

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Zina DEVETAK

**UGOTAVLJANJE GENOTOKSIČNIH VPLIVOV  
IZCEDNIH VOD IZ KOMUNALNIH DEPONIJ S  
KOMETNIM TESTOM NA CELICAH HEP-G2**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Zina DEVETAK

**UGOTAVLJANJE GENOTOKSIČNIH VPLIVOV IZCEDNIH  
VOD IZ KOMUNALNIH DEPONIJ S KOMETNIM TESTOM NA  
CELICAH HEP-G2**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**GENOTOXICITY EVALUATION OF WATER SOIL  
LEACHATES FROM MUNICIPAL LANDFILLS BY COMET  
ASSAY WITH HEP-G2 CELLS**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je nastalo v okviru univerzitetnega študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Eksperimentalno delo je bilo opravljeno v laboratorijih Katedre za mikrobiologijo in mikrobiološko biotehnologijo na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija medoddelčnega dodiplomskega študija biotehnologije je na seji dne 14.5.2009 za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Romano Marinšek Logar.

Recenzentka: prof. dr. Damjana DROBNE

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica:                   prof. dr. Branka JAVORNIK  
                                       Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članinca:                       prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR  
                                       Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica:                       prof. dr. Damjana DROBNE  
                                       Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Zina DEVETAK

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579(043.2)=163.6
KG	mikrobiologija/izcedne vode/komunalne deponije/genotoksičnost/ kometni test/HEP-G2
KK	AGRIS T01
AV	DEVETAK, Zina
SA	MARINŠEK LOGAR, Romana (mentorica)
KZ	SI-1000 LJUBLJANA, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2009
IN	UGOTAVLJANJE GENOTOKSIČNIH VPLIVOV IZCEDNIH VOD IZ KOMUNALNIH DEPONIJ S KOMETNIM TESTOM NA CELICAH HEP-G2
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	IX, 38 str., 16 pregl., 6 sl., 2 pril., 63 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Izcedne vode iz komunalnih deponij in odlagališč nenevarnih odpadkov vsebujejo mešanice zelo različnih kemijskih spojin, katerih strupeni in genotoksični učinki niso poznani in jih lahko dokažemo samo z biološkimi testi. S stalnim monitoringom sestave izcednih voda in ustreznim ravnanjem z njimi lahko omejimo velik del vpliva deponije na bližnjo okolico. V sklopu diplome smo testirali genotoksičnost vzorcev izcednih vod iz komunalnih deponij. Uvedli in preizkusili smo poseben postopek za kometni test s celično linijo HEP-G2, s katerim je poleg prelomov DNK možno dokazati tudi določene vrste oksidativnih poškb (oksidirane pirimidine, 8-oksogvanin in druge produkte oksidacije purinov). Pri testu smo uporabili restriktijska encima endonukleazo III in formamidopirimidin DNK glikozilazo. S preizkušenim postopkom smo testirali vzorce izcednih vod iz okolice nekaterih odlagališč komunalnih in nenevarnih odpadkov na Dolenjskem in v Zasavju. S postopkom kometnega testa smo dokazali genotoksičnost na ravni prelomov DNK pri vseh testiranih vzorcih, pri določenih pa tudi oksidativnih poškodb DNK. Za zanesljivejšo analizo genotoksičnosti vzorcev bi bilo potrebno uporabiti različne metode za ugotavljanje genotoksičnosti in uporabiti organizme in celice iz več trofičnih nivojev (prokarionti, evkariontski mikroorganizmi, rastline, nevretenčarji).

#### KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 579(043.2)=163.6  
CX microbiology/municipal landfills/water soil leachates/genotoxicity/comet assay/HEP-G2  
CC AGRIS T01  
AU DEVETAK, Zina  
AA MARINŠEK LOGAR, Romana (supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology  
PY 2009  
TI GENOTOXICITY EVALUATION OF WATER SOIL LEACHATES FROM MUNICIPAL LANDFILLS BY COMET ASSAY WITH HEP-G2 CELLS  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO IX, 38 p., 16 tab., 6 fig., 2 ann., 63 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Water soil leachates from municipal and non-hazardous waste landfills consist of different mixtures of non-similar chemicals, whose toxic and genotoxic properties are not known and can be proven only by bioassays. We can limit the influence of a landfill on the surrounding area by constantly monitoring water soil leachates composition and acting accordingly. In the present thesis, a special comet assay protocol with HEP-G2 cell line that indicates sample's genotoxicity and the presence of some types of oxidative damage to DNA (oxidised purines, 8-oxoguanine and other products of purine oxidation) had been set up and was tested. The assay was performed using the restrictive enzymes Endonuclease III and Formamidopyrimidine-DNA Glycosylase. Genotoxic properties of samples of water soil leachates from municipal and non-hazardous waste landfills from the regions of Dolenjska and Zasavje were evaluated by the assay. All samples were found to have genotoxic effects on HEP-G2 cells. Some samples were proven to cause oxidative damage to DNA. To further test the genotoxic properties of the samples, test organisms from different trophic levels should be used (Prokaryota, Eukaryotic microorganisms, plants and invertebrates).

## KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Kazalo prilog	VIII
Okrajšave in simboli	IX
<b>1 UVOD</b>	1
1.1 NAMEN DELA	2
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	3
2.1 ZGODOVINA KOMETNEGA TESTA	3
2.2 RAZLIČICE KOMETNEGA TESTA	4
<b>2.2.1 Alkalni kometni test</b>	4
<b>2.2.2 Nevtralni kometni test</b>	4
<b>2.2.3 Kometni test z uporabo specifičnih restriktijskih encimov</b>	5
<b>2.2.4 Nekatere manj pogoste različice kometnega testa</b>	5
2.2.4.1 Detekcija podvajajoče-se DNK	5
2.2.4.2 Detekcija prehodnih prelomov pri popravilu DNK	6
2.2.4.3 FISH različica kometnega testa	6
2.3 VIZUALIZACIJA KOMETOV	6
2.4 ANALIZA SLIKE	6
<b>2.4.1 Kvantitavina analiza poškodb DNK s programskimi paketi</b>	6
<b>2.4.2 Analiza s prostim očesom</b>	6
2.6 KALIBRACIJA	7
2.7 APLIKACIJE KOMETNEGA TESTA	7
<b>2.7.1 Testi genotoksičnosti</b>	7
<b>2.7.2 Okoljski monitoring</b>	7
<b>2.7.3 Raziskave, povezane z ljudmi</b>	8
2.7.3.1 Biomonitoring	8
2.7.3.2 Prehranske raziskave	8
2.7.3.3 Diagnoza bolezni	8
<b>2.7.4 Opazovanje popravljanja DNK</b>	8
2.7.4.1 Sposobnost celice za popravljanje DNK	9
2.8 STANDARDIZACIJA KOMETNEGA TESTA	9
2.9 IZCEDNE VODE IZ DEPONIJ	9
<b>3 MATERIAL IN METODE</b>	11

<b>3.1 VZORCI IZCEDNIH VOD</b>	11
<b>3.2 PREGLED IZBRANIH VZORČNIH MEST</b>	11
<b>3.2.1 Center za ravnanje z odpadki Dolenjske (CeROD)</b>	11
<b>3.2.2 Odlagališče Dobova</b>	12
<b>3.3 CELICE HEP-G2</b>	12
<b>3.4 TESTIRANJE GENOTOKSIČNOSTI S KOMETNIM TESTOM</b>	
– SHEMA DELA	13
<b>3.5 METODE</b>	13
<b>3.5.1 Gojenje in priprava celic HEP-G2 za kometni test</b>	13
3.5.1.1 Gojenje HEP-G2 celic	13
3.5.1.2 Priprava celic HEP-G2 za potrebe kometnega testa	14
<b>3.5.2 Kometni test</b>	14
3.5.2.1 Fiksacija celic v agarozni	14
3.5.2.1.1 Nanos prvega sloja agaroze	14
3.5.2.1.2 Nanos drugega sloja agaroze	14
3.5.2.1.3 Nanos tretjega sloja agaroze	14
3.5.2.2 Izpostavitev imobiliziranih celic vzorcem	15
3.5.2.3 Alkalna liza celic	15
3.5.2.4 Inkubacija minigelov z encimi (Dušinská, 2000)	15
3.5.2.5 Razvijanje superzvite DNK v elektroforetskem pufru	17
3.5.2.6 Elektroforeza minigelov	17
3.5.2.7 Nevtralizacija	17
3.5.2.8 Barvanje v etidijevem bromidu	18
3.5.2.9 Spiranje minigelov v Tris-HCl pufru (Osojnik, 2006)	18
3.5.2.10 Računalniška analiza rezultatov kometnega testa	18
3.5.2.11 Statistična analiza rezultatov	18
<b>4 REZULTATI</b>	19
<b>4.1 VIABILNOST CELIČNE LINIJE HEP-G2</b>	19
<b>4.2 REZULTATI ALKALNEGA KOMETNEGA TESTA</b>	
(DOKAZOVANJE DVOJNIH IN ENOJNIH PRELOMOV DNK)	19
<b>4.3 KOMETNI TEST S FORMAMIDOPIRIMIDIN GLIKOZILAZO</b>	
(DOKAZOVANJE OSKIDATIVNIH POŠKODB PURINOV)	24
<b>4.5 KOMETNI TEST Z ENDONUKLEAZO III</b>	
(DOKAZOVANJE OKSIDATIVNIH POŠKODB PIRIMIDINOV)	25
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	27
<b>6 POVZETEK</b>	31
<b>7 VIRI</b>	33
<b>ZAHVALA</b>	
<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Ključna odkritja na področju kometnega testa	3
Preglednica 2: Nekateri najbolj pogosto uporabljeni encimi in specifične poškodbe, ki jih zaznajo	5
Preglednica 3: Oznake vzorcev in mest, na katerih so bili vzorci odvzeti	11
Preglednica 4: Založna raztopina K-Na PBS 2006)	15
Preglednica 5: Delovna raztopina PBS	15
Preglednica 6: Pozitivna kontrola	15
Preglednica 7: Raztopina za alkalno lizo	15
Preglednica 8: Encimski reakcijski pufer	17
Preglednica 9: Elektroforetski pufer	17
Preglednica 10: 1 M Tris-HCl založna raztopina	17
Preglednica 11: 400mM Tris-HCl pufer	17
Preglednica 12: Viabilnost celic HEP-G2	19
Preglednica 13: Statistični prikaz rezultatov alkalnega kometnega testa z inkubacijo v encimskem reakcijskem pufru brez FPG.	23
Preglednica 14: Statistični prikaz rezultatov alkalnega kometnega testa z inkubacijo v encimskem reakcijskem pufre brez ENDO III.	23
Preglednica 15: Osnovna statistika za poškodbe jedrne DNK (RM-Olive) pri inkubaciji s FPG	25
Preglednica 16: Osnovna statistika za poškodbe jedrne DNK (RM-Olive) pri inkubaciji z ENDO III	26

## KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Shema testiranja genotoksičnosti s kometnim testom	13
Slika 2: Shema minigela z negativno kontrolo in nanešenim encimom.	16
Slika 3: Porazdelitve vrednosti RM-Olive za vzorce, ki smo jih v prvem poskusu inkubirali v encimskem reakcijskem pufru brez FPG.	21
Slika 4: Porazdelitve vrednosti RM-Olive za vzorce, ki smo jih v drugem poskusu inkubirali v encimskem reakcijskem pufru brez ENDO III.	22
Slika 5: Grafični prikaz razlike v stopnji poškodovanosti med inkubacijo s FPG in inbukacijo z encimskim reakcijskim pufrom brez FPG po posameznih vzorcih.	24
Slika 6 : Grafični prikaz razlike v stopnji poškodovanosti med inkubacijo z ENDO III in inbukacijo z encimskim reakcijskim pufrom brez ENDO III po posameznih vzorcih.	26

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Fizikalno kemijske analize vzorcev izcednih voda

Priloga B: Metode, uporabljeni pri fizikalno-kemijskih analizah

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

DMEM	Dulbeccov modificiran medij (angl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
DNK	Deoksiribonukleinska kislina
ENDO III	Rekombinantna endonukleaza III iz E. coli (SIGMA, E 0526)
FBS	zarodni telečji serum (angl. Fetal Bovine Serum)
FPG	formamidopirimidin-DNK glikozilaza iz E. coli (Trevigen, 4040-500-EB)
HBSS	angl. Hank's Buffered Salt Solution (Hankova puferska raztopina soli)
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina
LMP	low melting point (tališče pri nizki temperaturi, temperatura želiranja je pri 30°C)
mQ	Voda, očiščena z reverzno osmozo
NK	Negativna kontrola
NMP	normal melting point (tališče pri običajni temperaturi, temperatura želiranja je pri 36°C)
PBS	fosfatni pufer (angl. Phosphate Buffered Saline)
Tripsin-EDTA	Encim tripsin v etilendiaminotetraocetni kislini

## 1 UVOD

Zadnja leta vedno več govorimo o našem odnosu do okolja ter o tem, kako vplivamo nanj. Ljudje se vedno bolj zavedamo, da ohranjanje okolja ni le koristno, temveč nujno za obstoj mnogih niš zemeljskega ekosistema – in hkrati za naš obstoj. Vedno bolj nam postaja jasno tudi, da varovanje okolja ni le naloga skupnosti, temveč predvsem vsakega posameznika. Vedno več ljudi se zaveda, da bo plastična vrečka, ki smo jo odvrgli v gozdu, tam tudi ostala.

Razmere na področju ločevanja, odlaganja in recikliranja odpadkov so boljše kot nekdaj, vendar še vedno pridelamo veliko količino odpadkov, ki jih je potrebno nekje skladiščiti. Čeprav se tehnologija, ki jo uporabljam pri postavljanju in vodenju deponij, izboljšuje, le-te še vedno vplivajo na okolje, v katero jih postavimo.

Vpliv deponije na okolje je potrebno stalno nadzorovati, še posebej v primeru, ko se v bližnji okolini nahajo kmetijske površine ali naselbine. Izcedne vode so ena izmed vezi med deponijo in okolico, saj preko njih lahko prehajajo onesnaževala. S stalnim monitoringom sestave izcednih voda in ustreznim ravnanjem z njimi lahko omejimo velik del vpliva deponije na bližnjo okolico.

Po pravilniku o odlaganju odpadkov (2000) mora upravljalec odlagališča za nevarne ali nenevarne odpadke zagotavljati meritve emisije snovi pri odvajjanju izcedne vode in onesnažene padavinske vode s površin odlagališča na podlagi štiriindvajsetnih reprezentativnih vzorcev. Poskrbeti mora tudi za meritve fizikalno-kemijskih parametrov onesnaženosti podzemnih voda z nevarnimi snovmi, če so v vplivnem območju odlagališča. Monitoring izcednih vod in podzemnih voda z biotesti še ni zakonsko predpisan.

Izcedne vode iz komunalnih deponij in odlagališč nenevarnih odpadkov vsebujejo mešanice zelo različnih kemikalij, katerih strupeni in genotoksični učinki niso poznani in jih lahko dokažemo z biološkimi testi. Eden izmed takih bioloških testov za dokazovanje genotoksičnosti je kometni test.

## 1.1 NAMEN DELA

V diplomski nalogi smo želeli uvesti in preizkusiti poseben postopek za kometni test s celično linijo HEP-G2, s katerim je mogoče dokazati genotoksičnost vzorca na ravni enojnih in dvojnih prelomov DNK in tudi določene specifične tipe poškodb DNK (oksidirane pirimidine, 8-oksogvanin in druge produkte oksidacije purinov).

S preizkušenim postopkom smo želeli testirati genotoksičnost vzorcev izcednih vod iz okolice nekaterih odlagališč komunalnih in nenevarnih odpadkov na Dolenjskem in v Zasavju in ugotoviti stopnjo oksidativnih poškodb DNK, ki jih povzročijo ti vzorci.

## 1.2 HIPOTEZE

Predvidevamo, da bomo s preizkušenim izbranim postopkom lahko ustrezno dokazali oziroma ovrgli genotoksične vplive vzorcev izcednih vod na celice HEP-G2 ter dokazali morebitno prisotnost oksidiranih pirimidinov, 8-oksogvaninov in drugih produktov oksidacije purinov, kot posledico vpliva vzorcev na jedrno DNK celic HEP-G2.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ZGODOVINA KOMETNEGA TESTA

Začetki kometnega testa segajo v leto 1978, ko sta Rydberg in Johanson kot prva neposredno ocenila poškodbe DNK v posameznih celicah. Celice sta lizirala in jih na predmetnih stekelcih vklopila v agarozo pri rahlo alkalnih pogojih, pri katerih je prišlo do delnega razvijanja DNK. Po nevtralizaciji sta celice obarvala z barvilo akridin oranž in ocenila poškodbe DNK z merjenjem fluorescence od zelene, ki je označevala dvooverižno DNA, do rdeče, ki je označevala enoverižno DNA (Rydberg in Johanson, 1978).

Östling in Johanson sta leta 1984 razvila tehniko elektroforeze minigelov, s katero se je zaznavanje poškodb DNK na ravni posamezne celice še izboljšalo. Celice sta vklopila v agarozo in jih nanesla na predmetno stekelce ter jih razgradila s pomočjo detergentov in visokih koncentracij soli. Več dvojnih prelomov kot so imele celice, bolj je njihova DNA potovala proti anodi. Potupočno DNA sta obarvala z etidijevim bromidom in izmerila intenziteto fluorescence v dveh določenih točkah znotraj dobljenega vzorca s pomočjo fotometra (Östling in Johanson, 1984).

Singh in sodelavci so leta 1988 uvedli tehniko minigelov, pri kateri je elektroforeza potekala v alkalnih pogojih ( $\text{pH} > 13$ ). Pri tem pH je povečana selitev DNA povezana s povečano stopnjo neposrednih enojnih prelomov, alkalno labilnih mest in enojnih prelomov, povezanih z nepopolno popravljenimi mesti izreza. Ker večina genotoksičnih agensov povzroča veliko več enojnih prelomov in/ali alkalno labilnih mest kot direktnih dvojnih prelomov, je ta različica testa omogočala veliko večjo občutljivost pri identifikaciji genotoksičnih vplivov (Singh in sod. 1988).

Dve leti zatem so Olive in sodelavci razvili drugačno različico alkalnega kometnega testa, pri kateri poteka elektroforeza pri  $\text{pH} \sim 12,3$  (Olive in sod., 1990).

Od uvedbe alkalne različice kometnega testa leta 1988 se je razpon uporabe in število razvijalcev same tehnike močno povečalo.

Preglednica 1: Ključna odkritja na področju kometnega testa (Tice in sod., 2000)

<b>1984</b>	Östling and Johanson (1984) prva razvijeta minigelsko tehniko, pri kateri se z elektroforezo zaznava poškodbe DNA na ravni posamezne.
<b>1988</b>	Singh in sodelavci (1988) razvijejo tehniko minigelov, pri kateri elektroforeza poteka pri alkalnih pogojih .
<b>1990</b>	Olive in sodelavci (1990) uvedejo novo alkalno različico testa, pri katerem elektroforeza poteka pri $\text{pH} \sim 12,3$ .
<b>1993</b>	Collins in sodelavci (1993) uvedejo tehniko minigelov z uporabo encima endonukleaze III, s katero so zaznali oksidirane pirimidine.
<b>1996</b>	Collins in sodelavci (1996) uvedejo tehniko minigelov z uporabo encima FPG, s katero se zazna 8-OH gvanin in drugi poškodovani purini.
<b>1998</b>	Sauvaigo in sodelavci (1998) uvedejo uporabo imunofluorescentne tehnike za zaznavanje tipov poškodb DNA s specifičnimi protitelesi.

## 2.2 RAZLIČICE KOMETNEGA TESTA

### 2.2.1 Alkalni kometni test

Singh in sodelavci so uvedli postopek, pri katerem je liza potekala v alkalnem območju pri pH=10. Raztopina za alkalno lizo je vsebovala 2,5 M NaCl, Triton X-100 in sarkozil. V raztopini so minigele namakali 1 uro, zatem pa jih tretirali z alkalno raztopino, ki je vsebovala 0,3 M NaOH. Elektroforeza je potekala pri tako nastali visoki vrednosti pH (<13) (Singh in sod., 1988).

Olive in sodelavci (1990) so celice pred elektroforezo 1 uro lizirali v šibki alkalni raztopini (0,03 M NaOH).

Pri alkalni različici kometnega testa so kometi bolj jasni, poveča se tudi razpon poškodb, ki jih lahko zaznamo, vendar občutljivost (spodnji prag zaznave poškodb) samega testa ni večja (Collins, 2004).

Alkalno različico kometnega testa lahko uporabimo za zaznavanje dvojnih in enojnih prelomov DNK (če je pH elektroforetskega pufera=12,3). Če pH elektroforetskega pufera povečamo nad 13, lahko poleg dvojnih in enojnih prelomov DNK zaznamo tudi alkalno labilna mesta (Lee in Steinert, 2003).

### 2.2.2 Nevtralni kometni test

Olive in sodelavci so leta 1991 razvili novo nevtralno različico kometnega testa, ki je omogočala lažjo zaznavo dvojnih prelomov (Olive in sod., 1991). Njihova raztopina za lizo celic je vsebovala 30 mM EDTA, 0,5-odstotni SDS. Liza je potekala 4 h pri pH 8 in temperaturi 50°C. Elektroforetski pufer je bil umerjen na pH=8,5 in je vseboval 90 mM Tris, 2 mM EDTA in 90 mM borovo kislino. V njem je bilo minigele potrebno namakati od 2 do 16 ur (Olive in Banáth, 1993).

Collins in sodelavci so leta 1997 pokazali uporabnost nevtralne različice kometnega testa za zaznavo nizkih stopenj prelomov DNK (Collins in sod., 1997).

Nevtralno različico kometnega testa lahko uporabimo za zaznavanje dvojnih prelomov DNK (Lee in Steinert, 2003).

S kombiniranjem nevtralne in alkalne različice kometnega testa lahko določimo delež enojnih in dvojnih prelomov, ki jih povzroči določen genotoksičen dejavnik. Obe različici izvedemo na celicah, ki so bile izpostavljene istemu dejavniku, nato pa primerjamo stopnjo poškodovanosti, ki jo dobimo pri eni in drugi različici. Nevtralna različica nam pove, koliko je dvojnih prelomov DNK, razlika med nevtralno in alkalno različico pa, koliko enojnih prelomov DNK povzroči preizkušani genotoksični dejavnik (Lah, 2006)

### 2.2.3 Kometni test z uporabo specifičnih restriktivskih encimov

Informacije, ki jih dobimo s kometnim testom, lahko z uporabo specifičnih restriktivskih encimov še razširimo. Lomi verige DNK so lahko posledica različnih dejavnikov. Lahko so neposredni rezultat škodljivega agensa, vendar take prelome celica lahko običajno hitro popravi. Lahko so posledica apurinskih oziroma apirimidinskih mest, ki so alkalno labilna in jih s postopkom kometnega testa pretvorimo v dvojne prelome. Lahko pa so posledica napak pri popravljalnih procesih v celici, pri katerih celica običajno poškodovano DNK izreže in jo nadomesti z nepoškodovano (Collins, 2004).

Collins in sodelavci so kometnemu testu dodali še dodaten korak, pri katerem so DNK inkubirali s specifičnim encimom, ki prepozna določen tip poškodbe in ga spremeni v prelom. Nekateri najbolj pogosto uporabljeni encimi in specifične poškodbe, ki jih zaznajo, so prikazani v preglednici 2 (Collins, 2004).

S kombiniranjem alkalne različice kometnega testa in kometnega testa s specifičnimi encimi lahko določimo delež oksidiranih baz (ozioroma drugih poškodb DNK, odvisno od uporabljenega encima), ki jih povroči določen genotoksični dejavnik. Obe različici izvedemo na celicah, ki so bile izpostavljene istemu dejavniku, nato pa primerjamo stopnjo poškodovanosti, ki jo dobimo pri eni in drugi različici. Alkalna različica nam pove, koliko je dvojnih in enojnih prelomov DNK, razlika med alkalno različico in različico z encimi pa, koliko oksidiranih baz (ozioroma drugih poškodb DNK, odvisno od uporabljenega encima) povzroči preizkušani genotoksični dejavnik (Lah, 2006).

Preglednica 2: Nekateri najbolj pogosto uporabljeni encimi in specifične poškodbe, ki jih zaznajo

Encim	Tip poškodbe
Endonukleaza III (ENDO III)	Oksidirani pirimidini <sup>(1)</sup>
Formamidopirimidin DNK glikozilaza (FPG)	8-oksogvanin in drugi produkti oksidacije purinov <sup>(2)</sup>
T4 endonukleaza V	Ciklobutanski pirimidinski dimeri, ki jih povzroči UV svetloba <sup>(3)</sup>
Alk A	3-metiladenini <sup>(4)</sup>

(1) Collins in sod., 1993; (2) Dušinská in sod., 1996; (3) Collins in sod., 1997; (4) Collins in sod., 2001

### 2.2.4 Nekatere manj pogoste različice kometnega testa

#### 2.2.4.1 Detekcija podvajajoče-se DNK

S kometnim testom se celic, ki so v stopnji S v celičnem ciklu, običajno ne da razlikovati od tistih, ki niso v stopnji S. Collins predvideva, da je temu tako zaradi izredno majhne količine DNK, ki se ob vsakem danem trenutku podvaja hkrati, dopušča pa tudi možnost stabilizacije s strani replikacijskega aparata, ki preprečuje, da bi se razrezani deli kazali kot običajni prelomi (Collins, 2004). Če so celice med podvajanjem označene z bromodeoksiuridinom (BUDR), lahko s pomočjo protiteles za BUDR opazujemo količino podvajajoče se DNK (McGlynn in sod., 1999).

#### 2.2.4.2 Detekcija prehodnih prelomov pri popravilu DNK

Prelomi, ki se na DNK pojavijo med popravilom poškodb, povzročenih z UV svetlobo, se v delečih se celicah običajno pojavijo za zelo kratek čas. Če celice inkubiramo z inhibitorji DNK sinteze, kot so hidroksisurea, citozin arabinozid ali afidikolin, se prehodni prelomi kopičijo in tako omogočijo spremeljanje učinkov škodljivega tretiranja (Gedik in sod., 1992).

#### 2.2.4.3 FISH različica kometnega testa

Pri običajnem kometnem testu nam oblika kometa posreduje informacijo o poškodbah celokupne celične DNK. Pri kombiniranju kometnega testa s tehniko fluorescenčne in situ hibridizacije lahko zaznamo DNK iz specifičnih kromosomov, kromosomskih regij s pomočjo cDNK ali oligonukleotidnih prob. Možno je tudi določanje telomerne in centromerne DNK (McKelvey-Martin in sod., 1998).

### 2.3. VIZUALIZACIJA KOMETOV

DNK opazujemo s fluorescentnim mikroskopom po barvanju z barvilo, ki se veže na DNK. Najpogosteje uporabljeno barvilo je etidijev bromid, pogosto pa se uporablja tudi 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Etidijev bromid je interkalator, ki se bolj učinkovito veže na dvoverižno DNK kot na enoverižno. DAPI se veže na veliki kanal na DNK, torej bi morala biti fluorescensa bolj odvisna od dvoverižne strukture (Collins, 2004).

### 2.4 ANALIZA SLIKE

#### 2.4.1 Kvantitavina analiza poškodb DNK s programskimi paketi

Pri analizi slike se uporabljam številni programski paketi, ki izračunajo parametre fluorescence za komete, ki jih uporabnik izbere. Najpogosteje uporabljeni parametri so dolžina repa, relativna intenzivita fluorescence glave in repa (običajno izražena kot delež DNK v repu), ter repni moment. Povprečna dolžina repa se veča le pri relativno majhni poškodovanosti ob začetku oblikovanja kometov. Kasneje se kot odgovor na povečanje doze škodljivega agensa poveča le intenziteta v repu, ne pa tudi dolžina. Ker programi za analizo zaznajo konec repa kot presežek fluorescence glede na ozadje, je dolžina repa odvisna tudi od nastavitev ozadja in spodnje meje pri samem programu za analizo. Za nekatere je relativna intenziteta repa najbolj uporaben parameter, saj je linearno odvisna od pogostnosti prelomov in ni odvisna od nastavitev spodnje meje. Število prelomov jedrne DNK pa je glavni pokazatelj poškodovanosti DNK. Vsebuje tudi informacijo o tem, kako kometi dejansko izgledajo (Collins, 2004).

#### 2.4.2 Analiza s prostim očesom

Poškodbe DNK je mogoče oceniti tudi s prostim očesom, pri čemer stopnje poškodovanosti razdelimo na 5 razredov (0 – brez repa in 4 – skoraj vsa DNK je v repu). Če na minigelu ocenimo 100 kometov in vsakemu pripisemo vrednost od 0 do

4, dobi vsak posamezen minigel oceno med 0 do 400. Ocenjevanje s prostim očesom je hitro in preprosto in se dobro ujema z analizo s pomočjo programskega paketov (Collins in sod., 1997).

## 2.5 IZBIRA KOMETOV ZA ANALIZO

Kometi morajo biti izbrani nepristransko in morajo predstavljati celoten minigel, zato moramo minigel pregledati sistematično. Izogniti se moramo kometom pri robovih in okoli zračnih mehurčkov, saj le-ti pogosto kažejo neobičajno visoko stopnjo poškodb (Collins, 2004).

Pomembna je tudi gostota celic na samem minigelu, saj dveh prekrivajočih se kometov s programskimi paketi ni mogoče oceniti. Priporočeno število celic na minigel je okoli  $2 \times 10^4$  (Dušinská, 2000)

## 2.6 KALIBRACIJA

Kometni test kalibriramo tako, da celice obsevamo z gama ali X-žarki, ki povzročijo znano število enojnih prelomov v DNK. Te prelome celice precej hitro popravijo, zato je priporočljivo obsevanje celic izvajati na ledu. Najboljše je tudi, da celice obsevamo, ko so že vklopljene v agarozo (Collins, 2004).

## 2.7 APLIKACIJE KOMETNEGA TESTA

### 2.7.1 Testi genotoksičnosti

Kometni test se uvršča med standardne teste za testiranje varnosti novih farmacevtikov in drugih kemikalij (Collins, 2004). Uporaben je tako za *in vivo* teste na tkivih, ki jih lahko razbijemo na posamezne celice, kot za teste na belih krvničkah. Uporablja se tudi na tkivnih kulturnah, lahko tudi v povezavi z »S9«, mikrosomalnim ekstraktom iz jeter, s katerim *in vitro* bioaktiviramo kemikalije. Ekstrakt vsebuje encime, ki metabolizirajo kemikalije v potencialno bolj reaktivne oblike (Tice in sod., 2000).

Po drugi strani pa lahko kometni test uporabimo tudi za preučevanje primernosti posameznih fitokemikalij in drugih biološko aktivnih učinkovin za zaščito celic pred genotoksičnimi vplivi (Duthie in Dobson, 1999; Raspor in sod., 2005).

### 2.7.2 Okoljski monitoring

Določeni organizmi so v kombinaciji s kometnim testom uporabni kot biosenzorji za kontaminacijo okolja z genotoksini. Primeri uporabe so recimo testi kontaminacij morskega okolja s klapavicami (Dixon in sod., 2002), testi genotoksičnih komponent v prsti z deževniki (Verschaeve in Gilles, 1995) in testi genotoksičnosti vzorcev vode in zemlje na praživali *Tetrahymena termophila* in človeških celičnih linijah (Lah, 2006; Lah in sod., 2005a). Na praživali *T. termophila* so testirali tudi genotskične vplive jezerskih voda (Osojnik Črnivec in Marinšek Logar, 2007) in pitne vode (Lah in sod., 2005a).

### **2.7.3 Raziskave, povezane z ljudmi**

Za ta tip raziskav je kometni test primeren, saj ni potrebe po predhodnem označevanju z radioaktivnimi markerji in podobnih škodljivih postopkih. Prednost testa je gotovo tudi v tem, da ga je možno izvajati na lahko dostopnih celicah. Običajno se uporablajo bele krvničke, saj je odvzem relativno neinvaziven, celice pa so že po naravnih v suspendirani obliki (Collins, 2004).

#### **2.7.3.1 Biomonitoring**

Kometni test je uporaben med drugim tudi za monitoring poklicne izpostavljenosti genotoksičnim kemikalijam ali sevanju (Somorovska in sod., 1999), ugotavljanje oksidativnega stresa, povezanega z različnimi človeškimi boleznimi (Collins in sod., 1998), ter detekcijo poškodb DNK, povezanih s kajenjem (Betti in sod., 1994).

Kljud temu, da so razlike med izpostavljenimi in kontrolnimi skupinami osebkov značilne, še vedno obstajajo prevelike razlike med individualnimi osebki, ki so lahko posledica sprememb prehrane, stresa ali infekcije in ki preprečujejo, da bi bil test primeren za ocenjevanje tveganja za raka pri posameznikih (Collins, 2004).

#### **2.7.3.2 Prehranske raziskave**

Kometni test je idealen za raziskovanje pozitivnih in negativnih učinkov različnih sestavin hrane na ravni DNK. Tako na primer diete z različno vsebnostjo maščob povzročijo različne oksidativne poškodbe limfocitov (Jenkinson in sod., 1999; Rezar in sod., 2003)

Test je uporaben tudi za ugotavljanje zaščitnih učinkov zaužitih prehrabnih dodatkov antioksidantov ali živil, bogatih z antioksidanti. Učinki se izrazijo kot upad endogene oksidacije baz ali zmanjšana občutljivost na in vitro poškodbe s  $H_2O_2$  (Pool-Zobel in sod., 1997; Duthie in sod., 1996; Frankič in sod., 2008)

Od leta 2001 je kometni test v Evropi standardizirana in validirana hitra presejalna metoda za odkrivanje obsevane hrane (Lah, 2006).

#### **2.7.3.3 Diagnoza bolezni**

V nekaterih primerih je kometni test kljud vsemu primeren tudi kot pomoč pri diagnosticiranju bolezni.

»Nijmegen breakage syndrome« je avtosomalno recesivno stanje, ki ga povezujejo z genetsko nestabilnostjo in nagnjenostjo k raku. S kometnim testom lahko prepoznamo heterozigotne nosilce gena, saj je zanje značilna nenavado visoka stopnja prelomov v limfocitnih jedrih (Collins, 2004).

### **2.7.4 Opazovanje popravljanja DNK**

O razlikah v sposobnosti popravljanja DNK med posameznikih je znanega le malo, kljud temu, da je to verjetno eden od pomembnejših dejavnikov tveganja za razvoj

rakavih obolenj. Za preučevanje teh razlik še ni primernega testa, ki bi bil dovolj robusten in občutljiv, vendar bi bil kometni test lahko primeren za ta namen (Collins, 2004).

#### 2.7.4.1 Sposobnost celice za popravljanje DNK

Teoretično bi lahko sposobnost celic za popravljanje DNK ugotovili tako, da bi celice poškodovali in nato sledili hitrosti, s katero bi odstranjevale prelome (Collins, 2004).

Postopek ponovne združitve prelomov DNK je precej hiter, zgodи se v nekaj minutah (Frankenberg-Schwager, 1989). Kljub temu sveže izolirani limfociti popravljajo prelome, povzročene z vodikovim peroksidom, veliko počasneje. Do tega pride po vsej verjetnosti zaradi dodatnih prelomov DNK pri nenadni izpostavitvi atmosferskemu kisiku ob inkubaciji (Torberg sen in Collins, 2000).

Popravilo tarčnih mest za encima endonukleazo III in FPG, ki poteka z izrezom baz, je počasnejši proces, ki traja nekaj ur (Collins in Horváthová, 2001). Popravilo ciklobutanovih pirimidinskih dimerov, ki jih povzroči UV svetloba, in jih lahko zaznamo z encimom endonukleazo V, je prav tako relativno počasen proces (Collins in sod., 1997).

### 2.8 STANDARDIZACIJA KOMETNEGA TESTA

V analizo je potrebno vključiti standardne celice. Na primer, limfocite iz več različnih donorjev združimo in zamrznemo v alikvotih. Te celice nato testiramo pri vsaki ponovitvi testa in pri vsaki bi morala biti stopnja poškodb DNK standardnih celic podobna. Če stopnja poškodb standarda preveč odstopa od običajne, nas to opozori na to, da se pri testu nekaj spremeno (Collins, 2004).

### 2.9 IZCEDNE VODE IZ DEPONIJ

Izcedne vode so vse tekočine, ki se izcejajo iz odloženih odpadkov ali pronicajo skozi telo odlagališča in se odvajajo ali zadržujejo znotraj odlagališča (Pravilnik o odlaganju odpadkov, 2000).

Izcedna voda nastaja zaradi presežka padavin, ki pronicajo skozi plasti odpadkov na odlagališču. Kombinacija fizikalnih, kemijskih in mikrobioloških procesov v odpadkih omogoča prehod onesnaževal iz odpadnega materiala v vodo, ki skoznje pronica (Zupančič Justin in sod., 2005).

Na vsakem odlagališču mora biti zagotovljeno neovirano odvajanje izcedne vode, tako da voda odteka prosto samo zaradi vpliva gravitacije. Če odvajanje izcedne vode na naraven način ni možno, zagotovimo zbiranje izcedne vode v lahko dostopnih zbiralnikih, ki so nameščeni izven telesa odlagališča. Izcedno vodo zbiramo in odvajamo s sistemom, ki je sestavljen iz drenažnega sloja in v njem položenih zbirnih cevi. Z vgradnjo zaščitnega sloja nad drenažnim slojem ter z razpršenim vnašanjem odpadkov v telo odlagališča preprečimo vdiranje odpadkov v

drenažni sloj. Za začasno zadrževanje izcedne vode, ki jo odvajamo iz telesa odlagališča, uporabljamo zbiralnik izcedne vode, ki se nahaja izven območja odlaganja odpadkov, vendar znotraj območja odlagališča. Zbiralnik mora biti odporen na kemične vplive izcedne vode ter varen pred eksplozijo, v primeru izcednih voda z močnim vonjem pa tudi zaprt (Pravilnik o odlaganju odpadkov, 2000).

Pri odlagališču moramo zagotoviti, da površinske zaledne vode in podzemne vode s površin ali iz območja izven odlagališča ne pridejo v stik s telesom odlagališča. Izcedno vodo iz odlagališča, padavinsko vodo, ki smo jo odvedli iz prekritih površin na območju odlagališča, in tehnološko odpadno vodo iz naprav za čiščenje odlagališčnega plina moramo zbirati in odvajati ločeno od ostale odpadne vode, ki nastaja v območju odlagališča in ni onesnažena (Pravilnik o odlaganju odpadkov, 2000).

Upravljalec odlagališča za nevarne ali nenevarne odpadke mora zagotavljati izvajanje obratovalnega monitoringa, in sicer:

- meritve meteoroloških parametrov,
- meritve in izračunavanje emisije snovi v zrak iz odlagališča,
- meritve emisije snovi pri odvajanju izcedne vode in onesnažene padavinske vode s površin odlagališča in
- meritve parametrov onesnaženosti podzemnih voda z nevarnimi snovmi, če so v vplivnem območju odlagališča (Pravilnik o odlaganju odpadkov, 2000).

Na odlagališče za nenevarne odpadke je dovoljeno odlaganje komunalnih odpadkov, oz. mehansko-biološko obdelanih komunalnih odpadkov, nenevarnih odpadkov in obdelanih nenevarnih odpadkov z visoko vrednostjo biološko razgradljivih snovi ter stabilnih in nereaktivnih nevarnih odpadkov, katerih onesnaženost ne sme presegati mejne vrednosti parametrov onesnaženosti iz predpisa o odlaganju odpadkov za posamezno vrsto odpadka (Ulrich Supovec, 2009).

Genotoksični vplivi izcednih voda iz komunalnih odlagališč so bili že večkrat dokazani. Pri tem so bili uporabljeni testi na organizmih iz različnih trofičnih nivojev. S testom na koreninskih laskih so dokazali, da izcedne vode iz komunalnih odlagališč povzročajo povečanje frekvence anafaznih aberacij pri *Vicia faba* (Sang in sod., 2004). S testom na koreninskih laskih *Allium cepa* so dokazali genotoksični vpliv izcednih vod v obliki povečanja frekvence ana-telofaznih aberacij (Obidoska, 2008). Pri miših so izcedne vode iz komunalnih odlagališčna povzročile povišanje pogostnosti pojavljanja mikronukleusov in polikromatičnih eritrocitov (Li in sod., 2004). Prav tako so njihovo genotoksičnost dokazali s testom kromosomskih aberacij na celicah podganjega mozga (Alimba in sod., 2006).

Čiščenje izcednih vod iz komunalnih odlagališč se lahko izvaja z ozračevanjem, laguniranjem ali mokrišči. Za čiščenje uporabljajo tudi reverzno osmozo, pri kateri se prečiščeni del izcednih vod odvaja v okolico. (Brulc, 2005). V uporabi so tudi rastlinske čistilne naprave, pri katerih se prečiščena voda vrača na odlagališče in se tako okolico zavaruje pred njenimi vplivi (Zupančič Justin in sod., 2005).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 VZORCI IZCEDNIH VOD

Vzorčenje vode je opravil Zavod za zdravstveno varstvo Novo mesto z globinsko črpalko po standardu ISO 5667. Na vsakem vzorčnem mestu sta bili odvzeti dve paralelni posameznega vzorca.

Vzorce smo skladiščili v plastičnih steklenicah po 1 L pri -20°C. Tik pred testom s FPG smo jih odmrznili in jih nato do testa z ENDO III hranili v hladilniku pri 4°C.

Preglednica 3: Oznake vzorcev in mest, na katerih so bili vzorci odvzeti

Oznaka vzorca	Vzorčno mesto
S01 in S02	Odlagališče Dobova – vrtina D1
S03 in S04	Odlagališče Dobova – vrtina D2
S05 in S06	Cerod, vrtina SL-1/93
S07 in S08	Cerod, izvir št. 2
S09 in S10	Cerod, vrtina SL-4/94
S11 in S12	Cerod, vrtina SL-5/94

Analize fizikalno-kemijskih parametrov vzorcev izcednih vod je opravil Zavod za zdravstveno varstvo Novo mesto s standardnimi metodami (Priloga B).

#### 3.2 PREGLED IZBRANIH VZORČNIH MEST

##### 3.2.1 Center za ravnanje z odpadki Dolenjske (CeROD)

Odlagališče CeROD se nahaja v Mestni občini Novo mesto v opuščenem rudniku kremenčevega peska v neposredni bližini vasi Leskovec pri Velikih Brusnicah. Upravljalec odlagališča je podjetje CeROD, d.o.o. - Center za ravnanje z odpadki Dolenjske (Zavod za zdravstveno ..., 2008).

Odlagališče obratuje od leta 1981 dalje. Prvotno je obsegalo površino treh hektarov in so na njem odlagali izključno odpadke z območja občine Novo mesto, kasneje pa so se postopoma vključevale še druge občine. Trenutno na odlagališču odlaga 15 občin s skupno 159.779 prebivalci. Odlagališče ima kapaciteto preko 106 kubičnih metrov in naj bi zadostovalo potrebam območij Dolenjske, Bele Krajine in Posavja za dobo 25 do 30 let (Zavod za zdravstveno ..., 2008).

Staro odlagalno polje, ki leži na jugu odlagališča, je od leta 2007 v celoti prekrito in rekultivirano. Leta 2004 so pričeli z urejanjem in gradnjo novega dela odlagališča, ki jo je delno financirala tudi Evropska unija. Konec leta 2007 so končali z gradnjo novega odlagalnega polja z nasipom. Novo odlagalno polje so postavili v skladu s trenutno zakonodajo. Dno odlagalnega polja je zatesnjeno, izcedne vode iz odkritih površin pa se zbirajo v posebnem zbirnem bazenu (Poročilo o obratovalnem ... Cerod, 2008).

V podlagi odlagališča ležijo srednje in zgornje triasne plasti pasastega in plastovitega dolomita, ki so močno razpokane in je za njih značilna razpoklinska poroznost. V razpokanem dolomitu nastopajo večje vrednosti vodoprepustnosti in večje izdatnosti v smereh močneje izražene razpokanosti ob prelomih (Poročilo o obratovalnem ... Cerod, 2008).

Na odlagališče so prvotno odlagali mešane nenevarne komunalne odpadke, danes pa ločeno zbrane nenevarne komunalne odpadke prelomih (Poročilo o obratovalnem ... Cerod, 2008).

### **3.2.2 Odlagališče Dobova**

Deponija Dobova leži v opuščeni gramoznici na severozahodnemu delu Savske kotline, oziroma na Brežiskemu polju, severovzhodno od Dobove (Poročilo o obratovalnem ... Dobova – Brežice, 2008).

Okolica deponije je poraščena s travniki, njivami in posameznimi manjšimi območji listopadnega gozda. Na teh površinah prevladuje intenzivno kmetijstvo. V bližini je razvita tudi industrija, ki je skoncentrirana v okolici manjših vasi, predvsem v obliki obrtnih delavnic. Na številnih lokacijah po vsem polju so tudi večje ali manjše gramoznice. Ker deponija leži na skrajnem severnem robu brežiske kotline, je vpliv Save na območju deponije komaj opazen (Poročilo o obratovalnem ... Dobova – Brežice, 2008).

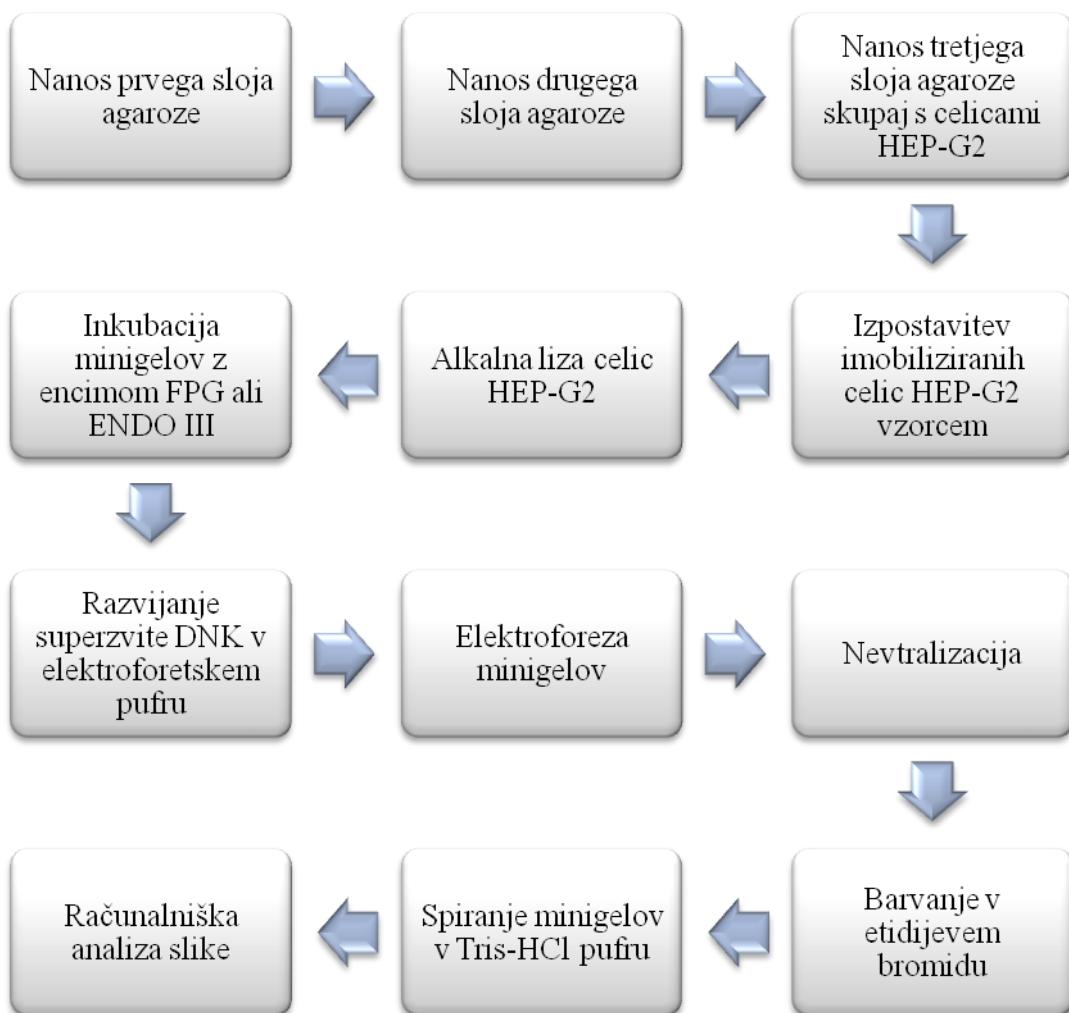
Dno deponije sestavlja nepropustna podlaga v obliki peščenih in glinastih miocenskih laporjev (Poročilo o obratovalnem ... Dobova – Brežice, 2008).

Od leta 2007 je odlagališče Dobova zaprto, na njem so bili odloženi nesortirani nenevarni komunalni odpadki (Poročilo o obratovalnem ... Dobova – Brežice, 2008).

## **3.3 CELICE HEP-G2**

Za testiranje genotoksičnosti izcednih vod s kometnim testom smo uporabili celice Hep-G2. Celična linija HEP-G2 izvira z Inštituta za raziskave raka Univerze na Dunaju. Celice so bile zamrznjene v tekočem dušiku pri  $-80^{\circ}\text{C}$ , za potrebe poskusa pa smo jih odmrznili in nato do konca eksperimentalnega dela vzdrževali celično linijo.

### 3.4 TESTIRANJE GENOTOKSIČNOSTI S KOMETNIM TESTOM – SHEMA DELA



Slika 1: Shema testiranja genotoksičnosti s kometnim testom

### 3.5 METODE

#### 3.5.1 Gojenje in priprava celic HEP-G2 za kometni test

##### 3.5.1.1 Gojenje HEP-G2 celic

Celice HEP-G2 smo gojili v obliki pritrjenega sloja v gojilnih posodicah velikosti 25 cm<sup>2</sup> v rastnem mediju, ki je vseboval Dulbeccov modificiran medij, 10 odstotkov zarodnega telečjega seruma in 40 µg/ml antibiotika gentamicina. Gojilne posodice s celicami smo hranili v CO<sub>2</sub> inkubatorju Sanyo pri temperaturi 37°C in v atmosferi s 5-odstotnim CO<sub>2</sub>. Rastni medij smo menjali trikrat na teden. Celice smo presajali na

tri ali štiri dni pri 80-odstotni konfluenci v razmerju 5:1 (sveže gojišče : staro gojišče s celicami).

### 3.5.1.2 Priprava celic HEP-G2 za potrebe kometnega testa

Celicam smo odstranili medij in jih sprali s HBSS pufrom. Nato smo jih 2 minuti inkubirali v 0,5-odstotnem tripsin-EDTA v CO<sub>2</sub> inkubatorju Sanyo pri temperaturi 37°C in 5-odstotnem CO<sub>2</sub>. Ko so se celice odlepile od podlage smo jih z mililitrsko avtomatsko pipeto resuspendirali v rastnem mediju.

Na celicah smo opravili test viabilnosti s Tripanskim modrilom. Gojišče s celicami in barvilo smo zmešali v razmerju 1:1 in nato z mikroskopom (Olympus CK2, 100x povečava) opravili štetje na Bürker-Türkovi ploščici. Celice smo prešteli v vseh osmih števnih mrežicah in nato iz povprečja izračunali gostoto celic. Določili smo tudi število modro obarvanih celic napram vsem celicam, iz katerega smo izračunali viabilnost celic v odstotkih (število neobarvanih celic smo delili s številom vseh celic in nato množili s sto).

## 3.5.2 Kometni test

### 3.5.2.1 Fiksacija celic v agarozni

#### 3.5.2.1.1 Nanos prvega sloja agaroze

400 µL 1-odstotne NMP agaroze (Sigma, A-9539) smo nanesli na hrapavo predmetno stekelce in jo razmazali s plastično hematološko razmazovalko. Stekelca smo čez noč pustili na zraku, da se je agariza posušila.

Postopek smo povzeli po Lah in sod. (2004).

#### 3.5.2.1.2 Nanos drugega sloja agaroze

Na vsako stekelce smo na prvi sloj NMP agaroze nanesli 2 posamezni kapljici po 100 µL

0,6-odstotne agaroze in vsako pokrili s krovnim stekelcem ter za 20 minut postavili na led.

Postopek smo povzeli po Dušinská (2000).

#### 3.5.2.1.3 Nanos tretjega sloja agaroze

Odstranili smo krovni stekelci in nanesli dve kapljici po 70 µL mešanice LMP agaroze (Sigma, A-9414) in rastnega medija s celicami (v takem razmerju, da je bilo v vsaki kapljici 10<sup>4</sup> celic) na strjeni plasti drugega sloja agaroze. Posamezni kapljici smo prekrili s krovnim stekelcem in ponovno postavili za 20 minut na led.

Postopek smo povzeli po Dušinská (2000).

### 3.5.2.2 Izpostavitev imobiliziranih celic vzorcem

Minigele smo izpostavili vzorcem ter negativni (delovna raztopina PBS) in pozitivni kontroli za 20 minut. Nato smo minigele spirali trikrat po 5 minut v delovni raztopini PBS.

Postopek smo povzeli po Lah in sod. (2004).

Preglednica 4: Založna raztopina K-Na PBS (pH = 7,2 – 7,4) (povzeto po Osojnik, 2006)

Sestavine	Količina
NaCl (Merck)	80 g
KCl (Sigma)	2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Sigma)	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O (Merck)	14,4 g
mQ	1 L

Preglednica 5: Delovna raztopina PBS

Sestavine	Volumen (mL)
Založna raztopina K-Na PBS	100
mQ	900*

\* Vodo uporabimo, da dopolnimo volumen reakcije do izbranega volumna raztopine

Preglednica 6: Pozitivna kontrola (povzeto po Lah in sod., 2004)

Sestavine	Volumen (mL)
30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Merck)	0,03
Delovna raztopina PBS	500

### 3.5.2.3 Alkalna liza celic

Minigele smo potopili v raztopino za alkalno lizo in jih čez noč inkubirali v hladilniku pri 4°C.

(Sestavo raztopine smo prilagodili po Dušinská, 2004 in Osojnik, 2006; inkubacijo smo iz 1 h pod Dušinski, 2004 podaljšali na celonočno.)

Preglednica 7: Raztopina za alkalno lizo\*

Sestavine	Količina
NaCl	146,125 g
1 M Tris-HCl	10 mL
0,5 M EDTA (Merck)	200 mL
N-laurilsarkozinat** (Sigma, L-5777)	1 g
Triton X 100*** (Sigma)	10 mL
DMSO*** (Sigma-Aldrich)	100 mL
mQ	780 mL****

\* raztopino za alkalno lizo smo pripravili dan pred eksperimentom ter jo ohladili na temperaturo 4°C

\*\*N-laurilsarkozinat smo dodali po tem, ko smo pH raztopine popravili na vrednost 10 z NaOH

\*\*\*Triton X in DMSO smo v raztopino dodali tik pred začetkom alkalne lize

\*\*\*\* Vodo uporabimo, da dopolnimo volumen reakcije do izbranega volumna raztopine.

### 3.5.2.4 Inkubacija minigelov z encimi (Dušinská, 2000)

Pri kometnem testu smo uporabili naslednja encima: rekombinantno endonukleazo III iz *E. coli*, proizvajalca SIGMA (E 0526) in formamidopirimidin DNK glikozilazo iz *E. coli* proizvajalca TREVIGEN (4040-500-EB).

Minigele smo spirali v encimskem reakcijskem pufru trikrat po 5 minut pri temperaturi 4°C. Nato smo na vsako stekelce nanesli (slika 2):

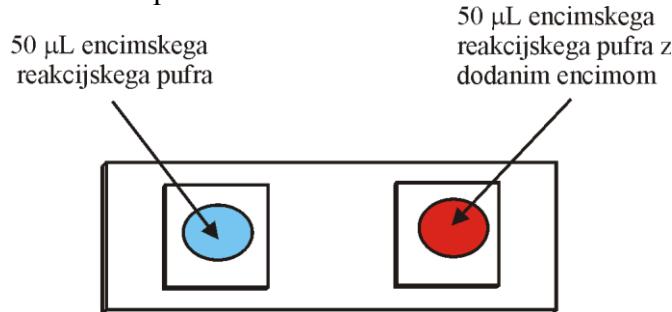
- Leva stran: 50 µL encimskega reakcijskega pufra
- Desna stran: 50 µL encimskega reakcijskega pufra z dodanim encimom\*

\*Endonukleaza III (E 0526) je originalno v obliki raztopine, ki vsebuje 230 µg encima na mL pufra. Encim smo alikvotirali po 2 µL in zamrznili pri temperaturi -20°C. Na dan poskusa smo encim odmrznili, ga razredčili z 18 µL encimskega reakcijskega pufra (preglednica 8) in od tako dobljene raztopine vzeli 1 µL, mu primešali 60 µL encimskega reakcijskega pufra ter 50 µL te raztopine nanesli na stekelce.

\*Formamidopirimidin DNK glikozilaza (4040-500-EB) je originalno v obliki raztopine, ki je vsebovala 2500 enot encima na mL pufra. Encim smo alikvotirali po 2 µL in zamrznili pri temperaturi -20°C. Na dan poskusa smo encim odmrznili, ga razredčili z 198 µL encimskega reakcijskega pufra (preglednica 8) in od tako dobljene raztopine vzeli 1 µL, mu primešali 60 µL encimskega reakcijskega pufra ter 50 µL te raztopine nanesli na stekelce

Vsako kapljico smo pokrili s krovnim stekelcem. Minigele smo zložili v plastične posode s pokrovom, ki smo jih predhodno navlažili z encimskim reakcijskim pufrom. Posode smo inkubirali:

- Encim ENDO III: 45 minut v inkubatorju (Kambič laboratorijska oprema) pri temperaturi 37°C.
- Encim FPG: 30 minut v inkubatorju (Kambič laboratorijska oprema) pri temperaturi 37°C.



Slika 2: Shema minigela z negativno kontrolo (levo) in nanešenim encimom (desno).

Preglednica 8: Encimski reakcijski pufer\*

Sestavine	Količina
HEPES (Sigma)	9,52 g
NaCl	5,9 g
EDTA	0,186 g
BSA (Sigma)	0,2 g
mQ	1 L

\* pH pufra smo popravili na 8 s KOH

Postopek smo povzeli po Dušinská (2000).

### 3.5.2.5 Razvijanje superzvite DNK v elektroforetskem pufru

Minigele smo v elektroforetskem pufru spirali trikrat po 20 minut.

Postopek smo povzeli po Lah in sod., 2004.

Preglednica 9: Elektroforetski pufer (Dušinská, 2000)

Sestavine	Volumen [mL]
10 M NaOH (Merck)	3
0,5 mM EDTA	2
mQ	995

### 3.5.2.6 Elektroforeza minigelov

Elektroforeza je potekala na elektroforeznem aparatu Amersham Pharmacia Biotech EPS 601. Tok smo nastavili na 300 mA, napetost na 25 V in čas ločevanja na 30 min. Zabeležili smo tudi dejanske vrednosti nastavljenih parametrov.

Postopek smo povzeli po Dušinská (2000) in Lah in sod. (2004).

### 3.5.2.7 Nevtralizacija

Minigele smo 20 minut spirali v 400 mM Tris-HCl pufru.

Postopek smo povzeli po Lah in sod. (2004).

Preglednica 10: 1 M Tris-HCl založna raztopina\*

Sestavine	Količina
Trizma base (Sigma)	121,1 g
mQ	1 L

\*pH smo s HCl popravili na vrednost 7,5

Preglednica 11: 400mM Tris-HCl pufer

Sestavine	Volumen (mL)
Tris-HCl založna raztopina	400
mQ	600

### 3.5.2.8 Barvanje v etidijevem bromidu

Minigele smo za 20 minut potopili v raztopino (20 µg/ 1mL 400mM Tris-HCl pufra) etidijkevega bromida.

Postopek smo povzeli po Osojnik (2006).

### 3.5.2.9 Spiranje minigelov v Tris-HCl pufru (Osojnik, 2006)

Minigele smo 5 minut spirali v 400 mM Tris-HCl pufru.

Postopek smo povzeli po Osojnik (2006).

### 3.5.2.10 Računalniška analiza rezultatov kometnega testa

Slike kometov smo ovrednotili z epifluorescentnim mikroskopom OLYMPUS BX50 (eksitacijska svetloba valovnih dolžin med 515 in 560 nm, emisijski filter 590 nm, 100-kratna povečava), digitalno kamero (Hamamatsu Orca 2) in programskim paketom Komet 5.0.

Po integraciji signala je program izračunal številne parametre poškodb jedrne DNK. Pri nadaljnjih izračunih smo uporabili repni moment po Olivu, saj le-ta najbolje izrazi stopnjo poškodb. Pri izračunu repnega momenta po Olivu program upošteva vrednosti zajetih signalov v glavi in repu kometa:

$$RM - Olive = (DNK_{glava} - D NK_{rep}) \times \% D NK_{rep} \times 0,01 \quad \dots(1)$$

Za vsak vzorec smo na objektno stekelce ovrednotili po 50 naključno izbranih celičnih jeder iz območja, obdelanega z encimom, ter po 50 iz območja, ki ni bilo obdelano z encimom.

### 3.5.2.11 Statistična analiza rezultatov

Statistično analizo smo opravili s pomočjo programskega paketa R, ki je prosto dostopen na spletu po splošnem dovoljenju GNU.

Osnovne statistične parametre smo določili s pomočjo vgrajenih funkcij. S pomočjo Wilcoxonovega testa smo testirali naslednja razmerja:

- ali obstaja statistično značilna razlika med vzorci iz istih mest vzorčenja
- ali se pozitivna kontrola statistično razlikuje od negativne kontrole
- ali se posamezni vzorci statistično razlikujejo od negativne kontrole
- ali se vzorci, obdelani s posameznim encimom, statistično razlikujejo od istih vzorcev, ki niso bili obdelani z encimom
- ali se tehnične ponovitve statistično razlikujejo med seboj

## 4 REZULTATI

### 4.1 VIABILNOST CELIČNE LINIJE HEP-G2

Pred vsakim poskusom smo preverili viabilnost uporabljenih celic HEP-G2. Tako pri poskusu z ENDO III kot pri poskusu s FPG je bila viabilnost večja od 90 odstotkov. Rezultati so prikazani v preglednici 12.

Preglednica 12: Viabilnost celic HEP-G2

Ponovitev poskusa	Število živih celic*	Število mrtvih celic*	Viabilnost (%)
Poskus s FPG	129,75	6	95,6
Poskus z ENDO III	113,25	7	94,2

\*povprečje, izračunano iz štirih števnih območij

### 4.2 REZULTATI ALKALNEGA KOMETNEGA TESTA (DOKAZOVANJE DVOJNIH IN ENOJNIH PRELOMOV DNK)

Z alkalno različico kometnega testa brez encimov smo testirali enojne in dvojne prelome DNK. V test smo vklopili encimski reakcijski pufer zaradi primerljivosti z različicama kometnega testa z encimi.

Najprej smo modificiran postopek kometnega testa, ki je opisan v poglavju 3.5, večkrat preizkusili s standardnimi genotoksičnimi spojinami in nekaterimi vzorci izcednih vod (rezultati niso prikazani), dokler nismo ugotovili zanesljivosti postopka.

Po preizkušenem postopku smo nato v dveh poskusih testirali vzorce izcednih vod iz komunalnih deponij. Rezultati so prikazani na slikah 3 in 4 ter v preglednicah 13 in 14.

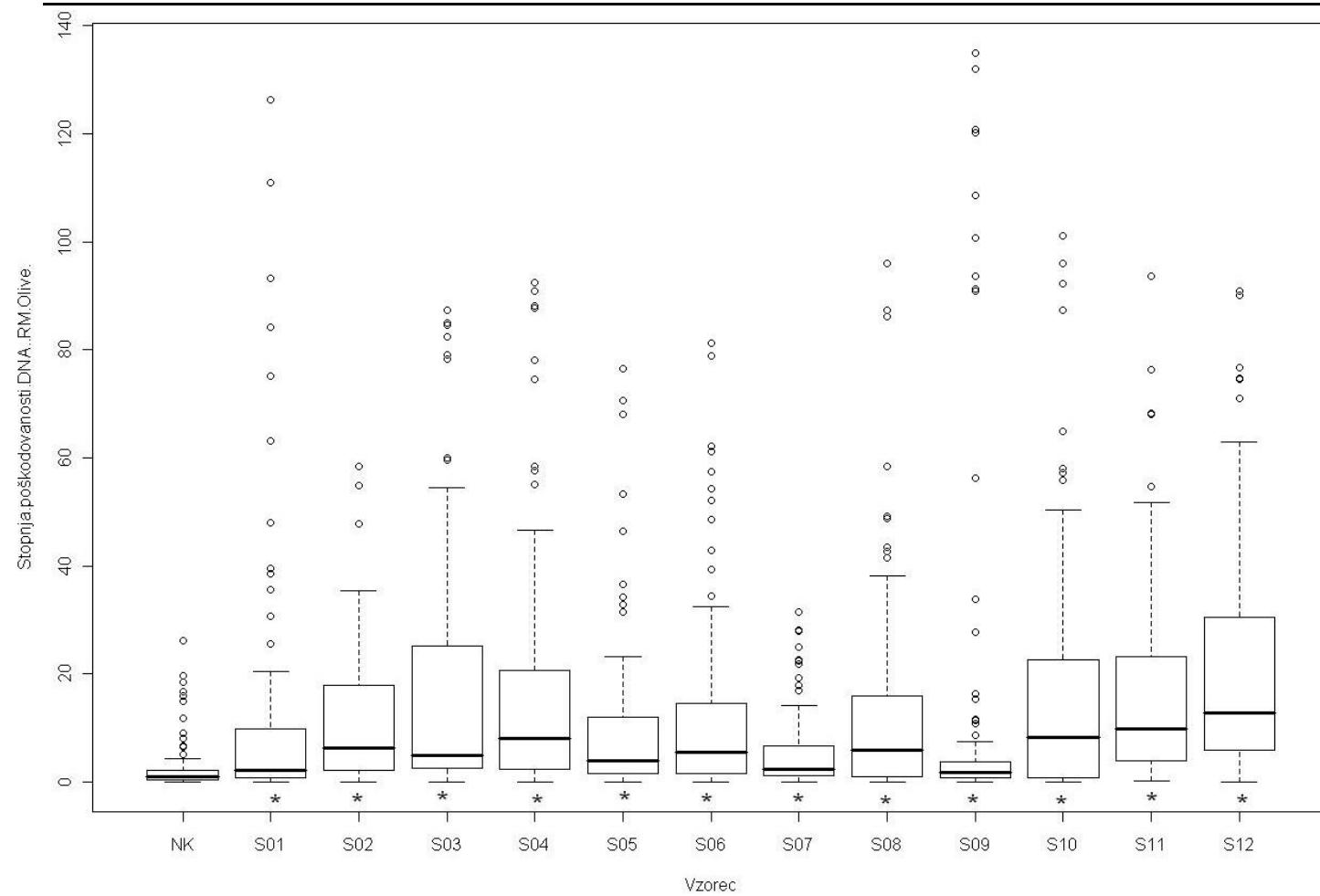
Pri številnih parametrih, izmerjenih v kometnem testu, se vrednosti ne prilegajo normalni porazdelitvi, temveč so nesimetrično porazdeljene. Zato smo za osnovni prikaz rezultatov kometnega testa uporabili mediano namesto povprečne vrednosti, kakor priporočajo Verde in sod. (2006).

Na slikah 3 in 4 so prikazane informacije o porazdelitvi rezultatov. Mediana je predstavljena kot vodoravna črta v medkvartilnih razmikih. 50 odstotkov vrednosti RM-Olive je manjših ali enakih mediani. Pod mejo prvega kvartila (spodnja stranica pravokotnikov na slikah 3 in 4) se nahaja 25 odstotkov vrednosti RM-Olive. Pod mejo tretjega kvartila (zgornje stranice pravokotnikov na slikah 3 in 4) se nahaja 75 odstotkov vrednosti RM-Olive. Zgornja in spodnja meja črtkanih linij označujeta mejne vrednosti. Vrednosti izven zgornje in spodnje meje so osamelci in so na grafikonu prikazani kot krogci.

Genotoksičnost smo tako pri prvem kot pri drugem poskusu dokazali pri vseh vzorcih izcednih vod. Vsi vzorci so se po RM-Olive statistično značilno razlikovali od negativne kontrole ( $p<0,05$ ).

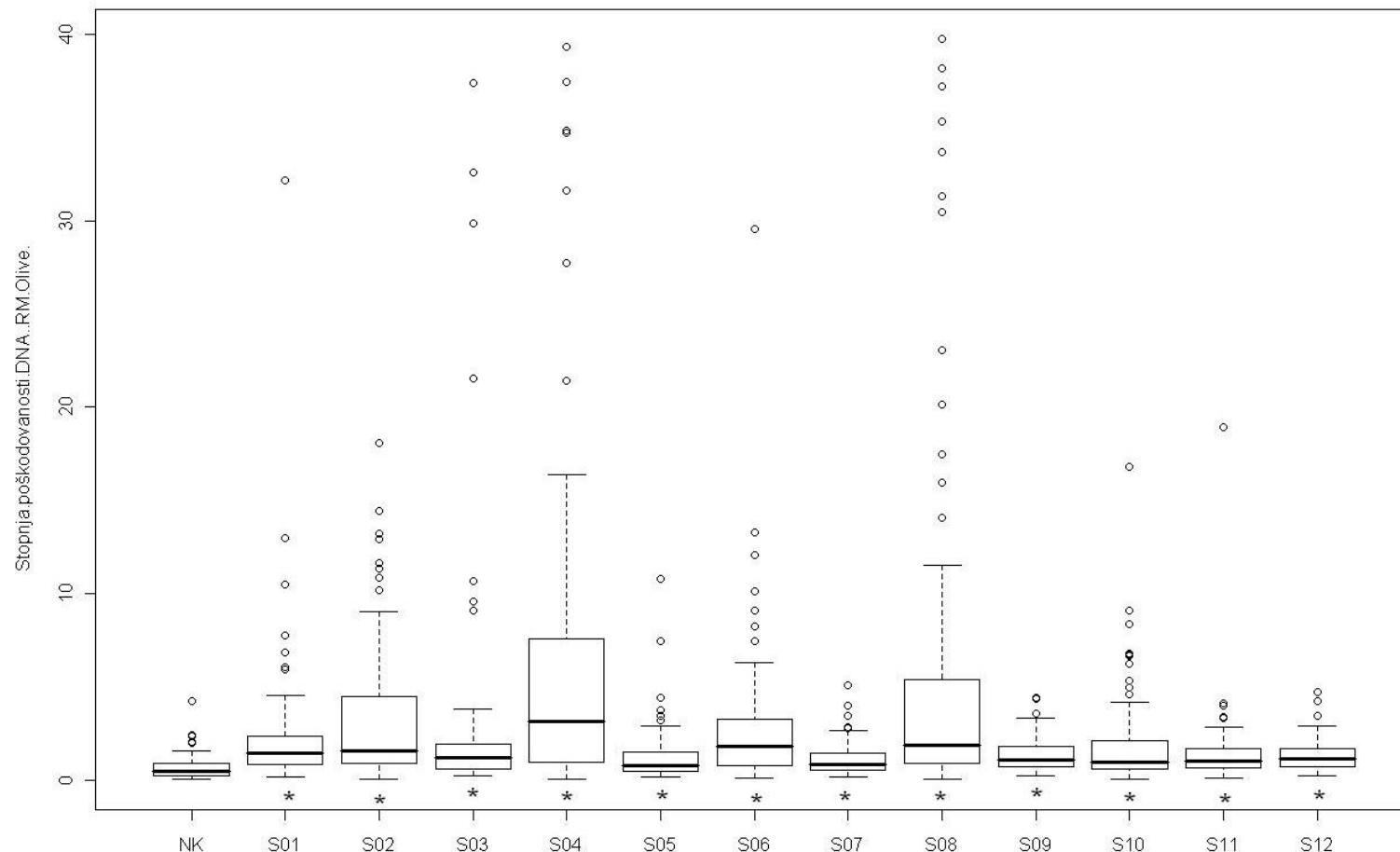
Najvišjo genotoksičnost so pokazali vzorci S04, S08, S11 in S12. Najmanjšo genotoksičnost smo zasledili pri vzorcih S01, S05, S07 in S09.

Devetak Z. Ugotavljanje genotoksičnih vplivov izcednih vod iz komunalnih deponij s kometnim testom na celicah HEP – G2.  
Dipl. delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2009



Slika 3: Porazdelitve vrednosti RM-Olive za vzorce, ki smo jih v prvem poskusu inkubirali v encimskem reakcijskem pufru brez FPG. Z zvezdico (\*) so označeni vzorci, ki se statistično značilno razlikujejo od negativne kontrole ( $p < 0,05$ ).

Devetak Z. Ugotavljanje genotoksičnih vplivov izcednih vod iz komunalnih deponij s kometnim testom na celicah HEP – G2.  
 Dipl. delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2009



Slika 4: Porazdelitve vrednosti RM-Olive za vzorce, ki smo jih v drugem poskusu inkubirali v encimskem reakcijskem pufru brez ENDO III. Z zvezdico (\*) so označeni vzorci, ki se statistično značilno razlikujejo od negativne kontrole ( $p < 0,05$ ).

Preglednica 13: Statistični prikaz rezultatov alkalnega kometnega testa z inkubacijo v encimskem reakcijskem pufru brez FPG. Rezultati so prikazani kot RM-Olive. Osnovna statistika za poškodbe jedrne DNK (RM-Olive).

Vzorec	Povprečje	Standardni odklon	Median	Minimum	Maksimum
NK	2,674	4,682239	0,925	0,03	26,2
PK	46,9385	19,259286	44,6	1,27	100,61
S01	11,3562	23,056718	2,17	0	126,3
S02	11,3662	12,647838	6,38	0	58,34
S03	18,0047	23,501872	4,97	0,1	87,41
S04	16,7037	22,134263	7,995	0,08	92,49
S05	10,0542	14,848052	4	0	76,49
S06	12,7982	17,719238	5,545	0	81,27
S07	5,8673	7,589141	2,29	0,02	31,44
S08	12,9829	18,97044	5,945	0	96,03
S09	13,3237	31,903973	1,875	0	135
S10	17,4728	22,897882	8,23	0	101,04
S11	16,7354	18,410074	9,87	0,2	93,65
S12	21,0398	21,663163	12,785	0,01	90,85

(NK) negativna kontrola; (PK) pozitivna kontrola

Preglednica 14: Statistični prikaz rezultatov alkalnega kometnega testa z inkubacijo v encimskem reakcijskem pufre brez ENDO III. Rezultati so prikazani kot RM-Olive. Osnovna statistika za poškodbe jedrne DNK (RM-Olive).

Vzorec	Povprečje	Standardni odklon	Median	Minimum	Maksimum
NK	0,6366	0,6116482	0,465	0,05	4,22
PK	80,743	41,2761624	81,035	3,94	198,53
S01	2,2847	3,6458994	1,42	0,18	32,19
S02	3,2563	3,722428	1,55	0,01	18,08
S03	6,1627	16,5622233	1,26	0,19	93,27
S04	7,1715	11,3304662	3,2	0,04	63,74
S05	1,2426	1,4463829	0,79	0,17	10,79
S06	2,7372	3,6840758	1,795	0,11	29,58
S07	1,124	0,8803546	0,83	0,17	5,07
S08	7,4557	12,3433236	2,01	0,06	54,31
S09	1,3379	0,8720014	1,09	0,23	4,4
S10	1,8894	2,4674339	0,925	0,04	16,83
S11	2,4583	10,5091369	1,005	0,08	104,66
S12	2,6603	9,7439585	1,145	0,24	82,63

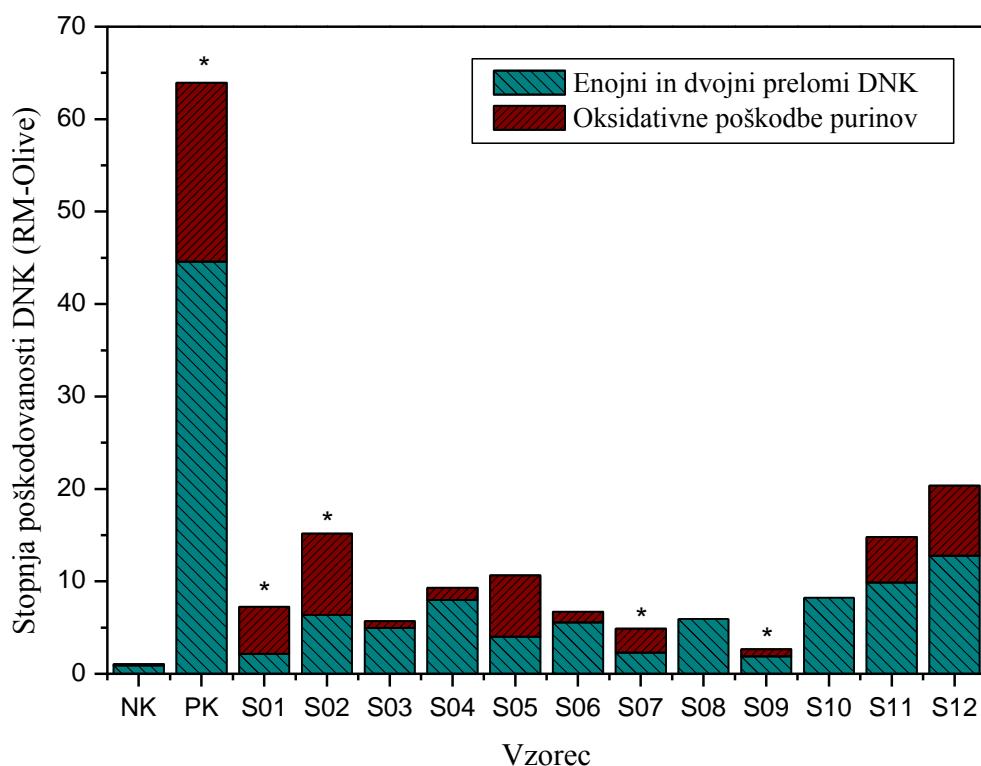
(NK) negativna kontrola; (PK) pozitivna kontrola

#### 4.3 KOMETNI TEST S FORMAMIDOPIRIMIDIN GLIKOZILAZO (DOKAZOVANJE OSKIDATIVNIH POŠKODB PURINOV)

Vzorce izcednih vod iz komunalnih deponij smo testirali tudi s kometnim testom z uporabo restriktijskega encima formamidopirimidin DNK glikozilaze. Rezultati so prikazani na sliki 5 in v preglednici 15.

Vsi vzorci so se po RM-Olive statistično značilno razlikovali od negativne kontrole ( $p<0,05$ ).

Rezultate, kometnega testa, pri katerem smo uporabili FPG, smo primerjali z rezultati testa brez uporabljenih encimov. S primerjavo obeh skupin podatkov smo dokazali prisotnost 8-oksogvanina in drugih produktov oksidacij purinov pri vzorcih S01, S02, S07, S09 in pri pozitivni kontroli. Rezultati so grafično prikazani na sliki 5. Po RM-Olive smo pri vzorcih S01, S02, S07, S09 in pozitivni kontroli dokazali statistično značilno razliko med rezultati, ki smo jih pridobili s postopkom, pri katerem smo uporabili FPG in rezultati alkalnega kometnega testa brez FPG ( $p<0,05$ ).



Slika 5: Grafični prikaz razlike v stopnji poškodovanosti med inkubacijo s FPG in inbukacijo z encimskim reakcijskim pufrom brez FPG po posameznih vzorcih. Pri posameznih vzorcih so v stolpcu prikazane celokupne poškodbe DNK, ki so v celicah nastale kot posledica genotoksičnosti vzorcev. Z modro je predstavljen delež poškodb DNK v obliki enojnih in dvojnih prelomov, ki smo jih dokazali z alkalno različico kometnega testa. Z rdečo je predstavljen delež poškodb DNK v obliki oksidativnih poškodb purinov, ki smo jih dokazali s kometnim testom s formamidopirimidin DNK glikozilazo. Z zvezdico (\*) so označeni vzorci, pri katerih je po RM-Olive prišlo do statistično značilnih razlik med deležem enojnih in dvojnih prelomov in deležem oksidativnih poškodb purinov ( $p<0,05$ ).

Preglednica 15: Osnovna statistika za poškodbe jedrne DNK (RM-Olive) pri inkubaciji s FPG

Vzorec	Povprečje	Standardni odklon	Mediana	Minimum	Maksimum
NK	2,4521	3,517783	1,05	0,01	22,09
PK	69,1462	23,90454	63,94	28,95	152,52
S01	20,1531	28,45529	7,235	0,01	140,49
S02	24,1061	26,15675	15,165	0,17	105,82
S03	19,5571	27,20493	5,71	0,36	113,58
S04	24,8474	32,6981	9,295	0,03	121,03
S05	26,6062	31,2312	10,645	0,04	112,91
S06	15,9156	18,45685	6,7	0,02	83,61
S07	12,4207	20,04991	4,885	0,41	104,65
S08	12,8566	21,95282	4,585	0,04	110,12
S09	17,4974	30,80602	2,655	0,09	128,63
S10	20,8268	24,75814	7,63	0,09	108,78
S11	19,4472	19,85307	14,805	0,02	121,77
S12	26,695	24,86464	20,36	0,08	110,49

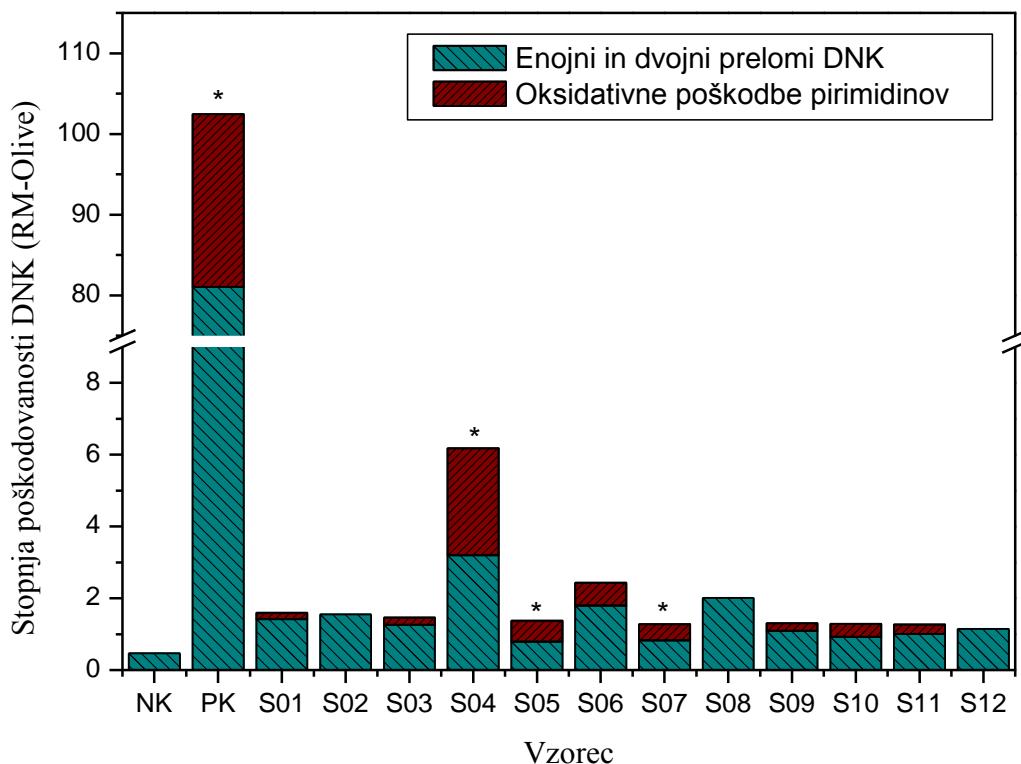
(NK) negativna kontrola; (PK) pozitivna kontrola

#### 4.5 KOMETNI TEST Z ENDONUKLEAZO III (DOKAZOVANJE OKSIDATIVNIH POŠKODB PIRIMIDINOV)

Vzorce izcednih vod iz komunalnih deponij smo testirali tudi s kometnim testom z uporabo restriktijskega encima endonukleaze III. Rezultati so prikazani na sliki 6 in v preglednici 16.

Vsi vzorci so se po RM-Olive statistično značilno razlikovali od negativne kontrole ( $p<0,05$ ).

Rezultate kometnega testa, pri katerem smo uporabili ENDO III, smo primerjali z rezultati testa brez uporabljenih encimov. S primerjavo obeh skupin podatkov smo dokazali oksidirane pirimidine pri vzorcih S04, S05, S07 in pri pozitivni kontroli. Rezultati so grafično prikazani na sliki 6. Po RM-Olive smo pri vzorcih S04, S05, S07 in pozitivni kontroli dokazali statistično značilno razliko med rezultati, ki smo jih pridobili s postopkom, pri katerem smo uporabili ENDO III in rezultati rezultati alkalnega kometnega testa brez ENDO III ( $p<0,05$ ). Pri vzorcu S06 je bila p-vrednost na meji statistične značilnosti ( $p=0,05033$ ).



Slika 6 : Grafični prikaz razlike v stopnji poškodovanosti med inkubacijo z ENDO III in inbukacijo z encimskim reakcijskim pufrom brez ENDO III po posameznih vzorcih. Pri posameznih vzorcih so v stolpcu prikazane celokupne poškodbe DNK, ki so v celicah nastale kot posledica genotoksičnosti vzorcev. Z modro je predstavljen delež poškodb DNK v obliki enojnih in dvojnih prelomov, ki smo jih dokazali z alkalno različico kometnega testa. Z rdečo je predstavljen delež poškodb DNK v obliki oksidativnih poškodb pirimidinov, ki smo jih dokazali s kometnim testom z endonukleazo III. Z zvezdico (\*) so označeni vzorci, pri katerih je po RM-Olive prišlo do statistično značilnih razlik med deležem enojnih in dvojnih prelomov in deležem oksidativnih poškodb pirimidinov ( $p < 0,05$ ).

Preglednica 16: Osnovna statistika za poškodbe jedrne DNK (RM-Olive) pri inkubaciji z ENDO III

Vzorec	Povprečje	Standardni odклон	Mediana	Minimum	Maksimum
NK	0,6366	0,6116482	0,05	0,2275	0,465
PK	92,7855	42,133014	10,1	59,5075	102,47
S01	2,7605	3,1449412	0,19	0,8675	1,595
S02	2,9524	5,1935496	0,15	0,72	1,47
S03	1,7273	1,2192089	0,25	1,06	1,465
S04	9,8823	11,2664385	0,01	2,475	6,18
S05	2,2124	3,4048032	0,22	0,7575	1,375
S06	4,2438	6,4051768	0,02	0,9325	2,43
S07	1,645	1,6412034	0,25	0,7875	1,28
S08	4,3869	6,3879254	0,12	0,825	1,565
S09	1,4582	0,8615119	0,1	0,8025	1,305
S10	2,1391	3,3542809	0,18	0,785	1,29
S11	2,0201	3,1593045	0,02	0,6325	1,27
S12	1,2913	0,7142187	0,07	0,7375	1,145

(NK) negativna kontrola; (PK) pozitivna kontrola

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Kometni test je delovno zahtevna metoda, predvsem zaradi potrebe po tem, da vse korake razen priprave prvega sloja agaroze opravimo v kratkem časovnem sosledju. Tak način dela nam omeji število vzorcev, ki smo jih sposobni testirati naenkrat. Tudi sama analiza rezultatov po barvanju celic je časovno zahtevna. Težavi bi se lahko izognili s tem, da bi se pri testu zaporedoma menjalo več ljudi. Vendar je prav pri analizi rezultatov priporočljivo, da vse minigele analizira ena oseba, saj se s tem zmanjša napaka zaradi subjektivnega ocenjevanja.

Postopek smo izboljšali tako, da smo podaljšali čas alkalne lize celic in s tem test razdelili na dva dni. Čas alkalne lize smo iz 1 h (Dušinská, 2004) podaljšali na prekonočno. Tako smo imeli zadnji dan testa več časa za analizo rezultatov in smo tako lahko testirali več vzorcev hkrati. Če bi hoteli testirati še več vzorcev naenkrat, bi se lahko poslužili tudi katere izmed metod sušenja in shranjevanja minigelov po barvanju, ki so jih predlagali Rojas in sodelavci (1999), vendar izkušnje s tem postopkom na Katedri za mikrobiologijo in mikrobiološko biotehnologijo na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani niso najbolj ugodne.

S postopkom kometnega testa brez uporabe encimov smo tako v prvem kot v drugem poskusu dokazali enojne in dvojne prelome DNK pri vseh testiranih vzorcih. Ti rezultati sovpadajo s fizikalno-kemijskimi analizami testiranih vzorcev, saj so pri vseh vzorcih (razen pri vzorcih S11 in S12) pri nekaterih parametrih dokazali vrednosti, ki so presegle zakonsko določene dovoljene maksimalne vsebnosti (Uredba o standardih kakovosti ..., 2005; Zavod za zdravstveno ..., 2008). Testiranje vzorcev je bilo izpeljano zanesljivo, kar dokazujejo stopnje genotoksičnosti pozitivnih kontrol, ki statistično značilno odstopajo od stopenj genotoksičnosti negativnih kontrol ( $p<0,05$ ).

Na podlagi primerjave rezultatov kometnega testa z encimom formamidopirimidin DNK glikozilazo z rezultati alkalnega kometnega testa brez encimov, lahko zaključimo, da so vzorci S01, S02, S07 ter S09 povzročili oksidativne poškodbe DNK celic HEP-G2 v obliki 8-oksogvanina in drugih produktov oksidacije purinov.

Pozitivna kontrola se statistično značilno razlikuje od negativne, kar dokazuje da smo kometni test z encimom FPG izvedli zanesljivo. Prav tako smo pri pozitivni kontroli dokazali oksidativne poškodbe purinov, ki jih je povzročil vodikov peroksid.

Na podlagi primerjave rezultatov kometnega testa z encimom endonukleazo III z rezultati alkalnega kometnega testa brez encimov, lahko zaključimo, da so vzorci S04, S05, S07 povzročili oksidativne poškodbe DNK v obliki oksidiranih pirimidinov.

Pozitivna kontrola se statistično značilno razlikuje od negativne, kar dokazuje da smo kometni test z encimom ENDO III izvedli zanesljivo. Prav tako smo pri pozitivni kontroli dokazali oksidativne poškodbe pirimidinov, ki jih je povzročil vodikov peroksid v pozitivni kontroli.

Pri vzorcih S01 in S02 iz vrtine D1 iz odlagališča Dobova so fizikalno-kemijske analize pokazale, da so maksimalno zakonsko dovoljeno vsebnost presegli le ortofosfati, ki sami po sebi nimajo oksidativnih učinkov (Uredba o standardih kakovosti ..., 2005; Zavod za zdravstveno ..., 2008). Za oba vzorca smo dokazali, da povzročita oksidativne poškodbe purinov v DNK celic HEP-G2. Prisotnost oksidativnih poškodb purinov si razlagamo s tem, da za mnogo parametrov še ni zakonsko določene maksimalne dovoljene vsebnosti – kar pa ne pomeni, da v količinah, ki so prisotne v vzorcih iz te vrtine, niso škodljivi.

Pri vzorcih S03 in S04 iz vrtine D2 iz odlagališča Dobova so fizikalno-kemijske analize pokazale, da so maksimalno zakonsko dovoljeno vsebnost presegli amonij, kalij, pesticidi ametrin, atrazin, metolaklor, prometrin. Prav tako je maksimalno zakonsko dovoljeno vrednost presegla skupna vrednost pesticidov. Vsebnost pesticida terbutrina je bila tik pod maksimalno zakonsko dovoljeno vsebnostjo (Uredba o standardih kakovosti ..., 2005; Zavod za zdravstveno ..., 2008). Za vzorec S04 smo dokazali, da povzroči oksidativne poškodbe pirimidinov v DNK celic HEP-G2. Oksidativne poškodbe bi lahko povzročili nekateri prisotni pesticidi ali pa kateri od dejavnikov, za katere še niso zakonsko določene maksimalne dovoljene vsebnosti. Osano in sodelavci so leta 2002 pokazali, da metolaklor deluje genotoksično na *V. fischeri* tudi po razgradnji pesticida. Štajner in sodelavci so leta 2003 dokazali, da metaloklor inhibira aktivnost antioksidativnih encimov v semenih solate, fižola in graha.

Pri vzorcih S05 in S06 iz vrtine SL-1/93 iz odlagališča CeROD so fizikalno-kemijske analize pokazale, da je vsebnost nitratov presegla zakonsko določeno maskimalno dovoljeno mejo (Uredba o standardih kakovosti ..., 2005; Zavod za zdravstveno ..., 2008). Za vzorec S05 smo dokazali, da povzroči oksidativne poškodbe pirimidinov v DNK celic HEP-G2. Sklepamo, da so oksidativne poškodbe povzročili nitrati ali prisotne spojine, za katere še niso zakonsko določene maksimalne dovoljene vsebnosti.

Pri vzorcih S07 in S08 iz izvira št. 2 iz odlagališča CeROD so fizikalno-kemijske analize pokazale, da je vsebnost amonija presegla zakonsko določeno maskimalno dovoljeno mejo, vsebnost atrazina pa je bila tik pod njo (Uredba o standardih kakovosti ..., 2005; Zavod za zdravstveno ..., 2008). Za vzorec S07 smo dokazali, da povzroči oksidativne poškodbe pirimidinov in purinov v DNK celic HEP-G2. Sklepamo, da so oksidativne poškodbe kljub prisotnosti pod maksimalno dovoljeno mejo povzročil atrazin ali pa dejavniki, za katere še niso zakonsko določene maksimalne dovoljene vsebnosti. Za atrazin so Ribas in sodelavci (1995) s kometnim testom dokazali, da povzroča poškodbe DNK. Song in sodelavci so leta 2009 dokazali, da atrazin inhibira aktivnost antioksidativnih encimov v deževnikih, Singh in sodelavci (2008) pa so dokazali, da povzroča oksidativni stres pri eritrocitih podgan.

Pri vzorcih S09 in S10 iz vrtine SL 4/94 iz odlagališča CeROD so fizikalno-kemijske analize pokazale, da so maksimalno zakonsko dovoljeno vsebnost presegli pesticida

atrazin, desetilatrazin in skupni pesticidi (Uredba o standardih kakovosti ..., 2005; Zavod za zdravstveno ..., 2008). Za vzorec S09 smo dokazali, da povzroči oksidativne poškodbe purinov v DNK celic HEP-G2. Sklepamo, da so oksidativne poškodbe povzročili omenjeni pesticidi ali pa dejavniki, za katere še niso zakonsko določene maksimalne dovoljene vsebnosti.

Pri vzorcih S11 in S12 iz vrtine SL 5/94 iz odlagališča CeROD so fizikalno-kemijske analize pokazale, da zakonsko določene maskimalne dovoljene meje niso bile presežene (Uredba o standardih kakovosti ..., 2005; Zavod za zdravstveno ..., 2008). Pri vzorcih S11 in S12 nismo dokazali oksidativnih poškodb DNK celic HEP-G2.

Razlike v stopnji oksidativnih poškodb, ki so jih povzročili vzorci, ki so bili zajeti v isti vrtini (S03 in S04, S05 in S06, S07 in S08, S09 in S10), bi lahko razložili z morebitnimi odstopanji pri obdelavi pripadajočih minigelov pri koraku inkubacije z encimi. Če kapljico encima v encimskem reakcijskem pufru s krovnim stekelcem ne prekrijemo popolnoma ali posode, v kateri minigele inkubiramo, ne zapremo povsem, lahko encimski reakcijski pufer izhlapi in encim ne pride več v stik z DNK. To bi pomenilo, da encim ne more pretvoriti oksidativnih poškodb v dvojne prelome in jih zato ne zaznamo.

Za večino kemikalij, ki so navedeni v prilogi A še nimamo zakonsko določene maksimalne dovoljene vsebnosti v okolju. Genotoksičnost smo zaznali tudi pri vzorcih, pri katerih nobedena od kemikalij, za katere so meje zakonsko že določene, ni presegla maksimalne dovoljene koncentracije (vzorca S11 in S12). To dokazuje, da imajo genotoksične lasnosti tudi dejavniki in/ali njihove mešanice, za katere meja še ni zakonsko določena. Zaključimo lahko, da bi bila potrebna ponovna ureditev zakonskega področja in določitev maksimalnih dovoljenih koncentracij tudi za ostale kemikalije.

Dokazali smo tudi, da le fizikalno-kemijske analize pri vzorcih izcednih vod ne zadostujejo, saj smo dokazali genotoksične vplive tudi pri vzorcih, pri katerih fizikalno-kemijske analize niso pokazale presežkov dovoljenih vrednosti (vzorca S11 in S12). Potrebno bi bilo med zakonsko določeni nabor testov izcednih vod vključiti tudi biološke teste strupenosti in genotoksičnosti, saj se z njimi dokaže biološki učinek prisotnih dejavnikov. Za dokazovanje genotoksičnosti je primeren kometni test, saj z njim zaznamo drobne kumulativne poškodbe DNK, ki skozi čas lahko privedejo do degeneracije DNK in celo do kancerogeneze in drugih kroničnih bolezni.

Pri vseh testiranih vzorcih izcednih vod smo dokazali genotoksičnost, natančneje dvojne in enojne prelome DNK. Tudi številne druge objave potrjujejo, da so izcedne vode iz komunalnih deponij genotoksične (Alimba in sod., 2006; Li in sod., 2004; Obidoska, 2008; Sang in sod., 2004). V skladu s temi ugotovitvami bi morali zakonsko določiti ustrezno obdelavo in čiščenje izcednih vod. Primerno bi bilo lahko čiščenje z rastlinskimi čistilnimi napravami (Zupančič Justin in sod., 2005).

Za zanesljivejšo analizo genotoksičnosti vzorcev bi bilo potrebno uporabiti različne metode za ugotavljanje genotoksičnosti, ki bi vključevale organizme iz več trofičnih nivojev (prokarioti, evkariontski mikroorganizmi, rastline, nevretenčarji, vretenčarji). Z vidika relevantnosti rezultatov je najbolje je uporabiti teste *in vivo*. V nekaterih primerih pa to ni mogoče (človek, človeku podobne opice ...) in se moramo poslužiti *in vitro* testov na celičnih linijah. Celične linije so običajno bolj primerne tudi s časovnega in finančnega vidika, še posebej pri višjih organizmih.

Na podlagi rezultatov raziskave lahko oblikujemo naslednje sklepe:

- Podaljšanje časa alkalne lize celic omogoči testiranje večjega števila vzorcev hkrati.
- Z uporabo alkalnega kometnega testa brez encimov smo dokazali genotoksičnost vseh vzorcev izcednih deponijskih vod na ravni enojnih in dvojnih prelomov DNK.
- Z uporabo kometnega testa z restriktičnim encimom endonukleaza III smo dokazali, da vzorci S04, S05 in S07 povzročajo oksidacijo pirimidinov v DNK celic HEP-G2
- Z uporabo kometnega testa z restriktičnim encimom formamidopirimidin DNK glikozilaza smo dokazali, da vzorci S01, S02, S07 in S09 povzročajo oksidacijo purinov v DNK celic HEP-G2.
- Zakonsko urejeni predpisi o maksimalnih dovoljenih vsebnostih v okolju zaobjemajo premajhno število znanih kemikalij.
- Med zakonsko določeni nabor testov izcednih vod bi bilo potrebno vključiti tudi biološke teste strupenosti in genotoksičnosti.
- Izcedne vode iz odlagališč nenevarnih in komunalnih odpadkov so lahko genotoksične.
- Za izcedne vode iz odlagališč nenevarnih in komunalnih odpadkov bi bilo potrebno zakonsko določiti ustrezno obdelavo in čiščenje.

## 6 POVZETEK

Začetki kometnega testa segajo v leto 1978, ko sta Rydberg in Johanson kot prva neposredno ocenila poškodbe DNK v posameznih celicah. Od tega leta so test razvili v več različic, med katerimi se najpogosteje uporabljajo tri. Z alkalno različico kometnega testa zaznamo dvojne in enojne prelome DNK. Nevratalno različico kometnega testa uporabimo v povezavi z alkalno različico za določanje deleža enojnih in dvojnih prelomov, ki jih povzroči določen genotoksičen dejavnik. S kometnim testom z uporabo specifičnih restriktijskih encimov v kombinaciji z alkalno različico kometnega testa dokažemo delež oksidiranih baz (oziroma drugih poškodb DNK, odvisno od uporabljenega encima), ki jih povzroči določen genotoksični dejavnik.

V sklopu diplome smo testirali genotoksičnost vzorcev izcednih vod iz odlagališč komunalnih in nenevarnih odpadkov Dobova iz Savske kotline in CeRod iz Mestne občine Novo mesto. Uvedli in preizkusili smo postopek za kometni test s celično linijo HEP-G2, s katerim je mogoče dokazati genotoksičnost vzorca na ravni enojnih in dvojnih prelomov DNK in tudi določene specifične tipe poškodb DNK (oksidirane pirimidine, 8-oksogvanin in druge produkte oksidacije purinov).

Kometni test uporablja za teste genotoksičnosti farmacevtikov, drugih kemikalij, okoljskih in drugih vodnih vzorcev. Uporaben je tudi za biomonitoring poklicne izpostavljenosti genotoksičnim kemikalijam ali sevanju, ugotavljanje oksidativnega stresa, povezanega z različnimi človeškimi boleznim prehranske raziskave, diagnozo nekaterih bolezni in opazovanje popravljanja DNK.

Celice smo testirali z alkalno različico kometnega testa in s kometnim testom z restriktijskima encimoma endonukleazo III (dokazovanje oksidacije pirimidinov) in formamidopirimidin DNK glikozilazo (dokazovanje oksidacije purinov). Celice HEP-G2 smo vklopili v agarozne minigele in jih tako imobilizirane izpostavili vzorcem. Nato smo celice izpostavili alkalni lizi pri pH=10. Po alkalni lizi smo celice inkubirali s posameznim encimom. Pri alkalni različici smo jih inkubirali v encinskem reakcijskem pufru brez encimov. Zatem smo superzvito DNK iz celic razvili v elektroforetskem pufru in nato nevtralizirali vrednost pH. DNK smo obarvali z etidijevim bromidom in ovrednotili z epifluorescentnim mikroskopom in digitalno kamero ter programskim paketom Komet 5.0 za računalniško analizo slike.

Z alkalno različico kometnega testa brez encimov smo dokazali enojne in dvojne prelome DNK pri vseh testiranih vzorcih izcednih vod. Ti rezultati sovpadajo tudi s fizikalno-kemijskimi analizami testiranih vzorcev. Na podlagi primerjave rezultatov kometnega testa z encimom formamidopirimidin DNK glikozilazo z rezultati alkalnega kometnega testa brez encimov, lahko zaključimo, da so vzorci S01, S02, S07 ter S09 povzročili oksidativne poškodbe DNK celic HEP-G2 v obliki 8-oksogvanina in drugih produktov oksidacije purinov. Na pogladi primerjave rezultatov kometnega testa z encimom endonukleazo III z rezultati alkalnega kometnega testa brez encimov, lahko zaključimo, da so vzorci S04, S05, S07 povzročili oksidativne poškodbe DNK v obliki oksidiranih pirimidinov.

Za večino kemijskih parametrov, ki so bili testirani, še nimamo zakonsko določene maksimalne dovoljene meje v okolju. Genotoksičnost smo zaznali tudi pri vzorcih, pri katerih nobeden od parametrov, za katere so meje zakonsko že določene, ni presegel maksimalne dovoljene koncentracije (vzorca S11 in S12). To dokazuje, da imajo genotoksične lastnosti tudi dejavniki in/ali njihove mešanice, za katere meja še ni zakonsko določena. Zaključimo lahko, da bi bila potrebna ponovna ureditev zakonskega področja in določitev maksimalnih dovoljenih koncentracij tudi za ostale parametre. Prav tako bi bilo potrebno med zakonsko določeni nabor testov izcednih vod vključiti tudi biološke teste strupenosti in genotoksičnosti, saj se le z njimi dokaže pravi biološki učinek prisotnih dejavnikov. Za dokazovanje genotoksičnosti je primeren kometni test, saj z njim zaznamo drobne kumulativne poškodbe DNK, ki skozi čas lahko privedejo do degeneracije DNK in celo do kancerogeneze in drugih kroničnih bolezni.

Pri vseh testiranih vzorcih izcednih vod smo dokazali genotoksičnost, natančneje dvojne in enojne prelome DNK. Tudi številne druge objave potrjujejo, da so izcedne vode iz komunalnih deponij genotoksične. V skladu s temi ugotovitvami bi morali zakonsko določiti ustrezno obdelavo in čiščenje izcednih vod. Primerno bi bilo lahko čiščenje z rastlinskimi čistilnimi napravami

Za zanesljivejšo analizo genotoksičnosti vzorcev bi bilo potrebno uporabiti različne metode za ugotavljanje genotoksičnosti in uporabiti organizme in celice iz več trofičnih nivojev (prokarionti, evkariontski mikroorganizmi, rastline, nevretenčarji).

## 7 VIRI

- Alimba C.G., Bakare A.A., Latunji C.A. 2006. Municipal landfill leachates induced chromosome aberrations in rat bone marrow cells. *African Journal of Biotechnology*, 5, 22: 2053-2057
- Betti C., Davini T., Giannessi L., Loprieno N., Barale R. 1994. Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutation Research*, 307: 323–333
- Brulc M. 2005. Tehnični pravilnik o odlaganju ostankov predelave ali odstranjevanja komunalnih odpadkov v centru za ravnanje z odpadki Nova Gorica. Mestni svet Mestne občine Nova Gorica, Nova Gorica, 352-01-11/2005: 11 str.
- Collins A.R. 2004. Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. *Molecular Biotechnology*, 26: 249-261
- Collins A.R., Dobson V.L., Dušinská M., Kennedy G., Štetina R. 1997. The comet assay: what can it really tell us? *Mutation Research*, 375: 183–193
- Collins A.R., Dušinská M., Franklin M., Somorovská M., Petrovská H., Duthie S., Fillion L., Panayiotidis M., Rašlová K., Vaughan N. 1997. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 30: 139–146
- Collins A.R., Dušinská M., Gedik C.M., Stetina R. 1996. Oxidative damage to DNA: Do we have a reliable biomarker? *Environmental Health Perspectives*, 104S3: 465–469
- Collins A.R., Dušinská M., Horská A. 2001. Detection of alkylation damage in human lymphocyte DNA with the comet assay. *Acta Biochimica Polonica*, 48: 611–614
- Collins A.R., Duthie S.J., Dobson V.L. 1993. Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis*, 14: 1733–1735
- Collins A.R., Horváthová E. 2001. Oxidative DNA damage, antioxidants and DNA repair: applications of the comet assay. *Biochemical Society Transactions*, 29: 337–341

- Collins A.R., Mitchell D.L., Zunino A., de Wit J., Busch D. 1997. UV-sensitive rodent mutant cell lines of complementation groups 6 and 8 differ phenotypically from their human counterparts. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 29: 152–160
- Collins A.R., Rašlová K., Somorovská M., et al. 1998. DNA damage in diabetes: Correlation with a clinical marker. *Free Radical Biology & Medicine*, 25: 373–377
- Dixon D.R., Pruski A.M., Dixon L.R.J., Jha A.N. 2002. Marine invertebrate eco-enotoxicology: a methodological overview. *Mutagenesis*, 17: 495–507
- Dušinská M. 2000. The Comet Assay modified for detection of oxidised bases with the use of bacterial repair endonucleases. Bratislava, Institute of Preventive and Clinical Medicine: 9 str.
- Dušinská M., Collins A.R. 1996. Detection of oxidised purines and UV-induced photoproducts in DNA of single cells, by inclusion of lesion-specific enzymes in the comet assay. *Alternatives to Laboratory Animals*, 24: 405–411
- Duthie S.J., Dobson V.L. 1999. Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack in vitro. *European Journal of Nutrition*, 38: 28–34
- Duthie S.J., Ma A., Ross M.A., Collins A.R. 1996. Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Research*, 56: 1291–1295
- Frankenberg-Schwager M. 1989. Review of repair kinetics for DNA damage induced in eukaryotic cells in vitro by ionizing radiation. *Radiotherapy & Oncology*, 14: 307–320
- Frankič T., Salobir J., Rezar V. 2008. The effect of vitamin E supplementations on reduction of lymphocyte DNA damage induced by T-2 toxin and deoxynivalenol in weaned pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 141, 3/4: 270-286
- Gedik C.M., Ewen S.W.B., Collins A.R. 1992. Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. *International Journal of Radiation Biology*, 62: 313–320
- ISO 5667. Guidance on the design of sampling programmes, sampling techniques and the handling of water samples taken from groundwater for physical, chemical and microbiological assessment. 1996: 11 str.

- Jenkinson A.M., Collins A.R., Duthie S.J., Wahle K.W.J., Duthie G.G. 1999. The effect of increased intakes of polyunsaturated fatty acids and vitamin E on DNA damage in human lymphocytes. *FASEB Journal*, 13: 2138–2142
- Lah B. 2006. Prilagoditev in preizkus bioloških testov za ugotavljanje genotoksičnosti različnih vzorcev vode in zemlje, Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta: 130 str.
- Lah B., Avberšek M., Gorjanc G., Marinšek Logar R. 2005a. Toxic and genotoxic evaluations of soil samples by bioassays. *Acta Agriculturae Slovenica*, 86, 1: 27-38
- Lah B., Malovrh Š., Narat M., Čepeljnik T., Marinšek-Logar R. 2004. Detection and quantification of genotoxicity in wastewater-treated *Tetrahymena thermophila* using the comet assay. *Environmental Toxicology*, 19: 545-553
- Lah B., Žinko B., Narat M., Marinšek-Logar R. 2005b. Monitoring of Genotoxicity in Drinking Water. *Food Technology and Biotechnology*, 43, 2: 139–146
- Lee R.F., Steinert S. 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research*, 544: 43-64
- Li G., Sang N., Zhao Y. 2004. Micronuclei induced by municipal landfill leachate in mouse bone marrow cells in vivo. *Environmental Research*, 95, 1: 77-81
- McGlynn A. P., Wasson G., O'Connor J., McKelvey-Martin V.J., Downes C.S. 1999. The bromodeoxyuridine comet assay: detection of maturation of recently replicated DNA in individual cells. *Cancer Research*, 59: 5912–5916
- McKelvey-Martin V.J., Ho E.T.S., McKeown S.R., McCarthy P.J., Rajab N.F., Downes C.S. 1998. Emerging applications of the single cell gel electrophoresis (Comet) assay. I. Management of invasive transitional cell human bladder carcinoma. II. Fluorescent in situ hybridization Comets for the identification of damaged and repaired DNA sequences in individual cells. *Mutagenesis*, 13: 1–8
- Obidoska G., Jasinska D. 2008. Phytotoxicity and potential genotoxicity of Radiowo municipal landfill leachate. *Annals of Warsaw University of Life Sciences – SGGW Land Reclamation*, 40: 39–44
- Olive P.L., Banáth J.P. 1993. Detection of DNA double-strand breaks through the cell cycle after exposure to X-rays, bleomycin, etoposide and  $^{125}\text{IdUrd}$ , *International Journal of Radiation Biology*, 64, 4: 349-358

- Olive P.L., Banáth J.P., Durand R.E. 1990. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “comet” assay. *Radiation Research*, 122: 86–94
- Olive P.L., Wlodek D., Banáth J. P. 1991. DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. *Cancer Research*, 51: 4671–4676
- Osano O., Admiraal W., Klamer H.J.C., Pastor D., Bleeker E.A.J. 2002. Comparative toxic and genotoxic effects of chloroacetanilides, formamidines and their degradation products on *Vibrio fischeri* and *Chironomus riparius*. *Environmental Pollution*, 119, 2: 195–202
- Osojnik G. 2006. Postopek kometnega testa na praživali *Tetrahymena thermophila*. Opis postopka. Domžale, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Katedra za mikrobiologijo in mikrobiološko biotehnologijo (neobjavljeno)
- Osojnik Črnivec I.G., Marinšek-Logar R. 2007. Analiza toksičnosti in genotoksičnosti jezerskih voda z biotesti. *Acta agriculturae Slovenica*, 90, 2: 115–124
- Östling O, Johanson K.J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123: 291–298
- Pool-Zobel B.L., Bub A., Muller H., Wollowski I., Rechkemmer G. 1997. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. *Carcinogenesis*, 18: 1847–1850
- Poročilo o obratovalnem monitoringu onesnaževanja podzemne vode ob odlagališču Cerod za leto 2007. Zavod za zdravstveno varstvo Novo mesto, Sanitarno kemični laboratorij (osebni vir, 2008)
- Poročilo o obratovalnem monitoringu onesnaževanja podzemne vode ob odlagališču Dobova – Brežice za leto 2007. Zavod za zdravstveno varstvo Novo mesto, Sanitarno kemični laboratorij (osebni vir, 2008)
- Pravilnik o odlaganju odpadkov. Ur.l. RS, št. 5-259/2000
- Raspor P., Pleseničar S., Gazdag Z., Pesti M., Miklavčič M., Lah B., Marinšek-Logar R., Poljšak B. 2005. Prevention of intracellular oxidation in yeast: the role of vitamin E analogue, Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylkroman-2-carboxyl acid), *Cell Biology International*, 29: 57–63

- Rezar V., Marinšek-Logar R., Ješe Janežič V., Pajk Žontar T., Salobir K., Orešnik A., Salobir J. 2003. Wheat bran and oat bran effectively reduce oxidative stress induced by high-fat diets in pigs. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 47, 1: 78-84
- Ribas G., Frenzilli G., Barale R., Marcos R. 1995. Herbicide-induced DNA damage in human lymphocytes evaluated by the single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 344, 1-2: 41-54
- Rojas E., Lopez M.C., Valverde M. 1999. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography B*, 722: 225–254
- Rydberg B., Johanson K.J., 1978. Estimation of single strand breaks in single mammalian cells. V: DNA Repair Mechanisms. Hanawalt P.C., Friedberg E.C., Fox C.F. (eds.). New York, Academic Press
- Sang N., Li G. 2004. Genotoxicity of municipal landfill leachate on root tips of *Vicia faba*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 560, 2: 159-165
- Sauvaigo S., Serres C., Signorini N., Emonet N., Richard M.J., Cadet J., 1998. Use of the single-cell gel electrophoresis assay for the immunofluorescent detection of specific DNA damage. *Analytical Biochemistry*, 259: 1–7
- Singh M., Sandhir R., Kiran R. 2008. Atrazine-induced alterations in rat erythrocyte membranes: ameliorating effect of vitamin E. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 22, 5: 363-369
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175:184 –191
- Somorovská M., Szabová E., Vodicka P., Tulinská J., Baranloková M., Fábry R., Lišková A., Riegerová Z., Petrovská H., Kubová J., Rausová K., Dušinská M., Collins A. 1999. Biomonitoring of genotoxic risk in workers in a rubber factory: comparison of the Comet assay with cytogenetic methods and immunology. *Mutation Research*, 445: 181–192
- Song Y., Zhu L.S., Wang J., Wang J.H., Liu W. , Xie H. 2009. DNA damage and effects on antioxidative enzymes in earthworm (*Eisenia foetida*) induced by atrazine. *Soil Biology and Biochemistry*, 41, 5: 905-909
- Štajner D., Popović M., Štajner M. 2003. Herbicide Induced Oxidative Stress in Lettuce, Beans, Pea Seeds and Leaves. *Biologia Plantarum*, 47, 4: 575-579

Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.-C., Sasaki Y.F., 2000. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. Environmental and Molecular Mutagenesis, 35: 206-221

Torbergsen A.C., Collins, A. R. 2000. Recovery of human lymphocytes from oxidative DNA damage: the apparent enhancement of DNA repair by carotenoids is probably simply an antioxidant effect. European Journal of Nutrition, 39: 80–85

Ulrich Supovec M. 2009. Odlaganje odpadkov na odlagališča. Agencija Republike Slovenije za okolje. <http://kazalci.ars.si/kazalci/> (3. apr. 2009)

Uredba o standardih kakovosti podzemne vode. Ur.l. RS, št. 100-4351/2005

Verde P.E., Geracitano L.A., Amado L.L., Rosa C.E., Bianchini A., Monserrat J.M., 2006. Application of public-domain statistical analysis software for evaluation and comparison of comet assay data. Mutation Research, 604: 71-82

Verschaeve L., Gilles J. 1995. Single-cell gelectrophoresis assay in the earthworm for the detection of genotoxic compounds in soils. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 54: 112–119

Wong V.W.C., Szeto Y.T, Collins A.R., Benzie I.F.F., 2005. The Comet Assay: a biomonitoring tool for nutraceutical research. Current Topics in Nutraceutical Research, 3, 1: 1-14

Zavod za zdravstveno varstvo Novo mesto. »Fizikalno kemijske analize vzorcev izcednih vod« (osebni vir, 2008)

Zupančič Justin M., Bulc T.G., Vrhovšek D., 2005. Vračanje izcedne vode na odlagališče s prekritjem, ki dopušča nadaljnjo razgradnjo (bio)razgradljivega dela odloženih odpadkov. Poročilo.

[\(23. apr. 2009\)](http://www.limnos.si/life-limnotop/files/clanek%20Gospodarjenje%20z%20odpadki%202005.pdf)

## ZAHVALA

Zahvaljujem se svoji mentorici prof. dr. Romani Marinšek-Logar, ki me je navdušila za okoljske raziskave in kometni test. Hvaležna sem ji za strokovno pomoč, nasvete in prijaznost.

Zahvala gre tudi recenzentki prof. dr. Damjani Drobne za strokovni pregled naloge.

Posebno hvaležna sem tudi Katarini Aleš, Marti Majdič in Maji Budič za nasvete in pomoč pri eksperimentalnem delu.

Gasantu Osojniku se zahvaljujem za strokovne nasvete pri spoznavanju kometnega testa in pomoč pri statistični analizi podatkov. Zahvaljujem se tudi vsem ostalim zaposlenim na Katedri za mikrobiologijo in mikrobiološko biotehnologijo na Oddelku za zootehniko, saj so mi bili vsi vedno pripravljeni priskočiti na pomoč.

Zahvala gre tudi dr. Ireni Oven za pomoč pri uvajanju v delo v celičnem laboratoriju in delu s celično linijo HEP-G2.

Iskreno se zahvaljujem vsem, ki ste mi kakor koli pomagali pri nastajanju tega dela.

Najlepša hvala tudi mojim staršem in bratu, ki so me ves čas spodbujali in mi stali ob strani. Posebej bi se rada zahvalila očetu, ki je v majhni deklici znal zbuditi zanimanje za prav vse in jo naučil, da se za vsako stvarjo skriva vprašanje, za vsakim vprašanjem pa odgovor.

Mojemu Mihu hvala za trdna tla pod nogami.

## PRILOGE

### Priloga A: Fizikalno kemijske analize vzorcev izcednih voda

Z rdečo so označene vrednosti parametrov, ki presegajo zakonsko določeno maksimalno dovoljeno vrednost (Uredba o standardih kakovosti ..., 2005), z rumeno vrednosti parametrov, ki so tik pod zakonsko določeno maksimalno dovoljeno vrednostjo; ostale vrednosti bodisi ne presegajo zakonsko določene maskimalne dovoljene vrednosti, bodisi le-ta za te parametre ni določena (Zavod za zdravstveno ..., 2008).

Parameter	Vrtina					
Meritve na terenu	Dobova, D1	Dobova, D2	CeROD, SL-5/94	CeROD, SL-4/94	CeROD, izvir št. 2	CeROD, SL-1/93
Temperatura zraka (°C)	13,2	13,4	3,6	-0,5	2,5	3,5
Temperatura vode (°C)	14,3	15,5	11,6	11	6,3	12,2
Vitez	bistra	motna	bistra	bistra	rahlo motna	bistra
pH	6,992	6,587	6,89	6,97	8,1	6,98
Elektroprevodnost pri 25°C (µS/cm)	783	1279	580	748	376	804
Raztopljeni kisik (mg/L O <sub>2</sub> )	5,13	0,65	6,89	0,14	911	2,32
Kisik – nasičenost (%)	50,8	6,9	65,2	1,3	76,1	22,4
Redoks potencial (mV)	353,7	281,5	280	160	450	370
<i>Osnovni parametri</i>						
Motnost (NTU)	0,17	1,7	4,3	4,4	6,8	3,5
Barva (m-1)	<0,1	0,55	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Celotni organski ogljik – TOC (mg/L C)	1,14	12,9	0,49	1,04	1,66	1,99
Adsorbirani organsko vezani halogeni – AOX (µg/L C)	<4	22	<4	8,6	<4	14,1
Amonij (mg/L NH <sub>4</sub> )	<0,02	8,5	<0,02	0,16	0,37	2
Natrij (mg/L Na)	7,7	38	2	7,4	5,3	28
Kalij (mg/L K)	2,8	20	0,15	0,48	2,4	5
Kalcij (mg/L Ca)	143	278	80,7	100	54,5	94
Magnezij (mg/L Mg)	34,3	43,3	43,7	55	27,3	56,2
Železo (mg/L Fe)	<40	<40	<40	<40	45	<40
Hidrogenkarbonati (mg/L HCO <sub>3</sub> )	505	821	444	524	269	526
Nitрати (mg/L NO <sub>3</sub> )	15,3	23,7	1,45	2,57	10,6	44,2
Sulfati (mg/L SO <sub>4</sub> )	28,6	17,8	8,8	10	11	18,7
Kloridi (mg/L Cl)	9,61	35,9	3,85	17,6	2,54	10,8
Fosfati-ortho (mg/L PO <sub>4</sub> )	0,28	0,069	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Bor (mg/L B)	0,046	0,38	0,0024	0,024	0,078	0,77
<i>Indikativni parametri</i>						
Nitriti (mg/L NO <sub>2</sub> )	<0,008	0,014	0,014	0,032	0,11	0,16
Fluoridi (mg/L F)	0,075	0,049	0,084	0,035	0,064	0,027
Bromidi (mg/L Br)	<0,05	0,099	<0,05	<0,05	<0,05	0,1
<i>Kovine in nekovine</i>						
Antimon (µg/L Sb)	0,13	0,31	0,14	0,15	0,48	0,13
Aluminij (µg/L Al)	1,1	2,2	9,5	<0,9	75	39

se nadaljuje

nadaljevanje

Parameter	Vrtina	Parameter	Vrtina	Parameter	Vrtina	Parameter
<b>Meritve na terenu</b>	Dobova, D1	Dobova, D2	CeROD, SL-5/94	CeROD, SL-4/94	CeROD, izvir št. 2	CeROD, SL-1/93
Arzen ( $\mu\text{g/L}$ As)	0,5	0,63	<0,1	0,14	0,28	0,17
Baker ( $\mu\text{g/L}$ Cu)	0,49	5,4	0,63	0,82	1,5	2
Barij ( $\mu\text{g/L}$ Ba)	40	114	7,2	18	19	45
Berilij ( $\mu\text{g/L}$ Be)	<0,04	<0,04	<0,04	<0,04	<0,04	<0,04
Cink ( $\mu\text{g/L}$ Zn)	<9	<9	<9	<9	<9	<9
Kadmij ( $\mu\text{g/L}$ Cd)	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Kobalt ( $\mu\text{g/L}$ Co)	0,56	2,9	0,57	0,77	0,38	3,5
Kositer ( $\mu\text{g/L}$ Sn)	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Krom – skupno ( $\mu\text{g/L}$ Cr)	0,47	2	0,52	0,59	0,6	1,5
Krom 6+ ( $\mu\text{g/L}$ Cr)	<8	<8	<8	<8	<8	<8
Mangan ( $\text{mg/L}$ Mn)	0,00057	0,99	0,0042	0,0085	0,045	0,0099
Molibden ( $\mu\text{g/L}$ Mo)	0,31	0,51	0,22	0,13	0,59	0,39
Nikelj ( $\mu\text{g/L}$ Ni)	1,2	12	0,84	3	1,1	4,9
Selen ( $\mu\text{g/L}$ Se)	0,44	0,49	0,23	0,32	0,17	0,3
Srebro ( $\mu\text{g/L}$ Ag)	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03
Svinec ( $\mu\text{g/L}$ Pb)	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,12	<0,1
Vanadij ( $\mu\text{g/L}$ V)	0,88	1,1	2,5	1,7	0,78	0,84
Živo srebro ( $\mu\text{g/L}$ Hg)			<0,2	1,5	<0,2	0,3
<b>Fenolne snovi</b>						
2-Metilfenol ( $\mu\text{g/L}$ )		0,006				
3,5-Dimetilfenol ( $\mu\text{g/L}$ )		0,03				
Fenolne snovi skupno ( $\mu\text{g/L}$ )	<1	2,1	<1	<1	<1	<1
4-Kloro-3-metilfenol ( $\mu\text{g/L}$ )	<0,005	0,012	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
2-Klorofenol ( $\mu\text{g/L}$ )	<0,005	<0,005	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
2,4-Diklorofenol ( $\mu\text{g/L}$ )	<0,005	<0,005	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Pentaklorofenol – PCP ( $\mu\text{g/L}$ )			<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
2,4,6-Triklorofenol ( $\mu\text{g/L}$ )	<0,005	<0,005	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
2,4-Dinitrofenol ( $\mu\text{g/L}$ )					0,1	
2-Nitrofenol ( $\mu\text{g/L}$ )					0,053	
<b>Organoklorini pesticidi</b>						
Aldrin ( $\mu\text{g/L}$ )			<0,003	<0,003	<0,003	<0,003
Klordan ( $\mu\text{g/L}$ )			<0,003	<0,003	<0,003	<0,003
DDD – o.p. ( $\mu\text{g/L}$ )			<0,003	<0,003	<0,003	<0,003
DDD – p.p. ( $\mu\text{g/L}$ )			<0,002	<0,002	<0,002	<0,002
DDT – p.p. ( $\mu\text{g/L}$ )			<0,003	<0,003	<0,003	<0,003
DDE – p.p. ( $\mu\text{g/L}$ )			<0,002	<0,002	<0,002	<0,002
Dieldrin ( $\mu\text{g/L}$ )			<0,003	<0,003	<0,003	<0,003
Endosulfan – alfa ( $\mu\text{g/L}$ )			<0,003	<0,003	<0,003	<0,003
Endrin ( $\mu\text{g/L}$ )			<0,003	<0,003	<0,003	<0,003
Izodrin ( $\mu\text{g/L}$ )			<0,003	<0,003	<0,003	<0,003
Heptaklor ( $\mu\text{g/L}$ )			<0,003	<0,003	<0,003	<0,003
Heptaklorepkosid ( $\mu\text{g/L}$ )			<0,002	<0,002	<0,002	<0,002
Heksaklorobenzen ( $\mu\text{g/L}$ )			<0,003	<0,003	<0,003	<0,003
HCH-alfa ( $\mu\text{g/L}$ )			<0,002	<0,002	<0,002	<0,002

se nadaljuje

nadaljevanje

Parameter	Vrtina	Parameter	Vrtina	Parameter	Vrtina	Parameter
<b>Meritve na terenu</b>	Dobova, D1	Dobova, D2	CeROD, SL-5/94	CeROD, SL-4/94	CeROD, izvir št. 2	CeROD, SL-1/93
HCH-beta (µg/L)			<0,003	<0,003	<0,003	<0,003
Lindan (µg/L)			<0,002	<0,002	<0,002	<0,002
HCH-delta (µg/L)			<0,002	<0,002	<0,002	<0,002
<b>Policiklični aromatski ogljikovodiki</b>						
Naftalen (µg/L)	0,006	0,037	0,005	0,005	0,009	0,11
Acenaftilen (µg/L)		<0,009	<0,009	<0,009	<0,009	<0,009
Acenaften (µg/L)	<0,003	<0,003	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Fluoren (µg/L)	<0,003	<0,003	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Fenantron (µg/L)	<0,003	<0,003	<0,005	0,006	0,011	<0,005
Antracen (µg/L)	<0,003	<0,003	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Floranten (µg/L)	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	0,004	<0,003
Piren (µg/L)	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	0,005	<0,003
Benzo(a)antracen (µg/L)	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003
Krizen (µg/L)	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003
Benzo(b)fluoranten (µg/L)	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003
Benzo(k)fluoranten (µg/L)	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002
Benzo(a)piren (µg/L)	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002
Benzo(ghi)perilen (µg/L)	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Dibenzo(a,h)antracen (µg/L)	<0,004	<0,004	<0,004	<0,004	<0,004	<0,004
Indeno(1,2,3-c,d)piren (µg/L)	<0,004	<0,004	<0,004	<0,004	<0,004	<0,004
PAO – vsota (µg/L)			<0,01	0,014	0,032	0,014
<b>Druge fosforjeve spojine</b>						
Tris (kloroetil) fosfat (µg/L)		0,07		0,38	0,078	0,16
Tris (kloropropil) fosfat (µg/L)				2	0,23	0,44
<b>Pesticidi</b>						
Ametrin (µg/L)		<b>0,12</b>				
Simazin (µg/L)	<0,011	0,043	<0,036	<0,036	<0,036	<0,036
Atrazin (µg/L)	<0,014	<b>0,2</b>	<0,046	<b>0,3</b>	<b>0,099</b>	<0,046
Desizopropilatrazin (µg/L)	<0,03	<0,03	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Cianazin (µg/L)	<0,014	<0,014	<0,046	<0,046	<0,046	<0,046
Desetilatrazin (µg/L)	0,023	0,037	<0,047	<b>0,25</b>	<0,047	<0,047
Metazaklor (µg/L)	<0,010	<0,010	<0,035	<0,035	<0,035	<0,035
Metolaklor (µg/L)	<0,015	<b>0,2</b>	<0,049	<0,049	<0,049	<0,049
Alaklor (µg/L)	<0,011	<0,011	<0,037	<0,037	<0,037	<0,037
Sebutilazin (µg/L)			<0,041	<0,041	<0,041	<0,041
Terbutrin (µg/L)		<b>0,096</b>				
Terbutilmeton (µg/L)		0,035				
Terbutilazin (µg/L)	<0,009	0,035	<0,031	<0,031	<0,031	<0,031
Bromacil (µg/L)	<0,03	<0,03	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Propazin (µg/L)	<0,010	<0,010	<0,033	<0,033	<0,033	<0,033

se nadaljuje

nadaljevanje

Parameter	Vrtina	Parameter	Vrtina	Parameter	Vrtina	Parameter
<b>Meritve na terenu</b>	Dobova, D1	Dobova, D2	CeROD, SL-5/94	CeROD, SL-4/94	CeROD, izvir št. 2	CeROD, SL-1/93
Prometrin ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )	<0,03	1	<0,05	<0,05	0,059	<0,05
Pesticidi – vsota ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )	0,023	1,51		0,55	0,158	
<b>Alifatski halogenirani ogljikovodiki</b>						
Bromoform ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )			<1	<1	<1	<1
Bromodiklorometan ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )			<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Dibromoklorometan ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )			<0,3	<0,3	<0,3	<0,3
Diklorometan ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )			<1	<1	<1	<1
Trikloronitrometan ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )			<1	<1	<1	<1
Kloroform ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )			<0,7	<0,7	<0,7	<0,7
Tetraklorometan ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )			<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
1,1-Dikloroetan ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )			<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
1,2-Dikloroetan ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )			<0,02	<0,02	<0,02	<0,02
1,1,1-Trikloroetan ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )			<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
1,1,2-Trikloroetan ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )			<0,02	<0,02	<0,02	<0,02
1,1,2,2-Tetrakloroetan ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )			<1	<1	<1	<1
1,1-Dikloroeten ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )			<0,3	<0,3	<0,3	<0,3
Cis-1,2-dikloroeten ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )			<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Trans-1,2-dikloroeten ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )			<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Trikloroeten ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )			<0,8	<0,8	<0,8	<0,8
Tetrakloroeten ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )			<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Heksaklorobutadien ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )			<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

## Priloga B: Metode, uporabljene pri fizikalno-kemijskih analizah

Vir: Zavod za zdravstveno ..., 2008

Parameter	Enota	Merilna metoda			Oprema
		Št. standarda	Ime metode in vir objave	Št. strani	
Homogenizacija vzorca		DIN 38402-30:1998	Nemške standardne metode za preiskavo vode, odpadne vode in usedlin- Splošne informacije (skupina A) – 30. del: predpriprava, homogenizacija in deljenje nehomogene vode (A30)	13 str.	Homogenizator odpadnih vod na terenu
Konzerviranje vzorca		SIST EN ISO 5667-3:2003	Water quality - Sampling - Part 3: Guidance on the preservation and handling of water samples Kakovost vode – Vzorčenje – 3. del: Vodila za konzerviranje in postopanje z vzorci vod	31 str.	
Vzorčenje podzemne vode (A)		SIST ISO 5667-11: 1996	Kakovost vode – Vzorčenje – 11.del: Vodila za vzorčenje podzemnih vod	10 str.	Črpalka Grundfos MP-1
Vzorčenje površinske vode in sedimenta		SIST ISO 5667-6:2005	Kakovost vode – Vzorčenje – 6.del: Vodila za vzorčenje rek in potokov	16 str.	
<b>Terenske meritve</b>					
Elektroprevodnost (25°C) (A)	µS/cm	SIST EN 27888:1998	Kakovost vode – Določevanje elektroprevodnosti (ISO 7888:1985)	6 str.	Merilec elektroprevodnosti – TESTO 252
Kisik raztopljeni (A)	mg/L O <sub>2</sub>	SIST EN 25813:1996	Kakovost vode – Določevanje raztopljenega kisika – jodometrična metoda (ISO 5813:1983)	5 str.	
Kisik raztopljeni (A)	mg/L O <sub>2</sub>	SIST EN 25814:1996	Kakovost vode – Določevanje raztopljenega kisika – elektrokemična metoda (ISO 5814:1990)	8 str.	Merilec raztopljenega kisika, SevenGo pro SG6
Kisik-nasičenost (A)	%	SIST EN 25813:1996	Kakovost vode – Določevanje raztopljenega kisika – jodometrična metoda (ISO 5813:1983)	5 str.	
Kisik-nasičenost (A)	%	SIST EN 25814:1996	Kakovost vode – Določevanje raztopljenega kisika – elektrokemična metoda (ISO 5814:1990)	8 str.	Merilec raztopljenega kisika, SevenGo pro SG6
Redoks potencial	mV	SIST DIN 38404-6:1984	Nemške standardne metode za preiskavo vode, odpadne vode in usedlin- Fizikalni in fizikalno kemijski parametri (skupina C) – Določanje oksidacijsko redukcijskega (redoks) potenciala (C6)	3 str.	Merilec pH, temperature in redoks potenciala – WTW 340i

se nadaljuje

nadaljevanje

Parameter	Enota	Merilna metoda			Oprema
		Št. standarda	Ime metode in vir objave	Št. strani	
Temperatura vode (A)	°C	SIST DIN 38404-C4-2:2000	Nemške standardne metode za preiskavo vode in usedlin-Fizikalni in fizikalno kemijski parametri (skupina C) – Določevanje temperature	12 str.	Merilec pH in temperature – WTW 340i
Temperatura zraka (A)	°C	SIST DIN 38404-C4-2:2000	Nemške standardne metode za preiskavo vode in usedlin-Fizikalni in fizikalno kemijski parametri (skupina C) – Določevanje temperature	12 str.	Merilec temperature – TESTO 110
Vitez		Laboratorijska metoda ŽM 0041			
pH (A)		SIST ISO 10523:1996	Kakovost vode – Določevanje pH	10 str.	Merilec pH in temperature – WTW 340i
<b>Osnovni parametri</b>					
Adsorbirani organsko vezani halogeni (AOX)	µg/L Cl	SIST EN ISO 9562:2005	Določevanje adsorbljivih organskih halogenov (AOX) (ISO 9562:2004)	21 str.	Aparat za določevanje AOX in EOX, H+B M 2000C
Amonij (A)	mg/L NH <sub>4</sub>	SIST ISO 7150-1:1996	Kakovost vode – Določevanje amonija – spektrofotometrična metoda	7 str.	Spektrofotometer Agilent 8453
Barva (A)	m <sup>-1</sup>	SIST EN ISO 7887:1996-Poglavlje 3	Kakovost vode – Preiskava in določevanje barve (ISO 7887:1994)	8 str.	Spektrofotometer Agilent 8453
Bor (A)	mg/L B	SIST EN ISO 17294-2:2005  SIST EN ISO 17294-2:2005 Modificiran (za Fe)	Kakovost vode – Uporaba induktivno sklopljene plazme z masno selektivnim detektorjem (ICP-MS) – 1. del: Splošna navodila (ISO 17294-1:2004)  Kakovost vode – Uporaba induktivno sklopljene plazme z masno selektivnim detektorjem (ICP-MS) – 2. del: Določevanje 26 elementov (ISO 17294-2:2003)	33 str. 21 str.	Aparat za določanje kovin ICP-MS, Agilent 7500a
Celotni organski ogljik (TOC) (A)	mg/L C	SIST EN 1484:1998	Analiza vode-navodilo za določevanje celokupnega organskega ogljika (TOC) in raztopljenega organskega ogljika (DOC)	14 str.	Aparat za določevanje TOC, DC 180 + nadgradnja

se nadaljuje

nadaljevanje

Parameter	Enota	Merilna metoda			Oprema
		Št. standarda	Ime metode in vir objave	Št. strani	
Fosfati-ortho (A)	mg/L PO <sub>4</sub>	SIST ISO 6878:2004-Točka 4	Spektrometrično določevanje ortofosforja in celokupnega fosforja po oksidaciji s peroksodisulfatom (ISO 6878:2004)	21 str.	Spektrofotometer Agilent 8453
Hidrogenkarbonati (A)	mg/L HCO <sub>3</sub>	SIST EN ISO 9963-1:1998	Določevanje alkalitete-1. del: Določevanje celotne in sestavljene alkalitete (ISO 9963-1:1994)	6 str.	
Kalcij (A)	mg/L Ca	SIST ISO 6058:1996	Določevanje kalcija-EDTA titračijska metoda	3 str.	
Kalcij (A)	mg/L Ca	SIST EN ISO 17294-1,2-modif.			Aparat za določanje kovin ICP-MS, Agilent 7500a
Kalij (A)	mg/L K	SIST EN ISO 17294-1,2-modif.			Aparat za določanje kovin ICP-MS, Agilent 7500a
Klorid (A)	mg/L Cl	SIST EN ISO 10304-1:1998	Kakovost vode – Določevanje raztopljenega fluorida, klorida, ortofosfata, bromida, nitrata in sulfata z ionsko kromatografijo – metoda za malo onesnažene vode (ISO 10304-1:1992)	15 str.	Ionski kromatograf, Metrohm 690
Magnezij (A)	mg/L Mg	SIST ISO 6059:1996	Določevanje kalcija in magnezija-EDTA titračijska metoda	4 str.	
Magnezij (A)	mg/L Mg	SIST EN ISO 17294-1,2-modif.			Aparat za določanje kovin ICP-MS, Agilent 7500a
Motnost (A)	NTU	SIST EN ISO 7027:2000- Poglavlje 6	Kakovost vode – Ugotavljanje motnosti (ISO 7027:1999)	10 str.	Turbidimeter, 2100 AN
Natrij (A)	mg/L Na	SIST EN ISO 17294-1,2-modif.			Aparat za določanje kovin ICP-MS, Agilent 7500a
Nitriti (A)	mg/L NO <sub>3</sub>	SIST EN ISO 10304-1			Ionski kromatograf, Metrohm 690
Sulfat (A)	mg/L SO <sub>4</sub>	SIST EN ISO 10304-1			Ionski kromatograf, Metrohm 690

se nadaljuje

nadaljevanje

Parameter	Enota	Merilna metoda			Oprema
		Št. standarda	Ime metode in vir objave	Št. strani	
Železo (A)	µg/L Fe	SIST EN ISO 17294-1,2-modif.			Aparat za določanje kovin ICP-MS, Agilent 7500a
<b>Indikativni parametri</b>					
Bromidi (A)	mg/L Br	SIST EN ISO 10304-1			Ionski kromatograf, Metrohm 690
Fluorid (A)	mg/L F	SIST EN ISO 10304-1			Ionski kromatograf, Metrohm 690
GC-MS posnetek		Laboratorijska metoda			Plinski kromatograf 6890N z masnim det. 5975
Nitriti (A)	mg/L NO <sub>2</sub>	SIST EN 26777:1996	Določevanje nitrita-molekularna absorpcijska spektrometrična metoda (ISO 6777:1984)	5 str.	Spektrofotometer Agilent 8453
Sulfid (A)	mg/L S	SIST ISO 10530:1996	Določanje raztopljenega sulfida-Fotometrijska metoda z uporabo metilen modrega	9 str.	Spektrofotometer HP 8452 A, diode array
<b>Kovine in nekovine</b>					
Aluminij (A)	µg/L Al	SIST EN ISO 17294-1,2-modif.			Aparat za določanje kovin ICP-MS, Agilent 7500a
Antimon (A)	µg/L Sb	SIST EN ISO 17294-1,2-modif.			Aparat za določanje kovin ICP-MS, Agilent 7500a
Arzen (A)	µg/L As	SIST EN ISO 17294-1,2-modif.			Aparat za določanje kovin ICP-MS, Agilent 7500a
Baker (A)	µg/L Cu	SIST EN ISO 17294-1,2-modif.			Aparat za določanje kovin ICP-MS, Agilent 7500a
Barij (A)	µg/L Ba	SIST EN ISO 17294-1,2-modif.			Aparat za določanje kovin ICP-MS, Agilent 7500a

se nadaljuje

nadaljevanje

Parameter	Enota	Merilna metoda			Oprema
		Št. standarda	Ime metode in vir objave	Št. strani	
Berilij (A)	µg/L Be	SIST EN ISO 17294-1,2-modif.			Aparat za določanje kovin ICP-MS, Agilent 7500a
Cink (A)	µg/L Zn	SIST EN ISO 17294-1,2-modif.			Aparat za določanje kovin ICP-MS, Agilent 7500a
Kadmij (A)	µg/L Cd	SIST EN ISO 17294-1,2-modif.			Aparat za določanje kovin ICP-MS, Agilent 7500a
Kobalt (A)	µg/L Co	SIST EN ISO 17294-1,2-modif.			Aparat za določanje kovin ICP-MS, Agilent 7500a
Kositer (A)	µg/L Sn	SIST EN ISO 17294-1,2-modif.			Aparat za določanje kovin ICP-MS, Agilent 7500a
Krom – skupno (A)	µg/L Cr	SIST EN ISO 17294-1,2-modif.			Aparat za določanje kovin ICP-MS, Agilent 7500a
Krom 6 <sup>+</sup> (A)	µg/L Cr	SIST ISO 11083:1996	Določevanje kroma (VI) – spektrometrična metoda z uporabo 1,5 - difenilkarbazida	5 str.	Spektrofotometer Agilent 8453
Mangan (A)	mg/L Mn	SIST EN ISO 17294-1,2-modif.			Aparat za določanje kovin ICP-MS, Agilent 7500a
Molibden (A)	µg/L Mo	SIST EN ISO 17294-1,2-modif.			Aparat za določanje kovin ICP-MS, Agilent 7500a
Nikelj (A)	µg/L Ni	SIST EN ISO 17294-1,2-modif.			Aparat za določanje kovin ICP-MS, Agilent 7500a

se nadaljuje

nadaljevanje

Parameter	Enota	Merilna metoda			Oprema
		Št. standarda	Ime metode in vir objave	Št. strani	
Selen (A)	µg/L Se	SIST EN ISO 17294-1,2-modif.			Aparat za določanje kovin ICP-MS, Agilent 7500a
Srebro (A)	µg/L Ag	SIST EN ISO 17294-1,2-modif.			Aparat za določanje kovin ICP-MS, Agilent 7500a
Svinec (A)	µg/L Pb	SIST EN ISO 17294-1,2-modif.			Aparat za določanje kovin ICP-MS, Agilent 7500a
Vanadij (A)	µg/L V	SIST EN ISO 17294-1,2-modif.			Aparat za določanje kovin ICP-MS, Agilent 7500a
Živo srebro (A)	µg/L Hg	SIST EN 1483-modif.:1998	Kakovost vode – Določevanje živega srebra z atomsko absorpcijsko spektroskopijo- hidridna tehnika - redukcija z natrijevim hidroboratom brez predhodnega koncentriranja	22 str.	Spektrometer za AA, AIM AA 6000, FIAS 400 in AS-72
<b>Fenolne snovi</b>					
2,4,6-Triklorofenol	µg/L	Laboratorijska metoda			Plinski kromatograf 6890N z masnim det. 5975
2,4-Diklorofenol	µg/L	Laboratorijska metoda			Plinski kromatograf 6890N z masnim det. 5975
2-Klorofenol	µg/L	Laboratorijska metoda			Plinski kromatograf 6890N z masnim det. 5975
4-Kloro-3-metilfenol	µg/L	Laboratorijska metoda			Plinski kromatograf 6890N z masnim det. 5975

se nadaljuje

nadaljevanje

Parameter	Enota	Merilna metoda			Oprema
		Št. standarda	Ime metode in vir objave	Št. strani	
Fenolne snovi skupno	µg/L	SIST ISO 6439:1996-Metoda B	Določevanje fenolnega indeksa – 4-aminoantipirin spektrometrična metoda po destilaciji	7 str.	Spektrofotometer Agilent 84535
Pentaklorofenol (PCP)	µg/L	Laboratorijska metoda			Plinski kromatograf 6890N z masnim det. 5975
<b>Organofosforni, triazinski in drugi pesticidi</b>					
Ametrin	µg/L	SIST EN ISO 10695:2000-Poglavlje 4	Kakovost vode – Določevanje izbranih organskih dušikovih in fosfornih spojin – Metoda plinske kromatografije (ISO 10695:2000)	23 str.	Plinski kromatograf 6890N z masnim det. 5975
<b>Organoklorni pesticidi</b>					
Aldrin (A)	µg/L	SIST EN ISO 6468:1998-modificiran	Kakovost vode – Določevanje nekaterih organoklornih insekticidov, polikloriranih bifenilov in klorobenzenov – Metoda plinske kromatografije po ekstrakciji tekoče-tekoče (ISO 6468:1996)	24 str.	Plinski kromatograf HP 6890 (ECD + TCD)
DDD (o,p) (A)	µg/L	SIST EN ISO 6468-modif.			Plinski kromatograf HP 6890 (ECD + TCD)
DDD (p,p) (A)	µg/L	SIST EN ISO 6468-modif.			Plinski kromatograf HP 6890 (ECD + TCD)
DDE (p,p) (A)	µg/L	SIST EN ISO 6468-modif.			Plinski kromatograf HP 6890 (ECD + TCD)
DDT (p,p) (A)	µg/L	SIST EN ISO 6468-modif.			Plinski kromatograf HP 6890 (ECD + TCD)
Dieldrin (A)	µg/L	SIST EN ISO 6468-modif.			Plinski kromatograf HP 6890 (ECD + TCD)
Endosulfan – alfa (A)	µg/L	SIST EN ISO 6468-modif.			Plinski kromatograf HP 6890 (ECD + TCD)
Endrin (A)	µg/L	SIST EN ISO 6468-modif.			Plinski kromatograf HP 6890 (ECD + TCD)
HCH-alfa (A)	µg/L	SIST EN ISO 6468-modif.			Plinski kromatograf HP 6890 (ECD + TCD)

se nadaljuje

nadaljevanje

Parameter	Enota	Merilna metoda			Oprema
		Št. standarda	Ime metode in vir objave	Št. strani	
HCH-beta (A)	µg/L	SIST EN ISO 6468-modif.			Plinski kromatograf HP 6890 (ECD + TCD)
HCH-delta (A)	µg/L	SIST EN ISO 6468-modif.			Plinski kromatograf HP 6890 (ECD + TCD)
Heksaklorobenz en (A)	µg/L	SIST EN ISO 6468-modif.			Plinski kromatograf HP 6890 (ECD + TCD)
Heptaklor (A)	µg/L	SIST EN ISO 6468-modif.			Plinski kromatograf HP 6890 (ECD + TCD)
Heptaklorepoks id	µg/L	SIST EN ISO 6468-modif.			Plinski kromatograf HP 6890 (ECD + TCD)
Izodrin	µg/L	SIST EN ISO 6468-modif.			Plinski kromatograf HP 6890 (ECD + TCD)
Klordan	µg/L	SIST EN ISO 6468-modif.			Plinski kromatograf HP 6890 (ECD + TCD)
Lindan (A)	µg/L	SIST EN ISO 6468-modif.			Plinski kromatograf HP 6890 (ECD + TCD)
<b>Policiklični aromatski ogljikovodiki</b>					
Acenaften	µg/L	ISO/DIS 7981-2:2005	Water quality; determination of six specified polynuclear hydrocarbons; part 2: high performance liquid chromatographic method	18 str.	Plinski kromatograf 6890N z masnim det. 5975
Acenaften (A)	µg/L	SIST EN ISO 17993:2004	Kakovost vode-Določevanje 16 policikličnih aromatskih ogljikovodikov (PAH) v vodi s tehniko HPLC s fluorescenčno detekcijo po ekstrakciji tekoče-tekoče (ISO17993:2002)	20 str.	Tekočinski kromatograf HPLC, Agilent 1100 (UV in fluoresc.det.)
Acenaftilen	µg/L	ISO/DIS 7981-2			Plinski kromatograf 6890N z masnim det. 5975

se nadaljuje

nadaljevanje

Parameter	Enota	Merilna metoda			Oprema
		Št. standarda	Ime metode in vir objave	Št. strani	
Acenaftilen (A)	µg/L	SIST EN ISO 17993			Tekočinski kromatograf HPLC, Agilent 1100 (UV in fluoresc.det.)
Antracen	µg/L	ISO/DIS 7981-2			Plinski kromatograf 6890N z masnim det. 5975
Antracen (A)	µg/L	SIST EN ISO 17993			Tekočinski kromatograf HPLC, Agilent 1100 (UV in fluoresc.det.)
Benzo(a)antracen	µg/L	ISO/DIS 7981-2			Plinski kromatograf 6890N z masnim det. 5975
Benzo(a)antracen (A)	µg/L	SIST EN ISO 17993			Tekočinski kromatograf HPLC, Agilent 1100 (UV in fluoresc.det.)
Benzo(a)piren	µg/L	ISO/DIS 7981-2			Plinski kromatograf 6890N z masnim det. 5975
Benzo(a)piren (A)	µg/L	SIST EN ISO 17993			Tekočinski kromatograf HPLC, Agilent 1100 (UV in fluoresc.det.)
Benzo(b)fluoranten	µg/L	ISO/DIS 7981-2			Plinski kromatograf 6890N z masnim det. 5975
Benzo(b)fluoranten (A)	µg/L	SIST EN ISO 17993			Tekočinski kromatograf HPLC, Agilent 1100 (UV in fluoresc.det.)
Benzo(ghi)perilen	µg/L	ISO/DIS 7981-2			Plinski kromatograf 6890N z masnim det. 5975

se nadaljuje

nadaljevanje

Parameter	Enota	Merilna metoda			Oprema
		Št. standarda	Ime metode in vir objave	Št. strani	
Benzo(ghi)peril en (A)	µg/L	SIST EN ISO 17993			Tekočinski kromatograf HPLC, Agilent 1100 (UV in fluoresc.det.)
Benzo(k)fluoranten	µg/L	ISO/DIS 7981-2			Plinski kromatograf 6890N z masnim det. 5975
Benzo(k)fluoranten (A)	µg/L	SIST EN ISO 17993			Tekočinski kromatograf HPLC, Agilent 1100 (UV in fluoresc.det.)
Dibenzo(a,h)antracen	µg/L	ISO/DIS 7981-2			Plinski kromatograf 6890N z masnim det. 5975
Dibenzo(a,h)antracen (A)	µg/L	SIST EN ISO 17993			Tekočinski kromatograf HPLC, Agilent 1100 (UV in fluoresc.det.)
Fenantren	µg/L	ISO/DIS 7981-2			Plinski kromatograf 6890N z masnim det. 5975
Fenantren (A)	µg/L	SIST EN ISO 17993			Tekočinski kromatograf HPLC, Agilent 1100 (UV in fluoresc.det.)
Fluoranten	µg/L	ISO/DIS 7981-2			Plinski kromatograf 6890N z masnim det. 5975
Fluoranten (A)	µg/L	SIST EN ISO 17993			Tekočinski kromatograf HPLC, Agilent 1100 (UV in fluoresc.det.)
Fluoren	µg/L	ISO/DIS 7981-2			Plinski kromatograf 6890N z masnim det. 5975

se nadaljuje

nadaljevanje

Parameter	Enota	Merilna metoda			Oprema
		Št. standarda	Ime metode in vir objave	Št. strani	
Fluoren (A)	µg/L	SIST EN ISO 17993			Tekočinski kromatograf HPLC, Agilent 1100 (UV in fluoresc.det.)
Indeno(1,2,3-c,d)piren	µg/L	ISO/DIS 7981-2			Plinski kromatograf 6890N z masnim det. 5975
Indeno(1,2,3-c,d)piren (A)	µg/L	SIST EN ISO 17993			Tekočinski kromatograf HPLC, Agilent 1100 (UV in fluoresc.det.)
Krizen	µg/L	ISO/DIS 7981-2			Plinski kromatograf 6890N z masnim det. 5975
Krizen (A)	µg/L	SIST EN ISO 17993			Tekočinski kromatograf HPLC, Agilent 1100 (UV in fluoresc.det.)
Naftalen	µg/L	ISO/DIS 7981-2			Plinski kromatograf 6890N z masnim det. 5975
Naftalen (A)	µg/L	SIST EN ISO 17993			Tekočinski kromatograf HPLC, Agilent 1100 (UV in fluoresc.det.)
PAO - vsota	µg/L	ISO/DIS 7981-2			Plinski kromatograf 6890N z masnim det. 5975
Piren	µg/L	ISO/DIS 7981-2			Plinski kromatograf 6890N z masnim det. 5975
Piren (A)	µg/L	SIST EN ISO 17993			Tekočinski kromatograf HPLC, Agilent 1100 (UV in fluoresc.det.)

se nadaljuje

nadaljevanje

Parameter	Enota	Merilna metoda			Oprema
		Št. standarda	Ime metode in vir objave	Št. strani	
<b>Poliklorirani bifenili</b>					
PCB-101 (2,2',4,5,5'-Pentaklorobifenil)	µg/L	SIST EN ISO 6468:1998 modificiran	Kakovost vode – Določevanje nekaterih organoklorornih insekticidov, polikloriranih bifenilov in klorobzenov – Metoda plinske kromatografije po ekstrakciji tekoče-tekoče	24 str.	Plinski kromatograf HP 6890 (ECD + TCD)
PCB-118 (2,3',4,4',5'-Pentaklorobifenil)	µg/L	SIST EN ISO 6468			Plinski kromatograf HP 6890 (ECD + TCD)
PCB-138 (2,2',3,4,4',5'-Heksaklorobifenil)	µg/L	SIST EN ISO 6468			Plinski kromatograf HP 6890 (ECD + TCD)
PCB-153 (2,2',4,4',5,5'-Heksaklorobifenil)	µg/L	SIST EN ISO 6468			Plinski kromatograf HP 6890 (ECD + TCD)
PCB-180 (2,2',3,4,4',5,5'-Heptaklorobifenil)	µg/L	SIST EN ISO 6468			Plinski kromatograf HP 6890 (ECD + TCD)
PCB-28 (2,4,4'-Triklorobifenil)	µg/L	SIST EN ISO 6468			Plinski kromatograf HP 6890 (ECD + TCD)
PCB-52 (2,2',5,5'-Tetraklorobifenil)	µg/L	SIST EN ISO 6468			Plinski kromatograf HP 6890 (ECD + TCD)

se nadaljuje

nadaljevanje

Parameter	Enota	Merilna metoda			Oprema
		Št. standarda	Ime metode in vir objave	Št. strani	
<b>Druge fosforjeve spojine</b>					
Tributilfosfat	µg/L	Laboratorijska metoda			Plinski kromatograf 6890N z masnim det. 5975
<b>Pesticidi</b>					
Alaklor (A)	µg/L	SIST EN ISO 10695:2004-Poglavlje 4	Kakovost vode – Določevanje izbranih organskih dušikovih in fosfornih spojin – Metoda plinske kromatografije (ISO 10695:2000)	23 str.	Plinski kromatograf 6890N z masnim det. 5975
Ametrin	µg/L	SIST EN ISO 10695-Poglavlje 4			Plinski kromatograf 6890N z masnim det. 5975
Atrazin (A)	µg/L	SIST EN ISO 10695-Poglavlje 4			Plinski kromatograf 6890N z masnim det. 5975
Bromacil	µg/L	SIST EN ISO 10695-Poglavlje 4			Plinski kromatograf 6890N z masnim det. 5975
Cianazin (A)	µg/L	SIST EN ISO 10695-Poglavlje 4			Plinski kromatograf 6890N z masnim det. 5975
Desetilatrazin (A)	µg/L	SIST EN ISO 10695-Poglavlje 4			Plinski kromatograf 6890N z masnim det. 5975
Desizopropilatrazin	µg/L	SIST EN ISO 10695-Poglavlje 4			Plinski kromatograf 6890N z masnim det. 5975

se nadaljuje

nadaljevanje

Parameter	Enota	Merilna metoda			Oprema
		Št. standarda	Ime metode in vir objave	Št. strani	
Metazaklor (A)	µg/L	SIST EN ISO 10695- Poglavlje 4			Plinski kromatograf 6890N z masnim det. 5975
Metolaklor (A)	µg/L	SIST EN ISO 10695- Poglavlje 4			Plinski kromatograf 6890N z masnim det. 5975
Pesticidi – vsota					
Prometrin	µg/L	SIST EN ISO 10695- Poglavlje 4			Plinski kromatograf 6890N z masnim det. 5975
Propazin (A)	µg/L	SIST EN ISO 10695- Poglavlje 4			Plinski kromatograf 6890N z masnim det. 5975
Sebutilazin (A)	µg/L	SIST EN ISO 10695- Poglavlje 4			Plinski kromatograf 6890N z masnim det. 5975
Simazin (A)	µg/L	SIST EN ISO 10695- Poglavlje 4			Plinski kromatograf 6890N z masnim det. 5975
Simetrin	µg/L	SIST EN ISO 10695- Poglavlje 4			Plinski kromatograf 6890N z masnim det. 5975
Terbutilazin (A)	µg/L	SIST EN ISO 10695- Poglavlje 4			Plinski kromatograf 6890N z masnim det. 5975

se nadaljuje

nadaljevanje

Parameter	Enota	Merilna metoda			Oprema
		Št. standarda	Ime metode in vir objave	Št. strani	
Terbutrin	µg/L	SIST EN ISO 10695-Poglavlje 4			Plinski kromatograf 6890N z masnim det. 5975
<b>Alifatski halogenirani ogljikovodiki</b>					
1,1,1-Trikloroetan (A)	µg/L	SIST EN ISO 15680:2004	Kakovost vode – Določevanje monocikličnih ogljikovodikov, naftalena in posameznih kloriranih spojin s plinsko kromatografijo z uporabo tehnike »purge-and-trap« in toplotno desorpcijo (ISO 15680:2003)	33 str.	Plinski kromatograf HP 5890(II) z masnim det. HP 5971A
1,1,2,2-Tetrakloroetan	µg/L	SIST EN ISO 15680			Plinski kromatograf HP 5890(II) z masnim det. HP 5971A
1,1,2-Trikloroetan	µg/L	SIST EN ISO 15680			Plinski kromatograf HP 5890(II) z masnim det. HP 5971A
1,1-Dikloroetan (A)	µg/L	SIST EN ISO 15680			Plinski kromatograf HP 5890(II) z masnim det. HP 5971A
1,1-Dikloroeten (A)	µg/L	SIST EN ISO 15680			Plinski kromatograf HP 5890(II) z masnim det. HP 5971A
1,2-Dikloroetan (A)	µg/L	SIST EN ISO 15680			Plinski kromatograf HP 5890(II) z masnim det. HP 5971A
Bromodiklorometan (A)	µg/L	SIST EN ISO 10301:1998-Poglavlje 3	Določevanje lahkohlapnih halogeniranih ogljikovodikov (ISO 10301:1997)	42 str.	Plinski kromatograf HP 5890 (ECD in FID)

se nadaljuje

nadaljevanje

Parameter	Enota	Merilna metoda			Oprema
		Št. standarda	Ime metode in vir objave	Št. strani	
Bromoform (A)	µg/L	SIST EN ISO 10301- Poglavlje 3			Plinski kromatograf HP 5890 (ECD in FID)
Cis-1,2-dikloroeten (A)	µg/L	SIST EN ISO 15680			Plinski kromatograf HP 5890(II) z masnim det. HP 5971A
Dibromoklorometan (A)	µg/L	SIST EN ISO 10301- Poglavlje 3			Plinski kromatograf HP 5890 (ECD in FID)
Diklorometan	µg/L	SIST EN ISO 10301- Poglavlje 3			Plinski kromatograf HP 5890 (ECD in FID)
Heksaklorobutadien (A)	µg/L	SIST EN ISO 6468-modif.			Plinski kromatograf HP 6890 (ECD + TCD)
Kloroform (A)	µg/L	SIST EN ISO 10301- Poglavlje 3			Plinski kromatograf HP 5890 (ECD in FID)
Tetrakloroeten (A)	µg/L	SIST EN ISO 10301- Poglavlje 3			Plinski kromatograf HP 5890 (ECD in FID)
Tetraklorometan (A)	µg/L	SIST EN ISO 10301- Poglavlje 3			Plinski kromatograf HP 5890 (ECD in FID)
Trans-1,2-dikloroeten (A)	µg/L	SIST EN ISO 10301- Poglavlje 3			Plinski kromatograf HP 5890 (ECD in FID)
Trikloroeten (A)	µg/L	SIST EN ISO 10301- Poglavlje 3			Plinski kromatograf HP 5890 (ECD in FID)
Trikloronitrometan (A)	µg/L	SIST EN ISO 10301- Poglavlje 3			Plinski kromatograf HP 5890 (ECD in FID)
<b>Aromatski ogljikovodiki</b>					
Benzen (A)	µg/L	SIST EN ISO 15680:2004	Kakovost vode – Določevanje monocikličnih ogljikovodikov, naftalena in posameznih kloriranih spojin s plinsko kromatografijo z uporabo tehnike »purge-and-trap« in toplotno desorpcijo (ISO 15680:2003)	33 str.	Plinski kromatograf HP 5890 (II) z masnim det. HP 5971A

se nadaljuje

nadaljevanje

Parameter	Enota	Merilna metoda			Oprema
		Št. standarda	Ime metode in vir objave	Št. strani	
Etilbenzen (A)	µg/L	SIST EN ISO 15680			Plinski kromatograf HP 5890 (II) z masnim det. HP 5971A
Ksilen (A)	µg/L	SIST EN ISO 15680			Plinski kromatograf HP 5890 (II) z masnim det. HP 5971A
Mezitilen (A)	µg/L	SIST EN ISO 15680			Plinski kromatograf HP 5890 (II) z masnim det. HP 5971A
Toluen (A)	µg/L	SIST EN ISO 15680			Plinski kromatograf HP 5890 (II) z masnim det. HP 5971A
<b>Organske kositrove spojine</b>					
Dibutil kositrove spojine	µg/L	SIST EN ISO 17353:2005	Kakovost vode – Določevanje izbranih organokositrovih spojin – Plinska kromatografija (ISO 17353:2004)	31 str.	Plinski kromatograf 6890 z masnim det. HP 5973
Tetrabutil kositer	µg/L	SIST EN ISO 17353			Plinski kromatograf 6890 z masnim det. HP 5973
Tributil kositrove spojine	µg/L	SIST EN ISO 17353			Plinski kromatograf 6890 z masnim det. HP 5973
Trifenil kositrove spojine	µg/L	SIST EN ISO 17353			Plinski kromatograf 6890 z masnim det. HP 5973
<b>Mineralna olja</b>					
Mineralna olja	µg/L	SIST EN ISO 9377-2:2001	Kakovost vode – Določevanje indeksa mineralnih olj – 2.del: Metoda z uporabo ekstrakcije s topilom in plinske kromatografije (ISO 9377-2:2000)	19 str.	Plinski kromatograf 6890N z masnim det. 5975