

Utvrđivanje genotoksičnog potencijala uzoraka sedimenta i površinske vode rijeke Save Ames biotestom

Crnjak, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2009

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:047122>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEU ILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATI KI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

MARTINA CRNJAK

**UTVR IVANJE GENOTOKSI NOG POTENCIJALA UZORAKA
SEDIMENTA I POVRŠINSKE VODE RIJEKE SAVE AMES
BIOTESTOM**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2009. godina

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju, te priprema uzoraka u Laboratoriju za biogeokemiju organskih spojeva, Zavoda za istraživanje mora i okoliša, Instituta „Ruđer Bošković“ u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc.

Tvrtka Smitala. Istraživački dio ovog rada financiran je sredstvima NATO Science for Piece projekta br. SfP 982590 (Assessment of hazardous chemical contamination in the Sava River basin), te projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa RH, br. projekta 098-0982934-2745 (Ekotoksikološko značenje ABC transportnih proteina u vodenih organizama).

Rad je predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer ekologija.

Zahvaljujem dr. sc. Tvrtku Smitalu , voditelju rada, što mi je omogućio izradu diplomskog rada u Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju. I nadalje, veliko hvala na strpljivosti i savjetima tijekom pisanja rada, te preporukama za daljnji rad na području ekologije.

Dr. sc. Branki Pivčević zahvaljujem na podršci, strpljenju i stručnom vodstvu tijekom izrade diplomskog rada.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

UTVRĐIVANJE GENOTOKSIČNOG POTENCIJALA UZORAKA SEDIMENTA I POVRŠINSKE VODE RIJEKE SAVE AMES BIOTESTOM

Martina Crnjak

Laboratorij za molekularnu ekotoksikologiju, Zavod za istraživanje mora i okoliša, Institut
„Ruđer Bošković“, Bijenika 54., Zagreb, Hrvatska

Primarni cilj NATO SFP projekta *Assessment of Hazardous chemical contaminatin in the Sava River basin* bio je razviti i primijeniti suvremeni, tzv. EDA (eng. *effects-directed analysis*) pristup u monitoringu i procjeni rizika od onečišćenja u području bazena rijeke Save.

EDA pristup temelji se na kombinaciju bioloških analiza u obliku bioloških testova toksičnosti (biotestova), i analitičko-kemijskih kromatografskih tehnika, kako bi se ciljano došlo do identifikacije kemikalija odgovornih za toksičnost u inak.

U okviru serije biotestova korištenih u ovom projektu provodio se i Ames test, kao danas najprihvaćeniji test kojim se određuje ima li neka tvar genotoksičnost u inak. Test smo provodili uz pomoć posebno konstruiranih sojeva bakterije vrste *Salmonella typhimurium*, a za detekciju premutagena (tvari koje u procesu bioaktivacije stvaraju mutagene metabolite), prilikom izvođenja testa u pokusnu smjesu smo kao aktivacijski sustav dodavali postmitohondrijsku frakciju jetre štakora.

Rezultati Ames testa jasno su pokazali da analizirani uzorci sedimenata ne posjeduju mutageni potencijal, dok pojedini uzorci površinskih i otpadnih voda pokazuju granične vrijednosti s obzirom na međunarodno prihvaćene kriterije za mutagenost.

(53 stranica, 9 slika, 15 tablica, 25 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska.

Glavne riječi: Ames test/genotoksičnost/biotransformacija/EDA

Mentor: Dr. sc. Tvrтко Smital, viši znanstveni suradnik

Ocjenjivači: Dr. sc. Tvrтко Smital, viši znanstveni suradnik

Dr. sc. Božena Mitić, izvanredni profesor

Dr. sc. Goran Klobučar, doc.

Dr. Zoran Tadić, doc.

Zamjena: Prof. dr. sc. Mladen Kerovec

Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

IDENTIFICATION OF GENOTOXIC POTENTIAL OF SURFACE WATER AND SEDIMENT SAMPLES OF THE SAVA RIVER BY AMES BIOTEST

Martina Crnjak

Laboratory for molecular ecotoxicology, Division for marine and environmental research,
"Ruđer Bošković" Institute, Bijenička 54, Zagreb, Croatia

The main goal of the NATO SfP project entitled *Assessment of Hazardous chemical contamination in the Sava River basin* was to develop and implement a modern, EDA (Effects Directed Analysis) approach customized for monitoring and risk assessment of hazardous chemical contamination in the Sava River basin.

EDA approach uses the combination of biological assays (biotests) and analytical chemical detection and separation technique to direct the identification of contaminants causing toxic effects.

Within a series of biotests used in the project, the Ames bacterial test was applied as the most widely used assay for assessment of mutagenicity of tested compounds or complex environmental samples. Test was performed using genetically modified strains of *Salmonella typhimurium*, and for detection of premutagens (substances that express mutagenicity upon enzymatic bioactivation) the postmitochondrial fraction of rat liver was used as activation system.

Our results clearly showed that the analyzed samples of sediments do not possess the mutagenic potential, while some surface and waste water samples showed threshold values in respect to internationally accepted criteria for mutagenicity.

(53 pages, 9 figures, 15 tables, 25 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central biological library

Key words: Ames test/genotoxicity/biotransformation/EDA

Supervisor: Dr. sc. Tvrтко Smital, Higher Research Associate

Reviewers: Dr. sc. Tvrтко Smital, Higher Research Associate

Dr. sc. Božena Mitić, Assoc. Prof..

Dr. sc. Goran Klobučar, Asst. Prof.

Dr. Zoran Tadić, Asst. Prof.

Replacement: Dr. Mladen Kerovec, Prof.

Thesis accepted:

Sadržaj

Temeljna dokumentacijska kartica	IV
Basic documentation card	V
Sadržaj	VI

1. Uvod

1.1. NATO-ov program: «Znanost za mir»	1
1.2. Značaj rijeke Save	3
1.3. Ekotoksikologija i biotestovi	4
1.3.1. Ekotoksikologija	4
1.3.2. Biotestovi	6
1.3.3. Testovi genotoksičnosti (mutagenosti)	9
1.4. AMES biotest	11
1.5. Unos, biotransformacija i ekskrecija	14
1.5.1. Unos	14
1.5.2. Biotransformacija	15
1.5.3. Ekskrecija	21
1.6. Cilj istraživanja	22

2. Materijali i metode

2.1. Instrumenti i pribor	23
2.2. Kemikalije	24
2.3. Pokusni organizmi	24
2.3.1. Soj <i>Salmonella typhimurium</i> TA 98	24
2.3.2. Štakori	25
2.4. Prikupljanje i priprema okolišnih uzoraka	26
2.4.1. Lokacije i načini prikupljanja uzoraka	26
2.4.2. Postupak pripreme uzoraka vode	30
2.4.3. Postupak pripreme uzoraka sedimenta	31
2.4.4. Naknadna priprema uzoraka vode	32
2.4.5. Naknadna priprema uzoraka sedimenta	34

2.5. Priprava postmitohondrijske frakcije jetre induciranih štakora	35
2.6. Priprema uzoraka	36
2.7. Priprava Petrijevih zdjelica s minimalnom podlogom	36
2.8. Priprava bakterijske suspenzije	36
2.9. Priprava top agara	36
2.10. Priprava aktivacijske smjese S9 mix	37
2.11. Test na mutagenu aktivnost	37
2.11.1. Testiranje uzoraka bez metaboli ke aktivacije	37
2.11.2. Testiranje uzoraka uz metaboli ku aktivaciju	38
2.12. Pozitivna i negativna kontrola	38
2.13. Obrada podataka	39
3. Rezultati	
3.1. Analiza podataka dobivenih testiranjem uzoraka sedimenta	40
3.1.1 Testiranje uzoraka sedimenta na direktnu mutagenost	40
3.1.2. Testiranje uzoraka sedimenta uz metaboli ku aktivaciju	42
3.2. Analiza podataka dobivenih testiranjem uzoraka vode uz metaboli ku aktivaciju	44
4. Rasprava	
4.1. EDA protokol	46
4.2. Odre ivanje mutagenog potencijala	47
4.3. Mutageni potencijal uzoraka sedimenata i površinske vode rijeke Save	48
5. Zaklju ci	50
6. Literatura	51

1. UVOD

1.1. NATO-ov program: «Znanost za mir»

U okviru velikog međunarodnog znanstvenoistraživačkog programa pod pokroviteljstvom NATO-a pod nazivom «Znanost za mir» (<http://www.nato.int/science/index.html>) započela je međunarodna suradnja norveških i hrvatskih znanstvenika na projektu naziva *Assessment of Hazardous chemical contamination in the Sava River basin*. Ključni partner s norveške strane pri tome je Norveški institut za istraživanje voda (*Norwegian Institute for Water Research – NIVA*; Oslo, Norveška), dok je s hrvatske strane to Institut „Ruđer Bošković“ (IRB) iz Zagreba (više o Projektu na Internet adresi <http://www.irb.hr/nato-savariver/>).

Primarni cilj ovog projekta jest razviti mehanizme nadgledanja (monitoringa) i identifikacije koji bi omogućili sveobuhvatnu procjenu štetnih i opasnih kemijskih onečišćenja u rijeci Savi. Tako procijenjeni rizik služio bi kao znanstveni temelj za kvalitetno, ekonomski učinkovito upravljanje vodnim resursima, kako u Hrvatskoj tako i u ostalim državama regije, odnosno savskog područja.

Ostvarenje zadanih ciljeva bit će omogućeno razvitkom i primjenom modernog, tzv. EDA (eng. *effects-directed analysis*) pristupa u monitoringu i procjeni rizika od onečišćenja posebno prilagođenog za rijeku Savu.

Tradicionalno, identifikacija uzročnika toksičnosti u opasnoj (onečišćenja ili zagađenja) isključivo se oslanjala na metode analitičke kemije. No, interakcije među toksikantima, sve češća pojava višestrukih onečišćivača, nedostatak podataka o toksičnosti za promatrane parametre ili jednostavno pogrešan odabir kemikalija koje su cilj analitičkog određivanja, čine metode analitičke kemije same po sebi ograničenima i nedostatnima za davanje vjerodostojnih informacija o biološki relevantnoj izloženosti potencijalno toksičnim zagađivačima.

Iz tog razloga, danas u svijetu najprihvaćeniji pristup u rješavanju tog problema, kako sa znanstvenog, tako i sa stanovišta regulative, jest razviti i/ili usvojiti odgovarajuće EDA protokole, kako bi se utvrdile veze između biološki relevantne izloženosti, tj. vjerojatnog toksičnosti u opasnoj, i identiteta i koncentracije kemikalija prisutnih u okolišu. EDA protokol oslanja se na kombinaciju bioloških analiza u obliku bioloških testova toksičnosti (biotestova), te analitičko-kemijskih kromatografskih tehnika, kako bi se ciljano došlo do identifikacije kemikalija odgovornih za toksičnost u opasnoj. Udruživanje kemijskih analiza s biotestovima nudi

relativno bržu i pouzdaniju informaciju o toksičnosti od one temeljene samo na kemijskoj analizi, te omogućuje fokusiranje analitičkih obrada na uzorke koji pokazuju toksično djelovanje, čak i ako toksična tvar nije na popisu do sada poznatih onesuštivača.

Uzimajući u obzir sadašnje stanje okolišnog monitoringa u Hrvatskoj, u okviru usvajanja i prilagodbe EDA protokola ključni ciljevi Projekta su modificirati i poboljšati kemijske metode ekstrakcije i analitičke detekcije, te standardizirati skupinu *in vitro* biotestova koji bi obuhvatili testove različitih oblika toksičnosti na više trofičkih razina, uz što manje žrtvovanje pokusnih životinja.

Pored razvijanja i implementacije odgovarajućih EDA protokola glavni ciljevi projekta su:

- Identificirati i odabrati kritične lokacije na rijeci Savi, na dijelu toka od granice sa Slovenijom do granice s Bosnom i Hercegovinom, te na tim lokacijama sakupiti okolišne uzorke (uzorke otpadnih voda, površinske vode i riječnih sedimenta) koji će se testirati prema EDA protokolu;
- Poboljšati postojeće uređaje i opremu za analizu u suradnji s laboratorijima IRB-a i razviti nove, ili optimizirati već prokušane kemijske metode i biotestove koji su potrebni za provedbu EDA protokola;
- Identificirati najzastupljenije, te potencijalno najopasnije kategorije organskih zagađivala u rijeci Savi;
- Razviti i standardizirati pouzdane EDA postupke za identifikaciju opasnih onesuštivača u različitim tipovima uzoraka/medija (vode, sedimenta, otpadne vode) rijeke Save, te njihovo vrednovanje prema (eko)toksikološkom riziku;
- Prenošenje stručnog znanja o primjeni EDA protokola obuhvaćanjem mladih hrvatskih znanstvenika s IRB-a na norveškom institutu NIVA;
- Širenje stečenog znanja prema svim potencijalnim korisnicima EDA protokola u Hrvatskoj i široj regiji koja gravitira savskom i dunavskom bazenu, zemljama kroz godišnje sastanke i međunarodne radionice koje će se održavati po završetku Projekta.

1.2. Značaj rijeke Save

U usporedbi sa situacijom u Zapadnoj Europi, ključni okolišni problem karakterističan za sve tranzicijske zemlje savskog i dunavskog porječja, predstavlja ispuštanje netretiranih komunalnih i industrijskih otpadnih voda u okoliš, posebice u rijeke. Industrijski objekti, komunalna naselja, ali jednako tako i brojni vojni objekti u regiji, uglavnom se u smislu tretmana otpadnih voda baziraju na zastarjeloj i ekološki neprihvatljivoj tehnologiji. Budući da se opskrba pitkom vodom u savskom porječju gotovo isključivo temelji na aluvijalnim rezervoarima visoko kvalitetne podzemne vode, koji su pod izravnim utjecajem Save, procjena mogućih štetnih utjecaja kemijskog onečišćenja na Savu i zalihe pitke vode od velike je važnosti.

Na žalost, sadašnje tehnike koje se u Hrvatskoj koriste za nadgledanje (monitoring), te identifikaciju potencijalnih štetnih tvari, ograničene su u svojoj sposobnosti da detektiraju i odrede tvari koje pripadaju novijim skupinama potencijalnih onečišćivača, a za koje se danas zna da imaju negativan biološki utjecaj na okoliš i organizme u njemu (npr. farmaceutski proizvodi, proizvodi za osobnu njegu, ksenobiotici i endokrini modulatori, aditivi i sl.). Takvim podcjenjivanjem mogućeg negativnog utjecaja tvari koje ne pripadaju skupini primarnih onečišćivača dovode se u pitanje ljudsko zdravlje i opstanak riječnih ekosustava.

Osnovni razlozi zašto bi u interesu svih država savskog porječja trebalo biti da se na rijeci Savi uspostave kvalitetan monitoring i identifikacija onečišćivača, koji omogućuju pravodobnu i ciljanu intervenciju u slučaju potrebe, sažeti su u ovim činjenicama:

- Sava predstavlja prirodnu sjeverozapadnu granicu balkanskog poluotoka. Preko Dunava, Sava pripada crnomorskom slivu, te ujedno predstavlja najdužu desnu pritoku Dunava i drugu najdužu ukupno. U bivšoj Republici Jugoslaviji, Sava je bila najduža rijeka koja je cijelim tokom pripadala tada jednoj državi, no nakon raspada Jugoslavije Sava danas protječe kroz četiri države: Sloveniju, Hrvatsku, Bosnu i Hercegovinu i Srbiju. Područje koje zauzimaju Sava i njezine pritoke (95.719 km²) čini 40% od ukupne površine i više od 80% od ukupne količine pitke vode dostupne za navedene države;
- Rijeka Sava povezuje tri europska glavna grada: Ljubljanu (SLO), Zagreb (HR) i Beograd (SRB). Nakon Ljubljane, Sava protječe kroz gusto naseljena i visoko industrijalizirana područja između Slovenije i Hrvatske. Nakon Zagreba, Sava teče prema

Jasenovcu gdje postaje grani na rijeka izme u Bosne i Hercegovine i Hrvatske. Na putovanju kroz Srbiju, Sava ulazi u Beograd gdje se ulijeva u Dunav;

- Dužina toka Save koji prolazi kroz Hrvatsku iznosi 518 km, dok površina drenažnog područja koje Sava i njezine pritoke pokrivaju iznosi 25 000 km². 50% stanovnika (2 340 000) od ukupne populacije ljudi u Hrvatskoj naseljeno je duž obala Save. Zalihe pitke vode mnogih hrvatskih gradova, uključujući i Zagreba, potiču na bogatim izvorima podzemnih voda iz aluvijalnih rezervoara duž rijeke Save. Konkretno, Sava svojim poplavama utječe na 5 000 km² izrazito plodne zemlje (dolina Save);
- Od Siska do Beograda Sava je plovna (593 km), te je nakon Domovinskog rata (1991. – 1995.) ponovno otvorena za međunarodni promet. Dolina Save je također i prirodni put za kopneni promet koji uključuje željeznicu i auto-cestu Ljubljana-Zagreb-Beograd, te regionalne rute za plinovode i naftovode od Hrvatske do Srbije.

Poznavaju i ove činjenice, monitoring i pravodobna reakcija izrazito su bitni kako bi se na vrijeme spriječio širenje zagađenja (onečišćenja) preko državnih granica, jer tada to postaje međunarodni ekološki, ali i politički problem.

1.3. Ekotoksikologija i biotestovi

1.3.1. Ekotoksikologija

Termin ekotoksikologija uveo je 1969. godine René Truhaut za novu znanstvenu disciplinu koju je definirao kao „dio toksikologije koji se bavi proučavanjem toksičnih učinaka prirodnih ili sintetičkih onečišćivača na dijelove ekosustava, životinje, biljke, mikroorganizme i ljude” (Truhaut, 1977).

Definicija koja se danas najčešće koristi određuje **ekotoksikologiju** kao znanstvenu disciplinu koja proučava izravni ili neizravni učinak ksenobiotika na ekosustav, na sve žive organizme i njihovu organizaciju, odnos prema neživoj tvari, međusobne odnose i odnos prema okolišu (Juany, 1979).

Knjiga *Silent Spring* Rachel Carson iz 1962. godine, u kojoj naglašava opasnosti od dugotrajnog korištenja tzv. perzistentnih organskih zagađivača (eng. *persistant organic pollutants* – POPs),

naročito pesticida DDT-a, ubrzala je odvajanje okolišne toksikologije i posljedice ekotoksikologije od klasične toksikologije. Revolucionaran dio njezinog rada bila je ekstrapolacija štetnih utjecaja od razine organizma na razinu ekosustava, kojom je pokazala kako negativan utjecaj na razini organizma može uzrokovati poremećaj prirodne ravnoteže cijelog ekosustava (Bazerman i sur., 2006).

Ekotoksikologija je sintetička znanost koja u sebi obuhvaća i dijelove drugih znanstvenih disciplina kao što su ekologija, toksikologija, fiziologija, molekularna biologija, analitička kemija. Konačni cilj sveobuhvatnih ekotoksikoloških istraživanja jest omogućiti znanstvenicima da sa što većom točnošću predviđaju raznolike utjecaje onečišćenja na ekosustav. U slučaju ekoloških nesreća ili kod kronično zagađenih ekosustava, znanstvenici bi na temelju takvih istraživanja mogli preporučiti najučinkovitije mjere za uklanjanje uzroka onečišćenja i vraćanje ekosustava u prvobitno (prirodno) stanje prije onečišćenja.

Za bolje razumijevanje ekotoksikologije bitno je razlikovati pojam onečišćenja od pojma zagađenja, te pojmove otrov, ksenobiotik i toksikant. Stoga u ovdje navesti nekoliko danas općeprihvaćenih definicija za navedene pojmove.

Onečišćenje (eng. **contamination**) - prisustvo bilo koje tvari na mjestu, u vremenu ili u koncentraciji koja nije «normalna» za ekosustav. Međutim, to prisustvo tvari nije (još) uzrokovalo nikakvu štetu organizmima i/ili okolišu, a ta se tvar naziva **onečišćivač** (eng. **contaminant**).

Zagađenje (eng. **pollution**) - pretpostavlja štetu bilo koje vrste nanesenu ekosustavu. Uzročnik zagađenja (**zagađivač**; eng. **pollutant**) može biti kemijska tvar ili energija (buka, svjetlosna ili toplinska energija).

Otrov - tvar prirodnog ili sintetskog podrijetla i/ili proizvodi dobiveni od te tvari, koji uneseni u organizam ili u dodiru s njim mogu ugroziti zdravlje i život organizma, ili štetno djelovati na okoliš.

Ksenobiotik (gr. *xènos* – stran, *bios* – život) je tvar strana biološkom sustavu, tvar koja za organizam nema nikakvu energetske (nutritivnu) ili strukturnu (građevnu) vrijednost, a predstavlja potencijalni otrov.

Toksikant - otrovni ksenobiotik.

1.3.2. Biotestovi

Jedno od oruđa koja se koriste u ekotoksikološkim istraživanjima, posebice u okviru monitoringa, tj. biomonitoringa različitih ekosustava (površinskih i otpadnih voda, te morskih i kopnenih ekosustava) jesu **biotestovi**.

Pojam **biotestovi, ili laboratorijski testovi toksičnosti** u užem smislu riječi, označava istraživanje djelovanja okolišnih uzoraka (vode, sedimenta, tla...) ili određene kemikalije na organizme/stanice u kontroliranim uvjetima, tj. u laboratoriju.

Biotestovima se u širem smislu riječi smatraju eksperimentalne metode za određivanje granice vrijednosti tolerancije pri izlaganju odabranih bioloških modela – test organizama – utjecaju različitih toksičnih tvari.

Možda najstariji i najpoznatiji biotest je test s kanarincem kojega su rudari nosili sa sobom u rudnike kako bi se osigurali ukoliko je u rudniku bio prisutan metan. Kanarinci su osjetljiviji na metan od ljudi, stoga su u slučaju da kanarinac uginje rudari znali da trebaju što prije napustiti rudnik.

Biotestove dijelimo na **dinamične i statične**.

U **dinamičnim (kontinuiranim) biotestovima**, testni organizam izlaže se testnom mediju, npr. riječnoj vodi, kontinuirano ili periodično u ciklusima od po nekoliko minuta. Promjene u metabolizmu, ponašanju ili fiziološkim parametrima testnih organizama koje su inducirane subletalnim uinkom zagađivala, mjere se sustavom automatske detekcije.

Pojam «**biomonitoring**» podrazumijeva da je glavna svrha takvog «biološkog nadgledanja», koje uključuje izlaganje testnih organizama u prirodnim ekosustavima, na vrijeme uočiti i identificirati biološke uinke i promjene uzrokovane kombiniranim djelovanjem zagađivala. Uključivanje kontinuiranih biotestova u praćenje emisija vrstih, tekućih i plinovitih tvari, aerosola i energije u okoliš; te emisija (unos) štetnih tvari u biosferu; ili u praćenje koncentracija tvari ispuštenih u određenom vremenu i na određenom mjestu u okoliš, nudi mogućnost više-manje konstantnog nadgledanja ekosustava u nekom vremenu, što je od osobite važnosti kad su u pitanju dinamični ekosustavi poput rijeka.

U praćenju emisija, kontinuirani biotestovi prvenstveno služe kao sustavi upozorenja, koji npr. upućuju na povećanu koncentraciju zagađivala uzrokovanu slučajnim otpuštanjem, iznad koncentracije koja je uobičajena za taj vodeni ekosustav. Kombinirani s kemijskim analizama i

podrobnijim biološkim pregledima, kontinuirani biotestovi mogu poslužiti kao dokaz o ekološkim nesrećama, te ilegalnim ispuštanjima opasnih tvari u okoliš.

Korišteni u svrhu praćenja emisija dinamični biotestovi, zajedno sa standardiziranim laboratorijskim biotestovima, nadopunjavaju monitoring, kao sredstva za kontinuiranu procjenu kvalitete vodenih ekosustava.

Statični (laboratorijski) biotestovi podrazumijevaju izlaganje testnog organizma utjecaju testnog medija (uzorak iz okoliša ili kemikalija) određeno vrijeme (npr. 24 ili 48 h) kako bi se utvrdili biološki učinci djelovanja medija na organizam. U pravilu, tijekom ovakvih akutnih biotestova ne dolazi do promjena u testnom mediju (npr. promjena koncentracije).

Danas je poznat niz laboratorijskih metoda koje služe za ispitivanje toksičnosti, a izbor test organizama ovisi ne samo o vrsti ispitivanog medija već i o svrsi samog testa, osjetljivosti vrste prema toksičnoj tvari i čimbenicima koji se prate, ekološkom značenju vrste (karakteristične za ispitivani ekosustav), poznavanju životnog ciklusa vrste, ali i tehničkim i stručnim mogućnostima laboratorija.

Kod različitih biotestova, ovisno o test organizmu i vrsti toksičnosti koja se mjeri (akutna toksičnost, kronična toksičnost, specifična toksičnost poput genotoksičnosti, endokrine modulacije i sl.), prate se različiti biomarkeri (učinka, izlaganja, osjetljivosti) koji ukazuju na interakciju između biološkog sustava i potencijalno štetnog kemijskog (fizikalnog ili biološkog) agensa.

Najčešće korišteni test ispitivanja **akutne toksičnosti** je praćenje stupnja mortaliteta. Svrha takvih testova toksičnosti jest da se odredi koncentracija toksikanta koja je letalna za 50% organizama određene vrste unutar određenog vremenskog razdoblja, a definira se kao srednja letalna koncentracija (LC50). Prema trajanju izlaganja razlikuje se 24-satna LC50, 96-satna LC50 itd.

S ekološkog stajališta narušena fiziologija, sterilnost ili promjene ponašanja mogu imati istu konačnu učinak na populaciju kao i brzo ugibanje jedinki. Stoga se danas u brojnim slučajevima za ekološki relevantnu procjenu toksičnosti, pored klasičnih *in vivo* ili *in situ* određivanja, sve više koriste **in vitro testovi** (Tablica 1.) na bakterijama, bakteriofagima, jednostaničnim algama, specifičnim sojevima kvasaca, stanicama višestaničnih organizama itd. Ovi testovi svakako imaju značajne prednosti, kao što su jednostavnost i brzina, relativno niska cijena, izbjegavanje žrtvovanja pokusnih organizama, jasan mehanizam toksičnosti i sl. No, da bi se dobio potpuniji uvid u dugoročne posljedice koje na organizme ostavlja kronično izlaganje zagađivačima u prirodnom okolišu, u mnogim je slučajevima izlaganje i žrtvovanje organizama neizbježno.

Tablica 1. Neki od poznatijih i češće korištenih kratkotrajnih laboratorijskih biotestova za testiranje okolišnih uzoraka.

NAZIV TESTA	TEST ORGANIZAM	PRINCIP TESTA
Test akutne toksičnosti – Daphnia test, te izvedenice tog testa s drugim testnim organizmima	<i>Daphnia magna</i> Straus (Crustacea); <i>D. pulex</i> ; <i>Ceriodaphnia dubia</i> ; <i>Artemia salina</i>	Slatkovodni razi / inhibicija pokretljivosti – optičko opažanje mortaliteta gravidnih jedinki
Microtox™; BIOTOX™; ToxAlert; LUMISTox	<i>Photobacterium phosphoreum</i> (dr. Lange LUMISTox luminous Bacteria, LCK480); <i>Vibrio fischeri</i>	Luminiscentna bakterija / inhibicija emitiranja svjetlosti
Testovi toksičnosti na morskim algama	<i>Ceramium strictum</i> ; <i>C. tenuicorne</i> ; <i>Phaedactylum tricornutum</i>	Morske alge / inhibicija rasta
Testovi toksičnosti na slatkovodnim algama	<i>Senedesmus subspicatus</i> ; <i>Selenastrum capricornutum</i> ; <i>Chlorella vulgaris</i>	Planktonske slatkovodne alge / inhibicija rasta
Yeast Toxicity Test YTT (Dvoraček, Stilinović, 1997)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Kvaševne gljivice / inhibicija fermentacije i smanjenje količine nastalog CO ₂
AMES test – test za detekciju genotoksičnosti	<i>Salmonella typhimurium</i> sojevi TA 100, TA 1535, TA 98, TA 1537, TA 1538	Sojevi bakterija his ⁻ / broje se kolonije revertanata izrasle na podlozi s manjkom histidina

Test inhibicije rasta zelene alge	<i>Raphidocelis subcapitata</i> ; <i>Scenedesmus subspicatus</i>	Zelene alge / procjena biomase – optička gustoća, klorofil; fiziološki procesi – fotosinteza, disanje...
US EPA test; OECD test; Lemna test	<i>Lemna minor</i> , <i>L. gibba</i> , <i>L. trisulca</i> ; <i>Eloidea canadensis</i> ; <i>Spirodela ptyrrhiza</i> ; <i>Wolfia arrhiza</i>	Viša biljka / izgled, prirast, konc. fotosintetskih pigmenata, pojava stresnih proteina...
Allium test – procjena uinka kemikalija na genom viših biljaka	<i>Allium cep</i> ; <i>A. sativum</i> ; <i>A. fistulosum</i> ; <i>Vicia faba</i>	Viša biljka / analiza kromosomskih i mitotskih aberacija

1.3.3. Testovi genotoksičnosti (mutagenosti)

Među brojnim testovima od posebnog su interesa za javnost testovi **genotoksičnosti**.

Epidemiološke studije o utjecaju kancerogenih tvari (genotoksina) na čovjeka u pravilu su dugotrajne, a eksperimenti na životinjama vrlo su skupi. Stoga se zadnja dva desetljeća razvijaju jeftiniji i relativno brzi tzv. kratkotrajni (eng. *short term*) testovi za procjenu genotoksičnosti. Premda ih je razvijeno oko stotinu, koji kao pokusne objekte koriste biološke sustave od bakteriofaga do sisavaca, manje od 20 ih je u redovitoj uporabi (IPCS, 1985). Razlog za to je činjenica što testiranje okolišnih uzoraka na mutagenost nije jednostavno i biotestovi osmišljeni za tu svrhu moraju zadovoljiti određene kriterije:

- Takvi biotestovi moraju biti dovoljno osjetljivi da detektiraju ponekad vrlo niske, a opet dovoljno visoke koncentracije mutagenih spojeva da uzrokuju genetska oštećenja;
- Testni organizmi moraju biti sposobni preživjeti dugo vremena nakon kontakta s uzorkom, što znači da ako se primjerice testira uzorak morske vode, bilo bi idealno da testni organizam bude morska bakterija. Samim time, velika bi prednost bila testni

organizam s velikom tolerancijom na različite okolišne uvjete, no to je teško postići i ukoliko želimo da je organizam ujedno i vrlo osjetljiv na mutagene tvari;

- Test bi trebao biti jednostavan za izvođenje jer se otkrivanje moguće simultano testiranja velikog broja uzoraka;
- I ne manje važno, test ne bi trebao biti odviše skup i složen za izvođenje. To je od posebne važnosti za zemlje u razvoju u kojima bi zaštita okoliša i monitoring trebalo znatno unaprijediti, a sredstva za ostvarenje tih ciljeva su ograničena.

Kratkotrajni testovi za detekciju kemijskih kancerogena temelje se na postavci da genotoksini specifično reagiraju sa, mijenjaju, izazivaju popravak, ometaju replikaciju ili na neki drugi način utječu na strukturu i funkciju DNA, te da izmeđ u navedenih genotoksinih učinaka i njima izazvanih štetnih posljedica (tumora) postoji određena korelacija (Parodi i sur., 1991). Osnovni principi mutageneze zajednički su svim organizmima, što znači da ako se neka tvar pokazala mutagenom na jednom tipu stanica, također se smatra mutagenom i za sve ostale tipove stanica. Upravo zbog te činjenice, testovi za procjenu mutagenog učinaka često se izvode na prokariotskim organizmima (uglavnom posebno modificiranim bakterijskim sojevima). Rezultati dobiveni na bakterijskim stanicama lako se ekstrapoliraju na eukariotske stanice (uključujući i ljudske), prokariotske stanice rastu znatno brže nego eukariotske, njihova kultivacija je jednostavnija i jeftinija, i genetska manipulacija prokariotskih stanica znatno je jednostavnija nego kod eukariotskih stanica.

Pojava tumora je kompleksan slijed genetski determiniranih događaja, čija ekspresija ovisi o nizu epigenetskih promjena. Iako kratkotrajnim testovima možemo utvrditi samo promjene na genomu stanice, a ne i promjene vezane uz diferencijaciju, proliferaciju i klonalnu ekspanziju stanica, ovi testovi ipak daju vrijedan doprinos prvoj procjeni mogućeg genotoksičnog rizika.

1.4. AMES biotest

Ames test je standardizirani test za otkrivanje potencijalnih kancerogena na temelju njihove mutagenosti (Ames i sur., 1973; Maron i Ames, 1983). Ames test je u svijetu najzastupljeniji i najpriznatiji test kojim se određuje ima li neka tvar (lijek, dodatak hrani, industrijska kemikalija, uzorak iz okoliša) genotoksični učinak. Ime je dobio po svom tvorcu dr. Bruceu Amesu (University of California, Berkeley, CA, USA).

Test se izvodi uz pomoć posebno konstruiranih sojeva bakterije vrste *Salmonella typhimurium*, koji ne mogu rasti ako u hranjivoj podlozi nema histidina, jer u jednom od svojih gena nose mutaciju koja onemogućava biosintezu te, za rast bakterija neophodne aminokiseline. Dodatak mutagena u hranjivu podlogu s ovom bakterijom (His^-) izazvati će povrat (*reverziju*) prvobitne mutacije u genu za biosintezu histidina, čime se vraća funkcija genu i ponovno omogućuje sinteza histidina. Ti se *revertanti* (His^+) razmnožavaju i bez dodatka histidina u hranjivoj podlozi, te ubrzo izrastu vidljive kolonije koje se mogu brojati. Broj revertanata se povećava s povećanjem koncentracije mutagena i predstavlja kriterij za mutagenost.

Postoji desetak sojeva *S. typhimurium* koji se koriste u Ames testu, a potekli su iz soja *S. typhimurium* LT2. Svi nose mutaciju u genu za sintezu histidina (Tablica 2.) kao i neke dodatne genetske promjene (Tablica 3.) koje povećavaju osjetljivost sojeva na mutagene. Sojevi TA 97, TA 98, TA 100 i TA 102 preporučuju se za primarno testiranje uzoraka, jer su vrlo osjetljivi na velik broj različitih mutagena. TA 100 se koristi za detekciju mutagena koji uzrokuju supstituciju parova baza, a TA 98 za mutagene koji uzrokuju pomak okvira čitanja (eng. *frameshift*).

Tablica 2. Histidinske mutacije u TA sojevima *S. typhimurium* koji se koriste u Ames testu.

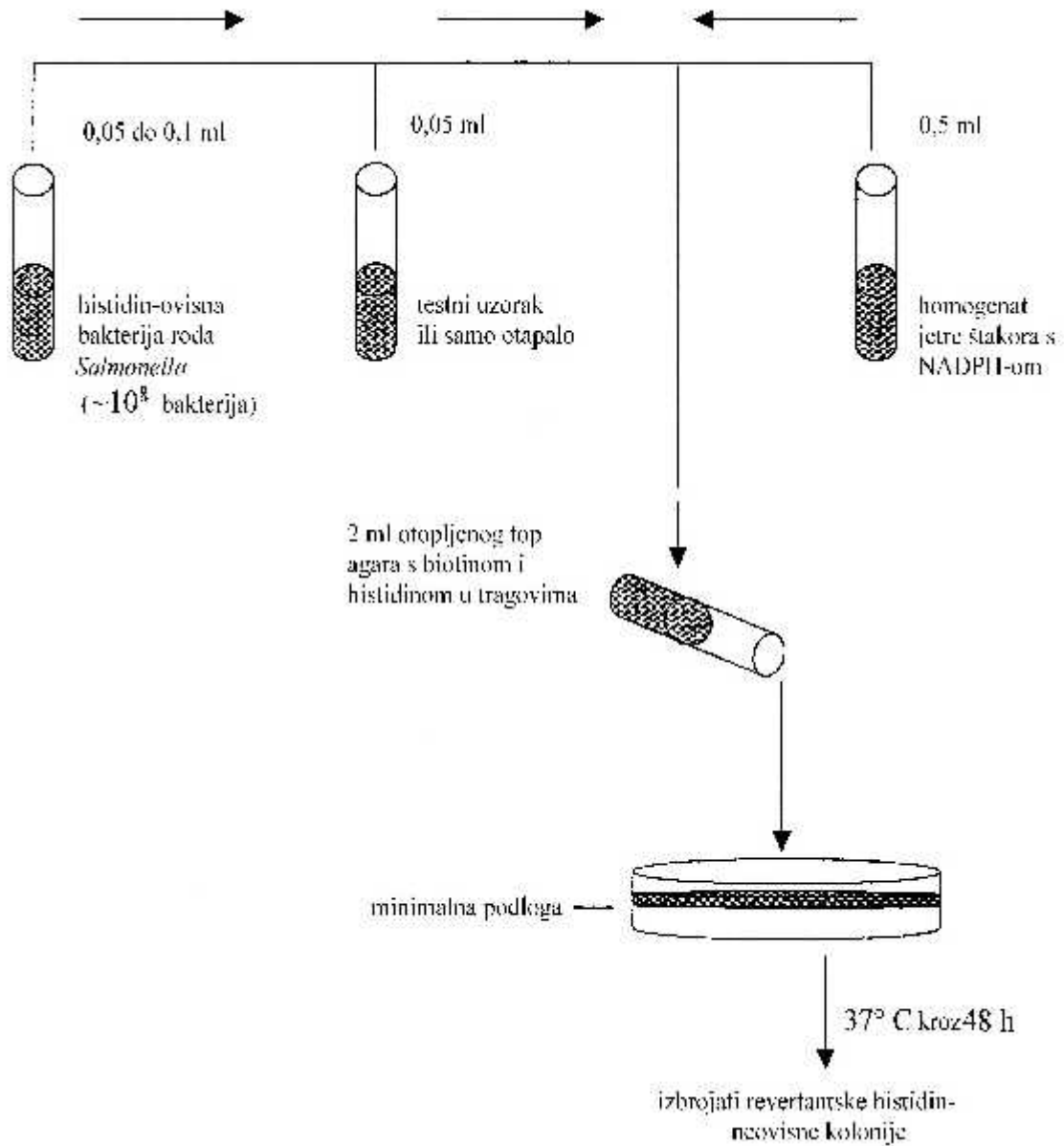
MUTACIJA	SOJ
HisD6610	TA 90; TA 97; TA 110; TA 89
HisD3052	TA 1538; TA 98; TA 1978; TA 94; TA 1534; TA 1964; TA 2641
HisG46	TA 1535; TA 100; TA 1975; TA 92; TA 1950; TA 2410; TA 1530; TA 2631
HisG428	TA 102

Tablica 3. Genotipovi TA sojeva koji se koriste za testiranje genotoksi nosti.

TIP MUTACIJE	BAKTERIJSKI SOJ	U INAK MUTACIJE
uvr B - delecija koja zahvaća <i>uvrB</i> , <i>bio i</i> i <i>chl</i> gene	TA 90; TA 1538; TA 1535; TA 97; TA 98; TA 100; TA 1534; TA 1950; TA 2410; TA 89; TA 1964; TA1530; TA 2641; TA 2631	eliminiran mehanizam popravka izrezivanjem (ekscizijom), ne mogu rasti na podlozi bez biotina, mutiran gen za nitratnu reduktazu-omogućuje detekciju nitro karcinogena (nitrofurazon, furilfuramid)
rfa	TA 90; TA 1538; TA 1535; TA 97; TA 98; TA 100; TA 1978; TA 1975; TA 102	oštećenje liposaharidnog (LPS) sloja na površini bakterije što je čini propusnijom za velike molekule
plazmid pKM101 – nosi R-faktor (<i>resistance transfer factor</i>)	TA 1535; TA 98; TA 1538; TA 100; TA 102; TA 104	povećava kemijski i UV induciranu mutagenozu povećanjem «popravka» DNK oštećenja sklonog stvaranju grešaka (eng. <i>error-prone repair</i>) – osjetljiviji u detekciji niza mutagena
plazmid pAQ1 s mutacijom hisG428	TA 102	povećan broj ciljnih mjesta za mutaciju, omogućena detekcija tvari koje uzrokuju unakrsno povezivanje DNA (eng. <i>DNA cross-linking agents</i>)

Mnoge kemikalije nisu mutagene same po sebi (**direktni mutageni**), već to postaju nakon metabolizacije (**potencijalni mutageni** ili tzv. **premutageni**), odnosno biotransformacije, koja u ovom slučaju predstavlja bioaktivaciju u reaktivne produkte (tzv. premutagene) posredstvom jetrenih enzima, najčešće oksidaza miješanih funkcija (OMF). Budući da bakterije ne posjeduju takvu metaboličku aktivnost, prilikom izvođenja Ames testa u pokusnu smjesu dodaju se jetreni enzimi sisavaca (Slika 1.). To je obično supernatant frakcije homogenata jetre štakora dobiven

centrifugiranjem pri 9000 x g (tzv. postmitohondrijska S9) frakcija uz prisustvo kofaktora. Da bi se poveao nivo metaboličkih enzima štakori se predtretiraju s inducerom OMF (na pr. Aroklorom 1254 ili -naftoflavonom).



Slika 1. Shematski prikaz Ames testa.

Kako je poznavanje procesa unosa, biotransformacije i ekskrecije endo- i ksenobiotika nužno za razumijevanje konteksta istraživanja opisanih u ovom diplomskom radu, navedeni pojmovi bit će detaljnije opisani u narednim poglavljima.

1.5. Unos, biotransformacija i ekskrecija

1.5.1. Unos

Ksenobiotik iz okoliša u organizam može ući na različite načine prikazane u Tablici 4.

Tablica 4.: Putovi ulaska stranih tvari u organizam.

NAČIN ULASKA	TIP KSENOBIOTIKA
KOŽA	Ksenobiotici prisutni u okolišu; kemikalije iz farmaceutskih proizvoda, proizvoda za njegu i proizvoda za održavanje kućanstva
RESPIRATORNI TRAKT	Ksenobiotici prisutni u onečišćenom zraku; kemikalije iz nekih farmaceutskih proizvoda (npr. nazalnih ili oralnih inhalatora)
GASTROINTESTINALNI TRAKT	Ksenobiotici prisutni u hrani i vodi za piće; glavni način ulaska za mnoge farmaceutike

Osim navedenih, postoje i drugi načini ulaska stranih tvari, uglavnom farmaceutika, u organizam npr. injektiranjem, rektalnim ili vaginalnim putem, te umetanjem implantata.

1.5.2. Biotransformacija

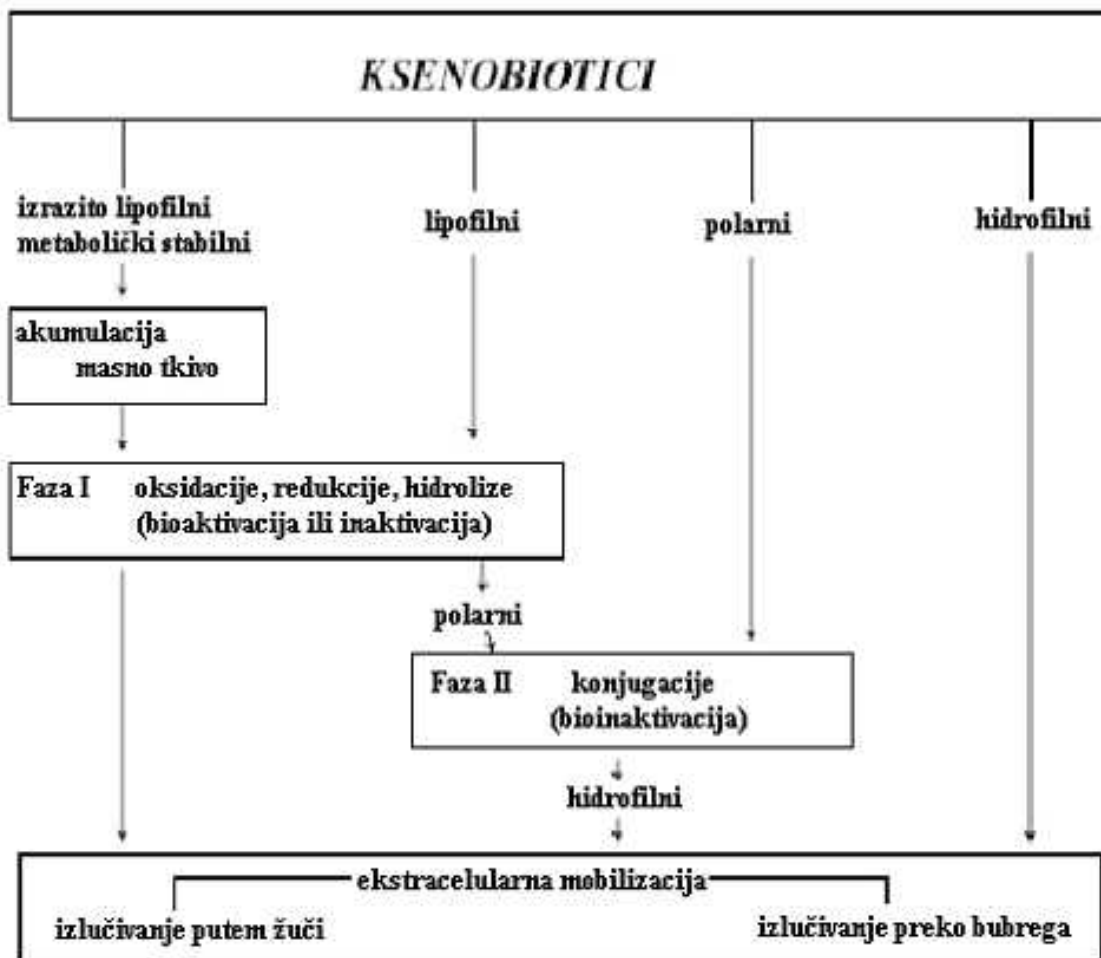
Jednom kad ksenobiotik uđe u organizam postoje dvije mogućnosti (Slika 2.):

- ostatak neizmijenjenog kemijskog sastava i vjerojatno biti pohranjen u stanicama adipoznog tkiva ili kosti;
- ovisno o stupnju lipofilnosti i polarnosti podle i njegove metabolizmu, tj. biotransformaciji.

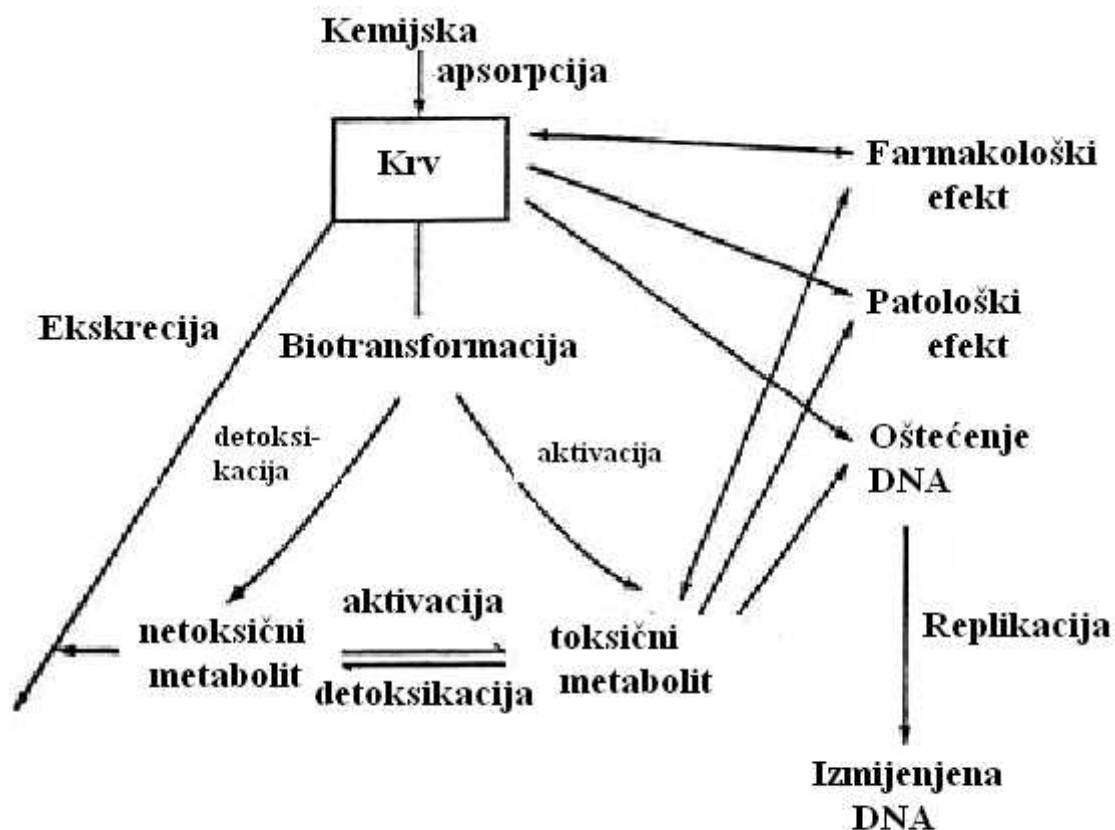
Biotransformacija obuhvaća sve biokemijske procese kojima se ksenobiotici ili endogeni spojevi pretvaraju, tj. konvertiraju u nove produkte. Biotransformacija je ključna za procesiranje i recikliranje mnogih endogenih molekula zaduženih za izgradnju i energetska opskrbu organizma. Konačni cilj biotransformacije ksenobiotika je spriječiti njihovo nakupljanje u tkivima do razine toksičnosti.

Sam proces biotransformacije sastoji se od dvije faze, faze I i faze II. Faza II ne mora nužno slijediti iza faze I, već ovisno o kemijskom sastavu tvari koja ulazi u proces biotransformacije faza I se može u potpunosti zaobići.

Općenito govoreći, lipofilne tvari relativno lako prolaze kroz biološke membrane i skladište se u stanicama. U procesu biotransformacije enzimi faze I na lipofilne tvari dodaju polarne skupine (-OH, -SH, -NH₂, -COOH) i time olakšavaju direktnu ekskreciju lipofilnih ksenobiotika, ili pak tako izmijenjeni ksenobiotik ulazi u slijedeći dio biotransformacije, fazu II, gdje se na njega vežu veće polarne (hidrofilne) molekule (primjerice glukuronska kiselina ili glutation), koje dodatno povećavaju polarnost novonastalog konjugiranog spoja i pospešuju njegovo izlučivanje.



Slika2. Koncept mogu e raspodjele ksenobiotika u organizmu.



Slika 3. Moguće posljedice unosa ksenobiotika u organizam.

Ulaskom tvari u procese metabolizma mijenja se njihova kemijska struktura, a time i njihova toksikološka (lijeikovi – farmakološka) aktivnost.

Toksične tvari koje ulaze u proces biotransformacije mogu se detoksicirati i pretvoriti u netoksične produkte ili postoji mogućnost da primarno nemutageni (tzv. premutageni) i netoksični spojevi postanu mutageni, tj. toksični nakon metabolizacije u reaktivne produkte posredstvom jetrenih enzima. Za oba ishoda (**detoksikaciju i bioaktivaciju**) odgovorni su enzimi i reakcije faze I. (Tablica 5.).

Tablica 5. Tipovi kemijskih reakcija i enzimi uključeni u fazu I. metabolizma ksenobiotika.

TIP REAKCIJE	ENZIMI
<p>Oksidacija (gubitak elektrona; dodatak O na mjesto H)</p>	<p>Sustav mikrosomskih monooksidaza -Citokrom P-450 (CYP); Ksantin oksidaza; Peroksidaze; Amin oksidaze; Monoamin oksidaza (MAO); Dioksidigenaza; Alkohol dehidrogenaza; Aldehid dehidrogenaza; Superoksid dizmutaza</p>
<p>Redukcija (davanje elektrona; dodatak H na mjesto O)</p>	<p>Citokrom P-450-ovisna reduktaza; Reduktaze crijevne mikroflore; Kettoreduktaza; Glutation peroksidaze</p>
<p>Hidroliza (voda reagira sa supstratom stvaraju i vezu preko O₂)</p>	<p>Esteraze; Amidaze</p>
<p>Hidracija epoksida</p>	<p>Epoksid hidrolaze</p>

Reakcije faze II. (Tablica 6.) uglavnom inaktiviraju toksične ili mutagene spojeve tako što funkcijskoj skupini metabolita nastalog reakcijama faze I., ili neizmijenjenom ksenobiotiku, dodaju polarne skupine endogenog porijekla i time olakšavaju njegovo izlučivanje putem urina i žuči.

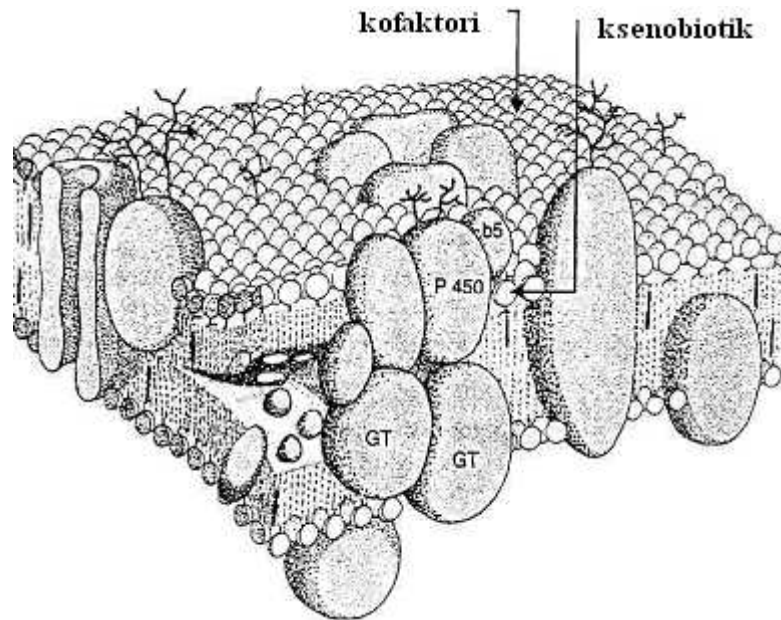
Tablica 6. Tipovi kemijskih reakcija i enzimi uključeni u fazu II. metabolizma ksenobiotika.

TIP REAKCIJE - Reakcije konjugacije (dodatak polarne skupine endogenog porijekla)	ENZIMI
Konjugacije s glukuronskom kiselinom	Glukuronosil transferaze
Konjugacije sa sulfatom	Sulfotransferaze
Konjugacije sa glutationom	Glutation S – transferaza
Konjugacije s amino kiselinama	Acil-CoA-sintetaza; N-acil transferaze
Acetilacija	Acetiltransferaze
Metilacija	O – Metiltransferaza; N – Metiltransferaza; S – Metiltransferaza

Enzimi koji su zaduženi za procese biotransformacije rasprostranjeni su u stanicama različitih tkiva, a smješteni su unutar glatkog endoplazmatskog retikuluma (SER – eng. *smooth* ER) ili u citosolu stanica. Zbog svoje veličine i visoke koncentracije enzima faze I. i II. u stanicama, **jetra** je primarni organ zadužen za biotransformaciju tvari (endo- i ksenobiotika). Bubrezi i pluća su slijedeći po redu s 10-30% kapaciteta jetre. Niski kapacitet za biotransformaciju postoji i u koži, intestinalnoj mukozii, krvi, testisima i placenti.

U jetrenim stanicama (hepatocitima), većina enzima faze I. (sustav oksidaza miješanih funkcija ili citokrom P-450 ovisnih oksidaza, P-450) i dio enzima faze II. (glukuronil transferaze, GT) smještena je u mikrosomima, malim vezikulima endoplazmatskog retikuluma, dok je većina enzima faze II. smještena u citosolu. činjenica da su kofaktori (NADPH) i enzimi faze I. (P-450)

i II. (GT) smješteni blizu jedni drugima u mikrosomima, olakšava biotransformaciju ksenobiotika i povezivanje reakcija faza I. i II. kada je to potrebno (Slika 4.).



Slika 4. Smještaj enzima faza I. i II. u mikrosomima.

Najznačajniji enzimatski sustav uključen u reakcije faze I. je sustav citokrom P-450 (CYP) ovisnih oksidaza, poznat i pod nazivom «oksidaze miješanih funkcija» (MFO – eng. *mixed function oxidases*). Smješten je u mikrosomima i odgovoran je za različite tipove oksidacija širokog spektra kemikalija (aromatske hidroksilacije; alifatske hidroksilacije; *N*-, *S*-, *O*-dealkilacije; *N*-, *S*-oksidacije; *N*-hidroksilacije; desulfurilacije).

Sumarni prikaz reakcije oksidacije katalizirane citokromom P-450:



Zaključno, uloga biotransformacije u metabolizmu ksenobiotika jest transformirati štetne spojeve u manje toksične na način da se poveća njihova polarnost kako bi se pospješilo izlučivanje, tj. ekskrecija tih tvari iz organizma.

1.5.3. Ekskrecija

Ovisno o karakteristikama metabolita/ksenobiotika (veličina, polarnost, topljivost) koji se izlučuju iz tijela razlikujemo više mogućih putova ekskrecije (Tablica 7.) .

Tablica 7. Mogući putevi ekskrecije endo- i ksenobiotika.

NAČIN EKSKRECIJE	TIP TVARI
IZDISAJ, IZDAHNUTI ZRAK	Hlapljive tvari
URIN	Glavni način za izlučivanje polarnih tvari male molekulske mase
ŽUČA	Konjugirani metaboliti velike molekulske mase
FECES	Tvari apsorbirane u želucu ili izlučene u žuč i
SLINA	Tvari jako male molekulske mase
MLIJEKO	Tvari topljive u vodi i mastima
KOSA	Kvantitativno zanemariv put ekskrecije

1.6. Cilj istraživanja

Ključni cilj opisanog istraživanja bio je odrediti mutageni, odnosno genotoksični potencijal okolišnih uzoraka površinske vode i sedimenta rijeke Save upotrebom Ames bakterijskog testa. Pored ovog glavnog cilja specifični ciljevi istraživanja obavljenih u okviru ovog diplomskog rada bili su:

- Upoznati se i savladati tehnike uzorkovanja različitih okolišnih matrica (površinska voda, sediment, otpadna voda);
- Upoznati i savladati tehnike koncentriranja/ekstrahiranja uzoraka;
- Upoznati se s EDA konceptom i kompleksnom problematikom povezivanja analitičkih kemijskih i bioloških metoda u svrhu vjerodostojne procjene ekološkog rizika;
- Upoznati se s nizom *in vitro* biotestova, te specifično ovladati primjenom Ames testa;
- Primijeniti Ames test na konkretnim uzorcima iz okoliša, kao međunarodno najprihvaćeniji test za određivanje mutagenog/genotoksičnog potencijala;
- Naučiti obraditi, kritički analizirati i prezentirati rezultate opisanog tipa laboratorijskih mjerenja.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Instrumenti i pribor

Pri izradi ovog rada upotrijebljena je slijedeća laboratorijska oprema i pribor:

autoklav;

centrifuga/ultracentrifuga Sorvall[®] RC28S, Sorvall, USA;

inkubator s tresalicom za uzgoj bakterija pri 37°C / 120 rpm;

inkubator za inkubiranje ploča s agarom;

električna vibracijsko rotacijska muha kalica, Vortex;

vodena kupelj, Sutjeska;

mikrovalna pećnica;

uređaj za izlivanje ploča;

tehnička vaga, d = 0,1 mg, max = 61 g, Sartorius, Njemačka;

analitička vaga, d = 0,1 g, max = 1200 g, Mettler, Njemačka;

hladnjak, -80°C, Heraeus Sepatech, Njemačka;

hladnjak, +4°C, Konar, Hrvatska;

kontejner s tekućim dušikom;

pH-metar, 0-14; CG 820 Schott Geräte, Njemačka;

plastične Petrijeve zdjelice (100x15 mm), Hospitalija, Hrvatska;

sterilno stakleno posuđe (boce, menzure, ašice, tikvice sa širokim grlom, epruvete...);

sterilne pipete (10 ml);

podesive mikropipete, 0.5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl, s odgovarajućim sterilnim

nastavcima, Ependorff, Njemačka;

pipetor za 10 ml epruvete;

sterilne kriogene tubice za trajnu pohranu bakterijske kulture;

magnetski štapići za miješanje;

sterilni filtri Millex HA 0.45 µm i Millex GS 0.22 µm, Millipore, Bedford, MA, USA.

2.2. Kemikalije

U svrhu obrade uzoraka te izvođenja svih potrebnih mjerenja pri izradi ovog rada upotrijebljene su slijedeće kemikalije:

DMSO (dimetilsulfoksid); natrij dihidrogen fosfat monohidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$); natrij-amonij hidrogenfosfat tetrahidrat ($\text{NaH}_2\text{NH}_4\text{PO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$) - firme Merck, Darmstadt, Njemačka;

2AF (2-aminofluoren) firme Sigma, St. Louis, MO, USA;

Aroklor 1254 – Merck, Darmstadt, Njemačka;

bacto nutrient broth i bacto agar firme DIFCO, Paisley, UK;

kalij klorid (KCl), magnezij diklorid (MgCl_2), magnezij sulfat 7-hidrat ($\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$),

limunska kiselina, MeOH (metanol), dikalij hidrogenfosfat (K_2HPO_4), L-histidin, D-biotin – firme Kemika, Zagreb, Hrvatska;

NADP (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat) – firme Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Njemačka;

glukoza-6-fosfat - firme Boehringer, Mannheim, Njemačka;

natrij hidrogen fosfat (Na_2HPO_4) – Kemika, Zagreb.

Za pripremu otopina korištena je MiliQ deionizirana voda.

2.3. Pokusni organizmi

2.3.1. Soj *Salmonella typhimurium* TA 98

Za provedbu Ames testa, korišten je bakterijski soj TA 98 vrste *Salmonella typhimurium* dobiven od dr. Bruce Ames (University of California, Berkeley, CA, USA). Genetske karakteristike TA 98 soja (Tablica 8.) čine ga osjetljivim na širok spektar različitih mutagena koji uzrokuju pomak okvira čitanja (eng. *frameshift*), te time izrazito pogodnim za primarno testiranje uzoraka.

Tablica 8. Genetske karakteristike TA 98 soja vrste *Salmonella typhimurium*.

VRSTA MUTACIJE	U INAK MUTACIJE
HisD6610 i HisD3052	mutacije u genima za proizvodnju histidina, što soj TA 98 ini ovisnim o toj aminokiselini
uvr B - delecija koja zahvaća uvrB, bio i chl gene	eliminiran mehanizam popravka izrezivanjem (ekscizijom); ne mogu rasti na podlozi bez biotina, mutiran gen za nitratnu reduktazu-omogućuje detekciju nitro karcinogena (nitrofurazon, furilfuramid)
Rfa	oštećenje liposaharidnog (LPS) sloja na površini bakterije, što je ini propusnijom za velike molekule
plazmid pKM101 – nosi R-faktor (resistance transfer factor)	povećava kemijski i UV induciranu mutagenezu povećanjem «popravka» DNK oštećenja sklonog stvaranju grešaka (eng. <i>error-prone repair</i>) – osjetljiviji u detekciji niza mutagena

Po primitku TA 98 soja (na malom filter disku ili u liofiliziranom obliku) bakterije su kultivirane u tekućoj (5 ml) i na krutoj (rezerva) hranjivoj podlozi pri 37°C preko noći (16 h maksimum). Potom su napravljeni odgovarajući i alikvoti: 0,8 ml tekuće kulture uz dodatak 0,07 ml dimetilsulfoksida (krioprezervativ) stavljeno je u 2 ml sterilnu kriogenu bočicu, potom smrznuto u tekućem dušiku i pohranjeno pri -80°C.

2.3.2. Štakori

Mušjaci štakora soja Wistar, uzgojeni u Institutu „Ruđer Bošković“, teški od 200-250 g, služili su za pripremu postmitohondrijske frakcije jetre sisavaca u testu na mutagenost. Pet dana prije upotrebe pokusnim štakorima injektira se intraperitonealno jednokratna doza Aroklora 1254 (500 mg/kg tjelesne težine, otopljenog u kukuruznom ulju u omjeru 1:5). Tijekom trajanja pokusa (4 dana) životinje trebaju uzimati hranu za štakore i vodu *ad libidum*. Peti dan uzimaju samo vodu. Nakon pet dana djelovanja Aroklora 1254 štakori se upotrebljavaju za pokuse.

2.4. Prikupljanje i priprema okolišnih uzoraka

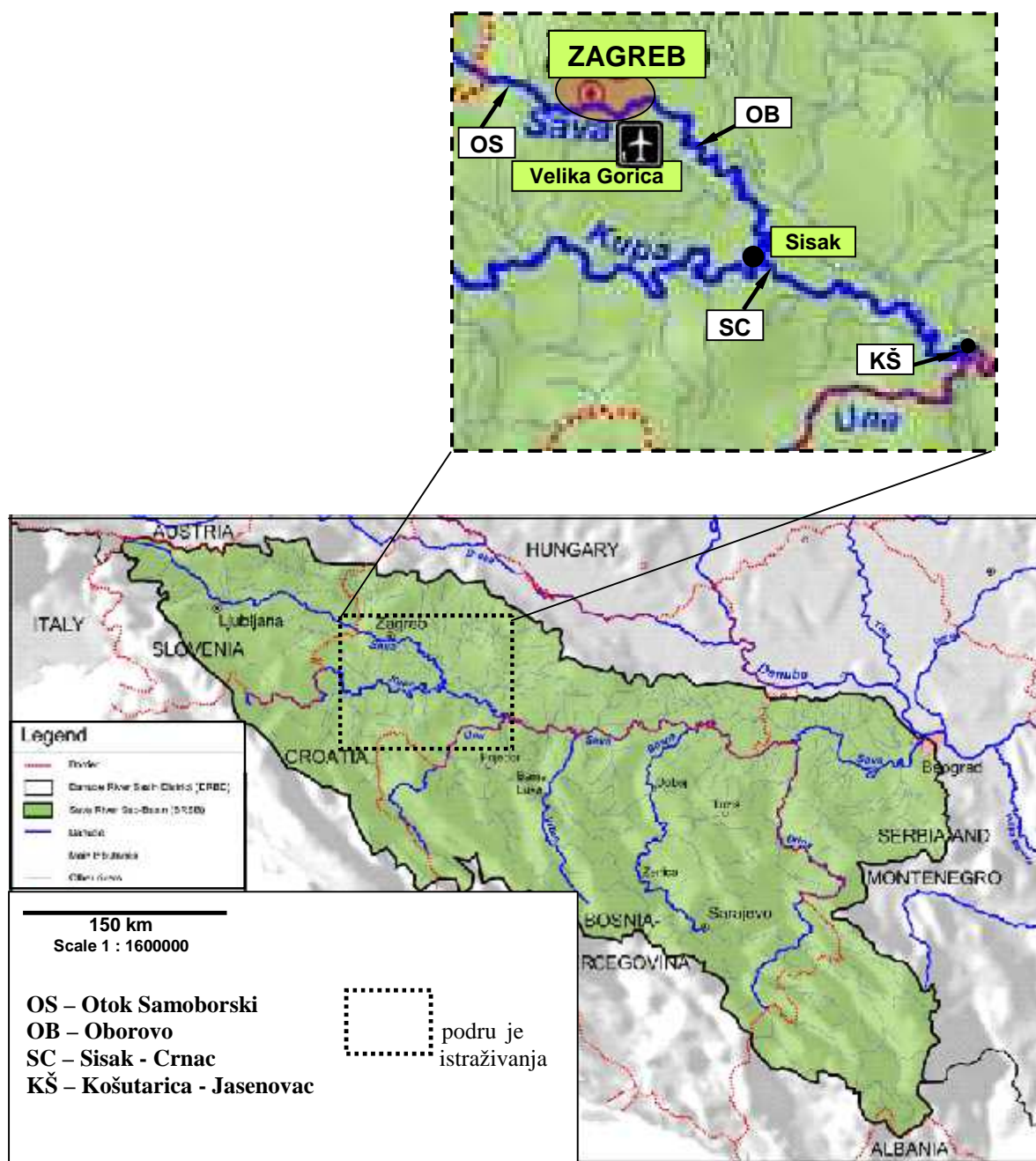
2.4.1. Lokacije i na ini prikupljanja uzoraka

U okviru planirane preliminarne karakterizacije organskog one iš enja u rijeci Savi, 3. lipnja 2008. obavljeno je prvo uzorkovanje na dijelu toka Save (dužine 150 km) od hrvatsko-slovenske granice do grada Jasenovca.

Navedeni dio toka Save izabran je zbog dobro definiranog gradijenta one iš enja u rasponu od slabo-do-umjerenog one iš enja prije Zagreba (1 mil. stanovnika; visok stupanj industrijalizacije), pa sve do jakog one iš enja na dijelu toka neposredno iza Zagreba i Siska. Cjelokupan osvrt na postoje e stanje i kvalitetu vode rijeke Save, temeljen na nacionalnim (HRN) i internacionalnim standardima (ISO-EN), napravljen je 2005. godine u okviru CARDS programa europske unije za Hrvatsku i dostupan na Internet adresi: <http://voda.hr/WIS-CARDS2002/documents.htm>.

Uzorci su prikupljeni na 4 lokacije (Slika 5.) u periodu niskog vodostaja kada je i koncentracija zaga ivala pretpostavljeno najve a.

Prikupljeni su uzorci vode od 25 l (Tablica 9.) i sedimenata (Tablica 10.) na sve 4 lokacije.



Slika 5. Karta savskoga porječja s područjem istraživanja i prikazom lokacija na kojem je vršeno uzorkovanje u okviru Projekta.

Lokacija **Otok Samoborski (OS)** nalazi se 10 km **uzvodno** od Zagreba u blizini granice sa Slovenijom, stoga je izrazito povoljna za procjenu prekograničnog onečišćenja iz Slovenije (i EU) u Hrvatsku. Služi i kao referentna lokacija, s obzirom da je na ovom dijelu toka Sava tradicionalno dobre kvalitete vode zbog slabe naseljenosti i nepostojanja industrije koja bi ispuštala otpadne produkte u rijeku;

Lokacija **Oborovo (OB)** nalazi se 15 km nakon mjesta ulijevanja zagrebačkog kolektora u Savu i 5 km nizvodno od ispusta otpadnih voda grada Velike Gorice;

Lokacija **Sisak Crnac (SC)** nalazi se 2 km nizvodno od grada Siska (50 000 stanovnika), u kojem su smještene tvornica pesticida, željezara i rafinerija nafte;

Lokacija **Košutarica (KŠ)** nalazi se neposredno nakon Jasenovca, nekoliko kilometara nizvodno od ušća rijeke Une u Savu. Na tom dijelu toka Sava postaje pogranična rijeka između država Hrvatske i Bosne i Hercegovine.

Uzorkovanje otpadnih voda načinjeno je 2. srpnja 2008, a prikupljeni su kompozitni uzorci primarnog i sekundarnog efluenta sa zagrebačkog uređaja za obradu otpadnih voda (Slika 6.; Tablica 9.).



Slika 6. Centralni uređaj za pročišćenje otpadnih voda Zagreba (CUPOVZ).

Tablica 9. Popis uzoraka vode.

POSTAJA	KOD UZORKA	VOLUMEN / l
Otok Samoborski	OS1	25
Oborovo	OB	25
Sisak Crnac	SC	25
Košutarica	KŠ	25
Sekundarni efluent zagreba kih otpadnih voda (ZOV – SE)	ZSE	10,85
Primarni efluent zagreba kih otpadnih voda (ZOV – PE)	ZPE	3,06
Kontrola postupka (200 ml MeOH)	BL	-
Otok Samoborski – preliminarni uzorak	OS2	22

Tablica 10. Popis uzoraka sedimenta.

POSTAJA	KOD UZORKA	ODVAGA / g
Otok Samoborski	S - OS	74,40
Oborovo	S - OB	72,41
Sisak Crnac	S - SC	56,24
Košutarica	S - KŠ	50,16
Kontrola (<i>blank</i> ; kvareni pijesak) 1	S - BL1	50
Kontrola (<i>blank</i> ; kvareni pijesak) 2	S - BL2	50

Uzorci Savske vode uzeti su 3. lipnja 2008. izravnim uranjanjem (0,3-0,5 m) staklenih demižona u Savu.

Uzorci otpadne vode sa zagrebačkog uređaja za obradu otpadnih voda (ZOV) uzeti su 3. srpnja 2008. Uz pomoć automatskog sakupljača prikupljen je 24-satni kompozitni uzorak primarnog efluenta (PE) i sekundarnog efluenta (SE).

Sakupljeni uzorci odmah su procesirani u laboratoriju prema dalje opisanim postupcima.

2.4.2. Postupak pripreme uzoraka vode

Po povratku u laboratorij uzorci vode su pohranjeni u ledenicu na 4-8°C, te su procesirani unutar slijedećih 48 sati. Uzorci (oko 25 l) propušteni su preko vertikalne kolone punjenih sa 6 g stacionarne faze Oasis (visokopolimerizirana smola koja apsorbira tvari u širokom rasponu lipofilnosti), bez prethodne filtracije uzorka uz upotrebu uređaja za ekstrakciju velikih volumena vode (LVE; Slika 7.).

Nakon propuštanja, kolona je osušena u struji dušika i eluirana s 200 ml metanola (organsko otapalo koje se koristi za ispiranje hidrofiličnih molekula). Za uzorke s lokacije Otok Samoborski i Oborovo zbog začepljenja upotrijebljene su 2 kolone.

Uzorci otpadne vode sa zagrebačkog uređaja za obradu otpadnih voda (ZOV) uzeti su 3. srpnja 2008. Prikupljen je 24-satni kompozitni uzorak primarnog efluenta (PE) i sekundarnog efluenta (SE). Zbog upozoravajućeg iskustva s uzorcima Save uzorci sa ZOV-a propušteni su preko Oasis kolona tek nakon filtracije preko prefiltera sa staklenim vlaknima.

Metanolni ekstrakti dobiveni eluacijom kolona Oasis (200-500 ml metanola) upareni su na manji volumen uz upotrebu rotacijskog isparivača (45°C, tlak 200 mbar), te je volumen podešen na približno 30 ml. Ekstrakti su podijeljeni na 2 jednaka dijela, za kemijske i ekotoksikološke analize, volumena izmeću 15 i 18 ml. Kao slijepa proba postupka načinjeno je i uparavanje 200 ml metanola, a upareni ekstrakt podijeljen je na isti način kao i uzorci.



Slika 7. Sustav za ekstrahiranje velikih volumena vode u Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju Instituta „Ruđer Bošković“.

2.4.3. Postupak pripreme uzoraka sedimenta

Uzorci sedimenta najprije su obrađeni sušenjem na zraku u digestoru u plastičnim pliticama. Nakon sušenja sediment je samljeven u ahatnom mlinu. Dobiven je fini praškasti materijal pogodan za ekstrakciju. Suhi sedimenti ekstrahirani su na uređaju za ubrzanu ekstrakciju (ASE) pod pritiskom u dva odvojena ciklusa primjenom dvaju otapala – diklormetana i metanola. Za svaki uzorak upotrijebljene su po dvije velike ćelije (33 ml) što znači da su dobivena po 4 ekstrakta za svaki uzorak.

Svi su ekstrakti pojedinih uzoraka spojeni i upareni u struji dušika. Da se izbjegnu gubitci hlapljivih hidrofobnih molekula uparavanje je provedeno na način da je najprije diklormetanski ekstrakt uparen na mali volumen (1-2 ml), a zatim je prebačen u udruženi i djelomično upareni metanolski ekstrakt. Volumen metanolskog ostatka reduciran je na oko 30 ml, pri čemu je većina diklormetana trebala biti uklonjena iz konačnog ukupnog ekstrakta. Ekstrakti su na kraju podijeljeni na 2 jednaka dijela, za kemijske i ekotoksikološke analize, volumena između 15 i 16 ml.

2.4.4. Naknadna priprema uzoraka vode

Ekstrakti su prije evaporacije u struji dušika bili profiltrirani kroz Na_2SO_4 da bi se uklonile sitnije estice i voda. Nakon uparavanja metanola iz uzoraka potrebno je otopiti suhi uzorak u dimetilsulfoksidu (DMSO-u). Uzimaju i u obzir toksičnost DMSO-a (te da je cilj provesti test toksičnosti) potrebno je otopiti uzorke u što manjem volumenu u skladu s volumenom prikupljenog uzorka iz okoliša, odnosno potrebno je bilo izračunati ekvivalente DMSO-a za dva uzorka (ZOV-PE i ZOV-SE) iji su prikupljeni volumeni bili manji od ostalih.

Raun:

$$V(DMSO_{ZOV}) = \frac{V(DMSO_{UE}) \times V_{ZOV}}{V_{UE}}$$

$$V(DMSO_{ZOVSE}) = \frac{0,5[ml] \times 10085[ml]}{25000[ml]} = 0,217ml = 217 \mu l$$

$$V(DMSO_{ZOVPE}) = \frac{0,5[ml] \times 3060[ml]}{25000[ml]} = 0,0612ml = 61,2 \mu l$$

Meutim, volumen od 61,2 μl nije ekonomičan za korištenje u biotestovima, jer su gubitci pri tako malom volumenu značajni. Stoga smo napravili slijedeće: uzorci pod šifrom ZOV su višestruko koncentriraniji (uzorci iz kolektora) od ostalih uzoraka stoga nam neće značajno utjecati na ishod testa ako ih razrijedimo više nego uzorke iz okoliša. Smisao je dobiti volumen s kojim možemo relativno dobro i ujednačiti i u protokol s biotestovima. U ZOV-PE uzorak nadodali smo DMSO do volumena od 200 μl i prema njemu korigirali volumen ZOV-SE, koji je tada iznosio 709 μl . Princip računanja isti je kao i gore navedeni.

Po dodatku DMSO-a, uzorke vode promiješamo u vorteksu i centrifugiramo da bismo oborili otapalo sa stjenke (cca 1000 g) i uklonili eventualni talog. Nakon toga, uzorke prebacujemo u iste bočice (uz gubitak otprilike 10-20 % uzorka) i bilježimo Neto volumen pojedinog uzorka (tj., koliko se uzorka stvarno nalazi u bočici).

Tablica 11. Rezultati kona ne pripreme uzoraka vode.

POSTAJA	ŠIFRA	UKUPNI VOLUMEN VODE (l)	VOLUMEN ZA EKOTOKSIKO - LOGIJU (l)	DODANO DMSO-a (μ l)	NETO VOLUMEN DMSO-a (μ l)	KOLI INA VODE (ml) U 1 μ l OBRA ENOG UZORKA
Otok Samoborski	OS1	25	12,5	500	490	25
Oborovo	OB	25	12,5	500	487	25
Sisak Crnac	SC	25	12,5	500	495	25
Košutarica	KŠ	25	12,5	500	487	25
ZOV - SE	ZSE	10,85	5,43	709	700	7,65
ZOV - PE	ZPE	3,06	1,53	200	185	7,65
Kontrola postupka (200 ml MeOH)	BL	-	-	500	490	-
Otok Samoborski - preliminarni uzorak	OS2	22	12,5	500	490	25

2.4.5. Naknadna priprema uzoraka sedimenta

Jednako kao za uzorke stupca vode, uzorci sedimenta nisu jednakih masa, stoga je i za njih bilo potrebno korigirati količinu DMSO-a. Prvenstveno zato što se oni teško otapaju, odnosno brzo zasićuju DMSO, bilo je potrebno dodati nešto više DMSO-a. Uzorci koji su bili najveće mase zahtijevali su i najveću količinu otapala (900 µl) dok je za uzorke iz Košutarice i Siska bilo potrebno korigirati količinu DMSO-a.

Račun:

$$V(DMSO_{s-kš}) = \frac{V(DMSO_{s-ref}) \times m_{s-kš}}{m_{s-ref}}$$

$$V(DMSO_{s-kš}) = \frac{900[\mu l] \times 50[g]}{73[g]} = 616\mu l$$

$$V(DMSO_{s-sc}) = \frac{900[\mu l] \times 56[g]}{73[g]} = 690\mu l$$

Po dodatku DMSO-a, uzorke sedimenta promiješamo u vorteksu i centrifugiramo kako bismo oborili otapalo zadržano na stjenkama plastičnih epruveta (cca 1000 g) i uklonili eventualni talog. Nakon toga, uzorke prebacujemo u iste bočice (uz gubitak otprilike 10-20 % uzorka) i bilježimo Neto volumen pojedinog uzorka.

Tablica 12. Rezultati kona ne pripreme uzoraka sedimenta.

POSTAJA	ŠIFRA	ODVAGA (g)	MASA ZA EKOTOKSI – KOLOGIJU (g)	DODANO DMSO-a (μ l)	NETO VOLUMEN DMSO-a (μ l)	KOLI INA SEDIMENTA (mg) U 1 μ l OBRA ENOG UZORKA
Otok Samoborski	S-OS	74,40	37,2	900	890	41,33
Oborovo	S-OB	72,41	36,205	900	890	40,23
Sisak Crnac	S-SC	56,24	28,12	690	680	40,75
Košutarica	S-KŠ	50,16	25,08	616	610	40,71
Bl 1 (kvarcni pijesak)	S-BL1	50	25	900	890	28
Bl 2 (kvarcni pijesak)	S-BL2	50	25	900	890	28

2.5. Priprava postmitohondrijske frakcije jetre induciranih štakora

Za pripravu postmitohondrijske frakcije (S9), štakor se usmrti cervikalnom dislokacijom. Abdominalnim rezom otvori se utroba i izvadi jetra. Cijela se jetra ispere u hladnom 0,15 M KCl puferu da se odstrani hemoglobin koji može inhibirati aktivnost OMF-enzima ovisnih o citokromu P450. Isprana jetra se zatim homogenizira u staklenom Potter-Elvehjem homogenizatoru uz dodatak istog 0,15 M KCl pufera u omjeru 1:3 w/v (težina tkiva : volumen pufera). Homogenat se centrifugira 10 min na 9000 x g. Supernatant (S9 frakcija) se koristi kao izvor enzima za potrebe testa na mutagenost još istog dana, ili se alikvoti pohrane na -80°C bez značajnog gubitka aktivnosti. Cijeli se postupak odvija na temperaturi $+4^{\circ}\text{C}$ i u sterilnim uvjetima.

U tako pripremljenoj S9 frakciji obavezno treba izmjeriti koncentraciju proteina.

2.6. Priprema uzoraka

Uzorke otopljene u dimetilsulfoksidu (DMSO) u digestoru pripravljamo u širokom rasponu razrjeđenja. Količina do 0,1 ml DMSO po ploči nije toksična za bakterije niti utječe na enzime S9 frakcije.

2.7. Priprava Petrijevih zdjelica s minimalnom podlogom

Autoklavira se u dvolitrenoj boci 15 g Bacto Agara – Difco i 930 ml destilirane vode (20 min, pri temperaturi 120°C i tlaka od 1 atm). Po završetku autoklavliranja otopini agara ohlađenoj na oko 70°C doda se 20 ml sterilne otopine Vogel-Bonner medij (10 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$; 100 g limunske kiseline $\times \text{H}_2\text{O}$; 500 g K_2HPO_4 i 175 g $\text{NaH}_2\text{NPO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ u 670 ml destilata na 45°C) i 50 ml sterilne 40% otopine glukoze. Zbog miješanja otopina na magnetskoj miješalici u bocu s agarom prije početka autoklavliranja doda se magnetski štapić. Vogel-Bonner medij i 40% glukoza autoklaviraju se pojedinačno. Nakon temeljitog miješanja izlije se po 25 ml agara (tzv. minimalna podloga) u Petrijeve zdjelice.

Za potrebe testa, zbog velikog broja uzoraka, prilagodili smo navedeni recept za volumen od 3 l.

2.8. Priprava bakterijske suspenzije

Dan prije testa nacijepi se hranjivi medij (100 ml dH_2O , 0,8% Bacto hranjivog bujona (broth) i 0,5% NaCl) bakterijskom kulturom s master ploče ili one koja je čuvana na -80°C , te stavi na inkubaciju na 37°C u vodenu kupelj s drmalicom (frekvencija 75 pomaka u minuti). Nakon 12-16 sati inkubacije prekida se dioba bakterija uranjanjem posude s kulturom u ledenu kupelj ili hladnjak (4°C) gdje se čuva do upotrebe. Koncentracija bakterija od 1 do 2×10^9 bakterija u 1 ml medija podesi se mjerenjem turbiditeta na valnoj dužini 650 nm.

2.9. Priprava top agara

U 100 ml dH_2O dodati 0,6 g agara i 0,5 g NaCl. Autoklavira se i sprema u bocama u volumenu od 100 ml na sobnoj temperaturi. Prije uporabe agar se otapa grijanjem i dodaje se 10 ml sterilne otopine 0,5 mM histidina / 0,5 mM biotina.

2.10. Priprava aktivacijske smjese S9 mix

Za otopinu MgCl₂ i KCl potrebno je odvagati (1,65 M KCl + 0,4 M MgCl₂) i otopiti u destiliranoj vodi. Otopina se autoklavira kroz 20 min na temp. 120°C i pohranjuje u staklenoj boci u hladnjaku ili na sobnoj temperaturi.

Izvaže se 1 M glukoza-6-fosfat i otapa u sterilnoj dest. H₂O do 10 ml.

Izvaže se 0,1 M NADP (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat) i otapa u sterilnoj dest. H₂O do 5 ml. Sterilne otopine glukoza-6-fosfat i NADP se zatim pohrane na –20°C i tako ostaju stabilne najmanje 6 mjeseci.

Za pripravu 0,2 M natrij fosfatnog pufera pH 7,4 potrebno je izvagati 0,2 M natrij dihidrogen fosfat monohidrata (staviti oznaku otopina A) i 0,2 M natrij hidrogen fosfata (staviti oznaku otopina B). Za podešavanje pH do 7,4 u otopinu B dolijeva se otopina A.

2.11. Test na mutagenu aktivnost

2.11.1. Testiranje uzoraka bez metaboli ke aktivacije

Za jednu Petrijevu plo u -S9 mix sadrži:

0,1 ml 0,15 M KCl, 0,01 ml 0,4 M MgCl₂ + 1,65 M KCl, 0,25 ml 0,2 M fosfatnog pufera pH 7,4 i 0,14 ml dH₂O

Smjesa od 0,01 – 0,1 ml otopine tvari koju ispitujeemo, 0,5 ml S9 mix-a bez metaboli ke aktivacije, 0,1 ml bakterijske suspenzije ($1 - 2 \times 10^9$ bakterija) i 2,0 ml površinskog agara (0,6% agar, 0,5% NaCl, u kojeg se doda 10 ml sterilne otopine 0,5 mM histidin x 0,5 mM biotin, termostirano na 45°C) pomiješa se u mikrobiološkoj epruveti i izlije (u diplikatu ili triplikatu) u sterilne Petrijeve zdjelice s 25 ml minimalnom podlogom.

2.11.2. Testiranje uzoraka uz metaboli ku aktivaciju

Za jednu Petrijevu ploču +S9 mix sadrži:

S9 (0,1 ml), 0,01 ml 0,4 M MgCl₂ + 1,65 M KCl, 0,25 ml 0,2 M fosfatnog pufera pH 7,4, 0,0025 ml 1 M glukoza-6-fosfat, 0,02 ml 0,1 M NADP-Na₂ i 0,1175 ml dH₂O

Za pokuse Ames testa koristi se svježe pripremljen S9 mix, što znači da se neposredno prije samog pokusa svi potrebni sastojci miješaju i filtriraju kroz sterilni filter (promjer pora 0,22 µm). Tako pripremljen S9 mix drži se na 4°C kroz nekoliko sati bez gubitka metaboličke aktivnosti. Smjesa od 0,01 – 0,1 ml otopine tvari koju ispitujemo, 0,5 ml S9 mix-a s metaboličkom aktivacijom, 0,1 ml bakterijske suspenzije (1 – 2 x 10⁹ bakterija) i 2,0 ml površinskog agara (0,6% agar, 0,5% NaCl, u kojeg se doda 10 ml sterilne otopine 0,5 mM histidin x 0,5 mM biotin, termostatorano na 45°C) pomiješa se u mikrobiološkoj epruveti i izlije (u duplikatu ili triplicatu) u sterilne Petrijeve zdjelice s 25 ml minimalnom podlogom.

2.12. Pozitivna i negativna kontrola

Pozitivne i negativne kontrole moraju se uključiti kod izvođenja svakog testa na ispitivanje mutagenosti.

Negativne kontrole su prirodni, tj. spontani broj revertanata (za TA 98 to je od 20–50 revertanata).

Pozitivne kontrole (dijagnostički mutageni) koriste se u potvrdi svojstva povećanja broja revertanata (His⁻ u His⁺) određenog bakterijskog soja *S. typhimurium* koje je istovremeno povezano s djelotvornošću (bioaktivacijskim potencijalom) S9 frakcije u S9 mix. Za TA 98 koristi se 2-aminofluoren (2-AF).

Kod ispitivanja mutagenog potencijala direktnih mutagena tj. tvari za koje nije potrebna metabolička aktivacija (- S9 mix) kao pozitivne kontrole koriste se direktni mutageni. To je za TA 98 daunomicin.

2.13. Obrada podataka

Nakon inkubacije 2-3 dana (u mraku) na temperaturi od 37°C, broje se kolonije koje su dobro vidljive na ploči. Brojanje kolonija izvodi se ručno ili na automatskom brojaču kolonija. Najmanje dvostruki broj revertanata na ploči s ispitivanim spojem (uzorkom) iznad broja spontanih mutanata kriterij je prema kojem se uzorak smatra mutagenim u Ames testu. Uz podatke o broju kolonija, izračunat je i indeks mutagenosti (eng. *Mutagenicity Indeks* - MI) koji predstavlja odnos između srednje vrijednosti broja kolonija izraslih pod utjecajem testiranog uzorka i srednje vrijednosti negativne kontrole (spontani broj revertanata izraslih u prisustvu otapala na dan testa). Indeks mutagenosti izračunat je preko formule:

$$MI = R_t/R_c$$

gdje R_t predstavlja srednju vrijednost broja revertantskih kolonija izraslih uz prisutnost testnog uzorka, a R_c predstavlja srednju vrijednost spontanog broja revertantskih kolonija izraslih u otapalu (DMSO) na dan testa.

Prema smjernicama (Myers i sur., 1987) koje je dala EPA - američka Agencija za zaštitu okoliša (eng. *U.S. Environmental Protection Agency* – EPA), tvar testirana Ames testom posjeduje mutageni potencijal (sposobnost kemijske tvari ili fizikalnog agensa da uzrokuje trajne genetske promjene – mutacije) ukoliko:

- je broj revertantskih kolonija dvostruko (ili više) veći od broja spontanih revertanata;
- je vrijednost MI veća od 2,0;
- je vrijednost MI između 1,7 i 1,9 u kombinaciji s doza/odgovor odnosom (eng. *dose/effect relationship*).

U skladu s navedenim EPA smjernicama tvar ne posjeduje mutageni potencijal ukoliko je vrijednost MI manja od 1,7 i ne postoji doza/odgovor odnos.

Za ekvivalenciju je da je broj revertanata u pozitivnoj kontroli biti povećan najmanje 10 puta u odnosu na negativnu kontrolu.

Podaci o broju kolonija/ploči i vrijednosti za indeks mutagenosti prikazani su kao srednje vrijednosti triplikata ± standardna devijacija.

Kod pripreme i analize podataka korišten je Microsoft Excel program.

3. REZULTATI

3.1. Analiza podataka dobivenih testiranjem uzoraka sedimenta

3.1.1. Testiranje uzoraka sedimenta na direktnu mutagenost

Testiranjem uzoraka sedimenta bez metaboličke aktivnosti (-S9) Ames testom dokazano je da niti jedan uzorak ne posjeduje direktni mutageni potencijal, budući da niti jedna vrijednost broja kolonija/plohi ne prelazi dvostruku vrijednost od broja kolonija dobivenih negativnom kontrolom. Također, vrijednosti MI ne prelaze 1,0 i ne postoji doza/odgovor odnos (Tablica 13.).

Tablica 13. Rezultati testiranja direktnog mutagenog potencijala uzoraka sedimenta Ames testom.

UZORAK (sediment -S9)	KOLI INA UZORKA (mg/plohi)	BROJ KOLONIJA/PLOHI ± SD	INDEKS MUTAGENOSTI (MI) ± SD
Otok Samoborski	10	71,33 ± 5,13	0,98 ± 0,07
	20	68,33 ± 8,39	0,94 ± 0,12
	40	69,00 ± 8,72	0,95 ± 0,12
	80	68,33 ± 16,20	0,94 ± 0,22
Oborovo	10	79,33 ± 6,35	1,09 ± 0,09
	20	72,33 ± 6,435	1,00 ± 0,09
	40	71,33 ± 7,64	0,98 ± 0,11
	80	69,00 ± 2,65	0,95 ± 0,04
Sisak-Crnac	10	76,67 ± 9,29	1,06 ± 0,13
	20	68,33 ± 1,53	0,94 ± 0,02
	40	63,00 ± 11,53	0,87 ± 0,16
	80	59,33 ± 9,50	0,82 ± 0,13
Košutarica	10	76,33 ± 12,90	1,05 ± 0,18
	20	66,00 ± 1,73	0,91 ± 0,02
	40	65,00 ± 15,10	0,90 ± 0,21
	80	66,33 ± 10,60	0,91 ± 0,146

Kontrola postupka (<i>blank</i>) 1	1 : 4	72,00 ± 8,48	0,99 ± 0,58
	1 : 3	63,00 ± 8,49	0,87 ± 0,12
	1 : 2	70,00 ± 2,83	0,97 ± 0,56
	1 : 1	72,00 ± 7,07	0,99 ± 0,58
Kontrola postupka (<i>blank</i>) 2	1 : 4	57,50 ± 4,95	0,79 ± 0,46
	1 : 3	76,00 ± 8,48	1,05 ± 0,61
	1 : 2	77,00 ± 5,66	1,06 ± 0,62
	1 : 1	74,00 ± 0,00	1,02 ± 0,00
Kontrola otapala (DMSO - 100µl)		72,50 ± 7,78	

Uzorci sedimenta testirani su u četiri razrjeenja i svako razrjeenje testirano je u triplikatu, dok su kontrole postupka i negativna kontrola (samo otapalo) raene u duplikatu.



Slika 8. Kolonije soja TA 98 vrste *Salmonella typhimurium* nakon provedenog Ames testa na uzorku sedimenta bez metaboli ke aktivnosti

3.1.2. Testiranje uzoraka sedimenta uz metaboli ku aktivaciju

Provedenim Ames testom na uzorcima sedimenta uz dodatak postmitohondrijske frakcije (S9) jetre štakora dokazano je da u testiranim uzorcima ne postoje potencijalni premutageni. Vrijednosti broja kolonija/plo i nisu bile ve e od dvostruke vrijednosti negativne kontrole. Indeks mutagenosti nigdje ne prelazi vrijednost od 2,0 i ne postoji doza/odgovor (Tablica 14.).

Tablica 14. Rezultati testiranja mutagenog potencijala uzoraka sedimenta Ames testom uz metaboli ku aktivaciju.

UZORAK (sediment +S9)	KOLI INA UZORKA (mg/plo i)	BROJ KOLONIJA/PLO I ± SD	INDEKS MUTAGENOSTI (MI) ± SD
Otok Samoborski	10	65,00 ± 9,54	1,00 ± 0,15
	20	63,33 ± 8,14	0,97 ± 0,13
	40	56,33 ± 8,39	0,87 ± 0,13
	80	47,00 ± 7,94	0,72 ± 0,12
Oborovo	10	62,00 ± 10,00	0,95 ± 0,15
	20	59,33 ± 5,00	0,91 ± 0,08
	40	51,33 ± 5,13	0,79 ± 0,08
	80	56,67 ± 4,93	0,87 ± 0,08
Sisak-Crnac	10	56,67 ± 10,07	0,87 ± 0,15
	20	63,00 ± 4,58	0,97 ± 0,07
	40	66,33 ± 3,05	1,02 ± 0,05
	80	62,67 ± 1,53	0,96 ± 0,02
Košutarica	10	68,00 ± 8,72	1,05 ± 0,13
	20	69,00 ± 11,00	1,06 ± 0,17
	40	60,33 ± 9,29	0,93 ± 0,14
	80	57,33 ± 1,15	0,88 ± 0,02
Kontrola postupka (blank) 1	1 : 4	52,33 ± 13,32	0,81 ± 0,21
	1 : 3	58,67 ± 10,40	0,90 ± 0,16
	1 : 2	56,00 ± 10,00	0,86 ± 0,15
	1 : 1	59,33 ± 4,16	0,91 ± 0,06
Kontrola postupka (blank) 2	1 : 4	63,00 ± 5,20	0,97 ± 0,08
	1 : 3	52,00 ± 5,00	0,80 ± 0,08
	1 : 2	53,67 ± 8,50	0,83 ± 0,13
	1 : 1	65,00 ± 12,53	1,00 ± 0,19
Kontrola otapala (DMSO - 100µl)		65,00 ± 5,66	
Pozitivna kontrola (aminofloren - 100µl)		2752,00 ± 497,80	42,34 ± 7,66

Uzorci sedimenta i kontrole postupka testirani su u četiri razrješenja i svako razrješenje testirano je u triplicatu, dok su negativna (samo otapalo) i pozitivna kontrola rađene u duplikatu.

3.2. Analiza podataka dobivenih testiranjem uzoraka vode uz metaboličku aktivaciju

Zbog nedostatne količine raspoloživih uzoraka uzorci vode testirani su samo uz dodatak postmitohondrijske frakcije (S9) jetre štakora. Iz istog razloga svi su uzorci testirani na samo dva razrješenja i u duplikatima. Vrijednosti broja kolonija/plohi i indeksa mutagenosti pojedinih uzoraka bile su veće ili vrlo blizu graničnih vrijednosti koje je EPA navela kao kriterij za proglašenje tvari/uzoraka mutagenima (Tablica 15.).

Tablica 15. Procjena mutagenog potencijala uzoraka vode Ames testom uz metaboličku aktivaciju

UZORAK (voda +S9)	KOLIČINA UZORKA (l/plohi)	BROJ KOLONIJA/PLOHI ± SD	INDEKS MUTAGENOSTI (MI) ± SD
Otok Samoborski	1	83,00 ± 15,56	1,89 ± 0,35
	3	89,50 ± 5,66	2,03 ± 0,13
Oborovo	1	67,50 ± 19,09	1,53 ± 0,43
	3	82,00 ± 1,41	1,86 ± 0,03
Sisak Crnac	1	84,00 ± 7,07	1,91 ± 0,16
	3	85,50 ± 0,71	1,94 ± 0,02
Košutarica	1	81,00 ± 5,66	1,84 ± 0,13
	3	97,00 ± 4,24	2,20 ± 0,10
Otok Samoborski (preliminarni uzorak)	1	68,00 ± 15,56	1,55 ± 0,35
	3	75,50 ± 16,26	1,72 ± 0,37
Kontrola postupka (blank)	1	60,50 ± 7,78	1,37 ± 0,18
	3	51,50 ± 0,71	1,17 ± 0,02

Primarni efluent	0,1	86,00 ± 5,66	1,96 ± 0,13
(ZOV)	0,2	71,00 ± 12,73	1,61 ± 0,29
Sekundarni efluent	0,5	127,00 ± 38,18	2,89 ± 0,87
(ZOV)	1,5	112,50 ± 17,68	2,70 ± 0,20
Kontrola otapala (DMSO - 100μl)		44,00 ± 12,73	
Pozitivna kontrola (aminofloren - 100μl)		2076,00 ± 50,9	47,18 ± 1,16

Vrijednosti koje se nalaze vrlo blizu ili prelaze prag nakon kojeg se uzorak/tvar proglašava (pre)mutagenom prikazane su crvenim znakovima.



Slika 9. Kolonije soja TA 98 vrste *Salmonella typhimurium* nakon provedenog Ames testa na uzorcima vode uz metaboli ku aktivnost.

4. RASPRAVA

4.1. EDA protokol

Geostrateška važnost rijeke Save u o uvanju sigurnosti i održivog razvoja regije tzv. Zapadnog Balkana prepoznata je od strane međunarodne zajednice, te su u posljednjih desetak godina pod međunarodnim pokroviteljstvom pokrenuti mnogi projekti kao npr.: Stability Pact Sava River Basin Initiative (ISRBC, 2001); UNDP/GEF projekt (2002); CARDS nacionalni projekti (CARDS, 2003); EC FP6 SARIB projekt (SARIB, 2004) itd.

Neki od ciljeva navedenih projekata bili su obnova i razvitak plovidbe, donošenje plana za održivo gospodarenje Savom i njezinim resursima, o uvanje i zaštita bioraznolikosti rijeke Save, te ekonomski i socijalni razvitak zemalja u regiji.

Međutim, do nedavne suradnje norveških i hrvatskih znanstvenika u okviru projekta *Assessment of Hazardous chemical contaminatin in the Sava River basin*, nije bilo pokušaja da se u Hrvatskoj (i ostalim zemljama savskog porječja) uspostavi znanstveni i institucionalni okvir potreban za pouzdanu identifikaciju, procjenu i kontrolu opasnog kemijskog oneišćenja Save i njezinih pritoka. Primjenom EDA protokola ostvarena je znanstvena suradnja stručnjaka za kemiju i biologiju s Instituta „Ruđer Bošković“ s ciljem da se unaprijede dosadašnje i razvijaju nove metode za što bržu i pouzdaniju identifikaciju različitih kemijskih spojeva koji svakodnevno ulaze u ekosustav rijeke Save, te procjeni njihova štetnost za okoliš i organizme u njemu.

Dosadašnja primjena EDA protokola kod nas i u drugim europskim zemljama pokazala je da ekotoksikologija svojim metodama za relativno brzo određivanje toksičnosti različitih tipova uzoraka omogućuje da se kemijske analize vrše ciljano na pojedinim uzorcima, dok analitička kemija upotpunjuje biološke metode otkrivajući i kemijsku strukturu i identitet konkretnog oneišćenja.

U okviru Projekta (EDA protokola) u Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju odabrano je 6 *in vitro* biotestova za testiranje okolišnih uzoraka vode i sedimenta iz Save i otpadnih voda iz Centralnog uređaja za pročišćenje otpadnih voda Zagreba:

- Procjena kronične toksičnosti uzoraka izvršena je pomoću testa inhibicije rasta slatkovodne jednostanične alge vrste *Selenastrum capricornutum*;

- Za procjenu indukcije ili inhibicije tri kritične faze u procesu stanične detoksikacije korištena su tri testa: EROD - mjerena je aktivnost etoksiresorufin O-deetilaze u PLHC-1 staničnoj liniji ribljih hepatoma stanica; mjerenje aktivnosti glutation S-transferaze također u PLHC-1 stanicama; za detekciju inhibitora MXR (eng. *multixenobiotic resistance*) mehanizma, mjerena je aktivnost ABC proteina uključenih u MXR mehanizam u PLHC-1 stanicama (Pivčević i Žaja, 2006; Žaja i sur., 2008);
- Prisutnost genotoksičnih supstanci detektirana je uz pomoć Ames testa, koji je već trideset godina najprihvaćeniji test za determinaciju mutagenih tvari;
- Ksenoestrogeni, tj. spojevi koji se u biološkim sustavima ponašaju poput hormona estrogena, detektirani su pomoću YES testa (Yeast Estrogen Screen) s posebnom linijom kvasca transfeciranom ljudskim estrogenim receptorom (Beresford i sur., 2000).

U ovom diplomskom radu obrađeni su rezultati određivanja potencijalnog prisustva mutagenih (genotoksičnih) zagađivala Ames bakterijskim testom.

4.2. Određivanje mutagenog potencijala

Izveštaja mnogih agencija pokazuju da je prisutnost mutagenih tvari u okolišu postala više pravilo nego iznimka (Davey, 1999). Lista poznatih mutagena vrlo je duga i neprestano se nadopunjuje. Baza podataka informacijskog centra za okolišne mutagene (*Environmental Mutagen Information Center; EMIC*; <http://toxnet.nlm.nih.gov>) sadrži više od 20 000 navoda o spojevima testiranim na mutagenu aktivnost. Prisutnost mutagenih spojeva u okolišu predstavlja ozbiljni problem zbog velikog potencijala takvih tvari da uzrokuju teška oboljenja (uključujući i rak), poremećaje u reprodukciji i stvaranje potomstva s genetičkim oštećenjima (Mortelmans i Zeiger, 2000).

Do sada je opisano mnogo različitih bioloških testova za detekciju mutagenih spojeva koji se baziraju na genetski modificiranim sojevima bakterija. Međutim, zbog prije navedenih razloga, vrlo se mali broj testova pokazao korisnim u analizama uzoraka iz okoliša. Također, do sada nije osmišljen test koji bi bio prikladan za testiranje svih vrsta uzoraka, stoga izbor pojedinog testa ovisi o svrsi konkretnog istraživanja.

Osmišljen prije više od 30 godina za procjenu kemijski inducirane mutageneze, Ames test se razvijao i unaprijeđivao, te je bio i ostao najčešće korišten laboratorijski test za procjenu mutagenosti istih spojeva i okolišnih uzoraka.

Poput drugih biotestova i Ames posjeduje određene nedostatke. *Salmonella* je potencijalno patogena bakterija i kako je vrlo osjetljiva na promijene u svom životnom okolišu, npr. povećana salinitet uzorka, te iako je pouzdanost testa vrlo velika kad su u pitanju poznate kemikalije, može biti premala kad se radi o niskoj koncentraciji mutagenih tvari u okolišnim uzorcima (Czyz i sur., 2002).

Neosporna vrijednost Ames testa leži u činjenici da se u relativno kratkom vremenu, i uz relativno niske troškove može testirati veliki broj uzoraka. Nadalje, osjetljivost testa je vrlo visoka (u 90% slučajeva, za spojeve koji su uzrokovali tumore kod štakora dobiven je pozitivan rezultat Ames testa) i stoga se Ames test uvelike koristi kao preliminarni test za otkrivanje mutagenog potencijala novih kemikalija, lijekova i okolišnih uzoraka, a dugogodišnja upotreba Ames testa znanstvenicima nudi veliku količinu podataka za komparativne analize.

4.3. Mutageni potencijal uzoraka sedimenata i površinske vode rijeke Save

U uzorcima sedimenta iz Save, testiranim Ames testom sa i bez metaboličke aktivacije, nije zabilježen porast broja revertantskih kolonija iznad graničnih vrijednosti (dvostruko od broja spontanih revertanata). Stoga vjerujemo da sediment na ovom dijelu toka rijeke Save može biti karakteriziran kao okolišni matriks niskog mutagenog potencijala.

Uzorci vode su zbog nedovoljne količine bili testirani samo uz metaboličku aktivaciju, te je u pojedinim uzorcima zabilježen porast broja revertantskih kolonija i vrijednosti indeksa mutagenosti iznad graničnih vrijednosti (dvostruko od broja spontanih revertanata, odnosno indeks mutagenosti iznad 2,0). No, uzimajući u obzir da je količina uzoraka bila premala da bi se uzorci testirali na široki rang razrjeđenja i u triplicatima, te uz činjenicu da ne postoji odnos doza/odgovor, podaci navedeni u Tablici 15. pokazuju da postoji mogućnost da se u pojedinim uzorcima nalaze potencijalni mutageni. U skladu s uobičajenim međunarodnim kriterijima tako nešto nije moguće definitivno utvrditi bez provedbe opsežnijeg istraživanja. To u biti znači da bi u optimalnom slučaju navedene uzorke trebalo testirati dodatnim testovima na mutagenost, primjerice mikronukleus testom, Comet testom, *in vitro* testovima na stanicama sisavaca i sl. Osim toga, znatno bolji uvid u eventualni mutageni potencijal mogao bi se dobiti frakcioniranjem navedenih uzoraka i testiranjem frakcija, u skladu s EDA konceptom.

Nadalje, činjenica da se naznake mutagenog potencijala pojavljuju u uzorcima vode s pojedinih lokacija, a da pripadaju ti sedimenti istovremeno nemaju mutageni potencijal, ukazuje na mogućnost

inicijalno prisustvo mutagena u površinskoj vodi, koji se potom u sedimentu raspadaju ili metaboliziraju na nemutagene produkte. Ovu tezu bilo bi zanimljivo obraditi u dodatnim istraživanjima, što u ovom trenutku svakako nadmašuje dosege ovog diplomskog rada.

5. ZAKLJUČCI

U skladu s definiranim ciljevima istraživanja ključni dosezi ovog diplomskog rada su slijedeći:

- Upoznala sam i ovladala raznovrsnim tehnikama uzorkovanja različitih okolišnih matrica (površinska voda, sediment, otpadna voda), te postupcima koncentriranja/ekstrahiranja uzoraka;
- Naučila sam osnovne principe EDA koncepta i nužnosti povezivanja analitičko-kemijskih i bioloških metoda u svrhu vjerodostojne procjene ekološkog rizika;
- Upoznala sam se s nizom *in vitro* biotestova koji su u Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju bili zastupljeni u okviru NATO SfP projekta, a samostalno sam ovladala izvornjem Ames bakterijskog testa na mutagene;
- Ames testom sam odredila mutageni potencijal odabranih uzoraka sedimenta i površinske vode rijeke Save, te naučila obraditi, kritički analizirati i prezentirati rezultate opisanog tipa laboratorijskih mjerenja;
- Rezultati Ames testa jasno su pokazali da analizirani uzorci sedimenta ne posjeduju mutageni potencijal, dok pojedini uzorci površinskih i otpadnih voda pokazuju granice vrijednosti s obzirom na međunarodno prihvaćene kriterije za mutagenost;
- Vjerodostojna evaluacija uvjetno pozitivnih preliminarnih rezultata dobivenih Ames testom rezultata zahtijeva dodatna istraživanja koja će biti izvršena u okviru NATO SfP projekta *Assessment of Hazardous chemical contaminatin in the Sava River basin* (NATO SfP Sava River, 2008).

6. LITERATURA

1. Beresford N., Routledge E.J., Harris C.A., Sumpter J.P. 2000. Issues arising when interpreting results from an in vitro assay for estrogenic activity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **162**, 22-33.
2. CARDS, Pilot River Basin Plan for Sava River Croatia, Bosnia and Herzegovina, Serbia and Montenegro. 2003. Dostupno na: <http://www.savariver.net/>.
3. Czy A., Wrobel B., W grzyn G. 2000b. *Vibrio harveyi* bioluminescence plays a role in stimulation of DNA repair. *Microbiology* **146**, 283–288.
4. Davey K. 1999. EPA's strategy for priority persistent, bioaccumulative, and toxic (PBT) pollutants. *Chemic. in Our Commun.*, **2**.
5. Docherty K.M., Hebbeler S.Z., Kulpa C.F.Jr. 2006. An assessment of ionic liquid mutagenicity using the Ames Test. *Green Chem.* **8**, 560–567.
6. iki D., Glava H., Glava V., Hršak V., Jelavi V., Njega D., Simon i V., Springer O.P., Tomaškovi I., Vojvodi V. 2001. *Ekološki leksikon*. BARBAT, Zagreb.
7. ISRBC, International Sava River Basin Commission. 2001. Dostupno na: <http://www.savacommission.org/>.
8. Kr a, S. 2007. Poglavlje 16.5. Amesov test. U: *Metode u molekularnoj biologiji*. Ur. Ambriovi -Ristov A., Institut "Ru er Boškovi ", Zagreb, 964-970.
9. LAWA, Working Group of the Federal States on Water Problems. 1996. Recommendation on the Deployment of Continuous Biomonitoring for the Monitoring of Surface Waters. Dostupno na: http://www.mosselfmonitor.nl/Links/lawa_de/300715.pdf/.

10. Maron D.M., Ames B.N. 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.* **113**, 173-215.
11. Myers L.E, Adams N.H., Hughes T.J., Williams L.R., Claxton L.D. 1987. An interlaboratory study of an EPA/Ames/Salmonella test protocol. *Mutat Res.* **182**, 121-133.
12. Mortelmans K., Zeiger E. 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.* **455**, 29-60.
13. NATO SfP Sava River, Assessment of hazardous chemical contamination in the Sava River basin. 2008. NATO Science for Piece projekt, dostupno na: <http://www.irb.hr/nato-savariver/>.
14. Pessala P., Schultz E., Nakari T., Joutti A., Herveb S. 2004. Evaluation of wastewater effluents by small-scale biotests and a fractionation procedure. *Ecotoxi. and Environ. Safety.* **59**, 263–272.
15. Piv evi B., and Žaja R. 2006. Pesticides and their binary combinations as p-glycoprotein inhibitors in nih 3t3/mdr1 cells. *Environ. Toxicol. and Pharmacol.* **3**, 268-276.
16. SARIB, Sava River Basin: Sustainable Use, Management and Protection of Resources. 2004. EC FP6 projekt. Dostupno na: <http://www.sarib.net/index.php?id=info/>.
17. UNDP/GEF, UNDP/GEF Danube Regional Project Activities supporting River Basin Management Planning in the Sava Basin. 2002. Dostupno na: http://bmu.info/files/pdfs/allgemein/application/pdf/petersberg_4_2_zavadsky.pdf/.
18. W grzyn G., Czy A. 2003. Detection of mutagenic pollution of natural environment using microbiological assays. *Journ. of Appl. Microb.* **95**, 1175-118.
19. Žaja, R., Caminada, D., Lon ar, J., Fent, K. and Smital, T. 2008. Development and characterization of P-glycoprotein 1 (Pgp1 ; ABCB1) mediated doxorubicin-resistant PLHC-1 hepatoma fish cell line. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **227**, 207-218.
20. <http://aquaticpath.umd.edu/appliedtox/metabolism.pdf>

21. http://en.wikipedia.org/wiki/Drug_metabolism
22. <http://chua2.fiu.edu/faculty/droy/PHC%206310/Lect-3/Binder1.pdf>
23. <http://www.stabilitypact.org/sava/savariver.ppt#266,1>, The Sava River Basin Initiative
24. www.pbf.hr/hr/content/download/6775/38013/version/1/file/
25. www.pbf.hr/hr/content/download/4817/31915/version/1/file/Metabolizam+faza+2.pdf