

# Genotoksični učinak podzemnih voda s područja odlagališta otpada Trebež

---

Korunek, Tanja

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:737728>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2017.

Tanja Korunek

788/MB

**GENOTOKSIČNI UČINAK  
PODZEMNIH VODA S PODRUČJA  
ODLAGALIŠTA OTPADA TREBEŽ**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, te na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada i Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ksenije Durgo i uz pomoć asistentice mag. ing. Ane Huđek.

*Najljepše se zahvaljujem mentorici dr.sc. Kseniji Durgo na strpljenju, trudu, pristupačnosti i pomoći tijekom izrade ovog rada. Isto tako veliko hvala i asistentici mag. ing. Ani Huđek na pomoći i korisnim savjetima. Također se zahvaljujem dr. sc. Nevenki Kopjar i ostalim djelatnicima Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada.*

*Neizmjerno se zahvaljujem svojoj obitelji i zaručniku Ivanu na nesebičnoj podršci, ljubavi i razumijevanju koje su mi pružali u svakom trenutku tijekom obrazovanja.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

## GENOTOKSIČNI UČINAK PODZEMNIH VODA S PODRUČJA ODLAGALIŠTA OTPADA TREBEŽ

*Tanja Korunek, 788/MB*

**Sažetak:** Odlaganje otpada na odlagališta najčešći je i najjeftiniji postupak zbrinjavanja otpada. Zbog neadekvatnog uređenja, odlagališta predstavljaju veliki problem zbog širenja neugodnih mirisa, opasnih plinova i zagađenih procjednih voda koje mogu kontaminirati podzemne vode. Tako podzemne vode postaju opasne za okoliš i zdravlje ljudi i životinja. Cilj ovog rada je utvrditi citotoksičnost, genotoksičnost i svojstvo indukcije slobodnih radikala podzemnih voda s područja odlagališta otpada Trebež, Samobor, uzorkovanih prilikom sanacije ovog odlagališta. Kao test sustav korištena je stanična linija humanog adenokarcinoma epitela debelog crijeva CaCo2, koja je bila izložena djelovanju uzorkovanih podzemnih voda tijekom 72 sata. Rezultati su pokazali da podzemne vode djeluju citotoksično, te da uzrokuju indukciju slobodnih radikala i oštećenje DNA. Također je ustanovljeno da nema povezanosti između citotoksičnog učinka i indukcije slobodnih radikala. U podzemnim vodama prisutno je mnogo vrsta kontaminanata koje mogu uzrokovati dokazane učinke. Iako su koncentracije individualnih kontaminanata vrlo niske, učinci se mogu pripisati njihovom aditivnom i/ili sinergističkom učinku.

**Ključne riječi:** *odlagalište otpada, podzemne vode, odlagalište Trebež, genotoksičnost*

**Rad sadrži:** 68 stranica, 18 slika, 2 tablice, 122 literaturna navoda, 3 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** *prof. dr. sc. Ksenija Durgo*

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. prof. dr. sc. Tibela Landeka Dragičević
2. prof. dr. sc. Ksenija Durgo
3. dr. sc. Nevenka Kopjar, znan. savj., IMI Zagreb
4. prof. dr. sc. Višnja Bačun-Družina (zamjena)

**Datum obrane:** 21. rujan, 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Biochemical Engineering  
Laboratory for Biology and Microbial Genetics

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

### GENOTOXIC EFFECT OF GROUNDWATERS FROM THE AREA OF LANDFILL TREBEŽ

*Tanja Korunek, 788/MB*

**Abstract:** Waste disposal at landfills is the most common and least expensive waste disposal process. Due to inadequate arrangement, landfills represent a major problem for spreading unpleasant smells, hazardous gases and polluted leachate, which can contaminate groundwater. Thus groundwater becomes dangerous for the environment and human and animal health. The aim of this paper is to determine cytotoxicity, genotoxicity and induction of free radicals of groundwater from the area of landfill Trebež, Samobor, sampled during the sanation of this landfill. As the test system, a human colon adenocarcinoma cell line CaCo2 was used, and it was exposed to the collected samples of groundwater for 72 hours. Results have shown that groundwater samples caused cytotoxic effects, induction of free radicals and DNA damage. It has also been found that there is no correlation between cytotoxic effect and free radical induction. There are many types of contaminants in groundwater that can cause proven effects. Although concentrations of individual contaminants are very low, effects can be attributed to their additive and/or synergistic effect.

**Keywords:** *landfill, groundwater, landfill Trebež, genotoxicity*

**Thesis contain:** 68 pages, 18 figures, 2 tables, 122 references, 3 supplements

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic version (pdf format) is deposited in:** Library of Food Technology and Biotechnology faculty, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** *PhD. Ksenija Durgo, Full professor*

**Reviewers:**

1. PhD. Tibela Landeka Dragičević, Full professor
2. PhD. Ksenija Durgo, Full professor
3. PhD. Nevenka Kopjar, Senior research scientist
4. PhD. Višnja Bačun-Družina, Full profesor (substitute)

**Thesis defended:** September 21, 2017.

## Sadržaj:

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	3
2.1. Gospodarenje otpadom .....	3
2.1.1. Odlagališta otpada .....	3
2.2. Procjedne vode .....	4
2.2.1. Sastav procjednih voda .....	5
2.2.1.1. Ksenobiotički organski spojevi .....	6
2.2.1.2. Teški metali .....	6
2.2.1.3. Mikroorganizmi .....	7
2.3. Podzemne vode .....	7
2.3.1. Hidrološki ciklus .....	8
2.3.2. Izvori kontaminacija podzemnih voda .....	8
2.3.3. Kontaminacija podzemnih voda .....	9
2.3.4. Povezanost odlagališta otpada s podzemnim vodama .....	9
2.3.5. Posljedice kontaminacije podzemnih voda .....	10
2.3.6. Potencijalni zdravstveni problemi .....	10
2.4. Odlagalište Trebež .....	11
2.4.1. O odlagalištu .....	11
2.4.2. Projekt sanacije odlagališta Trebež .....	13
2.5. Analiza podzemnih voda .....	14
2.5.1. Citotoksičnost .....	16
2.5.2. Oksidativni stres .....	16
2.5.2. Oštećenje DNA i komet test .....	17
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	18
3.1. Materijali .....	18
3.1.1. Biološki test sustav za određivanje genotoksičnog učinka-stanična linija CaCo2 .....	18
3.1.2. Uzorci vode .....	19
3.1.3. Kemikalije .....	19
3.1.4. Laboratorijska oprema .....	22
3.2. Metode rada .....	24
3.2.1. Kultivacija stanične linije CaCo2 u monosloju .....	24
3.2.2. Priprema stanične suspenzije iz subkonfluentnog monosloja .....	24
3.2.3. Određivanje broja stanica .....	24
3.2.4. Priprema otopina uzoraka za eksperiment .....	25
3.2.5. Određivanje citotoksičnog učinka podzemnih voda na staničnoj liniji CaCo2 .....	25
3.2.6. Određivanje slobodnih radikala na staničnoj liniji CaCo2 .....	27
3.2.7. Određivanje oštećenja DNA na staničnoj liniji CaCo2 – komet test .....	28
3.2.8. Statistička analiza rezultata .....	29



<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	30
4.1. Fizikalno-kemijska analiza uzoraka podzemnih voda.....	31
4.2. Citotoksični učinak podzemnih voda.....	32
4.3. Indukcija slobodnih radikala podzemnim vodama.....	34
4.4. Korelacija citotoksičnosti i indukcije slobodnih radikala.....	36
4.5. Učinak podzemnih voda na genetički materijal stanične linije CaCo <sub>2</sub> .....	39
4.5.1. Dužina repa kometa.....	39
4.5.2. Intenzitet repa kometa.....	41
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	45
<b>6. LITERATURA</b> .....	46
<b>7. PRILOZI</b> .....	58
Prilog 1. Geodetski situacijski nacrt s označenim piezometrima za uzorkovanje podzemnih voda na području odlagališta Trebež.....	58
Prilog 2. Kemijski sastav podzemnih voda.....	59
Prilog 3. Slike CaCo <sub>2</sub> stanica gledanih pod epifluorescencijskim mikroskopom (komet test).....	68

## 1. UVOD

U današnje vrijeme ubrzanog načina života dolazi do sve veće potrošnje značajnih količina neobnovljivih izvora energije, a posljedica toga je porast količine otpada. Kako bi se umanjio negativan utjecaj otpada na okoliš, otpad je potrebno sortirati, reciklirati i ponovo koristiti što dovodi do smanjenja njegove količine. No ipak ostaje značajna količina otpada koji se najčešće zbrinjava odlaganjem na odlagališta otpada s obzirom da se to smatra najlakšim i najjeftinijim postupkom. S druge strane, odlagališta otpada predstavljaju velik problem u cijelom svijetu jer većina nije adekvatno opremljena i uređena, pa se šire neugodni mirisi, opasni plinovi i zagađene procjedne vode koje mogu dospjeti u podzemne vode, a na kraju i u jezera, potoke i mora. Svi ovi nusprodukti odlagališta otpada opasni su za okoliš, životinje pa tako i ljude. Širenjem svijesti o opasnosti koja prijeti s odlagališta otpada diljem svijeta započela je i sanacija mnogih odlagališta. Time se odlagališta otpada posebno uređuju i zatvaraju, te se prikupljaju plinovi i procjedne vode koje nastaju nakon odlaganja otpada čime se sprječava njihovo otjecanje u okoliš.

Provedena su brojna *in vitro* i *in vivo* istraživanja ekotoksikološkog utjecaja nusprodukata koji nastaju u odlagalištima otpada. Posebice se naglasak stavlja na ispitivanje utjecaja procjednih voda odlagališta i podzemnih voda u blizini odlagališta otpada. Potrebno je njihovo redovito uzorkovanje i analiza fizikalnih, kemijskih i bioloških parametara. Time se u sastavu vode određuju potencijalni kontaminanti koji mogu štetno djelovati na okoliš. Osim toga vrlo je važno ispitati potencijalno toksično i genotoksično djelovanje procjednih ili podzemnih voda iz razloga što su to vrlo kompleksne smjese spojeva. Uobičajenim fizikalno-kemijskim analizama tih voda ne može se pouzdano utvrditi rizik za ljudsko zdravlje jer određeni spojevi ispoljuju drugačije djelovanje pod utjecajem nekih drugih spojeva ili metabolizma ljudi ili životinja.

Upravo iz tih razloga u ovom će se radu istražiti utjecaj podzemnih voda s područja sanitarnog odlagališta otpada Trebež, koje se nalazi u okolici grada Samobora, a u njegovoj su blizini i vodocrpilište Strmec te rijeka Sava. Na ovom je odlagalištu dugi niz godina odlagan komunalni i industrijski otpad, te je ovo odlagalište jedno od rijetkih odlagališta u Hrvatskoj koje je podvrgnuto sanaciji kako bi se smanjio njegov utjecaj na okoliš i poboljšala kvaliteta života u njegovoj blizini. Cilj ovog rada je utvrditi potencijalnu citotoksičnost, genotoksičnost i nastajanje slobodnih radikala podzemnih voda uzorkovanih uzvodno i nizvodno od odlagališta otpada nakon sanacije otpada. Također, cilj je usporediti rezultate dobivene na

biološkim test sustavima s rezultatima fizikalno-kemijske analize, te pronaći vezu između (geno)toksičnog učinka i kemijskog sastava uzorkovanih voda. Eksperimenti će se provesti s tri uzorka podzemne vode: podzemna voda uzorkovana zapadno (uzorak 1), sjeverno (uzorak 2) i istočno (uzorak 3) od odlagališta. Kao biološki test sustav za ispitivanje genotoksičnog učinka podzemnih voda koristit će se stanična linija humanog adenokarcinoma epitela debelog crijeva – CaCo2.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. GOSPODARENJE OTPADOM

Odlaganje komunalnog krutog otpada globalni je problem, osobito u zemljama u razvoju. Razlog tome je siromaštvo, brzi rast populacije i sve veće stope urbanizacije u kombinaciji s manjkom sredstava, te lošim planiranjem i upravljanjem vlade (APHA, 1998; Mor i sur., 2006). Brzi rast populacije doprinosi količini, kvaliteti i raznolikosti komunalnog krutog otpada, a prikupljanje, transport i rukovanje otpadom mora se provoditi ispravno kako bi se umanjilo nastajanje problema koji su povezani sa zdravljem ljudi i okoliša (Dhere i sur., 2008; El-Fadel i sur., 1997). Može se reći kako je kruti otpad najnepoželjniji nusprodukt ekonomskog razvoja i tehnološkog napretka (Bakare i sur., 2013). Postoje različite metode gospodarenja otpadom, a to su: spaljivanje, odlaganje, recikliranje, kompostiranje, odlaganje u more i vode. Od nabrojanih metoda, odlaganje na odlagalište otpada je najčešća i čini oko 95% metoda odlaganja krutog otpada u svijetu (Kurniawan i sur., 2006).

Razne vrste otpada (uključujući otpatke iz metalne industrije, industrije željeza i čelika, industrije papira i gume, trošeno ulje iz strojeva, sintetski tekstil, boju iz tekstilne industrije, radioaktivne tvari, farmaceutske i proizvode za osobnu njegu, životinjski otpad, električni i elektronički otpad) mogu posjedovati zapaljiva, iritabilna, toksična, karcinogena i korozivna svojstva. Prema tome kruti otpad može biti opasan za život ako nije prikladno odložen, te izaziva veliku međunarodnu zabrinutost zbog mogućih učinaka na okoliš i zdravlje živih bića u njegovoj blizini (Bakare i sur., 2013).

#### 2.1.1. Odlagališta otpada

Odlaganje otpada na odlagališta je najjednostavnija, najjeftinija i najisplativija metoda odlaganja krutog otpada i u razvijenim i u zemljama u razvoju širom svijeta (Ikem i sur., 2002). U većini zemalja koje su slabije ekonomski razvijene samo neka odlagališta dizajnirana su za odlaganje ili kućanskog ili industrijskog krutog otpada, dok je većina predviđena za odlaganje miješanog otpada. Odlagališta su najčešće nesanitarna bez ograda, pokrova i sustava za sakupljanje procjednih voda (Bakare i sur., 2013). Smještene su na

javnim mjestima okružena stambenim četvrtima ili u močvarnim i drugim mjestima sa visokom količinom oborina.

Tijekom odlaganja i procesiranja na odlagalištima i deponijima kruti otpad prolazi kroz kombinacije fizikalnih, kemijskih i mikrobnih procesa promjene (Christensen i sur., 2001). Na taj se način kruti otpad pretvara u različite spojeve topljive u vodi i krute čestice koje mogu dospjeti iz otpada u procjedne vode, a zatim i u podzemne vode (Bjerg i sur., 2003).

## 2.2. PROCJEDNE VODE

Procjedne vode odlagališta komunalnog otpada su visoko koncentrirane kompleksne otpadne vode koja sadrže otopljene organske tvari; anorganske spojeve kao što su amonijak, kalcij, magnezij, natrij, kalij, željezo, sulfati, kloridi i teški metali poput kadmija, kroma, bakra, olova, cinka i nikla; te ksenobiotičke organske spojeve (Christensen i sur., 2001; Lee i Jones-Lee, 1993). Izvori procjednih voda mogu uključivati precipitaciju, navodnjavanje, površinsko otjecanje, prodor podzemnih voda i početni sadržaj vlage prisutne u otpadu (El-Fadel i sur., 1997). Najčešće nastaju u odlagalištu infiltracijom oborina kroz masu otpada i biodegradacijom otpada.

Procjedne vode mogu prodrijeti u podzemne vode i dospjeti na značajne udaljenosti uzrokujući kontaminaciju okoliša. Osim u podzemne, mogu dospjeti i u površinske vode te utjecati na bioraznolikost vodenih ekosustava, kontaminirati lance prehrane i predstavljati rizik za ljudsko zdravlje. Rezultat toga može biti akumulacija spojeva iz procjednih voda u hranidbenom lancu ili u ljudskom organizmu kod dugotrajne izloženosti (Sang i Li, 2004). Procjena toksičnog i genotoksičnog potencijala odlagališne procjedne vode prema organizmima stječe poseban značaj osobito u slučaju konstantne izloženosti. Nekoliko *in vitro* i *in vivo* istraživanja ekotoksikološkog utjecaja kemikalija iz okoliša potvrdilo je da mnoge kemikalije koje su identificirane u gradskim odlagalištima i u procjednim vodama imaju genotoksični i karcinogeni potencijal (Omura i sur., 1992; Schrab i sur., 1993).

### 2.2.1. Sastav procjednih voda

Smatra se kako su procjedne vode kompleksna mješavina kemikalija i mikroorganizama. Christensen i sur. (1994) opisali su procjednu vodu odlagališta kao mješavinu četiri glavne skupine onečišćenja: otopljenih organskih tvari, anorganskih makrokomponentata, teških metala i ksenobiotičkih organskih spojeva. Drugi spojevi koji mogu biti prisutni, ali u malim količinama su: bor, arsen, selen, litij, živa i kobalt (Christensen i sur., 2001). Spojevi koji su od sekundarnog značaja variraju u sastavu ovisno o vrsti i starosti krutog otpada, tehnologiji odlagališta, stupnju zbijenosti, hidrologiji mjesta i klimatskim promjenama (Bjerg i sur., 2003; Fan i sur., 2006). Koncentracije makrokomponentata koje su glavni anorganski sastojci procjednih voda (Ca, Mg, Na, K, amonij (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), Fe, Mn, kloridi (Cl<sup>-</sup>), sulfati (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) i bikarbonati (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>)) ovise o procesima stabilizacije u odlagalištima ili deponijima (Kjeldsen i sur., 2002).

Otopljene organske tvari obično se izražavaju kao kemijska potrošnja kisika (KPK), ukupni organski ugljik (TOC) ili biokemijska potrošnja kisika (BPK). U ranim stadijima krutog otpada u odlagalištima, procjedne vode obično imaju visoku BPK (9500 mg/L) vrijednost te još višu KPK vrijednost (14 000 mg/L) (Kjeldsen i sur., 2002). Otopljene organske tvari su glavni parametar koji pokriva široki raspon produkata organske razgradnje uključujući metan (CH<sub>4</sub>), hlapive masne kiseline i druge postojeće spojeve. Boja procjednih voda rezultat je raspadanja organskih tvari u krutom otpadu (Aziz i sur., 2007). U procjednim vodama krutog otpada je identificirano više od 200 organskih spojeva (Paxeus, 2000; Schwarzbauer i sur., 2002), a njih oko 35 ima potencijal da uzrokuje štetu u okolišu i po ljudsko zdravlje (Paxeus, 2000). Neki od identificiranih organskih spojeva uključuju postojana organska onečišćenja (*persistent organic pollutants*; POP) kao što su *non-ortho* i *mono-ortho* supstituirani klorobifenili (dioksinima slični poliklorirani bifenili; PCB), poliklorirani dibenzo-*p*-dioksini i dibenzo-furani (PCDD/DF) (Ham i sur., 2008), policiklički aromatski ugljikovodici (PAH) (Valavanidis i sur., 2008), te heksaklorobutadieni i pentaklorobenzeni (Matejczyk i sur., 2011). Radovi Christensena i sur. (2001), Kjeldsena i sur. (2002) te Cuadra i sur. (2006) pokazali su da tijekom izlaganja, organski spojevi u procjednim vodama imaju sposobnost bioakumulacije u ribi i ljudskom tkivu.

### 2.2.1.1. Ksenobiotički organski spojevi

Ksenobiotički organski spojevi (*xenobiotic organic compounds*, XOC) su uglavnom povezani s industrijskim i konvencionalnim opasnim otpadom, no velik broj je također prisutan u komunalnom i kućanskom krutom otpadu (Schwarzbauer i sur., 2002; Slack i sur., 2007). Potencijalni izvori XOC su: boja, vrtno kemikalije, sredstva za čišćenje kućanstva, humani i životinjski lijekovi, proizvodi motornih vozila, električni otpad, elektronička oprema i baterije (Slack i sur., 2005, 2007). Vrste i koncentracije XOC-a u procjednim vodama krutog otpada razlikuju se od vode do vode, a razlika je odraz starosti odlagališta, sastava otpada i procesa upravljanja odlagalištem (Oman i Rosqvist, 1999; Christensen i sur., 2001). Koncentracije su više tijekom aktivne faze razgradnje i postepeno se smanjuju kako se odlagalište stabilizira (Christensen i sur., 2001), no mogu se nastaviti otpuštati iz otpada desetljećima. XOC obično nađeni u visokim koncentracijama u procjednim vodama krutog otpada su: benzen, toluen, etil-benzen i ksileni (BTEX spojevi) (Kjeldsen i sur., 2002). Uz BTEX nađeni su i halogenirani ugljikohidrati: tetrakloroetilen, dikloroetilen i dikloroetani (Krug i Ham, 1991; Kjeldsen i sur., 2002). Još jedna vrsta XOC-a nađenih u procjednim vodama odlagališta su plastifikatori, među koje spadaju ftalati: di-(2-etilheksil)-ftalat (DEHP), dietilftalat (DEP), diizoonilftalat (DINP) i dibutil ftalat (DBP). Oni su intenzivno korišteni u proizvodnji potrošačkih dobara (Jonsson i sur., 2003; Marttinen i sur., 2003). Zainteresiranost za ove spojeve je porasla od kako su klasificirani kao endokrini disruptori i navedeni kao primarni kontaminanti od strane US EPA jer su skloni dugotrajnom zadržavanju u okolišu i bioakumulaciji u organizmu (Schwarzbauer i sur., 2002).

### 2.2.1.2. Teški metali

Teški metali koji se najčešće pojavljuju u procjednim vodama odlagališta uključuju bakar, kadmij, olovo, nikel, krom, arsen, mangan, cink i živu (Reinhart, 1993), te njihove metalne koloide i komplekse s organskim tvarima (Jensen and Christensen, 1999). Teški metali s visokim nivoom sorpcije i precipitacije ne predstavljaju prijetnju kao kontaminanti podzemnih voda zbog slabe migracije u procjedne vode. No, bez obzira na to mogu doseći kritične razine zbog sposobnosti da se bioakumuliraju u tkivima živih organizama (Slack i sur., 2005; Cuadra i sur., 2006; Sanchez-Chardi i sur., 2007). Koncentracije teških metala u procjednim vodama odlagališta su obično niske i ne predstavljaju veliki problem za podzemne

vode (Bjerg i sur., 2003). Njihova prisutnost u visokoj koncentraciji čini mali volumen procjedne vode visoko toksičnim (Sawaittayothin i Polprasert, 2007).

### 2.2.1.3. Mikroorganizmi

Iz procjednih voda krutog otpada su izolirani patogeni i oportunistički mikroorganizmi. Donnelly i sur. (1988) su iz opasnog krutog otpada i procjednih voda eksperimentalnih odlagališta izolirali različite vrste Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Gram-pozitivne vrste uključuju bakterije iz roda *Clostridium*, dok Gram-negativne vrste najčešće čine bakterije rodova *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* i *Pseudomonas*. Također su identificirani i neki rodovi funga kao što su *Fusarium*, *Monosporium*, *Penicillium*, *Phoma* i *Pleospora* (Donnelly i sur., 1988). To su potencijalni patogeni i toksin-producirajući rodovi koji se mogu transportirati s procjednim vodama u podzemne ili površinske vode i kontaminirati pitku vodu (Daskalopoulos i sur., 1998). Analizom specifičnih grupa mikroorganizama procjednih voda odlagališta, Matejczyk i sur. (2011) su zaključili da one predstavljaju sanitarnu i epidemiološku opasnost.

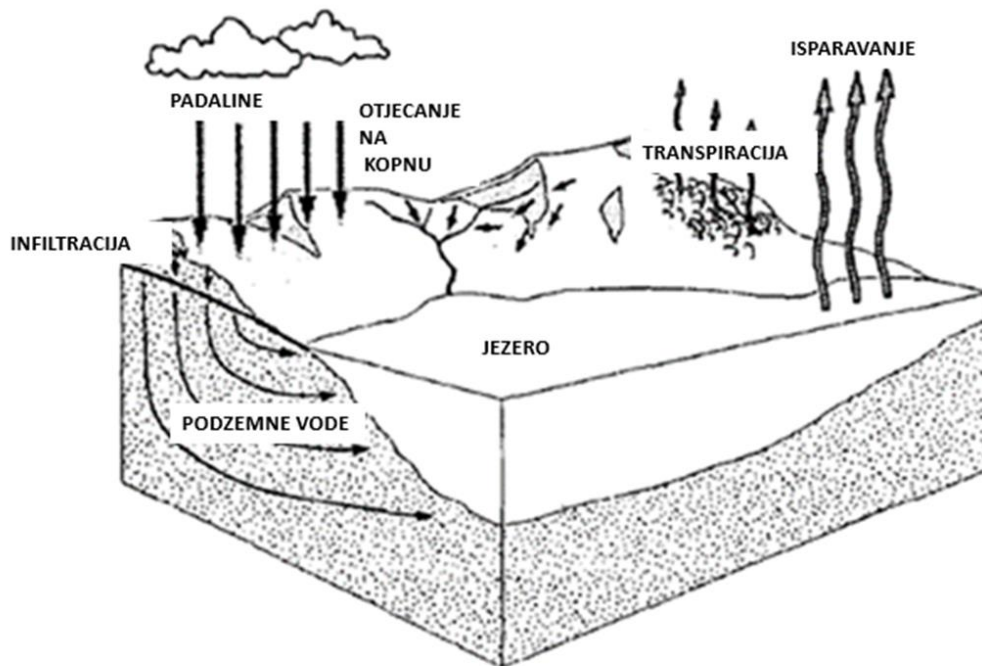
## 2.3. PODZEMNE VODE

Podzemne vode su vode ispod površine zemlje, zauzimaju dio tla koje je potpuno zasićeno i otječu u prostor za skladištenje pod pritiskom koji je veći od atmosferskog tlaka (Sabahi i sur., 2009). One su izvor održavanja života zajednica širom svijeta. U SAD-u pitkom vodom opskrbljuju 95% seoskih zajednica i oko pola ukupne populacije. Također se koriste za kuhanje, uzgoj stoke i u poljoprivredne svrhe (US EPA, 1993). Mislilo se da su podzemne vode zaštićene od kontaminacije slojevima kamenja i tla koji djeluju kao filteri. Danas je poznato da su podzemne vode osjetljive na kontaminacije, koje u njima mogu dospjeti iz odlagališta i laguna koji se koriste za odlaganje otpada. Onečišćenje podzemnih voda također može biti rezultat brojnih uobičajenih postupaka, kao što je upotreba gnojiva i pesticida, te odlaganje ljudskog, životinjskog i poljoprivrednog otpada. U podzemnim vodama u SAD-u detektirano je više od 200 različitih kemikalija od kojih su neke štetne za ljudsko zdravlje. Ključ održavanja zaliha podzemnih voda sigurnima je sprječavanje njihove kontaminacije (US EPA, 1993).



### 2.3.1. Hidrološki ciklus

Hidrološki ciklus (Slika 1) je izmjena vode između zemlje i atmosfere kroz procese kao što su isparavanje i padaline. Kada kiša ili druge padaline dospiju na površinu zemlje, dio njih obnavlja površinske vode kao što su rijeke, jezera, potoci i oceani; dio je apsorbiran od strane biljnog korijenja; a dio isparava. Ostatak vode se infiltrira u zemlju i postaje podzemna voda. Podzemne vode se kreću ispod površine zemlje, ali većina te vode se na kraju izlijeva u izvore, potoke, mora ili druge površinske vode. Dio površinskih voda isparava u atmosferu, formirajući oblake i nove padaline, te na taj način zatvara hidrološki ciklus. Biljke također pridonose hidrološkom ciklusu kroz transpiraciju, tj. evaporaciju vlage kroz pore u lišću. (US EPA, 1993)



**Slika 1.** Hidrološki ciklus (US EPA, 1993).

### 2.3.2. Izvori kontaminacija podzemnih voda

Kontaminanti u podzemne vode mogu dospjeti iz prirodnih izvora ili pak biti posljedica brojnih ljudskih aktivnosti. Stambene, komunalne, komercijalne, industrijske i poljoprivredne aktivnosti uvelike mogu utjecati na kvalitetu podzemnih voda. Neki od načina

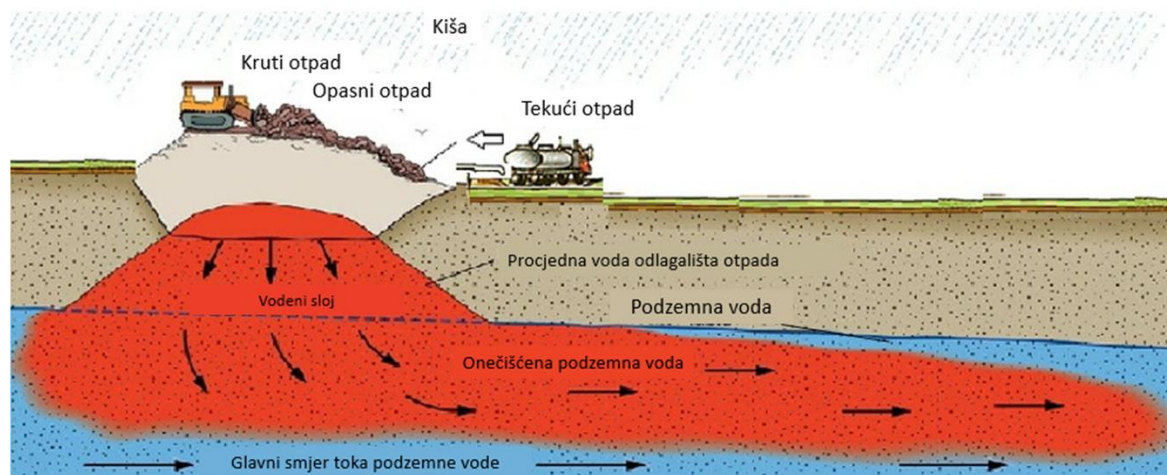
kontaminacije su prirodni izvori, septički sustavi, neprikladno odlaganje opasnog otpada, otpuštanje kemikalija, primjena pesticida i gnojiva, te odlagališta otpada (US EPA, 1993).

### 2.3.3. Kontaminacija podzemnih voda

Ovisno o fizikalnim, kemijskim i biološkim svojstvima vode, kontaminanti koji su otpušteni u okoliš mogu se kretati unutar vodonosnog sloja. Zbog sporog kretanja, kontaminanti imaju tendenciju koncentriranja u obliku nakupina koje teku istim putem kao i podzemne vode. Veličina i brzina kretanja nakupine ovisi o količini i vrsti kontaminanata, njihovoj topljivosti i gustoći, te brzini toka okolnih podzemnih voda (US EPA, 1993).

### 2.3.4. Povezanost odlagališta otpada s podzemnim vodama

Diljem Zemlje postoje tisuće komunalnih i industrijskih odlagališta otpada gdje je odložen kruti otpad, a smatraju se jednom od najvećih prijetnji podzemnim vodama (Fatta sur., 1999; US EPA, 1984). Mjerilo ove prijetnje ovisi o koncentraciji i toksičnosti kontaminanata u procjednoj vodi, vrsti i propusnosti geoloških slojeva, dubini vodenih tokova, te smjeru toka podzemnih voda (Adeolu i sur., 2011). Kemikalije koje bi trebale biti odložene na odlagališta opasnog otpada ponekad završe na odlagalištima komunalnog otpada (US EPA, 1993). One se s odlagališta mogu isprati u podzemne vode oborinama i površinskim otjecanjem (Slika 2). Naime, voda iz oborina se miješa s vodom koja je već prisutna u krutom otpadu i uzrokuje otjecanje procjednih voda s tla odlagališta infiltracijom u lateralnim ili vertikalnim smjerovima, te tako dospijevaju u podzemne vode i uzrokuju kontaminacije (Badmus, 2001; Iqbal i Gupta, 2009). Stoga bi nova odlagališta trebala imati glinene ili sintetičke obloge i sustave za prikupljanje procjednih voda kako bi zaštitili podzemne vode. Većina starijih odlagališta nema ove zaštitne mjere, te su često smještena iznad vodonosnih slojeva, blizu površinskih voda ili na propusnim tlima s plitkim vodenim tokovima, te je veća vjerojatnost da procjedne vode kontaminiraju podzemne vode. Isto tako, zatvorena odlagališta i dalje mogu predstavljati prijetnju za podzemne vode ukoliko prije zatvaranja nisu bila prekrivena nepropusnim materijalom poput gline (US EPA, 1993).



**Slika 2.** Kontaminacija podzemne vode procjednom vodom s odlagališta otpada (Aljaradin i Persson, 2014).

### 2.3.5. Posljedice kontaminacije podzemnih voda

Kontaminacija podzemnih voda može rezultirati lošom kvalitetom vode za piće, gubitkom opskrbe vodom, degradacijom sustava površinskih voda, visokim troškovima pročišćavanja i alternativne opskrbe vodom, te potencijalnim zdravstvenim problemima. S obzirom na to da se podzemne vode općenito kreću vrlo sporo, kontaminacije često dugo vremena ostaju neotkrivene, što pročišćavanje kontaminirane vode čini težim (US EPA, 1993).

### 2.3.6. Potencijalni zdravstveni problemi

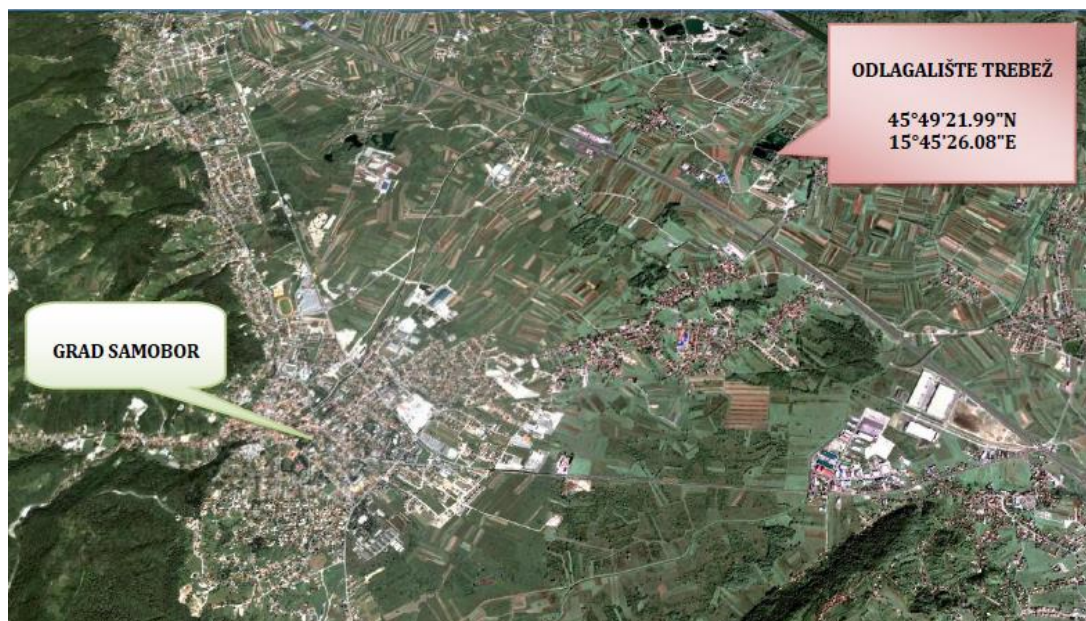
Voda za piće koja sadrži bakterije i viruse može rezultirati raznim bolestima, kao što su hepatitis, kolera ili giardijaza, dok voda za piće s visokom koncentracijom nitrata može uzrokovati methemoglobinemiju ili „sindrom plave djece“. Benzen je poznati humani karcinogen, a također su poznati i ozbiljni zdravstveni učinci olova kao što su poremećaji učenja kod djece, problemi sa živcima, bubrezima i jetrom, te rizična trudnoća. Koncentracije ovih i drugih spojeva u vodi za piće regulirane su zakonima. Stotine drugih kemikalija još nisu regulirane, a njihovi učinci na zdravlje još nisu poznati. Podzemne vode potencijalno mogu biti kontaminirane velikim brojem mikroorganizama i tisućama sintetskih kemikalija.

Sprječavanje kontaminacije podzemnih voda najbolji je način smanjenja rizika za zdravlje povezanog s lošom kvalitetom vode za piće (US EPA, 1993).

## 2.4. ODLAGALIŠTE TREBEŽ

### 2.4.1. O odlagalištu

Odlagalište Trebež nalazi se 3.5 km od centra Samobora (Slika 3), a u njegovoj su blizini vodocrpilište Strmec i rijeka Sava (Ministarstvo zaštite okoliša i energetike, 2015). Smješteno je u III. vodozaštitnoj zoni vodocrpilišta Strmec, koje se nalazi oko 2 km istočno i nizvodno u odnosu na generalni tok podzemnih voda (Anonymus 1, 2015). To nosi realnu opasnost od mogućnosti da otopljena onečišćenja kroz vodonosni sloj šljunka krenu nizvodno prema bunarima vodocrpilišta. Osim toga, prve kuće u naselju Vrbovec udaljene su svega 400 metara od odlagališta (Anonymus 2, 2010).



**Slika 3.** Lokacija odlagališta otpada Trebež (Anonymus 2, 2010).

Na ovom je odlagalištu odlagan komunalni i industrijski otpad u periodu od 1968. do 2007. godine. Ukupna površina odlagališta je 8 ha, a područje pod otpadom iznosi 43.792 m<sup>2</sup>. Budući da se na odlagalištu nisu provodila mjerenja težine otpada koji se odlaže, moguće je

dati tek procjenu odloženih količina komunalnog i tehnološkog otpada. U razdoblju od 1968. do 2004. godine procjenjuje se da je na odlagalištu odloženo 377 000 tona svih vrsta otpada. Prostor zauzet otpadom procjenjuje se u vrijednosti od 555 000 m<sup>3</sup> (Anonymus 2, 2010).

U dva navrata, 1997. i 2008. godine provedena su istraživanja u svrhu određivanja vrste, količine i sastava svježeg i neobrađenog komunalnog otpada koji se generira na području Grada Samobora (Tablica 1) (Anonymus 2, 2010).

**Tablica 1.** Sastav komunalnog otpada s područja Grada Samobora (Anonymus 2, 2010).

KOMPONENTA OTPADA	PROLJEĆE 1997.	PROLJEĆE 2008.
	MASENI %	
Guma	0,6	0,5
Papir i karton	17,2	19,0
Staklo	2,9	3,7
Plastika	8,9	14,0
Metali	5,2	3,0
Drvo	2,1	1,3
Tekstil	9,0	9,3
Posebni otpad	0,8	0,00
Biootpad	17,8	24,0
Inertni otpad	0,9	1,9
Koža i kosti	1,6	1,7
Sitnica	33,0	21,6

Ukupne količine komunalnog otpada generiranog na području Grada Samobora u navedenom periodu prikazane su u Tablici 2.

**Tablica 2.** Evidentirane količine prikupljenog komunalnog otpada na području Grada Samobora (Anonymus 2, 2010).

GODINA	2005.	2006.	2007.	2008.	2009.
<b>Količina prikupljenog otpada (t)</b>	10 949	9 092	9 537	12 348	11 903

#### 2.4.2. Projekt sanacije odlagališta Trebež

Projekt sanacije odlagališta neopasnog otpada Trebež proveden je u sklopu Operativnog programa "Zaštita okoliša" 2007.-2013., Prioritetna os 1 – Razvoj infrastrukture za gospodarenje otpadom radi uspostave cjelovitog sustava gospodarenja otpadom, Mjera 1.2 – Sanacija lokacija visoko onečišćenih otpadom. Projekt pridonosi ispunjenju ciljeva operativnog programa jer bi se sanacijom neuređenog odlagališta trebalo poboljšati stanje podzemnih i površinskih voda, ljudskog zdravlja i okoliša u cjelini (Anonymus 3, 2017). Radovi koji su započeli u rujnu 2015. (Slika 4.) uspješno su završeni u lipnju 2016. godine (Slika 5.).



**Slika 4.** Odlagalište Trebež prije sanacije (Anonymus 3, 2017).



**Slika 5.** Odlagalište Trebež nakon sanacije (Anonymus 3, 2017).

Opći ciljevi Projekta bili su: eliminacija negativnih učinaka nekontroliranog odlaganja otpada na odlagalištu; fizička izolacija onečišćene podzemne vode ispod samog tijela odlagališta od podzemne vode u okolišu; smanjenje rizika uzrokovanih otpadom, posebice rizika onečišćenja površinskih i podzemnih voda, zraka i tla, kao i rizika za ljudsko zdravlje; zaštita životinjskog i biljnog svijeta od negativnih utjecaja odloženog otpada; i povećanje vrijednosti nekretnina na užem području Trebeža (Anonymus 3, 2017).

Uređenje odlagališta "Trebež" u Samoboru je obuhvatilo: prekrivanje i zatvaranje odlagališta; izgradnju svih pratećih sustava: otplinjavanje, odvodnja oborinskih voda, hidrantska mreža, interne prometnice, hortikulturalno uređenje; izvedbu dijafragme oko odlagališta; izvedbu crpnog sustava za vode unutar dijafragme uz zbrinjavanje vode iz crpljenog sustava; te izvedbu lagune (Anonymus 3, 2017).

## 2.5. ANALIZA PODZEMNIH VODA

Kako bi istražili utjecaj podzemnih voda na okoliš, a samim time i na ljude, potrebno je njihovo redovito uzorkovanje i analiza. Analiza vode predstavlja određivanje potencijalnih kontaminanata koji se nalaze u sastavu vode i mogu utjecati na okoliš, a dijeli se na fizikalnu, kemijsku i biološku analizu. Fizikalna analiza voda obuhvaća mjerenje fizikalnih parametara, kao što su najčešće temperatura, elektrovodljivost, pH, boja, miris, otopljeni kisik i mutnoća, dok se kemijskom analizom vode određuju kemijski parametri poput koncentracije policikličkih aromatskih spojeva (PAH), organske (ugljikovodici, ulja, masti, pesticidi, površinski aktivne tvari) i anorganske tvari (alkalitet, sadržaj klora, teških metala, dušikovih spojeva i spojeva fosfora i sumpora, koncentracija plinova kisika i metana) (Jambrović, 2013). Osim toga, važna je i biološka analiza vode čime se određuje utjecaj kontaminanata prisutnih u vodi na biološke sustave, ali i prisutnost mikroorganizama, virusa ili drugih nepoželjnih organizama u vodi (Jambrović, 2013). Vrlo je česta mikrobiološka analiza pri čemu se obično određuju *Escherichia coli*, ukupni koliformi, enterokoki, *Clostridium perfringens* (uključujući spore) i *Pseudomonas aeruginosa* (Anonymus 4, 2014).

Određivanje kemijskog sastava i genotoksičnog potencijala otpadnih, površinskih i podzemnih voda smatra se ključnim za zaštitu okoliša i javno zdravlje (Brown i Donnelly, 1984). Vrlo je važna procjena toksičnog i genotoksičnog potencijala kompleksnih smjesa kao što su procjedne ili otpadne vode, jer trenutne kemijske provjere ne mogu pouzdano

identificirati rizik za ljudsko zdravlje i zdravlje životinja. Genotoksični utjecaj može dovesti do promjena koje uključuju jednu generaciju (oštećenja genoma u somatskim stanicama) ili do dugotrajnih učinaka (oštećenja genoma u germinativnim stanicama). To može rezultirati smanjenjem fertiliteta populacija koje nastanjuju vodeni okoliš, smanjenjem bioraznolikosti ili čak potpunim izumiranjem (Widziewicz i sur., 2012).

Učestalost karcinoma (Janerich i sur., 1981), niska težina djece pri rođenju (Vianna i Polan, 1984) i rastuće učestalost kromosomskih promjena (Heath i sur., 1984) među stanovnicima izloženim opasnim kemikalijama koje se procjeđuju s odlagališta povećala je svijest o štetnim učincima na zdravlje ljudi koji bi mogli biti povezani s odlagalištima otpada. To je privuklo pažnju istraživača ka istraživanju toksičnosti krutog otpada. Najčešće korišten pristup je identifikacija fizičkih i kemijskih sastojaka procjednih voda (Ikem i sur., 2002; Oyeku i Eludoyin, 2010; Laniyan i sur., 2011). Glavno ograničenje ovog pristupa je da ne daje informacije o svim toksičnim kemikalijama prisutnim u mješavini otpada i njihovim potencijalnim sinergističkim i antagonističkim interakcijama u živim organizmima (Bakare i sur., 2013).

Osobitu popularnost kao alat za procjenu rizika voda stekli su biotestovi genotoksičnosti i mutagenosti. To su *in vitro*, *in vivo* i *in situ* eksperimenti dizajnirani za određivanje potencijala ksenobiotika da različitim mehanizmima oštećuju DNA i kromosome, bez potrebe za njihovim standardnim kemijskim karakterizacijama (Claxton i sur., 1998). Spojevi, za koje se dokaže da su pozitivni na genetičke testove, su potencijalni humani karcinogeni i/ili mutageni (Bakare i sur., 2013). Procjena genotoksičnosti nepoznate smjese spojeva provodi se brojnim biotestovima pri čemu se koriste prokariotski i eukariotski organizmi. Nivo oštećenja DNA relativno brzo daje informacije o genotoksičnom potencijalu voda i omogućuje da se poduzmu preventivne mjere (Widziewicz i sur., 2012). Također, u posljednja tri desetljeća razvijeni su i brojni kratkoročni testovi kao pomoć pri identifikaciji genetičkog oštećenja u biološkim sustavima u blizini postrojenja za kruti otpad (Heath i sur., 1984; Vrijheid i sur., 2002).



### 2.5.1. Citotoksičnost

Svojstvo ksenobiotika da pri određenoj koncentraciji izazove staničnu smrt naziva se citotoksičnost. Različiti su načini djelovanja citotoksičnih spojeva poput nekroze, a to je gubitak integriteta stanične membrane što rezultira lizom stanice, stanice se prestaju dijeliti i rasti, te se aktivira apoptoza – genetički programirana stanična smrt. Citotoksičnost se izražava kao LD50 vrijednost koja predstavlja smrt 50% ispitivane populacije pri određenoj koncentraciji ksenobiotika, a određuje se pomoću dvije vrste testova: klasični (istraživanja na životinjama) i alternativni testovi toksičnosti (istraživanja na mikroorganizmima ili staničnim linijama) (Pacadi, 2015).

### 2.5.2. Oksidativni stres

Oksidativni stres predstavlja neravnotežu između proizvodnje slobodnih radikala i reaktivnih metabolita (oksidansa ili reaktivnih kisikovih spojeva – ROS), što može dovesti do oštećenja važnih biomolekula i organa u organizmu. Zaštitni mehanizmi kojima se eliminiraju ovi spojevi nazivaju se antioksidativni sustavi. Ovi su procesi povezani s prijenosom elektrona što utječe na redoks stanje stanica, ali i cijelog organizma. Promjena redoks stanja može stimulirati ili inhibirati aktivnost raznih signalnih puteva te tako utjecati na sudbinu stanica (Pacadi, 2015)

Slobodni radikali su nestabilne i visoko reaktivne kemijske vrste koje posjeduju nespareni elektron. U stanicama nastaju slučajno kao nusproizvodi metabolizma ili namjerno tijekom fagocitoze (Cheeseman i Slater, 1993). Oni mogu donirati ili primiti elektrone, pri čemu se ponašaju kao oksidansi ili reducensi. Najčešći reaktivni kisikovi radikali (ROS) su hidroksilni radikali (HO), superoksidni anion, vodikov peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), kisikov singlet, hipoklorit, radikal nitrita i peroksinitritni radikal. Oni mogu izazvati oštećenja biološki važnih molekula poput DNA, proteina, ugljikohidrata i lipida (Young i Woodside, 2001), što dovodi do oštećenja stanica i narušavanja homeostaze organizma (Lobo i sur., 2010).

### 2.5.3. Oštećenje DNA i komet test

Jedna od najčešće primjenjivanih metoda za mjerenje oštećenja DNA je *single cell gel electrophoresis* (SCGE), poznata i kao komet test. Ovo je fluorescentno mikroskopska metoda široko korištena kao jednostavan, osjetljiv i brzi alat za procjenu oštećenja DNA i njezinog popravka u jednoj stanici (Olive i sur., 1990).

Kemikalije ili agensi koji mogu uzrokovati kromosomsko oštećenje ili oštećenje DNA nazivaju se genotoksini (Pacadi, 2015). Oštećenja koja se mogu uočiti nakon djelovanja genotoksičnih spojeva u najvećoj su mjeri jednolančani i dvolančani lomovi DNA (Fučić, 1997). Jednolančani lomovi DNA mogu se popraviti baznim ili nukleotidnim ekscizijskim popravkom, dok su za popravak dvolančanih lomova potrebni složeniji mehanizmi kao što su homologna i nehomologna rekombinacija. Ukoliko se oštećenje DNA može popraviti to ne mora nužno značiti da je popravak dobar. Popravak DNA može biti pogrešan i dovesti do promjene genetičke informacije, a kao posljedica nastaju mutacije što na kraju može dovesti do maligne transformacije (rak) (Pacadi, 2015). Ukoliko se lom DNA ne može popraviti, onemogućena je replikacija i transkripcija, a time se zaustavlja rast stanice i sinteza proteina što na kraju rezultira smrću stanice.

Komet test kombinira jednostavnost biokemijskih tehnika s uobičajenim testovima citotoksičnosti (Widziewicz i sur., 2012). U odnosu na druge testove genotoksičnosti, kao što su aberacija kromosoma, izmjena sestrinskih kromatida ili mikronukleus test, prednosti komet testa su: moguća procjena oštećenja u svim tipovima stanica, visoka osjetljivost (detekcija 1 loma DNA na 1010 Da DNA), potreban mali broj stanica za analizu (10 000 stanica po uzorku), fleksibilnost odabira stanica za ispitivanje (i proliferirajuće i neproliferirajuće), niski troškovi, jednostavnost i relativno kratko vrijeme analize, male količine spojeva koji se testiraju, pouzdana statistička analiza i mogućnost procjene različitih oštećenja DNA (Gedik i sur., 1992; Tice i sur., 2000; Lah i sur., 2008; Dhawan i sur., 2009).

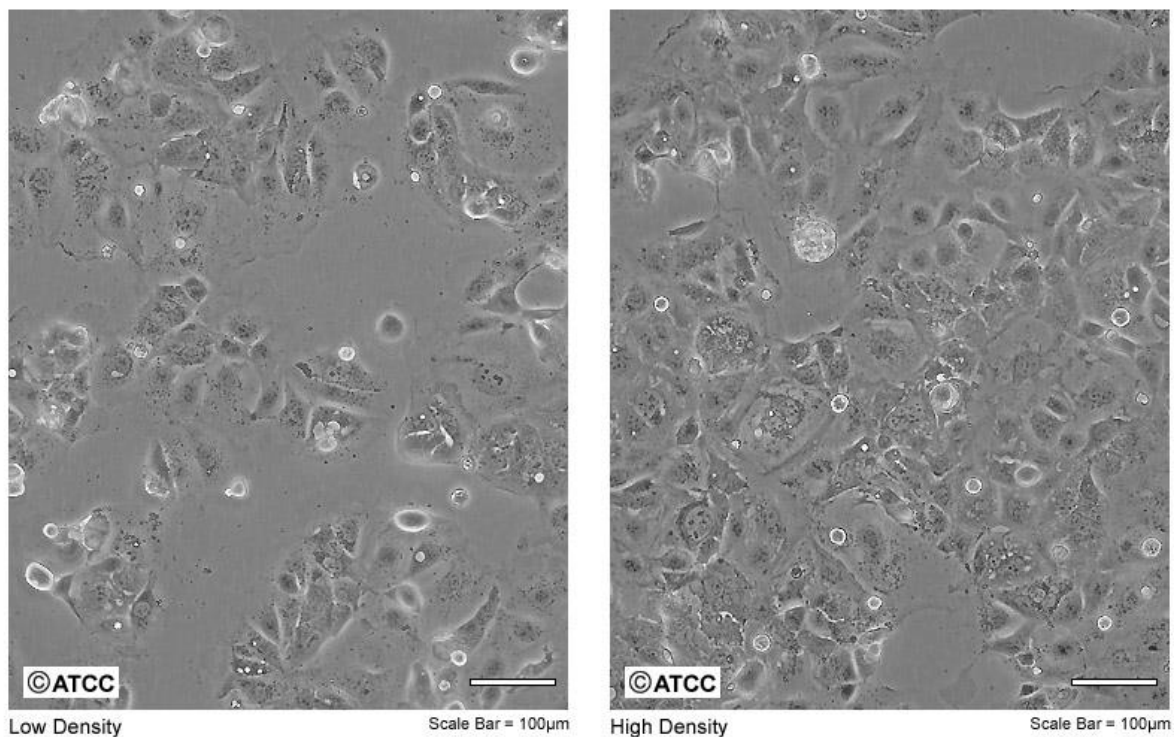
### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Biološki test sustav za određivanje genotoksičnog učinka - stanična linija CaCo2

Za provedbu istraživanja u ovome radu korištena je kontinuirana humana stanična linija adenokarcinoma epitela debelog crijeva - CaCo2 (Slika 6). Uzgoj stanične linije CaCo2 proveden je u kompletiranom mediju Eagle's Minimum Essential Medium u koji je dodan FBS (10%) i otopina antibiotika streptomicina (1%). Uvjeti uzgoja bili su 37°C u vlažnoj atmosferi uz 5% CO<sub>2</sub>. Prilikom presađivanja stanica korištena je 0,25% otopina tripsina.

ATCC Number: **HTB-37**  
Designation: **Caco-2**



**Slika 6.** Komercijalno dostupna CaCo2 stanična linija (Anonymus 5, 2017).

### 3.1.2. Uzorci vode

U eksperimentu su korišteni uzorci podzemnih voda:

Uzorak 1 – podzemne vode zapadno od odlagališta Trebež;

Uzorak 2 – podzemne vode sjeverno od odlagališta Trebež;

Uzorak 3 – podzemne vode istočno od odlagališta Trebež.

Svi uzorci voda su analizirani na fizikalno-kemijske parametre od strane poduzeća Euroinspekt Croatiakontrola d.o.o.

Uzorkovanje voda provedeno je 24. veljače 2016. godine na 3 lokacije (Pijezometri oznaka: PIP - ZAPAD, PIP - SJEVER, PIP - ISTOK). Uzorci su prikupljeni pomoću potopne pumpe (Grundfos, model MP1) spojene na benzinski agregat. Priprema uzoraka provedena je uparivanjem uzoraka (100 puta) na rotacionom uparivaču (Heidolph, model Elaborata 4000) te na uparivaču dušikom (VLM, model V.649.061.820). Određivanje anorganskog i organskog sastava uzoraka podzemnih voda provedeno je prema akreditiranim ISO metodama na uređajima :

1. pH metar Mettler Toledo, model Five Easy
2. KPK BEHR termoreaktor model TRS300
3. Spektrofotometar HACH, model DR 6000
4. GF-AAS Perkin Elmer, model Aanalist 600
5. FLAME-AAS Analytik Jena model NOVAA 350

### 3.1.3. Kemikalije

- agaroz niske točke tališta (LMP), Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka
- agaroz normalne točke tališta (NMP), Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka
- Bovine serum albumin (BSA), Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka
- 2',7'-diklorofluorescein diacetat (DCF - DA), Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka
- Dimetil-sulfoksid (DMSO), p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- EMEM medij, Gibco, Carlsbad, SAD
- etanol, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- etidij-bromid, Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka
- Foetal bovine serum (FBS), Gibco, Carlsbad, SAD

- kalij-hidrogenfosfat, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- kalij-klorid, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Na<sub>2</sub>EDTA, Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka
- natrij-hidrogenfosfat dodekahidrat, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- natrij-hidroksid, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- natrij-klorid, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- natrij-laurilsarkozinat, Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka
- neutral red, Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka
- octena kiselina, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- tripsin, Gibco, Carlsbad, SAD
- tris-HCl, Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka
- triton X-100, Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka

*i) Otopine korištene za provođenje testa citotoksičnosti:*

a) Fosfatni pufer - PBS (pH= 7,2 - 7,4):

Natrijev klorid	4,0 g
Kalijev klorid	0,1 g
Natrijev hidrogenfosfat dodekahidrat	1,16 g
Kalijev hidrogenfosfat	0,1 g
Destilirana voda	500,0 mL

Sterilizira se 20 minuta pri 120 °C.

b) Ishodišna otopina neutral red (5 mg mL<sup>-1</sup>):

Neutral red	5,0 mg
Destilirana voda	1,0 mL

c) Radna otopina neutral red (0,1 %):

Ishodišna otopina neutral red	250,0 mL
medij	24,750 mL

## d) Otopina za odbojavanje:

Octena kiselina	1,0 mL
Etanol	50,0 mL
Destilirana voda	49,0 mL

## ii) Otopine korištene za određivanje reaktivnih kisikovih radikala:

## a) Fosfatni pufer - PBS (pH= 7,2-7,4):

Natrijev klorid	4,0 g
Kalijev klorid	0,1 g
Natrijev hidrogenfosfat dodekahidrat	1,16 g
Kalijev hidrogenfosfat	0,1 g
Destilirana voda	500,0 mL

## b) Ishodišna otopina 2',7'- diklorofluorescin diacetat (DCF- DA):

DCF- DA	1,0 mg
Dimetil-sufoksid	1,0 mL

## c) Radna otopina 2',7'- diklorofluorescin diacetat (DCF-DA):

Ishodišna otopina DCF - DA	500,0 $\mu$ L
PBS pufer (pH= 7,2-7,4)	9,3 mL
BSA (1 %)	200 $\mu$ L

## iii) Otopine korištene za povodjenje Komet testa:

## a) Otopina NMP agaroze (1.5 %):

NMP agarozna	150,0 mg
PBS pufer (pH=7,2-7,4)	10,0 mL

## b) Otopina NMP agaroze (6 %):

NMP agarozna	60,0 mg
PBS pufer (pH=7,2-7,4)	10,0 mL

c) Otopina LMP agaroze (0,5 %):

LMP agarozna	50,0 mg
PBS pufer (pH=7,2-7,4)	10,0 mL

d) Pufer za lizu stanica (pH=10):

Matična otopina:

NaCl (2,5 M)	65 g
Na <sub>2</sub> EDTA (100 mM)	13 g
Tris-HCl (10 mM)	0,539 g
Na-laurilsarkozinat (1%)	4,45 g
destilirana voda	0,5 L

Sat vremena prije lize stanica, u 200 ml hladnog pufera za lizu potrebno je dodati 2 mL Triton X-100 i 20 mL dimetil-sulfoksida.

e) Pufer za denaturaciju stanica (pH=13):

NaOH (10 M)	30,0 mL
Na <sub>2</sub> EDTA (200 mM)	5,0 mL
Destilirana voda	965,0 mL

f) Pufer za neutralizaciju (pH=7,5):

Tris-HCl	48,5 g
Destilirana voda	1000,0 mL

g) Otopina etidij-bromida:

Etidij-bromid	2,0 µg
Destilirana voda	1,0 mL

#### 3.1.4. Laboratorijska oprema

i) *Laboratorijski uređaji:*

- analitička vaga, MC1 Laboratory LC 62OP, Sartorius, Goetingen, Njemačka
- autoklav, IPIM, Hrvatska
- CO<sub>2</sub> inkubator Brouwer CH, Luzern, Švicarska

- epifluorescencijski mikroskop, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Njemačka
- fluorimetar, FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech, Offenburg, Njemačka
- invertni mikroskop, Optika Microscopes, Ponteranica, Italija
- klasična centrifuga, Megafuge, 1.0 Heraeus, Sepatech, Gottlieb, Italija
- laminar, IBK 1 V2, Iskra, Šentjernej, Slovenija
- miješalica, MS1 minishaker, IKA®Works, Inc. Wilmington, Staufen, Njemačka
- spektrofotometar – microreader, Tecam, Männedorf, Njemačka
- termoblok, ISKRA, Slovenija
- termostat, ISKRA, Slovenija
- tresilica, ISKRA, Slovenija

ii) *Laboratorijski pribor:*

- brušena predmetna stakalca
- Bürker-Türk komorica
- Eppendorf epruvetice
- kiveta
- menzura, 50-1000 mL
- mikrofilteri
- mikropipete, 10-1000  $\mu$ L, Eppendorf, Hamburg, Njemačka
- mikrotitracijske ploče, Falcon, BD Company, Franklin Lakes, SAD
- Pasteurove pipete, 5-25 mL
- plastične epruvete
- plastične Petrijeve zdjelice, Aptaca, Canelli, Italija
- propipeta
- staklene epruvete, 3-10 mL
- staklene Petrijeve zdjelice
- T-boca, Falcon, BD Company, Franklin Lakes, SAD
- tikvice ravnog dna, 100-1000 mL



## 3.2. METODE RADA

### 3.2.1. Kultivacija stanične linije CaCo2 u monosloju

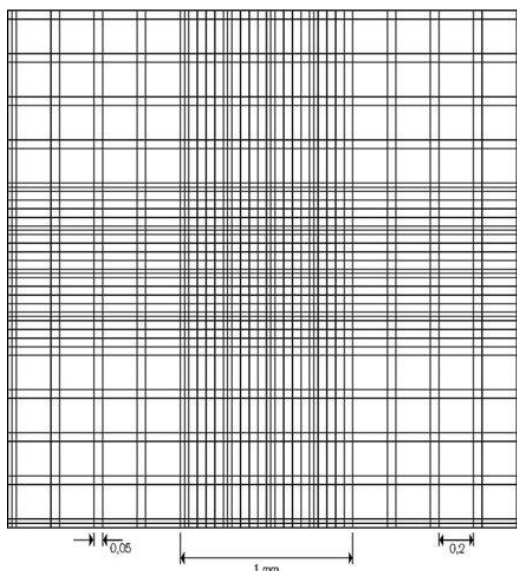
Zamrznuta stanična kultura na  $-80^{\circ}\text{C}$  (s 10% glicerola) se otopi u vodenoj kupelji pri  $37^{\circ}\text{C}$ . Nakon toga se centrifugira (100 rpm/5 min) čime se ukloni supernatant koji sadrži ostatke medija i krioprotektivnog sredstva - glicerola. Na dobiveni talog doda se svježi medij inkubiran na  $37^{\circ}\text{C}$ . Stanice se resuspendiraju i ponovo centrifugiraju (1000 rpm/1,5 min), te nacijspe u Petrijevu zdjelicu (promjera 5 cm). Ovaj postupak se naziva propagacija stanica. Nakon 24 sata, stanice se nacijspe u T-boce većeg volumena i uzgajaju u inkubatoru s kontroliranim atmosferom (pri  $37^{\circ}\text{C}$  uz 95% zraka i 5%  $\text{CO}_2$ ) do subkonfluentnog stanja, u kojem se mogu koristiti za eksperiment. Sav rad s kulturom humanih stanica mora se odvijati u aseptičkim uvjetima, koji se osiguravaju radom u komori za sterilan rad - laminar (Freshney, 2010).

### 3.2.2. Priprema stanične suspenzije iz subkonfluentnog monosloja

Sa stanica u T-bocama pipetom se ukloni medij, te se stanice ispiru s 0,25%-tnim tripsinom čime se uklanjaju tvari iz medija koje bi mogle inhibirati tripsin. Na stanice se dodaje minimalna količina otopine 0,25%-tnog tripsina potrebna da prekrije dno T-boce. Proteolitičko djelovanje tripsina (tripsinizacija) očituje se odljepljivanjem stanica od podloge pri čemu poprimaju okrugli oblik, a zaustavlja se dodatkom medija obogaćenog serumom (Freshney, 2010).

### 3.2.3. Određivanje broja stanica

Nakon tripsinizacije mikropipetom se uzme 20  $\mu\text{L}$  uzorka stanične suspenzije, te se uzorak ponovo resuspendira i nanese u Bürker-Türkovu komoricu (Slika 7) ispod prethodno postavljenog pokrovnog stakalca. Stanice se broje u četiri velika kvadrata pomoću invertnog mikroskopa. Svaki veliki kvadrat sastoji se od 16 malih kvadrata, a prostor između predmetnog i pokrovnog stakalca iznosi 0,1 mm, dok je površina svakog kvadrata 1  $\text{mm}^2$ . Prema tome, volumen svakog velikog kvadrata je  $10^{-4}$  mL. Izračuna se srednja vrijednost izbrojanih stanica, te se konačni broj izražava kao broj stanica po mililitru stanične suspenzije.



**Slika 7.** Bürker-Türk komorica (Anonymus 6, 2017)

#### 3.2.4. Priprema otopina uzoraka za eksperiment

Uzorci podzemnih voda koncentrirani su 100 puta, te su prije uporabe filtrirani kroz mikrofilter veličine  $0,45 \mu\text{m}$ . U eksperimentu su se istraživale koncentracije: 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5 i 10 x, pri čemu koncentracije 1 x predstavlja izvornu koncentraciju spojeva prisutnih u vodi prikupljenoj na mjestu uzorkovanja bez razrjeđivanja ili koncentriranja. Odgovarajuće koncentracije uzoraka podzemnih voda priređuju se dodatkom određenog volumena uzorka vode u medij obogaćen serumom.

#### 3.2.5. Određivanje citotoksičnog učinka podzemnih voda na staničnoj liniji CaCo2

Jedna od najčešće korištenih metoda za određivanje citotoksičnosti koja omogućuje kvantitativnu procjenu broja živih stanica u kulturi je Neutral red metoda. Temelji se na sposobnosti živih stanica da boju Neutral red (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid) unose aktivnim transportom i vežu (Repetto i sur., 2008). Ova je boja slabo kationska, prolazi kroz staničnu membranu pasivnom difuzijom te se koncentrira u lizosomima, gdje se elektrostatskim hidrofobnim vezama veže na anionske i/ili fosfatne grupe matriksa. Iz živih se stanica ekstrahira pomoću otopine etanola nakon čega se mjeri apsorbancija (Babich i Borenfreund, 1991).

Unos Neutral red boje ovisi o kapacitetu stanice da proizvodnjom ATP-a održava gradijent pH. Pri fiziološkom pH naboj boje je blizu nule, što joj omogućava difuziju kroz

staničnu membranu. Unutar lizosoma postoji gradijent protona koji održava pH unutar stanice nižim od pH citoplazme pri kojem boja poprima naboj te se zadržava unutar lizosoma. U mrtvih stanica ili pri smanjenom pH gradijentu boja se ne zadržava unutar lizosoma, što može biti naznaka da su tvari prisutne u uzorcima voda uzrokovale oštećenje stanica. Prema tome, količina vezane boje proporcionalna je broju živih stanica (Repetto i sur., 2008).

Ishodna otopine boje Neutral red priređuje se otapanjem boje u etanolu do konačne koncentracije od  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ , te se inkubira 24 sata na  $37^\circ\text{C}$ . Nakon toga se priprema 10%-tna otopina razrjeđivanjem ishodne otopine boje u mediju za uzgoj stanica, te se filtrira kako bi se uklonili neotopljeni kristalići i osigurala sterilnost (Babich i Borenfreund, 1991). Na mikrotitarske pločice s 96 jažica naciepljuje se suspenzija stanica  $\text{CaCo}_2$  u koncentraciji od  $10^5 \text{ st mL}^{-1}$  ( $100 \mu\text{L}$  po jažici), te se inkubira 24 sata pri  $37^\circ\text{C}$ , nakon čega se medij zamijeni svježim, te se nastavi inkubirati još 48 sati pri istim uvjetima. Nakon toga se stanice tretiraju uzorcima podzemnih voda u koncentracijama 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5 i 10 x u trajanju inkubacije od 72 sata, te se u slučaju negativnih kontrola isti postupak provodi s medijem obogaćenim serumom ( $100 \mu\text{L}$  po jažici). Po završetku tretmana iz jažica se uklanjaju uzorci vode i medij, te se stanice ispiru PBS-puferom kako bi se uklonili ostaci uzoraka voda i medija. Nakon ovog postupka u jažicama ostaju isprane stanice na koje se dodaje otopina Neutral red boje ( $100 \mu\text{L}$  po jažici), te se inkubira 1 sat pri  $37^\circ\text{C}$ . Potom se uklanja otopina Neutral red boje iz jažica i stanice se dva puta ispiru sa  $100 \mu\text{L}$  PBS-pufera. Naposljetku se u jažice dodaje  $100 \mu\text{L}$  otopine za odbojavanje kako bi se boja ekstrahirala iz lizosoma živih stanica. Otopina za odbojavanje sadrži 50% EtOH, 49%  $\text{H}_2\text{O}$  i 1% HAc (Repetto i sur., 2008; Durgo i sur., 2009). Intenzitet obojenja mjeri se pomoću spektrofotometra pri valnoj duljini od 540 nm i proporcionalan je broju preživjelih stanica. Kao slijepa proba služi jažica u koju nisu naciepljene stanice. Postotak preživljenja računa se u odnosu na negativnu kontrolu prema jednadžbi 1. Eksperiment je ponovljen tri puta.

$$\% \text{ – tak preživljenja} = \left( \frac{A_{540 \text{ nm}} \text{ uzorka podzemne vode}}{A_{540 \text{ nm}} \text{ kontrole}} \right) * 100 \quad (1)$$

### 3.2.6. Određivanje slobodnih radikala na staničnoj liniji CaCo2

Određivanje slobodnih radikala (ROS) nastalih bazalnim metabolizmom ili metabolizmom ksenobiotika kojima su stanice izložene provodi se 2',7'-diklorofluorescein-diacetat (DCFH-DA) fluorimetrijskim testom. DCFH-DA je neionski, nepolarni spoj koji ne fluorescira, te lako difundira kroz staničnu membranu gdje se u citosolu stanica djelovanjem intracelularnih enzima prevodi u 2',7'-diklorofluorescein (DCFH) koji isto tako nije fluorescentan. No u prisutnosti ROS-a, DCFH oksidira u diklorofluorescein (DCF) koji je izrazito fluorescentan (Wang i Joseph, 1999; Li i sur., 2000).

Ova je metoda osjetljiva na fotooksidaciju (Wang i Joseph, 1999), stoga se otopina DCFH-DA svježe pripravlja za eksperiment. Ishodišna otopina DCFH-DA (2mM) dobiva se otapanjem 1,5 mg DCFH-DA u 1,5 mL DMSO-a, dok se otopina za tretman stanica iz ishodišne otopine priređuje 50  $\mu$ M otopina DCFH-DA u PBS-puferu, koja sadrži i 1% BSA.

Stanice se nasađuju na crne mikrotitarske pločice s 96 jažica u koncentraciji od  $10^5$  st  $\text{mL}^{-1}$ . U svaku se jažicu unosi 100  $\mu$ L stanične suspenzije, te se inkubira 24 sata pri 37°C, nakon čega se medij zamjenjuje svježim, te se nastave inkubirati još 48 sati pri istim uvjetima. Nakon inkubacije iz jažica se uklanja medij, a stanice se tretiraju sa 100  $\mu$ L uzoraka podzemnih voda u koncentracijama 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5 i 10 x u trajanju inkubacije od 72 sata, te se u slučaju negativnih kontrola isti postupak provodi s medijem obogaćenim serumom. Po završetku tretmana iz jažica se uklanjaju uzorci vode i medij, te se stanice dva puta ispiru sa 100  $\mu$ L PBS-pufera kako bi se uklonili ostaci uzoraka voda i medija, te se nakon toga stanice tretiraju sa 100  $\mu$ L 50  $\mu$ M otopine DCFH-DA i inkubiraju 30 minuta pri 37°C. Kao slijepa proba služi jažica u koju nisu nacijepjene stanice. Intenzitet fluorescencije je mjera slobodnih radikala u stanici, a mjeri se pomoću fluorimetra pri valnoj duljini ekscitacije od 485 nm i valnoj duljini emisije od 520 nm. Rezultati se izražavaju kao umnožak fluorescencije i kvocijenta preživljenja koji se računa u odnosu na negativnu kontrolu (Bradford, 1976). Eksperiment je ponavljen tri puta.

## 3.2.7. Određivanje oštećenja DNA na staničnoj liniji CaCo2 – komet test

Komet test ili mikroelektroforeza pojedinačnih stanica u agaroznom gelu je metoda za brzo otkrivanje jednolančanih i dvolančanih lomova, oksidativnih oštećenja u DNA i jednolančanih lomova povezanih s inhibiranim ekscizijskim popravkom uzrokovanim UV zračenjem, ultrazvukom, elektromagnetskom frekvencijom zračenja i slično (Heepchantree i sur., 2006). Stanice se uklapaju u tanki agarozni gel, a pomoću otopine visoke koncentracije etilen-diamin-tetraoctene kiseline (EDTA) i detergenta u stanicama se liziraju citoplazma, membranske strukture i svi stanični proteini pri čemu se oslobađa ukupna DNA. Ona se nakon toga denaturira u alkalnom ili neutralnom puferu i podvrgava horizontalnoj elektroforezi tijekom koje mali fragmenti DNA, nastali zbog lomova, putuju kroz pore gela prema anodi, dok glavina DNA zbog velike molekularne mase nema tu sposobnost (Collins, 2004). Zbog razlike u duljini fragmenata DNA, a prema tome i različitih brzina kretanja kroz gel (kraći fragmenti putuju brže) dolazi do razdvajanja fragmenata prema veličini. DNA i obrasci putovanja njenih fragmenata nakon bojanja fluorescencijskom bojom pod mikroskopom su vidljivi kao „kometi“ s glavom i repom. Glava se sastoji od netaknute DNA, dok se rep sastoji od fragmenata DNA različitih duljina. Količina DNA koja je oslobođena iz glave kometa izravno je proporcionalna količini oštećenja DNA (Collins, 2004). Za njihovu analizu i mjerenje koristi se epifluorescencijski mikroskop i računalni program za analizu slike. Obično se određuju tri osnovna parametra kometa: dužina repa, intenzitet repa i moment repa. Dužina repa kometa predstavlja najveću udaljenost na koju su otputovali najkraći fragmenti DNA, a mjeri se od sredine glave ili od ruba glave kometa. Intenzitet repa kometa označava postotak DNA koja je migrirala u rep, izražava se u odnosu na ukupnu količinu DNA u kometu. Moment repa kometa definira se kao umnožak dužine repa i postotka DNA u repu (intenziteta repa) (Collins i sur., 2008).

U plastične Petrijeve zdjelice promjera 5 cm naciepljuje se 5 mL stanične suspenzije u koncentraciji od  $10^5$  st  $\text{mL}^{-1}$ . Stanice se inkubiraju 24 sata pri  $37^\circ\text{C}$ , nakon čega se medij zamjenjuje svježim, te se nastave inkubirati još 48 sati pri istim uvjetima. Zatim se stanice tretiraju uzorcima podzemnih voda u koncentracijama 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5 i 10 x u trajanju inkubacije od 72 sata, te se u slučaju negativnih kontrola isti postupak provodi s medijem obogaćenim serumom (5 mL po Petrijevoj zdjelici). Po završetku tretmana iz Petrijevih zdjelica se uklanjaju uzorci vode i medij, te se stanice ispiru s 1 mL PBS-pufera kako bi se uklonili ostaci uzoraka voda i medija. Stanice se zatim tripsiniziraju dodatkom 0,5 mL 0,25%-tnog tripsina, prebacuju se u Eppendorf epruvetice i centrifugiraju (5000 rpm/5 min). Na

brušeno predmetno stakalce nakapa se 300  $\mu\text{L}$  otopine NMP („*normal melting point*“) agaroze (1.5%), te se ostavi na hladnome da polimerizira. Na polimerizirani sloj NMP agaroze nanosi se sloj od 100  $\mu\text{L}$  LMP („*low melting point*“) agaroze u kojoj su resuspendirane stanice i ostavi se da polimerizira. Na kraju se nanosi još jedan sloj od 100  $\mu\text{L}$  agaroze, a nakon što zadnje nanese sloj polimerizira provodi se liza stanica u ohlađenom puferu za lizu stanica (4°C/1 sat). Potom se stanice tretiraju puferom za denaturaciju i provodi se elektroforeza pri jakosti struje od 300 mA i naponu od 25 V u trajanju od 20 minuta. Nakon elektroforeze se neutralizira puferom za neutralizaciju (0,4 M Tris), a preparat se boji sa 100  $\mu\text{L}$  etidij-bromida. Nakon 10 minuta preparat se ispire Tris-HCl puferom i na njega se stavlja pokrovnica (Collins i sur.,2008). Preparati se mikroskopiraju pomoću epifluorescencijskog mikroskopa s ekscitacijskim filterom podešenim na 515-560 nm, a slika se analizira pomoću programa Comet Assay II (Perceptive instruments Ltd., UK). U svrhu analize genotoksičnog učinka podzemnih voda korišteni su parametri: dužina i intenzitet repa kometa.

#### 3.2.8. Statistička analiza rezultata

Dobiveni rezultati citotoksičnosti, indukcije slobodnih radikala i parametara komet testa analizirani su *one way* ANOVA testom. Razina statističke značajnosti bila je  $p < 0,05$ . Povezanost citotoksičnosti i indukcije slobodnih radikala analizirana je pomoću Pearsonove korelacije, a razina statističke značajnosti bila je  $p < 0,01$ .

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Sanitarna odlagališta otpada, koja su obično prisutna u urbanim područjima, često se povezuju s potencijalnim onečišćenjem podzemnih ili površinskih voda, i zbog toga predstavljaju rizik za ljudsko zdravlje (Cabrerera i Rodriguez, 1997; Hu, 2000; Kjeldsen i sur., 2002; Slack i sur., 2005). Zabrinjavajući je podatak da Ujedinjeni Narodi (UN) predviđaju kako bi proizvodnja krutog otpada mogla porasti s 2-4,9 bilijuna tona godišnje u 2006. na 2,4-5,9 bilijuna tona godišnje u 2025. godini. Ovi negativni trendovi u proizvodnji otpada potiču razmatranje nekoliko problema. među kojima treba istaknuti: javno zdravstvo, utjecaj na okoliš i gospodarenje otpadom (UN, 2010).

Najvažniji štetni nusprodukt sa sanitarnog odlagališta otpada zasigurno je procjedna voda, karakterizirana visokim koncentracijama brojnih toksičnih i karcinogenih spojeva kao što su teški metali i organski spojevi (Halim i sur., 2005; Li i sur., 2004; Schrab i sur., 1993). Osim toga, u procjednim se vodama također mogu naći i brojne bakterije, uključujući aerobne, psihrofilne i mezofilne bakterije, koliformi i fekalni koliformi, sporogene bakterije poput *Clostridium perfringens* te filamentozni fungi (Matejczyk i sur., 2011). Vrlo je važno znati da i male količine procjedne vode s odlagališta otpada mogu onečistiti veliki volumen podzemnih voda, koje mogu kontaminirati i utjecati na bioraznolikost vodenih ekosustava, te tim putem kontaminirati prehrambene lance (Bakare i sur., 2000; Christensen i sur., 1994; Garaj-Vrhovac i sur., 2009). Takvo višestruko izlaganje štetnim tvarima može predstavljati veći rizik nego što bi se moglo zaključiti iz istraživanja učinaka svake pojedine tvari.

Nekoliko istraživanja je potvrdilo genotoksični potencijal procjednih voda značajnim porastom frekvencije mikronukleusa, izmjene sestrinskih kromatida, kromosomskih aberacija, oštećenja DNA i smanjenjem mitotičkog indeksa u različitim vrstama stanica i modelnim sustavima (Amahdar i sur., 2009; Bakate i sur., 2005; Chandra i sur., 2005; Donnelly i sur., 1990; Ernst i sur., 1994; Feng i sur., 2007; Gajski i sur., 2011; Li i sur., 2008; Monarca i sur., 2002; Sang i Li, 2004; Sang i sur., 2006; Tewari i sur., 2005). Iako se u gotovo svim navedenim istraživanjima ispitivao učinak procjednih voda odlagališta otpada, u ovom je radu cilj bio ispitati učinak podzemnih voda s područja odlagališta otpada. Razlog tome je što su ljudi, životinje i biljke iz okolice odlagališta izložene djelovanju podzemne vode, a ne direktno procjedne vode s odlagališta.

Za procjenu genotoksičnog učinka podzemnih voda kao biološki test korištena je stanična linija humanog adenokarcinoma epitela debelog crijeva - CaCo2. U svrhu ovog rada određivala se citotoksičnost, indukcija slobodnih radikala i oštećenje molekule DNA.

Usporedbom dobivenih rezultata i kemijskom analizom vode procijenjen je utjecaj krutog otpada na odlagalištu na sastav podzemnih voda u blizini istog.

#### 4.1. FIZIKALNO-KEMIJSKA ANALIZA UZORAKA PODZEMNIH VODA

Uzorak 1 testiran u ovom istraživanju uzorkovan je zapadno (zadnji dio na koji se stavljala dijafragma prilikom sanacije odlagališta), hidrološki gledano na smjer pružanja podzemnih voda uzvodno. Uzorak 2 uzorkovan je sjeverno te na sastav podzemnih voda ne bi trebalo utjecati odlagalište otpada, a uzorak 3 istočno od odlagališta otpada, hidrološki gledano na smjer pružanja podzemnih voda nizvodno (Prilog 1).

Sva tri uzorka podzemnih voda okarakterizirana su kao bistra tekućina, bez boje i mirisa, ali prema analitičkom izvješću ni jedan od uzoraka nije zadovoljio zahtjeve navedene u Pravilniku o parametrima sukladnosti i metodama analize vode za ljudsku potrošnju (NN 56/13) (Prilog 2). Uzorak 1 je za razliku od ostalih bio samo mikrobiološki neispravan zbog koncentracije ukupnih koliforma od  $120 \text{ cfu mL}^{-1}$ , dok MDK (maksimalna dopuštena količina) za ukupne koliforme iznosi  $0 \text{ cfu mL}^{-1}$ . Koncentracije fizikalno-kemijskih, te organskih i anorganskih pokazatelja nisu prelazile vrijednosti MDK. Svi analizirani organski pokazatelji bili su ispod praga osjetljivosti korištene analitičke metode, dok su koncentracije anorganskih pokazatelja kao što su cink, otopljeni fluoridi, kloridi, sulfati, amonij i nitrati izmjerene u rasponu od  $0,05 \text{ mg L}^{-1}$  do  $23,1 \text{ mg L}^{-1}$ . Kod uzoraka 2 i 3 mikrobiološki, fizikalno-kemijski i organski pokazatelji nisu prelazili vrijednosti MDK, te su bili ispod granice osjetljivosti korištene analitičke metode, dok su koncentracije nekih anorganskih pokazatelja bile iznad vrijednosti MDK. Uzorak 2 imao je povišenu koncentraciju arsena od  $0,013 \text{ mg L}^{-1}$  ( $\text{MDK}_{\text{As}} = 0,010 \text{ mg L}^{-1}$ ), mangana od  $0,071 \text{ mg L}^{-1}$  ( $\text{MDK}_{\text{Mn}} = 0,050 \text{ mg L}^{-1}$ ) i žive od  $0,014 \text{ mg L}^{-1}$  ( $\text{MDK}_{\text{Hg}} = 0,001 \text{ mg L}^{-1}$ ). Osim toga izmjerene su i koncentracije cinka, nikla, željeza, otopljenih fluorida, klorida, sulfata, amonija i nitrata u rasponu od  $0,034 \text{ mg L}^{-1}$  do  $18,5 \text{ mg L}^{-1}$ , koje su bile ispod vrijednosti MDK. Kod uzorka 3 problem je bila povišena koncentracija mangana od  $0,064 \text{ mg L}^{-1}$  ( $\text{MDK}_{\text{Mn}} = 0,050 \text{ mg L}^{-1}$ ) i amonija od  $0,966 \text{ mg NH}_4 \text{ L}^{-1}$  ( $\text{MDK} = 0,5 \text{ mg NH}_4 \text{ L}^{-1}$ ), dok su se koncentracije cinka, nikla, željeza, otopljenih fluorida i klorida kretale u rasponu od  $0,042 \text{ mg L}^{-1}$  do  $48,7 \text{ mg L}^{-1}$  te su bile ispod vrijednosti MDK (Prilog 2).

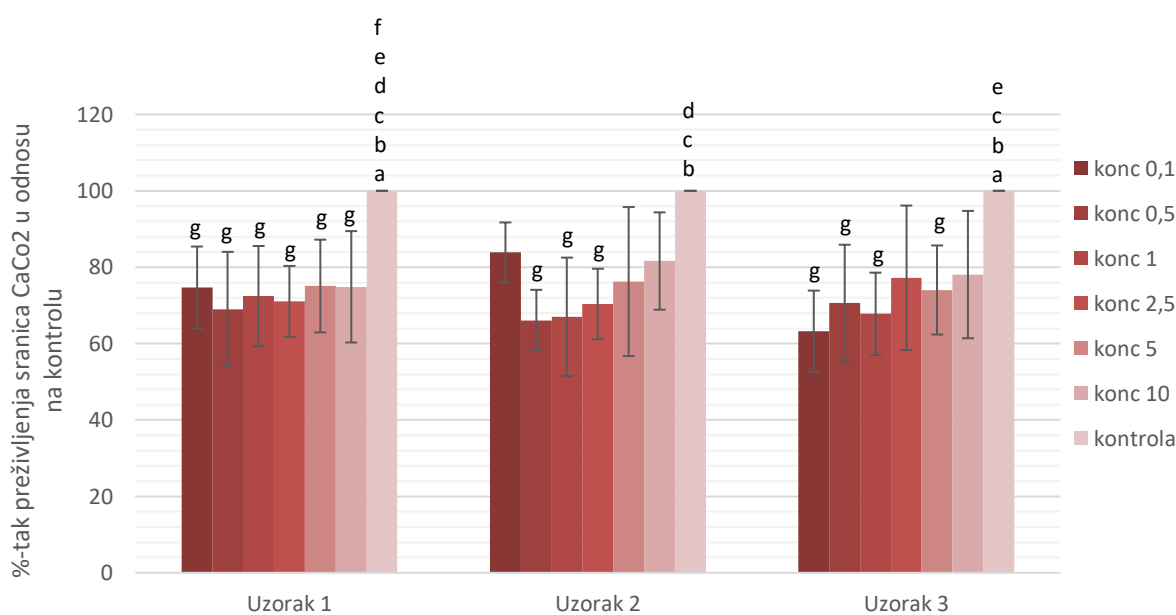
Razni teški metali kao što su olovo, krom, bakar i željezo nađeni su u vodama ispitivanim u brojnim istraživanjima čiji su pregled dali Baun i Christensen (2004). Oni su obično prisutni kao organski kompleksi sa slobodnim metalnim ionima što čini manje od 10%



koncentracije metala i zato predstavlja ozbiljne probleme u procjeni rizika temeljenog na kemijskom sastavu. Koncentracije drugih organskih kontaminanata često su u procjednim vodama odlagališta ispod limita detekcije korištenih analitičkih metoda (Ghosh i sur., 2015), a zapravo imaju značajan učinak na biološke test sustave.

## 4.2. CITOTOKSIČNI UČINAK PODZEMNIH VODA

Citotoksičnost se određivala Neutral red metodom pri čemu se ispitivao citotoksični učinak 6 koncentracija podzemne vode (0,1x; 0,5x; 1x; 2,5x; 5x; 10x) na staničnoj liniji CaCo2 pri koncentraciji stanica  $10^5$  st mL<sup>-1</sup> i nakon 72 sata izloženosti.



a - statistički ( $p < 0,05$  Scheffe-ov test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,1x; b - statistički ( $p < 0,05$  Scheffe-ov test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,5x ; c - statistički ( $p < 0,05$  Scheffe-ov test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 1x; d - statistički ( $p < 0,05$  Scheffe-ov test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 2,5x; e - statistički ( $p < 0,05$  Scheffe-ov test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 5x; f - statistički ( $p < 0,05$  Scheffe-ov test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 10x; g - statistički ( $p < 0,05$  Scheffe-ov test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju kontrolu.

**Slika 8.** Postotak preživljenja stanične linije CaCo2 ( $10^5$  st mL<sup>-1</sup>) u odnosu na negativnu kontrolu (stanice + medij za uzgoj stanica) nakon tretmana podzemnim vodama u koncentracijama raspona od 0,1 do 10x.

Analizom uzoraka vode na staničnoj liniji CaCo2 pokazalo se da statistički značajnu citotoksičnost ispitivanih stanica u odnosu na negativnu kontrolu (stanice + medij za uzgoj stanica) uzrokuju sve koncentracije (0,1x; 0,5x; 1x; 2,5x; 5x i 10x) uzorka 1, koncentracije

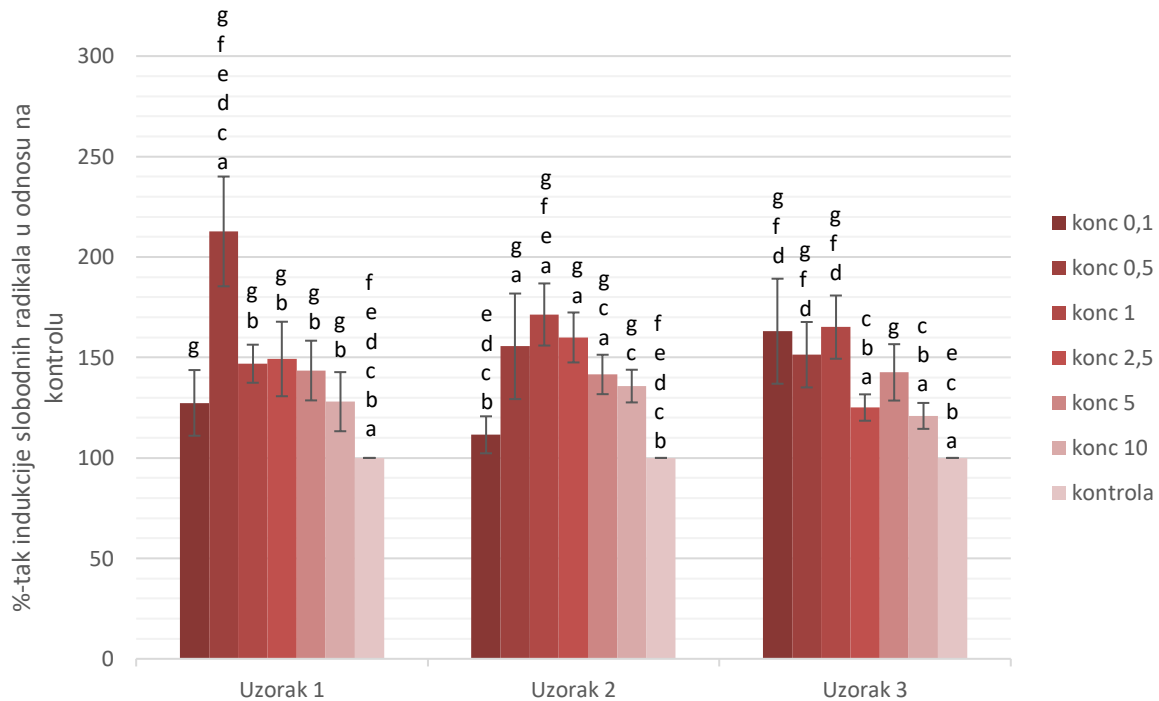
0,5x; 1x i 2,5x uzorka 2 i koncentracije 0,1x; 0,5x; 1x i 5x uzorka 3 (Slika 8). Vidljivo je da nema poveznice doza-učinak ni kod jednog od triju uzoraka, ali i da sva tri uzorka uzrokuju smanjenje broja stanica u odnosu na kontrolu (bilo da se radi o citotoksičnom efektu ili o inhibiciji diobe stanica). Kako je kemijskom analizom uzoraka podzemne vode ustanovljeno da su organski pokazatelji prisutni u vrlo niskim koncentracijama, citotoksični učinak svih triju uzoraka mogao bi se pripisati povišenoj koncentraciji anorganskih pokazatelja koji su kod nekoncentriranog uzorka 1 prisutni u još dopuštenim količinama, dok su kod uzoraka 2 i 3 čak iznad maksimalno dopuštenih količina. Kad se uzme u obzir da su u istraživanju korišteni koncentriraniji uzorci podzemnih voda, neki anorganski pokazatelji koji su kod nekoncentriranih uzoraka ispod vrijednosti MDK ipak ih prelaze kad se preračunaju kao deset puta koncentriraniji. Prema tome za uzorak 1 to su nitrati, za uzorak 2 željezo, otopljeni fluoridi i amonijak, te za uzorak 3 željezo, otopljeni fluoridi i kloridi, dok su koncentracije ostalih anorganskih pokazatelja također vrlo blizu vrijednosti MDK. Ono što je zanimljivo kod sva tri testirana uzorka jest da je citotoksičnost nešto jače ispoljena pri nižim koncentracijama uzoraka (0,5x; 1x; 2,5x) nego pri višim koncentracijama (5x; 10x).

Citotoksičnost uzrokovana podzemnom vodom može biti izazvana nastajanjem slobodnih radikala koji uzrokuju oštećenje DNA, te zaustavljanje staničnog ciklusa i mitoze (Baderna i sur., 2011). Spojevi kao što su PAH-ovi (Kang i sur., 2010), ftalatni esteri (Erkekoglu i sur., 2010), dioksini (Aly i Khafagy, 2011) i bisfenol A (Baderna i sur., 2011) koji su nađeni u nekim procjednim vodama s odlagališta otpada mogu uzrokovati poremećaj stanične proliferacije, a citotoksični učinci dokazani su i za teške metale kao što je krom (Naik i sur., 2014) i kadmij (Koizumi i sur., 1996).

Dobiveni rezultati su u skladu sa sličnim istraživanjima koja su dokazala citotoksičnost procjednih voda korištenjem stanica humanog raka dojke MCF-7 (Talorete i sur., 2008) i stanica raka jetre HepG2 (Ghosh i sur., 2014), dok su u Hrvatskoj značajnu citotoksičnost procjedne vode s odlagališta otpada Piškornica na humanim perifernim krvnim limfocitima dokazali Garaj-Vrhovac i sur. (2013).

### 4.3. INDUKCIJA SLOBODNIH RADIKALA PODZEMNIM VODAMA

Indukcija slobodnih radila određivala se diklorofluorescin-diacetat metodom pri čemu se ispitivao učinak 6 koncentracija podzemne vode (0,1x; 0,5x; 1x; 2,5x; 5x; 10x) na staničnoj liniji CaCo2 pri koncentraciji stanica  $10^5$  st mL<sup>-1</sup> i nakon 72 sata izloženosti.



a - statistički ( $p < 0,05$  Scheffe-ov test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,1x; b - statistički ( $p < 0,05$  Scheffe-ov test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,5x; c - statistički ( $p < 0,05$  Scheffe-ov test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 1x; d - statistički ( $p < 0,05$  Scheffe-ov test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 2,5x; e - statistički ( $p < 0,05$  Scheffe-ov test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 5x; f - statistički ( $p < 0,05$  Scheffe-ov test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 10x; g - statistički ( $p < 0,05$  Scheffe-ov test) značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu.

**Slika 9.** Indukcija slobodnih radikala na staničnoj liniji CaCo2 ( $10^5$  st mL<sup>-1</sup>) u odnosu na negativnu kontrolu (stanice + medij za uzgoj stanica) nakon tretmana podzemnim vodama u koncentracijama raspona od 0,1 do 10x.

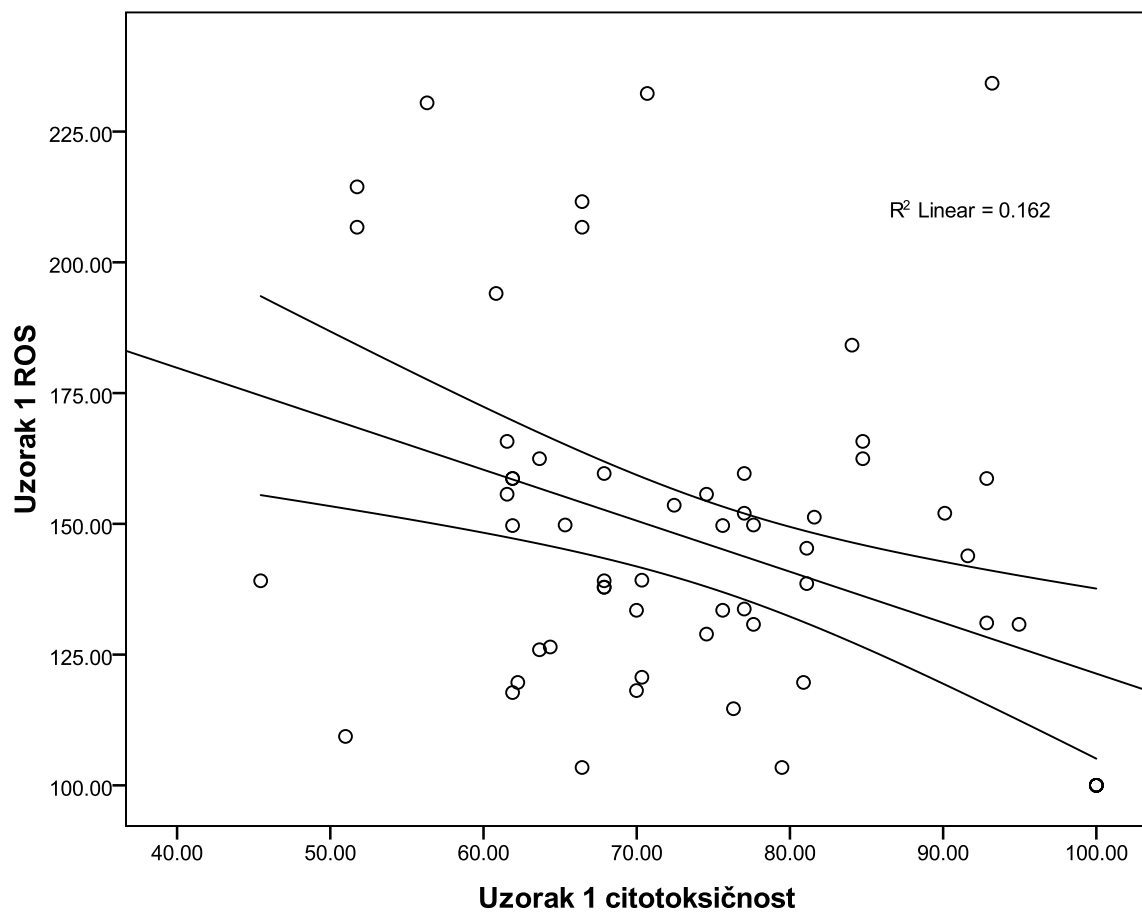
Analiza vode pokazala je da statistički značajno nastajanje slobodnih radikala induciraju gotovo sve koncentracije uzoraka 1, 2 i 3, dok su izuzeci koncentracije 0,1x za uzorak 2, te koncentracije 2,5x i 10x za uzorak 3 (Slika 9). Također, ni kod jednog od tri ispitana uzorka vode nije vidljiva veza doza-učinak. Najveću indukciju slobodnih radikala uzrokovao je uzorak 1 pri koncentraciji 0,5x. No uspoređujući uzorke međusobno, može se vidjeti kako uzorci 2 i 3 generalno pokazuju nešto veću indukciju slobodnih radikala nego uzorak 1. To se

može objasniti prisutnošću povećanih koncentracija kemijskih spojeva u uzorcima 2 i 3 u odnosu na uzorak 1. Naime, rezultati analize uzorka 2 i 3 pokazali su da imaju povišene koncentracije određenih anorganskih pokazatelja: arsena, mangana i žive; odnosno mangana i amonijaka. Ipak, i uzorak 1 uzrokovao je značajnu indukciju slobodnih radikala, a svi pokazatelji kemijske analize prisutni su u dopuštenim količinama. Njegov učinak može se pripisati sveukupnim organskim i anorganskim pokazateljima, koji iako su prisutni u niskim količinama ipak očito imaju značajan učinak.

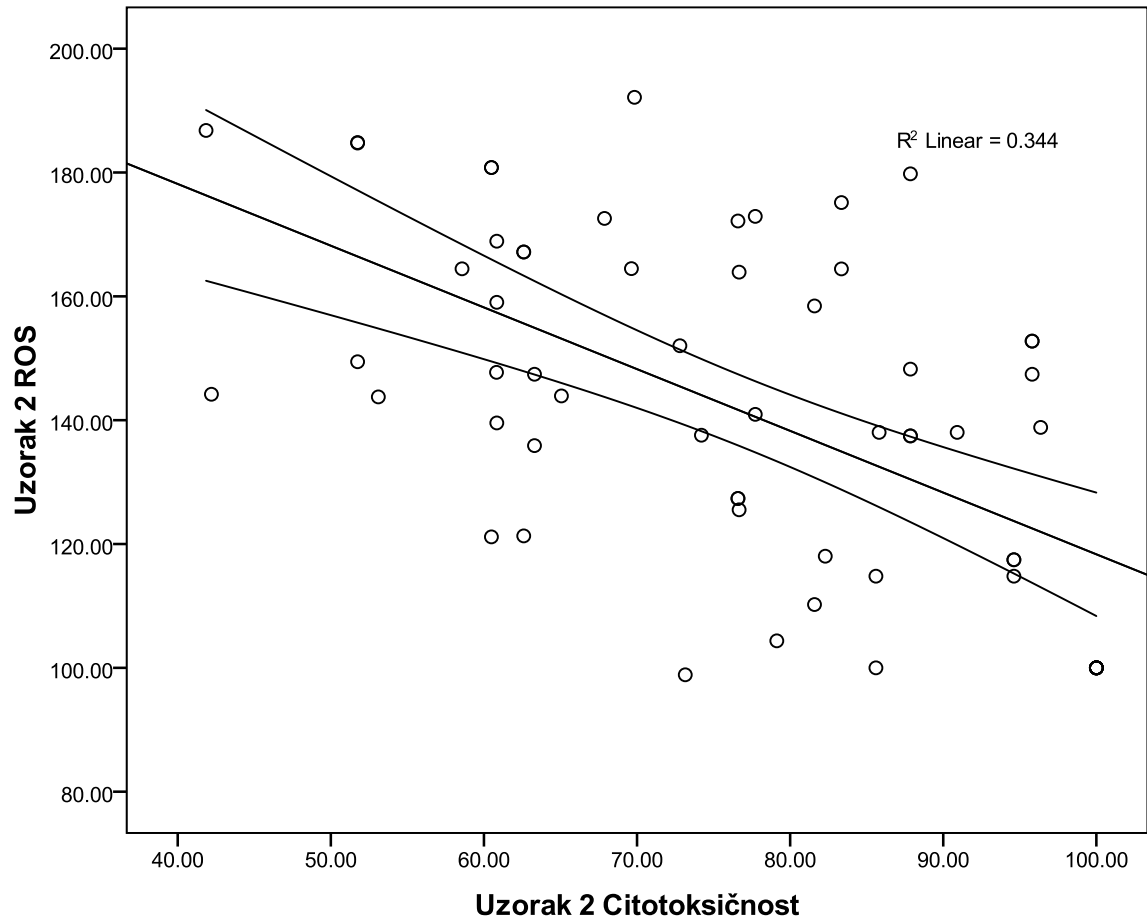
Kisikovi radikali mogu uzrokovati lipidnu peroksidaciju, oštećenje DNA i proteina, te oksidirati gotovo svaku organsku molekulu (Pacadi, 2015). Li i sur. (2008) potvrdili su štetni utjecaj procjednih voda na mozak i jetru miša koji je izložen *per os*. Efekti su se ispoljili na dva nivoa: kroz lipidnu peroksidaciju (LPO) i kroz promjene oksidativnog stanja mjenog pomoću koncentracije tiobarbituratnih tvari kao i povišene koncentracije antioksidacijskih enzima (Cu, Zn-superoksid dismutaza, Se-ovisna glutation peroksidaza i katalaza) koji su inducirani povišenim koncentracijama slobodnih radikala. Bhargav i sur. (2008) uočili su ekspresiju Hsp70 i povišenu aktivnost antioksidacijskih enzima, te povišenu koncentraciju produkata LPO nakon izlaganja vrste *Drosophila melanogaster* procjednim vodama. Ova otkrića potvrdila su da nastajanje slobodnih radikala predstavlja bazni mehanizam toksičnog učinka procjedne vode (Garaj-Vrhovac i sur., 2013).

#### 4.4. KORELACIJA CITOTOKSIČNOSTI I INDUKCIJE SLOBODNIH RADIKALA

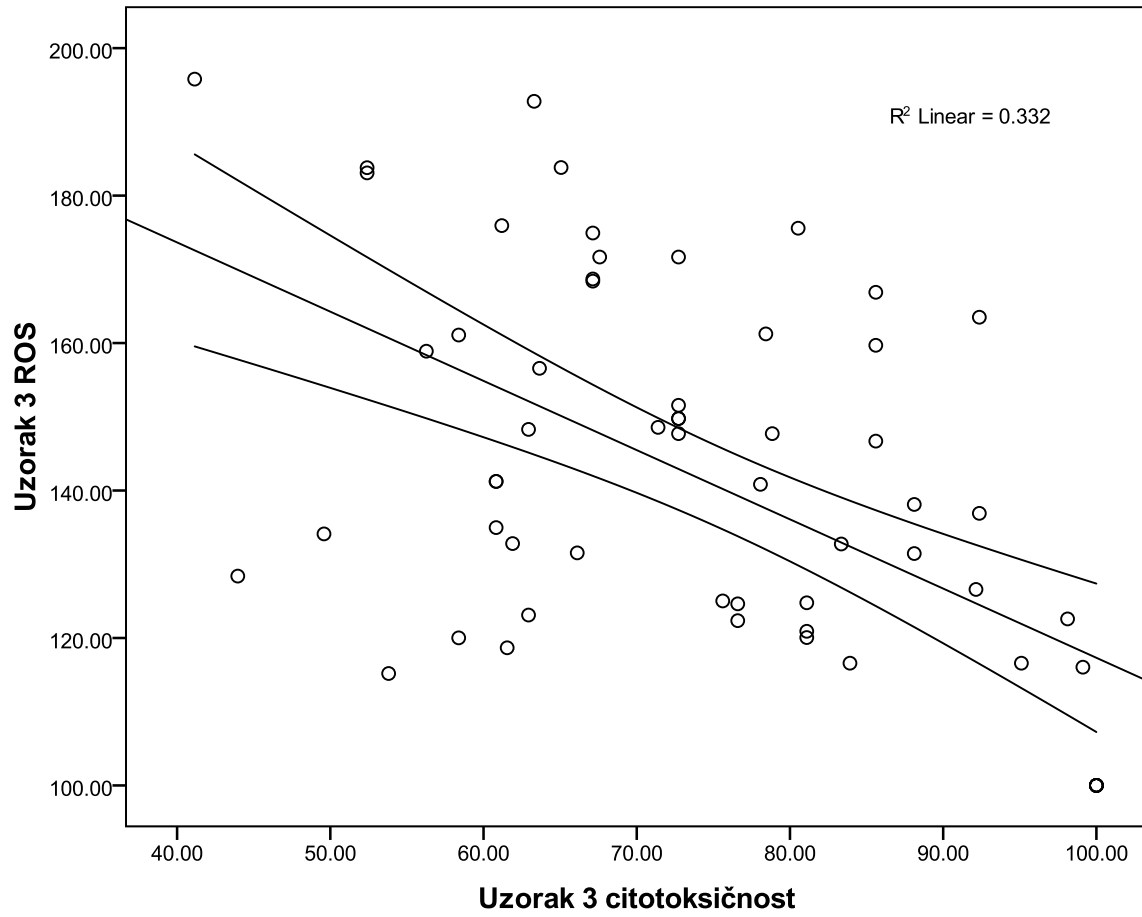
Poznato je da prisutnost slobodnih radikala može prouzročiti citotoksično djelovanje, što rezultira staničnom smrću, induciranjem mutacija i kromosomskih aberacija, te karcinogenezom (Pacadi, 2015). Stoga je za sva tri uzorka analizirana korelacija citotoksičnosti i indukcije slobodnih radikala kako bi se odredila njihova potencijalna povezanost.



**Slika 10.** Pearsonova korelacija citotoksičnosti i indukcije slobodnih radikala za uzorak 1 ( $p < 0,01$ ).



**Slika 11.** Pearsonova korelacija citotoksičnosti i indukcije slobodnih radikala za uzorak 2 ( $p < 0,01$ ).



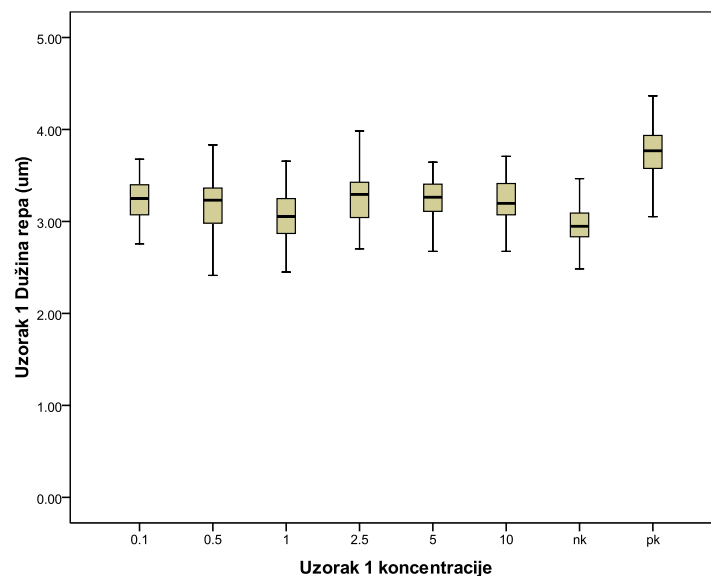
**Slika 12.** Pearsonova korelacija citotoksičnosti i indukcije slobodnih radikala za uzorak 3 ( $p < 0,01$ ).

Rezultati Pearsonove korelacije citotoksičnosti i indukcije slobodnih radikala za sva tri uzorka prikazani su na Slikama 10, 11 i 12. Vidljivo je kako je korelacija negativna nepotpuna, što znači da je koeficijent korelacije  $-1 < r < 0$ . U ovom slučaju linearnom porastu citotoksičnosti odgovara linearno opadanje indukcije slobodnih radikala, ali na način da je vrijednost jedne varijable povezana s više vrijednosti druge varijable. Pokazalo se da je za sva tri uzorka korelacija citotoksičnosti i indukcije slobodnih radikala slaba. Prema tome, citotoksični učinak nije rezultat indukcije slobodnih radikala, već je to posljedica nekog drugog mehanizma koji inhibira diobu stanica ili uzrokuje njihovo odumiranje.

#### 4.5. UČINAK PODZEMNIH VODA NA GENETIČKI MATERIJAL STANIČNE LINIJE CaCo2

Potencijalno oštećenje genetičkog materijala stanica CaCo2 mjerilo se komet testom za 6 koncentracija podzemne vode (0,1x; 0,5x; 1x; 2,5x; 5x; 10x) nakon 72 sata izloženosti. Oštećenje DNA izraženo je pomoću dva parametra: dužina i intenzitet repa kometa. Komet test je osjetljiva tehnika za *in vivo* i *in vitro* mjerenje i analizu oštećenja DNA na nivou jedne stanice (Collins i sur., 2008; McArt i sur., 2009; Moller, 2005) i detektira jednolančane i dvolančane lomove na nivou molekule DNA, mjesta nepotpunog popravka, alkalno labilna mjesta, te DNA-DNA i DNA-protein veze (Piperakis, 2009).

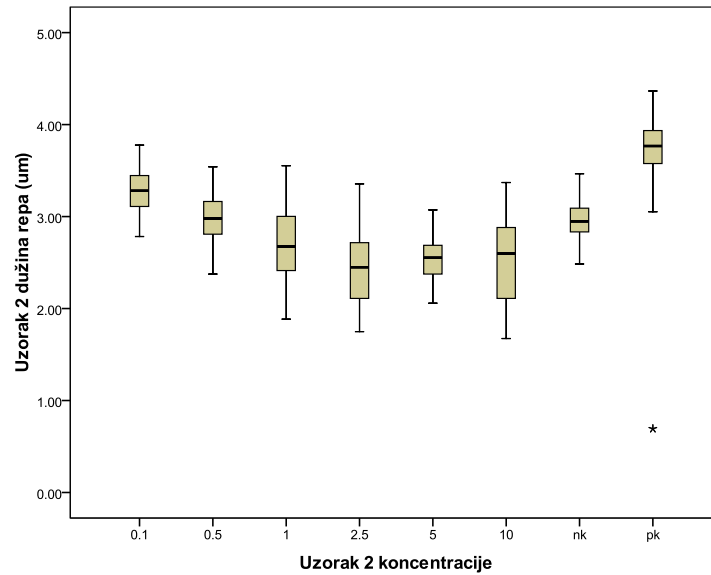
##### 4.5.1. Dužina repa kometa



nk – negativna kontrola (stanice + medij za uzgoj stanica); pk – pozitivna kontrola (stanice tretirane vodikovim peroksidom, 1mM).

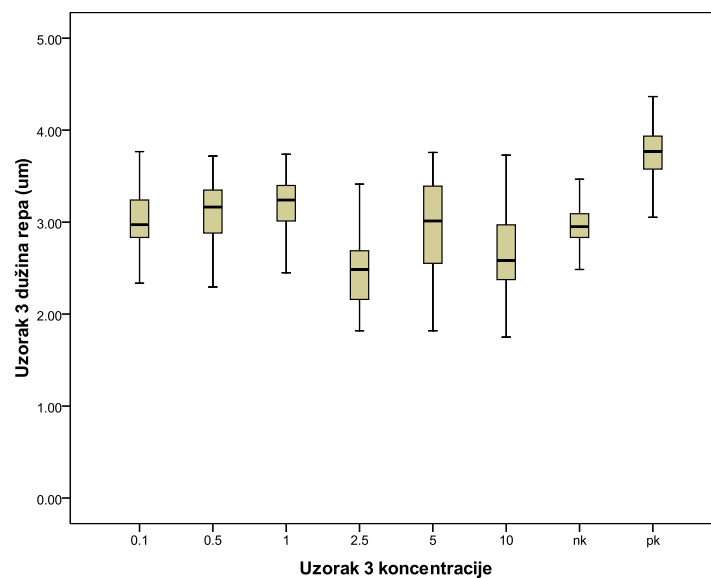
**Slika 13.** Oštećenje DNA (dužina repa kometa) mjereno komet testom na staničnoj liniji CaCo2 nakon tretmana uzorkom 1 u koncentracijama 0,1x-10x ( $p < 0,05$ ).





nk – negativna kontrola (stanice + medij za uzgoj stanica); pk – pozitivna kontrola (stanice tretirane vodikovim peroksidom, 1mM).

**Slika 14.** Oštećenje DNA (dužina repa kometa) mjereno komet testom na staničnoj liniji CaCo2 nakon tretmana uzorkom 2 u koncentracijama 0,1x-10x ( $p < 0,05$ ).

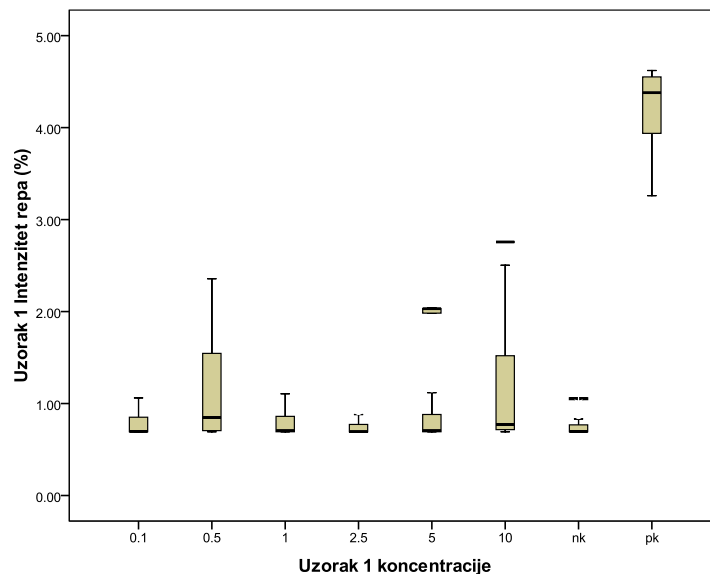


nk – negativna kontrola (stanice + medij za uzgoj stanica); pk – pozitivna kontrola (stanice tretirane vodikovim peroksidom, 1mM).

**Slika 15.** Oštećenje DNA (dužina repa kometa) mjereno komet testom na staničnoj liniji CaCo2 nakon tretmana uzorkom 3 u koncentracijama 0,1x-10x ( $p < 0,05$ ).

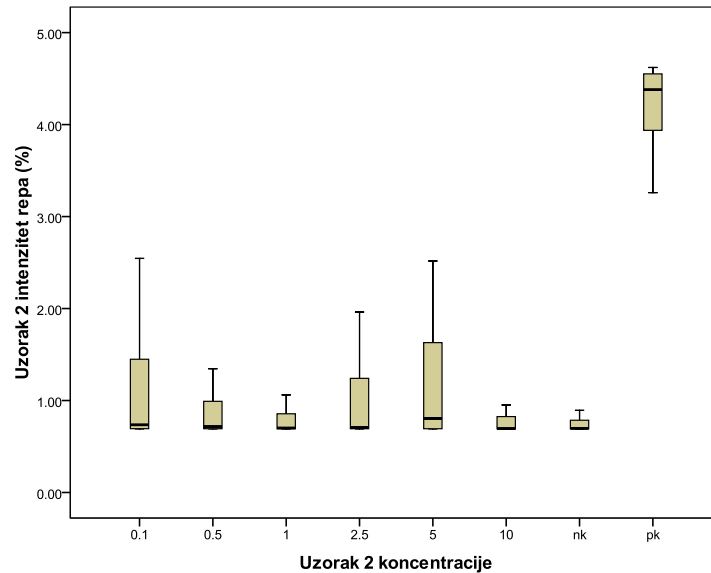
Rezultati parametra dužina repa kometa pokazali su statistički značajno povećanje dužine repa u odnosu na negativnu kontrolu za uzorak 1 (Slika 13) gotovo pri svim ispitanim koncentracijama, osim pri koncentracijama 0,1x i 1x. Uzorak 2 (Slika 14) statistički značajno povećanje dužine repa kometa u odnosu na negativnu kontrolu pokazao je samo pri koncentraciji 0,1x, a uzorak 3 (Slika 15) pri koncentraciji 1x. Uzorci 2 i 3 izazvali su čak i statistički značajno smanjenje dužine repa kometa u odnosu na negativnu kontrolu, i to pri koncentracijama 1x; 2,5x; 5x i 10x za uzorak 2, te pri koncentracijama 2,5x i 10x za uzorak 3. Prema tome, dalo bi se tvrditi kako uzorak 1 pokazuje veće oštećenje DNA od ostala dva uzorka. Jedno od mogućih objašnjenja ove pojave leži u činjenici da u preživjelim stanicama, uslijed izloženosti procjednim vodama, dolazi do indukcije enzima uključenih u popravak oštećenja uzrokovanih kontaminantima prisutnim u vodi, te time dolazi i do popravka oštećenog genetičkog materijala. Ni kod jednog uzorka nije uočena povezanost doze i učinka.

#### 4.5.2. Intenzitet repa kometa



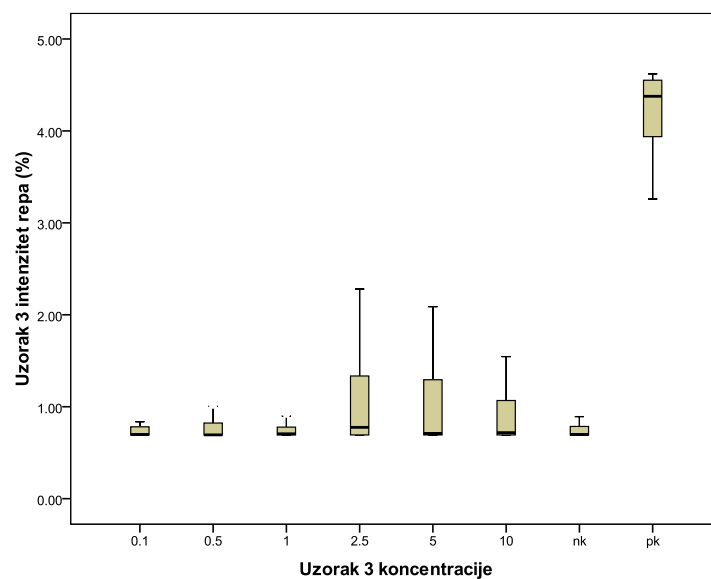
nk – negativna kontrola (stanice + medij za uzgoj stanica); pk – pozitivna kontrola (stanice tretirane vodikovim peroksidom, 1mM).

**Slika 16.** Oštećenje DNA (%-tak DNA) mjereno komet testom na staničnoj liniji CaCo2 nakon tretmana uzorkom 1 u koncentracijama 0,1x-10x ( $p < 0,05$ ).



nk – negativna kontrola (stanice + medij za uzgoj stanica); pk – pozitivna kontrola (stanice tretirane vodikovim peroksidom, 1mM).

**Slika 17.** Oštećenje DNA (%-tak DNA) mjereno komet testom na staničnoj liniji CaCo2 nakon tretmana uzorkom 2 u koncentracijama 0,1x-10x ( $p < 0,05$ ).



nk – negativna kontrola (stanice + medij za uzgoj stanica); pk – pozitivna kontrola (stanice tretirane vodikovim peroksidom, 1mM).

**Slika 18.** Oštećenje DNA (%-tak DNA) mjereno komet testom na staničnoj liniji CaCo2 nakon tretmana uzorkom 3 u koncentracijama 0,1x-10x ( $p < 0,05$ ).

Iz rezultata parametra intenziteta repa kometa, odnosno postotka DNA u repu, vidljivo je kako svi uzorci pokazuju povećanje intenziteta repa kometa u odnosu na negativnu kontrolu. Za uzorak 1 (Slika 16) povećanje intenziteta repa je statistički značajno pri koncentracijama 0,5x i 10x, za uzorak 2 (Slika 17) samo pri koncentraciji 5x, te za uzorak 3 (Slika 18) pri koncentraciji 2,5x. Postotak DNA u repu je najprikladniji parametar za analizu oštećenja DNA, jer su varijacije tijekom elektroforeze i između eksperimenata manje izražene nego kod dužine repa (De-Boeck i sur., 2000). S obzirom na podatke one way ANOVA statističke obrade, može se odrediti koji uzorak izaziva najveće oštećenje DNA. Iz toga slijedi poredak uzoraka prema jačini oštećenja DNA obzirom na intenzitet repa kometa: uzorak 1 (konc. 0,5x) > uzorak 2 (konc. 5x) > uzorak 1 (konc. 10x) > uzorak 3 (konc. 2,5x). Ovime se uzorak 1 u koncentraciji 0,5x još jednom pokazao kaj najštetniji, a isto je pokazala i analiza indukcije slobodnih radikala.

U uzorcima podzemnih voda prisutno je mnogo vrsta kontaminanata koje mogu uzrokovati oštećenje DNA iako su koncentracije individualnih kontaminanata vrlo niske (Hengstler i sur., 2003). Vrlo je teško odgonetnuti koji kontaminant je zapravo odgovoran za genotoksičnost ovih uzoraka. Sve ukupno, može se pretpostaviti da višestruke interakcije između organskih tvari, metala, otopljenih i suspendiranih tvari mogu imati aditivni i/ili sinergistički učinak na molekulu DNA (Graj-Vrhovac i sur., 2013), te je ovo moguće objašnjenje učinka uzorka 1 koji se prema kemijskom sastavu zapravo pokazao kao najbolji. Kod uzoraka 2 i 3 amonij i teški metali prisutni su u količinama višim od dopuštenih, te su vjerojatno ključni faktor povećanja oštećenja genoma (Garaj-Vrhovac i sur., 2013). Nekoliko autora je dokazalo toksičnost željeza (Pra i sur., 2008), cinka (Orioux i sur., 2011), bakra (Gabbianelli i sur., 2003), kroma (Trzeciak i sur., 2000) i nikla (Cavallo i sur., 2003; Wozniak i sur., 2004) na animalnim i humanim stanicama, a osim što uzrokuju oksidativni stres, nikal i olovo remete popravak DNA (Cavallo i sur., 2003; Wozniak i sur., 2004; Martinez-Alfaro i sur., 2012).

U istraživanju koje su proveli Gajski i sur. (2012) genotoksičnost procjedne vode s odlagališta otpada kod Rovinja ispitana je na humanim limfocitima pomoću mikronukleus testa i komet testa. Uzorci su sadržavali relativno niske koncentracije teških metala, dok je nivo organskih spojeva bio čak 39 puta viši od dopuštenih koncentracija. Opaženi genotoksični učinci povezali su se s visokim koncentracijama amonijaka, koji je bio 180 puta viši od dopuštene granice. Prema tome su zaključili da uzorci procjedne vode s odlagališta mogu predstavljati rizik za okoliš i ljudsko zdravlje ako se ispuštaju u vodeni okoliš. U

drugom istraživanju koje je provedeno na području Hrvatske istražen je učinak procjedne vode s odlagališta otpada Piškornica kraj Koprivnice od strane Garaj-Vrhovac i sur. (2013). Ispitani su citotoksičnost i oštećenje DNA pomoću fluorescentne mikroskopije i komet testa na humanim i biljnim stanicama, a dokazano je da je procjedna voda uzrokovala značajno više parametre komet testa u usporedbi s negativnom kontrolom nakon 24h izlaganja.

Slični rezultati dobiveni su i u istraživanjima provedenim na području Delhi u Indiji (Ghosh i sur., 2015) korištenjem kemijske analize i *in vitro* testova toksičnosti na HepG2 staničnoj liniji, te na otoku Macao u Kini (Feng i sur., 2007) gdje je istraživanje provedeno na stanicama korijena *Vicia faba* pri čemu je došlo do značajnog porasta frekvencije mikronukleusa u usporedbi s negativnom kontrolom. Pokazalo se da porastom koncentracije teških metala u procjednim vodama, toksični učinak na stanice korijena *Vicia faba* raste, a sve to ukazuje na očitu genotoksičnost ispitane procjedne vode.

Kompleksni sastav podzemnih voda može uzrokovati višestruke mehanizme toksičnosti. Ona može biti direktna; uzrokovana prisutnošću tvari kao što su amonijak, pesticidi i teški metali, i indirektna; uzrokovana metaboličkom aktivacijom ksenobiotika koja dovodi do formiranja sekundarnih spojeva kao što su reaktivne kisikove vrste koje mogu oštetiti stanične biomolekule (Renou i sur., 2008). U podzemnim vodama velik broj spojeva može biti prisutan u tragovima (Kalcikova i sur., 2011) i kad se istražuju zasebno nemaju velik učinak na stanice, ali zato koktel tih spojeva može pokazivati značajne toksične učinke (Baderna i sur., 2011; Baun i sur., 2004).

Dobiveni rezultati ukazuju da ljudi koji konzumiraju podzemnu vodu kontaminiranu procjednom vodom odlagališta imaju povećani rizik od štetnih učinaka na zdravlje. Prema tome osim stalne kontrole kvalitete podzemnih voda iz okolice odlagališta, potrebna je i sanacija odlagališta.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Dokazano je da svi ispitani uzorci podzemnih voda s područja odlagališta otpada imaju citotoksični učinak na stanice adenokarcinoma epitela debelog crijeva CaCo2.
2. Svi ispitani uzorci podzemnih voda induciraju nastajanje slobodnih radikala na stanicama CaCo2, a najveću indukciju izazvala je podzemna voda zapadno od odlagališta u koncentraciji 0,5x.
3. Nije dokazana povezanost citotoksičnog učinka s indukcijom slobodnih radikala.
4. Sva tri uzorka podzemnih voda uzrokuju oštećenje DNA u stanicama CaCo2, a najveće oštećenje izazvala je podzemna voda zapadno od odlagališta u koncentraciji 0,5x.
5. Uzrok genotoksičnog učinka može se povezati s kemijskim sastavom uzorkovanih voda. Podzemna voda zapadno od odlagališta imala je povišenu količinu ukupnih koliforma, voda sjeverno od odlagališta imala je povišene količine arsena, mangana i žive, dok je voda istočno od odlagališta imala povišene količine mangana i amonijaka. Ostali pokazatelji bili su ispod maksimalno dopuštenih količina.

## 6. LITERATURA

Adeolu, A. O., Ada, O. V., Gbenga, A. A., Adebayo, O. A. (2011) Assessment of groundwater contamination by leachate near a municipal solid waste landfill. *Afr. J. Environ. Sci. Technol.* **5** (11), 933-940.

Aly, H. A., Khafagy, R. M. (2011) 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced cytotoxicity accompanied by oxidative stress in rat Sertoli cells: possible role of mitochondrial fractions of Sertoli cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **252**, 273-280.

Aljaradin, M., Persson, K. M. (2014) Municipal landfilling practice and its impact on the water resources – Jordan. *World Environ.* **4** (5), 213-218.

Amahdar, L., Anouar, A., Ababou, B., Verschaeve, L., Hilali, A. (2009) In vitro genotoxicity of Settat town landfill leachate, Morocco. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **60**, 179-184.

American Public Health Association – APHA, Water Environment Federation Publication (1998) Standard methods for examination of water and wastewater, 19. izd., Washington, DC.

Anonymus 1 (2015) Odlagalište neopasnog otpada Trebež sanira se sredstvima EU. <<http://samobor.hr/novosti/odlagaliste-neopasnog-otpada-trebez-sanira-se-sredstvima-eu>>. Pristupljeno 24. travnja 2017.

Anonymus 2 (2010) Plan gospodarenja otpadom za Grad Samobor u razdoblju od 2010. do 2017. <[https://www.samobor.hr/storage/upload/doc\\_library/plan\\_gospodarenja\\_otpadom\\_za\\_grad\\_samobor\\_od\\_2010%E2%80%932017\\_9411.pdf](https://www.samobor.hr/storage/upload/doc_library/plan_gospodarenja_otpadom_za_grad_samobor_od_2010%E2%80%932017_9411.pdf)>. Pristupljeno 22. kolovoza 2017.

Anonymus 3 (2017) Sanacija odlagališta neopasnog otpada Trebež u gradu Samoboru. <<http://sanacija-trebez.com/>>. Pristupljeno 24. travnja 2017.

Anonymus 4 (2014) Analiza vode za piće. <<http://croatiakontrola.hr/aktivnosti/laboratorij/analiza-vode-za-pice/>>. Pristupljeno 5. srpnja 2017.

Anonymus 5 (2017) Caco-2 Health and Confluence. <<http://www.biocompare.com/6-Tissue-Culture-Forums/2335-Caco-2-Health-and-Confluence/>>. Pristupljeno 4. srpnja 2017.

Anonymus 6 (2017) BRAND® counting chamber BLAUBRAND® Bürker-Türk. <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/br719520?lang=en&region=HR>>.

Pristupljeno 4. srpnja 2017.

Aziz, H. A., Alias, S., Adlan, M. N., Faridah-Asaari, A. H., Zahari, M. S. (2007) Colour removal from landfill leachate by coagulation and flocculation processes. *Biores. Technol.* **98** (1), 218-220.

Babich, H., Borenfreund, E. (1991) Cytotoxicity of T-2 toxin and its metabolites determined with the Neutral red cell viability assay. *Appl. Environ. Microb.* **57**, 2101-2103.

Baderna, D., Maggioni, S., Boriani, E., Gemma, S., Molteni, M., Lombardo, A., Colombo, A., Bordonali, S., Rotella, G., Lodi, M., Benfenati, E. (2011) A combined approach to investigate the toxicity of an industrial landfill's leachate: chemical analyses, risk assessment and in vitro assays. *Environ. Res.* **111**, 603-613.

Badmus, B. S. (2001) Leachate contamination effect on ground water exploration. *Afr. J. Environ. Studies* **2**, 38-41.

Bakare, A. A., Alimba, C. G., Alabi, O. A. (2013) Genotoxicity and mutagenicity of solid waste leachates: A review. *Acad. J.* **12** (27), 4206-4220.

Bakare, A. A., Mosuro, A. A., Osibanjo, O. (2000) Effect of simulated leachate on chromosomes and mitosis in roots of *Allium cepa* (L.). *J. Environ. Biol.* **21**, 251-260.

Bakare, A. A., Mosuro, A. A., Osibanjo, O. (2005) An *in vivo* evaluation of induction of abnormal sperm morphology in mice by landfill leachates. *Mutat. Res.* **582**, 28-34.

Baun, D. L., Christensen, T. H. (2004) Speciation of heavy metals in landfill leachate: a review. *Waste Manage. Res.* **22**, 3-23.

Bhargav, D., Singh, M. P., Murthy, R. S., Mathur, N., Misra, D., Saxena, D. K., Chowdhuri, D. K. (2008) Toxic potential of municipal solid waste leachates in transgenic *Drosophila melanogaster* (hsp70-lacZ): hsp70 as a marker of cellular damage. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **69**, 233-245.



- Bjerg, P. L., Albrechtsen, H. J., Kjeldsen, P., Christensen, T. H., Cozzarelli, I. M., Heinrich, D. H. (2003) The Groundwater Geochemistry of Waste Disposal Facilities. U: Treatise on Geochemistry, (Turekian, K. K., Holland H. D., ured.), Elsevier Science, Pergamon, Oxford, str. 579-612.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brown, K. W., Donnelly, K. C. (1984) Mutagenic activity of runoff and leachate water from hazardous waste land treatment. *Environ. Poll.* **35**, 229-246.
- Cabrera, G. L., Rodriguez, D. M. G. (1997) Genotoxicity of leachates from a landfill using three bioassays. *Mutat. Res.* **426**, 207-210.
- Cavallo, D., Ursini, C. L., Setini, A., Chianese, C., Piegari, P., Perniconi, B., Iavicoli, S. (2003) Evaluation of oxidative damage and inhibition of DNA rapair in an in vitro study of nickel exposure. *Toxicol. In Vitro* **17**, 603-607.
- Chandra, S., Chauhan, L. K. S., Murthy, R. C., Saxena, P. N., Pande, P. N., Gupta, S. K. (2005) Comparative biomonitoring of leachaste from hazardous solid waste of two industries using Allium test. *Sci. Total Environ.* **347**, 46-52.
- Christensenm, T. H., Kjeldsen, P., Albrechtsen, H. J., Heron, G., Nielsen, P. H., Bjerg, P. L., Holm, P. E. (1994) Attenuation of Landfill Leachate pollutants in Aquifers. *Critical Rev. Environ. Sci. Technol.* **24** (2), 119-202.
- Christensen, T. H., Kjeldsen, P., Bjerg, P. L., Jensen, D. L., Christensen, J. B., Baun, A. (2001) Biogeochemistry of landfill leachate plumes. *Appl. Geochem.* **16**, 659–718.
- Collins, A. R. (2004) The comet assay for DNA damage and repair (Review). *Mol. Biotechnol.* **26**, 249-261.
- Collins, A. R., Oscoz, A. A., Brunborg, G., Gaivao, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C. C., Stetina, R. (2008) The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* **23**, 143-151.
- Cuadra, S. N., Linderholm, L., Athanasiadou, M., Jakobson, K. (2006) Persistent Organochlorine Pollutants in children working at a waste disposal site and in young females with high fish consumption in Managua, Nicaragua. *Ambio.* **35** (3), 109-116.

- Daskalopoulos, E., Badr, O., Probert, S. D. (1998) An integrated approach to municipal solid waste management. *Resour. Conservat. Recycl.* **241**, 33-50.
- Dhawan, A., Bajpayee, M., Parmar, D. (2009) Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol. Toxicol.* **25** (1), 5-32.
- Dhere, A. M., Chandrasekhar, B. P., Pratapsingh, B. P., Dhanraj, A. P. (2008) Municipal solid waste disposal in Pune city - An analysis of air and groundwater pollution. *Curr. Sci. India* **95** (6), 774-777.
- Donnelly, J. A., Scarpino, P. V., Tabor, M. W. (1988) Clostridial presence in hazardous waste-containing experimental landfills. U: Hazardous Waste: Detection, Control, Treatment, Part B, (Abbou, R., ured.), Elsevier Science, Amsterdam, str. 1073-1086.
- Donnelly, K. C., Brown, K. W., Thomas, J. C. (1990) Bacterial mutagenicity of leachate water from municipal sewage sludge-amended soils. *Environ. Toxicol. Chem.* **9**, 443-451.
- Durgo, K., Vuković, L., Rusak, G., Osmak, M., Franekić-Čolić, J. (2009) Cytotoxic and apoptotic effect of structurally similar flavonoids on parental and drug-resistant cells of a human cervical carcinoma. *Food Technol. Biotechnol.* **47**, 356-363.
- El-Fadel, M., Findikakis, A. N., Leckie, J. O. (1997) Environmental impacts of solid waste landfilling. *J. Environ. Manage.* **50** (1), 1-25.
- Erkekoglu, P., Rachidi, W., Yuzugullu, O. G., Giray, B., Favier, A., Ozturk, M., Hincal, F. (2010) Evaluation of cytotoxicity and oxidative DNA damaging effects of di(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) and mono(2-ethylhexyl)-phthalate (MEHP) on MA-10 Leydig cells and protection by selenium. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **248**, 52-62.
- Ernst, W. R., Henningar, P., Doe, K., Wade, S., Julien, G. (1994) Characterization of the chemical constituents and toxicity to aquatic organisms of a municipal landfill leachate. *Water Pollut. Res. J. Can.* **29**, 89-101.
- Fan, H. J., Shu, H. Y., Yang, H. S., Chen, W. C. (2006) Characteristics of landfill leachates in central Taiwan. *Sci.Total Environ.* **361** (1-3), 25-37.
- Fatta, D., Papadopoulos, A., Loizidou, M. (1999) A study on the landfill leachate and its impact on the groundwater quality of the greater area. *Environ. Geochem. Health* **21** (2), 175-190.

Feng, S., Wang, X., Wei, G., Peng, P., Yang, Y., Cao, Z. (2007) Leachates of municipal solid waste incineration bottom ash from Macao: Heavy metal concentrations and genotoxicity. *Chemosphere* **67**, 1133-1137.

Fučić, A. (1997) Metoda komete: novi pristup genotoksikološkim istraživanjima. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **48** (4), 413-419.

Freshney, R. I. (2010) Culture of animalia cells: a manual on basic tehnique and specialized applications. 4. izd., John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.

Gabbianelli, R., Lupidi, G., Villarini, M., Falcioni, G. (2003) DNA damage induced by copper on erythrocytes of gilthed sea bream *Sparus aurata* and mollusk *Scapharca inaequalvis*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **45**, 350-356.

Gajski, G., Oreščanin, V., Garaj-Vrhovac, V. (2011) Cytogenotoxicity of sewage sludge leachate before and after calcium oxide-based solidification in human lymphocytes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **74**, 1408-1415.

Gajski, G., Oreščanin, V., Garaj-Vrhovac, V. (2012) Chemical composition and genotoxicity assessment of sanitary landfill leachate from Rovinj, Croatia. *Ecotox. Environ. Safe.* **78**, 253-259.

Garaj-Vrhovac, V., Oreščanin, V., Gajski, G., Gerić, M, Ruk, D., Kollar, R., Radić Brkanac, S., Cvjetko, P. (2013) Toxicological characterization of the landfill leachate prior/after chemical and electrochemical treatment: A study on human and planet cells. *Chemosphere* **93** (6), 939-945.

Garaj-Vrhovac, V., Oreščanin, V., Ruk, D., Gajski, G. (2009) In vitro assessment of genotoxic effects of electric arc furnace dust on human lymphocytes using the alkaline comet assay. *J. Environ. Sci. Health A. Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* **44**, 279-287.

Gedik, C. M., Ewen, S. W. B., Collins, A. R. (1992) Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **62** (3), 313-320.

Ghosh, P., Das, M. T., Thakur, I. S. (2014) Mammalian cell line-based bioassays for toxicological evaluation of landfill leachate treated by *Pseudomonas* sp. ISTDF1. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **21**, 8084-8094.

Ghosh, P., Gupta, A., Thakur, I.S. (2015) Combined chemical and toxicological evaluation of leachate from municipal solid waste landfill sites of Delhi, India. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22** (12), 9148-9158. doi: 10.1007/s11356-015-4077-7.

Halim, C. E., Amal, R., Beydoun, D., Scott, J.A., Low, G. (2005) Evaluating the applicability of regulatory leaching tests for assessing the hazards of Pbcontaminated soils. *J. Hazard. Mater.* **120**, 101-111.

Ham, S. Y., Kim, Y. J., Lee, D. H. (2008) Leaching characteristics of PCDDs/DFs and dioxin-like PCBs from landfills containing municipal solid waste and incineration residues. *Chemosphere* **70** (9), 1685-1693.

Heath, C. W., Nadel, M. R., Zack, M. M., Chen, A. T. L., Bender, M. A., Preston, J. (1984). Cytogenetic findings in persons living near the Love Canal. *JAMA* **251**, 1437-1440.

Heepchantree, W., Paratasilpin, T., Kangwanpong, D. (2006) A biological evaluation of DNA damage detected by comet assay in healthy populations residing in areas that differ in lung cancer incidence. *J. Toxicol. Env. Heal. A.* **69**, 1071-1082.

Hengstler, J. G., Bolm-Audorff, U., Faldum, A. (2003) Occupational exposure to heavy metals: DNA damage induction and DNA repair inhibition prove co-exposures to cadmium, cobalt and lead as more dangerous than hitherto expected. *Carcinogenesis* **24**, 63-73.

Hu, H. (2000) Exposure to metals. *Primary Care* **27**, 983-996.

Ikem, A., Osibanjo, O., Sridhar, M. K. C., Sobande, A. (2002) Evaluation of groundwater quality characteristics near two waste sites in Ibadan and Lagos, Nigeria. *Water Air Soil Pollut.* **140**, 307-333.

Iqbal, M. A., Gupta, S. G. (2009) Studies on Heavy Metal Ion Pollution of Ground Water sources as an Effect of Municipal Solid Waste Dumping. *Afr. J. Basic. Appl. Sci.* **1** (5-6), 117-122.

Jambrović, F. (2013) Onečišćenje, zaštita i stanje kvalitete vode za piće Međimurske županije. Stručni rad, Osnovna škola Sveta Marija.

Janerich, D. T., Burnett, W. S., Feck, G., Hoff, M., Nasca, P., Polednak, A. P., Greenwald, P., Vianna, N. (1981) Cancer incidence in the Love canal area. *Science* **212**, 1404-1407.

- Jensen, D. L., Christensen, T. H. (1999) Colloidal and dissolved metals in leachates from four Danish landfills. *Water Res.* **33**, 2139-2145.
- Jonsson, S., Ejlertsson, J., Ledin, A., Mersiowsky, I., Svensson, B. H. (2003) Mono- and diesters from o-phthalic acid in leachates from different European landfills. *Water Res.* **37**, 609-617.
- Kalcikova, G., Vavrova, M., Zagorc-Koncan, Z., Gotvajn, A. Z. (2011) Seasonal variations in municipal landfill leachate quality. *MEQ: Int. J.* **22**, 612-619.
- Kang, Y., Cheung, K. C., Wong, M. H. (2010) Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in different indoor dusts and their potential cytotoxicity based on two human cell lines. *Environ. Int.* **36**, 542-547.
- Kjeldsen, P., Barlaz, M. A., Rooker, A. P., Baun, A., Ledin, A., Christensen, J. B. (2002) Present and Long-Term Composition of MSW Landfill Leachate: A Review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **32** (4), 297-336.
- Koizumi, T., Shirakura, H., Kumagai, H., Tatsumoto, H., Suzuki, K. T. (1996) Mechanism of cadmium-induced cytotoxicity in rat hepatocytes: cadmium-induced active oxygen-related permeability changes of the plasma membrane. *Toxicology* **114**, 125-134.
- Krug, M. N., Ham, R. K. (1991) Analysis of long-term leachate characteristics. Third International landfill Symposium. S Margherita di Pula. Cagliari, Italy CISA, str. 51-60.
- Kurniawan, T. A., Lo, W. H., Chan, G. Y. S. (2006) Physico-chemical treatments for removal of recalcitrant contaminants from landfill leachates. *J. Hazard. Mater.* **129**, 80-100.
- Lah, N., Vidic, T., Glasencnik, E., Cepeljnik, T., Gorjanc, G., Marinsek-Logar, R. (2008) Genotoxicity evaluation of water soil leachates by Ames test, comet assay, and preliminary Tradescantia micronucleus assay. *Environ. Monit. Assess.* **139**, 107-118.
- Laniyan, T. A., Kehinde-Phillips, O. O., Elesha, L. (2011) Hazards of heavy metal contamination on the groundwater around a municipal dumpsites in Lagos, Southwestern, Nigeria. *Internal. J. Engr Technol.* **11** (5), 61-69.
- Lee, G. F., Jones-Lee, A. (1993) Ground water Quality Protection: A Suggested Approach for Water Utilities. Report to the CA/NV AWWA Section Source Water Quality Committee.

- Li, G., Sang, N., Zhao, Y. (2004) Micronuclei induced by municipal landfill leachate in mouse bone marrow cells in vivo. *Environ. Res.* **95**, 77-81.
- Li, G., Yun, Y., Li, H., Sang, N. (2008) Effect of landfill leachate on cell cycle, micronucleus, and sister chromatid exchange in *Triticum aestivum*. *J. Hazard. Mater.* **155**, 10-16.
- Li, M., Kondo, T., Zhao, Q. L., Li, F. J., Tanabe, K., Arai, K., Kasuya, M. (2000) Apoptosis induced by cadmium in human lymphoma U937 cells through Ca<sup>2+</sup>-calpain and caspase-mitochondria-dependent pathways. *J. Biol. Chem.* **275**, 39702-39709.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn. Rev.* **4** (8), 118-126.
- Martínez-Alfaro, M., Hernández-Cortés, D., Wrobel, K., Cruz-Jiménez, G., Rivera-Leyva, J.C., Piña-Zentella, R.M., Cárabez Trejo, A. (2012) Effect of melatonin administration on DNA damage and repair responses in lymphocytes of rats subchronically exposed to lead. *Mutat. Res.* **742**, 37-42.
- Martinen, S. K., Kettunen, R. H., Rintala, J. A. (2003) Occurrence and removal of organic pollutants in sewages and landfill leachates. *Sci. Total Environ.* **301**, 1-12.
- Matejczyk, M., Płaza, G. A., Nałęcz-Jawecki, G., Ulfig, K., Markowska-Szczupak, A. (2011) Estimation of the environmental risk posed by landfills using chemical, microbiological and ecotoxicological testing of leachates. *Chemosphere* **82** (7), 1017-1023.
- McArt, D. G., McKerr, G., Howard, C. V., Saetzler, K., Wasson, G. R. (2009) Modelling the comet assay. *Biochem. Soc. Trans.* **37**, 914-917.
- Ministarstvo zaštite okoliša i energetike, Republika Hrvatska (2015) Počeli 65 milijuna kuna vrijedni radovi na sanaciji odlagališta otpada 'Trebež' kod Samobora. <<http://www.mzoip.hr/hr/ministarstvo/vijesti/poceli-65-milijuna-kuna-vrijedni-radovi-na-sanaciji-odlagalista-otpada-trebez-kod-samobora.html>>. Pristupljeno 24. travnja 2017.
- Møller, P. (2005) Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **96**, 1-42.
- Monarca, S., Feretti, D., Zerbini, I., Alberti, A., Zani, C., Resola, S., Gelatti, U., Nardi, G. (2002) Soil contamination detected using bacterial and plant mutagenicity tests and chemical analyses. *Environ. Res.* **88**, 64-69.

- Mor, S., Ravindra K., Dahiya R. P., Chandra A. (2006) Leachate characteristics and assessment of groundwater pollution near Municipal Solid Waste landfill site. *J. Environ. Monitor. Assess.* **118**, 435-456.
- Naik, U. C., Das, M. T., Sauran, S., Thakur, I. S. (2014) Assessment of in vitro cyto/genotoxicity of sequentially treated electroplating effluent on the human hepatocarcinoma HuH-7 cell line. *Mutat. Res.: Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **762**, 9-16.
- Olive, P. L., Banath, J. P., Durand, R. E. (1990) Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “comet” assay. *Radiat. Res.* **122** (1), 86-94.
- Oman, C., Rosqvist, H. (1999) Transport fate of organic compounds with water through landfills. *Water Res.* **33**, 2247-2254.
- Omura, M., Inamasu, T., Ishinishi, N. (1992) Mutagenic activity of the leachate of municipal solid waste landfill. *Mutat. Res.* **298** (2), 125-129.
- Orieux, N., Cambier, S., Gonzales, P., Morin, B., Adam, C., Garnier-Laplace, J., Bourdineaud, J. P. (2011) Genotoxic damages in zebrafish submitted to a polymetallic gradient displayed by the Lot River (France). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **74**, 974-983.
- Oyeku, O. T., Eludoyin, A. O. (2010) Heavy metal contamination of groundwater resources in a Nigerian urban settlement. *Afri. J. Environ. Sci. Technol.* **4** (4), 201-214.
- Pacadi, M. (2015) Ispitivanje genotoksičnosti podzemnih voda s područja Međunarodne zračne luke Zagreb na staničnim linijama HEP2 i A549. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- Paxeus, N. (2000) Organic components in municipal landfill leachates. *Water Res. Technol.* **42**, 323-333.
- Piperakis, S. M. (2009) Comet assay: a brief history. *Cell Biol. Toxicol.* **25**, 1-3.
- Prá, D., Rech Franke, S. I., Giulian, R., Yoneama, M. L., Dias, J. F., Erdtmann, B., Henriques, J. A. P. (2008) Genotoxicity and mutagenicity of iron and copper in mice. *Biometals* **21**, 289-297.

- Reinhart, D. R. (1993) A review of recent studies on the sources of hazardous compounds emitted from solid waste landfills: a US experience. *Waste Manage. Res.* **11**, 257-268.
- Renou, S., Givaudan, J. G., Poulain, S., Dirassouyan, F., Moulin, P. (2008) Landfill leachate treatment: review and opportunity. *J. Hazard Mater.* **150**, 468-493.
- Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J. L. (2008) Neutral red uptake assay for estimation of cell viability/cytotoxicity. <<https://www.nature.com/nprot/journal/v3/n7/abs/nprot.2008.75.html>>. Pristupljeno 4. Srpnja 2017.
- Sabahi, E. A., Rahim, A. S., Zuhairi, W. W. Y., Nozaily, F. A. (2009) Assessment of groundwater pollution at municipal solid waste of Ibb landfill in Yemen. *Bulletin of the Geological Society of Malaysia* **55**, 21-26.
- Sanchez-Chardi, A., Penarroja-Matutano, C., Ribeiro, C. A. O., Nadal, J. (2007) Bioaccumulation of metals and effects of a landfill in small mammals. Part II. The wood mouse, *Apodemus sylvaticus*. *Chemosphere* **70**, 101-109.
- Sang, N., Li, G. (2004) Genotoxicity of municipal landfill leachate on root tips of *Vicia faba*. *Mutat. Res.* **560** (2), 159-165.
- Sang, N., Li, G., Xin, X. (2006) Municipal landfill leachate induces cytogenetic damage in root tips of *Hordeum vulgare*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **63**, 469-473.
- Sawaitayothin, V., Polprasert, C. (2007) Nitrogen mass balance and microbial analysis of constructed wetlands treating municipal landfill leachate. *Biores. Technol.* **98**, 565-570.
- Schrab, G. E., Brown, K. W., Donnelly, K. C. (1993) Acute and genetic toxicity of municipal landfill leachate. *Water Air Soil Poll.* **69** (1-2), 99-112.
- Schwarzbauer, J., Heim, S., Brinker, S., Littke, R. (2002) Occurrence and alteration of organic contaminants in seepage and leakage water from a waste deposit landfill. *Water Res.* **36**, 2275-2287.
- Slack, R. J., Gronow, J. R., Hall, D. H., Voulvoulis, N. (2007) Household hazardous waste disposal to landfill: Using Land Sim to model leachate migration. *Environ. Pollut.* **146** (2), 501-509.



Slack, R. J., Gronow, J. R., Voulvoulis, N. (2005) Household hazardous waste in municipal landfills: contaminants in leachate. *Sci. Total Environ.* **337**, 119-137.

Talorete, T., Limam, A., Mitsuko, K., Jenhani, A. B. R., Ghrabi, A., Isoda, H. (2008) Stress response of mammalian cells incubated with landfill leachate. *Environ. Toxicol. Chem.* **27**, 1084-1092.

Tewari, A., Chauhan, L. K. S., Kumar, D., Gupta, S. K. (2005) Municipal sludge leachate-induced genotoxicity in mice - a subacute study. *Mutat. Res.* **587**, 9-15.

Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C., Sasaki, Y. F. (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* **35** (3), 206–221.

Trzeciak, A., Kowalik, J., Malecka-Panas, E., Drzewoski, J., Wojewódzka, M., Iwanenko, T., Blasiak, J. (2000) Genotoxicity of chromium in human gastric mucosa cells and peripheral blood lymphocytes evaluated by single cell gel electrophoresis (comet assay). *Med. Sci. Monit.* **6**, 24-29.

United Nations Human Settlements Programme (2010) Solid Waste Management in the World's Cities. Water and Sanitation in the World's Cities. Gutenberg Press, Malta.

United States Environmental Protection Agency - US EPA (1984) A Groundwater Protection Strategy for the Environmental Protection Agency. <[https://books.google.hr/books?id=IAvFMBHJd4wC&printsec=frontcover&hl=hr&source=gs\\_bse\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.hr/books?id=IAvFMBHJd4wC&printsec=frontcover&hl=hr&source=gs_bse_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)>. Pristupljeno 4. srpnja 2017.

United States Environmental Protection Agency - US EPA (1993) A Guide for Small Communities.

<<https://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/30004L42.txt?ZyActionD=ZyDocument&Client=EP A&Index=1991%20Thru%201994&Docs=&Query=&Time=&EndTime=&SearchMethod=1&TocRestrict=n&Toc=&TocEntry=&QField=&QFieldYear=&QFieldMonth=&QFieldDay=&UseQField=&IntQFieldOp=0&ExtQFieldOp=0&XmlQuery=&File=D%3A%5CZYFILES%5CINDEX%20DATA%5C91THRU94%5CTXT%5C00000009%5C30004L42.txt&User=ANONYMOUS&Password=anonymous&SortMethod=h%7C-&MaximumDocuments=1&FuzzyDegree=0&ImageQuality=r75g8/r75g8/x150y150g16/i425>>

&Display=hpfr&DefSeekPage=x&SearchBack=ZyActionL&Back=ZyActionS&BackDesc=R  
esults%20page&MaximumPages=1&ZyEntry=2>. Pristupljeno 4. srpnja 2017.

Valavanidis, A., Iliopoulos, N., Gotsis, G., Fiotakis, K. (2008) Leachability, heavy metals, PAHs and PCBs in fly and bottom ash of a medical waste incineration facility. *Waste Mgt. Res.* **26**, 247-255.

Vianna, N. J., Polan, A. K. (1984) Incidence of low birth weight among Love canal residents. *Science* **226**, 1217-1219.

Vrijheid, M., Dolk, H., Armstrong, B., Abramsky, L., Bianchi, F., Fazarinc, I. (2002) Chromosomal congenital anomalies and residence near hazardous waste landfill sites. *Lancet* **359**, 320-322.

Wang, H., Joseph, J. A. (1999) Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free. Radical. Bio. Med.* **27**, 612-616.

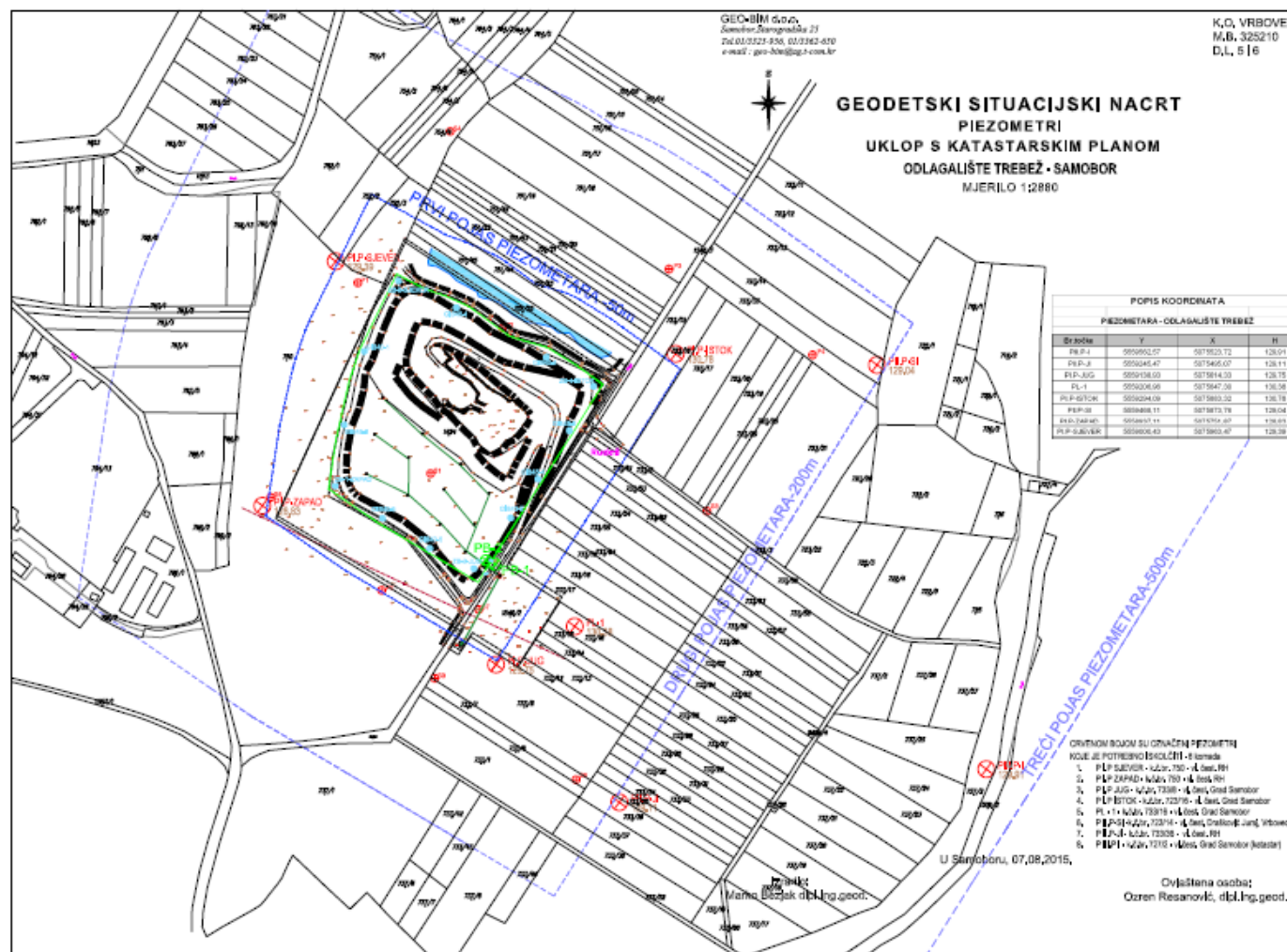
Widziewicz, K., Kalka, J., Skonieczna, M., Madej, P. (2012) The Comet Assay for the Evaluation of Genotoxic Potential of Landfill Leachate. *Sci. World J.* **2012**. doi:10.1100/2012/435239.

Wozniak, K., Błasiak, J. (2004) Nickel impairs the repair of UV- and MNNG-damaged DNA. *Cell Mol. Biol. Lett.* **9**, 83-94.

Young, I. S., Woodside, J. V. (2001) Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol.* **54** (3), 176-186.

## 7. PRILOZI

Prilog 1. Geodetski situacijski nacrt s označenim piezometrima za uzorkovanje podzemnih voda na području odlagališta Trebež.



**Prilog 2.** Kemijski sastav podzemnih voda.

a) Kemijski sastav podzemne vode uzorkovane zapadno od odlagališta otpada Trebež (uzorak 1).

Parametar	Jedinica mjere	Rezultat	MDK	Odgovara
Ukupni koliformi	cfu/ml	120	0	ne
Boja	-	0	20	da
Temperatura	°C	12,4	25	da
*Elektrovodljivost	µS/cm	826	2500	da
*Otopljeni kisik	mg O <sub>2</sub> /l	2,07	-	
*pH		7,17	6,5 – 9,5	da
Zasićenje kisikom	%	20,5	-	
*Suspendirane tvari	mg/l	4	-	
*BPK	mg O <sub>2</sub> /l	< 6	-	
*KPK	mg O <sub>2</sub> /l	< 15	-	
Ukupni ugljikovodici	µg/l	< 20	50	da
TOC/DOC	mg/l	0,157	-	
*Teško hlapljive lipofilne tvari (ukupna ulja i masti)	mg/l	< 0,10	-	
Fenoli	mg/l	< 0,050	-	da
α-HCH	µg/l	< 0,025	0,1	da
β-HCH	µg/l	< 0,025	0,1	da
γ-HCH (Lindan)	µg/l	< 0,025	0,1	da
δ-HCH	µg/l	< 0,025	0,1	da
2,4-DDT	µg/l	< 0,025	0,1	da
4,4-DDD	µg/l	< 0,025	0,1	da
4,4,-DDE	µg/l	< 0,025	0,1	da
4,4-DDT	µg/l	< 0,025	0,1	da
Lakohlapivi klorirani ugljikovodici (ukupno)	mg/l	< 0,001	-	da
1,1,1,2-tetrakloretan	mg/l	< 0,001	-	
1,1,1-trikloretan	mg/l	< 0,001	-	

1,1,2,2-tetrakloretan	mg/l	< 0,001	-	
1,1,2-trikloretan	mg/l	< 0,001	-	
1,1-dikloretan	mg/l	< 0,001	-	
1,1-dikloreten	mg/l	< 0,001	-	
1,2,3-triklorpropan	mg/l	< 0,001	-	
1,2-dibromometan	mg/l	< 0,001	-	
1,2-dikloretan	mg/l	< 0,001	-	
1,2-diklorpropan	mg/l	< 0,001	-	
2,2-diklorpropan	mg/l	< 0,001	-	
Bromodiklorometan	mg/l	< 0,001	-	
cis-1,3-diklorpropen	mg/l	< 0,001	-	
Dibromklorometan	mg/l	< 0,001	-	
Dibromometan	mg/l	< 0,001	-	
Diklorometan	mg/l	< 0,001	-	
HCBD	mg/l	< 0,001	-	
Kloroform	mg/l	< 0,001	-	
Tetrakloreten	mg/l	< 0,001	0,010	da
Tetraklorometan	mg/l	< 0,001	0,010	da
trans-1,2-dikloreten	mg/l	< 0,001	-	
trans-1,3-diklorpropen	mg/l	< 0,001	-	
Triklloreten	mg/l	< 0,001	-	
Arsen (As; ukupni)	mg/l	< 0,007	0,010	da
Bakar (Cu)	mg/l	< 0,025	2	da
Barij (Ba)	mg/l	< 0,025	0,700	da
Cink (Zn)	mg/l	0,050	3	da
Kadmij (Cd)	mg/l	< 0,0015	0,005	da
Krom (Cr; ukupni)	mg/l	< 0,025	0,050	da
Krom (VI)	mg/l	< 0,010	-	
Kalcij (Ca)	mg/l	63,3	-	
Kalij (K)	mg/l	5,47	12	da
Magnezij (Mg)	mg/l	36,6	-	
Mangan (Mn)	mg/l	< 0,025	0,050	da
Natrij (Na)	mg/l	13,1	200	da

Ukupna tvrdoća	mg/l	301	-	
Nikal (Ni)	mg/l	0,060	-	
Olovo (Pb)	mg/l	< 0,010	0,010	da
Selen (Se)	mg/l	< 0,010	0,010	da
Željezo (Fe)	mg/l	< 0,025	0,200	da
Živa (Hg; ukupna)	mg/l	< 0,001	0,001	da
Fluoridi otopljeni	mg/l	0,113	1,5	da
*Kloridi	mg/l	23,1	250	da
*Sulfati	mg/l	8,72	250	da
Ukupni fosfor	mg/l	< 0,050	-	
*Ortofosfati	mg/l	< 0,010	0,300	da
Ukupni dušik	mg/l	2,97	-	
*Amonij	mg NH <sub>4</sub> /l	0,018	0,5	da
Nitrati	mg NO <sub>2</sub> /l	13,6	50	da
*Nitriti	mg NO <sub>2</sub> /l	< 0,010	0,50	da
Ukupni cijanidi	mg/l	< 0,010	0,050	da

b) Kemijski sastav podzemne vode uzorkovane sjeverno od odlagališta otpada Trebež (uzorak 2).

Parametar	Jedinica mjere	Rezultat	MDK	Odgovara
Ukupni koliformi	cfu/ml	0	0	da
Boja	-	0	20	da
Temperatura	°C	12,5	25	da
*Elektrovodljivost	μS/cm	774	2500	da
*Otopljeni kisik	mg O <sub>2</sub> /l	1,30	-	
*pH		7,25	6,5 – 9,5	da
Zasićenje kisikom	%	13,5	-	
*Suspendirane tvari	mg/l	14	-	
*BPK	mg O <sub>2</sub> /l	< 6	-	
*KPK	mg O <sub>2</sub> /l	< 15	-	
Ukupni ugljikovodici	μg/l	< 20	50	da
TOC/DOC	mg/l	1,88	-	
*Teško hlapljive lipofilne tvari (ukupna ulja i masti)	mg/l	< 0,10	-	
Fenoli	mg/l	< 0,050	-	da
α-HCH	μg/l	< 0,025	0,1	da
β-HCH	μg/l	< 0,025	0,1	da
γ-HCH (Lindan)	μg/l	< 0,025	0,1	da
δ-HCH	μg/l	< 0,025	0,1	da
2,4-DDT	μg/l	< 0,025	0,1	da
4,4-DDD	μg/l	< 0,025	0,1	da
4,4,-DDE	μg/l	< 0,025	0,1	da
4,4-DDT	μg/l	< 0,025	0,1	da
Lakohlapivi klorirani ugljikovodici (ukupno)	mg/l	< 0,001	-	da
1,1,1,2-tetrakloretan	mg/l	< 0,001	-	
1,1,1-trikloretan	mg/l	< 0,001	-	
1,1,2,2-tetrakloretan	mg/l	< 0,001	-	
1,1,2-trikloretan	mg/l	< 0,001	-	

1,1-dikloreten	mg/l	< 0,001	-	
1,1-dikloreten	mg/l	< 0,001	-	
1,2,3-triklorpropan	mg/l	< 0,001	-	
1,2-dibromometan	mg/l	< 0,001	-	
1,2-dikloreten	mg/l	< 0,001	-	
1,2-diklorpropan	mg/l	< 0,001	-	
2,2-diklorpropan	mg/l	< 0,001	-	
Bromodiklorometan	mg/l	< 0,001	-	
cis-1,3-diklorpropen	mg/l	< 0,001	-	
Dibromklorometan	mg/l	< 0,001	-	
Dibromometan	mg/l	< 0,001	-	
Diklorometan	mg/l	< 0,001	-	
HCBD	mg/l	< 0,001	-	
Kloroform	mg/l	< 0,001	-	
Tetrakloreten	mg/l	< 0,001	0,010	da
Tetraklorometan	mg/l	< 0,001	0,010	da
trans-1,2-dikloreten	mg/l	< 0,001	-	
trans-1,3-diklorpropen	mg/l	< 0,001	-	
Trikloreten	mg/l	< 0,001	-	
Arsen (As; ukupni)	mg/l	0,013	0,010	ne
Bakar (Cu)	mg/l	< 0,025	2	da
Barij (Ba)	mg/l	< 0,025	0,700	da
Cink (Zn)	mg/l	0,065	3	da
Kadmij (Cd)	mg/l	< 0,0015	0,005	da
Krom (Cr; ukupni)	mg/l	< 0,025	0,050	da
Krom (VI)	mg/l	< 0,010	-	
Kalcij (Ca)	mg/l	57,9	-	
Kalij (K)	mg/l	2,87	12	da
Magnezij (Mg)	mg/l	40,5	-	
Mangan (Mn)	mg/l	0,071	0,050	ne
Natrij (Na)	mg/l	7,04	200	da
Ukupna tvrdoća	mg/l	311	-	
Nikal (Ni)	mg/l	0,061	-	



Olovo (Pb)	mg/l	< 0,010	0,010	da
Selen (Se)	mg/l	< 0,010	0,010	da
Željezo (Fe)	mg/l	0,034	0,200	da
Živa (Hg; ukupna)	mg/l	0,014	0,001	ne
Fluoridi otopljeni	mg/l	0,227	1,5	da
*Kloridi	mg/l	17,4	250	da
*Sulfati	mg/l	18,5	250	da
Ukupni fosfor	mg/l	< 0,050	-	
*Ortofosfati	mg/l	< 0,010	0,300	da
Ukupni dušik	mg/l	0,361	-	
*Amonij	mg NH <sub>4</sub> /l	0,063	0,5	da
Nitrati	mg NO <sub>2</sub> /l	0,80	50	da
*Nitriti	mg NO <sub>2</sub> /l	< 0,010	0,50	da
Ukupni cijanidi	mg/l	< 0,010	0,050	da

c) Kemijski sastav podzemne vode uzorkovane istočno od odlagališta otpada Trebež (uzorak 3).

Parametar	Jedinica mjere	Rezultat	MDK	Odgovara
Ukupni koliformi	cfu/ml	0	0	da
Boja	-	0	20	da
Temperatura	°C	12,0	25	da
*Elektrovodljivost	μS/cm	634	2500	da
*Otopljeni kisik	mg O <sub>2</sub> /l	1,42	-	
*pH		7,34	6,5 – 9,5	da
Zasićenje kisikom	%	14,3	-	
*Suspendirane tvari	mg/l	6	-	
*BPK	mg O <sub>2</sub> /l	< 6	-	
*KPK	mg O <sub>2</sub> /l	< 15	-	
Ukupni ugljikovodici	μg/l	< 20	50	da
TOC/DOC	mg/l	2,92	-	
*Teško hlapljive lipofilne tvari (ukupna ulja i masti)	mg/l	< 0,10	-	
Fenoli	mg/l	< 0,050	-	da
α-HCH	μg/l	< 0,025	0,1	da
β-HCH	μg/l	< 0,025	0,1	da
γ-HCH (Lindan)	μg/l	< 0,025	0,1	da
δ-HCH	μg/l	< 0,025	0,1	da
2,4-DDT	μg/l	< 0,025	0,1	da
4,4-DDD	μg/l	< 0,025	0,1	da
4,4,-DDE	μg/l	< 0,025	0,1	da
4,4-DDT	μg/l	< 0,025	0,1	da
Lakohlapivi klorirani ugljikovodici (ukupno)	mg/l	< 0,001	-	da
1,1,1,2-tetrakloretan	mg/l	< 0,001	-	
1,1,1-trikloretan	mg/l	< 0,001	-	
1,1,2,2-tetrakloretan	mg/l	< 0,001	-	
1,1,2-trikloretan	mg/l	< 0,001	-	

1,1-dikloreten	mg/l	< 0,001	-	
1,1-dikloreten	mg/l	< 0,001	-	
1,2,3-triklorpropan	mg/l	< 0,001	-	
1,2-dibromometan	mg/l	< 0,001	-	
1,2-dikloreten	mg/l	< 0,001	-	
1,2-diklorpropan	mg/l	< 0,001	-	
2,2-diklorpropan	mg/l	< 0,001	-	
Bromodiklorometan	mg/l	< 0,001	-	
cis-1,3-diklorpropen	mg/l	< 0,001	-	
Dibromklorometan	mg/l	< 0,001	-	
Dibromometan	mg/l	< 0,001	-	
Diklorometan	mg/l	< 0,001	-	
HCBD	mg/l	< 0,001	-	
Kloroform	mg/l	< 0,001	-	
Tetrakloreten	mg/l	< 0,001	0,010	da
Tetraklorometan	mg/l	< 0,001	0,010	da
trans-1,2-dikloreten	mg/l	< 0,001	-	
trans-1,3-diklorpropen	mg/l	< 0,001	-	
Trikloreten	mg/l	< 0,001	-	
Arsen (As; ukupni)	mg/l	< 0,007	0,010	da
Bakar (Cu)	mg/l	< 0,025	2	da
Barij (Ba)	mg/l	< 0,025	0,700	da
Cink (Zn)	mg/l	0,077	3	da
Kadmij (Cd)	mg/l	< 0,0015	0,005	da
Krom (Cr; ukupni)	mg/l	< 0,025	0,050	da
Krom (VI)	mg/l	< 0,010	-	
Kalcij (Ca)	mg/l	68,0	-	
Kalij (K)	mg/l	5,47	12	da
Magnezij (Mg)	mg/l	33,6	-	
Mangan (Mn)	mg/l	0,064	0,050	ne
Natrij (Na)	mg/l	45,2	200	da
Ukupna tvrdoća	mg/l	308	-	
Nikal (Ni)	mg/l	0,042	-	

Olovo (Pb)	mg/l	< 0,010	0,010	da
Selen (Se)	mg/l	< 0,010	0,010	da
Željezo (Fe)	mg/l	0,033	0,200	da
Živa (Hg; ukupna)	mg/l	< 0,001	0,001	da
Fluoridi otopljeni	mg/l	0,238	1,5	da
*Kloridi	mg/l	48,7	250	da
*Sulfati	mg/l	< 1,0	250	da
Ukupni fosfor	mg/l	< 0,050	-	
*Ortofosfati	mg/l	< 0,010	0,300	da
Ukupni dušik	mg/l	1,14	-	
*Amonij	mg NH <sub>4</sub> /l	0,966	0,5	ne
Nitrati	mg NO <sub>2</sub> /l	< 0,10	50	da
*Nitriti	mg NO <sub>2</sub> /l	< 0,010	0,50	da
Ukupni cijanidi	mg/l	< 0,010	0,050	da

Analitičari: Tomislav Pešo dr.vet.med. i Mario Ančić dipl.ing.biol

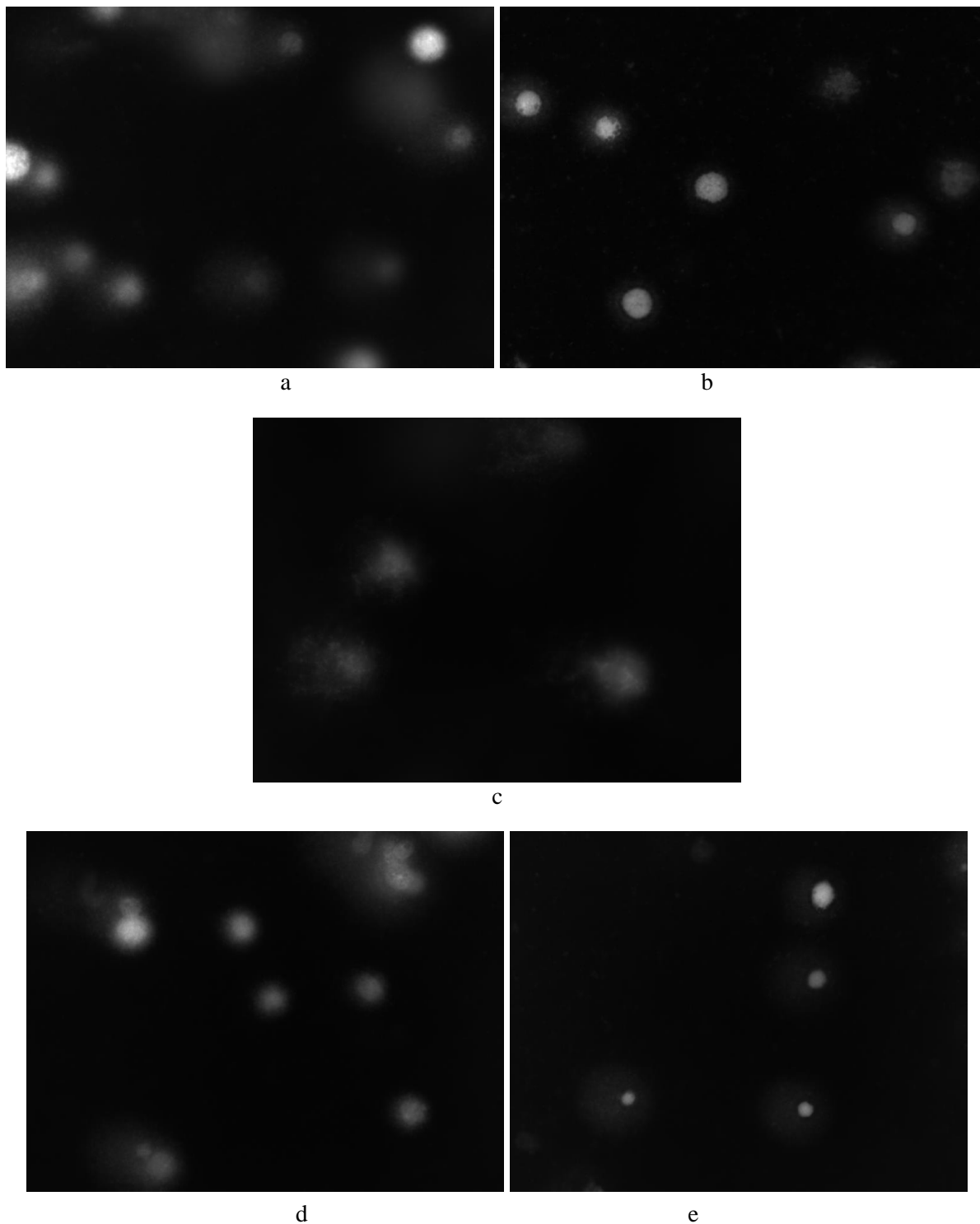
- = analit nije pronađen u koncentraciji većoj od granice određivanja (GO)

MDK=maksimalno dopuštena količina

Mjerena nesigurnost (U) izražava se samo za rezultat veći od MDK

\* Metode obuhvaćene područjem akreditacije

**Prilog 3.** Slike stanica CaCo2 gledanih pod epifluorescencijskim mikroskopom (komet test).



CaCo2 stanice izložene djelovanju podzemnih voda:

a) uzorak 1, koncentracija 2,5x;

b) uzorak 2, koncentracija 0,1x;

c) uzorak 3, koncentracija 0,1x;

d) negativna kontrola (netretirane stanice);

e) pozitivna kontrola (stanice izložene djelovanju vodikovog peroksida).