

EBER GÖLÜ VE AKARÇAY SUYUNUN MUTAJENİK ÖZELLİKLERİNİN AMES SALMONELLA/MİKROZOM TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI

*İ. Hakkı CİĞERCİ, *Recep LİMAN, **H. Mehtap KUTLU,
**Gözde AYDOĞAN, *Muhsin KONUK

** Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji
Bölümü Afyonkarahisar

**Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Eskişehir

ÖZET

Bu çalışmada Eber Gölü ve onu besleyen Akarçay üzerindeki üç farklı istasyondan elde edilen su örneklerinin muhtemel genotoksik etkilerini belirlemek için *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları kullanılarak Ames plak inkorporasyon testi yapılmıştır. Su örnekleri XAD 4 kolondan geçirilerek potansiyel mutajen maddeler konsantre halde elde edilmiştir. Metabolik aktivasyon içermeyen deneylerde, TA 98 suşu için her üç istasyonda, TA 100 suşu için ise 2. ve 3. istasyonlarda mutajenik etkiye rastlanmıştır. Metabolik aktivasyon varlığında yapılan deneylerde ise, yalnızca 3. istasyonda çerçeve kayması mutasyonuna neden olan mutajen maddelerin varlığı belirlenmiştir. Ayrıca su örneklerindeki toplam metal konsantrasyonları ICP (Inductively Coupled Plasma Spectrometer) ile belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Ames test, XAD reçinesi, mutajenite

MUTAGENIC INVESTIGATION ON BOTH EBER LAKE AND AKARÇAY'S WATER BY AMES SALMONELLA/MICROSOME TEST

ABSTRACT

In this study, Ames plaque incorporation test was used in order to investigate the possibly mutagenic features of both Eber Lake and Akarçay's water. The water samples were collected from 3 different stations and tests were carried out by use TA 98 ve TA 100 strains of *Salmonella typhomurium*. Water samples studied were introduced to XAD 4 column for obtaining the potential mutagenic compounds as bulk. The experiments including non-metabolic activation showed mutagenic activity in three stations for TA98 strain and in two stations for TA100 strain. When

metabolic activation experiments were carried out, only one station showed having mutagenic material by causing frame shift mutation. Apart from these, total heavy mineral contents of the water studied were also determined by ICP.

Keywords: Ames test, XAD resin, mutagenity

1. GİRİŞ

Nehir ve göl sularının kentsel ve endüstriyel kaynaklı kimyasal bileşenlerle kontamine olması potansiyel bir ekotoksikolojik risk oluşturmaktadır. Akarsu sedimenti sucul çevrelerde, bünyesinde ağır metalleri barındırarak kirleticilerin ikincil bir kaynağını oluşturmaktadır [1].

Doğal çevrelerde mutajenlerin belirlenmesi, kanseri indükleyebilmeleri, gelecek nesillerde negatif genetik değişikliklere neden olabilmeleri, üreme işlevleri üzerindeki olumsuz etkileri göz önüne alındığında son derece önemlidir [2,3].

Özellikle ksenobiotiklerden kaynaklanan risklerin belirlenmesi oldukça güçtür. Çünkü bu maddeler doğal çevrelerde, analitik belirlemeyi güçleştiren çok düşük miktarlarda bulunmaktadır.

Ekolojik risk belirlenmesinde en iyi yol sucul organizmalar üzerindeki toksisiteyi belirleyen biyolojik testler ve bakteriler üzerindeki genotoksik etki belirleme testleridir [4].

Kimyasal olarak indüklenen mutagenезisi belirlemede kullanılan Ames (Salmonella/mikrozom) testi, havada, akarsu ve göllerde, içme suyundaki kompleks karışımlarda mutajeniteyi tesbit etmek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır [1,5,6]. Bu test sisteminde, *Salmonella typhimurium* bakterisinin LT2 atasal suşundan in vitro mutasyonla elde edilen *Salmonella typhimurium* his⁻ mutantları kullanılmaktadır. Salmonella/mikrozom testi ile kimyasal maddelerin bu test suşlarını his⁺ revertantlara dönüştürme özellikleri belirlenmektedir. Test suşları, histidin mutasyonuna ek olarak farklı tipteki mutajenlere karşı duyarlılıklarını arttıran başka mutasyonlara da sahiptirler.

Salmonella/mikrozom testi, bakteri DNA'sı ile etkileşime girerek mutasyona neden olan ajanların, insanlar ve diğer türler için de potansiyel mutajenler olabileceği varsayımını ve mutajenite ile karsinojenite arasındaki korelasyonu temel almaktadır.

Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) ve Poliklorobifeniller (PCB) çevresel kirleticiler zincirinin en önemli halkalarını oluştururlar. PAH'lar fosil yakıtların ve diğer organik materyallerin yanması veya sıcakta erimesi sonucunda oluşurlar. PCB'ler ise çevrenin, endüstriyel kaynaklı devamlı kirleticileridir. PAH ve PBC'ler başlıca, karaciğerde yerleşmiş Faz I ve Faz II enzim sistemleri tarafından metabolize edilir. PAH'lar ve PCB'lerin, oksidasyon basamaklarında, toksisite, karsinojenite ve mutajeniteye neden olan reaktif ara ürünlere dönüştükleri saptanmıştır [7,8,9].

Salmonella/mikrozom testinde kullandığımız, TA 98 suşu, çerçeve kayması mutasyonuna sahip olup, TA 100 suşu baz değişimi mutasyonu içermektedir [10]. Çerçeve kayması mutasyonu, bir veya daha fazla nükleotidin DNA'ya eklenmesi veya ayrılması sonucu meydana gelir. Kodon dizilimi değiştiği için çerçeve kayması mutasyonu tamamen fonksiyonsuz bir proteinle sonuçlanabilir. Baz değişimi mutasyonları ise, bir nükleotidin diğeriyle yer değiştirmesi sonucu DNA diziliminin tek bir pozisyonunda değiştiği mutasyonlardır.

Salmonella/mikrozom testinde deneye ek olarak karaciğer enzimleri bakteri hücreleriyle inkübe edilmek yoluyla bu enzim sistemlerinin etkisi belirlenebilir.

Eber Gölü, Afyon iline bağlı Çay, Sultandağı ve Bolvadin ilçeleri arasındadır. Denizden 965 m yükseklikte ve 124.74 km² yüzölçümündedir. Gölü besleyen en önemli kaynaklar Afyon vadisinden gelen Akarçay ile Taşköprü çaylarıdır. Akarçay, yıllardır Afyon yerleşim bölgesi ile sanayinin evsel ve kanalizasyon atık sularını, Afyon Şeker Fabrikası deşarjını, Alkoloid ve Avşar Emaye Fabrikası atıklarını taşımıştır. Ayrıca Çay, Bolvadin, Eber Belediyeleri ve göl çevresindeki köylerin kanalizasyon atıkları Eber Gölüne deşarj edilir.

Bu çalışmada *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları, Eber Gölü ve onu besleyen Akarçay üzerindeki üç farklı istasyondan elde edilen su örneklerinin genotoksik karakterlerini belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Su örnekleri XAD 4 kolondan geçirilerek potansiyel mutajen maddeler konsantrasyon halde elde edilmiştir. Su örneklerindeki toplam metal konsantrasyonları ICP (Inductively Coupled Plasma Spectrometer) ile belirlenmiştir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. *Salmonella typhimurium* Test Suşları

Bu deneyde, Prof. Dr. Bruce N. Ames ve arkadaşları tarafından *Salmonella typhimurium* LT2 atasal suşundan in vitro mutasyonlarla geliştirilmiş TA98 ve TA100 suşları kullanılmıştır. Bu suşlar, Dr. B. N. Ames (University of California, Berkley, CA, USA)'den temin edilmiştir. Bu iki suş, Ames testi için gereken orjinal mutasyonlara ek olarak oluşturulan bir kısım özellikler ile baz değişimi ve çerçeve kayması mutajenlerine karşı daha duyarlı hale getirilmiştir.

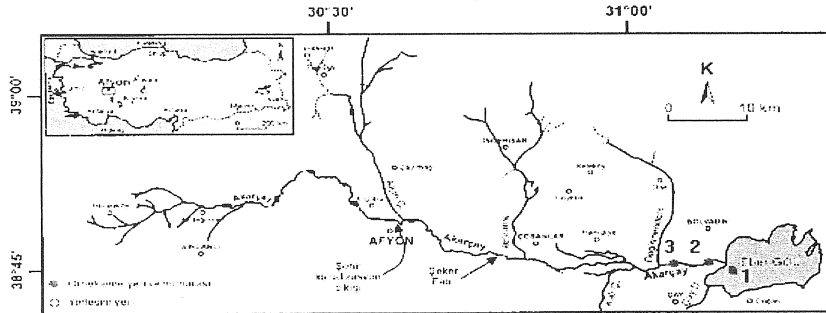
2.2 Kimyasallar

Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler aşağıdaki üreticilerden satın alınmıştır:

Nutrient broth, bacto agar (Oxoid), ampisilin trihidrat, β -nicotinamid adenin dinükleotid fosfat (β -NADP), 3 metilkolantren, kristal viyole, sodyum klorid (Sigma), amberlit XAD-4, dimetilsülfoksit (DMSO), 4-nitro-o-fenilendiamin (NPD) (Aldrich), sodyum azid (SAZ), magnezyum klorid, potasyum klorid, potasyum fosfat, sitrik asit monohidrat, sodyum amonyum fosfat, sodyum dihidrojen fosfat, disodyum hidrojen fosfat (Merk).

2.3. Su Örnekleri

Çalışmamızda kullanılan su örnekleri Ocak 2004 de 3 adet istasyon belirlenerek Eber Gölü ve gölü besleyen Akarçay'dan alınmıştır (Şekil 1). Çalışmamızda her bir istasyondan 4.5 litre su örneği alınmıştır. Su örnekleri kaba partiküllerinden uzaklaştırılmak amacı ile cam filtre kullanılarak süzülerek 18 °C'de saklanmıştır.



Şekil 1. Örneklerin alındığı istasyonlar

2.4. Su Örneklerinden Çözünmüş Organik Maddelerin Ekstraksiyonu

Su örneklerindeki çözünmüş organik maddelerin ekstraksiyonu her örnek için 4,5'er litre suyun ayrı ayrı, cam kolonlarda (15 mm x 150 mm) paketlenmiş olan XAD 4 reçineden geçirilmesiyle gerçekleştirilmiştir. XAD 4 reçinenin hazırlanışı ve kolonun paketlenmesi Junk ve arkadaşlarına göre yapılmıştır [11]. Kolondaki organik maddelerin elüsyonu 5 ml/dak hızda 300'er ml diklorometan (CH_2Cl_2), aseton (CH_3COCH_3), ve metanol (CH_3OH) ile yapılmıştır [11,12]. Çözücüler uçurulduktan sonra kalan tortu 10 ml DMSO içerisinde çözünmüş (alınan su örneği 450 kez konsantre edilmistir, daha sonra dilusyonu yapılarak farklı konsantrasyonlardaki dozlar (Su örneğinin ekstraktı $\times 10^0$, $\times 10^{-1}$, $\times 10^{-2}$, $\times 10^{-3}$, $\times 10^{-4}$) hazırlanmıştır.

2.5. Test Maddelerinin Sitotoksik Etkilerinin Saptanması

Kullanılan test maddelerinin test bakterileri için öldürücü dozunun saptanması amacıyla top agara 0.1 ml bakteri kültürü ve 0.1 ml su örneğinin değişik konsantrasyonları eklenmiştir. Tüpteki karışım NA plaklarına dökülerek plaklar 37°C 'de 24 saat inkübe edilmiş, inkübasyondan sonra plaklardaki koloniler sayılmış ve kontrol plakları ile karşılaştırılmıştır. Buna göre ekstraksiyonu yapılan su örneklerinin denenen dozlarında (Su örneğinin ekstraktı $\times 10^0$, $\times 10^{-1}$, $\times 10^{-2}$, $\times 10^{-3}$, $\times 10^{-4}$) sitotoksik etkiye rastlanılmamıştır. Deneylere bu dozlar kullanılarak devam edilmiştir.

2.6. Ames Testinin Yapılışı

Test prosedürü Maron ve Ames'de belirtilen şekilde, plak inkorporasyon metodu kullanılarak metabolik aktivasyonsuz olarak uygulanmıştır [10]. Su örnekleri DMSO içerisinde çözüldükten sonra dilüsyonu yapılmış ve artan dozajdaki 5 farklı konsantrasyonda olmak üzere deneylerde kullanılmıştır. İçerisinde 2 ml üst agar bulunan deney tüplerine 0.1 ml test bileşiği, 0.2 ml histidin-biyotin çözeltisi ve 0.1 ml gecelik bakteri kültürü ($1-2 \times 10^9$ bakteri/ml) eklenmiştir. S9'lu deneylerde top agar içerisine 500 μl S9 karışımı ilave edilmiştir. İyice çalkalandıktan sonra 37°C 'de ısıtılmış MGA plakları üzerine dökülüp, yüzeye tamamen yayılması sağlanmıştır. 15 dakika bekletildikten sonra 37°C 'de 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Deneyler her bir doz için 3 ayrı plak olarak yürütülmüş ve her deney 2 kez tekrar edilmiştir. Deneylerde her bir plaktaki revertant kolonilerin sayısının aritmetik ortalaması alınmış ve sonuçların değerlendirilmesi SPSS istatistiksel programının Student-t testi

kullanılarak, deney sonuçları her doz için ayrı ayrı çözücü kontrolle karşılaştırılarak yapılmıştır.

Sonuçların değerlendirilmesi Vargas ve arkadaşlarının kriterlerine göre yapılmıştır [13].

2.7. Total Metal İçeriklerinin Belirlenmesi

Su örneklerine uygulanan mutajenite testine ilave olarak, mutajenite testinin sonuçlarını değerlendirmeye katkısı olacağı düşünülerek örneklerin total metal içerikleri, Selçuk Üniversitesi'nde ICP spektrometre cihazı kullanılarak örnekler 3 kez analiz edilip ortalama değerleri \pm SD Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Su numunelerinin ağır metal analiz sonuçları

İstasyon No	TOPLAM AĞIR METAL İÇERİKLERİ (ppm)					
	Aritmetik Ortalama \pm SD					
	Al	Cu	Cd	Pb	Ni	Cr
1.	-	-	0,00022 $\pm 3 \times 10^{-5}$	0,009061 $\pm 56 \times 10^{-5}$	0,000579 $\pm 12 \times 10^{-5}$	0,006412 $\pm 8 \times 10^{-6}$
2.	-	-	0,001202 $\pm 7 \times 10^{-5}$	0,011505 $\pm 51 \times 10^{-5}$	0,017152 $\pm 14 \times 10^{-5}$	0,005046 $\pm 21 \times 10^{-5}$
3.	-	-	0,002368 $\pm 7 \times 10^{-6}$	0,012394 $\pm 14 \times 10^{-5}$	0,009475 $\pm 5 \times 10^{-5}$	0,006954 $\pm 19 \times 10^{-5}$

2.8. Sonuçların Değerlendirilmesi

Sonuçlar, solvent kontroldeki revertant koloni sayısı ile deney petrilerindeki revertant koloni sayılarının SPSS istatistiksel programı Student-t testi ile karşılaştırılması ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar farklı zamanda uygulanan iki ayrı deneyden elde edilen altı petrideki koloni sayılarının ortalamasıdır. Deney petrilerindeki koloni sayılarından kontrol petrilerindeki koloni sayıları çıkarılmış, aralarındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar mutajenitenin kanıtı olarak kabul edilmiştir. Revertant koloni sayısındaki doza bağlı artışlar da mutajenitenin bir diğer kanıtıdır [1,14].

3. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmanın amacı Eber Gölü suyunun mutajenik maddelerle potansiyel kontaminasyonunun Ames (Salmonella/mikrozom) mutajenite sistemi ile araştırılmasıdır. Çalışmalar plak inkorporasyon yöntemi kullanılarak metabolik aktivasyonlu ve metabolik aktivasyonsuz olarak yürütülmüştür. Deneylerde kullanılan TA 98 suşu çerçeve kayması mutasyonu, TA 100 suşu ise baz değişimi mutasyonu içermektedir. Daha önce yapılan pek çok ekotoksikolojik çalışmada TA 98 suşunun çevresel kirleticilere karşı TA 100 suşuna oranla daha hassas olduğu belirtilmiştir [5,6,15]. Bu çalışmanın sonuçları da bu bulguyu destekler niteliktedir.

Su örneklerinden elde edilen ekstraktlarda sitotoksik etkiye rastlanmamıştır. Her bir istasyondan elde edilen örneklerin dilüsyonu yapılmış ve artan dozda 5 farklı konsantrasyon olarak uygulanmıştır.

Metabolik aktivasyon içermeyen deneylerde örneklerdeki revertant koloni sayısı kontrolle karşılaştırıldığında, TA 98 suşu için her üç istasyonda da mutajenik etkiye rastlanmıştır. Bu etki bazı dozlar için solvent kontrolle yapılan karşılaştırma sonucunda ortaya çıkan istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olarak gözlenmiş, aynı zamanda her üç istasyonda da koloni sayısındaki doza bağlı artış olarak da ortaya çıkmıştır. TA 100 suşu için ise, metabolik aktivasyonsuz ortamda mutajenik etki 2. ve 3. istasyonlarda gözlenmiştir (Tablo 2).

Metabolik aktivasyon varlığında yapılan deneylerde ise, yalnızca 3. istasyonda çerçeve kayması mutasyonuna neden olan mutajen maddelerin varlığı belirlenmiştir. 2. ve 3. istasyonlarda S9'suz ortamda baz değişimi mutasyonuna neden olan maddelerin bu etkilerinin metabolik aktivasyon varlığında ortadan kalktığı gözlenmiştir (Tablo 2).

3 numaralı numunenin alındığı bölge, Eber Gölü'ne dökülen Akarçay Çayı üzerindedir. Bu bölgenin, şeker ve alkoloid fabrikalarına yakın bir bölge olması nedeniyle kirlilik yükünün fazla olduğu düşünülmekteydi. Elde edilen sonuçlar bu görüşü destekler niteliktedir.

2 numaralı numune ise Akarçay Çayı'nın göl ağzına yakın bir bölgesinden alınmıştır. Her iki suş üzerinde de mutajenik etkiye ağırlıklı olarak 2 ve 3 numaralı numunelerin alındığı istasyonlarda rastlanmıştır. 1 numaralı numunenin alınmış olduğu istasyon ise Eber Gölü üzerindedir.

Elde edilen bulgular, yapılan metal analizlerinin sonuçları ile de paralellik göstermektedir. 2 ve 3 numaralı istasyonlarda özellikle kurşun ağır

metalinin 1 numaralı istasyona göre daha yoğun olarak bulunduğu görülmüştür.

Tablo 2. İstasyonlara bağlı olarak revertant koloni sayıları

Örnekler		TA98 (ort± st.h.)		TA100 (ort± st.h.)	
		S9 ⁻	S9 ⁺	S9 ⁻	S9 ⁺
1. İstasyon	10 ⁰	49±4.4*	30±8.4	136±11.0	117±24.2
	10 ⁻¹	43±9.3*	29±2.3	138±12.0	123±30.8
	10 ⁻²	42±6.2*	31±4.1	143±7.7	137±24.3
	10 ⁻³	36±8.5	33±6.3	146±22.6	140±33.1
	10 ⁻⁴	33±9.7	28±3.1	143±8.5	134±28.7
2. İstasyon	10 ⁰	48±8.3*	30±4.4	199±27.0*	140±38.3
	10 ⁻¹	34±7.4	22±8.4	155±26.7	142±42.6
	10 ⁻²	32±11.2	19±6.5	139±8.6	130±19.5
	10 ⁻³	36±5.3*	21±8.2	142±8.3	138±31.4
	10 ⁻⁴	37±13.4	18±7.1	138±17.1	136±38.9
3. İstasyon	10 ⁰	47±6.0*	30±6.3	194±10.6*	137±23.2
	10 ⁻¹	34±8.1	29±10.1	153±23.3	136±18.3
	10 ⁻²	38±11.2	31±7.6	158±8.7	131±10.3
	10 ⁻³	35±12.1	33±3.7	143±7.2	127±14.6
	10 ⁻⁴	35±6.4*	28±9.3	146±9.6	124±21.4
DMSO		26.33±4,8	24.6±3.2	144.5±22.4	128.4±9.3
NPD (20 ug/petri)		819±5.8			
2AF (10 µg/petri)			689±11.7		607±20.4
SAZ (1.5 µg/petri)				653.5±35.7	

* Solvent Kontrolüne göre p<0.005 düzeyinde önemli (Student-t testi)

Tüm bu sonuçlar göstermektedir ki, Eber Gölü'nün suyu, Akarçay Çayı çevresinde yoğunlaşmış olan endüstriyel bölgelerin çay içerisine bırakmış olduğu kirleticilerle kirlenmektedir. Bu kirlilik Akarçay'ın suyunda daha yoğun olarak gözlenirken, çayın taşıdığı suyun Eber Gölü'nü beslemesi nedeniyle göl suyunun kirlilik yükü de gün geçtikçe artacaktır. Ames (Salmonella/mikrozom) mutajenite sistemi, mutajenik bileşenlerin varlığını belirlemede bir ön değerlendirme olarak ele alınmaktadır. İleride yapılacak çalışmalarda, diğer kısa zamanlı test sistemleri ile bu bulguların desteklenmesi ve uzun bir zaman diliminde elde edilen sonuçların değerlendirilmesi amacıyla mevsimsel örneklemeler yapılması yararlı olacaktır.

4. KAYNAKLAR

1. Vargas V.M.F., Migliavacca S.B., Melo, A.C., Horn R.C., Guidobono R.H., Sá Ferreira I.C.F., Pestana M.H.D., Genotoxicity Assessment In Aquatic Environments Under The Influence Of Heavy Metals And Organic Contaminants, *Mutat. Res.* 490, 141–158, (2001)
2. Czyz A., Szpilewska H., Dutkiewicz R., Kowalska W., Biniewska-Godlewska Wegrzyn G., Comparison Of The Ames Test And A Newly Developed Assay For Detection Of Mutagenic Pollution Of Marine Environments, *Mutat. Res.*, 519, 67–74, (2002).
3. Kataoka H., Hayatsu T., Hietsch G., Steinkellner H., Nishioka S., Narimatsu, S Nasmüller, S Hayatsu, Identification Of Mutagenic Heterocyclic Amines (IQ, trp-P-1 And A_C) In The Water Of The Danube River, *Mutat. Res.*, 466, 27–35, (2000).
4. Filipic, M., Toman, M.J., Ecotoxicological Studies Using Modified Ames Bioassay, *Water Sci. Technol.*, 34, 1–7, (1996).
5. Mamber S.W., Kolek B., Brookshire K.W., Bonner D.P., Fung-Tomc J., Activity Of Quinolones In The Ames Salmonella TA102 Mutagenicity Test And Other Bacterial Genotoxicity Assays, *Antimicrob.*, (1993).
6. Park J.H., Lee B.J., Lee S.K., Kim K., Lee K.H., Che J.H., Kang K.S., Lee Y.S., Genotoxicity Of Drinking Water From Three Korean Cities. *Mutat. Res.*, 466, 173–178, (2000).
7. Arınç E., Şen A., Hepatic Cytochrome P4501A And 7-Ethoxyresofurin-O-Deethylase Induction In Mullet And Common Sole As A Indicator Of Toxic Organic Pollution In İzmir Bay, Turkey, *Marine Environmental Research*, 48, 147-160, (1999).
8. Arınç E., Şen A., Bozcarmutlu A., Cytochrome P4501A And Associated Mixed Function Oxidase Induction In Fish As A Biomarker For Toxic Carcinogenic Pollutants In Aquatic Environment, *Pure Appl. Chem.*, 72:(6), 985-994, (2000).
9. Singer B., Gerunberger D., Metabolic Activation And Carcinogens And Mutagens Molecular Biology Of Mutagens And Carcinogens, Plenum: New York, 97-102, (1983).
10. Maron D., Ames B.N., Revised Methods For Salmonella Mutagenicity Test, *Mutat. Res.*, 113, 173–215, (1983).
11. Junk G.A., Svec H.J., Vick et R.D., M.J. Avery, Contamination Of Water By Synthetic Polymer Tubes, *Environ. Sci. Technol.*, 8:(13), 1100-1106, (1974).
12. Monarca S., Feretti D., Colivignarelli C., Guzzella L., Zerbini I., Bertanza G., Pedrazzani R., The Influence Of Different Disinfectants On Mutagenicity And Toxicity Of Urban Wastewater, *Water Res.*, 34, 4261–4269, (2000).
13. Vargas V.M.F., Motta V.E.P., Henriques J.A.P., Mutagenic Activity Detected By The Ames Test In River Water Under The Influence Of Petrochemical Industries, *Mutat. Res.*, 319, 31–45, (1993).
14. Mortelmans K., Zeiger E., The Ames Salmonella/Microsome Mutagenicity Assay. *Mutation Research*, 455, 29-60, (2000).
15. Černá M., Pastorková A., Šmid J., Dobiáš L., Rössner P., The Use Of YG Bacterial Strains For The Monitoring Of Drinking Water Mutagenicity. *Toxicology Letters*, 96, 335-339, (1998).

