranych zimą.

W teście klasycznym (rys. 5) uzyskano najwyższe wartości MR w obecności frakcji FA w porównaniu do testów przeprowadzonych bez aktywacji metabolicznej i z aktywacją metaboliczną pozostałymi frakcjami. Maksymalne wartości MR uzyskano w przypadku badań bez frakcji (MR = 15,5) i z frakcją FB (MR = 4,0) w stężeniu zanieczyszczeń pochodzących z 3,125 m³ powietrza, a w przypadku testów z frakcją FA (MR = 17,9) i F0 (MR = 7,47) w stężeniu ekstraktu 6,25 m³/płytkę. Stężenie progowe badanych zanieczyszczeń wynosiło 0,097 m³/płytkę w testach przeprowadzonych z udziałem frakcji FA i 0,39 m³/płytkę w pozostałych badaniach.



Rys. 5. Wartości MR dla szczepu TA 98 uzyskane w teście klasycznym dla próbki pobranej zimą

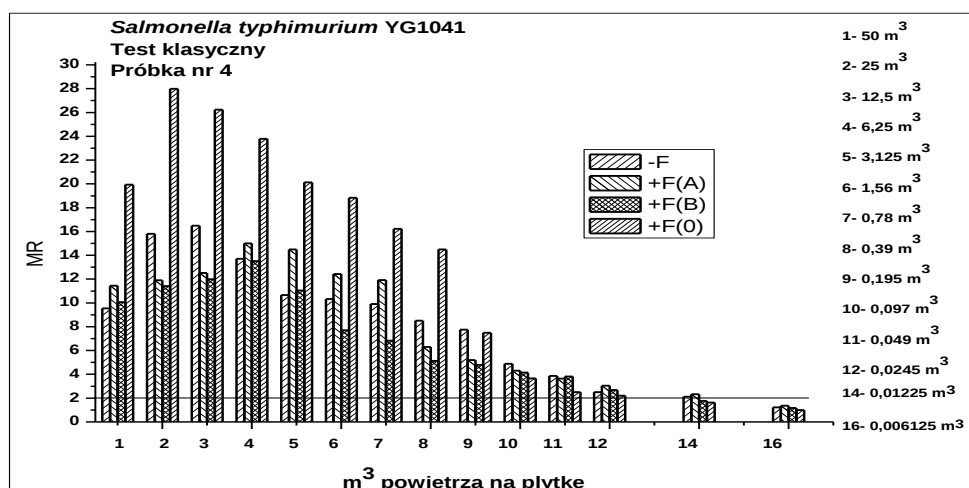
W teście preinkubacyjnym (rys. 6) otrzymano niższą liczbę rewertantów w porównaniu do liczby rewertantów uzyskanych w teście klasycznym. Najwyższe wartości MR uzyskano w badaniach przeprowadzonych ze wszystkimi frakcjami mikrosomalnymi. Preinkubacja poprawiła więc skuteczność wykrywania efektu mutagennego w obecności frakcji FB i F0. W teście tym próg wykrywalności stwierdzono dla następujących stężeń ekstraktu powietrza dodawanego na płytkę: 0,097 m³ w badaniach z frakcjami FB i F0, 0,39 m³ w badaniach z frakcją FA i 0,78 m³ w badaniach bez frakcji –F.



Rys. 6. Wartości MR dla szczepu TA 98 uzyskane w teście preinkubacyjnym dla próbki pobranej zimą

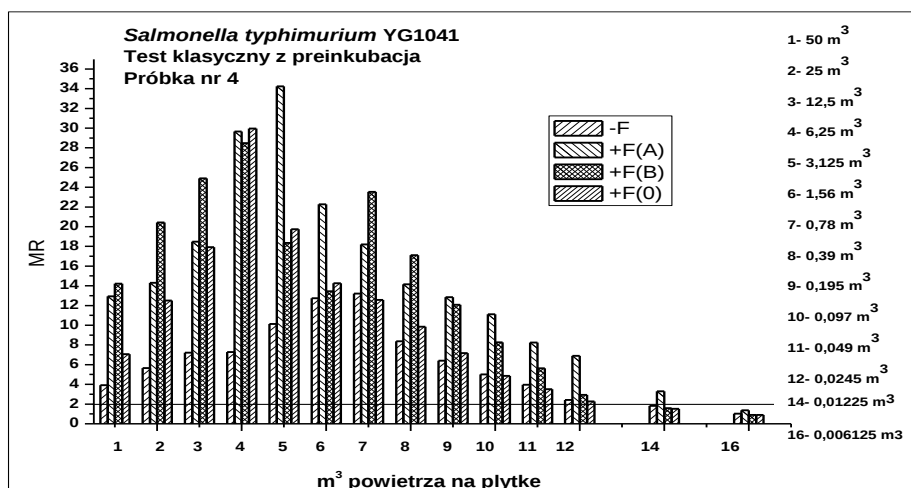
W większości testów przeprowadzonych z udziałem próbki pobranej zimą na szczepie YG1041 stwierdzono efekt toksyczny na krzywej dawka-odpowiedź. Otrzymano bardzo wysokie wartości MR (nawet rzędu 45), dużo większe w porównaniu do wartości MR uzyskanych dla próbki pobranej w lecie i to w niższych badanych stężeniach ekstraktu zanieczyszczeń powietrza. Stwierdzono także dużo niższe stężenia progowe badanych zanieczyszczeń w poszczególnych testach. Świadczy to o obecności większej ilości mutagenów typu zmiany fazy odczytu o charakterze nitrowych związków aromatycznych w próbce pobranej zimą.

W teście klasycznym (rys. 7) najwyższe wartości MR uzyskano w badaniach wykonywanych w obecności frakcji F0 i FA. Maksymalne wartości MR otrzymano w stężeniu ekstraktu wynoszącym 25 m³/płytkę w badaniach z F0 (MR = 27,99), w stężeniu 12,5 m³/płytkę w badaniach bez frakcji (MR = 16,48) oraz w stężeniu 6,25 m³/płytkę w obecności frakcji FA (MR = 15,0) i FB (13,52). Z kolei obecność zanieczyszczeń o działaniu mutagennym stwierdzono w stężeniu 0,01225 m³/płytkę powietrza w testach wykonywanych bez frakcji i z frakcją FA. Natomiast w badaniach z frakcją FB i F0 w stężeniu 0,0245 m³ powietrza wprowadzanego na płytkę.



Rys. 7. Wartości MR dla szczepu YG 1041 uzyskane w teście klasycznym dla próbki pobranej zimą

W przypadku testu prowadzonego z preinkubacją (rys. 8) otrzymano najwyższe wartości MR w badaniach prowadzonych z frakcją FA i FB. Stężenie progowe ekstraktów zanieczyszczeń powietrza w teście z frakcją FA wynosiło 0,01225 m³/płytkę, a w pozostałych testach 0,0245 m³/płytkę. W przypadku szczepu testowego YG1041, dla omawianej próbki, uzyskano podobne zależności wartości MR od stężenia ekstraktu zanieczyszczeń jak dla szczepu TA 98. W teście preinkubacyjnym stwierdzono wyższą liczbę rewertantów w porównaniu do testu klasycznego i zaobserwowano wyraźne obniżenie stężeń, w których zaobserwowano maksymalne wartości MR.



Rys. 8. Wartości MR dla szczepu YG 1041 uzyskane w teście preinkubacyjnym dla próbki pobranej zimą

4. Wnioski

1. We wszystkich testach najwyższe wartości współczynnika mutagenności (MR) uzyskano dla próbki pobranej w okresie zimowym. Mutagenność ekstraktów pyłów zawieszonych wzrasta więc w sezonie grzewczym i maleje w lecie.
2. Wysokie 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. W próbce pobranej zimą więcej było zanieczyszczeń o charakterze promutagenów, a w ekstrakcie próbki letniej związków o charakterze mutagenów bezpośrednich.
3. W ekstrakcie zanieczyszczeń pobranych latem mniej było mutagenów typu zmiany fazy odczytu o charakterze nitrowych związków aromatycznych w porównaniu do próbki pobranej zimą, o czym świadczą uzyskane w badaniach ze szczepem YG1041 wartości współczynników MR.
4. Test preinkubacyjny pozwolił na zwiększenie progów wykrywalności testem *Salmonella* zanieczyszczeń mutagennych pobranych latem, zwłaszcza mających działanie promutagenne.
5. W celu zwiększenia poziomu enzymów mikrosomalnych wątroby odpowiedzialnych za transformację szerokiego spektrum związków o działaniu mutagennym można zastąpić wysoce toksyczny i stabilny w środowisku Aroclor 1254 mniej toksycznym i tańszym fenobarbitem.
6. Badania mutagenności pyłowych zanieczyszczeń powietrza można prowadzić w obecności frakcji mikrosomalnej S9 nie poddanej uprzedniej aktywacji, zawierającej naturalny poziom enzymów mikrosomalnych.

Praca została zrealizowana w ramach grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego
Nr N523 612939 (2010-2013)

Literatura

1. Cohen A.J.: Outdoor air pollution and lung cancer. *Environmental Health Perspectives*, 2000, 108 (4), 743-750.
2. Dehnen W., Pitz N., Tomingas R.: The mutagenicity of airborne particulate pollutants. *Cancer Lett.*, 1997, 4: 5-12.
3. 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.
4. Claxton L.D., Matthews P.P., Warren S.H.: The genotoxicity of ambient outdoor air, a review: *Salmonella* mutagenicity, *Mutation Research*. 2004, 567, 347-399.
5. Claxton L.D., Woodall Jr G.M.: A review of the mutagenicity and rodent carcinogenicity of ambient air, *Mutation Research*. 2007, 636, 36- 94.
6. Ong T. M., Mukhtar C. R., Wolf and Zeiger E.: Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S9 from rat liver. *J. of Environ. Pathol. Toxicol.* 1980, 4: 55-65.
7. Wojewódzki Inspektorat Ochrony Środowiska we Wrocławiu, Raport o stanie środowiska w województwie dolnośląskim w 2010 roku, Wrocław 2011.
8. Lenicek J., Sekyra M., Badnarkova K., Benes I., Sipek F: Fractionation and chemical analysis of urban air particulate extracts. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 2000, 77(4): 269- 288.
9. Maron D.M., Ames B.N.: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutation Research* 1983, 113, 173-215.
10. Watanabe M., Ishidate M. Jr., Nohmi T.: 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.* 1990, 234: 337-348.
11. Matsushima T., T., Sugimura M., Nagao T., Yahagi A., Shurai A., Sawamura M.: Factors modulating mutagenicity in microbial tests. In: Norpoth K.H., Garner R.C. Eds: *Short-Term Test Systems Detecting Carcinogens*, Springer, Berlin, 1980, 273- 285.
12. Binkova B., Cerna B., Pastorkova A., Jelinek R., Benes I., Novak J., Sram 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.
13. Gilli G., Pignata C., Schiliro T., Bono R., La Rosa A., Traversi D.: The mutagenic hazards of environmental PM_{2.5} in Turin. *Environ. Res.* 2007, 103 (2) 168-175.
14. 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.
15. EEA Report No 5/2009: Ensuring quality of life in Europe's cities and towns, 2009.