



# VĚDECKÝ VÝBOR FYTOSANITÁRNÍ A ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

<b>Klasifikace:</b>	Draft	<input type="checkbox"/>	<i>Pro vnitřní potřebu VVF</i>
	Oponovaný draft	<input type="checkbox"/>	<i>Pro vnitřní potřebu VVF</i>
	Finální dokument	<input type="checkbox"/>	<i>Pro oficiální použití</i>
	Deklasifikovaný dokument	<input checked="" type="checkbox"/>	<i>Pro veřejné použití</i>

Název dokumentu:

**Využití testů genotoxicity pro kontrolu  
kontaminace zemědělských produktů, potravin  
a vzorků životního prostředí**

Poznámka:

VVF-06-03  
Zpracovatel: Prof. RNDr. Ivan Holoubek, CSc a kol. (TOCOEN, s.r.o.)

## **Obsah**

Obsah.....	2
1. Úvod.....	3
2. Genotoxicita a genotoxické látky .....	4
3. Testy genotoxicity .....	5
3.1. Testy genotoxicity na bakteriích .....	7
3.2. Testy genotoxicity na kvasinkách .....	9
3.3. Testy genotoxicity na rostlinách .....	10
3.4. Testy na živočiších .....	12
3.5. Doplněk .....	14
4. Genotoxické látky v prostředí a jejich detekce .....	15
4.1. Zemědělské produkty a potraviny .....	15
4.2. Vzduch .....	16
4.3. Půda.....	18
4.4. Voda .....	20
5. Závěr.....	21
6. Reference.....	22

## 1. Úvod

V životním prostředí je přítomno široké spektrum látek, které po interakci s živým systémem vykazují nejrůznější škodlivé účinky. Tyto účinky jsou závislé na fyzikálních a chemických vlastnostech těchto látek. Zájem o biologické účinky látek byl stimulován poznatky z epidemiologických studií o výskytu zvýšených četností změn a poškození zdravotního stavu u určitých skupin lidí (oblast, profese, kouření, životní styl a další). Vzhledem k tomu, že se tato poškození začala dávat do souvislosti s expozicí chemickým látkám, začal vzrůstat zájem o poznání příčinných souvislostí mezi působením určitých chemických látek a změnami na nejrůznějších úrovních organizace živé hmoty (molekulární, buněčné, organismální, populační). Pro poznávání biologických účinků látek bylo vyvinuto velké množství sofistikovaných detekčních systémů, které jsou souhrnně označovány jako biotesty. Jedná se o testovací systémy, kde na základě specifické interakce mezi testovanou látkou či vzorkem a biologickým systémem lze prostřednictvím určitého parametru kvalitativně i kvantitativně hodnotit biologický účinek testované látky či vzorku. Tyto systémy umožňují potom více či méně standardizovaným způsobem hodnotit účinky sledovaných látek a to i s ohledem na různou citlivost živých systémů k jejich působení. Pozitivní látky v těchto systémech vykazují dané účinky a mohou představovat možné zdravotní riziko. Hlavním cílem takového počínání je využití získaných poznatků zejména v ochraně lidského zdraví a to na základě identifikace rizikových faktorů a omezení jejich vlivu na populaci.

Vedle rozvoje studia čistých látek se pozornost začala soustředit i na sledování výskytu látek, které se vyznačují určitými typy biologických účinků a potenciálně mohou vstupovat do organismu (dýchání, požívání kontaminované potravy a vody), v prostředí. Tato oblast se začala rozvíjet v návaznosti na skutečnost, že byly v minulosti do prostředí uvolňovány ve velkém množství látky, u nichž byly až následně zjištěny velice nebezpečné vlastnosti pro lidské zdraví. Velice významnou skupinu znečištění prostředí v tomto směru představují i látky, které nebyly nikdy účelně vyráběny a do prostředí vstupovaly a doposud vstupují jako vedlejší produkty či odpad různých antropogenních činností. Vzhledem k jejich častokrát velice závažným biologickým účinkům se stalo neméně důležité zjistit, zda-li se nachází ve sledovaném prostředí a v jakých koncentracích, s cílem zhodnotit možnou expozici těmto látkám a identifikovat možná rizika.

Pro zjišťování takových látek v prostředí lze využívat dvou různých přístupů. Prvním z nich je chemická analýza s cílem kvalitativně a kvantitativně zhodnotit přítomnost nebezpečných látek. Druhým přístupem je využití biotestů, které umožňují identifikovat přítomnost nebezpečných látek na základě hodnocení jejich biologických účinků. Vzhledem ke skutečnosti, že při hodnocení kontaminace prostředí se ve většině případů setkáváme s velice složitou směsí látek – environmentální směs, není toto hodnocení jednoduché. V převážné řadě případů není z časových, finančních ani technických důvodů možné provést kvantitativní ani kvalitativní analýzu všech přítomných látek. Navíc pro případné hodnocení možných zdravotních rizik chybí údaje o toxických účincích celé řady přítomných látek a ani neexistuje vhodná metoda pro integraci toxicity tak komplexní environmentální směsi, v které jistě hrají významnou roli faktory interakce v biologickém působení látek, jako je aditivita, potenciace či antagonismus. V tomto směru je velmi vhodným přístupem využití biotestů, které umožňují identifikovat a kvantifikovat vybrané toxické parametry takové směsi. Takto získané údaje lze následně využít pro posouzení přítomnosti určitých látek (v návaznosti na biologické účinky) ve vzorku a tedy i v dané složce prostředí na sledované lokalitě a s tím spojená rizika. Kvantitativní výsledky lze využít pro porovnání různých vzorků a lokalit a dále propojit tato data s výsledky z provedených chemických analýz a tak získat mnohem ucelenější informaci

o situaci (Keddy et al., 1995). Výhodou takového využití biotestů je i výběr nejvíce kontaminovaných vzorků, které mohou být dále podrobně chemicky analyzovány, což přináší i velké finanční a časové úspory.

Oblastí, kde využití takových biologických detekčních systémů dosáhlo vysokého stupně rozvoje, je detekce genotoxických látek a jejich účinků. Zájem právě o tento typ účinku souvisí s nebezpečností takových látek a závažností důsledků expozice těmito látkami. V následujícím textu je podrobně pojednáno o problematice genotoxických látek a zejména metodách jejich detekce. V rámci metod je uveden nejen přehled v současnosti používaných metod, ale zejména je shrnuto na základě literární rešerše jejich využití pro detekci genotoxických látek v matricích, jako jsou zemědělské produkty a potraviny a pak dále v ovzduší, půdě a vodě.

## **2. Genotoxicita a genotoxické látky**

Genotoxicita patří mezi nejsledovanější z biologických účinků látek. Jedná se kvalitativní typ účinku, kdy látka ve své původní či pozměněné podobě v buňce vstupuje do interakcí s kyselinou deoxyribonukleovou (DNA), poškozuje ji a iniciuje nejzávažnější strukturní a informační změny v genetickém materiálu buňky, jejichž důsledkem je letalita, vznik mutace, karcinogeneze, indukce fágu a další procesy (Quillardet et Hofnung, 1984). Takové biologické účinky jsou označovány jako genotoxické (toxické pro genom) a jsou indukovány tzv. genotoxickými faktory. Každý z těchto genotoxických faktorů se vyznačuje genotoxickým potenciálem, který kvantitativně charakterizuje genotoxický účinek daného faktoru a to i s ohledem na citlivost biologického systému, který je exponován (Zimmermann, 1982). S expozicí genotoxickým faktorům jsou vždy spojována možná genotoxická rizika, která jsou integrálním vyjádřením genotoxického potenciálu všech látek a velikosti expozice (Brusick, 1994).

Od počátku 20. století, kdy byly učiněny první poznatky o schopnostech některých látek reagovat se strukturami DNA a vyvolávat tak změny v genetickém materiálu se závažnými důsledky (vznik nádorů, snížení životaschopnosti jedince, jeho potomků či v některých případech i smrti), bylo získáno velké množství poznatků o mechanismu interakce s DNA, procesu mutagenese, vyvolávaných změnách v DNA a jejich důsledcích. Bylo identifikováno velké množství genotoxických faktorů. Pro tuto identifikaci bylo nutné vyvinout vhodné detekční systémy a jedinou možností bylo využití biotestů, které jsou označovány jako testy genotoxicity. Test genotoxicity lze definovat jako detekční systém, který umožňuje na základě interakce studovaného faktoru a biologického systému provést jednoznačné kvalitativní i kvantitativní hodnocení jeho genotoxického potenciálu. Tyto systémy se tak začaly uplatňovat nejen při studiu nových látek, ale i při identifikaci přítomnosti genotoxických faktorů v životním prostředí.

V prostředí je přítomno velké množství faktorů, které mohou poškozovat genetický materiál živých organismů. Mezi nimi lze nalézt fyzikální (záření), chemické (chemické látky) i biologické (viry, mykoplazmata) faktory. Největší pozornost je však věnována chemickým látkám, které jsou v množství několika milionů tun každoročně využívány v různých oblastech lidských aktivit. Doposud je registrováno v seznamu ELNECS (European List of New Chemical Substances) kolem 102 000 látek. Avšak pouze pro 5 000 z nich jsou dostupné dostatečné údaje o jejich možných vlivech na lidské zdraví a životní prostředí. Tato skutečnost se dotýká i dostupnosti dat o genotoxických účincích látek. Pouze pro několik

stovek látek jsou dostupné informace pro komplexní hodnocení zdravotních rizik (Bro-Rasmussen et al., 1996). Vedle těchto látek je populace exponována celé řadě dalších látek, které se do prostředí dostávají jako vedlejší produkty různých antropogenních činností (např. emise ze spalování). Vedle parentálních látek se v prostředí nachází i jejich nejruznější transformační a degradační produkty, o jejichž škodlivých účincích údaje častokrát úplně chybí.

Tato situace však vytváří podmínky pro očekávané zvýšení četnosti výskytu geneticky podmíněných patologických stavů v populaci, jejichž důsledky zahrnují nádorová onemocnění. Obecně jsou dnes odhadovány hladiny geneticky podmíněných postižení na úrovni asi 0,6 % novorozenců s chromozómovou aberací, 1 % s vlohou či predispozicí pro dědičné onemocnění a 3 – 5 % narozených dětí, které mají závažnou vývojovou vadou (Phillips et Venitt, 1995). Dále je odhadováno, že 80 % lidí během života onemocní v důsledku dědičné predispozice k různým chorobám (Phillips et Venitt, 1995). Do souvislosti s expozicí genotoxickým faktorům jsou dále dávány procesy iniciace nádorových onemocnění (Fearon et Vogelstein, 1990; Würzler, 1992) a další změny zdravotního stavu, které jsou spojovány s předčasným stárnutím (Kirkwood, 1989; Slagborn, 1990), náchylnosti k degenerativním chorobám, jako jsou kardiovaskulární choroby (Mulkvag et al., 1988) včetně aterosklerózy (Penn et al., 1986; Bridges et al., 1990), autoimunní choroby (Karsten et Kryspin-Sorensen, 1988), snížení reprodukční schopnosti a jiné poruchy neumožňující žít plnohodnotný život. Z výše popsanych skutečností jednoznačně vyplývá význam identifikace a sledování genotoxických faktorů s cílem prevence vzniku nádorových onemocnění a ochrany genofondu populace (Vargová et Rosival, 1988; Brusick, 1994).

Vedle preventivních opatření na základě hodnocení genotoxických účinků nově produkovanych látek (potravinová aditiva, léčiva, kosmetické přípravky, pesticidy a další) je v rámci ochrany populace věnována pozornost identifikaci a monitorování genotoxických látek v prostředí, kterým tak může být populace exponována. Monitorování prostředí umožňuje rychlý průkaz přítomnosti genotoxických faktorů (nejčastěji se zaměřením na polutanty) v jednotlivých složkách prostředí. Obrovský význam v něm hraje právě využití testů genotoxicity, které našly uplatnění při hodnocení městského ovzduší, půdy, vody i hodnocení genotoxinů v potravinách. Umožňují tak velmi efektivně identifikovat možná genotoxická rizika.

### **3. Testy genotoxicity**

Na základě dosavadních znalostí genetiky, molekulární biologie a toxikologie bylo za účelem kvalitativního a kvantitativního hodnocení genotoxických faktorů, jejich potenciálu, rizik a citlivosti živých systémů, vyvinuto široké spektrum testů genotoxicity. Velké množství dostupných testovacích systémů (uvádí se kolem 200 testů) umožňuje výzkumným pracovníkům vybrat vhodné detekční systémy pro sestavení baterie testů, která bude splňovat jejich požadavky.

V souvislosti s požadavky je vhodné mít přehled o vlastnostech detekčních systémů, na základě kterých lze následně provádět výběr. Mezi diskutovanými parametry jsou: (i) doporučení, (ii) organizační stupeň, (iii) systematické zařazení, (iv) trofická úroveň, (v) specifita, (vi) účinek, (vii) citlivost, (viii) účel, (ix) matrice, (x) vzorek, (xi) finanční náročnost, (xii) časová náročnost, (xiii) design testu, (xiv) přídavek metabolické aktivace, (xv) odpověď, (xvi) interpretace a (xvii) extrapolace.

Dle doporučení lze testovací systémy rozdělit na dvě skupiny. Menšinu tvoří testy a metody, které jsou doporučovány národními (ČSN, DIN, ASTM) a mezinárodními normami (ISO, OECD). Jedná se o testy, které se na základě dlouhodobého používání a získaných zkušeností staly určitým standardem. Ostatní testy jsou dostupné ve validované podobě či ryze experimentální.

Další parametry charakterizují použitý biologický systém (organizační stupeň, systematické zařazení, trofická úroveň). Z hlediska organizačního stupně lze testy rozdělit na subbuněčné systémy, buněčné a organismální. Dalším kritériem je systematické zařazení použitého systému či jeho původu. Zjednodušené dělení rozlišuje bakterie (prokaryota) a houby, rostliny, živočichové (eukaryota). Dle trofické úrovně testovacího organismu mluvíme o úrovni producentů, konzumentů a destruentů.

Dělení dle specifity testovacího systému je založeno na možnosti sledovat specifickou interakci testované látky s genetickým materiálem či nelze blíže specifikovat interakci s DNA. V případě specifického účinku je možné dále rozlišovat systémy, které detekují indukci bodových mutací, chromozómových mutací či genomových mutací. Dalším dělením v rámci specifity detekčního systému je rozdělení na testy pro detekci somatických a gametických mutací.

Citlivost je problematickým kritériem pro dělení, ale obecně lze hovořit o testech s citlivostí k širokému spektru genotoxických faktorů a testech s citlivostí k úzké skupině genotoxických faktorů.

Významným kritériem pro výběr testu je jeho účel. V tomto směru jsou rozlišovány testy pro screeningové hodnocení a testy pro detailní studie. Screeningové testy umožňují rychle a levně zjistit genotoxické účinky látky (vzorku) i umožňují jeho kvantifikaci. Jsou využívány pro identifikaci rizik. Detailní testy umožňují podrobnou analýzu genotoxických účinků včetně analýzy závislosti dávka-odpověď. Získané výsledky lze následně využít pro hodnocení zdravotních rizik. V rámci účelu lze rozlišovat dále testy pro prospektivní studie (testování čistých látek) a testy pro retrospektivní studie (detekce látek s danými účinky v prostředí).

Dle matrice lze rozdělit testy na systémy, které umožňují testování vzduchu, vody, půdy, sedimentů a biologického materiálu. S testovanou maticí souvisí i podoba úprav vzorků, kdy rozlišujeme testy, které umožňují přímé testování dané matrice, testování vodných výluhů a organických extraktů.

Finanční náročnost významně rozhoduje o možnostech použití testu. Často tento aspekt zahrnuje i technické vybavení a možnosti pracoviště. Dělení dle časové náročnosti provedení testu je stejně jako finanční kritérium významně rozhodující při volbě testovacích systémů. Testy lze rozdělit dle trvání na testy krátkodobé (do 1 týdne), střednědobé (do několika týdnů) a dlouhodobé (v délce až několika měsíců).

Design testů představuje velmi rozmanitou kategorii. Testy lze z tohoto hlediska rozdělit na testy *in vitro* (mikrodestičky, zkumavky, petriho misky) a testy *in vivo* (v laboratoři, *in situ*). Významné postavení mají testy *in situ*, které umožňují přímé sledování přítomnosti genotoxických látek na lokalitě. Detekční systém je exponován po delší dobu komplexní směsi genotoxických faktorů a jsou v tomto případě eliminovány vlivy zpracování vzorku.

Dalším kritériem je skutečnost, že v případě některých testů je nutné přidávat S9 frakci savčích jater jako exogenní metabolickou aktivaci. Přídavek S9 frakce se týká zejména testů na bakteriích a kvasinkách a je jím simulována metabolická aktivace xenobiotik v savčím organismu.

V případě získané odpovědi, kterou nám dává detekční systém, je rozhodující zda se jedná o pouze kvalitativní nebo i kvantitativní odpověď. Kvantitativní výsledky jsou samozřejmě vhodnější pro případná srovnávání a další hodnocení.

V případě interpretačního kritéria lze rozlišovat možnosti přímé nebo nepřímé interpretace získaných výsledků. Úzce souvisí s podstatou a provedením testů.

Extrapolace výsledků z jednoho systému na jiný je vždy problematická. Testy genotoxicity lze z hlediska možnosti extrapolace výsledků rozdělit na testy s možností extrapolace na populační úroveň, mezidruhovou extrapolaci a testy s možností extrapolace výsledků na úroveň člověka. Možnost extrapolace na člověka se týká výsledků detailních testů a hraje významnou roli pro odvozování bezpečných koncentrací a dávek, které jsou využitelné v procesu hodnocení zdravotních rizik.

Výše popsané kategorie však neumožňují striktní zařazení všech testů a naopak některé testy ve vybraných kritériích umožňují zařazení do více skupin.

Pro přiblížení rozmanitosti dostupných testů genotoxicity, které umožňují hodnotit genotoxický potenciál, byla zvolena kategorizace testů dle systematického zařazení vlastního biologického systému: (i) bakterie, (ii) kvasinky, (iii) rostliny a (iv) živočichové. Popis těchto skupin testů s jejich vlastnostmi a možnostmi a zmíněnými příklady by mělo posloužit jako určitý podklad při rozhodování, jaký detekční systém zvolit pro získání požadovaných výstupů.

### 3.1. Testy genotoxicity na bakteriích

Bakteriální testy genotoxicity představují ideální rychlý a levný screeningový nástroj pro detekci genotoxického potenciálu. Jedná se o skupinu detekčních systémů, které jsou založeny na indukci specifické odpovědi geneticky upraveného prokaryotického organismu v důsledku interakce s genotoxickým faktorem. Představují vhodný alternativní přístup, který může často ušetřit náklady, čas a pokusná zvířata při studiu genotoxických faktorů.

Jedná se o skupinu testů genotoxicity, která zažívá obrovský rozvoj od 70. let, kdy byl publikován první bakteriální test genotoxicity založený na indukci reverzních mutací v kmeni *Salmonella typhimurium* (Ames et al., 1973). Dnes lze nalézt v literatuře odkazy na více než 20 testů genotoxicity na bakteriích. S výjimkou testu na reverzní mutace na *Salmonella typhimurium* (OECD 471) (ISO, 1992), testu na reverzní mutace na *Escherichia coli* (OECD 472) (ISO, 1992) a umuC testu (ISO 13829) (ISO, 1997), však nejsou tyto testy dostupné v podobě norem.

Z hlediska principu lze testy rozdělit do tří skupin: (i) testy založené na indukci reverzních mutací v lokuse určitého genu, který vede k obnově specifické vlastnosti a ta umožňuje

kvantifikaci odpovědi detekčního systému (model 1), (ii) testy založené na indukci SOS reparačního systému, která je kvantifikována prostřednictvím specifického reportérového genu (model 2) a (iii) testy založené na indukci zvýšené mortality buněk s nefunkčními reparačními systémy v důsledku poškození genetického materiálu buněk (model 3). Z principu detekce vyplývá možnost detekce specifických bodových mutací (záměnové mutace, posunové mutace, mikrodelece) u testů založených na indukci reverzních mutací nebo detekce nespecifického genotoxického účinku u bakteriálních testů odvozených od modelu 2 a 3. Pokud připustíme, že látky s klastogenními účinky (vyvolávají chromozómové mutace) jsou schopné vyvolávat i bodové mutace, lze očekávat citlivost bakteriálních testů k velmi širokému spektru genotoxických faktorů.

**Tabulka 1:** Přehled testů genotoxicity na bakteriích (výběr)

Test	Princip	Design	Délka testu**	Měření odpovědi	Citace
Reverzní mutace na <i>S. typhimurium</i> *	Model 1	Agarové plotny	Krátkodobý	Počet kolonií (CFU)	Ames et al. (1973)
Reverzní mutace na <i>E. coli</i> *	Model 1	Agarové plotny	Krátkodobý	Počet kolonií (CFU)	Bridges (1972)
Mutatox	Model 1	Zkumavky	Krátkodobý	Luminiscence	Ulitzur et al. (1980)
GFP test	Model 1	Agarové plotny	Krátkodobý	Fluorescence	Cariello et al. (1998)
SOS chromotest	Model 2	Zkumavky	Krátkodobý	Absorbance	Quillardet et al. (1982)
UmuC test	Model 2	Zkumavky	Krátkodobý	Absorbance	Oda et al. (1985)
SulA test	Model 2	Mikrodestičky	Krátkodobý	Absorbance	El Mzibri et al. (1996)
RecA test	Model 2	Mikrodestičky	Krátkodobý	Luminiscence	Belkin et al. (1997)
Vitotox	Model 2	Mikrodestičky	Krátkodobý	Luminiscence	Van der Lelie et al. (1997)
Reparační test	Model 3	Agarové plotny	Krátkodobý	Počet kolonií (CFU)	Green (1977)

\*Test v podobě normy OECD; \*\*krátkodobé – do 1 týdne, střednědobé – několik týdnů, dlouhodobé – několik měsíců.

Shodnost v kvalitě odpovědi s testy genotoxicity na savcích je v případě Amesova testu až 90 % a navíc byla prokázána vysoká citlivost ke známým genotoxickým karcinogenům (Purchase, 1982). Testy jsou doporučovány pro screeningové hodnocení čistých látek i environmentálních vzorků (vzduchu, půdy, sedimentu, vody i biologického materiálu) *in vitro*. Vzorky lze testovat v podobě vodných i organických extraktů. Testy, jako je Mutatox a SOS chromotest, umožňují přímé testování pevných matric bez extrakce (Johnson et Long, 1998; Kwan et Dutka, 1992). Provedení testů je rozličné, ale obecně je kladen důraz na miniaturizaci (Škarek, 2002). Délka expozice se pohybuje v rozmezí několika hodin až několika dnů. Při vyhodnocování moderních bakteriálních testů jsou využívány citlivé instrumentální analytické metody, které umožňují účinnou kvantifikaci odpovědi. Nevýhodou testů je nutnost přidávat exogenní metabolickou aktivaci, která však alespoň částečně umožňuje simulovat metabolickou transformaci (aktivaci) testovaných látek v savčím organismu. V některých testech není přímo kontrolována toxicita testovaných látek, která může vést k falešně negativní odpovědi (Gatehouse et al., 1994). Porovnání vybraných charakteristik (princip, design, délka testu, měření odpovědi) nejznámějších bakteriálních testů genotoxicity jsou uvedeny v tabulce 1. Výsledky testů umožňují přímou interpretaci pozorovaných biologických účinků na prokaryotickém organismu. Zjištěné výsledky lze velmi omezeně extrapolovat na vyšší organismy. Příčinou je skutečnost, že jsou využívány prokaryotické jednobuněčné organismy s odlišnými metabolickými drahami od vyšších organismů. Pozorované účinky jsou spojeny pouze s indukcí bodových mutací.



Jejich význam spočívá zejména v rychlé a levné analýze velkého počtu vzorků. Vzorky s pozitivními výsledky signalizují možné nebezpečí pro vyšší organismy a lze je potom dále detailně studovat s využitím dokonalejších testovacích systémů, které umožňují lepší extrapolace výsledků. Bakteriální testy představují nedílnou součást doporučených baterií testů genotoxicity (Müller et al., 1999).

### 3.2. Testy genotoxicity na kvasinkách

Další skupinu velmi jednoduchých screeningových testů genotoxicity představují testy na kvasinkách. Stejně jako bakteriální testy představují alternativní testovací systémy, z nichž některé mají podobu normy (OECD 480, OECD 481) (ISO, 1992). Jedná se o nevelkou skupinu testů, které využívají geneticky modifikovaných kmenů kvasinek, které jsou nejčastěji odvozeny od *Saccharomyces cerevisiae*. Kvasinky jsou řazeny mezi jednobuněčné eukaryotické organismy z říše hub. Stejně jako u bakterií je lze snadno dlouhodobě uchovávat a pro účely testování lze velmi rychle získat dostatečné množství organismů. Ve srovnání s bakteriálními testy umožňují specifickou detekci bodových mutací i mutace chromozómové.

Tato možnost vyplývá z principu fungování jednotlivých testů na kvasinkách. Detekce genových mutací je obdobně jako v reverzních testech na *Salmonella typhimurium* (Ames et al., 1973) či *Escherichia coli* (Green, 1977) založena na indukci reverzních mutací v lokusech genů, které obnovují specifické vlastnosti buněk (obnova syntézy specifické aminokyseliny a růst buněk) (Zimmermann, 1975; Zimmermann et al., 1984). V případě chromozómových mutací rozlišujeme test na indukci mitotického crossing-overu a test na indukci genových konverzí, spojených s translokací specifických úseků chromozómů (Zimmermann, 1975; Zimmermann et al., 1984). V obou případech je indukce těchto chromozómových mutací detekována na základě specifických vlastností mutovaných buněk (změna barvy kolonií, obnova syntézy specifické aminokyseliny a růst buněk) (Zimmermann, 1975; Zimmermann et al., 1984). Vedle těchto známých testů byl v poslední době uveřejněn i test na kvasinkách, který je založen na detekci indukce SOS reparačního systému v důsledku poškození DNA. Jako reportérový gen je využíván gen pro zelený fluorescenční protein (GFP) (Walmsley et al., 1997). Jedná se o stejný princip jako v případě bakteriálních testů založených na indukci SOS reparačního systému (viz kapitola 3.1.).

Jedná se o testy, které našly uplatnění při screeningových analýzách *in vitro* čistých chemických látek i nejrůznějších environmentálních vzorků. Environmentální vzorky (vzduch, voda, půda, sediment) jsou testovány v podobě vodných či organických výluhů. Malé finanční nároky na provedení souvisí s miniaturizovaným provedením testu na agarových plotnách. Vzhledem k pomalému růstu kvasinek je délka expozice v rozmezí 6 – 10 dnů při 28 °C, po kterých je test vyhodnocován ručně či s využitím čtečky kolonií. Paralelně je třeba provést měření toxicity testovaných vzorků pro snížení rizika falešně negativní odpovědi (Zimmermann, 1975; Zimmermann et al., 1984). Odlišné provedení má test založený na indukci SOS odpovědi, kdy test probíhá ve zkumavkách a po 4 hodinách inkubace při 28 °C, je odpověď detekčního systému kvantifikována pomocí fluorimetru (Walmsley et al., 1997). I když se jedná o eukaryotický organismus, pro zlepšení vypovídací hodnoty testu je možné přidávat do reakčního systému exogenní metabolickou aktivaci v podobě savčí S9 frakce (Zimmermann, 1975; Zimmermann et al., 1984). Zjištěné kvantitativní výsledky lze přímo interpretovat s ohledem na studované efekty na kvasinkách. I když se stále jedná o jednobuněčné organismy, ve srovnání s bakteriálními testy je třeba

zmínit, že se jedná testy, kde jsou využívány eukaryotické buňky, což nepatrně zvyšuje možnosti extrapolace pozorovaných účinků na vyšší organismy. Omezení extrapolace výsledků dále představuje menší rozmanitost metabolických drah a odlišná stavba buněčné stěny.

**Tabulka 2:** Přehled testů genotoxicity na kvasinkách.

Test	Účinek	Princip	Design	Délka testu**	Měření odpovědi	Citace
Reverzní mutace na <i>S. cerevisiae</i> *	Genové mutace	Reverzní mutace	Agarové plotny	Krátkodobý	Počet kolonií	Zimmermann (1975)
Mitotický c.o. na <i>S. cerevisiae</i> *	Chromozómové mutace	Mitotický crossing-over	Agarové plotny	Krátkodobý	Počet a barva kolonií	Zimmermann (1975)
Genové konverze na <i>S. cerevisiae</i> *	Chromozómové mutace	Translokace spec. části genu	Agarové plotny	Krátkodobý	Počet kolonií	Zimmermann (1975)
RAD54-GFP	Nespecifická genotoxicita	Indukce SOS reparač. systému	Zkumavky	Krátkodobý	Fluorescence	Walmsley et al. (1997)

\*Test v podobě normy OECD; \*\*krátkodobý – do 1 týdne, střednědobý – několik týdnů, dlouhodobý – několik měsíců.

Pro účely screeningového šetření poskytují velmi významný nástroj, jehož výstupy je třeba v závislosti na požadavcích dále studovat s využitím testů na vyšších organismech. Tabulka 2 shrnuje dostupné testy genotoxicity na kvasinkách včetně vybraných charakteristik (účinek, princip, design testu, délka testu, metoda měření odpovědi). Velký přínos je spatřován ve využití testů založených na indukci SOS odpovědi (Walmsley et al., 1997).

### 3.3. Testy genotoxicity na rostlinách

Testy na rostlinách představují další možnou alternativu k testům na savcích. Tato skupina testů nesmí být opomíjena, i když neexistují žádná doporučení národními ani mezinárodními normami a tyto testy jsou chápány spíše jako vhodná experimentální možnost pro detekci genotoxického potenciálu. Avšak některé z těchto testů byly validovány v rámci aktivit agentury International Programme on Chemical Safety (IPCS) a jí podporované skupiny International Programme on Plant Bioassays (IPBP) (Gopalan, 1999). Rostliny představují v prostředí nedílnou složku společenstev různých ekosystémů. Jsou produkční komponentou v trofických řetězcích. S výjimkou testu genotoxicity na řase *Chlamydomonas reinhardtii* (Podstavková et al., 1992) se jedná o mnohobuněčné organismy, které umožňují studium genových mutací, chromozómových mutací i genomových mutací. Vedle odlišných typů mutací umožňuje tato skupina provádět hodnocení genotoxických účinků na somatických i gametických buňkách.

Z hlediska principu lze rozlišovat testy založené na indukci nespecifických letálních mutací (Podstavková et al., 1992), testy založené na indukci recesivních mutací v somatických buňkách či zárodečných buňkách, kdy je sledován projev mutantního fenotypu (Müller, 1965; Sparrow et Schairer, 1971), a testy založené na indukci chromozómových a genomových mutací, které jsou studovány na základě četnosti výskytu mikrojader či přímo chromozómových aberací po obarvení (Ma, 1979; Degrassi et Rizzoni, 1982; Kihlman, 1975).

Detekované účinky, které jsou shodné s cílem používání živočišných systémů, v podmínkách mnohobuněčného eukaryotického organismu, umožňují provádět efektivní screeningové studie s čistými látkami, jejich směsmi i složitými environmentálními vzorky, které zahrnují

zejména vzduch, půdu i vodu. Princip a provedení testů umožňují testování v podobě extraktů ale i přímo odebraných vzorků (půda, voda). Velmi významným přínosem testů na rostlinách je i možnost provádění hodnocení genotoxického potenciálu půd a zejména vzduchu přímo *in situ*. I když je finanční náročnost těchto testů nízká, od jejich používání často odrazuje výrazná pracnost vyhodnocování, které je spojeno s mikroskopováním vybraných částí rostlin, které dosud nelze plně automatizovat. Ve srovnání s testy na bakteriích a kvasinkách prodlužuje test i příprava dostatečného množství testovacích organismů a postexpoziční kultivace. Designy testů genotoxicity na rostlinách se podřizují principu detekce účinků genotoxických faktorů. V případě testu na *Chlamydomonas reinhardtii* (Podstavková et al., 1992) je design obdobný jako v reparačních testech na *Salmonella typhimurium* a *Escherichia coli* (Ames et al., 1973; Green et Muriel, 1977), které jsou založeny na indukci zvýšené letality v důsledku poškození genomu buněk s nefunkčními reparačními systémy. Test se provádí na agarové plotně (Podstavková et al., 1992). V dalších testech jsou sledované části exponovaných rostlin (květ, kořenová špička) přímo nebo po předpůsobení, fixaci a obarvení mikroskopovány s cílem kvantitativního posouzení genotoxického potenciálu studovaných faktorů, kterým byly exponovány (Sparrow et Schairer, 1971; Müller, 1963; Ma, 1979; Degrassi et Rizzoni, 1982; Kihlman, 1975). Podstata provedení testů, které jsou zejména založeny na detekci mikrojader či chromozómových aberací v důsledku chromozómových a genomových mutací, umožňuje alternaci několika druhů rostlin (*Tradescantia sp.*, *Vicia faba*, *Zea mays*, *Allium cepa*, *Hordeum vulgare* a další). Rostlinné buňky nabízí široké spektrum metabolických drah a tak exogenní metabolická aktivace není v rostlinných testech genotoxicity využívána. Získané výsledky z testů jsou dobře interpretovatelné s ohledem na pozorované genotoxické účinky. Extrapolace výsledků testů na rostlinách lze dobře provádět na přírodní populace rostlin, ale lze i s jistými omezeními diskutovat o možných účincích na člověka a další živočichy. Nevýhodu při extrapolacích představuje mnohem nižší aktivita vybraných metabolických enzymů a transformačních dějů v rostlinných buňkách a odlišná stavba rostlinné buňky, která má na svém povrchu buněčnou stěnu.

**Tabulka 3:** Přehled testů genotoxicity na rostlinách

Test	Účinek	Princip	Design	Délka testu**	Měření odpovědi	Citace
Reparační test na <i>C. reinhardtii</i>	Nespecifická genotoxicita	Poškození DNA brání růstu buněk	Agarové plotny	Střednědobý	Počet kolonií (CFU)	Podstavková et al. (1992)
Test na tyčinkách <i>Tradescantia</i>	Genové mutace	Indukce barevné změny buněk trichomů	Kultivační nádoby	Střednědobý	Počet mutantních buněk v trichomech	Sparrow et al. (1971)
Letální embryonální mutace na <i>Arabidopsis thaliana</i>	Genové mutace	Indukce recesivně letálních a chlorofylových mutací v nezralých buňkách	Kultivační nádoby	Střednědobý	Počet defektních semen	Müller (1963)
Mikrojaderný test na <i>Tradescantia</i>	Chromozómové a genomové mutace	Indukce změn v tetradovém charakteru pylových buněk	Kultivační nádoby	Střednědobý	Počet pylových buněk s redukováním počtem gamet	Ma (1979)
Mikrojaderný test na <i>Vicia faba</i>	Chromozómové a genomové mutace	Vznik mikrojader v důsledku poškození genomu	Kultivační nádoby	Střednědobý	Počet buněk s mikrojádry	Degrassi et al. (1982)
Chromozómní aberace na <i>Vicia faba</i>	Chromozómové a genomové mutace	Cytogenetická analýza indukovaných chromozómových aberací	Kultivační nádoby	Střednědobý	Počet buněk s aberacemi	Kihlman (1975)

\* Test v podobě normy OECD; \*\* Krátkodobý – do 1 týdne, střednědobý – několik týdnů, dlouhodobý – několik měsíců.

Vedle testování čistých látek má velký význam využití rostlin při monitoringu *in situ*. Výhodou testů na rostlinách je přímé testování vzorků bez extrakce a zakoncentrování a dále možnost provádět studie a získávat poznatky ze studií přímo v zájmovém prostředí *in situ* na modelových organismech či domorodých (Mičieta et Murín, 1996, 1997). Tabulka 3 přináší přehled nejvýznamnějších testů genotoxicity na rostlinách včetně vybraných parametrů, které je charakterizují (účinek, princip, design testu, délka testu, metoda měření odpovědi).

### 3.4. Testy na živočiších

Poslední skupinu představují testy, které jsou založeny na využití živočišných systémů. Jedná se o velmi rozmanitou skupinu testů, která zahrnuje velké množství testů, z nichž několik patří mezi testy doporučené normami (ISO, 1992). Z hlediska stupně organizace umožňují sledování genotoxických účinků na úrovni subbuněčné (test afinity k DNA (Adams et al., 1996)), buněčné *in vitro* testy a organismální. Jedná se o trofickou úroveň konzumentů a z hlediska taxonomického zařazení jsou využívány v testech biologické systémy či jejich části, které původem zahrnují organismy z kmenů hlísti (háďátka), členovci (hmyz) a strunatci (savce).

Genotoxické účinky různých faktorů lze studovat jako nespecifické účinky na DNA (Samoiloff et al., 1980; Williams, 1978), ale i jako specifické zásahy, které zahrnují detekci genových mutací (Mollet et Würgler, 1974; Würgler et al., 1977; Thacker, 1985; Sasaki et al., 1986), chromozómových mutací (Schmid, 1975; Komárek, 1989; Galloway et al., 1994; Klingerman et al., 1994; Piperakis et al., 1999) i genomových mutací (Szabad, 1986; Dellarco, 1988). Hranice mezi skupinami testů nejsou ostré a v některých případech se z hlediska detekovaných typů mutací překrývají. Několik testů umožňuje studium indukovaných genetických změn v gametických buňkách (Würgler et al., 1977; Szabad, 1986; Dellarco, 1988; Klingerman et al., 1994; Dearfield et al., 1995). I když se jedná o velmi rozmanitou skupinu, lze v těchto testech rozpoznat několik odlišných principů detekce genotoxických účinků. Testy na živočiších zahrnují tedy testovací systémy, které přímo umožňují studium interakce testované látky s vyextrahovanou DNA, testy na speciálních buněčných liniích či organismech, které umožňují studium specifických genových a chromozómových mutací a jejich fenotypového projevu, a dále testy, které jsou založeny na cytogenetickém studiu chromozómových a genomových mutací ve vybraných buňkách (T-lymfocyty, erytrocyty, buňky kostní dřeně, hepatocyty, gamety) exponovaných organismů. V případě mikrojaderných testů či comet testu jsou detekovány nespecifické klastogenní účinky. Navíc testy na mikrojádra umožňují detekovat i účinky látek na mitotický aparát (Schmid, 1975). I když se jedná o živočišné systémy lze očekávat rozdíly v citlivosti k jednotlivým genotoxickým faktorům, kde významný vliv má enzymatická výbava pro metabolické transformace xenobiotik. Skupina zahrnuje testy vhodné pro screeningové studie i testy pro detailní studium genotoxických účinků. Jsou vhodné pro testování čistých látek i jejich směsí, kdy normované testy jsou často legislativně vyžadovány.

**Tabulka 4: Přehled testů genotoxicity na živočiších**

Test	Účinek	Princip	Design	Délka testu**	Měření odpovědi	Citace
Test na <i>P. redivivus</i>	Nespecifická genotoxicita	Indukce malformací těla	Petriho misky	Krátkodobý	Rozsah malformací	Samailoff et al. (1980)
Test na neplánovanou syntézu DNA <i>in vitro</i> *	Nespecifická genotoxicita	Inkorporace <sup>3</sup> H-thymidinu při reparaci DNA	Zkumavky	Krátkodobý	Počet pozitivních buněk	Williams (1978)
SMART na <i>D. melanogaster</i>	Genové a chromozómové mutace	Indukce somatických mutací a rekombinací v buňkách imaginálních disků	Erlenmayerova baňka	Krátkodobý	Detekce klonů mutantních buněk v orgánech z imaginálních disků (oko, křídla)	Mollet et al. (1974)
SLRL na <i>D. melanogaster</i>	Genové mutace	Letální genové mutace v chromozómu X v pohlavních buňkách vede k absenci normálních samečků v F <sub>2</sub> generaci	Erlenmayerova baňka	Střednědobý	Počet samečků v F <sub>2</sub> generaci s normálním genotypem	Würgler et al. (1977)
Genové mutace v savcích buňkách <i>in vitro</i> *	Genové mutace	Mutace v genu HPRT či TK vede k rezistenci vůči selekčnímu tlaku	Mikrodestičky	Krátkodobý	Spektrofotometrie	Thacker (1985)
Spot test na myši*	Genové mutace	Somatické mutace v melanoblastech způsobují barevné skvrny na srsti	Chov zvířat	Dlouhodobý	Výskyt a počet skvrn	Sasaki et al. (1986)
CA v lidských periferních lymfocytech <i>in vitro</i> *	Chromozómové a genomové mutace	Cytogenetická analýza indukovaných chromozómových aberací <i>in vitro</i>	Zkumavky	Krátkodobý	Počet buněk s aberacemi	Galloway et al. (1994)
Comet test na periferních lymfocytech <i>in vitro</i>	Chromozómové mutace	SCGE umožňující hodnotit semi-kvantitativně rozsah CA v jednotlivých buňkách	Zkumavky	Krátkodobý	Rozsah migrace fragmentů chromozómů (vznik komet)	Piperakie et al., (1999)
CA v buňkách kostní dřeně hlodavců <i>in vivo</i> *	Chromozómové a genomové mutace	Cytogenetická analýza indukovaných chromozómových aberací <i>in vivo</i>	Chov zvířat	Krátkodobý	Počet buněk s aberacemi	Komárek (1989)
Mikrojaderný test na savcích*	Chromozómové a genomové mutace	Vznik mikrojader v polychromatických erytrocytech	Chov zvířat	Krátkodobý	Počet buněk s mikrojádry	Schmid (1975)
Dominantní letální test na hlodavcích*	Chromozómové a genomové mutace	Indukované mutace v gametách snižují reprodukci	Chov zvířat	Dlouhodobý	Počet žlutých tělísek, živých a mrtvých plodů	Klingerman et al. (1994)
Test na dědičné translokace*	Chromozómové mutace	<i>In vivo</i> detekce dědičných translokací v gametách	Chov zvířat	Dlouhodobý	Cytogenetická analýza v F <sub>1</sub> generaci	Dearfield et al. (1995)
Test na chromozómové aneuploidie na <i>D. melanogaster</i>	Genomové mutace	Ztráta pohlavního chromozómu X nebo Y mění zastoupení jednotlivých fenotypů	Erlenmayerova baňka	Střednědobý	Zastoupení jednotlivých fenotypů v F <sub>1</sub> generaci	Szabad (1986) [
Test na aneuploidie v gametách*	Genomové mutace	Indukce genomových mutací ve spermatogoniálních buňkách	Chov zvířat	Krátkodobý	Cytogenetická analýza spermatocytů	Dellarco (1988)

\* Test v podobě OECD normy; \*\*krátkodobý – do 1 týdne, střednědobý – několik týdnů, dlouhodobý – několik měsíců; SCGE – jednobuněčná gelová elektroforéza.

Vedle testování čistých látek našly některé z těchto testů uplatnění i při analýzách environmentálních vzorků, které zahrnují testování vzduchu, vody, půdy, sedimentů. Nejčastěji je využíván postup testování v podobě vodních a organických extraktů. Velmi významným kritériem je finanční a časová náročnost, která je v této skupině testů velmi rozdílná. Testy na živočišných systémech nabízí možnost testování pomocí krátkodobých a levných *in vitro* testů s vyextrahovanou DNA (Adams et al., 1996), na buněčných liniích

(Williams, 1978; Thacker, 1985; Galloway et al., 1994; Piperakis et al., 1999), háďátkách (Samoiloff et al., 1980) a drozofilách (Mollet et al., 1974; Würgler et al., 1977; Szabad, 1986) a na druhé straně jsou zde testy, které probíhají *in vivo* na potkanech, křečcích a myších. Tyto testy vyžadují chov pokusných zvířat, dlouhou dobu expozice a pracné vyhodnocování indukovaných účinků (Komárek, 1989; Schmid, 1975; Klingerman et al., 1994; Dearfield et al., 1995; Dellarco, 1988). V případě Comet testu bylo rozvinuto jeho používání vedle *in vitro* provedení i v podobě *in vivo* testu, které je využíván pro identifikaci genotoxických faktorů v prostředí analýzou buněk exponovaných organismů (Mitchelmore et Chipman, 1998; Wilson et al., 1998). V případě jednoduchých *in vitro* testů lze získat výsledky do několika dnů až týdnů, testy *in vivo* se vyznačují délkou provedení v rozsahu několika týdnů až měsíců. Při vyhodnocování těchto testů jsou využívány nejrůznější metody zahrnující vizuální hodnocení, cytogenetické metody i instrumentální analytické metody (spektrofotometrie, elektroforéza, chromatografie). Stejně jako u jiných skupin testů genotoxicity i zde existuje snaha o možnou miniaturizaci provedení testů, která se odráží v rozvoji *in vitro* metod. Exogenní metabolická aktivace není do reakčního systému přidávána s výjimkou testů, kdy jsou používány jiné než savčí buňky (Williams, 1978; Samoiloff et al., 1980; Mollet et al., 1974; Würgler et al., 1977; Szabad, 1986) či vyextrahovaná DNA (Adams et al., 1996). Interpretační potenciál výsledků těchto testů je velmi vysoký vzhledem k podstatě studovaných účinků. Výsledky jsou velmi dobře extrapolovatelné na živočichy včetně člověka ve srovnání s testy na bakteriích, kvasinkách a rostlinách. Tato skutečnost platí zejména u detailních testů na savcích. V případě buněčných linií a dalších screeningových testů je třeba zohlednit mnohobuněčný charakter organismu, na který jsou výsledky extrapolovány. Výsledky testů na jiných živočiších, než jsou savci, nezohledňují metabolické dráhy v savčím organismu a tím vytváří prostor pro rozdíly v možné aktivaci promutagenních látek.

Vysoká vypovídací hodnota výsledků na savcích vzhledem k možným biologickým účinkům a rizikům studovaných faktorů předurčuje jejich nezbytné zařazení do baterií testů genotoxicity. V tabulce 4 je uveden přehled vybraných testů genotoxicity a jejich charakteristik (účinek, princip, design délka, testu a měření odpovědi).

### 3.5. Doplněk

Vzhledem ke skutečnosti, že nebyl doposud vyvinut žádný univerzální test, je třeba zvolit často kombinaci několika testů pro získání komplexních údajů o přítomnosti genotoxických látek ve vzorků. Pro tento účel jsou sestavovány baterie testů. I když existuje řada doporučení (Müller et al., 1999; MacGregor et al., 2000), vhodnou baterii testů genotoxicity tvoří nejčastěji test na genové mutace na *Salmonella typhimurium*, test na genové mutace na savcích buňkách *in vitro* a test na chromozómové aberace v buňkách kostní dřeně na hlodavcích *in vivo*. Další testy genotoxicity *in vivo* (viz tabulka 4) jsou používány jako doplňkové. Výsledkem takového testování je jednoznačný závěr o biologických účincích dané látky, který lze extrapolovat na člověka (Brusick, 1994). Výše používané baterie jsou však využívány převážně při studiu čistých látek.

Při identifikaci genotoxických látek a jejich rizik v prostředí je dáována přednost zejména rychlým, jednoduchým, levným avšak citlivým testům, které umožňují získat požadovanou informaci. Při sestavování baterie je využívána kombinace některého z bakteriálních testů, nejčastěji Amesův test, a testu, který umožňuje detekovat klastogenní účinky (*in vitro* chromozómové aberace v periférních lymfocytech, comet test). Výsledky z těchto testů nelze

přímo extrapolovat na člověka, ale lze je využít v rámci hodnocení znečištění prostředí a identifikace genotoxických rizik..

#### **4. Genotoxické látky v prostředí a jejich detekce**

Mezi genotoxickými látkami v prostředí se nachází jak látky přírodního původu tak i látky, které vstupují do prostředí v souvislosti s antropogenními činnostmi. I když nesmíme opomíjet význam přírodních toxických látek, největší pozornost je věnována antropogenním polutantům. Mezi nimi hrají významnou roli na jedné straně v minulosti cíleně široce používané látky, jejichž škodlivým účinkům nebyla věnována pozornost či nebyly z nejrůznějších důvodů zjišťovány, a na druhé straně látky, které vstoupily do prostředí v důsledku havárií a zejména uvolňováním plyných, kapalných a pevných odpadů různých výrobních a činností. V závislosti na složení prostředí, do které jsou uvolňovány, a fyzikálních a chemických vlastnostech takové látky mohou být v dané složce rychle degradovány nebo v ní setrvávat či dále mohou přecházet do jiných složek. Látky se v prostředí mohou nacházet v původní podobě či jako produkt přeměny původních látek. Z abiotických složek prostředí mohou tyto látky přecházet do živých organismů a potravních řetězců, kde se mohou projevit jejich škodlivé účinky. V důsledku kontaktu populace s těmito složkami prostředí může docházet k expozici těmto látkám a vzniku možných genotoxických rizik.

V tomto směru je kladen velký důraz na detekci genotoxických látek v těchto jednotlivých složkách prostředí a identifikaci možných rizik. V následujícím textu jsou stručně charakterizovány genotoxické látky, které mohou být přítomny ve vybraných složkách prostředí (zemědělské produkty a potraviny, vzduch, půda a voda) a metody, které jsou využívány pro jejich detekci. Vedle použitých metod detekce je stručně popsána i příprava vzorku pro takovou analýzu.

##### **4.1. Zemědělské produkty a potraviny**

Potraviny jsou především sledovány z hlediska možné kontaminace výchozích surovin genotoxickými látkami přírodního i antropogenního původu. Původ genotoxických látek v potravinách je spojován i s procesy při přípravě pokrmů a při jejich úpravě pro skladování (Ohnishi et al. 2001). Z možných skupin látek je tedy uvažováno zejména o meziproduktech zpracování (PAHs, pyrolyzáty aminokyselin), mykotoxinech, rostlinných mutagenech a látkách, které se vyskytují jako kontaminanty v prostředí.

Mezi genotoxickými látkami, které vznikají při tepelné přípravě pokrmů, hrají vedle PAHs (vznik při vysoké teplotě) nejvýznamnější roli aminoimidazochinolin a jeho methylderiváty. Pro detekci těchto látek byl úspěšně použit Amesův test (de Vet et al., 1981; Weisburger et al., 1986). Genotoxické účinky organického extraktu z tepelně upraveného masa byly hodnoceny i s využitím umuC testu (Whong et al., 1986).

Mezi další sledované genotoxiny patří chemické látky, které byly izolovány z extraktů rostlin a mohou být obsaženy v přírodních léčivech (Kevekordes et al. 1999). SOS-chromotest a série testů na kulturách *Salmonella typhimurium* TA, 97, 98, 100, 1535, 1536, 1537 a 1538 v provedení klasického Amesova testu byla aplikována na sadu celkem dvaceti přírodních látek, izolovaných především z potravin, extrakty z bylin, přírodní farmaka... (arecolin, beta-asaron, psoralen, kumarin, safrol,..). U více jak poloviny těchto látek byly potvrzeny

genotoxické účinky. SOS chromotest byl použit i pro hodnocení genotoxických účinků flavonoidů v potravinách (Rueff et al., 1986). Přítomnost genotoxických látek v přírodních léčivech byla zjišťována i s využitím umuC testu (Alpertunga et al., 1997).

Verschaeve et al. (2004) provedli podrobnou studii genotoxických účinků přírodních výtažků rostlin, které jsou běžně využívány v Jižní Africe místním obyvatelstvem a to Amesovým testem a mikrojaderným testem na periférních lymfocytech.

Genotoxické účinky mykotoxinů byly opět detekovány úspěšně Amesovým testem (Sorensen et al., 1984). Pro zjišťování genotoxických účinků mykotoxinů v potravinách byl použit i SOS chromotest (Reisenfeld et al., 1985; Frémy et Quillardet, 1985).

Při ošetření potravin ionizujícím zářením může vznikat celá řada chemických látek, jejichž biologické potenciální účinky nejsou dostatečně prozkoumány. Jednou z takových látek je 2-alkylcyklobutanon. Podmínkou jejich vzniku je přítomnost tuků a kyseliny palmitové, či kyseliny stearové v potravinách. Comet test na specifických buňkách *in vitro* (HT29 a HT29/19a). Testy však nepotvrdily významnou pravděpodobnost genotoxických účinků v rámci použitého detekčního systému (Delincée et al. 2002).

Dalším sledovaným faktorem, který může potenciálně ovlivnit genotoxický potenciál potravin je kvalita obalového materiálu, se kterým jsou v přímém kontaktu. Studie Leguy et al. (1997) byla zaměřena na nejtradičnější obalové materiály: polypropylen, polyetylen, polystyren a polyetylen tereftalát. Za detekční systém genotoxicity migrujících látek z obalových materiálů do potravin byl zvolen a v závěru i doporučen Amesův test s TA98 a TA100 (Leguy et al. 1997).

## 4.2. Vzduch

Znečištění ovzduší je tvořeno velmi složitou směsí několika set látek, které do ovzduší vstupují z nejrůznějších zdrojů, vyskytují se ve velmi nízkých koncentracích ve formě plynu či vázané na suspendované částice a vedle výchozích látek jsou v této směsi přítomny produkty jejich transformačních reakcí a degradace. Díky vlastnostem této složky prostředí mohou být tyto znečišťující látky transportovány na velké vzdálenosti a ovlivňovat tak zdraví populace i na vzdálených místech od zdroje (Hamers et al., 2000). Hlavními zdroji znečištění ovzduší genotoxickými látkami jsou doprava, lokální topeniště a další procesy spojené se spalováním fosilních paliv, spalovny a chemická výroba. Genotoxické účinky jsou přičítány zejména organickým polutantům a to vybraným látkám ze skupin volatilních organických látek (VOCs) a zejména semivolatilních organických látek (SVOCs). Až 90 % genotoxických účinků ovzduší je přičítáno PAHs a jejich nitro-, oxy-, halogen-derivátům (Hutzinger et Reichel, 1990). Z VOCs je pozornost věnována zejména formaldehydu, tetrachloretylenu, vinylchloridu, styrenu a benzenu. Na genotoxickém potenciálu ovzduší se mohou však podílet i kovy (As, Cr, Cd, Ni, Be). V případě kontaminace pracovního ovzduší je její složení závislé na průmyslové výrobě. Do organismu vstupují převážně respiračním traktem. Přítomnost látek s genotoxickými účinky v ovzduší byla doložena jak výsledky z epidemiologických studií tak i analýz s využitím biotestů. Výrazně vyšších hodnot genotoxického potenciálu bylo dosaženo při studiu ovzduší ve městech. Vedle hodnocení volného ovzduší je pozornost věnována i přítomnosti genotoxických látek v pracovním prostředí.



Vedle *in situ* studií jsou pro účely hodnocení výskytu genotoxických látek v ovzduší s využitím biotestů obvykle přítomné polutanty vzorkovány s využitím aktivních odběrových zařízení (PS-1, HiVol PM10, VAPS a další) tak, že se zachycují na vhodný filtr, kterým prochází kontrolovaný objem vzduchu. Frakce polutantů vázaná na suspendované částice se zachycuje na křemenný filtr. Polutanty v plynné fázi jsou zachycovány na polyuretanový filtr a případně XAD-filtr (těkavější zástupci). Exponované filtry jsou vyextrahovány organickými rozpouštědly a extrakt testován s využitím vhodných biotestů. Připravený extrakt může být dále frakcionován, například na základě polaritě látek v extraktu, s cílem identifikace skupiny látek, která je odpovědná za sledovaný biologický účinek (Pysalo et al., 1987; De Marini et al., 1994; Černá et al., 1999; De Martinis et al., 1999) Toto uspořádání je vhodné pro vzorkování SVOCs. Pro odběr a hodnocení znečištění touto skupinou látek lze využít i pasivní vzorkovací zařízení, jako je SPMD (Hutckins et al., 1990). Výsledkem odběru a zpracování vzorku je obvykle malé množství vzorku, což významně ovlivňuje výběr vhodných biotestů.

Pro hodnocení genotoxického potenciálu ovzduší jsou využívány screeningové biotesty na bakteriích i eukaryotických buňkách.

Obecně nejpoužívanějším testem je Ames test s využitím kmenů TA 98 a TA 100. Je využíván pro rychlé hodnocení zejména městského ovzduší vzhledem k jeho citlivosti k PAHs a jejich derivátům (nitro-PAHs) (Rosenkranz et Mermelstein, 1983; Kier et al., 1986; Tokiwa et al., 1987; Ashby et Tennant, 1988; Claxton et al., 1991a; Claxton et al., 1991b). Zatímco PAHs vyžadují metabolickou aktivaci, jejich deriváty patří mezi silné přímé genotoxiny. Mezi příklady takových studií lze zmínit práce Sorensen et al. (1982), Kado et al. (1986), Garner et al. (1986), Bell et Kamens. (1990), Nardini et Clonfero (1992) Pagano et al. (1996), Delgado-Rodriguez et al. (1998), Wasserkort et al. (1998), De Martinis et al. (1999), Černá et al. (1999), Adonis et Gil (2000), Buschini et al. (2001), Claxton et al. (2001), Zhao et al. (2002), Binková et al. (2003) a další. Test byl využit i pro analýzu genotoxického potenciálu emisí z určitých zdrojů jako je například doprava (Crebelli et al., 1991; Houk et al., 1991; Hannigan et al., 1994; Hughes et al., 1997; Lapin et al., 2002). Vedle hodnocení celkového genotoxického potenciálu ovzduší byl i tento test použit při hodnocení genotoxických látek v různých frakcích suspendovaných částic (Pagano et al., 1996; Monarca et al., 1997; Buschini et al., 2001). Vysokou citlivost k nitro-PAHs v ovzduší vykazují kmeny *Salmonella typhimurium* YG1041 a YG1042 (Kado et al., 1986; Černá et al., 1999; Binková et al., 2003). V menším počtu studií byly využity testy založené na indukci SOS odpovědi jako je umuC test (Whong et al., 1986; Wasserkort et al., 1998; Hamers et al., 2000) a SOS chromotest (Courtois et al., 1988; Schelibinger et al., 1989; Malachová, 1998). Jejich omezené používání souvisí pravděpodobně s jejich absencí v podobě normy. V případě umuC testu chybí doporučení pro testování vzduchů. Oba tyto testy jsou velmi citlivé k přímým genotoxinům v ovzduší (Mersch-Sundermann et al., 1993; Quillardet et Hofnung, 1993; Reifferscheid et al., 1996). Zajímavé je použití Mutatoxu v kombinaci s SPMD odběry (Isidori et al., 2003). Použití dalších testů na bakteriích je velmi omezené. Bakteriální testy našly uplatnění i při hodnocení pracovního ovzduší, jak dokládá použití Amesova testu (Fracasso et al., 1999; Dobiáš et al., 1999; Monarca et al., 2001).

Použití testu genotoxicity na kvasinkách při sledování znečištění ovzduší není v současné době příliš časté. Test na genové reverze a konverze na *Saccharomyces cerevisiae* D7 byl použit při hodnocení organických látek vázaných na různých frakcích suspendovaných částic ve volném ovzduší (Buschini et al., 2001).

Z testů na molekulární úrovni byl používán test na purifikované DNA pro hodnocení městského ovzduší (Binková et al., 1999, 2003) V práci Binková et al. (1998) je popsáno použití tohoto testu při sledování genotoxicity ovzduší v koksovnách.

Dalším z používaných testů pro detekci genotoxických účinků ovzduší je comet test, který umožňuje detekovat klastogenní účinky organických polutantů. V literatuře jsou dostupné údaje o jeho použití ve variantě *in vitro* i *in vivo*. Jeho použití při hodnocení znečištění městského ovzduší bylo publikováno v pracích (Petrovská et al., 1999; Buschini et al., 2001). Tento test byl použit i při hodnocení pracovního prostředí s vysokým obsahem VOCs (1,3-butadien, acetonitril, styren, vinylchlorid, etylenoxid, nitrosaminy) i SVOCs (PAHs) (Monarca et al., 2001).

K dalším *in vitro* testům, které byly použity pro hodnocení emisí z dopravy je test na sesterské chromatidové výměny (SCE) v buňkách periferních lymfocytů (Lockard et al., 1981; Krishna et al., 1984), buňkách čínské křečka V79 (Alink et al., 1983) a bronchiálních epiteliálních buňkách (Hornberg et al., 1998). V literatuře lze najít i použití testů genotoxicity, jako je test na neplánovanou syntézu DNA a mikrojaderný test na myši (Zhao et al., 2002).

Z *in vivo* testů, který byl použit pro detekci genotoxinů v ovzduší, by měl být zmíněn SMART na *Drosophila melanogaster*. V práci Delgado-Rodriguez et al. (1998) je popsáno použití SMART pro hodnocení genotoxického potenciálu organického extraktu suspendovaných částic z volného ovzduší. SMART test poskytl srovnatelné výsledky jako Amesův test (Delgado-Rodriguez et al., 1998). Test byl také použit i při hodnocení vnitřního ovzduší budov (Graf et Singer, 1989).

Při *in situ* hodnocení je využíváno zejména testů genotoxicity na rostlinách, které mohou být po delší dobu vystaveny ovzduší na sledované lokalitě. Vedle genotoxických účinků SVOCs umožňují detekovat účinky i VOCs a dalších látek, které nejsou analyzovány ve formě organického extraktu. Navíc jsou tyto detekční systémy vystaveny celé směsi látek a v reálných koncentracích. Nejpoužívanějším je mikrojaderný test na *Tradescantia*, který představuje velmi citlivý systém pro dlouhodobý monitoring volného i pracovního ovzduší (Ma, 1994). Pro sledování volného ovzduší ve městech je úspěšné použití tohoto testu publikováno v práci Batalha et al. (1999), Monarca et al. (1999), Guimaraes et al. (2000), Isidori et al. (2003). Dalším příkladem je monitorování pracovního ovzduší s vysokým obsahem látek, jako je 1,3-butadien, acetonitril, styren, vinylchlorid, etylenoxid, nitrosaminy a PAHs (Monarca et al., 1998; Monarca et al., 2001). V testech, kde byly paralelně použity i další testy (nejčastěji bakteriální) byla zjištěna shoda mezi použitými detekčními systémy (Monarca et al., 1998, 1999). Vedle výše zmíněného testu bylo publikováno využití testu na trichomech tyčinek *Tradescantia*. Schairer et al. (1978) použili tento test pro sledování volného ovzduší. Arutyunyan et al. (1999) použili tento test pro sledování genotoxických látek v okolí továrny na výrobu plastů.

### 4.3. Půda

Půda patří k významným zásobním rezervoárům, kde může být deponováno po dlouhou dobu velké množství znečišťujících látek včetně látek s genotoxickými účinky. Genotoxické látky v půdě mohou působit na lidské zdraví, přičemž expozice nastává několika cestami jako inhalací prachu, požitím rostlin, které přijímají chemické látky z půdy, nebo požitím pitné

vody (kontaminované podzemní či povrchové vody). Výskyt genotoxických látek v půdách je dáváno do souvislosti zejména s průmyslovou činností, zemědělstvím a dopravou.

Výsledky testování genotoxicity půdy je výrazně ovlivněno metodou přípravy vzorku a extrakce, protože chemické a fyzikální vlastnosti chemických látek v celé sledované směsi jsou velmi rozmanité. Hodnocení genotoxických účinků se provádí nejčastěji na vodném nebo organickém extraktu vzorku půdy. Avšak nejvíce relevantním přístupem by mělo být testování v pevné fázi. Pro tento přístup je možné využít testů, které byly vyvinuty pro přímé testování sedimentů, bakteriální testy SPT Mutatox (Johnson et Long, 1998), SOS Chromotest (Kwan et Dutka, 1992). Přímé testování této pevné matrice je využíváno i v testech na kroužkovcích a rostlinách.

V následující části jsou uvedeny příklady použití testů pro detekci genotoxických látek v půdách kontaminovaných z průmyslových zdrojů, zemědělskou činností a dopravou.

Značná část znečištění pochází z industriálních procesů. Mezi nejdůležitější sledované látky patří PCBs, PAHs, těžké kovy, rozpouštědla nebo odpadní produkty mnoha procesů (likvidace munice, impregnace dřeva,...). Za základní screeningový test bývá považován Amesův test, který je využíván k testování půd, které jsou kontaminovány polyaromáty, těžkými kovy, nitroaromatickými látkami, atd. (Ehrlichmann et al., 2000; Monarca et al., 2002; Bekaert et al., 1999). Mezi další využívané bakteriální testy se řadí umuC test, SOS Chromotest (Ehrlichmann et al., 2000) nebo Mutatox (Johnson et Long, 1998).

Pro tato hodnocení jsou využívány i *in situ* testy na rostlinách. Mezi nejpoužívanější patří zejména mikrojaderný test *Tradescantia* (Monarca et al., 2002). Tento test je navíc velmi vhodný pro testování půd kontaminovaných těžkými kovy, protože výsledky velmi dobře korelují s jejich obsahem v půdě (Majer et al., 2002). Dalším citlivým testem pro testování anorganických látek, zejména pak těžkých kovů, je test s *Arabidopsis thaliana* (Kovalchuk et al., 2001). Cotelle et al. (1999) testovali genotoxicitu půdních vzorků s pomocí 3 testů využívajících sledování indukce tvorby mikrojadern u rostlin (*Allium cepa*, *Vicia faba* a *Tradescantia*). Ze zástupců vyšších organismů se dále využívá mikrojaderný test s *Xenopus laevis* (Bekaert et al., 1999, 2002)

Zemědělské půdy jsou převážně kontaminovány pesticidními prostředky. Pro testování půd jsou vedle Amesova testu (Edenharder et al., 2000) využívány testy na rostlinách. Mezi nimi hrají důležitou roli zejména mikrojaderný test na *Tradescantia*, test na tyčinkách *Tradescantia*, mikrojaderný test na *Vicia faba* a dále anafázový test aberací s *Allium cepa*. Byly využity k testování obdělávaných ploch, na kterých byly používány takové prostředky jako Metolachlor, Atrazine, Extrazine nebo 2,4-D (Kong a Ma, 1999). Mikrojaderný test na *Vicia faba* byl použit pro hodnocení půd kontaminovaných alachlorem (De Marco et al., 1990).

Velmi dobrým zástupcem eukaryotických testů pro testování pesticidy kontaminovaných půd může být test s kroužkovci. Genotoxické účinky jsou detekovány s využitím *in vivo* verze Comet testu na coelomocytech žížal (Zang et al., 2000).

V blízkosti silnic je očekávána kontaminace PAHs a těžkými kovy. Obdobně jako u předchozích typů půd jsou využívány bakteriální testy jako Ames test nebo Mutatox (Bispo et al., 1999; Bekaert et al., 1999). Využívány jsou i testy *in situ* a to opět na rostlinách. Vysoká

citlivost byla prokázána zejména v případě mikrojaderného testu na *Tradescantia*. Test na trichomech tyčinek *Tradescantia* byl mnohem méně citlivý (Gichner a Velemínský, 1999).

Bakteriální testy genotoxicity jsou využívány i při sledování genotoxických efektů chemických látek a jejich degradačních produktů a reziduí v půdě. Použity byly testy jako Ames test (Donnelly et al., 1995; Hughes et al., 1998) nebo Mutatox (Belkin et al., 1994).

*In vitro* metody používané pro půdy jsou obvykle využívány i pro sedimenty.

#### 4.4. Voda

Genotoxické účinky vzorků vody jsou zejména s důsledky kontaminace produkty ze zemědělské výroby (pesticidy), kontaminací odpady z průmyslové výroby (rezidua, těžké kovy) a produkty dezinfekce pitné vody chlorováním (chloroform, tetrachloretylén, chlorbenzen a další).

Vzorky vody jsou testovány přímo bez zakoncentrování nebo v podobě zakoncentrovaného organického extraktu (vytřepání do organického rozpouštědla, SPE kolonky) (Park et al. 2000). Přímé testování vodných vzorků omezuje zákal vzorků a dále mikrobiální kontaminace, kterou však lze odstranit filtrací (0,2 – 0,45  $\mu\text{m}$ ).

I v případě vzorků vod jsou využívány především klasické testy genotoxicity – nejčastěji Amesův test. Intenzivně jsou studovány genotoxické účinky chemických látek, které se vyskytují po ošetření pitné vody formou chlorování, případně ozonozací (Giller et al. 1997). Mezi tyto studované skupiny chemických látek patří především halogenované organické sloučeniny, monochloro-, di- či trichloroctové kyseliny případně monobromo-, di- či tribromooctové kyseliny. Pro detekci genotoxických účinků byl použit Amesův flukтуаční test, SOS-chromotest a test na mikrojádrech. Na těchto systémech *in vitro* byl pozorován efekt snižování genotoxicity se zvyšujícím se počtem substituentů sledované skupiny chemických látek (Gillera et al. 1997).

Haider et al. (2002) hodnotil genotoxické účinky produktů UV-dezinfekce vody (vlnová délka 254 nm). Aplikovanými metodami byla série testů na TA 98, TA 100 a TA 102 v Amesově testu s a bez metabolické aktivace a dva testy na mikrojádrech a to s rostlinami *Tradescantia* a s primárními hepatocyty krys. Výsledky nepotvrdily významné genotoxické riziko ani v jednom z testovaných vzorků. Výjimkou byl pouze jeden vzorek a to se záchytem pouze v případě Amesova testu s S9 aktivací na TA 98.

V práci Hurrington at al. (1983) byla použita flukтуаční verze Amesova testu na nezakoncentrované vzorky pitné vody. V tomto také spočívá výhoda testu – nejen z hlediska postupu, který toto dávkování s minimálním naředění vzorku umožňuje, ale také z hlediska dostatečné citlivosti.

Ve studiích Park et al. (2000) a Shen et al. (2003) jsou popsány využití Amesova testu (kmeny TA 98, 100) pro testování zakoncentrovaných vzorků pitné vody. Při porovnání výsledků testů s případem identických vzorků bez chlorace bylo konstatováno, že významnost genotoxického účinku vzrůstá u vzorků ošetřených chlorací.

Míru znečištění akvatického prostředí kumulativním způsobem také identifikuje stav sedimentů a případně stav suspendovaných částic. Hodnocení genotoxicity těchto suspendovaných částic bylo provedeno ve studii Vahl et al. (1997). Pro detekci byly použity testy – Ames test a umuC test. Aplikován s dobrým výsledkem byl zejména Ames test. UmuC test vykázal menší citlivost ve srovnání s ostatními testy.

Pro detekci genotoxicity povrchových vod, či výtoků z ČOV do povrchových vod jsou nejčastěji používány alternativní screeningové testy, jako je umuC test (Dizer et al. 2002). Citlivost záhytu významného genotoxického účinku nebyla umuC testem ve studii, ale výsledky velmi úzce korelovaly s mírou zbytkové kontaminace.

Pro biomonitoring vodního prostředí je vhodné využití *in vivo* verze comet testu (Mitchelmore et Chipman, 1998; Wilson et al., 1998).

## **5. Závěr**

Z velkého množství testů, které umožňují detekovat genotoxické účinky látek, je při monitoringu různých složek prostředí využíváno omezené množství. Z výše zmíněných příkladů použitých testů pro zjištění přítomnosti látek s genotoxickými účinky v zemědělských produktech a potravinách, vzduchu, půdě a vodě lze učinit jednoznačné závěry.

Přednost se dává jednoznačně rychlým a jednoduchým screeningovým testům. Nejpoužívanějším z testů je Amesův test s testovacími kmeny *Salmonella typhimurium* TA 98 a TA 100. Vedle tohoto testu jsou z bakteriálních testů používány SOS chromotest a umuC test. Tyto testy jsou využívány zejména v případě malého množství vzorků. Všechny testy jsou prováděny bez i s metabolickou aktivací.

Z testů na eukaryotických systémech je využíván comet test a to jak v *in vitro* tak i v *in vivo* provedení. *In vitro* test je vhodný pro testování odebraných vzorků. *In vivo* test je používán pro monitoring sledovaného prostředí.

Pro sledování genotoxických látek ve vzduchu a půdě jsou velmi vhodné testy na rostlinách, které umožňují provádět *in situ* studie. Mezi doporučovanými jsou mikrojaderný test na *Tradescantia* a dále mikrojaderný test na *Vicia faba*, který je vhodný zejména pro sledování půd. Pro sledování ovzduší je ještě používán test tyčinkách *Tradescantia*.

Další zmiňované testy jsou používány pro detekci genotoxických látek v prostředí v omezeném množství případů. Jsou používány jen výjimečně a představují další možnosti.

## **6. Reference**

- Adams, S.P., G. M. Laws, R.D. Storer, J.G. Deluca, W.W. Nichols (1996): Detection of DNA damage induced by human carcinogens in acellular assays: Potential application for determining genotoxic mechanisms. *Mutat. Res.*, 368, 235 – 248.
- Adonis, M., L. Gil (2000): Polycyclic aromatic hydrocarbon levels and mutagenicity of inhalable particulate matter in Santiago, Chile. *Inhal. Toxicol.*, 12, 1173 – 1183.
- Afanassiev, V., Sefton, M., Anantachaiyong, T., Barker, G., Walmsley, R. Wolf, S. (2000): Application of yeast cells transformed with GFP expression constructs containing the RAD54 or RNR2 promoter as a test for the genotoxic potential of chemical substances. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 464, 297 - 308.
- Alink, G.M., H.A. Smit, J.J. Van Houdt, J.R. Kolkman, J.S.M. Boleij (1983): Mutagenic activity of airborne particulates at non-industrial locations. *Mutat. Res.*, 116, 21 – 34.
- Alpertunga, H., G. Z. Omurtag, N. Özmence (1997): An investigation about the genotoxic activities of some herabl teas used as folk medicine. *Acta Pharmaceutica Turcica*, 39, 105 - 110.
- Ames, B. N., W. E. Durston, E. Yamasaki, F. D. Lee (1973): Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection, *Proc. Natl. Sci.*, 70, USA, p. 2281 – 2285.
- Arutyunyan, R.M., V.S. Pogosyan, E.H. Simonyan, A.L. Atoyants, E.M. Djigardjian (1999): In situ monitoring of the ambient air around the chloroprene rubber industrial plant using the Tradescantia–stamen–hair mutation assay. *Mutat. Res.*, 426, 117 – 120.
- Ashby, J., R. W. Tennant (1988): Chemical structure, Salmonella mutagenicity and extent of carcinogenicity as indicators of genotoxic carcinogenesis among 222 chemicals tested in rodent by the U.S. NCI/NTP. *Mutat. Res.*, 204, 17 – 115.
- Batalha, J.R.F., E.T. Guimaraes, D.J.A. Lobo, A.J.F.C. Lichtenfels, T. Deur, H.A. Carvalho, E.S. Alves, M. Domingos, G.S. Rodrigues, P.H.N. Saldiva (1999): Exploring the clastogenic effects of air pollutants in Sao Paulo (Brazil) using the Tradescantia micronuclei assay. *Mutat. Res.*, 426, 229 – 232.
- Baumstark-Khan, C., Khan, R. A., Rettberg, P. & Horneck, G. (2003). Bacterial Lux-Fluoro test for biological assessment of pollutants in water samples from urban and rural origin. *Analytica Chimica Acta* 487, 51-60.
- Bekaert C., V. Ferrierb, J. Marty, A. Pfohl-Leszkwicz, A. Bispo, M.J. Jourdain, M. Jauzein, L. Lambolez-Michel, H. Billard (2002): Evaluation of toxic and genotoxic potential of stabilized industrial waste and contaminated soils. *Waste Management*, 22, 241 – 247.
- Bekaert, C., C. Rast, V. Ferrier, A. Bispo, M.J. Jourdain, P. Vasseur (1999): Use of in vitro (Ames and Mutatox tests) and in vivo (Amphibian Micronucleus test) assays to assess the genotoxicity of leachates from a contaminated soil. *Organic Geochemistry* 30, 953 – 962.
- Belkin, S., D. R. Smulski, S. Dadon, A. C. Vollmer, R. A. LaRossa (1997). A panel of stress-responsive luminous bacteria for the detection of selected classes of toxicants. *Wat. Res.* 31, 3009 – 3016.
- Bell, D.A., R.M. Kamens (1990): Evaluation of the mutagenicity of combustion particles from several common biomass fuels in the Ames/Salmonella microsome test. *Mutat. Res.*, 245, 177 – 183.
- Binková B., J. Leníček, I. Beneš, P. Vidová, O. Gajdoš, M. Fried, R.J. Šrám (1998): Genotoxicity of coke-oven and urban air particulate matter in in vitro acellular assays coupled with 32P-postlabeling and HPLC analysis of DNA adducts. *Mutat. Res.*, 414, 77 – 94.
- Binková, B., D. Veselý, D. Veselá, R. Jelínek, R.J. Šrám (1999): Genotoxicity and embryotoxicity of urban air particulate matter collected during winter and summer period in two different districts of the Czech Republic. *Mutat. Res.*, 440, 45 –58.
- Binková, B., M. Černá, A. Pastorková, R. Jelínek, I. Beneš, J. Novák, R.J. Šrám (2003): Biological activities of organic compounds adsorbed onto ambient air particles: comparison between the cities of Teplice and Prague during the summer and winter seasons 2000–2001. *Mutat. Res.*, 525, 43 – 59.
- Bispo A., M.J. Jourdain, M. Jauzein (1999): Toxicity and genotoxicity of industrial soils polluted by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Organic Geochemistry*, 30, 947 – 952.
- Bridges, B. A. (1972): Simple bacterial systems for detecting mutagenic agents. *Laboratory Practise*, 21, p. 413 – 419.
- Bridges, B. A., A. Penn, E. S. Hansen, K. Wakabayashi (1990): Report of ICPEMC Subcommittee 7/1: the possible involvement of somatic mutations in the development of atherosclerotic plaques. *Mutat. Res.*, 239, 143 – 188.
- Bro-Rasmussen, F., H. Lokke, P. Kristensen, et al. (1996): The non-assessed chemicals in EU-Report and recommendations from an interdisciplinary group of Danish experts. Report from the Danish Board of Technology, 1996/5, Copenhagen, 1996.
- Brusick, D. J. (1994): Methods for genotoxic risk assessment. Lewis Publishers, Boca Raton, 1994.

- Buschini, A., F. Cassoni, E. Anceschi, L. Pasini, P. Poli, C. Rossi (2001): Urban airborne particulate: genotoxicity evaluation of different size fractions by mutagenesis tests on microorganisms and comet assay. *Chemosphere*, 44, 1723 – 1736.
- Cabrera G.L., D.M.G. Rodriguez (1999): Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. *Mutat. Res.*, 426, 211 – 214.
- Cariello, N. F., S. Narayanan, P. Kwanyuen, H. Muth, W. M. Casey (1998): A novel bacterial reversion and forward mutation assay based on green fluorescent protein. *Mutat. Res.*, 414, 95 – 105.
- Claxton, L. D., V. S. Houk, J. R. Warner, L. E. Meyers, T. J. Hughes (1991b): Assessing the use of known mutagens to calibrate the *Salmonella typhimurium* mutagenicity assay: II. With exogenous activation. *Mutat. Res.*, 253, 149 - 159.
- Claxton, L. D., V. S. Houk, L. G. Monteith, L. E. Meyers, T. J. Hughes (1991a): Assessing the use of known mutagens to calibrate the *Salmonella typhimurium* mutagenicity assay: I. Without exogenous activation. *Mutat. Res.*, 253, 137 – 147.
- Claxton, L.D., S. Warren, R. Zweidinger, J. Creason (2001): A comparative assessment of Boise, Idaho, ambient air fine particle samples using the plate and microsuspension *Salmonella* mutagenicity assays. *Sci.Total Environ.*, 275, 95 – 108.
- Courtois, Y.A., S. Min, C. Lachenal, J. M. Jaquet-Deschamps, F. Callais, B. Festy (1988): Genotoxicity of organics extracts from atmospheric particles. *Ann. NY Acad. Sci.*, 534, 724 – 740.
- Cotelle S., Jean-Francois Masfarau, Jean-Francois Ferard (1999): Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium*/*Vicia*-micronucleus and the *Tradescantia*-micronucleus assays. *Mutat. Res.*, 426, 167 – 171.
- Crebelli, R., S. Fuselli, G. Conti, L. Conti, A. Carere (1991): Mutagenicity spectra in bacterial strains of airborne and engine exhaust particulate extracts. *Mutat. Res.*, 261, 237 - 248.
- Černá, M., A. Pastorková, V. Vrbíková, J. Šmíd, P. Rössner (1999): Mutagenicity monitoring of airborne particulate matter (PM 10) in the Czech Republic. *Mutat. Res.*, 444, 373 – 386.
- De Marco A.P., B.C. Simone, A. Piccolo, M. Raglione, A. Testa, S. Trinca (1990): Induction of micronuclei in *Vicia faba* root tips treated in different soils with the herbicide alachlor. *Mutat. Res.* 241, 1– 6.
- De Marini, D.M., M.L. Shelton, D.A. Bell (1994): Mutation spectra in *Salmonella* complex mixtures: Comparison of urban air to benzo(a)pyrene. *Environ. Mol. Mutagen.*, 24, 262 - 275.
- De Martinis, B. S., N. Y. Kado, L. R. F. de Carvalho, R. A. Okamoto, L. A. Gundel (1999): Genotoxicity of fractioned organic material in airborne particles from Sao Paulo, Brazil. *Mutat. Res.*, 446, 83 – 94.
- De Vet, C. W., C. Sharma, and B. S. Reddy (1981): Effect of dietary fried meat on fecal mutagenic and co-mutagenic activity in humans. *Nutrit. Rep. Inter.*, 23, 653 – 659.
- Dearfield, K. L., A. E. Auletta, M. C. Cimino, M. M. Moore, G. A. Sega, D. J. Brusick (1995): Acrylamide: a review of its genotoxicity and an assessment of heritable genetic risk. *Mutat. Res.*, 330, 71 – 99.
- Degrassi, F., M. Rizzoni (1982): Micronucleus test in *Vicia faba* root tips to detect mutagen damage in fresh-water pollution, *Mut. Res.*, 97, 19 – 33.
- Delgado-Rodriguez, A., R. Ortiz-Martelol, R. Villalobos-Pietriniz, S. Gomez-Arroyo, U. Graf (1999): Genotoxicity of organic extracts of airborne particles in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Chemosphere*. 39, 3343.
- Delincee, H., Soika, C., Horvatovich, P., Rechkemmer, G., Marchioni, E. (2002): Genotoxicity of 2-alkylcyclobutanones, markers for an irradiation treatment in fat-containing food--Part I: cyto- and genotoxic potential of 2-tetradecylcyclobutanone. *Radiation Physics and Chemistry* 63(3-6 SU -), 431-435.
- Dellarco, V. L. (1988): A mutagenicity assessment of acetaldehyde. *Mutat. Res.*, 195, p. 1 – 20.
- Dizer, H., Wittekindt, E., Fischer, B. et Hansen, P.D., (2002): The cytotoxic and genotoxic potential of source water and wastewater effluents as determined by bioluminescence, umu-assays and selected biomarkers. *Chemosphere*. 46, pp. 225-233.
- Dobiáš, L., J. Kůsová, O. Gajdoš, P. Vidová, D. Gajdošová, J. Havránková, M. Fried, B. Binková, J. Topinka (1999): Bioassay-directed chemical analysis and detection of mutagenicity in ambient air of the coke oven. *Mutat. Res.*, 445, 285 – 293.
- Donnelly K. C., Thomas J.C. and Brown K.W. (1995) Mutagenic potential of environmental samples before and after remediation of a solvent-contaminated site. *Environ Tox Chem*, 14, 1281-1286.
- Donnelly, K. C., Brown, K. W., DiGiullio, D. G. (1988) Mutagenic characterization of soil and water samples from a superfund site. *Nucl. Chemical Waste Manage.*, 8, 135–141.
- Edenharder, R., Ortseifen, M., Koch, M., Wesp, H. F. (2000) Soil mutagens are airborne mutagens: variation of mutagenic activities induced in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 by organic extracts of agricultural and forest soils in dependence on location and season. *Mutat. Res.*, 472, 23–36.
- Ehrlichmann, H., Dott, W., Eisentraeger, A. (2000): Assessment of the water-extractable genotoxic potential of soil samples from contaminated sites. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 46, 73–80.

- El Mzibri, M., M. P. De Méo, M. Laget, H. Guiraud, E. Séree, Y. Barra, and G. Duménil (1996): The salmonella sulA-test: a new in vitro system to detect genotoxins. *Mutat. Res.*, 369, 195 – 208.
- Fearon, E. R., B. Vogelstein (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61, 759 – 767.
- Fracasso, M. E., P. Franceschetti, E. Mossini, S. Tieghi, L. Perbellini, L. Romeo (1999): Exposure to mutagenic airborne particulate in a rubber manufacturing plant. *Mutat. Res.*, 441, 43 – 51.
- Frémy, J.M., P. Quillardet (1985): The “carry over” of aflatoxin into milk of cows fed ammoniated cations. Use of HPLC method and a genotoxicity test for determining milk safety. *Food Addit.Contam.*, 2, 201 – 207.
- Galloway, S. M., M. J. Aardema, M. Ishidate, J. L. Ivett, D. J. Kirkland, T. Morita, P. Mosesso, T. Sofuni (1994): Report from working group on in vitro tests for chromosomal aberrations. *Mutat. Res.*, 312, 241 – 261.
- Garner, R. C., C. A. Stanton, C. N. Martin, F. L. Chow, W. Thomas, D. Hubner, R. Herrmann (1986): Bacterial mutagenicity and chemical analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and some nitro derivatives in environmental samples collected in West Germany. *Environ. Mutagen.*, 8, 109 – 117.
- Gatehouse, D., S. Haworth, T. Cebula, E. Gocke, L. Kier, T. Matsushima, C. Melcion, T. Nohmi, T. Ohta, S. Venitt, E. Zeiger (1994): Recommendations for the performance of bacterial mutation assays. *Mutat. Res.*, 312, 217 – 233.
- Gichner, T., Velemínský, J. (1999): Monitoring the genotoxicity of soil extracts from two heavily polluted sites in Prague using the *Tradescantia* stamen hair and micronucleus (MCN) assays. *Mutat. Res.* 426, 163 -166.
- Giller, S., Curieux, F., Le, Erb, F. et Marzin, D., (1997): Comparative genotoxicity of halogenated acetic acids found in drinking water. *Mutagenesis*. Vol. 12. No. 5, pp. 321-328.
- Gopalan, H.N.B. (1999): Ecosystem health and human well being: the mission of the international programme on plant bioassays. *Mutat. Res.*, 426, 99 – 102.
- Graf, U., D. Singer (1989): Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster* (wing spot test): effects of extracts of airborne particulate matter from fire-exposed and non fire-exposed building ventilation filters, *Chemosphere* 19, 1094 – 1097.
- Green, M. H. L., W. J. Muriel (1977): Mutagen testing using TRP<sup>+</sup> reversion in *Escherichia coli*. In: Kilbey et al.: Handbook of mutagenicity test procedures. Amsterdam – New York – Oxford, 66 – 93.
- Guimaraes, E.T., M. Domingos, E.S. Alves, N. Caldini Jr, D.J.A. Lobo, A.J.F.C. Lichtenfels, P.H.N. Saldiva (2000): Detection of the genotoxicity of air pollutants in and around the city of Sao Paulo (Brazil) with the *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) assay. *Environ.Exper.Botany*, 44, 1–8.
- Haider T., Sommer, R., Knasmuller, S., Eckel, P., Pribil, W., Cabaj, A. et Kundi, M., (2002): Genotoxic response of Austrian groundwater samples treated under standardized UV (254 nm) – disinfection condition in a combination of three different bioassays. *Water Research*. 36, pp 25-32.
- Hamers, T., M.D. van Schaardenburg, E.C. Felzel, A.J. Murk, J.H. Koeman (2000): The application of reporter gene assays for the determination of the toxic potency of diffuse air pollution. *Sci.Total Environ.*, 262, 159 – 174.
- Hannigan, M.P., G.R. Cass, A.L. Lafleur, J.P. Longwell, W.G. Thilly (1994): Bacterial mutagenicity of urban organic aerosol sources in comparison to atmospheric samples. *Environ.Sci.Technol.*, 28, 2014 – 2024.
- Hornberg, C., L. Maciuleviciute, N.H. Seemayer, E. Kainka (1998): Induction of sister chromatid exchanges (SCE) in human tracheal epithelial cells by the fractions PM-10 and PM-2.5 of airborne particulates. *Toxicol.Lett.*, 96-97, 215 – 220.
- Houk, V. S., G. Early, L. D. Claxton (1991): Use of the spiral salmonella assay to detect the mutagenicity of complex environmental mixtures. *Environ. Mol. Mutagen.*, 17, 112 - 121.
- Hughes TJ., Claxton L.D., Brooks L., Warren S., Brenner R., Kremer F. (1998): Genotoxicity of Bioremediated Soils from the Reilly Tar Site, St. Louis Park, Minnesota. *Environ. Health Perspect.* 106, 1427-1433.
- Hughes, T. J., J. Lewtas, L. D. Claxton (1997): Development of a standard reference material for diesel mutagenicity in the *Salmonella* plate incorporation assay. *Mutat. Res.*, 391, 243 – 258.
- Hurrington, T.R., Nestmann, E.R. et Kowbel, D.J. (1983): Suitability of the modified fluctuation assay for evaluating the mutagenicity of unconcentrated drinking water. *Mutat. Res.* 120, pp 97-103.
- Hutckins, J.N., M.W. Tubergen, G.K. Manuweera (1990): Semipermeable membrane devices containing model lipid: a new approach to monitoring the bioavailability of lipophilic contaminants and estimating their bioconcentration potential. *Chemosphere*, 20, 533 – 552.
- Hutzinger, O., A. Reischel (1990): Atmospheric transport of combustion-generated organic compounds. In: Clement, R., Kagel, R (Eds.): Emissions from Combustion Preprocesses: Origin, Measurement, Control.
- Isidori, M., M. Ferrara, M. Lavorgna, A. Nardelli, A. Parrella (2003): In situ monitoring of urban air in Southern Italy with the *tradescantia* micronucleus bioassay and semipermeable membrane devices (SPMDs). *Chemosphere*, 52, 121–126.
- ISO (1992): ISO 10993-3:1992 Biological evaluation of medical devices – Part 3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity. 1992.



- ISO (1997): ISO 13829: 1997 Water quality-Determination of the genotoxicity of water and wastewater using the umu-test. 1992.
- Johnson, B.T., E. R. Long (1998): Rapid toxicity assessment of sediments from estuarine ecosystems: a new tandem in vitro testing approach. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17, 1099 -1106.
- Kado, N. Y., G. N. Giurgius, C. P. Flessel, R. C. Chan, K. Chang, J. J. Weselowski (1986): Mutagenicity of Fine (< 2.5 µm) Airborne Particles: Diurnal Variation in Community Air Determined by a Salmonella Micro Preincubation (Microsuspension) Procedure. *Environ. Mutagen.*, 8, 53 – 66.
- Karsten, W., I. Kryspin-Sorensen (1988): Penetrance and low concordance in monozygotic twins in disease: Are they the results of alterations in somatic genomes? *Mol. Reprod. Dev.*, 1, 63 – 75.
- Keddy, C. J., J. C. Greene, M. A. Bonnell (1995): Review of Whole-organism Bioassays: Soil, Freshwater Sediment, and Freshwater Assessment in Canada. *Ecotox. Environ. Saf.*, 30, 221-251.
- Kevekordes, S., Mersch-Sundermann, V., Burghaus, Ch.M., Spielberger, J., Schmeiser, H.H., Arlt, V.M. et Dunkelberg, H., (1999): SOS induction of selected naturally occurring sunstances in *Escherichia coli* (SOS chromotest). *Mutation Research*. No. 445, pp 81 – 91.
- Kier, L. E., D. J. Brusick, A. E. Auletta, E. S. Von Halle, M. M. Brown, V. F. Simmon, V. Dunkel, J. McCann, K. Mortelmans, M. Prival, T. K. Rao, V. Ray (1986): The Salmonella typhimurium mammalian microsomal assay. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.*, 168, 69 – 240.
- Kihlman, B. A. (1975): Root tips of *Vicia faba* for the study of the study of chromosomal aberrations, *Mutat. Res.*, 31, 401 – 412.
- Kim, J.K., Shin, H.S., Lee, J.H., Lee, J.J., (2003): Genotoxic effects of volatile organic compounds in a chemical factory as evaluated by the Tradescantia micronucleus assay and by chemical analysis. *Mutation Research* 541 (2003) 55–61.
- Kirkwood, T. B. L. (1989): DNA, mutations and aging. *Mutat. Res.*, 219, 1 – 8.
- Klingerman, A. D., J. B. Bishop, G. L. Erexson, H. C. Price, R. W. O'Connor, D. L. Morgan, E. Zeiger (1994): Cytogenetic and germ cell effets of phosphine inhalation by rodent: II. Substance exposures to rats and mice. *Environ. Mol. Mutagen.*, 24, 301 – 306.
- Knasmüller S., E. Gottmann, H. Steinkellner, A. Fomin, C. Pickl, A. Paschke, R. God, M. Kundi (1998). Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassays. *Mutat. Res.*, 420, 37 – 48.
- Komárek, L.: Metody biologického monitorování genotoxických účinků faktorů prostředí – standardní metodika. Příloha č. 20/1989 k Acta Hyg. Epidemiol. Microbiol. Inst. Hygieny a epidemiologie, Praha, 1989
- Kong M.S., T.H. Ma (1999): Genotoxicity of contaminated soil and shallow well water detected by plant bioassays. *Mutation Research*, 426, 221 – 228
- Kovalchuk O, Titov V, Hohn B, Kovalchuk I (2001): A sensitive transgenic plant system to detect toxic inorganic compounds in the environment. *Nat Biotechnol.*, 19, 568-572.
- Krishna, G., J. Nath, T. Ong (1984): Correlative genotoxicity studies of airborne particles in Salmonella typhimurium and cultured human lymphocytes. *Environ.Mutagenesis*, 6, 485 – 492.
- Kučerová, M. (1988): Vrozené a získané poruchy lidských chromozómů. Avicenum, Praha, 1988.
- Kummrow, F., Rech, C.M., Coimbrão, C.A., Roubicek, D.A., Umbuzeiro, G.A., (2003): Comparison of the mutagenic activity of XAD4 and blue rayon extracts of surface water and related drinking water samples. *Mutation Research* 541 (2003) 103–113.
- Kwan, K.K., B. J. Dutka (1992): A novel bioassay approach: Direct Application of the Toxi-Chromotest and the SOS Chromotest to Sediments. *Environ. Toxicol. Water Qual.*, 7, 49 – 60.
- Lapin, C.A., M. Gautam, B. Zielinska, V.O. Wagner, R.O. McClellan (2002): Mutagenicity of emissions from a natural gas fueled truck *Mutat. Res.*, 519, 205 – 209.
- Leguy, I., Le Bon, A.-M., Belloir, C., Lhuguenot, J.-C., Chagnon, M.-C. (1997): Migration and mutagenic potentiality of food contact materials: A new strategy for testing their safety. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 379(1 SU - 1), S198-S199.
- Lichtenberg-Frate, H., Schmitt, M., Gellert, G. & Ludwig, J. (2003). A yeast-based method for the detection of cyto and genotoxicity. *Toxicology in Vitro* 17, 709-716.
- Lockard, J.M., C.J. Viau, C. Lee-Stephens, J.C. Caldwell, J.P. Wojciewski, H.G. Enoch, P.S. Sabharwal (1981): Induction of sister chromatid exchanges and bacterial revertants by organic extracts of airborne particles. *Environ.Mutagenesis*, 3, 671 – 681.
- Ma, T.-H. (1979): Micronuclei induced by X-rays and chemical mutagens in meiotic pollen mother cells of Tradescantia. A promising mutagen test system. *Mutat. Res.*, 64, 307 – 313.
- Ma, T.H. (1994): Application of quick and simple plant bioassays to assess the genotoxicity of environmental pollutants—detection of potential health hazards of air, water and soil contaminants. In: G.H. Degen, J.P. Seiler, P. Bentley Eds., Proceedings of 1994 EUROTOX Congress, Springer, 1994, 420–433.

- MacGregor, J.T., D. Casciano, L. Müller (2000): Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. *Mutat. Res.*, 455, 3 – 20.
- Majer B.J., Tscherko D., Paschke A., Wennrich R., Kundi M., Kandeler E., Knasmüller S. (2002): Effects of heavy metal contamination of soils on micronucleus induction in *Tradescantia* and on microbial enzyme activities: a comparative investigation *Mutation Research*, 515, 111–124
- Malachová, K. (1998): Mutagenicity tests on the bacteria and the detection of genotoxicity of industrial complex mixtures containing PAHs. *Centr. Eur. J. Publ. Hlth.*, 6, 307 – 313.
- Mersch-Sundermann, V., U. Schneider, G. Klopmann, H. S. Rosenkranz (1993): SOS induction in *Escherichia coli* and *Salmonella* mutagenicity: A comparison using 330 compounds. *Mutagenesis*, 9, 205 – 224.
- Mičieta, K., G. Murin (1996): Microspore analysis for genotoxicity of polluted environment. *Environ. Exper. Botany*, 36, 21 – 27.
- Mičieta, K., G. Murin (1997): Wild plant species in practical use for bioindication polluted environment. *Ekológia (Bratislava)*, 16, 193 – 202.
- Mitchellmore, D.M., J.K. Chipman (1998): DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutat. Res.*, 399, 135 – 147.
- Mollet, P., F. W. Würigler (1974): Detection of somatic recombination and mutation in *Drosophila*. A method for testing genetic activity of chemical compounds. *Mutat. Res.*, 25, 421 – 424.
- Monarca S., Feretti D., Zerbini I., Alberti A., Zani C., Resola S., Gelatti U., Nardi G. (2002): Soil Contamination Detected Using Bacterial and Plant Mutagenicity Tests and Chemical Analyses *Environmental Research Section*, 88, 64 – 69.
- Monarca, S., A. Zanardini, D. Feretti, E. Falistocco, P. Antonelli, S. Resola, G. Nardi (1998): Mutagenicity and clastogenicity of gas stove emissions in bacterial tests and plants, *Environ. Mol. Mutagen.* 31, 402–408.
- Monarca, S., D. Feretti, A. Zanardini, E. Falistocco, G. Nardi (1999): Monitoring of mutagens in urban air samples. *Mutat. Res.*, 426, 189 – 192.
- Monarca, S., D. Feretti, A. Zanardini, M. Moretti, M. Villarini, B. Spiegelhalder, I. Zerbini, U. Gelatti, E. Lebbolo (2001): Monitoring airborne genotoxicants in the rubber industry using genotoxicity tests and chemical analyses. *Mutat. Res.*, 490, 159 – 169.
- Monarca, S., R. Crebelli, D. Feretti, A. Zanardini, S. Fuselli, L. Filini, S. Resola, P.G. Bonardelli, G. Nardi (1997): Mutagens and carcinogens in size classified air particulates of a northern Italian town. *Sci. Total Environ.*, 205, 137 – 144.
- Mulkvag, S. L., R. Roberts, M. D. Schneider (1988): Cellular oncogenes in cardiovascular disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 20, 657 – 662.
- Müller, A. J. (1963): Embryontest zum Nachweis rezessiver Letalfaktoren bei *Arabidopsis thaliana*, *Biol. Zbl.*, 82, 113 – 182.
- Müller, L., Y. Kikuchi, G. Probst, L. Schechtman, H. Shimada, T. Sofuni, D. Tweats (1999): ICH-harmonised guidances on genotoxicity testing of pharmaceuticals: evolution, reasoning and impact. *Mutat. Res.*, 436, 195 – 225.
- Nardini, B., E. Clonfero (1992): Mutagens in urban air particulate. *Mutagenesis*, 7, 421 – 425.
- Oda, Y. S. Nakamura, I. Oki, T. Kato, H. Shinagawa (1985): Evaluation of the new system (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutat. Res.*, 147, 219 - 229.
- Ohnishi, S., Murata, M., Oikawa, S., Totsuka, Y., Takamura, T., Wakabayashi, K., Kawanishi, S. (2001): Oxidative DNA damage by an N-hydroxy metabolite of the mutagenic compound formed from norharman and aniline. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 494, 63 - 72.
- Pagano, P., T. De Zaiacomo, E. Scarcella, S. Bruni, M. Calamosa (1996): Mutagenic activity of total and particle-sized fractions of urban particulate matter. *Environ. Sci. Technol.*, 30, 3512 - 3516.
- Park, J.H., Lee, B.J., Lee, S.K., Kim, K., Lee, K.H., Che, J.H., Kang, K.S. et Lee, Y.S. (2000): Genotoxicity of drinking water from three Korean cities. *Mutation Research*. 466, pp 173 – 178.
- Penn, A., S. J. Garte, L. Warren, D. Nesta, B. Mindich (1986): Transforming gene in human atherosclerotic plaque DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 7951 – 7955.
- Petrovská, H., M. Somorovská, B. Vallová, M. Dušínská (1999): Genotoxicity testing of air samples from cities of Slovakia detected by the comet assay in human cells. *Neoplasma*, 46, 16 – 17.
- Phillips, D. H., S. Venitt (1995): *Environmental mutagenesis*. Bios Scientific Publishers, Oxford, Limited, 1995.
- Piperakis, S. M., E. E. Visvardis and Tassiou (1999): Comet assay for nuclear DNA damage. *Methods Enzymol.*, 300, 184 -194.
- Podstavková, S., E. Miadoková, D. Vlcek (1992): New DNA repair-deficient mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mutat. Res.*, 293, 65 – 69.
- Poli, P., de Mello, M. A., Buschini, A., de Castro, V. L. S. S., Restivo, F. M., Rossi, C. & Zucchi, T. M. A. D. (2003). Evaluation of the genotoxicity induced by the fungicide fenarimol in mammalian and plant cells by use of the single-cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 540, 57-66.

- Purchase, I. F. H. (1982): An appraisal of predictive tests for carcinogenicity. *Mutat. Res.*, 99, 53 – 71.
- Pysalo, H., J. Tuominen, K. Wickstorm, E. Skytta, L. Tikkanen (1987): Polycyclic organic material (POM) in urban air fractionation, chemical analysis and genotoxicity of particulate and vapour phases in an industrial town in Finland. *Atmos. Environ.*, 21, 1167 - 1180.
- Quillardet, P., and M. Hofnung (1984): Use of the terms mutagenicity and genotoxicity. *Mutat. Res.*, 132, 141 – 142.
- Quillardet, P., M. Hofnung (1993): The SOS chromotest: A review. *Mutat. Res.*, 297, 235 – 279.
- Quillardet, P., O. Huisman, R. D`Ari, and M. Hofnung (1982): SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K12 to measure genotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 5971 – 5975.
- Reifferscheid, G., J. Heil (1996): Validation of the SOS/umu test results of 486 chemicals and comparison with the Ames test and carcinogenicity data. *Mutat. Res.*, 369, 129 - 145.
- Reisenfeld, G., I. Kirsch, S.H. Weissman (1985): Detection and quantification of aflatoxin B1 in orange juice by SOS chromotest. *Food Addit. Contam.*, 2, 253 – 257.
- Rosenkranz, H.S., R. Mermelstein (1983): Mutagenicity and genotoxicity of nitroarenes. All nitro-containing chemicals were not created equal. *Mutat. Res.*, 114, 217 - 267.
- Rossman T.G. (1994): Metal mutagenesis, in: R.A. Goyer, M.G. Cherian (Eds.), *Toxicology of Metals Biochemical Aspects*, Springer, New York, 1994, 374–405.
- Rueff, J., A. Laires, H. Borba, T. Chaveca, M. Inacia Gomes, M. Halpern (1986): Genetic toxicology of flavonoids: the role of metabolic conditions in the induction of reverse mutation, SOS functions and sister-chromatid exchanges. *Mutagenesis*, 1, 179 – 183.
- Salagovic J, Gilles J, Verschaeve L, Kalina I. (1996): The comet assay for the detection of genotoxic damage in the earthworms: a promising tool for assessing the biological hazards of polluted sites. *Folia Biol (Praha)*. 42, 17- 21.
- Samoiloff, M. R., S. Schulz, Y. Jordan, K. Denich, E. Arnott (1980): A rapid Simple Long-Term Toxicity Assay for Aquatic Contaminants Using The Nematode *Panagrellus redivivus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 37, 1167 – 1174.
- Sasaki, Y. F., H. I. Imanishi, M. Watanabe, A. Sekiguchi, M. Moriya, Y. Shirasu, K. Tutikawa (1986): Mutagenicity of 1,2-dibromo-3-chloropropane (DBCP) in the mouse spot test. *Mutat. Res.*, 174, 145 – 147.
- Shen, L., Wu, J.-Y., Lin, G.-F., Shen, J.-H., Westendorf, J. & Huehnerfuss, H. (2003). The mutagenic potentials of tap water samples in Shanghai. *Chemosphere* 52, 1641-1646.
- Schairer, L.A., J. Van, T. Hof, C.C. Hayes, R.M. Burton, F.J. de Serres (1978): Exploratory monitoring of air pollutants for mutagenicity activity with the *Tradescantia* stamen hair system. *Environ. Health Perspect.*, 27, 51 – 60.
- Schleibinger, H., C. Leberl, H. Rueden (1989): Nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons (nitro-PAH) in suspended particulate matter. II: Comparison of the mutagenic activity of nitro-PAH in the Ames-, the SOS-repair and the SCE-assay. *Int. J. Hyg. Environ. Med.*, 188, 421 – 438.
- Schmid, W. (1975): The micronucleus test. *Mutat. Res.*, 31, 9 – 15.
- Schnurstein, A. & Braunbeck, T. (2001): Tail Moment versus Tail Length--Application of an In Vitro Version of the Comet Assay in Biomonitoring for Genotoxicity in Native Surface Waters Using Primary Hepatocytes and Gill Cells from Zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 49, 187-196.
- Siddiqui, A.H., Ahmad, M., (2003): The Salmonella mutagenicity of industrial, surface and groundwater samples of Aligarh region of India. *Mutation Research* 541 (2003) 21–29.
- Slagborn, P. E. (1990): Meeting report: The aging genome: determinant and target? *Mutat. Res.*, 237, 183 – 187.
- Sorensen, W. G., J. D. Tucker, and J. P. Simpson (1984): Mutagenicity of the tetramic mycotoxin cyclopiazonic acid. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 1355 – 1357.
- Sorensen, W.G., W.Z. Whong, J. P. Simpson, F.J. Hearl, T. Ong (1982): Studies of the mutagenic response of *Salmonella typhimurium* TA 98 to size-fractionated air particles: comparison of the fluctuation and plate incorporation tests. *Environ. Mutagen.*, 4, 531 - 541.
- Sparrow, A. H., L. A. Schairer (1971): Mutation response in *Tradescantia* after an accidental exposure to a chemical mutagen. *EMS Newslett.*, 5, p. 16 – 19.
- Szabad, J. (1986): A genetic assay for the detection of aneuploidy in the germ-line cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, 164, 305 – 326.
- Škarek, M. (2002): Vývojové trendy v oblasti bakteriálních testů genotoxicity. In: Sborník z konference: 25. Pracovní dny České společnosti pro mutagenезu zevním prostředím, 22. – 24. května 2002, Brno.
- Thacker, J. (1985): The molecular nature of mutations in cultured mammalian cells: a review. *Mutat. Res.*, 150, 431 – 442.
- Tokiwa, H., R. Nakagawa, K. Horikawa, A. Ohkubo (1987): The nature of the mutagenicity and carcinogenicity of nitrated, aromatic compounds in the environment. *Environ. Health Perspect.*, 73, 191 – 199.

- Ulitzur, S., I. Weiser, S. Yannai (1980): A new sensitive and simple bioluminescent test for mutagenic compounds. *Mutat. Res.*, 74, 113 – 124.
- Vahl, H.H., Karbe, L., Westendorf, J., (1997): Genotoxicity assessment of suspended particulated matter in the Elbe river: comparison of Salmonella microsome test, arabinose resistance test, and umu-test. *Mutation Research*. No. 394, pp 81 – 93.
- Van der Lelie, D., L. Regniers, B. Borremans, A. Provoost, L. Verschaeve (1997): The VITOTOX<sup>®</sup> test, an SOS bioluminescence Salmonella typhimurium test to measure genotoxicity kinetics. *Mutat. Res.*, 189, 279 – 290.
- Vargová, M., L. Rosival (1988): Odporúčané testy pre špeciálne testy toxicity. *Acta Hygienica Epidemiol. Microbiol.*, 16, 1 – 136.
- Verschaeve, L., Gilles, J. (1995): Single cell gel electrophoresis assay in the earthworm for the detection of genotoxic compounds in soils. *Bull. Environ. Contain. Toxicol.* 54, 112-119.
- Verschaeve, L., Kestens, V., Taylor, J. L. S., Elgorashi, E. E., Maes, A., Van Puyvelde, L., De Kimpe, N., Van Staden, J. (2004). Investigation of the antimutagenic effects of selected South African medicinal plant extracts. *Toxicology in Vitro* 18, 29-35.
- Walmsley R.M., N. Billinton and W.-D. Heyer (1997): Green Fluorescent Protein as a reporter for the DNA damage-induced gene RAD54 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Trast*, 13, 1535-1545.
- Wasserkort, R., A. Hartmann, R.M. Widmer, H. Burtcher (1998): Correlation between on-line PAH detection in airborne particle samples and their bacterial genotoxicity. *Ecotox. Environ. Safety*, 40, 126 – 136.
- Weisburger, J. H., W. S. Barnes, C. A. Lovelette, C. Tong, T. Tanaka, G. M. Williams (1986): Genotoxicity, Carcinogenicity, and Mode of Action of the fried food mutagen 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ). *Environ. Health Perspect.*, 67, 121 – 127.
- Whong, W., Y. Wen, J. Stewart, T. Ong (1986): Validation of the SOS/umu test with mutagenic complex mixtures. *Mutat. Res.*, 175, 139 - 144.
- Whong, W.-Z., J. D. Stewart, D. C. Adamo, T. Ong (1983): Mutagenic detection of complex environmental mixtures using Salmonella/arabinose-resistant system. *Mutat. Res.*, 120, 13-19.
- Williams, G. M. (1978): Further improvements in the hepatocyte primary culture DNA repair test for carcinogens: detection of carcinogenic biphenyl derivatives. *Cancer Lett.*, 4, 69 – 75.
- Wilson, J.T., P.L. Pascoe, J.M. Perry, D.R. Dixon (1998): Evaluation of the comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate, *Mytilus edulis* L. (Mollusca: Pelecypoda). *Mutat. Res.*, 399, 87 – 95.
- Würgler, F. E. (1992): Recombination and gene conversion. *Mutat. Res.*, 272, 226 – 231.
- Würgler, F. E., F. H. Sobels, E. R. Vogel (1977): *Drosophila* as a assay system for detecting genetic changes. In: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, Elsevier, Amsterdam, 335 – 373.
- Zang, Z., Y. Zhong, Y. Luo, Z.M. Kong (2000): Genotoxicity of two novel pesticides for the earthworm, *Eisenia fetida*. *Environ.Poll.*, 108, 271 – 278.
- Zhao, X., Z. Wan, G. Chen, H. Zhu, S. Jiang, J. Yao (2002): Genotoxic activity of extractable organic matter from urban airborne particles in Shanghai, China. *Mutat. Res.*, 514, 177 – 192.
- Zimmermann, F. K. (1975): Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *S. cerevisiae*. *Mutat. Res.*, 31, 71 – 86.
- Zimmermann, F. K. (1982): Can we determine mutagenicity or only a mutagenic potential? *Mutat. Res.*, 92, 3 – 7.
- Zimmermann, F. K., R. C. von Borstel, E. S. von Halle, J. M. Parry, D. Siebert, R. Zettenberg, G. Barale, N. Lapireno (1984): Testing of chemicals for genetic activity with *S. cerevisiae*: A report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.*, 133, 199 – 244.
- Zwiener, C., Frimmel, F. H. (2003). Short-term tests with a pilot sewage plant and biofilm reactors for the biological degradation of the pharmaceutical compounds clofibric acid, ibuprofen, and diclofenac. *The Science of The Total Environment* 309, 201-211.