

## ANALIZA TOKSIČNOSTI IN GENOTOKSIČNOSTI JEZERSKIH VODA Z BIOTESTI

Ilja Gasan OSOJNIK ČRNIVEC <sup>a)</sup> in Romana MARINŠEK-LOGAR <sup>b)</sup>

<sup>a)</sup> Univ. v Ljubljani, Biotehniška Fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija,

<sup>b)</sup> isti naslov kot <sup>a)</sup>, prof., dr., mag., e-pošta: [romana.marinsek@bfro.uni-lj.si](mailto:romana.marinsek@bfro.uni-lj.si).

Delo je prispelo 14. novembra 2007, sprejeto 03. decembra 2007.

Received November 14, 2007, accepted December 03, 2007.

### IZVLEČEK

Ustrezno izvajanje ukrepov za obvladovanje problematike onesnaženosti prostora je v veliki meri odvisno od nepretrganega spremljanja trenutnega stanja okolja. Zakonsko predpisane preiskave v Sloveniji večinoma temeljijo na spremljanju fizikalnih in kemijskih kazalcev. Ker s takimi analizami ne moremo ugotoviti biološkega učinka, medsebojnega vpliva posameznih sestavin v vzorcu in bioaktivacije, je za celovitejši pregled mehanizmov in intenzivnosti vplivov okolja na organizme kemijsko fizikalne podatke potrebno dopolniti še z rezultati bioloških testov za toksičnost in genotoksičnost. V tej raziskavi smo preizkusili primernost komercialnega testnega kita za ugotavljanje toksičnosti Thamnotoxkit F<sup>TM</sup> s sladkovodnim rakcem *Thamnocephalus platyurus*, primernost mikrobnega testa Ames s sevi TA97, TA98 in TA100 bakterije *Salmonella typhimurium* in kometnega testa z evkariontskim mikroorganizmom *Tetrahymena thermophila* za ugotavljanje genotoksičnosti. Z izbranimi biotesti smo ovrednotili toksičnost in genotoksičnost vzorcev jezerske vode iz vzorčnih lokacij v Šaleški dolini in biološke učinke primerjali z izmerjenimi fizikalno-kemijskimi parametri.

Ključne besede: mikrobiologija / toksičnost / genotoksičnost / jezera / biotesti / varstvo okolja

### EVALUATION OF TOXIC AND GENOTOXIC POTENTIAL IN LAKE WATER SAMPLES BY BIOASSAYS

#### ABSTRACT

Preservation of the natural resources, valuable natural features and spatial characteristics plays an important role in the environmental management and is based on permanent environmental monitoring. For the time being, the current legislation regarding environmental monitoring in Slovenia is based mostly upon physicochemical analyses. Since the physicochemical analyses do not provide information about biological effects, interactions between sample compounds and bioactivation, bioassays have been considered for environmental monitoring supplementation. In the present study the adequacy of a commercial toxicity screening test Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>, which includes a freshwater crustacean *Thamnocephalus platyurus* and two genotoxicity determination test, a standard microbial Ames plate incorporation test with *Salmonella typhimurium* TA97, TA98 and TA100 strains and the comet assay with the eukaryotic microorganism *Tetrahymena thermophila* has been evaluated. With the selected biotests toxic and genotoxic effects of lake water samples from Šalek valley were evaluated and compared with the measured physicochemical values.

Key words: microbiology / toxicity / genotoxicity / lakes / bioassays / environmental protection

## UVOD

Rast svetovnega prebivalstva in razvoj ter povečanje proizvodnje in obsega industrializacije sta povzročila povečano kopičenje onesnaževal v okolju. Navkljub poznavanju tehnologij, ki nam omogočajo obdelavo, recikliranje in ponovno uporabo odpadnih snovi, okolje še vedno obremenjujemo z izpusti v atmosfero, hidrosfero in litosfero. Prisotnost onesnaževal v okolju je spodbudila potrebo po razvoju dovolj natančnih metod, s katerimi bi lahko ovrednotili škodljive vplive snovi na prisotne organizme, še posebno na zdravlje ljudi.

Zakonsko predpisane preiskave iz sklopa monitoringa okolja (površinskih voda) so večinoma utemeljene na spremljanje fizikalnih in kemijskih kazalcev (Rezolucija., Ur.l. RS, 2006; Uredba., Ur.l. RS, 2002). Pri izvajanju fizikalno-kemijskih analiz smo omejeni s spodnjo mejo občutljivosti, prav tako pa lahko z njimi zaradi cenovnih ali analitskih omejitev spremljamo le omejen nabor parametrov. S temi analizami ne moremo zaznati biološkega učinka, medsebojnega vpliva posameznih sestavin v vzorcu, deleža snovi, ki je organizmom dostopen in snovi, ki postanejo škodljive po bioaktivaciji (Josephy in sod., 1997; Derksen, 2002).

Pomembna orodja v ekotoksikoloških raziskavah so bioanalitske metode. Ob pravilni izbiri testnega organizma v biotestu razmeroma učinkovito dopolnimo omenjene pomanjkljivosti fizikalno-kemijskih testiranj. Z ustreznim biotestom lahko potrdimo biološki učinek potencialnih onesnaževal v vzorcu na testne organizme, ne moremo pa identificirati specifičnih snovi, ki so za odziv odgovorne (Derksen, 2002, Fendt, 2003). Pravni okvir za vključevanje biotestov v monitoring vodnih virov podaja t.i. Vodna direktiva 2000/60/EC, ki v aneksu v programu monitoringa ob spremljanju hidroloških in fizikalno-kemijskih parametrov predvideva tudi spremljanje bioloških elementov kakovosti vodnih teles.

Šaleška dolina je zaradi svoje obremenjenosti z raznolikimi onesnaževali kmetijskega in industrijskega izvora vzorčni primer, kjer na onesnaženje vplivajo številne toksične snovi, zapletene in nam pogosto nepoznane strukture in kjer za potrebe izvajanja ukrepov izboljševanja stanja okolja zgolj izvajanje rutinskih fizikalno-kemijskih raziskav ni dovolj. Biološke metode, ki se v takšnih razmerah izkažejo primerne za vrednotenje (geno)toksičnosti, se v nadaljevanju lahko uporabijo za dopolnitev monitoringa okolja na državni ravni.

Za preverjanje toksičnosti vzorcev jezerske vode smo v raziskavi preizkusili testni set Thamnotoxkit FTM s sladkovodnim rakcem *Thamnocephalus platyurus*. Za ugotavljanje genotoksičnosti jezerskih vzorcev pa smo izbrali standardni test Ames s sevi TA97, TA98 in TA100 bakterije *Salmonella typhimurium* in kometni test z migetalkarjem *Tetrahynema thermophila*. Pri biološkem testiranju toksičnosti in genotoksičnosti smo sledili sodobnemu konceptu 3R, ki uveljavlja predvsem alternativne metode biološkega testiranja z mikroorganizmi in organizmi na nižjih stopnjah evolucijskega razvoja.

## MATERIAL IN METODE

### Vzorci jezerskih voda

Šaleška dolina je bila v preteklih desetletjih med okoljsko najbolj obremenjenimi regijami v Sloveniji. Premogovništvo in pridobivanje električne energije spreminjata kvaliteto in fiziognomijo regije z emisijami nevarnih dimnih plinov, pepela in drugih produktov, ki nastanejo pri pridobivanju termoenergije ter s spreminjanjem reliefa montanogenega ugrezjanja površja (Šalej, 2002).

Iz ugrezninskih jezer smo odvzeli štiri vzorce (J1 – Družmirsko jezero; J2 – Velenjsko jezero pri nasipu pepela; J3 – Velenjsko jezero pri čolnarni, na drugi strani kot J2; J4 – Škalsko jezero) in jih do uporabe shranili pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## Fizikalno-kemijske analize jezerskih voda

Na vzorcih jezerske vode smo opravili večino fizikalno-kemijskih analiz, ki so predpisane v programu monitoringa jezer (2006).

Iz sklopa meritev na terenu smo ovrednotili motnost (SIST EN ISO 7027, 2000), redoks potencial (SIST DIN 38404-6; 2000), vrednost pH in temperaturo (SIST ISO 10523, 1996).

Iz sklopa analiz vode smo testirali vsebnosti celotnega organskega in raztopljenega organskega ogljika (SIST ISO 8245, 2000), amonijevega (Hach DR/400 Spectrophotometre Handbook, 1999) in nitratnega ter nitritnega dušika, sulfatov in kloridov (SIST EN ISO 10304-2, 1998), skupnega fosforja (SIST EN ISO 6878, 2004), kalcija in magnezija (SIST ISO 7980, 2000) ter natrija in kalija (SIST ISO 9964/1&3, 2000).

Opravili smo analize sledečih težkih kovin: raztopljenega bakra, kadmija, kroma, niklja, svinca, arzena in cinka (SIST DIN 38406-29, 2000) ter živega srebra (SIST ISO 5666, 2000).

Analizirali smo tudi vsebnost policikličnih aromatskih ogljikovodikov: benzopirena, fluorantrena, benzofluorantrena, benzoperilena, indenopirena, naftalena, acenaftilena, acenaftena, fluorena, fenatrena, antracena, pirena, benzoantracena, krizena in dibenzoantracena (SIST EN ISO 17993, 2004 in EPA Method 550.1, 1990).

### Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>

Postopek testa smo izvedli po navodilih proizvajalca (Microbiotests Ltd., Belgium; Standard Operational Procedur for Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>, 2006).

Pred samo izvedbo testa smo najprej vitalizirali ličinke organizma iz mirujočih cist. Ciste smo rehidrirali in 20 do 22 ur inkubirali pri temperaturi 25°C in pri neprekinjeni osvetlitvi 2800 lux. Nato smo za vsak vzorec jezerske vode pripravili pet različnih redčitev (100 %, 50 %, 25 %, 12,5 %, 6,25 %) in ličinke redčitvenim vrstam vzorcev izpostavili v testnih ploščah (4 vrste in 6 stolpcev vdolbin). Po 24 urni inkubaciji testnih plošč pri 25°C v temi smo pod lupo prešteli število mrtvih rakcev.

Rezultate testa Thamnotoxkit F<sup>TM</sup> izrazimo s parametrom LC<sub>50</sub>, t. j. kot koncentracijo vzorca, ki je smrtna za 50 % testne populacije.

Za negativno kontrolo, valjenje cist in pripravo redčitvene vrste vzorcev smo uporabljali raztopino, ki jo v svojih metodah za ugotavljanje akutne toksičnosti z vodnimi organizmi priporoča Ameriška agencija za varstvo okolja (Standard methods for ..., 2006).

### Test Ames

Test Ames smo izvajali po postopku, ki sta ga opisala Maron in Ames (1983) s sevi TA97, TA98 in TA100 bakterije *Salmonella typhimurium* brez in z vključitvijo metabolne aktivacije z mešanico S9 (homogenat podganjih jeter). Kolonije smo prešteli po 48 urni inkubaciji na petrijevih ploščah pri 37°C.

Mutageno aktivnost vzorcev smo izrazili s faktorjem indukcije (frekvenco mutacij). V skladu s priporočili organizacij EPA in OECD, s testom Ames mutageni potencial vzorca potrdimo, kadar je frekvenca mutacij testne snovi 2,0 ali večja. Če je vrednost količnika frekvence mutacij vzorca in negativne kontrole med 1,7 in 1,9, tedaj lahko govorimo o potencialno mutagenem učinku testirane snovi. Če pa je ta vrednost nižja od 1,6 testni snovi ne pripisujemo mutagenega potenciala.

Za pozitivne kontrole testa smo uporabili ICR-191 akridin (ICR), 4-nitroquinolin-N-oksidi (4NQO), bezo piren (BP) in 2-aminofluoren (2AF) raztopljene v dimetil sulfoksidu (DMSO) in natrijev azid (NA) v vodi Mili-Q.

Rezultate testa Ames smo statistično ovrednotili z programom GraphPadPrism, 3.02. Analizo variance smo opravili z enosmernim in neparametričnim postopkom ANOVA (Kruskal-Wallis test), test razlik med obravnavanimi skupinami pa s postopkom večkratne primerjave Dunnett C.

### Kometni test z migetalkarjem *Tetrahymena thermophila*

Kometni test ali elektroforezo posameznih celic, ki so ga razvili Singh in sod. (1988), smo prilagodili postopku, ki ga je za različico z migetalkarjem *Tetrahymena thermophila* razvila Lah (2004). Celice smo gojili v aksenični laboratorijski kulturi v bogatem gojišču za praživali (Schultz, 1997).

24 ur pred izvedbo testa smo kulturo praživali inokulirali v gojišča z vklopljenimi vzorci, ki smo jih sterilizirali s filtracijo skozi 0,22 µm membranske filtre. Po 24 urah smo migetalkarje vklopili v agarozne minigele na mikroskopskih objektivih. Sledila je alkalna liza celic (pH = 12,4), razvijanje DNA v elektroforetskem pufru, elektroforeza in nevtralizacija. DNA smo obarvali z etidijevim bromidom. Poškodbe jedrne DNA smo ovrednotili z epifluorescentnim mikroskopom in digitalno kamero ter programskim paketom Komet 5.0 za računalniško analizo slike.

Za oceno genotoksičnosti smo izbrali parameter repni moment po Olivu (RM-Olive), ki upošteva vrednosti zajetih signalov v glavi in repu kometa:  $RM-Olive = (DNA_{glava} - DNA_{rep}) \times \%DNA_{rep} \times 0,01$  (Olive in sod., 1990). Pozitivni rezultat kometnega testa je statistično značilno povečanje genotoksičnosti v primerjavi z negativno kontrolo. Za negativno kontrolo smo gojili praživali *Tetrahymena thermophila* v gojišču z vklopljeno vodo MQ. Za pozitivno kontrolo smo celice iz istega gojišča izpostavili 500 mikro molarini raztopini vodikovega peroksida.

Za statistično analizo podatkov smo prilagodili metodo, ki so jo opisali Verde in sod. (2006). Rezultate smo analizirali s programskim paketom R. Osnovne statistične parametre smo določili s pomočjo vgrajenih funkcij, razvoj in obdelavo modelov pa smo opravili z dodatkom za analizo preživetja, 'survival'.

## REZULTATI IN RAZPRAVA

V industriji, kmetijstvu in domačih gospodinjstvih dandanes uporabljamo številne potencialno (geno)toksične kemijske spojine (težke kovine, policiklične aromatske ogljikovodike (PAH), poliklorirane bifenile (PCB), pesticide...) Te snovi, še posebno ksenobiotiki, so navzoče v kompleksnih mešanica, ki so za prisotne organizme pogosto mutagene (Ohe in sod., 2004).

V naši raziskavi smo z uporabo fizikalno-kemijskih analiz skušali ugotoviti koncentracije težkih kovin, PAH, pH, redoks potenciala, sulfatov, fosfatov, dušika in ogljika (pregl. 1). Ti parametri lahko pomembno vplivajo na toksični in genotoksični potencial vzorca (Nieboer in Richardson, 1980), ki smo ga preverili s testom toksičnosti Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>, s testom mutagenosti Ames in s kometnim testom kot enim najobčutlivejših testov za geotoksičnost.

Uredba o kemijskem stanju površinskih voda (Uredba., Ur.l. RS, 2002) določa mejne vrednosti fizikalno-kemijskih parametrov in merila za čezmerno obremenjenost površinskih voda. Fizikalno-kemijske analize vzorcev jezerske vode (pregl. 1) so pokazale, da nobeden od preiskovanih parametrov jezerske vode iz izbranih vzorčnih območji (J1–J4) ni presegel predpisanih mejnih vrednosti. Vsebnosti vseh preiskovanih policikličnih aromatskih ogljikovodikov so bile pod mejo kemijske detekcije (<0,04 µg L<sup>-1</sup>; rezultati niso prikazani v preglednici 1).

Rezultati testa Thamnotoxkit F<sup>TM</sup> so za vse jezerske vzorce v vseh redčitvah pokazali tako majhno smrtnost testnega organizma, da izračun LC<sub>50</sub> ni bil smiseln za nobeno od ponovitev testa (rezultati niso prikazani). Odzivi so se pri posameznih vzorcih nekoliko razlikovali, vendar smrtnost testnega organizma v nobenem primeru ni presegla 10 %, ki jih po normativih testa sicer lahko doseže sama negativna kontrola (Microbiotests Ltd., Belgium, Standard Operational Procedure for Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>, 2006). Možno, je, da toksičnosti nismo dokazali zaradi filtracije vzorcev pred testiranjem, s čimer smo lahko odstranili del toksičnega bremena vzorca.

Preglednica 1. Fizikalno-kemijske analize vzorcev jezerske vode  
Table 1. Physico-chemical parameters of lake water samples

Parameter	Enote	Vzorec			
		J1	J2	J3	J4
Meritve na terenu					
Temperatura	°C	17,6	18,2	17,3	17,5
Vrednost pH	/	8,60	8,28	8,26	8,29
Redoks potencial	mV	484	489	483	487
Motnost	FTU	7	14	7	15
Analize vode					
Ogljik – celotni organski TOC	mgC L <sup>-1</sup>	13,1	14,5	16,4	17,7
Ogljik – raztopljeni organski DOC	mgC L <sup>-1</sup>	8,97	9,97	10,90	11,80
Amonijev dušik	mgN L <sup>-1</sup>	0,16	0,16	0,22	0,22
Nitratni dušik	mgN L <sup>-1</sup>	0,55	1,02	1,04	0,79
Nitritni dušik	mgN L <sup>-1</sup>	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3
Sulfat	mg L <sup>-1</sup>	38,5	44,5	8,73	28,5
Klorid	mg L <sup>-1</sup>	5,84	29,60	30,10	12,40
Fosfor celotni – F	mg L <sup>-1</sup>	0,05	0,03	0,04	0,03
Kalcij – Ca	mg L <sup>-1</sup>	52,4	211,0	214,0	67,6
Magnezij – Mg	mg L <sup>-1</sup>	14,0	15,2	14,2	20,8
Natrij – Na	mg L <sup>-1</sup>	6,66	59,20	58,70	8,32
Kalij – K	mg L <sup>-1</sup>	2,31	42,8	42,4	2,34
Težke kovine					
Arzen raztopljeni – As	µg L <sup>-1</sup>	<0,5	1,3	1,4	0,5
Svinec raztopljeni – Pb	µg L <sup>-1</sup>	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Živo srebro – Hg	µg L <sup>-1</sup>	<0,20	<0,20	<0,20	<0,20
Kadmij raztopljeni – Cd	µg L <sup>-1</sup>	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Krom raztopljeni – Cr	µg L <sup>-1</sup>	<5,0	<5,0	<5,0	<5,0
Nikelj raztopljeni – Ni	µg L <sup>-1</sup>	<1,0	1,5	1,7	<1,0
Cink raztopljeni – Zn	µg L <sup>-1</sup>	<2,0	18,1	3,3	<2,0
Baker raztopljeni – Cu	µg L <sup>-1</sup>	<1,0	1,1	1,3	<1,0

Test akutne toksičnosti Thamnotoxkit F<sup>TM</sup> spada v skupino mikrobiotestov. Ti biotesti zavzamejo malo laboratorijskega prostora, so cenovno ugodni, preprosti, hitri in občutljivi ter dajejo ponovljive rezultate (Derksen, 2002). Thamnotoxkit F<sup>TM</sup> spada med najbolj občutljivejše mikrobioteste (Willemsen in sod., 1995). V Sloveniji uporaba tega razmeroma novega testa toksičnosti še ni razširjena. Sladkovodni škrgonožec *Th. Platyurus*, ki ga uporabljamo v tem testu, je ubikvitaren vodni organizem. Njegov najpogostejši življenjski prostor so presihajoči ribniki, začasna jezera in luže. V ekotoksikoloških raziskavah s sladkovodnimi rakci pogosto vrednotimo prisotnost toksičnih učinkov onesnaževal v vzorcih površinskih voda (Stark in Banks, 2003). Zaradi navedenih vzrokov je bil ta biotest v raziskavi toksičnosti jezerskih voda tudi izbran. Kljub temu, da rezultati testa akutne toksičnosti Thamnotoxkit F<sup>TM</sup> niso potrdili toksičnega učinka vzorcev jezerske vode, toksičnosti na podlagi enega biotesta še ne moremo izključiti. Za boljši pregled toksičnih učinkov jezerskih voda iz Šaleške doline in biološke ustreznosti preizkušene testnega kita bi bilo potrebno vzorce pregledati še z drugimi testi toksičnosti v katerih so zastopani testni organizmi z različnih taksonomskih nivojev in z različni končni odzivi.

Rezultati testa Ames z in brez vključitve metabolne aktivacije so predstavljeni v preglednici 2. S sevom TA97 smo pri testu z aktivacijo dokazali mutageni potencial vzorcev 2 in 3. Pri testu brez aktivacije kaže potencialni mutageni učinek le vzorec 2 (pregl. 2).

Table 2. Results of the Ames test with (+S9) and without (–S9) activation of four lake water samples tested with the bacteria *S. typhimurium* strains TA97, TA98 and TA100 expressed as mean (P) and standard deviation (SD) of revertants/plate and induction factors (IF)

Preglednica 2. Rezultati Ames testa z (+S9) in brez (–S9) aktivacije vzorcev jezerske vode, testiranih s TA97, TA98 in TA100 sevi bakterije *S. typhimurium*, podani kot povprečje (P) in standardni odklon (SD) števila revertant/ploščo in faktor indukcije (IF)

Vzorec	TA97		TA98		TA100	
	Št. revertant ploščo	Faktor indukcije	Št. revertant Ploščo	Faktor indukcije	Št. revertant ploščo	Faktor indukcije
–S9						
Negativna kontrola	60,5±20,5	1	26±3	1	87,0±5,3	1
	P±SD	IF±SD	P±SD	IF±SD	P±SD	IF±SD
J1	91,0±36,8	1,50±0,50	25,6±6,8	0,98±0,26	86,9±12	0,99±0,14
J2	105,5±24,8	1,74±0,35	19,9±3,4	0,76±0,13	73,2±13,7	0,84±0,15
J3	98,8±11,1	1,63±0,22	24,8±5,2	0,95±0,20	68,6±15,3	0,78±0,17
J4	71,7±24,9	1,18±0,36	22±4,4	0,84±0,17	78,1±9,2	0,89±0,10
ICR (0,1 µg/ploščo)	163,3±25,9	2,7±0,43				
4NQO (0,5 µg/ploščo)			347,5±4,9	13,4±0,21		
NA (3,0 µg/ploščo)					221,3±7,4	2,54±0,08
+S9						
Negativna kontrola	59,0±6,2	1	15,7±3,2	1	65,5±4,9	1
	Povp.±SD	IF±SD	povp.±SD	IF±SD	povp.±SD	IF±SD
J1	75,5±31,3	1,28±0,57	19,3±3,5	1,23±0,23	66,1±12	1,00±0,18
J2	131,1±33,2	2,22±0,55	18,1±6,3	1,15±0,42	63,3±16,1	0,96±0,26
J3	139,9±18,6	2,37±0,15	21,9±4,5	1,39±0,28	63,6±17,1	0,97±0,26
J4	96,8±18,2	1,64±0,25	21,1±5,2	1,34±0,33	48,8±8,3	0,74±0,12
BP (50 µg/ploščo)	104,0±13,0	1,76±0,21				
2AF (10 µg/ploščo)			494,7±4,0	31,50±2,51	191,0±35,2	2,92±0,67

Test Ames se zelo pogosto uporablja v monitoringu mutagenosti voda in je najbolj validiran in razširjen *in vitro* test za identifikacijo mutagenega potenciala tako posameznih poznanih snovi kot kompleksno sestavljenih okoljskih vzorcev. S testom dokazujemo sposobnost sestavin vzorca za indukcijo točkovnih mutacij, ki so vzrok številnih genetskih bolezni. Pozitivni rezultati tega bakterijskega testa kažejo, da testna snov/mešanica snovi inducira točkovne mutacije z zamenjavo baz ali premikom bralnega okvirja v genomu *Salmonella typhimurium*. Negativni rezultati kažejo, da testna snov/mešanica snovi pri takšnih testnih pogojih ni mutagena za izbrani testni organizem (Koivusalo in Vartiainen, 1995). Seva TA97 in TA98 zaznavata mutagene snovi, ki so sposobne indukcije premika bralnega okvirja v histidinskem genu in tako spremenijo mutanto nazaj v divji tip. Takšne snovi so npr. nitroareni, aromatski amini in žveplo vsebujoče heterociklične spojine. Sev TA100 pa zaznava mutagene snovi, ki so sposobne zamenjave baz (GC para) v mutiranem genu. Mnoge mutagene snovi pa imajo sposobnost indukcije revertant obeh sevov (Chen in White, 2004).

Kljub temu, da analizirani fizikalno-kemijski parametri vzorcev jezerskih voda v našem primeru niso presegali mejnih vrednosti, smo s testom Ames v vzorcu 3 zaznali prisotnost snovi, ki za mutageno delovanje potrebujejo bioaktivacijo, v vzorcu 2 pa tudi tiste, ki so direktno mutagene. Vzorca 2 in 3 se od ostalih dveh razlikujeta po večji vsebnosti nitratnega dušika in nekaterih težkih kovin, ki bi eventualno lahko bili induktorji mutacij, vsebujeta pa tudi večje količine klorida, kalcija in natrija (pregl. 1). Številni avtorji poročajo, da je zaradi kombiniranja sestavin v vzorcu (npr. sinergizma in antagonizma) izredno težko določiti povezave med vsebnostjo posameznih onesnaževal v vzorcu in rezultati testov (geno)toksičnosti (Bekaert in

sod., 1999). V vodnih vzorcih pogosto zaznamo težke kovine, PAH, PCB ali pesticide, vendar vsebnosti teh kemikalij pogosto ne korelirajo z ocenjeno (geno)toksičnostjo vzorca (Ohe in sod., 2004). Prav tako številna so poročila, kjer rezultati fizikalno-kemijskih analiz ne zaznavajo (geno)toksičnih snovi, vendar preiskovani vzorci vseeno izražajo (geno)toksične učinke (Maron in Ames, 1983; Donnelly in sod., 1995).

S kometnim testom z migetalkarjem *T. thermophila* za noben vzorec jezerske vode nismo dokazali genotoksičnega potenciala, saj stopnja poškodb DNA, ki so jih povzročili vzorci jezerske vode ni bila statistično značilno večja kot pri negativni kontroli. Rezultate kometnega testa prikazuje slika 1.

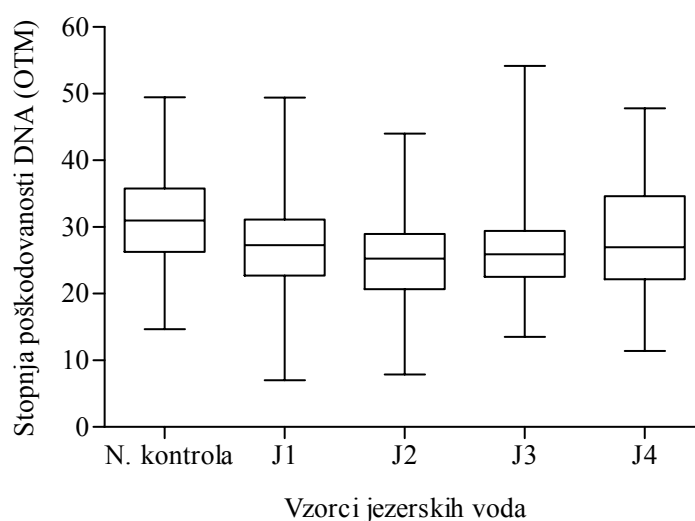


Figure 1. Nuclear DNA damage in *T. thermophila* treated with lake water samples represented as OTM (Olive tail moment). Results from 100 comets for each water sample are shown as box-and-whiskers plots. 50 % of the OTM data are included in the boxes. The inner lines mark the median values and the top and bottom whiskers represent 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles.

Slika 1. Poškodbe jedrne DNA na celicah *T. thermophila*, izražene z OTM (repni moment po Olivu) po izpostavitvi vzorcem jezerske vode. Rezultati 100 ocenjenih celic so prikazani v grafikonu z okvirji z ročaji. Okvirji obsegajo 50 % vrednosti OTM. Vmesne meje predstavljajo mediane, zgornji in spodnji ročaji pa 25. in 75. percentile.

Stopnje poškodb DNA, ki so jih povzročili vzorci jezerskih voda, so bile celo manjše, kot pri negativni kontroli. Idealna negativna kontrola, 'kontrolna jezerske vode', bi namreč morala vsebovati vse sestavine jezerske vode, z izjemo genotoksičnih sestavin. Sestavine, ki so v manjših količinah lahko prisotne v jezerski vodi (mikroelementi...), bi na testni organizem lahko delovale celo zaščitno in zmanjšale genotoksični odziv. Bekaert in sod. (2002) poročajo, da je ocena onesnaženosti okolja v filtriranih izlužkih vzorcev zemlje lahko podcenjena. Na podlagi takih poročil lahko predvidevamo, da je filtracija vzorcev lahko vplivala tudi na podcenitev genotoksičnega vpliva vzorcev jezerske vode v našem primeru.

V številnih ekotoksikoloških študijah se je test Ames izkazal za manj občutljivega kot kometni test (Musatova in sod., 1999; Lah in sod., 2005), kar se v naši raziskavi ni pokazalo. Predvidevamo, da so v vzorcih jezerskih voda Šaleške doline prisotne snovi, ki delujejo mutageno, ne povzročajo pa enoverižnih prelomov DNA, ki jih sledimo z alkalno različico kometnega testa.

Rezultati biotestov toksičnosti in genotoksičnosti običajno niso direktno primerljivi. Ker imajo snovi, ki delujejo toksično v organizmih drugačna prijemališča kot genotoksične snovi,

imajo določene substance lahko samo toksični učinek in ne genotoksičnega ter obratno (Chroust in sod., 2006). Toksične snovi največkrat posegajo v delovanje celičnega metabolizma, na encimatskem ali hormonalnem (Hill in sod., 2002) nivoju oz. preko mehanizmov oksidativnega stresa (Hoffman, 2002). Genotoksične učinkovine najpogosteje povzročajo poškodbe DNA ali/in inhibirajo samopopravljalne mehanizme DNA (Bertin in Averbeck, 2006). V naši raziskavi nismo dokazali toksičnega potenciala jezerskih voda v Šaleški dolini, dokazali pa smo mutageni potencial v dveh vzorcih. Zanesljivost teh rezultatov pa je potrebno potrditi z uporabo večjega števila biotestov z organizmi ali celicami na različnih trofičnih nivojih.

V ekotoksikoloških raziskavah želimo pridobiti širši vpogled na dogajanja v okolju. Celostni pristop do problematike lahko dosežemo le s kombiniranjem fizikalno-kemijskih analiz z dobro izbranim naborom biotestov. Če z biotestom potrdimo škodljive učinke okolja, lahko glede na karakteristike danega okolja in študije poti in načinov prenosa onesnaževal v ekosistemu s fizikalno-kemijskimi analizami identificiramo in kvantificiramo znane in tudi potencialno (geno)toksične snovi.

### SKLEPI

Za celovitejši pregled mehanizmov in intenzivnosti vpliva okolja na organizme je rezultate uveljavljenih metod fizikalno-kemijskih analiz potrebno dopolniti še z biološkim testiranjem toksičnosti in genotoksičnosti.

Pred dokončno oceno biološke relevantnosti izbranega nabora biotestov za vrednotenje vzorcev površinskih voda, bi bilo v nadaljnjih preučevanjih obravnavanih vzorcev potrebno preizkusiti več različnih biotestov toksičnosti s testnimi organizmi različnih taksonomskih nivojev in različnimi končnimi odzivi.

Vse v tej raziskavi uporabljene bioteste za toksičnost in genotoksičnost bi bilo potrebno tako prilagoditi, da bi lahko testirali nefiltrirane vzorce jezerskih vod. Predvidevamo, da bi bili rezultati v takem primeru lahko drugačni in bolj zanesljivi.

### SUMMARY

Every day thousands of chemical compounds are released into the atmosphere, land and water bodies. Thus numerous contaminants, especially xenobiotics, can eventually be found in surface waters and sediments. Some include toxic, genotoxic compounds or/and potent carcinogens. These hazardous components and their degradation metabolites affect aquatic and soil ecosystems and ultimately human health.

Coal and lignite-mining and their use for heating, industry, nearby thermal power plant and lead smelter, traffic and agriculture have all left severe ecological consequences in Slovenian industrial region of Šalek valley. Physicochemical analyses of four lake water samples have been supplemented with a battery of selected biotests. A commercial toxicity screening test Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>, which includes a freshwater crustacean *Thamnocephalus platyurus* and two genotoxicity determination tests, a standard Ames plate incorporation test with *Salmonella typhimurium* TA97, TA98 and TA100 strains and the comet assay with the ciliate *Tetrahymena thermophila* have been performed.

The results of physicochemical analyses showed no positive deviation from the limit values of Slovenian Decree on the chemical status of surface waters. Also the results of the Thamnotoxkit F<sup>TM</sup> and the comet assay showed no genotoxic activity. The results of the Ames test confirmed the mutagenic potential of lake water samples 2 and 3 (both from lake of Velenje).

The suggested biotest battery has to be further extended and examined before a conclusion of its biological relevance toward surface water ecotoxicity can be drawn.



## VIRI

- Bertin, G./ Averbeck, D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie*, 88(2006), 1549–1559.
- Bekaert, C./ Rast, C./ Ferrier, V./ Bispo, A./ Jourdain, M.J./ Vasseur, P. Use of *in vitro* (Ames and Mutatox) and *in vivo* (Amphibian Micronucleus test) assays to assess the genotoxicity of leachates from contaminated soil. *Organic Geochemistry*, 30(1999), 953–962.
- Bekaert, C./ Ferrier, V./ Marty, J./ Pfohl-Leszkowicz, A./ Bispo, A./ Jourdain, M.J./ Jauzein, M./ Lambomez-Michael, L./ Billard, H. Evaluation of toxic and genotoxic potential of stabilized industrial waste and contaminated soils. *Waste Management*, 22(2002), 241–247.
- Chen, G./ White, P.A. The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review. *Mutation research*, 567(2004), 151–225.
- Chroust, K./ Pavlova, M./ Prokop, Z./ Mendel, J./ Božkova, K./ Kubat, Z./ Zajičková V./ Damborsky J./ Quantitative structure–activity relationships for toxicity and genotoxicity of halogenated aliphatic compounds: Wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Chemosphere*, 2006, v tisku.
- Derksen, J.G.M. Microbiotests, Possibilities and Limitations. With special reference to (sub)tropical conditions and developing countries. Amsterdam, Aquasense, 2000, 76 str.
- Donnelly, K.C./ Safe S.H./ Randerath, K./ Randerath, E. Bioassays-based risk assessment of complex mixtures. *Journal of hazardous materials*, 14(1995), 341–350.
- EPA Method 550.1, Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Drinking Water by Liquid-Solid Extraction and HPLC with Coupled Ultraviolet and Fluorescence Detection, 1990, 22 str.
- Fendt, K. Ecotoxicological Problems Associated with Contaminated Sites. *Toxicology Letters*, 140–141(2003), 353–365.
- Hach DR/400 Spectrophotometer Handbook, Loveland, 1999.
- Hill, M./ Stabile, C./ Kraig Steffen, L./ Hill A. Toxic effects of endocrine disrupters on freshwater sponges: common developmental abnormalities. *Environmental Pollution*, 117(2002), 295–300.
- Hoffman D.J. Role of selenium toxicity and oxidative stress in aquatic birds. *Aquatic Toxicology*, 57(2002), 11–26.
- Josephy, P.D./ Gruz, P./ Nohmi, T. Recent Advances in the Construction of Bacterial Genotoxicity Assays. *Mutation Research*, 386(1997), 1–23.
- Koivusalo, M./ Vartiainen, T. Drinking water mutagenicity and leukemia lymphomas and cancers of the liver, pancreas and soft tissue. *Archives of Environmental Health*, 50(1995), 269–76.
- Lah, B./ Malovrh, Š./ Narat, M./ Čepeljnik, T./ Marinšek-Logar, R. Detection and quantification of genotoxicity in wastewater-treated *Tetrahymena thermophila* using the comet assay. *Environ. toxicol.*, 19( 2004), 545–553.
- Lah, B./ Žinko, B./ Narat, M./ Marinšek Logar, R. Monitoring of Genotoxicity in Drinking Water Using *in vitro* Comet Assay and Ames Test. *Food Technology and Biotechnology*, 43 (2005), 139–146.
- Maron, D.M./ Ames, N.B. Revised methods for the *Salmonella typhimurium* mutagenicity assay. *Mutation Research*, 113(1983), 211–245.
- Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth edition. United States Environmental Protection Agency, 2002, 275 str.
- Musatova, S.A./ Anisimov, V.N./ Andre, V./ Vigueux, C./ Godard, T./ Sichelc F. Effects of melatonin on N-nitroso-N-methylurea-induced carcinogenesis in rats and mutagenesis *in vitro* (Ames test and COMET assay). *Cancer Letters*, 138(1999), 37–44.
- Nieboer, E./ Richardson, D.H.S. The replacement of the nondescript term heavy metals by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environmental Pollution*, 1(1980), 3–26.
- Ohe, T./ Watanabe, T./ Wakabayashi, K. Mutagens in surface waters: a review. *Mutation Research* 567(2004), 109–149.
- Olive, P.L./ Banáth, J.P./ Durand, R.E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “comet” assay. *Radiation Research*, 112(1990), 86–94.
- Program monitoringa kakovosti jezer v letu 2006. Ljubljana, Ministrstvo za okolje in prostor, Agencija Republike Slovenije za okolje, 2006, 24 str.
- Resolucija o nacionalnem programu varstva okolja 2005–2012, Ur.l. RS št. 2(2006), 3.
- Singh, N.P./ McCoy, M.T./ Tice, R.R./ Schneider, E.L. A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. *Experimental Cell Research*, 175(1988), 184–191.
- SIST DIN 38404-6. Nemške standardne metode za preiskavo vode, odpadne vode in usedlin – Fizikalni in fizikalno-kemijski parametri (skupina C) – Določevanje redoks potenciala (C 6), (2000), 10 str.
- SIST DIN 38406-29, Nemške standardne metode za preiskavo vode, odpadne vode in usedlin – Kationi (skupina E) – 29. del: Določevanje 61 elementov z masno spektrometrijo z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-MS) (E29), 2000, 25. str.

- SIST EN ISO 10304-2, Kakovost vode – Določevanje raztopljenih anionov z ionsko kromatografijo – 2. del: Določevanje bromida, klorida, nitrata, nitrita, ortofosfata in sulfata v odpadni vodi. Geneve, Switzerland, International Organization for Standardization, 1998, 21 str.
- SIST EN ISO 17993, Kakovost vode – Določevanje 15 policikličnih aromatskih ogljikovodikov (PAH) v vodi s tehniko HPLC s fluorescenčno detekcijo po ekstrakciji tekoče-tekoče. Geneve, Switzerland, International Organization for Standardization, 2004, 23 str.
- SIST EN ISO 6878, Kakovost vode – Določevanje fosforja – Spektrometrijska metoda z amonijevim molibdatom. Geneve, Switzerland, International Organization for Standardization, (2004), 23 str.
- SIST EN ISO 7027, Kakovost vode - Ugotavljanje motnosti. Geneve, Switzerland, International Organization for Standardization, 2000, 10 str.
- SIST ISO 10381-6. Kakovost tal - Vzorčenje - 6. del. Navodilo za zbiranje, ravnanje in hranjenje tal za oceno aerobnih mikrobioloških procesov v laboratoriju. Geneve, Switzerland, International Organization for Standardization, 1993, 4 str.
- SIST ISO 10523, Kakovost vode - Določanje pH. Geneve, Switzerland, International Organization for Standardization, 1996, 10 str.
- SIST ISO 11464. Kakovost tal – Priprava vzorcev za fizikalno-kemijske analize. Geneve, Switzerland, International Organization for Standardization, 1994, 11 str.
- SIST ISO 5666, Kakovost vode – Določevanje živega srebra. Geneve, Switzerland, International Organization for Standardization, 2000, 16 str.
- SIST ISO 7980, Kakovost vode - Določevanje kalcija in magnezija - Atomska absorpcijska spektrometrijska metoda. Geneve, Switzerland, International Organization for Standardization, 2000, 5 str.
- SIST ISO 8245, Kakovost vode – Smernice za določevanje celotnega organskega ogljika (TOC) in raztopljenega organskega ogljika (DOC). Geneve, Switzerland, International Organization for Standardization, 2000, 11 str.
- SIST ISO 9964-1, Kakovost vode – Določevanje natrija in kalija – 1. del: Določevanje natrija z atomsko absorpcijsko spektrometrijo. Geneve, Switzerland, International Organization for Standardization, 2000, 4 str.
- SIST ISO 9964-2 Kakovost vode – Določevanje natrija in kalija – 2. del: Določevanje kalija z atomsko absorpcijsko spektrometrijo. Geneve, Switzerland, International Organization for Standardization, 2000, 4 str.
- SIST ISO 9964-3, Kakovost vode – Določevanje natrija in kalija – 3. del: Določevanje natrija in kalija s plamensko atomsko spektrometrijo. Geneve, Switzerland, International Organization for Standardization, 2000, 5 str.
- Schultz, T.W. Tetratox: *Tetrahymena pyriformis* population growth impairment endpoint-a surrogate for fish lethality. *Toxicology Methods*, 7(1997), 289–309.
- Stark, J.D./ Banks, E.J. Population Level Effects of Pesticides and other Toxicants on Arthropods. *Annual Review of Entomology*, 48(2003), 505–519.
- Šalej, M. Odnos prebivalcev obremenjenih območij do okolja in okoljskih problemov na vzorčnih primerih Šaleške doline in Zasavja. Velenje. ERICo Velenje, Inštitut za ekološke raziskave. *Dela*, 18(2002), 378–399.
- Uredba o kemijskem stanju površinskih voda. Ur.l. RS št. 11(2002), 461.
- Verde, P.E./ Geracitano, L.A./ Amado, L.L./ Rosa, C.E./ Bianchini, A./ Monserrat, J.M. Application of public-domain statistical analysis software for evaluation and comparison of comet assay data. *Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 604(2006), 71-82.
- Willemsen, A./ Vaal, M.A./ de Zwart, D. Microbiotests as tools for environmental monitoring. Bilthoven, National Institute of Public Health and Environmental Protection (RIVM), 1995, 39 str.
- White, P.A. The genotoxicity of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures. *Mutation Research*, 515(2002), 85–98.
- Zang, Y./ Zhong, Y./ Luo, Y./ Kong, Z.M. Genotoxicity of Two Novel Pesticides for the Earthworm *Eisenia fatida*. *Environmental Pollution*, 108(2000), 271–278.