

# **Određivanje toksičnosti uzorka 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://urn.nsk.hr/um:nbn:hr:217:311475>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-28**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prirodoslovno-matematički fakultet**  
**Biološki odsjek**

**Ivana Šestak**

**ODREIVANJE TOKSIČNOSTI 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. Tvrтka Smitala. Istraživački dio ovog rada financiran je sredstvima te projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa RH, br. projekta 098-0982934-2745 (*Ekotoksikološko znanje 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. Tvrtsku Smilatu na svesrdnoj pomo i tijekom izrade i osmišljavanja ovog diplomskog rada. Posebno hvala dipl. inž. Jovici Lonaru na objašnjenjima obrade podataka i pomo i pri provedbi testova, hvala dr. sc. Branki Pivevi na brojnim korisnim informacijama. Hvala mojoj obitelji i rodbini, prijateljima i deku na podršci tijekom cijelog školovanja, a posebno hvala kolegicama Petri Mari, Petri Svobodi i Nini Marn te drugim kolegama na nesebi nom pružanju znanja tijekom svih ovih godina.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveu ilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matemati ki fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

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

Ivana Šestak

Institut „Ru er Boškovi“, Zavod za istraživanje mora i okoliša, Laboratorij za molekularnu ekotoksikologiju, Bijeni ka cesta 54, 10001 Zagreb

Brojna teško razgradiva organska zaga ivala (eng. *Persistent Organic Pollutants; POPs*) poput polikloriranih dibenzo-*p*-dioksina i furana (PCDD/F), polikloriranih bifenila (PCB), polikloriranih naftalena (PCN) i policikli kih aromatskih ugljikovodika (PAH) izrazito su toksi na. POP-sovi u okoliš naj eš e dospijevaju industrijskim otpadnim vodama. Ispuštanjem nepro iš enih industrijskih otpadnih voda u potok Gorjak, tvrtke Pliva Hrvatska d.d. i Kvasac d.o.o. desetlje ima predstavlju problem za širu zajednicu. Cilj ovog istraživanja bio je odrediti razinu toksi nosti sedimenta potoka Gorjak pomo u dva biotesta: (1) testa kroni ne toksi nosti (inhibicija rasta zelene alge *Scenedesmus subspicatus*); te (2) EROD testa odre ivanja aktivnosti stani nog detoksikacijskog sustava oksidaza miješanih funkcija. Testom kroni ne toksi nosti mjerili smo razrje enja uzoraka sedimenta pri kojima je dosegнутa 50%-tna inhibicije rasta alge *S. subspicatus* (IC50) u odnosu na kontrolnu grupu. Odredili smo EC50 vrijednosti koje predstavljaju ekvivalentnu koli inu sedimenta, te izra unali toksi ne jedinice (TJ) dobivene prema izrazu  $TJ = 100 / EC50$ . Izvo enjem EROD testa izra unali smo TCDD toksi ne ekvivalente (TCDD TEQ). Rezultati pokazuju visoku toksi nost sedimenata na svim lokacijama, uz izrazito visoke vrijednosti neposredno nakon isputa industrijskih otpadnih voda spomenutih tvrtki.

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

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici Prirodoslovno-matemati kog fakulteta, Maruli ev trg 20/II, 10000 Zagreb

Klju ne rije i: POP, biotestovi, kroni na toksi nost, EROD, TCDD TEQ

Voditelj: Dr.sc.Tvrto Smilal

Suvoditelj: Dr. sc. Goran Klobu ar, doc.

Ocenjitelji: Dr. sc. Tvrto Smilal, znan. sur. IRB

Dr. sc. Goran Klobu ar, doc.

Dr. sc. Mirjana Pavlica, prof.

Dr. sc. Željka Vidakovi Cifrek, doc.

Rad prihva en: 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  $TU = 100 / EC50$ . 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. Tvrko Smital

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

Reviewers: Dr. Tvrko Smital

Dr. Goran Klobučar, Asst. Prof.

Dr. Mirjana Pavlica, Prof.

Dr. Željka Vidaković Cifrek, Asst. Prof.

Thesis accepted: 06. 05. 2009.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	
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. Određivanje količine toksičnosti .....	17
1.5.1. Zelena alga <i>Selenastrum subspicatus</i> .....	17
1.5.2. Test inhibicije rasta jednostanične alge vrste <i>Selenastrum subspicatus</i> .....	18
1.6. Cilj istraživanja.....	20
<b>2. MATERIJALI I METODE .....</b>	
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 jednostanične alge vrsta <i>Selenastrum subspicatus</i> .....	26
2.3. Tijek testa EROD.....	32
2.4. Tijek testa inhibicije rasta jednostanične alge vrsta <i>Selenastrum subspicatus</i> .....	34
<b>3. REZULTATI .....</b>	

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 ekvivalenta (TCDD TEQ).....	41
3.2. Test inhibicije rasta jednostanične alge vrste <i>Selenastrum subspicatus</i> .....	44
<b>4. RASPRAVA .....</b>	<b>50</b>
<b>5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>54</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>55</b>

## KRATICE

- AhR** - arilhidrokarbonski receptor, (eng. *Aril Hydrocarbons Receptor*)
- ARNT** - Ah-receptorski nuklearni translokator
- EROD** - etoksiresorufin-*O*-deetilaza
- FAD** - flavin adenin dinukleotid
- hsp90** – „heat-shock“ protein
- POP** - teško razgradiva organska zaga ivala (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*), najve a koncentracija testne tvari koja ne uzrokuje statisti ki mjerljivi u inak na sustav
- PAH** – policikli ki aromatski ugljikovodici (eng. **Polynuclear Aromatic Hydrocarbons**)
- PCB** - poliklorirani bifenili
- PLHC-1** – stani na 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** – razrje enje uzorka koje je uzrokovalo 50%-tnu inhibiciju rasta testnog organizma (eng. *inhibitory 50 concentration/dillution*)
- LID** – najmanje razrje enje koje je uzrokovalo manje od 5 % inhibicije rasta testnih organizama (eng. *lowest ineffective dillution*)
- LC50** – koncentracija testne tvari koja uzrokuje smrtnost za 50% životinja (eng. *lethal concentracion 50*)
- TJ** – toksi ne jedinice
- DMSO** - dimetil-sulfoksid
- YES** – eng. **Yeast Estrogen Screen**
- FBS** – fetalni gove i serum (eng. **Fetal Bovine Serum**)
- PBS** – fosfatni pufer (eng. **Phosphate Buffered Saline**)
- BSA** – gove i serumski albumin (eng. **Bovine Serum Albumin**)
- EC<sub>x</sub>** - koncentracija testnog uzorka koja rezultira redukcijom  $x$  postotka specifi ne stope rasta u odnosu na kontrolu
- DMEM** – eng. **Dulbecco's Modified Eagle Media**
- MEM** – minimalni esencijalni medij
- TEF** – faktor toksi ne jednakosti (eng. **Toxicity Equivqlency Factor**)
- TEQ** – toksi ni ekvivalent (eng. **Toxicity Equivalent**)
- FEL-TEQ** – toksi ni ekvivalenti na zadanoj razini u inka (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, ovjekovom aktivnošću stvorene „nove kemijske tvari“, esto su neprepoznatljive i/ili u energetskom ili strukturnom smislu neiskoristive za živa biota. Velik broj ksenobiotika zbog toga se sporo razgrađuje i posljedi u gomila u okolišu (Kurelec, 1982).

Znanost koja prepoznaže i procjenjuje u inke 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 upotrebostrukturnih (raznolikost, međuzavisnost, rasprostranjenost) i funkcionalnih (produkacija, potrošnja, kolanje hrane i energije, evolucija) parametara ekosustava. Toksi ne reakcije koje mjeri ekotoksikologija su patološki što raniji odgovori na biokemijskoj, imunološkoj, fiziološkoj ili organizmi koji 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.

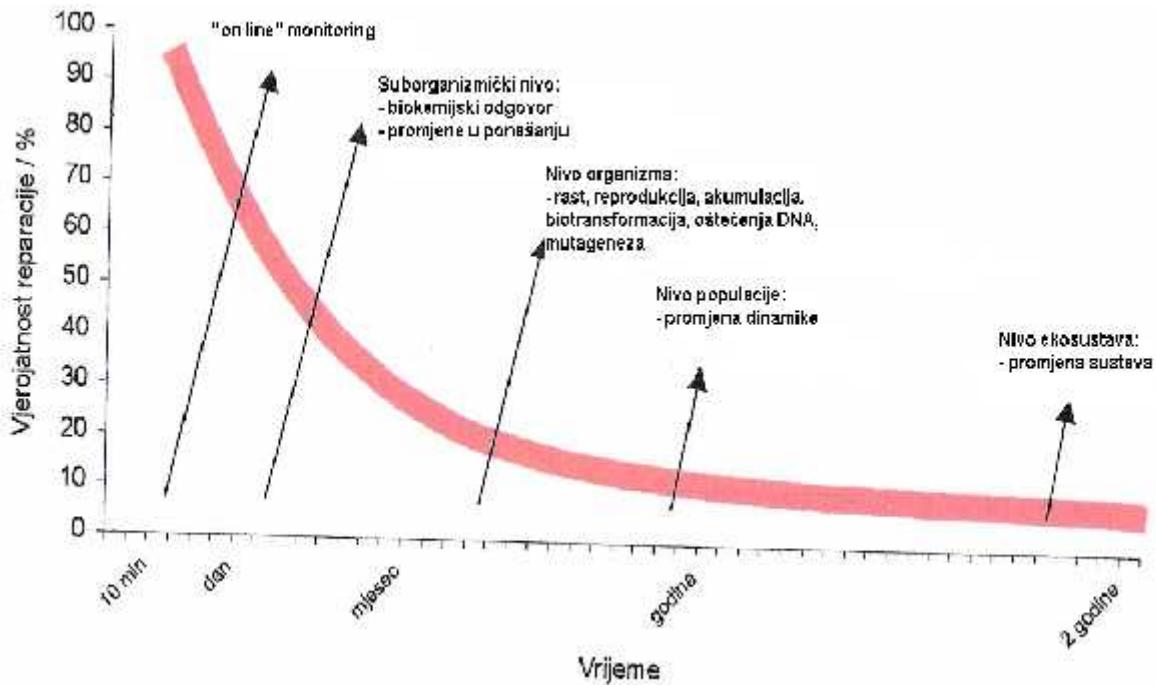
Akutna se toksičnost određuje na test-životinjama, a jedno od osnovnih mjerila toksičnosti (eng. *end-point*) jest LD50 ili LC50. Procjena subakutne toksičnosti nema jedinstveno mjerilo, a štetnost se može zapažati od promjene u ponašanju do, na pr., promjena na koži. Ključno mjerilo u tom slučaju je 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 ovjeka primjenom arbitarnog multiplikativnog faktora, tzv. sigurnosnog faktora. Uobičajeno, taj je faktor 100, od čega je 10 za međusudaru (eng. *interspecies*), a 10 za unutarudsnu (eng. *intraspesies*) varijaciju. Svrha je ove procjene da definira „sigurnosnu razinu“, pa se zbog ugrađene eksperimentalne nesigurnosti arbitarni faktor esto uvećava na 1000.

Procjena kronične toksičnosti esto 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. ovjeka, koja će predstavljati rizik od npr. pojave jednog slučaja raka na milijun izloženih ljudi. Umjesto „sigurnosne razine“, tuemo

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

Okolišni ili ekotoksikološki biomarkeri su rane promjene na molekularnoj ili fiziološkoj razini uzrokovane fizikalnim ili kemijskim zagaivalom (Kurelec, 2000). Danas su biomarkeri nezaobilazni sastavni dio procesa procjene okolišnog rizika i svakog programa za praenje (monitoring) okoliša. Oni uspješno nadopunjaju 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 i simptomima zapaženim u prirodi. Stvarnu velinu izloženosti možemo mjeriti jedino pokazateljima koji mjeru koncentraciju ksenobiotika na ciljnoj molekuli, npr. molekuli DNA. U slučaju izloženosti policiklickim aromatskim ugljikovodicima (eng. **Polynuclear Aromatic Hydrocarbons, 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 uinkovitu zaštitu cjelokupnih sustava potrebno je pravodobno detektirati pojavu promjena u njima. Brzina pojave promjene uzrokovanih nekim zagaivalom, 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 jest je jednaka vjerojatnosti da će isti ekološki sustav, bilo puterskim 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 uoči 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 mjeru 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 (mjerjenje biološkog učinka). Samo takva mjerjenja, za razliku od mjerjenja 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 zaga ivala (eng. *Persistent Organic Pollutants; POPs*) (npr. PCB-ova u zadnjih par desetlje a), oni još uvijek imaju jednako veliku važnost u okolišu, a njihova okolišna kemija i ekotoksikologija podru je je sve naprednijeg i šireg istraživanja. Visoke koncentracije pojedinih POPs-ova posljedice su njihovog potencijala za dalekosežnim zra nim rasprostiranjem u udaljena podru ja, bioakumulacije zbog op enito 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 toksi ni (dibenzodioksini su najtoksi nije tvari antropogenog podrijetla) (Kutuzovi Hackenberger, 1999), uklju uju kancerogene u inke na reproduktivni sustav, atrofiju timusa, gubitak tjelesne mase i akutnu letalnost kod sisavaca. Smatra se da su mnogi od ovih u inaka posredovani preko arilhidrokARBonskog receptora (AhR). Vezanjem na AhR, dioksini, PCB-ovi, i/ili PAH-ovi pokre u kaskadu stani nih doga aja koja vodi do poja ane ekspresije citokroma-P4501A (CYP1A) gena i s tim povezane kataliti ke aktivnosti 7-etoksiresorufin-*O*-deetilaze (Brack i sur., 2000).

### 1.2.1. Policikli ki aromatski ugljikovodici

Još sedamdesetih godina velika se pažnja po eli obra ati utvr ivanju podrijetla, prisutnosti i mehanizmima djelovanja policikli kih aromatskih ugljikovodika, budu i da je to skupina organskih spojeva koja uklju uje i tvari s kancerogenim djelovanjem, pa je stoga važna kako po kriteriju njihove štetnosti za okoliš, tako i po kriteriju štetnosti po zdravlje ovjeka (Stegeman, 1981).

Svaka prirodna voda sadrži odre enu koli inu prirodnih PAH-ova, ak i u podru jima znatno udaljenim od antropogenog utjecaja (Windsor i Hites, 1979). PAH-ovi su na eni u atmosferskim esticama (Prahl i sur., 1984), slatkoj i morskoj vodi, vodenim organizmima (Gardner i sur., 1979; Karickhoff i Morris, 1985), razli itim sedimentima i u tlu (Hites i sur., 1980). Jedan od najvažnijih predstavnika PAH-ova, benz[*a*]piren, prona en 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 zaga enja.

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).

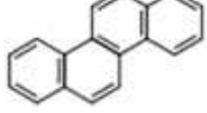
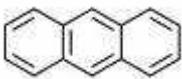
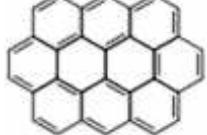
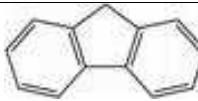
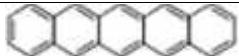
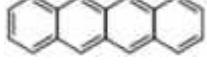
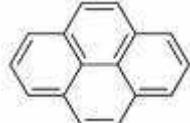
Nepostojanje većih koncentracija tih tvari u prirodi pokazuje da one bivaju metabolizirane unutar okoliša te da zato to stanje predstavlja zapravo stanje ravnoteže između ulaska (nastanka) i (bio)degradacije PAH-ova u okolišu (Lee i sur., 1978).

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

PAH-ovi nastaju uglavnom kao nusproizvodi, međuproizvodi ili krajnji proizvodi 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 smeće. Ostali izvori su ispusti i ispusi termoelektrana, asfaltnih baza, rafinerija itd. (Mix, 1984).

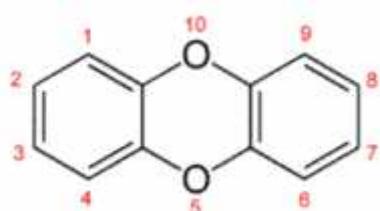
PAH-ovi ulaze u vodenim okolišima na razne načine: ispiranjem površina oborinskim vodama, otpadnim vodama iz industrije (Harrison i sur., 1978), otjecanjem gradskih površinskih voda nakon padavina, otpadnim vodama domaćinstava (Berrick, 1982) i izljevima nafte, i načinima varira od ispuštanja goriva u marinama do velikih izljeva u slučaju havarija naftotransportnih 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	

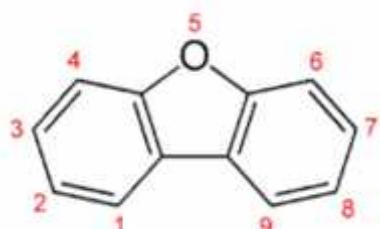
### 1.2.2. Poliklorirani dibenzodioksini i dibenzofurani

Za poliklorirane dibenzodioksine (PCDD) esto se u literaturi upotrebljava kra i naziv: dioksini. To nije posve to no jer je dioksin naziv za relativno jednostavan heterocikli ki spoj, 1,4-dioksin ili p-dioksin. Ipak u svijetu je naziv dioksin široko prihva en kao sinonim za 2,3,7,8-tetraklor-dibenzo-dioksin (TCDD) (Baird, 1995), dok se dioksinima nazivaju svi spojevi takve tricikli ke, dibenzodioksinske strukture s diokskim prstenom izme u dva benzenska (kongeneri) (Slika 2).



**Slika 2.** Struktura formula dibenzodioksina (Ontario, 2009).

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



**Slika 3.** Struktura formula dibenzofurana (Ontario, 2009).

injenica koja ovu grupu kemijskih spojeva ini izuzetno zanimljivom sa stajališta ekotoksikologije je da se niti jedan od ovih spojeva ne proizvodi ciljano, ve se svi javljaju ili kao neželjeni nusprodukti ili kao intermedijeri u razli itim kemijsko-tehnološkim postupcima. Jedan od zna ajnih kemijsko-tehnoloških postupaka pri kojem nastaje znatna koli ina 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

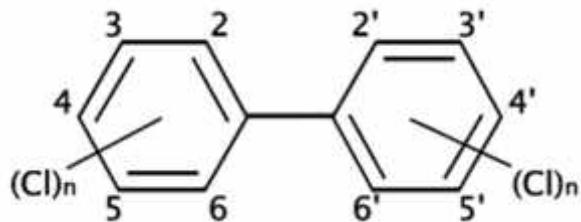
prethodno tretiran zaštitnim sredstvom na bazi pentaklorfenola (PCP), ili bilo koja druga tvar koja sadrži neki klorirani fenol, pod utjecajem povišene temperature, dovoljno velike za pobuivanje reakcije, ali nedovoljno visoke za potpuno izgaranje, određeni dio je, uz eliminaciju klorovodika, stvarati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

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

Može se reći 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 organoklornih kemijskih spojeva koji se sastoje od dva međusobno spojena fenilna prstena (Slika 4). Postoji 209 različitih kongenera PCB-a. Ovi spojevi svoj najveći znajak 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, već uvijek miješavina nekoliko različitih PCB-ja. Na osnovi namjene sintetizirale su se više ili manje klorirane smjese, pri čemu se viskoznost i gustoća povećava s povećanjem količine klora (Koss, 1994).

U okoliš PCB-ji dospijevaju industrijskim otpadnim vodama prilikom remonta, nesrećama pri havarijama trafo-stanica, procije ivanjem s otpada na koji su bili transformatori itd. Već znaće da PCB-ji imaju za stvaranje dibenzofurana. Naime, gorenjem pri temperaturama nedovoljnim za potpuno izgaranje, od polikloriranih bifenila lako nastaju poliklorirani dibenzofurani, spojevi daleko toksičnijih karakteristika. Zbog toga sve navedene izvore PCDD i PCDF možemo smatrati i izvorima PCB-a, i obrnuto (Kutuzović Hackenberger, 1999).

### **1.3. Biološka aktivacija policikli kih 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 razliti egzogene tvari (ksenobiotike), među kojima ima aromatskih ugljikovodika i njihovih derivata. Biološke oksidacije općenito obuhvataju 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 čemu 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.

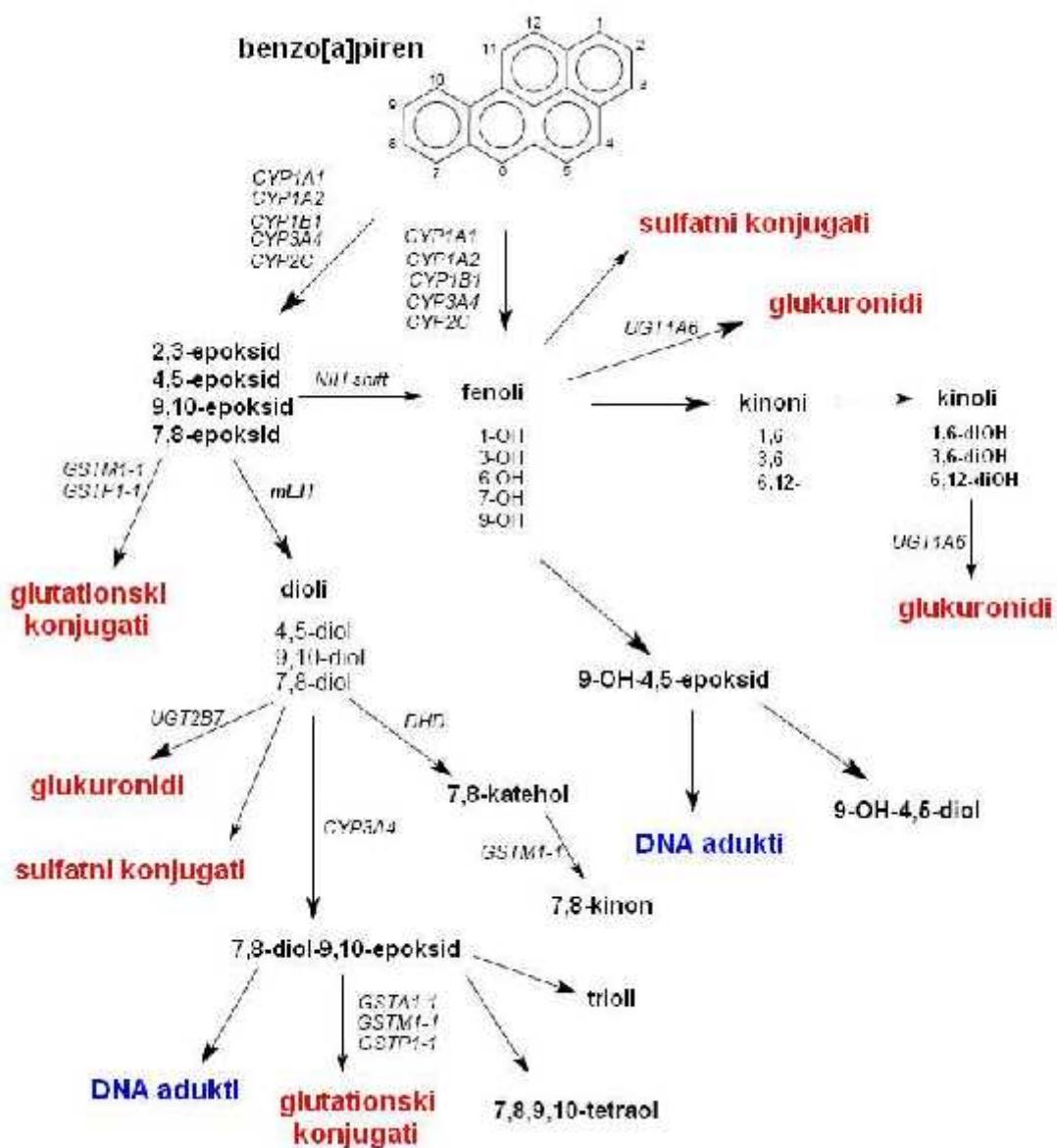
Reakcije monooksigenaza predstavljaju prvi stupanj u oksidaciji ksenobiotika viših organizama. U tom se koraku ksenobiotici oksidiraju uz pomoć citokroma-P450, hemoproteina koji reagira s molekularnim kisikom aktivirajući ga kako bi se vezao za supstrat.

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

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

Daljni 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 različitu biološku aktivnost uključujući 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 (Kutuzović Hackenberger, 1999).



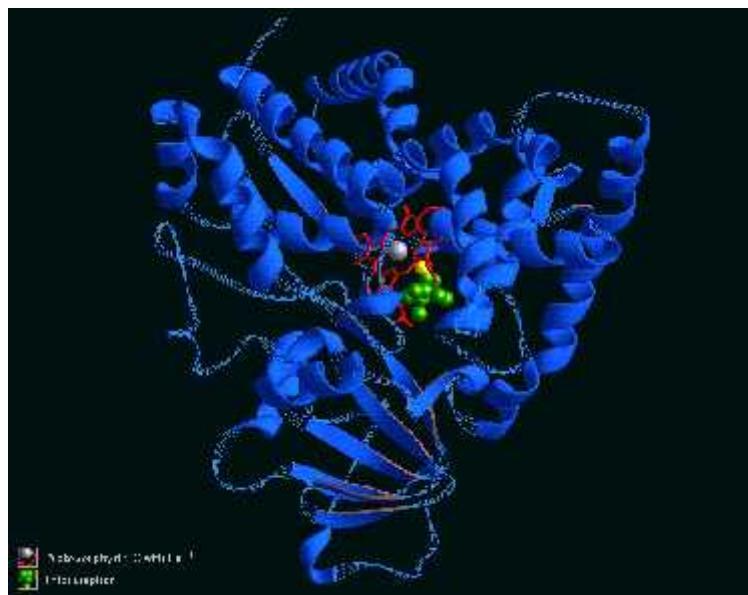
**Slika 5.** Primjer metabolizma benz[a]pirena preko oksidaza miješanih funkcija (Toksični u hrani, 2009).

## 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 načinu na koji mijenjaju apsorpcijski spektar citokroma-P450. Najvažniji diferencijalni spektar oksidiranog citokroma-P450 ima ligandi tipa I, sa apsorpcijskim maksimumom oko 385-390 nm i minimumom oko 420 nm. Ligandi ovog tipa su različiti po kemijskom sastavu i u njih su uključeni lijekovi, okolišna zagađivači, insekticidi, itd. Ligandi tipa II uzrokuju vrh kompleksa pri 420-435 nm i minimum pri 390-410 nm. Svaki ovakav ligand je ester 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 većom od 40% svrstani su u jednu obitelj. Do sada je opisano sedamdeset i etiri takvih obitelji (*Familiae*) (Anaesthetist.com, 2009). Unificirana nomenklatura propisana 1991. godine uzima u obzir kraticu „CYP“ za nadobitelj (*superfamiliae*) i sugerira puno itljivije 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 gairdneri* (Conney, 1967). Sustav monooksigenaza s citokromom-P450 otkriven je kod mnogih insekata. Većina citokroma-P450 beskralježnjaka i riba je usporedljiva 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 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 nazoru naći ksenobiotika uvećati (inducirati). Kemijske osobine i farmakološka aktivnost poznatih tvari koje induciraju oksigenaze miješanih funkcija su različite i njihova je jedina zajednica 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 osloba anja s enzimima (Payne, 1984).

Induceri monooksigenaza mogu se najop enitije podijeliti na dva tipa: tip fenobarbitala (u koji spadaju mnoge kemikalije, posebno lijekovi i insekticidi) i tip 3-metilkolanrena (u koji spadaju policikli ki ugljikovodici kao npr. benz[*a*]piren). Mnogi induceri moraju se primjeniti u relativno visokim dozama da bi bili u inkoviti. Veli ina 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 metilkolanrenskog tipa ne uzrokuje proliferaciju glatkog endoplazmatskog retikuluma, iako tako rade 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 dospije u ksenobiotika u citoplazmu on se veže (ukoliko po građa 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-receptorem 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 metilkolanrenskog tipa ne inducira jednako jako transkripciju svih enzima kompleksa Ah-gena.

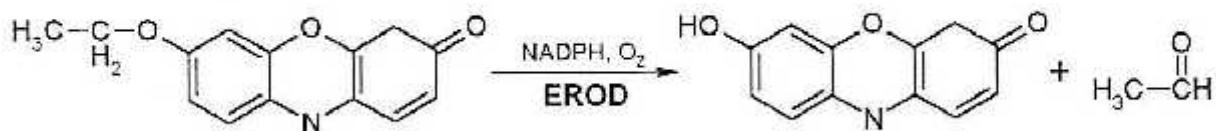
Ah-receptor posjeduje vezno mjesto za velike planarne, hidrofobne ligande. S obzirom na veličinu ligandi se mogu podijeliti u dvije skupine. Još nije sasvim jasno posjeduje li Ah-receptor dva vezna mjesta ili postoje dvije subpopulacije Ah-receptora.

Na manje vezno mjesto idealno odgovaraju PCDD i PCDF, pogotovo njihovi tetraklorni 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 ultimativnih mutagena) iz inkubacijskog medija i mjerenu njegove kolичine pomoću spektrofotometrijskih te brzih, direktnih fluorimetrijskih metoda za mjerjenje enzimske aktivnosti.

Jedna od takvih je i metoda mjerjenja 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 omogućuje mjerjenje EROD aktivnosti vrijednim za kvalitativnu procjenu aktivnosti OMF induciranih izlaganjem organizama brojnim okolišnim zagađivalima (Payne i sur., 1987).

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

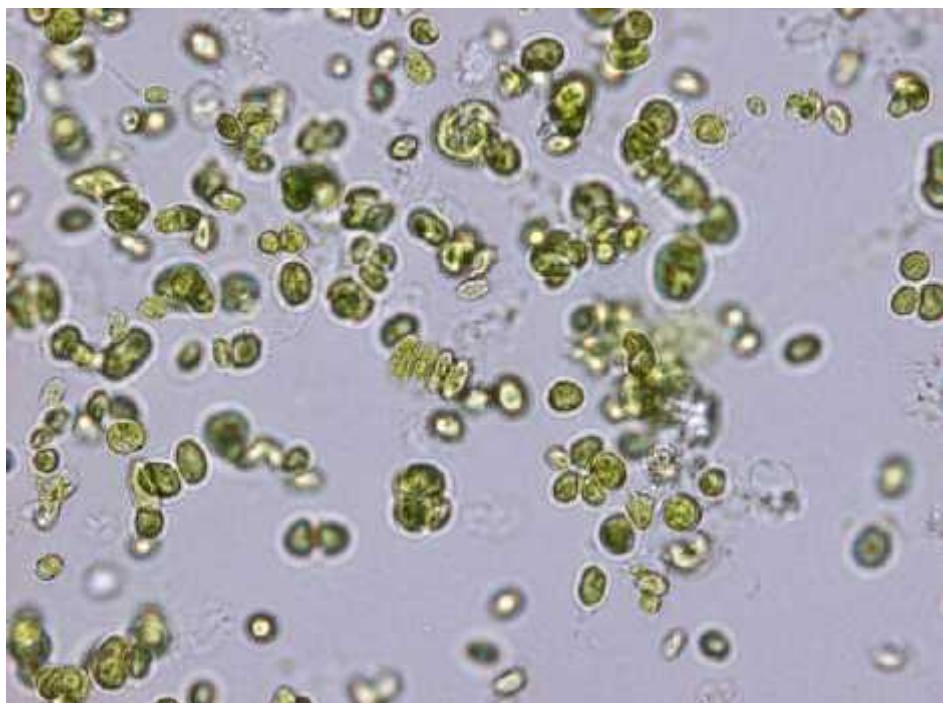
katalizira CYP1A (EROD), supstrat se prevodi u fluorescentni produkt rezorufin koji se mjeri fluorimetrijski na specifičnim ekscitacijskim i emisijskim valnim duljinama (535/590 nm).

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 indukcijskog potencijala u *in vitro* uvjetima temelji se na izlaganju stanica u primarnoj ili trajnoj kulturi. Za mjerenje indukcijskog potencijala okolišnih uzoraka u ekotoksikologiji najčešće je korištena stanična linija je PLHC-1. PLHC-1 stanice roblje 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, jednostani na zelena alga (Chlorophyceae) okruglog oblika ( $40$  do  $60 \mu\text{m}^3$ ) koja je estuarijini slatkih voda. Ova alga se jednostavno kultivira, a i lako je dostupna od dobavljava a. Njihova morfologija ima ih idealnima za brojanje pomoću elektronskog broja a estica. 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 ekivati 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 upotrebori 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 metabolizu, 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 obično izražava kao ono razrje enje uzorka koje je uzrokovalo 50 %-tnu inhibiciju rasta algi (eng. *inhibitory 50 concentration/dilution; IC50*); ili alternativno kao tzv. LID vrijednost (eng.

*lowest ineffective dilution),* odnosno najmanje razrje enje koje je uzrokovalo manje od 5 % inhibicije rasta algi. Dobivene vrijednosti potom se mogu prera unati i u EC50 vrijednosti koje izražavaju koliko inu uzorka potrebnu da izazove izmjereni toki ni u inak po volumenu medija, odnosno u toksi ne jedinice (TJ) koje omoguavaju 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 desetljeće ima predstavljaju problem za lokalnu i širu zajednicu. Radi se o industrijskim postrojenjima u kojima se desetljeće 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 po pojedinim toksičnim metalima. Analize otpada iz pogona «Plive» ukazale su da otpad sadrži znatne koncentracije anorganskih i organskih zagađivača. Tlo ispod i u blizini otpada sadržavalo je više koncentracije zagađivača nego sedimenti vodonosnika (Izvještaj, 2008).

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

U svrhu sanacije potoka Gorjak i njegovog dočekanja u prijašnje stanje na razinu vodotoka II. kvalitete prema važećoj nacionalnoj klasifikaciji, provedene su kemijske analize anorganskih i organskih zagađivača 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**

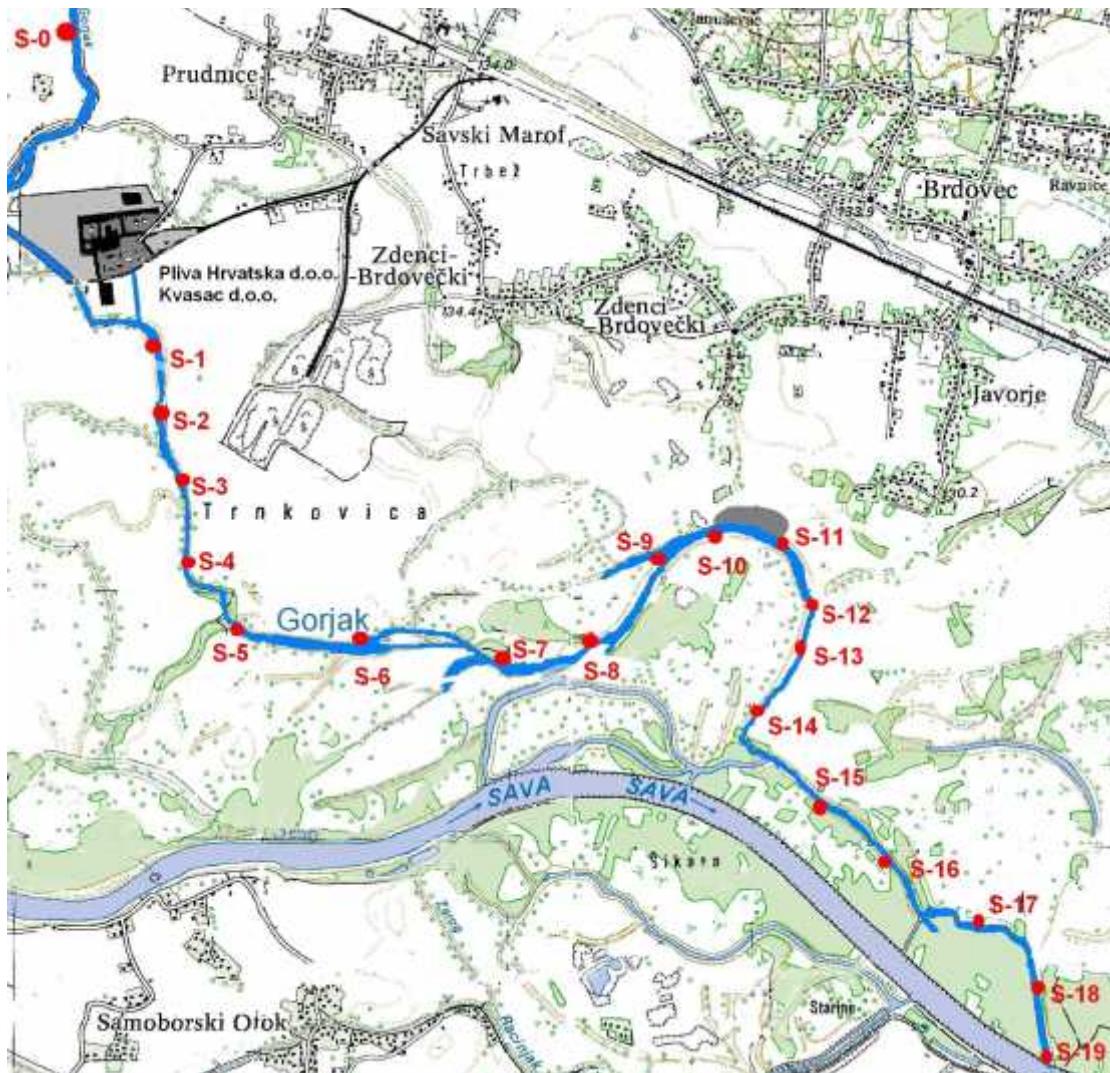
Sakupljanje uzoraka napravljeno je na 20 lokacija raspore enih uzduž potoka Gorjak, op ina Brdovec (Slika 9).

Lokacije uzorkovanja bile su raspore ene od pogona „Plive“ do utoka potoka Gorjak u rijeku Savu. Pri određivanju pozicije lokacija vodilo se ra una 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 mogućnost uzorkovanja mulja na pojedinim lokacijama s obzirom 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 plastnih koreri ili pomoću improviziranog uzorkivača za vrlo rijetki mulji 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 plasti nevreće. Također je za potrebe izoliranja porne vode iz sedimenta na svakoj lokaciji direktno uzet sediment u plasti nu bojicu i dobro zatvoren da se izolira od ulaska zraka. Prilikom uzorkovanja poduzete su odgovarajuće mjeru 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 obuhvataju referentnu lokaciju prije Plive (S0), lokaciju odmah iza Plive (S1), lokaciju koja sadrži tekući 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 uzorka

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

Za provedbu ekotoksikoloških analiza uzorka 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 jednostanih nealgi vrste *Selenastrum subspicatus*;
- 2) Određivanje biološki relevantne izloženosti zagađivača koja induciraju detoksikacijski sustav CYP1A ovisnih enzima – mjerjenjem EROD aktivnosti u kulturi ribljih PLHC-1 hepatoma stanica;
- 3) Određivanje estrogenog potencijala uzorka – korištenjem YES biotesta s genetski modificiranim sojem pekarskog kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*);
- 4) Određivanje mutagenog/genotoksičnog potencijala uzorka – 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 (gove 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 uzorka
- 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
- boice  $75 \text{ cm}^2$  za uzgoj stanica
- invertni mikroskop - Hund, Njemačka
- boca s tekućim dušikom za zamrzavanje stanica
- hemocitometar
- plastične mikroploče, sa 96 jamica ravnog dna – TPP, Trasadingen, Švicarska
- mikropipete
- fluorimetrijski instrumenti za mikroploče Fluorolite 1000 – Dynatech Laboratories Inc., Chantilly, SAD;

### 2.2.2. Test inhibicije rasta jednostanične alge vrste *Selenastrum subspicatus*

#### MATERIJALI:

- testni organizam; jednostanična alga vrste *Selenastrum subspicatus*
- deionizirana voda ; korištena u pripremi medija rasta i otopina s testnim supstancama
- hranjiva; pripremljene etiri temeljne otopine u vodi, sastav naveden u Tablici 2., otopine sterilizirane filtriranjem (promjer pora  $0,2 \mu\text{m}$ ), držane u tami na  $4^\circ\text{C}$ .
- 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, staklene 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  $0,2 \mu\text{m}$
- pH metar

**Tablica 2.** Masena koncentracija hranjiva u testnoj otopini.

<b>Temeljna otopina</b>	<b>Nutrijent (hranjivo)</b>	<b>Masena koncentracija u temeljnoj otopini</b>	<b>Kona na masena koncentracija u testnoj otopini</b>
Temeljna otopina 1: makro-hranjiva	$\text{NH}_4\text{Cl}$	1,5 g/l	15 mg/l
	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,2 g/l	12 mg/l
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,8 g/l	18 mg/l
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5 g/l	15 mg/l
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,16 g/l	1,6 mg/l
Temeljna otopina 2: Fe-EDTA	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	64 mg/l	64 $\mu\text{g/l}$
	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100 mg/l	100 $\mu\text{g/l}$
Temeljna otopina 3: elementi u tragovima	$\text{H}_3\text{BO}_3^{\text{a}}$	185 mg/l	185 $\mu\text{g/l}$
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	415 mg/l	415 $\mu\text{g/l}$
	$\text{ZnCl}_2$	3 mg/l	3 $\mu\text{g/l}$
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,5 mg/l	1,5 $\mu\text{g/l}$
	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01 mg/l	0,01 $\mu\text{g/l}$
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7 mg/l	7 $\mu\text{g/l}$
Temeljna otopina 4: $\text{NaHCO}_3$	$\text{NaHCO}_3$	50 g/l	50 mg/l
<sup>a</sup> $\text{H}_3\text{BO}_3$ može biti otopljen dodatkom 0,1 mol/l NaOH.			

### Priprema medija rasta

Medij rasta za zelene alge pripremamo dodavanjem odgovaraju ih 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 no i 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. Razlike pH vrijednosti mogu se održavati mijenjaju i koncentraciju  $\text{HCO}_3^-$  i ili atmosferskog  $\text{CO}_2$ .

### Priprema pre-kulture i nasa ivanje

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

Eksponencijani rast pre-kulture koristi se kao nasada za test. Izmjerimo stani nu guto u pre-kulti odmah prije upotrebe u svrhu izra una traženog volumena za nasa ivanje.

### Izbor koncentracija testnog uzorka

Alge se izlažu testnom uzorku u vrlo širokom rasponu geometrijskih razrje enja. Razrje enja koje trebaju biti izabrana, trebaju obuhvatiti barem jednu inhibitornu toku iznad i barem jednu ispod željenog  $E_rC_x$  parametra. Tako er, minimalno dvije inhibitorne toke (razrje enja) 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 po etka testa (npr. filtracijom ili neutralizacijom), ovisno o prirodi uzorka i svrhi 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 toksični u inak zbog izražene kiselosti ili lužnatosti. U svrhu određivanja toksičnosti uzorka neovisno o pH, prilagodimo pH vodenog uzorka ili temeljne otopine (prije serijskog razrzaja) mediju sa staničnim 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 temeljnih otopina testnih uzoraka medija rasta i nasada u testnim komorama.

Ukupni volumen, koncentracije dodanih hranjivih medija rasta i stanična gustoća treba biti ista u svim jamicama. Po etičkoj gustoći stanica treba biti dovoljno niska da omogući eksponencijalni rast u kontrolnoj kulturi stanica tijekom trajanja testa bez promjene pH više od 1,5 pH jedinica. Zbog toga po etičkoj gustoći 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<sub>2</sub> mogao ulaziti u komore. Inkubiramo testne komore na 23°C ± 2°C, ispod stalnog, bijelog svjetla.

### Mjerena

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

Test traje 72-96 ± 2 sata.

Brojanje stanica

Stanice na hemocitometru smo izbrojali pod mikroskopom, nakon ega smo koncentraciju stanica po ml izra unali po sljede oj formuli:

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

$C$ .....koncentracija stanica (broj stanica / ml)

$n$ .....srednja vrijednost broja stanica po kvadratu

Volumen stani ne suspenzije koju smo razrijedili do kona nog volumena, izra unali smo putem izraza:

$$Vs = \frac{Ca \cdot V}{C}$$

$Ca$ .....broj željenih stanica / ml

$C$ .....broj izmjereneih stanica / ml

$Vs$ .....volumen stani ne suspenzije (ml)

$V$ .....kona ni volumen medija (ml)

## 2.3. Tijek testa EROD

U ovom pokusu koristili smo PHLC-1 stanice koje smo uzgajali u boicama od  $75\text{ cm}^2$  s otprilike 20 ml medija za stanice. PHLC-1 stani su liniju održavali smo po uobi ajenom protokolu i presavali dva puta tjedno (koristili smo otopinu tripsina za odlepšivanje stanica od podloge).

Dan prije pokusa (kada je pokrivenost boice 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  $\mu\text{l}$  u istu tubicu, tome dodali još 800  $\mu\text{l}$  DMEM-a i izbrojali koncentraciju stanica pomoću hemocitrometra. Za pokus nam treba  $40-50 \times 10^4$  stanica/ml DMEM-a, 200  $\mu\text{l}$  po jamici, te smo izračunali koncentraciju stanica za nasa ivanje na mikrotitarske ploice. Napravljenu stani su suspenziju smo aseptički razdijelili 8-kanalnom mikropipetom u dvije mikrotitarske ploice s 96 jamicama, u vanjske jamice umjesto stani nih suspenzija dodali po 200  $\mu\text{l}$  miliQ vode. Pripremljene ploice stavili smo u inkubator za stanice te inkubirali 24 h na 30°C.

Prethodno napravljenoj sterilnoj otopini za pokus (DMEM mediju) dodali smo antibiotik (1  $\mu\text{l}$  antibiotika/ml DMEM) zbog sumnje na prisutnost anaerobnih bakterija u uzorku potoka Gorjak. U otopini smo potom napravili seriju dvostrukih razrješenja uzoraka (od 1:200 do 1:50000), prema Tablici 3. Razrješenja smo radili tako da smo najprije napravili najmanje razrješenje uzorka dodavanjem 4,4  $\mu\text{l}$  uzorka u 440  $\mu\text{l}$  DMEM-a. Otopinu smo nekoliko puta propuhali te prebacili 220  $\mu\text{l}$  u slijedećih 605  $\mu\text{l}$  DMEM-a te smo tako napravili još veće razrješenje svakog uzorka. Ovaj postupak ponavljali smo dok nismo napravili i posljednje, najveće razrješenje svakog uzorka. Za svaki pokus napravili smo dvostruka razrješenja uzoraka modelnog inducera TCDD u DMEM-u (konačna koncentracija u rasponu od 0 do 1 nM), prema Tablici 4. Koncentraciju od 1 nM otopine TCDD dobili smo miješanjem 0,8  $\mu\text{l}$  TCDD-a s 376  $\mu\text{l}$  MEM-a. Dobivenu otopinu nekoliko puta propuhali i prebacili 127  $\mu\text{l}$  u 225  $\mu\text{l}$  MEM-a i tako dobili 0,36 nM koncentraciju otopine TCDD-ja. Postupak smo ponovili prebacivanjem 101  $\mu\text{l}$  otopine u 264  $\mu\text{l}$  MEM-a dobivši 0,1 nM koncentraciju TCDD-a. Na isti način dobili smo i ostala razrješenja. Volumen od 100  $\mu\text{l}$  stanica nog medija zamjenili smo sa 100  $\mu\text{l}$  razrješenja uzorka, odnosno modelnog inducera. Inkubirali smo potom stanice 24 h na 30°C.

**Tablica 3.** Shema testnih razrješenja uzorka sedimenta potoka Gorjak.

RAZRJEŠENJE	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 razrješenja 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 ( $2 \mu\text{M}$  7-etoksiresorufin u fosfatnom puferu) i pufer za ispiranje. Zatamnili smo prostoriju u kojoj izvodimo test i izlili PBS u istu kadicu. U drugu, također sterilnu kadicu ulili smo otopinu supstrata i zaštitili je od svjetla. Naglo smo okrenuli pločice sa stanicama i pritisnuli na papir kako bismo uklonili stanice s medija, zatim smo isprali sa  $100 \mu\text{l}$  PBS-a po jamici i na kraju 8-kanalnom pipetom dodali lagano  $100 \mu\text{l}$  supstrata po jamici, te odmah pristupili mjerjenju 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 mjerena mikroploče stavljamo u zamrzivač na  $-20^{\circ}\text{C}$ , pa nakon 24 h određujemo koliku je proteina prema kojoj će na kraju biti izražena fluorescencija, odnosno kolika je rezorufina.

#### 2.4. Tijek testa inhibicije rasta jednostanih algi 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 stanice u suspenziju s koncentracijom stanica od  $5 \times 10^4$  st/ml, te izlijali u kadicu i pomoći u višekanalne mikropipete nanosili smo po  $100 \mu\text{l}$  u funkcionalne jamice (koje nisu rubne) triju mikroploče. U rubne jamice nanosili smo po  $200 \mu\text{l}$  miliQ vode. Prema Tablici 5. prikazanoj dolje radili smo seriju dvostrukih razreda.

**Tablica 5.** Dvostruko razrje ivanje uzorka.

<b>(2x) Razrje enja</b>	<b>V(uzorak)(<math>\mu</math>l)</b>	<b>V(medija)(<math>\mu</math>l)</b>
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  $\mu$ l uzorka u 500  $\mu$ l medija napravili smo najmanje razrje enje uzorka. Nakon što smo dobivenu otopinu propuhali, prebacili smo 250  $\mu$ l u slijede ih 250  $\mu$ l medija, dobivši još veću razrje enje uzorka (1:390,6). Postupak smo ponavljali i završili s najvećim razrje enjem, a to je 1:100000. Pripremljena razrje enja prebacili smo u prethodno pripremljene mikroploče. Koristeći višekanalnu pipetu uzeli smo po 100  $\mu$ l razrje enja najmanje koncentracije određenog uzorka i nanosili u odgovarajuće jamice na mikroploče. Postupno smo uzimali rasture koncentracije istog uzorka dok nismo nanijeli i posljednju, najveću koncentraciju. Ovaj postupak ponovili smo sa svakim uzorkom.

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

prebacivanjem 210  $\mu\text{l}$  otopine u 545  $\mu\text{l}$  medija rasta napravili smo još manje koncentriranu otopinu kalijevog bikromata (1 mg/l). Postupak ponavljamo dok ne napravimo i najmanje razrje enja kalijevog bikromata.

**Tablica 6.** Serija razrje enja kalijevog bikromata.

c( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ )(mg/l)	V( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ )( $\mu\text{l}$ )	medij rasta( $\mu\text{l}$ )
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

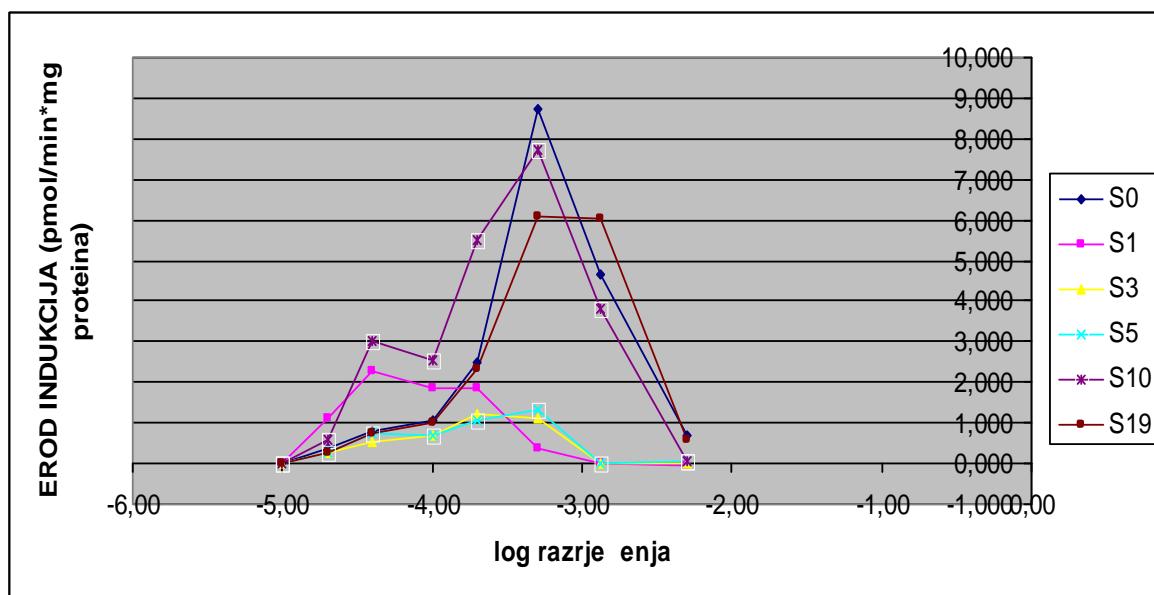
Idu im korakom prebacili smo razli ite koncentracije kalijevog bikromata u jamice na tre oj mikroplo i. Zapo eli smo s najmanjom koncentracijom, što je u ovom slu aju bio isti medij rasta. Mikropipetom smo uzimali po 100  $\mu\text{l}$  i punili odgovaraju e jamice. Postepeno smo uzimali sve ve e koncentracije i završili s najve om.

Na pripremljenim mikroplo ama pomo u fluorometrijskog ita a za mikroplo e 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 op enito prihva enog pristupa kvantifikaciji dobivenih rezultata. Ovo je povezano s injenicom da složeni uzorci sadrže više kemijskih spojeva i esto ne rezultiraju klasi nom, sigmoidalnom doza-odgovor krivuljom. Umjesto toga, EROD aktivnost pokazuje složenu krivulju u obliku zvona ija maksimalna indukcija ovisi o smjesi (Brunström i sur., 1995; Lorenzen i sur., 1997), ili krivulju s izraženim vrhom s ponekad loše definiranim razinama zasi enja, te s opadaju om EROD aktivnoš u na ve im testnim koncentracijama (Slika 10). Ovo može biti rezultat superpozicije indukcije ili inhibicije enzima toksikantima u uzorku što komplicira izra un 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 tipi ne sigmoidalne doza-odgovor krivulje, ve krivulje s izraženim vrhom i inhibicijom EROD aktivnosti na ve im koncentracijama uzoraka.

Budu i da u inci složenih okolišnih uzoraka nisu uzrokovani samo jednim, individualnim spojem, ve smjesom toksikanata, potvrda toksi nosti zahtjeva valjani koncept za takvu ujedinjenu toksi nost. Što se EROD indukcije ti e, op enito je prihva en koncept aditivnih koncentracija temeljen na ekvivalentima toksi nosti kao produkta koncentracije i faktora

toksi ne jednakosti (eng. **Toxicity Equivalency Factor**, TEF-a) koji se odnosi na jakost najja eg inducera EROD testa TCDD-ja (Ahlborg i sur., 1994; Clemons i sur., 1997). Me utim, nema dogovora o u inkovitoj razini koja bi služila kao osnova za izra unavanje toksi nih ekvivalenta, (eng. **Toxicity Equivalent**, TEQ). Upravo te u inkovite razine mogu biti od klju ne važnosti za analizu toksi nosti uzorka s obzirom na kombinaciju u inaka (Brack i sur., 2000).

Jakost indukcije EROD testa raznih uzoraka uspore uju se me usobno na osnovu vrijednosti toksi nih ekvivalenta u odnosu na TCDD. EC<sub>x</sub> vrijednosti TCDD-ja izra unate su koriste i softver Prism (GraphPad Prism, San Diego, CA, USA).

Toksi ni ekvivalenti mogu se izra unati na dva na ina;

- na osnovu u inkovitih koncentracija na zadanoj razini u inka (eng. *fixed-effect-level*, FEL), ili
- na osnovu najve e EROD indukcije koju postigne svaki uzorak (max EROD).

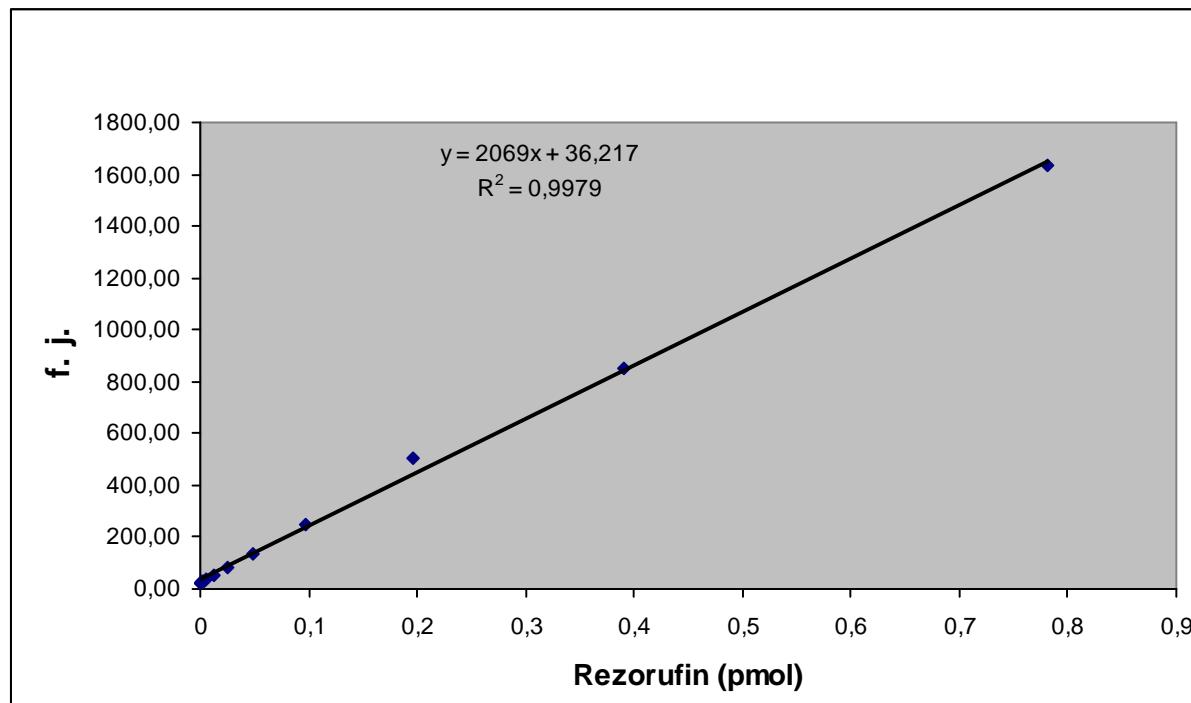
*Fixed-effect-level* ekvivalenti toksi nosti (FEL-TEQ) izra unati su koriste i zadanu indukcijsku razinu koja odgovara EC<sub>10</sub> vrijednostima TCDD-ja (Engwall i sur., 1997). Uz pretpostavku da je citokrom-P450 induciran spojem neovisne maksimalne razine, toksikantima sli nim dioksinima i da razli ite maksimalne razine EROD indukcije nastaju zbog superpozicije enzimske inhibicije (Hahn i sur., 1996), ini se razumnim izabrati nisku u inkovitu razinu za utvr ivanje TEQ, koji je rijetko kad pogo en inhibicijskim u incima. S druge strane, izabrana u inkovita razina mora jasno biti iznad zna ajne razine. EC<sub>10</sub><sub>TCDD</sub> ispunjava ove zahtjeve i zbog toga se preporu a za kvantifikaciju EROD indukcije složenih okolišnih uzoraka. Ova indukcijska razina neovisna je o maksimalnoj razini EROD indukcije testiranog uzorka. U inkovite koncentracije (EC<sub>10</sub><sub>TCDD</sub>) definiramo kao u inkovite 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 EC<sub>10</sub> koncentraciji.

Budu i da indukcija EROD-a koju pobude okolišni ekstrakti i frakcije obi no ne slijedi klasi nu sigmoidalnu doza-odgovor krivulju, iji model možemo dobiti pomo u Probit ili Logit distribucija, EC<sub>10</sub> vrijednosti izra unate su linearnom ekstrapolacijom izme u dvije najbliže u inkovite koncentracije iznad i ispod EC<sub>10</sub> vrijednosti (Brack i sur., 2000).

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

### 3.2.1. Kalibracijska krivulja rezorufina

Kalibracijsku krivulju rezorufina dobili smo koristeći Microsoft Excel program fluorimetrijskim mjeranjem rezorufina na specifičnim ekscitacijskim i emisijskim valnim duljinama (535 nm/590 nm). Na osnovu apisu nanosimo koncentraciju rezorufina po jamicama mikroploče, a na ordinatu fluorescentne jedinice (f.j.) od kojih je oduzet nespecifični signal (Slika 11). Na osnovi linearног dijela pravca dobivamo jednadžbu pravca u koju se tad ubacuju f.j. za uzorce. Konačno se dobiju TCDD EQ izraženi po litri.



Slika 11. Kalibracijska krivulja mjeranja koncentracije rezorufina na spektrofluorometru.

### 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 µl u jamice te izvadili plo ice iz leda i otopili ih. Dodali smo 100 µl radne koncentracije fluorescamina u svaki bunari , inkubirali 3-5 min na RT i potom mjerili fluorescenciju (na Varianu) u ovim uvjetima:

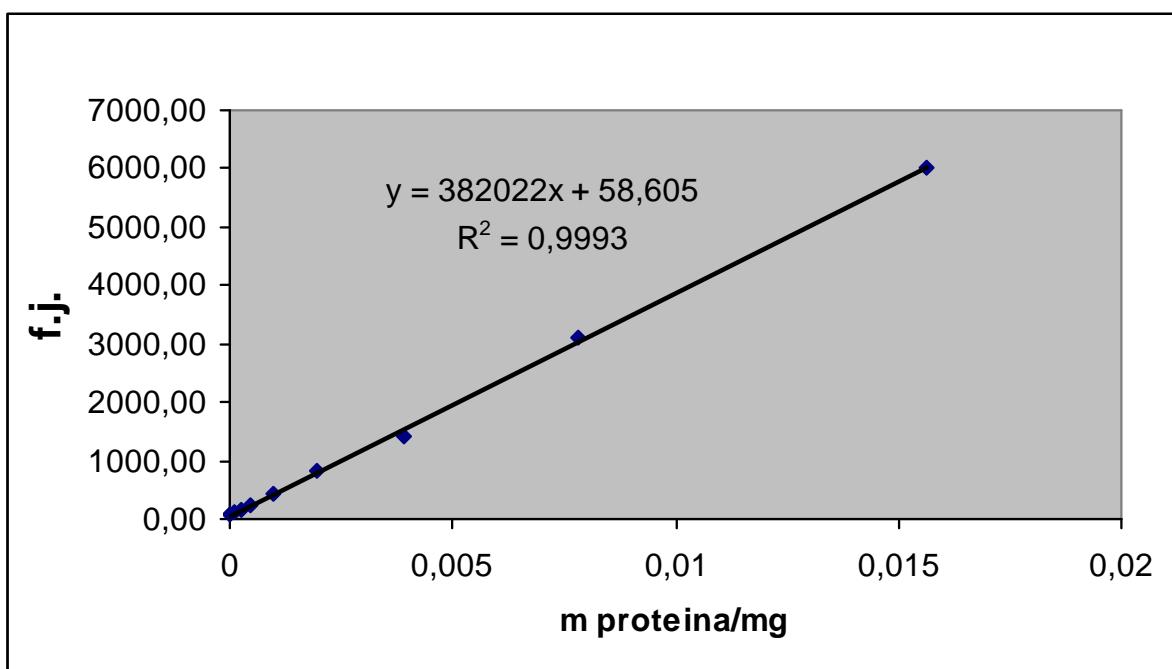
Fliteri: 390/465

$t = 0,0125$

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 između koncentracija 0 i 0,15625 mg/ml, tom je intervalu prilagođena kalibracijska krivulja proteina. Na osi apsisa upisane su vrijednosti mase proteina (mg), a na ordinatu pripadaju fluorimetrijske jedinice (f.j.) (Slika 12).



Slika 12. Kalibracijska krivulja proteina.

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

U odgovaraju im plo icama mjerili smo fluorescenciju rezorufina svake jamice na fluorimetrijskom ita u, te koli inu proteina. Izmjerene fluorimetrijske jedinice kod mjerjenja proteina prevodili smo u masu proteina po jamici mikroplo e koriste i a i b koeficijente iz jednadžbe pravca kalibracijske krivulje proteina.

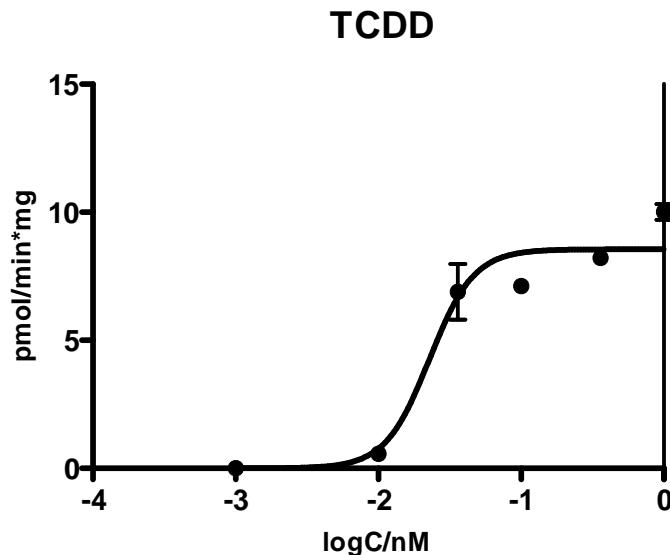
#### IZRA UN FEL-TEQ (EC10<sub>TCDD</sub>)

Rezultate o itanja rezorufina obiju plo ica obradili smo u Microsoft Office Excell programu. Mjerenje smo vršili 10 puta u razmaku od jedne minute. Za svaku jamicu i njenih 10 pripadaju ih vrijednosti pomo u formule LINEST dobili smo vrijednost koja najbolje opisuje a koeficijent rastu eg linearog 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 pripadaju im 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, u inili smo i s pozitivnom kontrolom, TCDD-jem. Nakon toga smo izra unali srednju vrijednost ovih vrijednosti budu i smo mjerili dvije iste koncentracije istog uzorka. Dobivene vrijednosti TCDD-ja ubacili smo u softver GraphPad Prism i tako dobili parametre koji su nam klju ni za daljnju analizu (Slika 13).

Izra unali smo EC50, EC25, EC10 i EC5 vrijednosti TCDD-ja u nM, a potom i koli inu pobu ene CYP1A aktivnosti, tj. induciranih oksidaza miješanih funkcija TCDD u pmol/min/mg prot preko jednadžbe;

$$y = \text{bottom} + (\text{top} - \text{bottom}) / (1 + 10^{((\log EC50 - \log(c)) * \text{Hill})})$$

da bi potom prera unali sve dobivene EC vrijednosti iz nM u ng/l množe i s molarnom masom TCDD-ja. Na kraju sada iz tih podataka još izra unamo i FEL-TEQ, odnosno TCDD TEQ (ng/g sedimenta) na temelju EC10<sub>TCDD</sub> za svaki uzorak.



BOTTOM	$\sim 1.275e-016$
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 izračun toksičnih ekvivalenta (TEQ).

#### IZRAČUN TCDD TEQ PREKO MAX-EROD INDUKCIJE UZORAKA

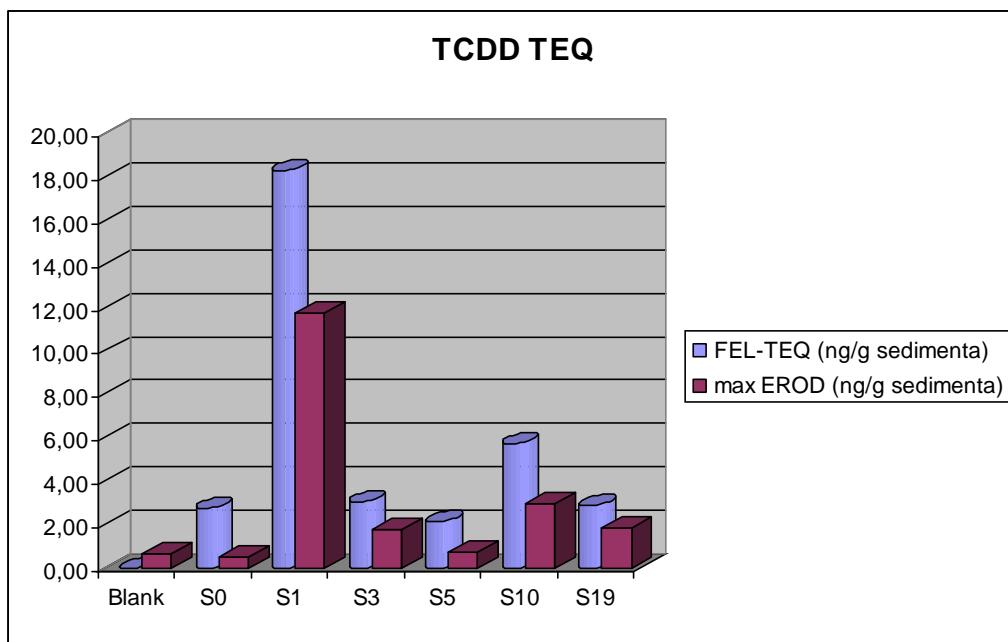
Izračunali smo logaritam koncentracije svakog uzorka koristeći formulu s prethodno izračunatim parametrima TCDD-ja:

$$\log(c) = (\log EC50 * Hill - \log((y-t)/(b-y))) / Hill$$

gdje umjesto  $y$  ubacujemo vrijednost najveće indukcije EROD-a za pojedini uzorak. Dobivene vrijednosti smo antilogaritmizirali, pomnožili s razređenjem uzorka pri kojem je postignuta najveća EROD indukcija svakog pojedinog uzorka i imenovali 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 toksičnosti u ng/g sedimenta. Odrediti su potencijala ispitivanih uzoraka da

induciraju (stimuliraju) aktivnost CYP1A ovisnih enzima (EROD), kao temeljnih detoksikacijskih enzima uključujućih u obranu stanice od potencijalno toksičnih tvari, tako da je jasno pokazalo da postoji velika razlika između biološki relevantne izloženosti ovim zagonima prije i poslije pogona „Plive“ (Slika 14). Kao i u slučaju mjerjenja kromatografskih toksičnosti, uzorak S0 (prije pogona) ne možemo smatrati referentnim nezagonom bez uzorkom, jer izraženo u toksičnim ekvivalentima modelnog inducera/toksičnika TCDD-a sadržava znatnu koliku EROD (CYP1A) inducirajućih zagona, reflektirajući zagonje koje se vjerojatno može povezati s ispuštanjem otpadnih voda domaćinstava. Međutim, kolika EROD inducira izrazito je, oko 9 puta kod FEL-TEQ te više od 20 puta kod max EROD, već u uzorku S1 sakupljenom neposredno iza pogona (Tablica 7) i predstavlja iznimno visoku izloženost biološki relevantnom zagonu.

Nakon lokacije S1 izmjerena je trend znatnog smanjenja koncentracije EROD inducera, koja se kreće od najniže vrijednosti za uzorak S5, nešto niže od razine izmjerene u uzorku S0 prije pogona, do najviših vrijednosti izmjereni za uzorak S10, što predstavlja razinu EROD inducera dvostruko (FEL-TEQ), odnosno šesterostruko (max EROD) veću nego u uzorku S0 (Slika 14, Tablica 7).



**Slika 14 .** CYP1A inducijski potencijal uzoraka sedimenta iz potoka Gorjak određen mjerjenjem EROD aktivnosti u PLHC-1 hepatoma stanicama. Stanice su u trajanju od 48 h izlagane seriji raznih zagonja uzoraka (S0-S19) sedimenta, seriji raznih zagonja proceduralne kontrole (blank), te nizu koncentracija modelnog CYP1A inducera TCDD-a kao pozitivne kontrole (Slika 13). Rezultati su izraženi u TCDD toksičnim ekvivalentima (TCDD TEQ) izračunatim na dva načina, 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).

TCDD TEQ		
POSTAJA UZORKOVANJA	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,  $\mu$  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 gusto a stanica u vremenu  $t_L$

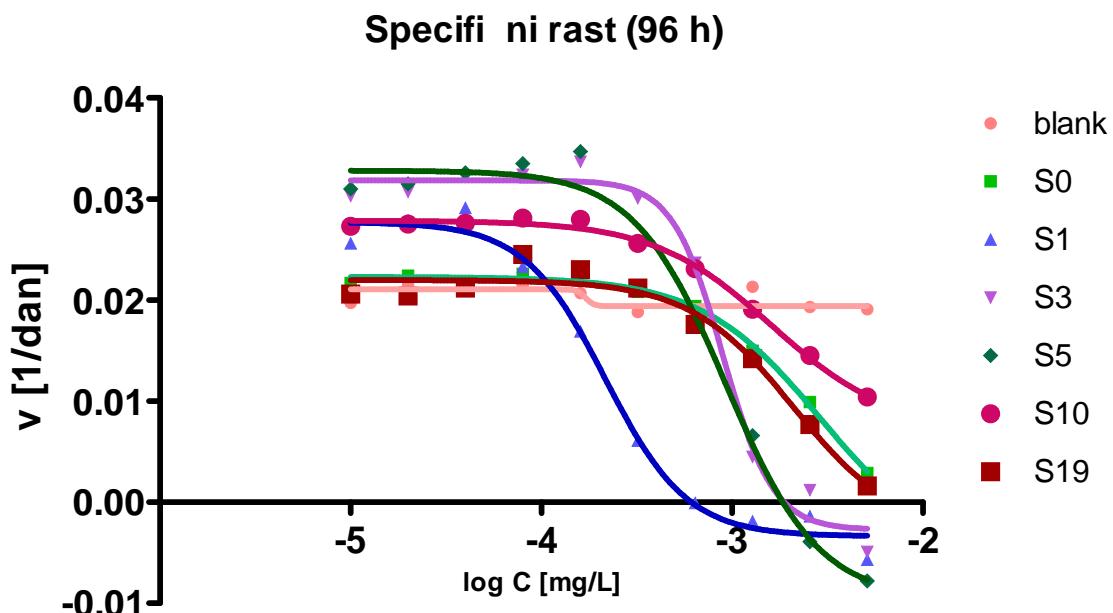
Sada smo iz ovih vrijednosti izra unali postotak inhibicije za svaki uzorak koriste i slijede u jednadžbu;

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

gdje je

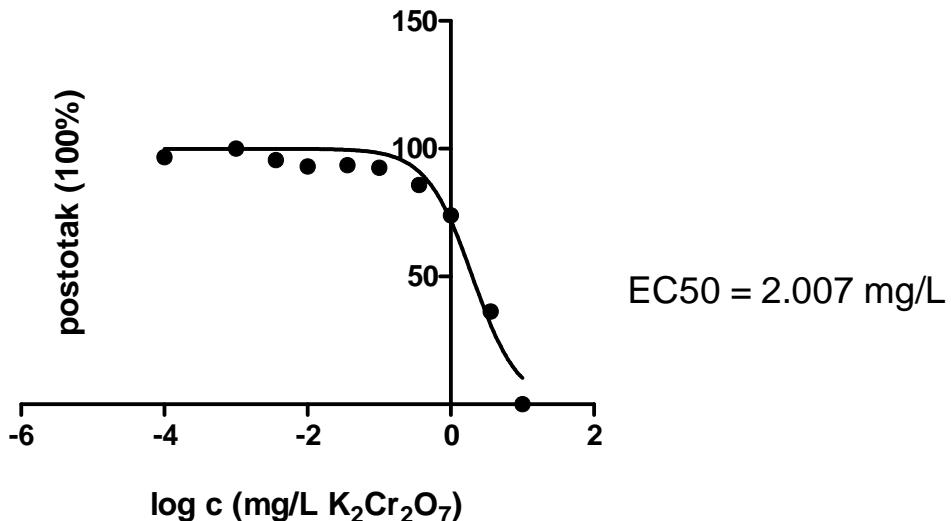
- $I_{\mu_i}$  postotak inhibicije (stope rasta) testne koncentracije  $i$
- $\mu_i$  srednja stopa rasta za testnu koncentraciju  $i$
- $\mu_c$  srednja stopa rasta kontrole

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

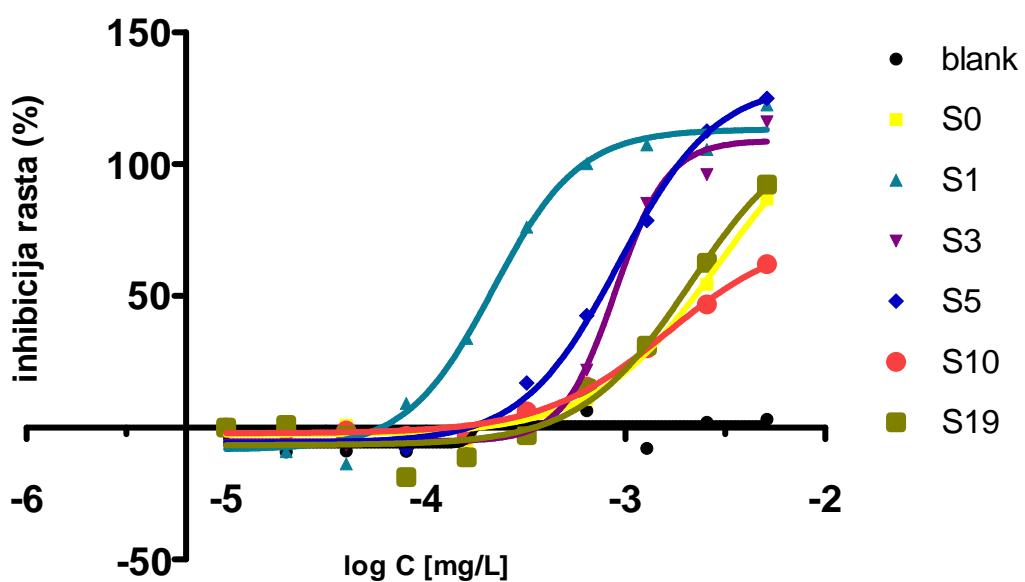


**Slika 15.** Ovisnost logaritma koncentracije uzorka o promjeni fluorescentnih jedinica prikazanih kao rast broja stanica po danu. Sve krivulje pokazuju pad specifi nog rasta stanica, osim krivulje negativne kontrole (blank). Krivulja uzorka S1 ima najizraženiji pad pri nizkim koncentracijama za razliku od ostalih uzoraka, što govori u prilog najja e toksi nosti uzorka S1.

### Prirast stanica u kalijevom bikromatu



**Slika 16.** Rast stanica u pozitivnoj kontroli, kalijevom bikromatu, opisuje padajuću krivulju ovisno o povećanju logaritma koncentracije kalijevog bikromata. GraphPad Prism programom izračunali smo EC<sub>50</sub> vrijednost kalijevog bikromata, koji iznosi 2.007 mg/L medija.



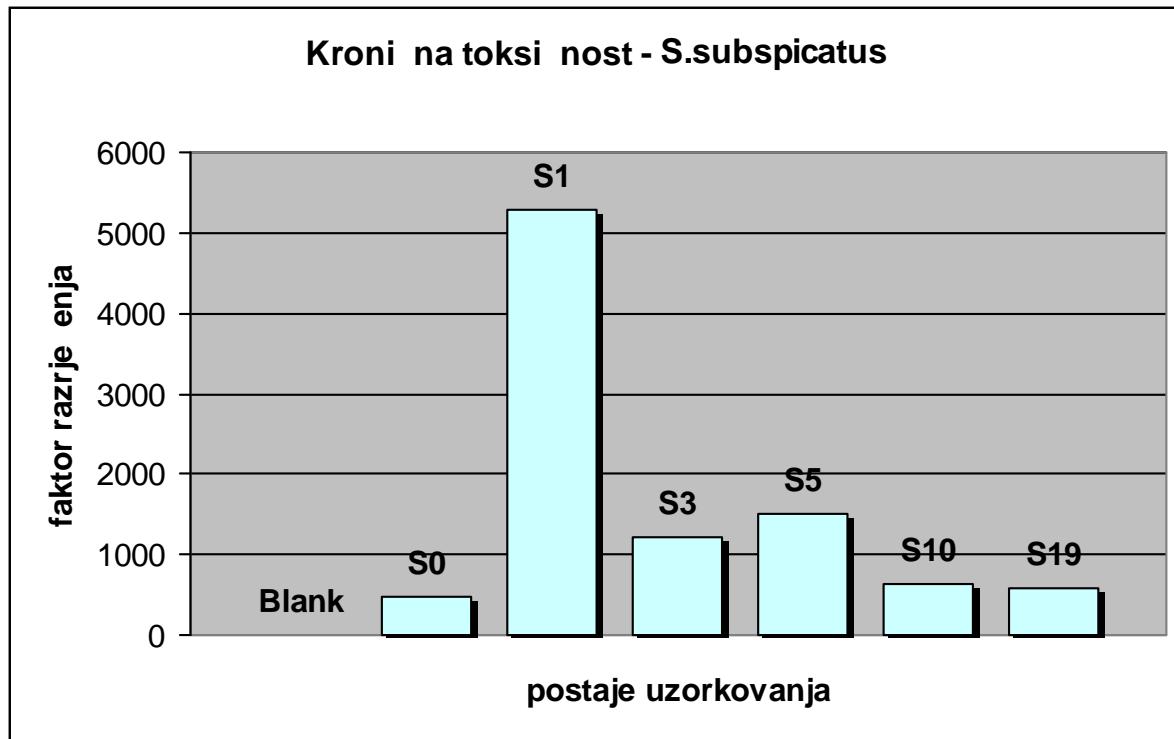
**Slika 17.** Graf postotka inhibicije rasta stanica pokazuje inhibitorni učinak svih uzoraka, izuzev negativne kontrole (blanka). Krivulja uzorka S1 premašuje 100%-nu inhibiciju pri nižim koncentracijama od ostalih uzoraka, što ponovno dokazuje veću toksičnost tog uzorka.

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) nedvojbena 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“ ( $S_0 = 4.47 \text{ TJ}$ ) višestruko, više od 10 puta niža od toksi nosti uzorka sakupljenog neposredno iza pogona ( $S_1 = 48.3 \text{ TJ}$ ). 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 bioraznolikosti 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 bioraznolikost 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	<b>4,47</b>
S1	5274,26	2,07	<b>48,30</b>
S3	1206,1	9,05	<b>11,05</b>
S5	1496,33	7,30	<b>13,70</b>
S10	622,67	17,54	<b>5,70</b>
S19	582,75	18,74	<b>5,34</b>

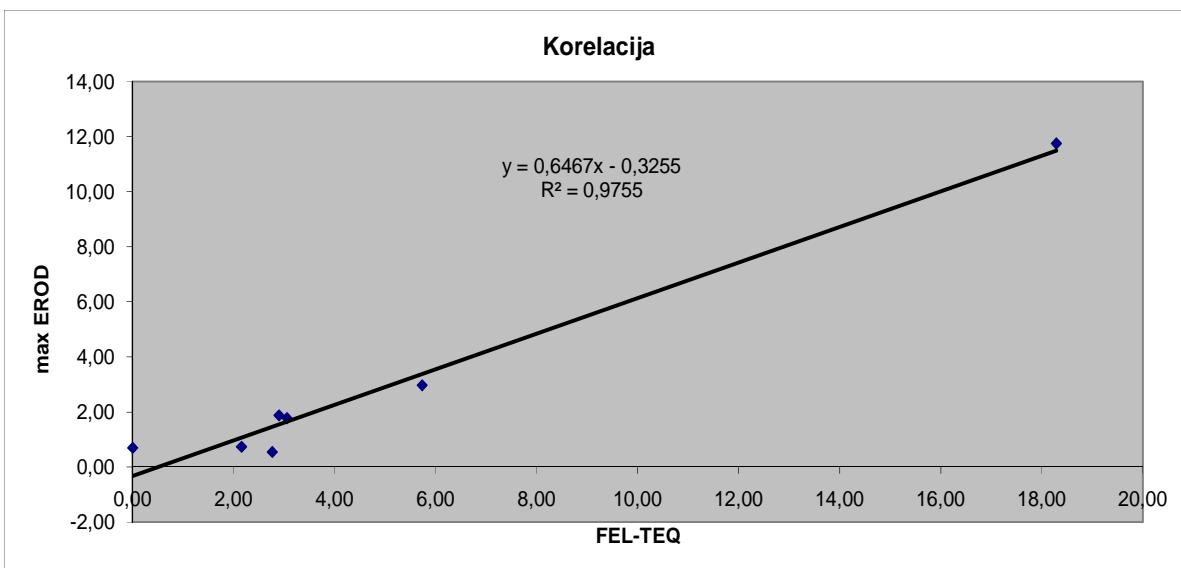
#### **4. RASPRAVA**

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 uzrokovani 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 mjerena 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 primjerenum 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<sub>10</sub>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).



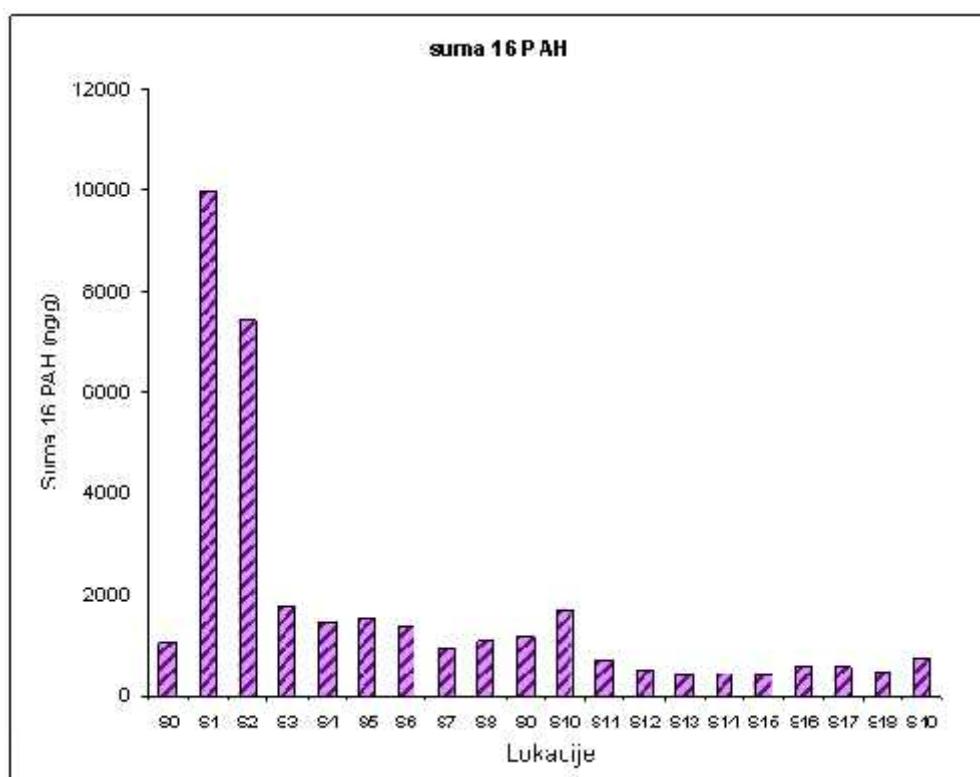
**Slika 19.** Koreliranost rezultata FEL-TEQ i max EROD dobivenih u ovom istraživanju.

U pogledu prisustva inducera sustava oksidaza miješanih funkcija ovisnih o citokromu P-450, rezultati dobiveni u ovom diplomskom radu nisu nimalo iznena uju i s obzirom na rezultate kemijske analize potoka Gorjak. Naime, analizom organskih zaga ivala u sedimentu potoka Gorjak utvr ena je znatna zastupljenost svih 16 nesupstituiranih predstavnika policikli kih aromatskih ugljikovodika, a najviše razine izmjerene su u uzorcima s lokacija S1 i S2 (Slika 20; Izvještaj, 2008). Što se ti e porijekla PAH-ova, na temelju doprinosa supstituiranih homologa može se procijeniti da se, najvjerojatnije, radi o kombinaciji doprinosa od naftnog zaga enja i piroliti kih 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). Uo liva je velika sli nost 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 izme u PCB-a i ukupnih PAH-ova ( $R^2=0,97$ ) sugerira da oba tipa zaga ivala dolaze iz istog izvora, ali i to da je njihovo ponašanje u istraživa kom sustavu vrlo sli no.

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

aktivnosti ne može u potpunosti, ak niti ve im dijelom, objasniti izmjerrenom koncentracijom PAH-ova. Stoga je nužno analizirati dominantna organska zaga ivala u sedimentu potoka Gorjak, a to su prije svega farmaceutici: najve im dijelom makrolidni antibiotici i njihovi metaboliti (Izvještaj, 2008), dakle klju ni 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 zaga ivala treba biti predmet budu ih istraživanja.



**Slika 20.** Raspodjela policikli kih aromatskih ugljikovodika u sedimentima potoka Gorjak (Izvještaj, 2008).

Prema razinama zaga ivala ije su koncentracije regulirne propisima (PAH i PCB), sedimenti potoka Gorjak mogu se klasificirati kao srednje do jako optere eni.

Što se ti e rezultata odre ivanja kroni ne toksi nosti korištenjem testa s jednostani nom algom vrste *S. subspicatus*, jasno se može uo iti visoka toksi nost sedimenta potoka Gorjak (Slike 15-18, Tablica 8). Osobito je to naglašeno za sedimente sakupljene na lokacijama bliže

pogonima „Plive“ i „Kvasca“, uz zna ajno opadanje toksi nosti nizvodno od postaje S5. Pri tome je važno istaknuti da se prema važe oj me unarodnoj regulativi sediment sakupljen na postaji S1 može smatrati izrazito (eko)toksi nim, ukazuju i na nužnost hitne sanacije potoka Gorjak.

U skladu s (ne)selektivnoš u testa sa *S. subspicatus*, izmjerena kroni na toksi nost vjerojatno je kumulativna posljedica niza toksi nih zaga ivala koja se u sedimentu potoka Gorjak mogu na i i u visokim koncentracijama. Ono što se posebno isti e su izmjerene koli ine ekotoksi nih metala, kojih ima itav niz i koji se pojavljuju nizvodno od referentne postaje. Poredani po ja ini koncentracije slijede Ni > Hg > Zn > Cu > Pb > Cr > Cd. Najve i i zabrinjavaju i stupanj zaga enja utvr en je za metale Ni, Hg, Zn, Cu i Pb (Izvještaj, 2008). Kada se tome pridodaju iznimno visoke koncentracije antibiotika, njihovih prekursora i metabolita, te zna ajne koncentracije „klasi nih“ organskih industrijskih zaga ivala, izmjerena toksi nost je vjerodostojna posljedica složene mješavine toksi nih komponenti sedimenta potoka Gorjak.

Prema tome, koriste i dva široko zastupljena biotesta vjerodostojno smo ustanovili da je sediment potoka Gorjak iznimno zaga en ekološki sustav, koji uz izuzetak specifi nih bakterijskih zajednica ne može ni u kojem slu aju osigurati bioraznolikost koja bi odgovarala ovakvom tipi vodotoka. Jednako tako je nedvojbeno da je zate eno stanje izravna posljedica dugogodišnjeg ispuštanja zaga enih industrijskih otpadnih voda iz pogona tvrtki „Pliva“ i „Kvasac“. Kada se tome pridoda injenica da se ovako zaga en potok izravno ulijeva u Savu, te da se susjedno podru je potoka Gorjak nalazi u okviru vodozaštitne zone „Šibice“, jasno je da podru je 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. ZAKLJU AK**

O igledno je da je sadržaj organskog one iš enja u sedimentima potoka Gorjak vrlo složen, a optere enje specifi nim organskim spojevima dosta je visoko. U sastavu organskog optere enja isprepli u se prirodni organski sastojci, koji u znatnoj mjeri potje u od otpadnih tvari povezanih s ispuštanjem otpadnih voda iz proizvodnje kvasca, te tipi na antropogena zaga ivala kao što su policikli ki aromatski ugljikovodici, poliklorirani bifenili, makrolidni antibiotici, ftalati i alkilfenoli.

Raspodjela zaga ivala antropogenog karaktera (ksenobiotika) pokazuju izrazito povišenje koncentracije na lokacijama neposredno nakon pogona “Plive” i “Kvasca”, dok u najdonjem dijelu toka (S10-S19) dolazi do znatnog smanjenja razina svih pravnih sastojaka.

Provedbom ekotoksikoloških analiza uzoraka sedimenta pomo u biotestova EROD i testa inhibicije rasta jednostani ne alge vrste *Selenastrum subspicatus*, zaklju ujemo slijede e:

1. Uzorci sedimenata iz potoka Gorjak pokazali su visoku razinu kroni ne toksi nosti. Osobito visoka razina izmjerena je u uzorku sakupljenim neposredno iza pogona „Plive“. Jasno je uo ena tendencija opadanja kroni ne toksi nosti s udaljavanjem od pogona;
2. Koncentracija biološki relevantnih zaga ivala u sedimentu, inducera 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 toksi an sediment;
4. Izrazito toksi nim 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 Puget 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. In: 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 ethoxresorufin-O-deethylase induction potency in complex environmental samples. Environ. Toxicol. Chem. **19**: 2493 – 2501.
- Brunström B., Broman D., Dencker L., Näf C., Vejlens E., Zebühr Y. (1992): Extracts from settling particulate matter collected in the Stockholm Archipelago waters: Embryolethality, 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): Assesment 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: Hodgcon 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 uzorka 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 najznačajnih zagađivača morskog ekosistema. *Pomorski zbornik*. **20**: 521-534.

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

Kutuzović 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, Elsavier/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., Creelius 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.ananesthetist.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](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 primjenjenu kemiju i ekologiju, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Sveučilište 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](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, Sveučilište 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>