

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Luka ŽGUR

**GENOTOKSIČNOST MORSKIH SEDIMENTOV OB SLOVENSKI
OBALI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

GENOTOXICITY OF SLOVENIAN COAST MARINE SEDIMENTS

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Nacionalnem inštitutu za biologijo, v laboratorijih Oddelka za genetsko toksikologijo in biologijo raka.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Metko Filipič.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Tom Turk
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Recenzent: prof. dr. Mihael J. Toman
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Metka Filipič
 Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za genetsko toksikologijo
 in biologijo raka

Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Datum zagovora: 15. 09. 2010

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Luka Žgur

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	502.51:575.17:577.2(043.2)=163.6
KG	morski sedimenti/genotoksičnost/citotoksičnost/slovensko obalno morje/ Tržaški zaliv/policiklčni aromatski ogljikovodiki/test SOS/ <i>umuC</i> /test MTT/test komet
AV	ŽGUR, Luka
SA	FILIPIČ, Metka (mentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2010
IN	GENOTOKSIČNOST MORSKIH SEDIMENTOV OB SLOVENSKI OBALI
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 67 str., 3 pregl., 28 sl., 1 pril., 85 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Morski sedimenti so dober pokazatelj onesnaženosti morja, saj se onesnažila odlagajo vanje skozi daljše časovno obdobje. V diplomski nalogi smo raziskovali citotoksičnost in genotoksičnost kompleksnih vzorcev morskih sedimentov, odvzetih na 11 lokacijah slovenskega obalnega morja. Policiklični aromatski ogljikovodiki (PAH) sodijo med najpomembnejša potencialno genotoksična onesnažila v sedimentih, med njimi je najbolj preučevan benzo[a]piren (B[a]P). Citotoksičnost in genotoksičnost vzorcev smo določili z izbranimi testi: z bakterijskim SOS/ <i>umuC</i> testom na <i>Salmonelli typhimurium</i> , sev TA1535/pSK1002, ter s testoma MTT in komet s celicami človeškega hepatoma HepG2. Pri SOS/ <i>umuC</i> testu brez metabolne aktivacije S9 sta bila genotoksična dva vzorca, DB2 in LK4a, s koncentracijo 12.5 g sedimenta/ml, pri testu z metabolno aktivacijo S9 pa noben vzorec ni učinkoval genotoksično na bakterije. S testom MTT smo določili najvišjo koncentracijo vzorca, pri kateri preživetje celic HepG2 ni bilo manjše od 70 %. Ta je bila 0.5 g sedimenta/ml pri vzorcih 14, KK, CZ, K, DB2, F, MA in LK4a, oziroma 0.1 g sedimenta/ml pri vzorcih LK4e, LK6 in PM. Te koncentracije vzorcev smo izbrali za najvišje pri testu komet. Najnižja koncentracija, pri kateri smo zaznali statistično značilno povečano število prelomov DNA (genotoksičnost), je bila 0.1 g sedimenta/ml pri vzorcih 14, CZ, DB2, F, K, KK in MA, oziroma 0.02 g sedimenta/ml pri vzorcih LK4a, LK4e, LK6 in PM. Največjo genotoksičnost smo dokazali v vzorcih iz Luke Koper in Marine Portorož, kjer predvidevamo, da je morje najbolj onesnaženo zaradi pomorskega prometa in komunalnih odpadkov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC 502.51:575.17:577.2(043.2)=163.6
CX marine sediments/genotoxicity/cytotoxicity/Slovenian coastal sea/
Gulf of Trieste/polycyclic aromatic hydrocarbons/SOS/*umuC* test/MTT assay/comet assay
AU ŽGUR, Luka
AA FILIPIČ, Metka (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
PY 2010
TI GENOTOXICITY OF SLOVENIAN COAST MARINE SEDIMENTS
DT Graduation Thesis (University studies)
NO X, 67 pg., 3 tab., 28 fig., 1 ann., 85 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Marine sediments are good indicators of marine pollution, for pollutants are being discarded into it during a longer period of time. The topic of examination of the present study was the cytotoxicity and the genotoxicity of complex samples of marine sediments that were obtained from 11 different locations of Slovenian coastal sea. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) belong to the most significant potential genotoxic pollutants in sediments, benzo[a]pyren being the most investigated of them all. The cytotoxicity and genotoxicity of the samples were measured by selected tests: the bacterial SOS/*umuC* test with *Salmonella typhimurium* strain TA1535/pSK1002, and both the MTT assay and the comet assay with human hepatoma HepG2 cells. The SOS/*umuC* test with no S9 metabolic activation resulted in two genotoxic samples, DB2 and LK4a, with the concentration of 12.5 g sediment/ml, whereas in the test with S9 metabolic activation none of the samples induced a genotoxic effect on bacteria. The MTT assay was used to determine the highest possible sample concentration that allows minimally 70 % cell survival of HepG2 cells. The highest possible sample concentration was 0.5 g sediment/ml in samples 14, KK, CZ, K, DB2, F, MA and LK4a, and 0.1 g sediment/ml in samples LK4e, LK6 and PM. These sample concentrations were selected for the highest concentration values for the comet assay. The lowest concentration by which the statistically significant increased number of DNA breaks was detected (genotoxicity) was 0.1 g sediment/ml in samples 14, CZ, DB2, F, K, KK, and MA, and 0.02 g sediment/ml in samples LK4a, LK4e, LK6 and PM. The highest genotoxicity was proved in the samples from the Koper harbour and the port of Portorož, where marine pollution is presumably the most severe due to sea traffic and wastewaters.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PREGLEDNIC	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 Namen naloge in delovne hipoteze	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 Območje raziskave	3
2.2 Onesnaženost morja in morskih sedimentov	4
2.2.1 Policiklični aromatski ogljikovodiki (PAH) v sedimentih	5
2.2.2 Ostale potencialno genotoksične snovi v sedimentih	8
2.3 Testi genotoksičnosti	9
2.3.1 Bakterijski testni sistem: test SOS/ <i>umuC</i>	9
2.3.1.1 Sistem SOS ali popravljanje z napakami	9
2.3.1.2 Test SOS/ <i>umuC</i>	10
2.3.2 Sesalski testni sistem: model na celični liniji humanega hepatoma HepG2	11
2.3.2.1 Celična linija HepG2	11
2.3.2.2 Test komet	12
3 MATERIALI IN METODE	15
3.1 Vzorci morskih sedimentov	15
3.2 Vzorčna mesta	15
3.3 Kemikalije	17
3.4 Pozitivne kontrole, ki smo jih uporabili v nalogi	18
3.4.1 Benzo[a]piren (B[a]P)	18
3.4.2 Aflatoksin B ₁	18
3.4.3 4-nitrokinolin-N-oksid (NQNO)	19
3.5 Bakterijski testni sistem: test SOS/ <i>umuC</i>	19
3.5.1 Sev bakterije <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535/pSK1002	19

3.5.1.1	Gojenje kultur bakterij <i>Salmonella typhimurium</i>	19
3.5.1.2	Priprava reagentov in raztopin za test SOS/ <i>umuC</i>	20
3.5.1.3	Izvedba testa SOS/ <i>umuC</i>	22
3.6	Sesalski testni sistem: model na celični liniji humanega hepatoma HepG2.....	23
3.6.1	Gojenje celic HepG2.....	23
3.6.2	Določanje citotoksičnega delovanja vzorcev morskih sedimentov s testom MTT	24
3.6.2.1	Test MTT.....	24
3.6.2.2	Nasajanje celic HepG2	25
3.6.2.3	Izpostavitev celic in izvedba testa MTT	25
3.6.3	Test komet	26
3.6.3.1	Priprava reagentov in raztopin za test komet	26
3.6.3.2	Izvedba testa komet.....	27
4	REZULTATI	30
4.1	Bakterijski testni sistem: test SOS/ <i>umuC</i>	30
4.2	Sesalski testni sistem: model na celični liniji humanega hepatoma HepG2	32
4.2.1	Test MTT.....	32
4.2.2	Test komet.....	38
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	50
5.1	Razprava	50
5.2	Sklepi	55
6	POVZETEK (SUMMARY)	56
7	VIRI.....	58

KAZALO SLIK

Slika 1: Pretvorba ONPG v rumen produkt o-nitrofenol	11
Slika 2: Celična linija HepG2 (slikano pod svetlobnim mikroskopom pri 100x povečavi)	12
Slika 3: Jedri celic HepG2 po testu komet (400x povečava)	14
Slika 4: Zemljevid lokacij vzorčenja	16
Slika 5: Benzo[a]piren	18
Slika 6: Pretvorba MTT soli v vijoličast produkt MTT formazan.....	25
Slika 7: Določanje citotoksičnega delovanja vzorca 14 na celicah HepG2 s testom MTT	32
Slika 8: Določanje citotoksičnega delovanja vzorca KK na celicah HepG2 s testom MTT.....	33
Slika 9: Določanje citotoksičnega delovanja vzorca CZ na celicah HepG2 s testom MTT	33
Slika 10: Določanje citotoksičnega delovanja vzorca K na celicah HepG2 s testom MTT.....	34
Slika 11: Določanje citotoksičnega delovanja vzorca DB2 na celicah HepG2 s testom MTT	34
Slika 12: Določanje citotoksičnega delovanja vzorca F na celicah HepG2 s testom MTT	35
Slika 13: Določanje citotoksičnega delovanja vzorca MA na celicah HepG2 s testom MTT	35
Slika 14: Določanje citotoksičnega delovanja vzorca LK4a na celicah HepG2 s testom MTT	36
Slika 15: Določanje citotoksičnega delovanja vzorca LK4e na celicah HepG2 s testom MTT	36
Slika 16: Določanje citotoksičnega delovanja vzorca LK6 na celicah HepG2 s testom MTT	37
Slika 17: Določanje citotoksičnega delovanja vzorca PM na celicah HepG2 s testom MTT...37	37
Slika 18: Določanje genotoksičnega delovanja vzorca 14 na celicah HepG2 s testom komet.....	39
Slika 19: Določanje genotoksičnega delovanja vzorca CZ na celicah HepG2 s testom komet.....	40
Slika 20: Določanje genotoksičnega delovanja vzorca DB2 na celicah HepG2 s testom komet.....	41
Slika 21: Določanje genotoksičnega delovanja vzorca F na celicah HepG2 s testom komet...42	42
Slika 22: Določanje genotoksičnega delovanja vzorca K na celicah HepG2 s testom komet ..43	43

Slika 23: Določanje genotoksičnega delovanja vzorca KK na celicah HepG2 s testom komet.....	44
Slika 24: Določanje genotoksičnega delovanja vzorca MA na celicah HepG2 s testom komet.....	45
Slika 25: Določanje genotoksičnega delovanja vzorca LK4a na celicah HepG2 s testom komet.....	46
Slika 26: Določanje genotoksičnega delovanja vzorca LK4e na celicah HepG2 s testom komet.....	47
Slika 27: Določanje genotoksičnega delovanja vzorca LK6 na celicah HepG2 s testom komet.....	48
Slika 28: Določanje genotoksičnega delovanja vzorca PM na celicah HepG2 s testom komet.....	49

KAZALO PREGLEDNIC

Tabela 1: Seznam vzorčnih mest	15
Tabela 2: Seznam uporabljenih kemikalij.....	17
Tabela 3: Rezultati testa SOS/ <i>umuC</i>	30

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AFB ₁	aflatoksin B ₁
ALS	alkalno labilna mesta (alkali labile sites)
B[a]P	benzo[a]piren
DDT	diklorodifeniltrikloroetan
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DSB	prelomi obeh verig (double strand breaks)
EDTA	etilendiamin tetraocetna kislina
FBS	serum govejega zarodka (foetal bovine serum)
IR	indukcijsko razmerje
LMP	nizko tališče (low melting point)
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid
NMP	normalno tališče (normal melting point)
NQNO	4-nitrokinolin-N-oksid
OCP	organoklorni pesticidi (organochlorine pesticides)
OD	optična gostota (optical density)
ONPG	o-nitrofenil-β-D-galaktopiranozid
PAH	policiklični aromatski ogljikovodiki (polycyclic aromatic hydrocarbons)
PBS	raztopina slanega fosfatnega pufra (phosphate buffered saline)
PCB	poliklorirani bifenili (polychlorinated biphenyls)
SCGE	gelska elektroforeza posameznih celic (single cell gel electrophoresis)
SD	standardna deviacija
SDS	natrijev dodecil sulfat (sodium dodecyl sulfate)
SSB	prelomi ene verige (single strand breaks)
TGA	trypton, glukoza, ampicilin

1 UVOD

Spremembe kvalitete morja zaradi onesnaženja, ki je posledica človekovih dejavnosti, omejujejo možnosti njegove uporabe. Med onesnažili morja najdemo številne nevarne snovi, med njimi tudi genotoksične, ki spadajo med najnevarnejše snovi za zdravje ljudi in za okolje.

Genotoksične snovi povzročajo poškodbe dednega materiala in izpostavljenost tem snovem, tudi če so koncentracije zelo nizke, lahko vpliva na biološko raznolikost, medtem ko pri ljudeh lahko vpliva na povečano pogostnost rakavih obolenj.

Dober pokazatelj onesnaženosti morja so morski sedimenti, saj se snovi v njih odlagajo in razporejajo skozi daljše časovno obdobje. Med najpomembnejšimi potencialno genotoksičnimi onesnažili, ki se nalagajo v sedimentih, so policiklični aromatski ogljikovodiki (PAH; npr. zelo razširjen benzo[a]piren (B[a]P)), poliklorirani bifenili (PCB), organoklorni pesticidi (npr. DDT) in težke kovine. Mutageni, karcinogeni ozziroma prokarcinogeni (za njihovo pretvorbo v aktivno obliko je potrebna metabolna aktivacija) povzročajo DNA adukte, te poškodbe pa lahko vodijo v proces mutogeneze.

Ocena kemijskega stanja sedimentov temelji na meritvah fizikalno-kemijskih parametrov, ki so bili določeni v okoljskih standardih za kemijske snovi v vodnem okolju in sedimentih. Ocena tveganj zaradi prisotnosti toksičnih onesnažil zgolj na osnovi kemijskih analitskih podatkov je nezanesljiva, saj so njihove koncentracije pogosto pod mejo zaznavanja kemijskih analitskih metod, poleg tega pa ni mogoče predvideti morebitnih sinergističnih, antagonističnih ali potencirajočih interakcij med komponentami kompleksne zmesi sedimenta. Biološke tehnologije imajo v sedanjosti vidnejšo vlogo v analizah onesnaženosti okolja. Večina bioloških testov je bila razvita za vrednotenje vpliva ksenobiotikov na življenje organizmov. Zagotavljajo strnjeno sliko celotnega vpliva na okolje, ki ga povzročajo onesnaženi iztoki, sedimenti ali onesnažena tla. Biološki testi pokažejo učinek kompleksne zmesi kemikalij, ne da bi bilo potrebno predhodno poznati njihovo kemijsko sestavo in fizikalno-kemijske lastnosti.

Slovensko morje je glede onesnaženosti obremenjeno zaradi goste poseljenosti obale, turizma, bližine pristanišč (Koper, Trst, Benetke) in bližine izlivov nekaterih večjih rek (Pad, Soča). Zaradi nevarnih učinkov, ki jih imajo v sedimentih nakopičene genotoksične snovi na človeka in ostale žive organizme, je pomembno, da spremljamo njihovo prisotnost v okolju ter potencialno biološko aktivnost.

1.1 Namen naloge in delovne hipoteze

Z raziskavami v okviru diplomske naloge smo želeli ugotoviti, ali so kompleksni vzorci morskih sedimentov, odvzetih na odvzemnih mestih z različno stopnjo in vrsto onesnaženosti, genotoksični. Genotoksični potencial vzorcev smo določili z izbranimi testi: z bakterijskim testom *SOS/umuC* ter s testoma MTT in komet s celicami človeškega hepatoma HepG2.

Pričakujemo, da bodo vzorci onesnaženih morskih sedimentov, predvsem iz Luke Koper in Marine Portorož, učinkovali genotoksično na bakterije seva *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 in celice HepG2, medtem ko vzorci odvzeti v manj onesnaženih predelih slovenskega morja ne bodo genotoksični, oz. bodo pokazali manjšo aktivnost.

2 PREGLED OBJAV

2.1 Območje raziskave

Tržaški zaliv je najbolj severni del tako Jadranskega kot Sredozemskega morja. Zanj so značilne največje razlike med plimo in oseko (poldnevne amplitude blizu 30 cm) in najnižje zimske temperature (pod 10 °C) v Sredozemskem morju (Boicourt s sod., 1999). Tržaški zaliv je dolg približno 29 km, širok 21 km in ni globlji od 25 m. Zaliv je s plitvino delno izoliran od preostalega severnega Jadranskega morja. Slanost se giblje med 33 in 38.5 ‰, temperatura vode pri dnu pa med 8 °C v februarju in 20 °C v septembru (Ogrinc s sod., 2003).

Slovensko obalno morje zavzema le majhen del Jadranskega morja, to je južni del Tržaškega zaliva. Piranski in Koprski zaliv sta široki potopljeni dolini manjših rek, Dragonje oz. Rižane. Oba zaliva imata visoko stopnjo sedimentacije (Ogorelec s sod., 1991). Detritni material v usedlinah severnega dela Tržaškega zaliva prvotno izvira iz reke Soče, grajen je predvsem iz karbonatov, medtem ko v južnem in vzhodnem delu izvira iz erozije obalnega fliša. Soča ima močan vpliv na hidrologijo zaliva, ostale reke pa prispevajo le 10 % sladke vode (Olivotti s sod., 1986). Glede na geološko zgradbo je substrat zgrajen predvsem iz muljaste gline (približno 60 % gline), v smeri proti odprtemu morju pa se spreminja v fini prod, zgrajen iz približno 80 % biogenega detrita (Ogorelec s sod., 1991). Obala je bila nekoč v celoti grajena iz peščenjaka (fliša), ki je glavni vir detritnega materiala. Hidrodinamika Tržaškega zaliva je v glavnem vezana na dvigajoči se vzhodni tok, ki prihaja z istrske obale. Splošni vzorec kroženja vode je večinoma v nasprotni smeri urinega kazalca v nižjih plasteh, v površinskih pa je spremenljiv. Omenjeno kroženje uravnava prevladujoči veter - burja (Stravisi, 1983).

Na slovensko obalno morje vplivajo pritoki celinskih voda, resuspenzija usedlin in onesnaževanje. V zadnjih desetletjih je obremenjeno zaradi mnogih antropogenih vplivov, kot so intenzivno kmetijstvo, gojenje morskih organizmov za prehrano, prekomerni ribolov in odplake. Hkrati so dejavnosti na obali (urbanizacija, intenzivno kmetijstvo in množični

turizem) uničile ali spremenile naravno obrežje. Danes le še 18 % obale ostaja v naravnem stanju (Orlando-Bonaca s sod., 2008).

Tržaški zaliv je precej zaprt zaliv z zmanjšano hidrodinamiko in je zaradi svojih posebnih geomorfoloških in hidroloških značilnosti nagnjen k akumulaciji onesnažil (Solis-Weiss s sod., 2004).

Vzorci morskih sedimentov v naši raziskavi so bili odvzeti na različnih mestih vzdolž slovenske obale, tako blizu obale kot tudi dlje proti odprtemu morju. Viri onesnaženja so predvsem pomorski in navtični promet ter komunalne odplake. V Luki Koper so vzorčili na treh lokacijah, ob plovni poti pred vhodom v 3. bazen, ob premogovnem terminalu v notranjosti 3. bazena ter v 1. bazenu ob izlivu reke Rižane, ki nosi tudi vode iz koprske komunalne čistilne naprave. Odvzemni mesti, kjer so prav tako predvidoma povečani antropogeni vplivi, sta še Marina Portorož in školjčišče na Debelem rtiču. Preostali vzorci pa so bili odvzeti dlje od obale: na sredi Piranskega, Koprskega in Tržaškega zaliva, ter proti odprtemu morju pri Debelem rtiču in piranski punti.

2.2 Onesnaženost morja in morskih sedimentov

Večina kemijskega onesnaženja je dandanes omejena na obalne vode in izlive rek, čeprav lahko zaznamo povišano onesnaženost, ki jo pripisujemo človeški dejavnosti, tudi v odprtih vodah oceanov (Sanudo-Wilhelmy in Flegal, 1992). Onesnaževanje je najbolj intenzivno v neposredni bližini človeških aktivnosti (Serricano s sod., 1990; Hanson s sod., 1993; Daskalakis in O'Connor, 1995), vendar se razporeditev spreminja zaradi fizikalnih procesov, ki redčijo, koncentrirajo ali prerazporejajo onesnažila. Prav tako so koncentracije najbolj spremenljive v najbolj onesnaženih ekosistemih (Luoma, 1990). Koncentracije onesnažil v sedimentih, odvzetih v Severni Ameriki in Evropi, kažejo, da se je onesnaževanje v prejšnjem stoletju vseskozi spreminja (Valette-Silver, 1993).

Prisotnost kompleksnih mešanic onesnažil se je povečala po drugi svetovni vojni, ko sta bila gospodarska rast in naraščanje prebivalstva zelo izrazita, skrb za ravnanje z odpadki pa minimalna. Najvišje koncentracije polikloriranih bifenilov (PCB), diklorodifeniltrikloroetana (DDT), policikličnih aromatskih ogljikovodikov (PAH), Se, Cd, Hg, Ag, Cu, Zn in Pb so bile med letoma 1960 in 1980. Organizacije v Severni Ameriki in

zahodni Evropi so koncem šestdesetih let močno investirale v razvoj metod za ravnjanje z odpadki, pojavil se je tudi nadzor nad uporabo nekaterih kemikalij. Današnji sedimenti tako razkrivajo človeško aktivnost v preteklosti, vendar pa so se koncentracije vsaj nekaterih posameznih onesnažil zmanjšale tako v organizmih kot sedimentih. Kljub temu, da se koncentracije nekaterih kemikalij, ki izvirajo iz industrijskih odplak, zmanjšujejo, pa je v morske ekosisteme sproščenih vedno več novih kemikalij in kombinacij kemikalij, kar poteka hitreje kot razvoj novih analitskih metod (Luoma, 1996).

Sproščanje neprečiščenih odplak in kanalizacije v morje povzroča kopičenje onesnažil v obalnih morskih sedimentih. Dotok onesnažil v morje, kot na primer PAH-i, težke kovine in ostale snovi, ki škodujejo ekosistemu, uničuje morske združbe in posamične morske organizme. Učinki se kažejo skozi celotni morski ekosistem (Schiff in Bay, 2003; Shtereva s sod., 2004; Zoller s sod., 2004). Znano je, da se okoljska onesnažila kopičijo v morskih nevretenčarjih in ribah ter tako ogrožajo zdravje ljudi neposredno ali posredno skozi prehranjevalno verigo (Porte in Albaiges, 1994; Dixon s sod., 2002; Jacobs s sod., 2002). Kopičenje teh snovi je vedno pogosteje predmet raziskav, za mnoge so odkrili, da so nevarne in karcinogene. Poleg tega se hidrofobna onesnažila zlahka vežejo na sedimente in tako povzročajo onesnaževanje skozi daljše časovno obdobje, po tem, ko se adsorbirajo na suspendirane delce ali iztrebke različnih organizmov (Borgmann s sod., 2004). Predvsem PAH-i so zelo razširjeni in prisotni v oceanih po vsem svetu, onesnaževanje s PAH-i pa narašča vsako leto kot posledica človekovega delovanja (izgorevanje fosilnih goriv, razlitja nafte).

Nekatere raziskave kažejo, da so PAH-i glavna komponenta z mutageno aktivnostjo, prisotna v sedimentih (LaRocca s sod., 1996), znana je pozitivna zveza med mutagenostjo in onesnaženjem s PAH-i (Chen in White, 2004).

2.2.1 Policiklični aromatski ogljikovodiki (PAH) v sedimentih

PAH-i so velika skupina organskih spojin z dvema ali več povezanimi aromatskimi obroči. V ožjem pomenu besede se PAH nanaša na spojine, ki vsebujejo le ogljikove in vodikove atome (npr. nesubstituirani izvorni PAH-i in njihovi alkilirani derivati), medtem ko v

širšem pomenu besede zajema tudi funkcionalne derivate (npr. nitro-PAH-i) in heterociklične analoge (npr. aza-areni). PAH-i so zelo slabo topni v vodi, so visoko lipofilni in topni v mnogih organskih topilih (Menichini in Bocca, 2003).

PAH-i so zelo razširjene, povsod prisotne spojine, ki večinoma nastajajo pri nepopolnem izgorevanju fosilnih goriv, organskih materialov, lesa in kurilnega olja. V morsko priobalno območje vstopajo z razlitji nafte, z industrijskimi odplakami, padavinami in odtoki iz mest (Neff, 1979; Gevao s sod., 1998; Sharma s sod., 1997). Naravni viri PAH-ov vključujejo gozdne požare, vulkanske izbruhe, naravne izvire nafte in postdepozicijske transformacije biogenih prekurzorjev (Young in Cerniglia, 1995). Za okolje so nevarni, ker imajo visok potencial za tvorbo visoko karcinogenih in mutagenih derivatov, kot so dioli in epoksidi (Baird, 1995; Stegeman in Lech, 1991). Ljudje smo preko vdihavanja in zaužitja izpostavljeni kompleksnim mešanicam s številnimi PAH-i in ostalimi potencialno karcinogenimi spojinami, zato ne moremo govoriti izključno o karcinogenosti posameznih PAH-ov (Menichini in Bocca, 2003). Zaradi njihove nizke vodotopnosti in hidrofobnosti se PAH-i v morskem okolju hitro vežejo z organskimi in anorganskimi delci v suspenziji (Chiou s sod., 1998) in se posledično nalagajo v sedimentih. Na delce vezana onesnažila se tako kopičijo v sedimentih, ki na ta način postanejo nekakšen rezervoar toksičnih in genotoksičnih snovi, ki nenehno ogrožajo zdravje in viabilnost morskih združb (Bihari s sod., 2006).

Sedimentarni PAH-i so nagnjeni h kopičenju do visokih koncentracij. Raven PAH-ov se v sedimentih spreminja, odvisno od bližine območij človekove aktivnosti. Prav tako se spreminjajo koncentracije in razporeditev PAH-ov v sedimentih zaradi biodegradacije teh spojin, ta proces pa je vezan na abiotiske in biotske dejavnike, ki so odvisni od značilnosti posameznega območja. Analize sedimentarnih PAH-ov nam lahko služijo kot učinkovit pokazatelj stopnje onesnaženosti in vira vnosa PAH-ov v vodna okolja (Sicre s sod., 1987; Budzinski s sod., 1997; Gui-Peng, 2000). Analize vsebnosti, razporeditve in vira PAH-ov v sedimentih Jadranskega morja so redke in večinoma osredotočene na Tržaški zaliv (Guzzella in DePaolis, 1994; Notar s sod., 2001).

Znano je, da so nekateri PAH-i toksični in da povečajo toksični potencial sedimentov (Shor s sod., 2004). Vendar povezava med koncentracijo PAH-ov in toksičnostjo sedimentov ni vedno dosledna. Toksični učinki, na primer, močno sovpadajo s koncentracijo PAH-ov v naftnih vrtinah v Severnem morju (Grant in Briggs, 2002), medtem ko v zalivu Kavala v Egejskem morju niso zaznali značilne povezave med toksičnostjo in koncentracijami posameznih ali celokupnih PAH-ov (Papadopoulou in Samara, 2002). Nekateri PAH-i in njihovi metaboliti lahko izzovejo mutacije (Hener s sod., 1997; Singh s sod., 1998) in imajo karcinogene lastnosti (IARC, 1987). Prav tako so poznani kot skupina močno progenotoksičnih morskih onesnažil. Izražanje njihove genotoksičnosti je posledica njihove biotransformacije v reaktivne metabolite. Genotoksičnost PAH-ov lahko ovrednotimo z meritvami povečanja potencialne genotoksičnosti in mutagenosti sedimentov (Chen in White, 2004) ter z meritvami poškodb DNA organizmov, ki živijo v okoljih, onesnaženih s PAH-i (Pandrangi s sod., 1995). Toda kljub vsemu ni povezave med izmerjeno mutagenostjo in kemičnimi oziroma fizikalnimi parametri vzdolž obale Baltskega morja v Nemčiji (Zietz s sod., 2001). Le sedimenti, ki so vsebovali visoke koncentracije PAH-ov (>10 mg/kg), so bili mutageni (Vondraček s sod., 2001) z glavno mutageno aktivnostjo, povezano z benzo[a]pirenom (Marvin s sod., 2000).

Mešanica PAH-ov, prisotnih v določenem vzorcu, v mnogih primerih odraža izvore PAH-ov. Poznamo tri glavne tipe PAH-ov, ki se razlikujejo glede na nastanek: petrogeni, biogeni in pirogeni. PAH-i petrogenega izvora so povezani z nafto, vključno s surovim oljem in njegovimi rafiniranimi produkti. V študiji priobalnih morskih sedimentov na območju Rovinja (Hrvaška) je bil naftalen – njegova prisotnost v sedimentih je značilna za svežo nafto (Robertson, 1998) – pod mejo zaznavanja na vseh mestih vzorčenja, kar kaže na odsotnost PAH-ov petrogenega izvora (Bihari s sod., 2006). PAH-i biogenega nastanka izvirajo iz bioloških procesov ali iz zgodnjih faz diageneze v morskih sedimentih; npr. perilen (Venkatesan, 1988). PAH-i s 4-6 ogljikovodikovimi obroči so v splošnem pirogenega nastanka in so posledica izgorevanja fosilnih goriv in novega organskega materiala (Bihari s sod., 2006).

Tehnike za merjenje genotoksičnosti niso specifične za učinke PAH-ov, so merilo poškodb DNA kot posledica biotransformacije mnogih organskih onesnažil v okolju, ne le PAH-ov.

Bihari s sod. (2006) so pokazali pozitivno zvezo, ki dokazuje, da so PAH-i lahko prevladujoče, vendar nikakor ne edine genotoksične spojine v preučevanih sedimentih. Najvišjih relativnih poškodb DNA niso zaznali v školjkah nabranih na mestih vzorčenja z najvišjo vsebnostjo PAH-ov.

2.2.2 Ostale potencialno genotoksične snovi v sedimentih

Poleg PAH-ov, ki so najbolj razširjeni, so v kompleksnih vzorcih morskih sedimentov predvidoma prisotne tudi številne druge potencialno genotoksične in mutagene snovi.

Poliklorirani bifenili (PCB) so, tako kot PAH-i, prednostna organska onesnažila. Najdemo jih v različnih okoljih po vsem svetu in škodujejo zdravju ljudi (Lang, 1992). PCB-ji se široko uporabljajo v električnih napravah, kot so transformatorji in kondenzatorji, v mehčalcih v barvah in v gumijastih tesnilih. Med PCB-je sodi 209 spojin z različno biološko aktivnostjo in toksičnostjo, odvisno od števila in položajev klorovih atomov v molekuli. Velike količine PCB-jev pridejo v okolje z uhajanjem, odlaganjem in evaporacijo. PCB-ji so v vodnih okoljih zaradi hidrofobnega značaja, nizke topnosti v vodi in dolgotrajnega učinka nagnjeni h kopičenju v sedimentih in organizmih (Smedes in de Boer, 1997).

Organoklorni pesticidi (OCP) so prav tako zelo dolgo prisotni v okolju preden razpadejo. So lipofilni in hidrofobni (Hornby in Augustijn-Beckers, 1991). Posledično so OCP-ji vezani kot organske komponente v prsti, sedimentih ali živih tkivih, manj verjetno pa raztopljeni v vodi. OCP-ji so med najbolj razširjenimi pesticidi na svetu. Čeprav so v 70. in 80. letih prejšnjega stoletja uporabo večine izmed njih prepovedali, še vedno ostajajo v okolju v različnih medijih, kot so površinske vode, prst ter rečni in morski sedimenti (povzeto po Vagi s sod., 2007).

Težke kovine v morskih sedimentih so naravnega in antropogenega izvora. Na razporeditev in kopičenje vplivajo zgradba sedimentov, vsebnost mineralov, redukcjsko-oksidacijske razmere, procesi adsorpcije in desorpcije ter fizični transport. Poleg tega se lahko kovine absorbirajo iz vodnega stolpca na površino drobnih delcev, ki nato potujejo

do sedimentov. Kovine sodelujejo v mnogih biogeokemičnih mehanizmih, so zelo mobilne, preko procesov bioakumulacije in biomagnifikacije lahko vplivajo na ekosisteme in so potencialno toksične za okolje in človeka (Manahan, 2000).

2.3 Testi genotoksičnosti

2.3.1 Bakterijski testni sistem: test SOS/*umuC*

2.3.1.1 Sistem SOS ali popravljanje z napakami

Celice imajo številne mehanizme, ki jim omogočajo preživetje v stresnih pogojih (Alberts s sod., 2002). Pri poškodbah bakterijskih ali evkariontskih celic zaradi mutagenih kemikalij, ultravijoličnega sevanja ali sevanja X-žarkov se aktivira SOS odziv, ki dvigne raven DNA popravljalnih encimov. V *Escherichii coli* so pokazali, da odziv pričneta dva proteina, ki ju kodirata gena *lexA* in *recA*. LexA protein je represor, ki z vezavo na *recA* operon prepreči transkripcijo skupine SOS proteinov. Domnevajo, da nekateri produkti poškodovane DNA (presežek enovijačne DNA, trinukleotidi, oligonukleotidi) aktivirajo RecA proteazno aktivnost. Aktivirani RecA protein nato cepi lexA represor in tako omogoči transkripcijo več kot 15 SOS genov. Gre za samorazrez dimernega lexA represorja, ki sicer zavira transkripcijo SOS odgovornih genov. SOS odgovor je začasen, vendar precej kompleksen. Vključuje povišano rekombinantno aktivnost, spremembe v začetku replikacije, inhibicijo nukleaz in indukcijo »k napakam nagnjene sinteze DNA«. Celica tako lahko podvaja DNA kljub napakam, ki bi sicer podvajanje ustavile, toda s povečano verjetnostjo za napake. Celica na primer preide timinski dimer (ali drugo napako) in nadaljuje sintezo DNA kljub nepravilnim bazam, ki so se vgradile v verigo nasproti timinskemu dimeru. Kasneje se lahko napaka popravi z rekombinantnim popravljanjem ali fotoreaktivacijo. V *Escherichii coli* je takšno popravljanje poškodb odvisno od DNA polimeraze III, RecA proteina in dveh proteinov, ki ju kodirata gena *umuC* in *umuD*. Ta gena sta bila spoznana za nosilca rezistence na toksičnost, povzročeno z UV sevanjem (Metzler, 2001). Ko je poprava DNA zaključena, pride do represije ekspresije SOS genov, celični ciklus se nadaljuje (Snyder in Champness, 2002).

Študije mutiranih bakterij s pomanjkljivostmi v različnih delih SOS odziva so pokazale, da imajo na novo sintetizirani proteini dva učinka. Prvič, kot je bilo pričakovano, indukcija teh dodatnih DNA popravljalnih encimov poveča preživetje celic po poškodbi DNA. Drugič, nekateri od induciranih proteinov povečajo raven mutacij z zvišanjem števila napak pri podvojevanju DNA. Napake so povzročene s produkcijo DNA polimeraze z nizko natančnostjo podvajanja, ki lahko uporablja poškodovano DNA kot šablon za nadaljnjo sintezo DNA molekul (Alberts s sod., 2002).

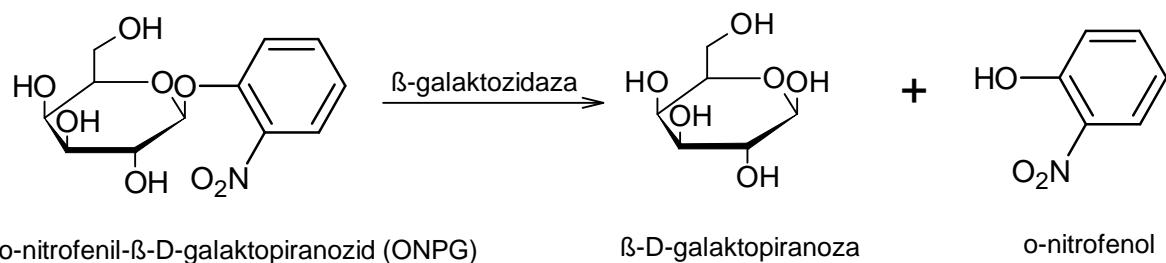
Takšno popravljanje DNA z napakami je lahko škodljivo za posamezne celice, na daljši čas pa privede do številnih genetskih variabilnosti, ki mutiranim celicam zvišajo možnost preživetja v spremenjenem okolju (Alberts s sod., 2002).

2.3.1.2 Test SOS/*umuC*

SOS/*umuC* test je široko uporabljen test za rutinsko presejanje kemikalij in kompleksnih vzorcev. Različica testa, ki ga izvajamo na mikrotitrskih ploščah, je bila razvita kot hitra in občutljiva metoda za določanje genotoksičnosti kemikalij (Reifferscheid in Heil, 1996). Navedeni test je bil standardiziran in validiran s strani nemškega DIN in na mednarodni ravni s standardom ISO (ISO/DIS 13829) (Wittekindt s sod., 2000).

Za izvedbo testa se uporablja genetsko spremenjen sev *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002, ki ima na plazmidu gen *umuC* vezan z genom *lacZ*, ter vsebuje tudi gen za rezistenco na ampicilin (Shinagawa s sod., 1983). Gen *lacZ* kodira sintezo encima β -galaktozidaze, gen za rezistenco na ampicilin pa služi kot seleksijski marker. Genski konstrukt *umuC-lacZ* je bil izbran, ker se domneva, da je *umuC* vključen v mutagenezi bolj direktno kot kateri drugi SOS gen (Kato in Shinoura, 1977). Genotoksičen učinek vzorcev povzroči aktivacijo celičnega SOS odziva. Najprej pride do aktivacije *recA* gena in s tem do tvorbe proteina RecA, ki cepi represor lexA. To omogoči transkripcijo več SOS genov, med njimi tudi *umuC* gena, ki je sklopljen z *lacZ* genom. Tako se aktivacija SOS odziva odraža tudi v aktivaciji β -galaktozidazne aktivnosti (Snyder in Champness, 2002). Encim β -galaktozidaza cepi substrat o-nitrofenil- β -D-galaktosid (ONPG) v rumenoobarvan produkt (Slika 1), katerega količino določimo z merjenjem absorbance pri 420 nm. β -galaktozidazna aktivnost je merilo za genotoksično aktivnost vzorcev. V SOS/*umuC* testu

genski konstrukt *umuC-lacZ* dovoljuje zaznavanje naslednjih genotoksičnih učinkov: primarno poškodbo DNA, ki vodi do naraščanja količine prelomov enojnih verig DNA in oligonukleotidov v jedru: O- in N-alkiliranje, adukti, depurinizacija, depirimidacija, deaminacijske oksidativne poškodbe DNA in DNA dimerov (Hamer s sod., 2001; Wittekindt s sod., 2000).



Slika 1: Pretvorba ONPG v rumen produkt o-nitrofenol

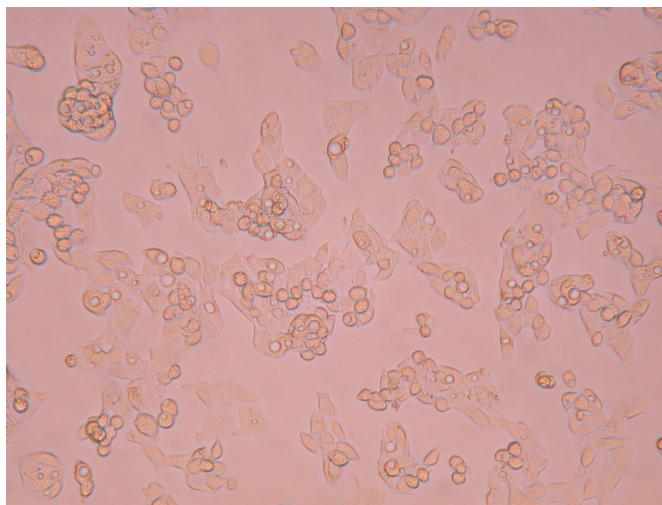
2.3.2 Sesalski testni sistem: model na celični liniji humanega hepatoma HepG2

2.3.2.1 Celična linija HepG2

Potencialno citotoksično in genotoksično delovanje izvlečkov morskih sedimentov smo v diplomski nalogi raziskali na modelu celične linije človeškega hepatoblastoma (celice HepG2). Celice HepG2 so leta 1979 izolirali iz hepatoblastoma 11-letnega dečka (Aden s sod., 1979). Ta celična linija se uveljavlja predvsem v študijah genotoksičnosti. Celice HepG2 so ohranile metabolno aktivnost in imajo aktivne metabolne encime prve (citokrom P-450, CYP1A1, CYP1A2, CYP2B in CYP2E1) in druge faze (glutation-S-transferaza, sulfotransferaza, N-acetiltransferaza in glukuroniltransferaza) presnove ksenobiotikov, ki igrajo ključno vlogo pri aktivaciji in detoksifikaciji mutagenov, ki delujejo na DNA. Aktivnosti teh encimov so nekoliko slabše izražene kot aktivnosti v sveže izoliranih primarnih človeških hepatocitih (Knasmüller s sod., 1998). Celice HepG2 imajo aneuploiden kariotip (od 48 do 54 kromosomov), najpogosteje imajo 52 kromosomov. Delitveni čas celic je 20 do 28 ur (Natarajan in Darroudi, 1991).

V uporabi je več različnih klonov te celične linije, ki se med seboj razlikujejo tako morfološko kot tudi glede aktivnosti presnovnih encimov. V naši raziskavi smo uporabili

klon celic HepG2, ki smo ga prejeli od prof. dr. Darroudija (Oddelek za radiacijsko genetiko in kemijsko mutagenezo, Univerza v Leidnu, Nizozemska) in ga na Oddelku za genetsko toksikologijo in biologijo raka uporabljajo že več let (Slika 2).



Slika 2: Celična linija HepG2 (slikano pod svetlobnim mikroskopom pri 100x povečavi)

2.3.2.2 Test komet

Test komet ali gelska elektroforeza posameznih celic (SCGE; iz ang. single cell gel electrophoresis) je hitra in občutljiva metoda za določanje poškodb DNA, katero sta leta 1984 razvila Östling in Johanson. S to metodo lahko v nevtralnih pogojih zaznamo prelome obeh verig DNA (DSB; iz ang. double strand breaks). Prvotni test so tudi modificirali tako, da so izpostavili celice na elektroforezi alkalnim pogojem, pri katerih je možno zaznati tudi enoverižne prelome DNA (SSB; iz ang. single strand breaks) in alkalno labilna mesta (ALS; iz ang. alkali labile sites) (Singh s sod., 1988).

Z alkalno različico testa komet lahko poleg omenjenih poškodb zaznamo tudi takšne, ki so le prehodno prisotne (na primer nastanejo pri nukleotidnem ali baznem izrezovanju) in so posledica celičnih popravljalnih mehanizmov. Prelomi, ki jih zaznamo s testom komet, nakazujejo na poškodbe DNA ali na uspešno popravljanje poškodb nastalih na DNA (Collins s sod., 1997).

Večina genotoksičnih agensov povzroči več enoverižnih prelomov DNA ter alkalno labilnih mest kot pa dvoverižnih. Ker se pri pH>12.6 alkalno labilna mesta izrazijo kot

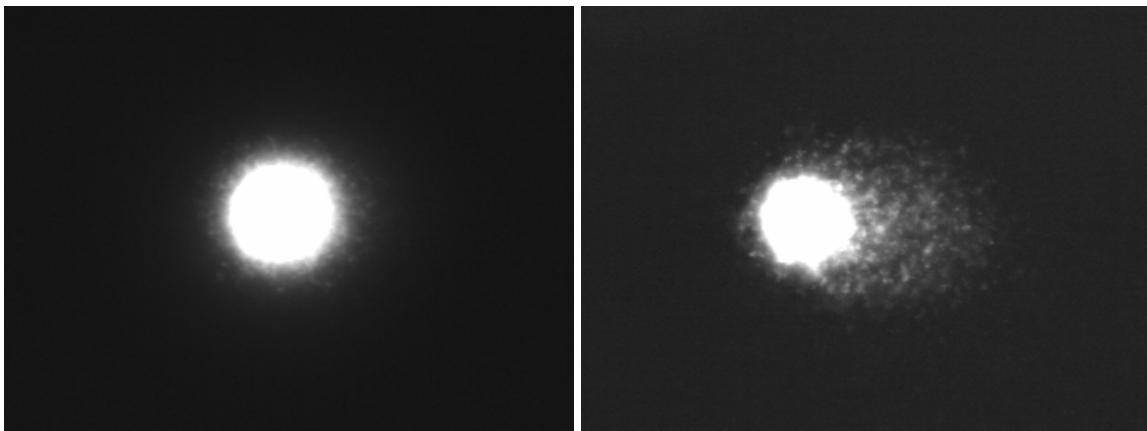
enoverižni prelomi, je alkalna različica testa najprimernejša za določanje genotoksičnega delovanja, saj na ta način zaznamo največ poškodb (Tice s sod., 2000).

Pri testu komet suspenzijo posameznih celic pomešamo z agarozo in jo nanesemo na objektno stekelce, ki ga položimo v hladno raztopino za liziranje. Ta vsebuje visoko koncentracijo soli in detergentov (pH 10), ki odstranijo celično vsebino, tako da ostane samo jedro z dodatno zvito DNA. Stekelca z geli nato prenesemo v alkalno raztopino (pH>13), kjer se DNA denaturira, odvije in izrazijo se enoverižni prelomi. Sledi elektroforeza v alkalnem okolju. Negativno nabita DNA v električnem polju potuje proti anodi. Po koncu elektroforeze stekelca postavimo v raztopino za nevtralizacijo. Pomembno je, da so vse faze od liziranja celic naprej izvedene v temi in pri 4 °C, da se izognemo dodatnim poškodbam DNA (Žegura in Filipič, 2004). Sledi barvanje s fluorescenčnim barvilom (na primer etidijev bromid), ki omogoči vizualizacijo DNA s fluorescenčnim mikroskopom. Bolj kot je DNA poškodovana, manjši so njeni fragmenti in hitrejše bo njihovo potovanje po gelu proti anodi. Slike poškodovanih jeder so podobne kometom, saj manjši fragmenti v električnem polju pripotujejo dlje kot nepoškodovana DNA (Slika 3). Za ovrednotenje poškodb uporabimo računalniško analizo slik posameznih jeder oziroma kometov.

Pomanjkljivost metode je, da ne moremo natanko določiti narave poškodbe, ki jo zaznamo s tem testom (Horvathova s sod., 1998).

Pri kometih lahko izmerimo različne parametre, ki odražajo obseg poškodovanosti DNA:

- % DNA v repu (odstotek DNA, ki je prepotovala iz jedra v rep kometa)
- dolžina repa kometa (prepotovana razdalja delcev DNA od glave do repa)
- različni momenti kometa (na primer razširjen moment, ki je produkt % DNA v repu in njegove dolžine).



Slika 3: Jedri celic HepG2 po testu komet (400x povečava)

(foto: Žegura)

Na lev sliki je nepoškodovano jedro kontrolne celice, na desni pa je poškodovano jedro celice, ki je bila izpostavljena $30 \mu\text{M}$ B[a]P in ima obliko kometa.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Vzorci morskih sedimentov

V diplomski nalogi smo raziskovali citotoksično in genotoksično delovanje kompleksnih vzorcev morskih sedimentov s postaj obalnega morja Slovenije. Vzorce nam je posredoval doc. dr. Oliver Bajt z Morske biološke postaje Piran, NIB. Na vseh odvzemnih mestih so vzeti površinski vzorci sedimenta (do globine 2 cm), razen LK4e, ki je globinski (globina okrog 40 cm).

Vzorci so bili celokupni, posamezne frakcije niso bile ločene. Vzorce LK4a, LK4e, LK6, KK, F, MA, CZ, K, 14 in DB2 smo raztopili v DMSO tako, da smo dobili koncentracijo 2.5 g sedimenta/ml, vzorec PM pa smo raztopili do koncentracije 2 g sedimenta/ml. Tako pripravljene vzorce smo hranili pri -20 °C.

3.2 Vzorčna mesta

Tabela 1: Seznam vzorčnih mest

oznaka	vzorčno mesto
14	1. bazen v Luki Koper, ob izlivu reke Rižane
CZ	sredina Tržaškega zaliva
DB2	Debeli rtič, ob školjčiju
F	2 km od piranske punte proti odprtemu morju
K	sredina Koprskega zaliva
KK	pri Debelem rtiču, proti odprtemu morju
LK4a	pred vhodom v 3. bazen Luke Koper, ob plovni poti (površina sedimenta)
LK4e	pred vhodom v 3. bazen Luke Koper, ob plovni poti (globina sedimenta 40 cm)
LK6	notranjost 3. bazena Luke Koper, ob premogovnem terminalu
MA	sredina Piranskega zaliva
PM	Marina Portorož



Slika 4: Zemljevid lokacij vzorčenja

3.3 Kemikalije

Tabela 2: Seznam uporabljenih kemikalij

kemikalija	proizvajalec	kataloška številka
aflatoksin B ₁ (AFB ₁)	Sigma	A 6636
Bacto Tryptone	Becton Dickinson	211705
benzo[a]piren (B[a]P)	Sigma	B-1760
β-merkaptoetanol	Fluka	63689
D-(+)-Glucose anhydrous	Fluka	49150
DMSO	Sigma-Aldrich	154938-100ML
EDTA	Sigma	E5134-500G
etanol	Sigma-Aldrich	32221
etidijev bromid	Gibco BRL	15585-011
FBS	EuroClone	EC S0180L
glukoza-6-fosfat	Sigma	G-7879
HCl	Merck	1.09063.1000
KCl	Fluka	60130
L-glutamin	EuroClone	EC B3000D
LMP agarozna	Invitrogen	15517-022
MgCl ₂ ·6H ₂ O	Fluka	63072
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Fluka	63140
MTT	Sigma	M-5655
NaCl	Merck	1.06404.100
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	Merck	1.06346.0500
Na ₂ HPO ₄	Fluka	71640
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	Merck	1.06580.1000
Na ₂ CO ₃	Sigma	S-2127
NADP-Na ₂	Merck	1.24541.0001
NaOH	Merck	1.06482.1000
NMP agarozna	Invitrogen	16500-100
NQNO	Sigma	N-9131
ONPG	Fluka	73660
PBS (10x)	PAA Laboratories	H15-011
penicilin/streptomycin	EuroClone	EC B3001D
S9	Moltox	11-01L.2
SDS	Sigma-Aldrich	L4509-100G
tripansko modrilo	Sigma	T-8154
tripsin	Sigma	T-4174
TRIS	Merck	1.08382.1000
triton X-100	Fluka	93420
Williamsov medij	Sigma	W1878

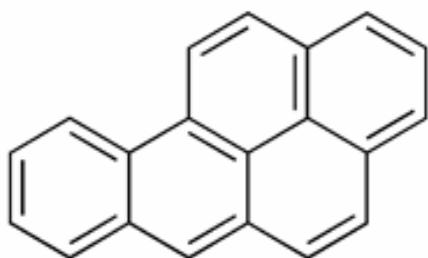
3.4 Pozitivne kontrole, ki smo jih uporabili v nalogi

Pri bioloških testih v naši nalogi smo kot pozitivne kontrole uporabili naslednje genotoksične spojine:

3.4.1 Benzo[a]piren (B[a]P)

Izmed vseh PAH-ov je B[a]P (Slika 5) najbolj preučevana spojina in največ podatkov o prisotnosti in toksičnosti PAH-ov je vezanih nanjo. Pri primerjavi različnih okolij se B[a]P pogosto uporablja kot indikator za razrede PAH-ov, tako za stopnjo onesnaženja kot za karcinogenost (Menichini in Bocca, 2003).

Benzo[a]piren se s citokromom P-450 aktivira v zelo nevarno in reaktivno obliko, ki reagira z DNA. Odkrili so ga tudi v cigaretinem dimu in izpušnih plinih avtomobilov. B[a]P je nepolarna planarna spojina. Komponente citokroma P-450 ga lahko metabolizirajo v fenole in dihidrodiole, ki se lahko v obliki estrskih konjugatov varno izločijo. Pri metabolizmu se tvorijo tudi elektrofilni epoksiidi. Eden od teh se lahko veže specifično z mestom C-10 na 2-amino položaj določenega gvanina v DNA ter se zaradi planarne strukture postavi v manjši žleb molekule DNA. To privede do poškodb DNA (Burdon, 1999; Klaasen, 2001).



Slika 5: Benzo[a]piren

3.4.2 Aflatoksin B₁

Aflatoksini so zelo škodljive komponente hrane, odkrite v 60. letih prejnjega stoletja. So glivični toksini (mikotoksini) pridobljeni iz vrst *Aspergillus flavis* in *Aspergillus parasiticus*. Ta plesen navadno napade številna živila, predvsem pa orehe in žita.

Aflatoksini so pogost vzrok za nastanek jetrnega raka pri ljudeh. Izjemno močan aflatoksin je aflatoksin B₁, ki se v jetrih s citokromom P-450 oksidira v aflatoksin B₁-8-9-epoksid. Le-ta napade gvanidinske ostanke določenega zaporedja DNA jetrnih celic ter tako tvori obsežne adukte (Burdon, 1999).

3.4.3 4-nitrokinolin-N-oksid (NQNO)

Primer neposrednega mutagena, ki za delovanje ne potrebuje metabolne aktivacije, je 4-nitrokinolin-N-oksid (NQNO), ki se veže na DNA, in sicer na adenin in gvanin. Reduciran metabolit NQNO pa lahko v celici sproži nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti, ki povzročijo oksidativne poškodbe DNA (povzeto po Nunoshiba in Demple, 1993).

3.5 Bakterijski testni sistem: test SOS/*umuC*

3.5.1 Sev bakterije *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002

Pri SOS/*umuC* testu uporabljamo genetsko spremenjeno bakterijo *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002, ki je gram negativna fakultativno anaerobna bakterija iz družine Enterobacteriaceae. Testni sev je konstruiran iz starševskega seva *Salmonella typhimurium* TA1535 (his-, rfa-, uvrB-), ki nosi plazmid pSK1002 z *umuC-lacZ* genom in gen za rezistenco na ampicilin. Bakterijske celice nimajo mikrosomalnih encimov, zato ne omogočajo metabolne aktivacije. Za testiranje vzorcev z metabolno aktivacijo smo bakterijam dodali frakcijo podganje jetrne S9 mešanice (Wittekindt s sod., 2000).

3.5.1.1 Gojenje kultur bakterij *Salmonella typhimurium*

Bakterijsko kulturo, ki smo jo čez noč stresali na 37 °C, smo redčili 1:10 s svežim 1x TGA medijem (1 ml bakterijske kulture in 9 ml 1x TGA medija) in jo nato približno 1.5 ure stresali s hitrostjo 600 obratov/minuto v inkubatorju na 37 °C.

Po 1.5 ure smo izmerili gostoto bakterij pri 600 nm (OD 600) in bakterijsko kulturo razredčili s svežim 1x TGA medijem, da smo dobili OD 600 približno 0.2. Testni organizmi so bili v eksponencialni fazni rasti in so bili pripravljeni za testiranje. Kot slepo

kontrolo smo uporabili 1x TGA medij, pri testu z metabolno aktivacijo pa tudi S9 mešanico brez bakterijske kulture.

3.5.1.2 Priprava reagentov in raztopin za test SOS/*umuC*

1x TGA medij

- 10 g tryptona
- 5 g NaCl
- 980 ml bidestilirane vode

pH raztopine smo umerili na 7.0 ± 0.2 . Raztopino smo avtoklavirali (121°C , 20 min), po avtoklaviranju smo dodali 0.2 % glukozo (2 g/l) in 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicilina. Tako pripravljen 1x TGA smo shranjevali pri -20°C .

B-pufer

- 10.09 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
- 2.75 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
- 0.352 g KCl
- 0.125 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

Sestavine smo zmešali in raztopili v 500 ml bidestilirane vode ter umerili pH na 7.0 ± 0.2 . Nato smo dodali 0.5 g natrijevega dodecil sulfata (SDS) v 500 ml pripravljenega B-pufra ter pred uporabo 0.27 ml β -merkaptoetanola na 100 ml B-pufra. B-pufer smo do uporabe shranili pri 4°C .

Fosfatni pufer (0.1 M PBS)

- 1.086 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
- 0.538 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
- 100 ml bidestilirane vode

Sestavine smo zmešali in raztopili v bidestilirani vodi ter umerili pH na 7.0 ± 0.2 . Nato smo raztopino avtoklavirali (121°C , 20 min). Fosfatni pufer smo do uporabe shranili pri 4°C .

Stop reagent

- 26.5 g Na₂CO₃
- 250 ml bdestilirane vode

Raztopino smo do uporabe shranjevali pri 4 °C.

Raztopina ONPG

- 180 mg ONPG
- 40 ml fosfatnega pufra

ONPG raztopimo v fosfatnem pufru. Ker je proces raztpljanja ONPG v fosfatnem pufru dolgotrajen zaradi slabe topnosti, smo si raztopino pripravili vnaprej in jo shranjevali v temi pri 4 °C.

Mešanica MgCl₂-KCl

- 61.5 g KCl
- 40.7 g MgCl₂ x 6H₂O
- dest. H₂O do 500 ml

0.2 M NaHPO₄ (0.2 M PBS)

- 440 ml 0.2 M Na₂HPO₄
- 100 ml 0.2 M NaH₂PO₄ x H₂O

pH uravnamo na 7.4, raztopino shranjujemo pri 4 °C.

10 % S9 mešanica

- 100 µl mešanice MgCl₂-KCl
- 125 µl 0.2 M G-6-P
- 500 µl 0.2 M NADP
- 2.5 ml 0.2 M PBS (pH 7.4)
- 500 µl S9
- 1.5 ml TGA s kulturo

Vse razen bakterijske suspenzije in S9 smo zmešali, sfiltrirali (0.22 µm) in dali na led. Bakterije in S9 smo dodali tik pred uporabo in imeli S9 mešanico ves čas na ledu.

3.5.1.3 Izvedba testa SOS/*umuC*

Na mikrotitrsko ploščo smo nanesli slepo kontrolo, negativno kontrolo, kontrolo topila, pozitivno kontrolo in vzorce.

Slepa kontrola

- 10 µl sterilne vode
- 90 µl 1x TGA

Slepa kontrola (samo pri testu z metabolno aktivacijo)

- 10 µl sterilne vode
- 90 µl S9 mešanice brez bakterij

Negativna kontrola

- 10 µl sterilne vode
- 90 µl bakterijske suspenzije (pri testu z metabolno aktivacijo S9 mešanica z bakterijami)

Kontrola topila

- 10 µl 5 % DMSO
- 90 µl bakterijske suspenzije (pri testu z metabolno aktivacijo S9 mešanica z bakterijami)

Pozitivna kontrola (test brez metabolne aktivacije)

- 10 µl NQNO (0.5 µg/ml)
- 90 µl bakterijske suspenzije

Pozitivni kontroli (test z metabolno aktivacijo)

- 10 µl B[a]P (10 µg/ml) oz. AFB₁ (0.5 µg/ml)
- 90 µl S9 mešanica z bakterijami

Vzorce smo testirali v treh koncentracijah, in sicer 0.5, 2.5 in 12.5 g sedimenta/ml (vzorci 14, KK, CZ, K, DB2, F, MA, LK4e, LK6 in LK4a) oziroma 0.5, 2.5 in 10 g sedimenta/ml (vzorec PM). V luknjice smo nanesli 10 µl pripravljene redčine vzorca in 90 µl bakterijske suspenzije (pri testu z metabolno aktivacijo S9 mešanica z bakterijami).

Ploščo smo inkubirali na stresalniku dve uri pri 37 °C. Po inkubaciji smo v novo mikrotitrsko ploščo (A) odpipetirali po 270 µl 1x TGA na luknjico in dodali po 30 µl suspenzije iz prve plošče. Ploščo A smo inkubirali še dve uri na stresalniku pri 37 °C. V tretjo mikrotitrsko ploščo (B) smo odpipetirali po 120 µl pufra B na luknjico in dodali 30 µl suspenzije iz plošče A ter 30 µl ONPG, ki je substrat β-galaktozidaze. Reakcija je potekala 20 min pri sobni temperaturi ob rahlem mešanju na stresalniku. Po 20-minutni inkubaciji smo dodali po 120 µl 1 M Na₂CO₃ v luknjice plošče B, kar je zaustavilo encimsko reakcijo. Na koncu smo izmerili absorbanco plošče A pri 600 nm in plošče B pri 420 nm.

Izmerjenim vrednostim smo odšteli vrednosti za slepo kontrolo in nato po spodaj navedenih enačbah izračunali indukcijsko razmerje za posamezne vzorce.

Biomasni faktor (določitev citotoksičnosti):

$$Bf\ G = \frac{OD_{600}(\text{vzorec})}{OD_{600}(\text{kontrola})}$$

Aktivnost β-galaktozidaze v relativnih enotah:

$$U = \frac{OD_{420}(\text{vzorec})}{OD_{600}(\text{vzorec})}$$

Indukcijsko razmerje (določitev genotoksičnosti):

$$IR = \frac{1}{G} \times \frac{OD_{420}(\text{vzorec})}{OD_{420}(\text{kontrola})}$$

Vzorce, pri katerih je IR>2, smatramo za genotoksične.

3.6 Sesalski testni sistem: model na celični liniji humanega hepatoma HepG2

3.6.1 Gojenje celic HepG2

Celično linijo HepG2 smo imeli shranjeno v tekočem dušiku. Celice smo uporabljali do največ štirinajstje pasaže po odmrznitvi, saj se s časom gojenja in pri višjih pasažah spremenijo morfogenetske lastnosti celic, encimske aktivnosti pa se zmanjšajo.

Celice smo gojili v plastenkah za gojenje celičnih kultur (Corning Costar Corporation, New York, USA) pri 37 °C v 5 % CO₂ atmosferi v celičnem gojišču sestavljenem iz Williamsovega gojišča, 15 % FBS (serum govejega zarodka, iz ang. foetal bovine serum), 100 enot/ml penicilin/streptomicina in 2 mM L-glutamina. CO₂ v atmosferi vzdržuje zakisanost gojišča. Celice smo presajali ob približno 80 % preraščenosti plošče.

Pri presajanju smo iz plstenke odstranili gojišče, celice sprali z 1x PBS, ga odstranili in dodali 0.1 % tripsin za celice HepG2 (1.5 ml za plstenko T25, 3 ml za plstenko T75) ter inkubirali 3-5 minut pri 37 °C. Po inkubaciji smo celice rahlo pretresli, da so se odlepile od podlage, nakar smo dodali sveže gojišče. Serum v gojišču zavre delovanje tripsina in tako prepreči morebitne dodatne poškodbe DNA, ki bi nastale zaradi predolge izpostavljenosti tripsinu. Suspenzijo celic smo centrifugirali 5 minut pri 800 obratih/minuto. Supernatant smo po centrifugiranju zavrgli, celice pa smo resuspendirali v svežem gojišču in jih prenesli v novo plstenko. S pomočjo brizge smo resuspendirane celice 6-8x potegnili skozi injekcijsko iglo (0.9x40 mm, Becton Dickinson, Fraga, Španija). Dobili smo suspenzijo posameznih celic, ki smo jih nasadili v novo plstenko.

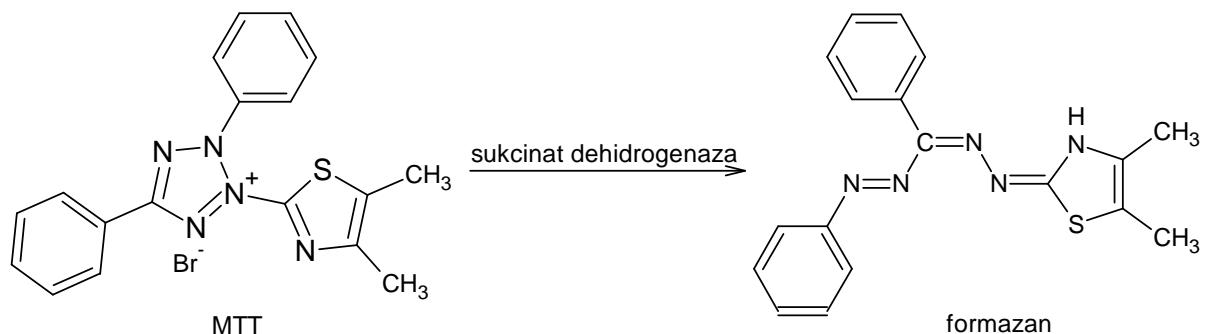
Za preverjanje številčnosti celic med gojenjem smo uporabljali 0.4 % tripansko modrilo.

3.6.2 Določanje citotoksičnega delovanja vzorcev morskih sedimentov s testom MTT

3.6.2.1 Test MTT

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid) je rumena vodotopna substanca, ki jo mitohondrijske sukcinat dehidrogenaze metabolno aktivnih celic reducirajo v vijolične nevodotopne kristale formazana (Slika 6). Kristali formazana so topni v DMSO, izopropanolu in podobnih organskih topilih.

Količina nastalega formazana je sorazmerna s številom živih celic. Količino nastalih formazanskih kristalov dobimo z merjenjem absorpcije pri svetlobi valovne dolžine 570 nm z referenčnim filtrom 690 nm (povzeto po navodilih 10G-Pos03-01, MTT test, Laboratorij GEN).

Slika 6: Pretvorba MTT soli v vijoličast produkt MTT formazan

3.6.2.2 Nasajanje celic HepG2

Na mikrotitrsko ploščo s 96 luknjicami (Nunclon, Danska) smo nasadili celice HepG2 z gostoto 35 000 celic/ml. V vsako luknjico smo dodali 200 µl celične suspenzije ter tako dobili gostoto 7 000 celic/luknjico. Ploščo smo inkubirali 24 ur (37 °C, 5 % CO₂, vlažna atmosfera), da so se celice prilepile na podlago.

3.6.2.3 Izpostavitev celic in izvedba testa MTT

Po inkubaciji smo gojišče zamenjali s 100 µl vzorca s koncentracijami 0 (kontrola topila; 0.5 % DMSO), 0.1, 0.5 in 2.5 g sedimenta/ml (vzorci 14, KK, CZ, K, DB2, F, MA, LK4e, LK6 in LK4a) ter v primeru vzorca PM s koncentracijami 0 (kontrola topila; 0.5 % DMSO), 0.1, 0.5 in 2 g sedimenta/ml. Vsako koncentracijo vzorca smo testirali v štirih paralelkah. Negativni kontroli smo dodali le sveže gojišče. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 75 µM benzo[a]piren. Sledila je 24-urna inkubacija pri 37 °C, 5 % CO₂ in v vlažni atmosferi. Nato smo v vsako luknjico dodali 10 µl MTT (5 mg/ml) ter inkubirali še 3 ure. Po inkubaciji smo odstranili gojišče in v vsako luknjico dodali 200 µl DMSO, da smo raztopili formazanske kristale. Izmerili smo absorpcijo pri svetlobi valovne dolžine 570 nm z referenčnim filtrom 690 nm. Z uporabo kontrole topila (0.5 % DMSO) in negativne kontrole smo izključili možne učinke topila. Celice izpostavljene vzorcem smo primerjali s kontrolo topila.

3.6.3 Test komet

3.6.3.1 Priprava reagentov in raztopin za test komet

Agaroza

- 1 % NMP; agaroza z normalno točko tališča (iz ang. normal melting point)
- 1 % LMP; agaroza z nizko točko tališča (iz ang. low melting point)

10 mg/ml NMP in LMP agaroze smo ob mešanju in segrevanju v mikrovalovni pečici raztopili v 1x PBS. Po potrebi smo strjeno agarozo med poskusom ponovno segregali.

Raztopina za liziranje celic

- 2.5 M NaCl (146.4 g/l H₂O)
- 100 mM EDTA (37.2 g/l H₂O)
- 100 mM Tris (1.21 g/l H₂O)

Za vsak poskus smo pripravili svež raztopino, kateri smo uravnnavali pH vrednost na 10 z 10 M NaOH ali s HCl (33 %). Raztopino smo ohladili na 4 °C in pred uporabo dodali 1 % Triton X-100 ter dobro premešali.

Pufer za elektroforezo

- 0.3 M NaOH (30 ml 10 M NaOH/ 1 H₂O)
- 1 mM EDTA (5 ml 0.2 M EDTA/l H₂O)

Za vsak poskus smo pripravili svež pufer in ga do uporabe hranili pri 4 °C.

Pufer za nevtralizacijo

- 0.4 M Tris (48.44 g/l H₂O)

Za vsak poskus smo pripravili svež pufer in uravnali pH na 7.5 z 10 M NaOH ali s HCl (33 %). Do uporabe smo ga hranili pri 4 °C.

3.6.3.2 Izvedba testa komet

Nasajanje in izpostavitev celic HepG2 vzorcem

Celice z gostoto 30 000 celic/luknjico smo nasadili na ploščo s 24 luknjicami (Becton Dickinson, ZDA) in jih inkubirali 24 ur pri 37 °C, pri 5 % CO₂ in v vlažni atmosferi, da so se celice prilepile na podlago. Po inkubaciji smo gojišče zamenjali s pripravljenimi koncentracijami vzorcev (0.02, 0.1 in 0.5 g sedimenta/ml za vzorce K, DB2, F, 14, KK, MA, CZ in LK4a ter 0.004, 0.02 in 0.1 g sedimenta/ml za vzorce LK4e, LK6 in PM). Za pozitivno kontrolo smo uporabili 30 µM benzo[a]piren. Po 24 urnem tretiranju smo iz luknjic odstranili gojišče z vzorci, celice sprali z 1x PBS in dodali 0.1 % tripsin za celice HepG2. Ko so se celice odlepile od podlage, smo dodali sveže gojišče, kar je ustavilo delovanje tripsina. Suspenzijo celic smo odpipetirali v centrifugirke ter centrifugirali 5 minut pri 800 obratih/min. Supernatant smo zavrgli, celice pa resuspendirali v svežem gojišču.

Priprava stekelc in nanos agaroze

Za test smo uporabili objektna stekelca peskana po celi površini (Surgipath, ZDA), ki so bila čez noč namočena v metanolu, da so se razmastila. Pred uporabo smo stekelca posušili z obžiganjem. Na označena stekelca smo nanesli plast 1 % NMP agaroze, in sicer 2x po 80 µl, ter pokrili s krovnim stekelcem. Tako smo dobili dva gela. Objektno stekelce smo nato položili v hladilnik, dokler se agaroza ni strdila. Krovno stekelce smo odstranili tik pred nanosom druge plasti agaroze iz 1 % LMP agaroze in celične suspenzije. 30 µl celične suspenzije smo zmešali s 70 µl 1 % LMP agaroze in 70 µl te suspenzije nanesli na prvo plast agaroze na stekelcu ter ponovno pokrili s krovnim stekelcem. Objektnik smo ponovno položili v hladilnik, dokler se agaroza ni strdila. Nato smo krovna stekelca previdno odstranili.

Liziranje celic

Pripravljena stekelca smo položili v raztopino za liziranje in jih pri 4 °C v temi inkubirali vsaj 60 minut. V tej fazи se zaradi visokega pH (pH 10) razgradijo vsi proteini in RNA, detergenti pa razgradijo celične membrane. S tem odstranimo celično vsebino, razen jeder s superzvito DNA.

Odvijanje DNA

Po liziranju smo stekelca prestavili v elektroforetsko kadičko. Enako orientirana (del z gelom proti anodi) smo zložili tesno skupaj. Da smo zagotovili homogenost električnega polja, smo prazna mesta zapolnili s stekelci. V kadičko smo dodali elektroforetski pufer do približno 3 mm nad stekelci. Sledila je 20-minutna inkubacija pri 4 °C v temi. V tej fazи se DNA denaturira, odvije, izrazijo se enoverižni prelomi.

Elektroforeza

Po odvijanju smo stekelca izpostavili električnemu polju za 20 min pri napetosti 0.5-1 V/cm (nastavili smo napetost 25 V, tok pa je znašal približno 300 mA in se je uravnaval z volumnom pufra). DNA zaradi negativnega naboja potuje proti pozitivnemu polu. Odvita in poškodovana DNA potuje proti anodi hitreje kot nepoškodovana DNA.

Nevtralizacija

Po elektroforezi smo stekelca prenesli v novo kadičko, v katero smo nalili hladen nevtralizacijski pufer (pH 7.5). Stekelca smo nevtralizirali v temi 15 min.

Shranjevanje stekelc

Stekelca smo položili v kadičko, v katero smo na dno položili navlaženo staničevino. Kadičko smo pokrili z alu-folijo, jo zaprli v vrečko in shranili v hladilnik pri 4 °C. Stekelca smo analizirali v roku enega tedna.

Barvanje

Tik pred mikroskopiranjem smo na vsak gel dodali 20 µl etidijevega bromida s koncentracijo 5 µg/ml ter ga pokrili s krovnim stekelcem.

Slikanje jeder celic

Slike kometov smo opazovali z mikroskopom (Nikon Eclipse E800, Japonska) s fluorescenčno svetlobo (Nikon HB-10104AF, Japonska) pri 400x povečavi (40x objektiv). Ekscitacijski filter za etidijev bromid je 515-560 nm in barierni 590 nm.

Na vsakem objektnem stekelcu smo zajeli slike 50 jeder, pri čemer smo se izogibali robnim delom gela. Slike smo s kamero (Marlin F046B, Allied, Vision Technologies,

Velika Britanija) prenesli na računalnik in jih analizirali s pomočjo programa Comet Assay IV (Perceptive Instruments, Velika Britanija). Program je izmeril več parametrov, za prikaz rezultatov pa smo izbrali % DNA v repu kometa. Rezultate smo obdelali s statističnim programom GraphPad Prism5, kjer smo za analizo razlik med skupinami uporabili enosmerno analizo variance (ANOVA, Kruskal-Wallis). Za primerjavo vrednosti median % DNA v repu znotraj poskusov smo uporabili test Dunnet; $p < 0.05$ smo določili kot statistično značilno razliko. Vsako izvedbo testa smo ponovili v treh neodvisnih poskusih.

4 REZULTATI

4.1 Bakterijski testni sistem: test SOS/*umuC*

V prvem delu diplomske naloge smo želeli preveriti, ali kompleksni vzorci morskih sedimentov iz slovenskega obalnega morja delujejo genotoksično na bakterije vrste *Salmonella typhimurium*, sev TA1535/pSK1002.

Najprej smo s testom SOS/*umuC* ugotavljali potencialno toksično in genotoksično delovanje vzorcev morskih sedimentov. Bakterije vrste *Salmonella typhimurium*, sev TA1535/pSK1002, smo izpostavili različnim koncentracijam vzorcev (0.5, 2.5 in 12.5 g sedimenta/ml za vzorce 14, KK, CZ, K, DB2, F, MA, LK4e, LK6 in LK4a ter 0.5, 2.5 in 10 g sedimenta/ml za vzorec PM) v odsotnosti in prisotnosti metabolne aktivacije S9.

Tabela 3: Rezultati testa SOS/*umuC*

	brez metabolne aktivacije		z metabolno aktivacijo	
	preživetje (%)	IR	preživetje (%)	IR
kontrola DMSO (5%)	100.0	1.00	100.0	1.00
NQNO (0.5 µg/ml)	98.6	3.02 *	/	/
AFB₁(0.5 µg/ml)	/	/	98.1	2.33 *
B[a]P (10 µg/ml)	/	/	95.9	2.36 *
MA (12.5 g/ml)	73.1	1.59	111.9	0.99
MA (2.5 g/ml)	102.9	1.02	97.8	1.18
MA (0.5 g/ml)	94.8	1.00	88.3	1.10
K (12.5 g/ml)	70.6	1.80	98.6	1.00
K (2.5 g/ml)	98.1	1.13	89.3	1.20
K (0.5 g/ml)	101.5	1.03	100.8	0.93
14 (12.5 g/ml)	78.5	1.52	103.3	0.96
14 (2.5 g/ml)	92.7	1.09	105.4	0.98
14 (0.5 g/ml)	99.1	1.02	104.7	0.93
F (12.5 g/ml)	68.5	1.83	111.7	0.88
F (2.5 g/ml)	100.0	1.07	101.0	0.92
F (0.5 g/ml)	92.5	1.12	84.3	1.09
CZ (12.5 g/ml)	82.3	1.65	107.6	1.01
CZ (2.5 g/ml)	98.6	1.04	98.1	0.98
CZ (0.5 g/ml)	99.1	1.01	104.3	1.01
DB2 (12.5 g/ml)	74.6	2.03 *	113.4	1.00
DB2 (2.5 g/ml)	95.6	1.33	116.0	0.85
DB2 (0.5 g/ml)	99.3	1.24	111.8	0.76

KK (12.5 g/ml)	81.6	1.63	116.4	0.85
KK (2.5 g/ml)	104.5	1.13	98.8	1.00
KK (0.5 g/ml)	98.0	1.15	101.6	1.06
LK4a (12.5 g/ml)	67.2	2.38 *	114.0	0.79
LK4a (2.5 g/ml)	95.7	1.18	107.7	1.21
LK4a (0.5 g/ml)	92.0	1.15	110.9	0.76
LK4e (12.5 g/ml)	84.4	1.73	107.1	0.91
LK4e (2.5 g/ml)	95.8	1.50	108.3	0.85
LK4e (0.5 g/ml)	98.8	1.10	109.9	1.05
LK6 (12.5 g/ml)	79.7	1.46	102.6	1.02
LK6 (2.5 g/ml)	98.8	1.07	91.9	1.16
LK6 (0.5 g/ml)	103.7	0.91	94.2	1.25
PM (10 g/ml)	82.8	1.54	106.1	1.05
PM (2.5 g/ml)	95.6	1.16	101.2	1.21
PM (0.5 g/ml)	100.9	1.04	96.2	1.03

Bakterije *S. typhimurium* seva TA1535/pSK1002 smo izpostavili različnim koncentracijam vzorcev morskih sedimentov (0.5, 2.5 in 12.5 g sedimenta/ml za vzorce 14, KK, CZ, K, DB2, F, MA, LK4e, LK6 in LK4a oziroma 0.5, 2.5 in 10 g sedimenta/ml za vzorec PM). Za kontrolo topila smo namesto vzorca dodali 5 % DMSO. Za pozitivno kontrolo smo pri testu brez metabolne aktivacije dodali 4-nitrokinolin-N-oksid (NQNO) v koncentraciji 0.5 µg/ml, pri testu z metabolno aktivacijo pa aflatoksin B₁ (AFB₁) v koncentraciji 0.5 µg/ml ter benzo[a]piren (B[a]P) v koncentraciji 10 µg/ml. Vsako koncentracijo smo testirali v treh paralelkah. Z * je označeno značilno povišano indukcijsko razmerje (določitev genotoksičnosti).

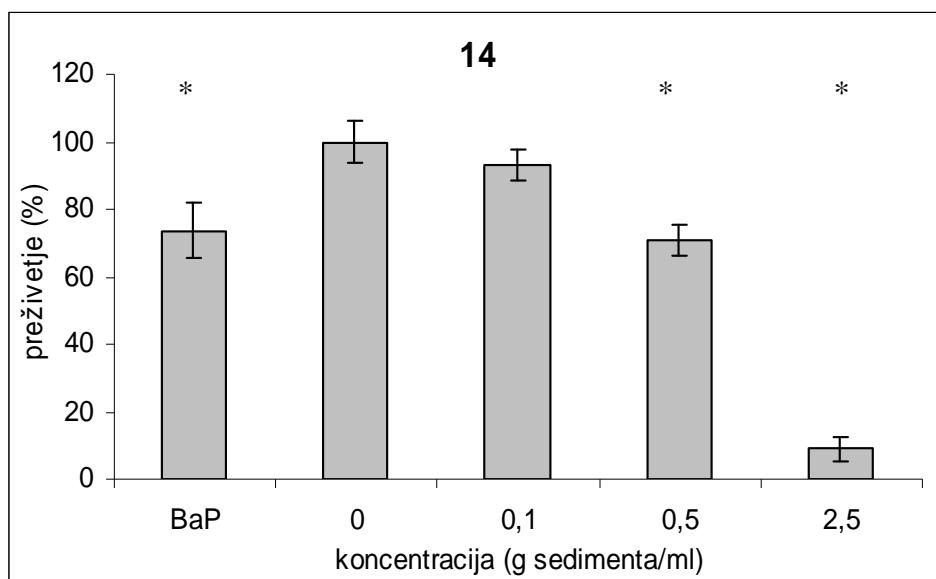
Pri testu SOS/*umuC* brez metabolne aktivacije smo zaznali značilno povečano indukcijsko razmerje, ki določa genotoksičnost (IR>2), pri pozitivni kontroli (NQNO) ter pri najvišjih koncentracijah (12.5 g sedimenta/ml) vzorcev DB2 in LK4a.

Pri testu z metabolno aktivacijo S9 pa smo zaznali značilno povečano indukcijsko razmerje, ki določa genotoksičnost (IR>2), samo pri obeh pozitivnih kontrolah (AFB₁ in B[a]P). Nobeden izmed vzorcev ni deloval genotoksično na bakterijo *S. typhimurium* v prisotnosti metabolne aktivacije S9.

4.2 Sesalski testni sistem: model na celični liniji humanega hepatoma HepG2

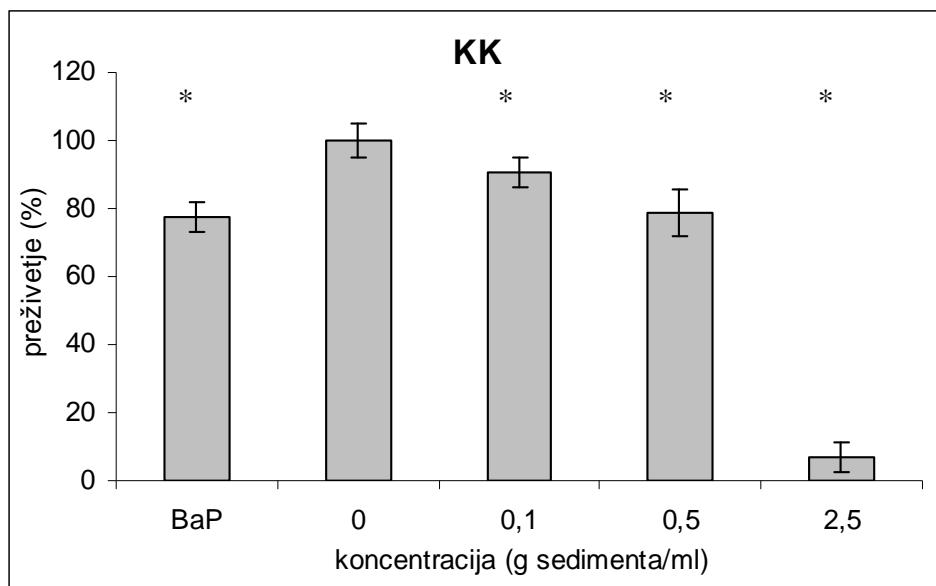
V drugem delu diplomske naloge smo želeli ugotoviti, ali celokupni vzorci morskih sedimentov iz slovenskega obalnega morja delujejo citotoksično in genotoksično na celice HepG2. Uporabili smo testa MTT in komet.

4.2.1 Test MTT



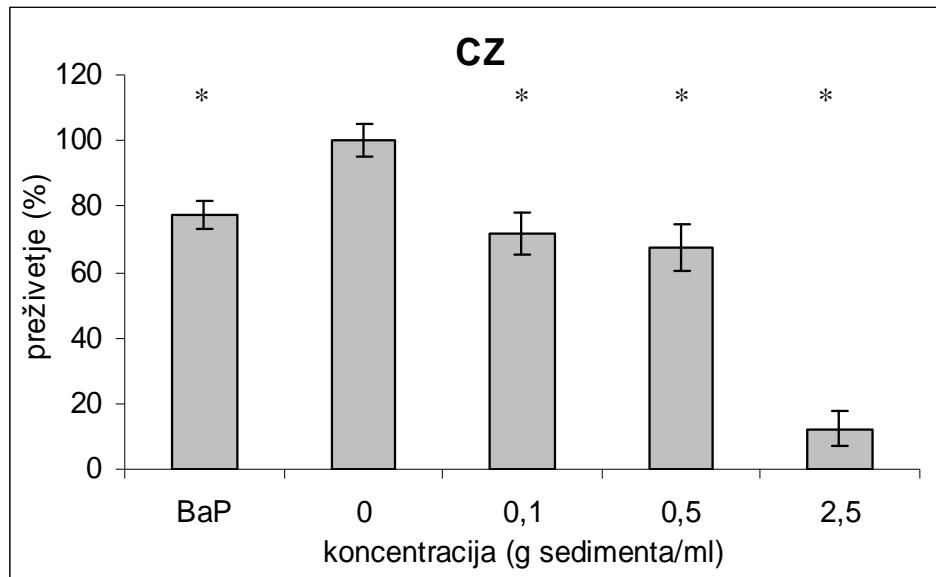
Slika 7: Določanje citotoksičnega delovanja vzorca 14 na celicah HepG2 s testom MTT

Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili vzorcu 14 s koncentracijami 0 (kontrola; 0.5 % DMSO), 0.1, 0.5 in 2.5 g sedimenta/ml ter nato ugotavljali živost celic s testom MTT. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 75 μ M B[a]P. Rezultati so podani kot odstotek živih celic po izpostavitvi vzorcu glede na kontrolno skupino ($p < 0.05$).



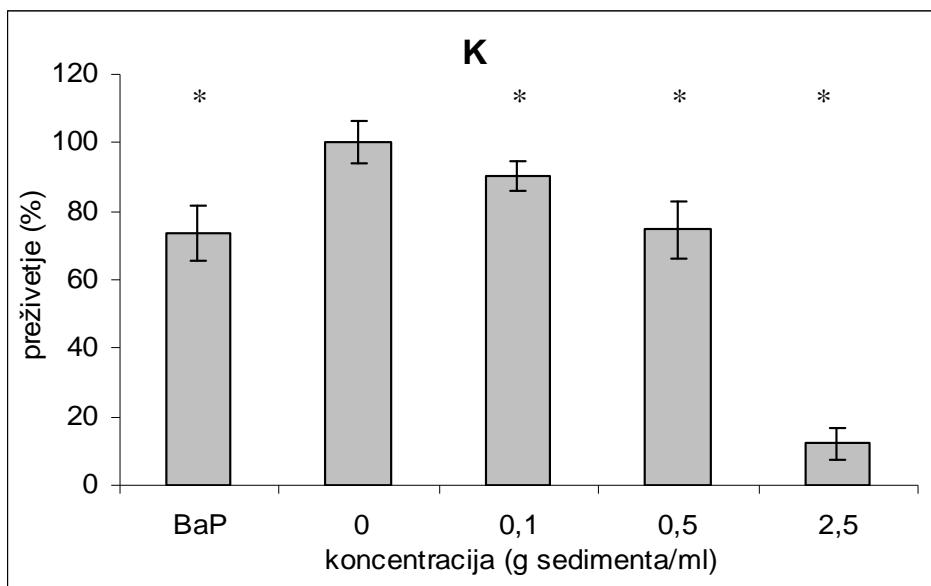
Slika 8: Določanje citotoksičnega delovanja vzorca KK na celicah HepG2 s testom MTT

Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili vzorcu KK s koncentracijami 0 (kontrola; 0.5 % DMSO), 0.1, 0.5 in 2.5 g sedimenta/ml ter nato ugotavljali živost celic s testom MTT. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 75 μM B[a]P. Rezultati so podani kot odstotek živih celic po izpostavitvi vzorcu glede na kontrolo \pm SD. * predstavlja statistično značilno razliko glede na kontrolno skupino ($p<0.05$).



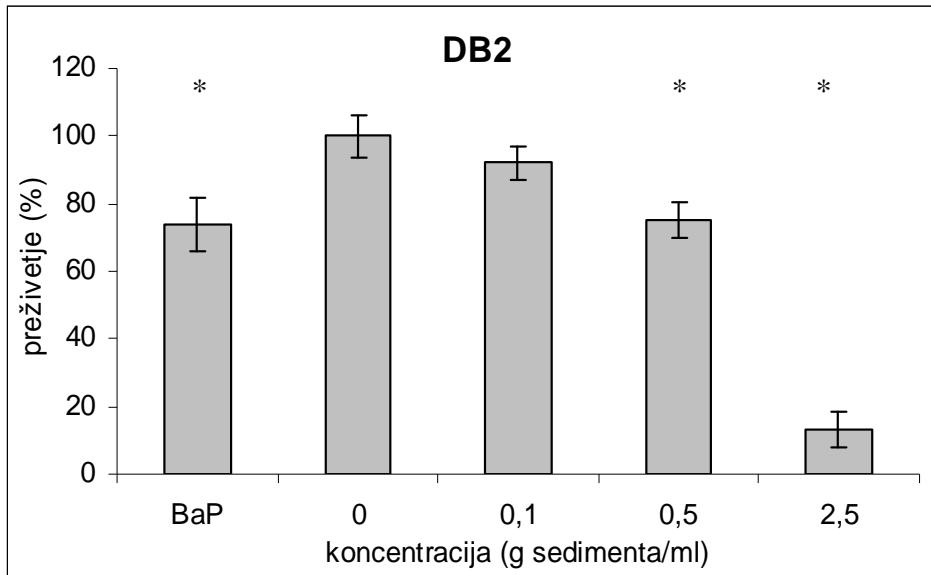
Slika 9: Določanje citotoksičnega delovanja vzorca CZ na celicah HepG2 s testom MTT

Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili vzorcu CZ s koncentracijami 0 (kontrola; 0.5 % DMSO), 0.1, 0.5 in 2.5 g sedimenta/ml ter nato ugotavljali živost celic s testom MTT. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 75 μM B[a]P. Rezultati so podani kot odstotek živih celic po izpostavitvi vzorcu glede na kontrolo \pm SD. * predstavlja statistično značilno razliko glede na kontrolno skupino ($p<0.05$).



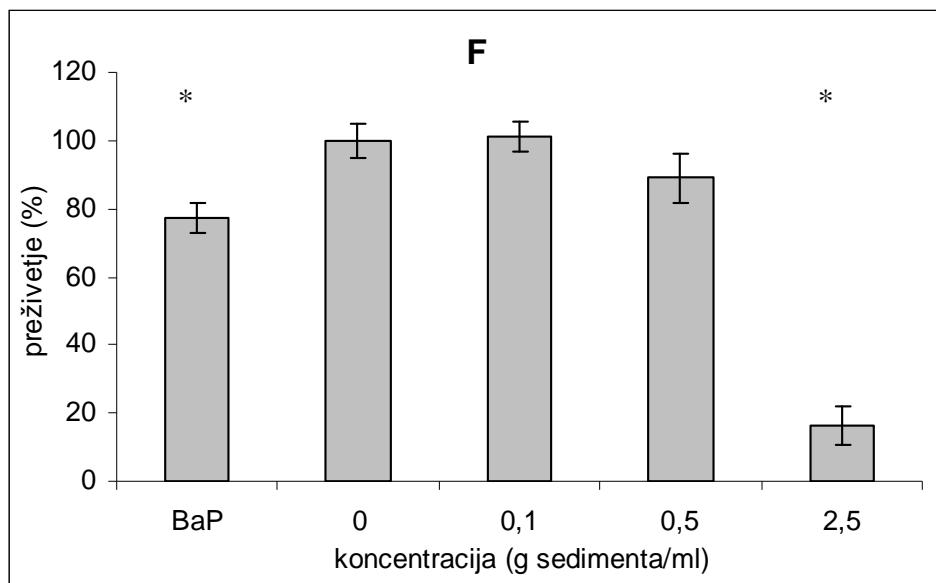
Slika 10: Določanje citotoksičnega delovanja vzorca K na celicah HepG2 s testom MTT

Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili vzorcu K s koncentracijami 0 (kontrola; 0.5 % DMSO), 0.1, 0.5 in 2.5 g sedimenta/ml ter nato ugotavljali živost celic s testom MTT. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 75 μ M B[a]P. Rezultati so podani kot odstotek živih celic po izpostavitvi vzorcu glede na kontrolo \pm SD. * predstavlja statistično značilno razliko glede na kontrolno skupino ($p<0.05$).



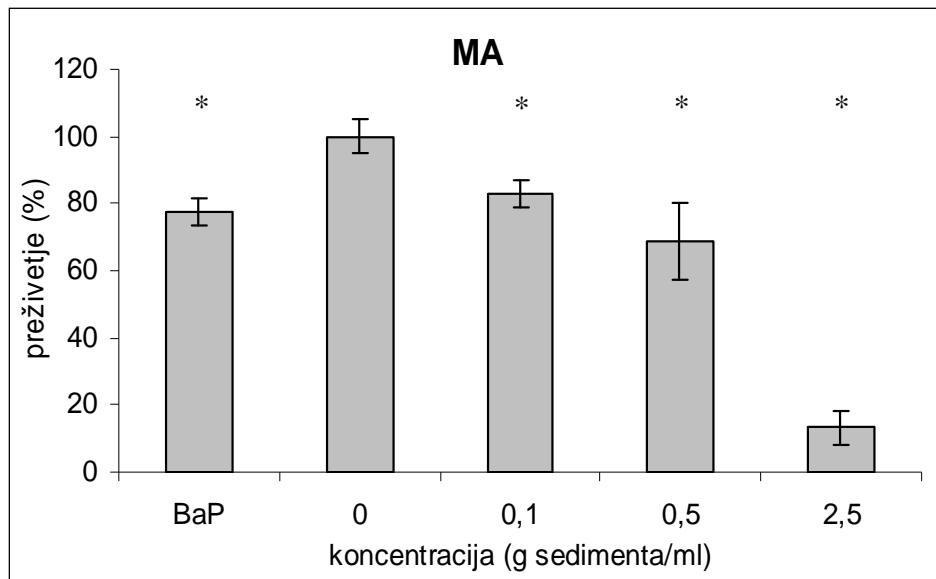
Slika 11: Določanje citotoksičnega delovanja vzorca DB2 na celicah HepG2 s testom MTT

Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili vzorcu DB2 s koncentracijami 0 (kontrola; 0.5 % DMSO), 0.1, 0.5 in 2.5 g sedimenta/ml ter nato ugotavljali živost celic s testom MTT. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 75 μ M B[a]P. Rezultati so podani kot odstotek živih celic po izpostavitvi vzorcu glede na kontrolo \pm SD. * predstavlja statistično značilno razliko glede na kontrolno skupino ($p<0.05$).



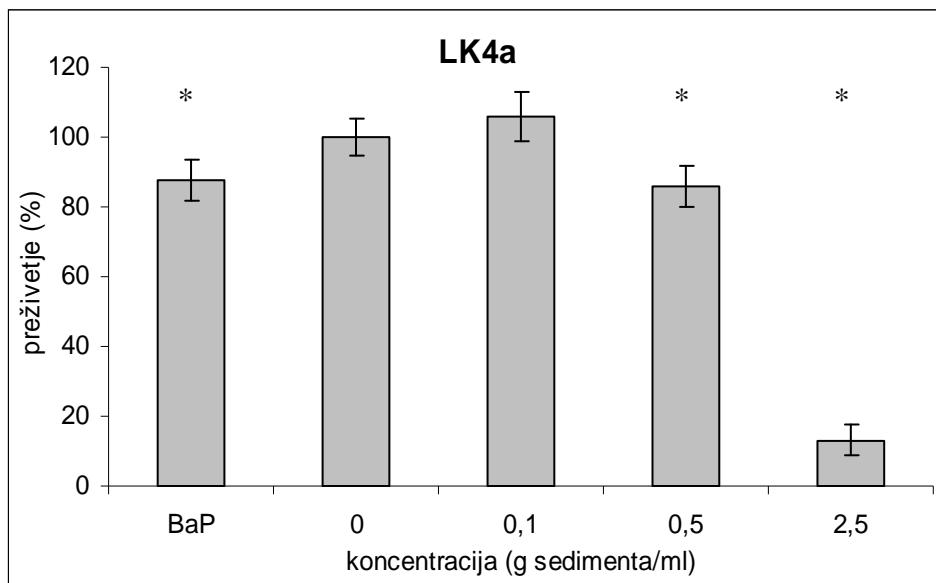
Slika 12: Določanje citotoksičnega delovanja vzorca F na celicah HepG2 s testom MTT

Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili vzorcu F s koncentracijami 0 (kontrola; 0.5 % DMSO), 0.1, 0.5 in 2.5 g sedimenta/ml ter nato ugotavljali živost celic s testom MTT. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 75 μ M B[a]P. Rezultati so podani kot odstotek živih celic po izpostavitvi vzorcu glede na kontrolo \pm SD. * predstavlja statistično značilno razliko glede na kontrolno skupino ($p<0.05$).



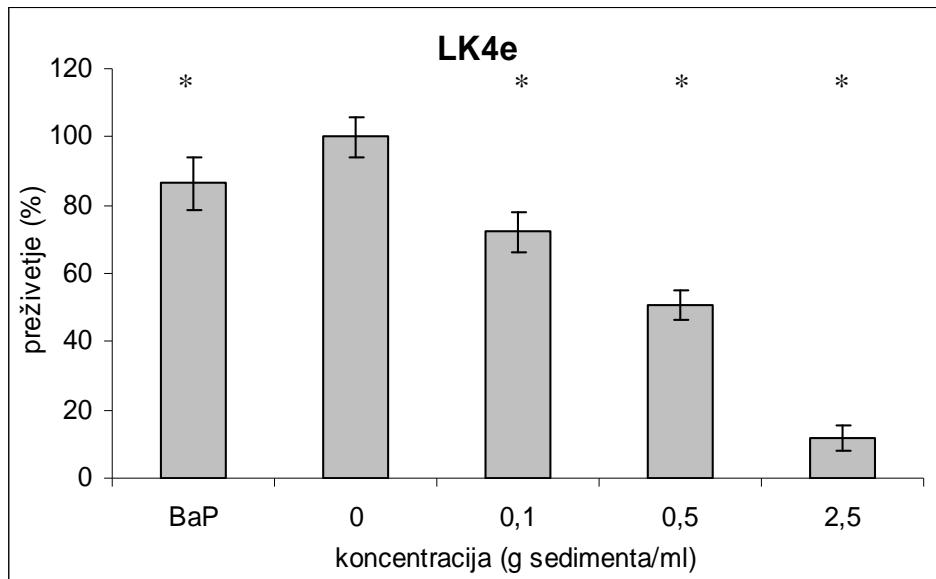
Slika 13: Določanje citotoksičnega delovanja vzorca MA na celicah HepG2 s testom MTT

Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili vzorcu MA s koncentracijami 0 (kontrola; 0.5 % DMSO), 0.1, 0.5 in 2.5 g sedimenta/ml ter nato ugotavljali živost celic s testom MTT. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 75 μ M B[a]P. Rezultati so podani kot odstotek živih celic po izpostavitvi vzorcu glede na kontrolo \pm SD. * predstavlja statistično značilno razliko glede na kontrolno skupino ($p<0.05$).



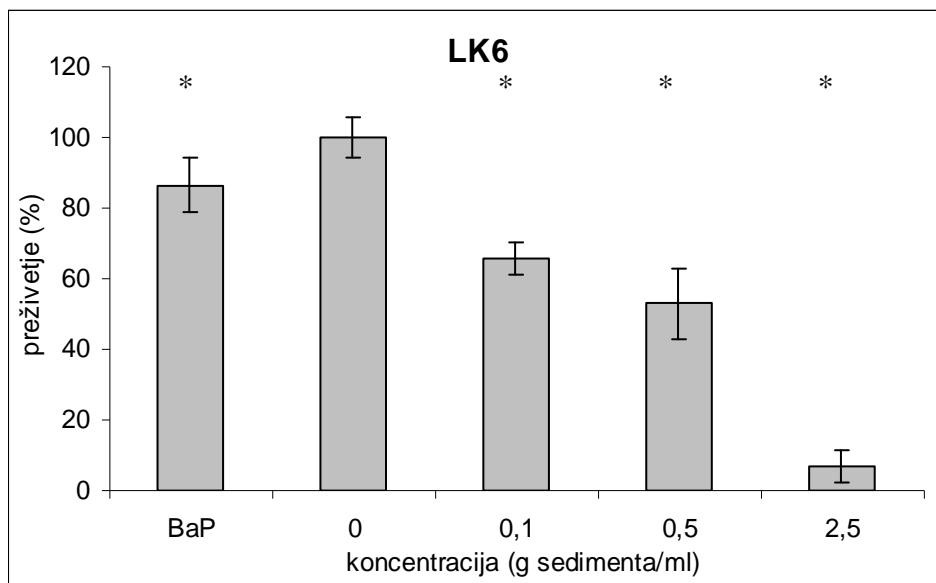
Slika 14: Določanje citotoksičnega delovanja vzorca LK4a na celicah HepG2 s testom MTT

Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili vzorcu LK4a s koncentracijami 0 (kontrola; 0.5 % DMSO), 0.1, 0.5 in 2.5 g sedimenta/ml ter nato ugotavljali živost celic s testom MTT. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 75 μM B[a]P. Rezultati so podani kot odstotek živih celic po izpostavitvi vzorcu glede na kontrolo \pm SD. * predstavlja statistično značilno razliko glede na kontrolno skupino ($p<0.05$).



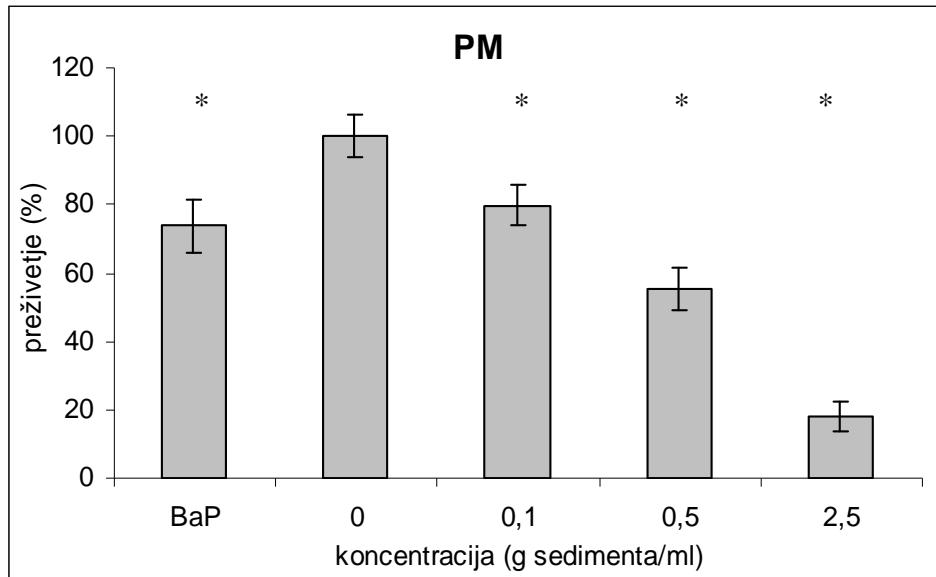
Slika 15: Določanje citotoksičnega delovanja vzorca LK4e na celicah HepG2 s testom MTT

Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili vzorcu LK4e s koncentracijami 0 (kontrola; 0.5 % DMSO), 0.1, 0.5 in 2.5 g sedimenta/ml ter nato ugotavljali živost celic s testom MTT. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 75 μM B[a]P. Rezultati so podani kot odstotek živih celic po izpostavitvi vzorcu glede na kontrolo \pm SD. * predstavlja statistično značilno razliko glede na kontrolno skupino ($p<0.05$).



Slika 16: Določanje citotoksičnega delovanja vzorca LK6 na celicah HepG2 s testom MTT

Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili vzorcu LK6 s koncentracijami 0 (kontrola; 0.5 % DMSO), 0.1, 0.5 in 2.5 g sedimenta/ml ter nato ugotavljali živost celic s testom MTT. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 75 μ M B[a]P. Rezultati so podani kot odstotek živih celic po izpostavitvi vzorcu glede na kontrolno skupino ($p < 0.05$). *



Slika 17: Določanje citotoksičnega delovanja vzorca PM na celicah HepG2 s testom MTT

Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili vzorcu PM s koncentracijami 0 (kontrola; 0.5 % DMSO), 0.1, 0.5 in 2 g sedimenta/ml ter nato ugotavljali živost celic s testom MTT. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 75 μ M B[a]P. Rezultati so podani kot odstotek živih celic po izpostavitvi vzorcu glede na kontrolno skupino ($p < 0.05$). *

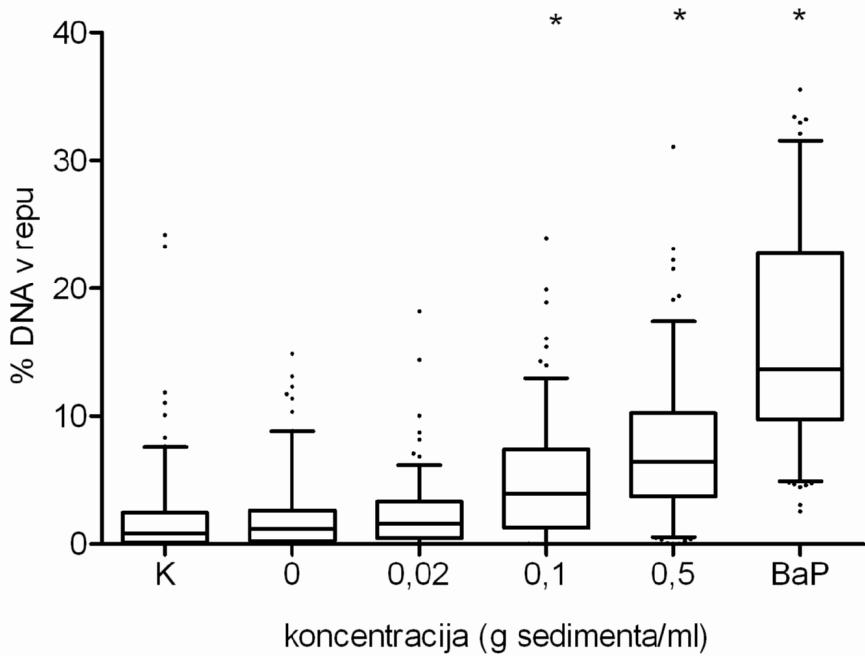
Pri testiranju različnih koncentracij vzorcev s testom MTT smo ugotovili, da je pri vzorcih KK, CZ, K, MA, LK4e, LK6 in PM prišlo do statistično značilnega znižanja preživetja celic glede na kontrolo pri vseh treh koncentracijah (0.1, 0.5 in 2.5 g sedimenta/ml oziroma 0.1, 0.5 in 2 g sedimenta/ml pri vzorcu PM).

Pri testiranju vzorcev 14, DB2 in LK4a smo opazili statistično značilno znižanje preživetja celic glede na kontrolo pri koncentracijah 0.5 in 2.5 g sedimenta/ml, medtem ko je vzorec F statistično značilno znižal preživetje celic le pri najvišji koncentraciji (2.5 g sedimenta/ml).

Na podlagi rezultatov testa MTT smo za posamezni vzorec določili koncentracijo, pri kateri preživetje ni bilo manjše od 70 %, in jo v nadaljevanju izbrali za najvišjo koncentracijo pri testu komet. Tako smo za testiranje genotoksične aktivnosti vzorcev pri vzorcih 14, KK, CZ, K, DB2, F, MA in LK4a izbrali najvišjo koncentracijo 0.5 g sedimenta/ml, pri vzorcih LK4e, LK6 in PM pa 0.1 g sedimenta/ml.

4.2.2 Test komet

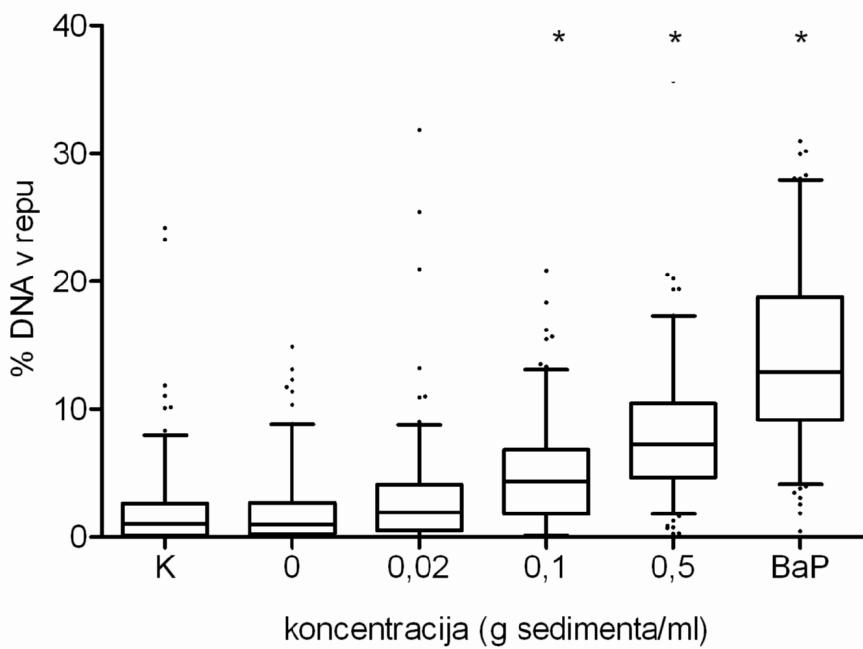
S testom komet smo ugotavljali, ali kompleksni vzorci morskih sedimentov delujejo genotoksično na celice HepG2. Testirali smo koncentracije, ki niso zmanjšale preživetja za več kot 30 %.



Slika 18: Določanje genotoksičnega delovanja vzorca 14 na celicah HepG2 s testom komet

Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili različnim koncentracijam vzorca 14 (0.02, 0.1 in 0.5 g sedimenta/ml), celice kontrole (K) smo izpostavili samo gojišču, za kontrolo topila (0) smo uporabili 0.5 % DMSO, kot pozitivno kontrolo pa smo uporabili 30 μ M B[a]P. Genotoksično delovanje smo ugotavljali s testom komet. Celoten poskus smo izvedli v treh neodvisnih ponovitvah in znotraj poskusa analizirali po 50 jeder. Rezultati so podani kot odstotek DNA v repu in prikazani kot grafikon kvantilov. Robovi boksa prikazujejo prvi in drugi interkvartilni razmik, mediana je črta, ki razmejuje boks. Ročaji grafikona kvantilov predstavljajo 95-ti percentil; * predstavlja statistično značilno razliko glede na kontrolno skupino (test Kruskal-Wallis, $p<0.05$).

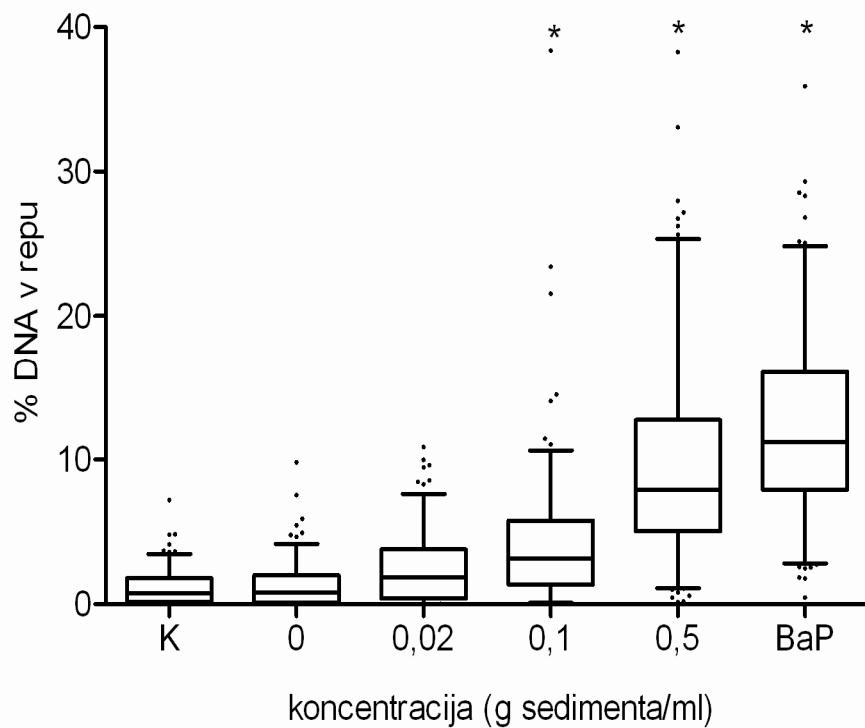
Po izpostavitvi celic vzorcu 14 smo zaznali statistično značilno povečano število prelomov DNA (genotoksičnost) v primerjavi s kontrolo pri koncentracijah 0.1 in 0.5 g sedimenta/ml.



Slika 19: Določanje genotoksičnega delovanja vzorca CZ na celicah HepG2 s testom komet

Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili različnim koncentracijam vzorca CZ (0.02, 0.1 in 0.5 g sedimenta/ml), celice kontrole (K) smo izpostavili samo gojišču, za kontrolo topila (0) smo uporabili 0.5 % DMSO, kot pozitivno kontrolo pa smo uporabili 30 μ M B[a]P. Genotoksično delovanje smo ugotavljali s testom komet. Celoten poskus smo izvedli v treh neodvisnih ponovitvah in znotraj poskusa analizirali po 50 jeder. Rezultati so podani kot odstotek DNA v repu in prikazani kot grafikon kvantilov. Robovi boksa prikazujejo prvi in drugi interkvartilni razmik, mediana je črta, ki razmejuje boks. Ročaji grafikona kvantilov predstavljajo 95-ti percentil; * predstavlja statistično značilno razliko glede na kontrolno skupino (test Kruskal-Wallis, $p < 0.05$).

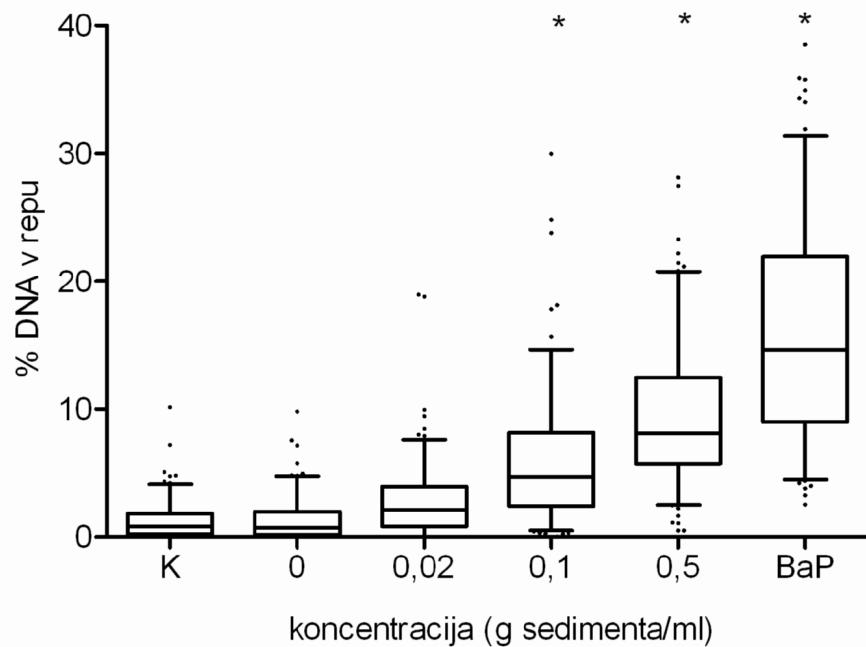
Po izpostavitvi celic vzorcu CZ smo zaznali statistično značilno povečano število prelomov DNA (genotoksičnost) v primerjavi s kontrolo pri koncentracijah 0.1 in 0.5 g sedimenta/ml.



Slika 20: Določanje genotoksičnega delovanja vzorca DB2 na celicah HepG2 s testom komet

Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili različnim koncentracijam vzorca DB2 (0.02, 0.1 in 0.5 g sedimenta/ml), celice kontrole (K) smo izpostavili samo gojišču, za kontrolo topila (0) smo uporabili 0.5 % DMSO, kot pozitivno kontrolo pa smo uporabili 30 μ M B[a]P. Genotoksično delovanje smo ugotavljali s testom komet. Celoten poskus smo izvedli v treh neodvisnih ponovitvah in znotraj poskusa analizirali po 50 jeder. Rezultati so podani kot odstotek DNA v repu in prikazani kot grafikon kvantilov. Robovi boksa prikazujejo prvi in drugi interkvartilni razmik, mediana je črta, ki razmejuje boks. Ročaji grafikona kvantilov predstavljajo 95-ti percentil; * predstavlja statistično značilno razliko glede na kontrolno skupino (test Kruskal-Wallis, $p < 0.05$).

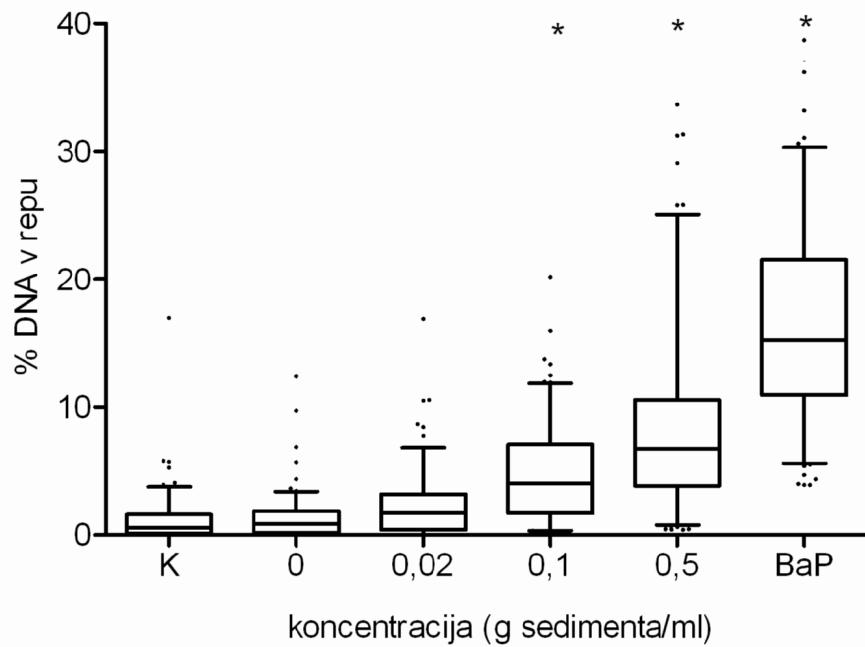
Po izpostavitvi celic vzorcu DB2 smo zaznali statistično značilno povečano število prelomov DNA (genotoksičnost) v primerjavi s kontrolo pri koncentracijah 0.1 in 0.5 g sedimenta/ml.



Slika 21: Določanje genotoksičnega delovanja vzorca F na celicah HepG2 s testom komet

Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili različnim koncentracijam vzorca F (0.02, 0.1 in 0.5 g sedimenta/ml), celice kontrole (K) smo izpostavili samo gojišču, za kontrolo topila (0) smo uporabili 0.5 % DMSO, kot pozitivno kontrolo pa smo uporabili 30 µM B[a]P. Genotoksično delovanje smo ugotavljali s testom komet. Celoten poskus smo izvedli v treh neodvisnih ponovitvah in znotraj poskusa analizirali po 50 jeder. Rezultati so podani kot odstotek DNA v repu in prikazani kot grafikon kvantilov. Robovi boksa prikazujejo prvi in drugi interkvartilni razmik, mediana je črta, ki razmejuje boks. Ročaji grafikona kvantilov predstavljajo 95-ti percentil; * predstavlja statistično značilno razliko glede na kontrolno skupino (test Kruskal-Wallis, $p < 0.05$).

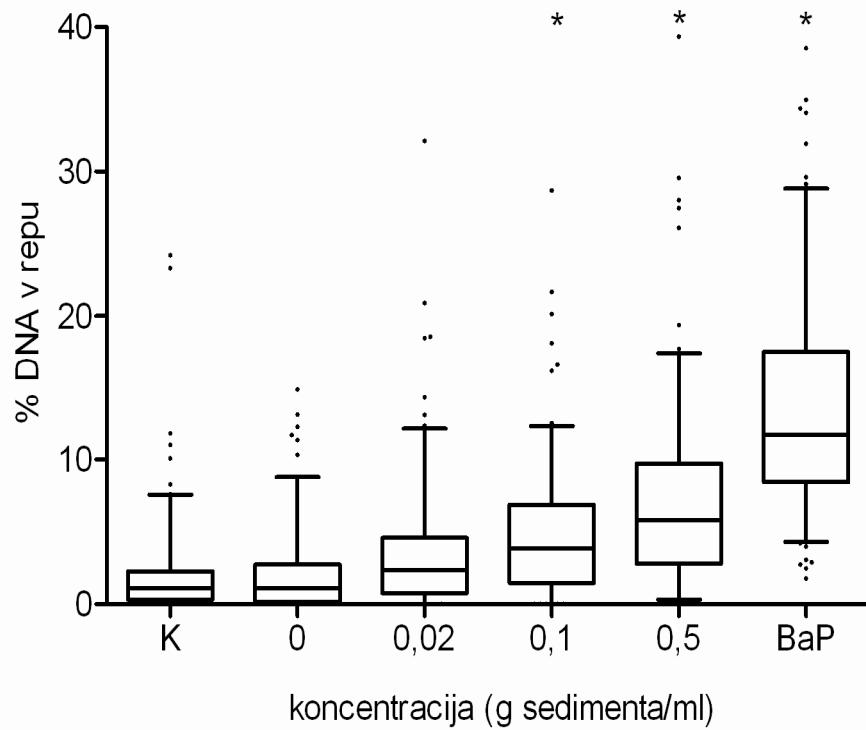
Po izpostavitvi celic vzorcu F smo zaznali statistično značilno povečano število prelomov DNA (genotoksičnost) v primerjavi s kontrolo pri koncentracijah 0.1 in 0.5 g sedimenta/ml.



Slika 22: Določanje genotoksičnega delovanja vzorca K na celicah HepG2 s testom komet

Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili različnim koncentracijam vzorca K (0.02, 0.1 in 0.5 g sedimenta/ml), celice kontrole (K) smo izpostavili samo gojišču, za kontrolo topila (0) smo uporabili 0.5 % DMSO, kot pozitivno kontrolo pa smo uporabili 30 µM B[a]P. Genotoksično delovanje smo ugotavljali s testom komet. Celoten poskus smo izvedli v treh neodvisnih ponovitvah in znotraj poskusa analizirali po 50 jeder. Rezultati so podani kot odstotek DNA v repu in prikazani kot grafikon kvantilov. Robovi boksa prikazujejo prvi in drugi interkvartilni razmik, mediana je črta, ki razmejuje boks. Ročaji grafikona kvantilov predstavljajo 95-ti percentil; * predstavlja statistično značilno razliko glede na kontrolno skupino (test Kruskal-Wallis, $p<0.05$).

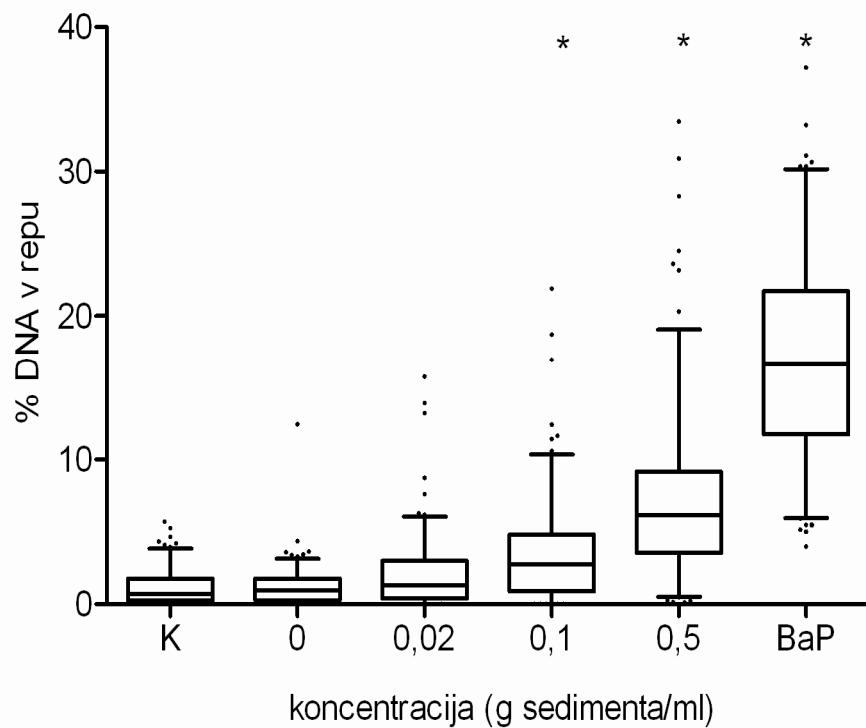
Po izpostavitvi celic vzorcu K smo zaznali statistično značilno povečano število prelomov DNA (genotoksičnost) v primerjavi s kontrolo pri koncentracijah 0.1 in 0.5 g sedimenta/ml.



Slika 23: Določanje genotoksičnega delovanja vzorca KK na celicah HepG2 s testom komet

Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili različnim koncentracijam vzorca KK (0.02, 0.1 in 0.5 g sedimenta/ml), celice kontrole (K) smo izpostavili samo gojišču, za kontrolo topila (0) smo uporabili 0.5 % DMSO, kot pozitivno kontrolo pa smo uporabili 30 μ M B[a]P. Genotoksično delovanje smo ugotavljali s testom komet. Celoten poskus smo izvedli v treh neodvisnih ponovitvah in znotraj poskusa analizirali po 50 jeder. Rezultati so podani kot odstotek DNA v repu in prikazani kot grafikon kvantilov. Robovi boksa prikazujejo prvi in drugi interkvartilni razmik, mediana je črta, ki razmejuje boks. Ročaji grafikona kvantilov predstavljajo 95-ti percentil; * predstavlja statistično značilno razliko glede na kontrolno skupino (test Kruskal-Wallis, $p < 0.05$).

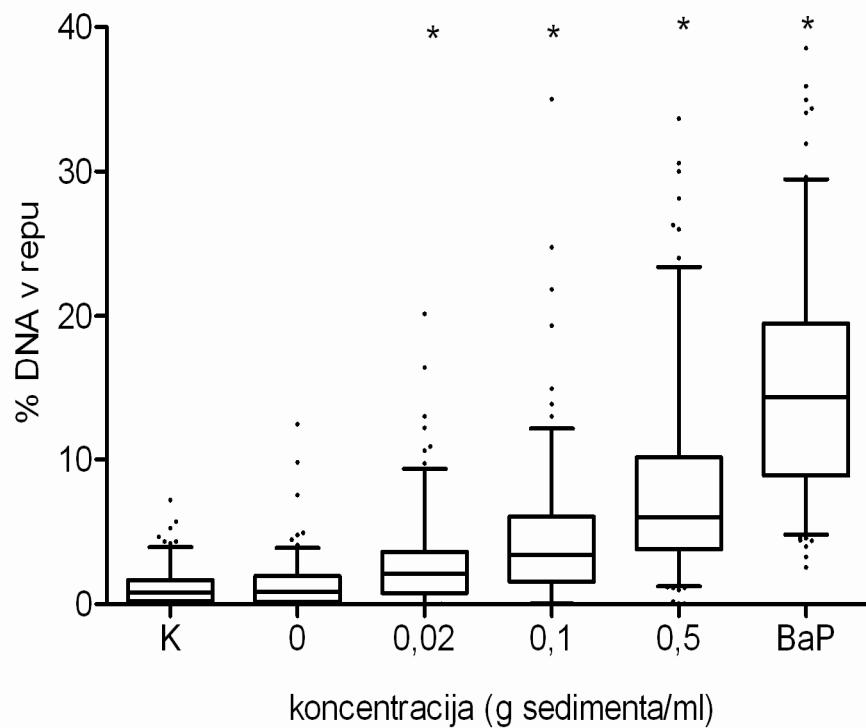
Po izpostavitvi celic vzorcu KK smo zaznali statistično značilno povečano število prelomov DNA (genotoksičnost) v primerjavi s kontrolo pri koncentracijah 0.1 in 0.5 g sedimenta/ml.



Slika 24: Določanje genotoksičnega delovanja vzorca MA na celicah HepG2 s testom komet

Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili različnim koncentracijam vzorca MA (0.02, 0.1 in 0.5 g sedimenta/ml), celice kontrole (K) smo izpostavili samo gojišču, za kontrolo topila (0) smo uporabili 0.5 % DMSO, kot pozitivno kontrolo pa smo uporabili 30 μ M B[a]P. Genotoksično delovanje smo ugotavljali s testom komet. Celoten poskus smo izvedli v treh neodvisnih ponovitvah in znotraj poskusa analizirali po 50 jeder. Rezultati so podani kot odstotek DNA v repu in prikazani kot grafikon kvantilov. Robovi boksa prikazujejo prvi in drugi interkvartilni razmik, mediana je črta, ki razmejuje boks. Ročaji grafikona kvantilov predstavljajo 95-ti percentil; * predstavlja statistično značilno razliko glede na kontrolno skupino (test Kruskal-Wallis, $p<0.05$).

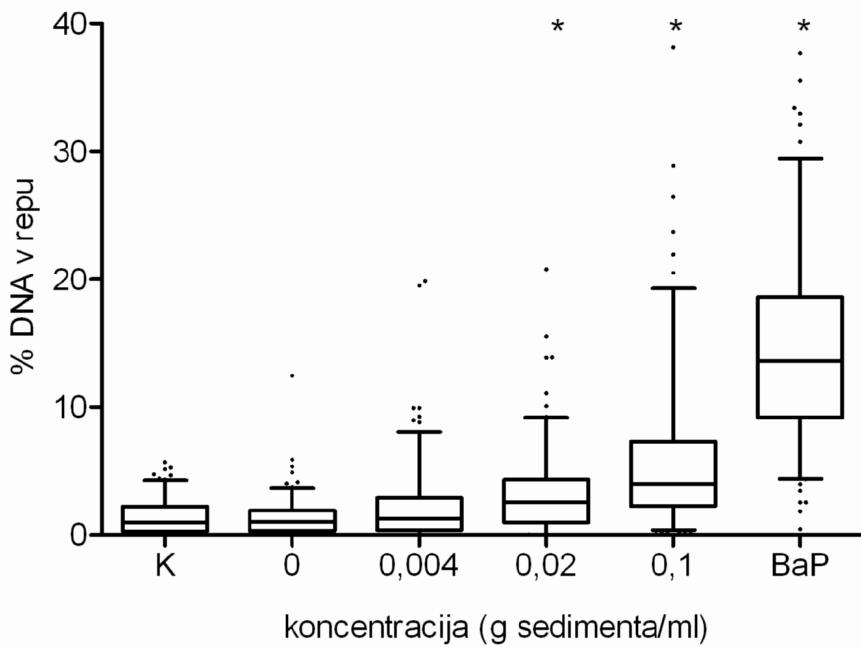
Po izpostavitvi celic vzorcu MA smo zaznali statistično značilno povečano število prelomov DNA (genotoksičnost) v primerjavi s kontrolo pri koncentracijah 0.1 in 0.5 g sedimenta/ml.



Slika 25: Določanje genotoksičnega delovanja vzorca LK4a na celicah HepG2 s testom komet

Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili različnim koncentracijam vzorca LK4a (0.02, 0.1 in 0.5 g sedimenta/ml), celice kontrole (K) smo izpostavili samo gojišču, za kontrolo topila (0) smo uporabili 0.5 % DMSO, kot pozitivno kontrolo pa smo uporabili 30 μM B[a]P. Genotoksično delovanje smo ugotavljali s testom komet. Celoten poskus smo izvedli v treh neodvisnih ponovitvah in znotraj poskusa analizirali po 50 jeder. Rezultati so podani kot odstotek DNA v repu in prikazani kot grafikon kvantilov. Robovi boksa prikazujejo prvi in drugi interkvartilni razmik, mediana je črta, ki razmejuje boks. Ročaji grafikona kvantilov predstavljajo 95-ti percentil; * predstavlja statistično značilno razliko glede na kontrolno skupino (test Kruskal-Wallis, $p < 0.05$).

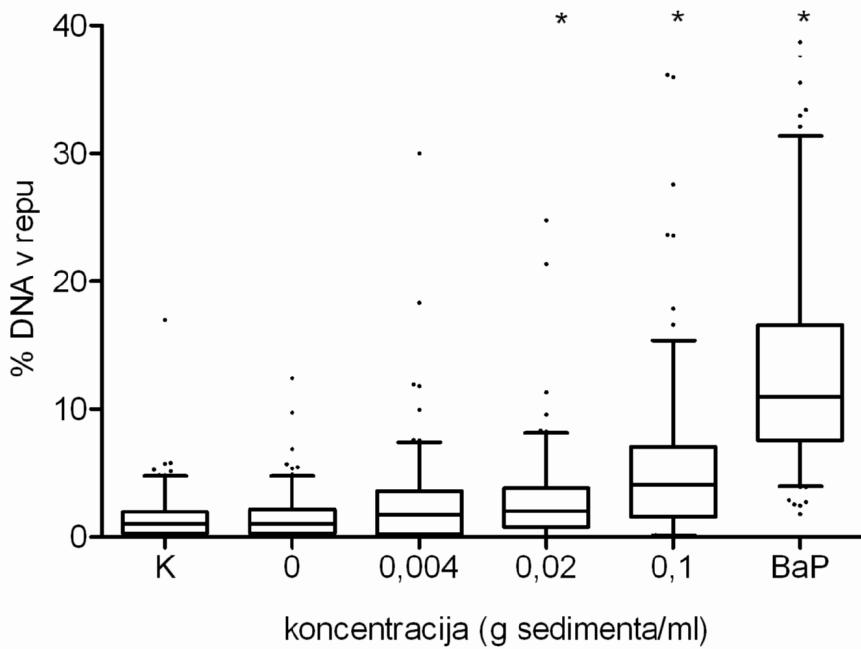
Po izpostavitvi celic vzorcu LK4a smo zaznali statistično značilno povečano število prelomov DNA (genotoksičnost) v primerjavi s kontrolo pri vseh treh koncentracijah vzorca (0.02, 0.1 in 0.5 g sedimenta/ml).



Slika 26: Določanje genotoksičnega delovanja vzorca LK4e na celicah HepG2 s testom komet

Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili različnim koncentracijam vzorca LK4e (0.004, 0.02 in 0.1 g sedimenta/ml), celice kontrole (K) smo izpostavili samo gojišču, za kontrolo topila (0) smo uporabili 0.5 % DMSO, kot pozitivno kontrolo pa smo uporabili 30 μ M B[a]P. Genotoksično delovanje smo ugotavljali s testom komet. Celoten poskus smo izvedli v treh neodvisnih ponovitvah in znotraj poskusa analizirali po 50 jeder. Rezultati so podani kot odstotek DNA v repu in prikazani kot grafikon kvantilov. Robovi boksa prikazujejo prvi in drugi interkvartilni razmik, mediana je črta, ki razmejuje boks. Ročaji grafikona kvantilov predstavljajo 95-ti percentil; * predstavlja statistično značilno razliko glede na kontrolno skupino (test Kruskal-Wallis, $p < 0.05$).

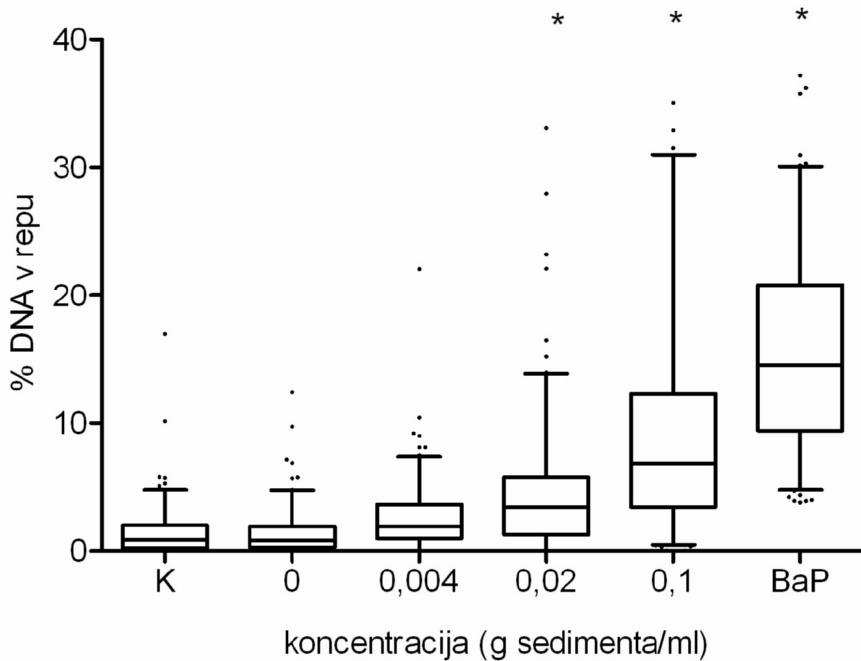
Po izpostavitvi celic vzorcu LK4e smo zaznali statistično značilno povečano število prelomov DNA (genotoksičnost) v primerjavi s kontrolo pri koncentracijah 0.02 in 0.1 g sedimenta/ml.



Slika 27: Določanje genotoksičnega delovanja vzorca LK6 na celicah HepG2 s testom komet

Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili različnim koncentracijam vzorca LK6 (0.004, 0.02 in 0.1 g sedimenta/ml), celice kontrole (K) smo izpostavili samo gojišču, za kontrolo topila (0) smo uporabili 0.5 % DMSO, kot pozitivno kontrolo pa smo uporabili 30 µM B[a]P. Genotoksično delovanje smo ugotavljali s testom komet. Celoten poskus smo izvedli v treh neodvisnih ponovitvah in znotraj poskusa analizirali po 50 jeder. Rezultati so podani kot odstotek DNA v repu in prikazani kot grafikon kvantilov. Robovi boksa prikazujejo prvi in drugi interkvartilni razmik, mediana je črta, ki razmejuje boks. Ročaji grafikona kvantilov predstavljajo 95-ti percentil; * predstavlja statistično značilno razliko glede na kontrolno skupino (test Kruskal-Wallis, $p<0.05$).

Po izpostavitvi celic vzorcu LK6 smo zaznali statistično značilno povečano število prelomov DNA (genotoksičnost) v primerjavi s kontrolo pri koncentracijah 0.02 in 0.1 g sedimenta/ml.



Slika 28: Določanje genotoksičnega delovanja vzorca PM na celicah HepG2 s testom komet

Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili različnim koncentracijam vzorca PM (0.004, 0.02 in 0.1 g sedimenta/ml), celice kontrole (K) smo izpostavili samo gojišču, za kontrolo topila (0) smo uporabili 0.5 % DMSO, kot pozitivno kontrolo pa smo uporabili 30 µM B[a]P. Genotoksično delovanje smo ugotavljali s testom komet. Celoten poskus smo izvedli v treh neodvisnih ponovitvah in znotraj poskusa analizirali po 50 jeder. Rezultati so podani kot odstotek DNA v repu in prikazani kot grafikon kvantilov. Robovi boksa prikazujejo prvi in drugi interkvartilni razmik, mediana je črta, ki razmejuje boks. Ročaji grafikona kvantilov predstavljajo 95-ti percentil; * predstavlja statistično značilno razliko glede na kontrolno skupino (test Kruskal-Wallis, $p < 0.05$).

Po izpostavitvi celic vzorcu PM smo zaznali statistično značilno povečano število prelomov DNA (genotoksičnost) v primerjavi s kontrolo pri koncentracijah 0.02 in 0.1 g sedimenta/ml.

V vseh poskusih smo zaznali statistično značilno povečano število prelomov DNA (genotoksičnost) po izpostavitvi celic pozitivni kontroli (B[a]P).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 Razprava

V diplomski nalogi smo ovrednotili citotoksično in genotoksično delovanje enajstih celokupnih vzorcev morskih sedimentov z različnih lokacij vzdolž slovenske obale. Testirali smo tako vzorce z odprtrega morja kot tudi vzorce odvzete ob obali, torej bliže virom onesnaženja (komunalne in industrijske odplake, pristanišča ipd.). Vzorci z odprtega morja so s sredine Piranskega zaliva (vzorec MA), sredine Tržaškega zaliva (vzorec CZ) in sredine Koprskega zaliva (vzorec K) ter z odprtega morja pri Debelem rtiču (vzorec KK) in približno 2 km od piranske punte (vzorec F). Preostali vzorci so bili odvzeti ob obali: v Luki Koper (LK), v Marini Portorož (vzorec PM) in ob školjčišču na Debelem rtiču (vzorec DB2). V Luki Koper so vzorčili na treh lokacijah. Vzorec LK4a je bil odvzet pred vhodom v 3. bazen Luke Koper, in sicer na površini sedimenta, na istem mestu je bil odvzet tudi vzorec LK4e, le da na globini sedimenta približno 40 cm. Vzorec LK6 je z mesta ob premogovnem terminalu v notranjosti 3. bazena Luke Koper, medtem ko je bil vzorec 14 odvzet ob izlivu reke Rižane v 1. bazenu v Luki Koper.

Za testiranje smo uporabili teste, ki so jih uporabili v številnih drugih študijah, kjer so ugotavljali onesnaženost okoljskih vzorcev, in so se izkazali za primerne biološke teste genotoksične aktivnosti (Žegura s sod., 2009; Bihari s sod., 2006; White in Rasmussen, 1998).

SOS/*umuC* omogoča določanje genotoksičnosti vzorcev, ki v primeru genotoksične aktivnosti povišajo ekspresijo SOS popravljalnega sistema povezanega z genom *umuC* v primerjavi s kontrolo (Wittekindt s sod., 2000), kar podamo z indukcijskim razmerjem.

Test komet je občutljiva metoda, s katero določamo primarne poškodbe DNA (Pra s sod., 2005). V kombinaciji s testom komet se za določanje onesnaženosti okolja z genotoksini uporablajo izolirane celice primernih organizmov ali celične linije (Tice s sod., 2000; Collins, 2004). Za določevanje genotoksičnega delovanja vzorcev sedimentov smo uporabili celično linijo HepG2, ki ima ohranjeno aktivnost metabolnih encimov prve in druge faze pretvorbe ksenobiotikov (Uhl s sod., 2000).

Za določitev genotoksičnosti je pomembno določiti koncentracije, pri katerih vzorci na organizme še ne delujejo akutno toksično (Tice s sod., 2000). Pri bakterijskem SOS/*umuC* testu smo citotoksičnost določili z merjenjem gostote bakterij, ki so bile izpostavljene vzorcem, in bakterij, ki niso bile izpostavljene vzorcem. Za določitev citotoksičnega delovanja vzorcev na celice HepG2 smo uporabili hitri spektrofotometrični test, ki na osnovi redukcije MTT soli v formazan omogoča kvantitativno vrednotenje živosti celic (Mosmann, 1983).

Pri testu SOS/*umuC* z metabolno aktivacijo nobeden izmed vzorcev ni učinkoval genotoksično na bakterije *S. typhimurium*, medtem ko smo pri testu brez metabolne aktivacije zaznali značilno povečano indukcijsko razmerje (IR>2), ki določa genotoksičnost, le pri dveh vzorcih (LK4a in DB2) pri najvišji testirani koncentraciji (12.5 g sedimenta/ml). Pomanjkanje indukcije sistema SOS bi lahko pripisali prisotnosti spojin, ki inhibirajo komponente bakterijskega sistema SOS (Marvin s sod., 2000), ali zgolj nizki vsebnosti onesnažil z genotoksičnim potencialom. Podobne rezultate so dobili tudi Bihari s sod. (2006), v katerih raziskavi noben vzorec sedimenta ni bil genotoksičen. To pripisujejo relativno nizki vsebnosti PAH-ov, prisotnosti SOS inhibirajočih spojin in/ali pomanjkanju benzo[a]pirena na vzorčnem mestu v pristanišču; glavna mutagena aktivnost s premogom in katranom onesnaženih sedimentov je namreč povezana z benzo[a]pirenom (Marvin s sod., 2000).

V drugem delu diplomske naloge smo izvedli dva testa. S testom MTT smo ugotovili, da so vsi vzorci statistično značilno znižali preživetje celic HepG2, ki je bilo odvisno od doze. Pri koncentraciji 2.5 g sedimenta/ml smo izmerili le okrog 10 % preživetje. Vzorec F je deloval najmanj akutno toksično, statistično značilno zmanjšano preživetje celic smo izmerili le pri koncentraciji 2.5 g sedimenta/ml. Pri nižjih dveh koncentracijah (0.1 in 0.5 g sedimenta/ml) se preživetje ni statistično značilno zmanjšalo. Odvezemno mesto F je referenčna postaja, ki je po podatkih Morske biološke postaje ponavadi najmanj onesnažena. Najbolj akutno toksično so na celice HepG2 delovali vzorci LK4e, LK6 in PM, ki so statistično značilno zmanjšali preživetje celo za okoli 50 % pri koncentraciji 0.5 g sedimenta/ml. Rezultat ni presenetljiv, saj sta vzorca LK4e in LK6 iz Luke Koper, PM pa iz Marine Portorož, torej z območij kjer je pričakovati največjo onesnaženost. V Luki

Koper in Marini Portorož je viden vpliv pomorskega oziroma navtičnega prometa. Izmed preostalih vzorcev velja izpostaviti še vzorec CZ, ki je bil nekoliko bolj toksičen v primerjavi z ostalimi vzorci z odprtega morja. Tu gre najbrž za vpliv pristanišča v Trstu, saj je vzorec CZ odvzet s sredine Tržaškega zaliva.

Zanimivo je, da je za vzorca LK4a in 14, ki sta prav tako iz Luke Koper, najvišja koncentracija, pri kateri živost celic ni bila zmanjšana za več kot 30 %, 0.5 g sedimenta/ml (pri ostalih vzorcih iz Luke Koper, LK4e in LK6, ter iz Marine Portorož (PM) je bila ta koncentracija 0.1 g sedimenta/ml). Vzorec LK4a je površinski, LK4e pa je bil odvzet z globine sedimenta okoli 40 cm. Površinski vzorec LK4a je pri koncentraciji 0.5 g sedimenta/ml zmanjšal preživelost le za 20 %, LK4e pa kar za 50 % pri isti koncentraciji. Snovi se nalagajo v sedimente skozi daljše časovno obdobje in tako razkrivajo onesnaževanje v preteklosti (Luoma, 1996). V globljih sedimentih so tako verjetno bolj toksične snovi z daljšo razpolovno dobo, ki so se včasih uporabljale, danes pa je njihova uporaba omejena in jih zato ne najdemo v novejših površinskih sedimentih. Pri tem velja upoštevati tudi, da lahko procesi zamrzovanja in sušenja naravnih sedimentov spremenijo njihove geokemijske lastnosti, kar lahko vodi v spremenjen toksični potencial sedimentov (Geffard s sod., 2004; Schuytema s sod., 1989).

Kot že omenjeno, so PAH-i najbolj razširjena organska onesnažila, prisotna v morjih po vsem svetu. Najvišje koncentracije alifatskih ogljikovodikov (AH) in PAH-ov v sedimentu so bile določene v Luki Koper (LK6) in Marini Portorož (PM), najnižja je bila vsebnost na referenčni postaji (F). Glede na razmerje ogljikovodikov z lihim in sodim številom C atomov lahko sklepamo na pomemben delež alifatskih ogljikovodikov naravnega kopenskega izvora. Predvsem velja to za merilni mestni v estuariju Rižane in v Marini Portorož. Vseeno pa so zelo povišane vrednosti v estuariju Rižane povezane tudi z onesnaževanjem s pomorskim prometom. Sestava PAH-ov kaže na prevladujoč pirogeni izvor, substituirani PAH-i pa kažejo tudi na sicer manj pomemben petrogeni izvor (Turk s sod., 2006). Tudi Bihari s sod. (2006) v raziskavi priobalnih morskih sedimentov na območju Rovinja (Hrvaška) poročajo o največji onesnaženosti ravno v pristanišču. PAH-ov petrogenega izvora niso zaznali, prevladujejo aromatski ogljikovodiki s 4 do 5 obroči, kar kaže na močan pirogeni izvor PAH-ov na vseh vzorčnih mestih.

Rezultati genotoksičnega delovanja, ki smo ga določili s testom komet, razkrivajo največji genotoksični potencial sedimentov z odvzemnih mest v Luki Koper (LK4a, LK4e, LK6) in Marini Portorož (PM), kar je pričakovano, saj je tam onesnaženje s pomorskim prometom in z obale največje. Pri omenjenih vzorcih se je pojavilo statistično značilno povečano število prelomov DNA (genotoksičnost) že pri koncentraciji 0.02 g sedimenta/ml. Vredno je omeniti, da je vzorec 14, ki je prav tako iz Luke Koper, učinkoval genotoksično na celice šele pri koncentraciji 0.1 g sedimenta/ml. Morda je razlog v tem, da je lokacija vzorca 14 ob izlivu reke Rižane, kjer je večji pretok in procesi sedimentacije počasnejši.

Kosmehl s sod. (2007) so raziskovali genotoksičnost sedimentov v reki Ren (Nemčija). Vzorčili so na devetih lokacijah vzdolž Rena na površini sedimenta (0-5 cm) in v globini (do 150 cm). Zanimivo je, da so trije površinski vzorci in le eden globinski delovali genotoksično pri testu komet, kar je v nasprotju z njihovo hipotezo, da so starejši in s tem globlji sedimenti bolj onesnaženi od novejših površinskih. Bodisi so bile plasti starejših sedimentov remobilizirane in zopet nameščene na novejše sedimente (Claus s sod., 2002) bodisi so novejši sedimenti onesnaženi z genotoksičnimi substancami, ki še niso bile določene kot prednostna onesnažila in torej njih uporaba še ni regulirana. Notar s sod. (2001) pa so v svoji raziskavi PAH-ov v Tržaškem zalivu pokazali, da koncentracije PAH-ov upadajo od površine proti globljim plastem sedimentov. Na podlagi teh ugotovitev lahko razlagamo, da se je onesnaženje s PAH-i v Tržaškem zalivu povečalo po prvi, še posebno pa po drugi svetovni vojni (Notar s sod., 2001). V naši raziskavi smo primerjali globinski in površinski sediment le na enem mestu v Luki Koper. Rezultat ni v skladu z omenjeno hipotezo nemških raziskovalcev (Kosmehl s sod., 2007), saj sta oba vzorca, tako globinski (LK4e) kot površinski (LK4a), imela podoben genotoksični učinek pri koncentracijah 0.02 in 0.1 g sedimenta/ml, pri testu SOS/*umuC* brez metabolne aktivacije pa je le površinski vzorec (LK4a) pokazal genotoksični učinek.

Najnižja koncentracija vseh ostalih vzorcev (CZ, DB2, F, K, KK, MA), pri kateri smo zaznali genotoksičnost, je bila 0.1 g sedimenta/ml, torej višja kot pri vzorcih iz Luke Koper in Marine Portorož. To je pričakovano, saj so ta mesta vzorčenja dlje od obale proti odprtemu morju. Notar s sod. (2001) so pokazali, da celokupna koncentracija PAH-ov določenih v sedimentih precej strmo upada z razdaljo od obale.

V primerjavi z ostalimi poseljenimi obalnimi območji po svetu na podlagi izmerjenih vsebnosti PAH-ov v sedimentih smatramo sedimente v Tržaškem zalivu kot nizko do zmerno onesnažene. Prevladujoči vir PAH-ov so procesi izgorevanja ter industrijske in kanalizacijske odplake, manj pomembna so razlitja nafte. Razmerje med pirogenimi in petrogenimi PAH-i se lahko neprestano spreminja zaradi intenzivnega tankerskega prometa v Tržaškem zalivu (Notar s sod., 2001).

V naši nalogi smo testirali kompleksne vzorce morskih sedimentov ter njihov celokupni učinek, zato ne moremo z gotovostjo trditi, katere spojine v vzorcu so povzročile citotoksične in genotoksične učinke. Na podlagi literarnih podatkov smo sklepali, da igrajo zelo pomembno vlogo PAH-i. Njihovo vsebnost v sedimentih sprembla Morska biološka postaja Piran z monitoringi kakovosti morja. Kosmehl s sod. (2007) predpostavlja, da imajo v splošnem pri onesnaženju sedimentov pomembno vlogo tudi spojine, ki niso določene za prednostna onesnažila. Biološki testi pokažejo celokupni učinek vzorcev, zato so še posebej uporabni za analize kompleksnih vzorcev, katerih kemijske sestave ne poznamo natančno. Do sedaj določanje in spremjanje akutno toksičnega delovanja in genotoksičnega potenciala sedimentov ni bilo vključeno v redni monitoring, ki ga izvajajo v okviru kontrole onesnaženosti slovenskega priobalnega morja. Na podlagi rezultatov diplomske naloge predlagamo, naj se tovrstne raziskave v bodoče redno izvajajo, zato naj jih vključijo v program nacionalnega monitoringa. Podatki, ki jih na ta način dobimo, uspešno dopolnjujejo in nadgrajujejo kemijske analize.

5.2 Sklepi

Na podlagi dobljenih rezultatov smo oblikovali naslednje sklepe:

- Pri bakterijskem testu SOS/*umuC* brez metabolne aktivacije S9 sta samo dva vzorca (LK4a in DB2) povišala induksijsko razmerje nad 2 in sta torej genotoksična, pri testu z metabolno aktivacijo S9 pa noben vzorec ni bil genotoksičen.
- Kolorimetrični test MTT se je izkazal kot zanesljivi preliminarni test za določanje preživetja celic HepG2 po izpostavitvi vzorcem. Pri vseh vzorcih smo opazili značilno od doze odvisno zmanjšanje preživetja celic HepG2.
- Z izjemo vzorca 14 so vsi vzorci iz Luke Koper in Marine Portorož pri testu komet učinkovali genotoksično na celice HepG2 že pri koncentraciji 0.02 g sedimenta/ml. Najnižja genotoksična koncentracija preostalih vzorcev je bila 0.1 g sedimenta/ml.
- Izmed vseh vzorčnih mest sta se izkazali kot najbolj onesnaženi Luka Koper in Marina Portorož.
- Biološki testi so se izkazali kot uporaben pokazatelj za določanje onesnaženosti morskih sedimentov.
- Glede na to, da je pri testu komet večina vzorcev delovala genotoksično na sesalske celice HepG2 celo pri mnogo nižjih koncentracijah vzorca, sklepamo, da se bakterijski test SOS/*umuC* ni izkazal kot dovolj občutljiv testni sistem za določanje genotoksičnosti naših vzorcev.

6 POVZETEK (SUMMARY)

Genotoksične snovi povzročajo poškodbe dednega materiala in izpostavljenost tem snovem, tudi če so koncentracije zelo nizke, lahko vpliva na biološko raznolikost, medtem ko pri ljudeh lahko vpliva na povečano pogostnost rakavih obolenj. Med najpomembnejšimi potencialno genotoksičnimi onesnažili, ki se nalagajo v sedimentih, so policiklični aromatski ogljikovodiki (PAH), poliklorirani bifenili, organoklorini pesticidi in težke kovine. Ocena tveganj zaradi prisotnosti toksičnih onesnažil zgolj na osnovi kemijskih analitskih podatkov je nezanesljiva, zato se v analizah onesnaženosti okolja vedno pogosteje uporablajo biološki testi, ki zagotavljajo celostno sliko vplivov onesnažil na okolje. Slovensko morje, ki obsega južni del Tržaškega zaliva, je obremenjeno zaradi goste poseljenosti obale, intenzivnega kmetijstva v zaledju, turizma, bližine pristanišč, pomorskega prometa in izlivov rek. Nekatere raziskave kažejo, da so PAH-i glavna komponenta z mutageno aktivnostjo, prisotna v sedimentih. Nastajajo pri nepopolnem izgorevanju fosilnih goriv, organskih materialov, lesa in kurilnega olja. V morsko priobalno območje vstopajo z razlitji nafte, z industrijskimi odplakami, padavinami in odtoki iz mest. Raziskave kažejo, da so PAH-i lahko prevladujoče, vendar nikakor edine genotoksične spojine v sedimentih.

V nalogi smo želeli s pomočjo bioloških testov ugotoviti, ali so kompleksni vzorci morskih sedimentov, odvzetih na odvzemnih mestih z različno stopnjo in vrsto onesnaženosti, genotoksični. Genotoksični potencial vzorcev smo določili z izbranimi testi: z bakterijskim testom SOS/*umuC* ter s testoma MTT in komet s celicami človeškega hepatoma HepG2.

Test SOS/*umuC* je metoda za določanje genotoksičnosti snovi, predvsem kompleksnih okoljskih vzorcev. Pri testu uporabljamo genetsko spremenjeno bakterijo *Salmonella typhimurium*, sev TA1535/pSK1002, ki nosi združena gena *umuC-lacZ* in tako lahko določamo izražanje gena *umuC* (eden izmed SOS genov) z merjenjem β -galaktozidazne aktivnosti.

Test MTT je kolorimetrični test, s katerim ugotavljamo živost celic po izpostavitvi vzorcem. MTT je rumena vodotopna substanca, ki jo mitohondrijske sukcinat dehidrogenaze metabolno aktivnih celic reducirajo v vijolične nevodotopne kristale formazana. Količina nastalega formazana je sorazmerna s številom živih celic.

S testom komet ugotavljamo genotoksično delovanje vzorcev. Test temelji na merjenju prelomov ene ali obeh verig DNA, ki jih povzročijo genotoksične snovi v vzorcih. Raztopino liziranih celic nanesemo na stekelca z agarozo in jih izpostavimo električnemu polju. Bolj kot je DNA poškodovana, manjši so njeni fragmenti in hitrejše bo njihovo potovanje po gelu proti anodi. Jedra obarvamo z editijevim bromidom in jih analiziramo s pomočjo fluorescenčnega mikroskopa.

Pri testu SOS/*umuC* brez metabolne aktivacije S9 na bakteriji *Salmonella typhimurium*, sev TA1535/pSK1002, sta samo dva vzorca (LK4a in DB2) povišala induksijsko razmerje nad 2, pri testu z metabolno aktivacijo S9 pa noben vzorec ni bil genotoksičen.

Pri testiranju vzorcev s testom MTT je pri vzorcih KK, CZ, K, MA, LK4e, LK6 in PM prišlo do statistično značilnega znižanja preživetja celic glede na kontrolo pri vseh testiranih koncentracijah (0.1, 0.5 in 2.5 g sedimenta/ml oziroma 0.1, 0.5 in 2 g sedimenta/ml pri vzorcu PM). Pri testiranju vzorcev 14, DB2 in LK4a smo opazili statistično značilno znižanje preživetja celic glede na kontrolo pri koncentracijah 0.5 in 2.5 g sedimenta/ml, pri vzorcu F pa le pri najvišji koncentraciji (2.5 g sedimenta/ml). Koncentracija, pri kateri preživetje ni bilo manjše od 70 %, je bila 0.5 g sedimenta/ml pri vzorcih 14, KK, CZ, K, DB2, F, MA in LK4a, pri vzorcih LK4e, LK6 in PM pa je bila 0.1 g sedimenta/ml.

Pri testu komet so vzorci LK4a, LK4e, LK6 in PM delovali genotoksično na celice HepG2 že pri koncentraciji 0.02 g sedimenta/ml, vsi ostali pa pri 0.1 g sedimenta/ml.

Izmed vseh vzorčnih mest sta najbolj onesnaženi Luka Koper in Marina Portorož. Zaradi nevarnih učinkov, ki jih imajo v sedimentih nakopičene genotoksične snovi na človeka in ostale žive organizme, je pomembno, da še naprej spremljamo njihovo prisotnost v okolju ter potencialno biološko aktivnost.

7 VIRI

Aden D. P., Vogel A., Plotkin S., Damjanov I., Knowless B. B. 1979. Controlled synthesis of HbsAg in different human liver carcinoma derived cell line. *Nature*, 282: 615-616

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2002. Molecular biology of the cell 4th ed. Garland Science (Taylor&Francis Group), New York, 274-275

Baird C. 1995. Environmental Chemistry. W.H. Freeman and Company, New York, 276-278

Bihari N., Fafandēl M., Hamer B., Kralj-Bilen B. 2006. PAH content, toxicity and genotoxicity of coastal marine sediments from the Rovinj area, Northern Adriatic, Croatia. *Science of the Total Environment*, 366: 602-611

Boicourt W. C., Kuzmić M., Hopkins T. S. 1999. The Inland Sea: circulation of Chesapeake Bay and the Northern Adriatic. In: Malone T.C., Malej A., Harding Jr. L.W., Smidlaka N., Turner R.E. 1999. Ecosystems at the Land-Sea Margin: Drainage Basin to Coastal Sea, Coastal and Estuarine Studies. American Geophysical Union, Washington, 55: 81-129

Borgmann U., Nowierski M., Grapentine L. C., Dixon D. G. 2004. Assessing the cause of impacts on benthic organisms near Rouyn-Noranda, Quebec. *Environ Pollut*, 129: 39-48

Budzinski H., Jones I., Bellocq J., Pierrad C., Garrigues P. 1997. Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary. *Mar Chem*, 58: 85-97

Burdon R. H. 1999. Genes and the environment. Taylor and Francis, Philadelphia, 13-14, 28-29

Chen G. S., White P. A. 2004. The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review. *Mutat Res*, 567: 151-225

Chiou C. T, McGroddi S. E., Kile D. E. 1998. Partition characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons on soils and sediments. *Environ Sci Technol*, 32: 264-269

Claus E., Tippmann P., Heininger. 2002. Application of differential investigational methods for sediment evaluation. *UWSF-Z Umweltchem Ökotox*, 14: 3-7

Collins A. R., Dobson V. L., Dušinska M., Kennedy G., Štetina R. 1997. The comet assay: what can it really tell us? *Mutation Research*, 375: 183-193

Collins A. R. 2004. The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology*, 26: 249-261

Daskalakis K. D., O'Connor T. P. 1995. Distribution of chemical concentrations in US coastal and estuarine sediment. *Mar Environ Res*, 40: 381-398

Dixon D. R., Pruski A. M., Dixon L. R., Jha A. N. 2002. Marine invertebrate ecogenotoxicology: a methodological overview. *Mutagenesis*, 17: 495-507

Geffard O., His E., Budzinski H., Chiffolleau J. F., Coynel A., Etcheber H. 2004. Effects of storage method and duration on the toxicity of marine sediments to embryos of *Crassostrea gigas* oysters. *Environ Pollut*, 129: 457-465

Gevao B., Jones K. C., Hamilton-Taylor J. 1998. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) deposition to and processing in a small rural lake, Cumbria UK. *Science of the Total Environment*, 215: 231-242

Grant A., Briggs A. D. 2002. Toxicity of sediments from around a North Sea oil platform: are metals or hydrocarbons responsible for ecological impacts? *Mar Environ Res*, 53: 95-116

Gui-Peng Y. 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediments of the South China Sea. *Environ Pollut*, 108: 163-171

Guzzella L., DePaolis A. 1994. Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments of the Adriatic Sea. *Mar Pollut Bull*, 28: 159-165

Hamer B., Bihari N., Reifferscheid G., Zahn R. K., Müller W. E. G., Batel R. 2001. Evaluation of the SOS/*umu*-test post-treatment assay for the detection of genotoxic activities of pure compounds and complex environmental mixtures. *Mutation Research*, 466: 166-171

Hanson P. J., Evans D. W., Colby D. R., Zdanowicz V. S., 1993. Assessment of elemental contamination in estuarine and coastal environments based on geochemical and statistical modeling of sediments. *Mar Environ Res*, 36: 237-266

Hener P., Schiavon M., Morel J. L., Lichtfouse E. 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) occurrence and remediation methods. *Anal Mag*, 25: 56-59

Hornby A. G., Augustijn-Beckers P. W. M. 1991. Handbook on Managing Pesticide Application for Crop Production and Water Quality Protection. IFAS, pub. SS-SOS-03, 1991

Horvathova E., Slamenova D., Hlinčíkova L., Mandal T. K., Gabelova A., Collins A. R. 1998. The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay. *Mutation Research*, 409: 163-171

IARC. 1987. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Overall evaluation of carcinogenicity: an updating of IAPC monographs, vol. 1-42. Lyon, France: International Agency for Research of Cancer, Supl. 7

Jacobs M. N., Covaci A., Schepens P. 2002. Investigation of selected persistent organic pollutants in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*), salmon aquaculture feed, and fish oil components of the feed. Environ Sci Technol, 36: 2797-2805

Kato T., Shinoura Y. 1977. Isolation and characterization of mutants of *Escherichia coli*, deficient in induction of mutations by ultraviolet light. Mol Gen Genet, 156: 121-131

Klaassen C. D. 2001. Casarett & Doull's Toxicology: The basic science of poison (6th edition). McGraw-Hill, New York, 59, 142, 252

Knasmüller S., Parcefall W., Sanyal R., Ecker S., Schwab C., Uhl M., Mersch-Sundermann V., Williamson G., Hietsch G., Langer T., Darroudi F., Natarajan A. T. 1998. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. Mutation Research, 402: 185-202

Kosmehl T., Krebs F., Manz W., Braunbeck T., Hollert H. 2007. Differentiation between bioavailable and total hazard potential of sediment-induced DNA fragmentation as measured by the comet assay with zebrafish embryos. J Soils Sediments, 7 (6): 377-387

Lang V. 1992. Polychlorinated biphenyls in the environment. J Chromatogr, 595 (1/2): 1-43

LaRocca C., Conti L., Crebelli R., Crochi B., Iacobella N., Rodriguez F. 1996. PAH content and mutagenicity of marine sediments from the Venice Lagoon. Ecotoxicol Environ Saf, 33: 236-245

Luoma S. N. 1990. Processes affecting metal concentrations in estuarine and coastal marine sediments. In: Furness R. W., Rainbow P. S. Editors. 1990. Heavy Metals in the Marine Environment. CRC Press, Inc., Boca Raton, 51-66

Luoma S. N. 1996. The developing framework of marine ecotoxicology: Pollutants as a variable in marine ecosystems? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 200: 29-55

Manahan S. E. 2000. Environmental Chemistry, Seventh Edition. Lewis Publishers, CRC Press LLC, 898

Marvin C. H., Mehta S., Lin D., McCarry B. E., Bryant D. W. 2000. Relative genotoxicities of PAH of molecular weight 252 amu in coal tar-contaminated sediment Policy. *Polycycl Aromat Compd*, 20: 305-318

Menichini E., Bocca B. 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbons. V: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (2nd edition). Caballero B. (ur.). Elsevier Science Ltd., 4616-4625

Metzler D. E. 2001. Biochemistry (The chemical reaction of living cells). Harcourt/Academic Press, San Diego, 1583-1584

Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular groeth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65: 55-63

Natarajan A. T., Darroudi F. 1991. Use of human hepatoma cells for *in vitro* metabolic activation of chemical mutagens/carcinogens. *Mutagenesis*, 5: 399-403

Navodila 10G-Pos03-01, MTT test. Laboratorij GEN, Nacionalni inštitut za biologijo.
Pripravila dr. Bojana Žegura

Neff J. M. 1979. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment – sources, fates and biological effects. *Applied Science*, London, 7-33

Notar M., Leskovšek H., Faganeli J. 2001. Composition, distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments of the Gulf of Trieste, Northern Adriatic Sea. *Mar Pollut Bull*, 42: 36-44

Nunoshiba T., Demple B. 1993. Potent Intracellular Oxidative Stress Exerted by the Carcinogen 4-Nitroquinoline-N-oxide. *Cancer Research*, 53: 3250-3252

Ogorelec B., Mišič M., Faganeli J. 1991. Marine geology of the Gulf of Trieste (Northern Adriatic): sedimentological aspects. *Marine Geology*, 99: 79-92

Ogrinc N., Faganeli J., Pezdic J. 2003. Determination of organic carbon remineralization in near-shore marine sediments (Gulf of Trieste, Northern Adriatic) using stable carbon isotopes. *Organic Geochemistry*, 34: 681-692

Olivotti R., Faganelli J., Malej A. 1986. Eutrophication of coastal waters, Gulf of Trieste. *Water Science Technology*, 18: 303-316

Orlando-Bonaca M., Lipej L., Orfanidis S. 2008. Benthic macrophytes as a tool for delineating, monitoring and assessing ecological status: The case of Slovenian coastal waters. *Marine Pollution Bulletin*, 56: 666-676

Pandragi R., Petras M., Ralph S., Vrsoc M. 1995. Alkaline single cell gel (Comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. *Environ Mol Mutagen*, 26: 345-356

Papadopoulou D., Samara C. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbon contamination and Lumistox[®] solvent extract toxicity of marine sediments in the North Aegean Sea, Greece. *Environ Toxicol*, 48: 1255-1261

Porte C., Albaiges J. 1994. Bioaccumulation patterns of hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in bivalves, crustaceans, and fishes. *Arch. Environ Contam Toxicol*, 26: 273-281

Pra D., Lau A. H., Knakievicz T., Carneiro F. R., Erdtmann B. 2005. Environmental genotoxicity assessment of urban stream using freshwater planarians. *Mutation Research*, 585: 79-85

Reifferscheid G., Heil J. 1996. Validation of the SOS/*umu* test using test results of 486 chemicals and comparison with the Ames test and carcinogenicity data. *Mutation Research*, 369: 129-145

Robertson A. 1998. Petroleum hydrocarbons, *AMAP assessment report: arctic pollution issues*, Artic Monitoring and assessment Programme (AMAP). Oslo, Norway, 661-716

Sanudo-Wilhelmy S. A., Flegal A. R. 1992. Anthropogenic silver in the Southern California Bight: A new tracer of sewage in coastal waters. *Env Sci Technol*, 26: 2147-2151

Schiff K., Bay S. 2003. Impacts of stormwater discharges on the nearshore benthic environment of Santa Monica Bay. *Mar Environ Res*, 56: 225-243

Schuytema G. S., Nebeker A. V., Griffis W. L., Miller C. E. 1989. Effects of freezing on toxicity of sediment contaminated with DDT and Endrin. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8: 883-891

Sericano J. L., Atlas E. L., Wade T. L., Brooks J. M. 1990. NOAA's status and trends mussel watch program: Chlorinated pesticides and PCB's in oysters (*Crassostrea virginica*) and sediments from the Gulf of Mexico, 1986–1987. *Mar Environ Res*, 29: 161-203

Sharma M., McBean E. A., Marsalek J. 1997. Source characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons in street and creek sediments. *Water Quality Research Journal of Canada*, 32: 23-35

Shinagawa H., Kato T., Ise T., Makino K., Nakata A. 1983. Cloning and characterization of the *umu* operon responsible for inducible mutagenesis in *Escherichia coli*. Gene, 23: 167-174

Shor L. M., Kosson D. S., Rockne K. J., Jang L. Y., Taghon G. L. 2004. Combined effects of contaminant desorption and toxicity on risk from PAH contaminated sediments. Risk Anal, 24: 1109-1120

Shtereva G. P., Dzhurova B. S., Nikolova T. S. 2004. Contamination of sediments in Varna Lake and Varna Bay. Water Sci Technol, 50: 317-320

Sicre M. A., Marty J. C., Saliot A., Aparacio X., Grimalt J., Albaiges J. 1987. Aliphatic and aromatic hydrocarbons in different sized aerosols over the Mediterranean Sea: occurrence and origin. Atmos Environ, 21: 2247-2259

Singh A. K., Spassova D., White T. 1998. Qualitative analysis of polychlorinated biphenyls, organochlorine insecticides, polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated hydrocarbons and polynitro hydrocarbons in spiked sample of soil, water and plasma by selected ion monitoring gas chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr, B706: 231-244

Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R., Schneider E. L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res, 175: 184-191

Smedes F., de Boer J. 1997. Determination of chlorobiphenyls in sediments – analytical methods. Trends Anal Chem, 16 (9): 503-517

Snyder L., Champness W. 2003. Molecular genetics of bacteria 2nd ed. ASM Press, Washington D. C., 390-394

Solis-Weiss V., Aleffi F., Bettoso N., Rossin P., Orel G., Fonda Umani S. 2004. Effects of industrial and urban pollution on the benthic macrofauna in the Bay of Muggia (industrial port of Trieste, Italy). *Science of the Total Environment*, 328: 247-263

Stegeman J. J., Lech J. J. 1991. Cytochrome P-450 monooxygenase system in aquatic species: Carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. *Environmental Health Perspectives*, 90: 101-109

Stravisi F. 1983. Some characteristics of the circulation in the Gulf of Trieste. *Thalassia Jugoslavica*, 19: 355-363

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

Turk V., Bajt O., Horvat M., Milačič R., Mozetič P., Ramšak A., Malej A. 2006. Kakovost morja in kontrola onesnaženja. Poročilo za leto 2005. Nacionalni inštitut za biologijo, Morska biološka postaja Piran (NIB/MBP)

Uhl M., Helma C., Knasmüller S. 2000. Evaluation of single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (HepG2) cells. *Mutation Research*, 468: 213-225

Vagi M. C., Petsas A. S., Kostopoulou M. N., Karamanolis M. K., Lekkas T. D. 2007. Determination of organochlorine pesticides in marine sediments samples using ultrasonic solvent extraction followed by GC/ECD. *Desalination*, 210: 146-156

Valette-Silver N. J. 1993. The use of sediment cores to reconstruct historical trends in contamination of estuarine and coastal sediments. *Estuaries*, 16: 577-589

Venkatesan M. I. 1988. Occurrence of possible sources of perylene in marine sediments – a review. *Mar Chem*, 25: 1-17

Vondraček J., Machala M., Minksova K., Blaha L., Murk A. J., Kozubik A. 2001.

Monitoring river sediments contaminated predominantly with polycyclic aromatic hydrocarbons by chemical and in vitro bioassay techniques. Environ Toxicol Chem, 20: 1499-1506

White P. A., Rasmussen J. B. 1998. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. Mutat Res 410: 223-236

Wittekindt E., Fischer B. & H., Diedrich P. 2000. Genotoxicity assay: umu-test (ISO/DIS 13829, 2000)

Young L. Y., Cerniglia C. E. 1995. Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals. Wiley, New York

Zietz B. P., Nordholt G., Ketseridis G., Pfeiffer E. H. 2001. Mutagenicity of Baltic seawater and the relation to certain chemical and microbiological parameters. Mar Pollut Bull, 42: 845-851

Zoller U., Plaut I., Hushan M. 2004. The case of the nonionic alkylphenol ethoxylates in the Mediterranean Sea region: is there a problem? Water Sci Technol, 50: 79-84

Žegura B., Filipič M. 2004. Application of in vitro comet assay for genotoxicity testing. V: Methods in pharmacology and toxicology optimization in drug discovery: In vitro methods. Yan Z., Caldwell G. W. (ur.). Totova, New Jersey, Humana press: 301-313

Žegura B., Heath E., Černoša A., Filipič M. 2009. Combination of in vitro bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples. Chemosphere, 75: 1453-1460

ZAHVALA

Najprej se zahvaljujem dr. Bojani Žegura, ki me je potrpežljivo vodila skozi eksperimentalni del mojega diplomskega dela, mi pomagala pri pisanju diplome in bila vedno pripravljena odgovarjati na moja vprašanja.

Hvala mentorici prof. dr. Metki Filipič, ki mi je omogočila opravljanje diplome na Nacionalnem inštitutu za biologijo in popravila diplomsko nalogu.

Hvala recenzentu prof. dr. Mihaelu J. Tomanu in predsedniku komisije prof. dr. Tomu Turku za pregled diplomske naloge.

Hvala doc. dr. Oliverju Bajtu z Morske biološke postaje v Piranu za vzorce morskih sedimentov in mnoge podatke, ki so mi služili pri pisanju diplome.

Mateja, hvala za prevod izvlečka.

Zlatka, hvala za jezikovni pregled naloge.

Matjaž, hvala za pomoč pri računalniškem oblikovanju.

PRILOGA

Rezultati koncentracij poliaromatskih ogljikovodikov (ng/g suhega sedimenta) v sedimentu na postajah obalnega morja Slovenije vzorčevanih 9. oktobra 2008 (prazno polje pomeni pod 1 ng/g).

Parameter	Koda postaje						
	00CZ	0014	00PM	000K	00KK	00MA	000F
Naftalen	6	2		9	8	6	
!-metilnaftalen	7			1		1	
1-etylnaftalen							
Acenaften	5	1	1			1	
Acenaftilen							
Fenantren	44	34	50	43	26	27	36
Antracen	1	3	4	2	2	3	2
Fluoren	17	54	2	6	5	9	3
2-metilfenantren	9	16	6	2	1	9	8
1-metilfenantren	6	17	12	12	36	6	8
Fluoranten	80	40	189	67	39	36	38
Piren	80	39	170	68	33	43	31
3,6-dimetilfenantren							
1-metilpiren	15	4	30	22	19	18	
Perilen							
Krizen	117	99	168	67	35	67	44
Squalan							
Benzo(a)antracen	35	22	64	33	17	19	11
Benzo(b)fluoranten	48	33	82	42	26	21	19
Benzo(k)fluoranten	113	62	199	81	13	54	42
Benzo(e)piren	64	28	67	40	25	48	16
Benzo(a)piren	92	15	99	34	44	52	22
Indeno(1,2,3-c,d)piren	13	20	94	37	53	23	19
Dibenzo(a,h)antracen	25	45	107	42	29	19	32
Benzo(g,h,i)perilen	28	31	52	12	15	18	13
Ločeni aromatski	802	587	1372	618	431	481	370

Luka Koper: LK4a: 438 ng/g; LK4e: 202 ng/g; LK6: 963 ng/g