

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Nataša LINDIČ

**UGOTAVLJANJE GENOTOKSIČNOSTI JEZERSKIH VODA V
ŠALEŠKI DOLINI S KOMETNIM TESTOM NA PRAŽIVALI
*Tetrahymena thermophila***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**GENOTOXICITY ASSESSMENT OF LAKE WATER SAMPLES
FROM ŠALEK VALLEY USING COMET ASSAY IN PROTOZOAN
*Tetrahymena thermophila***

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo predstavlja zaključek univerzitetnega medoddelčnega dodiplomskega študija mikrobiologije. V celoti je bilo opravljeno na Katedri za mikrobiologijo in mikrobnobiotehnologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete v Domžalah.

Študijska komisija univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije je dne 27.05.2005 odobrila temo in naslov diplomske naloge in za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Romano Marinšek Logar.

Mentorica: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR

Recezentka: 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

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

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Nataša Lindič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 504.4.064(285.2) + 615.9: 579.25/.26 (043) = 863
KG ekološka mikrobiologija/varstvo okolja/Slovenija/Šaleška dolina/jezera/jezerske vode/biotesti/genotoksičnost/kometni test/*Tetrahymena thermophila*
AV LINDIČ, Nataša
SA MARINŠEK LOGAR, Romana (mentorica)/ MANDIĆ MULEC, Ines (recezentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2008
IN UGOTAVLJANJE GENOTOKSIČNOSTI JEZERSKIH VODA V ŠALEŠKI DOLINI S KOMETNIM TESTOM NA PRAŽIVALI *Tetrahymena thermophila*
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP IX, 47 str., 21 pregl., 6 sl., 104 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Nprestano spremljanje stanja in procesov v okolju zagotavlja odkrivanje in obvladovanje onesnaženosti okolja in s tem škodljivih vplivov na živa bitja. Stalni monitoring kakovosti jezerskih voda v Sloveniji temelji predvsem na spremljanju fizikalnih in kemijskih parametrov. S fizikalno-kemijskimi analizami pa ne moremo dokazati prisotnosti onesnaževal, katerih koncentracije so pod mejo zaznave, zanemarimo pa tudi medsebojni vpliv posameznih sestavin v vzorcu, bioaktivacijo in biološke učinke onesnaževal na žive organizme. Celotno aktivnost mešanice snovi v vzorcu pa lahko izmerimo z biološkimi testi za toksičnost in genotoksičnost, s katerimi bi bilo priporočljivo dopolniti rezultate fizikalno-kemijskih analiz. V tej raziskavi smo ugotavljali genotoksičnost vzorcev jezerskih voda v Šaleški dolini z alkalno različico kometnega testa z migetalkarjem *Tetrahymena thermophila*, ki smo jo za ta namen ustrezno prilagodili. Genotoksičnost smo dokazali za tri vzorce jezerskih voda od štirih. Menimo, da smo genotoksičnost dokazali zaradi prisotnosti snovi, ki jih s fizikalno-kemijskimi analizami nismo zajeli, zaradi medsebojnega delovanja določenih snovi v jezerskih vodah, ali pa zaradi snovi, prisotnih v jezerskih vodah v povečanih koncentracijah, ki pa kljub temu niso presegale po zakonu določenih mejnih vrednosti. Kometni test se je v preizkušeni prilagojeni obliki izkazal kot dovolj občutljiv za vrednotenje genotoksičnosti vzorcev jezerskih voda. Končne zaključke o genotoksičnosti testiranih vzorcev jezerskih voda lahko podamo le, če izvedemo večje število biotestov, ki vključujejo zaznavanje različnih poškodb DNK in organizme iz različnih trofičnih nivojev.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 504.4.064(285.2) + 615.9: 579.25/.26 (043) = 863
CX ecological microbiology/environmental protection/Slovenia/Šalek valley/lakes/lake waters/biotests/genotoxicity/comet assay/*Tetrahymena thermophila*
AU LINDIČ, Nataša
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 2008
TI GENOTOXICITY ASSESSMENT OF LAKE WATER SAMPLES FROM ŠALEK VALLEY USING COMET ASSAY IN PROTOZOAN *Tetrahymena thermophila*

DT Graduation thesis (University studies)
NO IX, 47 p., 21 tab., 6 fig., 104 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Environmental monitoring plays an important role in detecting and controlling environmental pollution and its harmful effects on organisms. Regular monitoring of the quality of Slovenian waters is based mainly on monitoring of physicochemical parameters. Physicochemical analyses do not detect the presence of low concentrations of pollutants and also neglect interactions between sample compounds, bioactivation and biological effects on live organisms. Complete activity of mixture of compounds in the investigated sample can be measured by biological toxicity and genotoxicity tests with which results of physicochemical analyses should be supplemented. In the present thesis genotoxicity of water samples from the lake of the Šalek valley was evaluated. Using the adjusted alcalic version of comet assay on ciliate *Tetrahymena thermophila* in three out of four lake water samples genotoxic effects were detected. This suggests that responsible for the genotoxic effects were either those compounds that were not detected by physicochemical analyses, those that were present below the critical concentrations or those that interacted in the examined lake water samples. We conclude that the applied version of the comet assay is sensitive enough for the genotoxicity assessment of lake water samples. However, a battery of tests that measure different DNK adducts and employ organisms from different trophic levels would be preferred to make final conclusions on genotoxic potential of the given samples.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli	IX
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ONESNAŽEVANJE OKOLJA	3
2.1.1 Šaleška dolina	3
2.1.1.1 Sanacija Šaleške doline	4
2.1.1.2 Vzorčna jezera v Šaleški dolini	4
2.1.2 Spremljanje onesnaženosti jezer v Sloveniji	5
2.1.2.1 Spremljanje stanja jezer v Šaleški dolini	6
2.2 EKOTOKSIKOLOGIJA	8
2.2.1 Toksičnost	8
2.2.2 Genotoksičnost	9
2.2.2.1 Biotesti za monitoring genotoksičnosti	10
2.2.2.2 Kometni test	11
2.2.3 Interpretacija in biološki pomen rezultatov biotestov	13
2.2.3.1 Izbira nabora biotestov za biomonitoring	13
3 MATERIAL IN METODE	15
3.1 ODVZEM VZORCEV	16
3.2 ZALOŽNA KULTURA PRAŽIVALI <i>T. thermophila</i>	16
3.3 PRILAGAJANJE POSTOPKA KOMETNEGA TESTA ZA TESTIRANJE GENOTOKSIČNOSTI VZORCEV JEZERSKIH VODA	17
3.3.1 Ugotavljanje starosti kulture, pri kateri je jedrna DNK najbolj stabilna	17
3.3.2 Prilagajanje gojišča za testiranje genotoksičnosti vzorcev jezerskih voda	17
3.4 UGOTAVLJANJE GENOTOKSIČNOSTI VZORCEV JEZERSKIH VODA S PRILAGOJENIM POSTOPKOM KOMETNEGA TESTA	19
3.4.1 Starost kulture praživali <i>T. thermophila</i> za inokulacijo prilagojenega gojišča	19
3.4.2 Izpostavitve celic praživali v prilagojenem gojišču za testiranje genotoksičnosti jezerskih voda s kometnim testom	19
3.4.2.1 Prilagojeno gojišče za negativno in pozitivno kontrolo	19
3.4.2.2 Prilagojeno gojišče za testiranje genotoksičnosti vzorcev	20
3.4.3 Preverjanje viabilnosti kulture praživali <i>T. thermophila</i>	20

3.4.4	Priprava kulture praživali <i>T. thermophila</i> za vklapljanje v gele na objektnikih	20
3.4.5	Izvedba kometnega testa	20
3.4.5.1	Priprava gelov na mikroskopskih objektnikih	21
3.4.5.2	Negativna in pozitivna kontrola	21
3.4.5.3	Postopek kometnega testa	22
3.4.5.4	Odčitavanje rezultatov	22
3.4.6	Statistična analiza rezultatov kometnega testa	23
4	REZULTATI	24
4.1	PRILAGODITEV GOJIŠČA ZA PRAŽIVAL <i>T. thermophila</i>	24
4.1.1	Starost kulture praživali za inokulacijo prilagojenega gojišča	24
4.1.2	Viabilnost kulture praživali <i>T. thermophila</i> v kandidatnih gojiščih	25
4.1.3	Preverjanje genotoksičnosti kandidatnih gojišč za negativno in pozitivno kontrolo	26
4.2	REZULTATI KOMETNEGA TESTA Z VZORCI JEZERSKIH VODA	27
4.2.1	Viabilnost kulture praživali <i>T. thermophila</i>	27
4.2.2	Genotoksičnost vzorcev jezerskih voda	27
4.3	PRILAGOJENI POSTOPEK KOMETNEGA TESTA S PRAŽIVALJO <i>T. thermophila</i> , KI JE USTREZEN ZA DOKAZOVANJE GENOTOKSIČNOSTI V JEZERSKIH VODAH	30
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	31
6	POVZETEK	37
7	VIRI	39
8	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Fizikalno-kemijske analize vzorcev jezerskih voda (Mazej, 2006)	7
Preglednica 2 : Bogato gojišče za pražival <i>T. thermophila</i>	16
Preglednica 3: Raztopina soli 1	18
Preglednica 4: Raztopina soli 2	18
Preglednica 5: Fiziološka raztopina	18
Preglednica 6: 10 mM raztopina Tris HCl	18
Preglednica 7: 10 mM raztopina Tris HCl z železom	18
Preglednica 8: 10 mM raztopina Tris HCl s solmi	18
Preglednica 9: 10 mM raztopina Tris HCl z 0,2 % deležem glukoze	18
Preglednica 10: 10 mM raztopina Tris HCl z 0,5 % deležem glukoze	18
Preglednica 11: 10 mM raztopina Tris HCl s solmi in 0,2 % deležem glukoze	18
Preglednica 12: 10 mM raztopina Tris HCl s solmi in 0,5 % deležem glukoze	19
Preglednica 13: Prilagojeno gojišče za negativno in pozitivno kontrolo	19
Preglednica 14: Prilagojeno gojišče za testiranje genotoksičnosti vzorcev	20
Preglednica 15: Raztopina za alkalno lizo	20
Preglednica 16: Elektroforetski puffer	21
Preglednica 17: Koncentrirana raztopina K-Na pufra PBS	21
Preglednica 18: Viabilnost kulture praživali v gojiščih različne sestave	25
Preglednica 19: Viabilnost kulture praživali v izbranem gojišču	27
Preglednica 20: Osnovna statistika za poškodbe jedrne DNK (OTM) pri vzorcih jezerskih voda na predelanih podatkih–brez 1. ponovitve	27
Preglednica 21: Osnovna statistika za poškodbe jedrne DNK (OTM) pri vzorcih jezerskih voda na predelanih podatkih–brez 1. ponovitve in vzvodnih točk pri vzorcu V3	28

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Shema poskusov	15
Slika 2: Pogovorno okno programa za analizo slike	22
Slika 3: Porazdelitev vrednosti OTM v odvisnosti od starosti kulture	24
Slika 4: Porazdelitev vrednosti OTM v odvisnosti od sestave gojišča	26
Slika 5: Porazdelitve vrednosti OTM za genotoksični učinek vzorcev jezerskih voda	29
Slika 6: Postopek testiranja genotoksičnosti vzorcev jezerskih voda	30

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AOX	<i>adsorbable organic halogens</i> (vrednost adsorblijivih organskih halogenov)
ARSO	Agencija Republike Slovenije za okolje
BPK	biološka potreba po kisiku
DMSO	dimetilsulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kislina
DOC	<i>dissolved organic carbon</i> (raztopljeni organski ogljik)
ERICo	Inštitut za ekološke raziskave, Velenje
EU	Evropska unija
GNU	<i>GNU's Not Unix</i> (GNU ni UNIX)
KPK	kemijska potreba po kisiku
LMP agaroz	<i>low melting point</i> (agaroz z znižano temperaturo želiranja (30°C))
NMP agaroz	<i>normal melting point</i> (agaroz z običajno temperaturo želiranja (36°C))
PAH	<i>polycyclic aromatic hydrocarbons</i> (policiklični aromatski ogljikovodiki)
PBS	kalijski-natrijev fosfatni pufer
OTM	<i>Olive tail moment</i> (repni moment po Olivu)
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktivne kisikove zvrsti)
TEŠ	Termoelektrarna Šoštanj
TOC	<i>total organic carbon</i> (totalni organski ogljik)
<i>T. thermophila</i>	<i>Tetrahymena thermophila</i>

1 UVOD

Voda je preprosta kemijska spojina, na kateri temelji obstoj življenja. Pokriva sedem desetih zemeljske površine in sestavlja tri četrtine človeškega telesa. S stalnim onesnaževanjem pa se zmanjšuje uporabnost vode ne le za pitje, temveč tudi za druge namene. Onesnaževanje ima škodljive vplive na okolje, rastline, živali in na zdravje in kvaliteto življenja ljudi. Onesnaženje je lahko naravnega izvora ali pa posledica človekovih dejavnosti, ki naraščajo z naraščanjem števila prebivalstva na Zemlji. Zaradi pospešenega razvoja industrije, kmetijstva in urbanizacije, naraščanja produkcije energije in uporabe motornih vozil narašča količina organskih snovi, različnih kemijskih spojin, radioaktivnih in drugih nevarnih snovi (težke kovine, pesticidi, itd.), ki pogosto končajo v vodnih okoljih.

Osnovni cilj vseh študij o stanju in onesnaževanju okolja je oceniti vpliv različnih onesnaževal na žive organizme. Monitoring kakovosti površinskih voda v Sloveniji temelji na fizikalno-kemijskih in bioloških analizah. Fizikalno-kemijske analize vključujejo meritve posameznih anorganskih in organskih snovi in primerjavo izmerjenih vrednosti z maksimalnimi dovoljenimi vrednostmi za posamezne parametre. Vendar pa s temi analitskimi metodami ne moremo zaznati snovi, katerih koncentracije so pod mejo zaznave, in zanemarimo snovi, ki v analizo niso vključene. Poleg tega ne moremo izmeriti medsebojnega vpliva posameznih snovi v vzorcu in njihovih bioloških učinkov na žive organizme, ter bioaktivacije in biodostopnosti snovi. Živi organizmi so ogroženi zaradi direktnega toksičnega in genotoksičnega delovanja onesnaževal in zaradi kopičenja in prenosa onesnaževal preko prehranjevalne verige. Škodujejo jim tako visoke koncentracije onesnaževal z nizko toksičnostjo kot nizke koncentracije z visoko toksičnostjo, najbolj pa dolgotrajna izpostavljenost. Odgovor na celokupno biološko aktivnost mešanice snovi v vzorcu nam dajo biotesti, ki zaznajo prisotnost škodljivih snovi v okolju in določijo njihovo kvantitativno toksičnost ali genotoksičnost v vzorcu. Pri nas ekotoksikološki testi po zakonu še niso obvezni. Zaradi neusklajenosti rezultatov kemijsko-fizikalnih analiz z rezultati biotestov bi bilo potrebno v monitoring površinskih voda vključiti tudi poceni in hitre bioteste za genotoksičnost, kjer so biomarker genotoksičnosti različne vrste poškodb DNK, saj bi tako lahko pravočasno zaznali in preprečevali nevarna onesnaženja oziroma odločali o ekoloških sanacijah.

1.1 NAMEN DELA

V delu smo želeli preveriti primernost kometnega testa s praživaljo *Tetrahymena thermophila* za ugotavljanje genotoksičnosti v jezerskih vodah Šaleške doline. Želeli smo tudi ugotoviti, ali fizikalno-kemijski parametri odražajo stopnjo učinkov na dednino oz. ali imajo vzorci genotoksičen vpliv na izbrane testne organizme.

Delo je bilo opravljeno v okviru aplikativnega projekta L4-6222 Biološki testi za ugotavljanje toksičnosti in genotoksičnosti vode, zemlje in hrane (vodja projekta prof. dr. R. Marinšek Logar).

1.2 HIPOTEZE

Predvidevamo, da bomo z izbranim biotestom lahko zanesljivo dokazali genotoksičnost ali njeno odsotnost v vzorcih voda šaleških jezer s praživaljo *T. thermophila*. Pričakujemo, da bomo s kometnim testom s *T. thermophila* dobili pozitivne rezultate vsaj v tistih vzorcih, ki presegajo maksimalne dovoljene koncentracije toksičnih/genotoksičnih spojin, verjetno pa tudi v nekaterih vzorcih, katerih fizikalno-kemijski parametri ne presegajo dovoljenih vrednosti.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ONESNAŽEVANJE OKOLJA

Kvaliteta človeškega življenja je direktno in indirektno odvisna od okolja. Onesnaževanje okolja je neposredno ali posredno vnašanje snovi ali energije v zrak, vodo ali tla ali povzročanje odpadkov in je posledica človekove dejavnosti (Zakon o varstvu okolja, 2004). Naravno okolje je bilo in se še onesnažuje z fizikalnimi, kemijskimi in biološkimi faktorji, zaradi česar je moteno ekološko ravnovesje. Število motečih procesov je še posebej naraslo v drugi polovici 20. stoletja zaradi rasti človeške populacije, dinamike razvoja industrije, produkcije energije, prehranskih zahtev in povečane uporabe kemikalij v agrikulturni. Vodno okolje je pogosto končni prejemnik antropogenih onesnaževal (Wolska in sod., 2002; Jha, 2004). Površinske vode so kompleksne mešanice, ki lahko vsebujejo mnogo različnih onesnaževal različnih izvorov, ki se med sabo razlikujejo v svojih fizikalnih in kemijskih lastnostih (Wolska in sod., 2002), lahko pa imajo tudi toksične in/ali genotoksične učinke in so zato potencialno nevarni za ljudi in okolje. Mnogo toksinov in genotoksinov lahko nastane tudi s kemijsko in biološko transformacijo po izpustu v okolje (Žegura in sod., 2006). Onesnaževala se lahko prenašajo skozi prehranjevalno verigo in tako negativno učinkujejo na zdravje ljudi (Chen in sod., 2004).

Spremembe v okolju lahko spremljamo z naslednjimi postopki:

(a) direktno z merjenjem stopenj onesnaževal ali indikatorjev na večjih področjih (kisik, ogljikov dioksid, škodljivi plini, težke kovine, PAH, ...)

(b) z uporabo indikatorjev biocenoz (izračun razmerja klorofila in bakterijske biomase, merjenje količine pigmenta v celicah modro zelenih alg, vsebnost hemoglobina v živalski krvi (pokazatelj kisikovih razmer), ...)

(c) z uporabo bioindikatorjev: z rutinskimi opazovanji izbrane populacije organizmov, ki na osnovi njene prisotnosti, odsotnosti ali spremembe omogočajo oceno določenih fizikalnih in kemičnih elementov okolja (pH, KPK, BPK)

(d) s pomočjo biološkega testiranja (Wolska in sod., 2002; Van der Oost in sod., 2003).

Kemijske analize, ki se osredotočajo le na ugotavljanje posameznih komponent v vzorcu, dobro dopolnjujejo biotesti, v katerih se kot indikatorji uporabljajo živi organizmi, ki povedo, ali je okolje toksično za žive organizme (Wolska in sod., 2007).

2.1.1 Šaleška dolina

Šaleška dolina leži v predalpski severovzhodni Sloveniji med Kamniško-Savinjskimi Alpami in Karavankami v Velenjski kotlini. V pliocenu je kotlino zalivalo jezero, v katerem je nastajal lignit (Ževart, 1999).

Območje, na katerem danes ležijo jezera v Šaleški dolini, se je zaradi izkopavanja premoga v velenjskem premogovniku začelo pogrezati že leta 1887. Nad plastjo lignita so sipki, mehki in neodporni pliocenski kvartarni sedimenti (gline, glinovci in peski), ki se zaradi podzemeljskega odkopavanja pogrezajo. Večinoma so vodotesni, zato voda, ki zalije ugreznine, ne vdre v premogovnik. Tako so jezera nastala in se ohranila (Šterbenk, 1999).

V centru doline je mesto Velenje, kjer se nahaja največji slovenski rudnik premoga (lignita). Drugo največje mesto v Šaleški dolini je Šoštanj, kjer se v Termoelektrarni Šoštanj (TEŠ) proizvede do 30 % slovenske električne moči (Kotnik in sod., 2002). Poleg teh dveh vodilnih gospodarskih dejavnosti so se razvile še proizvodnja gospodinjskih aparatov Gorenje, gradbena industrija Vegrad, kovinsko-predelovalna industrija, kmetijstvo ter ostale človekove dejavnosti, posledica pa je kopičenje okoljskih problemov (Ževart, 1999; Šterbenk, 1999).

TEŠ uporablja samo lignit iz velenjskega rudnika. Obratuje že več kot 40 let in onesnažuje zrak z žveplovim dioksidom (SO₂), dušikovimi oksidi (NO_x), ogljikovim monoksidom (CO), ogljikovim dioksidom (CO₂), elementi v sledovih in prašnimi delci, sekundarno pa nastaja ozon. Problemi se pojavljajo tudi zaradi onesnaževanja okoliških voda in degradacije zemljišča zaradi odlaganja pepela in žlindre. Vse do leta 1983 sta se pepel in žlindra odlagala v Velenjskem jezeru, zato sta se jezero in bližnja reka Paka zastrupila in postala neprimerna za kakršnokoli aktivnost (Oman in sod., 2002; Lah, 2006).

2.1.1.1 Sanacija Šaleške doline

Inštitut ERICo Velenje je za območje Šaleške doline izdelal programe sanacije za vode, zrak in tla. Od leta 1994 so bili izvedeni ali se še izvajajo številni ukrepi za zmanjševanje vplivov na okolje, kot je namestitev čistilnih naprav, zaprti krogotoki vode, posodobitev proizvodnih postopkov, izgrajena so bila kanalizacijska omrežja v večini naselij, krožna kanalizacija v pojezerju, poteka tudi spremljanje kakovosti vodotokov in jezerskih voda ter ureditev ali sanacija degradiranih območij (Območni razvojni program ..., 2006; Šterbenk, 2006).

V devetdesetih letih so v TEŠ uvedli številne ukrepe za zmanjšanje emisij dušikovih in žveplovih oksidov, uredili zaprt sistem tehnoloških in sanitarnih vod in deponijo za sadro, zamenjali elektrofiltre in posodobili naprave (Poročilo o proizvodnji ..., 2006). Zaznali so precejšnje zmanjšanje onesnaževanja zraka, ter posledično tudi prsti in voda. S tem je postala Šaleška dolina šolski primer dobre in ustrezno izvedene ekološke sanacije (Šalej, 2005). Iz ekološkega vidika TEŠ so bili problemi emisij v večini rešeni, vendar pa škoda na okolju še ni bila popolnoma odpravljena (Oman in sod., 2002).

2.1.1.2 Vzorčna jezera v Šaleški dolini

Šaleška ugrezninska jezera vsebujejo skupno 35 milijonov m³ vode in obsegajo skoraj 2 km² površine (Ževart, 1999). To so umetno nastala jezera, ki se razlikujejo od naravnih po hitri ojezeritvi in po veliko razgradljivih snoveh, ki ostanejo na dnu jezer po zalitju z vodo, zato so jezera že od nastanka v procesu evtrofizacije (Beričnik Vrbovšek in sod., 1995).

Škalsko jezero (V4) leži najvišje, na nadmorski višini 372 m, in je najmanjše med tremi jezери. Izkopavanje lignita v tem predelu doline je že zaključeno. V preteklosti je bilo Škalsko jezero zaradi bližnjega zaledja močno organsko obremenjevano (kmetijstvo, odlagališče nenevarnih in inertnih odpadkov) (Šterbenk in sod., 2004). Zaradi obilice organskih snovi se je v hipolimnionu pojavil vodikov sulfid (H₂S) (Šterbenk, 2006).

Velenjsko jezero (V2, V3) je največje v dolini. Izkopavanje premoga je intenzivno le še pod zahodnim bregom, kjer ugreznino sproti zasipavajo s pepelom iz TEŠ, s čimer hkrati vzdržujejo pregrado med Velenjskim in Družmirskim jezerom (Šterbenk in sod., 2004). Do leta 1983 je bilo Velenjsko jezero odlagališče pepela iz TEŠ. Suspenzijo pepela in vode so črpali vanj po ceveh. Pri takšnem transportu se iz pepela izlužijo različni hidroksidi, ki povečujejo alkalnost vode. Oglje namreč vsebuje kalcijev karbonat CaCO_3 , iz katerega pri gorenju nastaja CaO . Ob mešanju z vodo pa iz njega nastaja Ca(OH)_2 , ki ustvarja zelo bazičen pH (Beričnik Vrbovšek in sod., 1995; Šterbenk in Ramšak, 1999). Od leta 1983 naprej so s sedimentacijo ločevali pepel od transportne vode. Pepel so odlagali na deponijo, vodo pa so še naprej črpali v jezero, kjer se je pH dvignil na okoli 12 in iz jezera so izginile vse oblike življenja. Že eno leto po uvedbi zaprtega kroga transportne vode leta 1994 se je pH na površini jezera zmanjšal na 9, leta 1997 pa pH po celotnem globinskem profilu ni presegal 8,7. V jezero se je po daljšem obdobju spet začelo vračati življenje (Mazej in Epšek, 2005), in sicer najprej predvsem plankton in alge, nato pa še makrofiti (Šterbenk in Ramšak, 1999).

Družmirsko jezero (V1) je začelo nastajati najkasneje, in sicer leta 1975. Je glavni vir tehnološke vode za elektrarno. Kakovost vode v jezeru se zadnje desetletje malce slabša, vendar je kljub temu v primerjavi z drugima dvema jezeroma v Šaleški dolini še vedno najboljša (Šterbenk in sod., 2004).

Glede na skromne vodne vire in njihovo nesorazmerno veliko (po)rabo prihaja po eni strani do izhlapevanja (hladilne vode), na drugi pa do onesnaževanja vodnih teles (gospodarstvo, prebivalstvo). Velenjsko in Družmirsko jezero lahko uvrstimo med zmerno evtrofna (zmerno onesnažena), kar je dokaj ugodno, Škalsko pa je slabše kvalitete. Problem ostaja tudi občasno cvetenje Velenjskega jezera, ko se med drugim pojavijo tudi modrozelenne alge, katerih toksini so nevarni za druge organizme, tudi za ljudi (Šterbenk, 2003).

2.1.2 Spremljanje onesnaženosti jezer v Sloveniji

Področje voda v EU ureja Vodna direktiva (Water Framework Directive) 2000/60/EC, ki temelji na celovitem pristopu k varstvu, izboljšanju in trajnostni rabi vode. Cilj je zagotoviti dobro kemijsko in ekološko stanje vseh teles površinske in podzemne vode do leta 2015 (Ocena možnosti ..., 2007). Monitoring kakovosti slovenskih voda je ena ključnih nalog Agencije Republike Slovenije za okolje (ARSO), ki opravlja strokovne, analitične in regulatorne oziroma upravne naloge s področja okolja na nacionalni ravni (ARSO, 2007b).

V letu 2007 se monitoring prvič izvaja v skladu z aneksom V Vodne direktive 2000/60/EC. Spremljanje stanja jezer v letu 2007 vključuje vsa površinska vodna telesa s površino vodne gladine, ki je večja od $0,5 \text{ km}^2$, in sicer naravna jezera, večino rečnih zadrževalnikov in umetnih ojezeritev s statusom kandidatov za močno preoblikovana vodna telesa, ter umetno Velenjsko jezero.

Pri monitoringu testirajo biološke elemente kakovosti (fitoplankton, makrofiti in fitobentos, bentoški nevretenčarji in ribe), fizikalno-kemijske parametre (prosojnost, temperatura, kisikove razmere, slanost, zakisanost, stanje hranil ter tista onesnaževala, ki se v znatnih količinah odvajajo v porečje ali pojezerje posameznega vodnega telesa), ter

hidrološke in morfološke elemente (ARSO, 2007a; ARSO, 2006). V Sloveniji biološki testi za spremljanje stanja voda po zakonu še niso obvezni, so pa predvideni (Žinko, 2004). Za Velenjsko jezero program v letu 2007 predvideva spremljanje vsebnosti kroma, živega srebra in ostalih težkih kovin, fenolnih spojin, PAH, AOX, detergentov ter mineralnih olj (ARSO, 2007a).

Mejne vrednosti za dobro oziroma slabo kemijsko stanje vodnih teles površinskih voda so podane v Uredbi o kemijskem stanju površinskih voda (Uredba ..., 2002).

2.1.2.1 Spremljanje stanja jezer v Šaleški dolini

Monitoring stanja šaleških jezer pa od leta 1987 opravlja tudi Inštitut za ekološke raziskave ERICo iz Velenja. Vodo vzorčijo štirikrat letno na točkah največje globine, vzorce vzamejo po celotni globini jezer, vzorčna mesta pa so oddaljena dva oziroma pet metrov. V vzorcih vode analizirajo osnovne fizikalne, kemijske in biološke parametre (temperaturo, prosojnost, vsebnost kisika, nasičenost s kisikom, pH, različne ione, celokupni dušik in fosfor, fitoplankton, zooplankton in makrofite) (Šterbenk in sod., 2004).

Fizikalno kemijske raziskave v Šaleški dolini so leta 2001 pokazale, da so vode in tla v določenih predelih precej onesnažena, še posebej s težkimi kovinami (Kugonič in Stropnik, 2001). Leta 2006 so rezultati analize vzorcev jezerskih voda (preglednica 1 na str. 7) pokazali, da nobeden izmed preiskovanih parametrov jezerske vode (V1-V4) iz izbranih vzorčnih območij ni presegel predpisane mejne vrednosti (Mazej, 2006).

Z uporabo bioindikatorjev in z biotesti pa lahko dejansko spremljamo vpliv okoljskih dejavnikov na izbrane organizme (Šalej, 2005). Leta 2005 so na primer ocenjevali obremenjenost šaleških jezer s težkimi kovinami v različnih komponentah jezerskega ekosistema. V planktonu so bile vsebnosti težkih kovin veliko večje kot v vodi in sedimentu jezer. Plankton lahko relativno hitro akumulira težke kovine iz vode, kar je lahko tudi vzrok za nizko vsebnost težkih kovin v vodi, zato raziskovalci menijo, da je analiza vsebnosti težkih kovin v planktonu boljši pokazatelj obremenjenosti jezerske vode s težkimi kovinami kot pa analiza same vode (Poročilo o proizvodnji ..., 2006).

Preglednica 1: Fizikalno-kemijske analize vzorcev jezerskih voda (Mazej, 2006)

Parameter	Vzorec			
	V1	V2	V3	V4
Meritve na terenu				
Temperatura (°C)	17,6	18,2	17,3	17,5
pH	8,60	8,28	8,26	8,29
Redoks potencial (mV)	484	489	483	487
Motnost (FTU)	7	14	7	15
Analize vode				
Ogljik – celotni organski - TOC (mgC/L)	13,1	14,5	16,4	17,7
Ogljik – raztopljeni organski - DOC (mgC/L)	8,97	9,97	10,90	11,80
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	44,5	8,73	28,5
Klorid (mg/L)	5,84	29,60	30,10	12,40
Fosfor – celotni (mg/L)	0,05	0,03	0,04	0,03
Kalcij – Ca (mg/L)	52,4	211,0	214,0	67,6
Magnezij – Mg (mg/L)	14,0	15,2	14,2	20,8
Natrij – Na (mg/L)	6,66	59,20	58,70	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
Krom raztopljeni – Cr (µg/L)	<5,0	<5,0	<5,0	<5,0
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
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
Fenantren (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
Krizen (µg/L)	<0,04	<0,04	<0,04	<0,04
Dibenzo (a,h) antracen (µg/L)	<0,04	<0,04	<0,04	<0,04

2.2 EKOTOKSIKOLOGIJA

Ekotoksikologija je znanost, ki se ukvarja s proučevanjem škodljivih učinkov okoljskih onesnaževal na različnih nivojih biološke organizacije (od molekularnega do systemskega) (Fent, 2004). Tveganje za okolje je verjetnost, da bo nek poseg v okolje posredno ali neposredno v določenih okoliščinah ali v določenem času škodoval okolju ali življenju ali zdravju ljudi (Zakon o varstvu okolja, 2004). Ocenjevanje tveganja se nanaša na ocenjevanje lastnosti onesnaževal za povzročanje škode na onesnaženih mestih (Fent, 2003), kot so visoka akutna in/ali kronična toksičnost, visoka obstojnost v okolju, visoka mobilnost, ki vodi v onesnaženje talne vode, in visoka lipofilnost, ki vodi v bioakumulacijo v prehranjevalni verigi (Fent, 2004). Toksični učinki na bioto so v tesni povezavi z okoljsko kemijo in usodo onesnaževal v okolju ter raznolikostjo organizmov (Fent, 2003). Odvisni so od izpostavitve, biodostopnosti, privzema, metabolizma, intracelularne koncentracije, načina toksičnega delovanja ter ravnotežja med toksičnim učinkom in varovalnimi celičnimi odzivi (Fent, 2004).

Kemične analize so najbolj direktne metode za dokazovanje obstoja in narave specifičnih snovi v površinskih vodah (Ohe in sod., 2004), vendar pa lahko zanemarijo kemikalije, ki jih z analitskimi tehnikami ne moremo identificirati in kvantificirati (Bekaert in sod., 1999) ali tiste, ki so prisotne v zelo nizkih količinah (Filipič, 1995), ne upoštevajo biodostopnosti snovi, medsebojnih interakcij kemikalij v kompleksnih mešanica, bioaktivacije snovi in razlik v delovanju na žive organizme (Fent, 2004). Za temeljito oceno okoljskega tveganja je priporočljiva združitev fizikalno-kemijskih z biološkimi analizami (Bekaert in sod., 1999), saj biotesti omogočajo oceno celotne biološke aktivnosti mešanice onesnaževal v vzorcu (Fent, 2004; Lah in sod., 2005a).

V laboratoriju lahko izvedemo tri vrste biotestov. Opazujemo lahko toksičnost oz. neposredni biološki odziv posameznih organizmov na toksično snov (preživetje, gibljivost, rast, ...), bioakumulacijo v organizmu ali pa škodljive vplive in/ali spremembe v genetskem materialu organizmov oziroma genotoksičnost (Derksen, 2002).

2.2.1 Toksičnost

Interakcije kemikalij z bioto se dogajajo najprej na nivoju celice. Zato so celični odzivi ne samo dokaz toksičnosti, ampak tudi primerno orodje za zgodnjo in občutljivo detekcijo izpostavitve kemikalijam (Fent, 2004).

Ali se bodo kemično inducirane spremembe v celični strukturi in fiziologiji razvile v škodljive toksične učinke, je odvisno od mnogih dejavnikov (Fent, 2004), najbolj pa od količine onesnaževala (doze) in metabolizma. Metabolizem določa aktivnost, trajanje delovanja in razpolovno dobo snovi v telesu. Tuje, potencialno toksične snovi, absorbirane v biološke sisteme, so večinoma lipofilne. Z biotransformacijo se spremenijo njihove fizikalno-kemijske lastnosti. Ponavadi se poveča polarnost, velikost in molekularna teža, zato se poveča tudi ekskrecija.

Izpostavitve mešanica toksičnih kemikalij lahko izzove različne odzive. Če je odziv vsota posameznih učinkov, je to aditivizem, če je odziv večji kot vsota posameznih učinkov, je to sinergizem. Če neka snov zmanjša toksični učinek druge, se pojavi

antagonizem. Alternativno je lahko toksičnost drugačna (koalitivna). Ponavljajoča izpostavitve pa lahko privede do zmanjšanja toksičnega učinka (toleranca) (Timbrell, 2000). Ravno zaradi tega je priporočljivo ocenjevanje vzorca kot celote brez kemične frakcionacije (Sasaki in sod., 1997; Ferrao Vargas in sod., 2001).

Toksični učinki se lahko manifestirajo kot direktni toksični učinek (poškodbe tkiv), farmakološki, fiziološki in biokemični učinek, teratogeneza, imunotoksičnost, mutageneza ali kancerogeneza (Timbrell, 2000). Povezava med toksikološkimi odzivi celic in toksičnostjo na višjih bioloških nivojih je ključno vprašanje v ekotoksikologiji. Celične spremembe lahko dokončno vplivajo na biološke parametre kot so rast, razvoj, zdravje in razmnoževanje (Fent, 2004).

2.2.2 Genotoksičnost

Genetična ekotoksikologija je definirana kot proučevanje z onesnaževali induciranih sprememb v genetskem materialu naravne biote (Depledge, 1994). Za pravilno transkripcijo, translacijo in replikacijo je osnova neokrnjenost DNK (Riso in sod., 1999). Genotoksini so povzročitelji, ki interagirajo z DNK in/ali z njo povezanimi celičnimi komponentami, npr. delitvenim vretenom ali encimi (Dearfield in sod., 2002) in spreminjajo podvajanje DNK in prenos genov (Fairbairn in sod., 1995). Genotoksične kemikalije lahko povzročajo poškodbe DNK direktno, preko metabolitov, preko produkcije reaktivnih kisikovih vrst ali z inhibicijo sinteze in popraviljanja DNK, nekatere pa poškodujejo DNK z več naštetimi mehanizmi (Lee in Steinert, 2003).

Termoelektrarne na premog so največji izvor antropogenih emisij Hg in drugih težkih kovin v okolje (Kotnik in sod., 2002). Težke kovine se lahko vežejo na številne pomembne biološke molekule, kjer izpodrivajo naravno prisotne kovine, inhibirajo encimske funkcije in razdirajo zgradbo nukleinskih kislin (Loska in sod., 2004). Poškodbe povzročajo z indukcijo nastanka reaktivnih kisikovih vrst ali pa z interakcijo s popravljivim procesom DNK (Reinecke S.A. in Reinecke A.J., 2004). Premog vsebuje tudi policiklične aromatične ogljikovodike, ki imajo toksične in genotoksične učinke na žive organizme (Da Silva in sod., 2000). DNK poškodujejo preko produkcije reaktivnih kisikovih vrst (Mitchellmore in Chipman, 1998).

Mutacija je dedna sprememba, ki nastane v celičnem genotipu. Nakazuje, da je bila molekula DNK, vir genetske informacije, spremenjena. Genotoksične kemikalije imajo na DNK lahko tri tipe učinkov: aneuploidijo (pridobitev ali izguba kompletnega kromosoma), klastogenezo (izguba, adicija ali prerazporejanje delov kromosoma) in mutagenezo (izguba, adicija ali sprememba majhnega števila baznih parov) (Timbrell, 2000). Najpomembnejši odziv prizadetih celic ali organizmov je popravilo poškodovane DNK (Reifferscheid in Grummt, 2000). Medtem, ko so nekateri genotoksični učinki le prehodne narave, so mutacije večinoma obstojne (Dearfield in sod., 2002). Dolgoročni učinki genotoksinov so mutageni in kancerogeni učinki (Fairbairn in sod., 1995). Primeri poškodb DNK, nastalih zaradi kemijskih in fizikalnih povzročiteljev, so lomi verig, spremenjene baze in prečne povezave molekul (DNK-DNK in DNK-protein) (Lee in Steinert, 2003).

Genotoksičnosti ne bi smeli obravnavati kot posebno vrsto biološke poškodbe, ampak kot vsoto škodljivih učinkov onesnaževal, ki pripeljejo do sprememb v genotipu in genskih frekvencah v izpostavljenih populacijah (Depledge, 1994). Učinki genotoksinov na DNK v somatskih celicah lahko vodijo v kancerogenezo ali druge degenerativne procese, kot je pospešeno staranje in koronarne bolezni, učinki na DNK v zarodnih celicah pa se lahko prenesejo na prihodnje generacije (Depledge, 1998; Dearfield in sod., 2002).

2.2.2.1 Biotesti za monitoring genotoksičnosti

Biomarkerji za genotoksičnost so trenutno eni izmed najbolj pomembnih parametrov za ocenjevanje okoljskega tveganja (Ohe in sod., 2004).

Osnovna predpostavka pri testih genotoksičnosti je, da je osnova dednega materiala enaka pri vseh živih bitjih. Glede na vrsto genetskih poškodb, ki jih ti testi zaznavajo, jih delimo na tiste, ki zaznavajo primarne poškodbe DNK (izmenjava DNK med sestrskimi kromatidami, prelomi DNK, rekombinacije) in tiste, ki zaznavajo mutacije in kromosomske aberacije (Filipič, 2004).

Testiranje genotoksičnosti kemikalij poteka v treh stopnjah. V prvi stopnji je potrebno izvesti 3 *in vitro* študije, in sicer študijo, v kateri opazujemo pojav genskih mutacij v bakterijskih celicah, študijo, v kateri ugotavljamo pojavljanje mutacij v sesalskih celicah in tretjo študijo na sesalskih celicah, s katero ugotovimo, ali preiskovana snov povzroči strukturne ali številčne spremembe kromosomov. V drugi stopnji opravimo študije *in vivo* na somatskih (telesnih) sesalskih celicah. Ugotavljamo, ali snov, ki deluje genotoksično v *in vitro* sistemih, deluje genotoksično tudi v telesnih celicah poskusnih živali (*in vivo*), najpogosteje s štetjem nastalih mikrojedr v kostnem mozgu izpostavljenih glodalcev.

Tretja stopnja vključuje izvajanje *in vivo* metod na spolnih celicah (jajčecih, spermijih) in jo izvajamo le za snovi, ki so mutagene v somatskih celicah *in vivo*. Ugotavljamo, ali je snov mutagena za zarodne celice poskusnih živali, kar pomeni, da se bodo škodljivi učinki potencialno prenesli na potomce (Guidance on a strategy ..., 2000).

Prokariontski (bakterijski) testi zaznavajo dejavnike, ki sprožajo mutacije genov in primarne poškodbe DNK (Dearfield s sod., 2002). Najbolj razširjeni prokariontski *in vitro* test v ekotoksikologiji je test Ames, s katerim kvantitativno ovrednotimo pogostnost povratnih mutacij specifičnih sevov bakterije *Salmonella typhimurium* TA 98 in TA 100, ki zaradi delovanja genotoksinov ponovno pridobita sposobnost sinteze histidina (Ohe in sod., 2004; Žinko, 2004; Lah in sod., 2005a). Alternativa testu Ames sta SOS-kromotest in *umu*-test, pri katerih testna sistema vsebujeta fuzijo gena β -galaktozidaze in gena za SOS odgovor. Genotoksična snov aktivira SOS odgovor, ki ga ugotavljamo z merjenjem aktivnosti encima β -galaktozidaze (Ohe in sod., 2004; Žegura in sod., 2006). Preostali prokariontski testi so še Mutatox test s temno mutanto luminiscentne bakterije *Vibrio fischeri*, ki ob prisotnosti mutagenov revertira in pridobi nazaj svojo bioluminiscenco (Guzzella in sod., 2004; Bekaert in sod., 1999) in *rec* test (Mazza, 1982). Pomanjklivost prokariontskih testov je odsotnost nekaterih metabolnih encimov, ki so značilni za evkariontske celice (Lah, 2006).

Med evkariontskimi biotesti, ki zaznavajo širši obseg genetskih poškodb (Dearfield in sod., 2002), pa je v ekotoksikologiji najpogostejši test mikrojedr, ki nastanejo zaradi odlomljenih kromosomskih ali kromatidnih delov, lahko pa tudi celih kromosomov, ki se niso vključili v preostali kromatin (Hayashi in sod., 1998; Bekaert in sod., 1999; Ohe in

sod., 2004). Pomembna sta tudi test kromosomskih aberacij, ki je uporaben predvsem na rastlinah, ki imajo zelo velike kromosome in so poceni testni sistemi (Cabrera in Rodriguez, 1999; Lah, 2006), in test Zimmermann s kvasovkami *Saccharomyces cerevisiae* za ugotavljanje izmenjave sestrskih kromatid (Marinšek Logar in sod., 2006; Žinko, 2004). Skupna slabost teh treh metod je potreba po mitotsko aktivnih celicah z relativno velikimi kromosomi (Ralph in Petras, 1997), kar pa ne velja za kometni test (Tice in sod., 2000).

2.2.2.2 Kometni test

Kometni test (elektroforeza posameznih celic) je enostavna metoda za merjenje enoverižnih in dvoverižnih lomov DNK, alkalno labilnih mest, kot so apurinska in apirimidinska mesta, prečnih povezav molekul DNK-DNK in DNK-protein, in mest z zakasnjanim popravilanjem DNK v posameznih evkariontskih celicah (Žegura in Filipič, 2004). Metoda je občutljiva, fleksibilna, poceni, enostavna in hitra, za izvedbo je potrebna relativno majhna količina testne snovi in število celic v vzorcu (Tice in sod. 2000), uporabimo lahko skoraj katerokoli evkariontsko celico in celični tip (Da Silva in sod., 2000), vsako leto pa se tudi povečuje število objav o raziskavah, v katerih uporabijo kometni test (Collins, 2004).

Uporabljajo ga pri testiranju genotoksičnosti, humanem biomonitoringu, molekularni epidemiologiji, ekotoksikologiji in pri raziskavah poškodovanosti in popraviljanja DNK (Collins, 2004), in sicer pri različnih pogojih izpostavitve, vključno z *in vitro*, *in vivo* in *in situ* (Lee in Steinert, 2003).

Osnovni postopek testa je preprost. Celice, vklopljene v sloj agaroze na objektnem stekelcu, liziramo z alkalno raztopino detergenta in soli, pri čemer se odstrani vsa vsebina celic razen DNK, ki ostane pretežno v obliki superzvitih zank vezana na jedrni matriks. Sledi elektroforeza pri visokem pH, kjer pride do odvijanja DNK na mestih prelomov verige. Celice s povečano stopnjo poškodb DNK pod vplivom električnega toka kažejo povečano stopnjo migracije nukleinske kisline iz jedra v smeri anode, kar vodi v nastanek strukture, podobne kometu (Rojas in sod., 1999; Collins, 2004). Nato DNK obarvamo z etidijevim bromidom in ovrednotimo poškodovanost DNK z epifluorescentnim mikroskopom, digitalno kamero in programom za analizo slike, s katerim je mogoče meriti intenziteto fluorescence in distribucijo DNK v kometu (Lee in Steinert, 2003).

V uporabi so različne modifikacije testa. Občutljivost testa povečamo z uporabo inhibitorjev popraviljalnih mehanizmov DNK, specifičnost pa z inkubacijo celic s popraviljalnimi encimi, ki prepoznajo določen razred poškodb DNK (npr. oksidativne poškodbe), in na mestu te poškodbe naredijo zarezo (Žegura in Filipič, 2004; Collins in sod., 1997).

S podaljšanjem trajanja elektroforeze omogočimo detekcijo prečnih povezav med verigami DNK, saj bo DNK kontrolnih celic v električnem polju potovala hitreje kot DNK celic s prečnimi povezavami (Uhl in sod., 2000; Tice in sod., 2000).

Spreminjanje pH med lizo in elektroforezo vpliva na to, kateri tip DNK poškodb se bo izrazil. Pri nevtralnih pogojih bomo zaznali samo dvoverižne lome DNK, pri pH 12.3 dvoverižne in enoverižne lome, pri pH okoli 13 pa dvoverižne, enoverižne lome in še alkalno labilna mesta (Fairbairn in sod., 1995; Lee in Steinert, 2003).

Dvoverižni lomi so lahko posledica interakcije ROS z molekulo DNK (Riso in sod., 1999) ali apoptoze, in so za celico pogosto letalni (Lee in Steinert, 2003). Enoverižni lomi so posledica različnih tipov reakcij, kot so bazno in nukleotidno popraviljanje z izrezovanjem, direktna cepitev verige DNK zaradi kemikalij, napada radikalov ali vezave interkalirajočih agensov, alkalno labilnih mest, delovanja endonukleaz, topoizomeraz in lizosomskih DNK hidrolaz (Horvathova in sod., 1998). Zaznavanje enoverižnih lomov je mogoče le pri visoki pH vrednosti, ki prekine komplementarno parjenje baz, tako da se verigi DNK ločita (Lah, 2006). Alkalno labilna mesta so posledica popraviljanja z izrezovanjem baz ali nukleotidov (Panayiotidis in Collins, 1997) in so stabilna pri pH vrednostih, nižjih od 12,5 (Horvathova in sod., 1998). V alkalnih pogojih pri pH vrednosti 13 pa lahko tako mesto pretvorimo v prelom verige (Collins, 1999).

Obseg zaznanih enoverižnih lomov DNK je odvisen od povzročitelja poškodbe, narave nastalih lezij, tipa in biološkega stanja izpostavljene celice ali tkiva, časa izpostavitve, postopka ter obsega popraviljanja poškodb (Fairbairn in sod., 1995).

Lomi DNK, ki jih zaznamo pri kometnem testu, so posledica predvsem dveh procesov: poškodovanja ter popraviljanja DNK (Klobučar in sod., 2003), ki ju v netretiranih celicah ne moremo ločiti (Panayiotidis in Collins, 1997). Zaznamo lahko tudi lome, ki so fiziološko inducirani s transkripcijo, rekombinacijo ter vzdrževanjem topologije DNK zank s topoizomerazo (Belyaev in sod., 1999). Lomi so lahko tudi posledica razgradnje DNK zaradi apoptoze (Mitchelmore in Chipman, 1998), zato je priporočljivo hkrati s kometnim testom ugotavljati tudi citotoksičnost (Tice in sod., 2000; Lee in Steinert, 2003).

Test, ki je bil v osnovi razvit za človeške krvne celice (Singh in sod., 1988), je danes prilagojen za uporabo pri številnih živalskih in rastlinskih celicah, kvasovkah in algah (Lah in sod., 2004; Olive in Banath, 2006). Za analizo so najbolj primerne celične linije ali celice, ki so že naravno suspendirane (Marinšek Logar in sod., 2000). Najbolj pogosto pri testu uporabljajo živalske celice (Collins, 2004), uporabili pa so ga že za kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* (Miloshev in sod., 2002; Lah in sod., 2004), enocelične zelene alge *Chlamydomonas reinhardtii* (Erbes in sod., 1997), migetalkarje *T. thermophila* (Lah in sod., 2004) in bičkarje *Euglena glacialis* (Aoyama in sod., 2003), rastlinske celice (Ptaček in sod., 2001), celomske celice deževnikov *Eisenia fetida* (Reinecke S.A. in Reinecke A.J., 2004), celice rib (Lemos in sod., 2005; Mitchelmore in Chipman, 1998), dvoživk (Ralph in Petras, 1997), školjk (Pavlica in sod., 2001), humane celične linije Caco-2 (Lah in sod., 2005b) in HepG2 (Uhl in sod., 2000; Žegura in sod., 2006). Postopek kometnega testa je potrebno prilagoditi za vsak organizem oz. tip celic posebej (Lah, 2006).

V naši raziskavi smo za testni organizem izbrali migetalkarja *T. thermophila*, saj poseduje veliko število željenih lastnosti testnih organizmov za ocenjevanje okoljskega tveganja: je evkariont, njegova biologija in splošen odziv na okolje sta dobro poznana, uporaba v laboratoriju je relativno enostavna, generacijski čas je kratek. V okolju je široko razširjen in ima ekološki pomen, saj izvaja ključne vloge pri pretoku energije in kroženju elementov v vodnih prehranjevalnih mrežah, zato je idealen kot indikator za zgodnje opozorilo poslabšanja stanja vodnega ekosistema (Nicolau in sod., 2001; Aoyama in sod., 2003; Lah in sod., 2004). Pražival *T. thermophila* je modelna evkariotska celica, saj poseduje vse

esencialne biološke funkcije, ki prispevajo k sposobnosti genotoksičnih snovi za poškodovanje DNK, kot so celični privzem in metabolni procesi v celici oz. bioaktivacija (Frankel, 2000).

Potrebne bodo še nadaljnje raziskave, vključno s standardizacijo metode in meritev, preden se bo lahko kometni test uporabljal kot standardni biotest za vodna okolja (Lemos in sod., 2005).

2.2.3 Interpretacija in biološki pomen rezultatov biotestov

Rezultate bioloških testov ovrednotimo z ustreznimi statističnimi metodami. Pozitiven rezultat kometnega testa predstavlja statistično značilno povečanje poškodb dednine testnih organizmov v primerjavi z vzorcem negativne kontrole (Tice in sod., 2000). Za testno snov ali vzorec, ki ne kaže statistično značilnega povečanja poškodb dednine, lahko trdimo, da v uporabljanem testnem sistemu nima genotoksičnega vpliva (Lah, 2006). Za potrditev negativnega rezultata moramo opraviti dodatne teste pri spremenjenih pogojih ali spremeniti verzijo kometnega testa (Žegura in Filipič, 2004).

Statistične metode naj ne bi bile edini odločilni faktor za potrditev pozitivnega odziva (Lee in Steinert, 2003; Žegura in Filipič, 2004), saj se kljub izboljšani izvedbi testov genotoksičnosti pojavljajo pozitivni odzivi, še posebej *in vitro*, ki niso biološko relevantni za glodalce ali človeka. Pri ugotavljanju biološkega pomena rezultatov, pridobljenih *in vitro*, moramo upoštevati naslednja dejstva (Kirkland in Muller, 2000):

1. Nekatere kemikalije lahko povzročajo poškodbe DNK indirektno preko delovanja na druge sestavine celice.
2. Nekatere genotoksične snovi lahko pri nizkih koncentracijah tvorijo konjugate, ki so neškodljivi za celico.
3. Nekatere kemikalije se lahko pri specifičnih *in vitro* pogojih testa metabolizirajo do intermediatov, ki se ne tvorijo v glodalcih ali ljudeh.
4. Lažno pozitivne rezultate lahko pridobimo tudi zaradi ekstremnih pogojev gojenja (pH, osmolarnost, ionska jakost).
5. Normalna celica v *in vivo* pogojih lahko tolerira ali popravi določene nivoje potencialno mutagenih DNK poškodb brez bioloških posledic.

In vitro testi ne upoštevajo biokinetike, tkivne distribucije in biotransformacije, ki se lahko pojavijo *in vivo* (Fent, 2004). Upoštevati moramo tudi primernost izbranega merjenega končnega odziva in primernost postopka za tip uporabljenih celic ali organizmov (Dearfield in sod., 2002), heterogenost celičnih tipov, celični cikel, razmere rasti in gojenja (Lee in Steinert, 2003), ter razlike v občutljivosti testnih organizmov (Ferrari in sod., 2005). Medvrstna variabilnost glede na toksične in genotoksične odzive se pripisuje razlikam v privzemu, akumulaciji, metabolizmu, ekskreciji, sekvestraciji in učinkovitosti popraviljanja (Jha, 2004). Ekotoksikološko ovrednotenje naj bi zato temeljilo na kemičnih analizah in skupini različnih *in vitro* in relativno preprostih *in vivo* biotestov (Fent, 2004).

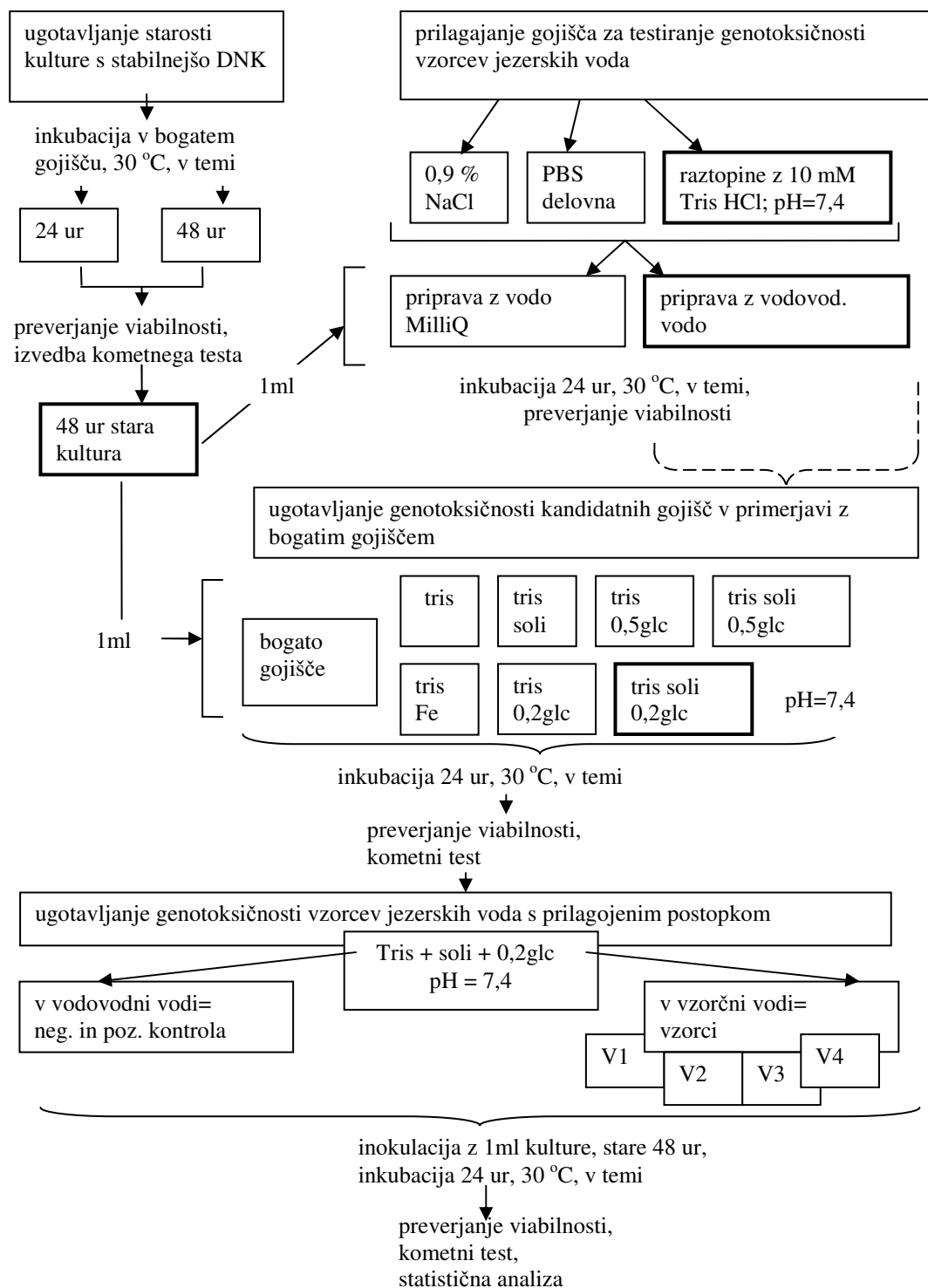
2.2.3.1 Izbira nabora biotestov za biomonitoring

Ker je toksičnost vrstno in kemijsko specifična, je priporočljiva uporaba nabora biotestov (Wadhia in Thompson, 2007). Izbira biotestov je odvisna od tipa zahtevane informacije,

stanja ter fizikalnih in kemijskih lastnosti preiskovane snovi ali vzorca ter občutljivosti in ustreznosti testne vrste (Rojčikova Padrtova in sod., 1998). Pri izbiri moramo upoštevati praktičnost, ponovljivost, občutljivost, ceno testa, taksonomsko in ekološko diverzitetu uporabljenih organizmov ali celic, možnost statistične ocene, prenosljivost rezultatov, zaščito živali in kompatibilnost testnih sistemov (Reifferscheid in Grummt, 2000). V nabor moramo izbrati bioteste, s katerimi bomo izmerili različne končne odzive (preživetje, razmnoževanje, rast, encimska aktivnost, genetske spremembe, ...) (Van der Oost in sod., 2003), kar nam omogoča razlikovanje med določenimi skupinami onesnaževal, med različnimi toksikološkimi mehanizmi ali prizadetimi biološkimi funkcijami (Fent, 2004). Testni organizmi morajo biti iz različnih trofičnih nivojev (Manusadžianas in sod., 2003; Lah, 2006). V ekotoksikoloških študijah je esencialno oceniti toksični odziv indigene faune kot indikatorske vrste (Ohe in sod., 2004; Wadhia in Thompson, 2007). Na podlagi *in vitro* testov lahko načrtujemo *in vivo* teste (Kirkland in Muller, 2000), s katerimi preverimo, ali se bodo mutageni učinki, zaznani *in vitro*, pokazali tudi *in vivo* pri sesalcih (Dearfield in sod., 2002).

V zadnjem času cenejšo rešitev za rutinsko testiranje naraščujočega števila okoljskih vzorcev nudijo mikrobiotesti (Wadhia in Thompson, 2007).

3 MATERIAL IN METODE



Slika 1: Shema poskusov

3.1 ODVZEM VZORCEV

Odvzem in pripravo vzorcev smo opravili skupaj 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 jezerskih voda v Šaleški dolini (odvzem za kometni test: 16.06.2005):

- V1 – Družmirsko jezero
- V2 – Velenjsko jezero pri deponiji
- V3 – Velenjsko jezero pri čolnarni
- V4 – Škalsko jezero

Vzorce jezerskih voda smo pred uporabo razdelili na alikvote po 10 ml in jih shranili pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2 ZALOŽNA KULTURA PRAŽIVALI *T. thermophila*

Pri kometnem testu smo kot testne organizme uporabili kulturo migetalkarja *T. thermophila* brez mikrojedr, ki je bila sestavni del testnega seta PROTOXKIT FTM (Microbiotests Inc. Belgium). Celice smo gojili v 50 ml bogatega gojišča za pražival *T. thermophila* (Shultz, 1997). Sestava gojišča je navedena v preglednicah 2, 3 in 4.

Preglednica 2 : Bogato gojišče za pražival *T. thermophila*

Bakteriološki pepton (Sigma, P-0556)	5 g
D-glukoza (Sigma, G-7528)	5 g
Kvasni ekstrakt (Sigma, Y-1625)	1 g
Tris-hidroksimetil aminometan (Sigma, T-8524)	1,2114 g
Voda MilliQ	1000 ml

Na 1000 ml gojišča smo dodali še 10 ml raztopine soli 1 in 10 ml raztopine soli 2 (preglednici 3 in 4).

Preglednica 3: Raztopina soli 1

$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,5 g
$\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,05 g
$\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	0,0125 g
Voda MilliQ	100 ml

Preglednica 4: Raztopina soli 2

$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	1 g
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	0,25 g
$\text{MnCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	0,005 g
ZnCl_2	0,0005 g
Voda MilliQ	100 ml

Raztopini smo nato s HCl vrednost pH prilagodili na 7,35. Gojišče smo razdelili v serumske stekleničke po 50 ml in ga avtoklavirali. 500 µl kulture praživali *T. thermophila* smo inokulirali v 50 ml gojišča in jo inkubirali pri 30 °C tri dni.

Da smo zagotovili stalno zalogo stacionarne kulture praživali *T. thermophila*, smo kulturo precepljali dvakrat tedensko. Tekočo kulturo *T. thermophila* smo gojili v inkubatorju pri 30 °C.

3.3 PRILAGAJANJE POSTOPKA KOMETNEGA TESTA ZA TESTIRANJE GENOTOKSIČNOSTI VZORCEV JEZERSKIH VODA

Postopek kometnega testa, ki je bil prvotno razvit za testiranje genotoksičnosti v odpadnih vodah (Lah in sod., 2004), smo prilagodili.

Spremenili smo način in čas izpostavitve testnih organizmov. Lah in sodelavci so celice praživali izpostavili vzorcem odpadne vode za 20 minut po vključitvi celic v gele na objektivih. Vendar se pri tako kratkem času izpostavitve popravljalni mehanizmi še ne izrazijo v večji meri, zato smo celice izpostavili prilagojenim gojiščem, pripravljenim z vzorci jezerskih voda, za 24 ur, šele nato smo jih vključili v gele na objektivih.

Preverili smo tudi stabilnost DNK celic v kulturah različne starosti. Za inokulacijo vzorcev ter pozitivne in negativne kontrole smo želeli uporabiti celice praživali iz kulture take starosti, pri kateri je DNK celic najbolj stabilna.

Prilagodili smo tudi gojišče za izpostavitve celic vzorcem. Namesto v bogatem gojišču za pražival *T. thermophila* (Shultz, 1997) smo želeli celice izpostaviti vzorcem ter negativni in pozitivni kontroli v prilagojenem gojišču, ki bo po sestavi podobno naravnemu okolju praživali, po drugi strani pa čimbolj primerljivo z bogatim gojiščem. Poleg tega smo se hoteli izogniti reagiranju sestavin bogatega gojišča s sestavinami vzorca.

3.3.1 Ugotavljanje starosti kulture, pri kateri je jedrna DNK najbolj stabilna

Celice smo gojili v bogatem gojišču za pražival *T. thermophila* (Shultz, 1997), katerega sestava je navedena v točki 3.2. Podvajanje celic v kulturi se konča od 40 do 44 ur po inokulaciji v sveže gojišče (Shultz, 1997). Gojišča smo inokulirali s 500 µl kulture za 48-urno inkubacijo in dan kasneje s 1000 µl kulture za 24-urno inkubacijo. Inkubirali smo jih pri 30 °C v temi. Nato smo preverili viabilnost celic v kulturi in izvedli kometni test.

3.3.2 Prilaganje gojišča za testiranje genotoksičnosti vzorcev jezerskih voda

Celice smo poskušali gojiti v delovni raztopini PBS, fiziološki raztopini (preglednica 5) ter vodovodni vodi z 10mM koncentracijo raztopine Tris-hidroksimetil aminometana s pH vrednostjo, uravnano na 7,4 s HCl, ki sta jo za stradanje celic praživali *T. thermophila* uporabila Hellung-Larsen in Andersen (1989), in različnimi dodatki (Frankel, 2000), ki so podani v preglednicah od 6 do 12. Prvotno smo sestavine raztapljali v vodi MilliQ, nato pa smo jo zamenjali z vodovodno vodo, v kateri je bila viabilnost *T. thermophila* večja. Vsem raztopinam smo tudi uravnali pH s HCl na 7,4. Sestava in priprava delovne raztopine PBS je navedena v točki 3.4.5.

Preglednica 5: Fiziološka raztopina

NaCl 0,9 %	0,09 g
Voda MilliQ	10 ml

Preglednica 6: 10 mM raztopina Tris HCl (tris)

Tris-hidroksimetil aminometan (Sigma, T-8524) 10 mM	1,211 g
Vodovodna voda	10 ml

Preglednica 7: 10 mM raztopina Tris HCl z železom (tris Fe)

Tris-hidroksimetil aminometan (Sigma, T-8524) 10 mM	1,211 g
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	0,0025 g
Vodovodna voda	10 ml

Preglednica 8: 10 mM raztopina Tris HCl s solmi (tris soli)

Tris-hidroksimetil aminometan (Sigma, T-8524) 10 mM	1,211 g
Raztopina soli 2	0,1ml
Vodovodna voda	10 ml

Preglednica 9: 10 mM raztopina Tris HCl z 0,2 % deležem glukoze (tris 0,2glc)

Tris-hidroksimetil aminometan (Sigma, T-8524) 10 mM	1,211 g
D-glukoza (Sigma, G-7528)	0,02 g
Vodovodna voda	10 ml

Preglednica 10: 10 mM raztopina Tris HCl z 0,5 % deležem glukoze (tris 0,5glc)

Tris-hidroksimetil aminometan (Sigma, T-8524) 10 mM	1,211 g
D-glukoza (Sigma, G-7528)	0,05 g
Vodovodna voda	10 ml

Preglednica 11: 10 mM raztopina Tris HCl s solmi in 0,2 % deležem glukoze (tris soli 0,2glc)

Tris-hidroksimetil aminometan (Sigma, T-8524) 10 mM	1,211 g
D-glukoza (Sigma, G-7528)	0,02 g
Raztopina soli 2	0,1ml
Vodovodna voda	10 ml

Preglednica 12: 10 mM raztopina Tris HCl s solmi in 0,5 % deležem glukoze (tris soli 0,5glc)

Tris-hidroksimetil aminometan (Sigma, T-8524) 10 mM	1,211 g
D-glukoza (Sigma, G-7528)	0,05 g
Raztopina soli 2	0,1ml
Vodovodna voda	10 ml

V vsako izmed zgoraj naštetih gojišč v epruveh Falcon (10 ml), prav tako pa tudi v 50 ml bogatega gojišča za pražival (Shultz, 1997), smo nacepili po 1000 μ l 48 ur stare kulture iz bogatega gojišča. Celice smo gojili 24 ur pri 30 °C v temi. Naslednji dan smo preverili viabilnost celic v gojiščih in izvedli kometni test, da smo lahko primerjali stopnjo poškodovanosti jedrne DNK celic, ki smo jih gojili v posameznih kandidatnih gojiščih, z stopnjo poškodovanosti celic v bogatem gojišču, in tako izbrali primerno prilagojeno gojišče.

3.4 UGOTAVLJANJE GENOTOKSIČNOSTI VZORCEV JEZERSKIH VODA S PRILAGOJENIM POSTOPKOM KOMETNEGA TESTA

3.4.1 Starost kulture praživali *T. thermophila* za inokulacijo prilagojenega gojišča

S 500 μ l 48 ur stare kulture smo pred izvedbo poskusa dvakrat zapored inokulirali 50 ml svežega bogatega gojišča za pražival (Shultz, 1997), da smo zmanjšali variabilnost celic. Zadnji dan pred izvedbo eksperimenta smo precepili 1000 μ l 48 ur stare kulture iz bogatega gojišča v serumskih stekleničkah v 10 ml prilagojenega gojišča v epruveh Falcon.

3.4.2 Izpostavitev celic praživali v prilagojenem gojišču za testiranje genotoksičnosti jezerskih voda s kometnim testom

Gojišča smo pripravili v epruveh Falcon, pri čemer smo za pozitivno in negativno kontrolo sestavine gojišča raztopili v vodovodni vodi, za testiranje vzorcev pa v vzorčni vodi posameznih vzorcev. Vsem gojiščem smo pH uravnali na 7,4. Inokulirali smo jih z 1000 μ l kulture *T. thermophila*. Izpostavitev je trajala 24 ur, pri 30 °C v temi.

3.4.2.1 Prilagojeno gojišče za negativno in pozitivno kontrolo

Preglednica 13: Prilagojeno gojišče za negativno in pozitivno kontrolo

Tris-hidroksimetil aminometan (Sigma, T-8524) 10 mM	1,211 g
D-glukoza (Sigma, G-7528) 0,2 %	0,02 g
Raztopina soli 2	0,1 ml
Vodovodna voda	do 10 ml

Sestava raztopine soli 2 je v preglednici 4.

3.4.2.2 Prilagojeno gojišče za testiranje genotoksičnosti vzorcev

Preglednica 14: Prilagojeno gojišče za testiranje genotoksičnosti vzorcev

Tris-hidroksimetil aminometan (Sigma, T-8524) 10 mM	1,211 g
D-glukoza (Sigma, G-7528) 0,2 %	0,02 g
Raztopina soli 2	0,1 ml
Vzorčna jezerska voda	do 10 ml

Sestava raztopine soli 2 je v preglednici 4.

3.4.3 Preverjanje viabilnosti kulture praživali *T. thermophila*

Na objektno stekelce smo z alkoholnim flomastrom narisali ravno črto. Na drugo stran objektnega stekelca smo ob črti nanесли 25 μ l kulture praživali *T. thermophila*. Pod mikroskopom smo prešteli vse mrtve celice ob črti. Nato smo dodali 5 μ l raztopine 4 % formalina in ob črti prešteli vse celice (Dias in Lima, 2002).

$$\text{viabilnost} = (\text{št. živih celic} / \text{št. vseh celic}) \times 100 \% \quad \dots (1)$$

Viabilnost mora presegati 90 %, da je kultura celic primerna za nadaljnje delo.

3.4.4 Priprava kulture praživali *T. thermophila* za vkapljanje v gele na objektnikih

Celice praživali *T. thermophila* so aerobni migetalkarji, zato jih po inkubaciji vidimo predvsem v zgornjem sloju tekočega gojišča. Zaradi naravne suspendiranosti smo jih morali po 24 urni inkubaciji pred vklopom v tretji sloj agaroze skoncentrirati s centrifugiranjem. Kulture z volumnom 10,5 ml smo centrifugirali pri sobni temperaturi 3 minute pri 300 x g. Supernatant smo zavrgli, da je ostalo približno 0,5 ml usedline celic. Celice smo resuspendirali v 2,5 ml 0,7 % LMP agaroze.

3.4.5 Izvedba kometnega testa

Uporabljali smo naslednje raztopine:

Preglednica 15: Raztopina za alkalno lizo

NaOH 30 mM	0,6 g
NaCl 1M	69,6 g
N-laurilsarkozinat (Sigma, L-5777) 0,1 %	1,0 g
Triton-x 100 (Sigma, M-0880)	0,500ml
Dimetil sulfoksid (Sigma, D-8779)	100 ml
Voda MilliQ	do 1000 ml

Preglednica 16: Elektroforetski pufer

NaOH 10M	3 ml
Etilendiamin tetraacetna kislina 1M (Sigma, E-5134)	2 ml
Voda MilliQ	do 1000 ml

Preglednica 17: Koncentrirana raztopina K-Na pufra PBS

NaCl	80 g
KCl	2 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Na ₂ HPO ₄	11,5 g
Voda MilliQ	do 1000 ml

Za delovni pufer PBS razredčimo 100 ml koncentrirane raztopine z 900 ml vode MilliQ.

3.4.5.1 Priprava gelov na mikroskopskih objektivih

Za fiksacijo gelov smo uporabljali obrušena mikroskopska objektna stekelca, ki smo jih predhodno očistili v ultrazvočni kopeli (2 x 15 minut pri 90 °C). Delo je potekalo v zatemnjenem prostoru.

Za pripravo agaroze smo agarozni prašek raztopili v delovni raztopini pufra PBS. Sestava pufra je opisana v preglednici 8. Agarozo smo pred uporabo utekočinili v mikrovalovni pečici. Agarozo za 3. in 4. sloj smo nato ohladili na 30 °C, da smo se izognili poškodbam celic zaradi visoke temperature.

1. sloj: 400 µl 1 % NMP agaroze (Sigma, A-9539) smo na stekelce nanegli s hematološko razmazovalko. Razmaze smo sušili preko noči pri sobni temperaturi.
2. sloj: 600 µl 0,6 % NMP agaroze smo nanegli na posušen prvi sloj. Enakomerno smo ga porazdelili s polaganjem gladkega objektnega stekelca na tekoči gel. Sloj smo 10 minut utrjevali na ledeni plošči.
3. sloj: na utrjeni drugi sloj smo po odstranitvi zgornjega objektnega stekelca nanegli 500 µl mešanice tekoče kulture celic in 0,7 % LMP agaroze (Sigma, A-9414) v razmerju 1: 5. Gele smo porazdelili z objektnim stekelcem in jih ponovno utrjevali na ledeni plošči. Pokrili smo jih z aluminijevo folijo in vklopljene celice tako zaščitili pred svetlobo.
4. sloj: 500 µl 0,5 % LMP agaroze smo po odstranitvi zgornjega objektnika nanegli na tretji sloj z novim gladkim objektivom. Štirislojne gele, pokrite z aluminijevo folijo, smo 10 minut utrjevali na ledeni plošči.

3.4.5.2 Negativna in pozitivna kontrola

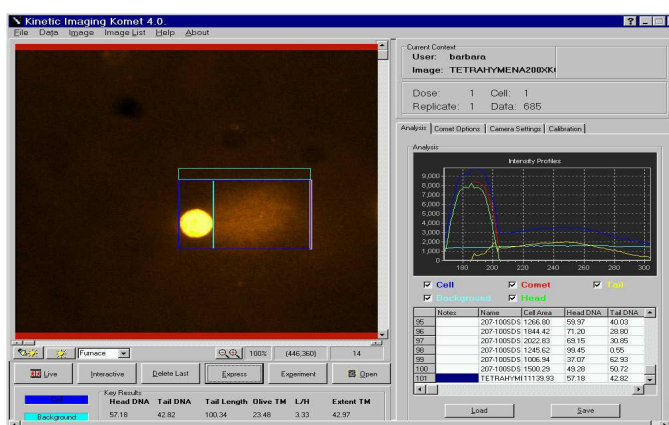
Negativno kontrolo je predstavljalo prilagojeno gojišče za pražival *T. thermophila* (preglednica 13). Za pozitivno kontrolo smo štirislojne gele z vklopljenimi celicami iz istega gojišča za 5 minut izpostavili raztopini 500 µM vodikovega peroksida v delovni raztopini PBS. Pred nadaljnjo izpostavitvijo raztopini za alkalno lizo smo gele na objektivih spirali v delovni raztopini PBS.

3.4.5.3 Postopek kometnega testa

Pripravljene štirislojne gele na objektivih smo potopili v raztopino za alkalno lizo (preglednica 15). Alkalna liza je potekala v hladilniku (4 °C) 1 uro. Sledilo je razvijanje superzvite DNK v alkalnem pH. Gele smo 60 minut spirali v elektroforetskem pufru (preglednica 16) (pufer smo zamenjali vsakih 20 minut). Nato smo objektive z geli preložili v elektroforetske banjice. Elektroforeza je potekala 5 minut pri 25V in 300mA. Po končani elektroforezi smo jih spirali v 400 mM raztopini Tris-hidroksimetil aminometana (2 x 10 minut), da smo nevtralizirali visoko alkalno vrednost pH elektroforetskega pufra. DNK v gelih smo obarvali z etidijevim bromidom (2µg/ml 10 mM PBS pufru) in gele ponovno spirali v 400 mM raztopini Tris-hidroksimetil aminometana.

3.4.5.4 Odčitavanje rezultatov

Poškodbe jedrne DNK smo ovrednotili pri 400-kratni povečavi z epifluorescentnim mikroskopom (Olympus BX 50) z uporabo filtra BP 515-560 nm in filtra BA 590 nm. Sliko smo prenesli na računalnik z digitalno kamero (Hamamatsu Orca 2) in z računalniškim programom Komet 5.0 (Kinetic Imaging, Ltd) (Single Cell Gel Electrophoresis Analysis, 2001) določili stopnjo poškodb jedrne DNK.



Slika 2: Pogovorno okno programa za analizo slike

Računalniški program iz slike razbere celotno jedro, glavo in rep ter ozadje (slika 2). Po integraciji signala program izračuna številne parametre poškodb jedrne DNK, med katerimi je tudi repni moment po Olivu, ki najbolje izrazi stopnjo poškodb. Pri izračunu vrednosti OTM program upošteva vrednosti zajetih signalov v glavi in repu kometa (2).

$$OTM = (DNK_{glava} - DNK_{rep}) \times \% DNK_{rep} \times 0,01 \quad \dots (2)$$

3.4.6 Statistična analiza rezultatov kometnega testa

Na vsakem objektu stekelcu smo ovrednotili 50 celičnih jeder in za vsako meritev izračunali vrednost OTM. V posameznem poskusu smo za posamezen vzorec ovrednotili 100 celičnih jeder. Opravili smo 3 ponovitve poskusa.

Večjo težavo pri kometnem testu predstavlja primerjanje rezultatov zaporedno izvedenih kometnih testov, saj lahko pride do nihanj in odstopanj pri izvedbi poskusa zaradi uporabe različno starih in metabolno različnih testnih celic, kakovosti priprave gelov na objektih stekelcih, rokovanja s celicami, rahlo različnih elektroforetskih časov ali nihanja temperatur raztopine za alkalno lizo in elektroforezo. Zato uspešnost izvedbe kometnega testa preverjamo s pomočjo interne (pozitivne) kontrole. Statistično značilno višja stopnja poškodbe DNK v pozitivni kontroli proti stopnji poškodbe DNK negativne kontrole je predpogoj za statistično vrednotenje vzorcev v testu.

Izmerjeni kazalci poškodovanosti DNK v kometnem testu se ne prilegajo normalni porazdelitvi, temveč je porazdelitev zamaknjena v levo (Bauer in sod., 1998). Zato smo za statistično analizo podatkov prilagodili metodo analize preživetja, ki so jo opisali Verde in sod. (2006), in v testiranih modelih privzeli Weibullovo in logistično porazdelitev.

Za statistično analizo podatkov kometnega testa lahko uporabimo analizo preživetja ('*survival*'), ker ne izmerimo odziva genotoksičnosti v celoti, temveč le genotoksičnost od začetka izpostavitve do elektroforeze, vpliv genotoksične snovi pa bi se na posameznikih v populaciji lahko izrazil tudi kasneje. Ker so naša opazovanja v tem smislu okrnjena, lahko z analizo preživetja relevantno pojasnimo del te neizražene populacije.

Rezultate kometnega testa smo analizirali s programskim paketom R, prosto dostopnim po splošnem dovoljenju GNU (GNU's Not Unix) na spletni strani <http://www.r-project.org/> (R Development ..., 2004). Osnovne statistične parametre smo določili s pomočjo vgrajenih funkcij, razvoj in obdelavo modelov pa smo opravili z dodatkom '*survival*'.

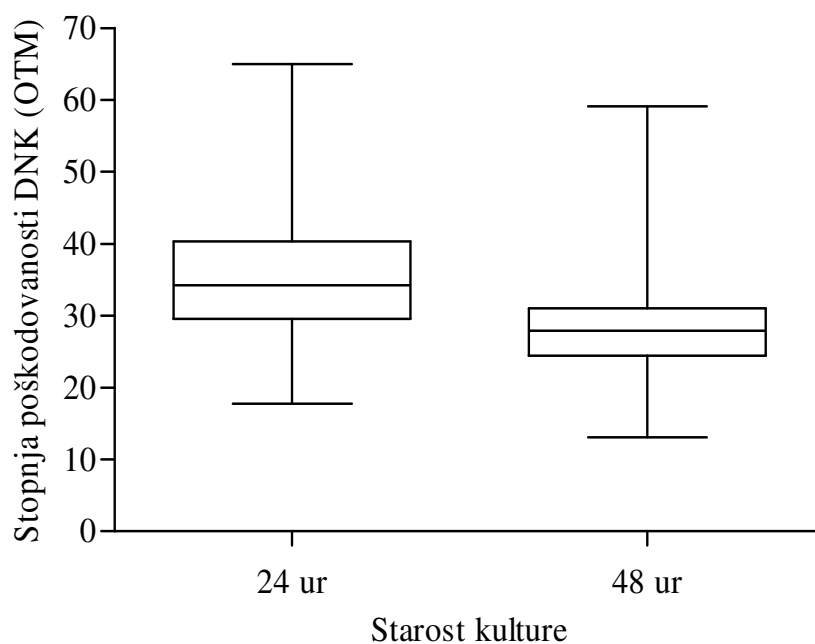
V popolni možni model smo vključili vpliv ponovitve in vzorca ter njuno interakcijo in naključni vpliv koreliranosti znotraj ene enote (100 ocenjenih celic na stekelcu). V analizi smo skupno testirali osem regresijskih modelov (regresijske modele opišemo s funkcijo *survreg*). Regresijske modele smo testirali med seboj s funkcijo *anova*. Pri tem smo za mero uspešnosti vzeli Akakijev informacijski kriterij (AIC), ki modelu z najboljšim prilaganjem danemu setu podatkov pripiše najmanjšo vrednost.

Parameter, ki pri statistični obdelavi pove, da se dva vzorca statistično značilno razlikujeta, je p vrednost. V naši analizi je statistično značilna razlika zabeležena, ko je $p < 0,05$, oziroma statistično značilne razlike ni, če je $p > 0,05$.

4 REZULTATI

4.1 PRILAGODITEV GOJIŠČA ZA PRAŽIVAL *T. thermophila*

4.1.1 Starost kulture praživali za inokulacijo prilagojenega gojišča



Slika 3: Porazdelitev vrednosti OTM v odvisnosti od starosti kulture

Stopnji poškodb (OTM) 24 ur stare kulture in 48 ur stare kulture se med seboj statistično značilno razlikujeta ($p < 0,05$). Ker je DNK celic praživali iz kulture, stare 48 ur, manj poškodovana (bolj stabilna) kot DNK celic 24 ur stare kulture, smo za inokulacijo prilagojenega gojišča dalje uporabljali 48 ur staro kulturo. Sestava bogatega gojišča za pražival je navedena v preglednicah 2, 3 in 4.

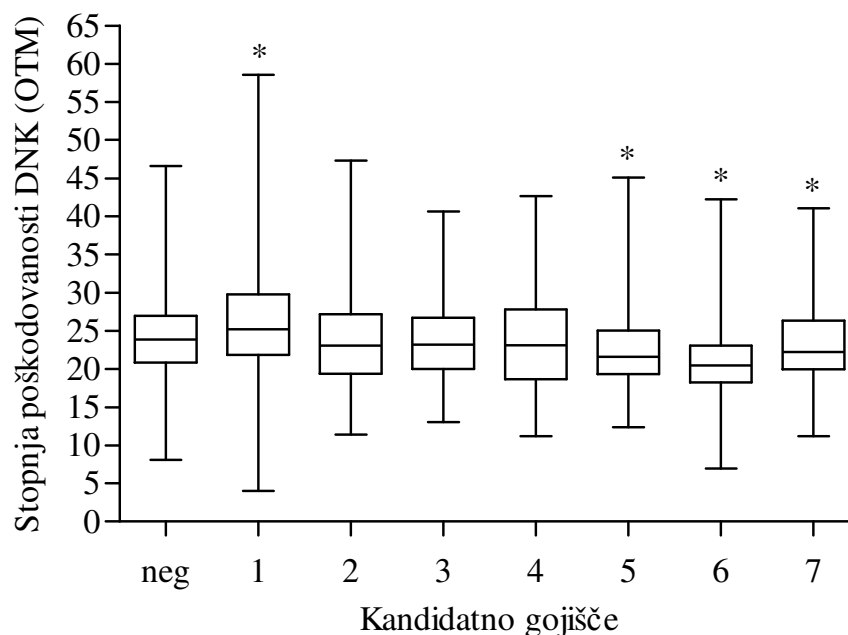
4.1.2 Viabilnost kulture praživali *T. thermophila* v kandidatnih gojiščih

Preglednica 18: Viabilnost kulture praživali v gojiščih različne sestave

gojišče	št. mrtvih celic	št. živih celic	viabilnost (%)
bogato gojišče za pražival (neg)	1	369	99,7
delovna razt. PBS	27	29	51,8
0,9 % NaCl	0	0	0
10 mM Tris HCl (tris)	9	185	95,4
10 mM Tris HCl+Fe (tris Fe)	2	42	95,5
10 mM Tris HCl+soli (tris soli)	2	79	97,5
10 mM Tris HCl+0,2 % glukoza (tris 0,2 glc)	0	73	100
10 mM Tris HCl+0,5 % glukoza (tris 0,5 glc)	0	80	100
10 mM Tris HCl+soli+0,2 % glukoza (tris soli 0,2 glc)	0	56	100
10 mM Tris HCl+soli+0,5 % glukoza (tris soli 0,5 glc)	1	63	98,4

Gojenje praživali v fiziološki raztopini in delovni raztopini PBS smo opustili, ker je bila viabilnost organizmov v teh dveh raztopinah premajhna. Viabilnost organizmov je bila v ostalih gojiščih dovolj velika (večja od 90 %), izmed vseh pa smo izbrali gojišče z 10 mM koncentracijo Tris-hidroksimetil aminometana z raztopljenimi solmi ($MgSO_4 \times 7H_2O$, $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \times 6H_2O$, $MnCl_2 \times 6H_2O$ in $ZnCl_2$) ter 0,2 odstotnim deležem glukoze v vodovodni vodi.

4.1.3 Preverjanje genotoksičnosti kandidatnih gojišč za negativno in pozitivno kontrolo



Slika 4: Porazdelitev vrednosti OTM v odvisnosti od sestave gojišča

(neg-bogato gojišče, 1-tris, 2-tris Fe, 3-tris soli, 4-tris 0,2glc, 5-tris 0,5glc, 6-tris soli 0,2glc, 7-tris soli 0,5glc)

Slika 4 prikazuje primerjavo genotoksičnega učinka kandidatnih gojišč z genotoksičnim učinkom bogatega gojišča (neg) po Shultzu (1997). Sestava posameznih kandidatnih gojišč (tris, tris Fe, tris soli, tris 0,2glc, tris 0,5glc, tris soli 0,2glc, tris soli 0,5glc) je navedena v preglednicah od 6 do 12, sestava bogatega gojišča pa v preglednicah 2, 3 in 4. Pri statistični analizi smo ugotovili, da se od stopnje poškodb DNK (OTM) negativne kontrole statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$) stopnje poškodb kandidatnih gojišč, ki so označena z zvezdico (1, 5, 6 in 7). Gojišče 1 (tris) deluje v primerjavi z bogatim gojiščem (neg) na celice bolj genotoksično, ostala tri gojišča (tris 0,5glc, tris soli 0,2glc, tris soli 0,5glc) pa manj. Izmed zadnjih treh je imelo najmanjši genotoksični učinek na celice gojišče 6 (tris soli 0,2glc), ki smo ga zato izbrali za nadaljnje delo. Gojišče je vsebovalo 10 mM raztopino Tris HCl s solmi ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ in ZnCl_2) in 0,2 % deležem glukoze. Sestava gojišča je prikazana v preglednici 11.

4.2 REZULTATI KOMETNEGA TESTA Z VZORCI JEZERSKIH VODA

4.2.1 Viabilnost kulture praživali *T. thermophila*

Celice praživali *T. thermophila* smo gojili v raztopinah, v katere smo vklopili vodovodno vodo (negativna in pozitivna kontrola) oz. posamezne vzorce jezerskih voda. Viabilnost kultur 24 ur po inokulaciji v sveža gojišča prikazuje preglednica 19.

Preglednica 19: Viabilnost kulture praživali v izbranem gojišču

vzorec	št. mrtvih celic	št. živih celic	viabilnost (%)
V1	0	40	100
V2	1	123	99,2
V3	0	73	100
V4	0	170	100
neg	1	262	99,6

neg–negativna kontrola

Za vse kulture praživali *T. thermophila*, gojene v vodovodni vodi ali vzorcih jezerskih voda, je viabilnost presegala 90 %.

4.2.2 Genotoksičnost vzorcev jezerskih voda

Rezultati testiranja vzorcev jezerskih voda na genotoksičnost so prikazani za zadnji dve ponovitvi kometnega testa skupaj, in sicer v preglednicah 20 in 21 ter na sliki 5. Prvo ponovitev je bilo potrebno izvesti iz obdelave, saj v njej pozitivna kontrola ni bila statistično značilno različna od negativne ($p > 0,05$).

Preglednica 20: Osnovna statistika za poškodbe jedrne DNK (OTM) pri vzorcih jezerskih voda na predelanih podatkih–brez 1. ponovitve

vzorec	št. meritev	povprečje OTM	st. odklon	mediana	min	max
neg	200	17.796	5.449	17.745	3.50	39.87
poz	200	23.413	5.145	23.575	4.60	41.34
V1	200	23.851	5.255	23.210	13.37	43.54
V2	200	17.673	4.735	17.900	3.50	30.58
V3	200	20.308	7.284	19.035	0.55	60.44
V4	144	23.976	5.646	24.295	5.28	40.78

neg–negativna kontrola, poz–pozitivna kontrola, vrednost OTM je v arbitrarnih enotah

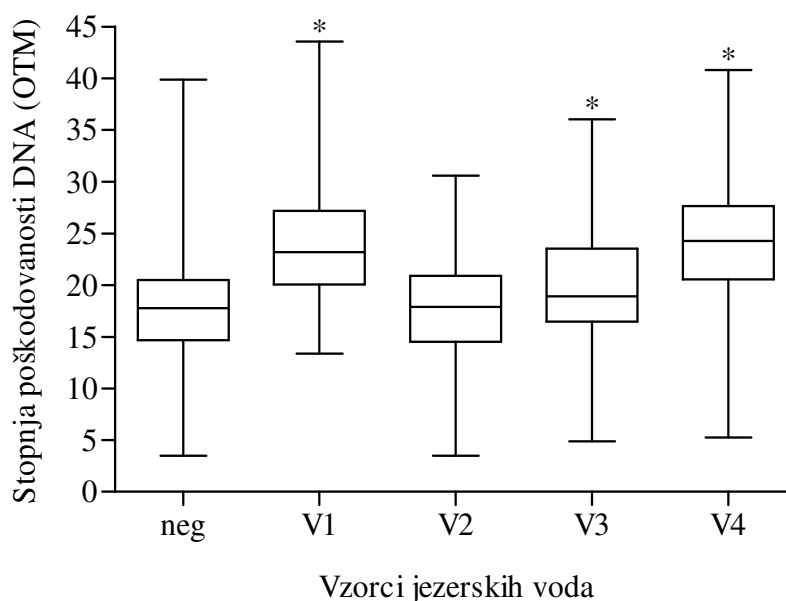
Izločili smo tudi 5 vzvodnih točk pri vzorcu V3 v tretji ponovitvi.

Preglednica 21: Osnovna statistika za poškodbe jedrne DNK (OTM) pri vzorcih jezerskih voda na predelanih podatkih–brez 1. ponovitve in vzvodnih točk pri vzorcu V3

vzorec	št. meritev	povprečje OTM	st. odklon	mediana	min	max
neg	200	17.796	5.449	17.745	3.50	39.87
poz	200	23.413	5.145	23.575	4.60	41.34
V1	200	23.851	5.255	23.210	13.37	43.54
V2	200	17.673	4.735	17.900	3.50	30.58
V3	195	19.797	5.741	18.920	4.91	36.03
V4	144	23.976	5.646	24.295	5.28	40.78

neg–negativna kontrola, poz–pozitivna kontrola, vrednost OTM je v arbitrarnih enotah

Na sliki 5 so grafično prikazani rezultati kometnega testa, izvedenega po ustrezno prilagojenem postopku za vzorce jezerskih voda. Rezultati so grafično predstavljeni v obliki "pravokotnikov z ročajji". Mediana je vrisana kot horizontalna črta v interkvartilnih razmikih. 50 % vrednosti OTM je manjših od mediane ali njej enakih, 50 % pa večjih od mediane ali njej enakih. Pod mejo 1. kvartila (spodnje meje pravokotnikov na pripadajočem grafikonu) se nahaja 25 % vrednosti OTM. Pod mejo 3. kvartila (zgornje meje pravokotnikov na grafikonu) pa se nahaja 75 % vrednosti OTM. Med 1. in 3. kvartilom je 50 % podatkov; to imenujemo tudi interkvartilni razmik. Zgornja in spodnja meja premic označujeta mejne vrednosti.

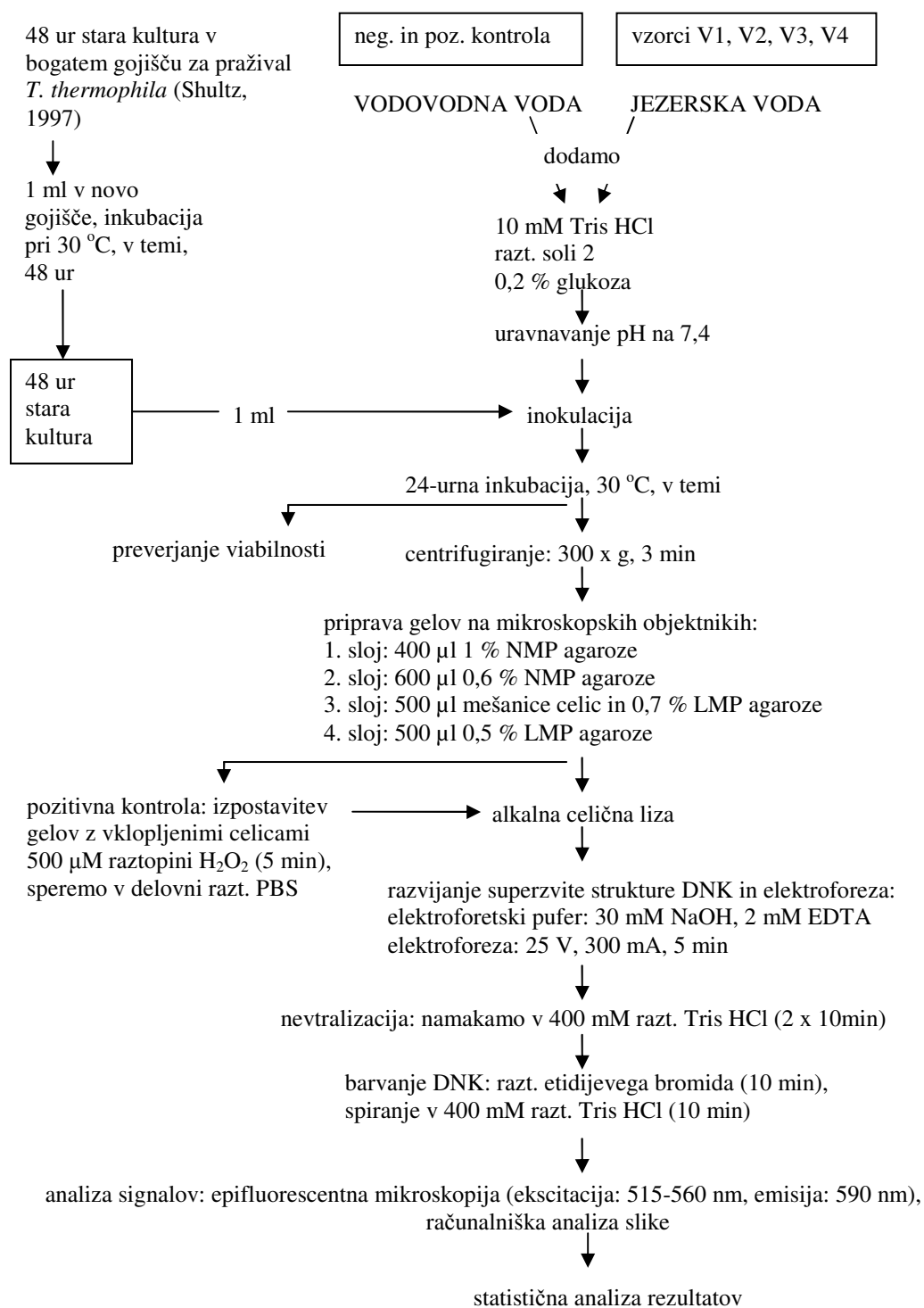


Slika 5: Porazdelitve vrednosti OTM za genotoksični učinek vzorcev jezerskih voda
(neg-negativna kontrola)

Stopnja poškodb DNK (OTM) vseh vzorcev, razen vzorca V2 (Velenjsko jezero pri deponiji), se statistično značilno razlikuje od OTM negativne kontrole (označeni so z zvezdico-* ($p < 0,05$)). Med seboj se statistično značilno razlikujejo stopnje poškodbe DNK vseh vzorcev, razen vzorca V1 in V4.

S kometnim testom smo genotoksičnost dokazali za vzorce jezerskih voda V1 (Družmirsko jezero), V3 (Velenjsko jezero pri čolnarni) in V4 (Škalsko jezero).

4.3 PRILAGOJENI POSTOPEK KOMETNEGA TESTA S PRAŽIVALJO *T. thermophila*, KI JE USTREZEN ZA DOKAZOVANJE GENOTOKSIČNOSTI V JEZERSKIH VODAH



Slika 6: Postopek testiranja genotoksičnosti vzorcev jezerskih voda

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V Šaleški dolini je okolje v veliki meri degradirano zaradi industrije, elektroenergetike in premogovništva, ki so v preteklosti povzročili hitro urbanizacijo. Šoštanjaska termoelektrarna kljub nedavnim sanacijam še vedno onesnažuje zrak, tla in vodo predvsem z žveplovimi in dušikovimi oksidi ter težkimi kovinami, pa tudi z radioaktivnimi snovmi. Na območju prevladujejo naravno kislila tla, ki se zaradi vnosa dušikovih in žveplovih spojin (kisel dež in uporaba mineralnih gnojil) dodatno zakisujejo. Zaradi tega se v njih raztapljajo tudi snovi, ki so drugače netopne (npr. težke kovine). Povečana je tudi vsebnost težkih kovin v pridelkih. Zakisovanje poleg tega zmanjšuje pridelek in gozdni prirast, zato je potrebno apnenje pridelovalnih površin. Problem predstavljajo tudi divja odlagališča odpadkov, viški živalskih gnojil, nevarni gospodinjski odpadki, blato iz čistilne naprave in nenadzorovana ter prekomerna uporaba gnojil in pesticidov (Kugonič in Stropnik, 2001; Sanacijski program ..., 2003). Okolje v Šaleški dolini je torej obremenjeno s številnimi znanimi in neznanimi onesnaževali, ki jih vseh ne moremo določiti s fizikalno-kemijskimi analizami.

Površinske in odpadne vode so kompleksne mešanice, ki lahko vsebujejo tisoče različnih onesnaževal industrijskega, agrikulturnega in gospodinjskega izvora (Žegura in sod., 2006). Onesnaževala se pogosto pojavljajo v tako nizkih koncentracijah, da jih je težko analitično določiti, vseeno pa lahko dolgoročno škodljivo vplivajo na žive organizme. Poleg tega za večino še niso znani posamezni ali združeni biološki učinki, upoštevati pa moramo tudi dejstvo, da nekatere snovi postanejo (geno)toksične šele z bioaktivacijo. Najboljša pot za ugotavljanje škodljivih vplivov onesnaževal je uporaba bioloških testov, s katerimi merimo učinke snovi ali vzorca na živ organizem, rezultati pa predstavljajo povezan biološki odziv na celotno aktivnost vzorca.

Poškodbe DNK so eden pomembnejših biomarkerjev, ki nam pokažejo učinke posameznih snovi ali mešanic snovi na genetski material. Za analizo kompleksnih testnih mešanic z neznanim genotoksičnim potencialom so potrebni občutljivi, ponovljivi, natančni in robustni testni sistemi, med katere so v predhodnih raziskavah uvrstili tudi kometni test (Reifferscheid in Grummt, 2000). Primernost in občutljivost kometnega testa za merjenje genotoksičnosti vzorcev iz vodnih okolij so potrdili Ohe in sodelavci (2004) ter Mitchelmore in Chipman (1998). Pri merjenju genotoksičnosti površinskih voda s testi Ames, *umu*, testom alkalne elucije, razvijanja DNK in neplanirane sinteze DNK ter kometnim testom sta Reifferscheid in Grummt (2000) uvrstila zadnjega med najbolj občutljivega. Za bolj občutljivega se je izkazal tudi v primerjavi s testoma Ames in Zimmermann v raziskavah, ki so jih izvedli Monarca in sodelavci (2004) ter Lah in sodelavci (2005a).

Pri našem delu smo uporabili alkalno različico kometnega testa, katerega osnovni postopek je za praživali *T. thermophila* razvila Lah s sodelavci leta 2004.

Kot modelna evkariontska celica nam je služila pražival *T. thermophila*, ki združuje biološko kompleksnost višjih in eksperimentalno dostopnost nižjih organizmov, in naj bi bila zelo primerna za tovrstno testiranje. Izbrali smo jo, ker je enostavna in poceni za gojenje (Shultz, 1997; Aoyama in sod., 2003; Dayeh in sod., 2005), poleg tega pa je v sladki vodi to ubikvitaren organizem in zato indigena vrsta v preiskovanem okolju.

Raziskava, v kateri so primerjali kometni test na praživali *T. thermophila* z rezultati kometnega testa na humanih celičnih linijah Caco-2 in HepG2, je pokazala primerljive rezultate (Lah in sod., 2005c).

Ker je naravni habitat praživali sladka voda, bi morala idealna negativna kontrola vsebovati vse elemente vzorca jezerske vode brez toksičnih in genotoksičnih snovi. Kometni test je bil v tej točki še nedodelan in zato je bila naša prva naloga v raziskavi poiskati ustrezno prilagojeno gojišče za testiranje genotoksičnosti jezerskih voda. Za negativno kontrolo smo želeli pripraviti gojišče, ki je po sestavi podobno naravnemu okolju praživali, po drugi strani pa čimbolj primerljivo z bogatim gojiščem po Shultzu (1997). Hoteli smo se tudi izogniti reagiranju sestavin gojišča z vzorcem. Dayeh in sodelavci (2005) so ugotovili, da so celice praživali *T. thermophila* v poenostavljenem gojišču bolj dovzetne za težke kovine kot v gojišču z dodanimi organskimi snovmi. Do istih ugotovitev je prišel tudi Nilsson (1989). Glavni vzrok za ta pojav je, da kovine tvorijo komplekse z organskimi komponentami v ravnem mediju in se zato zmanjša njihova dostopnost in s tem toksičnost (Nilsson, 1989).

Pri preizkušanju različnih prilagojenih gojišč se je za najbolj primerljivo z bogatim gojiščem (Shultz, 1997) glede na citotoksičnost in genotoksičnost (rezultati v točkah 4.1.2 in 4.1.3) izkazala raztopina, katere sestava je prikazana v preglednici 11. Raztopino, ki je vsebovala 10mM koncentracijo Tris-hidroksimetil aminometana, in katere pH smo uravnali na 7,4 s HCl, sta za stradanje celic praživali *T. thermophila* uporabila Hellung-Larsen in Andersen (1989). Dodali smo še raztopino soli, ki je vsebovala $MgSO_4 \times 7H_2O$, $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \times 6H_2O$, $MnCl_2 \times 6H_2O$ in $ZnCl_2$ (preglednica 4), da smo zagotovili celicam esencialne anorganske ione (predvsem železo), in glukozo za osnovno energijo pri celičnem metabolizmu in rasti (Shultz, 1997; Frankel, 2000). Sestavine prilagojenega gojišča smo za negativno kontrolo raztapljali v vodovodni vodi, za izpostavljanje vzorcem pa v vzorčni vodi. Sestavine gojišča, raztopljene v vodovodni vodi ali vzorcih, vsebujejo več življenjskemu okolju praživali podobnih sestavin, kot tiste, raztopljene v vodi MilliQ, ki smo jo ravno zaradi tega opustili. Opustili smo tudi fiziološko raztopino, v kateri je bila viabilnost zelo slaba. Tudi Dayeh in sod. (2005) so ugotovili, da ti migetalkarji živijo raje v sveži vodi kot v fiziološki raztopini z različnimi dodatki (Dayeh in sod., 2005).

Vzorcev nismo sterilizirali s filtriracijo, saj lahko tako iz testa odstranimo določene snovi, ki ostanejo na filtrih, mi pa smo hoteli zajeti vplive vseh komponent vzorca. Predhodne analize, ki so bile opravljene na istih filtriranih vzorcih jezerskih voda in izlužkih tal z vklopljenimi sestavinami bogatega gojišča po Shultzu (1997), niso pri nobenem od vzorcev pokazale statistično povečane genotoksičnosti (Osojnik Črnivec, 2006). Bekaert in sodelavci (1999) so v svoji raziskavi ugotovili, da je bila količina organskih in anorganskih onesnaževal v filtriranih izlužkih tal zanemarljivo majhna v primerjavi z nefiltriranimi. Skladno s tem so opazili dramatično zmanjšanje genotoksičnega odgovora po eliminaciji trdnih delcev z membransko filtracijo (Bekaert in sod., 1999).

Podvajanje celic v kulturi se konča od 40 do 44 ur po inokulaciji v sveže gojišče (Shultz, 1997), zato smo za inokulacijo vzorcev uporabili 48 ur staro kulturo, v kateri smo ugotovili manjši obseg poškodb DNK celic praživali kot pri celicah praživali, starih 24 ur (slika 3).

Pomanjkljivost kometnega testa je v tem, da ne vemo, ali so lomi DNK, ki jih zaznamo pri kometnem testu, posledica direktne poškodbe ali napačnega popravila DNK (Klobučar in

sod., 2003). Zaznani lomi DNK so pogosto reverzibilne poškodbe (Lemos in sod., 2005), katerih popravilo je odvisno od časa izpostavitve (Žegura in sod., 2003).

Pri načinu izpostavitve testnih organizmov smo izhajali iz raziskave iz leta 2004, pri kateri so Lah in sodelavci celice praživali izpostavili redčenim vzorcem odpadne vode iz čistilne naprave po vključitvi celic v gele na objektivih za 20 minut. Vendar pri tako kratkem času izpostavitve ne moremo ugotoviti, ali se bodo povzročene poškodbe popravile ali obdržale, saj se popravljalni mehanizmi v tem času še ne izrazijo v večji meri. Zato smo pri naši raziskavi spremenili način izpostavitve testnih organizmov. Izpostavitvev je trajala 24 ur, med katero smo celice izpostavili prilagojenim gojiščem, pripravljenim z vzorci jezerskih voda, šele nato pa smo jih vključili v gele. Pri daljši izpostavljenosti lahko pride do poškodb genetskega materiala, ki se bodo ohranile in privedle do mutacije, v večji meri pa se izrazijo tudi popravljalni mehanizmi. Tako lahko ustrezneje ocenimo dejansko genotoksičnost, moramo pa se zavedati, da so rezultati le odraz stanja ob koncu izpostavitve celic vzorcem. Obseg lomov, ki nastanejo samo zaradi delovanja genotoksinov, bi lahko izmerili, če bi uporabili inhibitorje popravljalnih mehanizmov.

Za pridobitev veljavnih in ponovljivih rezultatov moramo pri testu zagotoviti enake pogoje. Postopek kometnega testa moramo ves čas razvijanja in elektroforeze izvajati v temi pri temperaturi okrog 4 °C, da preprečimo dodatne poškodbe DNK med testom. Preveč koncentrirana agarozna lahko na primer zmanjša migracijo DNK (Žegura in Filipič, 2004). Lažno pozitivne rezultate lahko pridobimo tudi pri poškodbah DNK, povezanih s citotoksičnostjo, zato smo pred izvedbo testa testirali celično viabilnost.

S kometnim testom smo za vzorce jezerskih voda V1 (Družmirsko jezero), V3 (Velenjsko jezero pri čolnarni) in V4 (Škalsko jezero) dokazali genotoksično delovanje na pražival *T. thermophila* (slika 5).

Toksičnost in genotoksičnost snovi je močno povezana z fizikalno-kemijskimi lastnostmi vode in sedimenta, sestavo in zdravstvenim stanjem živih organizmov in tudi koncentracijo in biodostopnostjo škodljivih snovi.

Predhodne analize so genotoksičnost na področju Šaleške doline za tla potrdile (Lah in sod., 2005b) oz. nakazale (Kungotič in Stropnik, 2001). Prvotna raziskava s kometnim testom na filtriranih vzorcih jezerskih voda in izlužkih tal z vklopljenimi sestavinami gojišča po Shultzu (1997) ni pokazala genotoksičnosti (Osojnik Črnivec, 2006).

Čeprav nobeden od merjenih fizikalno-kemijskih parametrov (preglednica 1 na str. 7) ni presegal zakonsko določenih mejnih vrednosti, so analize zaznale povečane vrednosti sulfatov v vzorcu Velenjskega jezera (V2) ter težkih kovin v obeh vzorcih Velenjskega jezera (V2 in V3), in sicer bakra in niklja v vzorcu V2 in V3 ter cinka v V2. V obeh vzorcih Velenjskega jezera so tudi povečane koncentracije drugih ionov. Vzrok je odlagališče pepela iz termoelektrarne, od koder odteka izprane snovi v Velenjsko jezero (Kotnik in sod., 2002). Težke kovine so elementi v sledovih in so esencialni elementi za živa bitja, vendar pa so lahko v prevelikih količinah toksične.

V vzorcu iz Velenjskega jezera (V2) in v vzorcu iz Škalskega jezera (V4) je povečana motnost, ki se povezuje z erozijo koloidnih snovi, zaradi česar se lahko poveča adsorpcija snovi in posledično zmanjša toksičnost. Vrednost totalnega in raztopljenega organskega ogljika je najvišja v vzorcu iz Škalskega jezera (V4), kar kaže na organsko onesnaženje. Zaradi tega se lahko poveča aktivnost organizmov in posledično količina ROS, ki lahko poškodujejo DNK. V vzorcu iz Družmirskega jezera (V1) so zaznali povečano pH

vrednost v primerjavi z drugimi vzorci. Mi smo vsem vzorcem uravnali pH na 7,4, s čimer smo morda spremenili dostopnost ali aktivnost nekaterih snovi.

Predvidevamo, da smo povečano genotoksično delovanje vzorcev V1, V3 in V4 zaznali zaradi prisotnosti snovi, ki so bile v nekoliko povečanih koncentracijah, a niso presegale mejnih vrednosti, in zaradi snovi, ki morda niso bile vključene v kemijsko analizo. Lahko je prišlo tudi do medsebojnih interakcij snovi v vzorcu, lahko pa smo s postopkom obdelave vzorca spremenili biodostopnost ali aktivnost nekaterih snovi ali kako drugače vplivali na genotoksičnost. Lahko so bili v nefiltriranem vzorcu prisotni mikroorganizmi, ki so vplivali na sestavo vzorca.

Lahko da je v vzorcu iz Velenjskega jezera (V2) prišlo do upočasnjene migracije DNK pri elektroforezi zaradi povečane količine nastanka prečnih povezav (Uhl in sod., 2000), kar je značilno za toksično delovanje težkih kovin (Reinecke S.A. in Reinecke A.J., 2004). To bi lahko dokazali z modifikacijo kometnega testa s podaljšanim časom elektroforeze.

Pomembna faktorja, ki vplivata na biodostopnost težkih kovin v okolju, sta pH in koncentracija organske snovi. Nizek pH mobilizira težke kovine, visok pa jih precipitira in zmanjša toksičnost. Organska snov jih veže in kelira (Atlas in Bartha, 1998). Pražival *T. thermophila* v gojišče skozi celoten celični cikel izloča velike količine amonija, ki lahko poviša pH gojiča, kot so dokazali Larsen in sodelavci (1988), ki so zaradi izločanja amonija kljub pufrski kapaciteti gojišča opazili porast pH iz vrednosti 6,8 na 8,3. To bi lahko zmanjšalo biodostopnost težkih kovin in vplivalo tudi na druge v vzorcu prisotne snovi, ki jih ne poznamo.

Morda je praživali v vzorcu iz Velenjskega jezera (V2) ustrezala višja vsebnost ionov, prisotnih v tem vzorcu.

Za temeljitejši pregled dejanske onesnaženosti jezerskih vzorcev bi morali opraviti še dodatne analize parametrov iz prednostnega in indikativnega seznama parametrov, kot so na primer AOX, BPK, KPK, fenolni indeks, vsota pesticidov in mineralna olja, ki so navedeni v Uredbi o kemijskem stanju površinskih voda (Uredba ..., 2002).

Uporabljeno statistično analizo bi morali primerjati še z drugimi statističnimi metodami, saj v znanstveni literaturi še ni opisane standardizirane metode za statistično obdelavo rezultatov kometnega testa (Verde in sod., 2006).

V zanesljiv monitoring stanja voda je priporočljivo vključiti bioteste, ki vključujejo različne molekularne, biokemijske, histocitopatološke in fiziološke biomarkerje, ki so občutljivi, zanesljivi in hitroodzivni, meritve bioakumulacije v organizmu, ter uporabo več različnih organizmov iz različnih trofičnih nivojev. Medtem ko bi lahko *in vitro* bakterijske testne sisteme uporabili za ugotavljanje resnične genotoksičnosti snovi, pa moramo za dokončno oceno tveganja za okolje upoštevati izraženo genotoksično aktivnost v organizmih, relevantnih v okolju. S tem upoštevamo realne poti izpostavitve v preiskovanem okolju, učinke metabolizma in učinkovitost popravljanja DNK (Jha in sod., 2000). Za zanesljivo ugotavljanje genotoksičnosti površinskih voda potrebujemo nabor dveh ali treh testnih sistemov. Reifferscheid in Grummt (2000) sta predlagala uporabo testa Ames, *umu* in kometnega testa, Žegura in sodelavci (2006) pa kombinacijo SOS/*umu*C testa, MTT in kometnega testa. Ker pa z biotesti ne moremo ugotoviti, katera izmed snovi deluje genotoksično, se za ocenjevanje okoljskih vzorcev priporoča hkratno izvajanje

fizikalno-kemijskih analiz. Za boljšo interpretacijo biološkega pomena rezultatov pa je priporočljivo pridobiti tudi podatke o morfologiji vodnega telesa, geografiji in geologiji področja, klimi ter ekonomiji.

Na podlagi rezultatov naše diplomske naloge lahko podamo naslednje sklepe:

- S prilagojenim postopkom kometnega testa z migetalkarjem *T. thermophila* smo dokazali genotoksičen vpliv (enojne, dvojne prelome DNK ter alkalno labilna mesta) vzorcev jezerskih voda Šaleške doline, čeprav nobeden od fizikalno-kemijskih parametrov ni presegal zakonsko predpisanih mejnih vrednosti.
- Kometni test z migetalkarjem *T. thermophila* v preizkušeni obliki lahko predlagamo kot eno izmed dovolj občutljivih metod za vrednotenje genotoksičnosti vzorcev jezerskih voda.
- Realno sliko genotoksičnosti vzorcev jezerskih voda v Šaleški dolini lahko pridobimo le z izvedbo večjega števila biotestov, ki vključujejo zaznavanje različnih poškodb DNK in organizme iz različnih trofičnih nivojev. Na podlagi le enega samega biotesta za genotoksičnost ne moremo podati končnih zaključkov o genotoksičnosti testiranih vzorcev jezerskih voda.

6 POVZETEK

Z učinkovitim spremljanjem stanja okolja bi lahko zaznali zgodnje onesnaženje in pravočasno izboljšali kakovost okolja, spremljali uspešnost postopkov remediacije ter lažje zavarovali zdravje ljudi in živali. Škodljivo lahko na okolje in živa bitja vplivajo najrazličnejša kemijska in fizikalna onesnaževala, katerih vrednosti po zakonu spremljamo predvsem s fizikalno-kemijskimi analizami. Pri teh analizah pa ne upoštevamo bioloških učinkov onesnaževal na žive organizme, medsebojnih vplivov onesnaževal v vzorcu, onesnaževal, katerih koncentracije so pod mejo zaznave, učinkov neznanih onesnaževal in bioaktivacije.

V diplomskem delu smo z alkalno različico kometnega testa preverjali genotoksično delovanje vzorcev jezerskih voda iz treh šaleških jezer na pražival *T. thermophila*.

Kometni test smo prilagodili po postopku, ki so ga leta 2004 opisali Lah in sodelavci. Pražival *T. thermophila* smo pred začetkom testa gojili v bogatem gojišču za pražival. Ker pa je pražival *T. thermophila* v sladkih vodah ubikvitaren organizem, smo uporabili gojišče, ki bi bilo čimboljše približek njenemu naravnemu okolju. Gojišče za negativno in pozitivno kontrolo je vsebovalo 10 mM koncentracijo Tris HCl s solmi (esencialne anorganske snovi) in glukozo (osnovna energija) v vodovodni vodi. V primeru testiranih vzorcev pa smo vodovodno vodo zamenjali z vzorci jezerskih voda. Vzorcev nismo filtrirali, ker smo hoteli zajeti vplive vseh komponent vzorca. Za pozitivno kontrolo smo celice praživali izpostavili raztopini 500 μ M vodikovega peroksida. Po alkalni lizi in elektroforezi smo stopnjo poškodb DNK ocenili s pomočjo epifluorescentnega mikroskopa, povezanega preko digitalne kamere s sistemom za analizo slike. Statistično analizo rezultatov kometnega testa smo opravili s prosto dostopnim programskim paketom R. Osnovne statistične parametre smo določili s pomočjo vgrajenih funkcij, razvoj in obdelavo pa smo opravili z dodatkom 'survival'.

V naši raziskavi smo uspeli dokazati genotoksičnost pri treh vzorcih jezerskih voda. Predhodne analize tal na istem področju potrjujejo genotoksičnost, analize istih jezerskih vzorcev, ki so bili filtrirani, pa niso pokazale genotoksičnega delovanja.

Sklepamo, da smo genotoksičnost zaznali zaradi prisotnosti snovi, ki so bile s filtriranjem izvete iz predhodne analize, prisotnosti snovi, ki jih s fizikalno-kemijskimi analizami nismo zaznali, prisotnosti povečanih koncentracij v vzorcu zaznanih snovi, ki pa niso presegale po zakonu določenih mejnih vrednosti, zaradi medsebojnega delovanja snovi ali zaradi delovanja prisotnih mikroorganizmov. Rezultati našega kometnega testa odražajo povečane koncentracije snovi, zaznane pri analizi fizikalno-kemijskih parametrov, zato bi bilo bioteste smiselno vključiti v spremljanje stanja površinskih voda.

V nabor testnih sistemov bi morali vključiti teste, ki merijo različne biološke odzive prizadetih organizmov in vključujejo organizme iz različnih trofičnih nivojev.

Diplomsko delo pomeni nov korak k oblikovanju metodike vrednotenja onesnaženosti površinskih voda s kometnim testom na praživali *T. thermophila*, in je dobra podlaga za nadaljnje raziskave.

Pred dokončno oceno biološke ustreznosti kometnega testa s praživaljo *T. thermophila* je specifičnost odziva praživali potrebno preveriti na širokem spektru različnih skupin poznanih toksičnih in genotoksičnih snovi.

Podrobnejše razlage za ugotovljeno genotoksičnost na obravnavanih vzorcih je potrebno ugotoviti v nadaljnjih raziskavah.

7 VIRI

- Aoyama K., Iwahori K., Miyata N. 2003. Application of *Euglena glacialis* cells to comet assay: evaluation of DNA damage and repair. *Mutation Research*, 538: 155-162
- ARSO. 2006. Poročilo o kakovosti jezer za leto 2005. Ljubljana, Ministrstvo za okolje in prostor Republike Slovenije, Agencija Republike Slovenije za okolje (oktober 2006)
http://www.arso.gov.si/vode/jezera/jezera_2005.pdf (september 2007): 187 str.
- ARSO. 2007a. Program spremljanja ekološkega in kemijskega stanja jezer. 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 (september 2007): 17 str.
- ARSO. 2007b. Vode. Ljubljana, Ministrstvo za okolje in prostor Republike Slovenije, Agencija Republike Slovenije za okolje (september 2007)
<http://www.arso.gov.si/vode> (september 2007): 1 str.
- Atlas R.M., Bartha R. 1998. *Microbial ecology: Fundamentals and applications*, 4th ed., Menlo Park, Benjamin Cummings Publishing: 694 str.
- Bauer E., Recknagel R.D., Fiedler U., Wollweber L., Bock C., Greulich K.O. 1998. The distribution of the tail moments in a single cell electrophoresis (comet assay) obeys a chi-square (χ^2) not a gaussian distribution. *Mutation Research*, 398: 101-110
- Bekaert C., Rast C., Ferrier V., Bispo A., Jourdain M.J., Vasseur P. 1999. Use of *in vitro* (Ames and Mutatox tests) assays to assess the genotoxicity of leachates from a contaminated soil. *Organic Geochemistry*, 30: 953-962
- Belyaev I.Y., Eriksson S., Nygren J., Torudd J., Harms-Ringdahl M. 1999. Effects of ethidium bromide on DNA loop organisation in human lymphocytes measured by anomalous viscosity time dependence and single cell gel electrophoresis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1428: 348-356
- Beričnik Vrbovšek J., Šterbenk E., Ramšak R. 1995. Velenjsko jezero-pogled od blizu. *Zeleno okno*, 3: 29-31
- Cabrera G.L., Rodriguez D.M.G. 1999. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. *Mutation Research*, 426: 211-214
- Chen Y., Wang C., Wang Z., Huang S. 2004. Assessment of the contamination and genotoxicity of soil irrigated with wastewater. *Plant and Soil*, 261: 189-196

- Collins A.R., Dobson V.L., Dušinska M., Kennedy G., Štetina R. 1997. The comet assay: what can it really tell us? *Mutation Research*, 375: 183-193
- Collins A.R. 1999. The comet assay: some considerations. *Neoplasma*, 46: 3-5
- Collins A.R. 2004. The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology*, 26: 249-261
- Da Silva J., De Freitas T.R.O., Marinho J.R., Speit G., Erdtmann B. 2000. An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. *Genetics and Molecular Biology*, 23, 1: 241-245
- Dayeh V.R., Lynn D.H., Bols N.C. 2005. Cytotoxicity of metals common in minning effluent to rainbow trout cell lines and to the ciliated protozoan, *Tetrahymena thermophila*. *Toxicology in Vitro*, 19: 399-410
- Dearfield K.L., Cimino M.C., McCarroll N.E., Mauer I., Valovic L.R. 2002. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. *Mutation Research*, 251: 121-135
- Depledge M.H. 1994. Genotypic toxicity: implications for individuals and populations. *Environmental Health Perspective*, 102, 12: 101-104
- Depledge M.H. 1998. The ecotoxicological significance of genotoxicity in marine invertebrates. *Mutation Research*, 399: 109-122
- Derksen J.G.M. 2002. Microbiotests, possibilities and limitations. With special reference to (sub)tropical conditions and developing countries. Amsterdam, Aquasense: 76 str.
- Dias N., Lima N. 2002. A comparative study using a fluorescence-based and a direct-count assay to determine cytotoxicity in *Tetrahymena pyriformis*. *Research in Microbiology*, 153, 5: 313 – 322
- Erbes M., Weissler A., Obst U., Wild A. 1997. Detection of primary DNA damage in *Chlamydomonas reinhardtii* by means of modified microgel electrophoresis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 30: 448-458
- Fairbairn D.W., Olive P.L., O'Neill K.L. 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research*, 339: 37-59
- 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: 223-240

- Ferrao Vargas V.M., Migliavacca S.B., De Melo A.C., Horn R.C., Guidobono R.R., Fernandes De Sa Ferreira I.C., Pestana M.H.D. 2001. Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants. *Mutation Research*, 490: 141-158
- Ferrari L., De la Torre F.R., Demichelis S.O., Garcia M.E., Salibian A. 2005. Ecotoxicological assessment for receiving waters with the premetamorphic tandpoles acute assay. *Chemosphere*, 59: 567-575
- Filipič M. 1995. Mutagenicity and toxicity of water extracts from the Sora river area. *Mutation Research*, 342: 1-8
- Filipič M. 2004. Genotoksične snovi v vodovodni in embalirani vodi: ali se jim lahko popolnoma izognemo. V: Strokovno posvetovanje Kakovost vodovodne in embalirane pitne vode. Pitne vode '04, Ljubljana, 24.-26.11.2004. Komac M. (ur.). Ljubljana, Zavod za tehnično izobraževanje: 93-101
- Frankel J. 2000. Cell biology of *Tetrahymena thermophila*. V: *Tetrahymena thermophila*. Asai D.J., Forney J.D. (eds.). London, Academic Press: 28-103 (Methods in Cell Biology; vol. 62)
- Guidance on a strategy for testing of chemicals for mutagenicity. 2000. London. Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment (COM) (december 2000)
http://www.dh.gov.uk/en/Publicationsandstatistics/Publications/PublicationsPolicyAndGuidance/DH_4005790 (september 2007): 36 str.
- Guzzella L., Monarca S., Zani C., Feretti D., Zerbini I., Buschini A., Poli P., Rossi C., Richardson S.D. 2004. *In vitro* potential genotoxic effects of surface drinking water treated with chlorine and alternative disinfectants. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 564, 2: 179-193
- Hayashi M., Ueda T., Uyeno K., Wada K., Kinai N., Saotome K., Tanaka N., Takai A., Sasaki Y.F., Asano N., Sofuni T., Ojima Y. 1998. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. *Mutation Research*, 399: 125-133
- Hellung-Larsen P., Andersen A.P. 1989. Cell volume and dry weight of cultured *Tetrahymena*. *Journal of Cell Science*, 92: 319-324
- Horvathova E., Slamenova D., Hlinčková L., Mandal T.K., Gabelova A., Collins A.R. 1998. The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay. *Mutation Research*, 409: 163-171
- Jha A.N., Cheung V.V., Foulkes M.E., Hill S.J., Depledge M.H. 2000. Detection of genotoxins in the marine environment: adoption and evaluation of an integrated approach using the embryo-larval stages of the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Mutation Research*, 464: 213-228

- Jha A.N. 2004. Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview. *Mutation Research*, 552: 1-17
- Kirkland D.J., Muller L. 2000. Interpretation of the biological relevance of genotoxicity test results: the importance of thresholds. *Mutation Research*, 464: 137-147
- Klobučar G.I.V., Pavlica M., Erben R., Papeš D. 2003. Application of the micronucleus and comet assay to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. *Aquatic Toxicology*, 64: 15-23
- Kotnik J., Horvat M., Jereb V. 2002. Modelling of mercury geochemical cycle in lake Velenje, Slovenia. *Environmental Modelling & Software*, 17: 593-611
- Kugonič N., Stropnik M. 2001. Vsebnost težkih kovin v tleh in rastlinah na kmetijskih površinah v Šaleški dolini. Zaključno poročilo. Velenje, ERICo Velenje: 173 str.
- Lah B., Malovrh S., Narat M., Čepeljnik T., Marinšek Logar R. 2004. Detection and quantification of genotoxicity in wastewater-treated *Tetrahymena thermophila* using the comet assay. *Environmental Toxicology*, 19: 545-553
- Lah B., Žinko B., 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., Marinišek Logar R. 2005b. Toxic and genotoxic potential 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.
- Larsen J., Svensmark B., Nillson J.R. 1988. Variation in the growth medium during the culture cycle of *Tetrahymena*: with special reference to ammonia (NH₃), ammonium (NH₄⁺), and pH. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 35, 4: 541-546
- Lee R.F., Steinert S. 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research*, 544: 43-64
- Lemos N.G., Dias A.L., Silva-Souza A.T., Mantovani M.S. 2005. Evaluation of environmental waters using the comet assay in *Tilapia rendalli*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19: 197-201

- Loska K., Wiechula D., Korus I. 2004. Metal contamination of farming soils affected by industry. *Environment International*, 30: 159-165
- Manusadžianas L., Balkelyte L., Sadauskas K., Blinova I., Pollumaa 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., Pajk T., Salobir K. 2000. Kometni test v modelni prehranski raziskavi. Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. *Kmetijstvo (Zootehnika)*, 76, 1: 105-111
- Marinšek Logar R., Zrimec A., Berden Zrimec M., Čepeljnik T., Tišler T. 2006. Ugotavljanje strupenosti in genotoksičnosti pitnih vod. V: Zbornik referatov. Vodni dnevi 2006. Portorož, 18.-19. oktober 2006. Roš M. (ur.). Ljubljana, Slovensko društvo za zaščito voda: 58-69
- Mazej Z., Epšek M. 2005. The macrophytes of lake Velenjsko jezero, Slovenia-the succession of macrophytes after restoration of the lake. *Acta Biologica Slovenica*, 48, 1: 21-31
- Mazej Z. 2006. "Fizikalno-kemijske analize vzorcev jezerskih voda". Velenje. ERICo Velenje, Inštitut za ekološke raziskave (osebni vir, 25. sep. 2006).
- Mazza G. 1982. *Bacillus subtilis* "rec assay" test with isogenic strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 43, 1: 177-184
- Miloshev G., Mihaylov I., Anachkova B. 2002. Application of single cell electrophoresis on yeast cells. *Mutation Research*, 513: 69-74
- Mitchelmore C.L., Chipman J.K. 1998. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutation Research*, 399: 135-147
- 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
- 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: 621-630
- Nilsson J.R. 1989. *Tetrahymena* in cytotoxicology: with special reference to effects of heavy metals and selected drugs. *European Journal of Protistology*, 25: 2-25
- Območni razvojni program Savinjsko-Šaleške regije za obdobje 2007 – 2013. 2006. Mozirje, Savinjsko-šaleška območna razvojna agencija, Predlog d.o.o. <http://arhiva.velenje.si/aktualno/sasa-1.pdf> (julij 2007): 83 str.

- Ocena možnosti za vzpostavitev dobrega stanja voda v Sloveniji do leta 2015. 2007. V: Informativni bilten Ministrstva za okolje in prostor Republike Slovenije. Marec 2007. Janežič M. (ur.). Ljubljana, Ministrstvo za okolje in prostor Republike Slovenije (marec 2007)
http://www.mop.gov.si/fileadmin/mop.gov.si/pageuploads/publikacije/bilteni/bil12_5_07.pdf (avgust 2007): 8 str.
- Ohe T., Watanabe T., Wakabayashi K. 2004. Mutagens in surface waters: a review. *Mutation Research*, 567: 109-149
- Olive P.L., Banath J.P. 2006. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols*, 1, 1: 23-29
- Oman J., Dejanovič B., Tuma M. 2002. Solution to the problem of waste deposition at a coal-fired power plant. *Waste Management*, 22: 617-623
- Osojnik Črnivec I. G. 2006. Analiza toksičnosti in genotoksičnosti tal in jezer v Šaleški dolini. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 43 str.
- Panayiotidis M., Collins A.R. 1997. *Ex vivo* assessment of lymphocyte antioxidant status using the comet assay. *Free Radical Research*, 27, 5: 533-537
- Pavlica M., Klobučar G.I.V., Mojaš N., Erben R., Papeš D. 2001. Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay. *Mutation Research*, 490: 209-214
- Poročilo o proizvodnji, vzdrževanju in ekoloških bremenitvah okolja TE Šoštanj v letu 2005. 2006. Rotnik U. (ur.). Šoštanj, Termoelektrarna Šoštanj: 140 str.
- Ptaček O., Stavreva D.A., Kim J.K., Gichner T. 2001. Induction and repair of DNA damage as measured by the comet assay and the yield of somatic mutations in gamma-irradiated tobacco seedlings. *Mutation Research*, 491: 17-23
- Ralph S., Petras M. 1997. Genotoxicity monitoring of small bodies of water using two species of tadpoles and the alkaline single cell gel (comet) assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 29: 418-430
- Reifferscheid G., Grummt T. 2000. Genotoxicity in German surface waters - results of a collaborative study. *Water, Air, and Soil Pollution*, 123: 67-79
- Reinecke S.A., Reinecke A.J. 2004. The comet assay as biomarker of heavy metal genotoxicity in earthworms. *Environmental Contamination and Toxicology*, 46: 208-215

- R Development Core Team, 2004. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna (december 2004)
<http://www.r-project.org/> (april 2007)
- Riso P., Santangelo A., Porrini M. 1999. The comet assay for the evaluation of cell resistance to oxidative stress. *Nutrition Research*, 19, 3: 325-333
- Rojas E., Lopez M.C., Valverde M. 1999. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and application. *Journal of Chromatography B*, 722: 225-254
- Rojčikova Padrtova R., Maršalek B., Holoubek I. 1998. Evaluation of alternative and standard toxicity assays for screening of environmental samples: selection of optimal test battery. *Chemosphere*, 27, 3: 495-507
- Sanacijski program za tla v Mestni občini Velenje. 2003. Uradni vestnik Mestne Občine Velenje, 14: 47-59
- Sasaki Y.F., Izumiyama F., Nishidate E., Ishibashi S., Tsuda S., Matsusaka N., Asano N., Saotome K., Sofuni T., Hayashi M. 1997. Detection of genotoxicity of polluted sea water using shellfish and the alkaline single-cell gel electrophoresis (SCE) assay: a preliminary study. *Mutation Research*, 393: 133-139
- Shultz T.W. 1997. Tetratox: *Tetrahymena thermophila* population growth impairment endpoint-a surrogate for fish lethality. *Toxicology Methods*, 7: 289-309
- Singh N.P., McCOy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175: 184-191
- Single cell gel electrophoresis analysis. User guide - Version 5. 2001. Bromborough, Kinetic Imaging Ltd.: 215 str.
- Šalej M. 2005. Sanacija TEŠ je izboljšala okolje. *Rudar – časopis poslovnega sistema Premogovnik Velenje*, 39, 7: 18
- Šterbenk E. 1999. Šaleška jezera. Vpliv premogovništva na pokrajinsko preobrazbo Šaleške doline. Velenje, ERICo Velenje, Založništvo Pozoj Velenje: 191 str.
- Šterbenk E., Ramšak R. 1999. Pokrajinski vidiki rabe premogovniškega ugrezninskega Velenjskega jezera. V: Sonaravni razvoj v slovenskih Alpah in sosedstvu. 1. Melikovi geografski dnevi, Kranjska Gora, 5.-7. nov. 1998. Ljubljana, Filozofska fakulteta Univerze v Ljubljani, Oddelek za geografijo: 215-223
- Šterbenk E. 2003. Vloga vodnih virov v trajnostno sonaravnem razvoju Šaleške doline in obrobja. Letno poročilo 2002. Velenje, ERICo Velenje: 48 str.
- Šterbenk E., Ževart M., Ramšak R. 2004. Jezera, o katerih bomo še slišali - Šaleška jezera. *Geografski obzornik*, 1/2004: 4-12.

- Šterbenk E. 2006. Trajnostna in sonaravna raba vodnih virov v porečju Pake. V: Šaleška in Zgornja Savinjska dolina. 19. zborovanje slovenskih geografov, Velenje, 21.-23. oktober 2004. Šalej M. (ur.). Velenje, Erico, Inštitut za ekološke raziskave: 184-193
- Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.-C., Sasaki Y.F. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35: 206-221
- Timbrell J. 2000. Principles of biochemical toxicology. 3rd ed. London, Taylor and Francis: 394 str.
- Uhl M., Helma C., Knasmüller S. 2000. Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (Hep G2) cells. *Mutation Research*, 468: 213-225
- Uredba o kemijskem stanju površinskih voda. 2002. Uradni list Republike Slovenije, 12, 11: 818-822
- Van der Oost R., Beyer J., Vermeulen N.P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13: 57-149
- Verde P.E., Geracitano L.A., Amado L.L., Rosa E.C., Bianchini A., Monserrat J.M. 2006. Application of public-domain statistical analysis software for evaluation and comparison of comet assay data. *Mutation Research*, 604: 71-82
- 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
- Wolska L., Rawa-Adkonis M., Namiesnik J. 2002. Assessment of water and sediments contamination in the Bug river based on a bacterial test (*Vibrio fischeri*). V: Book of abstracts. International symposium on advances in analytical separation science, 3-5 June, 2002, Pörtlach/Wörthersee, Austria. Buchberger W., Strlič M. (eds.). Ljubljana, Slovensko kemijsko društvo: str. 142-143
- Wolska L., Sagajdakow A., Kuczynska A., Namiesnik J. 2007. Application of ecotoxicological studies in integrated environmental monitoring: possibilities and problems. *Trends in Analytical Chemistry*, 26, 6: 332-334
- Zakon o varstvu okolja. 2004. Uradni list Republike Slovenije, 14, 41: 4818
- Žegura B., Sedmak B., Filipič M. 2003. Mycrocystin-LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line HepG2. *Toxicology*, 41: 41-48

- Žegura B., Filipič M. 2004. Application of *in vitro* comet assay for genotoxicity testing. V: Methods in pharmacology and toxicology. Optimization in drug discovery, *in vitro* methods. Yan Z., Caldwell G.W.(eds). Totowa, Humana Press: 301-313
- Žegura B., Health E., Černoša A., Filipič M. 2006. Toxicity and genotoxicity studies of surface and waste water samples using a bacterial SOS/*umu* test and mammalian MMT and comet assay. V: Environmental Toxicology: 1st international conference on environmental toxicology, 11-13 September 2006, Mykonos, Greece. Kungolos A.G. (ed.). Southampton; Boston: WIT Press: 159-168.
- Ževart M. 1999. Šaleška dolina. V: Enciklopedija Slovenije. 13. zvezek. Javornik M. (ur.). Ljubljana, Založba Mladinska knjiga: 4-5
- 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.

8 ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Romani Marinšek Logar za strokovno pomoč in nasvete med nastajanjem moje diplomske naloge.

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

Dr. Barbari Lah in Marti Majdič se zahvaljujem za pomoč, prijaznost in potrpežljivost pri uvajanju v laboratorijsko delo.

Gasanu Osojniku Črnivcu se zahvaljujem za družbo med spoznavanjem skrivnostnega sveta kometnega testa in za veliko pomoč pri statistiki.

Moji Mausli hvala za vse vesele urice ob Glinščici, čudovita leta med zvezki, in ker je z menoj uspešno preganjala črne oblake nad faksom in v življenju nasploh.

Hvala tudi mojemu Mišotu in vsem mojim prijateljem, ki mi stojijo ob strani, prenašajo moje izpade, me podpirajo in razumejo.

Mojemu bratcu Andreju hvala, ker z menoj pošastkuje naokoli, in ker je moj sonček.

Največja zahvala pa gre mojima mami in atiku, ker me že vsa ta leta na vse mogoče načine podpirata, verjameta vame, in me imata rada. Brez njiju mi ne bi uspelo.

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Nataša LINDIČ

**UGOTAVLJANJE GENOTOKSIČNOSTI JEZERSKIH
VODA V ŠALEŠKI DOLINI S KOMETNIM TESTOM
NA PRAŽIVALI *Tetrahymena thermophila***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008