

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Irena KAVČIČ

**UGOTAVLJANJE GENOTOKSIČNOSTI JEZERSKIH VODA V
ŠALEŠKI DOLINI S TESTOM AMES IN TOKSIČNOSTI S TESTOM
PROTOX^R**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**DETECTING GENOTOXICITY OF LAKE WATER SAMPLES FROM
ŠALEK VALLEY BY AMES TEST AND TOXICITY BY PROTOX^R**

GRADUATION THESIS

University Studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Delo je bilo opravljeno na Katedri za mikrobiologijo in mikrobnno biotehnologijo, Oddelka za zootehniko, Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Romano Marinšek Logar, za recenzentko pa prof. dr. Ines Mandić-Mulec.

Mentorica: prof. dr. Romana Marinšek Logar

Recenzentka: prof. dr. Ines Mandić-Mulec

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. David STOPAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

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

Član: prof. dr. Ines MANDIĆ-MULEC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Irena KAVČIČ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 504.4.064 (285.2) + 615.9: 579.25/.26 (043) = 863
KG varstvo okolja/jezerske vode/toksičnost/genotoksičnost/test Protox^R/*Tetrahymena thermophila*/ test Ames/*Salmonella typhimurium*
AV KAVČIČ, Irena
SA MARINŠEK LOGAR, Romana (mentor)/ MANDIČ-MULEC, Ines (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2007
IN **UGOTAVLJANJE GENOTOKSIČNOSTI JEZERSKIH VODA V ŠALEŠKI DOLINI S TESTOM AMES IN TOKSIČNOSTI S TESTOM PROTOX^R**
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP X, 42 str., 13 pregl., 5 sl., 92 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Med osnovnimi ukrepi za zagotavljanje varovanja okolja je tudi redno spremljanje kvalitete voda. Zakonsko določena praksa ugotavlja kvaliteto vode predvsem s fizikalno-kemijskimi analizami. Fizikalno-kemijske analize so omejene s spodnjo mejo detekcije, z njimi ne moremo ugotoviti biološkega učinka, medsebojnega vpliva posameznih sestavin v vzorcu in bioaktivacije. Za celovitejšo oceno stanja okolja in stopnjo ogroženosti zdravja ljudi moramo v monitoring vključiti biološke teste za ugotavljanje toksičnosti in genotoksičnosti. V tej raziskavi smo vrednotili toksičnost in genotoksičnost vzorcev jezerskih vod iz Šaleške doline. Uporabili smo komercialni testni kit za ugotavljanje toksičnosti Protoxkit FTM z migetalkarjem *Tetrahymena thermophila*, genotoksičnost pa smo ugotavljali s testom Ames, ki smo ga izvedli z in brez aktivacije ob uporabi različnih sevov bakterije *Salmonella typhimurium*. V nobenem primeru nismo dokazali toksičnosti in genotoksičnosti. Primerjava rezultatov z rezultati drugih testov za toksičnost in genotoksičnost v sklopu širše raziskave, katere del je ta naloga, kaže, da izbrana testna sistema nista dovolj občutljiva za ugotavljanje toksičnosti in genotoksičnosti jezerskih vod. Toksičnost in genotoksičnost vzorcev bi bilo možno bolj zanesljivo oceniti z večjim naborom biotestov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 504.4.064 (285.2) + 615.9: 579.25/.26 (043) = 863
CX environmental protection/lake water samples/toxicity/genotoxicity/ Protox^R test/
Tetrahymena thermophila/ Ames test/*Salmonella typhimurium*
AU KAVČIČ, Irena
AA MARINŠEK LOGAR, Romana (supervisor)/ MANDIĆ-MULEC, Ines (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in
Microbiology
PY 2007
TI **DETECTING GENOTOXICITY OF LAKE WATER SAMPLES FROM
ŠALEK VALLEY BY AMES TEST AND TOXICITY BY PROTOX^R**
DT Graduation Thesis (University studies)
NO X, 42 p., 13 tab., 5 fig., 92 ref.
LA sl
AL sl/en
AB One of the basic steps in assuring environmental protection is regular monitoring
of the quality of water. Legislation regarding lake water monitoring is mainly
based on physico-chemical analyses. Physico-chemical analyses indicate only the
concentration of contaminants within their detection limits. They do not provide
information about biological effects, interactions between sample components and
bioactivation. We need to apply toxicity and genotoxicity biotests in the regular
monitoring of the environment to provide more integrated evaluation of the actual
state of environment and environmental risk to humans. In this thesis toxicity and
genotoxicity of lake water samples from Šalek valley was evaluated. A
commercial toxicity screening test Protoxkit FTM was used, which includes a
ciliate *Tetrahymena thermophila* and genotoxicity determination test, Ames test,
performed with and without metabolic activation using different *Salmonella*
typhimurium strains. In neither case significant toxic or genotoxic responses in
lake water samples have been proved. This study was a part of a broader research.
The comparison of toxicity and genotoxicity tests results and results of the study in
question implies that chosen test systems are not sensitive enough for
determination of toxicity and genotoxicity in lake water samples. A battery of tests
is needed to give more reliable evaluation of toxic and genotoxic potential for
given samples.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	II
Key Words Documentation (KWD)	III
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Kazalopreglednic	IX
Okrajšave in simboli	IX
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 HIPOTEZA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ONASNAŽEVANJE VODA	3
2.2 ŠALEŠKA JEZERA	3
2.3 BIOMONITORING	4
2.3.1 Biomonitoring jezer v Sloveniji	4
2.4 EKOTOKSIKOLOGIJA	5
2.4.1 Biotesti za ugotavljanje toksičnosti in genotoksičnosti	5
2.4.2 Toksičnost	6
2.4.2.1 Protoxkit F TM	7
2.4.3 Genotoksičnost	8
2.4.3.1 Mutageneza in biotesti za dokazovanje mutageneze	9
2.4.3.2 Bioaktivacija	9
2.4.3.3 Test Ames	10
2.4.3.4 Biološka ustreznost testov za genotoksičnost	11
2.4.4 Prihodnost v ekotoksikologiji	11
3 MATERIALI IN METODE	13
3.1 ODVZEM VZORCEV JEZERSKE VODE	13
3.2 TESTIRANJE TOKSIČNOSTI S PROTOXKIT F TM	13
3.2.1 Priprava redčitvene vrste vzorcev jezerskih vod	13
3.2.2 Priprava inokuluma <i>Tetrahymena thermophila</i>	13
3.2.3 Priprava substrata	14
3.2.4 Inokulacija epruvel	14
3.2.5 Merjenje optične gostote	14
3.2.6 Ugotavljanje stopnje inhibicije rasti	15
3.2.7 Referenčni test toksičnosti s K₂Cr₂O₇	15
3.2.8 Analiza rezultatov	15
3.3 TEST AMES	15
3.3.1 Priprava gojišč in raztopin	16

3.2.2	Kultura bakterije <i>Salmonella typhimurium</i>	18
3.3.3	Testiranje genotipov	19
3.3.4	Pozitivne kontrole za test Ames	20
3.3.5	Izvedba testa	21
3.3.6	Analiza rezultatov	21
4	REZULTATI	23
4.1	REZULTATI TESTA PROTOXKIT F TM	23
4.2	REZULTATI TESTA AMES	26
5	RAZPRAVA	29
6	POVZETEK	33
7	VIRI	34
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str
Preglednica 1: Redčitvena vrsta vzorca (Protoxkit F TM ..., 2006)	13
Preglednica 2: Gojišče po Vogel-Bonnerju (50X) za 500 ml (Test mutegenosti <i>Salmonella typhimurium</i> ...,2003)	16
Preglednica 3: 40 % raztopina glukoze (Test mutegenosti <i>Salmonella typhimurium</i> ...,2003)	16
Preglednica 4: 0,5 mM raztopina histidin/biotin (Test mutegenosti <i>Salmonella typhimurium</i> ...,2003)	16
Preglednica 5: Ampicilin (Test mutegenosti <i>Salmonella typhimurium</i> ...,2003)	16
Preglednica 6: Naslojeni agar (Test mutagenosti <i>Salmonella typhimurium</i> ...,2003)	17
Preglednica 7: Hranilni bujon za gojenje <i>S. typhimurium</i> (Test mutagenosti <i>Salmonella typhimurium</i> ...,2003)	17
Preglednica 8: Trdna gojišča za test Ames (Test mutagenosti <i>Salmonella typhimurium</i> ..., 2003)	17
Preglednica 9: Mikrosomalna mešanica S9 (Test mutagenosti <i>Salmonella typhimurium</i> ...,2003)	18
Preglednica 10: Pregled genotipov uporabljenih sevov <i>S. Typhimurium</i> (Test mutagenosti <i>Salmonella typhimurium</i> ...,2003)	19
Preglednica 11 : Pozitivne kontrole, ki smo jih uporabili pri izvedbi testa Ames	20
Preglednica 12: Rezultati ProtoxkitF TM testa štirih vzorcev jezerskih vod pri drugi ponovitvi biotesta (36 urna inkubacija) Prikaz meritev optične gostote (OD), izračunanih vrednosti %inhibicije in EC50	25
Preglednica 13: Rezultati testa Ames štirih vzorcev jezerskih vod (Vj1-Vj4) testiranih s TA 100, TA 98 in TA 97a sevi <i>S. typhimurium</i> , podani kot povprečno število revertant, standardni odklon in faktor indukcije (frekvenca mutacij) z aktivacijo (+S9) in brez aktivacije (-S9)	

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Preverjanje <i>rfa</i> mutacije s kristal vijoločnim barvilom	20
Slika 2: Primerjava odstotkov inhibicije rasti testnega organizma <i>Tetrahymena thermophila</i> ob ustreznih razredčinah kalijevega bikromata po 48 urni in 36 urni inkubaciji.	24
Slika 3: Grafični prikaz inhibicije rasti testnega organizma <i>Tetrahymena thermophila</i> za redčitveno vrsto vsakega od vzorcev jezerskih vod Vj1 do Vj4	26
Slika 4: Grafični prikaz vseh vzorcev jezerskih vod Vj1-Vj4, testiranih s TA 100, TA 98 in TA 97a sevi <i>S. typhimurium</i>	28
Slika 5: Primerjava pozitivne (1 µg MMS na ploščo) in negativne kontrole pri testu Ames za sev TA100	28

KAZALO PRILOG

Priloga A: Fizikalno-kemijske analize vzorcev jezerske vode (Mazej, 2006)

Priloga B: Rezultati referenčnega testa pri prvi ponovitvi biotesta Protoxkit FTM
(48 urna inkubacija)

Priloga C: Rezultati referenčnega testa pri drugi ponovitvi biotesta Protoxkit FTM
(36 urna inkubacija)

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

2-AF	2-aminofluoren (ang.: 2-aminofluorene)
ARSO	Agencija RS za okolje
Bio	Biotin
dH ₂ O	destilirana voda
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoxyribonucleic acid (deoksiribonukleinska kislina)
EC _i	effective concentration (efektivna koncentracija)
ERICo	Inštitut za ekološke raziskave, Velenje
His	histidin
LC _i	lethal concentration (letalna koncentracija)
MGA	minimalni glukozni agar
MMS	metil metan sulfonat
NQNO	4-nitrokinolin-N-oksidi
OD	optična gostota
PBS	kalij-natrijev fosfatni pufer
<i>S.typhimurium</i>	bakterijska vrsta <i>Salmonella typhimurium</i>
S9	mikrosomalna mešanica iz podganjih jeter
TA 97a, TA98, TA100	v testu Ames uporabljeni sevi <i>Salmonella typhimurium</i>
TEŠ	Termoelektrarna Šoštanj
<i>T. thermophila</i>	<i>Tetrahymena thermophila</i>

1 UVOD

Voda je naravna dobrina, ki je pogoj za življenje na Zemlji. Voda v naravi nenehno kroži, z izhlapevanjem prehaja v ozračje in se s padavinami vrača na zemeljsko površje. Čista voda in zdravo okolje je gotovo želja vseh nas. Pa vendar človek s svojimi aktivnostmi močno prispeva k onesnaženju. Neurejeni izpusti odpadnih vod iz industrije in gospodinjstev, onesnaževanje zaradi vedno več avtomobilov in tovornega prometa ter intenzivna kmetijska pridelava močno vplivajo na kakovost površinskih vod.

Zaradi emisij nevarnih snovi v vode je prišlo do poslabšanja kakovosti vodnih virov. Med osnovnimi ukrepi za zagotavljanje varovanja vodnega okolja je tudi ustrezno spremljanje (monitoring) kakovosti voda. Pomemben vidik kontrole varovanja okolja je laboratorijsko testiranje vzorcev vode.

Kvaliteto vode merimo s fizikalno-kemijskimi analizami in z ekotoksikološkimi testi. Prve imajo značaj kvantitativnih meritev posameznih parametrov. Ocena kvalitete temelji na primerjavi rezultatov meritev in predpisanih mejnih vrednosti za posamezen parameter. Fizikalno-kemijske analize so učinkovite le za spremljanje omejenega nabora parametrov in kemijskih snovi ter so pogosto omejene s spodnjo mejo občutljivosti. S temi analizami ne moremo zaznati biološkega učinka, interakcij med posameznimi snovmi v vzorcu in bioaktivacije. Ekotoksikološki testi oziroma biotesti pa dajejo neposreden odgovor testiranih živih organizmov oziroma celic na toksične in/ali genotoksične snovi v testiranem vzorcu. Biološke učinke (geno)toksičnih snovi v vzorcih lahko ugotavljamo z biološkimi testi za toksičnost in genotoksičnost. Tako dobimo celovit odgovor na to, kako vzorec vpliva na organizem, in izmerimo intenzivnost njegovega odgovora.

Površinske vode, ki vsebujejo mnogo neznanih spojin, lahko uporabljamo kot vir pitne vode, v kmetijstvu, proizvodnji hrane in v rekreacijske namene. Posledično lahko onesnažene vode predstavljajo velik problem za vodni ekosistem in zdravje človeka. Dokazovanje toksičnosti in genotoksičnosti v različnih okoljskih vzorcih je tako izrednega pomena tudi za zdravje človeka.

1.1 NAMEN DELA

V sklopu diplomske naloge smo z biotesti testirali jezerske vode iz jezer na območju Šaleške doline. To so Škalsko, Velenjsko in Družmirsko jezero, ugrezninska jezera, ki so nastala zaradi podzemnega izkoriščanja premoga. Zaradi premogovništva in elektroenergetike je bila Šaleška dolina v preteklem desetletju podvržena veliki degradaciji okolja.

Od osemdesetih let poteka intenzivna okoljska sanacija Šaleške doline, kar zahteva tudi oceno stopnje tveganja na ravni toksičnosti in genotoksičnosti za ekosisteme in oceno tveganja v smislu toksičnosti in genotoksičnosti okolja za ljudi. V diplomski nalogi smo z biotesti testirali vzorce jezerske vode iz Šaleške doline. Izbrali smo komercialno dostopen test toksičnosti Protoxkit FTM z migetalkarjem *Tetrahymena thermophila* in test genotoksičnosti z bakterijo *Salmonella typhimurium* oziroma test Ames.

To diplomsko delo je bilo opravljeno v sklopu projekta L4-6222: Biološki testi za ugotavljanje toksičnosti in genotoksičnosti vode, zemlje in hrane. V tem projektu so bili preizkušeni številni testi za dokazovanje toksičnosti in genotoksičnosti vzorcev vode in zemlje, za biotestiranje so bili uporabljeni različni organizmi na različnih trofičnih nivojih. Namen tega diplomskega dela je bil preizkusiti ustreznost dveh testov za toksičnost in genotoksičnost, v katerih uporabljamo mikroorganizme oziroma ugotoviti, če imajo vzorci iz jezer Šaleške doline (geno)toksičen vpliv na izbrane testne organizme.

1.2 HIPOTEZA

Predvidevali smo, da bomo v vzorcih jezerskih vod z izbranimi biotesti lahko zanesljivo dokazali odsotnost oziroma prisotnost toksičnosti in genotoksičnosti.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ONESNAŽEVANJE VODA

Voda je nenadomestljiv medij, ki omogoča življenje rastlinam, živalim in ljudem (Atlas in Bartha, 1998; Wolska in sod., 2007). Kvaliteta življenja ljudi je direktno in indirektno odvisna od čistosti okolja okrog nas (Békaert in sod., 1999; Jha, 2004). Površinske vode kot so reke in jezera uporabljamo kot vire hrane in pitne vode (Vargas in sod., 1993) in imajo pomembno vlogo za kmetijstvo, industrijo, pridobivanje energije, transport (Wolska in sod., 2007), gospodinjstvo (White in Rasmussen, 1998), rekreacijo in verske obrede (Park s sod., 2000; Ohe in sod., 2004).

Človeška aktivnost lahko negativno vpliva na površinske in podtalne vode (Wolska in sod., 2007). Reke, jezera in morja prejmejo velike količine odpadnih vod iz industrijskih, agrikulturnih in gospodinjstvih virov (Ohe in sod., 2003; Ohe in sod., 2004; Lah in sod., 2005a). K onesnaženju površinskih vodnih virov nekaj prispeva tudi padavinska voda, ki vstopa v rečne in jezerske sisteme (Cardozo in sod., 2006; Pereira in sod., 2007).

Proizvodnja in odlaganje antropogenih kemičnih spojin in odpadkov narašča kot posledica rasti človeške populacije in industrijskega razvoja (Jha, 2004). Težava onesnaženih tal je zaradi lateralnih in vertikalnih prenosov onesnaževal resen problem s posledicami ne samo za kopenske, temveč tudi za vodne združbe (Bekaert in sod., 1999). Dejstvo, da je vodno okolje pogosto končni prejemnik naraščajočega števila antropogenih onesnaževal, katerih velik delež so toksične in/ali genotoksične snovi (Jha, 2004), vodi v naraščajočo skrb o potencialnih direktnih in indirektnih učinkih teh snovi na zdravje človeka (Nicolau in sod., 2001), zato si stroka in znanost prizadevata pri oblikovanju novih metod in načinov za odkrivanje virov onesnaževanja in njihovih učinkov (Lah, 2006).

2.2 ŠALEŠKA JEZERA

Šaleška dolina je ena bolj onesnaženih pokrajin v Sloveniji. Nahaja se v severnem delu Slovenije, med Kamniško-Savinjskimi Alpami in Karavankami (Kotnik, 2002). V dnu doline leži zelo debela lignitna plast, ki je najpomembnejša za njeno popolno preoblikovanje (Šterbenk, 1999). V osrednjem delu doline leži mesto Velenje z največjim premogovnikom v Sloveniji. Drugo največje mesto v dolini je Šoštanj poznan po termoelektrarni, ki proizvaja kar 30% slovenske električne energije (Kotnik, 2002). Dno predalpske Šaleške doline se je med stodvajsetletnim premogovništvom pogreznilo za več kot 100 milijonov m³. Najgloblje dele ugreznin je zalila voda. Nastala so Škalsko, Velenjsko in Družmirsko jezero (Šterbenk, 1999).

Poleg premogovništva in elektroenergetike, se je v Velenju razvila kovinsko-predelovalna industrija, poleg nje pa se pojavljajo tudi druga podjetja ter uslužnostne, upravne, šolske, kulturne in druge dejavnosti. Na dolinskem dnu tradicionalno ostaja tudi kmetijstvo. Zaradi velike koncentracije človeške dejavnosti, so se v Šaleški dolini nakopičili okoljski problemi (Šterbenk, 1999). Največje poškodbe je utrpelo prav vodno okolje. Pepel iz

termoelektrarne so odlagali v Velenjsko jezero. Močno alkalna transportna voda je tekla v jezero in ga onesnaževala (Šterbenk, 2004). Zaradi tega je bil pH Velenjskega jezera tako visok (12), da v njem ni bilo živih organizmov (Šterbenk in Ramšak, 1999).

V Šaleški dolini so bili v preteklih 15 letih storjeni pomembni koraki k izboljšanju stanja naravnega okolja (Šalej, 2002). Leta 1994 so zgradili zaprti sistem odpepeljevanja. Onesnažena voda sedaj kroži skoraj brez negativnih vplivov na jezero in druge vode v Šaleški dolini. Po prenehanju onesnaževanja so se hitro naselili živi organizmi, predvsem plankton in alge (Šterbenk in Ramšak, 1999). Ob Velenjskem in Škalskem jezeru je že nastalo rekreacijsko središče. Izboljšana voda je postala primerna za kopanje. Osnovni pogoj za razvoj rekreacije ob jezeru in v njem je njegova čistost. Obremenjevanje jezera in njegovih bregov ne sme presegati samočistilnih sposobnosti občutljivega jezerskega ekotopa (Šterbenk in Ramšak, 1999).

2.3 BIOMONITORING

Biomonitoring je definiran kot redna, sistematična raba živih organizmov za oceno sprememb v okolju in v kvaliteti vode. Koncept biološkega indikatorja je ključen v biomonitoringu. Indikatorske vrste so lahko občutljivi organizmi na samem mestu onesnaženja, rezidenčne indigene vrste, ki bi lahko pokazale odgovore na okoljske spremembe, vrste katerih prisotnost nakazuje onesnaženje ali organizmi, ki v svojih tkivih akumulirajo merljive količine kemičnih spojin (Mitchell in sod., 2002).

2.3.1 Biomonitoring jezer v Sloveniji

Podobno kot v večini evropskih držav, tudi v Sloveniji uvajamo celovito upravljanje z vodnimi viri. Prednostna naloga je odpravljanje škodljivih vplivov na vode. Agencija RS za okolje na področju kakovosti voda pripravlja programe za izvajanje monitoringa kakovosti voda (Ministrstvo za okolje in prostor...,2000).

Jezeri so zaradi stoječe vode bolj občutljiva za vnos različnih snovi iz prispevnih površin, kot tekoče površinske vode. Državni monitoring kakovosti jezer je del državnega imisijskega monitoringa površinskih voda. Izvajanje monitoringa poteka ob sodelovanju treh inštitucij: Agencije Republike Slovenije za okolje, Nacionalnega inštituta za biologijo, Ljubljana in Zavoda za zdravstveno varstvo, Maribor (Poročilo o kakovosti jezer...,2006).

V letu 2007 se monitoring prvič izvaja v skladu z aneksom Vodne direktive 2000/60/EC (Directive 2000/60/EC...,2000; Program spremljanja ekološkega in kemijskega stanja jezer ..., 2007), ki prinaša bistvene spremembe prav na področje ocenjevanja stanja vodnih teles. Vključuje oceno ekološkega stanja, ki daje zlasti biološkim analizam večji pomen (Poročilo o kakovosti jezer ...,2006). V program spremljanja stanja jezer je vključeno tudi Velenjsko jezero. Poleg splošnih fizikalno-kemijskih parametrov se v vzorcih vode iz Velenjskega jezera določa tudi onesnaževala, za katera je bilo ugotovljeno povečano odvajanje v okolje (Program spremljanja ekološkega in kemijskega stanja jezer ..., 2007).

Merila za ugotavljanje kemijskega stanja vodnih teles določa uredba o kemijskem stanju površinskih voda. Kemijsko stanje površinske vode določajo na podlagi izračuna letne

povprečne vrednosti parametrov, za katere je v Uredbi določena mejna vrednost. Vodno telo površinske vode ima dobro kemijsko stanje, če na merilnem mestu nobena povprečna vrednost parametrov ni večja od mejne vrednosti, ki je za ta parameter določena v uredbi in če časovna vrsta letnih povprečnih vrednosti nobenega od parametrov prednostnega seznama nevarnih snovi, za katere se ugotavlja vsebnost v sedimentih, nima trenda naraščanja v obdobju zadnjih petih let (Poročilo o kakovosti jezer ...,2006; Program spremljanja ekološkega in kemijskega stanja jezer ..., 2007).

2.4 EKOTOKSIKOLOGIJA

Ekotoksikologija ali toksikologija okolja je veda, ki se ukvarja s toksičnimi učinki fizikalnih in/ali kemijskih vplivov na okolje, v katerem prebivamo. Proučuje interakcije med snovmi prisotnimi v ekosistemu in vpliv teh snovi na živo naravo. Ekotoksikologija je interdisciplinarna veda, ki vključuje kemijsko- fizikalne, molekularne, toksikološke, fiziološke in ekološke analize (Fent, 2004). Usmerjenost ekotoksikologije je predvsem v smislu razumevanja dejanske toksičnosti nekega okolja na živo naravo ekosistema (Fent, 2003).

2.4.1 Biotesti za ugotavljanje toksičnosti in genotoksičnosti

Do nedavnega so pri oceni okoljskega tveganja uporabljali običajne kemijske in fizikalno-kemijske metode (Wolska in sod., 2007). Fizikalno-kemijske metode za ugotavljanje onesnaževal so drage, kompleksne in dolgotrajne (Fernandez in sod., 1995). Spremljajo jih številne težave kot so zaznavanje samo znanih spojin, identifikacija kemikalij v vzorcu ne da bi pri tem poznali njihov biološki učinek, nezmožnost zaznavanja zelo nizkih koncentracij določenih kemičnih spojin (Filipič, 1995; Lah in sod., 2005a). Poleg tega ne upoštevajo interakcij, ki se lahko pojavijo med različnimi sestavinami v vzorcu (Fernandez in sod., 1995).

Interakcije med posameznimi sestavinami v vzorcu lahko povzročijo:

- aditivizem oziroma povečan učinek spojin,
- sinergizem oziroma povečan učinek, ki je večji kot bi pričakovali s preprostim seštevanjem učinkov posameznih spojin
- antagonizem oziroma slabljenje učinkov spojin zaradi interakcij med spojinami (Fernandez in sod., 1995; Békaert in sod. 2002; Wolska in sod., 2007).

Toksično in genotoksično delovanje je dejansko posledica aditivizma, sinergizma, antagonizma in bioaktivacije, kar lahko direktno pokažemo samo z biotesti (Josephy in sod.,1997; Helma in sod., 1998; Lah in sod., 2005c). Biotesti nudijo celotno oceno toksičnega potenciala določenega okoljskega vzorca, katerega sestava je neznana in so idealni komplement tradicionalnim analitskim tehnikam (Fernandez in sod., 1995). Kemične meritve niso zadovoljive za oceno okoljskih tveganj in tveganj za zdravje človeka. Te meritve niso prave meritve (geno)toksičnih učinkov, ker je (geno)toksičnost biološki odgovor. To je pomembno predvsem, kadar merjena onesnaževala ne presegajo

maksimalnih dovoljenih koncentracij določenih s kemičnimi analizami, vendar pa lahko omenjene interakcije med onesnaževali igrajo pomembno vlogo pri povzročanju (geno)toksičnih učinkov na živa bitja. Šele z vključitvijo bioloških metod spremljanja stanja v okolju lahko ocenimo stopnjo tveganja za zdravje človeka, ki je izpostavljen takemu okolju (Békaert in sod., 1999; Lah in sod., 2005b; Lah in sod., 2005c).

Biotesti imajo nekatere pomanjkljivosti. Ne upoštevajo nekaterih *in vivo* pojavov kot sta tkivna porazdelitev in biotransformacija. Prav tako biotesti ne morejo identificirati posameznih spojin, ki povzročajo značilen odgovor v testnih organizmih, ampak poročajo o celotni aktivnosti testnega vzorca. Ekotoksikološke ocene bi zato poleg kemičnih analiz morale temeljiti na setu različnih *in vitro* testov in relativno enostavnih *in vivo* testov (Fent, 2004).

Številne ameriške in evropske študije kažejo neskladnost rezultatov kemijskih analiz z rezultati biotestov za toksičnost in genotoksičnost (Helma in sod., 1998; Monarca in sod., 2004; Guzzella in Sora, 1997).

Iskanje korelacij med fizikalno-kemično sestavo vzorcev in njihovo toksičnostjo je težka naloga zaradi kompleksne sestave večine tekočih vzorcev. Njihova natančna fizikalno-kemična sestava je redokdaj poznana (Jean in Fruget, 1994). Samo po pridobitvi znanja o korelaciji med rezultati pridobljenimi z analitičnimi orodji in biotesti, bomo lahko identificirali vire toksičnosti in ustrezno ukrepali (Wolska in sod., 2007).

2.4.2 Toksičnost

Obstaja mnogo načinov na katere lahko organizem odgovori na toksično spojino (Timbrell, 2000) in tip odgovora je odvisen od fizičnih in kemičnih interakcij med spojino in njenim mestom delovanja (Schultz, 1999). Zaradi kompleksnosti vodnih ekosistemov in multifunkcionalnih lastnosti toksičnosti same po sebi, ki je lahko vrstna, kemična in od končnega učinka odvisna spremenljivka, je potrebno oceno potencialno nevarnih vzorcev opraviti z več biotesti in z organizmi na različnih trofičnih nivojih (Manusadžianas in sod., 2003). V splošnem velja, da naj bi baterija ekotoksikoloških testov vključevala vsaj enega predstavnika vsake od treh glavnih trofičnih nivojev v ekosistemu: producenti, porabniki in razkrojevalci (Rojičkova-Padratova in sod., 1998; Rojičkova-Padratova in Maršalek, 2000).

Po odkritju, da je toksičnost specifična glede na trofično raven, se je pojavila potreba po multitrofičnem testiranju toksičnosti in razvili so mikrobioteste (Blaise, 2000).

Po Blaisu (1991) je mikrobiotest definiran kot izpostavitve enoceličnega ali majhnega večceličnega organizma tekočemu vzorcu z namenom merjenja specifičnega učinka.

Poznamo bakterijske mikrobioteste, mikrobioteste z algami, praživalmi in nevretenčarji. (Janssen in sod., 2000). Mikrobiotesti imajo mnoge prednosti kot so relativno nizka cena analize, potrebujemo majhne volumne vzorca, testnih organizmov ni potrebno kontinuirano gojiti, delamo lahko z več vzorci naenkrat, odzivni čas je kratek, uporaba pa je enostavna, primerna tudi za neizkušen kader (Janssen in sod., 2000; Wolska in sod., 2007).

2.4.2.1 Protoxkit FTM

Pri testu ProtoxkitFTM, ki ga proizvaja podjetje Microbiotests Inc. iz Belgije (ProtoxkitFTM..., 2006), kot testni organizem uporabljamo pražival *Tetrahymena thermophila*, ki pripada deblu Ciliophora (Schultz, 1999).

Praživali najdemo skoraj na vseh predelih Zemlje (Pauli in Berger, 2000). Predstavljajo pomemben trofični nivo primarnih potrošnikov in detritnih prehranjevalcev v vodni prehranjevalni mreži (Schultz, 1999), zato igrajo pomembno ekološko vlogo v samoočiščevalnih procesih in kroženju snovi v naravnih vodnih ekosistemih (Pauli in Berger, 2000). Zaradi teh lastnosti so idealni zgodnji pokazatelji motenj v vodnem ekosistemu (Nicolau in sod., 2001).

Praživali najpogosteje uporabljamo v ekotoksikologiji (Schultz, 1997), saj pripadajo evkariontom, obenem pa je njihovo gojenje prav tako enostavno in ekonomično kot gojenje prokariontov (Pauli in Berger, 2000). Njihova ultrastruktura, celična fiziologija, razvoj, biokemija, genetika in molekularna biologija je dobro raziskana (Nicolau in sod., 2001; Lah in sod., 2005c).

ProtoxkitFTM spada v skupino Toxkit mikrobiotestov (ProtoxkitFTM..., 2006). Toxkit je generično ime mikrobiotestov, ki jih je razvila raziskovalna skupina profesorja G. Persoone v Laboratoriju za okoljsko toksikologijo in vodno ekologijo v Belgiji. Osnova Toxkit mikrobiotestov je vključitev ključnih materialov, potrebnih za izvedbo testa. Testni protokol je zelo enostaven: aktivacija organizmov, izpostavitve redčitveni vrsti potencialno toksičnega testnega vzorca, zabeleženje testnega parametra in določitev EC50/LC50.

EC50 oziroma efektivna koncentracija, je statistično pridobljena koncentracija toksične spojine, ki povzroči definiran, neletalni učinek pri 50% dane populacije organizmov v definiranih pogojih (Wadhia in Thompson, 2007).

ProtoxkitFTM omogoča občutljivo, enostavno, hitro, ponovljivo in poceni testiranje toksičnosti kemikalij in odpadnih snovi v vodnih in zemeljskih okoljih. Glavna prednost tega testa je, da so testni mikroorganizmi v dormantni obliki in jih lahko aktiviramo pred izvedbo testa. Tako ni potrebno dolgotrajno gojenje testnih organizmov, kar bistveno zmanjša stroške testiranja. Migtalkar *Tetrahymena thermophila* tako lahko hranimo pri sobni temperaturi v specifičnem mediju več mesecev, brez negativnega vpliva na njegovo fiziološko stanje.

Princip delovanja biotesta je v porabljanju dodanega substrata za nastanek ciliatne biomase. Rezultati testa temeljijo na merjenju optične gostote s spektrofotometrom. Normalno razmnožujoči se mikroorganizmi zbistrijo suspenzijo znotraj testne kivete v 24 urah, kar pomeni, da se optična gostota močno zmanjša na račun porabe substrata. Pri kulturi, ki ima inhibirano rast zaradi prisotnosti toksične snovi v vzorcu pa je poraba substrata manjša, motnost v kiveri in s tem optična gostota vzorca pa večja. Na podlagi meritev optične gostote lahko določimo stopnjo inhibicije testiranega vzorca (ProtoxkitFTM..., 2006).

2.4.3 Genotoksičnost

Količina in število mutagenih in toksičnih sredstev sta se močno povečala s človekovo gospodarsko dejavnostjo, predvsem v zadnjih dveh stoletjih. Ocenjujejo, da je v vsakodnevni uporabi nad 70.000 sintetičnih kemikalij. Od tega kar 79% takih, za katere ni nobene informacije v zvezi z njihovo (geno)toksičnostjo (Mitchell in sod., 2002).

Viri genotoksičnih snovi so lahko delno obdelane ali neobdelane odplake kemijske industrije, petrokemijske industrije, naftnih rafinerij, jeklarn, neobdelane gospodinjske odplake, pesticidi, ki se izpirajo iz zemlje v vodo (Ohe in sod., 2004; Cardozo in sod., 2006). Največ genotoksičnih spojin najdemo v odpadnih vodah industrije organskih kemičnih spojin in mestnih odplakah, ki so kompleksne mešanice odpadnih vod iz različnih virov (White in Rasmussen, 1998). Mnoge reke po svetu so onesnažene z močnimi direktno in indirektno delujočimi mutageni (Cardozo in sod., 2006).

V širšem smislu se genotoksičnost nanaša na vse vrste poškodb DNA, medtem ko se mutagenost nanaša na indukcijo mutacij v genih. Spojine, ki reagirajo z DNA in/ali z DNA povezanimi celičnimi sestavinami, so genotoksične. Genotoksični učinki vključujejo tvorbo DNA aduktov, prelome verig, zakasnjeno sintezo DNA in izmenjavo sestrskih kromatid. Genotoksični učinki so lahko prehodni, medtem ko so mutageni učinki stalni. Na nivoju dednega materiala torej prihaja do velikega števila sprememb, ki jih ne moremo zaznati z enim samim testom. Zato so razvili baterije testov, s katerimi spremljamo tri pomembne in različne končne spremembe genetskih poškodb povezanih z boleznimi pri človeku: mutageneza, klastogeneza in aneuploidija (Dearfield in sod., 2002).

- Mutageneza, se nanaša na mutacije genov ali točkovne mutacije in vključuje substitucije (sprememba baz v DNA), adicije (dodajanje enega ali nekaj baznih parov DNA) in delecije baznih parov (izguba enega ali nekaj baznih parov DNA).
- Klastogeneza pomeni spremembe v strukturi kromosoma in gre običajno za pridobitve, izgube ali preureditve delov kromosoma.
- Aneuploidija pomeni pridobitev ali izgubo intaktnih kromosomov.

Vsakega od teh dogodkov lahko štejemo za končni odziv pri oceni genotoksičnosti. (Timbrell, 2000)

Mutacijo lahko definiramo kot stabilno, dedno spremembo v DNA nukleotidni sekvenci: takšne dedne spremembe nastanejo zaradi substitucij baz (tranzicije, transverzije), premikov bralnega okvirja (delecije ali adicije enega ali večih nukleotidnih parov, ki vodijo v spremembe bralnega okvirja genskega koda), velikih delecij, insercij ali translokacij. Redki mutageni povzročajo samo en tip mutacijskih sprememb (Gatehouse in sod., 1990).

2.4.3.1 Mutageneza in biotesti za dokazovanje mutageneze

Kemične spojine z mutagenimi in karcinogenimi učinki in spojine, ki vplivajo na reproduktivne funkcije organizmov, so najbolj nevarne za človeško zdravje, zaradi njihove sposobnosti dolgoročnih učinkov (Ivanchenko in sod., 2000) in sposobnosti za poškodovanje primarnega nosilca informacij živih bitij, DNA (Reifferscheid in Grummt, 2000). Največje ekološko in zdravstveno tveganje predstavljajo v naravi molekule, ki so zaradi svoje lipofilne narave težko razgradljive in lažje prehajajo celične stene in membrane celic. Obenem se takšne molekule lahko akumulirajo v maščobnih tkivih in njihov učinkovit odmerik narašča (Pollack in sod., 2003).

Obstaja veliko dokazov, da mutacije v spolnih celicah povzročajo dedne genetske napake in da so mutacije v somatskih celicah ključne pri začetnih korakih razvoja rakavih obolenj (Gatehouse in sod., 1990; Mortelmans in Zieger, 2000; MacGregor in sod., 2000; Flamand in sod., 2001) in drugih degenerativnih procesov kot so pospešeno staranje in koronarne bolezni (Dearfield in sod., 2002). Zato je identifikacija snovi, ki so sposobne inducirati mutacije zelo pomembna (Mortelmans in Zieger, 2000; Flamand in sod., 2001).

Čeprav obstajajo med živimi bitji vrstne razlike v metabolizmu, DNA popravilnih mehanizmi in ostalih fizioloških procesih, ki vplivajo na kemično mutagenezo, omogoča univerzalnost DNA in genetskega koda uporabo različnih nehumanih testnih sistemov za napoved mutagenosti testne spojine (Dearfield in sod., 2002). Dodatna podpora nehumanim testnim sistemom je dejstvo, da kemične spojine, ki povzročajo genetske poškodbe v eni vrsti navadno povzročajo podobne učinke tudi na drugi vrsti, s čimer postavljajo osnovo spremljanja učinkovanja in ugotavljanja možnih mutagenih dejavnikov na človeka (Dearfield in sod., 2002). Kratkotrajni testi za zaznavanje bakterijskih mutacij, merijo sposobnost kemičnih spojin, da poškodujejo DNA (Gatehouse in sod., 1990). Ne identificirajo koncentracij, ki poškodujejo organizme, vendar pa omogočajo hitro metodo za pregledovanje genotoksičnega potenciala kompleksnih okoljskih mešanic (McDaniels in sod., 1990). Da bomo lahko učinkovito ocenili vsebnost mutagenov v vodi, bi morali v programe monitoringa kvalitete vod poleg kemijskih analiz vključiti tudi teste genotoksičnosti (Ohe in sod., 2004). K bateriji potrebnih testov spada tudi Amesov test (Flamand in sod., 2001).

2.4.3.2 Bioaktivacija

Bioaktivacija je proces, pri katerem zaradi encimskega delovanja primarno neškodljive snovi postanejo genotoksične (Venitt in Parry, 1984). V evkariontskih celicah se pretvorijo v elektrofilne molekule, ki se kovalentno vežejo na proteine in nukleinske kisline in povzročajo genotoksične učinke (Josephy in sod., 1997). Pri bioaktivaciji sodelujejo številni metabolični encimi in kofaktorji, pri tem gre predvsem za oksigenaze različnih funkcij (Venitt in Parry, 1984). Ena izmed pomanjkljivosti prokariontskih testov genotoksičnosti je, da prokariontski organizmi nimajo nekaterih encimov, ki sodelujejo pri bioaktivaciji snovi. V testu zato dodajamo zunanji aktivacijski sistem v obliki homogenata jetrnih celic glodalcev (Josephy in sod., 1997; Claxton in sod., 2001).

Zunanji aktivacijski sistem ima nekaj slabosti:

- Bakterijska celična stena predstavlja fizično oviro med mestom bioaktivacije mutagena in bakterijskim kromosomom.
- Bioaktivacijski procesi med glodalci in človekom se razlikujejo.
- Za pridobivanje jetrnega ekstrakta je potrebno žrtvovati veliko laboratorijskih živali (Josephy in sod., 1997).
- Mnogi encimi, kritični za bioaktivacijo mutagenov, niso aktivni v S9 mešanici (Kirkland in sod., 2007; Ku in sod., 2007).
- V bakterijskih celicah ne potakajo absorpcija, porazdelitev, metabolizem in izločanje, ki potekajo v višjih organizmih (Gatehouse in sod., 1990).

Te omejitve moramo upoštevati, ko vrednotimo rezultate bakterijskega mutacijskega testa (Gatehouse in sod., 1990).

2.4.3.3 Test Ames

Bakterijske teste mutagenosti, še posebej Amesov test, raziskovalni laboratoriji in regulatorne agencije že več desetletij uporabljajo širom po svetu (Josephy in sod., 1997). Sprva so ga uporabljali le za testiranje mutagenosti različnih vrst čistih kemikalij, danes pa ga uporabljamo tudi za ugotavljanje genotoksičnosti različnih sestavljenih vzorcev (Maron in Ames, 1983; Filipič, 1995; Černa in sod., 1996; Černa in sod., 1998) kot so naravne vode, pitne vode, odpadne vode (Stahl, 1991; Vargas in sod., 1993) in za odkrivanje okoljskih mutagenov (Siddiqui in Ahmad, 2003; Ohe in sod., 2004). Ob uporabi različnih sevov *Salmonella*, ki so občutljivi na različne mutagene, lahko identificiramo posamezne razrede genotoksičnih spojin v vodah (Umbuzeiro in sod., 2004). Ima številne prednosti kot so hitrost, stroškovna ugodnost, zanesljivost in obsežna podatkovna baza (Claxton in sod., 2001).

Test Ames ali test povratne mutacije z bakterijo *Salmonella typhimurium* je razvil B. N. Ames s sodelavci okoli leta 1970 (Maron in Ames, 1983). To je kratkotrajni bakterijski test povratnih mutacij, namenjen zaznavanju širokega spektra spojin, ki povzročajo poškodbe genskega materiala, katere vodijo v nastanek genskih mutacij (Mortelmans in Zeiger, 2000). Vsak testni sev ima drugačno mutacijo v histidinskem operonu in tako niso sposobni sintetizirati aminokislina histidin, ki je nujno potrebna za rast. Poleg tega vsebujejo tudi druge mutacije, ki povečajo njihovo sposobnost zaznavanja mutagenov. Mutacija v *rfa* genu povzroča delno izgubo lipopolisaharidnega plašča, kar vodi v povečano permeabilnost za velike molekule. Mutacija v *uvrB* genu povzroča okvare izrezovalnega DNA popravljalnega mehanizma (Maron in Ames, 1983). Pomemben napredek v razvoju Amesovega testa je bila vključitev plazmida pKM101 (R-faktor). Sevi z R-faktorjem imajo poudarjen popravljalni sistem, ki je nagnjen k napakam. Imajo večjo stopnjo preživetja na račun povečane stopnje mutacij (Snyder, 2003).

Povratne mutacije na mestu že obstoječe mutacije v histidinskem operonu oziroma blizu nje, lahko obnovijo funkcijo gena in celica je znova sposobna sintetizirati histidin. Nove kolonije lahko rastejo brez histidina in jim pravimo histidinske revertante (Mortelmans in Zeiger, 2000). Mutageno aktivnost testne spojine izračunamo iz razmerja med številom kolonij revertant na ploščah s testno substanco in številom revertant na kontrolnih ploščah (Flamand in sod., 2001).

2.4.3.4 Biološka ustreznost testov za genotoksičnost

Rezultate vseh bioloških testov je potrebno ovrednotiti z ustreznimi statističnimi metodami. Pozitiven rezultat predstavlja statistično značilno povečanje poškodb dednine v primerjavi z negativnim kontrolnim vzorcem. Za testno snov, ki ne kaže statistično značilnega povečanja poškodb dednine, lahko trdimo, da v uporabljenem testnem sistemu nima genotoksičnega vpliva. Pri testih genotoksičnosti so se nemalokrat pojavljali lažno pozitivni *in vitro* rezultati, ki pa niso bili biološko relevantni ne za glodalce ne za človeka. Za določanje biološke relevance rezultatov *in vitro* testov je potrebno razumevanje nekaterih osnovnih mehanizmov:

- Nekateri kemični spojine ne poškodujejo DNA direktno, ampak reagirajo z drugimi celičnimi komponentami in inducirajo genotoksičnost.
- Nekateri genotoksični snovi v majhnih koncentracijah učinkovito tvorijo konjugate in postanejo neškodljive za celico.
- V *in vitro* pogojih lahko nastanejo genotoksični metaboliti, ki sicer ne nastajajo *in vivo* v glodalcih ali ljudeh.
- Živa celica je v *in vivo* pogojih lahko sposobna tolerirati nizke koncentracije genotoksičnih snovi ali popraviti nastale poškodbe brez bioloških posledic. Celica v *in vitro* pogojih lahko te sposobnosti izgubi.

Upoštevanje naštetih mehanizmov je potrebno razlikovati biološko relevantne *in vitro* pozitivne rezultate od tistih, ki so biološko nerelevantni, še posebej, ko gre za ljudi (Kirkland in Müller, 2000 ; Thybaud in sod., 2007).

2.4.4 Prihodnost v ekotoksikologiji

Analize toksičnih lastnosti vsake kemične spojine so drage in dolgotrajne, zato obstaja velik pritisk po razvijanju novih testnih metodologij (Neumann in Galvez, 2002).

Novejša študija kažejo, da lahko zgodnje interakcije med geni/genskimi produkti in okoljskimi faktorji spremljamo z analiziranjem genske ekspresije. Nov molekularni pristop preučevanja interakcij med geni in okoljem se imenuje toksikogenomika (Olden, 2004). Prednosti toksikogenomike so številne. Pridobili bi bolj natančno razumevanje molekularnih mehanizmov toksičnosti, hitreje bi lahko testirali toksičnost spojin in izboljšali ekstrapolacijo med eksperimentalnimi živalmi in ljudmi (Orphanides, 2003). Poleg zmožnosti za definiranje mehanizmov toksičnosti, analiza genskih vzorcev nudi

potencial za predvidevanje toksičnih odgovorov. Ker se spremembe v celičnih molekulah pojavijo pred toksičnim izidom, lahko služijo kot zgodnji, občutljivi indikatorji potencialne toksičnosti (Aardema in MacGregor, 2002). Nova znanja vodijo v razvoj testnih sistemov, ki bodo cenovno in časovno ugodnejši in manj odvisni od uporabe živali (Olden, 2004; Kroeger, 2006).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 ODVZEM VZORCEV JEZERSKE VODE

Odvzem in pripravo vzorcev smo opravili v sodelovanju z Inštitutom za ekološke raziskave ERICo Velenje. Pripravljene vzorce smo transportirali do našega laboratorija in jih do uporabe hranili v zamrzovalniku pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Vzorčna mesta jezerske vode v Šaleški dolini dne 16.06.2005:

- Vj1 – Družmirsko jezero
- Vj2 – Velenjsko jezero pri nasipu pepela
- Vj3 – Velenjsko jezero pri čolnarni
- Vj4 – Škalsko jezero

Vzorce jezerske vode smo pred uporabo razdelili na alikvote in jih v steklenih posodah z volumnom 1 litra, shranili pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pred testiranjem smo vzorce odtalili pri sobni temperaturi. Pri testu Ames smo vzorce tudi sterilizirali s filtracijo skozi filter s porami premera $0,20\text{ }\mu\text{m}$.

3.2 TESTIRANJE TOKSIČNOSTI S PROTOXKIT FTM

Delo je potekalo v skladu z navodili, ki smo jih prejeli od proizvajalca biotesta, podjetja Microbiotests Inc. iz Belgije.

3.2.1 Priprava redčitvene vrste vzorcev jezerskih vod

Pripravili smo redčitve vzorcev jezerskih vod kot prikazuje Preglednica 2.

Preglednica 1: Redčitvena vrsta vzorca (Protoxkit FTM ..., 2006).

Oznaka epruvete	Koncentracija vzorca (%)
C1	100
C2	50
C3	25
C4	12,5
C5	6,25

3.2.2. Priprava inokuluma *Tetrahymena thermophila*

Založna kultura je bila nacepljena 11.2.2006. Steklениčko z založno kulturo smo dobro premešali, nato pa smo s sterilno injekcijsko iglo odvzeli $500\text{ }\mu\text{l}$ kulture in jo prenesli v $1,5\text{ ml}$ epruveto. Dodali smo $500\text{ }\mu\text{l}$ destilirane vode in dobili 50% založno kulturo. Epruveto smo nežno premešali in izmerili optično gostoto pri valovni dolžini 330 nm . Spektrofotometer smo ničili z destilirano vodo.

Vrednosti optične gostote smo vnesli v enačbo regresijske krivulje OD/N (koncentracija celic *Tetrahymena thermophila* v odvisnosti od optične gostote), ki smo jo povzeli po standardnem operativnem postopku:

$$N = 9,74 \times 10^4 \times OD - 3,98 \times 10^2 \quad \dots(1)$$

pri čemer je N koncentracija celic v suspenziji, OD pa optična gostota.

Dobljeni N smo uporabili v naslednjih enačbah:

$$F = N/10000 \quad \dots(2)$$

$$V = 0,5 \times (F-1) \quad \dots(3)$$

V novo epruveto smo prenesli 500 µl 50 % založne kulture in dodali izračunani volumen V (enačba 3) destilirane vode. Tako smo dobili ustrezno razredčino kulture, ki smo jo uporabili v biotestu.

3.2.3. Priprava substrata

Z mikropipeto smo prenesli vsebino vial z rekonstitucijskim medijem v vialo s substratom. Vialo smo zaprli in vsebino dobro premešali.

3.2.4. Inokulacija epruвет

Vzeli smo 12 epruвет za vsak vzorec, 6 za ponovitev »a« in 6 za ponovitev »b«, in jih ustrezno označili. Delali smo v dveh ponovitvah. V epruveto z oznako C0 smo prenesli 2 ml destilirane vode. Te epruvete so služile kot negativna kontrola. V ostale epruvete smo prenesli po 2 ml ustrezno redčenega vzorca iz predhodno pripravljene redčitvene vrste (Preglednica 1), v epruveto C1 smo dodali 2 ml neredčenega vzorca (100%), v epruveto C2 smo dodali 2 ml 50 % vzorca, v epruveto C3 smo dodali 2 ml 25 % vzorca, v epruveto C4 smo dodali 2 ml 12,5 % vzorca in v epruveto C5 smo dodali 2 ml 6,25 % vzorca.

Nato smo v vseh 12 epruвет (tudi v negativno kontrolo) dodali 40 µl pripravljene suspenzije substrata in 40 µl pripravljenega ciliatnega inokuluma. Epruvete smo zaprli in nežno premešali.

3.2.5. Merjenje optične gostote

Optično gostoto smo merili dvakrat, prvič takoj po inokulaciji epruвет (T0) in drugič po 24 urni inkubaciji epruвет (T24).

Spektrofotometer smo najprej ničili pri 440 nm s testno epruveto, ki je vsebovala samo 2 ml destilirane vode (C0). Nato smo izmerili optično gostoto vseh epruвет pri 440 nm, ki smo jih predhodno nežno premešali.

Epruvete smo po merjenju optične gostote v času T0 inkubirali na 30 °C 24 ur. Po 24 urah smo spet ničili spektrofotometer, nežno premešali vsako epruveto in izmerili optično gostoto pri 440 nm (T24).

3.2.6. Ugotavljanje stopnje inhibicije rasti

Stopnjo inhibicije rasti v posameznem vzorcu smo izračunali z enačbo :

$$\% \text{ inhibicije }_{(C1-C5)} = \left(1 - \frac{\Delta OD_{(C1-C5)}}{\Delta OD_{C0}} \right) \times 100 \quad \dots(4)$$

$\Delta OD_{(C1-C5)}$ je razlika med povprečno optično gostoto posamezne razredčitve (C1,C2,C3,C4,C5) v času T0 in T24. Odstotek inhibicije se izračuna za vsako redčitev posebej.

ΔOD_{C0} je razlika v optični gostoti kontrolne kivete v času T0 in T24.

3.2.7. Referenčni test toksičnosti s $K_2Cr_2O_7$

Z referenčnim testom preverjamo pravilno delovanje biotesta, ker ustrezne razredčine značilno inhibirajo rast testnega organizma.

Najprej smo pripravili raztopino $K_2Cr_2O_7$ s koncentracijo 100 mg/l. To smo storili tako, da smo zatehtali 25 mg $K_2Cr_2O_7$ in jih raztopili v 250 ml destilirane vode. Nato smo pripravili redčitveno vrsto, ki je vsebovala naslednje koncentracije $K_2Cr_2O_7$: 56,0 mg/ml, 32,0 mg/ml, 18,0 mg/ml, 10,0 mg/ml in 5,6 mg/ml.

Nadaljni postopek je bil enak kot pri testiranju vzorcev jezerskih vod, le da namesto vzorca jezerskih vod v testne kivete dodajamo ustrezne razredčine $K_2Cr_2O_7$.

24h-EC50 za referenčni test, ki ga dobimo po analizi rezultatov, mora biti znotraj vrednosti, ki jo proizvajalec določi za veljavno (24h EC50 : 15-24 mg/ml).

3.2.8. Analiza rezultatov

S pomočjo Excelove datoteke z urejenimi enačbami, ki smo jo dobili pri proizvajalcu kita in v katero smo vnesli naše meritve, smo izračunali 24h-EC50 za testne vzorce in za referenčno snov.

3.3 TEST AMES

Test smo izvajali kot test z vključitvijo z in brez metabolne aktivacije, po standardnem operativnem postopku (Test mutagenosti *Salmonella typhimurium*...,2003) in postopku, ki sta ga opisala Maron in Ames (1983). Delo je potekalo v sterilnih pogojih.

3.3.1 Priprava gojišč in raztopin

Vsa gojišča smo pripravili po opisanih postopkih in v sterilnih pogojih.

Preglednica 2: Gojišče po Vogel-Bonnerju (50X) za 500 ml (Test mutagenosti *Salmonella typhimurium*...,2003)

d. H ₂ O	325 ml
Magnezijev sulfat, MgSO ₄ x 7 H ₂ O	5 g
Citronska kislina monohidrat	50 g
Kalijev fosfat, dibazičen, brezvodni (K ₂ HPO ₄)	250 g
Natrijev amonijev hidrogen fosfat (NaH ₂ NH ₄ PO ₄ ·4H ₂ O)	87,5 g

Soli smo v napisanem vrstnem redu raztapljali v topli vodi. Raztopino smo avtoklavirali 20 minut pri 121 °C in jo shranili v hladilniku do uporabe.

Preglednica 3: 40 % raztopina glukoze (Test mutagenosti *Salmonella typhimurium*...,2003)

d. H ₂ O	500 ml
glukoza	200 g

Destilirano vodo smo segreli na približno 50°C in postopno dodajali glukozo. Raztopino smo avtoklavirali 20 minut pri 121 °C in jo shranili v hladilniku do uporabe.

Preglednica 4: 0,5 mM raztopina histidin/biotin (Test mutagenosti *Salmonella typhimurium*...,2003)

D-Biotin (F.W. 247,3)	12,36 mg
L-Histidin (F.W. 191,7)	9,6 mg
d. H ₂ O	100 ml

Biotin smo raztopili s segrevanjem vode do vrenja. Nato smo dodali še histidin. Raztopino smo sterilizirali s filtracijo in shranili pri 4 °C.

Preglednica 5: Ampicilin (Test mutagenosti *Salmonella typhimurium*...,2003):

Ampicilin	8 mg
0,02 N NaOH	1 ml

Raztopino smo sterilizirali s filtracijo (velikost por 0,2 µm) in do uporabe shranili v zmrzovalniku pri -20 °C

Preglednica 6: Naslojeni agar (Test mutagenosti *Salmonella typhimurium*...,2003):

bakteriološki agar	6 g
NaCl	5 g
d. H ₂ O	do 1000 ml

Naslojeni agar brez raztopine histidin/biotin smo avtoklavirali 20 minut pri 121 °C. Pred izvedbo testa smo naslojenemu agarju dodali 0,5 mM raztopino histidin/biotin, in sicer 10 ml 0,5 mM raztopine histidin/biotin na 100 ml naslojenega agarja.

Preglednica 7: Hranilni bujon za gojenje *S. typhimurium* (Test mutagenosti *Salmonella typhimurium*...,2003):

bakteriološki pepton	5g
mesni ekstrakt	3g
d. H ₂ O	do 1000 ml

Pripravljeni hranilni bujon smo razdelili po 10 ml v sterilne epruvete in avtoklavirali 20 minut pri 121 °C.

Preglednica 8: Trdna gojišča za test Ames (Test mutagenosti *Salmonella typhimurium*..., 2003)

kemikalija	hranilne agarne plošče	plošče minimalni glukozni agar	plošče s histidinom in biotinom (master)	plošče z ampicilinom (master)	ločena sterilizacija
bakteriološki agar	15 g	15 g	15 g	15 g	avtoklaviramo 20 min
d. H ₂ O	1000 g	930 ml	914 ml	910 ml	
50xVB soli	-	20 ml	20 ml	20 ml	avtoklaviramo
40% glukoza	-	50 ml (10)	50 ml	50 ml	avtoklaviramo
histidin-HCl-H ₂ O (2g/400ml vode)	-	-	10 ml	10 ml	filtriramo
0,5 mM biotin	-	-	6 ml	6 ml	filtriramo
sterilni ampicilin	-	-	-	3,15ml	filtriramo
hranilna juha	25 g	-	-	-	-
UPORABA	test <i>rfa</i> test <i>uvrB</i>	TEST	potreba po histidinu	R faktor	-

Opomba: za sev TA97a uporabimo minimalni glukozni agar z manjšo vsebnostjo glukoze (10ml)

Preglednica 9: Mikrosomalna mešanica S9 (Test mutagenosti *Salmonella typhimurium*...,2003)

voda MiliQ	19,75 ml
0,2 M fosfatni pufer, pH=7,4	25,00 ml
0,1 M NADP	2,00 ml
1 M Glukoza-6-fosfat	0,25 ml
MgCl ₂ -KCl soli	1,00 ml
S9 (inducirano z Aroclor-1254), 4%	2,00 ml

Mešanico S9 smo pripravili tik pred izvedbo testa. Med samo izvedbo testa smo jo hranili na ledu.

3.3.2 Kultura bakterije *Salmonella typhimurium*

Uporabili smo gensko spremenjene seve *Salmonella typhimurium*: TA97a, TA98 in TA100.

Sevi so bili globoko zamrznjeni. Nacepili smo jih v epruvete s hranilnim bujonom, ki smo jih čez noč inkubirali na stresalniku pri 37 °C in 200 obratih/min. Kulture smo nacepili na ustrezne plošče master.

Priprava kulture bakterije *Salmonella typhimurium* na ploščah master:

V minimalno glukozno gojišče smo dodali histidin, biotin in ampicilin. Na pripravljene plošče smo naredili razmaz do posameznih kolonij za vsak sev. Plošče smo najprej inkubirali na 37°C nato pa smo jih do uporabe hranili v hladilniku.

Priprava prekonočne kulture:

Pripravili smo hranilni bujon, ga po 10 ml razdelili v epruvete in avtoklavirali. Približno 16 ur pred izvedbo testa smo s sterilno ezo prenesli eno osamljeno kolonijo bakterij iz plošče master. Nacepljeno epruveto smo inkubirali na stresalniku pri 37 °C in 200 obratih/min. Vedno smo pripravili tudi kontrolno epruveto s hranilnim bujonom brez bakterij za preverjenje morebitne kontaminacije.

Priprava sevov za globoko zamrznjeno shranjevanje:

Za shranjevanje globoko zamrznjenih sevov smo v sterilne Eppendorf epruvete prenesli 500 µl prekonočne kulture in 250 µl glicerola, vse skupaj smo dobro premešali na vrtnem mešalniku in shranili pri -70 °C.

3.3.3 Testiranje genotipov

Z različnimi testi smo ugotavljali značilnosti genotipa bakterij, ki jih uporabljamo pri testiranju. Preverjali smo ali so značilne mutacije in plazmidi v sevih še prisotni:

Preglednica 10: Pregled genotipov uporabljenih sevov *S. typhimurium* (Test mutagenosti *Salmonella typhimurium*...,2003)

Mutacije v histidinskem operonu			Mutacija v <i>rfa</i> genu	Mutacija v <i>uvrB</i> genu	Prisotnost plazmida pKM101
hisD6610 hisO1242	hisD3052	hisG46			
TA97a	TA98	TA100	+	+	+

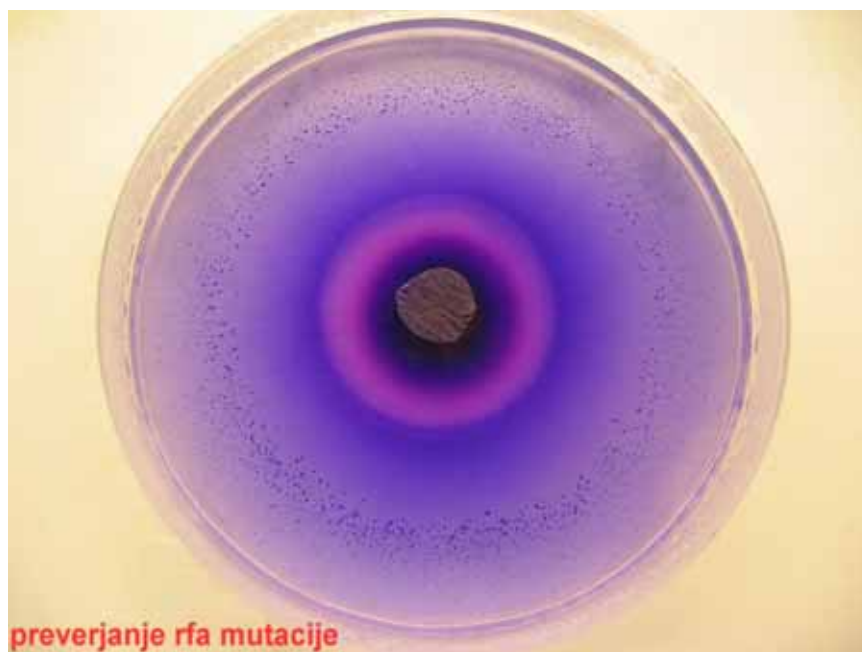
Preverjanje testnih sevov TA97a, TA98 in TA100 za prisotnost mutacij:

1.) Preverjanje sposobnosti za sintezo histidina: seve smo nacepili na plošče z minimalnim glukoznim agarjem in dodano raztopino histidin/biotin. Kontrolne plošče so vsebovale le biotin. Plošče smo inkubirali 24 ur pri 37°C. Zaradi mutacij v histidinskem operonu vsi sevi za rast potrebujejo histidin. Praviloma kolonije zrastejo le na ploščah z dodanim histidinom, medtem ko na kontrolnih ploščah ni rasti.

2.) Preverjanje mutacije *rfa* s kristal vijoličnim barvilom: na hranilne agarne plošče smo izlili mešanico prekončne bakterijske kulture in naslojenega agarja. Petrijevke smo postavili na ravno površino. Ko se je agar strdil, smo v center petrijevke položili sterilni disk filtrirnega papirja, ki smo ga predhodno namočili v raztopino kristal vijoličnega (1 mg/ml). Plošče smo inkubirali 24 ur pri 37°C. Po inkubaciji se je okoli diska pojavila bistra cona inhibicije rasti. To pomeni, da je bila mutacija *rfa* prisotna in je zato membrana celic prepustna za velike molekule kristal vijoličnega. Celice, ki pridejo v stik z barvilom, odmrejo.

3.) Preverjanje mutacije *uvrB*: Mutacijo v genu *uvrB* potrdimo tako, da pokažemo občutljivost na UV žarke. Na hranilne agarne plošče smo nacepili seve bakterij v vzporednih linijah. Polovice petrijevke smo zavili v aluminijevo folijo in 6 sekund obsevali z UV lučjo. Plošče smo inkubirali 24h na 37°C. Sevi z okvarjenim izrezovalnim popravljalnim sistemom so zrasli samo na neožarčeni strani.

4.) Preverjanje rezistence na ampicilin: vsi sevi z R-faktorjem (pKM101) so odporni na ampicilin. Ampicilinska rezistenca se uporablja kot priročen pokazatelj prisotnosti plazmida. Sevi z R-faktorjem so bolj občutljivi na mutagene. Seve bakterij smo nacepili na minimalno glukozno agarjo gojišče z dodanim histidinom, biotinom in ampicilinom in jih inkubirali 48 ur pri 37°C. Na ploščah zrastejo le sevi, ki imajo ohranjen R-faktor.



Slika 1: Preverjanje *rfa* mutacije s kristal vijoločnim barvilom (fotografirala I.Kavčič)

3.3.4. Pozitivne kontrole za test Ames

V vsak eksperiment smo vključili pozitivne kontrole, ki potrdijo povratne lastnosti in specifičnost vsakega seva ter učinkovitost metabolnega aktivacijskega sistema (Mortelmans in Zeiger, 2000)

Za izvedbo testa je bilo potrebno preveriti od koncentracije odvisni odgovor (angl.: dose response) vsakega seva na večanje koncentracije znane mutagene snovi. Mutagene snovi za pozitivne kontrole smo izbrali glede na predhodne izkušnje v laboratoriju (Lah, 2006).

Preglednica 11 : Pozitivne kontrole, ki smo jih uporabili pri izvedbi testa Ames

	sev	ime kemikalije	uporabljena koncentracija
Brez S9	TA 97a	4-Nitrokinolin-N-Oksid (DMSO)	0,5 µg/pl
	TA 98	4-Nitrokinolin-N-Oksid (DMSO)	0,5 µg/pl
	TA 100	Metil metan sulfonat (voda MiliQ)	1,0 µg /pl
Z S9	TA 97a	2-Amino fluoren (DMSO)	10 µg/pl
	TA 98	2-Amino fluoren (DMSO)	2,5 µg/pl
	TA 100	2-Amino fluoren (DMSO)	15 µg/pl

* V oklepajih je navedeno topilo

3.3.5. Izvedba testa

Izvedli smo test z vključitvijo (angl.: plate incorporation test) brez aktivacije in z aktivacijo. Delo je potekalo v sterilnih pogojih, pri delu smo uprabljali sterilno opremo in raztopine. Najmanj dva dni pred izvedbo testa smo pripravili testne plošče z minimalnim glukoznim gojiščem. En dan pred izvedbo testa smo pripravili svežo kulturo bakterij.

Test z vključitvijo brez aktivacije:

V sterilne epruvete smo nalili po 2 ml naslojenega agarja in jih postavili v vodno kopel (45 °C). Naslojenemu agarju smo dodali po 200 µl 0,5 mM raztopine aminokislin histidin/biotin (10 ml na 100 ml naslojenega agarja). Dodali smo po 100 µl suspenzije prekonočne kulture bakterij, 500 µl vzorca jezerskih vod in 500 µl fosfatnega pufra. Vsebinsko epruvete smo dobro premešali na vrtničnem mešalu in hitro izlili na predhodno označeno ploščo z minimalnim glukoznim gojiščem. Takoj po izlitju naslojenega agarja smo plošče nekajkrat zavrteli, da se je naslojeni agar enakomerno porazdelil po minimalnem glukoznem agarju. Po strditvi smo obrnjene petrijevke postavili v inkubator za 72 ur pri 37 °C. Test smo izvajali v treh paralelkah in treh neodvisnih poskusih.

Dodatek aminokislin v sledovih sproži prve delitve bakterij. Prerast bakterij povzroči pojav motnosti na petrijevki. Bakterije se potem zaradi pomanjkanja obeh hranil prenehajo razmnoževati. Rastejo samo še revertante, ki za rast ne potrebujejo teh aminokislin in tvorijo s prostim očesom vidne kolonije.

Test z vključitvijo z aktivacijo:

Postopek je potekal enako kot pri testu brez aktivacije, le da smo namesto 500 µl fosfatnega pufra v reakcijsko zmes dodajali S9 mešanico. Mešanico smo vedno pripravili svežo, in sicer tik pred izvedbo testa. Med samo izvedbo pa smo jo hranili na ledu.

Pozitivne kontrole smo pripravili tako, da smo vzorec jezerskih vod nadomestili z znano mutageno snovjo, ki je specifična za posamezen sev bakterij.

Negativno kontrolo smo pripravili tako, da smo v epruvete dodali vse sestavine, razen vzorca jezerskih vod. V primeru uporabe topila smo pripravili tudi posebno negativno kontrolo, s katero smo testirali topilo v katerem je bila raztopljena pozitivna kontrolna snov (organsko topilo DMSO).

Po 72 urni inkubaciji smo na vsaki plošči ročno prešteli število kolonij revertant.

3.3.6. Analiza rezultatov

Iz števila revertant pri testiranih vzorcih in števila kolonij zraslih pri negativni kontroli smo izračunali frekvenco mutacij, ki je merilo za oceno mutagenosti oz. genotoksičnosti vzorca:

$$\text{Indukcijski faktor} = \frac{\text{število revertant}}{\text{število revertant negativne kontrole}} \dots(5)$$

- Če je induksijski faktor testne snovi/vzorca večji ali enak **2,0**, ima testirana snov mutageni potencial.
- Če je induksijski faktor testne snovi/vzorca med **1,7** in **1,9**, ima testirani vzorec možen mutageni potencial.
- Če je induksijski faktor testne snovi/vzorca med **1,0** in **1,6** ali manjši, testirana snov nima mutagenega potenciala (Health Effects Test Guidelines..., 1996; Guideline for the Testing of Chemicals...,1997)

Delali smo v treh ponovitvah in treh neodvisnih poskusih. Za vsako ploščo smo določili število revertant in izračunali induksijski faktor. Nato smo na 9 prešteti plošč/vzorec preračunali povprečno število revertant in povprečni faktor indukcije.

4. REZULTATI

4.1 REZULTATI TESTA PROTOXKIT FTM

Test smo izvedli v dveh ponovitvah. Pri prvi ponovitvi smo optično gostoto vzorcev merili najprej po 24 urah. Po 24 urah (T24) inkubacije naj bi se po navodilih proizvajalca optična gostota v kontrolnih epruvetah zmanjšala za 60 % v primerjavi z optično gostoto testnih epruvet pred inkubacijo (T0). Zmanjšanje optične gostote je bilo po 24 urah bistveno premajhno, zato smo optično gostoto merili še po 48 urni inkubaciji. Iz dobljenih rezultatov smo izračunali odstotek inhibicije. Zaradi majhnih vrednosti odstotkov inhibicije rasti, računanje vrednosti EC 50 ni bilo smiselno in rezultati niso podani (Protoxkit FTM ..., 2006).

Tudi pri drugi ponovitvi biotesta je bilo zmanjšanje optične gostote po 24 urni inkubaciji premajhno. Ponovno meritev smo opravili po 36 urah (Preglednica 12). Zaradi majhnih vrednosti odstotkov inhibicije rasti, računanje vrednosti EC 50 ni bilo smiselno (Protoxkit FTM ..., 2006).

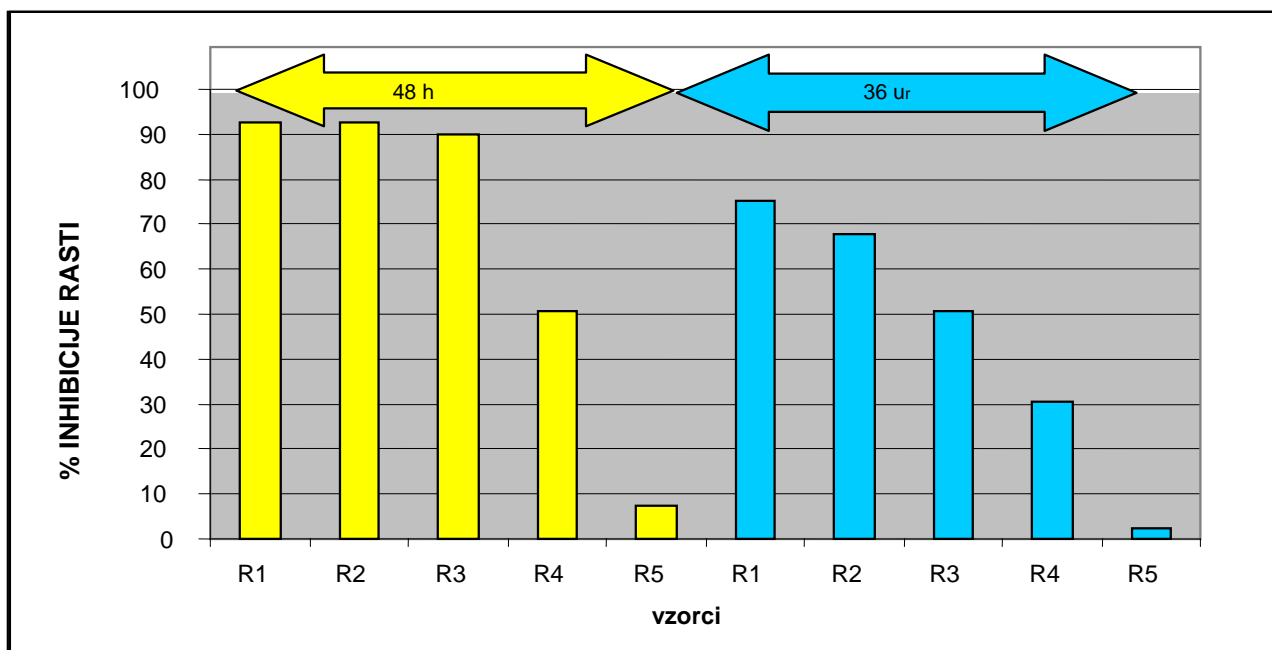
Pri obeh ponovitvah testa smo opravili tudi referenčni test s kalijevim bikromatom, K₂Cr₂O₇.

Po navodilih proizvajalca naj bi se dobljeni 24 h- EC50 K₂Cr₂O₇ gibal znotraj vrednosti 15- 24 mg/l.

Pri prvi ponovitvi biotesta, ko smo rezultate dobili po 48 urni inkubaciji, je bil dobljeni rezultat izven normativov, ki jih je postavil proizvajalec (Priloga B). Pri drugi ponovitvi biotesta smo rezultate pridobili po 36 urni inkubaciji. Rezultat referenčnega testa je tokrat potrdil pravilno delovanje mikrobiotesta (Priloga C). Zato smo ugotovili, da je v primeru potrebe po podaljšanju inkubacije, drugo meritev bolje opraviti po 36 urah kot po 48 urah. Na sliki 2 vidimo bolj pravilen trend padanja inhibicije rasti testnega organizma ob redčenju kalijevega bikromata.

V preglednici 12 in na sliki 3 vidimo, da odstotek inhibicije rasti testnega mikroorganizma pri nobenem vzorcu (Vj1-Vj4) ne presega 12 %. Zaradi nizkega odstotka inhibicije rasti izračun EC50 ni smiseln (Protoxkit FTM ..., 2006).

S ProtoxkitFTM testom torej pri nobenem od testiranih vzorcev nismo dokazali toksičnega potenciala.

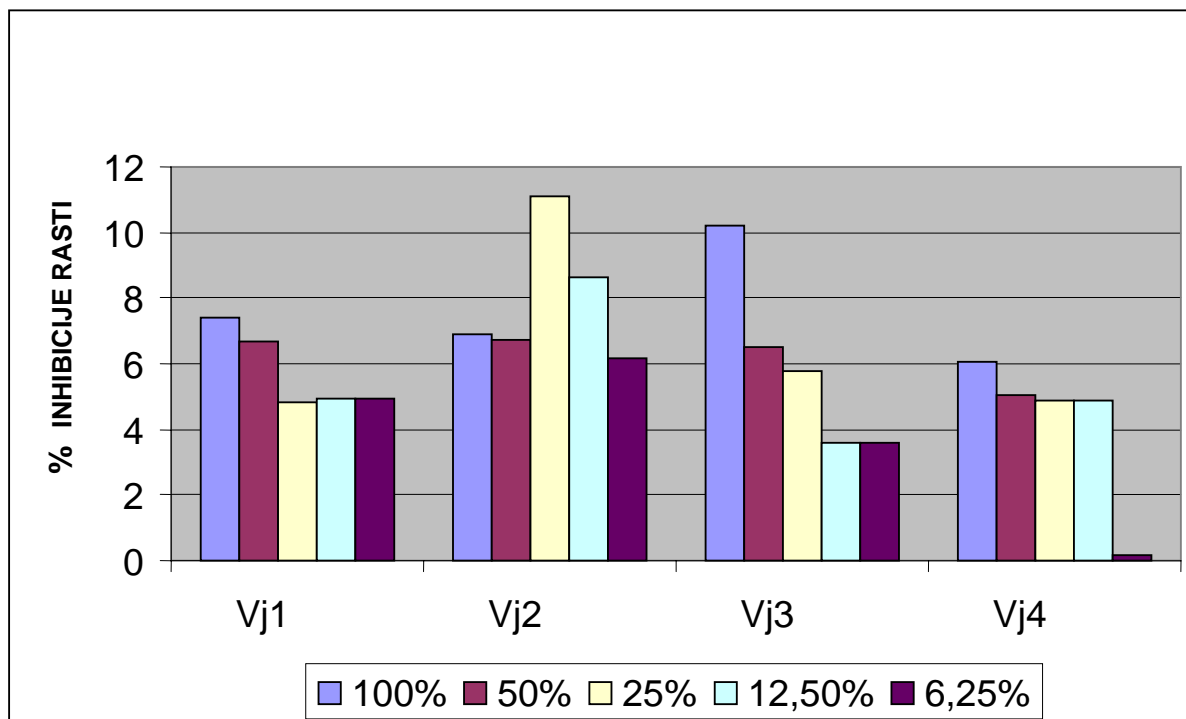


Slika 2: Primerjava odstotkov inhibicije rasti testnega organizma *Tetrahymena thermophila* ob ustreznih razredčinah kalijevega bikromata po 48 urni in 36 urni inkubaciji.

Preglednica 12: Rezultati ProtoxkitFTM testa štirih vzorcev jezerskih vod pri drugi ponovitvi biotesta (36 urna inkubacija) Prikaz meritev optične gostote (OD), izračunanih vrednosti %inhibicije in EC50

VZORČN O MESTO	KONCEN TRACIJA VZORCA (%)	OD (ponovitev «a«)		OD (ponovitev «b«)		%INHIBI CIJE	EC50
		T0	T36	T0	T36		
Družmirsko jezero	Kontr.	0,455	0,135	0,502	0,135	/	/
	100%	0,454	0,133	0,430	0,115	7,42	
	50%	0,447	0,140	0,465	0,131	6,70	
	25%	0,470	0,133	0,445	0,128	4,80	
	12,5%	0,450	0,123	0,450	0,124	4,95	
	6,25%	0,458	0,131	0,467	0,141	4,95	
Velenjsko jezero pri nasipu pepela	Kontr.	0,481	0,117	0,504	0,140	/	/
	100%	0,489	0,120	0,485	0,176	6,87	
	50%	0,472	0,138	0,478	0,133	6,73	
	25%	0,460	0,130	0,441	0,124	11,13	
	12,5%	0,472	0,130	0,486	0,163	8,65	
	6,25%	0,475	0,140	0,467	0,119	6,18	
Velenjsko jezero pri čolnarni	Kontr.	0,501	0,145	0,532	0,163	/	/
	100	0,450	0,137	0,488	0,150	10,21	
	50	0,523	0,215	0,548	0,178	6,48	
	25	0,491	0,165	0,547	0,190	5,79	
	12,5	0,494	0,157	0,523	0,161	3,59	
	6,25	0,506	0,156	0,511	0,162	3,59	
Škalsko jezero	Kontr.	0,432	0,136	0,429	0,133	/	/
	100	0,466	0,220	0,473	0,163	6,08	
	50	0,462	0,158	0,432	0,174	5,07	
	25	0,442	0,172	0,454	0,161	4,90	
	12,5	0,440	0,156	0,440	0,161	4,90	
	6,25	0,437	0,136	0,428	0,138	0,17	

Opomba: T0= meritev optične gostote pred inkubacijo
T36= meritev optične gostote po 36 urni inkubaciji



Slika 3: Grafični prikaz odstotkov inhibicije rasti testnega organizma *Tetrahymena thermophila* za redčitveno vrsto vsakega od vzorcev jezerskih vod Vj1 do Vj4

4.2 REZULTATI TESTA AMES

Rezultati testiranja vzorcev jezerskih vod s testom Ames so prikazani v preglednici 16. Indukcijske faktorje smo izračunali po enačbi 5. Niti v testu brez, niti v testu z aktivacijo s frakcijo S9, faktor indukcije ne presega ali dosega kritične vrednosti 2,0. Faktor indukcije prav tako v nobenem primeru ne dosega vrednosti v območju med 1,7 in 1,9. Rezultati testa Ames torej ne dokazujejo genotoksičnega potenciala ali možnega genotoksičnega potenciala v nobenem od testiranih vzorcev. Največja dokazana frekvenca mutacij je bila 1,59 pri vzorcu Vj2 (Velenjsko jezero pri nasipu pepela).

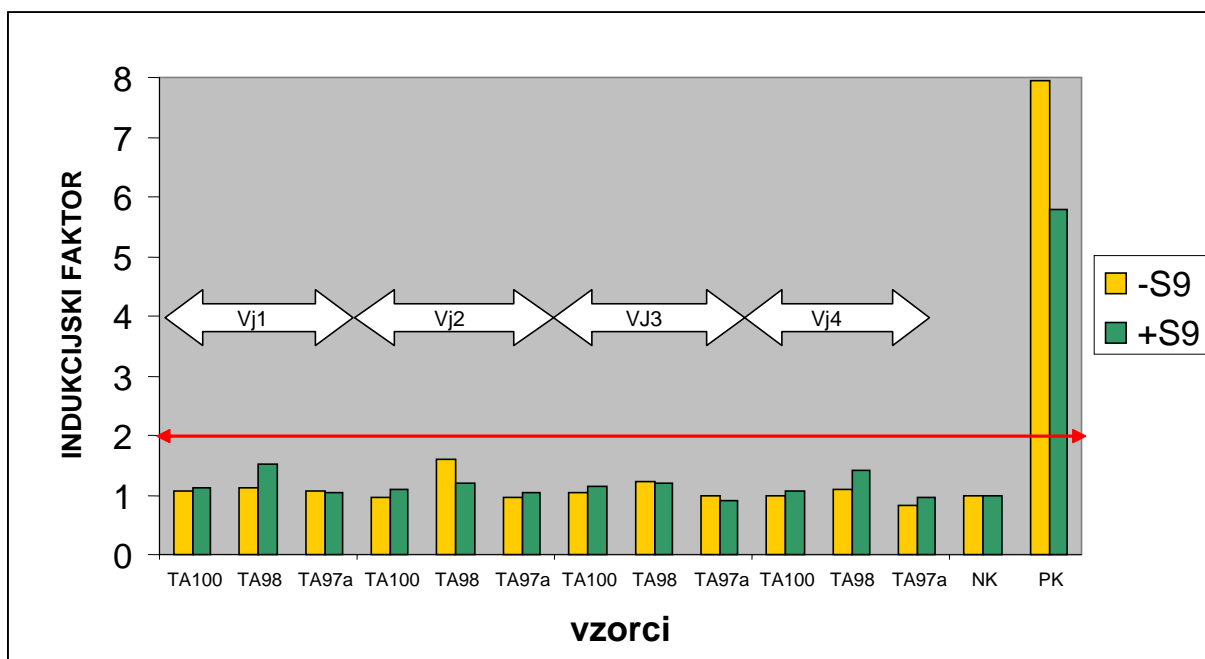
Preglednica 13: Rezultati testa Ames štirih vzorcev jezerskih vod (Vj1-Vj4) testiranih s TA 100, TA 98 in TA 97a sevi *S. typhimurium*, podani kot povprečno število revertant, standardni odklon in faktor indukcije (frekvenca mutacij) z aktivacijo (+S9) in brez aktivacije (-S9).

Vzorec	TA 100		TA 98		TA 97a	
	Št.revertant/ploščo	Faktor indukcije	Št.revertant/ploščo	Faktor indukcije	Št.revertant/ploščo	Faktor indukcije
-S9						
K-	97±33	1	12±4	1	93 ±33	1
	povprečje ±SD	IF±SD	povprečje ±SD	IF±SD	povprečje ±SD	IF±SD
Vj1	100±16	1.08±0.21	12 ±5	1.11±0.44	99±45	1.07±0.22
Vj2	89±14	0.97±0.24	17±5	1.59±0.57	88±34	0.95±0.18
Vj3	96±15	1.05±0.22	14±4	1.23±0.31	90±23	1.00±0.14
Vj4	92±16	1.00±0.23	11±3	1.09±0.56	72±11	0.82±0.16
K+						
m(MMS)=(1µg/ploščo)	1128±267	12.5±4.14	-	-	-	-
m(NQNO)=(0.5µg/ploščo)	-	-	471±71	45.95±17.14	-	-
m(NQNO)=(0.5µg/ploščo)	-	-	-	-	702±96	7.95±1.38
+S9						
K-	82±8	1	9±2	1	100±17	1
	povprečje ±SD	IF±SD	povprečje ±SD	IF±SD	povprečje ±SD	IF±SD
Vj1	90±18	1.13±0.32	12±4	1.51±0.55	103±23	1.03±0.16
Vj2	89±8	1.09±0.17	10±2	1.19±0.34	102±22	1.03±0.13
Vj3	92±10	1.14±0.22	10±3	1.21±0.31	89±19	0.90±0.11
Vj4	86±13	1.07±0.23	11±1	1.41±0.48	95±17	0.95±0.11
K+						
m(2AF)=(15µg/ploščo)	919±75	11.28±1.31	-	-	-	-
m(2AF)=(2.5µg/ploščo)	-	-	317±56	40.65±17.37	-	-
m(2AF)=(10µg/ploščo)	-	-	-	-	564±93	5.78±1.33

Opombe:

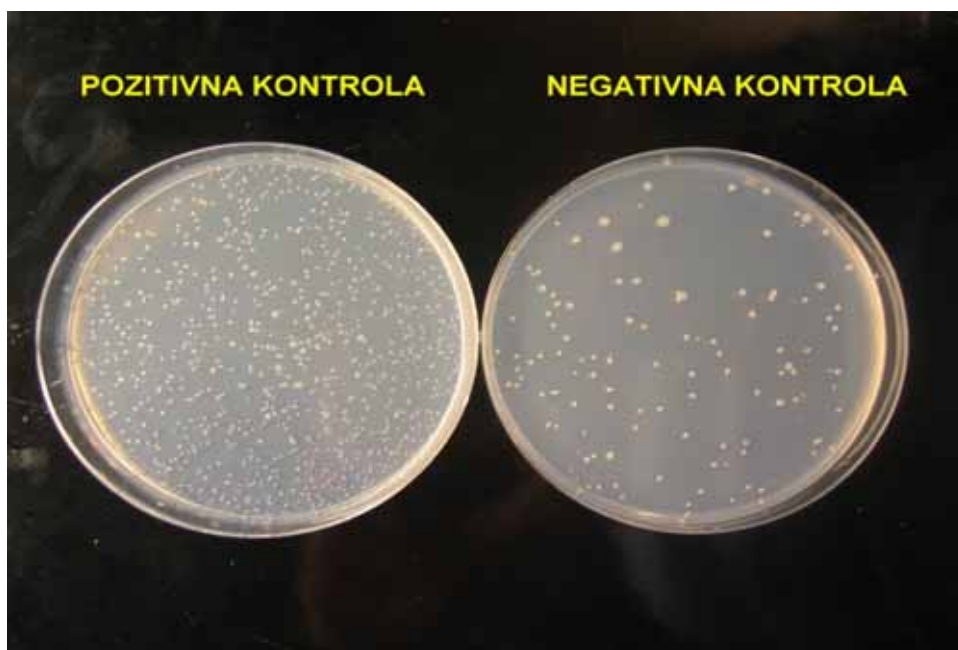
- K+ = pozitivna kontrola
- K- = negativna kontrola
- S9 = mešanica metabolnih encimov iz podganjih jeter
- MMS= metil metan sulfonat
- NQNO= 4-nitrokinolin-N-oksidi
- 2AF= 2-aminofluoren
- z rdečo barvo je označena največja frekvenca mutacij

Slika 4 grafično prikazuje faktorje indukcije vseh vzorcev testiranih s sevi TA 100, TA 98 in TA 97a. Na grafu nazorno vidimo, da se vrednosti indukcijskih faktorjev testiranih vzorcev gibljejo blizu vrednosti 1 in tako ne odstopajo veliko od negativne kontrole. Opazno je povečanje faktorja indukcije v prisotnosti aktivacijske mešanice S9 (+S9) pri sevu TA100, vendar kljub temu pri nobenem od vzorcev ne moremo govoriti o statistično značilnem genotoksičnem potencialu.



- Opomba:
- PK= pozitivna kontrola
 - NK= negativna kontrola
 - Z rdečo črto je označena meja genotoksičnega potenciala

Slika 4: Grafični prikaz vseh vzorcev jezerskih vod Vj1-Vj4, testiranih s TA 100, TA 98 in TA 97a sevi *S. typhimurium*



Slika 5: Primerjava pozitivne (1 µg MMS na ploščo) in negativne kontrole pri testu Ames za sev TA100 (fotografirala I.Kavčič)

5 RAZPRAVA

Kot posledica rasti človeške populacije in industrijskega razvoja, se povečujejo emisije ksenobiotikov v okolje. Vodno okolje je pogosto končni prejemnik naraščajočega števila antropogenih onesnaževal. Zaradi premogovništva in drugih dejavnosti je bila Šaleška dolina v preteklem desetletju podvržena veliki degradaciji okolja. Med osnovnimi ukrepi za zagotavljanje varovanja okolja je ustrezno spremljanje (monitoring) stanja in kvalitete voda, ki zahteva tudi oceno stopnje tveganja na ravni toksičnosti in genotoksičnosti. Biotesti dajejo neposreden odgovor testnih živih organizmov ali celic na toksične ali/in genotoksične snovi v testiranem vzorcu.

Fizikalno-kemijske analize vzorcev jezerskih vod iz Šaleške doline so bile opravljene na Inštitutu za ekološke raziskave ERICo Velenje (Mazej, 2006). Fizikalno-kemijske analize vzorcev (Priloga A) so pokazale, da nobeden od preiskovanih parametrov jezerske vode iz Družmirskega, Velenjskega in Škalskega jezera (Vj1-Vj4) ni presegal predpisane mejne vrednosti (Uredba o kemijskem stanju površinskih voda, 2002). Kljub temu smo v vzorcu Velenjskega jezera pri nasipu pepela (Vj2) opazili povečane vrednosti koncentracije sulfata glede na ostale vzorce. V tem vzorcu so glede na ostale vzorce opazili tudi povišane koncentracije raztopljenega cinka (Priloga A).

Za preverjanje toksičnosti vzorcev jezerske vode smo v raziskavi uporabili testni set Protoxkit FTM. Testni organizem v tem testu je *Tetrahymena thermophila*. Migetalkarji imajo velik ekološki pomen zaradi svojih funkcij v kroženju energije in elementov v vodnem ekosistemu. Zaradi teh lastnosti so idealni zgodnji pokazatelji motenj v vodnem ekosistemu.

Z uporabljenim testom nam ni uspelo dokazati toksičnosti v vzorcih jezerskih vod (Vj1-Vj4), saj inhibicija rasti v nobenem primeru ni preseгла 12%. Prav tako so fizikalno-kemijske analize vzorcev jezerske vode pokazale, da nobeden od preiskovanih parametrov jezerske vode iz izbranih vzorčnih območij ni presegal predpisane mejne vrednosti. Najvišji odstotek inhibicije rasti smo zaznali pri vzorcih Vj2 in Vj3, ki oba pripadata Velenjskemu jezeru. Kljub temu, da kemijski parametri ne prehajajo mejnih vrednosti, pa bi bila lahko prisotna določena stopnja toksičnosti, ki bi morda lahko bila posledica aditivizma, sinergizma in bioaktivacije. Vendar test Protoxkit FTM ni pokazal niti nizke stopnje toksičnosti.

Morda testni organizem, ki smo ga uporabili, ni dovolj občutljiv za testiranje izbranih vzorcev. Blinova (2000) v primerjavi občutljivosti različnih vodnih organizmov na okoljske vzorce ugotavlja, da se *Tetrahymena thermophila* ni izkazal kot občutljiv organizem za oceno toksičnosti okoljskih vzorcev. Testni organizem so v raziskavi izpostavili različnim redčenim in neredčenim vzorcem industrijskih in mestnih odpadnih vod ter onesnaženim rečnim vodam. Inhibicija rasti je bila v vseh primerih nižja od 10%, na podlagi česar so zaključili, da *T. thermophila* ni dovolj občutljiv testni organizem za ugotavljanje toksičnosti površinskih vod (Blinova, 2000). Podobno lahko zaključimo iz naših rezultatov.

Po navodilih proizvajalca bi morali rezultate biotesta dobiti že po 24 urah. V kontrolni epruveti naj bi po 24 urah zasledili 60% zmanjšanje optične gostote. V našem primeru je bilo zmanjšanje optične gostote v kontrolni epruveti bistveno premajhno. O enakih problemih poroča Avberšek v svoji raziskovalni nalogi (Avberšek, 2004). Zaradi bistveno premajhnega padca optične gostote smo morali inkubacijo podaljšati. V prvi ponovitvi biotesta smo inkubacijo podaljšali na 48 ur, v drugi ponovitvi pa na 36 ur. Razultati dobljeni po 36 urni inkubaciji so bili bolj reprezentativni kot po 48 urni inkubaciji.

Na podlagi tega biotesta ne moremo direktno sklepati na raven toksičnosti vzorcev jezerske vode, saj smo na enem samem testnem organizmu merili le eno vrsto končnih odzivov toksičnosti. Za boljši pregled toksičnih učinkov snovi v okolju in biološke ustreznosti preizkušene biotesta bi bilo potrebno opraviti več različnih biotestov z različnimi organizmi na različnih trofičnih nivojih (Isomaa in Lilius, 1995; Fochtman, 2000).

Z biotesti večinoma dokazujemo biokemične, celične ter fiziološke spremembe živih bitij, ki so prišla v stik z različnimi kemičnimi snovmi. Eden pomembnejših biomarkerjev so tudi poškodbe DNA v celicah, ki so bile predhodno izpostavljene posameznim genotoksičnim snovem ali mešanici snovi. Prav to lastnost uspešno izkoriščamo pri Ames testu (Gatehouse in sod., 1990). Genotoksični parametri so trenutno najbolj dragoceni biomarkerji za ocenjevanje okoljskega tveganja, ker odsevajo delovanje toksičnih spojin v mešanicah na genetski material organizmov in so dobri zgodnji indikatorji stanja v okolju (Wu, 2005).

Ames test je najbolj pogosto uporabljen testni sistem v monitoringu voda. Citiran je v več kot polovici znanstvenih publikacij iz področja mutageneze in ga po celem svetu uporabljajo za vrednotenje genotoksičnosti vzorcev vode (Stewart-Houk, 1992; Guzzella in Sora, 1997).

Tudi v diplomski nalogi smo ugotavljali genotoksičnost vzorcev jezerskih vod z Ames testom. Uporabili smo sev TA100, ki zaznava mutagene, ki povzročajo substitucije baznih parov in seva TA98 in TA97a, ki zaznavata mutagene, ki povzročajo premike bralnega okvirja. V nobenem primeru nismo dokazali genotoksičnosti, niti v testih brez metabolne aktivacije

(-S9), niti v testih z metabolno aktivacijo (+S9). Največji faktor indukcije (1,59) smo dobili pri vzorcu Vj2 (Velenjsko jezero pri nasipu pepela) s sevom TA 98 brez aktivacije (Preglednica 16), vendar glede na standardno interpretacijo rezultatov obeh testov ne moremo govoriti o dokazani genotoksičnosti.

Pri vseh vzorcih (Vj1-Vj4) smo s sevom TA98 dobili najvišje faktorje indukcije. Očitno je sev TA98 bolj občutljiv na zaznavanje mutagenov. Višji faktorji indukcije pridobljeni s sevom TA98 lahko nakazujejo na večjo vsebnost mutagenov, ki povzročajo premike bralnih okvirjev.

Tudi drugi raziskovalci poročajo o povišanih faktorjih indukcije pri sevu TA98. Guzzella in Sora (1997) sta v raziskavi mutagenosti vzorcev vod iz italjanskih jezer prav tako najvišje indukcijske faktorje pridobila s testnim sevom TA98. Sev TA98 se je v tej raziskavi izkazal kot bolj dovzeten za mutagene v primerjavi s sevom TA100. Ohe in sod. (2004) v

pregledu mutagenov v površinskih vodah ugotavljajo, da je bila večina testov mutagenosti po svetu opravljena s sevi TA98 in TA100. Pri tem so s sevom TA98 večkrat pridobili pozitivne rezultate, kar nakazuje na večjo vsebnost mutagenov, ki povzročajo premike bralnega okvirja kot pa mutagenov, ki povzročajo bazne zamenjave, v površinskih vodah po vsem svetu. Do enakih zaključkov so prišli tudi drugi raziskovalci (Shen in sod., 2001; Umbuzeiro in sod., 2001)

Ames test smo izvedli z aktivacijo (+S9) in brez aktivacije (-S9). Pri testiranju vzorcev s sevi TA98 in TA97a ne moremo govoriti o povečani mutagenosti ob dodatku aktivacijske mešanice S9. TA98 brez metabolne aktivacije se je odzval bolje kot z metabolno aktivacijo, torej so od mutagenov, ki povzročajo premike bralnega okvirja prisotni predvsem direktno delujoči, ki jih ni potrebno aktivirati. Dodatek S9 mešanice zato ne poveča mutagenega odgovora.

Pri testiranju vzorcev s sevom TA 100 smo v vseh primerih z aktivacijo opazili večje odstopanje od negativne kontrole, kot v testih brez aktivacije. Torej so v vzorcih jezerskih vod od mutagenov, ki povzročajo mutacije s substitucijami baznih parov, prisotni predvsem indirektno delujoči mutageni, ki jih aktiviramo z metabolno aktivacijsko mešanico S9.

O podobnih rezultatih poroča Umbuzeiro s sod. (2001) v primerjavi podatkov pridobljenih z Ames testom v 20 letnem programu monitoringa površinskih voda v Braziliji. V njihovi študiji se je sev TA98 izkazal za najbolj občutljivega in se je najbolje odzval v odsotnosti metabolne aktivacije, medtem ko so s sevom TA100 zaznali višjo mutagenost ob dodatku metabolne aktivacije. Rezultati nakazujejo povečano prisotnost direktno delujočih mutagenov, ki povzročajo premike bralnega okvira in in promutagenov, ki ob aktivaciji z S9 povzročajo substitucije baznih parov, v površinskih vodah Brazilije.

Ames test se je že mnogokrat izkazal za učinkovito orodje ocenjevanja genotoksičnosti okoljskih vzorcev. V vzorcih vode iz italijanskih jezer, ki jih uporabljajo kot vir pitne vode, so s testom Ames dokazali genotoksičnost. Dodatne kemijske analize so pokazale, da vzorci jezerske vode vsebujejo nekatera organska onesnaževala, ki so posledica kmetijstva in industrije (Guzzela in Sora, 1997). V Indiji so z dvema različicama Ames testa ugotavljali genotoksičnost vzorcev podzemne vode (Siddiqui in Ahmad, 2003). Spet druge raziskave v Indiji so pokazale, da so za mutageno aktivnost vzorcev rečne vode odgovorni predvsem pesticidi (Rehana in sod., 1995). Pereira in sod. so z Amesovim testom potrdili mutagenost vzorcev pridobljenih iz rečnega sistema, ki je bil pod močnim vplivom antropogenega delovanja (Pereira in sod., 2007). V Braziliji so s sistematičnim testiranjem mutagenosti pripomogli k identificiranju onesnaženosti. Uspešno so odkrili vir onesnaženja in ustrezno preprečili distribucijo onesnažene vode med populacijo ljudi. Njihova 20 letna raziskava je vplivala na vključitev Ames testa v program monitoringa kvalitet voda v državi. Redni monitoring površinskih voda v Braziliji od leta 1998, poleg fizikalno-kemijskih parametrov vključuje tudi Ames test (Umbuzeiro in sod., 2004). Umbuzeiro in sod. (2004) so mnenja, da je Ames test zelo primeren za ugotavljanje onesnaženja rek in identifikacijo vrst mutagenih kemijskih spojin.

Kljub zgoraj naštetim prednostim pa ima Amesov test številne pomanjkljivosti, predvsem za testiranje mutagenosti okoljskih vzorcev. Vzorce je potrebno pred testiranjem

sterilizirati s filtracijo, da se izognemo bakterijski kontaminaciji. To pa lahko vpliva na sestavo vzorca in izloči potencialno mutagene snovi. Poleg tega je vzorce v večini primerov potrebno koncentrirati, da zaznamo mutagene snovi v sledovih (Békaert in sod., 1999). Nekonzentrirani vzorci so redkokdaj pokazali genotoksičen potencial. Vsako spreminjanje vzorcev pred testiranjem pa lahko vpliva na rezultate testa (Stahl, 1991).

Če v našem primeru vzorcev jezerskih vod rezultate Ames testa primerjamo z rezultati kometnega testa na istih vzorcih bi lahko trdili, da se je Ames test izkazal premalo občutljiv za nizke stopnje genotoksičnosti (Marinšek Logar, 2007). Kometni test trenutno velja za najboljčutljivejšo metodo dokazovanja genotoksičnosti (Rojas in sod., 1999; Tice in sod., 2000). O podobnih rezultatih poroča v svoji raziskavi Žinko (2004), kjer se je Ames test izkazal kot premalo občutljiv za odkrivanje genotoksičnosti v vzorcih pitnih vod, medtem ko so s kometnim testom genotoksičnost dokazali (Žinko, 2004).

Tudi v prihodnosti bodo površinske vode prejemale velike količine raznih odplak, vključno z nezaželenimi toksičnimi in genotoksičnimi spojinami, zahvaljujoč se nadaljnemu ekonomskemu razvoju, tehničnemu napredku in nenehni uporabi novih kemikalij. Zato so potrebne primerne metode za učinkovito oceno relativnih tveganj za človeka in okolje. Da bomo lahko učinkovito ocenili vsebnost zdravju nevarnih snovi v vodah, bi morali v programe monitoringa kvalitete vod poleg kemijsko-fizikalnih analiz vključiti tudi teste genotoksičnosti in toksičnosti z živimi organizmi.

Z izbiro ustreznih ekotoksikoloških in genotoksikoloških metod v kombinaciji s standardno fizikalno-kemijsko analitiko bi dosegli celovitejšo oceno stanja okolja in stopnjo ogroženosti zdravja ljudi zaradi izpostavljenosti škodljivim snovem iz okolja. Šele z vključitvijo bioloških metod spremljanja stanja v okolju lahko ocenimo stopnjo tveganja za zdravje človeka, ki je izpostavljen takemu okolju.

Na podlagi rezultatov raziskave lahko oblikujemo naslednje sklepe;

- Z uporabljenim biotestom nam ni uspelo dokazati toksičnosti vzorcev jezerskih voda.
- Genotoksičnega vpliva vzorcev jezerskih vod s testom Ames nismo dokazali.
- Realnejšo sliko toksičnosti in genotoksičnosti vzorcev bi dobili z večjim naborom biotestov z različnimi organizmi na različnih trofičnih nivojih.

6 POVZETEK

Voda je naravna dobrina, ki je pogoj za življenje na Zemlji. Zaradi emisij nevarnih snovi v vode je prišlo do poslabševanja njene kakovosti ter primernosti razpoložljivih vodnih virov za uporabo. Naraščajoče onesnaževanje okolja in neprestani razvoj novih kemičnih spojin, vodi v naraščajočo skrb o potencialnih direktnih in indirektnih učinkih teh snovi na zdravje človeka zato si stroka in znanost prizadevata pri oblikovanju novih metod in načinov za odkrivanje virov onesnaževanja in njihovih učinkov.

V Šaleški dolini so bili v preteklih 15 letih storjeni pomembni koraki pri izboljšanju stanja naravnega okolja z okoljskimi sanacijami naših največjih termoenergetskih objektov. Med osnovnimi ukrepi za zagotavljanje varovanja okolja je tudi ustrezno spremljanje (monitoring) stanja in kvalitete voda. V skladu z aneksom Vodne direktive 2000/60/EC program monitoringa že vključuje spremljanje hidroloških, fizikalno-kemijskih in bioloških elementov kakovosti.

V diplomskem delu smo z biotesti testirali vzorce jezerskih vod iz Šaleške doline. S komercialnim kitom Protoxkit FTM za ugotavljanje toksičnosti smo testirali vzorce jezerskih vod. Genotoksičnost pa smo ugotavljali s testom Ames.

Test Protoxkit FTM smo izvedli po navodilih proizvajalca. Inkubacijski čas smo morali iz 24 ur podaljšati na 36 ur, ker je bil padec optične gostote v kontrolni kivetu po 24 urni inkubaciji manjši kot navajajo v navodilih proizvajalca. Z biotestom toksičnega odziva vzorcev jezerske vode nismo dokazali. Na podlagi biotesta ne moremo direktno sklepati na nivo toksičnosti vzorcev jezerske vode, saj smo na enem samem testnem organizmu merili le eno vrsto končnih odzivov toksičnosti. Rezultati komercialnega biotesta Protoxkit FTM se sicer skladajo z izsledki fizikalno-kemijskih analiz, ki tudi ne pokažejo onesnaženosti vzorcev jezerske vode.

Test Ames smo izvajali z bakterijo *Salmonella typhimurium*, s sevi TA 97a, TA 100 in TA98, po Standardnem operativnem postopku (Test mutagenosti *Salmonella typhimurium*..., 2003) in postopku Maron in Ames (1983). Test Ames smo izvajali brez in z aktivacijo s homogenatom podganjih jeter S9. S testom Ames v nobenem od vzorcev jezerskih vod nismo dokazali genotoksičnosti.

Zelo pomembno je v monitoring kvalitete voda vključiti biološke teste. Le biotesti nam lahko ponudijo odgovore o učinkih onesnaževal na živa bitja, vključno s človekom. Za boljšo oceno raziskave toksičnosti in genotoksičnosti moramo izbrati dovolj občutljive testne sisteme in v raziskavo vključiti bioteste z raznovrstnimi organizmi različnih trofičnih nivojev.

7 VIRI

- Aardema M.J., MacGregor J.T. 2002. Toxicology and genetic toxicology in the new era of 'toxicogenomics': impact of '-omics' technologies. *Mutation Research*, 499: 13-25
- Atlas R.M., Bartha R. 1998. *Microbial ecology: Fundamentals and applications*. 4th ed. Menlo Park, California, Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.: 511-535
- Avberšek M. 2004. Odkrivanje toksičnih učinkov onesnaževanja v Šaleški dolini z biotesti. Raziskovalna naloga. Velenje, samozaložba: 35 str.
- Békaert C., Rast C., Ferrier V., Bispo A., Jourdain M.J., Vasseur P. 1999. Use of *in vitro* (Ames and Mutatox tests) and *in vivo* (Amphibian Micronucleus test) assays to assess the genotoxicity of leachates from a contaminated soil. *Organic Geochemistry*, 30: 953-962
- Békaert C., Ferrier V., Marty J., Pfohl-Leszkowicz A., Bispo A., Jourdain M.J., Jauzein M., Lambalez-Michel L., Billard H. 2002. Evaluation of toxic and genotoxic potential of stabilized industrial waste and contaminated soils. *Waste Management*, 22: 241-247
- Blaise C., 2000. Canadian application of microbiotests to assess the toxic potential of complex liquid and solid media. V: *New microbiotests for routine screening and biomonitoring. Proceedings of the International Symposium on New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring, June 1-3, 1998, Brno, Czech Republic.* Persoone G., Janssen C., De Coen W. (eds.). New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers: 3-12
- Blinova I. 2000. Comparison of the sensitivity of aquatic test species for toxicity evaluation of various environmental samples. V: *New microbiotests for routine screening and biomonitoring. Proceedings of the International Symposium on New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring, June 1-3, 1998, Brno, Czech Republic.* Persoone G., Janssen C., De Coen W. (eds.). New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers: 217-220
- Cardozo T.R., Rosa D.P., Feiden I.R., Rocha J.A.V., Oliveira N.C.D., Pereira T.S., Pastoriza T.F., Motta Marques D.M.L., Lemos C.T., Terra N.R. 2006. Genotoxicity and toxicity assessment in urban hydrographic basins. *Mutation Research*, 603: 83-96
- Claxton L.D., Stewart-Houk V., Warren S. 2001. Methods for the spiral *Salmonella* mutagenicity assay including specialized applications. *Mutation Research*, 488: 241-257
- Černa M., Pastorkova A., Šmid J., Bavorova H., Ocadlikova D., Rössner P., Zavadil J. 1996. Genotoxicity of industrial effluents, river waters, and their fractions using the Ames test and *in vitro* cytogenetic assay. *Toxicology Letters*, 88: 191-197

- Černa M., Pastorkova A., Šmid J., Dobiaš L., Rössner P. 1998. The use of YG bacterial strains for the monitoring of drinking water mutagenicity. *Toxicology Letters*, 96/97: 335-339
- Dearfield K.L., Cimino M.C., McCarroll N.E., Mauer I., Valcovic L.R. 2002. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. *Mutation Research*, 251: 121-135
- Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23.October, 2000. Establishing a Framework for community action in the filed of water policy. 2000. Official Journal of the European Communities, L 327: 1-72
- Fent K. 2003. Ecotoxicological problems, associated with contaminated sites. *Toxicology Letters*, 140-141: 353-365
- Fent K. 2004. Ecotoxicological effects at contaminated sites. *Toxicology*, 205, 3:223-240
- Fernandez A., Tejedor C., Cabrera F., Chordi A. 1995. Assessment of toxicity of river water and effluents by the bioluminescence assay using *Photobacterium phosphoreum*. *Water Research*, 29, 5, 1281-1286
- Filipič M. 1995. Mutagenicity and toxicity of water extracts from the Sora river area. *Mutation Research*, 342: 1-8
- Flamand N., Meunier J.-R., Meunier P.-A., Agapakis-Causse C. 2001. Mini mutagenicity test: a miniaturized version of the Ames test used in a prescreening assay for point mutagenesis assessment. *Toxicology in Vitro*, 15: 105-114
- Fochtman P., 2000. Acute toxicity of nine pesticides as determined with conventional assays and alternative microbiotests. V: New microbiotests for routine screening and biomonitoring. Proceedings of the International Symposium on New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring, June 1-3, 1998, Brno, Czech Republic. Persoone G., Janssen C., De Coen W. (eds.). New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers: 233-241
- Gatehouse D.G., Wilcox P., Forster R., Rowland, I., Callender, R.D. 1990. Bacterial mutation assays. V: Basic mutagenicity tests. UKEMS recommended procedures. Report of the UKEMS Sub-committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Kirkland D.J. (ed.). Cambridge, Cambridge University Press: 13-61
- Guidelines for the testing of chemicals: Bacteria reverse mutation test guideline 471. 1997. Paris, Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD): 5 str.
- Guzzella L., Sora S. 1997. Mutagenic activity of lake water samples used as drinking water resources in northern Italy. *Water Research*, 32, 6: 1733-1742

- Health Effects Test Guidelines: OPPTS 870.5265, The *Salmonella typhimurium* reverse mutation assay EPA712-C-96-219, 1996. United States Environmental Protection Agency: 7 str.
- Helma C., Eckl P., Gottmann E., Kassie F., Rodinger W., Steinkeller H., Windpassinger C., Schulte-Hermann R., Knasmüller S. 1998. Genotoxic and ecotoxic effects of groundwaters and their relation to routinely measured chemical parameters. *Environmental Science Technology*, 32: 1799-1805
- Isomaa B., Lilius H. 1995. The urgent need for *in vitro* tests in ecotoxicology. *Toxicology in Vitro*, 9, 6: 821-825
- Ivanchenko O., Ilinskaya O., Skipina I., Kruglova Z., Petrov A. 2000. Genotoxicity monitoring of environmental samples in Tatarstan, Russia. V: New microbiotests for routine screening and biomonitoring. Proceedings of the International Symposium on New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring, June 1-3, 1998, Brno, Czech Republic. Persoone G., Janssen C., De Coen W. (eds.). New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers: 511-517
- Janssen C.R., Vangheluwe M., Van Sprang P. 2000. A brief review and critical evaluation of the status of microbiotests. V: New microbiotests for routine Screening and biomonitoring. Proceedings of the International Symposium on New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring, June 1-3, 1998, Brno, Czech Republic. Persoone G., Janssen C., De Coen W. (eds.). New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers: 27-33
- Jean G., Fruget J.F. 1994. Comparison of ecotoxicological and physico-chemical data by use of multivariate analyses and graphical displays. *Chemosphere*, 28, 12: 2249-2267
- Jha Awadhesh N. 2004. Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview. *Mutation Research*, 552: 1-17
- Joseph P. D., Gruz P., Nohmi T. 1997. Recent advances in the construction of bacterial genotoxicity assays. *Mutation Research*, 386: 1-23
- Kirkland D. J., Müller L. 2000. Interpretation of the biological relevance of genotoxicity test results: the importance of thresholds. *Mutation Research*, 464: 137-147
- Kirkland D., Pfuhrer S., Tweats D., Aardema M., Corvi R., Darroudi F., Elhajouji A., Glatt H., Hastwell P., Hayashi M., Kasper P., Kirchner S., Lynch A., Marzin D., Maurici D., Maunier J.-R., Mueller L., Nohynek G., Parry J., Parry E., Thybaud V., Tice R., van Benthem J., Vanparys P., White P. 2007. How to reduce positive results when undertaking *in vitro* genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: Report of an ECVAM Workshop. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 628: 31-55

- Kotnik J. 2002. Modelling of mercury geochemical cycle in Lake Velenje, Slovenia. *Environmental Modelling and Software*, 17: 593-611
- Kroeger M. 2006. How omics technologies can contribute to the 3R principles by introducing new strategies in animal testing. *Trends in Biotechnology*, 24, 8: 343-346
- Ku Warren W., Bigger A., Brambilla G., Glatt H., Gocke E., Guzzie P.J., Hakura A., Honma M., Martus H.-J., Obach R.S., Roberts S. 2007. Strategy for genotoxicity testing- Metabolic considerations. *Mutation Research*, 627: 59-77
- Lah B., Žinko B., Tišler T., Marinšek-Logar R. 2005a. Genotoxicity detection in drinking water by Ames test, Zimmermann test and comet assay. *Acta Chimica Slovenica*, 52, 3: 341-348
- Lah B., Avberšek M., Gorjanc G., Marnišek-Logar R. 2005b. Toxic and genotoxic evaluation of soil samples by bioassays. *Acta Agriculturae Slovenica*, 86, 1: 27-38
- Lah B., Žinko B., Narat M., Marinšek-logar R. 2005c. Monitoring of genotoxicity in drinking water using in vitro comet assay and Ames test. *Food Technology and Biotechnology*, 43, 2: 139-146
- 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.
- MacGregor J. T., Casciano D., Mueller L. 2000. Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. *Mutation Research*, 455: 3-20
- Manusadžianas L., Balkelyte L., Sadauskas K., Blinova I., Pöllumaa L., Kahru A. 2003. Ecotoxicological study of Lithuanian and Estonian wastewaters: selection of the biotests, and correspondence between toxicity and chemical-based indices. *Aquatic Toxicology*, 63: 27-41
- Marinšek Logar R. 2007. Zaključno poročilo o rezultatih raziskovalnega projekta L4-6222: biološki testi za ugotavljanje toksičnosti in genotoksičnosti vode, zemlje in hrane, ARRS. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Domžale: 13 str.
- Maron D.M., Ames B.N. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*, 113: 173-215

- Mazej Z. 2006. Fizikalno.kemijske analize vzorcev jezerskih voda. Velenje, ERICo-Inštitut za ekološke raziskave (osebni vir, 25. sep. 2006)
- McDaniels A.E., Reyes A.L., Wymer L.J., Rankin C.C., Stelma G.N.Jr. 1990. Comparison of the *Salmonella* (Ames) Test, Umu Test and the SOS Chromotests for detecting genotoxins. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 16: 204-215
- Ministrstvo za okolje in prostor Republike Slovenije, Agencija Republike Slovenije za okolje. 2000. Vode. Ljubljana.
<http://www.arso.gov.si/vode> (maj 2006): 1 str.
- Mitchell J.A.K., Burgess J.E., Stuetz R.M. 2002. Developments in ecotoxicity testing. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 1, 2: 169-198
- Monarca S., Zani C., Richardson S.D., Thruston Jr. A.D., Moretti M., Feretti D., Villarini M. 2004. A new approach to evaluating the toxicity and genotoxicity of disinfected drinking water. *Water Research*, 38: 3809-3819
- Mortelmans K., Zieger E. 2000. The Ames *Salmonella* microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, 455: 29-60
- Neumann N.F., Galvez F. 2002. DNA microarrays and toxicogenomics: application for ecotoxicology? *Biotechnology Advances*, 20, 5-6: 391-419
- Nicolau A., Dias N., Mota M., Lima N. 2001. Trends in the use of protozoa in the assessment of wastewater treatment. *Research in Microbiology*, 152, 7:621-360
- Ohe T., White P.A., DeMarini D.M. 2003. Mutagenic characteristics of river waters flowing through large metropolitan areas in North America. *Mutation Research*, 534: 101-112
- Ohe T., Watanabe T., Wakabayashi K. 2004. Mutagens in surface waters: a review. *Mutation Research*, 567: 109-149
- Olden K. 2004. Genomics in environmental health research-opportunities and challenges. *Toxicology*, 198: 19-24
- Orphanides G. 2003. Toxicogenomics: challenges and opportunities. *Toxicology Letters*, 140-141: 145-148
- Park J. H., Lee B. J., Lee S. K., Kim K., Lee K. H., Che J. H., Kang K. S., Lee Y. S. 2000. Genotoxicity of drinking water from three Korean cities. *Mutation Research*, 466: 173-178

- Pauli W., Berger S., 2000. A new Toxkit microbiotest with the protozoan ciliate *Tetrahymena*. V: New microbiotests for routine screening and biomonitoring. Proceedings of the International Symposium on New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring, June 1-3, 1998, Brno, Czech Republic. Persoone G., Janssen C., De Coen W. (eds.). New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers: 169-176
- Pereira T.S., Rocha J.A.V., Duccatti A., Silveira G.A., Pastoriza T.F., Bringuenti L., Vargas V.M.F. 2007. Evaluation of mutagenic activity in supply water at three sites in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mutation Research*, 629: 71-80
- Pollack N., Cunningham A.R., Rosenkranz H.S. 2003. Environmental persistence of chemicals and their carcinogenic risks to humans. *Mutation Research*, 528: 81-91
- Poročilo o kakovosti jezer za leto 2005. 2006. Ljubljana, Ministrstvo za okolje in prostor Republike Slovenije, Agencija Republike Slovenije za okolje
http://www.arso.gov.si/vode/jezera/jezera_2005.pdf (junij 2007): 187 str.
- Program spremljanja ekološkega in kemijskega stanja jezer za leto 2007, 2007. Ljubljana, Ministrstvo za okolje in prostor Republike Slovenije, Agencija Republike Slovenije za okolje
http://www.arso.gov.si/vode/jezera/programi/program_jezera_2007.pdf (junij 2007): 17 str.
- Protoxkit FTM, Standard Operational Procedure, Freshwater Toxicity Test with a Ciliate Protozoan. 2006. Nazareth, Belgium, Microbiotests Inc.: 18 str.
- Rehana Z., Malik A., Ahmad M. 1995. Mutagenic activity of the ganges water with special reference to the pesticide pollution in the river between Kachla to Kannauj (U.P.), India. *Mutation Research*, 343: 137-144
- Reifferscheid G., Grummt T. 2000. Genotoxicity in German surface waters – results of collaborative study. *Water, Air and Soil Pollution*, 123: 67-79
- Rojas E., Lopez M.C., Valvedere M. 1999. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography B*, 722: 225-254
- Rojičkova-Padrtova R., Maršalek B., Holoubek I. 1998. Evaluation of alternative and standard toxicity assays for screening of environmental samples: selection of an optimal test battery. *Chemosphere*, 37, 3: 495-507

- Rojičkova-Padrtova R., Maršalek B. 2000. Selection of a battery of microbiotests for various purposes- the Czech experience. V: New microbiotests for routine screening and biomonitoring. Proceedings of the International Symposium on New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring, June 1-3, 1998, Brno, Czech Republic. Persoone G., Janssen C., De Coen W. (eds.). New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers: 95-101
- Siddiqui A.H., Ahmad M. 2003. The *Salmonella* mutagenicity of industrial, surface and ground water samples of Aligarh region of India. *Mutation Research*, 541: 21-29
- Schultz T.W. 1997. Tetratox: *Tetrahymena pyriformis* population growth impairment endpoint- a surrogate for fish lethality. *Toxicology Methods*, 7: 289-309
- Schultz T.W. 1999. Structure-Toxicity relationships for benzenes evaluated with *Tetrahymena pyriformis*. *Chemical Research in Toxicology*, 12, 12: 1262-1267
- Snyder L. 2003. Molecular genetics of bacteria. 2nd ed. Washington, ASM: 566 str.
- Stahl R.G.Jr. 1991. The genetic toxicology of organic compounds in natural waters and wastewaters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 22: 94-125
- Stewart Houk V. 1992. The genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutation Research*, 277: 91-138
- Shen J.H., Gutendorf B., Vahl H.H., Shen L., Westendorf J. 2001. Toxicological profile of pollutants in surface water from an area in Taihu lake, Yengtze Delta. *Toxicology*, 166: 71-78
- Šalej M. 2002. Odnos prebivalcev obremenjenih območij do okolja in okoljskih problemov na vzorčnih primerih Šaleške doline in Zasavja. V: Geografija in njene aplikativne možnosti. Drugi Melikovi geografski dnevi, Portorož, 27. in 28. september 2002. Ljubljana, Filozofska fakulteta Univerze v Ljubljani, Oddelek za geografijo: 61-62
- Šterbenk E., Ramšak R. 1999. Pokrajinski vidiki rabe premogovniškega ugrezninskega Velenjskega jezera. V: Sonaravni razvoj v slovenskih Alpah in sosedstvu. Prvi Melikovi geografski dnevi, Kranjska Gora, 5.-7. november 1998. Ljubljana, Filozofska fakulteta Univerze v Ljubljani, Oddelek za geografijo: 215-223
- Šterbenk E. 1999. Šaleška jezera. Vpliv premogovništva na pokrajinsko preobrazbo Šaleške doline. Velenje, Založništvo Pozoj Velenje: 191 str.

- Šterbenk E. 2004. Trajnostna in sonaravna raba vodnih virov v porečju Pake V: Šaleška in Zgornja Savinjska dolina. 19. zborovanje slovenskih geografov, 21.-23. oktober 2004. Velenje, Inštitut za ekološke raziskave: 55 str.
- Test mutagenosti *Salmonella typhimurium*: Standardni operativni postopek. 2003. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije, Laboratorij za ekotoksikologijo in gensko toksikologijo: 17 str.
- Thybaud V., Aardema M., Clements J., Dearfield K., Galloway S., M. Hayashi, Jacobson-Kram D., Kirkland D., MacGregor J.T., Marzin D., Ohya W., Schuler M., Suzuki H. Zeiger E. 2007. Strategy for genotoxicity testing: Hazard identification and risk assessment in relation to *in vitro* testing. *Mutation Research*, 627: 41-58
- Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayasi 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
- Timbrell J. 2000. Principles of biochemical toxicology. 3rd ed. London, Taylor and Francis: 394 str.
- Uredba o kemijskem stanju površinskih voda. 2002. Uradni list Republike Slovenije, 12, 11: 818-822
- Umbuzeiro G. A., Roubicek D. A., Sanchez P.S., Sato M.I.Z. 2001. The *Salmonella* mutagenicity assay in a surface water quality monitoring program based on a 20-year survey. *Mutation Research*, 491: 119-126
- Umbuzeiro G. A., Roubicek D. A., Rech C. M. 2004. Investigating the sources of the mutagenic activity found in a river using *Salmonella* assay and different water extraction procedures. *Chemosphere*, 54: 1589-1597
- Vargas V.M.F., Motta V.E.P., Henriques J.A.P. 1993. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. *Mutation Research*, 319: 31-45
- Venitt S., Parry J.M., 1984. Background to mutagenicity testing. V: Mutagenicity testing: A practical approach. Venitt S., Parry J.M. (eds). Washington DC, IRL Press: 1-24
- Wadhia K., Thompson K.C. 2007. Low cost ecotoxicity testing of environmental samples using microbiotests for potential implementation of the water framework directive. *Trends in Analytical Chemistry*, 26, 4, 300-307
- White P.A., Rasmussen J.B. 1998. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. *Mutation Research*, 410: 223-236

- Wolska L., Sagajdakow A., Kuczyńska A., Namieśnik J. 2007. Application of ecotoxicological studies in integrated environmental monitoring: Possibilities and problems. *Trends in Analytical Chemistry*, 26, 4, 332-344
- Wu J. 2005. Assesing surface water quality of the Yangtze Estuary with genotoxicity data. *Marine Pollution Bulletin*, 50, 1661-1667
- Žinko B. 2004. Ugotavljanje genotoksičnosti pitne vode iz treh zajetij na območju Ljubljane. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 67 str.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Romani Marinšek Logar za strokovno pomoč in spodbudne besede med nastajanjem moje diplomske naloge.

Prof. dr. Ines Mandić-Mulec se zahvaljujem za strokovno recenzijo dela.

Dr. Barbari Lah se zahvaljujem za vso pomoč in potrpežljivost pri uvajanju v laboratorijsko delo. Najlepša hvala tudi Marti Majdič, ki se ni jezila name zaradi razbitih epruvetk.

Zahvaljujem se moji Mausli za vse ure skupnega učenja, nepozabna študentska leta, neskončne kavice in pogovore o življenju nasploh.

Bebi, ker me je prenašal med prepogostimi napadi slabe volje in me skril v žličko, kadar mi je bilo težko.

Iztoku, ker verjame vame in mi pomaga pri nadeljevanju študija. Hvala za vse puričje šale in hvala, ker si najboljši brat.

Najbolj pa se zahvaljujem svoji mami, ki me že vsa leta sprejema tako kot sem, mi pomaga in me ima rada. Brez nje mi ne bi uspelo.

PRILOGE

Priloga A: Fizikalno-kemijske analize vzorcev jezerske vode (Mazej, 2006)

Lokacija/ Parameter	Družmirsko jezero, Vj1	Velenjsko jezero- nasip pepela, Vj2	Velenjsko jezero – čolnarna, Vj3	Škalsko jezero, Vj4
Meritve na terenu				
motnost (FTU)	7	14	7	15
redoks potencial (mV)	484	489	483	487
pH	8,60	8,28	8,26	8,29
temperatura (°C)	17,6	18,2	17,3	17,5
Analize vode				
TOC (mgC/L)	13,1	14,5	16,4	17,7
DOC (mgC/L)	8,97	9,97	10,9	11,8
amonijev dušik (mg N/L)	0,16	0,16	0,22	0,22
nitratni dušik (mg-N/L)	0,55	1,02	1,04	0,79
nitritni dušik (mg N/L)	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3
sulfat (mg/L)	38,5	445	8,73	28,5
klorid (mg/L)	5,84	29,6	30,1	12,4
celotni fosfor (mg/L)	0,05	0,03	0,04	0,03
kalcij – Ca (mg/L)	52,4	211	214	67,6
magnezij – Mg (mg/L)	14,0	15,2	14,2	20,8
natrij- Na (mg/L)	6,66	59,2	58,7	8,32
kalij – K (mg/L)	2,31	42,8	42,4	2,34
Težke kovine				
arzen raztopljeni – As (µg/L)	<0,5	1,3	1,4	0,5
svinec raztopljeni – Pb (µg/L)	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
živo srebro – Hg (µg/L)	<0,20	<0,20	<0,20	<0,20
kadmij raztopljeni Cd (µg/L)	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Nikelj raztopljeni – Ni (µg/L)	<1,0	1,5	1,7	<1,0
cink raztopljeni – Zn (µg/L)	<2,0	18,1	3,3	<2,0
baker raztopljeni – Cu (µg/L)	< 1,0	1,1	1,3	<1,0
Krom raztopljeni – Cr (µg/L)	<5,0	<5,0	<5,0	<5,0
Policiklični aromatski ogljikovodiki (PAH)				
benzo (a) piren (µg/L)	<0,04	<0,04	<0,04	<0,04
fluorantren (µg/L)	<0,04	<0,04	<0,04	<0,04
benzo (b) fluorantren (µg/L)	<0,04	<0,04	<0,04	<0,04
benzo (k) fluorantren (µg/L)	<0,04	<0,04	<0,04	<0,04
benzo (g,h,i) perilen (µg/L)	<0,04	<0,04	<0,04	<0,04
indeno (1,2,3,c,d) piren (µg/L)	<0,04	<0,04	<0,04	<0,04
naftalen (µg/L)	<0,04	<0,04	<0,04	<0,04
acenaftilen (µg/L)	<0,04	0,04	<0,04	<0,04
acenaften (µg/L)	<0,04	<0,04	<0,04	<0,04
fluoren (µg/L)	<0,04	<0,04	<0,04	<0,04
phenanthrene (µg/L)	<0,04	<0,04	<0,04	<0,04
antracen (µg/L)	<0,04	<0,04	<0,04	<0,04
piren (µg/L)	<0,04	<0,04	<0,04	<0,04

benzo (a) antracen (µg/L)	<0,04	<0,04	<0,04	<0,04
crysene (µg/L)	<0,04	<0,04	<0,04	<0,04
dibenzo (a,h) antracen (µg/L)	<0,04	<0,04	<0,04	<0,04

Priloga B: Rezultati referenčnega testa pri prvi ponovitvi biotesta Protoxkit FTM
 (48 urna inkubacija)

kalijev bikromat (K ₂ Cr ₂ O ₇)	oznaka kivete	koncentracija vzorca (mg/L)	% inhibicije	EC50
	R0	kontrola	/	
	R1	56	92,66	11,36 mg/L
	R2	32	92,48	
	R3	18	90,03	
	R4	10	50,52	
	R5	5,6	7,34	

Opomba: Po navodilih proizvajalca je 24 h- EC50 za K₂Cr₂O₇ med 15 in 24 mg/l

Preglednica C: Rezultati referenčnega testa pri drugi ponovitvi biotesta Protoxkit FTM
(36 urna inkubacija)

	oznaka kivete	koncentracija vzorca	% inhibicije	EC50
kalijev bikromat (K ₂ Cr ₂ O ₇)	R0	kontrola		/
	R1	56 mg/L	75,25	20,56 mg/L
	R2	32 mg/L	67,87	
	R3	18 mg/L	50,82	
	R4	10 mg/L	30,66	
	R5	5,6 mg/L	2,30	

Opomba: Po navodilih proizvajalca je 24 h- EC50 za K₂Cr₂O₇ med 15 in 24 mg/l