

Piotr Jadczyk<sup>1\*</sup>, Barbara Kołwzan<sup>1</sup>

Instytut Inżynierii Ochrony Środowiska, Politechnika Wrocławska,  
ul. Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław

Wpłynęło w maju 2012 r.

1. Wstęp. 2. Ekstrakcja zanieczyszczeń genotoksycznych. 2.1. Techniki ekstrakcji. 2.2. Rozpuszczalniki organiczne. 2.3. Woda jako rozpuszczalnik. 2.4. Warunki ekstrakcji. 3. Szczepy *Salmonella* Typhimurium stosowane do oceny aktywności mutagennej zanieczyszczeń gleby. 4. Stężenie frakcji mikrosomalnej S-9 i metodyka jej aktywacji. 5. Preinkubacja. 6. Podsumowanie

### The application of the Ames test to the evaluation of the mutagenic activity of soil's pollutants

**Abstract:** The Ames test is universally used for examining the mutagenic activity of contaminated soil samples. Soil pollution is mostly extracted with the use of an ultrasonic bath or Soxhlet's apparatus. Dichloromethane and methanol are commonly applied solvents for the extraction of soil pollutants. Methanol was the most effective solvent. A mixture or the sequence of solvents was also applied for the extraction. Less effective was the extraction of soil pollutants in the form of water leakage. There is no sufficient literature data for determining optimal conditions of the extraction. Variants of the biotest technique applied by different authors demonstrated the significant diversity. The organisms tested the most often were strains of *Salmonella* Typhimurium TA 98 and TA 100. Its different sensitivity on extracts genotoxicity suggests the predominance of soil pollutants causing the mutation of the reading phase, which could be detected only by *Salmonella* Typhimurium TA 98, whereas mutations of the substitution of base pairs, are detected with the use of *Salmonella* Typhimurium TA 100. For activating promutagens a microsomal fraction S-9, obtained from the liver of rat, has most often been applied in different concentrations, which is activated by Aroclor 1254. Some authors applied a preincubation when performing Ames test for the genotoxicity evaluation of soil pollutants. Papers concerning the influence of the preincubation on the mutagenic effect in Ames test are rarely found. Collected literature data show the significant usefulness of the Ames test for the evaluation of mutagenic activity of soil pollutants. The comparison of the results obtained by different authors prevents the diversification of extraction techniques, solvents application and some aspects of biotest: test strains, the concentration and the preparation of the microsomal fraction S-9, the possibility of applying the preincubation. Unification of the extraction technique and the biotest, taking into consideration soil diversity and pollutants types would facilitate the comparison of the results.

1. Introduction. 2. The extraction of genotoxic pollutants. 2.1. Methods of the extraction. 2.2. Organic solvents. 2.3. The water as the solvent. 2.4. Extraction's conditions. 3. *Salmonella* Typhimurium strains used to evaluation of the mutagenic activity of soil's pollutants. 4. S-9 microsomal fraction's concentration and its activation's methods. 5. Preincubation. 6. Conclusion

**Słowa kluczowe:** biotest, ekstrakcja zanieczyszczeń, genotoksyczność, *Salmonella* Typhimurium, Salmonella test, zanieczyszczenia gleby  
**Key words:** biotest, pollutants extraction, genotoxicity, *Salmonella* Typhimurium, soil pollutants

## 1. Wstęp

Szereg zanieczyszczeń gleby wykazuje aktywność mutagenną i kancerogenną. Do takich zanieczyszczeń należą wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) oraz ich pochodne chlorowe i nitrowe, a także metale ciężkie. Pochodzenie tych zanieczyszczeń w glebie jest różne. Część z nich (m.in. WWA i ich nitropochodne) trafia do gleby w wyniku depozycji zanieczyszczeń atmosfery [16]. Są one emitowane jako produkty spalania paliw. Do zanieczyszczenia gleby nitropochodnymi WWA dochodzi też na terenach wojskowych, przemysłowych i górniczych, ponieważ są one używane jako materiały wybuchowe [7, 19, 25]. Chlorowane węglowodory aromatyczne są stosowane w rolnictwie jako pestycydy, część z nich trafia do gleby podczas opryskiwania upraw [9, 38]. Polichlorowane bifenyle

znajdowały zastosowanie jako m.in. płyny hydrauliczne, płyny izolująco-chłodzące w transformatorach oraz plastyfikatory. Są one bardzo trwałymi zanieczyszczeniami przedostającymi się do gleb w wyniku niedbałego ich składowania oraz jako odpady poprodukcyjne [52]. Zanieczyszczenie gleby produktami naftowymi, wśród których są także WWA i ich liczne pochodne następuje na skutek wycieku paliw podczas awarii rurociągów, cystern, wokół stacji benzynowych itp. [10, 49]. Aktywność mutagenna wykazują też niektóre z metali ciężkich zanieczyszczających glebę. Źródłem tych zanieczyszczeń jest różnorodna aktywność przemysłowa człowieka [38], są one uwalniane przez hutnictwo [52], a jako zanieczyszczenia paliw są także emitowane podczas procesów spalania.

Mutageny zanieczyszczające glebę stanowią poważne zagrożenie zdrowotne. Ulegają one biokumulacji

\* Autor korespondencyjny: Instytut Inżynierii Ochrony Środowiska, Politechnika Wrocławska, ul. Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław; piotr.jadczyk@pwr.wroc.pl

w tkankach roślin uprawnych oraz karmionych nimi zwierząt gospodarskich. Prowadzi to do skażenia żywności spożywanej przez ludzi. Część tych zanieczyszczeń migruje do wód podskórnych [30] i powierzchniowych, które są ujmowane na potrzeby ludzi, także do picia.

Dlatego też konieczne jest monitorowanie skażenia gleb przez zanieczyszczenia wykazujące aktywność mutagenną i kancerogenną. Najczęściej stosuje się do tego metody fizyko-chemiczne (GC-MS, HPLC). Ze względu na koszt analiz możliwe jest oznaczanie jedynie wybranych zanieczyszczeń wskaźnikowych, takich jak np. WWA z listy EPA. Wyniki analiz fizyko-chemicznych pozwalają tylko na przybliżoną ocenę zagrożenia zdrowotnego, jakie stwarzają mutageny zanieczyszczające gleby. Mogą one w zespołach działać addytywnie, synergistycznie albo antagonistycznie. Część z nich w środowisku glebowym oraz po wnikięciu do organizmu ludzkiego ulega przemianom biochemicznym powodujących zwiększenie albo zmniejszenie aktywności mutagennej. Na pełną ocenę genotoksyczności wszystkich mutagenów zanieczyszczających badaną glebę pozwala jedynie zastosowanie biotestów. W badaniach nad mutagenezą środowiskową najpowszechniej stosowany jest test Ames [21, 41]. Charakteryzuje go stosunkowo znaczna wrażliwość na działanie mutagenów środowiskowych oraz znaczna zdolność prognozowania ich kancerogenności [21].

Organizmami testowymi w teście Ames są bakterie *Salmonella* Typhimurium, które w wyniku celowej mutacji zostały pozbawione zdolności syntezy histydyny. W konsekwencji nie mogą one rosnąć na podłożu mikrobiologicznym pozbawionym tego aminokwasu. Test polega na hodowli bakterii na podłożu niemal zupełnie pozbawionym histydyny w obecności badanej próbki, np. ekstraktu glebowego. Wzrost bakterii oznacza, że uległy one mutacji powrotnej, polegającej na naprawie wady genetycznej, jaką jest niezdolność do wytwarzania histydyny. Zastosowanie w teście frakcji enzymatycznej uzyskiwanej najczęściej z wątroby szczurów pozwala zasymulować w teście bakteryjnym warunki biochemiczne panujące w organizmie kręgowca, jakim jest człowiek [34, 41].

Piśmiennictwo na temat genotoksyczności zanieczyszczeń gleby jest obszerna. Przedstawia ona wyniki badania wielu próbek gleb zebranych w różnych częściach świata. Brakuje natomiast prac przeglądowych. Dotychczasowy stan wiedzy na temat genotoksyczności gleb został dotychczas podsumowany najpierw przez Watanabe i Hirayama [57], a następnie przez White i Claxton [60]. Watanabe i Hirayama [57] ogólnikowo wymienili najpowszechniej stosowane metody ekstrakcji zanieczyszczeń mutagennych z gleb zwracając uwagę, że do biotestów wprowadzane są glebowe wyciągi wodne oraz ekstrakty organiczne, a dokładniej przeanalizowali zastosowanie biotestów do badania

genotoksyczności gleb. Autorzy ci dokonali podziału gleb zawierających zanieczyszczenia genotoksyczne na gleby: przemysłowe, rolnicze i komunikacyjne. Praca White i Claxtona [60] jest znacznie bardziej obszerna, podkreślono w niej powszechność zastosowania testu Ames w badaniach nad genotoksycznością gleb. Autorzy w oparciu o analizę statystyczną wyników badania genotoksyczności zanieczyszczeń wyekstrahowanych z 1633 próbek gleby określili zależność efektu mutagennego od rozpuszczalnika użytego do ekstrakcji, zastosowanego szczepu *Salmonella* Typhimurium, zawartości w glebie WWA, pochodzenia zanieczyszczeń (gleby miejskie, przemysłowe i rolnicze), aktywacji metabolicznej oraz zróżnicowanie powszechności zastosowania różnych wariantów metodyki. Autorzy tej pracy nie podjęli natomiast szeregu innych ważnych zagadnień, jak: metodyka ekstrakcji (technika, czas i temperatura), stężenie frakcji S9 oraz związek użyty do jej aktywacji.

Celem prezentowanej pracy jest podsumowanie aktualnego stanu wiedzy na temat badania genotoksyczności gleb testem Ames ze szczególnym uwzględnieniem techniki ekstrakcji, czasu jej trwania i temperatury w jakiej jest ona prowadzona oraz użytego rozpuszczalnika, możliwości badawczych jakie daje zastosowanie jako organizmów testowych różnych szczepów *Salmonella* Typhimurium, stężenia frakcji mikrosomalnej S9 oraz metodyki jej aktywacji. Większość prac będących podstawą prezentowanego opracowania nie była cytowana w pracy White i Claxton [60].

## 2. Ekstrakcja zanieczyszczeń genotoksycznych

### 2.1. Techniki ekstrakcji

Zanieczyszczające glebę związki mutagenne muszą być z niej wyekstrahowane przed wprowadzeniem do testu Ames oraz analizą chemiczną. Ekstrakcja ta polega najczęściej na wypłukaniu zanieczyszczeń organicznych za pomocą rozpuszczalników. Autorzy poszczególnych prac stosowali jednak różne techniki ekstrakcji i różne rozpuszczalniki.

Najpowszechniej stosowane były ekstrakcja na zimno w łaźni ultradźwiękowej oraz ekstrakcja w aparatach Soxhleta, rzadziej inne techniki (tab. I). Mieszanie i wytrząsanie było stosowane do otrzymywania wyciągów wodnych zanieczyszczeń gleby [11–13, 44]. Niektórzy autorzy powtarzali ekstrakcję takim samym rozpuszczalnikiem [12, 16, 58]. Inną modyfikacją była sekwencja dwóch różnych technik ekstrakcji, np. poprzedzenie ekstrakcji w łaźni ultradźwiękowej wytrząsaniem gleby z rozpuszczalnikiem [7]. W piśmiennictwie nie ma informacji na temat skuteczności poszczególnych technik ekstrakcji.

Tabela I  
Techniki stosowane do ekstrakcji zanieczyszczeń mutagennych gleby

Technika ekstrakcji	Liczba prac	Piśmiennictwo
W aparatach Soxhleta	12	[4, 10, 22, 23, 26–29, 37, 49, 58, 59]
Ekstrakcja na zimno w łaźni ultradźwiękowej	8	[12, 33, 36, 34, 38, 48, 50, 56]
Ekstrakcja przyspieszona	3	[12–15]
Wytrząsanie	3	[11, 12, 44]
Mieszanie	2	[9, 13]
Zalewanie gleby rozpuszczalnikiem i odparowywanie jej w podciśnieniu	1	[16]

## 2.2. Rozpuszczalniki organiczne

Do ekstrakowania zanieczyszczeń gleby w celu oceny ich aktywności mutagennej stosowane były różne rozpuszczalniki. Większość autorów stosowała ekstrakcję jednym rozpuszczalnikiem (tab. II), niektórzy stosowali ich mieszaninę (tab. III) lub sekwencję kolejnych rozpuszczalników (tab. IV). Na etapie planowania eksperymentu istotne znaczenie ma fakt, że badanie genotoksyczności ekstraktów tych samych próbek gleby, otrzymanych za pomocą różnych rozpuszczalników znacznie zwiększa pracochłonność i materiałochłonność badań, w niewielkim stopniu zwiększa natomiast prawdopodobieństwo wykrycia genotoksyczności poszczególnych próbek [22]. Najczęściej stosowanymi rozpuszczalnikami były dichlorometan i metanol. W h i t e

Tabela II  
Rozpuszczalniki stosowane do ekstrakcji zanieczyszczeń mutagennych gleby

Rozpuszczalnik	Liczba prac	Piśmiennictwo
Dichlorometan	16	[6, 9, 10, 12, 13, 15, 22, 23, 5, 26–28, 29, 32, 37, 50]
Metanol	13	[1, 3, 10, 11, 13, 15, 16, 22, 25, 26, 28, 56, 58]
Aceton	6	[1, 3, 15, 16, 25, 56]
Acetonitryl	6	[1, 3, 11, 16, 25, 40]
Heksan	6	[3, 11, 22, 26–28]
Eter dietylowy	4	[26, 28, 30]
Cykloheksan	2	[11, 37]
Chloroform	1	[3]
Etanol	1	[11]
DMSO	1	[30]
Woda	7	[6, 7, 11, 13, 25, 30, 44]
Kwas octowy 1 M	1	[12]
Wodorotlenek sodu 1 M	1	[12]

Tabela III  
Mieszaniny rozpuszczalników stosowane do ekstrakcji zanieczyszczeń gleby

Mieszanina rozpuszczalników	Piśmiennictwo
Benzen + etanol (3:1)	[36]
Dichlorometan + heksan (1:1)	[6]
Aceton + heksan	Googgleman i Spitzauer 1982 [za 25]
Dichlorometan + metanol (2,3:1)	[4]
Heksan + aceton (2:1)	[16]
Aceton + toluen + metanol (1:1:1)	[16]
DMSO + etanol (1:1)	[7]
dichlorometan + aceton	[11]
eter dietylowy + heksan (1:1)	[22, 26, 28]

Tabela IV  
Sekwencje rozpuszczalników i ich mieszanin stosowane do ekstrakcji zanieczyszczeń gleby

Sekwencja rozpuszczalników i ich mieszanin	Piśmiennictwo
Cykloheksan, aceton	[38]
Aceton, heksan, dichlorometan, toluen, dietylketon	[59]
Heksan, aceton, dichlorometan	
Dichlorometan, aceton, toluen+dietylketon (2:1), heksan	
Aceton+dichlorometan (1:1), toluen+dietylketon (2:1)	
Aceton+dichlorometan (1:1), toluen+dietylketon (2:1)	

i C l a x t o n [60] na podstawie analizy wyników badania genotoksyczności 1633 próbek gleby opisanych w literaturze stwierdzili, że ponad 50% z nich było ekstrahowanych metanolem, 24% mieszaniną heksanu i acetonu, 14% dichlorometanem, a 11% innymi rozpuszczalnikami. Powszechność zastosowania tych samych rozpuszczalników ułatwia porównywanie wyników, nie powinna ona jednak być jedynym kryterium ich doboru.

Prac poświęconych porównaniu skuteczności ekstrakcji zanieczyszczeń mutagennych gleby jest niewiele. Większość z nich omawia wyniki badania aktywności mutagennej nielicznych próbek gleby. Prac, w których porównano skuteczność ekstrakcji zanieczyszczeń mutagennych różnymi rozpuszczalnikami co najmniej 10 próbek gleby jest zaledwie kilka [13, 15, 38]. Uzyskane dotychczas wyniki wskazują, że metanol ekstrahował zanieczyszczenia mutagenne na ogół nieznacznie skuteczniej od dichlorometanu. Tak było w przypadku 70% z 18 [13] oraz połowy z 21 badanych próbek gleby [15]. Na wysoką skuteczność metanolu wskazują także prace innych autorów oparte na wynikach badania mutagenności pojedynczych gleby [1, 3, 4]. Nie zawsze jednak

tak było. Courty i wsp. [11] na podstawie wyników badania mutagenności 4 próbek gleby ekstrahowanych 8 różnymi rozpuszczalnikami, w tym metanolem uznali dichlorometan, aceton i acetonitryl za rozpuszczalniki najskuteczniej ekstrahujące zanieczyszczenia mutagenne z gleb. W niektórych przypadkach skuteczniejsze od metanolu czy dichlorometanu okazały się inne rozpuszczalniki: acetonitryl [16] i eter dietylowy [30]. Były to jednak wyniki badania pojedynczych próbek gleby. Monarca i wsp. [38] stwierdzili, że acetonem ekstrahuje się dwukrotnie większą masę zanieczyszczeń niż cykloheksanem (średnia dla 10 próbek gleby), jednak nie porównywali oni aktywności mutagennej obydwóch ekstraktów. White i Claxton [60] na podstawie danych literaturowych porównali metodami statystycznymi genotoksyczność wobec *Salmonella Typhimurium* próbek gleby ekstrahowanych metanolem, dichlorometanem i mieszaniną heksan/aceton stwierdzając, że skuteczność ekstrakcji zależała nie tylko od użytego rozpuszczalnika, ale i od rodzaju zanieczyszczeń obecnych w glebie (gleby przemysłowe, miejski i rolnicze). Nie było zatem możliwe wskazanie jednego – uniwersalnego rozpuszczalnika, który byłby najbardziej skuteczny do ekstrakcji wszystkich próbek gleb. Zebrane dane literaturowe wskazują, że w pierwszej kolejności należy brać pod uwagę metanol i dichlorometan.

Efekt ekstrakcji zanieczyszczeń mutagennych z gleby może być też zależny od rodzaju gleby. Zróżnicowanie skuteczności ekstrakcji zanieczyszczeń mutagennych różnymi rozpuszczalnikami z pojedynczych próbek w zależności od rodzaju gleby analizowali jedynie Kool i wsp. [30]. Ekstrakcja eterem dietylowym była najskuteczniejsza w przypadku gleby ogrodowej, torfiastej i bielcowej), natomiast w przypadku gleby piaszczystej nie było jednego ekstraktu, który wykazywałby największą aktywność mutagenną wobec różnych szczepów *Salmonella* z aktywacją metaboliczną i bez niej.

### 2.3. Woda jako rozpuszczalnik

Część zanieczyszczeń gleby stanowią związki nieorganiczne, m. in. sole metali ciężkich. Są one rozpuszczalne w wodzie. Dlatego też niektórzy autorzy badali aktywność mutagenną tej grupy zanieczyszczeń ekstrahując je z gleby w postaci odcieków wodnych (tab. II). Zastosowanie wody jako rozpuszczalnika, pozwala na ocenę możliwości migracji zanieczyszczeń mutagennych gleby wraz z wodami gruntowymi oraz na określenie wpływu pH wód gruntowych i opadowych na aktywność mutagenów zanieczyszczających gleby. Największą aktywność mutagenną wykazywał ekstrakt wodny zanieczyszczeń gleby o odczynie obojętnym [30]. Była ona większa od aktywności mutagennej zanieczyszczeń ekstrahowanych DMSO. Aktywność mutagenna roztworów wodnych o odczynie kwaśnym i zasadowym była

natomiast znikoma. Wyniki tych badań wskazywały na niebezpieczeństwo przenikania mutagenów zanieczyszczających gleby do wód ujmowanych na potrzeby gospodarstw domowych ludzi, w tym także do picia. Niewielką aktywność mutagenną zanieczyszczeń gleby rozpuszczalnych w wodzie o pH=2 stwierdzili też Kniz i wsp. [25], zanieczyszczenia tej samej gleby rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych były znacznie bardziej aktywne mutagenie. Zanieczyszczenia gleby ekstrahowane wodą wykazywały mniejszą aktywność mutagenną od zanieczyszczeń tej samej gleby ekstrahowanych metanolem, a w 2 z 3 próbek także dichlorometanem [13]. W niektórych przypadkach odcieki wodne z gleb przed wprowadzeniem do testu Amesa były zagęszczane na żywicach, a następnie wymywane z nich rozpuszczalnikami organicznymi [17, 51].

### 2.4. Warunki ekstrakcji

Autorzy poszczególnych prac stosują nie tylko różne techniki ekstrakcji i różne rozpuszczalniki oraz ich mieszaniny i sekwencje, ale i różne parametry ekstrakcji. Zróżnicowanie tych parametrów obejmuje: czas ekstrakcji, temperaturę w jakiej jest prowadzona, prędkość wytrząsania.

Courty i wsp. [11] dokonali przeglądu literaturowego proporcji pomiędzy masą gleby a objętością rozpuszczalnika. Zróżnicowanie tych proporcji wynosiło od 1:1 do 1:10. Aktywność mutagenna zanieczyszczeń gleby ekstrahowanych przy proporcji gleby i rozpuszczalnika 1:10 była większa niż przy proporcji 1:1 w przypadku 3 z 4 próbek gleby badanych przez ten zespół autorów. Dane te pozwalają na stwierdzenie, że użycie większej ilości rozpuszczalnika pozwala na zwiększenie wydajności ekstrakcji. Nie są one jednak wystarczające do określenia optymalnych proporcji pomiędzy masą gleby i objętością rozpuszczalnika. Dalsze badania w tym kierunku powinny uwzględniać zróżnicowanie technik ekstrakcji, stosowanych rozpuszczalników oraz zróżnicowanie właściwości różnych typów genetycznych gleb, a także rodzaje obecnych w nich zanieczyszczeń.

Czasy ekstrakcji stosowane w różnych laboratoriach wykazywały znaczne różnicowanie: od 10 min. do 18 godzin przy ekstrakcji ultradźwiękami [7, 32, 33, 38, 48, 56, 58], 6–24 godzin przy ekstrakcji w aparatach Soxhleta [4, 6, 10, 22, 27, 29, 37, 49], od 30 min. do 24 godzin w przypadku mieszania i wytrząsania [11–13, 44]. Ekstrakcja w aparatach Soxhleta była zatem najbardziej czasochłonną metodą. Niewiele jest natomiast danych na temat zależności pomiędzy czasem ekstrakcji, a jej skutecznością. Ekstrakty 3 z 4 próbek gleby badanych przez Courty i wsp. [11] wykazywały większą aktywność mutagenną wobec szczepu *Salmonella Typhimurium* TA 98 gdy czas ekstrakcji wynosił 24 a nie 4 godziny. Pozwala to wnioskować, że wydłuża-



nie czasu ekstrakcji zwiększa jej skuteczność. Dane te są jednak niewystarczające do określenia optymalnego czasu ekstrakcji, to znaczy gwarantującego wysoką skuteczność bez zbędnego wydłużania ekstrakcji. Dalsze badania mające na celu optymalizację czasu ekstrakcji powinny być prowadzone w sposób uwzględniający zróżnicowanie stosowanych technik ekstrakcji, rozpuszczalników, różnorodność typów genetycznych gleb oraz ich zanieczyszczeń.

Dane piśmiennictwa nie dają podstaw do określenia optymalnej temperatury ekstrakcji. W przypadku ekstrakcji ultradźwiękami, poprzez wytrząsanie albo mieszanie proces ten może być prowadzony w temperaturze pokojowej. 3 z 4 próbek gleby badanych przez C o u r t y i wsp. [11] wykazywały większą aktywność mutagenną gdy ekstrakcję prowadzono w temperaturze 37°C (takiej samej jak badanie genotoksyczności testem Ames) niż w temperaturze pokojowej. W przypadku zastosowania aparatów Soxhleta temperatura ekstrakcji jest zależna od temperatury wrzenia zastosowanego rozpuszczalnika (ponad 37°C). Nie zawsze też, ekstrakcja dichlometanem o stosunkowo niskiej temperaturze wrzenia (40,2°C) dawała najlepsze rezultaty, w przypadku wielu gleb był to metanol (temperatura wrzenia 64,5°). Przy doborze rozpuszczalnika należy jednak pamiętać, że nadmierne ogrzewanie może spowodować rozkład najmniej trwałych mutagenów.

Wpływ na skuteczność ekstrakcji może mieć także prędkość wytrząsania i mieszania. Autorzy dostępnych prac stosowali różne prędkości, np. 120 obrotów na minutę [44]. Nie ma natomiast danych literaturowych, które pozwoliłyby określić graniczną prędkość wytrząsania i mieszania, której zwiększanie nie powodowałoby już przy danym czasie ekstrakcji zwiększenia skuteczności tego procesu. Niektórzy autorzy podkreślają, że ekstrakcję prowadzono bez dostępu światła [11]. Jest to istotne, ze względu na możliwość fotochemicznego rozkładu niektórych WWA.

Do wypracowania metodyki ekstrakcji zanieczyszczeń mutagennych gleby, która zostałaby powszechnie zaakceptowana konieczne są dalsze badania. Powinny one obejmować przede wszystkim poszukiwania najbardziej skutecznego rozpuszczalnika, czy też mieszaniny albo sekwencji rozpuszczalników. Warunkiem porównywalności wyników uzyskiwanych w różnych laboratoriach jest też ujednoczenie metody ekstrakcji oraz czasu jej trwania. Rozstrzygnięcia wymaga też kwestia, czy możliwe jest opracowanie uniwersalnej metodyki ekstrakcji zanieczyszczeń gleby, czy także konieczne jest jej zróżnicowanie w zależności od rodzaju gleby oraz przeważającej w próbce grupy zanieczyszczeń. C o u r t y i wsp. [11] zaproponowali następującą kolejność badań mających na celu określenie optymalnej dla danej partii próbek gleb metodyki ekstrakcji oraz badania genotoksyczności:

1. identyfikacja bardziej wrażliwego szczepu (TA 98 i TA 100),
2. identyfikacja najbardziej skutecznego rozpuszczalnika,
3. optymalizacja warunków ekstrakcji: temperatury, czasu i proporcji między glebą a rozpuszczalnikiem.

### 3. Szczepy *Salmonella typhimurium* stosowane do oceny aktywności mutagennej zanieczyszczeń gleby

W badaniach nad mutagenną aktywnością zanieczyszczeń gleby testem Amesa najpowszechniej stosowane są szczepy TA 98 i TA 100 (tab. V). Szczep TA 98 użyty został przez autorów wszystkich dostępnych prac, szczep TA 100 przez większość nich. Inne szczepy były sporadycznie stosowane do oceny właściwości mutagennych zanieczyszczeń gleby. Powszechność zastosowania szczepów TA 98 i TA 100 w oparciu o zebrane dane literaturowe stwierdzili też W h i t e i C l a x t o n [60].

Tabela V

Zastosowanie szczepów *Salmonella Typhimurium* do badania aktywności mutagennej zanieczyszczeń gleby testem Ames

Szczep	Liczba prac	Piśmiennictwo
TA 98	33	[1, 4, 6, 9–16, 22, 23, 25–33, 36–40, 44, 49, 50, 56, 58, 59]
TA 100	22	[1, 6, 7, 9–12, 16, 23, 25, 29–31, 36–38, 44, 49, 50, 56, 58, 59]
YG 1041	4	[26, 27, 29, 50]
YG 1042	3	[26, 29, 50]
TA 97a	3	[1, 12, 31]
TA 102	2	[1, 50]
TA 104	2	[1, 50]
TA 98NR	2	[25, 59]
TA 98/1,8–DNP6	1	[25]
TA 100NR	1	[25]
YG 1021	1	[59]
YG 1024	1	[59]
YG 1026	1	[59]
YG 1029	1	[59]
TA 97	1	[50]

Wyniki większości autorów stosujących szczepy TA 98 i TA 100 do oceny aktywności mutagennej zanieczyszczeń gleby wskazują na większą wrażliwość szczepu TA 98 [1, 7, 9, 11, 16, 23, 25, 26, 29, 30, 37, 38, 56]. Na większą wrażliwość szczepu TA 98 niż TA 100 wskazywały także wyniki analizy danych literaturowych dokonanej przez W h i t e i C l a x t o n [60]. Pozwala to wnioskować, że wśród zanieczyszczeń gleby przeważają mutageny powodujące powstawanie mutacji zmiany fazy odczytu, na wykrywanie których pozwala szczep TA 98, nie zaś mutageny powodujące powstawanie

mutacji typu zmiany par zasad na wykrywanie których pozwala szczep TA 100. Zdarzały się jednak przypadki odwrotne [6, 49]. Dlatego też zasadne jest stosowanie w początkowej fazie badań obydwóch szczepów. Pozwala to na wybór bardziej wrażliwego z nich. Rozwiązanie takie zastosowali z powodzeniem *McDaniels* i wsp. [37] oraz *Courty* i wsp. [11].

Szczepy TA 97, TA 97a, TA 102, TA 104 były sporadycznie stosowane do badania aktywności mutagennej zanieczyszczeń gleby (tab. IV). Ponadto były one albo w ogóle nie wrażliwe na działanie mutagenów zanieczyszczających badane gleby, albo wykazywały wrażliwość mniejszą od szczepów TA 98 i TA 100 [1]. Także *Mortelmans* i *Zeiger* [41] na podstawie analizy wyników wielu badań aktywności mutagennej różnych mutagenów prowadzonych w różnych laboratoriach na przestrzeni wielu lat zalecają stosowanie szczepów TA 97, TA 102 i TA 104 do potwierdzania wyników ujemnych testów wstępnych z zastosowaniem szczepów TA 98 i TA 100. Szczep TA 97 pozwala na wykrywanie mutacji typu zmiany fazy odczytu, podobnie jak szczep TA 98, szczepy TA 102 i TA 104 umożliwiają wykrywanie mutacji typu podstawiania par zasad.

Niektóre ze szczepów stosowanych w teście Ames posiadają modyfikacje genetyczne, które predysponują je do wykazywania udziału wybranych grup związków chemicznych w ogólnej mutagenności badanej próbki o charakterze mieszaniny wieloskładnikowej. Charakter taki mają ekstrakty zanieczyszczeń gleby. Modyfikacje genetyczne omawianych szczepów polegają na pozbawieniu ich wrażliwości na mutagenne działanie niektórych grup mutagenów, albo zwiększeniem tej wrażliwości. Należą do nich szczepy *Salmonella* Typhimurium TA 98NR, TA 100NR pozbawione zdolności wytwarzania nitroreduktazy [46, 47] oraz szczep TA 98/1,8-DNP<sub>6</sub> pozbawiony zdolności wytwarzania nitroreduktazy specyficznej wobec nitropirenów [45]. Szczepy te są pozbawione wrażliwości na mutagenne działanie nitrowych pochodnych WWA. Szczepy *Salmonella* Typhimurium YG 1021, YG 1024 mają wprowadzone plazmidy zawierające kopię genu odpowiedzialnego za syntezę nitroreduktazy, szczepy YG 1026 i YG 1029 mają wprowadzone plazmidy zawierające kopię genu odpowiedzialnego za syntezę *O*-acetylotransferazy. Szczepy YG 1041 i YG 1042 wykazują podwyższoną aktywność nitroreduktazową i *O*-acetylotransferazową. Szczepy o zwiększonej aktywności nitroreduktazowej są szczególnie wrażliwe na mutagenne działanie nitropochodnych WWA, szczepy o zwiększonej aktywności *O*-acetylotransferazowej są szczególnie wrażliwe na mutagenne działanie nitrowych i aminowych pochodnych WWA [18, 20, 53–55]. Przypadki zastosowania szczepów o zmienionej aktywności nitroreduktazowej i *O*-acetyloaminotransferazowej są jak na razie nieliczne i wskazują na znaczący udział nitrowych

i aminowych pochodnych WWA wśród ogółu mutacji powodowanych przez zanieczyszczenia gleby (tab. 5).

Wyniki dotychczasowych badań prowadzonych różnych laboratoriach pozwalają rekomendować szczepy TA 98 i TA 100 do badania aktywności mutagennej zanieczyszczeń gleby. Ich pochodne o zmienionej aktywności nitroreduktazowej i *O*-acetylotransferazowej pozwalają na określenie udziału nitrowych i aminowych pochodnych WWA. Szczepy o zwiększonej aktywności nitroreduktazowej umożliwiają wykrycie aktywności mutagennej badanych prób, nawet wtedy, gdy w próbie nie ma innych mutagenów. Szczepy pozbawione aktywności nitroreduktazowej dadzą wówczas wynik ujemny, podobnie jak szczepy macierzyste. Zastosowanie szczepów o zwiększonej aktywności nitroreduktazowej powinno, zatem mieć pierwszeństwo przed zastosowaniem szczepów aktywności tej pozbawionych.

#### 4. Stężenie frakcji mikrosomalnej S-9 i metodyka jej aktywacji

Do aktywacji promutagenów stosowana jest w teście Ames frakcja mikrosomalna [34, 41]. Najczęściej używa się ją z wątroby szczurów, czasem jednak stosowana jest frakcja uzyskana z wątroby ssaków innych gatunków. W poszczególnych laboratoriach stosuje się różne stężenia frakcji mikrosomalnej S-9 oraz różne jej aktywatory. Brakuje natomiast prac porównujących skuteczność aktywacji promutagenów wyekstrahowanych z gleby przez frakcję mikrosomalną S-9 w zależności od jej stężenia i związku użytego do aktywacji jej enzymów. Wielu autorów pomija w opisie metodyki informacje o przygotowaniu frakcji mikrosomalnej oraz o jej stężeniu we frakcji S-9 mix.

W badaniach nad aktywnością mutagenną zanieczyszczeń gleby najczęściej stosowana jest frakcja mikrosomalna wypreparowana z wątroby szczurów [1, 6, 9, 12–16, 25, 28–30, 37, 44, 49, 50, 56, 58], rzadziej z wątroby chomików [39].

Do aktywacji enzymów tej frakcji najczęściej stosowany był Aroclor 1254 [1, 6, 9, 11–16, 23, 25, 26, 29, 30, 37, 44], ewentualnie Aroclor 1248 [59]. Część autorów zamiast wysoce toksycznego, rakotwórczego i trwałego Arochloru stosuje fenobarbital sodu [49] albo fenobarbital z naftoflawonem [16, 56, 58, 59] wg metodyki opisaną przez *Onga* i wsp. [43]. *Wesp* i wsp. [59] stwierdzili jednak w badaniach wstępnych, że frakcja mikrosomalna aktywowana Aroclorem 1248 wykazuje większą aktywność wobec promutagenów zanieczyszczających glebę niż frakcja aktywowana fenobarbitalem z naftoflawonem i w badaniach zasadniczych zastosowali frakcję aktywowaną Aroclorem 1248. *Morelli* i wsp. [39, 40] do aktywacji enzymów wątroby chomika zastosowali 3-metylocholanren.

Do aktywacji promutagenów będących zanieczyszczeniami gleby w różnych laboratoriach stosowana jest frakcja S-9 mix o różnej zawartości frakcji S-9 uzyskiwanej bezpośrednio z wątroby: 4% [13, 37], 7,5% [30], 10% [11, 13, 23, 27, 28, 56, 58], 30% [9, 13, 14, 15]. Knize i wsp. [25] zastosowali frakcję S-9 mix w ilości odpowiadającej 2 mg białka na płytkę, Nielsen i wsp. [42] 1 mg białka na płytkę. Jedynie Donnelly i wsp. [13] Porównywali skuteczność aktywacji metabolicznej promutagenów będących zanieczyszczeniami gleby przez frakcje S-9 mix różniące się zawartością czystej frakcji S-9. Mutagenność małych dawek badanych prób najbardziej podnosiła frakcja 4%, dużych 10%, frakcja 30% wykazywała działanie toksyczne.

Maron i Ames [34] zalecają stosowanie frakcji 4%, a w przypadku uzyskania wyniku ujemnego frakcji o stężeniu 10%. Za optymalne uważają oni zastosowanie obydwóch stężeń frakcji w jednym eksperymencie, zwracają jednak uwagę, że rozwiązanie takie podnosi jego koszty. Mortelmans i Zeiger [41] w oparciu o analizę wyników uzyskanych w różnych laboratoriach przez autorów 95 publikacji stwierdzają, że w teście Amesa stosowana jest frakcja o stężeniu 4–30%. Przy doborze jej optymalnego dla danego rodzaju próbek w niektórych laboratoriach zaczyna się od stężeń niskich, a w innych od stężeń dużych. Autorzy ci zalecają dobór stężenia frakcji w zakresie 5–30% zaczynając od stężeń dużych. Wyniki dotychczasowych badań nad zróżnicowaniem skuteczności aktywacji metabolicznej zanieczyszczeń gleby przez różne stężenia frakcji S-9 w S-9 mix wskazują na toksyczność stężeń wysokich [13]. Przemawia to za zastosowaniem w eksperymencie wstępnym niewielkich stężeń frakcji i zwiększaniem ich w kolejnych eksperymentach w przypadku uzyskania wyników ujemnych. Rozwiązanie takie z punktu widzenia praktyki laboratoryjnej ma szereg zalet. Umożliwia wykrycie aktywności mutagennej niewielkiej dawki mutagenów, a co za tym idzie zwiększa wrażliwość testu. Pozwala to też ograniczyć wielkość próbki niezbędnej do badań, a w konsekwencji ilość rozpuszczalników zużytych do jej ekstrakcji. Ograniczenie zużycia frakcji ma nie tylko wymiar finansowy, ale i etyczny, pozwala bowiem zminimalizować liczbę zwierząt niezbędnych do jej uzyskania oraz zużycie wysoce niebezpiecznych odczynników, takich jak Aroclor.

Aroclor 1254 jest najpowszechniej stosowanym i najbardziej uniwersalnym induktorem enzymów mikrosomalnych [34, 41]. Przemawia to za stosowaniem go do aktywacji mieszaniny wieloskładnikowej, jaką jest ekstrakt zanieczyszczeń gleby. Pozostałe związki stosowane do aktywacji enzymów mikrosomalnych mogą wykazywać większą skuteczność aktywowaniu niektórych związków. Fenobarbital skuteczniej aktywuje aminy aromatyczne, jest jednak nieefektywny w aktywowaniu niektórych węglowodorów aromatycznych [2]. Sku-

teczną alternatywą dla Arocloru okazała się natomiast mieszanina fenobarbitalu i  $\beta$ -naftoflawonu [35, 43]. Znalazienie takiej alternatywy jest ważne ze względu na zagrożenie jakie wyjątkowo trwałe i wysoce rakotwórczy Aroclor stanowi dla pracowników laboratorium oraz dla środowiska oraz ze względu na trudności w precyzyjnym dozowaniu cieczy o znacznej lepkości [34].

Do aktywowania mutagenów pośrednich w teście Amesa wykorzystywana jest frakcja mikrosomalna uzyskiwana z wątroby, rzadziej nerek albo płuc. Płuca są jednak trudne do homogenizacji ze względu na ich gąbczastą strukturę, są także mniej sterylne niż wątroba. Ponadto frakcja uzyskana z wątroby wykazuje największą aktywność enzymów odpowiedzialnych za aktywację promutagenów. Organy, z których otrzymuje się frakcję mikrosomalną najczęściej pozyskuje się ze szczurów, a także z chomików, świnek morskich, myszy oraz ludzi [34, 41]. Maron i Ames [34] zalecają generalnie stosowanie w teście Amesa frakcji mikrosomalnej uzyskanej z wątroby szczurów, zwracają jednak uwagę, że w niektórych przypadkach frakcja uzyskana z wątroby chomików może skuteczniej aktywować promutageny. Dzieje się tak w przypadku np. nitrozoamin [5].

Dalsze badania nad aktywacją promutagenów zanieczyszczających gleby powinny pozwolić na ostateczne zastąpienie Arocloru innymi aktywatorami enzymów oraz określić standardowe stężenie frakcji mikrosomalnej. Standardowa procedura powinna określać także gatunek ssaka oraz jego organ, z którego pochodzą enzymy używane w teście do aktywacji promutagenów. Wyjaśnienia wymaga też kwestia, czy możliwe jest stworzenie procedury uniwersalnej, która będzie mogła być stosowana do badania wszystkich próbek gleby, czy też konieczne jest jej zróżnicowanie w zależności od przeważającej w danej glebie grupy zanieczyszczeń. Wyniki badań dotychczasowych pozwalają rekomendować tymczasowo zastosowanie frakcji uzyskanej z wątroby szczurów ze względu na powszechność jej stosowania.

## 5. Preinkubacja

Oryginalna procedura testu Amesa przewiduje możliwość zastosowania preinkubacji w celu przedłużenia czasu kontaktu bakterii testowych z badaną próbką. Niektórzy autorzy stosowali ten wariant testu do badania genotoksyczności zanieczyszczeń gleby [12, 44]. Nie ma jednak prac, których autorzy porównaliby efekt mutageny spowodowany przez zanieczyszczenia wyekstrahowane z gleby w teście bez i z preinkubacją.

## 6. Podsumowanie

Test Amesa jest powszechnie stosowany do badania aktywności mutagennej prób środowiskowych, w tym zanieczyszczeń gleb. Zanieczyszczenia te przed



wprowadzeniem do testu muszą być wyekstrahowane z gleby. Najczęściej w tym celu stosowana jest ekstrakcja na zimno w łaźni ultradźwiękowej oraz ekstrakcja w aparatach Soxhleta. W piśmiennictwie nie ma informacji na temat zróżnicowanie skuteczności różnych technik ekstrakcji. Rozpuszczalnikami najpowszechniej stosowanymi do ekstrakowania zanieczyszczeń gleb są dichlorometan i metanol. Powszechność zastosowania tych samych rozpuszczalników ułatwia porównywanie wyników, nie powinna być jednak kryterium ich doboru. Często najskuteczniejsza była ekstrakcja metanolem. Niektórzy autorzy do ekstrakcji zanieczyszczeń gleb stosowali mieszaninę albo sekwencję rozpuszczalników. Skuteczność ekstrakcji różnymi rozpuszczalnikami wykazywała zróżnicowanie w zależności od rodzaju gleby oraz składu jej zanieczyszczeń. Mało skuteczną była ekstrakcja zanieczyszczeń gleb w postaci odcieków wodnych. Na ogół wykazywały one niewielką genotoksyczność w teście Ames. Zróżnicowanie technik ekstrakcji oraz stosowanych w niej rozpuszczalników powoduje, że istniejące obecnie dane literaturowe są niewystarczające do określenia optymalnych warunków ekstrakcji (czasu, temperatury, proporcji między glebą a rozpuszczalnikiem).

Znaczne zróżnicowanie wykazywały także liczne warianty techniki samego biotestu stosowane przez autorów poszczególnych prac. Organizmami testowymi najczęściej były szczepy *Salmonella* Typhimurium TA 98 i TA 100. Zróżnicowanie ich wrażliwości na genotoksyczne działanie ekstraktów większości gleb wskazywało, że w glebach obecne są głównie zanieczyszczenia powodujące powstawanie mutacji zmiany fazy odczytu, na wykrywanie których pozwala szczep *Salmonella typhimurium* TA 98, nie zaś mutacje podstawiania par zasad, na wykrywanie których pozwala szczep *Salmonella* Typhimurium TA 100. Do aktywowania promutagenów najczęściej stosowana była w różnych stężeniach frakcja mikrosomalna S-9 otrzymana z wątroby szczurów, aktywowana Aroclorem 1254. Niektórzy autorzy stosowali do oceny genotoksyczności zanieczyszczeń gleb wariant testu Ames z preinkubacją. Nie ma jednak prac, których autorzy określiliby wpływ preinkubacji na wielkość efektu mutagennego w teście Ames.

Zebrane dane z piśmiennictwa wskazują na znaczną przydatność testu Ames do oceny aktywności mutagennej zanieczyszczeń gleb. Porównywanie wyników otrzymywanych przez różnych autorów utrudnia zróżnicowanie technik ekstrakcji, stosowanych w niej rozpuszczalników oraz niektórych aspektów samego biotestu: dobór szczepów testowych, stężenie i sposób przygotowania frakcji mikrosomalnej S-9 stosowanej do aktywowania obecnych w próbkach promutagenów oraz celowości stosowania preinkubacji. Pozwoli to na ujednoczenie techniki ekstrakcji i biotestu z uwzględnieniem zróżnicowania rodzajów gleb oraz obecnych w nich zanieczyszczeń.

## Piśmiennictwo

1. Aleem A., Malik A.: Genotoxic hazards of long-term application of wastewater on agricultural soil. *Mutat. Res.* **538**, 145–154 (2003)
2. Ames B.N., Durston W.E., Yamasaki E. Lee F.D.: Carcinogens are mutagens, a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 2281–2285 (1973)
3. Ansari M., Malik A.: Genotoxicity of agricultural soils in the vicinity of industrial area. *Mutat. Res.* **673**, (2009)
4. Barbee G.C., Brown K.W., Thomas J.C., Donnelly K.C., Murray H.E.: Mutagenic activity (Ames Test) of Wood-Preserving waste Sludge applied to Soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **57**, 54–62 (1996)
5. Barch H., Malaveille C., Montesano R.: In vitro metabolism and microsome mediated mutagenicity of dialkylnitrosoamines in rat, hamster and mouse tissues. *Cancer Res.* **35**, 644–651 (1975)
6. Békaert C., Rast C., Ferrier V., Bispo A., Jourdain M.J., Vasseur P.: Use of in vitro (Ames and Mutatox test) and in vivo (Amphibian Micronucleus test) assays to assess the genotoxicity of leachates from a contaminated soil. *Org. Geochem.* **30**, 953–962 (1999)
7. Berthe-Corti L., Jacobi H., Kleihaure S., Witte I.: Cytotoxicity and mutagenicity of a 2,4,6-trinitrotoluene (tnt) and hexogen contaminated soil in *S. typhimurium* and mammalian cells. *Chemosphere*, **37**, 209–218 (1998)
8. Bierkens J. Klein G., Corbiser P. Van Den Heuel R., Verschave L., Weltens R., Schoeters G.: Comparative sensitivity of 20 bioassays for soil quality. *Chemosphere*, **37**, 2935–2947 (1998)
9. Brown K.W., Donnelly K.C., Thomas J.C., Davol P., Scott B.R.: Mutagenicity of 3 agricultural soils. *Sci. Total Environ.* **41**, 173–186 (1985)
10. Cho B.-H., Chino H., Tsuji H., Unito T., Naganka K., Otsuka S., Yamashita K., Matsumoto S., Oyaizu H.: Laboratory-scale bioremediation of oil-contaminated soil of Kuwait with soil amendment materials. *Chemosphere*, **35**, 7, 1599–1611 (1997)
11. Courty B. Le Curieux F., Milon V., Marzin D.: Influence of extraction parameters on the mutagenicity of soil samples. *Mutat. Res.* **565**, 23–34 (2004)
12. da Silva Júnior F.M.R., Vaz Rocha J.A., Vargas V.M.F.: Extraction parameters in the mutagenicity assay of soil samples. *Sci. Total Environ.* **407**, 6017–6023 (2009)
13. Donnelly K.C., Brown K.W., Anderson C.S., Thomas J.C., Scot B.R.: Bacterial mutagenicity and acute toxicity of solvent and aqueous extracts of soil samples from a abandoned chemical manufacturing site. *Environ. Toxicol. Chem.* **10**, 1123–1131 (1991)
14. Donnelly K.C., Thomas J.C., Anderson C.S., Brown K.W.: The Influence of Application of Soil Amended with Municipal Sewage Sludge. *Environ. Pollut.* **68**, 147–159 (1990)
15. Donnelly K.C., Thomas J.C., Brown K.W.: Mutagenic potential of environmental samples before and after remediation of a solvent-contaminated site. *Environ. Toxicol. Chem.* **14**, 1281–1286 (1995)
16. Edenharter R., Ortseifen M., Koch M., Wesp H.F.: Soil mutagens are airborne mutagens, variation of mutagenic activities induced in *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100 by organic extracts of agricultural and forest soils in dependence on location and season. *Mutat. Res.* **472**, 23–36 (2000)
17. Ehrlichmann H., Dott W., Eisentraeger A.: Assessment of Water-Extractable Genotoxic Potential of Soil Samples from Contaminated Sites. *Ecotoxicol. Environment. Safety*, **46**, 73–80 (2000)



18. Einistö P., Watanabe M., Ishidate Jr. M., Nohmi T.: Mutagenicity of 30 chemicals in *Salmonella typhimurium* strains possessing different nitroreductase or O-acetyltransferase activities. *Mutat. Res.* **259**, 95–102 (1991)
19. George S.E., Huggins-Clark G., Brooks L.R.: Use of a *Salmonella* microsuspensions of munitions compounds at low concentrations. *Mutat. Res.* **490**, 45–56 (2001)
20. Hagiwara Y., Watanabe M., Oda Y., Sofuni T., Nohmi T.: 1993. Specificity and sensitivity of *Salmonella typhimurium* YG 1041 and YG 1042 strains possessing elevated levels of both nitroreductase and acetyltransferase activity. *Mutat. Res.* **291**, 171–180 (1993)
21. Indulski J. (red.): Przewodnik do testów krótkoterminowych przeznaczonych do wykrywania mutagennych i rakotwórczych substancji chemicznych. Kryteria zdrowotne środowiska, t. 51. Inst. Med. Pracy, Łódź 1993
22. Jadczyk P., Kołwzan B.: Genotoxicity of soil pollutants extracted with different solvents. *Pol. J. Environ. Stud.* (W druku)
23. Jadczyk P., Kołwzan B., Rybak J., Adamiak W.: Badania właściwości toksycznych i mutagennych gleby skażonej materiałami wybuchowymi. W, Zielińska-Psujka B., Orłowski J. [red.] Wyd. Naukowe Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego, s. 101–105, Poznań 2007
24. Jarvis A., McFarland V., Honeycutt E.: Assessment of the Effectiveness of Composting for the Reduction of Toxicity and Mutagenicity of Explosive-Contaminated. *Soil. Ecotoxicol. Environ. Safe.* **39**, 131–135 (1998).
25. Knize M. G., Takemoto B., Lewis P. R., Felton J. S. The characterization of the mutagenic activity of soil. *Mutat. Res.* **192**, 23–30 (1987)
26. Kołwzan B., Heweyer M., Jadczyk P., Andrzejewski P., Dąbrowska A.: Ocena genotoksyczności gleb skażonych materiałami wybuchowymi. W, II Kongres Inżynierii Środowiska. Materiały. T. 2. Lublin 2005, Komitet Inżynierii Środowiska PAN, s. 533–541
27. Kołwzan B., Jadczyk P., Pawlik M., Andrzejewski P., Dąbrowska A.: Genotoksyczność gleb zanieczyszczonych. Genotoxicity of contaminated soils. W, Andrzejewski P. [red.] Zanieczyszczenie środowiska produktami naftowymi i innymi antropogennymi zanieczyszczeniami organicznymi, ich analityka, monitoring i usuwanie. Soil and groundwater contamination by oil products and other anthropogenic organic compounds, analysis, monitoring and remediation. Futura and PZITS Poznań 2005, s. 65–74
28. Kołwzan B., Jadczyk P., Pawlik M., Umińska B.: Zastosowanie testu Ames do badania genotoksyczności gleby. W, Biotechnologia środowiskowa. VII Ogólnopolskie Sympozjum Naukowo-techn. Politechnika Śląska, s. 213–219, 2005
29. Kołwzan B., Jadczyk P., Rybak J., Adamiak W.: Genotoxicity of explosives contaminated soil before and after bioremediation. *Environ. Prot. Eng.* **34**, 53–62 (2008)
30. Kool H.J., Van Kreyll C.F., Persad S.: 1989. Mutagenic activity in groundwater in relation to mobilization of organic mutagens in soil. *Sci. Total. Envir.* **84**, 185–199 (1989)
31. Lah B., Vidic T., Glasencnic., Cepeljnik T., Gorjanc G., Marinsek-Logar R.: Genotoxicity evaluation of water soil leachates by Ames test comet assay, and preliminary *Tradescantia* micronucleus assay. *Environ. Monit. Assess.* **139**, 107–118 (2008)
32. Malachová K., Lednická D., Novotný Č.: Genotoxicity estimation in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons after biodegradation. In: Šašek V. et al. (eds.). The utilization of Bioremediation to Reduce Soil Contamination, Problems and Solutions, s. 211–215. Kluwer Acad Publ. 2003
33. Malachová K.: Using Short-Term Mutagenicity Tests for the Evaluation of genotoxicity of Contaminated Soils. *J. Soil Contam.* **8**, 667–680 (1999)
34. Maron D.M., Ames B.N.: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* **113**, 173–215 (1983)
35. Matsushima T., Sawamura M., Hara K., Sumigura T.: A safe substitute for polychlorinated biphenyls as an inducer of metabolic activation system. In, de Serres F.J., Fouts J.R., Bend J.R., Philpot R.M. (eds.). *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. Elsevier/Noth-Holland. Amsterdam, s. 85–88, 1976
36. Matsushita H., Tamura T., Kato Y., Nishimura T.: Mutagenic activities of organic components in soil collected in Tokyo, Bangkok, Chaing Mai and Manila. *Mutat. Res.* **130**, 370 (1984)
37. McDaniels A.E., Reyes A.L., Wymer L.J., Rankin C.C., Stelma Jr.G.N.: Genotoxic Activity Detected in Soils From a Hazardous waste site by the Ames Test and an SOS Colorimetric Test. *Environ. Mol. Mutagen.* **22**, 115–122 (1993)
38. Monarca S., Feretti D., Zerbini I., Alberti A., Zani C., Resola S., Gelatti U., Nardi G.: Soil Contamination Detected Using Bacterial and Plant Mutagenicity Tests and Chemical Analyses. *Environ. Res. A*, **88**, 64–69 (2002)
39. Morelli I.S., Vecchioli G.I., Del Panno M.T., Garré M.I., Costanza O.R., Paineira M.T.: Assessment of the toxic potential of hydrocarbon containing sludges. *Environ. Pollution*, **89**, 131–135 (1995)
40. Morelli I.S., Vecchioli G.I., Del Panno M.T., Paineira M.T.: Effect of petrochemical sludge concentrations on changes in mutagenic activity during soil bioremediation process. *Environ. Toxicol. Chem.* **20**, 2179–2183 (2001)
41. Mortelmans K., Zeiger E.: The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.* **455**, 29–60 (2000)
42. Nielsen P.A.: Mutagenicity studies on complex environmental mixtures, selection of solvent system for extraction. *Mutat. Res.* **276**, 117–123 (1992)
43. Ong T.-M., Mukhtar M., Wolf C.R., Zeiger E.: Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* **4**, 55–65 (1980)
44. Pereira R., Marques C.R., Ferreira M.J.S., Neves M.F.J.V., Caetano A.L.: Phytotoxicity and genotoxicity of soils from an abandoned uranium mine area. *Appl. Soil Ecol.* **42**, 209–220 (2009)
45. Rosenkranz H.S., McCoy E.C., Mermelstein R., Speck W.T.: A cautionary note on the use of nitroreductase-deficient strains of *Salmonella typhimurium* for the detection of nitroarenes as mutagens in complex mixtures including diesel exhaust. *Mutat. Res.* **91**, 103–105 (1981)
46. Rosenkranz H.S., Speck W. T.: Activation of nitrofurantoin to a mutagen by rat liver nitroreductase. *Biochem. Pharmacol.* **25**, 1555–1556 (1976)
47. Rosenkranz H.S., Speck W.T.: Mutagenicity of metronidazole, Activation by mammalian liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **66**, 520–525 (1975)
48. Šašek V., Bhatt M., Cajthaml T., Malachová K., Lednická D., Metwally M., Al-Muzaini S.: Arch. Environ. Compost-mediated removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil. *Contam. Toxicol.* **44**, 336–342 (2003)
49. Sato S., Matsumura A., Urushigawa Y.: Type analysis and mutagenicity of petroleum oil extracted from sediment and soil samples in Kuwait. *Environ. Interan.* **24**, 67–76 (1998)
50. Sayles G.D., Acheson C.M., Kupferle M.J., Shan Y., Zhou Q., Meier J.R., Chang L., Brenner R.C.: Land Treatment of PAH-Contaminated Soil, Performance Measured by Chemical and Toxicity Assays. *Environ. Sci. Technol.* **33**, 4310–4317 (1999)
51. Smith J.W.: Mutagenicity of extracts from agricultural soil in the *Salmonella*/microsome test. *Environ. Mutagen.* **4**, 369–370 (1982)

52. Walker C.H., Hopkin S.P., Sibly R.M., Peakall D.B.: Podstawy ekotoksykologii. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 2002
53. Watanabe M., Ishidate Jr. M., Nohmi T.: 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 (1989)
54. Watanabe M., Ishidate Jr.M., 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.* **234**, 337–348 (1990)
55. Watanabe M., Sofuni T., Nohmi T.: Comparison of the sensitivity of *Salmonella typhimurium* strains YG 1024 and 1012 for detecting the mutagenicity of aromatic amines and nitroarenes. *Mutat. Res.* **301**, 7–12 (1993)
56. Watanabe T., Hasei T., Takahashi Y., Otake S., Murahashi T., Takamura T., Hirayama T., Wakabayashi K.: Mutagenic activity and quantification of nitroarenes in surface soil in the Kinki region of Japan. *Mutat. Res.* **538**, 121–131 (2003)
57. Watanabe T., Hirayama T.: Genotoxicity of Soil. *J. Health. Sci.* **47**, 433–438 (2001)
58. Watanabe T., Takahashi K., Konishi E., Hoshino Y., Hasei T., Asanoma M., Hirayama T., Wakabayashi K.: Mutagenicity of surface soil from residential areas in Kyoto city, Japan, and identification of major mutagens. *Mutat. Res.* **649**, 201–212 (2008)
59. Wesp H. F. Tang X., Edenharder R.: The influence of automobile exhausts on mutagenicity of soils, contamination with, fractionation, separation, and preliminary identification of mutagens in the *Salmonella*/reversion assay and effects of solvent fractions on the sister-chromatid exchanges in human lymphocyte cultures and in the in vivo mouse bone marrow micronucleus assay. *Mutat. Res.* **472**, 1–21 (2000)
60. White P., Claxton L.D.: Mutagens in contaminated soils, a review. *Mutat. Res.* **567**, 227–345 (2004)