

Određivanje toksičnosti uzoraka sedimenta potoka Gorjak biotestovima in vitro

Šestak, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2009

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:311475>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveu ilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matemati ki fakultet
Biološki odsjek

Ivana Šestak

**ODRE IVANJE TOKSI NOSTI UZORAKA SEDIMENTA POTOKA
GORJAK BIOTESTOVIMA IN VITRO**

Diplomski rad

Zagreb, 2009. godina

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju, te priprema uzoraka u Laboratoriju za biogeokemiju organskih spojeva, Zavoda za istraživanje mora i okoliša, Instituta «Ruđer Bošković» u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Tvrтка Smitala. Istraživački dio ovog rada financiran je sredstvima te projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa RH, br. projekta 098-0982934-2745 (*Ekotoksikološko značenje ABC transportnih proteina u vodenih organizama*), te sredstvima projekta *Ispitivanje onečišćenja u sedimentu potoka Gorjak* (naručitelji: “APO d.o.o.” i “Hrvatske vode”).

Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. inž. biologije, smjer ekologija.

Najljepše zahvaljujem svom mentoru dr. sc. Tvrtku Smitalu na svesrdnoj pomoći tijekom izrade i osmišljavanja ovog diplomskog rada. Posebno hvala dipl. inž. Jovici Lončaru na objašnjenjima obrade podataka i pomoći pri provedbi testova, hvala dr. sc. Branki Pivčevići na brojnim korisnim informacijama. Hvala mojoj obitelji i rodbini, prijateljima i drugovima na podršci tijekom cijelog školovanja, a posebno hvala kolegicama Petri Mari, Petri Svobodi i Nini Marneti te drugim kolegama na nesebičnom pružanju znanja tijekom svih ovih godina.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

ODREĐIVANJE TOKSIČNOSTI UZORAKA SEDIMENTA POTOKA GORJAK BIOTESTOVIMA IN VITRO

Ivana Šestak

Institut „Ruđer Bošković“, Zavod za istraživanje mora i okoliša, Laboratorij za molekularnu ekotoksikologiju, Bijenička cesta 54, 10001 Zagreb

Brojna teško razgradiva organska zagađivala (eng. *Persistent Organic Pollutants*; POPs) poput polikloriranih dibenzo-*p*-dioksina i furana (PCDD/F), polikloriranih bifenila (PCB), polikloriranih naftalena (PCN) i policikličkih aromatskih ugljikovodika (PAH) izrazito su toksična. POP-ovi u okolišu najčešće dospijevaju industrijskim otpadnim vodama. Ispuštanjem nepročišćenih industrijskih otpadnih voda u potok Gorjak, tvrtke Pliva Hrvatska d.d. i Kvasac d.o.o. desetljeće ima predstavljaju problem za širu zajednicu. Cilj ovog istraživanja bio je odrediti razinu toksičnosti sedimenta potoka Gorjak pomoću dva biotesta: (1) testa kronične toksičnosti (inhibicija rasta zelene alge *Scenedesmus subspicatus*); te (2) EROD testa određivanja aktivnosti staninog detoksikacijskog sustava oksidaza miješanih funkcija. Testom kronične toksičnosti mjerili smo razmjernu vrijednost uzoraka sedimenta pri kojima je dosegnuta 50%-tna inhibicija rasta alge *S. subspicatus* (IC50) u odnosu na kontrolnu grupu. Odredili smo EC50 vrijednosti koje predstavljaju ekvivalentnu količinu sedimenta, te izrazili u jedinice toksičnosti (TJ) dobivene prema izrazu $TJ = 100 / EC50$. Izvođenjem EROD testa izrazili smo TCDD toksičnost ekvivalente (TCDD TEQ). Rezultati pokazuju visoku toksičnost sedimenta na svim lokacijama, uz izrazito visoke vrijednosti neposredno nakon ispusta industrijskih otpadnih voda spomenutih tvrtki.

(60 stranica, 20 slika, 8 tablica, 77 literaturna navoda, hrvatski jezik)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Marulićev trg 20/II, 10000 Zagreb

Ključne riječi: POP, biotestovi, kronična toksičnost, EROD, TCDD TEQ

Voditelj: Dr.sc.Tvrtko Smital

Suvoditelj: Dr. sc. Goran Klobučar, doc.

Ocjenjitelji: Dr. sc. Tvrtko Smital, znan. sur. IRB

Dr. sc. Goran Klobučar, doc.

Dr. sc. Mirjana Pavlica, prof.

Dr. sc. Željka Vidaković Cifrek, doc.

Rad prihvaćen: 06. 05. 2009.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

DETERMINATION OF SEDIMENT TOXICITY OF GORJAK STREAM BY BIOASSAYS IN VITRO

Ivana Šestak

Ruđer Bošković Institute, Division for Marine and Environmental Research, Laboratory for
Molecular Ecotoxicology, Bijenička cesta 54, 10001 Zagreb, Croatia

Numerous persistent organic pollutants (POPs), such as polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and furans (PCDD/F), polychlorinated biphenyls (PCBs), polychlorinated naphthalenes (PCNs) and polyaromatic hydrocarbons (PAHs) are highly toxic. POPs get into environment mostly by industrial wastewaters. By releasing untreated industrial wastewater into the Gorjak stream, Industries Pliva Hrvatska d.d. and Kvasac d.o.o. for decades represent a problem for local community. The purpose of this research was to determine ecotoxicity of Gorjak stream sediment samples, using two bioassays: (1) chronic toxicity test (growth inhibition test with green algae *Scenedesmus subspicatus*), and (2) EROD test for determination of the activity of the mixed function oxygenases cellular detoxification system. Using chronic toxicity test we measured sample dilutions at which 50% growth inhibition of the algae was achieved (IC₅₀) in comparison to the control group. EC₅₀ values representing corresponding amount of sediment were determined and toxicity units (TU) obtained recalculated by expression $TU = 100 / EC_{50}$. For the EROD bioassay we calculated TCDD toxicity equivalents (TCDD TEQ). Results showed high sediment toxicity at each location, with the highest values determined at location closest to the wastewater outlet of the above mentioned industrial facilities.

(60 pages, 20 figures, 8 tables, 77 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central biological library, Faculty of Science, Marulićev Trg 20/II, 10000 Zagreb

Key words: POPs, bioassays, chronic toxicity, EROD, TCDD TEQ

Supervisor: Dr. Tvrtko Smital

Co-supervisor: Dr. Goran Klobučar, Asst. Prof.

Reviewers: Dr. Tvrtko Smital

Dr. Goran Klobučar, Asst. Prof.

Dr. Mirjana Pavlica, Prof.

Dr. Željka Vidaković Cifrek, Asst. Prof.

Thesis accepted: 06. 05. 2009.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	
1.1. Ekotoksikologija i biomarkeri	1
1.2. Policikli ki aromatski ugljikovodici, poliklorirani dibenzodioksini, dibenzofurani i bifenili	4
1.2.1. Policikli ki aromatski ugljikovodici	4
1.2.2. Poliklorirani dibenzodioksini i dibenzofurani	7
1.2.3. Poliklorirani bifenili	8
1.3. Biološka aktivacija policikli kih aromatskih ugljikovodika, polikloriranih dibenzodioksina, dibenzofurana i bifenila	10
1.4. Detoksikacijski sustav oksidaza miješanih funkcija.....	12
1.4.1. Sustav citokrom-P450 ovisnih oksidaza miješanih funkcija	12
1.4.2. Indukcija sinteze citokroma-P450 i monooksidaza miješanih funkcija.....	13
1.4.3. EROD – test indukcije CYP1A.....	15
1.5. Odre ivanje kroni ne toksi nosti	17
1.5.1. Zelena alga <i>Selenastrum subspicatus</i>	17
1.5.2. Test inhibicije rasta jednostani ne alge vrste <i>Selenastrum subspicatus</i>	18
1.6. Cilj istraživanja.....	20
2. MATERIJALI I METODE	
2.1. Lokacija uzimanja uzoraka i uzorkovanje	21
2.2. Priprema uzoraka	23
2.3. Kemikalije i materijali	24
2.2.1. EROD – test indukcije CYP1A.....	25
2.2.2. Test inhibicije rasta jednostani ne alge vrsta <i>Selenastrum subspicatus</i>	26
2.3. Tijek testa EROD.....	32
2.4. Tijek testa inhibicije rasta jednostani ne alge vrsta <i>Selenastrum subspicatus</i>	34
3. REZULTATI	

3.1. EROD test.....	37
3.2.1. Kalibracijska krivulja rezorufina	39
3.2.2. Mjerenje proteina fluorescencijom	40
3.2.3. Izračun TCDD toksičnih ekvivalenata (TCDD TEQ).....	41
3.2. Test inhibicije rasta jednostanične alge vrste <i>Selenastrum subspicatus</i>	44
4. RASPRAVA	50
5. ZAKLJUČAK.....	54
6. LITERATURA	55

KRATICE

- AhR** - arilhidrokarbonski receptor, (eng. *Aryl Hydrocarbons Receptor*)
- ARNT** - Ah-receptorski nuklearni translokator
- EROD** - etoksiresorufin-*O*-deetilaza
- FAD** - flavin adenin dinukleotid
- hsp90** – „*heat-shock*“ protein
- POP** - teško razgradiva organska zagađivača (eng. **Persistent Organic Pollutants**; POPs)
- LD50** - doza testne tvari koja uzrokuje smrtnost za 50% životinja (eng. *lethal dose 50*)
- NOEL** - (eng. **No Observable Effect Level**), najveća koncentracija testne tvari koja ne uzrokuje statistički mjerljivi učinak na sustav
- PAH** – policiklički aromatski ugljikovodici (eng. **Polynuclear Aromatic Hydrocarbons**)
- PCB** - poliklorirani bifenili
- PLHC-1** – stanična linija ribljih hepatoma stanica (eng. *Poeciliopsis lucida hepatoma cell line*)
- OMF** - oksidaze miješanih funkcija
- PCDD** - poliklorirani dibenzo-*p*-dioksini
- PCDF** – poliklorirani dibenzofurani
- PCN** - poliklorirani naftaleni
- CYP** - citokrom-P450 ovisne monooksigenaze
- TCDD** - 2,3,7,8-tetraklordibenzo-*p*-dioksin
- TCDF** - 2,3,7,8-tetraklordibenzofuran
- XRE** - eng. **Xenobiotic Responsive Element**
- IC50** – razrjeđena uzorka koje je uzrokovalo 50%-tnu inhibiciju rasta testnog organizma (eng. *inhibitory 50 concentration/dilution*)
- LID** – najmanje razrjeđena uzorka koje je uzrokovalo manje od 5 % inhibicije rasta testnih organizama (eng. *lowest ineffective dilution*)
- LC50** – koncentracija testne tvari koja uzrokuje smrtnost za 50% životinja (eng. *lethal concentration 50*)
- TJ** – toksične jedinice
- DMSO** - dimetil-sulfoksid
- YES** – eng. **Yeast Estrogen Screen**
- FBS** – fetalni goveji serum (eng. **Fetal Bovine Serum**)
- PBS** – fosfatni pufer (eng. **Phosphate Buffered Saline**)
- BSA** – goveji serumski albumin (eng. **Bovine Serum Albumin**)
- EC_x** - koncentracija testnog uzorka koja rezultira redukcijom *x* postotka specifične stope rasta u odnosu na kontrolu
- DMEM** – eng. **Dulbecco's Modified Eagle Media**
- MEM** – minimalni esencijalni medij
- TEF** – faktor toksične jednakosti (eng. **Toxicity Equivalency Factor**)
- TEQ** – toksični ekvivalent (eng. **Toxicity Equivalent**)
- FEL-TEQ** – toksični ekvivalenti na zadanoj razini u tvari (eng. **Fixed-Effect-Level Toxicity Equivalents**)
- S-EQ/L** – sedimentni ekvivalenti po litri

PER – procjena ekološkog rizika

1. UVOD

1.1. Ekotoksikologija i biomarkeri

Svakim danom u svijetu je prisutan sve veći broj tzv. ksenobiotika. Te egzogene, od prirode nepostojane, aktivne tvari su stvorene „nove kemijske tvari“, što su neprepoznatljive i/ili u energetskom ili strukturnom smislu neiskoristive za živa bića. Velik broj ksenobiotika zbog toga se sporo razgrađuje i posljedično gomila u okolišu (Kurelec, 1982).

Znanost koja prepoznaje i procjenjuje utjecaj ksenobiotika na ekosustav, te granice opterećenja koje neka životna zajednica može podnijeti bez poremećaja, naziva se ekotoksikologija. Rizici na razini ekosustava mogu biti procijenjeni istovremenom upotrebom strukturalnih (raznolikost, međuzavisnost, rasprostranjenost) i funkcionalnih (produkcija, potrošnja, kretanje hrane i energije, evolucija) parametara ekosustava. Toksične reakcije koje mjeri ekotoksikologija su patološki što raniji odgovori na biokemijskoj, imunološkoj, fiziološkoj ili organizmičkoj razini, tj. na razini tzv. biomarkera. Testiranje neke kemijske tvari na toksičnost odvija se u laboratoriju. U takvoj procjeni toksičnosti valja razlikovati akutnu, subakutnu i procjenu kronične toksičnosti.

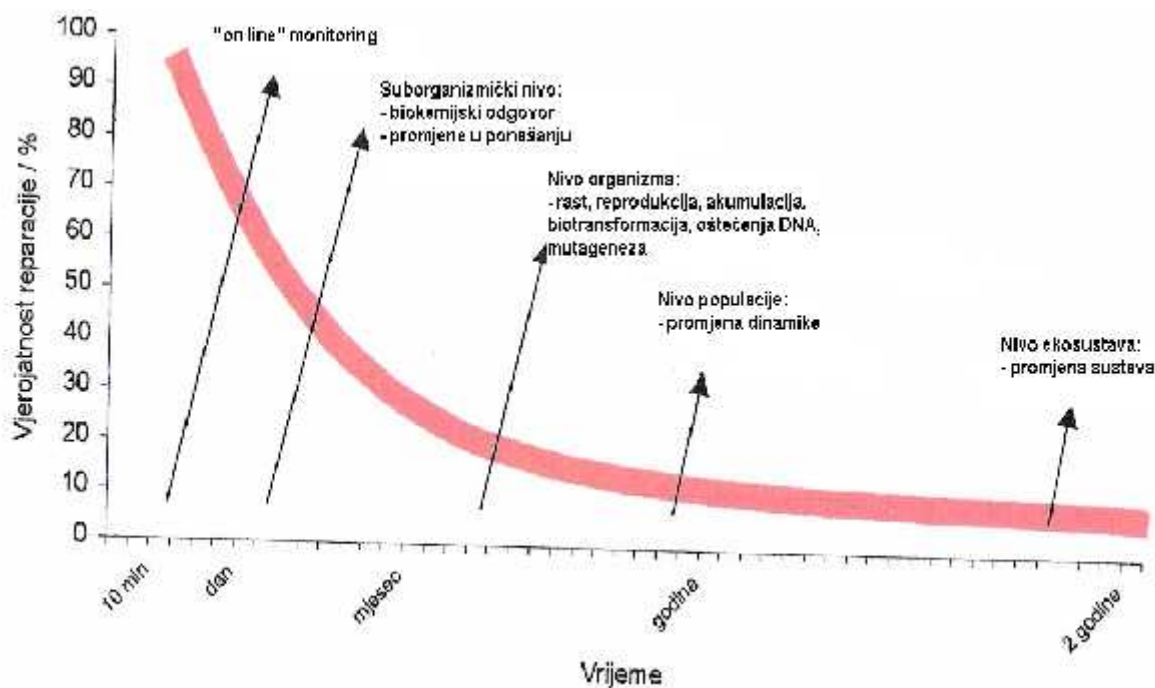
Akutna se toksičnost određuje na test-životinjama, a jedno od osnovnih mjerila toksičnosti (eng. *end-point*) jest LD50 ili LC50. Procjena subakutne toksičnosti nema jedinstveno mjerilo, a štetnost se može zapažati od promjene u ponašanju do, na pr., promjena na koži. Ključno mjerilo u tom slučaju je tzv. NOEL (eng. *No Observable Effect Level*) koncentracija testne tvari. Takav NOEL utvrđen na, na pr., glodavcima služi kao temelj za ekstrapolaciju opažene LD50 doze na uvijek primjenom arbitrarnog multiplikativnog faktora, tzv. sigurnosnog faktora. Uobičajeno, taj je faktor 100, od čega je 10 za među vrstama (eng. *interspecies*), a 10 za unutarvrstnu (eng. *intraspecies*) varijaciju. Svrha je ove procjene da definiše „sigurnosnu razinu“, pa se zbog ugrađene eksperimentalne nesigurnosti arbitrarni faktor često uvećava na 1000.

Procjena kronične toksičnosti često se vrši za toksične tvari koje uzrokuju veoma ozbiljne štetne učinke (rak, primjerice) pa je potrebno istražiti i razine izlaganja kod kojih postoji i najmanji rizik. U tom slučaju se najčešće koriste tzv. biotestovi (eng. *bioassay*), pri čemu se testira vrlo širok raspon doza s malim brojem pokusnih životinja. Tako dobivene rezultate valja ekstrapolirati na razinu izloženosti, npr. uvijek, koja će predstavljati rizik od npr. pojave jednog slučaja raka na milijun izloženih ljudi. Umjesto „sigurnosne razine“, tu ćemo

imati „razinu prihvatljivog rizika“, a umjesto višestrukog mjerila imamo jednostruko (eng. *single end-point*) – rak.

Okolišni ili ekotoksikološki biomarkeri su rane promjene na molekularnoj ili fiziološkoj razini uzrokovane fizikalnim ili kemijskim zagađivačima (Kurelec, 2000). Danas su biomarkeri nezaobilazni sastavni dio procesa procjene okolišnog rizika i svakog programa za praćenje (monitoring) okoliša. Oni uspješno nadopunjuju dosadašnji kemijski monitoring okoliša i biote (biomonitoring), koji najčešće nisu davali odgovor na pitanje rizika za eksponiranu populaciju, jer se razina ksenobiotika u okolišu ili tkivu najčešće nije mogla korelirati na doza-odgovor na in situ simptomima zapaženim u prirodi. Stvarnu veličinu izloženosti možemo mjeriti jedino pokazateljima koji mjere koncentraciju ksenobiotika na ciljnoj molekuli, npr. molekuli DNA. U slučaju izloženosti policikličkim aromatskim ugljikovodicima (eng. **P**olynuclear **A**romatic **H**ydrocarbons, PAH) i polikloriranim bifenilima (PCB), biomarker izloženosti bit će indukcija aktivnosti citokrom-P450 oksidaza miješanih funkcija (OMF), jer ta će indukcija biti siguran pokazatelj da su ksenobiotici dosegli svoju ciljanu molekulu – Ah-receptor (Kurelec, 2000).

Za učinkovitu zaštitu cjelokupnih sustava potrebno je pravodobno detektirati pojavu promjena u njima. Brzina pojave promjene uzrokovanih nekim zagađivačima, unijetim u ekološki sustav u subletalnoj količini, koje se mogu detektirati, opada s razinom ekološkog sustava, dok se istovremeno smanjuje vjerojatnost njegovog popravka (Slika 1).



Slika 1. Opadanje vjerojatnosti uspješnog popravka ekološkog sustava s povećanjem vremena proteklog od unosa subletalne količine zagađivača.

Vjerojatnost da će neka doza uzrokovati promjene na razini ekološkog sustava isto je jednaka vjerojatnosti da će isti ekološki sustav, bilo puferskim mehanizmom, bilo mehanizmima detoksikacije, eliminirati utjecaj zagađivača na njegovu strukturu i funkcije. Monitoring populacija i rezultati koji su dobiveni na taj način, izvrstan su pokazatelj promjena u strukturi ekosustava. Međutim, oni ne daju odgovor na pitanja vezana uz uzrok tih promjena. Osim toga, prema Slici 1, kada se uočavaju promjene na tako visokim razinama ekološkog sustava kao što je populacija neke vrste, bitno su smanjene mogućnosti sanacija posljedica (Hansen, 1995).

Glavni zadatak procjene ekološkog rizika (PER) je ustanoviti prioritete i sprovesti regulativne mjere na znanstvenoj osnovi. Procjena ekološkog rizika je definirana kao postupak određivanja vjerojatnosti da se dogodi neka ekološka promjena kao rezultat djelovanja jednog ili više stresora. Razinu izloženosti okolišnih organizama stresoru mjerimo koncentracijom ksenobiotika na njihovim ciljanim molekulama u organizmima (mjerenje biološkog uinka). Samo takva mjerenja, za razliku od mjerenja koncentracije ksenobiotika u okolišu, ili u tkivu izloženih organizama, mogu biti biološki relevantna (Kurelec, 1997).

1.2. Policikli ki aromatski ugljikovodici, poliklorirani dibenzodioksini, dibenzofurani i bifenili

Unato zabranama i smanjenoj emisiji nekih teško razgradivih organskih zagađivača (eng. *Persistent Organic Pollutants*; POPs) (npr. PCB-ova u zadnjih par desetljeća), oni još uvijek imaju jednako veliku važnost u okolišu, a njihova okolišna kemija i ekotoksikologija područje je sve naprednijeg i šireg istraživanja. Visoke koncentracije pojedinih POPs-ova posljedice su njihovog potencijala za dalekosežnim zračnim rasprostiranjem u udaljena područja, bioakumulacije zbog općenito visoke hidrofobnosti i relativno visoke otpornosti raspadanju u okolišnim uvjetima. Brojni POPs-ovi, poput polikloriranih dibenzo-*p*-dioksina i furana (PCDD/F), PCB-a, polikloriranih naftalena (PCN), ali i PAH-ova su izrazito toksični (dibenzodioksini su najtoksičnije tvari antropogenog podrijetla) (Kutuzovi i Hackenberger, 1999), uključuju kancerogene i utječu na reproduktivni sustav, atrofiju timusa, gubitak tjelesne mase i akutnu letalnost kod sisavaca. Smatra se da su mnogi od ovih utjecaj posredovani preko arilhidrokarbonskog receptora (AhR). Vežanjem na AhR, dioksini, PCB-ovi, i/ili PAH-ovi pokreću kaskadu stanih događaja koja vodi do pojačane ekspresije citokroma-P4501A (CYP1A) gena i s tim povezane katalitičke aktivnosti 7-etoksiresorufin-*O*-deetilaze (Brack i sur., 2000).

1.2.1. Policikli ki aromatski ugljikovodici

Još sedamdesetih godina velika se pažnja posvećivala utvrđivanju podrijetla, prisutnosti i mehanizmima djelovanja policikličkih aromatskih ugljikovodika, budući da je to skupina organskih spojeva koja uključuje i tvari s kancerogenim djelovanjem, pa je stoga važna kako po kriteriju njihove štetnosti za okoliš, tako i po kriteriju štetnosti po zdravlje ljudi (Stegeman, 1981).

Svaka prirodna voda sadrži određenu količinu prirodnih PAH-ova, čak i u područjima znatno udaljenim od antropogenog utjecaja (Windsor i Hites, 1979). PAH-ovi su nađeni u atmosferskim česticama (Prah i sur., 1984), slatkoj i morskoj vodi, vodenim organizmima (Gardner i sur., 1979; Karickhoff i Morris, 1985), različitim sedimentima i u tlu (Hites i sur., 1980). Jedan od najvažnijih predstavnika PAH-ova, benz[*a*]piren, pronađen je u sedimentu, vodi i morskim organizmima na zapadnoj obali Grenlanda (Stich i Dunn, 1980) i Tihom

oceanu (Niaussat i Auger, 1970), dakle na lokacijama vrlo udaljenim od industrijskog zagaenja.

Prirodni izvori PAH-ova su šumski požari (Blumer, 1976), diageneza u sedimentima (Tan i Heit, 1981), geološke pojave kao što su vulkani, gejziri i sl. (Kaden i sur., 1979), i metabolizam živih organizama (Neff, 1979).


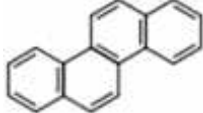
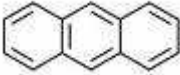

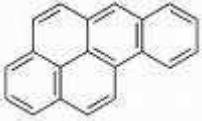

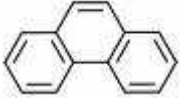
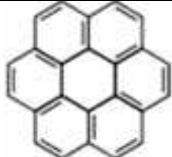
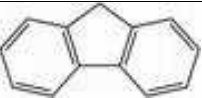
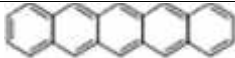
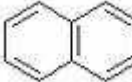
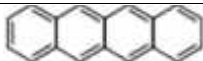
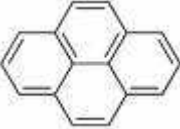

Nepostojanje veih koncentracija tih tvari u prirodi pokazuje da one bivaju metabolizirane unutar okoliša te da zateeno stanje predstavlja zapravo stanje ravnoteže izmeu ulaska (nastanka) i (bio)degradacije PAH-ova u okolišu (Lee i sur., 1978).

Glavni izvori kancerogenih policikličkih aromatskih ugljikovodika, kao i velikog broja drugih spojeva (pesticidi, teški metali, poliklorirani bifenili, dibenzodioksini, dibenzofurani, naftni derivati, detergents i dr.) antropogene su prirode (Hites i sur., 1980).

PAH-ovi nastaju uglavnom kao nusprodukti, meuproducti ili krajnji produkti različitih tehnoloških postupaka, kao npr. pri dobivanju acetilena iz prirodnog plina, pri nastajanju benzena pirolizom kerozina, pri proizvodnji toluena i ostalih organskih otapala, pri proizvodnji drvenog ugljena pirolizom drveta, pri pretvaranju ugljena u plin, pri proizvodnji sintetskog alkohola i preradi nafte, pri sagorijevanju drveta, pri proizvodnji koksa, pri transportu i spaljivanju smea. Ostali izvori su ispusti i ispusi termoelektrana, asfaltnih baza, rafinerija itd. (Mix, 1984).

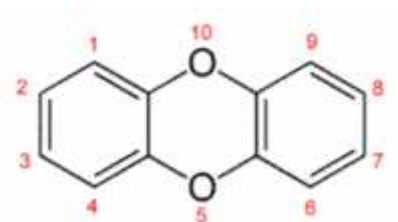
PAH-ovi ulaze u vodeni okoliš na razne načine: ispiranjem površina oborinskim vodama, otpadnim vodama iz industrije (Harrison i sur., 1978), otjecanjem gradskih površinskih voda nakon padavina, otpadnim vodama domaćinstava (Barrick, 1982) i izljevima nafte, koja veliki dio varira od ispuštanja goriva u morima do velikih izljeva u slučaju havarija naftom natovarenih tankera (Kurelec i sur., 1977; Coleman i sur., 1984; Hellou i Payne, 1987). U Tablici 1. su prikazani neki PAH-ovi važni za ekotoksikološka istraživanja.

Tablica 1. Pregled nekih policikličkih aromatskih ugljikovodika važnih za zagađenje okoliša i ekotoksikološka istraživanja (PAH factsheet, 2009; Zavod za primijenjenu kemiju i ekologiju, 2009; Gestis, 2009; Sigma Aldrich, 2009).

Acenaften		Krizen	
Antracen		Ovalen	
Benz[a]piren		Koranulen	
Fenantren		Koronen	
Fluoren		Pentacen	
Naftalen		Tetracen (naftacen)	
Piren		Trifenilen	

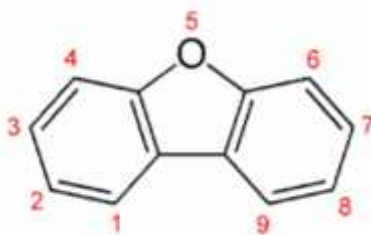
1.2.2. Poliklorirani dibenzodioksini i dibenzofurani

Za poliklorirane dibenzodioksine (PCDD) često se u literaturi upotrebljava kraći naziv: dioksini. To nije posve točno jer je dioksin naziv za relativno jednostavan heterociklički spoj, 1,4-dioksin ili p-dioksin. Ipak u svijetu je naziv dioksin široko prihvaćen kao sinonim za 2,3,7,8-tetraklor-dibenzo-dioksin (TCDD) (Baird, 1995), dok se dioksinima nazivaju svi spojevi takve tricikličke, dibenzodioksinске strukture s dioksinским prstenom između dva benzenska (kongeneri) (Slika 2).



Slika 2. Strukturna formula dibenzodioksina (Ontario, 2009).

Vrlo sličnu strukturu dioksinima imaju dibenzofurani (DF) kod kojih se na mjestu centralnog prstena, umjesto dioksina nalazi furan (Slika 3). Postoji 75 različitih kloriranih dioksina i 135 kloriranih dibenzofurana. Svi dibenzodioksini i dibenzofurani su planarne molekule.



Slika 3. Strukturna formula dibenzofurana (Ontario, 2009).

činjenica koja ovu grupu kemijskih spojeva čini izuzetno zanimljivom sa stajališta ekotoksikologije je da se niti jedan od ovih spojeva ne proizvodi ciljano, već se svi javljaju ili kao neželjeni nusprodukti ili kao intermedijeri u različitim kemijsko-tehnološkim postupcima. Jedan od značajnijih kemijsko-tehnoloških postupaka pri kojem nastaje znatna količina PCDD je sinteza kloriranih fenola (kod proizvodnje npr. pesticida). Drugi važni izvori su spalionice i ložionice (Sagunski i Perger, 1994). Ukoliko se u spalionici spaljuje drveni materijal

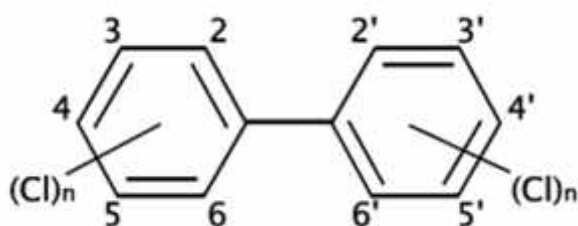
prethodno tretiran zaštitnim sredstvom na bazi pentaklorfenola (PCP), ili bilo koja druga tvar koja sadrži neki klorirani fenol, pod utjecajem povišene temperature, dovoljno velike za pobuđivanje reakcije, ali nedovoljno visoke za potpuno izgaranje, određeni dio će, uz eliminaciju klorovodika, stvarati dibenzodioksine.

Izvori PCDF-a vezani su za proizvodnju ili preradu PCB-a. Naime, jako zagrijavanje PCB-a uz prisutstvo kisika može dovesti do sinteze dibenzofurana eliminiranjem po jednog supstituenta sa svakog benzenskog prstena u orto položaju u odnosu na bifenilnu vezu.

Može se reći i da su najvažniji izvori dibenzodioksina i dibenzofurana spalionice otpada, te kemijski i metalurški pogoni. Ne mogu se zanemariti ni emisije ovih tvari ispušnim automobilskim plinovima, plinovima iz kotlovnica, itd. Svako mjesto na kojem se nešto spaljuje ili na kojem se radi pod povećanom temperaturom, uvjetno rečeno, predstavlja mogući izvor različitih PCDD i PCDF (Mocarelli i sur., 1991).

1.2.3. Poliklorirani bifenili

Poliklorirani bifenili (PCB) naziv su za grupu industrijskih organoklorinih kemijskih spojeva koji se sastoje od dva međusobno spojena fenilna prstena (Slika 4). Postoji 209 različitih kongenera PCB-a. Ovi spojevi svoj najveći značaj za okoliš dobili su tijekom osamdesetih i devedesetih godina. Od kraja pedesetih godina do danas proizvedeno je preko milijun tona PCB-a (Baird, 1995).



Slika 4. Strukturna formula bifenila (SpringerLink, 2009).

PCB posjeduju veliku fizikalno kemijsku stabilnost tako da zadržavaju uljnu konzistenciju i pri vrlo visokim temperaturama. Osim toga, PCB su otporni na otvoreni plamen i provode vrlo dobro elektricitet. Zbog tih svojstava PCB-ji su se upotrebljavali u mnogobrojnim

otvorenim i zatvorenim sustavima. Trafo-stanice, hidrauli ni pogoni, rashladni ure aji itd., samo su neki od primjera široke primjene ovih tvari.

Zanimljivo je da produkt sinteze PCB nikada nije bio jedan jedini spoj, ve uvijek miješavina nekoliko razli itih PCB-ja. Na osnovi namjene sintetizirale su se više ili manje klorirane smjese, pri emu se viskoznost i gusto a pove avala s pove anjem koli ine klora (Koss, 1994).

U okoliš PCB-ji dospijevaju industrijskim otpadnim vodama prilikom remonta, nesre ama pri havarijama trafo-stanica, procije ivanjem s otpada na koji su ba eni transformatori itd. Ve e zna enje PCB-ji imaju za stvaranje dibenzofurana. Naime, gorenjem pri temperaturama nedovoljnim za potpuno izgaranje, od polikloriranih bifenila lako nastaju poliklorirani dibenzofurani, spojevi daleko toksi njih karakteristika. Zbog toga sve navedene izvore PCDD i PCDF možemo smatrati i izvorima PCB-a, i obrnuto (Kutuzovi Hackenberger, 1999).

1.3. Biološka aktivacija policikličkih aromatskih ugljikovodika, polikloriranih dibenzodioksina, dibenzofurana i bifenila

Mikrosomi u endoplazmatskom retikulumu nekih stanica mogu pored oksidacije spojeva endogenog porijekla (hormoni, vitamini, masne kiseline), oksidirati i različite egzogene tvari (ksenobiotike), među kojima ima aromatskih ugljikovodika i njihovih derivata. Biološke oksidacije općenito obuhvaćaju dvije kategorije reakcija: reakcije dehidrogenacije, gdje je primatelj cijela molekula kisika i/ili druga molekula karakteristična za druge anaerobne organizme, i reakcije adicije kisika, pri kojima se može adirati cijela molekula kisika (posredovanjem enzima dehidrogenaze) ili pola molekule kisika (posredovanjem enzima monooksigenaza ili hidroksilaza). Za biotransformaciju ksenobiotika najznačajnije su adicije kisika.

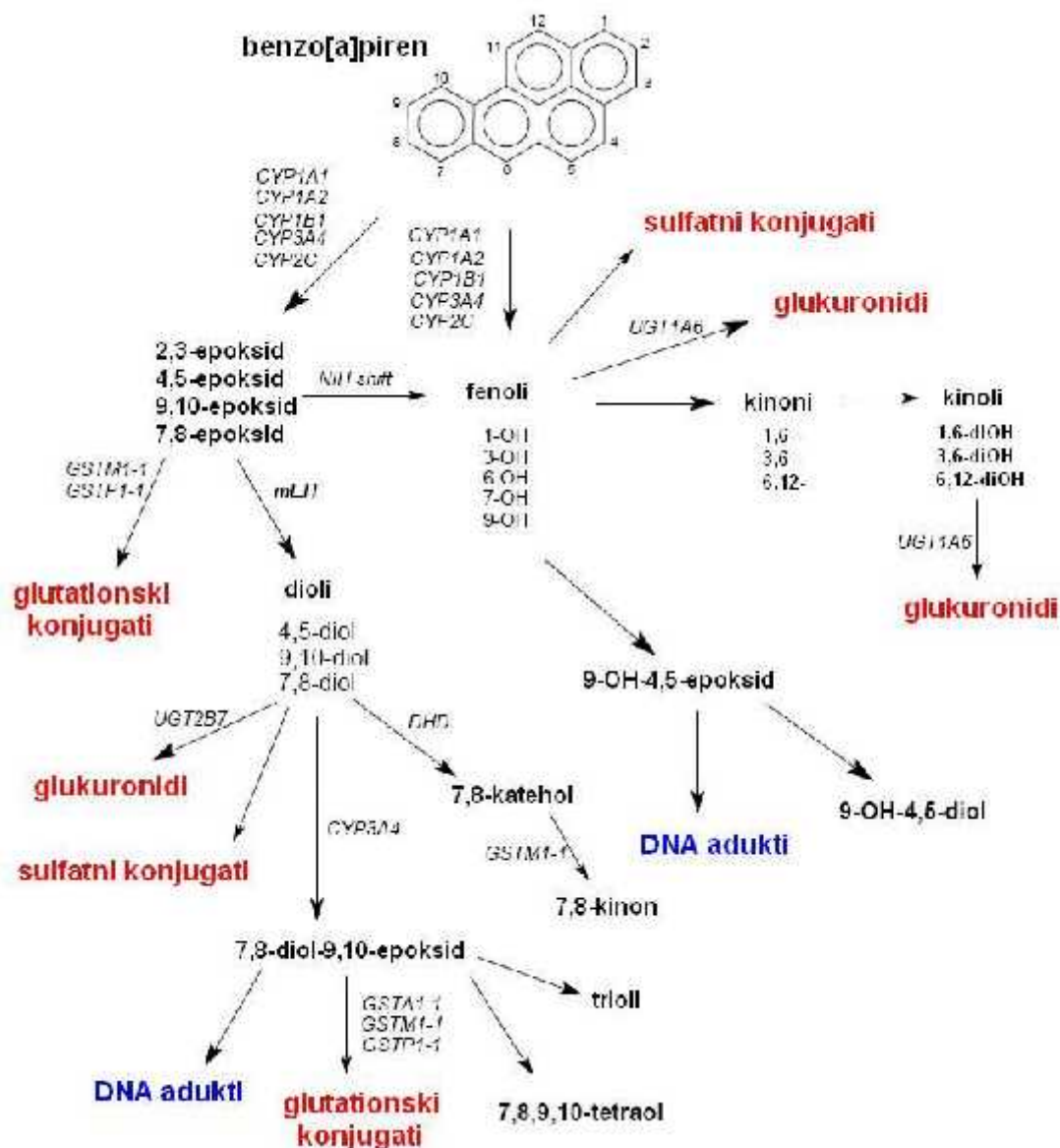
Reakcije monooksigenaza predstavljaju prvi stupanj u oksidaciji ksenobiotika viših organizama. U tom se koraku ksenobiotici oksidiraju uz pomoć citokroma-P450, hemoproteina koji reagira s molekularnim kisikom aktivirajući ga kako bi se vezao za supstrat.

Oksidaze miješanih funkcija (OMF) su enzimatski sustav ovisan o citokromu-P450 kojim se uspješno detoksiciraju mnoge strane tvari, ali se druge nažalost pretvaraju u me uprodukte (metabolite) koji su toksični, mutageni ili kancerogeni. Enzimska aktivnost OMF-a ukazuje na zdravstveno stanje organizama, genetska oštećenja i veličinu bioakumulacije (Kurelec, 1982).

Prijenosom jednog atoma kisika iz molekule kisika na supstrat, citokrom-P450 ovisne monooksigenaze (CYP) kataliziraju reakcije epoksidacije, hidroksilacije i dealkilacije.

Daljnji metabolizam oksidiranih produkata uključuje ponovnu oksidaciju pomoću istog sustava, hidrataciju epoksid metabolita u dihidrodiole (Yang i sur., 1978) te daljnju oksidaciju do diol epoksida (Yang i sur., 1976; Thakker i sur., 1977; 1978) ili konjugaciju oksidiranih metabolita u vodotopive konjugate s glutationom (Hesse i Jernstrom, 1984), glukuronidom ili sulfatom (James, 1986). Diolepoksid mnogo je aktivniji od aren oksida i smatra se kancerogenom, tj. molekulom odgovornom za pojavu raka (Kapitulnik i sur., 1978) (Slika 5). Poznato je da neke od ovih reakcija stvaraju metaboličke produkte koji se kovalentno vežu na

DNA i RNA (Lutz, 1979; Ahokas i sur., 1979; Farber i Sarma, 1986), pokazuju i razliitu biološku aktivnost uključujući i citotoksičnost (Wislocki i sur., 1976), mutagenost (Bartsch i sur., 1982), transformaciju stanica *in vitro* (Kapitulnik i sur., 1978) kao i indukciju raka u eksperimentalnim organizmima (Kutuzovi i Hackenberger, 1999).



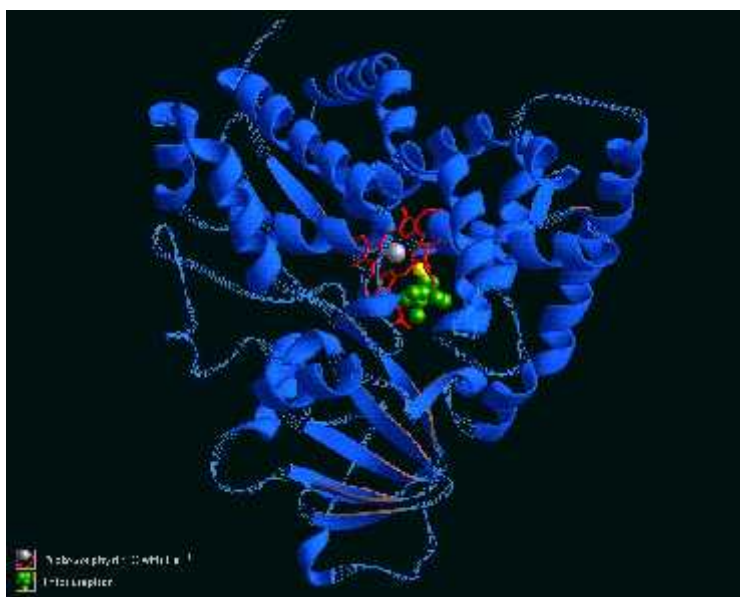
Slika 5. Primjer metabolizma benz[a]pirena preko oksidaza miješanih funkcija (Toksikanti u hrani, 2009).

1.4. Detoksikacijski sustav oksidaza miješanih funkcija

1.4.1. Sustav citokrom-P450 ovisnih oksidaza miješanih funkcija

Monooksigenacije ksenobiotika katalizirane su sustavom citokrom-P450 ovisnih monooksigenaza ili monooksigenazama koje sadrže flavin adenin dinukleotid (FAD). Oba sustava nalaze se u endoplazmatskom retikulumu stanica poglavito jetre, ali i drugih tkiva.

Citokrom-P450 otkriven je 1958. u endoplazmatskom retikulumu hepatocita sisavaca. To je atipičan citokrom tipa b s protohemom kao prostetičkom skupinom (Slika 6). Citokrom-P450, kao i drugi hemoproteini ima karakterističan apsorpcijski spektar u vidljivom položaju. Dodavanje različitih organskih i anorganskih liganda rezultira promjenom spektra.



Slika 6. Željezo u protohemu citokroma P450 (Smith College, 2009).

Razlikuju se tri osnovna tipa liganda prema na inu na koji mijenjaju apsorpcijski spektar citokroma-P450. Najvažniji diferencijalni spektar oksidiranog citokroma-P450 i njegovi ligandi tipa I, s apsorpcijskim maksimumom oko 385-390 nm i minimumom oko 420 nm. Ligandi ovog tipa su različitog kemijskog sastava i u njih su uključeni lijekovi, okolišna zagađivača, insekticidi, itd. Ligandi tipa II uzrokuju vrh kompleksa pri 420-435 nm i minimum pri 390-410 nm. Svaki ovakav ligand je često inhibitor aktivnosti monooksigenaza ovisnim o

citokromu-P450. Najpoznatiji ligand tipa III je etil-izocijanid. Različite citokrom-P450 monooksigenaze su konstitutivni enzimi koji služe posebno u metabolizmu steroida, lijekova i ksenobiotika.

Svi tipovi citokroma-P450 su polipeptidi s oko 500 aminokiselinskih ostataka i s hemom vezanim za sekvencu od dvadeset i dvije aminokiseline bogatu cisteinom u blizini C-terminalnog kraja. Geni sa sekvencijskom podudarnosti većinom od 40% svrstani su u jednu obitelj. Do sada je opisano sedamdeset i četiri takvih obitelji (*Familiae*) (Anaesthetist.com, 2009). Unificirana nomenklatura propisana 1991. godine uzima za obvezu kraticu „CYP“ za nadobitelj (*superfamiliae*) i sugerira punočitljivije arapske brojke za označavanje obitelji i podobitelji (npr. gen CYP2E1).

Citokrom-P450 reduktaza i citokrom-P450 pronađeni su u mikrosomima jetre gotovo svih kralježnjaka. U nižih kralježnjaka veliki interes pridaje se ovim enzimima kod riba pogotovo zbog njihovog ekotoksikološkog značaja. Prvi nalaz citokroma-P450 kod riba uslijedio je kod pastrve *Salmo gairderi* (Conney, 1967). Sustav monooksigenaza s citokromom-P450 otkriven je kod mnogih insekata. Većina citokroma-P450 beskralježnjaka i riba je uspoređljiva s enzimima sisavaca samo u njihovim karakteristikama inducibilnosti ili inhibicije (Stegeman i Lech, 1991).

U kralježnjaka najveći dio citokroma-P450 nalazi se u jetri koja je i najaktivnija u monooksigenaciji ksenobiotika. Iako je kod insekata glavno mjesto nalaza citokroma-P450 crijevo, on se može naći i u masnom tijelu, integumentu i drugim organima. Osim uloge u metaboliziranju ksenobiotika, kod insekata citokrom-P450 sustav ima i druge važne uloge u metaboliziranju endogenih tvari: epoksidacija juvenilnog hormona u *corpora allata*, hidroksilacija ekdisona u masnom tijelu, inaktivacija ekdisteroida, biosinteza nekih feromona i metabolizam insekticida (Hodgson, 1983; Collins, 1985; Feyereisen i Farnsworth, 1985; Riviere i Cabanne, 1987).

1.4.2. Indukcija sinteze citokroma-P450 i monooksidaza miješanih funkcija

Aktivnost OMF-a može se u nazovnosti ksenobiotika uvećati (inducirati). Kemijske osobine i farmakološka aktivnost poznatih tvari koje induciraju oksigenaze miješanih funkcija su različite i njihova je jedina zajednička osobina visoka topljivost u mastima. Indukcija može biti izazvana gotovo svakim supstratom ovih enzima. Ona ovisi o afinitetu supstrata za

citokrom-P450 (i ostalih mikrosomskih enzima), dozi supstrata, u estalosti primjene kao i brzini njegovog metabolizma i oslobađanja s enzimima (Payne, 1984).

Induceri monooksigenaza mogu se najbolje podijeliti na dva tipa: tip fenobarbitala (u koji spadaju mnoge kemikalije, posebno lijekovi i insekticidi) i tip 3-metilkolantrena (u koji spadaju policiklički ugljikovodici kao npr. benz[*a*]piren). Mnogi induceri moraju se primjeniti u relativno visokim dozama da bi bili učinkoviti. Velika doza obično se kreće od više od 10 mg/kg do preko 200 mg/kg. Danas najbolji poznati inducer je TCDD koji inducira već pri koncentraciji od 1 µg/kg.

Pri djelovanju inducera fenobarbitalnog tipa dolazi do snažne proliferacije glatkog endoplazmatskog retikuluma kao i do snažnog povećanja sadržaja citokroma-P450 u hepatocitima. Nasuprot tome, djelovanje inducera metilkolantrenskog tipa ne uzrokuje proliferaciju glatkog endoplazmatskog retikuluma, iako također uzrokuje povećanje citokroma-P450.

Poznato je da se u citoplazmi nalazi Ah-receptor (eng. *Aryl Hydrocarbon Receptor*) vezan na „heat-shock“ protein *hsp90* (Probst i sur., 1993). Po dospjevu ksenobiotika u citoplazmu on se veže (ukoliko po grafi i odgovara) za Ah-receptor pri čemu se on otpušta sa *hsp90*. Kompleks ksenobiotika (inducera) i Ah-receptora veže se na Ah-receptorski nuklearni translokator (ARNT), te dospijeva u staničnu jezgru u kojoj se veže na XRE regiju na DNA (eng. *Xenobiotic Responsive Element*). Vezanje kompleksa inducera s Ah-receptorom na XRE inducira transkripciju susjednih strukturnih gena. U kontrolnom području Ah-genske baterije postoje dodatni elementi koji utječu na kvalitetu indukcije. Naime, zbog tih kontrolnih elemenata, svaki induktor metilkolantrenskog tipa ne inducira jednako jako transkripciju svih enzima kompleksa Ah-gena.

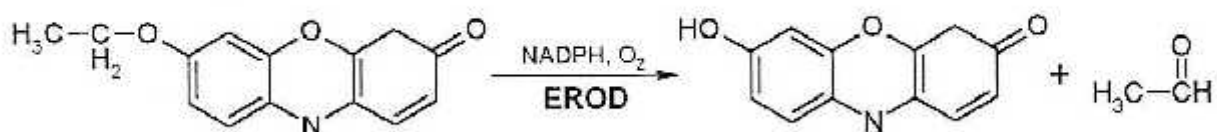
Ah-receptor posjeduje vezno mjesto za velike planarne, hidrofobne ligande. S obzirom na veličinu ligandi se mogu podijeliti u dvije skupine. Još nije sasvim jasno posjeduje li Ah-receptor dva vezna mjesta ili postoje dvije subpopulacije Ah-receptora.

Na manje vezno mjesto idealno odgovaraju PCDD i PCDF, pogotovo njihovi tetraklorini kongeneri (2,3,7,8-TCDD i 2,3,7,8-TCDF). Premještanjem substituenata (klora) na druga nelateralna mjesta u molekuli smanjuje se afinitet vezanja za Ah-receptor (Koss, 1994).

1.4.3. EROD – test indukcije CYP1A

Za istraživanje enzimskog sustava OMF prisutnog u mikrosomima jetre kralježnjaka bilo je potrebno razviti osjetljive i odgovarajuće biokemijske metode za određivanje enzimske aktivnosti. Većina od njih zasniva se na inkubaciji specifičnog supstrata s enzimom, odjeljivanju metabolita (obično ulativnih mutagena) iz inkubacijskog medija i mjerenju njegove količine pomoću spektrofotometrijskih te brzih, direktnih fluorimetrijskih metoda za mjerenje enzimske aktivnosti.

Jedna od takvih je i metoda mjerenja aktivnosti enzima etoksirezorufin-*O*-deetilaze (EROD) (Burke i Mayer, 1974). Osnovna svojstva EROD su brzina, osjetljivost i iznad svega jednostavnost određivanja aktivnosti monooksigenaza u mikrosomima jetre i drugih tkiva. Metoda je zasnovana na deetilaciji 7-etoksirezorufina u produkt rezorufin jake fluorescencije (Klotz i sur., 1984) (Slika 7).



Slika 7. Oksidacija 7-etoksirezorufina posredstvom 7-etoksirezorufin-*O*-deetilaze (EROD).

Razni spojevi za koje je utvrđeno da izazivaju indukciju monooksigenaza isto tako utječu i na aktivnost etoksirezorufin-*O*-deetilaze. Aktivnost EROD može se stoga koristiti kao pokazatelj aktivnosti OMF ovisnih o citokromu-P448 (Rifkind i Muschick, 1983). Ovo svojstvo čini mjerenje EROD aktivnosti vrijednim za kvalitativnu procjenu aktivnosti OMF induciranih izlaganjem organizama brojnim okolišnim zagađivačima (Payne i sur., 1987).

CYP1A1 i 1A2 glavni su izoenzimi uključeni u metabolizam PAH-ova u vodenim kralježnjaka. Osnovno svojstvo CYP1A enzima jest njihova inducibilnost uslijed izlaganja organskim zagađivačima iz skupine PAH-ova. Indukcija se odvija putem spomenutog citosolnog Ah-receptora koji uslijed vezanja liganda odlazi u jezgru stanice i dovodi do pojačane transkripcije CYP1A gena. Povećana količina CYP1A enzima prati se mjerenjem enzimske aktivnosti koristeći 7-etoksirezorufin kao supstrat. Reakcijom dealkilacije koju

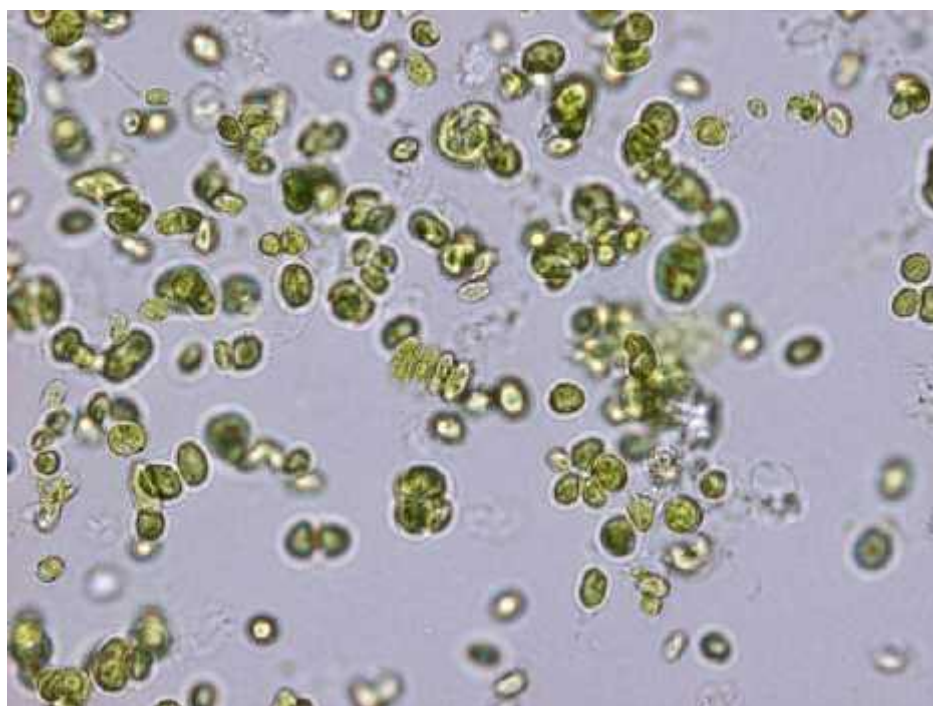
katalizira CYP1A (EROD), supstrat se prevodi u fluorescentni produkt rezorufin koji se mjeri fluorimetrijski na specifičnim ekscitacijskim i emisijskim valnim duljinama (535/590 nm).

Indukcijski potencijal okolišnih uzoraka može se pratiti *in vivo*, intraperitonealnim tretiranjem modelnih organizama. Nakon 3-4 dana iz jedinki se izolira postmitohondrijalna frakcija hepatocita u kojoj se odredi aktivnost EROD-a. Mjerenje induksijskog potencijala u *in vitro* uvjetima temelji se na izlaganju stanica u primarnoj ili trajnoj kulturi. Za mjerenje induksijskog potencijala okolišnih uzoraka u ekotoksikologiji najčešće korištena stanica je PLHC-1. PLHC-1 stanice riblje su hepatoma stanice koje su zadržale mehanizam indukcije CYP1A enzima. *In vitro* metode nude osjetljiviju, bržu, ali i etički prihvatljiviju opciju za testiranje velikog broja okolišnih uzoraka.

1.5. Određivanje kronične toksičnosti

1.5.1. Zelena alga *Selenastrum subspicatus*

Selenastrum subspicatus (Slika 8) je nepokretna, jednostanična zelena alga (Chlorophyceae) okruglog oblika (40 do 60 μm^3) koja je česta u većini slatkih voda. Ova alga se jednostavno kultivira, a i lako je dostupna od dobavljača. Njihova morfologija čini ih idealnima za brojanje pomoću elektronskog brojača stanica. Grupiranje se rijetko pojavljuje kod *S. subspicatus* jer nemaju kompleksnih struktura i ne stvaraju lance. Rast je dovoljno brz da se izmjeri broj stanica nakon 72 h, a i vrsta je srednje osjetljiva na toksične supstance.



Slika 8. Zelena alga *Selenastrum subspicatus*. (VUSTAH, 2009)

1.5.2. Test inhibicije rasta jednostani ne alge vrste *Selenastrum subspicatus*

Niti od jednog testa, ili testnog organizma, ne može se o ekvivalenti davanje jednozna nih odgovara dostatnih za zadovoljavanje složenog pristupa o uvanju i zaštiti okoliša. Samo kada se pojedini test koristi kao dio u seriji dobro definiranih testova toksi nosti, gdje se mjeri mnoštvo krajnjih to aka i ispitano je mnogo vrsta, rezultati mogu pridonijeti holisti koj interpretaciji toksi nih u inaka. Potpuno testiranje toksi nosti otpadnih voda u usporedbi s testiranjem jedne kemikalije omogu uje ve u korelaciju izme u rezultata testova toksi nosti i vjerojatnih utjecaja na stvarni okoliš. Vjerodostojnost laboratorijskih testova toksi nosti prema okolišu je tako er poja ana upotrebom prirodnih vrsta poput slatkovodne alge *Selenastrum subspicatus*. Test inhibicije rasta korištenjem slatkovodne alge jest jedan od klju nih vodenih testova toksi nosti izabranih za standardizaciju.

Test rasta zelene alge *Selenastrum subspicatus* ima relativno kratko vrijeme izlaganja (72-96 h), ali ipak govorimo o kroni nom testu toksi nosti, budu i da uklju uje više završenih životnih ciklusa. Pojam kroni ne toksi nosti odnosi se na na dugotrajne u inke koji su povezani s promjenama u metabolizmu, rastu, reprodukciji ili sposobnosti preživljavanja. U ovom testu, kroni na toksi nost je nastali štetni u inak (letani ili subletalni) induciran u testnom organizmu tijekom zna ajnog i osjetljivog dijela životnog cikusa.

Jednostani ne alge vrste *S. subspicatus* kultiviraju se u trajanju od nekoliko generacija u definiranom mediju koji sadržava seriju koncentracija ili razrije enja pojedina nih kemikalija, odnosno okolišnih uzoraka koji se testiraju. Testni medij priprema se tako da se u odgovaraju im omjerima pomiješa hranjivi medij, testna supstanca/uzorak i inokulum algi u eksponencijalnoj fazi rasta. Tako pripremljena testna smjesa inkubira se 72-96 sati na sobnoj temperaturi, a tijekom tog perioda gusto a algi u testnoj smjesi fluorimetrijski se odre uje svakih 24 sata.

Inhibicija rasta na kraju se odre uje i izražava kao redukcija u broju algi u odnosu na kontrolni uzorak bez test supstanci, odnosno uzorak tzv. pozitivne kontrole koji sadržava seriju koncentracija modelnog toksikanta (u ovom slu aju kalijevog bikromata, $K_2Cr_2O_7$).

Kada su u pitanju okolišni uzorci poput testiranih ekstrakata sedimenta, toksi nost se obi no izražava kao ono razrije enje uzorka koje je uzrokovalo 50 %-tnu inhibiciju rasta algi (eng. *inhibitory 50 concentration/dillution*; IC50); ili alternativno kao tzv. LID vrijednost (eng.

lowest ineffective dilution), odnosno najmanje razrjeđenje koje je uzrokovalo manje od 5 % inhibicije rasta algi. Dobivene vrijednosti potom se mogu preračunati i u EC50 vrijednosti koje izražavaju količinu uzorka potrebnu da izazove izmjereni tok u inak po volumenu medija, odnosno u toksične jedinice (TJ) koje omogućavaju izravnu usporedbu uzoraka.

1.6. Cilj istraživanja

Uz potok Gorjak, u blizini Savskog Marofa, nalaze se industrijski pogoni tvrtki Pliva Hrvatska d.d. i Kvasac d.o.o., koje ispuštanjem nepročišćenih industrijskih (tehnoloških) otpadnih voda desetlje ima predstavljaju problem za lokalnu i širu zajednicu. Radi se o industrijskim postrojenjima u kojima se desetlje ima proizvode farmaceutici, posebno makrolidni antibiotici, dakle tvari s jasnim biološkim učinkom. Osim toga, nije teško pretpostaviti da su otpadne vode „Plive“ i „Kvasca“ opterećene i brojnim tvarima koje su uobičajeno prisutne u složenim industrijskim procesima i postrojenjima.

Opsežna istraživanja provedena 1988. i 1989. godine obuhvatila su ispitivanje kakvoće i sastava podzemnih i površinskih voda (tekućica i stajaćica), sedimenta, tla i otpada uz potok Gorjak. Ta istraživanja pokazala su da je sediment potoka Gorjak (analize su provedene samo na dvije lokacije) izrazito onečišćen pojedinim toksičnim metalima. Analize otpada iz pogona «Plive» ukazale su da otpad sadrži znatne količine anorganskih i organskih zagađivala. Tlo ispod i u blizini otpada sadržavalo je više koncentracije zagađivala nego sedimenti vodonosnika (Izvještaj, 2008).

Ispuštanje tehnoloških i sanitarnih voda u potok Gorjak s jedne strane ugrožava kvalitetu samog potoka, ali također predstavlja i potencijalnu opasnost za zagađivanje podzemnih voda. Naime, potok Gorjak nalazi se u širem području vodocrpilišta Šibice. Prodor zagađivanja iz potoka u podzemlje mogao bi dakle direktno ugroziti izvore pitke vode za grad Zaprešić.

U svrhu sanacije potoka Gorjak i njegovog dovođenja u prijašnje stanje na razinu vodotoka II. kvalitete prema važećoj nacionalnoj klasifikaciji, provedene su kemijske analize anorganskih i organskih zagađivala te ekotoksikološka ispitivanja sedimenta/mulja potoka Gorjak. Biotestovi opisani u ovom diplomskom radu dio su ekotoksikoloških ispitivanja.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Lokacija uzimanja uzoraka i uzorkovanje

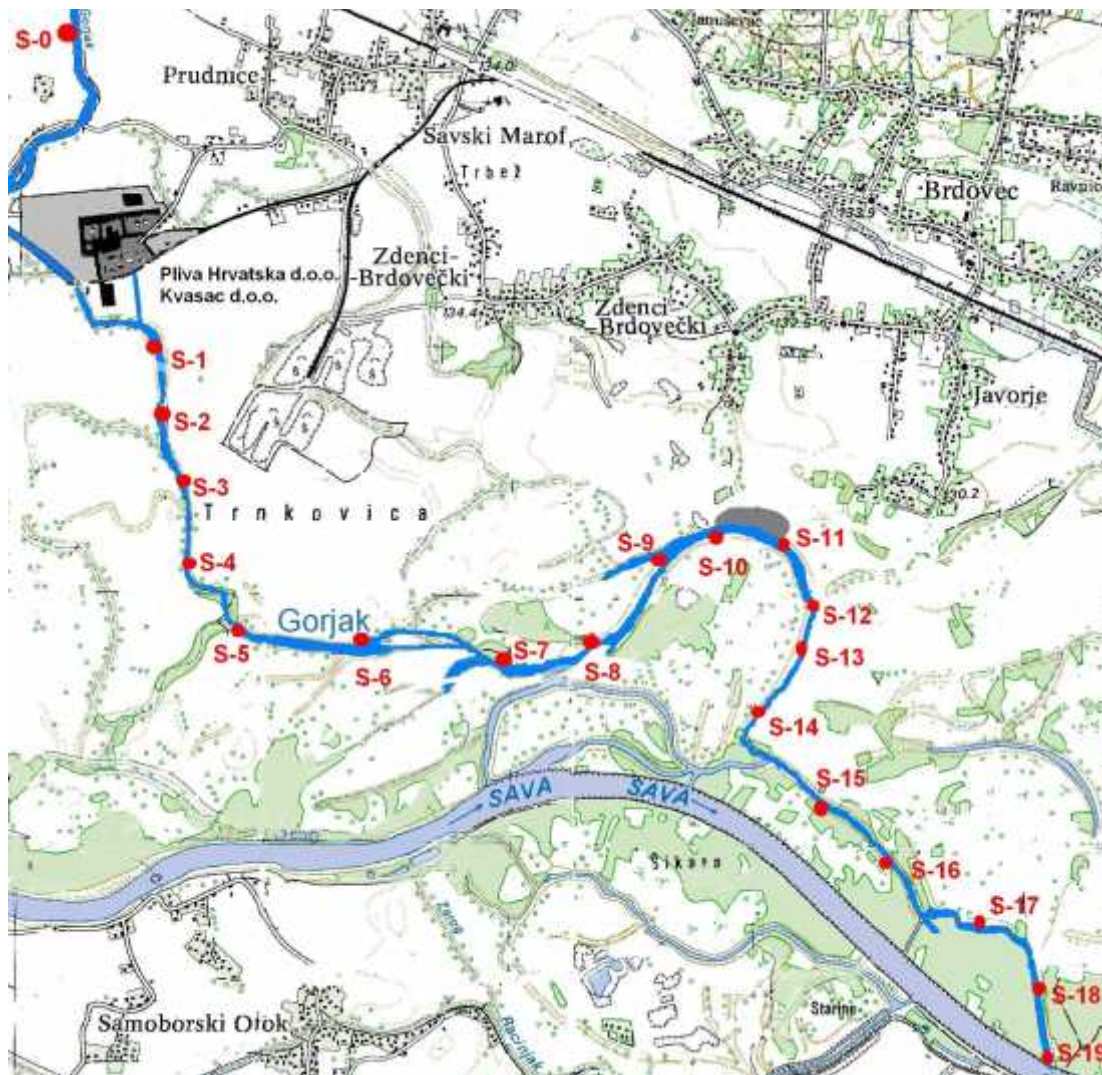
Sakupljanje uzoraka napravljeno je na 20 lokacija raspoređenih uzduž potoka Gorjak, općina Brdovec (Slika 9).

Lokacije uzorkovanja bile su raspoređene od pogona „Plive“ do utoka potoka Gorjak u rijeku Savu. Pri određivanju pozicije lokacija vodilo se računa i o specifičnoj situaciji na terenu, kao što su proširenja ili suženja korita potoka Gorjak. Na svakoj lokaciji procijenjena je širina potoka, dubina vode iznad mulja, dubina stupca mulja, te mogući način uzorkovanja mulja na pojedinim lokacijama s obzirom na lokaciju, dubinu i konzistenciju mulja.

Uzorkovanje sedimenta iz potoka Gorjak izvršeno je u toku 3 dana u periodu 26-28.2.2008., na svih 20 odabranih lokacija.

Uzorci su sakupljeni pomoću plastičnih korera ili pomoću improviziranog uzorkivača za vrlo rijetki mulj na pojedinim lokacijama, ovisno o pristupačnosti lokacije te dubini i karakteristikama mulja na pojedinoj lokaciji. Na svakoj lokaciji sakupljeno je 3-4 kg mokrog mulja i pohranjeno u plastične vrećice. Također je za potrebe izoliranja porne vode iz sedimenta na svakoj lokaciji direktno uzet sediment u plastičnu bocu i dobro zatvoren da se izolira od ulaska zraka. Prilikom uzorkovanja poduzete su odgovarajuće mjere zaštite svih suradnika koji su bili opremljeni zaštitnom opremom (odjelima, izmama i rukavicama), te je sva oprema nakon upotrebe dezinficirana.

Na karti je prikazana pozicija 20 lokacija odabranih za uzimanje uzoraka sedimenta. Lokacije S0, S1, S5, S10 i S19 odabrane su za lokacije na kojima su se vršila ekotoksikološka ispitivanja ovog diplomskog rada. Odabir tih lokacija napravljen je tako da one obuhvaćaju referentnu lokaciju prije Plive (S0), lokaciju odmah iza Plive (S1), lokaciju koja sadrži tekući i organski mulj (S5), lokaciju iza proširenja potoka u blizini smetlišta (S10), te zadnju lokaciju prije utoka potoka Gorjak u rijeku Savu (S19). Većina dodatnih parametara određena je i na lokaciji S3.



Slika 9. Karta područja oko potoka Gorjak s označenim postajama sakupljanja uzoraka.

2.2. Priprema uzoraka

Uzorci sedimenta su nakon sakupljanja osušeni na zraku, te za potrebe ekotoksikoloških analiza ekstrahirani u diklormetan-metanolu kako bi se iz uzoraka ekstrahirala što šira (nespecifična) serija zagađivala. Diklormetan, odnosno metanolski ekstrakti upareni su potom do suha na rotavaporu, odnosno u struji dušika, udruženi, te potom otopljeni u dimetil-sulfoksidu (DMSO). Od tako pripremljenih uzoraka otopljenih u DMSO-u pripremljene su odgovarajuće serije razrjeđenja koje su analizirane biotestovima *in vitro*.

Za provedbu ekotoksikoloških analiza uzoraka sedimenta u okviru istražnih radova na utvrđivanju stanja u potoku Gorjak odabrana je serija suvremenih *in vitro* biotestova koji pokrivaju različite mehanizme toksičnosti, odnosno taksonomske kategorije pokusnih organizama iz kojih su dobivene odgovarajuće stanice ili sojevi. To su:

- 1) Određivanje kronične toksičnosti – testom inhibicije rasta jednostanične alge vrste *Selenastrum subspicatus*;
- 2) Određivanje biološki relevantne izloženosti zagađivalima koja induciraju detoksikacijski sustav CYP1A ovisnih enzima – mjerenjem EROD aktivnosti u kulturi ribljih PLHC-1 hepatoma stanica;
- 3) Određivanje estrogenog potencijala uzoraka – korištenjem YES biotesta s genetski modificiranim sojem pekarskog kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*);
- 4) Određivanje mutagenog/genotoksičnog potencijala uzoraka – Ames bakterijskim testom uz korištenje modificiranog soja bakterije vrste *Salmonella typhimurium*

U okviru ovog diplomskog rada bit će predstavljeni rezultati dobiveni određivanjem kronične toksičnosti, te biološki relevantne izloženosti tvarima koje induciraju CYP1A ovisne enzime.

2.3. Kemikalije i materijali

Za obradu uzoraka i izvršenje svih potrebitih mjerenja pri izradi ovog rada upotrebljene su sljedeće kemikalije:

Amonijev klorid

Magnezijev klorid

Kalcijev klorid – dihidrat

Magnezijev sulfat

Kalij-dihidrogenfosfat

Željezov(III) klorid – heksahidrat

Borna kiselina

Manganov(II) klorid – tetrahidrat

Cinkov klorid

Kobaltov(II) klorid – heksahidrat

Bakrov(II) klorid – dihidrat

Natrijev molibdat – dihidrat

Natrijev hidrogenkarbonat

Kalijev bikromat

Acetonitril

7-etoksirezorufin

BSA (goveji i serumski albumin)

Fluorescamin

Dinatrij etilendiamintetraacetat – dihidrat

Gore navedene kemikalije kupljene su od tvrtke Sigma/Aldrich (St. Louis, MO, SAD)

FBS (fetalni gove i serum) – GibcoBrl, Life Technologies, Karlsruhe, Njema ka

PBS (fosfatni pufer) – Seromed, Biochrom KG, Berlin, Njema ka

Tripsin-EDTA u PBS-u ; koncentrirana (10x) otopina tripsin-EDTA (0,5 – 0,2 %) u PBS-u –
Seromed Biochrom KG, Berlin, Njema ka

2,3,7,8 - tetraklorodibenzo-p-dioksin (TCDD) - Cambridge Isotope Laboratories, Andover ,
MA , SAD

DMEM – (52100, Gibco, SAD) – kupljen u Imunološkom zavodu d.d. , Zagreb, Hrvatska

Natrijev hidroksid - Kemika, Zagreb, Hrvatska

Dimetilsulfoksid (DMSO) – Kemika, Zagreb, Hrvatska

Diklormetan - Kemika, Zagreb, Hrvatska

Metanol – Kemika, Zagreb, Hrvatska

2.2.1. EROD – test indukcije CYP1A

MATERIJALI:

- stani na linija; PLHC-1 (*Poeciliopsis lucida hepatoma cell line*) stani na linija
- mediji i otopine za rad sa stani nom kulturom; minimalni esencijalni medij, DMEM, fetalni gove i serum (FBS), fosfatni pufer (PBS), 0,025 % tripsin u PBS-u
- otopina za pokus (može se u manjim volumenima držati na -20°C); MEM: Razrje enja uzoraka
- modelni inducer, supstrat i otapalo; TCDD (1 nM), 7-etoksiresorufin (2 μM), 50 mM fosfatni pufer pH=8

LABORATORIJSKA OPREMA:

- kabinet za rad u sterilnim uvjetima - Heraeus instruments, Njema ka
- niskotemperaturni inkubator za stanice

- vodena kupelj
- bočice 75 cm² za uzgoj stanica
- invertni mikroskop - Hund, Njemačka
- boca s tekućim dušikom za zamrzavanje stanica
- hemocitometar
- plastične mikroploče, s 96 jamica ravnog dna – TPP, Trasadingen, Švicarska
- mikropipete
- fluorimetrijski čitač za mikroploče Fluorolite 1000 – Dynatech Laboratories Inc., Chantilly, SAD;

2.2.2. Test inhibicije rasta jednostanične alge vrsta *Selenastrum subspicatus*

MATERIJALI:

- testni organizam; jednostanična alga vrste *Selenastrum subspicatus*
- deionizirana voda ; korištena u pripremi medija rasta i otopina s testnim supstancama
- hranjiva; pripremljene četiri temeljne otopine u vodi, sastav naveden u Tablici 2., otopine sterilizirane filtriranjem (promjer pora 0,2 μm), držane u tami na 4°C.
- kalijev bikromat

LABORATORIJSKA OPREMA:

- kabinet za rad u sterilnim uvjetima – Heraeus instruments, Njemačka
- hemocitometar
- invertni mikroskop – Hund, Njemačka
- autoklav za sterilizaciju plastičnih nastavaka i otopina

- suhi sterilizator za sterilizaciju staklenog posu a
- sterilni nastavci, pipete, stakleno posu e
- jednokanalne i 8-kanalne mikropipete – Eppendorf, Njema ka
- pipeta za višekratno dodavanje (razdjeljivanje) – Eppendorf, Njema ka
- analiti ka vaga
- plasti ne mikroplo e, s 96 jamica ravnog dna – TPP, Trasadingen, Švicarska
- fluorometrijski ita za mikroplo e Fluorolite 1000 – Dynatech Laboratories Inc., Chantilly, SAD
- spektrofotometrijski ita za mikroplo e Anthos Reader HT3, Anthos, Be , Austrija
- aparat za membransku filtraciju – koristi filtere srednje veli ine pora 0,2 μm
- pH metar

Tablica 2. Masena koncentracija hranjiva u testnoj otopini.

Temeljna otopina	Nutrijent (hranjivo)	Masena koncentracija u temeljnoj otopini	Kona na masena koncentracija u testnoj otopini
Temeljna otopina 1: makro-hranjiva	NH ₄ Cl	1,5 g/l	15 mg/l
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	1,2 g/l	12 mg/l
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,8 g/l	18 mg/l
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,5 g/l	15 mg/l
	KH ₂ PO ₄	0,16 g/l	1,6 mg/l
Temeljna otopina 2: Fe-EDTA	FeCl ₃ ·6H ₂ O	64 mg/l	64 µg/l
	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	100 mg/l	100 µg/l
Temeljna otopina 3: elementi u tragovima	H ₃ BO ₃ ^a	185 mg/l	185 µg/l
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	415 mg/l	415 µg/l
	ZnCl ₂	3 mg/l	3 µg/l
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,5 mg/l	1,5 µg/l
	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,01 mg/l	0,01 µg/l
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	7 mg/l	7 µg/l
Temeljna otopina 4: NaHCO ₃	NaHCO ₃	50 g/l	50 mg/l
^a H ₃ BO ₃ može biti otopljen dodatkom 0,1 mol/l NaOH.			

Priprema medija rasta

Medij rasta za zelene alge pripremamo dodavanjem odgovarajućih volumena temeljnih otopina prikazanih u Tablici 2. vodi. U 500 ml vode dodajemo:

- 10 ml temeljne otopine br. 1
- 1 ml temeljne otopine br. 2
- 1 ml temeljne otopine br. 3
- 1 ml temeljne otopine br. 4

Nadolijemo vodu do ukupnog volumena od 1000 ml.

Prije upotrebe, ostavljamo medij preko noći u kontaktu sa zrakom kako bi se pH uravnotežio. Ukoliko je potrebno, pH se treba prilagoditi do $8,1 \pm 0,2$ dodavanjem ili 1 mol/l kloridne kiseline ili 1 mol/l otopine natrijevog hidroksida.

Medij rasta puferiran je bikarbonatima i atmosferskim ugljik-dioksidom. Različite pH vrijednosti mogu se održavati mijenjajući koncentraciju HCO_3^- i/ili atmosferskog CO_2 .

Priprema pre-kulture i nasa ivanje

Pre-kultura se treba nasaditi do četiri dana prije početka testa. U medij rasta se nasa uju stanice s dovoljno niskom gustoćom (npr. 5×10^3 st/ml do 10^4 st/ml za tri dana pre-kulture) kako bi se održao eksponencijalni rast do početka testa. Pre-kultura treba biti inkubirana pod istim uvjetima kao i ona u testu.

Eksponencijalni rast pre-kulture koristi se kao nasada za test. Izmjerimo staninu gustoću u pre-kulturi odmah prije upotrebe u svrhu izračuna traženog volumena za nasa ivanje.

Izbor koncentracija testnog uzorka

Alge se izlažu testnom uzorku u vrlo širokom rasponu geometrijskih razrjeđenja. Razrjeđenja koje trebaju biti izabrana, trebaju obuhvatiti barem jednu inhibitornu točku iznad i barem jednu ispod željenog $E_r C_x$ parametra. Također, minimalno dvije inhibitorne točke (razrjeđenja) između 10% i 90% trebaju biti uključene u svrhu dobivanja podataka za regresivnu analizu.

Priprema testnog uzorka i temeljnih otopina

U slučaju vodenog testnog uzorka, potrebno je obraditi uzorak prije početka testa (npr. filtracijom ili neutralizacijom), ovisno o prirodi uzorka i svrsi testa. Uzorku se dodaju hranjive temeljne otopine kao što je opisano u Pripremi medija rasta.

Test se provodi bez prilagođavanja pH medija nakon što je dodan testni uzorak. Međutim, neke supstance mogu uzrokovati toksičnost i inače zbog izražene kiselosti ili lužnatosti. U svrhu određivanja toksičnosti uzorka neovisno o pH, prilagodimo pH vodenog uzorka ili temeljne otopine (prije serijskog razrjeđenja) mediju sa staničnom kulturom koristeći ili 1 mol/l kloridne kiseline ili 1 mol/l otopine natrijevog hidroksida.

Priprema testnih i kontrolnih grupa

Priprema testnih i kontrolnih grupa miješanjem odgovarajućih volumena testnog uzorka ili otopina temeljnih testnih uzoraka medija rasta i nasada u testnim komorama.

Ukupni volumen, koncentracije dodanih hranjivih medija rasta i stanica na gustoća treba biti ista u svim jamicama. Početna gustoća stanica treba biti dovoljno niska da omogućiti eksponencijalni rast u kontrolnoj kulturi stanica tijekom trajanja testa bez promjene pH više od 1,5 pH jedinica. Zbog toga početna gustoća stanica ne smije prelaziti 10^4 stanica/ml.

Inkubacija

Testne komore trebaju biti dobro pokrivene kako bi se izbjegla zračna kontaminacija i smanjilo isparavanje vode, ali ne smiju biti hermetički zatvorene kako bi CO_2 mogao ulaziti u komore. Inkubiramo testne komore na $23^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, ispod stalnog, bijelog svjetla.

Mjerenja

Mjerimo staničnu gustoću u svakoj testnoj komorici najmanje svakih 24 sata.

Test traje $72-96 \pm 2$ sata.

Brojanje stanica

Stanice na hemocitometru smo izbrojali pod mikroskopom, nakon čega smo koncentraciju stanica po ml izračunali po sljedećoj formuli:

$$C = n \cdot 10^4$$

Ckoncentracija stanica (broj stanica / ml)

nsrednja vrijednost broja stanica po kvadratu

Volumen stanice u suspenzije koju smo razrijedili do konačnog volumena, izračunali smo putem izraza:

$$V_s = \frac{C_a \cdot V}{C}$$

C_abroj željenih stanica / ml

Cbroj izmjerenih stanica / ml

V_svolumen stanice u suspenzije (ml)

Vkonačni volumen medija (ml)

2.3. Tijek testa EROD

U ovom pokusu koristili smo PHLC-1 stanice koje smo uzgajali u bo icama od 75 cm² s otprilike 20 ml medija za stanice. PHLC-1 stani nu liniju održavali smo po uobi ajenom protokolu i presa ivali dva puta tjedno (koristili smo otopinu tripsina za odljepljivanje stanica od podloge).

Dan prije pokusa (kada je pokrivenost bo ice 95-100 %) stanice smo isprali s 10 ml sterilnog PBS-a i odlijepili stanice s dodatkom 1 ml otopine tripsina (0,025 % tripsin u PBS-u). Tripsinizaciju smo zaustavili dodatkom 2 ml DMEM-a, propuhali stanice, prebacili 200 µl u istu tubicu, tome dodali još 800 µl DMEM-a i izbrojali koncentraciju stanica pomo u hemocitrometra. Za pokus nam treba 40-50 x 10⁴ stanica/ml DMEM-a, 200 µl po jamici, te smo izra unali koncentraciju stanica za nasa ivanje na mikrotitarske plo ice. Napravljenu stani nu suspenziju smo asepti ki razdijelili 8-kanalnom mikropipetom u dvije mikrotitarske plo ice s 96 jamica, u vanjske jamice umjesto stani nih suspenzija dodali po 200 µl miliQ vode. Pripremljene plo ice stavili smo u inkubator za stanice te inkubirali 24 h na 30°C.

Prethodno napravljennoj sterilnoj otopini za pokus (DMEM mediju) dodali smo antibiotik (1 µl antibiotika/ml DMEM) zbog sumnje na prisutnost anaerobnih bakterija u uzorku potoka Gorjak. U otopini smo potom napravili seriju dvostrukih razrje enja uzoraka (od 1:200 do 1:50000), prema Tablici 3. Razrje enja smo radili tako da smo najprije napravili najmanje razrje enje uzorka dodavanjem 4,4 µl uzorka u 440 µl DMEM-a. Otopinu smo nekoliko puta propuhali te prebacili 220 µl u slijede ih 605 µl DMEM-a te smo tako napravili još ve e razrje enje uzorka. Ovaj postupak ponavljali smo dok nismo napravili i posljednje, najve e razrje enje svakog uzorka. Za svaki pokus napravili smo dvostruka razrje enja uzoraka modelnog inducera TCDD u DMEM-u (kona na koncentracija u rasponu od 0 do 1 nM), prema Tablici 4. Koncentraciju od 1 nM otopine TCDD dobili smo miješanjem 0,8 µl TCDD-a s 376 µl MEM-a. Dobivenu otopinu nekoliko smo puta propuhali i prebacili 127 µl u 225 µl MEM-a i tako dobili 0,36 nM koncentraciju otopine TCDD-ja. Postupak smo ponovili prebacivanjem 101 µl otopine u 264 µl MEM-a dobivši 0,1 nM koncentraciju TCDD-a. Na isti na in dobili smo i ostala razrje enja. Volumen od 100 µl stani nog medija zamijenili smo sa 100 µl razrje enja uzorka, odnosno modelnog inducera. Inkubirali smo potom stanice 24 h na 30°C.

Tablica 3. Shema testnih razrje enja uzorka sedimenta potoka Gorjak.

RAZRJE ENJE	V(uzorak)(μl)	V (DMEM-a)(μl)
200	4,4	440
750	220	605
2000	220	366,67
5000	220	330
10 000	220	220
25 000	220	330
50 000	220	220
0	0	220

Tablica 4. Shema razrje enja TCDD-a.

c (TCDD-a)(nM)	V (TCDD-a)(μl)	V(MEM-a)(μl)
1	0,8	376
0,36	127	225
0,1	101	264
0,036	115	204
0,01	69	181
0	0	250

Slijede i dan smo pripremili otopinu supstrata (2 μ M 7-etoksiresorufin u fosfatnom puferu) i pufer za ispiranje. Zatamnili smo prostoriju u kojoj izvodimo test i izlili PBS u istu kadu. U drugu, također sterilnu kadu ulili smo otopinu supstrata i zaštitili je od svjetla. Naglo smo okrenuli pločice sa stanicama i pritisnuli na papir kako bismo uklonili stanični medij, zatim smo ispirali sa 100 μ l PBS-a po jamici i na kraju 8-kanalnom pipetom dodali lagano 100 μ l supstrata po jamici, te odmah pristupili kinetičkom mjerenju fluorescencije na ita u za mikroploče.

Kinetika se mjeri 10 minuta u ciklusima od minute, pri ekscitaciji na 535 nm i emisiji na 590 nm. Nakon mjerenja mikroploče stavljamo u zamrzivač na -20°C , pa nakon 24 h određujemo količinu proteina prema kojoj će na kraju biti izražena fluorescencija, odnosno količina rezorufina.

2.4. Tijek testa inhibicije rasta jednostanične alge vrsta *Selenastrum subspicatus*

Pokus sa zelenim algama radili smo pod aseptičkim uvjetima u sterilnom kabinetu i sa sterilnim 96 mikropločama i priborom.

Prije početka testa, izbrojali smo gustoću stanica u prethodno uzgojenoj kulturi zelenih alga. Napravili smo staničnu suspenziju s koncentracijom stanica od 5×10^4 st/ml, te izlijali u kadu i pomoću višekanalne mikropipete nanosili smo po 100 μ l u funkcionalne jamice (koje nisu rubne) triju mikroploča. U rubne jamice nanosili smo po 200 μ l miliQ vode. Prema Tablici 5. prikazanoj dolje radili smo seriju dvostrukih razrjeđenja.

Tablica 5. Dvostruko razrjeivanje uzorka.

(2x) Razrjeenja	V(uzorak)(μl)	V(medija)(μl)
1: 195,311	5,12	500
1: 390,6	250	250
1: 781,2	250	250
1:1561,5	250	250
1:3125	250	250
1: 6250	250	250
1:12500	250	250
1:25000	250	250
1:50000	250	250
1:100000	250	250

Dodavanjem 5,12 μ l uzorka u 500 μ l medija napravili smo najmanje razrjeenja uzorka. Nakon što smo dobivenu otopinu propuhali, prebacili smo 250 μ l u slijede ih 250 μ l medija, dobivši još ve e razrjeenja uzorka (1:390,6). Postupak smo ponavljali i završili s najve im razrjeenjem, a to je 1:100000. Pripremljena razrjeenja prebacili smo u prethodno pripremljene mikroplo e. Koriste i višekanalnu pipetu uzeli smo po 100 μ l razrjeenja najmanje koncentracije odre enog uzorka i nanosili u odgovaraju e jamice na mikroplo e. Postupno smo uzimali rastu e koncentracije istog uzorka dok nismo nanijeli i posljednju, najve u koncentraciju. Ovaj postupak ponovili smo sa svakim uzorkom.

Prije kraja testa, napravili smo i razrjeenja pozitivne kontrole, kalijevog bikromata. Razrjeenja smo radili prema podacima iz Tablice 6. U 604 μ l medija rasta dodali smo 151,1 μ l kalijevog bikarbonata, propuhali otopinu i prebacili 256 μ l u 454 μ l medija rasta dobivši manju koncentraciju otopine kalijevog bikromata (3,6 mg/l). Ponovnim propuhivanjem i

prebacivanjem 210 μl otopine u 545 μl medija rasta napravili smo još manje koncentriranu otopinu kalijeveg bikromata (1 mg/l). Postupak ponavljamo dok ne napravimo i najmanje razrije enje kalijeveg bikromata.

Tablica 6. Serija razrje enja kalijeveg bikromata.

$c(\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7)(\text{mg/l})$	$V(\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7)(\mu\text{l})$	medij rasta(μl)
10	151,1	604
3,6	256	454
1	210	545
0,36	255	454
0,1	209	544
0,036	253	450
0,01	203	527
0,0036	230	409
0,001	139	361
0	-	500

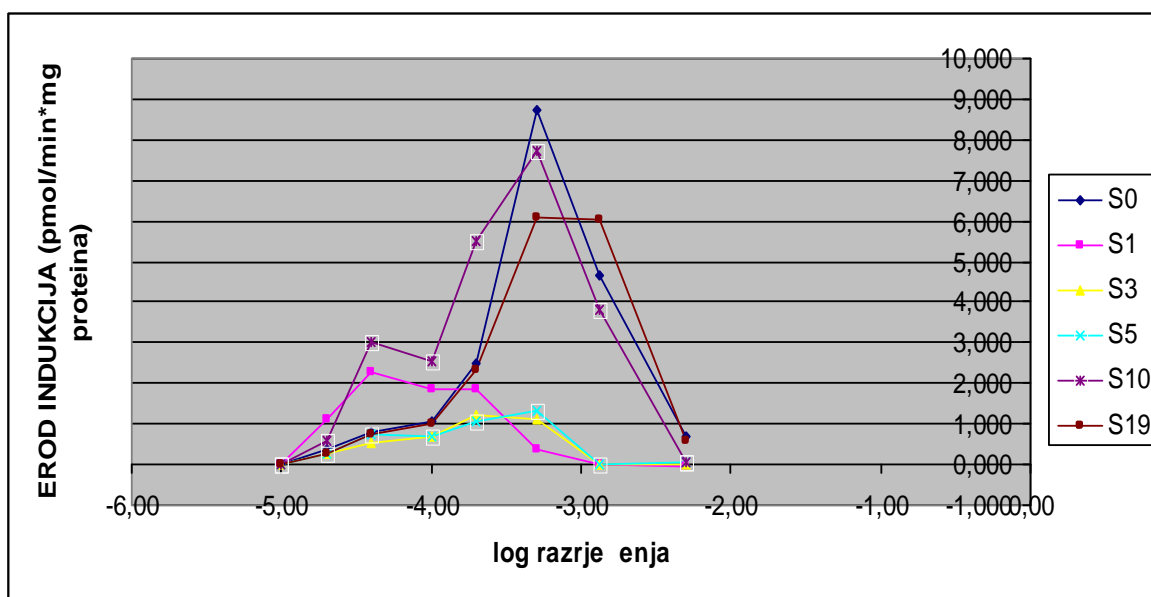
Idu im korakom prebacili smo razli ite koncentracije kalijeveg bikromata u jamice na tre oji mikroplati. Zapo eli smo s najmanjom koncentracijom, što je u ovom slu aju bio isti medij rasta. Mikropipetom smo uzimali po 100 μl i punili odgovaraju e jamice. Postepeno smo uzimali sve ve e koncentracije i završili s najve om.

Na pripremljenim mikroplata poma u fluorometrijskog ita a za mikroplati mjerili smo fluorescenciju na 440/680 nm. Mjerenja smo ponavljali svakih 24 sata do etvrtog dana.

3. REZULTATI

3.1. EROD test

Problem korištenja *in vitro* EROD testa za testiranje okolišnih uzoraka, jest nedostatak općenito prihvaćenog pristupa kvantifikaciji dobivenih rezultata. Ovo je povezano s činjenicom da složeni uzorci sadrže više kemijskih spojeva i često ne rezultiraju klasičnom, sigmoidalnom doza-odgovor krivuljom. Umjesto toga, EROD aktivnost pokazuje složenu krivulju u obliku zvona čija maksimalna indukcija ovisi o smjesi (Brunström i sur., 1995; Lorenzen i sur., 1997), ili krivulju s izraženim vrhom s ponekad loše definiranim razinama zasićenja, te s opadajućom EROD aktivnošću na većim testnim koncentracijama (Slika 10). Ovo može biti rezultat superpozicije indukcije ili inhibicije enzima toksikantima u uzorku što komplicira izračun pouzdanih EC50 vrijednosti (Hahn i sur., 1996; Villeneuve i sur., 1997).



Slika 10. Krivulje doza-odgovor za indukciju etoksiresorufin-O-deetilaze (EROD) uzoraka potoka Gorjak ne opisuju tipične sigmoidalne doza-odgovor krivulje, već krivulje s izraženim vrhom i inhibicijom EROD aktivnosti na većim koncentracijama uzoraka.

Budući da u inčiči složenih okolišnih uzoraka nisu uzrokovani samo jednim, individualnim spojem, već smjesom toksikanata, potvrda toksičnosti zahtjeva valjan koncept za takvu ujedinjenu toksičnost. Što se EROD indukcije tiče, općenito je prihvaćen koncept aditivnih koncentracija temeljen na ekvivalentima toksičnosti kao produkta koncentracije i faktora

toksi ne jednakosti (eng. **Toxicity Equivalency Factor**, TEF-a) koji se odnosi na jakost najjačeg inducera EROD testa TCDD-ja (Ahlborg i sur., 1994; Clemons i sur., 1997). Međutim, nema dogovora o uinkovitoj razini koja bi služila kao osnova za izražavanje toksičnosti ekvivalenata, (eng. **Toxicity Equivalent**, TEQ). Upravo te uinkovite razine mogu biti od ključne važnosti za analizu toksičnosti uzorka s obzirom na kombinaciju uinkovita (Brack i sur., 2000).

Jakost indukcije EROD testa raznih uzoraka uspoređuju se međusobno na osnovu vrijednosti toksičnosti ekvivalenata u odnosu na TCDD. EC_x vrijednosti TCDD-ja izražavane su koristeći i softver Prism (GraphPad Prism, San Diego, CA, USA).

Toksični ekvivalenti mogu se izražavati na dva načina;

- na osnovu uinkovite koncentracije na zadanoj razini uinka (eng. *fixed-effect-level*, FEL), ili
- na osnovu najveće EROD indukcije koju postigne svaki uzorak (max EROD).

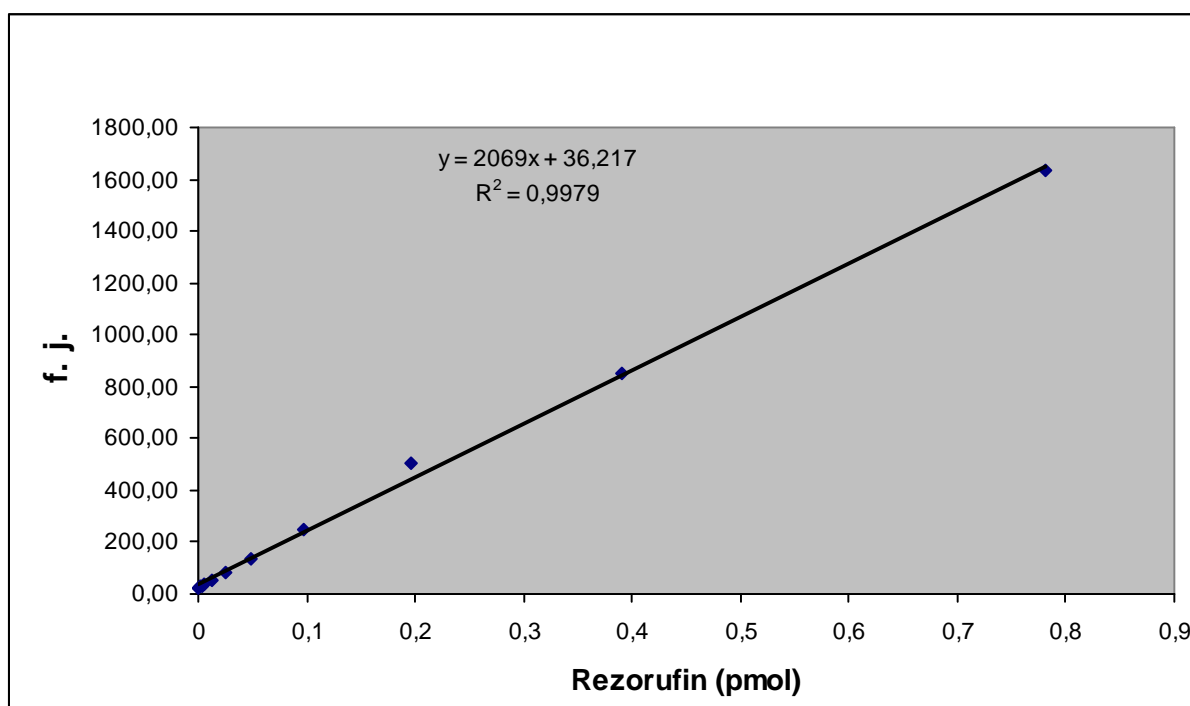
Fixed-effect-level ekvivalenti toksičnosti (FEL-TEQ) izražavani su koristeći i zadanu induksijsku razinu koja odgovara EC₁₀ vrijednostima TCDD-ja (Engwall i sur., 1997). Uz pretpostavku da je citokrom-P450 induciran spojem neovisne maksimalne razine, toksikantima sličnim dioksinima i da različite maksimalne razine EROD indukcije nastaju zbog superpozicije enzimске inhibicije (Hahn i sur., 1996), čini se razumnim izabrati nisku uinkovitu razinu za utvrđivanje TEQ, koji je rijetko kad pogodan inhibicijskim uincima. S druge strane, izabrana uinkovita razina mora jasno biti iznad značajne razine. EC₁₀_{TCDD} ispunjava ove zahtjeve i zbog toga se preporuča za kvantifikaciju EROD indukcije složenih okolišnih uzoraka. Ova induksijska razina neovisna je o maksimalnoj razini EROD indukcije testiranog uzorka. U uinkovite koncentracije (EC₁₀_{TCDD}) definiramo kao uinkovite koncentracije u masenim sedimentnim ekvivalentima po volumenu medija (g S-EQ/l), koje pokazuju EROD indukciju na zadanoj razini jednakoj TCDD induciranoj EROD razini pri njegovoj EC₁₀ koncentraciji.

Budući da indukcija EROD-a koju pobude okolišni ekstrakti i frakcije obično ne slijedi klasičnu sigmoidalnu doza-odgovor krivulju, čiji model možemo dobiti pomoću Probit ili Logit distribucija, EC₁₀ vrijednosti izražavane su linearnom ekstrapolacijom između dvije najbliže uinkovite koncentracije iznad i ispod EC₁₀ vrijednosti (Brack i sur., 2000).

Druga korištena metoda za izra unavanje TEQ-a temelji se na maksimalnoj EROD indukciji svakog uzorka (max-EROD).

3.2.1. Kalibracijska krivulja rezorufina

Kalibracijsku krivulju rezorufina dobili smo koriste i Microsoft Excel program fluorimetrijskim mjerenjem rezorufina na specifi nim ekscitacijskim i emisijskim valnim duljinama (535 nm/590 nm). Na os apcisu nanosimo koncentraciju rezorufina po jamicama mikroplo e, a na ordinatu fluorescentne jedinice (f.j.) od kojih je oduzet nespecifi ni signal (Slika 11). Na osnovi linearnog dijela pravca dobivamo jednadžbu pravca u koju se tad ubacuju f.j. za uzorke. Kona no se dobiju TCDD EQ izraženi po litri.



Slika 11. Kalibracijska krivulja mjerenja koncentracije rezorufina na spektrofotometru.

3.2.2. Mjerenje proteina fluorescencijom

Ponajprije smo napravili seriju razrje enja BSA (10 mg/ml) u fosfatnom puferu pH=8, koja nam treba za kalibracijski pravac. Uzeli smo stock fluorescamina (1,5 mg/ml) te ga razrijedili u acetonitrilu do 0,15 mg/ml i tako dobili radnu koncentraciju supstrata. Nanijeli smo razrje enja BSA u volumenu od 100 μ l u jamice te izvadili plo ice iz leda i otopili ih. Dodali smo 100 μ l radne koncentracije fluorescamina u svaki bunari , inkubirali 3-5 min na RT i potom mjerili fluorescenciju (na Varianu) u ovim uvjetima:

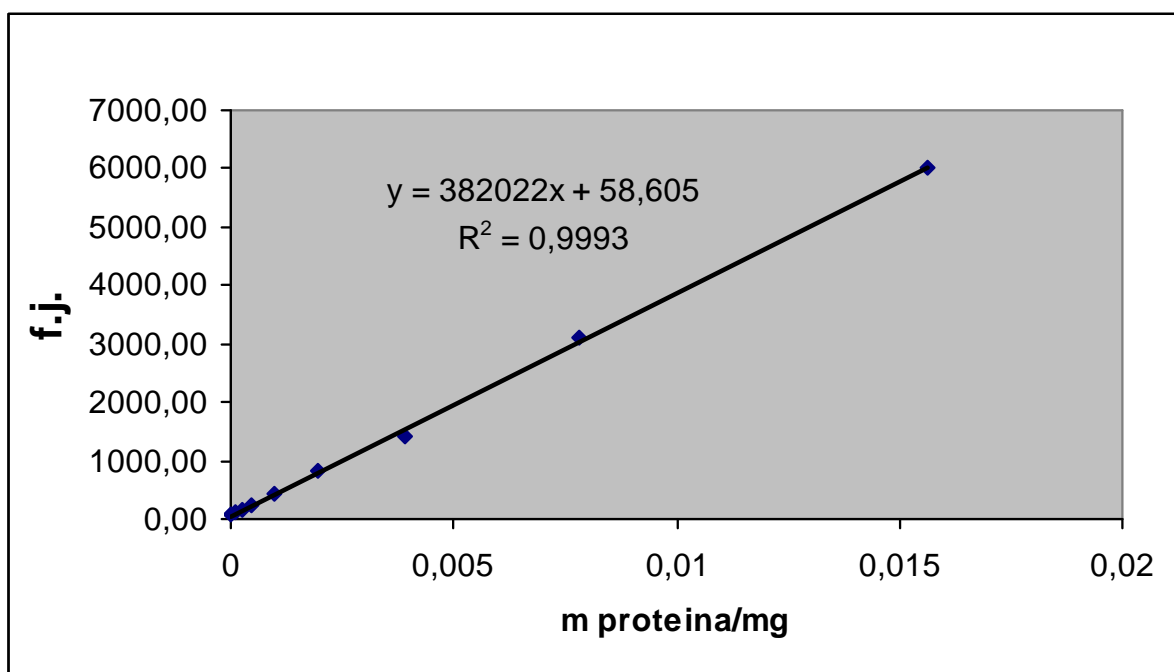
Fliteri: 390/465

t= 0,0125

slitovi=10 nm

Napon=600 V

Korištene su koncentracije proteina u rasponu od 0 do 5 mg/ml, ali budu i da je najbolji linerani trend izme u koncentracija 0 i 0,15625 mg/ml, tom je intervalu prilago ena kalibracijska krivulja proteina. Na os apcisu upisane su vrijednosti mase proteina (mg), a na ordinatu pripadaju e fluorimetrijske jedinice (f.j.) (Slika 12).



Slika 12. Kalibracijska krivulja proteina.

3.2.3. Izra un TCDD toksi nih ekvivalenata (TCDD TEQ)

U odgovarajućim pločicama mjerili smo fluorescenciju rezorufina svake jamice na fluorimetrijskom ita u, te količinu proteina. Izmjerene fluorimetrijske jedinice kod mjerenja proteina prevodili smo u masu proteina po jamici mikroploče koristeći a i b koeficijente iz jednadžbe pravca kalibracijske krivulje proteina.

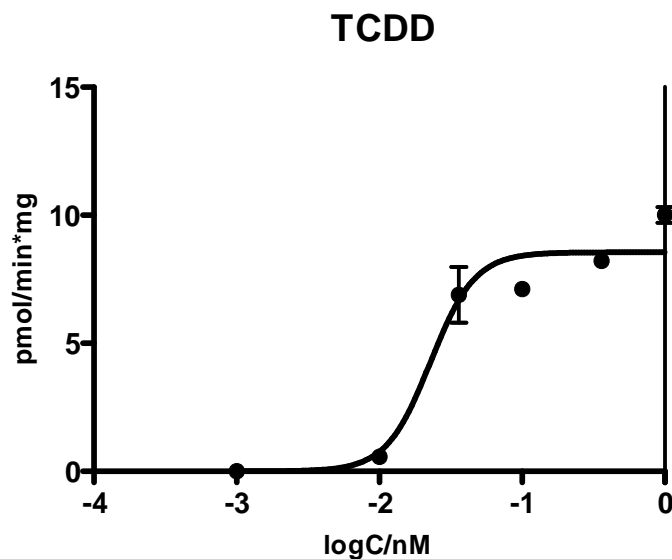
IZRA UN FEL-TEQ (EC10_{TCDD})

Rezultate o itanja rezorufina obiju pločica obradili smo u Microsoft Office Excell programu. Mjerenje smo vršili 10 puta u razmaku od jedne minute. Za svaku jamicu i njenih 10 pripadajućih vrijednosti pomoću formule LINEST dobili smo vrijednost koja najbolje opisuje a koeficijent rastege linearnog pravca – promjenu fluorescencije po minuti (dF/min). Kada smo te vrijednosti podijelili s koeficijentom a iz jednadžbe pravca baždarne krivulje resorufina dobili smo promjenu fluorescencije u pmol po min; dF(pmol/min). Dobivene vrijednosti smo podijelili s pripadajućim masama proteina svake jamice i tako dobili promjenu fluorescencije po pmolu u minuti po mg proteina (pmol/min*mg). Sve što smo radili s uzorcima, učinili smo i s pozitivnom kontrolom, TCDD-jem. Nakon toga smo izračunali srednju vrijednost ovih vrijednosti budući smo mjerili dvije iste koncentracije istog uzorka. Dobivene vrijednosti TCDD-ja ubacili smo u softver GraphPad Prism i tako dobili parametre koji su nam ključni za daljnju analizu (Slika 13).

Izračunali smo EC50, EC25, EC10 i EC5 vrijednosti TCDD-ja u nM, a potom i količinu pobuđene CYP1A aktivnosti, tj. induciranih oksidaza miješanih funkcija TCDD u pmol/min/mg prot preko jednadžbe;

$$y = \text{bottom} + (\text{top} - \text{bottom}) / (1 + 10^{((\log \text{EC}_{50} - \log(c)) * \text{Hill}))})$$

da bi potom preračunali sve dobivene EC vrijednosti iz nM u ng/l množe ih s molarnom masom TCDD-ja. Na kraju sada iz tih podataka još izračunamo i FEL-TEQ, odnosno TCDD TEQ (ng/g sedimenta) na temelju EC10_{TCDD} za svaki uzorak.



BOTTOM	~ 1.275e-016
TOP	8.553
LOGEC50	-1.641
HILLSLOPE	2.799
EC50	0.02285

Slika 13. Graf pozitivne kontrole, 2,3,7,8 - tetraklorodibenzo-p-dioksina (TCDD) s dobivenim parametrima koje koristimo za izra un toksih ekvivalenata (TEQ).

IZRA UN TCDD TEQ PREKO MAX-EROD INDUKCIJE UZORAKA

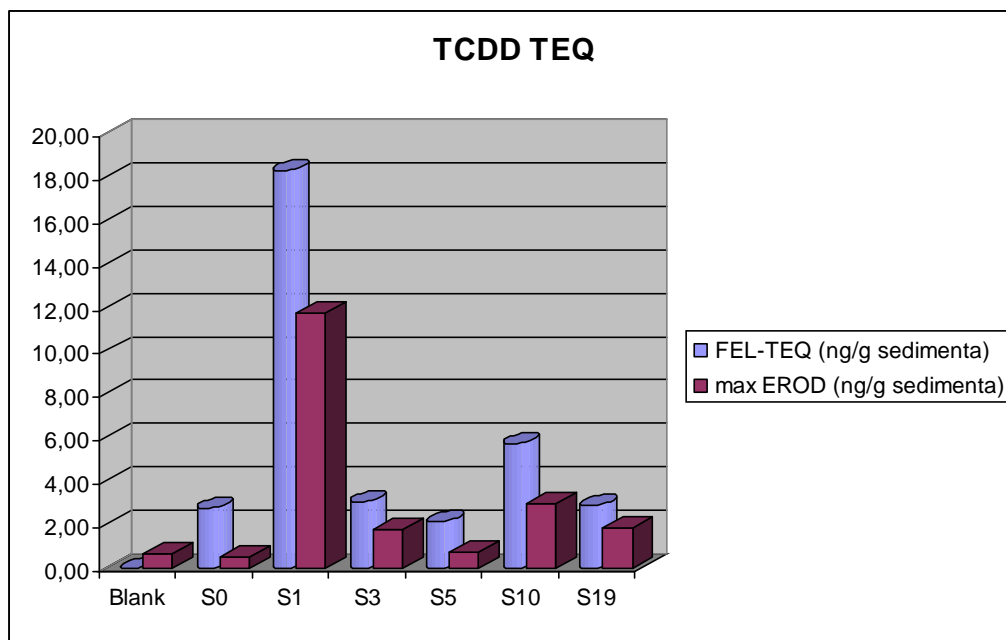
Izra unali smo logaritam koncentracije svakog uzorka koriste i formulu s prethodno izra unatim parametrima TCDD-ja:

$$\log(c) = (\log EC_{50} * Hill - \log((y-t)/(b-y))) / Hill$$

gdje umjesto y ubacujemo vrijednost najve e indukcije EROD-a za pojedini uzorak. Dobivene vrijednosti smo antilogaritmirali, pomnožili s razrje enjem uzorka pri kojem je postignuta najve a EROD indukcija svakog pojedinog uzorka ime smo dobili ekvivalente izražene u nmol/l, što smo dijeljenjem s 1000 preveli u nmol/ml. Množenjem s molarnom masom TCDD-ja i dijeljenjem s koncentracijom sedimenta, koja je 10,92 g/ml DMSO, dobili smo ekvivalente toksi nosti u ng/g sedimenta. Odre ivanje potencijala ispitivanih uzoraka da

induciraju (stimuliraju) aktivnost CYP1A ovisnih enzima (EROD), kao temeljnih detoksikacijskih enzima uklju enih u obranu stanice od potencijalno toksi nih tvari, tako er ja jasno pokazalo da postoji velika razlika izme u biološki relevantne izloženosti ovim zaga ivalima prije i poslije pogona „Plive“ (Slika 14). Kao i u slu aju mjerenja kroni ne toki nosti, uzorak S0 (prije pogona) ne možemo smatrati referentnim nezaga enim uzorkom, jer izraženo u toksi nim ekvivalentima modelnog inducera/toksikanta TCDD-a sadržava zna ajnu koli inu EROD (CYP1A) induciraju ih zaga ivala, reflektiraju i zaga enje koje se vjerojatno može povezati s ispuštanjem otpadnih voda doma instava. Me utim, koli ina EROD inducera izrazito je, oko 9 puta kod FEL-TEQ te više od 20 puta kod max EROD, ve a u uzorku S1 sakupljenom neposredno iza pogona (Tablica 7) i predstavlja iznimno visoku izloženost biološki relevantnom zaga enju.

Nakon lokacije S1 izmjeren je trend zna ajnog smanjenja koncentracije EROD inducera, koja se kretala od najniže vrijednosti za uzorak S5, nešto niže od razine izmjerene u uzorku S0 prije pogona, do najviših vrijednosti izmjerenih za uzorak S10, što predstavlja razinu EROD inducera dvostruko (FEL-TEQ), odnosno šesterostruko (max EROD) ve u no u uzorku S0 (Slika 14, Tablica 7).



Slika 14 . CYP1A indukcijski potencijal uzoraka sedimenta iz potoka Gorjak odre en mjerenjem EROD aktivnosti u PLHC-1 hepatoma stanicama. Stanice su u trajanju od 48 h izlagane seriji razrje enja uzoraka (S0-S19) sedimenta, seriji razrje enja proceduralne kontrole (blank), te nizu koncentracija modelnog CYP1A inducera TCDD-a kao pozitivne kontrole (Slika 13). Rezultati su izraženi u TCDD toksi nim ekvivalentima (TCDD TEQ) izra unatim na dva na ina, kao FEL-TEQ i max EROD TEQ, a vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti uzoraka testiranih u triplikatu.

Tablica 7. TCDD toksi ni ekvivalenti (TCDD TEQ) za uzorke sedimenata potoka Gorjak.

Vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti prera unatih TEQ, izraženih u ng TCDD po gramu suhog sedimenta, ukazuju i da odgovaraju i uzorci sadržavaju maksimalni potencijal za indukciju CYP1A (EROD aktivnosti) ekvivalentan iskazanoj koli ini modelnog inducera (TCDD).

POSTAJA UZORKOVANJA	TCDD TEQ	
	FEL – TEQ (ng/g sedimenta)	max EROD (ng/g sedimenta)
Blank	0,01	0,69
S0	2,77	0,54
S1	18,29	11,74
S3	3,06	1,77
S5	2,16	0,73
S10	5,74	2,96
S19	2,90	1,87

3.2. Test inhibicije rasta jednostani ne alge vrste *Selenastrum subspicatus*

Rast stanica algi zabilježen je pove anjem fluorescencije klorofila. Najprije smo izra unali specifi ni rast, μ za svaki uzorak koriste i jednadžbu;

$$\mu = (\ln N_L - \ln N_0) / (t_L + t_0)$$

gdje je

- t_0 vrijeme po etka testa
- t_L vrijeme završetka testa
- N_0 nominalna po etna gusto a stanica

N_L izmjerena gustoća stanica u vremenu t_L

Sada smo iz ovih vrijednosti izračunali postotak inhibicije za svaki uzorak koristeći i slijedeću jednadžbu;

$$I_{-i} = (\mu_c - \mu_i) / \mu_c * 100$$

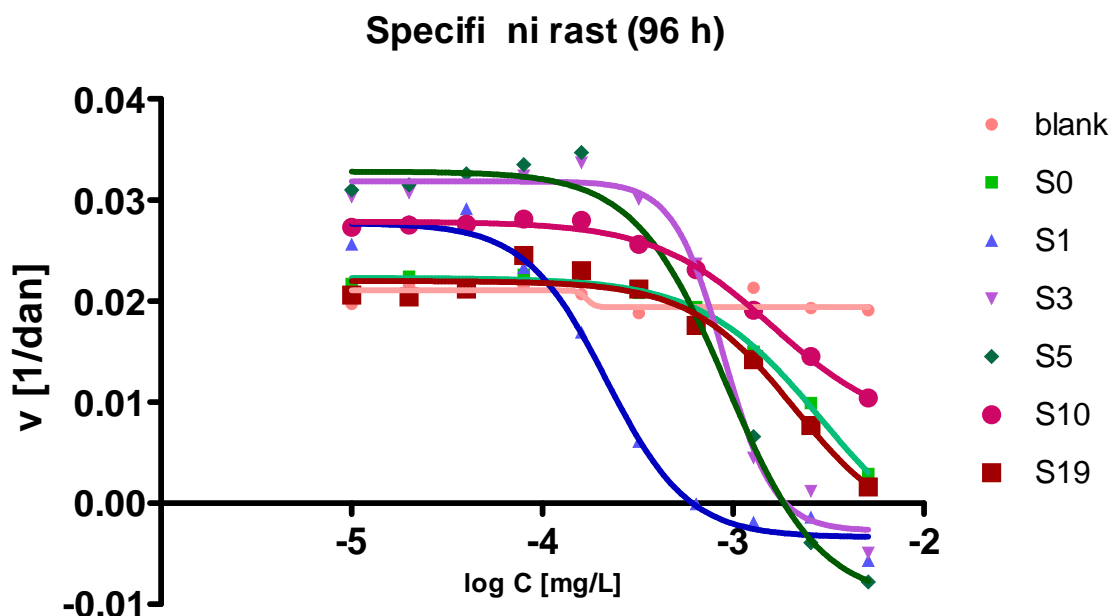
gdje je

I_{μ_i} postotak inhibicije (stope rasta) testne koncentracije i

μ_i srednja stopa rasta za testnu koncentraciju i

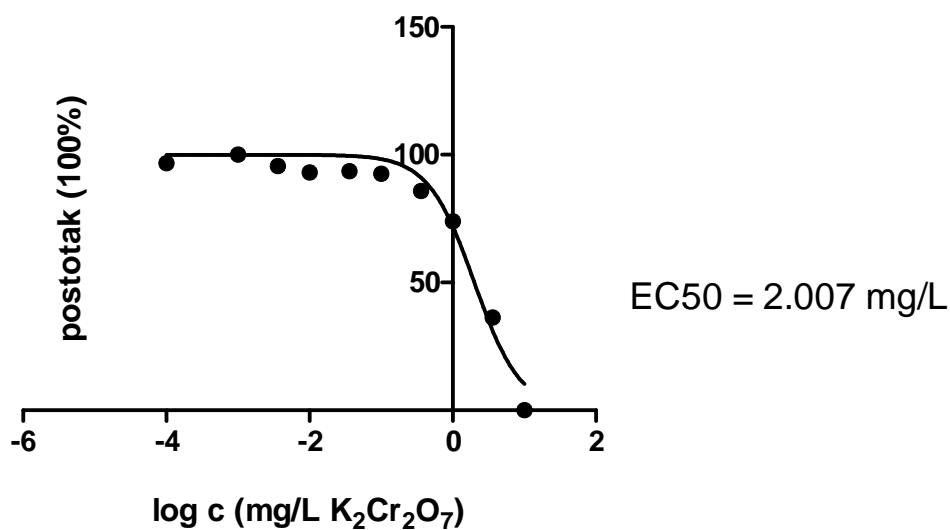
μ_c srednja stopa rasta kontrole

Rezultati su prikazani grafičkim prikazima, kako za testne uzorke (Slika 15 i Slika 17), tako i za pozitivnu kontrolu, kalijev bikromat (Slika 16).

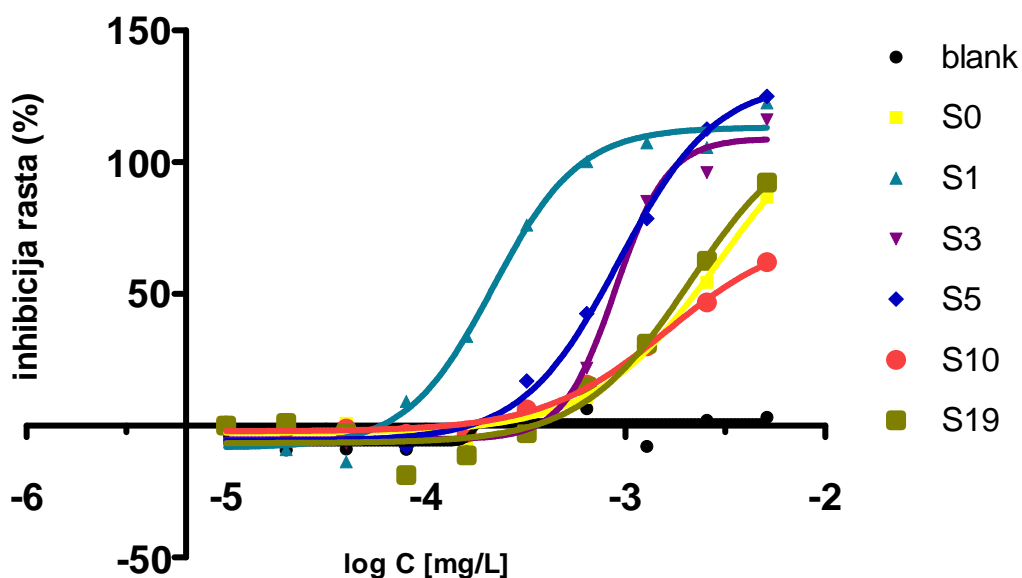


Slika 15. Ovisnost logaritma koncentracije uzoraka o promjeni fluorescentnih jedinica prikazanih kao rast broja stanica po danu. Sve krivulje pokazuju pad specifičnog rasta stanica, osim krivulje negativne kontrole (blank). Krivulja uzorka S1 ima najizraženiji pad pri nižim koncentracijama za razliku od ostalih uzoraka, što govori u prilog najjače toksičnosti uzorka S1.

Prirast stanica u kalijevom bikromatu



Slika 16. Rast stanica u pozitivnoj kontroli, kalijevom bikromatu, opisuje padajuća krivulja ovisno o povećanju logaritma koncentracije kalijevog bikromata. GraphPad Prism programom izračunali smo EC50 vrijednost kalijevog bikromata, koji iznosi 2.007 mg/L medija.



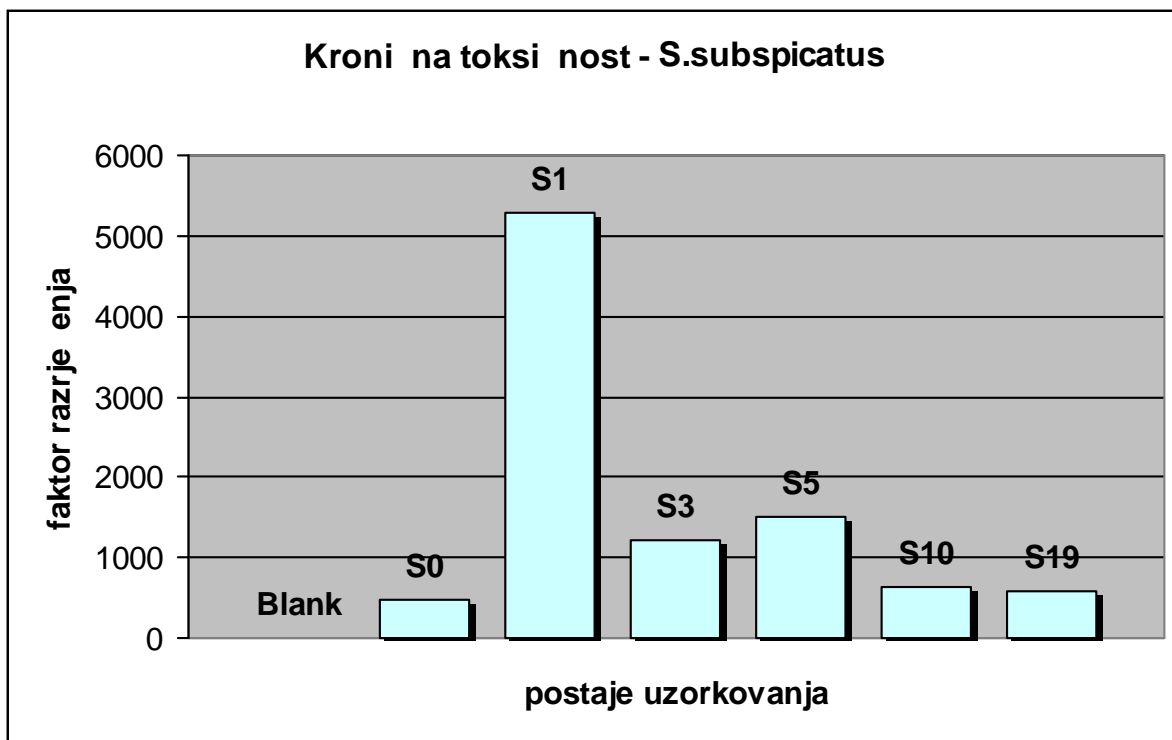
Slika 17. Graf postotka inhibicije rasta stanica pokazuje inhibični učinak svih uzoraka, izuzev negativne kontrole (blanka). Krivulja uzorka S1 premašuje 100%-nu inhibiciju pri nižim koncentracijama od ostalih uzoraka, što ponovno dokazuje veću toksičnost tog uzorka.

Rezultati testiranja kroni ne toksi nosti jasno su pokazali su da su svi uzorci sedimenta iz potoka Gorjak u stanju dose i IC50 u inak, tj. u odre enom razrje enju uzrokovati 50 % inhibicije rasta algi (Slika 17). Prema važe im me unarodnim standardima to zna i da se svi uzorci mogu smatrati toksi nima, posebice za alge, ali i druge za vodene organizme sedimenta. Štoviše, i uzorak S0, sakupljen prije no što potok Gorjak dolazi u izravni doticaj s otpadnim vodama pogona „Plive“, rezultirao je mjerljivim toksi nim u inkom.

Me utim, razlika u toksi nosti uzoraka sedimenata prije (S0) i poslije pogona „Plive“ (S1, S3, S5, S10 i S19) nedvojbeno je. Kona no prera unato na toksi ne jedinice (TJ) koje omogu avaju izravnu i jednostavnu usporedbu toksi nog potencijala uzoraka (Tablica 7) vidljivo je da je toksi nost sedimenta uzorkovanog prije pogona „Plive“ (S0 = 4.47 TJ) višestruko, više od 10 puta niža od toksi nosti uzorka sakupljenog neposredno iza pogona (S1 = 48.3 TJ). Uzorak S1 pri tome možemo smarati izrazito toksi nim – za 50 % inhibicije rasta algi dovoljna je bila koncentracije od svega 2.07 g suhog sedimenta po L medija.

Nakon lokacije S1 vidljiv je trend zna ajnog opadanja toksi nog potencijala (Slika 18, Tablica 8) udaljavanjem od pogona „Plive“.

Mada u ovoj studiji nije ra ena analiza bioraznoglosti i zastupljenosti sedimentnih zajednica, nije teško ustanoviti da su ovi rezultati u skladu su s anoksi nim karakterom i op om optere enoš u sedimenta razli itim zaga ivalima, te se o igledno radi o sedimentnom supstratu koji uz izuzetak bakterijskih zajednica ne može podržati bioraznoglost koja bi u normalnim okolnostima bila karakteristi na za vodotok sli nih hidrobioloških karakteristika poput potoka Gorjak.



Slika 18. Rezultati testa kroni ne toksi nosti prikazani su kao razrje enja (faktor razrje enja) koja su uzrokovala 50 % inhibicije rasta algi. Vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti uzoraka testiranih u triplikatu.

Tablica 8. IC50, EC50 i TJ vrijednosti za uzorke sedimenata potoka Gorjak. Vrijednosti predstavljaju: srednje vrijednosti prera unatih faktora razrje enja pri kojima je izmjereno 50 % inhibicije rasta jednostani ne alge *S. Subspicatus* (IC50) u odnosu na kontrolnu grupu (alge izlagane ekstraktu proceduralnog blanka); prera unate EC50 vrijednosti koje predstavljaju koli inu sedimenta (u gramima suhog sedimenta po litri medija) potrebnu da izazove izmjereni toksi ni u inak; te prera unate toksi ne jedinice (TJ) dobivene prema izrazu $TJ = 100 / EC50$.

Oznaka uzorka (lokacije)	IC50 faktor razrje enja	EC50 (g sedim./L)	TJ (100/EC50)
Kontrola (blank)	-	-	-
S0	488,52	22,35	4,47
S1	5274,26	2,07	48,30
S3	1206,1	9,05	11,05
S5	1496,33	7,30	13,70
S10	622,67	17,54	5,70
S19	582,75	18,74	5,34

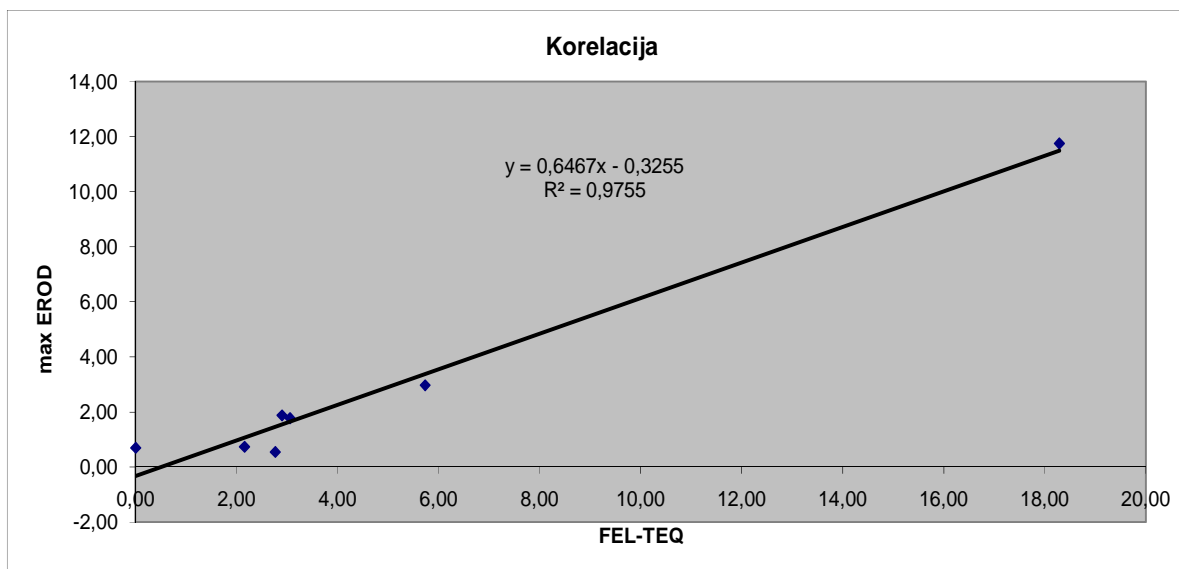
4. RASPRAVA

Analiza EROD indukcije okolišnih uzoraka esto se temelji na apsolutnoj indukciji pri odre enom razrje enju (Brunström i sur., 1992; Burnison i sur., 1996). Indukcija EROD-a je rastu a s pove anjem doze do maksimuma, nakon ega slijedi inhibicija na ve im koncentracijama. Ovo nije tipi no samo za složene okolišne uzorke, ve i za jednostavne inducere, poput PCB-a, dioksina i furana (Brunström i sur., 1995; Lorenzen i sur., 1997). Me utim, kao dodatak inhibitornom u inku samih EROD inducera na visokim koncentracijama, inhibitorni u inci ostalih neinduciraju ih spojeva mogu poja ati daljnju redukciju maksimalne EROD aktivnosti i rezultirati padom doza-odgovor krivulje na nižim u inkovitim koncentracijama. Niska EROD aktivnost na jednoj odre enoj koncentraciji ne ukazuje nužno na malu koncentraciju inducera, ve opaženi u inak može biti uzrokovan visokim koncentracijama inducera i/ili neinducera koji inhibiraju EROD aktivnost. Složene okolišne smjese esto sadrže dodatne spojeve s isklju ivo inhibiraju im u incima, što dodatno smanjuje maksimalne razine indukcije.

U složenom okolišnom uzorku s razli itim koncentracijama nepoznatih inducera i inhibitora, svi se u inci zbrajaju, rezultiraju i složenom doza-odgovor krivuljom s pove avaju om EROD aktivnoš u na niskim koncentracijama i smanjuju om na visokim koncentracijama.

Unato uvelike korištenim metodama za procjenu aktivnosti sli ne djelovanju dioksina preko mjerenja EROD indukcije, te izra unavanja zajedni kih u inaka koriste i koncept koncentracijske aditivnosti na osnovu TEQ, do danas nema op enito prihva enog dogovora za izra un TEQ. Zbog razli itih maksimalnih indukcijskih razina EROD-a, vjerojatno kao posljedica dodavanja enzimske indukcije i enzimske inhibicije, uvelike korištene EC50 vrijednosti ne ine se primjerenim za opisivanje aktivnosti sli ne djelovanju dioksina složenih okolišnih mješavina. Umjesto toga preporu ene su niske zadane razine EC vrijednosti s osvrtom na najja i EROD inducer TCDD, poput $EC_{10_{TCDD}}$. Omogu uju najjasniji zaklju ak o u incima posredovanim Ah-receptorom uvelike isklju uju i utjecaj dodane enzimske aktivnosti (Brack i sur., 2000).

Stoga smo se u ovom istraživanju ekotoksi nosti uzoraka sedimenta potoka Gorjak, za procjenu EROD aktivnosti, koristili izra unavanjem FEL-TEQ, tako i max EROD vrijednosti. Visoka koreliranost dobivenih rezultata FEL-TEQ i max EROD ($R^2 = 0.98$), temeljenih na razli itim u inkovitim koncentracijama, govori u prilog vjerodostojnosti dobivenih rezultata (Slika 19).



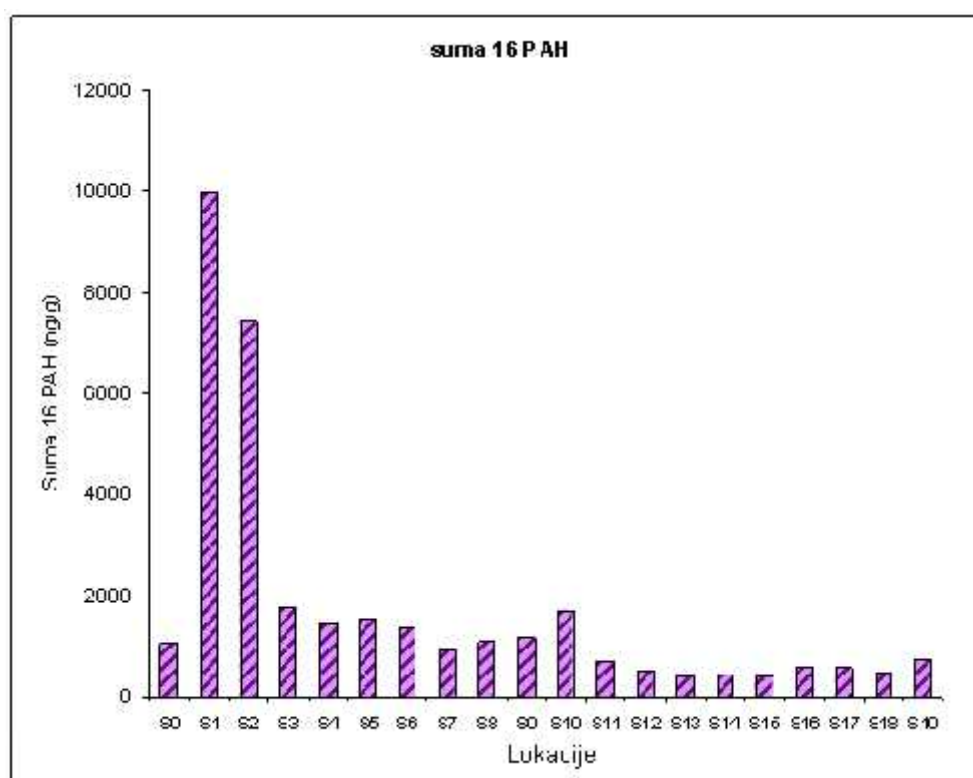
Slika 19. Koreliranost rezultata FEL-TEQ i max EROD dobivenih u ovom istraživanju.

U pogledu prisustva inducera sustava oksidaza miješanih funkcija ovisnih o citokromu P-450, rezultati dobiveni u ovom diplomskom radu nisu nimalo iznenađujuć i s obzirom na rezultate kemijske analize potoka Gorjak. Naime, analizom organskih zagađivala u sedimentu potoka Gorjak utvrđena je znatna zastupljenost svih 16 nesupstituiranih predstavnika policikličkih aromatskih ugljikovodika, a najviše razine izmjerene su u uzorcima s lokacija S1 i S2 (Slika 20; Izvještaj, 2008). Što se tiče porijekla PAH-ova, na temelju doprinosa supstituiranih homologa može se procijeniti da se, najvjerojatnije, radi o kombinaciji doprinosa od naftnog zagađivanja i pirolitičkih procesa.

Osim PAH-ova, registrirana je visoka razina i polikloriranih bifenila (PCB). Koncentracija ukupnih PCB-a dostižu na lokacijama nizvodno od pogona „Plive“ i „Kvasca“ i do 720 ng/g što se može smatrati dosta visokom razinom, posebno ako se ima na umu da bi potok Gorjak trebao imati kvalitetu vodotoka druge kategorije (Izvještaj, 2008). Uočljiva je velika sličnost s raspodjelom PAH-ova. Izrazito povišene razine zabilježene su samo na postajama S1 i S2, dok se na nizvodnim postajama koncentracije naglo smanjuju. Dobiven vrlo visok koeficijent korelacije između PCB-a i ukupnih PAH-ova ($R^2=0.97$) sugerira da oba tipa zagađivala dolaze iz istog izvora, ali i to da je njihovo ponašanje u istraživanom sustavu vrlo slično.

Prema tome, kako su CYP1A induceri u pravilu organske kemikalije, vrlo vjerojatno je posljedica relativno visoke koncentracije PAH-ova, PCB-ja i srodnih organskih spojeva koji su rezultat intenzivne industrijske aktivnosti. Međutim, jednako tako je izvjesno da se zabilježena razina EROD

aktivnosti ne može u potpunosti, čak niti većim dijelom, objasniti izmjerenom koncentracijom PAH-ova. Stoga je nužno analizirati dominantna organska zagađivača u sedimentu potoka Gorjak, a to su prije svega farmaceutici: najviše u dijelom makrolidni antibiotici i njihovi metaboliti (Izveštaj, 2008), dakle ključni proizvodi u pogonima „Plive“ i „Kvasca“. Kako o EROD indukcijskom potencijalu makrolidnih antibiotika nema puno podataka, rezultati ovog rada jasno ukazuju da ova skupina okolišnih zagađivača treba biti predmet budućih istraživanja.



Slika 20. Raspodjela policikličkih aromatskih ugljikovodika u sedimentima potoka Gorjak (Izveštaj, 2008).

Prema razinama zagađivača koje su koncentracije regulirane propisima (PAH i PCB), sedimenti potoka Gorjak mogu se klasificirati kao srednje do jako opterećeni.

Što se tiče rezultata određivanja kronične toksičnosti korištenjem testa s jednostaničnom algom vrste *S. subspicatus*, jasno se može uočiti visoka toksičnost sedimenta potoka Gorjak (Slike 15-18, Tablica 8). Osobito je to naglašeno za sedimente sakupljene na lokacijama bliže

pogonima „Plive“ i „Kvasca“, uz značajno opadanje toksičnosti nizvodno od postaje S5. Pri tome je važno istaknuti da se prema važećoj međunarodnoj regulativi sediment sakupljen na postaji S1 može smatrati izrazito (eko)toksičnim, ukazujući na nužnost hitne sanacije potoka Gorjak.

U skladu s (ne)selektivnošću testa sa *S. subspicatus*, izmjerena toksičnost vjerojatno je kumulativna posljedica niza toksičnih zagađivala koja se u sedimentu potoka Gorjak mogu naći i u visokim koncentracijama. Ono što se posebno ističe su izmjerene količine ekotoksičnih metala, kojih ima čitav niz i koji se pojavljuju nizvodno od referentne postaje. Poredani po jačini koncentracije slijede $Ni > Hg > Zn > Cu > Pb > Cr > Cd$. Najveći i zabrinjavajući stupanj zagađenja utvrđen je za metale Ni, Hg, Zn, Cu i Pb (Izveštaj, 2008). Kada se tome pridodaju iznimno visoke koncentracije antibiotika, njihovih prekursora i metabolita, te značajne koncentracije „klasičnih“ organskih industrijskih zagađivala, izmjerena toksičnost je vjerodostojna posljedica složene mješavine toksičnih komponenti sedimenta potoka Gorjak.

Prema tome, koristeći dva široko zastupljena biotesta vjerodostojno smo ustanovili da je sediment potoka Gorjak iznimno zagađen ekološki sustav, koji uz izuzetak specifičnih bakterijskih zajednica ne može ni u kojem slučaju osigurati bioraznolikost koja bi odgovarala ovakvom tipu vodotoka. Jednako tako je nedvojbeno da je zatečeno stanje izravna posljedica dugogodišnjeg ispuštanja zagađenih industrijskih otpadnih voda iz pogona tvrtki „Pliva“ i „Kvasac“. Kada se tome pridodaje činjenica da se ovako zagađen potok izravno ulijeva u Savu, te da se susjedno područje potoka Gorjak nalazi u okviru vodozaštitne zone „Šibice“, jasno je da područje zahtijeva hitnu i pažljivo planiranu sanaciju. Nadam se da su rezultati ovog istraživanja barem manjim dijelom pridonijeli znanstveno utemeljenom i što skorijem rješenju ovog ekološkog problema.

5. ZAKLJUČAK

Ogledno je da je sadržaj organskog onečišćenja u sedimentima potoka Gorjak vrlo složen, a opterećenje specifičnim organskim spojevima dosta je visoko. U sastavu organskog opterećenja ispreplju se prirodni organski sastojci, koji u znatnoj mjeri potječu od otpadnih tvari povezanih s ispuštanjem otpadnih voda iz proizvodnje kvasca, te tipična antropogena zagađivala kao što su policiklički aromatski ugljikovodici, poliklorirani bifenili, makrolidni antibiotici, ftalati i alkilfenoli.

Raspodjela zagađivala antropogenog karaktera (ksenobiotika) pokazuje izrazito povišenje koncentracije na lokacijama neposredno nakon pogona "Plive" i "Kvasca", dok u najdonjem dijelu toka (S10-S19) dolazi do znatnog smanjenja razina svih praćenih sastojaka.

Provedbom ekotoksikoloških analiza uzoraka sedimenta pomoću biotestova EROD i testa inhibicije rasta jednostanične alge vrste *Selenastrum subspicatus*, zaključujemo slijedeće:

1. Uzorci sedimenta iz potoka Gorjak pokazali su visoku razinu kronične toksičnosti. Osobito visoka razina izmjerena je u uzorku sakupljenim neposredno iza pogona „Plive“. Jasno je uočena tendencija opadanja kronične toksičnosti s udaljavanjem od pogona;
2. Koncentracija biološki relevantnih zagađivala u sedimentu, inducira CYP1A ovisnih detoksikacijskih enzima, izrazito je visoka neposredno nakon pogona „Plive“.
3. Testovi ukazuju da se sediment iz potoka Gorjak, sakupljen nizvodno od pogona „Plive“, može kvalificirati kao srednje do visoko toksičan sediment;
4. Izrazito toksično ocjenjujemo sediment neposredno nakon pogona „Plive“ (lokacije S1 do S3, otprilike prvih 700 m potoka nakon pogona).

6. LITERATURA

- Ahlborg U. G. i sur. (1994): Toxic equivalency factors for dioxin-like PCBs. *Chemosphere* **28**: 1049-1067.
- Ahokas J. T., Saarni H., Nebert D. W., Pelkonen O. (1979): The in vitro metabolism and covalent binding of benzo(a)pyrene to DNA catalyzed by trout liver microsomes. *Chem. Biol. Interact.* **25**: 103-108.
- Baird C. (1995): Environmental chemistry. W. H. Freeman and Company, New York.
- Barrick R. C. (1982): Flux of aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons to central Pudget Sound from Seattle (Westpoint) primary sewage effluent. *Environ. Sci. Technol.* **16**: 682-692.
- Bartsch H., Kuroki T., Roberfroid M., Malaveille C. (1982): Metabolic activation systems in vitro for carcinogen/mutagen screening tests. U: Chemical mutagens, Principles and Methods for their Detection, (ur.) A. Hollaender, Plenum Press, New York. **7**: 95-161.
- Blumer M. (1976): Polycyclic aromatic compounds in nature. *Sci. Amer.* **234**: 34-45.
- Brack W., Segner H., Möder M., Schüürmann G. (2000): Fixed-effect-level toxicity equivalents – a suitable parameter for assessing ethoxyresorufin-*O*-deethylase induction potency in complex environmental samples. *Environ. Toxicol. Chem.* **19**: 2493 – 2501.
- Brunström B., Broman D., Dencker L., Näf C., Vejlsens E., Zebühr Y. (1992): Extracts from settling particulate matter collected in the Stockholm Archipelago waters: Embryo lethality, immunotoxicity and EROD-inducing potency of fractions containing aliphatics/monoaromatics, diaromatics or polyaromatics. *Environ. Toxicol. Chem.* **11**: 1441-1449.
- Brunström B., Engwall M., Hjelm K., Lindqvist L., Zebühr Y. (1995): EROD induction in cultured chick embryo liver: A sensitive bioassay for dioxin-like environmental pollutants. *Environ. Toxicol. Chem.* **14**: 837-842.
- Burke M. D., Mayer R. T. (1974): Etoxyresorufin: Direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metab. Dispos.* **2**: 583-588.
- Burnison B. K., Hodson P. V., Nuttley D. J., Efler S. (1996): A bleached-kraft mill effluent causing induction of a fish mixed-function oxygenase enzyme. *Environ. Toxicol. Chem.* **15**: 524-1531.
- Clemons J. H., van den Heuvel M. R., Stegeman J. J., Dixon D. G., Bols N. C. (1994): Comparison of toxic equivalent factors for selected dioxin and furan congeners derived using fish and mammalian liver cell lines. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* **51**: 1577-1584.
- Clemons J. H., Dixon D. G., Bols N. C. (1997): Derivation of 2,3,7,8-TCDD toxic equivalent factors (TEFs) for selected dioxins, furans and PCBs with rainbow trout and rat liver cell lines and the influence of exposure time. *Chemosphere* **34**: 1105-1119.
- Coleman W. E., Munch J. W., Streicher R. P., Ringhand H. P., Kopfler F. C. (1984): The identification and measurement of components in gasoline, kerosine and No. 2 fuel oil that partition into the aqueous phase after mixing. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **13**: 171-183.

- Collins P. J. (1985): Induction of the polysubstrate monooxygenase system of the native budworm *Heliothis punctiger* (Wallengren) (*Lepidoptera: Noctuidae*). *Insect Biochem.* **15**: 551-555.
- Conney A. H. (1967): Pharmacological implications of microsomal enzyme induction. *Pharmacological Review* **19**: 317-366.
- Engwall M., Broman D., Dencker L., Näf C., Zebühr Y., Brunström B. (1997): Toxic potencies of extracts of sediment and settling particulate matter collected in the recipient of a bleached pulp mill effluent before and after abandoning chlorine bleaching. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**: 1187-1194.
- Farber E., Sarma D. S. R. (1985): Chemical carcinogenesis: the liver as a model. *Pathol. Immunopathol. Res.* **5**: 1-38.
- Feyereisen R., Farnsworth E. E. (1985): Developmental changes of microsomal cytochrome P-450 monooxygenases in larval and adult *Diploptera punctata*. *Insect Biochem.* **15**: 755-761.
- Gardner W. E., Lee R. F., Tenore K. R., Smith L. W. (1979): Degradation of selected polycyclic aromatic hydrocarbons in coastal sediments: importance of microbes and polychaete worms. *Water Air Soil Pollut.* **11**: 339-348.
- Hahn M. E., Woodward B. L., Stegeman J. J., Kennedy S. W. (1996): Rapid assessment of induced cytochrome P4501A protein and catalytic activity in fish hepatoma cells grown in multiwell plates: Response to TCDD, TCDF, and two planar PCBs. *Environ. Toxicol. Chem.* **15**: 582-591.
- Hansen P. D. (1996): Bioassay on Sediment Toxicity. U: Calmano W., Förstner: Sediments and Toxic Substances. Springer Verlag, Berlin- Heidelberg, str. 179-196.
- Harrison R. M., Perry R., Wellings R. A. (1987): Polynuclear aromatic hydrocarbons in raw, potable and waste waters. *Water Res.* **9**: 331-346.
- Hellou J., Payne J. F. (1987): Assessment of contamination of fish by water soluble fractions of petroleum: a role for bile metabolites. *Environ. Toxicol. Chem.* **6**: 857-866.
- Hesse S., Jernstrom B. (1984): Role of glutathione-S-transferases: detoxification of reactive metabolites of benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol by conjugation with glutathion. U: Greim H., Jung R., Kramer M., Marquardt H., Oesch F.(ur.) *Biochemical Basis of Chemical Carcinogenesis*, Raven Press, New York.
- Hites R. A., LaFlame R. E., Windsor J. G. (1980): Polycyclic aromatic hydrocarbons in marine/aquatic sediments: their ubiquity. U: Petrakis L., Weis F. T. (ur.) *Petroleum in the Marine Sediment*, American Chemical Society, Washington, D. C., str. 289-337.
- Hodgson E. (1983): Modification of metabolism. U: Hodgson E., Levi P. E. (ur.) *A textbook of modern toxicology*, Elsevier, New York-Amsterdam, str. 85-121.
- Izvještaj (2008) Ispitivanje one iš enja u sedimentu potoka Gorjak. Izvještaj o izvršenim analizama po Ugovoru br. 70-07-4636/29 za provedbu analiza uzoraka mulja u okviru istražnih radova na utvrđivanju stanja u potoku Gorjak. Institut „Ruđer Bošković“, Zagreb.

James M. O. (1986): Xenobiotic conjugation in fish and other aquatic species. U: Paulson G. D., Caldwell J., Hutson D. H., Menn J. J. (ur.) Xenobiotic Conjugation Chemistry., American Chem. Society, Washington D. C., str. 29-74.

Kaden D. A., Hites R. A., Thilly W. G. (1979): Mutagenicity of soot and associated polycyclic aromatic hydrocarbons to *Salmonella typhimurium*. Cancer Res. **39**: 4152-4159.

Kapitulnik J., Vislocki P. G., Levin W., Yagi H., Jerina D. M., Conney A. H. (1978): Tumorigenicity studies with diol epoxides of benzo(a)pyrene which indicate that (+)-trans-7,8-dihydroxyepoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene is an ultimate carcinogen in newborn mice. Cancer Res. **38**: 354-358.

Karickhoff S. W., Morris K. R. (1985): Impact of tubificid oligochetes on pollutant transport in bottom sediments. Environ. Sci. Technol. **19**: 51-61.

Klotz A. V., Stegeman J. J., Walsh C. (1984): An alternative 7-ethoxyresorufin O-deethylase activity assay: a continuous visible spectrophotometric method for measurement of cytochrome P-450 monooxygenase activity. Anal. Biochem. **140**: 138-145.

Koss G. (1994): Kohlenwasserstoffe. U: Marquardt H., Schäfer S. G. (ur.) Toxikologie. Wissenschaftsverlag, Mannheim, str. 369-404.

Koss G. (1994): Polychlorierte biphenyle (PCB). U: Marquardt H., Schäfer S. G. (ur.) Toxikologie. Wissenschaftsverlag, Mannheim, str. 417-434.

Kurelec B., Britvi S., Rijavec M., Müller W. E. G., Zahn R. K. (1977): Benzo(a)pyrene monooxygenase induction in marine fish-molecular response to oil pollution. Marine Biology. **44**: 211-216.

Kurelec B. (1982): Biološki efekti nekih najznačajnijih zagađivala morskog ekosistema. Pomorski zbornik. **20**: 521-534.

Kurelec B. (2000): Ekotoksikologija i znanost o okolišu. Klinička ekotoksikologija, Zagreb.

Kutuzovi i Hackenberger B. (1999): Indukcija aktivnosti 7-etoksiresorufin-O-deetilaze i inhibicija aktivnosti acetilkolin-esteraze u jetri babuške (*Carassius auratus gibelio*) u jetri babuške rijeke Drave i Dunava, Magistarski rad, Sveučilište u Zagrebu, Poslijediplomski studij prirodnih znanosti, Biologija – toksikologija.

Lee R. F., Gardner W. S., Anderson J. W., Blaylock J. W., Barwell-Clarke J. (1978): Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in controlled ecosystem enclosures. Environ. Sci. Technol. **12**: 832-838.

Lorenzen A., Kennedy S. W., Bastien L. J., Hahn M. E. (1997): Halogenated aromatic hydrocarbon-mediated porphyrin accumulation and induction of cytochrome P4501A in chicken embryo hepatocytes. Biochem. Pharmacol. **53**: 373-384.

Lutz W. K. (1979): In vivo covalent binding of organic chemicals to DNA as a quantitative indicator in the process of chemical carcinogenesis. Mutation Res. **65**: 289-356.

- Mix M. C. (1984): Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment: occurrence and biological monitoring. U: Hodgson E. (ur.) Reviews in Environmental Toxicology, Elsevier/North Holland, Amsterdam. **50**: 51-133.
- Mocarelli P., Needham L. L., Marocchi A., Patterson D. G., Brambilla P., Gerthoux P. M., Meazza L., Carreri V. (1991): Serum concentrations of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and test results from selected residents of Seveso, Italy. Journal of Toxicology and Environmental Health. **32, 4**: 357-366.
- National Institute of Water and Atmospheric Research (NIWA), 1998. Freshwater Algae (*Selenastrum capricornutum*) – Chronic Toxicity Test Protocol. NIWA Ecotoxicology Laboratory, Wellington, New Zealand.
- Neff J. M. (1979): Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment: sources, fates and biological effects. Appl. Sci. Publishers Ltd., Barking.
- Niaussat P., Auger C. (1970): Distribution of benzo(a)pyrene and perylene in various organisms of the Clipperion Lagoon ecosystem. C. R. Acad. Sci., Paris, Ser. D270. 1909-2112.
- Payne J. F. (1984): Mixed-function oxygenases in biological monitoring programs: review of potential usage of different phyla of aquatic animals. U: Persone G., Jasper E., Claus C. (ur.) Ecotoxicological Testing for the Marine Environment, State Univ., Ghent and Inst. Mar. Scient. Res., Bredene, Belgium. 1, str. 625-655.
- Payne J. F., Fancey L. L., Rahimtula A. D., Porter E. L. (1987): Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring. Comp. Biochem. Physiol. **86C**: 233-245.
- Prahl F. G., Crelius E., Carpenter R. (1984): Polycyclic aromatic hydrocarbons in Washington coastal sediments: an evaluation of atmospheric and riverine routes of introduction. Environ. Sci. Technol. **18**: 687-694.
- Probst M. R., Reisz-Porszasz S., Agbunag R. V., Ong M. S., Hankinson O. (1993): Role of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein in aryl hydrocarbon (dioxin) receptor action. Mol. Pharmacol. **44**: 511-518.
- Rifkind A. B., Muschick H. (1983): Benzoxaprofen suppression of polychlorinated biphenyl toxicity without alteration of mixed-function oxidase function. Nature. 303: 525-526.
- Riviere J. L., Cabbane F. (1987): Animal and plant cytochrome P-450 systems. Biochemie. **69**: 743-752.
- Sagunski H., Perger G. (1994): Biozide. U: Marquardt H., Schäfer S. G. (ur.), Toxikologie. Wissenschaftsverlag, Mannheim, str. 439-480.
- Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity for Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms (EPA, 2002).

- Stegeman J. J. (1981): Polynuclear aromatic hydrocarbons and their metabolism in the marine environment. U: Gelboin H. V., Tso P. O. P. (ur.) Polycyclic hydrocarbons and cancer, Academic Press, New York. 3, str. 1-60.
- Stegeman, J. J., Lech J. J. (1991): Cytochrome P-450 Monooxygenase Systems in Aquatic Species: Carcinogen Metabolism and Biomarkers for Carcinogen and Pollutant Exposure. *Environmental Health Perspectives* **90**: 101-109.
- Stich H. F., Dunn B. P. (1980): The carcinogenic load of the environment: Benzo(a)pyrene in sediments of arctic waters. *Arctic* **33**: 807-813.
- Tan, Y.L., Heit M. (1981): Biogenic and Abiogenic Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in Sediment from Two Remote Adirondack Lakes. *Geochimica Cosmochimica Acta* **45**: 2267-2279.
- Thakker D. R., Yagi H., Koreeda M., Lu A. Y. H., Levin W., Wood A. W., Conney A. H., Jerina D. M. (1977): Metabolism of benzo(a)pyrene: VI. Stereoselective metabolism of benzo(a)pyrene and benzo(a)pyrene 7,8-dihydrodiol to diol epoxides. *Chem. Biol. Interact.* **16**: 281-300.
- Thakker D. R., Yagi H., Lehr R. E., Levin W., Buening M., Lu A. Y. H., Chang R. L., Wood A. W., Conney A. H., Jerina D. M. (1978): Metabolism of trans-9-10-dihydroxy-9,10-dihydrobenzo(a)pyrene occurs primarily by arylhydroxylation rather than formation of a diol epoxides. *Mol. Pharmacol.* **14**: 502-513.
- Villeneuve D. L., Crunkilton R. L., DeVita W. M. (1997): Aryl hydrocarbon receptor-mediated toxic potency of dissolved lipophilic organic contaminants collected from Lincoln Creek, Milwaukee, Wisconsin, USA, to PLHC-1 (*Poeciliopsis lucida*) fish hepatoma cells. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**: 977-984.
- Whyte J. J., van den Heuvel M. R., Clemons J. H., Huestis S. Y., Servos M. R., Dioxin D. G., Bols N. C. (1998): Mammalian and teleost cell line bioassay and chemically derived 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin equivalent concentrations in lake trout (*Salvelinus namaycush*) from Lake Superior and Lake Ontario, North America. *Environ. Toxicol. Chem.* **17**: 2214-2226.
- Windsor J. T., Hites R. A. (1979): Transport of polycyclic aromatic hydrocarbons across the Gulf of Maine. *Geochem. Cosmochim. Acta.* **43**: 27-32.
- Wislocki P. G., Wood A. W., Chang R. L., Levin W., Yagi H., Hernandez O., Jerina D. M., Conney A. H. (1976): High mutagenicity and toxicity of a diol-epoxide derived from benzo(a)pyrene. *Biochem. Res. Comm.* **3**: 1006-1012.
- Yang S. K., McCourt D. V., Roller P. P., Gelboin H. V. (1976): Enzymatic conversion of benzo(a)pyrene leading predominantly to the diol-epoxide *r*-7,8-dihydroxy *t*-9,10-oxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene through a single enantiomer of *r*-7, *t*-8-dihydroxy 7,8-dihydroxy 7,8-dihydrobenzo(a)pyrene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **73**: 2594-2598.
- Yang S. K., Deutsch J., Gelboin H. V. (1978): Benzo(a)pyrene metabolism: activation and detoxification. U: Gelboin H. V., Tso P.O.P. (ur.) Polycyclic Hydrocarbons and Cancer, Academic Press, New York. 1, str. 205-232.

Anaesthetist.com (2009), Cytochrome P450. Raspoloživo na:
<http://www.anaesthetist.com/physiol/basics/metabol/cyp/Findex.htm>

Gestis (2009), Database on hazardous substances. Raspoloživo na:
<http://biade.itrust.de/biade/lpext.dll?f=templates&fn=main-hit-h.htm&2.0>

Ontario (2009), Ministry of the Environment. Raspoloživo na:
<http://www.ene.gov.on.ca/cons/681e01.htm>

PAH factsheet (2009), European Community Reference Laboratory for PAHs.
Raspoloživo na:
http://irmm.jrc.ec.europa.eu/html/CRLs/crl_pah/about_pahs/JRC_50087_EN_CRL_PAH_factsheet.pdf

Policikli ki benzenoidni ugljikovodici (s kondenziranim prstenovima) (2009), Skripta Zavoda za primijenjenu kemiju i ekologiju, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Sveu ilište Josipa Jurja Strossmayera, Osijek. Raspoloživo na:
<zk.ptfos.hr/policiklicki%20aromati.ppt>

Sigma Aldrich (2009), Accelerating Customers' Success through Innovation and Leadership in Life Science, High Technology and Service. Raspoloživo na:
http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=P1802|ALDRICH&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC

Smith College (2009), Biochemistry. Raspoloživo na:
<http://www.science.smith.edu/departments/Biochem/>

SpringerLink (2009), Investigation of Structure – Biodegradability Relationships in Polychlorinated Biphenyls Using Self-Organising Maps. Raspoloživo na:
<http://www.springerlink.com/content/1jwu6n4a0y1xgflr/>

Toksikanti u hrani (2009), Skripta Zavoda za ispitivanje hrane i prehrane, Prehrambeno tehnološki fakultet, Sveu ilište J.J. Strossmayera, Osijek. Raspoloživo na:
http://zhp.ptfos.hr/filez/th/tox07-klorirani_ugljikovodici_PAH_n.ppt

VUSTAH (2009), Research Institute of Building Materials, Research, development, production, realization and consultancy in sphere of building materials. Raspoloživo na:
<http://www.vustah.cz/en/zlatelab.htm>