

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Ilja Gasan OSOJNIK ČRNIVEC

**ANALIZA TOKSIČNOSTI IN GENOTOKSIČNOSTI TAL IN JEZER V
ŠALEŠKI DOLINI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**TOXICITY AND GENOTOXICITY OF SOIL AND LAKE WATER
SAMPLES FROM ŠALEK VALLEY**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija kmetijstvo - zootehnika. Delo je bilo opravljeno na Katedri za mikrobiologijo in mikrobno biotehnologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete v Domžalah.

Komisija za dodiplomski študij Oddelka za zootehniko je dne 21.07.2005 odobrila temo in naslov diplomske naloge in za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Romano Marinšek Logar.

Recenzent: prof. dr. Franc Viktor NEKREP

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Jurij POHAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

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

Član: prof. dr. Franc Viktor NEKREP
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora: 06.10.2006

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Ilja Gasan OSOJNIK ČRNIVEC

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579:504.06(043.2)=863
KG	mikrobiologija/toksičnost/genotoksičnost/tla/jezera/varstvo okolja/Slovenija
KK	AGRIS P10/P30/T01
AV	OSOJNIK ČRNIVEC, Ilja Gasan
SA	MARINŠEK LOGAR, Romana (mentor)
KZ	SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI	2006
IN	ANALIZA TOKSIČNOSTI IN GENOTOKSIČNOSTI TAL IN JEZER V ŠALEŠKI DOLINI
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	IX, 43 str., 14 tab., 6 sl., 100 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Ustrezno izvajanje ukrepov za obvladovanje problematike onesnaženosti prostora je v veliki meri odvisno od nepretrganega spremljanja trenutnega stanja okolja. Zakonsko predpisane preiskave iz sklopa monitoringa tal in jezerskih voda so utemeljene na spremljanju fizikalnih in kemijskih kazalcev. Ker s fizikalno-kemijskimi analizami ne moremo ugotoviti biološkega učinka, medsebojnega vpliva posameznih sestavin v vzorcu in bioaktivacije, je za celovitejši pregled mehanizmov in intenzivnosti vplivov okolja na organizme rezultate teh metod potrebno dopolniti še z rezultati bioloških testov za toksičnost in genotoksičnost. V tej raziskavi smo preizkusil komercialni testni kit za ugotavljanje toksičnosti Thamnotoxkit F TM s sladkovodnim rakcem <i>Thamnocephalus platyurus</i> , genotoksičnost pa smo ugotavljali z alkalno različico kometnega testa z migetalkarjem <i>Tetrahymena thermophila</i> . S testoma smo vrednotili toksičnost in genotoksičnost vzorcev jezerske vode in genotoksičnost izlužkov talnih vzorcev iz vzorčnih lokacij v Šaleški dolini. V nobenem primeru nismo dokazali toksičnosti in genotoksičnosti. Kljub temu menimo, da je preizkušeni testni kit za ugotavljanje toksičnosti zaradi enostavnosti in hitrosti izvedbe primeren za vrednotenje toksičnega vpliva tovrstnih vzorcev. Na podlagi predhodnih analiz, ki so bile opravljene na istih vzorčnih mestih namreč sklepamo, da genotoksičnosti izlužkov talnih vzorcev in morebitne genotoksičnosti vzorcev jezerskih voda nismo zaznali zaradi načina priprave vzorcev in načina izpostavitve testnega organizma.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579:504.06(043.2)=863
CX microbiology/toxicity/genotoxicity/soil/lakes/environmental protection/Slovenia
CC AGRIS P10/P30/T01
AU OSOJNIK ČRNIVEC, Ilja Gasan
AA MARINŠEK LOGAR, Romana (supervisor)
PP SI-1230 Domžale, Groblje 3
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Zootechnical Department
PY 2006
TI TOXICITY AND GENOTOXICITY OF SOIL AND LAKE WATER SAMPLES FROM ŠALEK VALLEY

DT Graduation Thesis (University studies)
NO IX, 43 p., 14 tab., 6 fig., 100 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Preservation of the natural resources, valuable natural features and spatial characteristics plays an important role in the environmental management and is based on permanent environment condition assessment. For the time being, the current legislation regarding soil and lake water monitoring is heavily based upon physicochemical assays. Since the physicochemical analyses do not provide enough information about biological effects, interactions between sample compounds and bioactivation, bioassays have been considered for environmental monitoring supplementation. In the present thesis a commercial toxicity screening test Thamnotoxkit FTM, which includes a freshwater crustacean *Thamnocephalus platyurus* and one genotoxicity determination test, comet assay on the ciliate *Tetrahymena thermophila* have been performed. With the tests toxic and genotoxic effects on lake water and genotoxic effects on soil samples leachates from Šalek valley were evaluated. In neither case significant toxic or genotoxic responses have been proved. Nonetheless, we may conclude that the commercial screening kit could serve as an appropriate assessment test for the toxicity of such samples. Based on the preceding studies from the same sampling posts we concluded, that the absence of soil sample leachates genotoxicity and eventual genotoxicity of the lake water samples has been recorded, due to the preparation procedure of the growing medium and to the test organism exposure treatment.

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 ŠALEŠKA DOLINA	3
2.1.1 Pregled izbranih vzorčnih mest	4
2.1.1.1 Vzorčne lokacije tal	4
2.1.1.2 Vzorčne lokacije jezerskih voda	6
2.2 SPREMLJANJE ONESNAŽENOSTI TAL IN JEZER V SLOVENIJI	9
2.2.1 Spremljanje onesnaženosti tal	9
2.2.2 Spremljanje onesnaženosti jezer	9
2.3 EKOTOKSIKOLOGIJA	11
2.3.1 Toksičnost	12
2.3.1.1 Thamnotoxkit F TM	13
2.3.2 Genotoksičnost	14
2.3.2.1 Kometni test za dokazovanje različnih oblik prelomov DNA	15
2.3.3 Interpretacija biološkega odziva v testih toksičnosti in genotoksičnosti	16
3 MATERIAL IN METODE	17
3.1 ODVZEM VZORCEV	17
3.1.1 Talni vzorci	17
3.1.1.1 Priprava izlužkov talnih vzorcev	17
3.1.2 Vzorci jezerskih voda	18

3.2	THAMNOTOXKIT F TM	18
3.2.1	Valjenje cist	18
3.2.2	Kontrola	19
3.2.3	Postopek testa Thamnotoxkit FTM	19
3.2.4	Analiza rezultatov	20
3.3	KOMETNI TEST	21
3.3.1	Kultura praživali <i>T. thermophila</i>	21
3.3.1.1	Preverjanje viabilnosti kulture praživali <i>T. thermophila</i>	22
3.3.1.2	Starost kulture praživali <i>T. thermophila</i>	22
3.3.1.3	Priprava kulture praživali <i>T. thermophila</i>	22
3.3.2	Priprava kometnega testa	23
3.3.2.1	Priprava minigelov na mikroskopskih objektivih	23
3.3.3	Kontrole	24
3.3.4	Postopek kometnega testa	24
3.3.5	Odčitavanje rezultatov	24
3.3.6	Statistična analiza rezultatov kometnega testa	25
4	REZULTATI	27
4.1	THAMNOTOXKIT F TM	27
4.2	KOMETNI TEST	28
4.2.1	Viabilnost kultur praživali <i>T. thermophila</i>	28
4.2.2	Genotoksičnost izlužkov talnih vzorcev	28
4.2.3	Genotoksičnost vzorcev jezerskih voda	30
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	31
6	POVZETEK	35
7	VIRI	37
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Pregl. 1: Pedološke analize talnih vzorcev (Lah, 2006)	4
Pregl. 2: Fizikalno-kemijski parametri talnih vzorcev (Lah, 2006)	5
Pregl. 3: Vsebnost težkih kovin, žvepla in nitratov v talnih vzorcih (Lah, 2006)	5
Pregl. 4: Fizikalno-kemijske analize vzorcev jezerske vode (Mazej, 2006)	8
Pregl. 5: Bogato gojišče za pražival <i>T. thermophila</i>	21
Pregl. 6: Kloridi	21
Pregl. 7: Sulfati	22
Pregl. 8: Raztopina za alkalno lizo	23
Pregl. 9: Elektroforetski pufer	23
Pregl. 10: Koncentrirana raztopina K-Na pufra PBS	23
Pregl. 11: Prikaz izračunanih vrednosti % smrtnosti v testu Thamnotoxkit F TM	27
Pregl. 12: Viabilnost gojenih kultur praživali <i>T. thermophila</i>	28
Pregl. 13: Osnovna statistika za poškodbe jedrne DNA pri izlužkih talnih vzorcev	29
Pregl. 14: Osnovna statistika za poškodbe jedrne DNA pri vzorcih jezerskih voda	30

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Valjenje cist v inkubatorju	19
Slika 2: Prenos ličink	20
Slika 3: Štetje mrtvih ličink	20
Slika 4: Pogovorno okno programa za analizo slike	25
Slika 5: Porazdelitve vrednosti RM-Olive za genotoksičnost izlužkov talnih vzorcev	29
Slika 6: Porazdelitve vrednosti RM-Olive za genotoksičnost vzorcev jezerske vode	30

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ANAS	analitsko nadzorni in alarmni sistem
AOX	<i>adsorbable organic halides</i> (adsorbirani organski halogeni)
ARSO	Agencija RS za okolje
DNA	<i>deoxiribonucleic acid</i> (deoksiribonukleinska kislina)
EC _i	<i>effective concentration</i> (efektivna koncentracija)
ED _i	<i>effective dose</i> (efektivna doza)
EOX	<i>extractable organic halides</i> (ekstrahirani organski halogeni)
EU	Evropska unija
GNU	<i>GNU's Not Unix</i> (GNU ni UNIX)
LC _i	<i>lethal concentration</i> (letalna koncentracija)
LD _i	<i>lethal dose</i> (letalna doza)
LOEC _i	<i>lowest observed effect concentration</i> (najnižja koncentracija z opaznim učinkom)
LMP	<i>low melting point</i> (tališče pri nizki temperaturi, temperatura želiranja je pri 30°C)
NMP	<i>normal melting point</i> (tališče pri običajni temperaturi, temperatura želiranja je pri 36°C)
NOEC _i	<i>no observed effect concentration</i> (koncentracija brez opaznih učinkov)
PBS	kalij-natrijev fosfatni pufer
RM-Olive	repni moment po Olivu
TEŠ	Termoelektrarna Šoštanj
<i>Th. platyurus</i>	<i>Thamnocephalus platyurus</i>
<i>T. thermophila</i>	<i>Tetrahymena thermophila</i>

1 UVOD

Okolja, v katerem živimo, ne lastimo, temveč z njim zgolj upravljamo. Gospodarjenje z okoljem mora zagotoviti ohranitev značilnosti naravnih virov, naravnih vrednot in nosilcev prostora v vsaj takšni obliki, kot smo jih prejeli od naših predhodnikov. Z upoštevanjem načel trajnostnega razvoja in s celostnim pristopom gospodarjenja bomo lahko, ob ustrezni ravni življenja človeka, ohranili naše okolje za zanamce. Varovanje okolja je za obstoj in razvoj človeštva nepogrešljiva dejavnost.

Onesnaževanje okolja je posledica nepravilne uporabe kemičnih sredstev v različnih industrijskih ali kmetijskih obratih (težke kovine, pesticidi, herbicidi, radioaktivne snovi, itd.), izlivanja onesnaženih in strupenih voda iz rudnikov in različnih drugih proizvodnih obratov ter izpuščanja plinastih snovi in trdnih delcev iz procesov zgorevanja, industrijskih procesov in motornih vozil.

Kadar to onesnaženje preseže meje dopustne koncentracije, povzroči veliko in tudi dolgotrajno škodo na zemljiščih, flori, favni, vodi in zdravju prebivalstva. Zaradi izpuščanja onesnažujočih snovi v ozračje se pojavljata kisli dež in smog. Onesnaženi zrak povzroča škodo na objektih, površinskih in talnih vodah, gozdovih in drugi vegetaciji, vodnih rastlinah in živalih ter ogroža zdravje ljudi.

Ustrezno izvajanje ukrepov za obvladovanje onesnaženosti prostora je v veliki meri odvisno od nepretrganega spremljanja trenutnega stanja okolja. Zakonsko predpisane preiskave iz sklopa monitoringa okolja so večinoma utemeljene na spremljanju fizikalnih in kemijskih kazalcev. Fizikalno-kemijske analize so učinkovite le za spremljanje omejenega nabora parametrov in kemijskih snovi ter so pogosto omejene s spodnjo mejo občutljivosti. S temi analizami ne moremo zaznati biološkega učinka, medsebojnega vpliva posameznih sestavin v vzorcu in bioaktivacije. Za celovitejši pregled mehanizmov in intenzivnosti vpliva okolja na organizme je rezultate uveljavljenih metod fizikalno-kemijskih analiz potrebno izvednotiti še z rezultati bioloških testov za toksičnost in genotoksičnost.

Nevarnost za zdravje pomenijo predvsem tiste snovi, ki so pogosto navzoče v okolju in se dolgotrajno ohranjajo. Zdravju škoduje tako izpostavljanje večjim koncentracijam za kratek čas, kot dolgotrajno izpostavljanje majhnim koncentracijam. Majhno toksičnost in genotoksičnost je potrebno zanesljivo dokazati, kar lahko storimo le z dovolj občutljivimi biotesti.

1.1 NAMEN DELA

Ekotoksikološke raziskave kažejo na potrebo po obširnejšem monitoringu tal in površinskih voda. Rutinske fizikalno-kemijske analize je potrebno dopolniti z izbranimi biotesti za vrednotenje toksičnosti in genotoksičnosti tal in vodnih vzorcev. Z biotesti ocenimo biološki učinek vseh potencialnih onesnaževal v vzorcu, sestavo snovi pa dalje ugotavljamo s fizikalno-kemijskimi analizami. V prvi fazi ugotavljanja onesnaženosti nekega okolja bi lahko z biotesti zaradi njihove dostopnosti, enostavnosti, časovne nezahtevnosti in ekonomske sprejemljivosti znatno pripomogli h kvaliteti monitoringa okolja.

V sklopu diplomske naloge smo z biotesti testirali vzorce tal in jezerske vode iz različnih lokacij na območju Šaleške doline, kjer so bile predhodno že opravljene številne raziskave okolja v bližini energetskih in industrijskih objektov (prisotnost aerosolov, žveplovih sestavin in elementov v sledovih v zraku, tleh in vodnih virih). Izbrali smo komercialno dostopen test toksičnosti Thamnotoxkit FTM s sladkovodnim rakcem *Thamnocephalus platyurus* in kometni test z migetalkarjem *Tetrahymena thermophila*. Za ugotavljanje toksičnosti in genotoksičnosti talnih in vodnih vzorcev so primerni občutljivi, hitri in ponovljivi biotesti.

Želeli smo preizkusiti ustreznost izbranih metod za ocenjevanje toksičnih in genotoksičnih učinkov v talnih in jezerskih vzorcih in ugotoviti, ali imajo vzorci iz zemljišč in jezer iz Šaleške doline toksičen in genotoksičen vpliv na izbrane testne organizme.

1.2 HIPOTEZE

Predvidevamo, da bomo z izbranimi biotesti lahko zanesljivo dokazali toksičnost in genotoksičnost v vzorcih obdelovalne zemlje in v vzorcih šaleških jezer oz. njuno odsotnost.

Izlučki vzorcev iz zemljišč ter jezer iz Šaleške doline imajo verjetno majhen toksičen in genotoksičen vpliv na izbrane testne organizme, prav tako pa je verjetno, da se stopnja toksičnosti in genotoksičnosti vzorcev razlikuje znotraj regije.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ŠALEŠKA DOLINA

Šaleška dolina leži v Velenjski kotlini, ob srednjem delu toka reke Pake. Kotlino je reka, ki teče po njenem južnem robu, močno preoblikovala. Dolina se zaradi izkopavanja pliocenskega lignita, ki je deponiran 200-250 m pod površjem doline, pogreza. Od odprtja Velenjskega premogovnika leta 1887 je ugrezanje zajelo 600 ha površine dolinskega dna, kar je največje preoblikovanje pokrajine na Slovenskem. V ugrezninah osrednjega dela Šaleške doline so nastala jezera, ki vsebujejo 35 milijonov m³ vode in obsegajo skoraj 200 ha. Od štirih jezer je največje Velenjsko (130 ha, 24 milijonov m³ vode), Družmirsko pa je z globino 64,5 m najgloblje v Sloveniji. Zaradi ugrezanja so naselja, industrijski, premogovniški in elektroenergetski objekti stisnjeni na rob doline. Ob premogovništvu se je razvila Termoelektrarna Šoštanj, od drugih gospodarskih panog pa sta pomembni še proizvodnja gospodinjstevskih aparatov (Gorenje) in gradbena industrija Vegrad v Velenju. Pred industrializacijo je bilo kmetijsko najbolj pomembno Družmirsko polje, ki je sedaj pogreznjeno skupaj z naseljem (Enciklopedija Slovenije, 1999).

Šaleška dolina je bila v preteklih desetletjih med okoljsko najbolj obremenjenimi regijami v Sloveniji. Vodilni gospodarski dejavnosti sta s svojo dejavnostjo pustila velike ekološke posledice. Premogovništvo in pridobivanje električne energije spreminjata kvaliteto in fiziognomijo regij z emisijami nevarnih dimnih plinov, pepela in drugih produktov, ki nastanejo pri pridobivanju termoenergije ter s spreminjanjem reliefa montanogenega ugrezanja površja (Šalej, 2002). K onesnaževanju okolja pa so prispevali tudi povečevanje prometa, industrije in uporaba premoga v kotlovnica za ogrevanje in malih kuriščih (Okolje v Sloveniji ..., 1998).

Od devetdesetih let so v našem največjem termoenergetskem obratu 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). Kot posledico učinkovite sanacije okoljskih objektov TEŠ, deloma pa tudi zaradi splošne uporabe čistejših goriv za ogrevanje, so lahko zaznali precejšnje zmanjšanje onesnaževanja zraka, ter posledično tudi prsti in voda (Šalej, 2005; Okolje v Sloveniji ..., 1998).

Spremljanje stanja onesnaženosti je v preteklih obdobjih potekalo na podlagi fizikalno-kemijskih raziskav (Lah, 2006). V obsežni raziskavi so v Šaleški dolini analizirali vsebnosti težkih kovin v talnih vzorcih in kopičenje v izbranem rastlinskem materialu (Vsebnost težkih kovin v tleh ..., 2001). V novejših raziskavah se raziskovalci odločajo za kombinacijo kemijskih analiz z raznimi bioindikatorskimi organizmi (Avberšek 2004). Za ugotavljanje genotoksičnih učinkov v okolju se tudi pri nas uveljavlja test Ames, kometni test in test mikrojedr v socvetju rastlin (Lah, 2006).

2.1.1 Pregled izbranih vzorčnih mest

2.1.1.1 Vzorčne lokacije tal

Analize vsebnosti težkih kovin iz izbranih vzorčnih območji (T1-T6) so v raziskavi, ki jo je opisala Lah (2006), pokazale, da šest vzorcev zemlje iz Šaleške doline ni onesnaženih s Pb, Hg, Zn, Cu, Co, Mo in Ni. Ti rezultati se ujemajo z izsledki raziskave Vsebnost težkih kovin v tleh in rastlinah na kmetijskih površinah v Šaleški dolini (2001). Mejne imisijske vrednosti, ki predstavljajo gostoto posamezne snovi v tleh, pri kateri še ni škodljivih učinkov na zdravje ljudi (Uredba o mejnih ..., 1996), so za Cd (1 mg/kg suhe zemlje) presežene v vzorčnem območju T3 in T5, za As (20 mg/kg suhe zemlje) pa v območju T6. Zaskrbljujoč je podatek, da so za Cr v vseh vzorčnih območjih presežene mejne imisijske vrednosti (20 mg/kg suhe zemlje) in celo opozorilne imisijske vrednosti, t.j. gostoto posamezne snovi v tleh, pri kateri je ob določenih pogojih zdravje ljudi že lahko ogroženo (Preglednica 3, vrednosti presežkov so odebeljene).

Že v predhodnih raziskavah (Vsebnost težkih kovin v tleh ..., 2001) je bilo ugotovljeno, da se vsebnost Cd manjša z globino vzorčenja. Med rastlinami, ki akumulirajo največ Cd so vrste iz skupine širokolistne zelenjave (regrat in solata), zato se je genotoksičnim vplivom težkih kovin v vrtninah mogoče izogniti z upoštevanjem priporočil o dnevni/tedenski vnosih posameznih elementov.

Lah (2005b) je opisala kometni test s celičnimi linijami Caco-2 in HepG2 na izlužkih vzorcev iz lokacij T1-T6. Genotoksične učinke v primerjavi z negativno kontrolo so zaznali pri vseh testiranih izlužkih ($p > 0,005$). Vzorec T2 je statistično značilno odstopal od vseh ostalih vzorcev pri kometnem testu s celicami Caco-2 ($p > 0,0001$). Pri preverjanju genotoksičnega potenciala s celicami HepG2 pa je prav tako odstopal od vseh ostalih vzorcev, razen vzorca T5 ($p > 0,0001$). S kometnim testom dokazano genotoksičnost talnih izlužkov lahko povežemo s preseženimi imisijskimi vsebnostmi Cr v tleh in preseženo mejno vsebnost As v izlužku T6.

Preglednica 1: Pedološke analize talnih vzorcev (Lah, 2006)

Vzorec	Fini melj (%)	Grobi melj (%)	Glina (%)	Pesek (%)	Teksturni razred
T1	15,5	15,5	10,9	58,1	PI
T2	19,3	12,0	19,1	49,6	I
T3	17,9	7,7	13,1	61,3	PI
T4	26,1	9,9	14,0	50,0	I
T5	26,9	7,1	19,1	46,9	I
T6	28,2	8,1	21,0	42,7	I

PI – peščena ilovica; I - ilovica

Preglednica 2: Fizikalno-kemijski parametri talnih vzorcev (Lah, 2006)

Vzorec	pH (H ₂ O)	pH (KCl)	Organski ogljik (g/kg SS)	Dušik po Kjeldahlu (%)	Lahko dostopni kalij (mg K ₂ O/100 g)	Lahko dostopni fosfor (mg P ₂ O ₅ /100 g)
T1	7,42	6,90	28,7	0,33	9,30	1,95
T2	6,16	5,29	28,5	0,35	27,2	4,94
T3	6,40	5,74	96,2	0,97	22,3	12,4
T4	6,91	6,34	44,0	0,44	9,24	8,11
T5	5,53	4,22	61,7	0,58	53,0	4,77
T6	6,27	5,62	45,1	0,56	25,9	1,56

Preglednica 3: Vsebnost težkih kovin, žvepla in nitratov v talnih vzorcih (Lah, 2006)

Snov	Vzorec					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Pb (mg/kg)	38,0	37,2	72,0	44,0	33,0	46,2
Zn (mg/kg)	119,0	90,1	144	131	126	123
Cd (mg/kg)	0,59	0,64	1,74	0,62	1,11	0,98
As (mg/kg)	13,7	10,7	6,66	11,6	8,86	21,2
Hg (mg/kg)	0,11	<0,10	0,24	0,15	0,42	0,15
Ni (mg/kg)	43,6	43,2	16,6	40,9	31,3	42,3
Mo (mg/kg)	2,61	1,90	2,31	2,55	3,22	4,66
Cr (mg/kg)	193	193	187	216	169	191
Co (mg/kg)	16,3	10	11,7	15,7	8,78	14,4
Cu (mg/kg)	31,9	17,9	16,9	33,5	23,1	35,1
SO ₂ (µg/m ³)	54	126	138	525	266	-
Nitrati (mg/kg)	6,9	<4,0	4,0	4,6	6,4	<4,0

Vzorčna lokacija v Velenju (T1)

Lokacija se nahaja v centru Velenja, med OŠ Anton Aškerc in OŠ Gustav Šilih v bližini postaje ANAS. To je primer urbane lokacije. Mesto vzorčenja leži na nadmorski višini 388 m z naklonom 2° v smeri jugovzhod. Tla lokacija so bila ob gradnji premeščena, horizonti pa med seboj pomešani. Razvita so globoka rjava tla. Tla so slabo alkalna, slabo založena s fosforjem in kalijem ter slabo humozna. Po teksturi jih uvrščamo med peščeno ilovnata tla. K onesnaženosti tal in rastlinskega materiala prispeva predvsem onesnaženost zraka, ki je tipična za mesta (Vsebnost težkih kovin v tleh ..., 2001).

Vzorčna lokacija na Graški Gori (T2)

Mesto vzorčenja leži na ekstenzivnem travinju na Graški Gori v neposredni bližini postaje ANAS, na nadmorski višini 778 m. Območje leži v smeri severno od TEŠ, na zgornji inverzijski plasti. Teren je neskaloovit, strm, z naklonom 35° in ekspozicijo na severozahod. Plitva distrična tla so nastala na miocenskih peskih, peščenjakih in konglomeratih. Tla so močno kislá, slabo založena s hranili in organsko snovjo. Po teksturi so lahka, peščeno

ilovnata. Omejitveni faktor za rast in razvoj predstavljajo neugodne pedološke lastnosti, kot je kislost in slaba založenost s hranili (Vsebnost težkih kovin v tleh ..., 2001).

Vzorčna lokacija v Zavodnjah (T3)

Vzorčno območje se nahaja na severnem vznožju Božičevega in Lipovškega vrha, v neposredni bližini ANAS postaje. Kmetijsko območje leži 8 km severozahodno od TEŠ, na 765 m nadmorske višine (zgornja inverzijska plast). Distrično rjava tla lokacije so se razvila na tonalitu. Tla so močno humozna in zato močno kislila ter slabo založena s fosforjem. Po teksturi jih uvrščamo med lahka, peščeno ilovnata tla. Zaradi kisle vrednosti pH tal in slabe založenosti s hranili je mobilnost Cd povečana, kar omejuje vpliva na rastni potencial. Krma in regrat sta onesnažena s kadmijem. Onesnaženost zraka se je v primerjavi s preteklimi leti precej zmanjšala, vendarle se čez leto še vedno pojavljajo visoke vsebnosti SO₂, v poletnih mesecih pa zaznavajo večje vsebnosti ozona (O₃) (Vsebnost težkih kovin v tleh ..., 2001).

Vzorčna lokacija v Šoštanju (T4)

Ta vzorčna lokacija se nahaja v urbanem predelu na zatravljenem, rekultiviranem ugrezninskem območju Šoštanjskega jezera. Območje leži na nadmorski višini 360 m, z naklonom 3° in severovzhodno ekspozicijo. Globoka rjava tla so se razvila na ilovnatih naplavinah. Tla so srednje kislila, dobro humozna in slabo založena z rastlinam dostopnima fosforjem in kalijem. Po teksturi jih uvrščamo med meljasta ilovnata tla. Zaradi neposredne bližine TEŠ so v Šoštanju posebno v zimskem času presežene vsebnosti SO₂ v zraku (Vsebnost težkih kovin v tleh ..., 2001).

Vzorčna lokacija na Velikem Vrhju (T5)

Izbrano mesto leži na travniku na Velikem Vrhju južno od TEŠ. V bližini je postaja ANAS, na nadmorski višini 555 m z naklonom 5° proti vzhodu. Distrična rjava tla so se razvila na piroklastičnih kameninah. Tla so zelo močno kislila (vrednost pH < 4) po celotni globini in slabo humozna. Slabo so preskrbljena s fosforjem in kalijem. Po teksturi jih uvrščamo med srednje težka, ilovnata tla. Vsebnost As v tleh se približuje mejni vrednosti. Neugodne pedološke značilnosti tal vplivajo na omejen rastni potencial ter povečujejo sposobnost kopičenja težkih kovin v rastlinah. Vsebnost kadmija je presežena le v regratu. Zaradi klimatskih razmer, smeri vetrov in geografske lege je območje neposredno izpostavljeno onesnaževanju s SO₂ in drugimi onesnaževali (Vsebnost težkih kovin v tleh ..., 2001).

2.1.1.2 Vzorčne lokacije jezerskih voda

Fizikalno-kemijske analize vzorcev jezerske vode (Preglednica 4 na str. 8) so pokazale, da nobeden od preiskovanih parametrov jezerske vode iz izbranih vzorčnih območji (J1-J4) ni presejal predpisane mejne vrednosti. Za podrobnejšo oceno obremenjenosti površinskih voda z znanimi kemičnimi snovmi na naših vzorčnih lokacijah, bi bilo v sklopu fizikalno-kemijskih analiz potrebno oceniti še nekatere druge parametre (AOX, EOX, fenolni indeks, vsota pesticidov, ...), navedene v prednostnem seznamu in indikativnem seznamu kazalcev

kemijskega stanja (Uredba o kemijskem stanju površinskih voda, 2002; Program monitoringa ..., 2006).

Vodno telo površinske vode je sicer čezmerno obremenjeno, če na osnovnem merilnem mestu ena od letnih povprečnih vrednosti parametrov presega mejno vrednost, ki je za ta parameter določena v uredbi, ali ima časovna vrsta letnih povprečnih vrednosti enega od parametrov iz prednostnega seznama nevarnih snovi, za katere se ugotavlja vsebnost v sedimentih, trend naraščanja v obdobju zadnjih petih let (Uredba o kemijskem stanju površinskih voda, 2002).

Prvotno rečna pokrajina se je spremenila v pokrajino z ugrezninskimi jezeri. Do danes so se v Šaleški dolini izoblikovale tri jezerske ugreznine. V vzhodni leži Škalsko jezero (J1), v zahodni Družmirsko (J2) in med njima Velenjsko jezero (J3, J4). Zaradi hitre ojezeritve je na dnu jezer ostalo veliko razgradljivih snovi, zato so jezera že od nastanka v procesu evtrofikacije (Beričnik-Vrbovšek in sod., 1995). Velenjsko jezero v poletnih mesecih občasno cveti (Šterbenk, 1999).

Do leta 1983 je bilo Velenjsko jezero odlagališče pepela iz termoelektrarne Šoštanj. Pri izgorevanju premoga ostane 20% pepela in drugih primesi. Vse to so pomešali z vodo in nastalo suspenzijo po ceveh črpali iz elektrarne direktno v jezero. Nekatere spojine, ki jih vsebuje pepel, so topne v vodi in med transportom pride do izluževanja predvsem kalcijevih hidroksidov v vodo. Premog vsebuje kalcijev karbonat oz. apnenec (CaCO_3), ki v kotlu zgori v žgano apno (CaO). Pri mešanju pepela z vodo nastane gašeno apno (Ca(OH)_2), ki ima visoko vrednost pH. Ker se je vrednost pH vode dvignila na 12 in so iz jezera izginile vse oblike življenja so od leta 1983 s sedimentacijo ločevali pepel od transportne vode. Pepel so odlagali na deponijo, vodo pa še naprej črpali v jezero. Leta 1994 so uvedli še zaprt kroga transportne vode, vrednost pH na površini jezera se je v enem letu zmanjšala na 9 (Beričnik-Vrbovšek in sod., 1995; Šterbenk in Ramšak, 1999). Po daljšem obdobju se je v jezero začelo vračati življenje leta 1997, ko vrednost pH vode po celotnem globinskem profilu ni presegala 8,7 (Šterbenk in Ramšak, 1999).

Preglednica 4: Fizikalno-kemijske analize vzorcev jezerske vode (Mazej, 2006)

Parameter	Vzorec			
	J1	J2	J3	J4
Meritve na terenu				
Temperatura (°C)	17,5	17,6	17,3	18,2
pH	8,29	8,60	8,26	8,28
Redoks potencial (mV)	487	484	483	489
Motnost (FTU)	15	7	7	14
Analize vode				
Ogljik – celotni organski - TOC (mgC/L)	17,7	13,1	16,4	14,5
Ogljik – raztopljeni organski DOC (mgC/L)	11,80	8,97	10,90	9,97
Amonijev dušik (mg N/L)	0,22	0,16	0,22	0,16
Nitretni dušik (mg-N/L)	0,79	0,55	1,04	1,02
Nitritni dušik (mg N/L)	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3
Sulfat (mg/L)	28,5	38,5	8,73	44,5
Klorid (mg/L)	12,40	5,84	30,10	29,60
Fosfor – celotni (mg/L)	0,03	0,05	0,04	0,03
Kalcij – Ca (mg/L)	67,6	52,4	214,0	211,0
Magnezij – Mg (mg/L)	20,8	14,0	14,2	15,2
Natrij – Na (mg/L)	8,32	6,66	58,70	59,20
Kalij – K (mg/L)	2,34	2,31	42,4	42,8
Težke kovine				
Arzen raztopljeni – As (µg/L)	0,5	<0,5	1,4	1,3
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	<1,0	1,7	1,5
Cink raztopljeni – Zn (µg/L)	<2,0	<2,0	3,3	18,1
Baker raztopljeni – Cu (µg/L)	<1,0	<1,0	1,3	1,1
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 SPREMLJANJE ONESNAŽENOSTI TAL IN JEZER V SLOVENIJI

Po uradno prečiščenem besedilu Zakona o varstvu okolja (2006) monitoring stanja okolja obsega spremljanje in nadzorovanje kakovosti tal, vode in zraka ter biotske raznovrstnosti.

2.2.1 Spremljanje onesnaženosti tal

V EU so ukrepi za varstvo tal zajeti v okviru različnih področij, predvsem na področju varstva voda pred onesnaženjem z nitrati iz kmetijskih virov, vnašanjem blata čistilnih naprav v tla ter varstva zraka. Kakovost tal je opredeljena tudi z ukrepi omejevanja emisij iz industrijskih objektov in objektov za rejo živine. Leta 2002 je EU posvetila veliko pozornosti pripravi tematske strategije za varstvo tal, v okviru katere bo pripravljena nova krovna direktiva o tleh (*Soil Framework Directive*). Pomemben del krovne direktive bo seveda tudi obveznost spremljanja stanja tal (Resolucija o nacionalnem programu ..., 2006).

Republika Slovenija še nima celovitega pregleda stanja onesnaženosti tal, zaključek pridobivanja celovitega pregleda onesnaženosti tal do leta 2008 je zato prvi cilj v Resoluciji o nacionalnem programu varstva okolja. Na podlagi teh podatkov bo možno izvajanje drugega cilja, vzpostavitve državnega monitoringa tal (Resolucija o nacionalnem programu ..., 2006).

ARSO v okviru trenutnega izvajanja spremljanja stanja tal izdaja pooblastila, vodi registre in obdeluje poročila, ki so omejena na obratovalne monitoringe vnosa nevarnih snovi in rastlinskih hranil v tla. V soglasju z Ministrstvom za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano izdaja ARSO tudi dovoljenja za vnos blata čistilnih naprav, komposta ali mulja v tla (ARSO, 2006).

Raziskava onesnaženosti tal, ki je po naročilu ARSO potekala na Centru za pedologijo in varstvo okolja Biotehniške fakultete ter Centru za varstvo okolja Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor, navaja številne fizikalno-kemijske analize za ugotavljanje onesnaženosti talnih vzorcev. Vzorci so bili testirani na podlagi standardne pedološke analize (% peska, grobega, finega melja ter gline, teksturni razred, organska snov, vsebnost ogljika in dušika, vrednost pH, fosfor, kalij, izmenjalna kapaciteta tal, stopnja nasičenosti z bazami in razmerje med kationi) na nevarne anorganske snovi (kovine ekstrahirane z zlatotopko, vsebnost fluoridov) in na nevarne organske snovi (Raziskave onesnaženosti tal ..., 2004). Biotesti v raziskavo niso bili vključeni.

2.2.2 Spremljanje onesnaženosti jezer

Varstvo voda je zelo heterogeno področje, ki je pod stalnim vplivom tako naravnih procesov, kot od človeka povzročenih dejavnikov. Zaradi svoje specifičnosti zahteva upravljanje z vodnimi viri celovito obravnavo in temu ustrezno institucionalno organiziranost (Resolucija o nacionalnem programu ..., 2006).

ARSO izvaja številne monitoringe v povezavi z varstvom voda, prav tako je to področje bolj temeljito dodelano kot področje tal. Čeprav so v slovenski zakonodaji predvidene tudi biološke preiskave stanja voda, ustrezne biološke metode še niso zakonsko predpisane (ARSO, 2006; Žinko, 2004).

Na podlagi Uredbe o kemijskem stanju površinskih voda (2002), ki vsebinsko povzema nekatere člene in točke aneksa Vodne direktive 2000/60/EC, poteka državni monitoring kakovosti površinskih voda, katerega del je tudi monitoring kakovosti jezer. Monitoring poteka v sodelovanju ARSO, Nacionalnega inštituta za biologijo Ljubljana in Inštitutom za varovanje okolja Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor.

V skladu z aneksom Vodne direktive 2000/60/EC program monitoringa že vključuje spremljanje hidroloških, fizikalno-kemijskih in bioloških elementov kakovosti. Monitoring je usmerjen predvsem v spremljanje eutrofikacije na podlagi vsebnosti hranilnih snovi in ostalih splošnih fizikalno-kemijskih analiz vzorcev jezer in njihovih pritokov (Program monitoringa ..., 2006).

Leta 2006 je v program monitoringa vključeno tudi Velenjsko jezero, kot edino umetno vodno telo, za katerega je predvideno spremljanje kakovosti, sicer pa se stanje jezera redno spremlja tudi v okviru obratovalnega monitoringa TEŠ, ki ga izvaja Inštitut za ekološke raziskave ERICo. Meritve v okviru preglednega monitoringa jezer v letu 2006 vključujejo splošne fizikalno-kemijske analize (T zraka, T vode, prosojnost, vrednost pH, električna prevodnost, kisik, ...) in analize fitoplanktona (vrsta, število, biomasa, gostota glede na globino, vsebnost klorofila a). Na nekaterih drugih jezerih, na primer Bohinjskem ali Blejskem, se ugotavlja številnost posamezne zooplanktonske vrste glede na globino ter frekvenco in pogostnost makrofitov. Na podlagi bentoških nevretenčarjev in alg v prerasti za Cerknjsko jezero izračunajo še saprobiološki indeks, kot je to sicer v navadi pri vodotokih (Program monitoringa ..., 2006).

2.3 EKOTOKSIKOLOGIJA

Ekotoksikologija ali toksikologija okolja je veda, ki se ukvarja s toksičnimi učinki fizikalnih ali/in kemijskih vplivov na okolje, v katerem prebivamo. Toksične učinke ekotoksikologi še posebno obravnavajo na ravni organizmov, na ravni posameznika, populacije ali združbe. Razumevanje vpliva onesnaženosti na nek ekosistem lahko dosežemo le z interdisciplinarnim pristopom. V prizadevanju za razumevanje dejanske toksičnosti nekega okolja, sodelujejo toksikologija, aplikativna ekologija in kemija okolja (Fendt, 2003).

V starejših študijah okolja so raziskovalci podajali ocene tveganj posameznih onesnaževal za okolje na podlagi fizikalno-kemijskih analiz, katerim so sledile primerjave med zaznanimi koncentracijami in empirično določenimi mejami toksičnosti posameznih snovi (Chatterjee in Banerjee, 1999). Tak pristop ima precej pomanjkljivosti (Derksen, 2002):

- Zaradi cenovnih ali analitskih omejitev lahko v vzorcih zaznamo le določene snovi. Čeprav v rutinskih analizah običajno ocenijo med 30-40 različnih snovi je lahko v vzorcu prisotnih veliko več kot 10.000.
- Dostopnih je relativno malo toksikoloških podatkov.
- Snov je lahko toksična tudi, če so njene koncentracije pod mejo detekcije kemične analize.
- Toksičnost lahko povzročajo tudi nepoznane snovi, npr. metaboliti.
- Ne pridobimo podatka o deležu snovi, ki je organizmom prosto dostopna.
- Na podlagi razpoložljivih rezultatov ne moremo oceniti učinkov kombiniranja toksičnih snovi v naših vzorcih (sinergizmi in antagonizmi, adaptivne reakcije, ...).

Prav tako velja, da nekatere toksične in večino genotoksičnih spojin v okolju ni kemijsko reaktivnih. Šele ko vstopijo v organizem se pretvorijo v elektrofilne molekule, ki se kovalentno vežejo na proteine in nukleinske kisline. Prvotno neškodljive snovi postanejo genotoksične, proces pa imenujemo bioaktivacija (Josephy in sod., 1997).

Podatki o sprejemanju in koncentracijah kemičnih spojin v človeškem organizmu, ki so danes na voljo, so le podatki posameznih raziskav, med katerimi številne ne omogočajo splošno veljavnih zaključkov. Nadalje ni mogoče primerjati izsledkov raziskav iz najbolj onesnaženih območij z nevarnostjo posameznih kemičnih spojin drugod oz. jih upoštevati povsod enako (Likar, 1998).

Pomembna orodja v ekotoksikoloških preiskavah, so bioanalitske metode. Ob pravilni izbiri testnega organizma v biotestu razmeroma učinkovito dopolnimo zgoraj omenjene pomanjkljivosti fizikalno-kemijskih raziskav. Z ustreznim biotestom lahko potrdimo biološki učinek potencialnih onesnaževal v vzorcu na testne organizme, ne moremo pa identificirati specifičnih snovi, ki so za odziv odgovorne (Derksen, 2002; Fendt, 2003).

Glede na vrsto biotesta lahko v poskusu spremljamo različne nivoje toksičnosti oz. različne vrste posledic toksičnih vplivov na preizkušeni organizmi. Odvisno od testnega organizma lahko po izpostavitvi zaznamo delno toksičnost vzorca (motena rast ali nenormalno obnašanje testnih organizmov) ali visoko toksičnost vzorca (smrt, inhibicija rasti). Druga vrsta toksičnosti je na organizmi zaznavna le posredno in se ponavadi izraža

preko biokemijskih in genetskih sprememb. Takšne dolgoročne spremembe lahko ovrednotimo s pomočjo biomarkerjev (Bekaert in sod., 2002).

V ekotoksikološki raziskavi želimo pridobiti širši pogled na snovi v okolju. Za snov, ki je na obravnavani lokaciji povzročila neobičajen odziv, poskušamo razložiti vse dogodke od vnosa do njene končne vloge v ekosistemu. Celostni pristop bomo dosegli v treh korakih (Bekaert in sod., 2002):

- fizikalno-kemijska identifikacija večjih koncentracij onesnaževal prisotnih v vzorcih,
- študija poti in načinov prenosa onesnaževal v ekosistem,
- preizkus z biotestom o mogočih učinkih onesnaževal na organizme v okolju.

V okoljevarstvenih analizah stanja okolja se srečujemo z nekaj osnovnimi mediji. Kadar odvezemamo kompaktno vzorce (sedimenti, tla ali odpadna masa) imamo dve možnosti za nadaljnjo raziskavo. Vzorec lahko preučimo neposredno kot celoto ali pa se osredotočimo na pripravo tekoče faze vzorca (Derksen, 2002).

Izvajanje biotesta na talnem vzorcu je cenovno neustrezno, saj zahteva veliko časa in prostora (Lah, 2005). Ocenjevanje ekotoksičnosti v izlužkih talnih vzorcev omogoča mnogo hitrejšo pridobitev odziva (Bekaert in sod., 1999; Cabrera in Rodriguez, 1999; Gichner in Veleminsky, 1999; Bekaert in sod., 2002; Lah, 2005).

V podobnih proučevanjih izlužkov talnih vzorcev in vzorcev površinskih voda uporabljamo bioteste, ki so bili prvotno večinoma razviti za testiranje odpadnih voda. V končni odziv teh testov so integrirane interakcije kompleksnih mešanic onesnaževal. Tako brez poznavanja kemične sestave vzorca preverimo njegov toksični učinek. Ponavadi opazujemo toksične vplive na preživetje, rast ali reprodukcijo bakterij, alg, vodnih bolh ali rib (Bekaert in sod., 2002).

V laboratoriju lahko izvedemo tri vrste biotestov. Opazujemo lahko **toksičnost** oz. neposredni biološki odziv posameznih organizmov na toksično snov (preživetje, gibljivost, rast, ...). Analiziramo lahko **bioakumulacijo** oz. vsebnost določenih snovi v testnih organizmih oz. njihovih delih. Ocenjujemo lahko škodljive vplive ali/in spremembe v genetskem materialu organizmov oziroma **genotoksičnost** (Derksen, 2002).

2.3.1 Toksičnost

S testi toksičnosti dokazujemo vplive toksičnih snovi, ki kvarno vplivajo na organizem. V preteklih desetletjih je bilo veliko število toksikoloških raziskav posvečenih preučevanju raznolikih vplivov pesticidov in drugih toksičnih snovi na žuželke in ostale členonožce (Stark in Banks, 2003). Prav tako je velik del študij posvečen vplivom težkih kovin na različne organizme (Avberšek, 2004).

Bolj uveljavljene metode toksikologije se posvečajo odzivu posameznega organizma oz. odzivu sestavin, ki izhajajo iz organizma (npr. celične linije ali encimi) in se osredotočajo na procese (toksikodinamika) ter na obseg vnosa, izločanja in kopičenja spojin v telesu (toksikokinetika). Za enostavno zaznavanje vpliva toksične snovi morajo biti variabilnosti med starostjo, velikostjo, težo, razvojnim in zdravstvenim statusom osebkov čim manjše. Zmanjšano variabilnost dosežemo z izvedbo toksikoloških raziskav v laboratorijskem

okolju, tako se izboljšata še statistična moč in zanesljivost sklepanja. Zbirka organizmov, prinesenih iz terenskih vzorčenj, neizogibno vsebuje posameznike, ki se od ostalih razlikujejo glede na starost, fazo razvoja, težo, zdravstveni status ipd. (Stark in Banks, 2003).

Toksikološke raziskave lahko glede na način izpostavitve razdelimo na akutne in kronične študije. Z akutnimi študijami pridobimo podatke o odzivih organizma na kratkoročno izpostavitve izbranim vzorcem (od nekaj ur do nekaj dni). Končni odziv mnogih akutnih študij je smrtnost (tudi encimska aktivnost in njena zaustavitev). V kroničnih študijah opazujemo vplive ponavljajočega izpostavljanja toksičnim snovem v daljšem časovnem obdobju (Stark in Banks, 2003). Smrtnost običajno izražamo s parametrom LC_{50} , t.j. s koncentracijo toksične snovi, pri kateri 50 % testne populacije propade (mediana letalne koncentracije). Za prikazovanje delovanja toksične snovi v okolju pogosto uporabimo tudi parameter EC_{50} , t.j. koncentracija toksične snovi, katere vpliv je po inkubaciji viden na 50 % testne populacije (Derksen, 2002).

V biotestih glede na želeni končni odziv in značilnosti preučevanega okolja ali vzorcev uporabljamo različne testne organizme. Za ocenjevanje toksičnosti izlužkov talnih vzorcev ali vzorcev jezerskih voda najpogosteje uporabljamo občutljive *in vitro* teste, kot so merjenje bioluminiscence bakterij *Vibrio fischeri* (*Phosphobacterium phosphoreum*) (Filipič, 1995; Bekaert in sod., 1999; Froehner in sod., 2000; Wolska in sod., 2002; Vidic, 2003) in spremljanje smrtnosti ali inhibicije rasti migetalkarja *Tetrahymena thermophila* (Dayeh in sod., 2002; Avberšek, 2004; Lah in sod., 2005b), vodne leče (Oang in Bengtsson, 1995; Tong in Hongjun, 1997; Frankart in sod., 2003; Geoffroy in sod., 2004), alg (Oanh in Bengtsson, 1995; Geoffroy in sod., 2004; Ferrari in sod., 2005), ličink nevretenčarjev (Derksen, 2002; Wolska in sod., 2002), rakov (Bispo in sod., 1999; Jos in sod., 2003; Stark in Banks, 2003; Emmanuel in sod., 2005) in ribjih celičnih linij (Dayeh in sod., 2002). Poznamo tudi veliko *in vivo* testov z avtohtonimi organizmi, npr. z žabjimi paglavci (Ferrari in sod., 2005), školjkami (Odžak in sod., 2000) in rastlinami (Jos in sod., 2003).

Za rutinsko ocenjevanje toksičnosti izlužkov talnih vzorcev ali vzorcev jezerskih voda najpogosteje so še posebno uporabni t.i. mikrobiotesti. To so miniaturni biotesti za ugotavljanje akutne toksičnosti. Ti komercialno dostopni mikrobiotesti vsebujejo ves potreben material za izvedbo biotesta in so zasnovani za delovno ekstenziven in prostorsko nezahteven potek testa (Derksen, 2002).

2.3.1.1 Thamnotoxkit FTM

Test toksičnosti sladkovodnih vzorcev Thamnotoxkit FTM spada v skupino mikrobiotestov TOXKIT. Po zagotovitvi proizvajalca so ti biotesti cenovno ugodni, preprosti, hitri in občutljivi ter dajejo ponovljive rezultate (Standard Operational Procedure ..., 2006).

Thamnotoxkit FTM je zamenjava predhodnega testa Streptotoxkit FTM, v katerem je bil uporabljen organizem *Streptocephalus proboscideus*, z organizmom *Thamnocephalus platyurus*, ki se je ob boljšem valjenju cist izkazal kot bolj občutljiv na prisotne toksične snovi (Derksen, 2002).

Pred samo izvedbo testa akutne toksičnosti z rakcem *Th. platyurus* izvalimo ličinke organizma iz mirujočih cist. Po 20 do 22 urni inkubaciji cist pri temperaturi 25°C in pri

neprekinjeni osvetlitvi ličinke izpostavimo različnim koncentracijam vzorcev. Po 24 urni inkubaciji pri 25°C v temi preštejemo število mrtvih rakcev (Isidori in sod., 2003).

Organizem *Th. platyurus* (Crustacea, Branchiopoda, Anostraca) najdemo v naravi v presihajočih ribnikih, začasnih jezercih in lužah. Ti škrgonožci so geografsko zelo dobro razširjeni, saj prebivajo v subtropskih razmerah, visokogorjih in celo v arktičnih okoljih. (Kurmayer in Juttner, 1999; Derksen, 2002). V ekotoksikoloških raziskavah s sladkovodnimi nižjimi rakci vrednotimo prisotnost toksične učinkne onesnaževal v vzorcih površinskih voda, lahko pa tudi v izlužkih talnih vzorcev (Ripley in sod., 2002-2003; Isidori in sod., 2003; Stark in Banks, 2003; Brilly in sod., 2005).

V objavljenih toksikoloških poročilih z območja Slovenije je rakec *Th. platyurus* omenjen le nekajkrat. Razmeroma nov biotest akutne strupenosti za nižje rakce so raziskovalci do sedaj vključili le v nekaj študij okolja pri nas, uporabljajo pa ga tudi za vrednotenje toksičnosti odpadnih in izcednih vod v laboratorijih Inštituta za varstvo okolja Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor (Marinšek-Logar, 2003; Brilly in sod., 2005; Ekotoksikološke preiskave, 2006).

2.3.2 Genotoksičnost

S testi genotoksičnosti ocenjujemo vplive toksičnih snovi na genetski material živih bitij.

Rast svetovnega prebivalstva in razvoj ter povečevanje obsega industrializacije sta povzročila povečano kopičenje onesnaževal v naravi, večje število rakavih obolenj in genetsko pogojenih bolezni (Cabrera in Rodriguez, 1999). Navkljub poznavanju tehnologij, ki nam omogočajo obdelavo, recikliranje in ponovno uporabo odpadnih snovi, okolje še vedno obremenjujemo z izpusti toksičnega materiala v atmosfero, hidrosfero in litosfero (White in Claxton, 2004). Prisotnost mutagenih snovi v okolju je spodbudila potrebo po razvoju dovolj natančnih biotestov, s katerimi bi lahko ovrednotili vplive kopičenja teh snovi na ekosisteme in zdravje ljudi (Žinko, 2004; Lah in sod., 2005a).

Pri ocenjevanju genotoksičnosti moramo upoštevati različne končne učinke takšnega delovanja: mutacije genov ali točkaste mutacije (mutageneza), spremembe v številu kromosomov (anevplodijo, poliplodija) ali njihovi strukturi (klastogeneza) (White in Claxton, 2004; Plaper, 2005).

V objavljenih poročilih o testiranju genotoksičnosti izlužkov talnih vzorcev in vzorcev jezerske vode naletimo na več kot 30 različnih testov, s katerimi vrednotimo učinke na genetski material testnih organizmov (White in Claxton, 2004).

Najbolj razširjeni *in vitro* test v okoljevarstvenih študijah mutagenih vplivov je test Ames (Filipič, 1995; Bekaert in sod., 1999; Žinko, 2004; Lah in sod., 2005a). V testu kvantitativno ovrednotimo pogostnost povratnih mutacij specifičnih sevov (TA98, TA100, ...) bakterije *Salmonella typhimurium*, ki ponovno pridobijo sposobnost sinteze histidina in tvorijo kolonije na gojišču brez te aminokisljine. Test zaradi njegove enostavnosti uporabljajo v številnih različicah.

Drugi prokariotski testi za ugotavljanje mutageneze pa so še SOS-kromotest z bakterijo *Escherichia coli* - sev PQ37 (Le Curieux in sod., 1995), MutatoxTM test s temno mutanto luminiscentne bakterije *Vibrio fischeri* – sev M169 (Bispo in sod., 1999) in *rec* test z

dvema različnima sevoma bakterij *Escherichia coli* ali *Bacillus subtilis*, ki kažeta različno sposobnost preživetja ob prisotnosti genotoksične snovi (White in Claxton, 2004).

Klastogene spremembe dednine in anevplodije ugotavljamo s testom kromosomskih aberacij v meristemskih celicah koreninskega vršička čebule *Allium* sp. (Cabrera in Rodriguez; 1999; Kong in Ma, 1999), testom Zimmerman za ugotavljanje izmenjave sestrskih kromatid s prilagojenimi sevi (D7, D61.M, ...) kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* (Žinko, 2004), testom mikro jeder na deževnikih *Eisenia foetida* (Zang in sod., 2000), dvoživki *Xenopus laevis* (Bekaert in sod., 1999) ali v socvetju rastline *Vicia faba* (Duan in sod., 1999a) oz. *Tradescantia* sp. (Kong in Ma, 1999) in testom mutacij v trihomih prašničnih niti rastline *Tradescantia* (Gichner in Veleminsky, 1999).

V novejših metodoloških študijah genotoksičnosti izlužkov talnih vzorcev in vzorcev jezerskih voda se raziskovalci posvečajo primerjavi občutljivosti testnih organizmov z različnih trofičnih nivojev na določene genotoksične učinkovine. Na učinkovitost postopkov v biomonitoringu vplivata tudi enostavnost in cenenost izvedbe, zato ima uporaba mikrobiotestov in rastlinskih organizmov velik potencial (Cabrera in Rodriguez, 1999; Derksen, 2002; Jos in sod., 2003; Avberšek, 2004; Emmanuel in sod., 2005).

2.3.2.1 Kometni test za dokazovanje različnih oblik prelomov DNA

Kometni test ali elektroforeza posameznih celic (*Single Cell Gel Electrophoresis*) je hitra, dokaj preprosta in občutljiva metoda, s katero merimo stopnjo poškodbe DNA (predvsem lome DNA verig) v posameznih celicah.

V testu posamezne celice vklopimo v tanek sloj agaroze. Nato celice liziramo z detergenti in solmi ter izpostavimo elektroforezi. Poškodovana DNA potuje proti anodi in z nepoškodovano dednino jedra tvori kometu podobno obliko, podoba, po kateri je metoda dobila ime. Po obarvanju DNA z etidijevim bromidom ovrednotimo poškodovano DNA z epifluorescentnim mikroskopom, digitalno kamero in programskim paketom za računalniško analizo slike (Menke in sod., 2001). Če celice izpostavimo testnemu vzorcu pred vklapljanjem v gel, govorimo o "*in vivo*" kometnem testu. Pri "*in vitro*" različici celice najprej vklopimo v gel in šele potem izpostavimo vzorcu.

Poznamo številne izvedbe kometnega testa, ki so prilagojene za zaznavanje specifičnih skupin poškodb DNA (Singh in sod., 1999). Zaznavanje eno-verižnih zlomov je mogoče le pri visoki vrednosti pH, ko se verigi DNA ločita. Alkalno labilna mesta so večinoma stabilna pri vrednosti pH > 12,5. Tako lahko na osnovi vrednosti pH elektroforetskega pufra razlikujemo med alkalno labilnimi mesti (vrednost pH > 13) in eno-verižnimi prelomi (vrednost pH = 12,1) (Lah in sod., 2003). Singh in sod. (1999) pa poročajo, da je nevtralna različica kometnega testa lahko primerna metoda za zaznavanje dvo-verižnih zlomov. Ti zlomi so redkejši, vendar toliko bolj pomembni, saj so pogosto letalni za bakterije in celice sesalcev.

Za analizo so najbolj primerne celične linije ali celice, ki so že naravno suspendirane (Marinšek Logar in sod., 2000). Prav tako je bolje, da uporabimo sveže celice oz. tkivo, kot pa zamrznjen ali prepariran material (Reinecke S.A. in Reinecke J.A., 2004). Test, ki je bil v osnovi razvit na človeških krvnih celicah, je do danes prilagojen za uporabo s številnimi celicami živalskega ali rastlinskega porekla, kvasovkami in algami (Lah in sod., 2004). Pri testu uporabljamo različne organizme oz. tipe celic, npr. kvasovke

Saccharomyces cerevisiae (Miloshev in sod., 2002), migetalkarje *T. thermophila* (Lah, 2001), rastlinske celice (Poli in sod., 1999), celomske celice deževnikov *Eisenia foetida* (Reinecke S.A. in Reinecke J.A., 2004), celice rib (Lemos in sod., 2005) in ribje celične linije (Kammann in sod., 2001), humane celične linije Caco-2 (Lah in sod., 2005b) in HepG2 (Ehrlich in sod., 2002).

V naši raziskavi smo uporabili testni organizem *T. thermophila*, ki ga taksonomsko uvrščamo med migetalkarje. V naravi ga najdemo v vseh vodnih habitatih in tleh. Redno ga uporabljamo v najrazličnejših toksikoloških študijah s končnim učinkom zmanjšanja rasti ali inhibicije razmnoževanja kulture. Je enocelični organizem, ki izraža tudi biološko kompleksnost višjih organizmov. Pražival *T. thermophila* je enostavno gojiti v aksenični laboratorijski kulturi (Shultz, 1997; Lah in sod., 2004)

2.3.3 Interpretacija biološkega odziva v testih toksičnosti in genotoksičnosti

Rezultati bioloških testov so relevantni samo ob dobri statistični analizi podatkov. Pozitiven rezultat predstavlja statistično značilno povečanje inhibicije rasti oz. smrtnosti testne populacije ali poškodb dednine v primerjavi z vzorcem negativne kontrole. Za testno snov ali vzorec, ki ne povzroči statistično značilnega odstopanja od negativne kontrole, lahko trdimo, da v danem testnem sistemu nima toksičnega ali genotoksičnega vpliva (Guidance document ..., 2001).

Kljub izboljšavam testov toksičnosti in genotoksičnosti, znanstveniki opozarjajo na 'lažno pozitivne' rezultate, še posebno pri *in vitro* testih kromosomskih aberacij za sledenje genotoksičnosti. Številni pozitivni rezultati biotestov, kjer uporabljajo testne organizme nižjih trofičnih nivojev s stališča biološkega odziva niso pomembni za glodavce ali človeka (Kirkland in Muller, 2000).

Za prikaz celotne slike stanja okolja potrebujemo rezultate več različnih biotestov, kjer kot testne organizme uporabimo tako živali in rastline kot tudi mikroorganizme (prokariote in evkariote). Prav tako moramo pri dobrih analizah uporabiti bioteste, pri katerih merimo različne končne odzive (preživetje, reprodukcija, rast, encimska aktivnost, genetske spremembe, ...). Skupino biotestov bomo določili na podlagi informacij, ki jih želimo pridobiti, na fizikalnih in kemijskih lastnostih vzorca in občutljivosti testnega organizma (Derksen, 2002).

Previdni moramo biti, saj lahko z uporabo nekaterih biotestov izločimo značilne okoljske faktorje preiskovanega ekosistema, prav tako pa se lahko odzivi med različnimi testnimi organizmi močno razlikujejo (Fendt, 2003).

Ob upoštevanju naštetih mehanizmov je potrebno razlikovati biološko pomembne pozitivne rezultate od tistih, ki so biološko nepomembni, še posebno, kadar gre za zdravje ljudi. Ekotoksikološki principi se namreč že uveljavljajo v področju varovanja zdravja ljudi, kot npr. v nadzoru novih zdravil na tržišču in epidemoloških študijah, kjer se pogosto srečujemo s številnimi vplivi, med katerimi ni jasne ločnice (Eason in O'Halloran, 2002).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 ODVZEM VZORCEV

Odvzem in pripravo vzorcev so opravili na Inštitutu za ekološke raziskave ERICo Velenje. Pripravljene vzorce smo transportirali do našega laboratorija in jih do uporabe hranili v zamrzovalniku pri - 20°C.

3.1.1 Talni vzorci

Odvzem in pripravo talnih vzorcev smo izvedli v skladu z uveljavljenimi mednarodnimi standardnimi postopki (SIST ISO 10381/1-6, 1996, SIST ISO 11464).

Vzorčna mesta talnih vzorcev v Šaleški dolini (odvzem: 8.10.2004):

T1 – urbana lokacija v centru Velenja

T2 – ekstenzivno travinje na Graški Gori

T3 – travnik v Zavodnjah

T4 – zatravljeno rekultivirano območje v Šoštanju

T5 – travnik na Velikem Vrhu

Ustrezne referenčne lokacije v Šaleški dolini ni bilo mogoče najti. Zato smo izbrali referenčno vzorčno mesto v Zgornji Savinjski dolini, kjer so pedološke lastnosti primerljive z vzorčnimi območji T1-T5 (Glaseničnik, 2004; Preglednici 1 in 2).

T6 – referenčno mesto v Zgornji savinjski dolini.

3.1.1.1 Priprava izlužkov talnih vzorcev

Za potrebe kometnega testa smo pripravili vodne izlužke zemlje v skladu s postopkom, ki ga je opisal Bekaert in sod. (1999).

V 250 ml steklenice smo zatehtali 50 g suhega vzorca zemlje in dolili 250 ml vode Mili-Q. Suspenzijo smo pri 25°C in 120 obratih na minuto 24 ur stresali v stresalniku. Za naslednjih 24 ur smo suspenzijo prestavili v hladilnik (4°C), kjer se je usedala (Bekaert in sod., 1999).

Supernatant smo prefiltrirali preko filtrirnega papirja in filtrat 20 minut centrifugirali pri 10.000 obratih na minuto. Supernatante smo prelili v 50 ml epruvete Falcon in jih do uporabe shranili pri - 20°C.

3.1.2 Vzorci jezerskih voda

Vzorčna mesta jezerske vode v Šaleški dolini (odvzem za kometni test: 16.06.2005, odvzem za Thamnotoxkit FTM: 20.06.2006):

J1 – Škalsko jezero

J2 – Družmirsko jezero

J3 – Velenjsko jezero pri čolnarni

J4 – Velenjsko jezero pri deponiji (na drugi strani kot J3)

Vzorce jezerske vode smo pred uporabo razdelili na alikvote in jih shranili pri -20°C .

3.2 THAMNOTOXKIT FTM

Za namen preverjanja toksičnosti vzorcev smo pri podjetju Microbiotests Inc. nabavili testni set Thamnotoxkit FTM. Testni organizmi so bili sladkovodni rakci *Th. platyurus*, ki so vključeni v set.

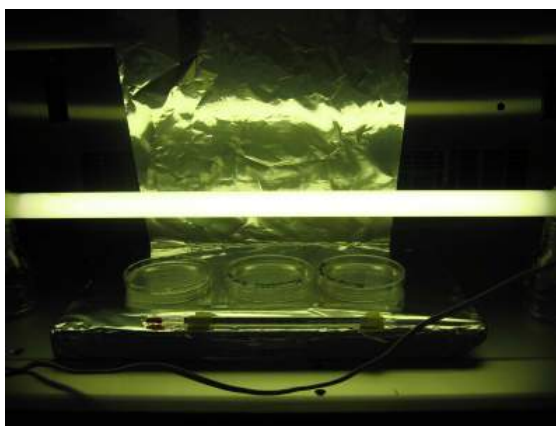
Postopek biotesta smo opravili po navodilih proizvajalca (Standard Operational Procedure ..., 2006).

V testu smo za rehidracijo in valjenje cist ter za pripravo redčitvene vrste vzorca uporabljali delovno raztopino, ki smo jo pripravili z mešanjem v kitu dobavljenih posameznih raztopin soli NaHCO₃, CaSO₄, MgSO₄ in KCl. Koncentracije soli v delovni raztopini ustrezajo priporočilom ameriške agencije za varstvo okolja za pripravo umetnega sladkovodnega medija (Methods for ..., 2006).

3.2.1 Valjenje cist

24 ur pred začetkom testa je bilo iz cist potrebno izvaliti ličinke. Epruvete s cistami smo napolnili z razredčeno delovno raztopino. Redčili smo z destilirano vodo (8:1). V intervalu 30. minut smo epruvete redno stresali.

Predhodno rehidrirane ciste smo nato po dve epruveti skupaj prelili v petrijevke in jim dodali prezračeno razredčeno delovno raztopino do skupnega volumna 45 ml.



Slika 1: Valjenje cist v inkubatorju

Pokrite petrijevke smo inkubirali 20 do 22 ur pri 25°C pri neprekinjeni osvetlitvi 2800 lux (Slika 1).

Ripley in sod. (2002-2003) so opisali prenos ličink po 24 urni inkubaciji v svežo standardno delovno raztopino za 2 do 4 ure pred izpostavitvijo vzorcem. V našem poskusu smo po 20 do 22 urah inkubacije pred prenosom rakcev v testne plošče polovico vsebine inkubiranih petrijevok odlili v nove petrijevke. V vse petrijevke smo nato dodali aerirano delovno raztopino do volumna 45ml.

3.2.2 Kontrola

Negativno kontrolo v testu je predstavljala delovna raztopina. Smrtnost rakcev v delovni raztopini ne sme preseči 10 %, sicer je test neveljaven in ga je potrebno ponoviti.

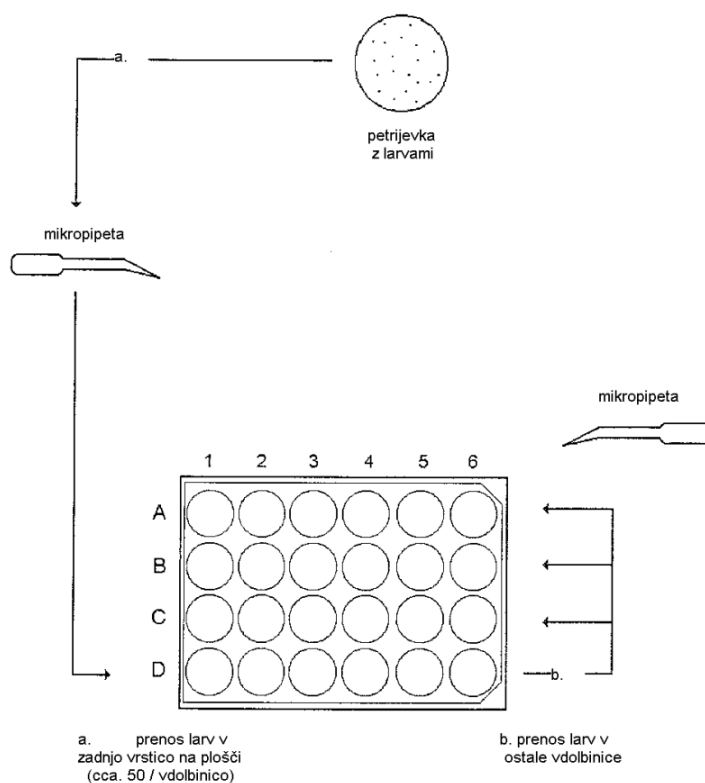
3.2.3 Postopek testa Thamnotoxkit F™

Za vsak vzorec jezerskih vod smo pripravili sledeče redčitve: 100 %, 50 %, 25 %, 12,5 % in 6,25 %. Tako redčitveno vrsto smo dobili z enkratnim redčenjem predhodne redčitve vzorca.

V prvi stolpec na testni plošči smo odpipetirali delovno raztopino, v vsakega naslednjega pa določeno redčitev vzorca, tako da je koncentracija vzorca po stolpcih naraščala.

Pod lupo smo iz osvetljenega roba petrijevke prenesli približno 40 ličink v vsako testno vdolbinico na dnu vsakega stolpca (Slika 2). V ostale tri vdolbinice v stolpcu smo iz najnižje vdolbinice prenesli po 10 ličink. Da bi preprečili prekomerno izhlapevanje smo testne plošče nato prevlekli s Parafilmom in jo tesno zaprli s pokrovom.

Testne plošče inkubiramo v temi za 24 ur, pri 25°C.



Slika 2: Prenos ličink

3.2.4 Analiza rezultatov

Pod lupo preštujemo število negibljivih rakcev (ki se ne gibajo v 10 sekundah opazovanja) v vdolbinicah zgornjih treh vrst testne plošče (Slika 3). Na podlagi števila mrtvih ličink po stolpcih izračunamo % smrtnosti po enačbi (1).



Slika 3: Štetje mrtvih ličink

$$\%_{sm} = \frac{a_m + b_m + c_m}{s} \quad \dots (1)$$

a_m, b_m, c_m – števila mrtvih ličink v posameznem stolpcu po vrstah (a,b,c)
testne plošče

s – število vseh testnih ličink v posameznem stolpcu testne plošče (30)

Izračun smrtnosti in pregled rezultatov smo pripravili s programom Microsoft® Excel 2000.

Glede na dobljene rezultate izračun parametra LC_{50} (koncentracija vzorca, ki je smrtna za 50% testne populacije) ni bil smiseln. Statistično obdelavo različnih odzivnih krivulj (parametri $ED_i, EC_i, LD_i, LC_i, NOEC_i, LOEC_i, \dots$) sicer lahko opravimo s paketom funkcij 'drc' programskega okolja R (Ritz in Streibig, 2006)

3.3 KOMETNI TEST

Kometni test smo prilagodili po postopku, ki ga je opisala Lah (2001). Kot testne organizme smo uporabili kulturo migetalkarja *T. thermophila* brez mikrojed, ki smo jo kupili kot sestavni del testnega seta PROTOXKIT F™ (Microbiotests Inc. Belgium).

3.3.1 Kultura praživali *T. thermophila*

Celice smo gojili v 50 ml bogatega gojišča za pražival *T. thermophila* (Shultz, 1997). Sestava gojišča je v preglednicah 5, 6 in 7.

Preglednica 5: 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 Mili-Q	1000 ml

Na 1000 ml gojišča smo dodali še 10 ml raztopine kloridov in sulfatov (Preglednici 6 in 7).

Preglednica 6: Kloridi

$CaCl_2 \times 2 H_2O$	0,5 g
$CuCl_2 \times 2 H_2O$	0,05 g
$FeCl_3 \times 6 H_2O$	0,0125 g
Voda Mili-Q	100 ml

Preglednica 7: Sulfati

MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1 g
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ x 6 H ₂ O	0,25 g
MnCl ₂ x 6 H ₂ O	0,005 g
ZnCl ₂	1,2114 g
Voda Mili-Q	100 ml

Obstoječi raztopini smo s HCl vrednost pH popravili na 7,35. Gojišče smo nato razdelili po 50 ml v 125 ml serumske stekleničke in ga avtoklavirali. 500 µl kulture praživali *T. thermophila* smo inokulirali v 50 ml gojišča in jo inkubirali pri 30°C za tri dni.

Po opisanem postopku smo pripravili tudi gojišča, ki smo jih v kometnem testu uporabili pri pozitivni in negativni kontroli. Ostala gojišča smo pripravili na enak način, le da smo namesto vode Mili-Q za pripravo gojišča uporabili posamezne vzorce jezerskih voda ali izlužke talnih vzorcev. Ker avtoklaviranje teh gojišč lahko nekontrolirano spremeni sestavo ali lastnosti sestavin v vzorcih, smo gojišča z vklopljenimi vzorci sterilizirali s filtriranjem preko 0,22 µm membranskih filtrov v sterilne epruvete Falcon.

3.3.1.1 Preverjanje viabilnosti kulture praživali *T. thermophila*

Na objektno stekelce smo narisali ravno črto. Ob črti smo nanesti 25 µl kulture praživali *T. thermophila*. Pod mikroskopom smo prešteli vse mrtve celice ob črti. Nato smo dodali 5 µl raztopine 4 % formalina in ob črti prešteli vse celice (Vidic, 2005).

Viabilnost predstavlja odstotek živih celic (razlika med številom mrtvih celic in celokupnim številom celic) od vseh celic. Viabilnost mora presegati 90 %, da je kultura celic primerna za nadaljnje delo.

3.3.1.2 Starost kulture praživali *T. thermophila*

Da smo zagotovili stalno zalogo stacionarne kulture praživali *T. thermophila* smo kulturo precepljali dvakrat tedensko. Prvotno smo en dan pred izvedbo kometnega testa kulturo precepili v 10 ml gojišča v epruveh Falcon, vendar je bila variabilnost celic znotraj posameznega vzorca izredno raznolika. Z večkratnim precepljanjem kulture v logaritemski fazi rasti smo variabilnost zmanjšali. Podvajanje celic v kulturi se konča 40 do 44 ur po inokulaciji v sveže gojišče (Schultz, 1997).

Tekočo kulturo *T. thermophila* smo gojili v inkubatorju pri 30°C. Iz tridnevne kulture smo tri dneve zapored 1x dnevno inokulirali 1000 µl kulture v 50 ml svežega gojišča. Zadnji dan smo precepili 200 µl kulture iz gojišča v serumskih stekleničkah v 10 ml gojišča v epruveh Falcon.

3.3.1.3 Priprava kulture praživali *T. thermophila*

Ker so celice praživali *T. thermophila* aerobni migetalkarji, jih po inkubaciji jasno vidimo predvsem v zgornjem sloju tekočega gojišča. Zaradi naravne suspendiranosti celic smo jih pred vklopom v tretji sloj agaroze morali samo še skoncentrirati s centrifugiranjem.

Centrifugirali smo pri sobni temperaturi, 3 minute pri 300 x g. Supernatant smo zavrgli in celice resuspendirali v 1,5 ml gojišča.

3.3.2 Priprava kometnega testa

Uporabljali smo naslednje raztopine:

Preglednica 8: Raztopina za alkalno lizo

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

Preglednica 9: Elektroforetski pufer

NaOH 1M	3 ml
Etilendiamintetraoetna kislina 1M (Sigma, E-5134)	2 ml
Voda Mili-Q	do 1000 ml

Preglednica 10: 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 Mili-Q	do 1000 ml

Za delovni pufer PBS razredčimo 100 ml koncentrirane raztopine z 900 ml vode Mili-Q.

3.3.2.1 Priprava minigelov na mikroskopskih objektivih

Za fiksacijo minigelov smo uporabljali obrušena mikroskopska objektiva stekelca, ki smo jih predhodno dobro 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 10. Agarozne gele smo pred uporabo utekočinili v mikrovalovni pečici. Da smo se izognili poškodbam celic zaradi velike temperature smo agarozni za 3. in 4. sloj naknadno ohladili na 30°C.

1. sloj: 400 µl NMP 1 % agaroze (Sigma, A-9539) smo na stekelce nanesli s hematološko razmazovalko. Stekelca smo osušili čez noč, pri sobni temperaturi.

2. sloj: 600 µl NMP 0,6 % agaroze smo nanesli na prvi sloj. Enakomerno smo ga porazdelili s polaganjem gladkega objektivega stekelca na tekoči gel. Sloj smo 5 minut utrjevali na ledeni plošči.

3. sloj: na utrjeni drugi sloj smo po odstranitvi zgornjega objektnega stekelca nanесли 500 μ l mešanice med 1 delom tekoče kulture in 3 deli 0,7 % LMP agaroze (Sigma, A-9414). Gele smo porazdelili z objektnim stekelcem in jih ponovno utrjevali na ledeni plošči. Objektne stekelca smo na plošči pokrili z aluminijevo folijo in vklopljene celice tako zaščitili pred svetlobo.

4. sloj: 500 μ l 0,5 % LMP agaroze smo z gladkimi objektnimi stekelci nanесли na predhodni sloj po odstranitvi zgornjega objektnega stekelca. Štiri-slojne minigele smo še enkrat utrдили na ledeni plošči in pokrili z aluminijevo folijo (5 minut).

3.3.3 Kontrole

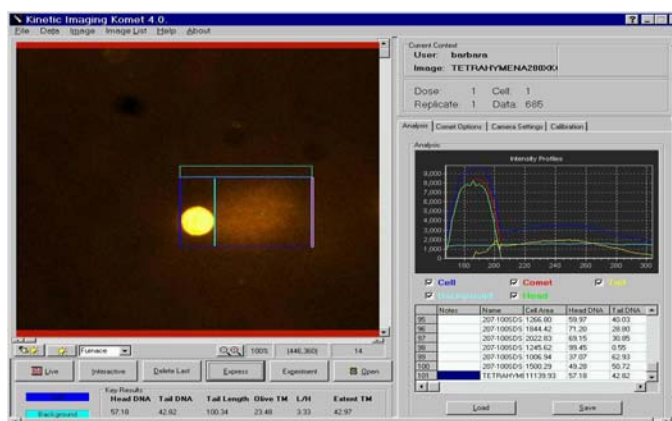
Negativno kontrolo je predstavljalo bogato gojišče za pražival *T. thermophila* (Preglednica 5 na str. 21). Za pozitivno kontrolo smo štirislojne minigele z vklopljenimi celicami iz istega gojišča za 5 minut izpostavili raztopini 500 μ M vodikovega peroksida v delovni raztopini PBS. Pred nadaljnjo izpostavitvijo raztopini za alkalno lizo smo minigele splaknili v delovni raztopini PBS.

3.3.4 Postopek kometnega testa

Pripravljene štirislojne minigele smo potopili v raztopino za alkalno lizo (Preglednica 8). Alkalna liza je 1h potekala v hladilniku (4°C). Nato je sledilo alkalno razvijanje superzvite DNA. Minigele smo 60 minut spirali v elektroforetskem pufu (Preglednica 9) (pufer smo zamenjali na vsakih 20 minut). Nato smo stekelca preložili v elektroforetske banjice. Elektroforeza je potekala 5 minut, pri 25V in 300mA. Po končani elektroforezi smo minigele spirali (2 x 10 minut) v 400 mM raztopini Tris-hidroksimetil aminometana, da smo nevtralizirali visoko alkalno vrednost pH elektroforetskega pufra. DNA v minigelih smo obarvali z etidijevim bromidom (2 μ g/ml 10 mM PBS pufra) in minigele ponovno spirali v 400 mM raztopini Tris-hidroksimetil aminometana.

3.3.5 Odčitavanje rezultatov

Poškodbe jedrne DNA smo ovrednotili z epifluorescentnim mikroskopom (Olympus BX50) pri ekscitacijski svetlobi valovnih dolžin med 515 in 560 nm, emisijskem filtru 590 nm in 200-kratni povečavi. Prenos slike na računalnik smo omogočili z digitalno kamero (Hamatsu Orca 2), pri obdelavi slike pa smo si pomagali s programskim paketom Komet 5.0 (Single Cell Gel Electrophoresis Analysis, 2001).



Slika 4: Pogovorno okno programa za analizo slike

Računalniški program iz slike razbere celotno jedro, glavi in rep ter ozadje (Slika 4).

Po integraciji signala program izračuna številne parametre poškodb jedrne DNA. Repni moment po Olivu najbolj izrazi stopnjo poškodb. Pri izračunu RM-Olive program upošteva vrednosti zajetih signalov v glavi in repu kometa (2).

$$RM - Olive = (DNA_{glava} - DNA_{rep}) \times \%DNA_{rep} \times 0,01 \quad \dots (2)$$

3.3.6 Statistična analiza rezultatov kometnega testa

Na vsakem objektnem stekelcu smo ovrednotili 50 celičnih jeder in izračunali povprečno vrednost RM-Olive. V posameznem poskusu smo za posamezen vzorec ovrednotili 100 celičnih jeder. Pri kometnem testu z izlužki talnih vzorcev smo opravili 3 ponovitve, pri kometnem testu z vzorci jezerskih voda pa 2.

Za statistično analizo podatkov smo prilagodili metodo, ki so jo opisali Verde in sod. (2006). Rezultate smo analizirali s programskim paketom R, prosto dostopnim po splošnem dovoljenju GNU.

Osnovne statistične parametre smo določili s pomočjo vgrajenih funkcij, razvoj in obdelavo modelov pa smo opravili z dodatkom 'survival'.

Analiza preživetja se najpogosteje uporablja v medicini, kjer se kot mera uspešnosti zdravljenja pogosto uporablja čas trajanja bolezni. Pri zbiranju podatkov pa časa dejansko ne izmerimo v celoti, temveč vemo le, da je bolnik preživel določeno obdobje. Metoda je uporabna tudi za nas, saj tudi pri kometnem testu ne izmerimo odziva genotoksičnosti v celoti, temveč le genotoksičnost vzorca od začetka izpostavitve do elektroforeze.

V sklopu analize preživetja smo skupno testirali sedem regresijskih modelov (regresijske modele opišemo s funkcijo *survreg*). Predpostavili smo Weibullovo porazdelitev. Modele smo testirali med seboj s funkcijo *anova*.

V popolni možni model smo vključili sistematska vpliva ponovitve in vzorca ter njuno interakcijo in naključni vpliv koreliranosti znotraj ene enote (100 ocenjenih celic na stekelcih).

Primerjava modelov je pokazala, da so modeli z vključenim vplivom vzorca boljše opisali podatke kot modeli brez. Enako je veljalo za vključitev naključnega vpliva. Vključitev ponovitve v modelih ni imela vpliva na prilaganje podatkom.

Med modelom z vključenim vplivom vzorca in modelom, z vključenim vplivom vzorca in naključnega vpliva ni bilo statistično značilne razlike. Variabilnost med skupinami naključnega vpliva (med stekelci istega vzorca v posamezni ponovitvi) je torej večja, kot med skupinami vzorcev.

4 REZULTATI

4.1 THAMNOTOXKIT F™

Vse tri ponovitve biotesta smo naredili na dan 15.08.2006. Po 24 urah inkubacije v temi pri 25°C smo prešteli negibljive ličinke za vse koncentracije vzorcev v testnih vdolbinicah v vseh treh vrstah testne plošče (Preglednica 11).

Preglednica 11: Prikaz izračunanih vrednosti % smrtnosti za vse tri ponovitve testa Thamnotoxkit F™

Vzorec	Koncentracija vzorca (%)	Smrtnost (%)			Skupaj
		Ponovitev			
		1	2	3	
J1	kontrola	3,333	3,333	3,333	3,333
	6,25	0,000	0,000	0,000	0,000
	12,5	0,000	0,000	0,000	0,000
	25	0,000	0,000	0,000	0,000
	50	0,000	0,000	0,000	0,000
	100	0,000	0,000	0,000	0,000
J2	kontrola	0,000	0,000	0,000	0,000
	6,25	0,000	0,000	3,333	1,111
	12,5	0,000	0,000	0,000	0,000
	25	0,000	0,000	0,000	0,000
	50	6,667	3,333	6,667	5,556
	100	3,333	6,667	0,000	3,333
J3	kontrola	0,000	0,000	0,000	0,000
	6,25	0,000	0,000	0,000	0,000
	12,5	3,333	3,333	3,333	3,333
	25	6,667	6,667	3,333	5,556
	50	0,000	0,000	3,333	1,111
	100	0,000	0,000	0,000	0,000
J4	kontrola	0,000	0,000	3,333	1,111
	6,25	0,000	0,000	0,000	0,000
	12,5	0,000	0,000	3,333	1,111
	25	0,000	0,000	0,000	0,000
	50	0,000	0,000	0,000	0,000
	100	0,000	3,333	0,000	1,111

Zaradi nizke smrtnosti rakcev pri vseh testnih koncentracijah vseh štirih vzorcev, izračun LC₅₀ ni smiseln za nobeno od ponovitev testa. V preglednici 11 so pri nekaterih koncentracijah posameznih vzorcev vidni večji odzivi kot drugod, vendar smrtnost rakca *Th. platyurus* v nobene primeru ni presegla 10 %, ki jih sicer po normativih testa lahko doseže sama negativna kontrola, da je test ponovljiv (Standard Operational Procedure ..., 2006)..

4.2 KOMETNI TEST

4.2.1 Viabilnost kultur praživali *T. thermophila*

V kometnem testu smo kulture praživali *T. thermophila* gojili v gojiščih, v katere smo vklopili vodo Mili-Q (negativna in pozitivna kontrola) oz. posamezne vzorce jezerskih voda ali izlužke talnih vzorcev. Viabilnost kultur 24 ur po inokulaciji v sveža gojišča prikazuje preglednica 12.

Preglednica 12: Viabilnost gojenih kultur praživali *T. thermophila*

Vzorec	Št. mrtvih celic	Št. živih celic	Viabilnost (%)
Tla			
T1	1	43	97,7
T2	1	29	96,6
T3	1	45	97,8
T4	1	68	98,5
T5	0	54	100
T6	0	28	100
NK	0	57	100
Jezer			
J1	1	34	97,1
J2	0	52	100
J3	0	46	100
J4	0	30	100
NK	1	59	98,3

NK – negativna kontrola

Za vse kulture praživali *T. thermophila*, gojene v bogatem gojišču z vklopljenimi izlužki talnih vzorcev, vzorci jezerske vode ali Mili-Q vodo je viabilnost presegala 90 % (Preglednica 12).

4.2.2 Genotoksičnost izlužkov talnih vzorcev

Vrednosti številnih parametrov izmerjenih v kometnem testu ne prilegajo normalni porazdelitvi, temveč so nesimetrični. Zato Verde in sod. (2006) za osnovni prikaz rezultatov kometnega testa priporočajo uporabo mediane pred uporabo povprečne vrednosti.

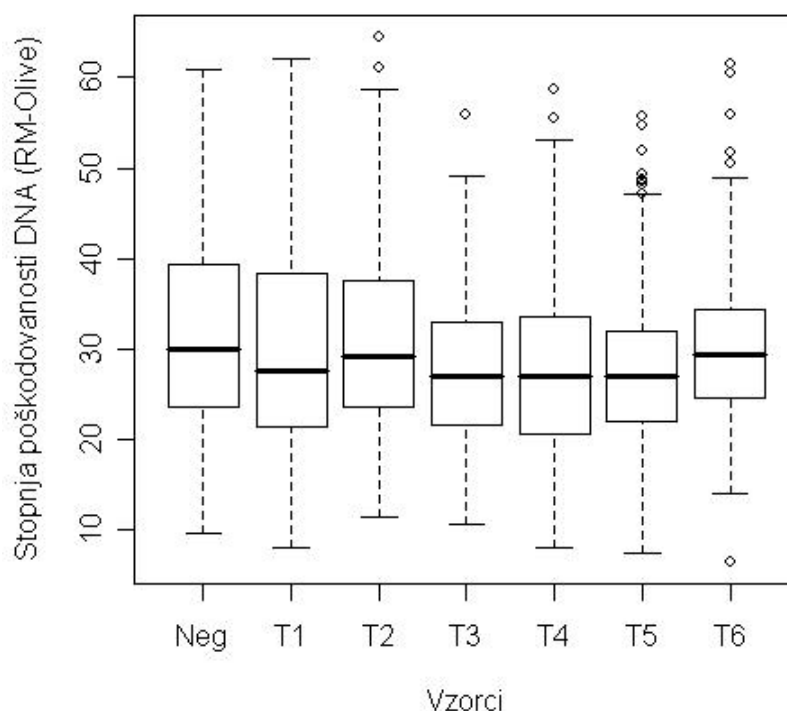
Rezultati testiranja izlužkov talnih vzorcev na genotoksičnost so za vse tri ponovitve skupaj prikazani v preglednici 13 in sliki 5. Genotoksični učinek je prikazan kot RM-Olive (enačba (2)).

Preglednica 13: Osnovna statistika za poškodbe jedrne DNA (RM-Olive) pri izlužkih talnih vzorcev

Vzorec	Povprečje	St. odklon	Mediana	Minimum	Maksimum
T1	30,121	11,312	27,600	8,01	62,05
T2	31,093	9,763	29,115	11,47	64,50
T3	27,490	8,259	26,975	10,55	55,81
T4	27,366	9,584	27,010	8,08	58,76
T5	27,383	8,419	26,940	7,41	55,66
T6	30,227	8,370	29,355	6,40	61,44
NK	31,779	10,590	29,890	9,67	60,98
PK	37,744	19,681	35,420	5,54	215,09

NK - negativna kontrola, PK – pozitivna kontrola

Slika 5 nam kaže informacije o porazdelitvi rezultatov. Mediana je vrisana kot horizontalna črta v interkvartilnih razmikih. 50 % vrednosti RM-Olive 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 RM-Olive. Pod mejo 3. kvartila (zgornje meje pravokotnikov na grafikonu) pa se nahaja 75 % vrednosti RM-Olive. Zgornja in spodnja meja črtkanih premic označujeta mejne vrednosti. Vrednosti izven zgornje in spodnje meje so osamelci in so na grafikonu označene kot krogci.



Slika 5: Porazdelitve vrednosti RM-Olive za genotoksični učinek izlužkov talnih vzorcev

Pri izlužkih talnih vzorcev stopnja poškodb DNA (RM-Olive) statistično značilno ni odstopala od RM-Olive negativne kontrole. Prav tako se ti genotoksični odzivi tudi med

samimi izlužki statistično značilno ne razlikujejo. S kometnim testom za noben izlužek talnega vzorca nismo dokazali genotoksičnosti.

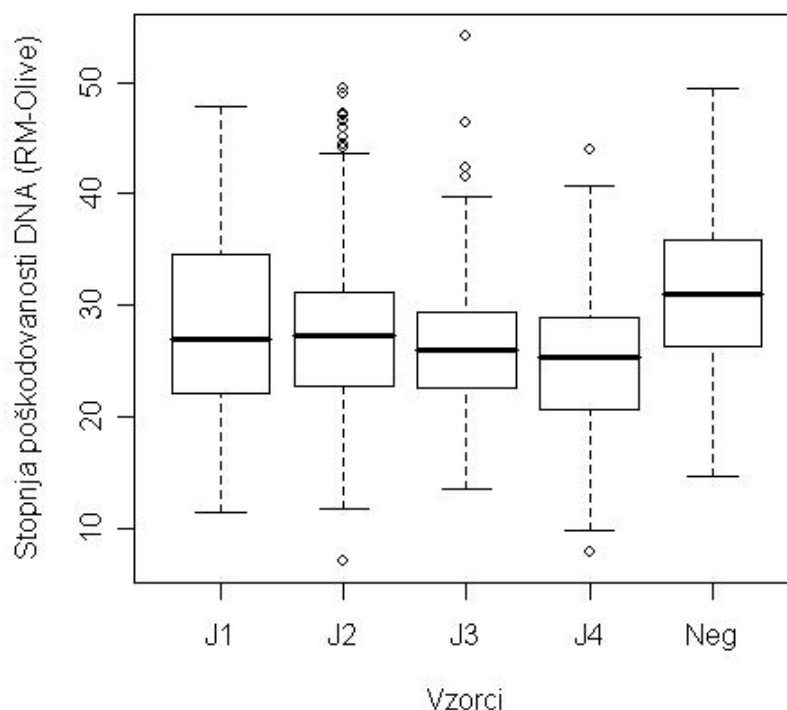
4.2.3 Genotoksičnost vzorcev jezerskih voda

Rezultati testiranja vzorcev jezerskih voda na genotoksičnost so prikazani za obe ponovitvi kometnega testa skupaj, v preglednici 14 in sliki 6. Razlaga grafikona, ki je v poglavju Genotoksičnost izlužkov talnih vzorcev podana za sliko 5 velja tudi na sliko 6.

Preglednica 14: Osnovna statistika za poškodbe jedrne DNA (RM-Olive) pri vzorcih jezerskih voda

Vzorec	Povprečje	St. odklon	Mediana	Minimum	Maksimum
J1	28,224	8,176	26,975	11,44	47,82
J2	27,816	7,635	27,290	7,03	49,43
J3	26,339	6,159	25,925	13,52	54,18
J4	25,302	6,469	25,300	7,88	44,00
NK	30,962	6,871	30,975	14,66	49,45
PK	38,586	9,349	37,895	14,69	68,65

NK – negativna kontrola, PK – pozitivna kontrola



Slika 6: Porazdelitve vrednosti RM-Olive za genotoksični učinek vzorcev jezerske vode

Pri vzorcih jezerskih voda stopnja poškodb DNA (RM-Olive) statistično značilno ni odstopala od RM-Olive negativne kontrole. Prav tako se ti genotoksični odzivi tudi med vzorci jezerskih voda statistično značilno ne razlikujejo. S kometnim testom za noben vzorec jezerske vode nismo dokazali genotoksičnosti.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Prisotnost in kopičenje različnih onesnaževal v vodnem okolju in talnih sistemih predstavlja težko obvladljivo vprašanje, zato so številne raziskave usmerjene v oblikovanje novih metod in načinov za odkrivanje onesnaženja in njegovih učinkov. V znanstveni literaturi lahko zasledimo obširne študije o identifikaciji in ugotavljanju koncentracij kemikalij, vnesenih v talni sistem ali vodno okolje. Tudi sicer se trenutno spremljanje onesnaženosti okolja v sklopu državnega monitoringa okolja opira na rezultate fizikalno-kemijskih analiz. Iz teh analiz izvemo veliko o sestavi analiziranih vzorcev, nič pa o medsebojnem vplivu posameznih sestavin, bioaktivaciji, bioakumulaciji in ostalih učinkih na organizme. Za izdelavo ustrezne ocene dejanskega obsega onesnaženja v prostoru potrebujemo analizo okolja z biotesti za toksičnost in genotoksičnost, ki lahko izmerijo skupne učinke onesnaževanja na žive organizme.

V Šaleški dolini se soočajo z izgubljanjem rodovitnih kmetijskih površin, bodisi zaradi kemičnega onesnaženja bodisi kot posledice degradacije tal (stranski industrijski produkti, še posebno termoenergetskih objektov, komunalni odpadki, gošče iz čistilnih naprav, množična pridelave hrane in krme ob nenadzorovani, pogosto prekomerni uporabi gnojil, herbicidov, pesticidov, ...). Normalna rodovitnost tal je v Šaleški dolini že ogrožena (Vsebnost težkih kovin v tleh ..., 2001), dodatno pa je rastni potencial oziroma proizvodna sposobnost tal ovirana zaradi zakisanosti tal. Kar 60 % lokacij ima vrednost pH nižjo od 5,5, zato je apnenje potrebno na približno dveh tretjinah obdelovalnih površin Šaleška dolina je zaradi svoje obremenjenosti z raznolikimi onesnaževali vzorčni primer, kjer na kontaminacijo vplivajo številne toksične snovi, zapletene in nam pogosto nepoznane strukture in kjer za potrebe izvajanja ukrepov izboljševanja stanja okolja zgolj izvajanje rutinskih fizikalno-kemijskih raziskav ni dovolj. Biološke metode, ki se dobro izkažejo v takšnih razmerah, se v nadaljevanju lahko uporabijo za dopolnitev monitoringa okolja na državni ravni.

V ekotoksikološki raziskavi želimo pridobiti širši pogled na snovi v okolju. Za snov, ki je na obravnavani lokaciji povzročila neobičajen odziv, poskušamo razložiti vse postopke od vnosa do njene končne vloge v ekosistemu. Celostni pristop bomo dosegli s fizikalno-kemijsko identifikacijo večjih koncentracij onesnaževal prisotnih v vzorcih, študijo procesov prenosa onesnaževal v ekosistem in končnim preizkusom z biotestom o možnih učinkih onesnaževal na organizme v okolju.

Za preverjanje toksičnosti vzorcev jezerske vode smo v raziskavi uporabili testni set Thamnotoxkit FTM. Testni organizmi so bili sladkovodni rakci *Th. platyurus*, ki so vključeni v set. Test omogoča enostavno, hitro in prostorsko ter cenovno nezahtevno vrednotenje toksičnosti.

Pri valjenju cist rakca *Th. platyurus* smo se srečali z različno uspešnostjo oživitve cist, glede na temperaturo inkubacije. Čeprav v literaturi poročajo o normalnem poteku postopka valjenja pri 28°C (Belk in Nelson, 1995), nam pri tej temperaturi ni uspelo doseči ustrezne valilne uspešnosti. Pri 25°C je bilo valjenje uspešno tudi pri nekoliko manjši osvetlitvi, 2800 lux, od priporočene (3000-4000 lux; Standard Operational Procedure ..., 2006).

Ripley in sod. (2002-2003) so opisali prenos ličink po 24 urni inkubaciji v svežo standardno delovno raztopino za 2 do 4 ure pred izpostavitvijo vzorcem. Tudi v našem primeru se je vnos sveže aerirane delovne raztopine v petrijevke z ličinkami po 20 do 22 urni inkubaciji izkazal kot dober ukrep za izboljšanje učinkovitosti prenosa ličink v testne plošče. Pri večjem številu testnih plošč lahko prenos ličink traja tudi nekaj ur. Z vnosom sveže raztopine ličinke med samim prenosom delno okrepimo pred neugodnimi vplivi zunaj inkubatorja.

Derksen (2002) v pregledu miniaturnih biotestov predstavlja Thamnotoxkit FTM kot občutljiv sistem vrednotenja toksičnosti. Drugi avtorji poročajo o različni občutljivosti rakca *Th. platyurus* in drugih testnih organizmov na poznane toksične snovi (Ripley in sod., 2002-2003; Blom in Juttner, 2005). Na podlagi biotesta ne moremo direktno sklepati na raven toksičnosti vzorcev jezerske vode, saj smo na enem samem testnem organizmu merili le eno vrsto končnih odzivov toksičnosti. Za boljši pregled toksičnih učinkov snovi v okolju in biološke ustreznosti preizkušenega biotesta bi bilo potrebno opraviti več različnih biotestov z različnimi organizmi na različnih trofičnih nivojih (prokarionti, evkariontski mikroorganizmi, rastline, nevretenčarji, vretenčarji). Medsebojno je potrebno primerjati tudi različne končne odzive biotestov in rezultate biotestov z in brez vključitve biomarkerjev. Dobljeni rezultati biotesta se sicer skladajo z (sicer omejenimi) izsledki podatkov fizikalno-kemijskih analiz vzorcev jezerske vode. Fizikalno-kemijske analize vzorcev jezerske vode (Preglednica 4 na str. 8) so pokazale, da nobeden od preiskovanih parametrov jezerske vode iz izbranih vzorčnih območji (J1-J4) ni presegal predpisane mejne vrednosti, z uporabljenim biotestom pa nam prav tako ni uspelo dokazati toksičnosti vzorcev jezerskih voda.

Pomembno je, da izberemo biološki testni sistem, ki omogoča povezovanje in primerjavo različnih končnih odzivov toksičnosti (merila na fenotipskem in genotipskem nivoju). V okoljskih študijah se namreč srečujemo s primeri, kjer toksičnosti vzorcev ne moremo potrditi, hkrati pa na teh primerih dokažemo nezanemarljive vplive genotoksičnosti (Bekaert in sod., 2002).

Kometni test ali elektroforeza posameznih celic se je v predhodnih raziskavah že izkazala za primerno metodo vrednotenja poškodb DNA na nivoju posameznih celic. Prav tako se je kometni test izkazal za bolj občutljivega od testa Ames, sicer najbolj pogosto uporabljanega testnega sistema v monitoringu voda (Žinko, 2004).

Postopek kometnega testa na praživali *T. thermophila* je l. 2001 razvila Lah in ga l. 2005 s sod. primerjala s kometnima testoma na humanih celičnih linijah Caco-2 in HepG2, kjer je test s praživaljo *T. thermophila* pokazal primerljive rezultate. Primerjavo kometnega testa na praživali *T. thermophila* z drugimi najpogosteje uporabljanimi testi za genotoksičnost je l. 2004 opravila Žinko. Pred dokončno oceno biološke ustreznosti pa je za test potrebno pregledati primerjalno vrsto na širokem spektru različnih skupin poznanih genotoksičnih snovi.

Glede na druge testne celice, ki se uporabljajo za ocenjevanje genotoksičnosti s kometnim testom, pri praživali *T. thermophila* naletimo na veliko variabilnost odčitanih rezultatov. Mlada pražival ima veliko sposobnost samopopravljanja napak v dednini in zato je repni moment takih celic majhen. Genom starejših celic pa se ne popravlja več, zato je podvržen propadanju in, zajet v meritve, vsebuje vedno več napak tudi brez zunanega vpliva genotoksičnosti. Zato je pomembno, da ocenjujemo celice v logaritemski fazi rasti. Z

opisanim načinom precepljanja kulture smo dosegli boljšo učinkovitost vrednotenja poškodb DNA.

V naši raziskavi nam ni uspelo dokazati genotoksičnosti niti pri izlužkih talnih vzorcev niti pri vzorcih jezerskih voda. Predhodne analize, ki so bile opravljene na istih vzorčnih območjih pa genotoksičnost potrjujejo (Lah in sod., 2005b) oz. nakazujejo (Vsebnost težkih kovin v tleh ..., 2001).

Med našo raziskavo in raziskavo, ki so jo opravili Lah in sod (2005b) sta dve pomembni razliki v načinu izpostavitve testnih organizmov izlužkom talnih vzorcev. Lah in sod. so testne celice izpostavili supernatantom izlužkov talnih vzorcev. Izpostavitve je trajala 20 minut, izvedli pa so jo po vključitvi testnih celic v minigele. V naši raziskavi smo supernatante izlužkov talnih vzorcev in vzorce jezerskih voda vklopili v gojišča, ki smo jih sterilizirali s filtriranjem preko 0,22 µm membranskih filtrov. Tako je izpostavitve testnih organizmov trajala 24 ur, nato pa smo celice vključili v minigele.

S kratkotrajno izpostavitvijo testnih organizmov vzorcu lahko zaznamo stopnjo poškodbe DNA, ki se nastane še preden se izrazijo samopopravljalni mehanizmi dednine. Da ocenimo dejansko genotoksičnost je ustrežnejše, da izpostavitve traja daljši časa v katerem se testni organizmi tudi podvajajo in se samopopravljalni mehanizmi dednine izrazijo v večji meri.

Bekaert in sod. (2002) poročajo, da je ocena onesnaženosti okolja v izlužkih lahko delno podcenjena, zaradi uporabe postopka filtracije. Podcenitev majhnega genotoksičnega vpliva v kometnem testu lahko privede do neznčilnih razlik med vzorci in negativno kontrolo.

Nekaj toksikoloških raziskav je pokazalo, da *in vitro* sistemi ocenjevanja toksičnosti in genotoksičnosti na deževnikih *Eisenia foetida* pogosto kažejo večji odziv kot testi *in vivo* oz. testi v razmerah, ki so bolj podobne naravnem okolju testnega organizma (Zang in sod., 2000; Reinecke S.A. in Reinecke J.A., 2003). Gojišča z vklopljenimi izlužki talnih vzorcev in vzorci jezerskih voda vsebujejo več življenjskemu okolju praživali *T. thermophila* sorodnih sestavin, kot gojišče z vklopljeno vodo Mili-Q, saj migetalkarja v naravi najdemo v vseh vodnih habitatih in tleh.

Na podlagi predhodnih analiz, ki so bile opravljene na istih vzorčnih mestih torej sklepamo, da genotoksičnosti izlužkov talnih vzorcev in morebitne genotoksičnosti vzorcev jezerskih voda najverjetneje nismo zaznali zaradi načina sterilizacije s filtracijo skozi membranske filtre in dolgotrajne, 24 urne izpostavitve praživali *T. thermophila* vzorcem.

Za podrobnejšo ugotovitev razloga odsotnosti genotoksičnega odziva v naših vzorcih bi bilo v nadaljnjem potrebno izvesti študije vpliva načina priprave izlužkov in sterilizacije oz. preveriti vpliv dolgotrajnejše izpostavitve praživali *T. thermophila* vzorcu na zaznavo genotoksičnih vplivov v kometnem testu.

Rezultati kometnega testa testov so relevantni samo ob dobri statistični analizi podatkov, vendar v znanstveni literaturi še ni opisane standardizirane metode za statistično obdelavo rezultatov kometnega testa (Verde in sod., 2006). Tako je uporabljeno statistično analizo rezultatov kometnega testa izlužkov talnih vzorcev in vzorcev jezerskih voda potrebno primerjati še z drugimi statističnimi metodami.

Na podlagi rezultatov raziskave lahko oblikujemo naslednje sklepe;

- Testni kit Thamnotoxkit FTM omogoča enostavno, hitro in prostorsko ter cenovno nezahtevno vrednotenje toksičnosti.
- Z uporabljenim biotestom nam ni uspelo dokazati toksičnosti vzorcev jezerskih voda. Prav tako pa nobeden od preiskovanih parametrov fizikalno-kemijske analiz vzorcev jezerske vode ni presegal predpisane mejne vrednosti.
- Za boljši pregled toksičnih učinkov jezerskih voda iz Šaleške doline in biološke ustreznosti preizkušenega biotesta bi bilo potrebno v raziskave vključiti več različnih biotestov z različnimi organizmi na različnih trofičnih nivojih. Medsebojno je potrebno primerjati tudi različne končne odzive biotestov.
- Kometni test se v preizkušeni obliki ni izkazal primernega za vrednotenje genotoksičnosti izlužkov talnih vzorcev in vzorcev jezerske vode.
- Genotoksičnega vpliva izlužkov talnih vzorcev in vzorcev jezerske vode nismo dokazali. Podrobnejše razloge za odsotnost genotoksičnega odziva je potrebno ugotoviti v nadaljnjih raziskavah.

6 POVZETEK

Talni sistem in vodno okolje imata pomembno vlogo v okolju. Onesnaženost in degradacija značilnosti naravnih virov, naravnih vrednot in nosilcev prostora predstavljajo veliko težavo pri nas in drugod po svetu, zato potrebujemo vse bolj izpopolnjene metode, ki bodo osnova ustreznem izvajanju ukrepov pri ohranjanju in izboljševanju stanja okolja. Zakonsko predpisane preiskave iz sklopa monitoringa okolja so večinoma utemeljene na spremljanju fizikalnih in kemijskih kazalcev, s katerimi ne moremo ugotoviti biološkega učinka, medsebojnega vpliva posameznih sestavin v vzorcu in bioaktivacije.

Nevarnost za zdravje pomenijo zlasti tiste snovi, ki so povsod navzoče in se trajno ohranjajo. Zdravju škoduje tako izpostavljanje večjim koncentracijam za kratek čas, kot dolgotrajno izpostavljanje majhnim koncentracijam. Majhno toksičnost in genotoksičnost je potrebno zanesljivo dokazati, kar lahko storimo le z dovolj občutljivimi biotesti.

V diplomskem delu smo z biološkimi testi testirali vzorce tal in jezerske vode iz različnih lokacij na območju Šaleške doline. S komercialnim kitom za ugotavljanje toksičnosti Thamnotoxkit FTM smo testirali toksičnost jezerskih vzorcev, genotoksičnost izlužkov talnih vzorcev in vzorcev jezerske vode pa smo ovrednotili z alkalno različico kometnega testom z migetalkarjem *T. thermophila*.

Test Thamnotoxkit FTM smo izvedli v skladu z navodili proizvajalca. Dan pred izpostavitvijo testnega organizma *Th. platyurus* vzorcem, smo pričeli s postopkom valjenja cist. Naslednji dan smo pripravili redčitvene vrste vzorca in jih pri standardnih pogojih izpostavili ličinkam za 24 ur. Po inkubaciji smo prešteli število negibljivih rakcev in izračunali oceno smrtnosti. Za negativno kontrolo smo uporabili delovno raztopino.

Z biotestom toksičnega odziva vzorcev jezerske vode nismo dokazali. Na podlagi biotesta ne moremo direktno sklepati na nivo toksičnosti vzorcev jezerske vode, saj smo na enem samem testnem organizmu merili le eno vrsto končnih odzivov toksičnosti. Rezultati komercialnega biotesta Thamnotoxkit FTM sicer sovpadajo z izsledki fizikalno-kemijskih analiz vzorcev jezerske vode.

Kometni test smo prilagodili po postopku, ki ga je opisala Lah (2001). Pražival *T. thermophila* smo gojili v bogatem gojišču za praživali, ki smo ga za negativno in pozitivno kontrolo pripravili z vodo Mili-Q, v ostalih primerih pa s posameznimi izlužki talnih vzorcev oz. vzorci jezerskih voda. Ker lahko avtoklaviranje nekontrolirano spremeni sestavo ali lastnosti sestavin vzorcev, smo gojišča z vklopljenimi vzorci sterilizirali s filtracijo. Za pozitivno kontrolo smo celice izpostavili raztopini 500 μ M vodikovega peroksida. Poškodbe jedrne DNA smo po alkalni lizi celic in elektroforezi minigelov ocenili s pomočjo epifluorescentnega mikroskopa v povezavi s sistemom za računalniško analizo slike.

Statistično analizo podatkov kometnega testa smo opravili s po GNU prosto dostopnim programskim paketom R. Osnovne statistične parametre smo določili s pomočjo vgrajenih funkcij, razvoj in obdelavo modelov pa smo opravili z dodatkom '*survival*'.

V naši raziskavi nam ni uspelo dokazati odziva genotoksičnosti niti pri izlužkih talnih vzorcev niti pri vzorcih jezerskih voda. Predhodne analize, ki so bile opravljene na istih vzorčnih območjih pa genotoksičnost potrjujejo oz. jo nakazujejo. Sklepamo, da genotoksičnosti izlužkov talnih vzorcev in morebitne genotoksičnosti vzorcev jezerskih

voda najverjetneje nismo zaznali zaradi načina sterilizacije s filtracijo skozi membranske filtre in dolgotrajne, 24 urne izpostavitve praživali *T. thermophila* vzorcem.

Diplomsko delo pomeni nov korak k oblikovanju metodike vrednotenja onesnaženosti z biotesti in je dobra podlaga za nadaljnje raziskave.

Za boljši pregled toksičnih učinkov snovi v okolju in biološke ustreznosti preizkušenelega kita za vrednotenje toksičnosti bi bilo potrebno preizkusiti več različnih biotestov z različnimi organizmi na različnih trofičnih nivojih. Medsebojno je potrebno primerjati tudi različne končne odzive biotestov in rezultate biotestov z in brez vključitve biomarkerjev.

Pred dokončno oceno biološke ustreznosti je za kometni test s praživaljo *T. thermophila* potrebno še pregledati primerjalno vrsto na širokem spektru različnih skupinah poznanih genotoksičnih snovi. Podrobnejše razloge za odsotnost genotoksičnega odziva na obravnavanih vzorcih je potrebno ugotoviti v nadaljnjih raziskavah.

7 VIRI

- ARSO (Agencija RS za okolje). Ministrstvo za okolje in prostor. (20. avg. 2006)
<http://www.arso.gov.si> (27. sep. 2006)
- Avberšek M. 2004. Odkrivanje toksičnih učinkov onesnaževanja v Šaleški dolini z biotesti. Raziskovalna naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, Velenje, Gibanje mladi raziskovalci za razvoj Šaleške doline: 35 str.
- Belk D., Nelson T.S. 1995. Observations on the Effects of Incubation at Inhibitory Temperature on Subsequent Hatching of Anostracan Cysts. *Hydrobiologia*, 298, 1-3: 179-181
- 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 Contaminated Soils. *Chemosphere*, 46, 2: 251-258
- Bekaert C., Ferrier V., Marty J., Pfohl-Leszkowicz A., Bispo A., Jourdain M.J., Jauzein M., Lambomez-Michel L., Billard H. 2002. Evaluation of Toxic and Genotoxic Potential of Stabilized Industrial Waste and Contaminated Soils. *Waste Management*, 22: 241-247
- Beričnik-Vrbovšek J., Šterbenk E., Ramšak R. 1995. Velenjsko jezero-pogled od blizu. *Zeleno okno* 3: 29-31
- Bispo A., Jourdain M.J., Jauzein M. 1999. Toxicity and Genotoxicity of Industrial Soils Polluted by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). *Organic Geochemistry*, 30: 947-952
- Blom J.F., Juttner F. 2005. High Crustacean Toxicity of Microcystin Congeners Does Not Correlate With High Protein Phosphatase Inhibitory Activity. *Toxicon*, 46: 465-470
- Brilly M., Globevnik L., Štravs L., Rusjan S. 2005. Eksperimentalna porečja v Sloveniji. V: Raziskave s področja geodezije in geofizike 2004, 10. strokovno srečanje Slovenskega združenja za geodezijo in geofiziko, Ljubljana, 13. jan. 2005: 45-59. http://www.fgg.uni-lj.si/sugg/referati/2005/SZGG_05_Brilly_et_all.pdf (30. avg. 2006)
- Cabrera G.L., Rodriguez D.M.G. 1999. Genotoxicity of Soil from Farmland Irrigated with Wastewater Using Three Plant Bioassays. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 426: 211-214
- Chatterjee A., Banerjee R.N. 1999. Determination of Lead and Other Metals in a Residential Area of Greater Calcuta. *The Science of the Total Environment*, 227: 175-185
- 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

- Chen Y. Wang Z. 2005. Detection of Genotoxicity of Soil Pollution to Earthworm *in vivo* Exposure by Comet Assay. *Acta Pedologica Sinica*, 42: 577-583
- Dayeh V.R., Schirmer K., Bols N.C. 2002. Applying Whole-Water Samples Directly to Fish Cell Cultures in Order to Evaluate the Toxicity of Industrial Effluent. *Water Research*, 36: 3727-3738
- Dayeh V.R., Lynn D.H., Bols N.C. 2005. Cytotoxicity of Metals Common in Mining Effluent to Rainbow Trout Cell Lines and to the Ciliated Protozoan. *Tetrahymena thermophila*. *Toxicology in Vitro*, 19: 399-410
- Derksen J.G. M. 2002. Microbiotests, Possibilities and Limitations. With special reference to (sub)tropical conditions and developing countries. Amsterdam, Aquasense: 76 str.
- Duan C.Q., Hu B., Jiang B.H., Wen C.H., Wang Z., Wang Y.X. 1999. Genotoxicity of Water Samples from Dianchi Lake Detected by the *Vicia faba* Micronucleus test. *Mutation Research*, 426: 121-125
- Duan C.Q., Hu B., Wang Z.H., Wen C.H., Yan S.Q., Jiang X.H., Wang D.K., Li Q., Liang Q.F. 1999. *Tradescantia* Bioassays for the Determination of Genotoxicity of Water in the Panlong River, Kuming, People's Republic of China. *Mutation research*, 426: 127-131
- Eason C., O'Halloran K. 2002. Biomarkers in Toxicology Versus Ecological Risk Assessment. *Toxicology*, 181-182: 517-521
- Ehrlich V., Darroudi F., Uhl M., Steinkellner H., Gann M., Majer B. J., Eisenbauer M., Knausmuller S. 2002. Genotoxic Effects of Ochratoxin A in Human-Derived Hepatoma (HepG2) Cells. *Food and Chemical Toxicology*, 40: 1085-1090
- Ekotoksikološke preiskave. 2006. Zavod za zdravstveno varstvo Maribor, Inštitut za varstvo okolja.
http://www.zzv-mb.si/?pid=view_menu&submenu_id=16 (24. avg. 2006)
- Emmanuel E., Perrodin Y., Keke G., Blanchard J.M., Vermande P. 2005. Ecotoxicological Risk Assessment of Hospital Wastewater: A Proposed Framework for Raw Effluents Discharging Into Urban Sewer Network. *Journal of Hazardous Materials*, A117: 1-11
- Enciklopedija Slovenije, 13. zvezek. 1999. Ljubljana, Založba Mladinska knjiga: 416 str.
- Fendt K. 2003. Ecotoxicological Problems Associated with Contaminated Sites. *Toxicology Letters*, 140-141: 353-365
- Ferrari L., de la Torre F.R., Demichelis S.O., Garcia M.E., Salibian A. 2005. Ecotoxicological Assessment for Receiving Waters with the Premetamorphic Tadpoles 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

- Frankart C., Eullaffroy P., Vernet G. 2003. Comparative Effects of Four Herbicides on Non-Photochemical Fluorescence Quenching in *Lemna minor*. *Environmental and Experimental Botany*, 49: 159-168
- Froehner K., Backhaus T., Grimme L.H. 2000. Bioassays with *Vibrio fischeri* for the Assessment of Delayed Toxicity. *Chemosphere*, 40: 821-828
- Geoffroy L., Frankart C., Eullaffroy P. 2004. Comparison of Different Physiological Parameter Responses in *Lemna minor* and *Scenedesmus obliquus* Exposed to Herbicide Flumioxazin. *Environmental Pollution*, 131: 233-241
- Gichner T., Velemínský J. 1999. Monitoring the Genotoxicity of Soil Extracts from Heavily Polluted Sites in Prague Using the *Tradescantia* Stamen Hair and Micronucleus (MNC) Assay. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 426: 163-166
- Glasičnik E. 2004. Primerjava vplivov okolja na ozemlju Slovenije na citogenetski material šalotke (*Allium cepa* L. var. *ascalonicum*). DP 09/02/04. Velenje, ERICo Velenje: 53 str.
- Guidance Document on the Development, Validation and Regulatory Acceptance of New and Updated Internationally Acceptable Test Methods in Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 34. 2001. Paris, OECD: 43 str.
- Isidori M., Lavorgna M., Nardelli A., Parrella A. 2003. Toxicity Evaluation of Leachates from Municipal Solid Waste Landfills: A Multispecies Approach. *Chemosphere*, 52: 85-94
- Jos A., Repetto G., Rios J.C., Hazen M.J., Molero M.L., del Peso A., Salugero M., Fernandez-Freire P., Perez-Martin J.M., Camean A. 2003. Ecotoxicological Evaluation of Carbamazepine Using Six Different Model Systems with Eighteen Endpoints. *Toxicology in Vitro*, 17: 525-532
- Joseph P.D., Gruz P., Nohmi T. 1997. Recent Advances in the Construction of Bacterial Genotoxicity Assays. *Mutation Research*, 386: 1-23
- Jovtchev G., Menke M., Schubert I. 2001. The Comet Assay Detects Adaptation to MNU-Induced DNA Damage in Barley. *Mutation Research*, 493: 95-100
- Kammann U., Bunke M., Steinhart H., Theobald N. 2001. A Permanent Fish Cell Line (EPC) for Genotoxicity Testing of Marine Sediments with the Comet Assay. *Mutation Research*, 498: 67-77
- Kirkland D.J., Muller L. 2000. Interpretation of the Biological Relevance of Genotoxicity Test Results: the Importance of Thresholds. *Mutation Research*, 464: 137-147
- Kong M.S., Ma T.H. 1999. Genotoxicity of Contaminated Soil and Shallow Well Water Detected by Plant Bioassays. *Mutation Research*, 426: 221-228

- Kurmayer R., Juttner F. 1999. Strategies for Co-Existence of Zooplankton with the Toxic Cyanobacterium *Planktothrix rubescens* in Lake Zurich. *Journal of Plankton Research*, 21: 659-683
- Lah B. 2001. Razvoj novega biotesta za kontrolo genotoksičnosti onesnaženih voda. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 48 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., Narat M., Marinšek-Logar R. 2005a. Monitoring of Genotoxicity in Drinking Water Using *in vitro* Comet Assay and Ames Test. *Food Technology and Biotechnology*, 43-2: 139-146
- Lah B., Avberšek M., Gorjanc G., Marnišek-Logar R. 2005b. Toxic and Genotoxic Potential Evaluation of Soil Samples by Bioassays. *Acta agriculturae Slovenica*, 86, 1: 27-38
- 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.
- Le Curieux F., Giller S., Gauthier L., Erb F., Marzin D. 1995. Study of the Genotoxic Activity of Six Halogenated Acetonitriles, Using the SOS Chromotest, the Ames-Fluctuation Test and the Newt Micronucleus Test. *Mutation Research*, 341: 289-302
- Lemos N.G., Dias A.L., Silva-Souza A.T., Mantovani M. S. 2005. Evaluation of Environmental Waters Using Comet Assay in *Tilapia rednalli*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19: 197-201
- Likar M. 1998. Vodnik po onesnaževalcih okolja. Ljubljana, Zbornica sanitarnih tehnikov in inženirjev Slovenije: 391 str.
- 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. Development of a System for Ecotoxicology Biotesting in Alpine and Carst Regions. 2003. University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Zootechnical department (1. avg. 2006).
<http://www.rtd.si/slo/6op/podr/trajraz/globeko/gradivo/Marinsek-Logar-Trico-Lj-jan-03-project-description.pdf> (30. avg. 2006)

- Mazej Z. 2006. "Fizikalno-kemijske analize vzorcev jezerskih voda". Velenje. ERICo Velenje, Inštitut za ekološke raziskave (osebni vir, 25. sep. 2006).
- Menke M., Chen I.P., Angelis K.J., Schubert I. 2001. DNA Damage and Repair in *Arabidopsis thaliana* as Measured by the Comet Assay After Treatment with Different Classes of Genotoxins. *Mutation Research*, 493: 87-93
- Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. 2002. Fifth Edition. United States Environmental Protection Agency (27. feb. 2006)
<http://epa.gov/waterscience/WET/disk2/atx.pdf> (1. sep. 2006)
- Miloshev G., Mihaylov I., Anachkova B. 2002. Application of Single Cell Electrophoresis on Yeast Cells. *Mutation Research*, 513: 69-74
- Oanh N.T.K., Bengtsson B.E. 1995. Toxicity to Microtox, Micro-algae and Duckweed of Effluents from the Bai Bang Paper Company (BAPACO), a Vietnamese Bleached Kraft Pulp and Paper Mill. *Environmental Pollution*, 90: 391-399
- Odžak N., Zvonarić T., Kljaković Gašpić Z., Horvat M., Barić A. 2000. Biomonitoring of Mercury in the Kaštela Bay Using Transplanted Mussels. *The Science of the Total Environment*, 261: 61-68
- Okolje v Sloveniji 1996. 1998. Ljubljana, Ministrstvo za okolje in prostor, Uprava RS za varstvo narave.
http://www.arso.gov.si/poro~cila_o_stanju_okolja_v_Sloveniji (20. avg. 2006)
- Plaper A. 2005. Določanje mutagenega potenciala snovi na celični liniji mišjega limfoma. *Farmacevtski vestnik, Strokovno glasilo slovenske farmacije*, 56, 2: 115-119
- Poli P., Buschini A., Restivo F.M., Ficarelli A., Cassoni F., Ferrero I., Rossi C. 1999. Comet Assay Application in Environmental Monitoring: DNA Damage in Human Leukocytes and Plant Cells in Comparison With Bacterial and Yeast Cells. *Mutagenesis*, 14, 6: 547-555
- Poročilo o proizvodnji, vzdrževanju in ekoloških bremenitvah okolja TE Šoštanj v letu 2005. 2006. Rotnik U. (ur.). Šoštanj, Termoelektrarna Šoštanj: 140 str.
- Program monitoringa kakovosti jezer v letu 2006. 2006. Ljubljana, Ministrstvo za okolje in prostor, Agencija Republike Slovenije za okolje: 24 str.
- Raziskave onesnaženosti tal Slovenije – poročilo za leto 2004. 2005. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Center za pedologijo in varstvo okolja, Maribor, Zavod za zdravstveno varstvo Maribor, Center za varstvo okolja: 86 str.
- Reinecke S.A., Reinecke J.A. 2004. The Comet Assay as Biomarker of Heavy Metal Genotoxicity in Earthworms. *Environmental Contamination and Toxicology*, 46: 208-215

- Resolucija o nacionalnem programu varstva okolja 2005-2012 (ReNVPO), Ur.l. RS št. 2-3/06
- Ripley B.J., Davis K.C., Carter B.J., Simovich M.A. 2002-2003. Toxicity of Malathion and Roundup[®] to the San Diego Fairy Shrimp. Transaction of the Western Section to the Wildlife Society, 38-39: 13-21
- Ritz C., Streibig J.C. 2006. Bioassay Analysis using R. The R Project for Statistical Computing.
<http://cran.r-project.org/doc/vignettes/drc/drc.pdf> (19. sep. 2006)
- Shultz T.W. 1997. Tetratox: *Tetrahymena thermophila* Population Growth Impairment Endpoint-A Surrogate for Fish Lethality. Toxicology Methods, 7: 289-309
- Singh N.P., Stephens R.E., Singh. H., Lai H. 1999. Visual Quantification of DNA Double-Strand Breaks in Bacteria. Mutation Research, 429: 159-168
- Single Cell Gel Electrophoresis Analysis. User Guide - Version 5. 2001. Bromborough, Kinetic Imaging Ltd.
- SIST ISO 10381-6. Soil Quality – Sampling. Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory. 1993: 4 str.
- SIST ISO 11464. Soil Quality – Pretreatment of Samples for Physico-Chemical Analysis. 1994: 11 str.
- Standard Operational Procedure, Thamnotoxkit FTM, Crustacean Toxicity Screening Test for Freshwater. 2006. Nazareth, Belgium, Microbiotests Inc: 28 str.
- Stark J.D., Banks E.J. 2003. Population Level Effects of Pesticides and Other Toxicants on Arthropods. Annual Review of Entomology, 48: 505-519
- Šalej M. 2002. Odnos prebivalcev obremenjenih območij do okolja in okoljskih problemov na vzorčnih primerih Šaleške doline in Zasavja. Velenje. ERICo Velenje, Inštitut za ekološke raziskave. Dela, 18: 378-399
- 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. Založništvo Pozoj Velenje: 191 str.
- Šterbenk E., Ramšak R. 1999. Pokrajinski vidiki rabe premogovniškega ugrezninskega Velenjskega jezera. V: Dela 13. 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

- Tong Z., Hongjun J. 1997. Use of Duckweed (*Lemna minor L.*) Growth Inhibition Test to Evaluate the Toxicity of Acrylonitrile, Sulphocyanic Sodium and Acetonitrile in China. *Environmental Pollution*, 98: 143-147
- Uredba o kemijskem stanju površinskih voda. Ur.l. RS št. 11-461/02
- Uredba o mejnih, opozorilnih in kritičnih imisijskih vrednostih nevarnih snovi v tleh, Ur.l. RS št. 68-3722/96
- Uredba o vnosu nevarnih snovi in rastlinskih hranil v tla, Ur.l. RS št. 68-3721/96
- 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
- Vsebnost težkih kovin v tleh in rastlinah na kmetijskih površinah v Šaleški dolini – zaključno poročilo. 2001. Velenje, ERICo Velenje, Inštitut za ekološke raziskave: 173 str.
- Vidic T. 2003. Povezava med nukleotipom rastlinskih vrst in njihovo uspešnostjo na industrijsko onesnaženem območju pri Žerjavu (Koroška). Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 144 str.
- Vidic T. 2005. "Metoda za preverjanje viabilnosti na *T. thermophila*". Ljubljana. Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo (osebni vir, 17. nov. 2005)
- White P.A., Claxton L.D. 2004. Mutagens in Contaminated Soil: A Review. *Reviews in Mutation Research*, 567: 227-345
- 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*). 2002. V: Symposium on Advances in Analytical Separation Science, Pörtscach/Wörthersee, 3.-5. jun. 2002 (12. feb. 2002)
http://abra.fkkt.uni-lj.si/fkktstrlic/chrom02/pdf/P/wols3_P.pdf (19. sep. 2006)
- Zakon o varstvu okolja. Uradno prečiščeno besedilo (ZVO Upb1). Ur.l. RS št. 39-1682/06
- Zang Y., Zhong Y., Luo Y., Kong Z.M. 2000. Genotoxicity of Two Novel Pesticides for the Earthworm *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution*, 108: 271-278
- Žinko B. 2004. Ugotavljanje genotoksičnosti pitne vode iz treh zajetij na območju Ljubljane. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 60 str.

ZAHVALA

Iz srca se zahvaljujem mentorici prof. dr. Romani Marinšek Logar, za strokovni zorni kot in nasvete, prijaznost in spodbudo, ki sem jih med nastajanjem diplomskega dela zelo potreboval.

Prof. dr. Francu Viktorju Nekrepu, predstojniku Katedre za mikrobiologijo in mikrobno biotehnologijo Oddelka za zootehniko se zahvaljujem za strokovno recenzijo dela.

Inštitutu za ekološke raziskave ERICo Velenje se zahvaljujem za posredovanje talnih vzorcev in vzorcev jezerske vode in rezultatov fizikalno-kemijskih analiz.

Dr. Barbari Lah, Marti Majdič, dr. Tadeju Čepeljniku in dr. Maši Zorec se zahvaljujem za nesebično deljenje bogatih izkušenj z eksperimentalnim delom. Barbara mi je med piljenjem lastne doktorske disertacije namenila precej časa za uvajanje v kometni test, za kar sem ji še posebno hvaležen.

Gregorju Gorjancu se zahvaljujem za njegove stopinje prostosti, porabljene v pogovorih o statistični obdelavi in interpretaciji rezultatov.

Študentom diplomantom in zaposlenim na Katedri za mikrobiologijo in mikrobno biotehnologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete se moram zahvaliti za sproščeno delovno vzdušje in prijetne medsebojne odnose.

Sošolcu Jožetu hvala za zadnje korekture in pomoč pri tiskanju.

Moji Nini hvala za postavljanje na realna tla.

Naj se na koncu zahvalim še vsem drugim, ki so kakorkoli prispevali k nastajanju diplomske naloge, pa jih nisem omenil.

Hvala vsem!

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Ilja Gasan OSOJNIK ČRNIVEC

**ANALIZA TOKSIČNOSTI IN GENOTOKSIČNOSTI
TAL IN JEZER V ŠALEŠKI DOLINI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2006

Samo odmerek odloči, da stvar ni strupena.

- Paracelsus