
MICROORGANISMS AS OBJECTS FOR EXAMINATION GENOTOXICITY WITH THE USE OF AMES TEST

Ana Coneva

Faculty of medical sciences, University Goce Delcev – Stip, Republic of North Macedonia
ana.211382@student.ugd.edu.mk

Nevenka Velickova

Faculty of medical sciences, University Goce Delcev – Stip, Republic of North Macedonia
nevenka.velickova@ugd.edu.mk

Vaso Taleski

Faculty of medical sciences, University Goce Delcev – Stip, Republic of North Macedonia
vaso.taleski@ugd.edu.mk

Abstract: Ames test or analysis of reversible mutation of *Salmonella typhimurium* is a test for identification or detection (screening) of substances that cause genotoxicity or have a mutagenic effect on bacterial cells as a final object. It is a generally accepted test by the WHO used to confirm the genotoxicity of various chemical and physical agents, drugs, additives, preservatives used in various technological or industrial branches. The Ames test is one of the most commonly used tests in toxicology, genetics, microbiology, histology and other branches or scientific disciplines. The Ames test is named after the researcher or person who first applied it in practice, Bruce N. Ames, of the University of California. The purpose of this paper to emphasize the importance and significance of the Ames test and the application of microorganisms as objects for confirmation of genotoxicity in the body. It provides a historical overview of the development and improvement of the Ames test, its advantages and disadvantages, explains in detail the procedure and performance of the test, explains in stages all the changes in *Salmonella typhimurium* that are the result of certain genotoxicity in the body, compares the Ames test with other in vivo and in vitro genotoxicity tests and a review of several studies that used the same test was evaluated.

Keywords: microorganism, Ames test, genotoxicity, *Salmonella typhimurium*

МИКРООРГАНИЗМИТЕ КАКО ОБЈЕКТИ ЗА ИСПИТУВАЊЕ НА ГЕНОТОКСИЧНОСТ СО ПРИМЕНА НА АМЕСОВ ТЕСТ

Ана Цонева

Факултет за мед. науки, Универзитет “Гоце Делчев”-Штип, Република Северна Македонија
ana.211382@student.ugd.edu.mk

Невенка Величкова

Факултет за мед. науки, Универзитет “Гоце Делчев”-Штип, Република Северна Македонија
nevenkavelickova@ugd.edu.mk

Васо Талевски

Факултет за мед. науки, Универзитет “Гоце Делчев”-Штип, Република Северна Македонија
vaso.taleski@ugd.edu.mk

Резиме: Амесов тест или анализа на реверзибилна мутација на *Salmonella typhimurium* е тест за идентификација или детекција (скрининг) на субстанции што предизвикуваат генотоксичност или имаат мутагено дејство кај бактериските клетки како краен објект. Станува збор за општо прифатен тест од СЗО кој се користи за потврдување на генотоксичноста на различни хемиски и физички агенси, лекови, адитиви, конзерванси кои се користат во различни технолошки или индустриски гранки. Амесовиот тест е еден од најчесто применуваните тестови во токсикологијата, генетиката, микробиологијата, хистологијата и други гранки или научни дисциплини. Амесовиот тест е именуван по истражувачот или човек што прв го применил во пракса, Bruce N. Ames, од Универзитетот во Калифорнија. Цел на овој труд сакаме да ја потенцираме важноста и значењето на Амесовиот тест и примената на микроорганизмите како објекти за потврдување на генотоксичност во организмот. Во истиот направен е историски преглед на развојот и усовршувањето на Амесовиот тест, неговите предности и недостатоци, детално се објаснети процедурата и изведувањето на тестот, етапно се објаснети сите промени во *Salmonella typhimurium* кои се резултат на одредена генотоксичност во организмот, направена е споредба на Амесовиот тест со останатите in vivo и in

in vitro тестови за генотоксичност и евалуиран е ревијален преглед на неколку студии кои го користеле истиот тест.

1. ВОВЕД

Генотоксикологијата е современа научна дисциплина која се занимава со проучување на влијанието на различни физички, хемиски или биолошки агенси врз наследниот материјал во клетката. Најчесто генотоксичните ефекти се манифестираат или резултираат со промени во нуклеинските киселини, генски мутации, хромозомски промени, мејотички или митотички промени и др. Под генотоксичност се подразбира секое штетно влијание на различни нокси присутни во нашата работна или животна средина врз генетскиот материјал во клетката. Таквите промени не мора да бидат фенотипски видливи туку да се манифестираат како промени во наредните генерации. Од таа причина многу е битна акумулацијата или присуството на тие штетни агенси во организмот во подолг временски интервал. Постојат различни тестови за потврдување на генотоксичност, дел од нив се изведуваат во in vivo или во in vitro услови. Тестовите за генотоксичност (микронуклеусен тест, комет тест, промени во сестринските хроматиди, Амесов тест) ги потврдуваат промените кои се случиле на молекуларно или клеточно ниво, промените во бројот или структурата на хромозомите (Krča, 2007; Kirsch-Volders, 2011; Velickova & Milev, 2017; Velickova, 2019). Истите се апликативни во хумани, анимални или растителни клеточни линии, квасци и микроорганизми.

Амесовиот тест или микросоматски тест на мутагеност (Microsome mutagenicity test) е релативно брз тест кој се темели на реверзна мутација на бактериите. Тестот се применува на соеви од *Salmonella* spp., најчесто на сојот *Salmonella typhimurium*, поради тоа уште се нарекува и Амесов Салмонела тест или Салмонела тест на мутагеноста (Docherty et al., 2006; Hamel et al., 2016). Името на овој тест доаѓа од амерички биохемичар Bruce Nathan Ames, научникот кој прв го потврдил и применил во пракса. Во 1954 година, Bruce е назначен за независен истражувач во NIH (National Institutes of Health) и се фокусира на проучување на биосинтезата на хистидин кај *S. typhimurium*. Почетоците на Амесовиот тест, датираат од 1964 година кога Bruce ја прочитал листата на состојки на кутија чипс од компири и почнал да размислува дали конзерванси и други хемикалии можат да предизвикаат генетски промени и хромозомски структурни аберации кај луѓе. Bruce сфатил дека би било корисно да се направи краткорочен тест за скрининг на мутагеноза предизвикана од хемиски агенси и сфатил дека може да дизајнира таков тест со искористување на буквално илјадници мутанти на *S. typhimurium* на кои им е неопходен хистидин за раст и развој (Walker, 2020). Со развојот на Амесовиот тест се потврдува проценката на мутагените и канцерогените ризици од голем број хемиски агенси (Lawa, 1996; Wegrzyn et al., 2003; Pessala et al., 2004; Medač, 2017). Bruce, во своите истражувања со помош на овој тест, потврдува и објавува дека одредени хемиски супстанции кои се користат во технологијата и производството на храна можат да имаат негативен или генотоксичен ефект врз организмот.

2. ЦЕЛИ НА ТРУДОТ

Цели на овој труд се да се:

направи историски преглед на развојот и усовршувањето на Амесовиот тест

објасни процедурата и изведувањето на тестот

објаснат сите етапни промени во *S. typhimurium* кои се резултат на одредена генотоксичност во организмот

направи споредба на Амесовиот тест со останатите in vivo и in vitro тестови за генотоксичност

направи ревијален преглед или споредба на резултатите и заклучоците на неколку студии во период од 2000 до 2014 година кои во основа се базираат на Амесовиот тест

да се утврдат неговите предности и недостатоци

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

Во овој труд детално е објаснета целата постапка и процедура за изведување на тестот, образложени се сите неопходни материјали и инструменти кои се неопходни за изведување на истиот.

Материјал:

Хранителна подлога за размножување на бактериите, хранлива подлога збогатена со траги на хистидин, натриум азид, стерилна дестилирана вода, ДМСО (диметил сулфооксид), петриева плоча со минимален глукозен агар, ST Quad плоча за генотипизација. Инструменти за работа: стерилни ерленмаерови колби, пипети од 10 ml, 2 ml, 1000 µl и 100 µl, наставци за пипети, стерилни пинцети, термостат, печка, водена бања, ракавици, еспандорфни епрувети, пластичен држач за епрувети, вага, лабораториска лажичка, Vortex миксер, епрувети за центрифугирање, држач за епрувети, фломастер, инкубатор

3.1.1 *Salmonella typhimurium* микросомална анализа

Salmonella typhimurium микрозомалната анализа е широко прифатена бактериска анализа за идентификација и скрининг на генотоксични субстанции кои предизвикуваат генетски алтерации и мутации во клетките. Тестот користи соеви на *Salmonella* со веќе постоечки мутации кои резултираат со неспособност на бактериите да ја синтетизираат потребната аминокиселина хистидин, и поради недостатокот на хистидин не можат да растат и формираат колонии. Новите мутации на местото на овие постоечки мутации или во близина на гените, можат да ја вратат функцијата на генот и да овозможат клетките да синтетизираат хистидин. Овие ново мутирани клетки можат да растат во отсуство на хистидин и да формираат колонии. Од оваа причина, тестот често се нарекува и „реверзибилна анализа“. Тестот за мутагеност на *Salmonella* е специјално дизајниран за откривање на хемиски индуцирана мутагенеза, (Mortelmans et al, 2000). Заедничко за бактериските соеви е што не можат да растат на хранлив медиум со минимална количина гликоза без аминокиселини (чиј ген за синтеза е опфатен со мутација). Во тој случај единствено може да се формираат колонии доколку во подлогата се додаде аминокиселина неопходна за раст или субстанца што ќе предизвика обратна мутација за синтеза на одредена есенцијална аминокиселина, така што бактериите ќе можат самостојно да ја синтетизираат и да растат. Во тестот, во подлогата се додаваат траги за раст на потребната аминокиселина што треба да создаде услови за размножување на неколку генерации на бактерии. Бактеријата *Salmonella* која има мутација во оперонот за синтеза на хистидин е генетички прецизно дизајнирана со цел различни мутагени субстанции соодветно да бидат третирании и со помош на ваквата анализа да бидат препознаени. Се користат два соја на *S. typhimurium* односно TA100 и TA1535. Сојот TA100 поседува мутација во *hisG46* алелот. Тоа се мутагени клетки кои предизвикуваат замена на азотните базни парови GC (Guanine – Cytosine) (Hamel at al, 2016).

Escherichia coli

Во прилог на соевите на *Salmonella*, во студиите се користи и сој WP21 на *Escherichia coli*. (*E.coli*). Како што соевите на *Salmonella* содржат мутации во хистидинскиот оперон што ги прави зависни од хистидин, така и сојот WP2 на *E.coli* кој е зависен од триптофан. WP2 сојот на *E. coli* содржи терминална мутација во *trpE* генот што го вклучува AT (Adenine – Thymine) базниот пар, и со оваа мутација ја блокира биосинтезата на триптофан. Реверзибилна мутација може да се појави на првобитната локација со промена на една база или некаде на хромозомот, така што првата мутација ќе биде потисната. Постојат неколку видови на *E. coli* со мутација во генот *trpE*, од кои најчесто се користат за оваа намена: WP2, WP2 (pKM101), WP2 *uvrA*, WP2 *uvrA* (pKM101) (Hamel at al, 2016).

Метод на работа

Амесов тест на мутагеност

Мутациите можат да се појават како генетска мутација, каде што има промени во само една или повеќе азотни бази. Генетските мутации лесно се потврдуваат во бактерии и други клеточни линии кои резултираат со промени во бројот или растот на клетката (Maron и Ames 1983, Mortelmans & Zeiger (2000); Mortelmans & Riccio, 2000; Wegrzyn at al, 2003; Sui at al, 2009; Prono, 2021). Амесовиот тест се заснова на разликување помеѓу хистидин-зависни и хистидин-независни соеви. Според тоа, за бактериите се користи хранителна подлога која содржи траги на хистидин. Хистидинот од подлогата брзо се троши и со тоа престанува растот на немутираните бактерии т.е. хистидин зависни бактерии, додека хистидин независните бактерии ќе почнат да синтетизираат хистидин и ќе продолжат да растат. Постојат одреден број на бактерии кои спонтано мутираат на подлога сиромашна со хистидин, меѓутоа бројот на тие колонии е релативно мал и се во корелација со негативната контрола, додека кај реверзибилните колонии кои се јавуваат како последица на дејството на некој потенцијален мутаген агенс или генотоксикант, бројот е значително зголемен, во тој случај бројот на реверзибилни колонии е во корелација со количината на предизвикувачот на мутагените својства. И покрај тоа што Амесовиот тест има широка примена, тестот има свои предности и недостатоци.

Тестот се изведува само врз прокариотски организми

Тестот се изведува *in vitro*.

Се користи како скрининг тест за испитување на генотоксичноста и мутагеното дејство на различни физички и хемиски агенсии, истиот не се користи во дијагностички цели туку само укажува упатува на понатамошно тестирање и докажување на генотоксичното дејство на различни агенсии.

Поради разликите во метаболизмот на прокариотските и еукариотските клетки, тестот може да биде негативен на некој хемикалии кои се генотоксични за еукариотските клетки.

¹ *E.coli* WP2 pKM[101] и други тестери на *E. coli*, како и тестери на *S. typhimurium* се користат повеќе од 40 години за откривање на мутагени соединенија во хемикалии, фармацевтски производи, козметика, биоциди, вода и други примероци од животната средина. Видот WP2 е високо чувствителен на оксидативен стрес.

Методот за изведување на Амесовот тест за прв пат е објаснет и применет од страна на Maron и Ames (1983), потоа Mortelmans и Zeiger (2000) за испитување на соеви на Salmonella, како и за соеви на E. coli кои се опишани од страна на Mortelmans и Riccio (2000).

Бактериските соеви и контролите се засадуваат на минимален глюкозен агар и агар збогатен со траги на хистидин. Испитувањето се одвива во два примерока за секој бактериски вид. Испитуваните соеви се припремаат во три различни концентрации: 10⁻⁴, 10⁻⁵ и 10⁻⁶ како што предлагаат Maron и Ames

Како позитивна контрола се користи N3Na (натриум азид) во концентрација од 1,9 * 10⁻² (mol/dm³). Како негативна контрола се користи DMSO (диметил сулфооксид) и стерилна вода.

Во епрувета се пипетира 2 ml агар збогатен со траги на хистидин (кој предходно е растопен во печка, потоа се остава да одстои во водена бања на 45 °C), се додава 100 µl од тест супстанцијата и 100 µl од еден бактериски вид.

Се култивира на 48 часа на 37°C. Размножувањето на бактериите се одвива во асептички услови.

Во Ерленмаерови колби се додава 20 – 25 ml хранителна подлога и диск со лиофилизирани бактерии. Ерленмаеровата колба се става во инкубатор на 37 °C, инкубацијата не смее да трае повеќе од 16 часа. По инкубацијата, концентратот се става во фрижидер на +4 °C [26].

За проверка на генотипот на бактеријата S. typhimurium, соевите TA100 и TA1535, се користат ST Quad плочи на кои со брис се нанесува од бактерискиот концентрат. Се додава дискови на кристал виолет и се инкубираат на 37°C 48 часа. По 48 часа инкубација, се отчитуваат резултатите како број на колонии. Истовремено се отчитуваат и резултатите на ST Quad плочата на кои според фенотипот се одредува генотипот на бактеријата.

4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Направена е споредба на резултатите и заклучоците на неколку студии во период од 2000 до 2014 godina. Истражувањата се базираат на испитувања на повеќе хемиски соединенија како потенцијални генотоксиканти и мутагени агенси. Истражувањата се спроведени кај видовите на S. typhimurium (TA102 и TA2638A) и E. coli (WP2).

Во трудот „Споредба на чувствителноста на соевите на S. typhimurium TA102 и TA2638A со 16 мутагени” кој е спроведен од страна на Riden et al. (2009) анализирани се 16 субстанции потенцијални предизвикувачи на мутагеност од кои во овој труд издвоив четири: афлатоксин Б1, дантрон, формалдеhid и водороден пероксид.

На пример, афлатоксин Б1 е микотоксин кој го произведуваат габи (Aspergillus) кои паразитираат на растителни култури и е еден од најсилните токсини. Зголемената концентрација на афлатоксин предизвикува поголем број на мутации во видот TA100, но не и мутации во сојот на TA1538, како што било предвидено.

Во студијата на Stiven et al, (2014) прикажана е различната специфичност кај двата соеви на S. typhimurium (TA100 и TA1538) и нивната реакција на афлатоксин.

Во оваа студија предмет на истражување е афлатоксин, микотоксин кој може да се сретне во млекото, истиот се јавува кај животните кои се исхрануваат со пченка на која паразитира оваа габа со овој микотоксин. При спроведеното истражување кај двата вида на Salmonella забележана е многу поголема сензитивност односно поголем раст на реверзибилни колонии кај видот TA100 за разлика од видот TA1538.

Во студијата на Mortelmans et al, (2000) е анализиран бензопирин и неговата реакција кај двата соеви на S. typhimurium и тоа TA98 и TA100.

Авторите со помош на овој тест потврдуваат дека бензопиринот како соединение претставува потенцијална генотоксична субстанција и потенцијален канцероген кај човекот.

Во студијата на Chaudhary et al, (2014) прикажан резултатот за мутагеност на CSE1034 (нова комбинација на цефтриаксон) со и без метаболичка активација користејќи видови на S. typhimurium (TA 98, TA100, TA1535 and TA1537) и видот на E. coli [WP2 (uvrA)].

Заклучоците од оваа студија, добиени со примена на Амесовиот тест укажуваат дека CSE1034 не покажува мутагени својства и со тоа не претставува генотоксичен агенс.

Во студијата на Jadczyk et al, (2013) е направена анализа во 12 примероци на почви. Примероците претставуваат различни типови на почви: песочна, песочна плодна почва од глина и песок што содржи хумус, плодна почва од глина и песок што содржи хумус и тиња.

Почвите се разликуваат во однос на видот на користењето (обработлива и необработлива) и видот на загадувањето (остатоци од течност горива, експлозиви, хлорооргански соединенија).

Резултатите од оваа студија потврдуваат дека најмалку еден екстракт или агенс во секој тест примерок од почвата предизвикува мутација во сојот S. typhimurium TA 98. Тоа значи дека загадувачите или агенсите кои

биле присутни во тие почви имале силно директно или индиректно генотоксично дејство. Пет од нив, биле контаминирани со тринитротолуен (ТНТ). Просечниот број на реверзибилни клетки во соеви на овие соеви за 6 типови на почви загадени со остатоци од тринитротолуен (ТНТ) бил 81 пати повисок отколку за другите 6 почви (177606 и 2166). Ова укажува на значителна генотоксичност на ТНТ во споредба со другите загадувачи на почвата.

5. ЗАКЛУЧОК

Идентификацијата и скринингот на генотоксични агенси присутни во нашата животна или работна средина овозможува нивна брза детекција и заштита или превенција од голем број на заболувања кои истите ги предизвикуваат. Имајќи ги во предвид се поголемиот број на присутни мутагени агенси во непосредна работна или животна средина, се повеќе се наметнува потребата од ваков вид биомониторинг. Покрај стандардните и вообичаени *in vivo* или *in situ* испитувања, се повеќе се користат *in vitro* испитувања или тестови кај бактерии, бактериофаги, едноклеточни алги или квасци, имајќи ја во предвид релативната брзина и едноставност на изведување на тестот, ниската цена, јасниот механизам на токсичност и избегнување на жртвување животни во анимални модели. Се надеваме дека со детално објаснување на овој тест и разработување на оваа тема, ќе ја потенцираме важноста од примената на истиот и ќе ја потенцираме улогата на микроорганизмите во детекција на потенцијално генотоксични субстанции.

ЛИТЕРАТУРА

- Chaudhary, M., & Payasi, A. (2014). Evaluation of Genotoxicity of CSE1034 by Ames and *In vitro* chromosomal Aberration Tests. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13, 527. 10.4314/tjpr.v13i4.6.
- Docherty, K.M., Hebbeler, S.Z., & Kulpa, C.F.J. (2006). An assessment of ionic liquid mutagenicity using the Ames Test. *Green Chem.* 8, 560–567.
- Hamel, A., Roy, M., & Proudlock, R. (2016). The bacterial reverse mutation test., Department of Genetic Toxicology, Charles River Laboratories.
<https://www.criver.com/sites/default/files/resources/GeneticToxTestingTheBacterialReverseMutationTest.pdf>
- Jadczyk, P. & Kołwzan, B. (2013). Genotoxicity of Soil Pollutants Extracted with Different Solvents. *Polish Journal of Environmental Studies*, 22(1).
- Krča, S. (2007). Poglavlje 16.5. Amesov test. U: Metode u molekularnoj biologiji. Ur. Ambrović-Ristov A., Institut "Ruđer Bošković", Zagreb, 964-970.
- Kirsch-Volders, M., Decordier, I., Elhajouji, A., Plas, G., J., Aardema, M., & Fenech, M. (2011). *In vitro* genotoxicity testing using the micronucleus assay in cell lines, human lymphocytes and 3D human skin models, *Mutagenesis*, Volume 26, Issue 1.
- LAWA, Working Group of the Federal States on Water Problems. (1996). Recommendation on the Deployment of Continuous Biomonitoring for the Monitoring of Surface Waters.
http://www.mosselfmonitor.nl/Links/lawa_de/300715.pdf/59
- Maron, D.M., Ames, B.N. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res.*; 113(3-4):173-215. doi: 10.1016/0165-1161(83)90010-9. PMID: 6341825.
- Medač, P. (2017). 'Određivanje mogućeg mutagenog učinka monometinskih cijaninskih derivata', Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek, citirano: 02.02.2022., <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:958109>
- Myers, L.E., Adams, N.H., Hughes, T.J., Williams, L.R., & Claxton, L.D. (1987). An interlaboratory study of an EPA/Ames/Salmonella test protocol. *Mutat Res.* 182, 121-133.
- Mortelmans, K & Zeiger, E. (2000). Ames test screening service. (n.d.). ADME-Tox CRO. <https://www.cyprotex.com/toxicology/genotoxicity/amestest>
- Mortelmans K, Zeiger E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res.* (2000) Nov 20;455(1-2):29-60. doi: 10.1016/s0027-5107(00)00064-6. PMID: 11113466.
- Mortelmans, K., & Zeiger, E. (2000). The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.* 455, 29-60.
- Mortelmans, K., & Riccio, E. S. (2000). The bacterial tryptophan reverse mutation assay with *Escherichia coli* WP2. *Mutation research*, 455(1-2), 61–69. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(00\)00076-2](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(00)00076-2)
- Pessala, P., Schultz, E., Nakari, T., Joutti, A., & Herveb S. (2004). Evaluation of wastewater effluents by small-scale biotests and a fractionation procedure. *Ecotoxi. and Environ. Safety.* 59, 263–272.
- Rydén, E., Ekström, C., Hellmér, L., & Bolcsfoldi, G. (2000). Comparison of the sensitivities of Salmonella typhimurium strains TA102 and TA2638A to 16 mutagens, *Mutagenesis*, Volume 15, Issue 6, November 2000, Pages 495–502, <https://doi.org/10.1093/mutage/15.6.495>

- Rodríguez, E., Piccini, C., Sosa, V., Zunino, P.(2012). The use of the ames test as a tool for addressing problem-based learning in the microbiology lab. *J Microbiol Biol Educ.*:175-7. doi: 10.1128/jmbe.v13i2.421. PMID: 23653807; PMCID: PMC3577329.
- Prono, L. (2021). "Bruce Ames". *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/biography/Bruce-Ames>. Accessed 26 December 2021
- Sui, H., Kawakami, K., Sakurai, N., Hara, T., & Nohmi, T. (2009). Improvement and evaluation of high throughput fluctuation Ames test using 384-well plate with salmonella typhimurium TA100 and TA98. (n.d.). J-STAGE Home. https://www.jstage.jst.go.jp/article/jemsg/31/2/31_2_47/_article#citedby-wrap
- Velickova, N. (2019). "The Application and Benefits of Comet Assay in Biomonitoring Studies", *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research (IJSBAR)*, 46(2), pp. 8-12. Available at: <https://www.gssrr.org/index.php/JournalOfBasicAndApplied/article/view/9894>
- Velickova, N., & Milev, M. (2017). Micronucleus Assay as Genotoxicity Method to Determine the Human Health Risk. *Int. J. Curr. Res. Chem. Pharm. Sci.* 4(5): 31-35.
- Walker, G. (2020). A special issue dedicated to Dr. Bruce N. Ames: Introduction. (n.d.). PubMed Central (PMC).<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7055955/>
- Węgrzyn, G., & Czyż, A. (2003). Detection of mutagenic pollution of natural environment using microbiological assays. *Journ. of Appl. Microb.* 95, 1175-118.
- Williams, L. & Preston, J. (1983). Interim procedures for conducting the 'salmonella'/microsomal mutagenicity assay (ames test). U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., EPA/600/4-82/068 (NTIS PB88205380).