



Sveučilište u Zagrebu

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

Mario Ančić

**BIOLOŠKI UČINAK PODZEMNIH I
PROCJEDNIH VODA S ODLAGALIŠTA
OTPADA MRACLINSKA DUBRAVA**

DISERTACIJA

ZAGREB, PROSINAC, 2019



Sveučilište u Zagrebu

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

Mario Ančić

**BIOLOŠKI UČINAK PODZEMNIH I
PROCJEDNIH VODA S ODLAGALIŠTA
OTPADA MRACLINSKA DUBRAVA**

DISERTACIJA

Mentor:

prof.dr.sc. Ksenija Durgo

ZAGREB, PROSINAC, 2019



Sveučilište u Zagrebu

FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

Mario Ančić

**BIOLOGICAL EFFECT OF GROUND WATER
AND LEACHATE FROM LANDFILL
MRACLINSKA DUBRAVA**

DOCTORAL THESIS

Supervisors:

Ksenija Durgo, PhD

ZAGREB, DECEMBER, 2019

Rad je izrađen u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Jedinici za mutagenezu Instituta za medicinska istraživanja u Zagrebu i odjelu za Ekologiju okoliša laboratorija Euroinspekt Croatiakontrola d.o.o., Zagreb.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Sveučilišni poslijediplomski studij Biotehnologija i bioproceno inženjerstvo

UDK: 351.777.613:556.315(497.5)(043.3)

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Disertacija

BIOLOŠKI UČINAK PODZEMNIH I PROCJEDNIH VODA S ODLAGALIŠTA OTPADA MRACLINSKA DUBRAVA

Mario Ančić, dipl. ing.

Rad je izrađen na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

Mentor: prof. dr. sc. Ksenija Durgo

Kratki sažetak: Odlagališta otpada predstavljaju globalni problem. Cilj istraživanja bio je provesti fizikalno-kemijska i biološka ispitivanja procjedne i podzemne vode uzorkovane uzvodno i nizvodno od odlagališta neopasnog otpada tijekom različitih godišnjih doba kako bi se utvrdio utjecaj odlagališta otpada na okoliš te procjenio rizik za ekosustav. Rezultati toksikoloških ispitivanja su u skladu s fizikalno-kemijskim analizama kojima je utvrđeno da tijekom ljetnih mjeseci, zbog intenzivnije degradacije i visokih temperatura, u procjednoj vodi su prisutne veće koncentracije različitih štetnih tvari. Podzemna voda uzorkovana uzvodno i nizvodno od odlagališta nije pokazala statistički značajan (geno)toksični učinak. Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti da je navedeno odlagalište funkcionalno, trenutno ne predstavlja opasnost za ekosustav, a rezultati analiza mogli bi poslužiti kao referentne vrijednosti za ostala odlagališta u RH.

Broj stranica: 101

Broj slika: 16

Broj tablica: 23

Broj literaturnih navoda: 134

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: Odlagalište otpada, podzemna voda, procjedna voda, fizikalno-kemijske analize, genotoksičnost

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. prof. dr. sc. Tibela Landeka Dragičević, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2. prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu

3. dr. sc. Nevenka Kopjar, znan.savj., Institut za medicinska istraživanja, Sveučilište u Zagrebu

4. prof. dr. sc. Blaženka Kos (zamjena), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Rad je pohranjen u: knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, Kačićeva 23;

Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb; Sveučilištu u Zagrebu, Trg Republike Hrvatske 14.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Ph.D. thesis

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Postgraduate study of Biotechnology and Bioprocess Engineering

UDK: 351.777.613:556.315(497.5)(043.3)

Scientific Area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

BIOLOGICAL EFFECT OF GROUND WATER AND LEACHATE FROM LANDFILL MRACLINSKA DUBRAVA

Mario Ančić, BSc

Thesis performed at Faculty of Food technology and Biotechnology, University of Zagreb

Supervisor: Ksenija Durgo PhD

Short abstract: Landfills are a global problem. The present study dealt with physico-chemical and biological evaluation of leachate and groundwater sampled upstream and downstream of the non-hazardous landfills during different seasons in order to determine the impact of landfills on the environment and assess the risk to the ecosystem. The results of toxicological tests are in accordance with the physicochemical analyzes, which revealed that during the summer months, due to more intense degradation and high temperatures, higher concentrations of various harmful substances are present in the leachate. Groundwater sampled upstream and downstream of the landfill did not show a statistically significant (geno) toxic effect. According to the obtained results, it can be concluded that the landfill is functional, does not present any danger to the ecosystem, and the results of the analyzes could serve as benchmarks for other landfills in the Republic of Croatia.

Number of pages: 101

Number of figures: 16

Number of tables: 23

Number of references: 134

Original in: Croatian

Keywords: Landfill, Groundwater, Leachate, Physico-chemical analysis, Genotoxicity

Date of the thesis defense: 18.01.2018.

Reviewers:

1. PhD Tibela Landeka Dragičević, Full Professor, Faculty of food technology and biotechnology, University of Zagreb
2. PhD Ivana Radojčić Redovniković, Full Professor, Faculty of food technology and biotechnology, University of Zagreb
3. PhD Nevenka Kopjar, scientific advisor, Institute for medicinal research, Zagreb
4. PhD Blaženka Kos, Full Professor, Faculty of food technology and biotechnology, University of Zagreb

Thesis is deposited in: Library of Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23;

National and University Library, Hrvatske bratske zajednice bb; University of Zagreb, Trg Republike Hrvatske 14.

Fakultetsko vijeće Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu prihvatilo jetemu ovog doktorskog rada pod naslovom „Biološki učinak podzemnih i procjednih voda s odlagališta otpada Mraclinska dubrava“ temeljem izvješća Povjerenstva za ocjenu teme i imenovanje mentora na sjednici održanoj 22. studenog 2016., a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je odluku o odobravanju pokretanja postupka stjecanja doktorata znanosti na sjednici održanoj 14. veljače 2017. godine.

Sažetak: **BIOLOŠKI UČINAK PODZEMNIH I PROCJEDNIH VODA S
ODLAGALIŠTA OTPADA MRACLINSKA DUBRAVA**

Odlagališta otpada predstavljaju globalni problem, pogotovo u zemljama u razvoju u kojima zbog nedostatka sredstava nije proveden postupak odvajanja i obrade otpada. Cilj istraživanja bio je uzorkovati procjednu i podzemnu vodu uzvodno i nizvodno od odlagališta neopasnog otpada tijekom različitih godišnjih doba i provesti fizikalno-kemijska i biološka ispitivanja kako bi se utvrdila moguća opasnost za ekosustav. Potencijalno citotoksično, prooksidativno i mutageno djelovanje procjedne i podzemne vode ispitano je na HEP2 staničnoj liniji. Procjedne vode s odlagališta uzrokovale su genotoksični učinak i imale su povišeni pH, kemijsku potrošnju kisika (KPK), biokemijsku potrošnju kisika (BPK) i povišene koncentracije fosfora, klorida, dušikovih spojeva i sulfata. Genotoksični učinak procjedne vode bio je veći kod uzoraka uzetih tijekom toplih i suhih mjeseci. Rezultati toksikoloških ispitivanja su u skladu s fizikalno-kemijskim analizama kojima je utvrđeno da tijekom ljetnih mjeseci, zbog intenzivnije degradacije i visokih temperatura, u procjednoj vodi su prisutne veće koncentracije različitih štetnih tvari. Podzemna voda uzorkovana hidrološki uzvodno i hidrološki nizvodno od odlagališta nije pokazala statistički značajan (geno)toksični učinak. Kemijske analize su otkrile da su koncentracije štetnih tvari ispod maksimalno dopuštenih koncentracija. Postupak pročišćavanja procjedne vode na odlagalištu je učinkovit i tvari koje dospiju u podzemne vode ne predstavljaju toksikološku opasnost. Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti da je navedeno odlagalište funkcionalno, trenutno ne predstavlja opasnost za ekosustav, a rezultati analiza mogli bi poslužiti kao referentne vrijednosti za ostala odlagališta u RH.

Ključne riječi: Odlagalište otpada, podzemna voda, procjedna voda, HEP2, fizikalno-kemijske analize, genotoksičnost.

Abstract: **BIOLOGICAL EFFECT OF GROUND WATER AND LEACHATE FROM LANDFILL MRACLINSKA DUBRAVA**

Waste landfills represent a global problem, which is more pronounced in developing countries because of the lack of resources to implement procedures that include separation and waste processing. The aim of this research was to analyze leachate and ground waters samples at the site, upstream and downstream from the landfill during different year seasons on a registered non-hazardous waste dump and to conduct physico-chemical and biological assays to determine potential risk for the ecosystem. Potential cytotoxic, prooxidative and mutagenic effects of leachates and groundwater samples were evaluated on human laryngeal cell line (HEp2). Leachates collected at landfill site caused genotoxic effect and had a higher pH, chemical oxygen demand (COD), biochemical oxygen demand (BOD) and elevated concentrations of phosphorus, chloride, nitrogen compounds and sulphate. Genotoxicity of the leachate was increased in samples collected in dry and warm period of the year. These results are in accordance to the physicochemical analysis which revealed that during summer period, because of intense degradation process at high temperatures increased concentrations of different chemicals can be found in leachate. Groundwater collected downstream and upstream from landfill did not show statistically significant (geno)toxic effect, irrespective of the sampling season. Chemical analysis revealed that all compounds in groundwater were below permitted values. Purification process at landfill is effective and compounds that reach groundwater do not represent a toxicological threat. Based on the results achieved, it can be concluded that this landfill is functional, does not present any danger to ecosystems, and the results of the analysis can serve as benchmarks for other landfills in the Republic of Croatia.

Keywords: Landfill, Groundwater, Leachate, HEp2, Physico-chemical analysis, Genotoxicity

ZAHVALA

Zahvala mentorici dr. sc. Kseniji Durgo na pomoći istrpljenju pri pisanju ove disertacije, dr. sc. Nevenki Kopjar i njenim kolegama s IMI-a na suradnji tijekom izrade disertacije, roditeljima, obitelji, prijateljima i kolegama na podršci tijekom svih ovih godina.

Hvala mojim curama što su probdjele sa mnom mnoge noći, bez vas ovo ne bi imalo smisla.

SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
2. Teorijski dio.....	3
2.1. Otpad.....	3
2.1.1. Komunalni otpad.....	3
2.1.2. Proizvodni otpad.....	5
2.2. Odlagalište otpada.....	5
2.2.1. Odlagalište neopasnog otpada Mraclinska dubrava.....	6
2.3. Procjedna voda.....	6
2.3.1. Pročišćavanje procjednih voda.....	7
2.4. Kontrola utjecaja odlagališta na okoliš – hrvatska legislativa.....	8
2.5. Toksikološki i genotoksični učinak procjednih voda.....	9
2.5.1. Oksidativni stres.....	10
2.5.2. Lipidna peroksidacija.....	11
2.6. Citotoksičnost.....	12
2.7. Genotoksičnost.....	13
2.7.1. Ames test.....	13
2.7.2. Komet test.....	14
3. Materijal i metode.....	16
3.1. Materijal.....	16
3.1.1. Procjedna voda odlagališta Mraclinska Dubrava i podzemna voda hidrološki uzvodno i hidrološki nizvodno od odlagališta otpada.....	16
3.1.2. Kemikalije.....	18
3.1.2.1. Ispitivanje fizikalno-kemijskih pokazatelja.....	18
3.1.3. Otopine.....	22
3.1.3.1. Otopine korištene za određivanje režima kisika.....	22
3.1.3.2. Otopine korištene za određivanje hranjivih soli.....	25
3.1.3.3. Otopine korištene za određivanje aniona i kationa.....	26
3.1.3.4. Otopine Otopine korištene za određivanje teških metala.....	28
3.1.4. Podloge za uzgoj bakterije <i>Salmonella typhimurium</i>	28
3.1.5. Otopine korištene za provođenje Ames-ovog testa.....	29
3.1.6. Otopine korištene za provođenje testa citotoksičnosti.....	31
3.1.7. Otopine korištene za provođenje testa prooksidativnog djelovanja.....	32
3.1.8. Otopine korištene za provođenje testa lipidne peroksidacije.....	32
3.1.9. Otopine korištene za provođenje komet testa.....	33
3.1.10. Biološki test sustavi za utvrđivanje genotoksičnih učinaka.....	34
3.1.11. Oprema.....	35
3.2. Metode.....	37
3.2.1. Metode fizikalno-kemijskih ispitivanja.....	37
3.2.2. Određivanje fizikalnih pokazatelja.....	38
3.2.2.1. Određivanje pH i električne vodljivosti.....	38
3.2.2.2. Gravimetrijsko određivanje ostatka sušenjem i suspendirane tvari... ..	38
3.2.2.3. Određivanje režima kisika.....	38
3.2.2.4. Spektrofotometrijske analize hranjivih tvari, aniona i kation.....	39
3.2.2.5. Titrimetrijske analize.....	40
3.2.2.6. Analize teških metala na AAS s grafitnom peći.....	41
3.2.3. Priprema podloga za uzgoj bakterija <i>Salmonella typhimurium</i> i S9 smjese..	41
3.2.4. Uzgoj bakterije <i>Salmonella typhimurium</i> iz pohranjene bakterijske kulture	42
3.2.5. Kultivacija HEP2 stanične linije i priprema stanične suspenzije.....	42

3.2.6. Analiza genetičkih karakteristika Amesovih sojeva.....	42
3.2.7. Određivanje točkastih mutacija procjedne i podzemnih voda na bakterijskom test sustavu <i>Salmonella Typhimurium</i>	43
3.2.8. Određivanje citotoksičnog učinka procjedne i podzemne vode na HEp2 staničnoj liniji.....	44
3.2.9. Određivanje prooksidativnog učinka procjedne i podzemne vode na HEp2 staničnoj liniji.....	45
3.2.10. Određivanje lipidne peroksidacije procjedne i podzemne vode na HEp2 staničnoj liniji.....	46
3.2.10.1. Određivanje TBA-MDA kompleksa u uzorcima.....	46
3.2.10.2. Određivanje koncentracije proteina po Bradfordu.....	47
3.2.11. Određivanje jednolančanih i dvolančanih lomova izazvanih procjednom i podzemnim vodama na HEp2 staničnoj liniji.....	47
3.3. Statistička obrada rezultata.....	47
4. Rezultati.....	48
4.1. Kemijski sastav procjedne i podzemne vode.....	48
4.2. Citotoksični učinak procjedne i podzemnih voda na staničnu liniju HEp2 metodom neutral red.....	55
4.3. Indukcija slobodnih radikala podzemnim i procjednim vodama na staničnoj liniji HEp2 metodom diklorofluorescin-diacetat.....	58
4.4. Učinak procjedne i podzemnih voda na lipidnu perooksidaciju na staničnoj liniji HEp2 TBARS metodom.....	60
4.5. Točkaste mutacije izazvane procjednom i podzemnim vodama na bakterijskom sustavu <i>Salmonella typhimurium</i>	64
4.6. Kromosomske mutacije izazvane procjednom i podzemnim vodama na HEp2 staničnoj liniji komet testom.....	73
5. Rasprava.....	77
6. Zaključak.....	88
7. Literatura.....	90

1. UVOD

Odlagališta otpada predstavljaju globalni problem, koji je izraženiji u zemljama u razvoju jer zbog nedostatka sredstava za provedbu edukacije stanovništva i implementaciju sustava odvojenog prikupljanja otpada u komunalni otpad biva odbačena velika količina opasnog otpada, biorazgradivog otpada i otpada koji se može oporabiti, te koristiti kao sekundarna sirovina. Pošto odlaganje otpada predstavlja najjednostavniji i najjeftiniji način zbrinjavanja otpada, kako u razvijenim tako i u nerazvijenim zemljama svijeta (Barret i Lawlor, 1995), odlagališta otpada predstavljaju globalni ekološki problem.

Zbog potencijalne opasnosti za okoliš, koju predstavlja ovakav način postupanja s otpadom, Republika Hrvatska propisala je dva cilja vezana uz odlaganje otpada na odlagalištima. Prvi cilj je da se količina ukupno odloženog otpada na odlagališta smanji, a drugi da se udio biorazgradivog otpada u ukupnom otpadu smanji (Zakon o gospodarenju otpadom, NN 94/13). U Hrvatskoj je tijekom 2018. godine na 127 aktivnih odlagališta odloženo 1.638.599 tona otpada što je 9,7% manje nego u 2017. godini kada je odloženo 1.814.539 tona (MZOE, Pregled podataka o odlaganju i odlagalištima otpada za 2018. godinu).

Cilj ove doktorske disertacije je: odrediti fizikalno-kemijski sastav procjedne i podzemne vode odlagališta neopasnog otpada Mraclinska Dubrava, te utvrditi citotoksično, prooksidativno i mutageno djelovanje procjednih i podzemnih voda s odlagališta neopasnog otpada Mraclinska Dubrava. Na temelju provedenih istraživanja i dobivenih rezultata donijeti zaključke o mogućem sinergističkom utjecaju različitih razmatranih kontaminanata potencijalno prisutnih u podzemnoj i procjednoj vodi i mogućem učinku na ljude koji žive u blizini odlagališta, te postaviti referentne vrijednosti za daljnja slična istraživanja na drugim odlagalištima u Republici Hrvatskoj. Također, cilj ovog rada je provjeriti učinkovitost brtvenih i drenažnih slojeva odlagališta.

Kako bi se ostvarili zadani ciljevi istraživanja i procijenio utjecaj odlagališta na ekosustav rad je obuhvatio:

- Određivanje koncentracija fizikalno-kemijskih pokazatelja i potencijalnih kontaminanata
- Praćenje određenih pokazatelja toksičnosti, genotoksičnosti, citotoksičnosti i mutagenosti: broj induciranih revertanata sojeva TA98 i TA100 bakterije *Salmonella typhimurium* (Ames test), indukcija slobodnih radikala (ROS) u stanicama Hep2

stanične linije, indukcija kompleksa malondialdehid-tiobarbiturna kiselina MDA-TBA (lipidna peroksidacija), te kromosomska oštećenja (komet test)

2. TEORIJSKI DIO

2.1 OTPAD

Prema Zakonu o održivom gospodarenju otpadom (NN 94/13) otpad je svaka tvar ili predmet koji posjednik odbacuje, namjerava ili mora odbaciti. Otpadom se smatra i svaki predmet i tvar čije su sakupljanje, prijevoz i obrada nužni u svrhu zaštite javnog interesa. Prema podacima iz plana gospodarenja otpadom Republike Hrvatske, (NN 3/2017) u 2014. godini ukupne evidentirane količine proizvedenog otpada (komunalnog i proizvodnog) iznosile su oko 3,7 milijuna tona što je za 10,5% više u odnosu na 2012. godinu.

2.1.1 Komunalni otpad

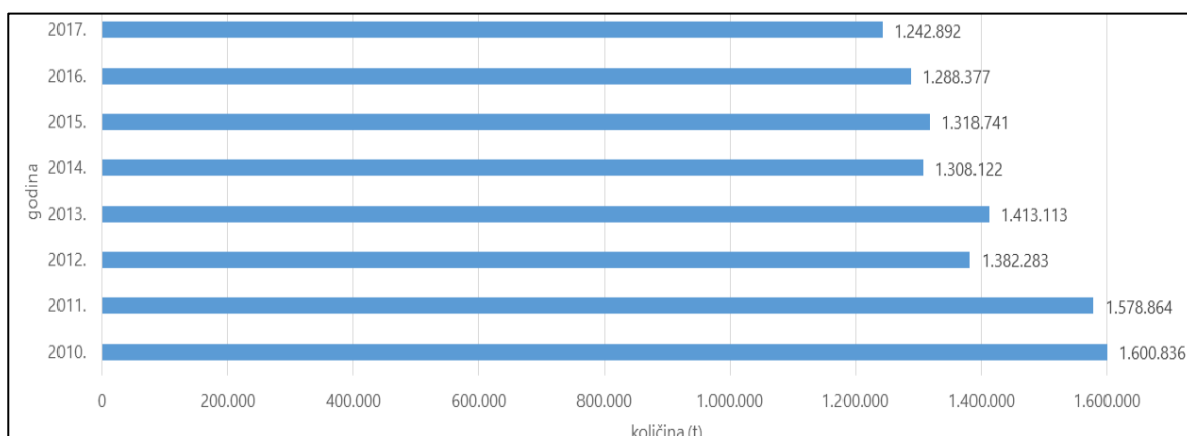
U komunalni otpad spada sav otpad koji je nastao u kućanstvu i otpad koji je po prirodi i sastavu sličan otpadu iz kućanstava, a ne uključuje proizvodni otpad i otpad iz poljoprivrede i šumarstva, a najveći dio (preko 70%) čini miješani komunalni otpad ključnog broja KB 20 03 01 (HAOP, Izvješće o komunalnom otpadu za 2017. godinu). Postotni sastav miješanog komunalnog otpada prikazan je u tablici 1.

Tablica 1. Sastav miješanog komunalnog otpada, KB 20 03 01 (HAOP, Metodologija za određivanje sastava i količina komunalnog odnosno miješanog komunalnog otpada)

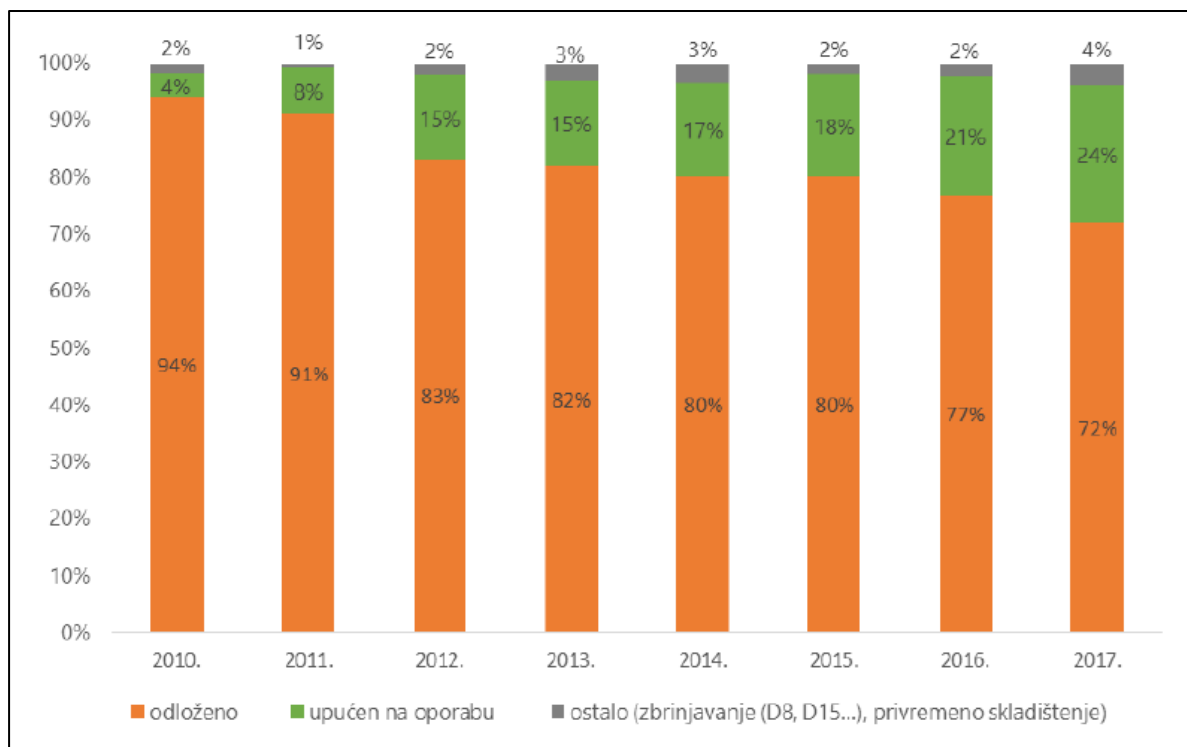
Sastavnica	Udio (%)
Kuhinjski otpad	30,9
Papir i karton	23,2
Plastika	22,9
Vrtni otpad	5,7
Tekstil/odjeća	3,7
Staklo	3,7
Metal	2,1
Drvo	1,0
Koža/kosti	0,5
Guma	0,2
Ostali otpad	6,3

Prema dostupnim podacima za Republiku Hrvatsku od 1995. godine do 2017. godine vidljiv je porast količine proizvedenog komunalnog otpada sa 978.542 tona komunalnog otpada proizvedenog 1995. godine na 1.716.441 tona komunalnog otpada proizvedenog 2017. godine (HAOP, Izvješće o komunalnom otpadu za 2017. godinu). Od ukupne količine proizvedenog komunalnog otpada dio se odlaže na odlagališta otpada, dio se upućuje na uporabu, a dio zbrinjava na druge načine. Sukladno odredbama zakona o gospodarenju

otpadom (NN 94/13) cilj je smanjiti udio komunalnog otpada koji se odlaže na odlagalište, te umjesto odlaganja komunalnog otpada koristiti različite postupke oporabe. Tako se, usprkos rastu količine proizvedenog komunalnog otpada, količina komunalnog otpada koji se odlaže na odlagališta kontinuirano smanjuje (slika 1.), te se sukladno tome i udio odloženog komunalnog otpada u ukupnoj količini proizvedenog otpada smanjuje dok se udio komunalnog otpada upućenog na uporabu povećava (slika 2.).



Slika 1. Količina odloženog komunalnog otpada za razdoblje od 2010. godine do 2017. godine (HAOP, Izvješće o komunalnom otpadu za 2017. godinu)



Slika 2. Udio postotaka odloženog komunalnog otpada i otpada upućenog na uporabu u ukupnoj količini otpada za 2014. godinu (HAOP, Izvješće o komunalnom otpadu za 2017. godinu)

2.1.2 Proizvodni otpad

Proizvodnim otpadom smatra se otpad koji nastaje u proizvodnom procesu u industriji, obrtu i drugim procesima, osim ostataka iz proizvodnih procesa koji se koriste u proizvodnom procesu istog proizvođača (NN 94/13). Prema dostupnim podacima za 2017. godinu (HAOP, Izvješće o podacima iz Registra onečišćavanja okoliša za 2017. godinu) ukupna prijavljena količina proizvodnog otpada u Republici Hrvatskoj iznosila je 1.869.789 tona, od kojih je 1.780.089 tona (95%) neopasni proizvodni otpad, a 89.699 tona (5%) opasni proizvodni otpad. Najveći udio proizvodnog otpada nastaje u procesima obrade drugih vrsta otpada u građevinama za gospodarenje otpadom i procesima obrade otpadnih voda u uređajima za pročišćavanje otpadnih voda (UPOV) (38%), te kao građevinski otpad (17%).

2.2 ODLAGALIŠTE OTPADA

Odlagalište otpada je građevina namijenjena odlaganju otpada na površinu ili pod zemlju (podzemno odlagalište) u svrhu kontroliranog i trajnog zbrinjavanja (Koelmel i sur., 2016). Ovisno o vrsti otpada koji se odlaže odlagališta se dijele na (NN 114/15):

- a) odlagalište inertnog otpada
- b) odlagališta neopasnog otpada
- c) odlagališta opasnog otpada

Kako bi se opasnost koju odloženi otpad predstavlja za okoliš svela na najmanju moguću mjeru svako odlagalište otpada mora imati učinkoviti brtveni sustav (brtveni slojevi), sustave odvodnje oborinskih i procjednih voda i sustav za otplinjavanje.

Brtveni sustav je dio odlagališta koji sprječava prodiranje oborinskih voda u tijelo odlagališta (pokrovni brtveni sustav), te istjecanje procjednih voda u okoliš (temeljni brtveni sustav). Izgrađeni su od kombinacije mineralnih i umjetnih materijala u više propusnih i nepropusnih slojeva. Efikasan temeljni brtveni sustav omogućit će da se nastala procjedna voda ne zadržava u tijelu odlagališta, nego da sustavom cijevi bude transportirana u sabirne bazene ili lagune iz kojih će se ovisno o tehničkim mogućnostima odlagališta vratiti na tijelo odlagališta (postupak recirkulacije) ili ispustiti u sustav pročištača otpadnih voda (Hrnčić, N., Hrnčić, M., 2011). Pokrovni brtveni sustav ima za funkciju spriječiti da oborinska voda s uređenih površina (zelene površine) dođe u doticaj s odloženim otpadom. Oborinska voda se sustavom

otvorenih ili zatvorenih kanala transportira u sabirne bazene i dalje se može koristiti u različitim tehnološkim procesima odlagališta ili se ispušta u okoliš (Hrnčić, N., Hrnčić, M., 2011).

2.2.1 Odlagalište neopasnog otpada Mraclinska Dubrava

Odlagalište otpada Mraclinska Dubrava nalazi se oko 7,5 km južno od centra grada Velike Gorice, 1,6 km od naselja Mraclin i 2 km od naselja Buševac. Prve naseljene kuće udaljene su oko 600 m od odlagališta. Lokacija odlagališta je omeđena s jedne strane kanalom Mrtvica i vodotokom Buna. S obzirom na navedene vodotoke, lokacija se nalazi neposredno uz nasip vodotoka Buna (zapadno) i od kanala Mrtvica (istočno) i nije smještena unutar granice vodozaštitne zone. Sa zapadne strane lokacije nalazi se asfaltna cesta prema naselju Mraclin s kojom je lokacija povezana makadamskom cestom dužine oko 600 m.

2.3 PROCJEDNE VODE

Otpad odložen na odlagalište pod utjecajem je atmosferskih prilika uslijed kojih dolazi do ispiranja organskih i anorganskih sastojaka otpada koje se prikupljaju u lagune na dnu odlagališta i tvore procjedne vode. Procjedne vode su kompleksna otopina organskih i anorganskih tvari koja nastaje procesima razgradnje, ispiranja i zbijanja krutog otpada odloženog na odlagalište (Kjeldsen i sur., 2002). Niski omjer biokemijske potrošnje kisika (BPK) i kemijske potrošnje kisika (KPK) ukazuje da su procjedne vode biološki slabo razgradive, te predstavljaju veliku opasnost ako dospiju u okoliš. U sastavu procjedne vode mogu se pronaći četiri različite skupine kontaminanata: otopljene organske tvari, anorganske makrokomponente, teški metali i ksenobiotičke organske tvari u koncentracijama koje mogu predstavljati opasnost za ekosustav (Christensen i sur., 2001).

Dva faktora koja određuju kvalitetu procjedne vode su: količina i sastav. Dok je volumen nastalih procjednih voda u izravnoj vezi s količinom padalina i prodiranju podzemnih voda u tijelo odlagališta (Renou i sur., 2008) sastav procjedne vode značajno varira između različitih odlagališta (Bolton i Evans, 1991). Utvrđeno je pet glavnih čimbenika koji utječu na sastav procjedne vode (Baig i sur., 1999; Christensen i sur., 2001; El-Fadel i sur., 2002; Harmsen, 1983; Nanny and Ratasuk, 2002; Rapti-Caputo and Vaccaro, 2006; Rodríguez i sur., 2004; Stegman and Ehrig, 1989), to su:

- 1) Klimatski i hidrogeološki čimbenici (padaline, prodiranje podzemne vode)

- 2) Metode odlaganja otpada i upravljanja odlagalištem (zbijanje otpada, vrsta pokrova, vegetacija)
- 3) Karakteristike odloženog otpada (veličina čestica, kemijski sastav, gustoća, biorazgradivost)
- 4) Procesi koji se odvijaju unutar tijela odlagališta (razgradnja organske tvari, nastajanje odlagališnog plina, razvijanje temperature)
- 5) Starost odlagališta

2.3.1 Pročišćavanje procjednih voda

Na uređenim odlagalištima otpada postoji funkcionalan sustav prikupljanja i obrade procjednih voda s ciljem uklanjanja organskih i anorganskih kontaminanata iz procjedne vode. Iz tijela odlagališta procjedna voda se drenažnim sustavom prikuplja i odvodi u lagune iz kojih odlazi u uređaj za pročišćavanje otpadnih voda (UPOV). Ovisno o vrsti uređaja, pročišćavanje se sastoji od fizikalnog, biološkog i/ili kemijskog tretmana procjedne vode, te nakon pročišćavanja procjedna voda na izlazu iz uređaja za pročišćavanje ima niže koncentracije kontaminanata od procjedne vode na ulazu u uređaj. Ukoliko su zadovoljeni granični kriteriji za maksimalno dopuštene koncentracije navedene u Pravilniku o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (NN 80/13) pročišćena procjedna voda može se bez opasnosti od zagađenja ispustiti u okoliš (Robinson i sur., 1992; Kurniawan i sur., 2006a, 2006b).

Na odlagalištu Mraclinska Dubrava proces pročišćavanja procjednih voda sastoji se od:

- 1) predobrade koja uključuje koagulaciju/flokulaciju i flotaciju
- 2) biološke obrade u aeracijskom bazenu s dubinskom aeracijom
- 3) membranskog bioreaktora (MBR) s uronjenim membranskim modulima s vakuum filtracijom.

Procjedna voda s tijela odlagališta sakuplja se u lagunu volumena 1500 m³ odakle se prepumpava u uređaj za pročišćavanje procjedne vode kapaciteta 25 m³/dan. Pročišćavanje procjedne vode započinje procesima koagulacije/flokulacije i flotacije. Za proces koagulacije koristi se željezov (III) klorid, a u procesu flokulacije koristi se anionski polielektrolit u prahu. Iz flotacijskog spremnika odvaja se mulj koji se odlaže u spremnik mulja na dehidrataciju, te se takav dehidrirani mulj dalje zbrinjava sukladno važećoj legislativi. Za regulaciju pH, tijekom procesa predobrade procjedne vode, dodaje se NaOH ili H₂SO₄ ovisno da li je procjedna voda u laguni lužnata ili kisela. Nakon završene predobrade procjedna voda se preko sustava međuspremnik i selektora volumena 1 m³ prepumpava u denitrifikacijski

spremnik (4 m³) i aeracijski spremnik (55 m³) u kojemu se odvija biološka obrada. Nakon završetka procesa biološke obrade manji volumen procjedne vode (do 1 m³) se vraća u selektor, a ostatak procjedne vode prolazi kroz membranske module. U kojima se provodi mikrofiltracija s veličinom pora 0,2 µm. Tako pročišćena procjedna voda odvodi se u spremnik efluenta, te se može vratiti na tijelo odlagališta ili zbrinuti na odgovarajući način (Nuić, B., 2008).

2.4 KONTROLA UTJECAJA ODLAGALIŠTA NA OKOLIŠ – HRVATSKA LEGISLATIVA

S ciljem kontrole utjecaja odlagališta otpada na okoliš Pravilnik o načinima i uvjetima odlaganja otpada, kategorijama i uvjetima rada za odlagališta otpada (NN 114/15, 103/18, 56/19) i Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (NN 80/13, 43/14, 27/15, 3/16) propisuju obavezu mjerenja i granične vrijednosti fizikalno-kemijskih pokazatelja procjednih i oborinskih voda odlagališta, te podzemnih i površinskih voda u neposrednoj blizini odlagališta. Pošto su odlagališta postrojenje u kojima se obavlja djelatnost koja može prouzročiti emisije kojima se onečišćuje tlo, zrak, vode i more, odlagališta moraju imati okolišnu dozvolu (Ministarstvo zaštite okoliša i energetike, 2019) u kojima će biti navedene mjerne postaje, učestalost ispitivanja i kriteriji prema kojima se provodi kontrola procjednih, podzemnih i površinskih voda. U 2018. godini od 127 aktivnih odlagališta u RH manje od polovice ima ishodovane okolišne dozvole, te su kod njih uspostavljeni obavezni mehanizmi kontrole utjecaja na okoliš.

Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (NN br. 80/13, 43/14, 27/15, 3/16) regulira područja ispitivanja procjednih voda i maksimalno dopuštene koncentracije za ispitivanje: fizikalnih pokazatelja (temperatura, pH, suspendirane tvari), ekotoksikoloških pokazatelja (toksičnost na *Daphnia magna*, toksičnost na svjetleće bakterije), organskih pokazatelja (BPK, KPK, TOC, ugljikovodici, AOX, BTEX, fenoli) i anorganskih pokazatelja (teških metali i hranjivih tvari). Mjerenjem navedenih pokazatelja kontrolira se da li dolazi do prodiranja procjednih voda u okoliš i kontrolira se utjecaj odlagališta na okoliš. Međutim dio pokazatelja koji se najčešće ne mjeri o procjednim, površinskim i podzemnim vodama, kao što su: poliklorirani bifenili (PCB), pesticidi, policiklički aromatski ugljikovodici (PAH), pentabromdifenileteri (PBDE), di(2-etilheksil)ftalat (DEHP) predstavljaju značajnu opasnost za okoliš i svakako bi bilo potrebno poznavati da li su navedeni pokazatelji prisutni u okolišu,

te da li odlagališta otpada predstavljaju potencijalni izvor točkastih zagađenja navedenim kontaminantima.

Ovisno o tehnici odlaganja otpada, izvedbi odlagališta, visini vodnog lica i geologiji tla procjedne vode mogu u različitoj mjeri prodirati u podzemlje, te ovisno o smjeru i brzini kretanja podzemnih voda biti rasprostranjene na velike udaljenosti od odlagališta (Mihovec-Grdić i sur., 2002; Nakić i sur., 2007). U do sada provedenim istraživanjima potvrđeno je da postoje dva glavna načina prodiranja procjednih voda u podzemlje (Foose i su., 2002; Katsumi i sur., 2001), to su: disperzivni transport kroz oštećenu geomembranu i kroz glineni sloj ispod geomembrane i difuzni transport organskih tvari kroz geomembranu i glineni sloj. Utvrđeno je da na svakih 10.000 m² geomembrane u prosjeku postoji 22,5 pukotina koje omogućavaju prolazak procjednih voda (Laine i Derilek, 1993.).

Pošto su odlagališta pozicionirana i u ruralnim područjima gdje stanovništvo koristi podzemnu vodu za piće i navodnjavanje postoji realna opasnost da, ako dođe do prodiranja procjedne vode u podzemlje, stanovnici u okolici odlagališta budu izloženi utjecaju štetnih tvari iz procjednih voda. Iz navedenih razloga postoji potreba za toksikološkim istraživanjem (određivanje točkastih i kromosomskih mutacija, određivanje citotoksičnog i prooksidativnog učinka, određivanje slobodnih radikala i lipidne peroksidacije) podzemnih voda u okolici odlagališta kako bi se utvrdio mogući sinergistički učinak različitih kontaminanata i posljedice kroničnog izlaganja kontaminantima na zdravlje ljudi (Mor i sur., 2006, Maqbool i sur. 2011, Widziewicz i sur., 2012)

2.5. TOKSIKOLOŠKI I GENOTOKSIČNI UČINAK PROCJEDNIH VODA

Raspoloživi podaci o utjecaju procjednih voda odlagališta otpada na ekosustav dolazi iz provedenih fizikalno-kemijskih analiza sastava procjednih voda. Međutim iz tih podataka, zbog kompleksne prirode procjednih voda i procesa koji se odvijaju unutar tijela odlagališta, je gotovo nemoguće predvidjeti njihov toksikološki učinak (Thomas i sur., 2009).

Brojni autori (Schrab i sur., 1993; Singh i sur., 2007, Renou i sur., 2008) su u istraživanjima dokazali toksikološki i genotoksični učinak procjednih voda koji može biti izravno izazvan prisutnošću kontaminanata kao što su teški metali, aromatski ugljikovodici, pesticidi i neizravan koji je uzrokovan metaboličkom aktivacijom ksenobiotika. Ksenobiotici su spojevi strani prirodi, načinjeni od čovjeka, koji mogu dospjeti u ljudski organizam, a nisu prirodno prisutni niti se proizvodi u njemu, te u organizmu mogu dovesti do formiranja sekundarnih

spojeva poput reaktivnih kisikovih vrsta koje mogu oštetiti stanične biomolekule (Renou i sur., 2008). Genotoksičnost procjedne vode prvo je dokazana upotrebom bakterijskih biotestova (*Salmonella typhimurium* - Ames test) (Schrab i sur., 1993; Singh i sur., 2007). Daljnja ispitivanja na različitim biljnim i životinjskim organizmima kao što su: vinska mušica *Drosophila melanogaster* (Siddique i sur., 2005), zlatna ribica *Carassius auratus* (Deguchi i sur., 2007), luk *Allium cepa* (Chandra i sur., 2005), račić *Artemia franciscana* (Olivero-Verbel i sur., 2008) su potvrdila genotoksični učinak procjedne vode koji je proporcionalan rastu koncentracije kontaminanata u procjednim vodama.

2.5.1. Oksidativni stres

Oksidativni stres je pomak ravnoteže u staničnim oksidativno-redukcijskim reakcijama u smjeru oksidacije. Do oksidativnog stresa dolazi uslijed prekomjernog stvaranja slobodnih kisikovih radikala (*engl. Reactive Oxygen Species, ROS*), koji se stvaraju većom brzinom nego se mogu razgraditi što za posljedicu ima oštećenje stanica. Slobodni radikali su molekule ili atomi koji u vanjskoj ljusci imaju jedan ili više nesparenih elektrona (Halliwell i Gutteridge, 1989). Zbog nesparenih elektrona dolazi do njihovog davanja ili uzimanja elektrona drugim molekulama te ih to čini izrazito nestabilnima i visoko reaktivnima, pri čemu reagiraju s organskim ili anorganskim spojevima (Anderson, 1996). Slobodni kisikovi radikali nastaju u redukcijsko-oksidacijskim reakcijama tijekom normalnih i patoloških fizioloških procesa poput oksidativne fosforilacije u mitohondrijima (Lee i Wei, 2000), prijenosu elektrona u sistemu citokroma P-450 u endoplazmatskom retikulumu (Fulton i sur., 1997), oksidacije masnih kiselina u peroksisomima (Crane i Masters, 1984), fagocitoze (Knight, 2000). Slobodni radikali mogu nastati i tijekom enzimatske oksidacije i autooksidacije različitih kemijskih spojeva poput tiola, oksihemoglobina, hidrokinona, kateholamina, pri čemu dolazi do redukcije molekularnog kisika i nastajanja superoksida (Halliwell, 2000).

Reaktivne kisikove vrste predstavljaju skupinu reaktivnih spojeva koji obuhvaćaju kisikove radikale poput superoksidnog aniona (O_2^-) koji nastaje redukcijom jednog elektrona molekule kisika. Iz superoksidnog aniona, u kiseloj sredini, vezanjem protona nastaje još reaktivniji perhidroksilni radikal (HO_2). Osim perhidroksilnog radikala uz pomoć enzima superoksid dismutaze (SOD), te vodikovih iona iz superoksidnog aniona može nastati vodikov peroksid (H_2O_2). Vodikov peroksid djeluje kao oksidans koji uz prisustvo prijelaznih metala, dvovalentnog iona željeza (Fe^{2+}) i jednovalentnog iona bakra (Cu^+), može prihvatiti jedan elektron stvarajući vrlo toksičan hidroksilni radikal (OH).

Prisutnost povećanih koncentracija različitih teških metala u procjednim vodama može rezultirati nastankom slobodnih kisikovih radikala što je i potvrđeno u brojnim istraživanjima. Nekoliko autora potvrdilo je toksičnost željeza (Prá i sur., 2008), cinka (Orieux i sur., 2011), bakra (Gabbianelli i sur., 2003), kroma (Trzeciak i sur., 2000), olova (García-Lestón i sur., 2011; Martínez-Alfaro i sur., 2012), i nikla (Cavallo i sur., 2003; Woz'niak, i sur., 2004) na kulturu ljudskih i animalnih stanica. Kod većine navedenih istraživanja glavni uzrok oštećenja DNA bio je nastanak slobodnih kisikovih radikala koji su uzrokovali oksidativna oštećenja stanica. Drugim riječima, oksidativni stres može se definirati kao oštećenje tkiva uvjetovano poremećajem ravnoteže prooksidativnog i antioksidativnoga sustava. Oksidacijsko oštećenje može utjecati na strukturu i funkciju brojnih biomolekula (polinezasićenih lipida, ugljikohidrata, proteina i nukleinskih kiselina) što rezultira promjenama u strukturi i funkciji stanica, tkiva i organa. Bhargava i sur. (2008) su utvrdili ekspresiju gena za hsp70 protein toplinskog šoka kao i povećanu aktivnost antioksidativnih enzima, te povišene koncentracije produkata lipidne peroksidacije nakon izlaganja vrste *Drosophila melanogaster* procjednim vodama. Ovi rezultati su potvrdili pretpostavku da je osnovni mehanizam toksičnog učinka procjednih voda oksidacijsko oštećenje stanica uzrokovano nastankom slobodnih radikala (Bhargava i sur., 2008).

2.1.6. Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija je složena lančana reakcija razgradnje višestruko nezasićenih masnih kiselina potaknuta djelovanjem reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta (Esterbauer i sur., 1991; Svingen i sur., 1978). Višestruko nezasićene masne kiseline, koje se nalaze u sastavu svih bioloških membrana, su osjetljive na oštećenja uzrokovana reaktivnim kisikovim vrstama. Pojava lipidne peroksidacije u biološkim membranama može dovesti do poremećaja funkcije i smanjene fluidnosti membrane što za posljedicu može imati oštećenje različitih organa. Li i sur. (2008) su u svojem istraživanju potvrdili negativne učinke procjednih voda na mozak i jetru miševa. Negativni učinci su se manifestirali na dva načina: preko lipidne peroksidacije i u promjenama oksidativnog stanja organizma izmjerenog preko koncentracija tiobarbiturata kao i preko povećanja antioksidativnih enzima (Cu, Zn superoksid dismutaze, Se-ovisne glutation peroksidaze i katalaze) čiji je nastanak potaknut povećanom koncentracijom slobodnih radikala.

Proces oksidacije lipida započinje fazom inicijacije (Blake i Winyard, 1995) u kojoj visoko reaktivni oksidans oduzima atom vodika višestruko nezasićenoj masnoj kiselini pri čemu nastaje alkilni, odnosno lipidni radikal. Hidroksilni radikal je jedini od reaktivnih kisikovih

radikala koji ima dovoljno energije da izazove lipidnu peroksidaciju (Porter, 1984). Ukoliko inicijacija nije kontrolirana obrambenim mehanizmima dolazi do lančane reakcije lipidne peroksidacije koja može dovesti do uništenja okolnih molekula. U procesu lipidne peroksidacije sudjeluju ioni željeza. Lipidni hidroperoksidi lako reagiraju s Fe^{2+} i Fe^{3+} pri čemu nastaju alkoksi radikali i lipidni peroksilni radikali. Tako dolazi do grananja lančane reakcije procesa lipidne peroksidacije (Armstrong, 1994; Aikens i Dix, 1991). Završni produkti lipidne peroksidacije su reaktivni aldehidi. To su 4-hidroksialkenali i drugi srodni α,β -nezasićeni aldehidi (Sies, 1991). Reaktivni aldehidi mogu u određenim uvjetima nastaviti lančanu reakciju oksidacijskog oštećenja. Njihova je reaktivnost niža od reaktivnosti slobodnih radikala, ali dovoljno velika da mogu reagirati s molekulama u okolini te tako oštetiti stanice ili uzrokovati staničnu smrt. Mogu se kretati i djelovati daleko od mjesta početnog nastanka slobodnih radikala, bilo intracelularno ili ekstracelularno (Esterbauer i sur., 1991).

2.6 CITOTOKSIČNOST

Citotoksičnost je sposobnost neke tvari da djeluje toksično na stanicu što za posljedicu ima različite negativne učinke na stanicu kao što su nekroza, apoptoza ili smanjenje preživljavanja stanica (Tülay, A.C., 2018). Stanice koje su izložene citotoksičnim supstancama mogu vrlo brzo izgubiti stanični integritet i umrijeti u procesu nekroze, proći postepeni programirani proces smrti stanice tijekom apoptoze ili izgubiti sposobnost rasta i dijeljenja kao posljedica smanjenog preživljavanja stanica .

U svrhu mjerenja citotoksičnosti tvari danas se koriste različiti testovi koji se većinom baziraju na procjeni postotka preživljavanja stanica upotrebom različitih boja, biomarkera ili mjerenjem sadržaja ATP-a. Pretpostavka je da umiruće stanice imaju narušeni integritet staničnih membrana što izaziva ispuštanje citoplazmatskih komponenti u medij koje se mogu izmjeriti ili se mijenja svojstvo membrane da propušta specifične spojeve (najčešće različite boje) u samu stanicu. Mjerenjem intenziteta obojenja moguće je definirati postotak preživljenja.

2.7 Genotoksičnost

Genotoksičnost je svojstvo neke tvari (genotoksina) da izaziva oštećenja na kromosomima ili DNA molekuli. Genotoksin može biti kancerogen, mutagen ili teratogen, a u većini slučajeva izazivaju mutacije koje dalje dovode do razvijanja karcinoma i drugih oblika bolesti (Shaily, 2012). Genotoksični spojevi se dijele na direktno djelujuće mutagene i promutagene. Promutageni/prokancerogeni kemijski agensi se metaboličkom aktivacijom, pomoću enzimskog sustava, transformiraju u reaktivne mutagene/kancerogene koji se tada vežu na nukleofilna mjesta u DNA (Shinohara i Cerutti, 1977).

S obzirom na strukturu DNA koje zahvaćaju mutacije mogu obuhvatiti jedan ili nekoliko parova baza (točkaste ili genske mutacije) i/ili dio gena, gen, dio kromosoma, cijeli kromosom i setove kromosoma (kromosomske mutacije).

Ovisno o načinu nastanka mutacije mogu biti spontane i inducirane. Inducirane mutacije mogu biti potaknute kemijskim spojevima, a s obzirom na vrstu kemijskih spojeva mutageni mogu biti:

- 1) Alkilirajući spojevi - procesom alkilacije, prijenos alkilne skupine s jedne molekule na drugu, narušavaju stanični integritet i mogu dovesti do smrti stanice.
- 2) Deaminirajući spojevi – procesom deaminacije, uklanjanjem amino skupine iz molekule, izazivaju hidrolitičko oštećenje DNA molekule.
- 3) Analози dušičnih baza – kemijski spojevi sličnog kemijskog sastava kao i DNA baze, ugrađuju se u DNA molekulu i krivo sparuju prilikom sljedeće replikacije.
- 4) Spojevi koji izazivaju nastajanje DNA adukta - adukti nastaju djelovanjem interkalirajućih agenasa koji se umeću u parove baza DNA. Takva interkalacija narušava strukturu DNA te dolazi do pogrešaka tijekom replikacije. Reichert i sur. su pokazali da je razina DNA adukta značajan faktor rizika za određene degenerativne lezije koje nastaju u histogenezi neoplazma jetre u ribi list uzete iz područja, estuarija Pudged Sound u Washingtonu, visoko kontaminiranog policikličkim aromatskim spojevima (Reichert i sur., 1988).
- 5) Spojevi koji oksidiraju DNA

2.7.1 Ames test

Ames test je široko prihvaćen bakterijski test za brzu identifikaciju supstanci koje mogu izazvati genska oštećenja, što vodi do genskih mutacija. Test je razvio Bruce Ames početkom 70-ih godina prošlog stoljeća. Svi sojevi bakterije *Salmonella typhimurium* konstruirani su iz

divljeg tipa LT-2 koji ima deleciju u galaktoznom operonu, pa ne može doći do sinteze lipopolisaharida koji sadrži galaktozu što sve sojeve čini slabo patogenima.

U ovom testu se koriste sojevi *Salmonella typhimurium* s postojećim mutacijama u histidinskom operonu koje ne mogu rasti ako u podlozi nema histidina jer u jednom od svojih gena nose mutaciju koja im onemogućuje biosintezu histidina. Nove mutacija na mjestu ili blizu mjesta postojeće mutacije mogu vratiti funkciju gena i omogućiti stanicama da opet sintetiziraju histidin. Novo mutirane stanice su povratni mutant-prototrofi koji mogu rasti na podlogama bez prisustva histidina i formirati kolonije (Mortelmans i Zeiger, 2000). Njihov broj se povećava s povećanjem koncentracije mutagena i predstavlja kriterij za mutagenost. Osim mutacija izazvanim mutagenima svaki bakterijski soj ima i određen broj stanica koje će spontano popraviti unesenu mutaciju, tako da svaki soj daje određeni broj spontanih revertanata na minimalnoj podlozi. Tako soj TA98 na minimalnoj podlozi na koju se naciepljuje oko 10^8 stanica daje od 30 – 60 spontanih revertanata, a soj TA100 u istim uvjetima daje od 100 – 200 spontanih revertanata. Uz ovu razliku navedeni sojevi bakterija se razlikuju u karakterističnim mutacijama, soj TA98 ima mutaciju na histidinskom operonu his3052 i služi za praćenje pomaka okvira čitanja, soj TA100 služi za praćenje supstitucije parova baza i ima mutaciju na histidinskom operonu hisG46.

2.7.2 Komet test

Oštećenja DNA su osjetljivi markeri koji ukazuju na genotoksičnu štetu. Komet test omogućuje vizualizaciju oštećenja DNA u pojedinačnim stanicama. Stanice s jezgrom se uklapaju u mikrogel agaroze, te pomoću otopine visoke koncentracije etilen-diamin-tetraoctene kiseline (EDTA) i deterdženata liziraju se citoplazma i membranske strukture u stanici te se oslobađa ukupna DNA (Collins, 2004). Ona se zatim denaturira u alkalnom ili neutralnom puferu i podvrgava elektroforezi tijekom koje mali fragmenti DNA nastali lomovima putuju kroz pore gela prema anodi, dok glavnina DNA zbog velike molekularne mase nema tu sposobnost. Kraći fragmenti brže putuju kroz gel, pa zbog razlike u njihovoj duljini i brzini kretanja dolazi do razdvajanja prema veličini. DNA i obrasci putovanja njenih fragmenata nakon bojanja fluorescencijskom bojom pod mikroskopom su vidljivi kao "kometi". Za njihovu analizu i mjerenje najčešće se koristi epifluorescencijski mikroskop i računalni program za analizu slike. Na mjerenim kometima se utvrđuju tri osnovna parametra: dužina repa kometa, intenzitet repa i repni moment. Dužina repa kometa predstavlja najveću

udaljenost na koju su otputovali najkraći odlomljeni fragmenti DNA; obično se mjeri od sredine glave kometa ili od ruba glave i izražava u mikrometrima. Intenzitet repa označava postotak DNA koja je migrirala u rep, a izražava se u odnosu na ukupnu količinu DNA u kometu. Repni moment se obično definira kao umnožak dužine repa i % DNA u repu.

Provedena istraživanja na procjednim vodama utvrdili su vezu između kontaminanata u procjednim vodama i pojavu samostalnih kromatinskih struktura potpuno odvojenih od jezgre - mikronukleusa. Tako su Amahdar i sur. (2009) utvrdili povećanu učestalost pojave mikronukleusa u limfocitima koji su bili izloženi procjednim vodama. Učestalost pojave mikronukleusa u limfocitima rasla je s povećanjem volumena procjednih voda kojom su limfociti bili tretirani. Istraživanjem stanica vrška korijena biljke *Hordeum vulgare* Sang i sur. (2006) su utvrdili smanjenje mitotičke aktivnosti, te povećan broj mikronukleusa nakon izlaganja procjednim vodama.

3. MATERIJAL I METODE

3.1 MATERIJALI

3.1.1 Procjedna voda odlagališta Mraclinska Dubrava i podzemna voda hidrološki uzvodno i hidrološki nizvodno od odlagališta otpada

Uzorkovanja podzemne vode i procjedne vode je provedeno tijekom jeseni i zime 2013. godine i ljeta 2014. godine. Takva dinamika uzorkovanja odabrana je s ciljem obuhvaćanja perioda različitih vremenskih uvjeta kojima je izložen otpad na odlagalištu.

Tijekom ljeta, kada su temperature najviše a količina oborina najmanja, očekivano je da se zbiva brža razgradnja odloženog otpada, ali zbog male količine oborina posljedično se manji dio kontaminanata ispire iz tijela deponija u procjednu vodu.

Krajem ljeta i tijekom jeseni količina oborina se povećava, a time i količina nastalih procjednih voda, te se u tom periodu očekuju i najveće koncentracije kontaminanata u procjednim vodama. Također, u jesenskom periodu su očekivane visoke razine podzemnih voda, kao i najveća mogućnost prodiranja procjednih voda u podzemlje.

U zimskom periodu, pri nižoj temperaturi smanjuje se brzina biorazgradnje odloženog otpada kao i koncentracija kontaminanata u procjednim vodama.

Na kakvoću podzemne i procjedne vode, u odabranom razdoblju provođenja istraživanja ove disertacije, osim atmosferskih prilika utječu i drugi bitni čimbenici poput količina i sastav mješovitog komunalnog otpada koji se odlaže na odlagalište. Tijekom ljeta količina odloženog otpada je manja s manjim udjelom biorazgradive komponente, nego je to u zimskim mjesecima što također pridonosi nešto različitom sastavu procjednih voda.

Za uzorkovanje podzemnih voda uporabljena je potopna pumpa Grundfos MP1, dok su uzorci procjedne voda uzeti na ulazu u uređaj za pročišćavanje voda smješten na središnjem dijelu odlagališta između sanirane i aktivne plohe odlagališta Mraclinska Dubrava. Uzorci podzemnih voda uzorkovani su s ciljem pokrivanja cijelog područja odlagališta imajući na umu hidrologiju podzemnih voda.

Mjesto uzimanja uzoraka podzemne i procjedne vode prikazano je na slici 3.

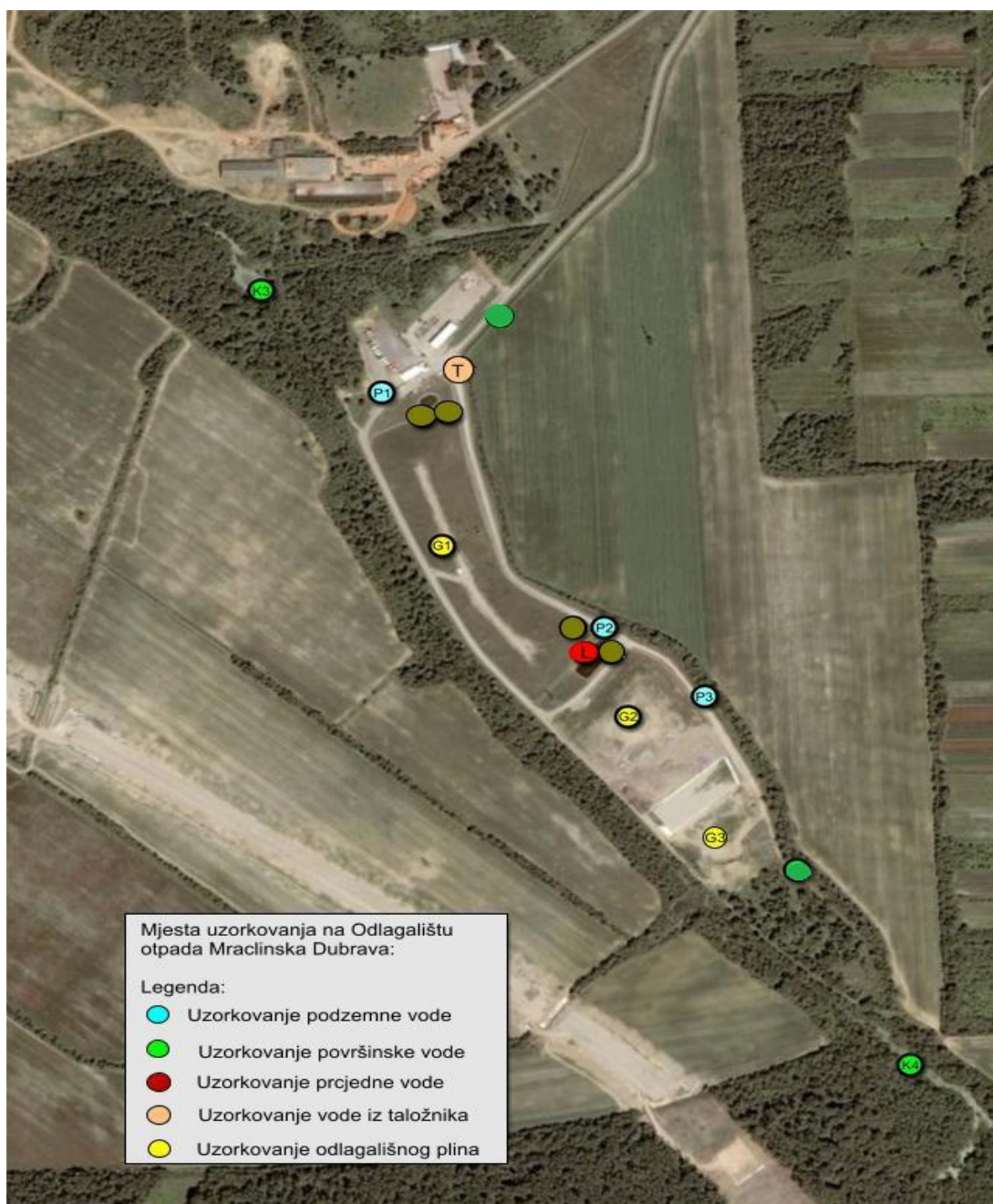
Uzorkovana je podzemna voda:

- uzorak 1 uzet je iz pijezometra 1 koji se nalazi na sjevernom dijelu odlagališta što je hidrološki uzvodno od tijela odlagališta

- uzorak 2 uzet je iz pijezometra 2 koji se nalazi između aktivnog i zatvorenog dijela odlagališta
- uzorak 3 uzet je iz pijezometra 3 koji se nalazi na jugoistočnom cijelu odlagališta što je hidrološki nizvodno od aktivnog dijela odlagališta.

i netretirana procjedna voda:

- uzorak 4, uzorkovana na ulazu u uređaj za pročišćavanje vode, u neposrednoj blizini pijezometra 2



Slika 3. Avionski snimak područja odlagališta otpada Mraclinska Dubrava s označenim mjestima uzorkovanja podzemne i procjedne vode

Uzorci podzemne i procjedne vode su neposredno po uzorkovanju konzervirani i transportirani u laboratorij firme Euroinspekt Croatiakontrola d.o.o. gdje su čuvani u kontroliranim uvjetima pri temperaturi od 4°C do provođenja analize.

Prije provođenja genotoksikoloških ispitivanja uzorci su koncentrirani 100 puta i filtrirani preko filter papira promjera pora 0,45µm. Koncentriranje uzoraka provelo se na rotacionom uparivaču (Heidolph Instruments GmbH, model Elaborata 4000, Njemačka) i na uparivaču dušikom (VLM GmbH, model V.649.061.820, Njemačka). Koncentracija nehlapivih spojeva prisutnih u originalnom uzorku tako je povećana 100 puta što je omogućilo pripremu odgovarajućih razrjeđenja (0,1X, 1X, 5X i 10X, gdje 1X predstavlja uzorak vode u kojemu su koncentracije nehlapivih spojeva identične onima u podzemnoj i procjednoj vodi uzorkovanoj na terenu) za provedbu genotoksikoloških istraživanja. Sukladno tome, 0.1X predstavlja 10 puta razrijeđenu originalnu vodu, a 5X i 10X su uzorci koji sadržavaju 5 odnosno 10 puta veće koncentracije nehlapivih spojeva u odnosu na originalni uzorak.

Fizikalno-kemijska ispitivanja su u dijelu provedena na terenu prilikom samog uzorkovanja i u laboratoriju odmah po dostavi uzoraka.

Ispitivanja su provedena prema ISO normama i validiranim metodama na instrumentima koji se redovito umjeravaju od strane vanjskog akreditiranog laboratorija.

3.1.2 Kemikalije

3.1.2.1 *Određivanje fizikalno-kemijskih pokazatelja kakvoće*

Za provedbu fizikalno-kemijskih ispitivanja pokazatelja kakvoće uporabljene su kemikalije:

a) **Ispitivanje fizikalnih pokazatelja**

- Pufferi pH = 4,00, pH = 7,00, pH = 10,01, *HACH Lange*, Düsseldorf,
- KCl standard = 1413 µS/cm, *HACH Lange*, Düsseldorf
- Mikrokristalična celuloza, *Kemika*, Zagreb

b) **Ispitivanje režima kisika**

- Sumporna kiselina, *Kemika*, Zagreb
- Živin(II) sulfat p.a., *Kemika*, Zagreb
- Kalijev dikromat, *Kemika*, Zagreb
- Amonijev željezo(II) sulfat, *Kemika*, Zagreb
- Srebrov(I) sulfat, *Kemika*, Zagreb

- Kalijev hidrogenftalat, *Kemika, Zagreb*
- 1,10-fenantrolin-1-hidrat, *Kemika, Zagreb*
- Kalijev dihidrogen fosfat, *Kemika, Zagreb*
- Dikalijev hidrogen fosfat, *Kemika, Zagreb*
- Magnezijev sulfat, *Kemika, Zagreb*
- Kalcijev klorid bezvodni, *Kemika, Zagreb*
- Željezov(III) klorid heksahidrat, *Kemika, Zagreb*
- Aliltiurea, *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim*
- Kalijev permanganat, *Kemika, Zagreb*
- Natrijev oksalat, *Kemika, Zagreb*

c) Ispitivanje sadržaja hranjivih tvari

- Natrijev salicilat, *Kemika, Zagreb*
- Trinatrijev citrat dihidrat, *Kemika, Zagreb*
- Natrijev nitropursid, *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim*
- Natrijev hidroksid, *Kemika, Zagreb*
- Natrijev diklorizocijanurat, *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim*
- Amonijev klorid, *Kemika, Zagreb*
- Ortofosforna kiselina, *Kemika, Zagreb*
- Sulfanilamid, *Kemika, Zagreb*
- N-(1-naftil)-1,2-diaminoetan dihidroklorid, *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim*
- Natrijev nitrit, *Kemika, Zagreb*
- EDTANa₂, *Kemika, Zagreb*
- Natrij-azid, *Kemika, Zagreb*
- Kalij-nitrat, *Kemika, Zagreb*
- Sumporna kiselina, *Kemika, Zagreb*
- Askorbinska kiselina, *Kemika, Zagreb*
- Amonijev heptamolibat tetrahidrat, *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim*
- Antimon-kalij tartarat hemihidrat, *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim*
- Kalijev peroksidisulfat, *Kemika, Zagreb*
- Kalijev dihidrogen fosfat, *Kemika, Zagreb*
- LCK 138 kivetni test za određivanje ukupnog dušika, *HACH, Loveland, Colorado*

d) Ispitivanje aniona i kationa

- Kalijev kromat, *Kemika, Zagreb*
- Natrijev klorid, *Kemika, Zagreb*
- Nitratna kiselina, *Kemika, Zagreb*
- Natrijev hidroksid, *Kemika, Zagreb*
- Magnezijev klorid, *Kemika, Zagreb*
- Natrijev acetat, *Kemika, Zagreb*
- Kalijev nitrat, *Kemika, Zagreb*
- Barijev klorid, *Kemika, Zagreb*
- Bezvodni natrijev sulfat, *Kemika, Zagreb*
- Kalijev klorid, *Kemika, Zagreb*
- Amonijev klorid, *Kemika, Zagreb*
- Amonijak, *Kemika, Zagreb*
- EDTANa₂, *Kemika, Zagreb*
- Kalcijev karbonat, *Kemika, Zagreb*
- Eriokrom crno T, *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim*
- Kalkon, *Kemika, Zagreb*
- 1,5-difenilkarbazid, *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim*
- Ledena octena kiselina, *Kemika, Zagreb*
- Kalijev dikromat, *Kemika, Zagreb*
- Dikalijev hidrogen fosfat, *Kemika, Zagreb*
- Aluminijski sulfat, *Kemika, Zagreb*
- LCK 323 kivetni test za određivanje fluorida, HACH, Loveland, Colorado

e) Ispitivanje teških metala

- Dušična kiselina, *Merck, Darmstadt*
- CRM standard pojedinih metala, *Merck, Darmstadt*

f) Test genotoksičnosti na bakterijskim stanicama

- β-nikotinamid adenin dinukleotid fosfat, reducirani oblik, *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim*
- Amonijev natrijev hidrogenfosfat tetrahidrat, p.a., *Kemika, Zagreb*
- Ampicilin, *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim*

- Bacto agar, *Difco*, Lawrence
- Bacto Nutrient broth, *Difco*, Lawrence
- Citronska kiselina monohidrat, p.a., *Kemika*, Zagreb
- D-biotin, *Sigma-Aldrich-Chemie*, Steinheim
- D-glukoza-6-fosfat, p.a., *Kemika*, Zagreb
- Glukoza, p.a., *Kemika*, Zagreb
- Kalijev dihidrogenfosfat, p.a., *Kemika*, Zagreb
- Kalijev hidrogenfosfat trihidrat, p.a., *Kemika*, Zagreb
- Kalijev klorid, p.a., *Kemika*, Zagreb
- kristal violet, *Sigma-Aldrich-Chemie*, Steinheim
- L-histidin-HCl, *Sigma-Aldrich-Chemie*, Steinheim
- Magnezijev sulfat heptahidrat, p.a., *Kemika*, Zagreb
- Natrijev hidrogenfosfat, p.a., *Kemika*, Zagreb
- Natrijev hidrogenfosfat dodekahidrat, p.a., *Kemika*, Zagreb
- Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, p.a., *Kemika*, Zagreb
- Natrijev klorid, p.a., *Kemika*, Zagreb
- Nutrient broth No.2, *Oxoid*, Basingstoke
- S-9 frakcija homogenata jetre štakora, *Invitrogen*, Carlsbad

g) Uzgoj stanične linije

- DMEM medij, *Gibco*, Carlsbad
- „Foetal bovine serum“ (FBS), *Gibco*, Carlsbad
- Kalijev dihidrogenfosfat, p.a., *Kemika*, Zagreb
- Kalijev klorid, p.a., *Kemika*, Zagreb
- Natrijev hidrogenfosfat dodekahidrat, p.a., *Kemika*, Zagreb
- Natrijev klorid, p.a., *Kemika*, Zagreb
- Tripsin, *Gibco*, Carlsbad

h) Test citotoksičnosti na staničnoj liniji

- Etanol, p.a., *Kemika*, Zagreb
- Neutral red, *Sigma-Aldrich-Chemie*, Steinheim
- Octena kiselina, p.a., *Kemika*, Zagreb

i) Test lipidne peroksidacije na staničnoj liniji

- Coomasie blue, *Bio-Rad*, Berkely
- Bovine serum albumin (BSA), *Sigma-Aldrich-Chemie*, Steinheim
- Etanol, p.a., *Kemika*, Zagreb
- Fosfatna kiselina, p.a., *Kemika*, Zagreb
- Malondialdehid, *Sigma-Aldrich-Chemie*, Steinheim

j) Test prooksidativnog djelovanja na staničnoj liniji

- 2',7'-diklorofluorescin diacetat (DCFH-DA), *Sigma-Aldrich-Chemie*, Steinheim
- Bovine serum albumin (BSA), *Sigma-Aldrich-Chemie*, Steinheim
- Dimetil-sulfoksid, p.a., *Kemika*, Zagreb

k) Komet test

- Agarozna niske točke tališta (LMP), *Sigma-Aldrich-Chemie*, Steinheim
- Agarozna normalne točke tališta (NMP), *Sigma-Aldrich-Chemie*, Steinheim
- DMSO, p.a., *Kemika*, Zagreb
- Etidij bromid, *Sigma-Aldrich-Chemie*, Steinheim
- Na₂EDTA, *Sigma-Aldrich-Chemie*, Steinheim
- Natrijev hidroksid, p.a., *Kemika*, Zagreb
- Natrijev laurilsarkozinat, *Sigma-Aldrich-Chemie*, Steinheim
- Tris-HCl, *Sigma-Aldrich-Chemie*, Steinheim
- Triton X-100, *Sigma-Aldrich-Chemie*, Steinheim

3.1.3 Otopine

3.1.3.1 Otopine korištene za određivanje režima kisika

a) Određivanje kemijske potrošnje kisika (KPK – Cr)

Otopina srebrnog sulfat - sumporna kiseline

Sumporna kiselina	965 ml
Srebrov sulfat	10 g

Otopina kalijevog dikromata (0,040 molL⁻¹) koja sadrži živin(II)sulfat

Živin(II) sulfat	80 g
------------------	------

Sumporna kiselina	100 ml
Kalijev dikromat	11,768 g
- nadopuniti s destiliranom vodom u odmjernoj tikvici volumena 1000 ml do oznake	

Otopina amonijevog željezo(II) sulfata, (0,120 molL⁻¹) (FAS)

Amonijev željezov(II) sulfat heksahidrat	47,1 g
Sumporna kiselina	20 ml
- nadopuniti s destiliranom vodom u odmjernoj tikvici volumena 1000 ml do oznake	

Otopina kalijevog hidrogenftalata (2,0824 mmolL⁻¹)

Kalijev hidrogenftalat	0,4251 g
- nadopuniti s destiliranom vodom u odmjernoj tikvici volumena 1000 ml do oznake	

Otopina feroin indikatora

1,10-fenantrolin-1-hidrat	1,485 g
Amonij željezov(II) sulfat heksahidrat	0,980 g
- nadopuniti s destiliranom vodom u odmjernoj tikvici volumena 100 ml do oznake	

b) Određivanje permanganatnog indeksa (KPK – Mn)

Osnovna otopina natrijevog oksalata (0,05 molL⁻¹)

Natrijev oksalat	6,700 g
- nadopuniti s destiliranom vodom u odmjernoj tikvici volumena 1000 ml do oznake	

Radna otopina natrijevog oksalata (5 mmolL⁻¹)

Osnovna otopina natrijevog oksalata	100 ml
- nadopuniti s destiliranom vodom u odmjernoj tikvici volumena 1000 ml do oznake	

Osnovna otopina kalijevog permanganata (≈ 20 mmolL⁻¹)

Kalijev permanganat	3,2 g
- nadopuniti s destiliranom vodom u odmjernoj tikvici volumena 1000 ml do oznake	

Radna otopina kalijevog permanganata ($\approx 2 \text{ mmolL}^{-1}$)

Osnovna otopina kalijevog permanganata 100 ml

- nadopuniti s destiliranom vodom u odmjernoj tikvici volumena 1000 ml do oznake

c) Određivanje biokemijske potrošnje kisika (BPK₅)**Otopina za nacjepljivanje**

Kapsula s bakterijama 1 kom

Destilirana voda 500 ml

Fosfatni pufer (pH=7,2)

Kalijev dihidrogen fosfat 8,5 g

Dikalijev hidrogen fosfat 21,75g

Dinatrijev hidrogen fosfat heptahidrat 33,4 g

Amonijev klorid 1,7 g

- nadopuniti s destiliranom vodom u odmjernoj tikvici volumena 1000 ml do oznake

Otopina magnezijevog sulfata heptadihrata

Magnezijev sulfat heptahidrat 22,5 g

- nadopuniti s destiliranom vodom u odmjernoj tikvici volumena 1000 ml do oznake

Otopina kalcijevog klorida

Kalcijev klorid 27,5 g

Otopina željezovog (III) klorida heksahidrata

Željezov(III) klorid heksahidrat 0,25 g

- nadopuniti s destiliranom vodom u odmjernoj tikvici volumena 1000 ml do oznake

Otopina za razrjeđivanje (mineralni medij)

Fosfatni pufer 1 ml

Otopina magnezijevog sulfata heptahidrata 1 ml

Otopina kalcijevog klorida 1 ml

Otopina željezovog(III) klorida heksahidrata 1 ml

- nadopuniti s destiliranom vodom u odmjernoj tikvici volumena 1000 ml do oznake

3.1.3.2 Otopine korištene za određivanje hranjivih soli

a) **Određivanje amonija**

Bojajući reagens

Natrijev salicilat 130 g

Trinatrijev citrat dihidrat 130 g

Natrijev nitropursid 0,970 g

- nadopuniti s destiliranom vodom u odmjernoj tikvici volumena 1000 ml do oznake

Otopina natrijevog diklorizocianurata

Natrijev hidroksid 32,0 g

Natrijev diklorizocijanurat 2,0 g

- nadopuniti s destiliranom vodom u odmjernoj tikvici volumena 1000 ml do oznake

b) **Određivanje nitrita**

Bojajući reagens

4-aminobenzen sulfonamid 40,0 g

Ortofosforna kiselina 100,0 ml

N-(1-naftil)-1,2-diaminoetan dihidroklorid 2,0 g

- nadopuniti s destiliranom vodom u odmjernoj tikvici volumena 1000 ml do oznake

c) **Određivanje nitrata**

Otopina lužine

Natrijev hidroksid 200 g

EDTANa₂ 50 g

- nadopuniti s destiliranom vodom u odmjernoj tikvici volumena 1000 ml do oznake

Otopina natrijevog azida

Natrijev azid 0,05 g

- nadopuniti s destiliranom vodom u odmjernoj tikvici volumena 100 ml do oznake

Otopina natrijevog salicilata

Natrijev salicilat 1,0 g

- nadopuniti s destiliranom vodom u odmjernoj tikvici volumena 1000 ml do oznake

d) Određivanje ukupnog fosfora

Otopina kalijevog peroksidisulfata

Kalijev peroksidisulfat 5,0 g

- nadopuniti s destiliranom vodom u odmjernoj tikvici volumena 100 ml do oznake

Otopina askorbinske kiseline

Askorbinska kiselina 10,0 g

- nadopuniti s destiliranom vodom u odmjernoj tikvici volumena 100 ml do oznake

Otopina kiselog molibdata (II)

Sumporna kiselina 230 ml

Amonijev heptamolibat tetrahidrat 13,0 g

Antimon kalijev tartarat hemihidrat 0,35 g

- nadopuniti s destiliranom vodom u odmjernoj tikvici volumena 500 ml do oznake

3.1.3.3 Otopine korištene za određivanje aniona i kationa

a) Određivanje klorida

Otopina srebrnog nitrata $\approx 0,02 \text{ molL}^{-1}$

Srebrov nitrat 3,3974 g

- nadopuniti s destiliranom vodom u odmjernoj tikvici volumena 1000 ml do oznake

Otopina kalijevog kromata

Kalijev kromat 10,0 g

- nadopuniti s destiliranom vodom u odmjernoj tikvici volumena 100 ml do oznake

b) Određivanje sulfata

Otopina pufera A

Magnezijev klorid heksahidrat 30,0 g

Natrijev acetat 5,0 g

Kalijev nitrat 1,0 g

Ledena octena kiselina 20,0 ml

- nadopuniti s destiliranom vodom u odmjernoj tikvici volumena 1000 ml do oznake

c) Određivanje kalcija i magnezija

Amonijačni pufer (pH = 10 ± 0,1)

Amonijev klorid 67,5 g

Amonijak 570 ml

EDTANa₂ 5,0 g

- nadopuniti s destiliranom vodom u odmjernoj tikvici volumena 1000 ml do oznake

Otopina EDTA za titraciju

EDTANa₂ 3,725 g

- nadopuniti s destiliranom vodom u odmjernoj tikvici volumena 1000 ml do oznake

Otopina natrijevog hidroksida, 2 mol/l

Natrijev hidroksid 8,0 g

d) Određivanje kroma(VI)

Otopina difenilkarbazida

1,5-defenilkarbazid 1,0 g

Aceton 100 ml

Ledena octena kiselina

1 kap

3.1.3.4 Otopine korištene za određivanje teških metala

matriks “modifier” 10% $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (u vodi)

matriks “modifier” 1% Mg (u vodi; $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$)

matriks “modifier” 1% $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ (u 15% HNO_3)

otopine standarda različitih koncentracija

3.1.4 Podloge za uzgoj bakterije *Salmonella typhimurium*

Sve navedene podloge steriliziraju se 20 min na 121°C.

a) **Kompletna tekuća podloga (OX)**

Nutrient broth (no.2)

0,75 g

Destilirana voda

30,0 mL

b) **Kompletna kruta podloga (NB)**

Nutrient broth

2,4 g

Natrijev klorid (NaCl)

1,5 g

Agar

4,5 g

Destilirana voda

300,0 mL

c) **Minimalna kruta podloga (VB)**

Agar

3,0 g

Destilirana voda

200,0 mL

- Nakon sterilizacije (20min/120°C) dodaje se:

VB soli

10,0 mL

Biotin

5,0 mL

40% glukoze

2,5 mL

d) Površinski (top) agar (TA)

Agar	1,2 g
Destilirana voda	200,0 mL
- Agar se topi u mikrovalnoj pećnici prije negoli se razlije te mu se dodaje:	
VB soli (50%)	4,0 ml
Histidin-biotin otopina (0,5mM)	20,0 mL
40% glukoza	2,5mL

3.1.5 Otopine korištene za provođenje Ames-ovog testa

a) VB soli (50%):

Destilirana voda	167,5g
Magnezijev sulfat heptahidrat	2,5 g
Citronska kiselina x H ₂ O	25,0 g
Kalijev hidrogenfosfat trihidrat	163,7 g
Natrijev amonijev hidrogenfosfat tetrahidrat	43,47 g

- Sterilizira se 20 minuta na 120° C.

b) Otopina glukoze (40%):

Glukoza	40,0 g
Destilirana voda	100,0 mL

- Sterilizira se 15 minuta na 110° C

c) Otopina biotin (0,5 mM):

D-biotin	61 mg
Destilirana voda	500,0 mL

- Sterilizira se 30 minuta na 110° C.

d) Otopina histidin-biotin (0,5 mM):

L-histidin-HCl	52,4 mg
D-biotin	61,0 mg

Destilirana voda 500,0 mL

- Sterilizira se 30 minuta na 110° C.

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

Natrijev klorid 4,0g

Kalijev klorid 0,1g

Natrijev hidrogenfosfat dodekahidrat 1,16g

Kalijev hidrogenfosfat (KH₂PO₄) 0,1g

Destilirana voda 500,0 mL

- Sterilizira se 20 minuta na 120° C.

f) Otopina MgCl₂ x 6H₂O (0,254 M):

Magnezijev klorid heksahidrat 2,5 g

Destilirana voda 50,0 mL

g) Otopina KCl (1 M):

Kalijev klorid 3,8 g

Destilirana voda 50,0 mL

h) PO₄⁻ pufer:

Natrijev hidrogenfosfat dihidrat 31,2g

Destilirana voda 750,0 mL

- Sterilizira se filtracijom (0,22 μm).

i) Otopina NADP (0,04 M):

NADP 0,3 g

Destilirana voda 10,0 mL

- Sterilizira se filtracijom (0,22 μm).

j) Otopina glukoza-6-fosfata (0,2 M):

Glukoza-6-fosfat 0,6 g

Destilirana voda 10,0 mL
- Sterilizira se filtracijom (0,22 µm).

k) Smjesa S9 (10%):

NADP (0,04 M) 1,0 mL
Glukoza-6-fosfat (0,2 M) 0,3 mL
Magnezijev klorid heksahidrat (0,25 M) 0,3 mL
Kalijev klorid (1 M) 0,3 mL
Fosfatni pufer 5,0 mL
S9 1,0 mL
Destilirana voda 2,1 mL

3.1.6 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 na 120° C

b) Ishodišna otopina neutral red (5mg/mL):

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

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

Ishodišna otopina neutral red 250 mL
Medij 24,750 mL

d) Otopina za odbojavanje:

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

3.1.7 Otopine korištene za provođenje testa prooksidativnog djelovanja

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

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

- Sterilizira se 20 minuta na 120° C.

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

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

c) Radna otopina 2',7'-diklorofluorescin diacetat (DCF-DA) (50 µL):

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

3.1.8 Otopine korištene za provođenje testa lipidne peroksidacije

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 na 120° C.

b) Tiobarbiturna kiselina (0.67%):

Tiobarbiturna kiselina	0,067 g
Destilirana voda	10,0 mL

c) Trikloroctena kiselina (10%):

Trikloroctena kiselina	1,0 g
Destilirana voda	10,0 mL

3.1.9 Otopine korištene za provođenje komet testa

a) Otopina NMP agaroze (1%):

NMP agarozna	100,0 mg
PBS pufer (pH=7,2 – 7,4)	10,0 ml

b) Otopina NMP agaroze (0,6%):

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)

Osnovna otopina: destilirana voda, NaCl (2,5 M), Na₂EDTA (100 mM), Tris-HCl (10 mM), Na-laurilsarkozinat (1%)

Radna otopina priređena je iz osnovne dodavanjem:

Triton X-100	1 %
Dimetil-sulfoksid	10%

e) Pufer za denaturaciju stanica (pH = 13)

Natrijev hidroksid (10 M)	30,0 ml
Na ₂ EDTA (20 mM)	5,0 ml
Destilirana voda	965,0 mL

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

Tris-HCl	48,5 g
Destilirana voda mL	1000,00

g) Otopina Etidij-bromida

Etidijev bromid	2,0 µg
Destilirana voda	1,0 mL

3.1.10 Biološki test sustavi za određivanje genotoksičnih učinaka

a) Sojevi bakterije *Salmonella typhimurium*

Korištena su dva soja bakterije *Salmonella typhimurium*: TA 98 i TA 100.

Karakteristike sojeva dane su u tablici 2. Za provođenje eksperimenta bakterijski sojevi su uzgojeni kao prekonocna kultura u 30 ml kompletne tekuće podloge pri 37 °C.

Tablica 2. Karakteristike sojeva TA 98 i TA 100 (Mortelmans i Zeiger, 2000)

Vrsta promjene	Bakterijski sojevi	
	TA 98	TA 100
Mutacija na operonu	<i>hisD3052</i>	<i>hisG46</i>
Ciljana DNA	-C-G-C-G-C-G-C-G-	-G-G-G-
Vrsta mutacija	Pomak okvira čitanja (frameshift)	Supstitucija parova baza
<i>uvrB- bio</i>	Delecija	Delecija
LPS oštećenje	<i>Rfa</i>	<i>Rfa</i>
Prisutnost plazmida	pKM101	pKM101
Broj spontanih revertanata bez S-9	20 – 50	75 – 200
Broj spontanih revertanata sa S-9	20 – 50	75 – 200

b) Stanična linija HEP2

U eksperimentu je korištena kultura humanog karcinoma grkljana (HEP2) koja je rasla u monosloju. Stanice su uzgojene u mediju DMEM s 10% FBS-a, pri 37 °C u vlažnoj atmosferi uz 5% CO₂. Prilikom presađivanja stanica korištena je 0,25%- tna otopina tripsina.

3.1.11 Oprema

Pregled uređaja uporabljenih u izradi disertacije dan je u tablici 3.

Tablica 3. Aparatura – uređaji uporabljeni u izradi disertacije

Aparat	Proizvođač
Analitička vaga MC1 Laboratory LC 620P	Sartorius, Goettingen
Analitička vaga XS204/A	Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland
Autoklav	IPIM, Hrvatska
CO ₂ inkubator	Brouwer CH, Luzern
Epifluorescencijski mikroskop	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Fluorimetar FLUOsta OPTIMA	BMG Labtech, Offenburg
Invertni mikroskop	Optica Microscopes, Ponteranica
Kadica za elektroforezu	Life Technologies, New York
Klasična centrifuga Megafuge 1.0 Heraus	Sepatech, Gottlieb
Laminar, IBK 1 V2	Iskra, Šentjernej
Miješalica, MS1 minishaker, IKA® Works, Inc.	Wilmington, Staufen
Spektrofotometar- microreader	Tecam, Mannerdorf
Termoblok	ISKRA, Slovenija
Termostat	ISKRA, Slovenija
Tresilica	ISKRA, Slovenija
pH metar, model Five easy	Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland
Terenski multimetar, HACH 30 dQ	HACH, Loveland, Colorado
Uređaj za određivanje KPK	model TRS 300, BEHR, Njemačka
Inkubator, model 606-3i	WTW, Njemačka
Oksimetar, model InoLab Oxi 7310,	WTW, Njemačka
Elektroda Stirox G	WTW, Njemačka
Spektrofotometar, model DR 6000	HACH, Loveland, Colorado
Vodena kupelj	GFL, Njemačka
Termoblok	HACH, Loveland, Colorado
Plameni fotometar	
Plameni atomski apsorpcijski spektrofotometar (AAS)	model novAA 350, Analytik Jena
Atomski apsorpcijski spektrofotometar s grafitnom peći (AAS-GF)	model AAnalyst 600, PerkinElmer
Sušionik	model INB 200, Memmert

U provođenju pokusa i analitičkih metoda uporabljeno je i standardno laboratorijsko posuđe, pribor i materijal, navedeni u tablici 4.

Tablica 4. Laboratorijsko posuđe, pribor i materijal uporabljeni u provedbi pokusa i analitičkih metoda

Laboratorijsko posuđe, pribor	Proizvođač
Klipna pipeta, 10- 1000 μ L	Eppendorf, Hamburg
Klipna pipeta, 0,5 – 5,0 mL	Eppendorf, Hamburg
Klipna pipeta, 1,0 – 10 mL	Eppendorf, Hamburg
Digitalna bireta	Solarus
Dispenzor 5 – 30 ml	Ceramus
Fiksni dispenzor, 5 ml	Ceramus
Mikrotitracijske ploče	Falcon, BD Company, Fanklin Lakes
Plastične Petrijeve zdjelice	Aptaca, Canelli
T- boca	Falcon, BD Company, Fanklin Lakes
Pasteurove pipete, 5- 25 mL	-
Plastične epruvete	-
Propipeta	-
Automatske birete volumena 25 i 50 ml	Hirschmann-Laborgeräte, Eberstadt
Mikrofilteri	-
Menzure	-
Kivete	-
Brušena predmetna stakalca	-
Staklene epruvete, 3- 10 mL	-
Staklene Petrijeve zdjelice	-
Tikvice ravnog dna, 100- 1000 mL	-
Odmjerne tikvice	-
Türken-Bürkova komora	
Stakleni filter papir	Whatman, Maidstone

3.2. Metode

3.2.1 Metode fizikalno-kemijskih ispitivanja

Fizikalno-kemijski pokazatelji kakvoće, uporabljene metode i granice određivanja odraabranih pokazatelja kakvoće prikazani su u tablici 5.

Tablica 5. Popis pokazatelja i metoda ispitivanja

Pokazatelj	Metoda	Granica određivanja
Fizikalni pokazatelji		
pH	HRN EN ISO 10523:2012	0,01
Električna vodljivost	HRN EN 27888:2011	0,1 μScm^{-1}
Ukupna tvar sušena	DIN 38409 (1):1987	2,0 mg L^{-1}
Suspendirana tvar	HRN EN 872:2008	2,0 mg L^{-1}
Režim kisika		
KPK – Mn	HRN EN ISO 8467:2001	0,5 $\text{mg O}_2 \text{L}^{-1}$
KPK – Cr	HRN ISO 6060:2003	15 $\text{mgO}_2 \text{L}^{-1}$
BPK ₅	HRN EN 1899-1:2004 HRN EN 1899-2:2004	0,5 $\text{mg O}_2 \text{L}^{-1}$
Anorganski pokazatelji – hranjive tvari		
Amonij	HRN ISO 7150-1:1998	0,010 mg N L^{-1}
Nitriti	HRN EN 26777:1998	0,010 mg N L^{-1}
Nitrati	HRN ISO 7890-3:1998	0,2 mg N L^{-1}
Ukupni dušik	RU-OTV-005_izdanje 1 (HACH Lange, kivetni test)	1 mg N L^{-1}
Ukupni fosfor	HRN EN ISO 6878:2008	0,050 mg P L^{-1}
Anorganski pokazatelji – anioni i kationi		
Kloridi	HRN ISO 9297:1998	5,00 mg L^{-1}
Sulfati	Standard methods 21th Ed. 2005:4500-SO42- E	1,00 mg L^{-1}
Natrij	HRN ISO 9964-3:1998	1,00 mg L^{-1}
Kalij	HRN ISO 9964-3:1998	1,00 mg L^{-1}
Kalcij	HRN ISO 6058:2001	0,05 mmol L^{-1}
Magnezij	HRN ISO 6059:1998	0,1 mmol L^{-1}
Fluoridi	RU-OTV-045_izdanje 1 (HACH Lange, kivetni test)	0,100 mg L^{-1}
Krom (VI)	HRN ISO 11083:1998	0,010 mg L^{-1}
Anorganski pokazatelji – teški metali		
Željezo	HRN EN ISO 15586:2008	0,025 mg L^{-1}
Mangan	HRN EN ISO 15586:2008	0,025 mg L^{-1}
Arsen	HRN EN ISO 15586:2008	0,007 mg L^{-1}
Kadmij	HRN EN ISO 15586:2008	0,0015 mg L^{-1}
Krom	HRN EN ISO 15586:2008	0,025 mg L^{-1}
Olovo	HRN EN ISO 15586:2008	0,010 mg L^{-1}
Živa	RU-MET-198_izdanje 1	0,001 mg L^{-1}
Nikal	HRN EN ISO 15586:2008	0,025 mg L^{-1}
Cink	HRN EN ISO 15586:2008	0,025 mg L^{-1}

3.2.2. Određivanje fizikalnih pokazatelja

3.2.2.1. *Određivanje pH i električne vodljivosti*

Tijekom sanitarne pripreme pijezometara za uzimanje uzoraka podzemne vode (HRN ISO 5667-11:2011) na terenu je provedeno ispiranje pijezometara. Prilikom ispiranja pijezometra terenskim multimetrom mjerena je električna vodljivost (HRN EN27888:2011) podzemne vode.

Uzorak podzemne vode uzet je tek kada se vrijednost električne vodljivosti ustalila, 3 uzastopna mjerenja provedena u razmaku od 5 minuta moraju imati razliku manju od 5%.

U tom uzorku primjenom terenskog multimetra izmjerena je pH vrijednost (HRN EN ISO 10523:2012) i temperatura.

3.2.2.2. *Gravimetrijsko određivanje ostatka sušenjem i suspendirane tvari*

Određivanje ukupnog ostatka sušenog (DIN 38409-1:1987-01) i suspendirane tvari (HRN EN 872:2008) provedeno je gravimetrijskim analizama.

Ostatak sušenjem (DIN 38409-1:1987-01) određen je uparavanjem do suhog poznatog volumena vode u porculanskoj posudici poznate mase, na vodenoj kupelji. Nakon uparavanja određena je masa posudice s uparenim ostatkom i iz razlike mase porculanske posudice prije i poslije uparavanja izračunat je ukupni ostatak sušeni i izražen u mgL^{-1} .

Suspendirana tvar (HRN EN 872:2008) određena je filtriranjem 100 ml vode preko staklenog filter papira poznate mase, te sušenjem filter papira s talogom pri 105°C do konstantne mase. Iz razlike mase filter papira prije i nakon filtriranja izračunata je suspendirana tvar i izražena u mg L^{-1} .

3.2.2.3. *Određivanje režima kisika*

Nakon kuhanja uzorka uz prisutnost kalij-permanganata i oksalne kiseline titrimetrijski je određen permanganatni indeks (HRN EN ISO 8467:2001).

Na oksimetru je izmjerena početna koncentracija kisika. Uzorak na kojem je izmjerena početna koncentracija kisika ostavljen je pet dana u inkubatoru pri $21,0^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ i nakon pet dana opet je izmjerena koncentracija kisika.

Razlika između početne i konačne koncentracije predstavlja biokemijsku potrošnju kisika, BPK_5 (HRN EN 1899-1:2004, HRN EN 1899-2:2004).

3.2.2.4. Spektrofotometrijske analize hranjivih tvari, aniona i kation

a) Određivanje amonija (HRN ISO 7150-1:1998) napravljeno je u odmjernim tikvicama volumena 50 ml. U tikvice je dodano 40 ml originalnog uzorka, 4 ml bojajućeg reagensa za amonij i 4 ml otopine natrijevog diklorizocianurata, te je tikvica nadopunjena do oznake s destiliranom vodom. Nakon dodavanja reagensa uzorci su ostavljeni na sobnoj temperaturi 60 minuta, te je na spektrofotometru izmjerena apsorbancija uzorka na valnoj duljini 655 nm u kiveti optičkoga puta 10 mm. Za slijepu probu koristila se ultračista voda u koju su dodani isti reagensima kao i u uzorak.

b) Određivanje nitrita (HRN EN 26777:1998) napravljeno je u odmjernim tikvicama volumena 50 ml. U tikvice je dodano 40 ml originalnog uzorka i 1 mL bojajućeg reagensa za nitrite, te je tikvica nadopunjena do oznake s destiliranom vodom. Nakon dodavanja reagensa uzorci su ostavljeni na sobnoj temperaturi 20 minuta. Nakon 20 minuta izmjerena je apsorbancija uzoraka na spektrofotometru pri valnoj duljini od 540 nm u kiveti optičkog puta 10 mm prema ultračistoj vodi kao slijepoj probi.

c) Određivanje nitrata (HRN ISO 7890-3:1998) napravljeno je iz 25 mL uzorka koji je kvantitativno prenesen u porculanske posudice. U posudice je dodano 0,5 mL otopine natrijevog azida i 0,2 mL otopine octene kiseline. Nakon 5 minuta reakcije posudice su prenesene na vodenu kupelj i uzorak je uparen do suhog. U posudice je zatim dodano 1 mL otopine natrijevog salicilata, promiješan i opet uparen do suhog. Nakon drugog uparavanja posudice su maknute s vodene kupelji i ostavljene da se ohlade na sobnu temperaturu. Zatim je u posudice dodano 1,0 mL sumporne kiseline i ostavljeno 10 minuta. Nakon završetka reakcije u posudice je dodano 10 mL destilirane vode i 10 ml otopine natrijevog hidroksida. Ovako pripremljen uzorak je kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu volumena 25 mL i kroz 10 minuta grijan u vodenoj kupelji pri 25°C, te je nakon grijanja nadopunjen do oznake s otopinom natrijevog hidroksida. Nakon nadopunjavanja izmjerena je apsorbancija uzorka na spektrofotometru pri 415 nm u kiveti optičkoga puta 40 mm prema destiliranoj vodi kao slijepoj probi.

d) Određivanje ukupnog dušika (RU-OTV-005, izdanje 1/2013) napravljeno je s komercijalno dostupnim kivetni testovima proizvođača HACH Lange. U kivetu se doda 10 mL uzorka i 1

kapsula reagensa, te se kuha u termobloku na 170 °C kroz 60 minuta. Nakon digestije u uzorak su dodani reagensi i izmjerena je apsorbancija na spektrofotometru.

e) Određivanje ukupnog fosfora (HRN EN ISO 6878:2008) napravljeno je iz 40 mL uzorka. Uzorak je dodan u Erlenmayerovu tikvicu volumena 100 ml nakon čega je dodano 4 mL otopine peroksidisulfata i kuhano kroz 30 minuta. Nakon kuhanja uzorak je ohlađen i kvantitativno je prenesen u odmjernu tikvicu volumena 50 mL. U tikvicu je zatim dodano 1 mL otopine askorbinske kiseline i 2 ml otopine kiselog molibdata, te je tikvica nadopunjena do oznake s destiliranom vodom. Nakon dodavanja reagensa uzorci su ostavljeni na sobnoj temperaturi 30 minuta nakon čega je izmjerena apsorbancija uzoraka na spektrofotometru pri valnoj duljini od 880 nm u kiveti optičkog puta 10 mm prema ultračistoj vodi kao slijepoj probi.

f) Određivanje sulfata (Standard Methods, 21th Ed. 2005:4500-SO42- E) napravljeno je iz 100 mL uzorka u kojeg je dodano 20 pufera A i 1 žličica barijevog klorida. Uzorak je promiješan u trajanju od 1 minuta i ostavljen 5 minuta da se istaloži. Nakon taloženja izmjerena je apsorbancija uzorka na spektrofotometru pri valnoj duljini od 420 nm prema čistom uzorku kao slijepoj probi.

g) Određivanje fluorida (RU-OTV-045, izdanje 1/2013) napravljeno je s komercijalno dostupnim kivetnim testovima proizvođača HACH Lange, Colorado. U kivete testa se klipnom pipetom doda 3 mL uzorka, kiveta se protrese i nakon 60 sekundi se očita na spektrofotometru.

h) Određivanje Kroma (VI) (HRN ISO 11083:1998) napravljeno je u odmjernim tikvicama volumena 100 mL. U tikvice je dodano 50 ml uzorka, 2 ml otopine fosforne kiseline i 2 ml otopine difenilkarbazida. Tikvice su nadopunjene do oznake s vodom, nakon 15 minuta izmjerena je apsorbancija uzorka pri valnoj duljini od 550 nm prema destiliranoj vodi kao slijepoj probi.

3.2.2.5. *Titrimetrijske analize*

a) Određivanje klorida (HRN ISO 9297:1998) napravljeno je iz 100 ml uzorka. U uzorak je dodano 1 mL otopine kalijevog kromata i uzorak je titriran s otopinom srebrnog nitrata do prelaska boje iz žute u narančasto-crvenu. Paralelno s uzorkom, istim postupkom, titrirala se

i destilirana voda. Iz razlike utrošenog volumena srebrnog nitrata za titraciju destilirane vode i uzorka, faktora koncentracije srebrnog nitrata i volumena uzorka izračunala se koncentracija klorida u uzorku.

b) Određivanje kalcija (HRN ISO 6058:2001) i magnezija (HRN ISO 6059:1998) napravljeno je titracijom 50 mL uzorka s otopinom EDTA. Prva titracija se radi uz dodatak 4 ml amonijačnog pufera i na vrhu žličice indikatora Eriokrom crno T. Titracija se provodi do promjene boje otopine iz crvene u plavu. Računski se iz utrošenog volumena EDTA izračuna suma koncentracija kalcija i magnezija u otopini. Druga titracija s EDTA se provodi iz dodatnih 50 ml uzorka u koje je dodano 2 ml otopine natrijevog hidroksida i na vrhu žličice indikatora Kalkon. Titracija se provodi do promjene boje otopine iz ljubičaste u plavu. Iz utrošenog volumena izračuna se koncentracija kalcija u uzorku, a iz razlike sume koncentracija kalcija i magnezija i koncentracije kalcija izračunala se koncentracija magnezija.

3.2.2.6. Analize teških metala na AAS s grafitnom peći

Određivanje je napravljeno izravnim injektiranjem određenog volumena uzorka u instrument. Prethodno je uzorak obrađen filtriranjem preko filtera papira promjera pora 0,45 μ m i zakiseljen dodavanjem 0,5 ml dušične kiseline na 50 mL uzorka.

3.2.3. Priprema podloga za uzgoj bakterija *Salmonella typhimurium* i S9 smjese

Za izvedbu pokusa potrebno je pripremiti tri vrste podloga – kompletna tekuća podloga (OX), minimalna kruta podloga (VB) i top agar (TA). Kompletna tekuća podloga priprema se dodavanjem 0,75 g Nutrient broth No.2 u 30 mL destilirane vode. Tako pripremljena podloga sterilizira se autoklaviranjem 20 min na 120 °C. Minimalna kruta podloga priprema se dodavanjem 7,5 g agara u 500 mL destilirane vode, te se sterilizira u autoklavu 20 min na 120°C. Nakon sterilizacije u ohlađenu otopinu se dodaje 10,0 mL VB soli (Vogel-Bonner soli), koje su smjesa $MgSO_4 \times 7 H_2O$, K_2HPO_4 , $K_2HPO_4 \times 3 H_2O$, NH_4NaHPO_4 , $NH_4NaHPO_4 \times 4 H_2O$ i limunske kiseline otopljenih u vrućoj destiliranoj vodi, 12,5 mL histidina i 6,25 mL glukoze. Top agar podloga se priprema dodavanjem 0,72 g agara u 120 mL destilirane vode, te se sterilizira u autoklavu 20 min na 120 °C. Prije razlijevanja agar se zagrije u mikrovalnoj pećnici te mu se doda 2,4 mL VB soli, 12 mL otopine histidin biotina i 1,5 ml 40% glukoze. S9 smjesa priprema se dodavanjem 2,5 ml NADP, 0,75 ml glukoza-6-fosfat, 0,75 mL $MgCl_2 \times 6H_2O$, 0,75 mL KCl, 12,5 mL PO_4 - pufera, 5,25 mL sterilne destilirane vode i 2,5 mL S9

(mikrosomalna frakcija) u Erlenmayerovu tikvicu volumena 25 mL. S9 je metabolički aktivator dobiven homogeniziranjem jetre štakora koji je boga tenzimima, ribosomima i endoplazmatiskim retikulom

3.2.4. Uzgoj bakterije *Salmonella typhimurium* iz pohranjene bakterijske kulture

Do početka pripreme bakterijska kultura je pohranjena na -80 °C. Bakterijski soj se priprema iz jedne izolirane bakterijske kolonije. Na bakterijskim sojevima su provođeni testovi za provjeru funkcionalnosti i prisutnosti svih željenih genotipskih svojstava (mutacija na *his*-operonu, *rfa* i *uvr*-*B* mutacije), te prisustvu pKM101 plazmida i broj spontanih revertanata (Mortelmans i Zeiger, 2000).

3.2.5. Kultivacija HEP2 stanične linije i priprema stanične suspenzije

Zamrznuta stanična kultura otopila se u vodenoj kupelji pri 37 °C nakon čega se centrifugiranjem pri 1000 rpm kroz 5 min uklonio supernatant. U dobiveni talog doda se 1 mL svježeg medija zagrijanog na 37 °C i ponovno centrifugira na 1000 rpm kroz 5 min. Ovako pripremljene stanice nasađuju se u petrijeve zdjelice. Nakon 24 sata stanice se nasađuju u T-bocice i uzgajaju do subkonfluentnog stanja, kada se mogu koristiti za eksperiment (Freshney, 2000). Za pripremu stanične suspenzija sa stanica u T-bocama pipetom se ukloni preostali medij i stanice se isperu 0,25% tripsinom. Nakon ispiranja na stanice se doda mala količina otopine 0,25% tripsina. Na taj način stanice se odlijepu od podloge i poprimaju okrugli oblik. Za zaustavljanje proteolitičkog učinka tripsina, na stanice se dodaje medij obogaćen serumom (Freshney, 2010).

3.2.6. Analiza genetičkih karakteristika Amesovih sojeva

Nakon pripreme zamrznutih stanica, a prije izvođenja genotoksikoloških eksperimenata, testirani sojevi su analizirani zbog provjere genetičkog integriteta i stope povratnih mutacija. Testovi uključuju provjeru *rfa* markera, provjeru *uvr B* delecije, prisutnost plazmida pKM101 i broj povratnih mutanata.

a) Provjera *rfa* markera:

Na kompletnu (NB) podlogu nacijepljeno je 100 µL prekonoćne kulture i razmazano sa sterilnim štapićem po Drigalskom. Na sredinu ploče je stavljen sterilni papirnati disk na koji je dodano 10 µL otopine kristal violeta i podloga je inkubirana kroz 24 sata na 37 °C. Svi

Salmonella sojevi bi trebali pokazati zonu inhibicije koja okružuje disk (Venitt i Parry, 1984; Timbrell, 2000).

b) Provjera *uvr B delecije*:

Na kompletnu (NB) podlogu kapaljkom je dodano 4 kapi prekonoćne kulture na jednakim udaljenostima jedna od druge. Kapi su se ravnomjerno rasporedile po podlozi. Bakterije na podlozi su postepeno ozračene UV svjetlosti u maksimalnom trajanju od 15 sekundi, ukoliko bi izlaganje bilo dulje od 15 sekundi smanjilo bi se preživljavanje bakterija (Venitt i Parry, 1984; Timbrell, 2000).

c) Prisutnost plazmida pKM101 (ampicilin rezistentnost)

Na kompletnu (NB) podlogu naciepljeno je 100 μ L prekonoćne kulture i razmazano sa sterilnim štapićem po Drigalskom. Na sredinu ploče je stavljen sterilni papirnati disk na koji je dodano 10 μ L ampicilina i podloga je inkubirana kroz 24 sata na 37 °C.

d) Učestalost povratnih mutanata: svaki od ispitivanih sojeva ima karakterističnu učestalost spontanih revertanata his^+ . Obično postoje varijacije koje ovise o laboratoriju te o izboru otopine. Neki sojevi su visoko osjetljivi na S9 koncentracije i njihove vrijednosti spontanih revertanata rastu sa koncentracijom S9 (Mortelmans i Zeiger, 2000).

3.2.7. Određivanje točkastih mutacija procjedne i podzemnih voda na bakterijskom test sustavu *Salmonella typhimurium*

Za ispitivanje točkastih mutacija korišteni su sojevi *Salmonella typhimurium* s već postojećim mutacijama u histidinskom operonu. Ovi sojevi su histidin auksotrofi te ne mogu stvarati kolonije na minimalnoj podlozi. Nove mutacije na mjestu ili u blizini mjesta postojeće mutacija mogu vratiti funkcionalnost gena i omogućiti stanicama da opet sintetiziraju histidin i rastu na podlogama bez prisustva histidina. Takve novo mutirane stanice su povratni mutant-prototrofi (Mortelmans i Zeiger, 2000). Ames-ov test je korišten za određivanje mutagenog učinka. U 2 mL top agra dodana je određena koncentracija ispitivanog uzorka vode (0,1x, 1,0x, 5,0x i 10,0x), 100 μ L bakterijskog soja i 500 μ L PBS-a (kada se eksperiment provodi bez metaboličkog aktivatora). Sve zajedno je homogenizirano i preneseno na minimalnu (VB) podlogu te inkubirano 48 sati na 37 °C. Kada se eksperiment provodi u prisustvu metaboličkog aktivatora postupak je isti, samo se umjesto 500 μ L PBS-a dodaje 500 μ L S9 smjese. Uz

svaki eksperiment se radi i negativna kontrola (Mortelmans i Zeiger, 2000). Nakon inkubacije se određuje kvocijent mutacije (Qm-) koji predstavlja omjer broja kolonija poraslih nakon tretiranja uzorkom i broja kolonija poraslih na negativnoj kontroli.

3.2.8. Određivanje citotoksičnog učinka procjedne i podzemne vode na HEP2 staničnoj liniji

Određivanje citotoksičnog učinka napravljeno je *Neutral red* metodom (Babich i Borenfreund, 1991). *Neutral red* metoda je široko primijenjena metoda kojom se određuje citotoksičnosti različitih tvari s brojnim primjenama u biomedicinskim ispitivanjima i ispitivanjima utjecaja na okoliš (Borenfreund i Puerner, 1984; Babich i Borenfreund, 1991). To je kolorimetrijski test koji se temelji na ugradnji boje *Neutral red* (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidrokolid) u lizosome živih stanica nakon inkubacije s istraživanim tvarima. *Neutral red* je slabo kationska boja koja prolazi kroz staničnu membranu neionskom pasivnom difuzijom i elektrostatskim hidrofobnim vezama veže se na dijelove lizosomskog matriksa (Winckler J, 1974; Nemes i sur 1979.) Zadržavanje boje u stanici ovisi o sposobnosti stanice da održava pH gradijent. Ksenobiotici koji oštećuju plazmu ili lizosomalnu membranu smanjuju unos i zadržavanje boje, te se uočava razlika između normalnih, oštećenih i mrtvih stanica. Oštećene ili mrtve stanice ne zadržavaju boju nakon ispiranja i procesa fiksacije (Babich i Borenfreund, 1991) zbog toga je količina zadržane boje proporcionalna broju živih funkcionalnih stanica.

Za izvođenje metode na mikrotitarske pločice od 96 jažica nasadeno je 100 μL suspenzije stanica HEP2 u koncentraciji 10^5 stanica mL^{-1} kroz 24 sata. Inkubacija stanica trajala je 24 sata pri 37 °C. Nakon što su stanice ušle u eksponencijalnu fazu rasta tretirane su, kroz 24 sata, uzorcima vode u koncentracijama 0,1x, 1,0x, 5,0x i 10,0x. Nakon 24 sata tretiranja, da se ukloni preostali medij i uzorci, stanice su isprane sa 100 μL PBS-pufera. Nakon ispiranja u jažice je dodano 100 μl radne otopine *Neutral red*, te su inkubirane 1 sat pri 37°C. Poslije inkubacije stanice su ponovno isprane s 100 μL PBS pufera. Ekstrakcija boje iz lizosoma živih stanica napravila se s 100 μl otopine za odbojavanje, te se intenzitet ekstrahirane boje mjerio na spektrofotometrijskom čitaču mikrotitarskih pločica pri 540 nm. Kao negativna kontrola koristio se čisti medij bez uzoraka (Repetto i sur, 2008; Durgo i sur, 2009). Ispitivanje je ponovljeno 2 puta sa 6 tretmana koncentracija svih uzoraka po eksperimentu. Iz dobivenih podataka izračunao se postotak preživljena prema formuli:

$$P = \frac{A}{NK} \times 100$$

Gdje je,

A – apsorbancija tretiranih stanica

NK – apsorbancija negativne kontrole

3.2.9. Određivanje prooksidativnog učinka procjedne i podzemne vode na HEP2 staničnoj liniji

Određivanje slobodnih radikala (ROS) nastalih bazalnim metabolizmom ili metabolizmom ksenobiotika kojima su stanice izložene vrši se 2',7'- diklorofluorescin-diacetat fluorimetrijskim testom. Struktura 2',7'- diklorofluorescin-diacetat (DCFH-DA) mu omogućuje laku difuziju kroz staničnu membranu gdje se u citosolu stanica djelovanjem intracelularnih enzima prevodi u 2',7'- diklorofluorescin (DCFH) koji je izrazito fluorescentan (Wang i Joseph, 1999). Na mikrotitarske ploče s 96 jažica posađeno je 100 µL suspenzije HEP2 stanica koncentracije 10⁵ stanica mL⁻¹. Nakon posađivanja stanica u jažice je dodana ispitivana voda različitih koncentracija (0,1X – 10,0X) i stanice su inkubirane 24 sata pri 37°C. Inkubacija se odvijala tijekom eksponencijalne faze rasta stanica. Nakon 24 sata stanice su isprane s 100,0 µL PBS pufera i dodano je 100 µL otopine DCFH-DA (50 µM), te su stanice ostavljene 30 minuta u inkubatoru na 37 °C. Poslije inkubacije s DCFH-DA izmjeren je intenzitet fluorescencije pri valnim duljinama od 485±10 nm za ekscitaciju i 530±12 nm za emisiju (Vulić, 2011). Eksperiment je ponovljen dva puta sa 6 tretmana koncentracija svih uzoraka po eksperimentu. Postotak indukcije izražen je prema formuli:

$$In = \frac{ROS}{P} \times 100$$

$$ROS = \frac{IF}{NK}$$

Gdje je,

In – postotak indukcije

ROS – intenzitet fluorescencije

IF – fluorescencija tretiranih stanica

NK – fluorescencija negativne kontrole

P – posto preživljenja (v.p. 4.2.4)

3.2.10. Određivanje lipidne peroksidacije procjedne i podzemne vode na HEp2 staničnoj liniji

Peroksidacija lipida se odredila fluorimetrijski TBARS metodom koristeći MDA ekvivalente dobivene iz tetraetoksiopropana. Prilikom reakcije MDA s tiobarbituratnom kiselinom (TBA) nastaje ružičasto obojenje koje je proporcionalno koncentraciji TBARS u uzorku (Devasagayam i sur., 2003).

3.2.10.1. *Određivanje TBA-MDA kompleksa u uzorcima*

U petrijeve zdjelice promjera 10 cm nasadeno je 5,0 ml stanične suspenzije koncentracije stanica 10^5 stanica mL^{-1} . Nakon nasadivanja stanica u petrijeve zdjelice je dodana ispitivana voda i stanice su ostavljene kroz 24 sata. Poslije 24 sata sa stanica je uklonjen medij i stanice su isprane s PBS puferom. Plastičnim štapiće stanice su pažljivo uklonjen s dna Petrijevih posudica i prebačene u mikroeprovete za centrifugu, te su dva puta isprane s po 1 mL PBS pufera. Ovako pripremljene stanice su centrifugirane u trajanju 5 min na 5000 okr/min. Nakon centrifugiranja u epruvete je dodano 200,0 μL PBS-a, te se stanice razbijaju s kuglicama promjera 0,2 μm u 3 ciklusa vorteksiranja i hlađenja. Svaki ciklus se sastoji od 30 sekundi vorteksiranja nakon kojih slijedi 30 sekundi hlađenja uzorka. Iz ovako pripremljenih stanica 5,0 μL uzorka se kvantitativno preneseno u kivetu za kasnije određivanje proteina po Bradfordu, a u preostalih 100,0 μL se dodaje 200,0 μl 10%-tne trikloroctene kiseline i drži 15 minuta na temperaturi od $+4^\circ\text{C}$. Nakon hlađenja, tijekom kojega su se istaložili proteini, uzorak se centrifugirao kroz 5 min na 5000 okr/min. Iz supernatanta se uzelo 300,0 μL otopine u koji se dodalo 300,0 μL 0,67%-tne tiobabituratne kiseline, te se inkubiralo kroz 30 minuta na 95°C . Nakon inkubacije 100,0 μL uzorka se dodalo u mikrotitarske pločice (96 jažica) te se mjerio intenzitet fluorescencije pri valnim duljinama od 560 nm za ekscitaciju i 585 nm za emisiju. Ispitivanje se napravilo u 4 paralelna određivanja. Koncentracija TBA-MDA kompleksa izračunava se iz baždarnog dijagrama (Durgo i sur. 2007, BSA, 2009) i izražava u $\mu\text{M mg}^{-1}$ proteina. Baždarni dijagram napravio se iz ishodišne otopine malondialehida u koncentracijskom području od 0,0 do 1,5 μM .

3.2.10.2. *Određivanje koncentracije proteina po Bradfordu*

U kivetu je kvantitativno preneseno 5,0 μL supernatanta (staničnog lizata), pipetom je dodano 95,0 μL destilirane vode i 1,0 mL Bradfordovog reagensa. Nakon 2 minute reakcije,

apsorbancija otopine je mjerena na 595 nm. Koncentracija proteina u uzorcima određena je iz baždarnog dijagrama pripremljenog iz BSA raspona koncentracija od 0,0 μL do 100 μL (Bradford, 1976). Eksperiment je ponovljen 2 puta s 2 tretmana koncentracija svih uzoraka po ispitivanju.

3.2.11. Određivanje jednolančanih i dvolančanih lomova izazvanih procjednom i podzemnim vodama na HEp2 staničnoj liniji

U petrijeve zdjelice promjera 10 cm nacičepljeno je 5,0 ml stanične suspenzije koncentracije stanica 10^5 stanica mL^{-1} . Nakon nasađivanja stanica u petrijeve zdjelice je dodana ispitivana voda i stanice su ostavljene kroz 24 sata. Poslije 24 sata s stanica je uklonjen medij i stanice su isprane s PBS puferom. Plastičnim štapiće stanice su pažljivo uklonjen s dna Petrijevih posudica i prebačene u mikroeprovete za centrifugu, te su dva puta isprane s po 1 mL PBS pufera. Ovako pripremljene stanice su centrifugirane u trajanju 5 min na 5000 okr/min. Nakon centrifugiranja 10 μL stanica su resuspendirane u 100,0 μL LMP agaroze (LMP – „Low Melting Point“) i nanese na brušeno predmetno stakalce na koje je prethodno nakapano 300,0 μL NMP (NMP – „Normal Melting Point“) agaroze (1%) i polimerizirano na sobnoj temperaturi. Nakon 10 minuta polimerizacije gel je presvučen s još jednim slojem agaroze, polimeriziran i provedena je liza uzoraka u ohlađenom puferu za lizu stanica (4°C u trajanju od 1 sat). Po završetku liziranja stanice su tretirane puferom za denaturaciju i provedena je elektroforeza pri jakosti struje od 300 mA, naponu od 25 V i trajanju od 20 minuta. Poslije elektroforeze napravljena je neutralizacija puferom uza neutralizaciju (0,4 M Tris). Preparat je obojan s 100,0 μL etidij-bromida, ispran s Tris-HCl puferom, te pokriven pokrovnim stakalcem. Ovako pripremljeni preparat je mjereno pomoću programa za analizu slike *Comet Assay II* (Perceptive instruments Ltd., UK), a mikroskopska analiza je napravljena pomoću epifluorescencijskog mikroskopa s ekscitacijskim filterom podešenim na 515-560 nm. U svrhu analize genotoksičnog učinka voda, korišteni su parametri dužina repa i intenzitet repa.

3.3. Statistička obrada rezultata

Svi rezultati su obrađeni statistički one-way ANOVA statističkim programom uz granicu statističke značajnosti od $p < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. KEMIJSKI SASTAV PROCJEDNE I PODZEMNIH VODA

Rezultati fizikalno-kemijskog ispitivanja podzemne vode uzorkovanih u jesen 2013. godine, zimu 2013. godine i ljeto 2014 na pijezometrima P1 (hidrološki uzvodno od tijela odlagališta), P2 (između sanirane i aktivne plohe odlagališta) i P3 (hidrološki nizvodno od tijela odlagališta) i procjedne vode uzorkovane u istom periodu na ulazu u uređaj za pročišćavanje otpadne vode odlagališta otpada Mraclinska Dubrava prikazani su u tablicama 6-10.

Tablica 6. Fizikalno-kemijski sastav podzemne vode uzorkovane na pijezometru P1. Pijezometar P1 nalazi se na sjevernoj strana odlagališta, hidrološki uzvodno od smjera toka podzemnih voda.

Pokazatelj	Rezultati		
	Jesen, 2013 godine	Zima, 2013 godine	Ljeto, 2014 godine
pH	7,40	7,14	7,16
Elektrovodljivost ($\mu\text{s cm}^{-1}$)	615	660	670
Ukupna tvar sušena (mg L^{-1})	72	76	80
Suspendirana tvar (mg L^{-1})	<2	<2	<2
KPK (KMnO_4) ($\text{mg O}_2 \text{L}^{-1}$)	5,0	3,2	4,0
BPK ($\text{mg O}_2 \text{L}^{-1}$)	1,4	1,1	1,8
Organski dušik (mg N L^{-1})	0,40	0,40	0,50
Ukupni fosfor (mg P L^{-1})	0,022	0,018	0,020
Kloridi (mg Cl L^{-1})	10,0	18,0	20,0
Sulfati ($\text{mg SO}_4^2 \text{L}^{-1}$)	8,0	12	14
Kalij (mg L^{-1})	28	30	32
Amonij (mg N L^{-1})	0,050	0,006	0,008
Nitriti (mg N L^{-1})	0,005	0,033	0,033
Nitrati (mg N L^{-1})	2,2	2,8	3,0
Ukupni dušik (mg N L^{-1})	3,87	3,80	4,00
Kalcij (mg L^{-1})	55	60	58
Magnezij (mg L^{-1})	27	30	26
Željezo (mg L^{-1})	<0,050	<0,010	<0,010
Mangan (mg L^{-1})	<0,050	<0,010	<0,010
Flouridi (mg L^{-1})	0,180	0,090	<0,100
Arsen (mg L^{-1})	<0,010	0,670	<0,010
Kadmij (mg L^{-1})	<0,010	<0,010	<0,010
Krom (mg L^{-1})	<0,050	<0,050	<0,050
Krom (VI) (mg L^{-1})	<0,010	<0,01	<0,010
Olovo (mg L^{-1})	<0,025	0,198	<0,025
Živa (mg L^{-1})	<0,001	<0,001	<0,001
Nikal (mg L^{-1})	<0,100	<0,001	<0,100
Cink (mg L^{-1})	<0,100	<0,001	<0,100

Rezultati pokazuju da kod većine fizikalno-kemijskih pokazatelja nema značajnijih promjena u koncentraciji tijekom godine (Tablica 6).

Elektrovodljivost i pH vrijednost tijekom cijele godine su u rasponu od 615 do 670 $\mu\text{S cm}^{-1}$, odnosno 7,14 – 7,40 pH jedinica.

Suspendirane tvari su ispod granica detekcije, permanganatni indeks u rasponu od 3,2 do 5,0 $\text{mg O}_2\text{L}^{-1}$, a biokemijska potrošnja kisika u rasponu od 1,1 do 1,8 $\text{mg O}_2\text{L}^{-1}$.

Koncentracija ukupnog dušika tijekom cijele godine je oko 4,00 mg L^{-1} , s time da je koncentracija amonija nešto viša tijekom jeseni (0,050 mg N L^{-1}) u odnosu na zimu (0,006 mg N L^{-1}) i ljeto (0,008 mg N L^{-1}).

Za razliku od amonija, nitriti i nitrati pokazuju trend povećanja koncentracije tijekom zime i ljeta. Tako je u jesen izmjerena koncentracija od 0,005 $\text{mgNO}_2\text{-N L}^{-1}$ a u ljeto sljedeće godine iznosila je 0,33 $\text{mg NO}_2\text{-N L}^{-1}$, dok je koncentracija nitrata u jesen bila 2,2 $\text{mg NO}_3\text{-N L}^{-1}$, a u ljeto sljedeće godine 3,0 $\text{mg NO}_3\text{-N L}^{-1}$.

Koncentracije klorida, sulfata, kalcija i magnezija su tijekom cijele godine sličnih vrijednosti i ne pokazuje velike oscilacije.

Od teških metala, najviše koncentracije izmjerene su kod arsena i olova u uzorku uzorkovanom u zimu 2013. godine. Koncentracija arsena iznosila je 0,670 mg L^{-1} , a olova 0,198 mg L^{-1} . Budući da su ove vrijednosti arsena i olova određene u uzorku iz pijezometra P1 koji je hidrološki uzvodno od odlagališta, navedena kontaminacija se ne može dovesti u izravnu vezu s procjedinim vodama odlagališta, te dodatno ukazuje na važnost redovitog monitoringa podzemnih voda.

Tablica 7. Fizikalno-kemijski sastav podzemne vode uzorkovane na pijezometru P2. Pijezometar P2 nalazi se na središnjem dijelu odlagališta, kod uređaja za pročišćavanje voda, između saniranog i aktivnog dijela odlagališta.

Pokazatelj	Rezultati		
	Jesen, 2013 godine	Zima, 2013 godine	Ljeto, 2014 godine
pH	7,44	7,16	7,24
Elektrovodljivost ($\mu\text{s cm}^{-1}$)	645	665	680
Ukupna tvar sušena (mg L^{-1})	680	674	680
Suspendirana tvar (mg L^{-1})	2	< 2	< 2
KPK (KMnO_4) ($\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$)	5,1	3,2	3,4
BPK ($\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$)	1,6	0,8	1,6
Organski dušik (mg N L^{-1})	0,5	0,3	0,3
Ukupni fosfor (mg P L^{-1})	0,028	0,090	0,110
Kloridi (mg Cl L^{-1})	14,0	18,0	21,0
Sulfati ($\text{mg SO}_4^{2-} \text{ L}^{-1}$)	12,0	14,0	16,0
Kalij (mg L^{-1})	30	32	33
Amonij (mg N L^{-1})	0,060	0,012	0,014
Nitriti (mg N L^{-1})	0,008	0,009	0,010
Nitrati (mg N L^{-1})	3,40	2,60	2,90
Ukupni dušik (mg N L^{-1})	4,20	3,70	3,90
Kalcij (mg L^{-1})	53	51	55
Magnezij (mg L^{-1})	22	24	28
Željezo (mg L^{-1})	< 0,050	< 0,050	< 0,050
Mangan (mg L^{-1})	< 0,050	< 0,050	< 0,050
Flouridi (mg L^{-1})	0,174	0,070	0,090
Arsen (mg L^{-1})	< 0,010	0,510	< 0,010
Kadmij (mg L^{-1})	< 0,010	< 0,010	< 0,010
Krom (mg L^{-1})	< 0,050	< 0,010	< 0,010
Krom (VI) (mg L^{-1})	< 0,010	< 0,010	< 0,010
Olovo (mg L^{-1})	0,028	< 0,025	< 0,025
Živa (mg L^{-1})	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Nikal (mg L^{-1})	< 0,100	< 0,100	< 0,100
Cink (mg L^{-1})	< 0,100	< 0,100	< 0,100

Iz rezultata ispitivanja na pijezometru P2, koji se nalazi između saniranog i aktivnog dijela odlagališta u blizini uređaja za pročišćavana otpadne vode vidljivo je da nema značajnijih promjena u koncentracijama između uzoraka uzorkovanih u jesen 2013. godine, zimu 2013. godine i ljeto 2014. godine (Tablica 7). Izmjerene vrijednosti pokazatelja ukazuju da ne dolazi do prodiranja procjednih voda u podzemlje, a izmjerene vrijednosti vrlo su slične kao i kod pijezometra P1.

Elektrovodljivost i pH vrijednost tijekom cijele godine su se kretale u rasponu od 645 do 680 $\mu\text{S cm}^{-1}$, odnosno 7,16 – 7,44 pH jedinica. Permanganatni indeks bio je u rasponu od 3,2 do 5,1 $\text{mg O}_2\text{L}^{-1}$, a biokemijska potrošnja kisika u rasponu od 0,8 do 1,4 $\text{mg O}_2\text{L}^{-1}$. Koncentracija ukupnog dušika tijekom cijele godine je oko 4,00 mg L^{-1} , a amonij i nitrati imaju višu koncentraciju tijekom jeseni u odnosu na zimu i ljeto. Koncentracije klorida, sulfata, kalcija i magnezija su tijekom cijele godine stabilne i vrlo slične vrijednostima iz pijezometra P1. Koncentracije svih teških metala, osim arsena, su ispod granice kvantifikacije analitičkih metoda, a izmjerena koncentracija arsena iznosi 0,510 mg L^{-1} te je niža nego na pijezometru P1 izmjerena u istom razdoblju.

Tablica 8. Fizikalno-kemijski sastav podzemne voda izmjerena na pijezometru P3. Pijezometar P3 nalazi se na južnoj strani odlagališta, hidrološki nizvodno od smjera toka podzemnih voda.

Pokazatelj	Rezultati		
	Jesen, 2013 godine	Zima, 2013 godine	Ljeto, 2014 godine
pH	7,28	7,18	7,24
Elektrovodljivost ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	745	765	780
Ukupna tvar sušena (mg L^{-1})	88	80	84
Suspendirana tvar (mg L^{-1})	4	< 2	< 2
KPK (KMnO_4) ($\text{mg O}_2\text{L}^{-1}$)	5,4	3,0	3,6
BPK ($\text{mg O}_2\text{L}^{-1}$)	1,9	1,0	1,6
Organski dušik (mg N L^{-1})	0,3	0,3	0,4
Ukupni fosfor (mg P L^{-1})	0,034	0,010	0,012
Kloridi (mg Cl L^{-1})	22,0	19,0	23,0
Sulfati ($\text{mg SO}_4^{2-}\text{L}^{-1}$)	14,0	16,0	19,0
Kalij (mg L^{-1})	34	33	35
Amonij (mg N L^{-1})	0,050	0,010	0,012
Nitriti (mg N L^{-1})	0,005	0,018	0,020
Nitrati (mg N L^{-1})	2,30	2,60	2,70
Ukupni dušik (mg N L^{-1})	3,94	3,60	3,60
Kalcij (mg L^{-1})	58	65	68
Magnezij (mg L^{-1})	30	32	34
Željezo (mg L^{-1})	< 0,050	< 0,050	< 0,050
Mangan (mg L^{-1})	< 0,050	< 0,050	< 0,050
Flouridi (mg L^{-1})	< 0,100	0,650	0,140
Arsen (mg L^{-1})	< 0,010	0,490	< 0,010
Kadmij (mg L^{-1})	< 0,010	< 0,010	< 0,010
Krom (mg L^{-1})	< 0,050	< 0,050	< 0,050
Krom (VI) (mg L^{-1})	< 0,010	< 0,010	< 0,010
Olovo (mg L^{-1})	< 0,025	< 0,025	< 0,025

Živa (mg L ⁻¹)	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Nikal (mg L ⁻¹)	< 0,100	< 0,100	< 0,100
Cink (mg L ⁻¹)	< 0,100	< 0,100	< 0,100

Koncentracije fizikalno-kemijskih pokazatelja kakvoće određeni na pijezometru P3, koji je smješten na južnom dijelu, hidrološki nizvodno od aktivne plohe odlagališta, pokazuju da ne dolazi do prodiranja procjednih voda u podzemlje (Tablica 8). Izmjerene vrijednosti su vrlo slične kao i na pijezometrima P1 i P2. Koncentracija arsena u uzorku uzorkovanom u zimu 2013. godine iznosi 0,490 mg L⁻¹.

Tablica 9. Kemijski sastav neobrađene (sirove) procjedne vode

Pokazatelj	Rezultati		
	Jesen, 2013 godine	Zima, 2013 godine	Ljeto, 2014 godine
pH	8,38	8,14	8,09
Ukupna tvar sušena (mg L ⁻¹)	-	2802	5550
Suspendirana tvar (mg L ⁻¹)	80	78	150
KPK (KMnO ₄) (mg O ₂ L ⁻¹)	1050	673	1653
BPK(mg O ₂ L ⁻¹)	108	174	288
Ukupni fosfor (mg P L ⁻¹)	5,40	6,76	7,37
Ukupni dušik (mg N L ⁻¹)	670	255	315
Kloridi (mg Cl L ⁻¹)	470	390	460
Sulfati (mg SO ₄ ²⁻ L ⁻¹)	205	198	250
Kalij (mg L ⁻¹)	6150	4900	-
Željezo (mg L ⁻¹)	<0,050	<0,050	<0,050
Mangan (mg L ⁻¹)	-	-	0,080
Flouridi (mg L ⁻¹)	2,01	0,445	0,500
Arsen (mg L ⁻¹)	<0,010	0,010	0,022
Kadmij (mg L ⁻¹)	<0,010	<0,010	<0,010
Krom (mg L ⁻¹)	0,060	0,338	0,280
Krom (VI) (mg L ⁻¹)	<0,010	<0,010	<0,010
Olovo (mg L ⁻¹)	0,034	<0,025	<0,025
Živa (mg L ⁻¹)	<0,001	<0,001	<0,001
Nikal (mg L ⁻¹)	<0,100	0,199	0,231
Cink (mg L ⁻¹)	<0,100	<0,100	<0,100

Izmjerene koncentracije fizikalno-kemijskih pokazatelja u procjednoj vodi (Tablica 9.) ukazuju da odlagalište Mraclinska Dubrava spada u stabilizirano odlagalište starosti između 10 i 20 godina (Mukherjee i sur., 2015). Početak odlaganja na prvoj plohi odlagališta bio je 1976. godine i na nju se odlagao otpad do sanacije i zatvaranja 2003. godine. Nakon 2003. godine otpad se odlaže na novu plohu. Procjedne vode koje se skupljaju u lagunu, između te

dvije plohe odlagališta su u prosjeku starosti između 10 i 20 godina što potvrđuju provedena ispitivanja.

Iz rezultata ispitivanja procjedne vode vidljivo je da procjedna voda odstupa po sastavu od podzemnih voda hidrološki uzvodno od odlagališta (pijezometar P1), podzemne voda između stari i nove plohe odlagališta (pijezometar P2) i podzemne voda hidrološki nizvodno od odlagališta (pijezometar P3), te se može pretpostaviti da brtveni sustavi odlagališta otpada Mraclinska Dubrava funkcioniraju i da ne dolazi do prodiranja procjedne vode u podzemlje.

Uz fizikalno-kemijska ispitivanja provedena u laboratoriju, na odlagalištu se provodilo kontinuirano mjerenje manjeg broja pokazatelja kakvoće procjedne vode tijekom cijele godine. Određivanje tih pokazatelja kakvoće provedeno je u laboratoriju koji se nalazi u sklopu uređaja za pročišćavanje otpadne vode.

U tablicama 10 i 11 prikazani su rezultati mjesečnih mjerenja odabranih pokazatelja kakvoće procjedne vode, i to pH, KPK, BPK, ukupni fosfor, ukupni dušik, amonij, nitrati i nitriti, određeni tijekom 2013. i 2014. godine.

Tablica 10. Rezultati mjesečnih mjerenja kakvoće neobrađene (sirove) procjedne vode određeni tijekom 2013. godine.

	Pokazatelj							
	pH	KPK	BPK	Ukupni fosfor	Ukupni dušik	Amonij	Nitrati	Nitriti
Siječanj	7,8	669	48,2	6,0	671	217	6,3	0,2
Veljača	7,8	621	86,8	4,2	484	240	3,4	0,1
Ožujak	7,8	645	45,3	4,1	391	133	3,8	0,1
Travanj	7,9	611	35,7	3,6	476	214	6,5	0,2
Svibanj	8,1	736	94,0	4,9	600	247	7,9	0,1
Lipanj	8,3	968	86,8	4,6	532	228	7,2	0,2
Srpanj	7,9	991	143	5,9	791	273	10,5	0,2
Kolovoz	Nema podataka	Nema podataka	Nema podataka	Nema podataka	Nema podataka	Nema podataka	Nema podataka	Nema podataka
Rujan	8,4	1018	111	5,7	690	227	6,2	0,3
Listopad	8,1	1027	44,2	5,5	707	142	8,9	0,3
Studeni	8,0	984	47,0	5,2	505	117	9,2	0,2
Prosinac	Nema podataka	Nema podataka	Nema podataka	Nema podataka	Nema podataka	Nema podataka	Nema podataka	Nema podataka

Tablica 11. Rezultati mjesečnih mjerenja kakvoće neobrađene (sirove) procjedne vode određeni tijekom 2014. godine.

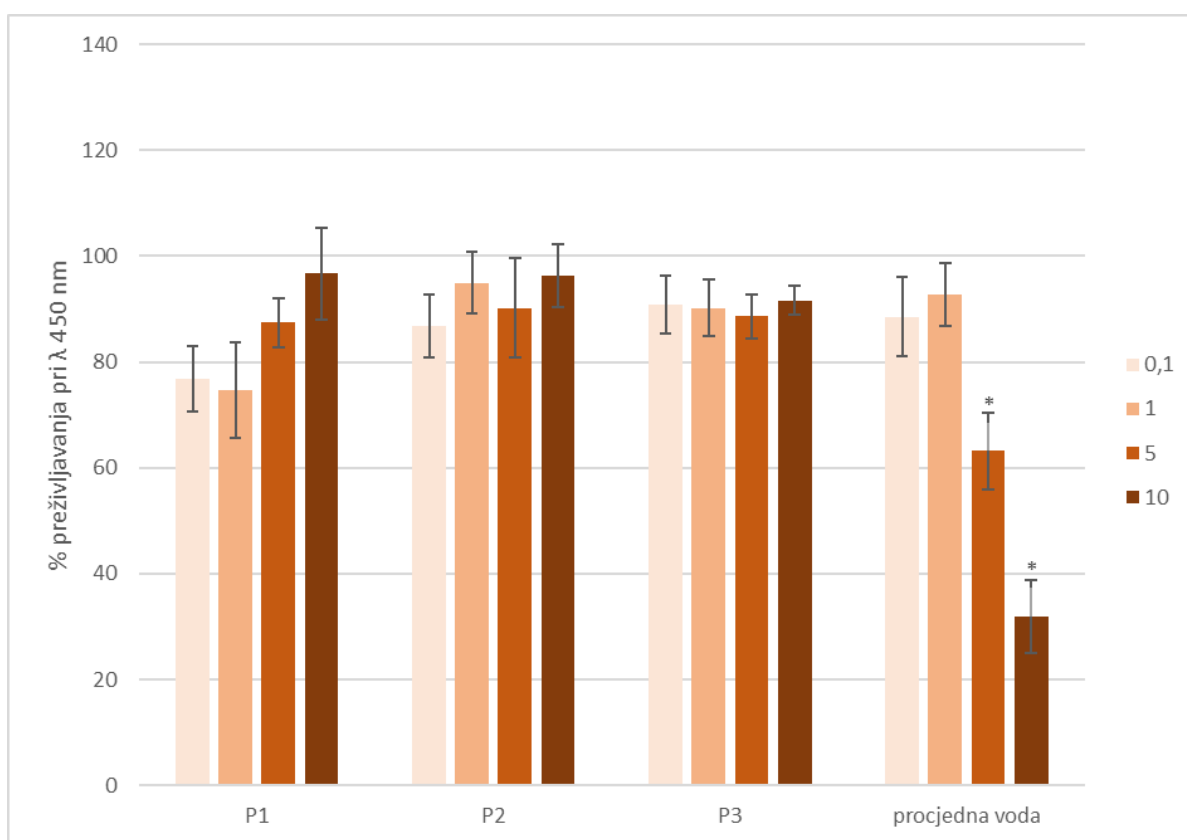
	Pokazatelj							
	pH	KPK	BPK	Ukupni fosfor	Ukupni dušik	Amonij	Nitrati	Nitriti
Siječanj	7,65	1274	51,3	6,52	820	421	12,1	0,186
Veljača	7,74	1120	79,7	6,18	791	316	12,3	0,189
Ožujak	7,83	1323	111	6,84	799	322	12,1	0,250
Travanj	7,90	1347	58,3	6,10	777	257	14,2	0,173
Svibanj	8,07	1588	84,5	7,59	952	431	9,02	0,275
Lipanj	8,28	Nema podataka	Nema podataka	Nema podataka	Nema podataka	Nema podataka	Nema podataka	Nema podataka
Srpanj	7,88	Nema podataka	Nema podataka	Nema podataka	Nema podataka	Nema podataka	Nema podataka	Nema podataka
Kolovoz	7,64	2007	Nema podataka	7,71	872	887	11,0	1,07
Rujan	7,67	1623	Nema podataka	8,53	719	564	8,14	4,20
Listopad	7,90	1533	Nema podataka	7,28	858	520	9,81	0,159
Studeni	8,14	1434	78,0	5,22	659	384	8,10	3,06
Prosinac	7,99	1244	50,0	6,44	491	299	9,89	0,196

4.2 CITOTOKSIČNI UČINAK PROCJEDNE I PODZEMNIH VODA NA STANIČNU LINIJU HEP2 METODOM NEUTRAL RED

Rezultati citotoksičnog učinka procjedne i podzemnih voda prikazani su na slikama 4 - 6.

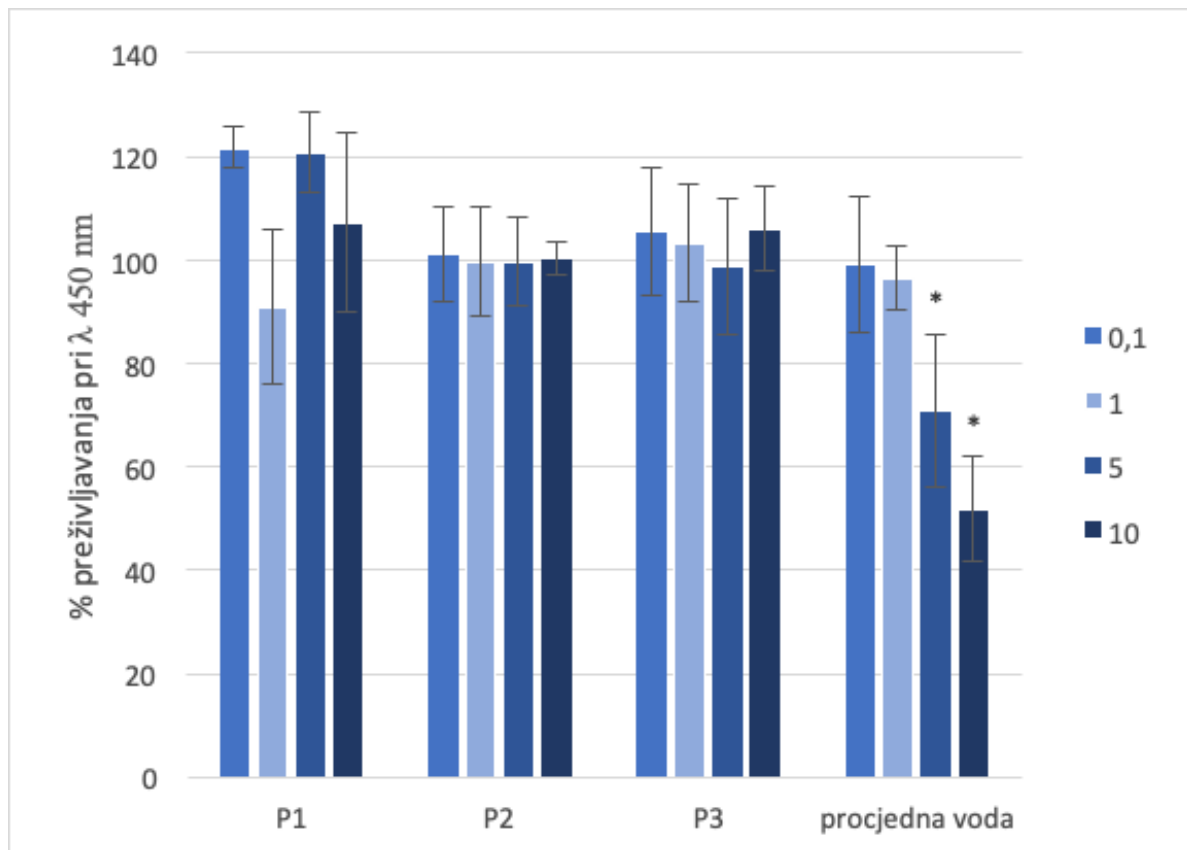
Citotoksični učinak je očitavan nakon 24 sata tretmana i prikazan pri rasponu koncentracija od 0,1 do 10.

Kod uzoraka vode uzorkovanih u jesen 2013. godine podzemna voda hidrološki uzvodno od odlagališta (uzorak P1), podzemna voda između sanirane i aktivne plohe odlagališta (uzorak P2) i podzemna voda hidrološki nizvodno od odlagališta (uzorak P3) nisu pokazali statistički značajnu citotoksičnost u odnosu na negativnu kontrolu. Procjedna voda je pokazala statistički značajnu citotoksičnost stanica kod koncentracija 5,0x i 10,0x u odnosu na kontrolu (Slika 4.).



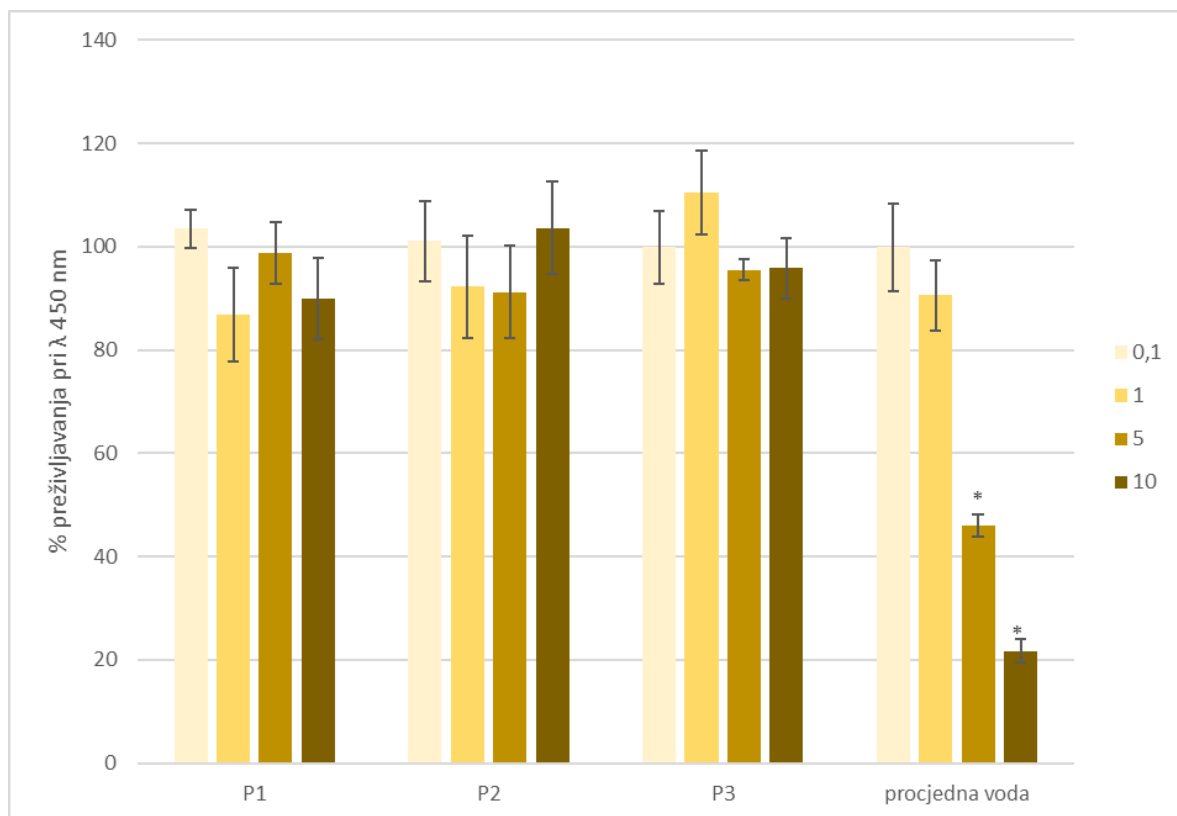
Slika 4. Postotak preživljenja stanica Hep2 u odnosu na negativnu kontrolu, mjereno pri 450 nm. Kod pijezometra P1 (% preživljavanja između $73\pm 11\%$ – $101\pm 15\%$), pijezometra P2 (% preživljavanja između $82\pm 24\%$ – $100\pm 12\%$) i pijezometra P3 (% preživljavanja između $87\pm 14\%$ – $105\pm 19\%$) ne postoji statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu, dok kod procjedne vode dvije najviše koncentracije pokazale su statistički značajnu razliku (označeno zvjezdicom).

Kod uzoraka vode uzorkovanih u zimu 2013. godine podzemna voda hidrološki uzvodno od odlagališta (uzorak P1), podzemna voda između sanirane i aktivne plohe odlagališta (uzorak P2) i podzemna voda hidrološki nizvodno od odlagališta (uzorak P3) nisu pokazali statistički značajnu citotoksičnost u odnosu na negativnu kontrolu. Procjedna voda je pokazala statistički značajnu citotoksičnost stanica kod koncentracija 5,0x i 10,0x u odnosu na kontrolu (Slika 5.).



Slika 5. Postotak preživljenja stanica Hep2 mjeren pri 450 nm u odnosu na negativnu kontrolu. Kod pijezometra P1 (% preživljavanja između $81 \pm 29\%$ – $103 \pm 18\%$), kod pijezometra P2 (% preživljavanja između $92 \pm 18\%$ - $109 \pm 11\%$) i kod pijezometra P3 (% preživljavanja između $98 \pm 18\%$ – $108\% \pm 10\%$) ne postoji statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu. Kod procjedne vode dvije najviše koncentracije pokazale su statistički značajnu razliku (označeno zvjezdicom).

Kod uzoraka vode uzorkovanih u ljeto 2014. godine podzemna voda hidrološki uzvodno od odlagališta (uzorak P1), podzemna voda između sanirane i aktivne plohe odlagališta (uzorak P2) i podzemna voda hidrološki nizvodno od odlagališta (uzorak P3) nisu pokazali statistički značajnu citotoksičnost u odnosu na negativnu kontrolu. Procjedna voda je pokazala statistički značajnu citotoksičnost stanica kod koncentracija 5,0x i 10,0x u odnosu na kontrolu (slika 6).



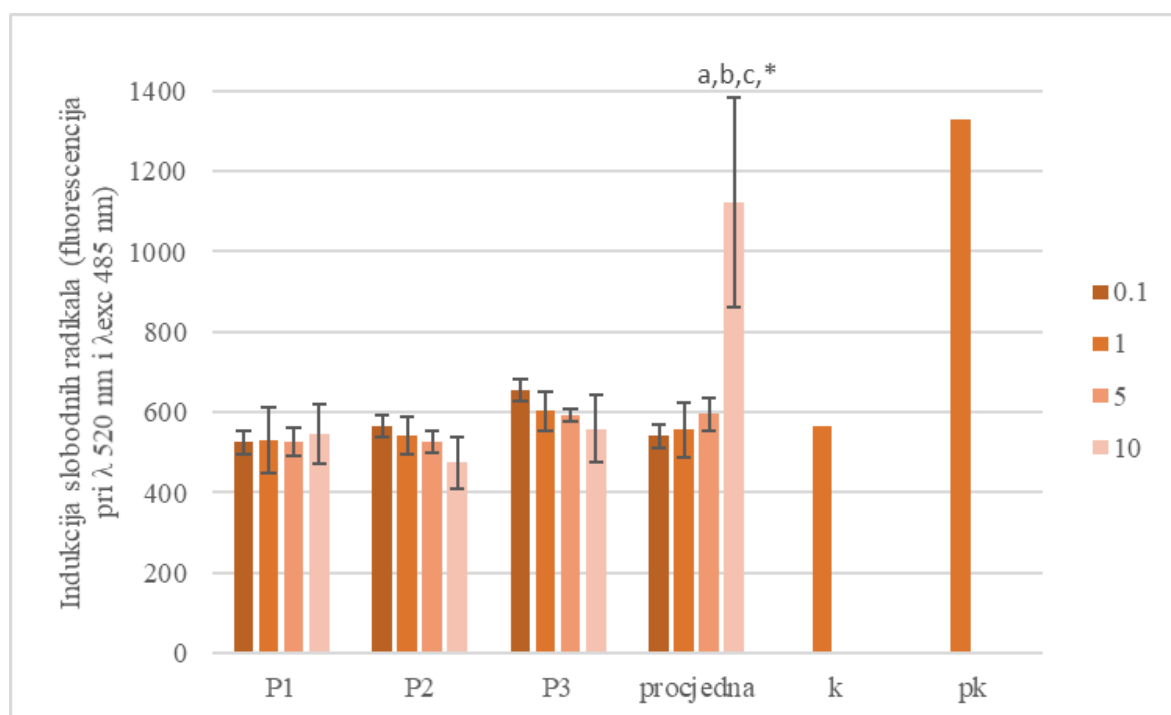
Slika 6. Postotak preživljenja stanica Hep2 mjeren u odnosu na negativnu kontrolu mjeren pri 450 nm. Kod pijezometra P1 (% preživljavanja između $87 \pm 17\%$ – $108 \pm 12\%$), pijezometra P2 (% preživljavanja između $95 \pm 14\%$ – $112 \pm 12\%$) i pijezometra P3 (% preživljavanja između $96 \pm 13\%$ – $117 \pm 16\%$) ne postoji statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu, dok kod procjedne vode dvije najviše koncentracije pokazale su statistički značajnu razliku (označeno zvjezdicom).

4.3. INDUKCIJA SLOBODNIH RADIKALA PODZEMNIM I PROCJEDNIM VODAMA NA STANIČNOJ LINIJI HEP2 METODOM DIKLOROFLUORESCIN-DIACETAT

Indukcija slobodnih radikala određena je nakon 24 sata inkubacije. Prikazana je kao odnos induciranih radikala u stanicama tretiranim vodama i bazalnih radikala izmjerenih u negativnoj kontroli. Postotak indukcije je izražen u usporedbi s preživjelim stanicama.

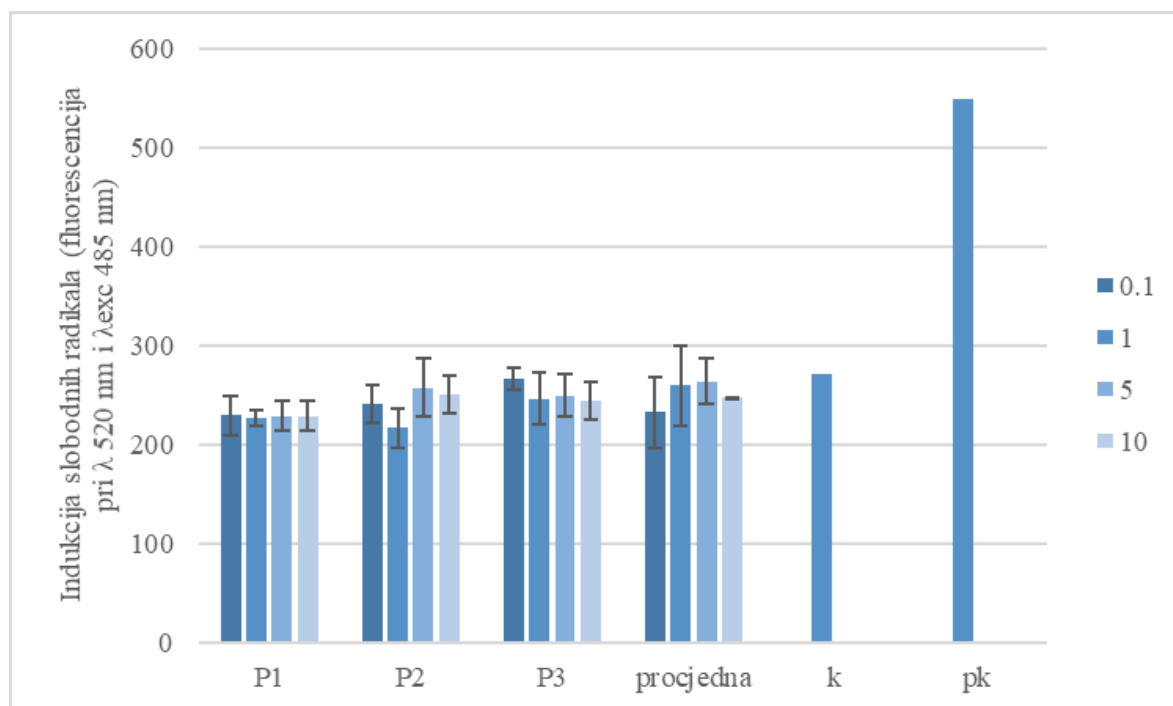
Rezultati istraživanja indukcije slobodnih radikala podzemnim i procjedinim vodama na staničnoj liniji Hep2 prikazani su na slikama 7-9.

Kod uzoraka uzorkovanih u jesen 2013. godine procjedna voda u koncentraciji 10x izaziva indukciju slobodnih radikala u odnosu na negativnu kontrolu (k), te u doznoj ovisnosti u odnosu na niže koncentracije procjedne vode. Podzemna voda hidrološki uzvodno od odlagališta (uzorak P1), između sanirane i aktivne plohe odlagališta (uzorak P2), te hidrološki nizvodno od odlagališta (uzorak P3) ne uzrokuju statistički značajnu indukciju slobodnih radikala (Slika 7).



Slika 7. Indukcija slobodnih radikala u HEP2 staničnoj liniji izazvana podzemnim i procjedinim vodama uzorkovanim tijekom jeseni 2013. godine (označeno zvjezdicom).

Kod uzoraka uzorkovanih u zimu 2013. godine podzemna voda hidrološki uzvodno od odlagališta (uzorak P1), između sanirane i aktivne plohe odlagališta (uzorak P2), te hidrološki nizvodno od odlagališta (uzorak P3) ne uzrokuju statistički značajnu indukciju, kao ni procjedna voda uzorkovana na ulazu u pročistač otpadnih voda (slika 8.).

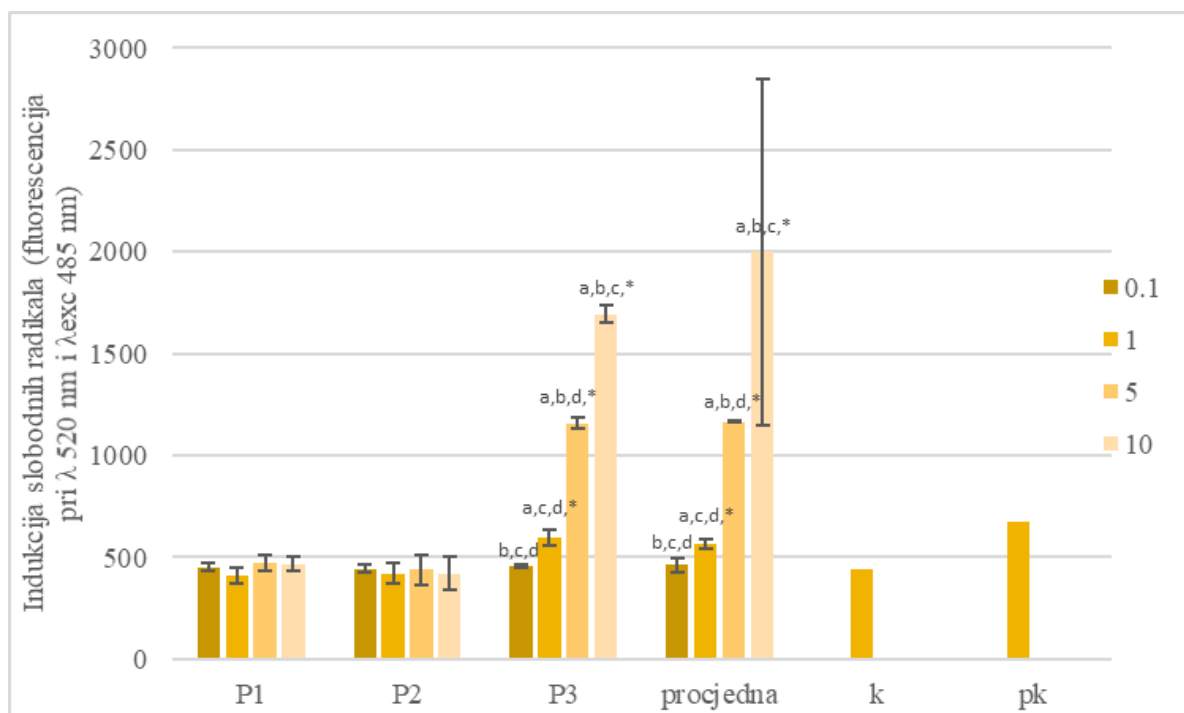


Slika 8. Inducija slobodnih radikala u HEP2 staničnoj liniji izazvana podzemnim i procjednom vodom uzorkovanim tijekom zime 2013. godine (označeno zvjezdicom).

Istraživani uzorci podzemne vode uzorkovani u ljeto 2014. godine hidrološki uzvodno od odlagališta (uzorak P1) i između sanirane i aktivne plohe odlagališta (uzorak P2) ne izazivaju statistički značajnu promjenu u odnosu na kontrolu (Slika 9).

Uzorci podzemne vode uzorkovani na pijezometru P3 (hidrološki nizvodno od odlagališta) izazivaju indukciju slobodnih radikala u odnosu na negativnu kontrolu (koncentracije 1,0x, 5,0x i 10x) i u doznoj ovisnosti u odnosu na niže koncentracije (Slika 9).

Kod procjedne vode koncentracije 1,0x, 5,0x i 10,0x postoji statistički značajno povećanje indukcije slobodnih radikala u odnosu na kontrolu i u doznoj ovisnosti u odnosu na niže koncentracije (Slika 9).



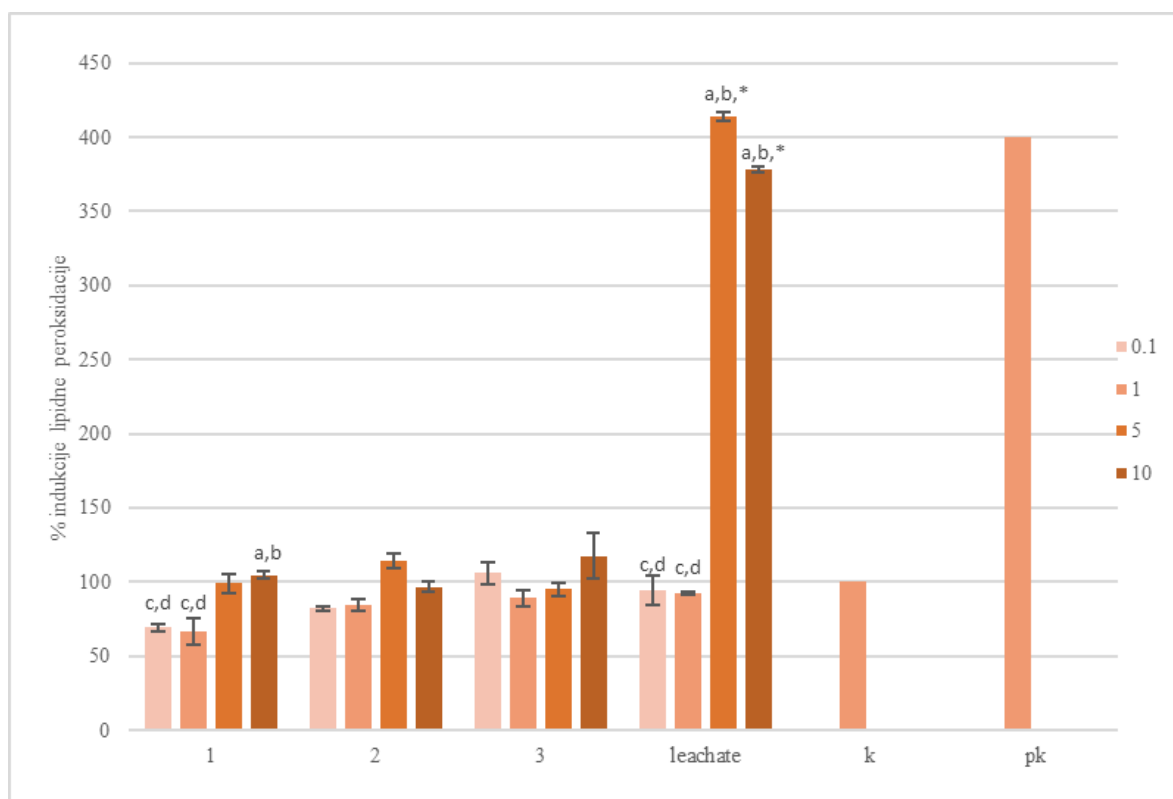
Slika 9. Indukcija slobodnih radikala u HEP2 staničnoj liniji izazvana podzemnim i procjednim vodama uzorkovanim tijekom ljeta 2014. godine (označeno zvjezdicom).

4.4. UČINAK PROCJEDNE I PODZEMNIH VODA NA LIPIDNU PEROOKSIDACIJU NA STANIČNOJ LINIJI HEP2 TBARS METODOM

Rezultati lipidne peroksidacije kao postotak indukcije kompleksa malondialdehid-tiobarbiturna kiselina MDA-TBA za podzemnu i procjedna vodu prikazani su slikama 10-12. Postotak indukcije kompleksa malondialdehida dobiven je na način da se vrijednost koncentracije malonaldehida u ispitivanim uzorcima dobije iz jednadžbe pravca baždarnog dijagrama koji pokazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji kompleksa MDA-TBA. Iz jednadžbe pravca baždarnog dijagrama koji prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji proteina izračunata je pripadajuća vrijednost koncentracije proteina u uzorcima. Postotak indukcije kompleksa malondialdehid-tiobarbiturna kiselina MDA-TBA se dobije usporedbom vrijednost koncentracija kompleksa MDA-TBA i koncentracije proteina.

Istraživani uzorci podzemne vode hidrološki uzvodno od odlagališta (uzorak P1), između sanirane i aktivne plohe odlagališta (uzorak P2), te hidrološki nizvodno od odlagališta (uzorak P3) ne izazivaju statistički značajnu promjenu u odnosu na kontrolu (Slika 10).

Kod procjedne vode koncentracije 5,0x i 10,0x postoji statistički značajno povećanje indukcije lipidne peroksidacije odnosu na negativnu kontrolu i statistički značajno povećanje u odnosu na niže koncentracije (0,1x i 1x) procjedne vode (Slika 10).

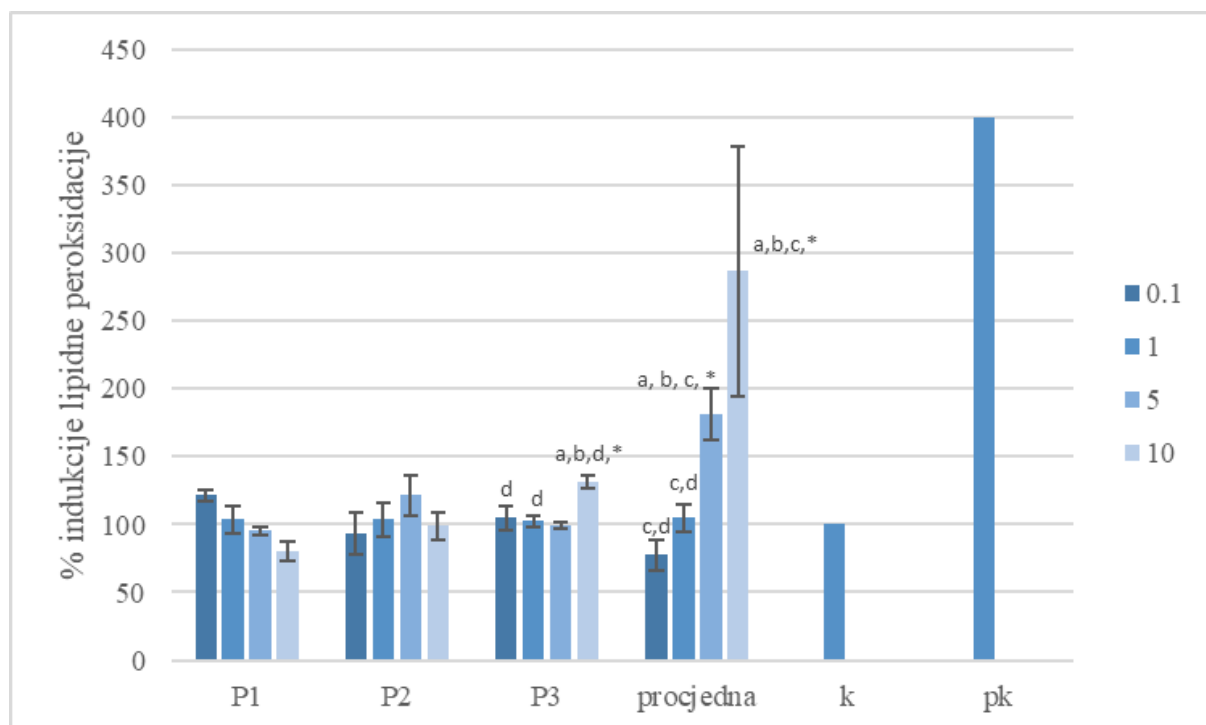


Slika 10. Postotak indukcije lipidne peroksidacije mjereno u odnosu na negativnu kontrolu, jesen 2013. godine. Kod pijezometra P1 (% indukcije između 67% – 105%), pijezometra P2 (% indukcije između 82% – 114%) i pijezometra P3 (% indukcije između 89% – 117%) ne postoji statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu (k), dok kod procjedne vode (% indukcije između 92% – 414%), dvije najviše koncentracije (5x i 10x) pokazale su statistički značajnu razliku (označeno zvjezdicom) u odnosu na negativnu kontrolu (k) i u odnosu na niže koncentracije (0,1x i 1x).

Uzorci podzemne vode hidrološki uzvodno od odlagališta (uzorak P1) i podzemne vode između sanirane i aktivne plohe odlagališta (uzorak P2) ne izazivaju statistički značajnu promjenu u indukciji lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolu (Slika 11).

Podzemna voda hidrološki nizvodno (uzorak P3) izaziva lipidnu peroksidaciju u doznoj ovisnosti i to kod koncentracije 10,0x koje izazivaju statistički značajnu promjenu u indukciji lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolu i u odnosu na koncentracije 0,1x i 1x (Slika 11).

Procjedna voda izaziva lipidnu peroksidaciju u doznoj ovisnosti i to kod koncentracija 5,0x i 10,0x koje izazivaju statistički značajnu promjenu u indukciji lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolu i u odnosu na niže koncentracije (Slika 11).

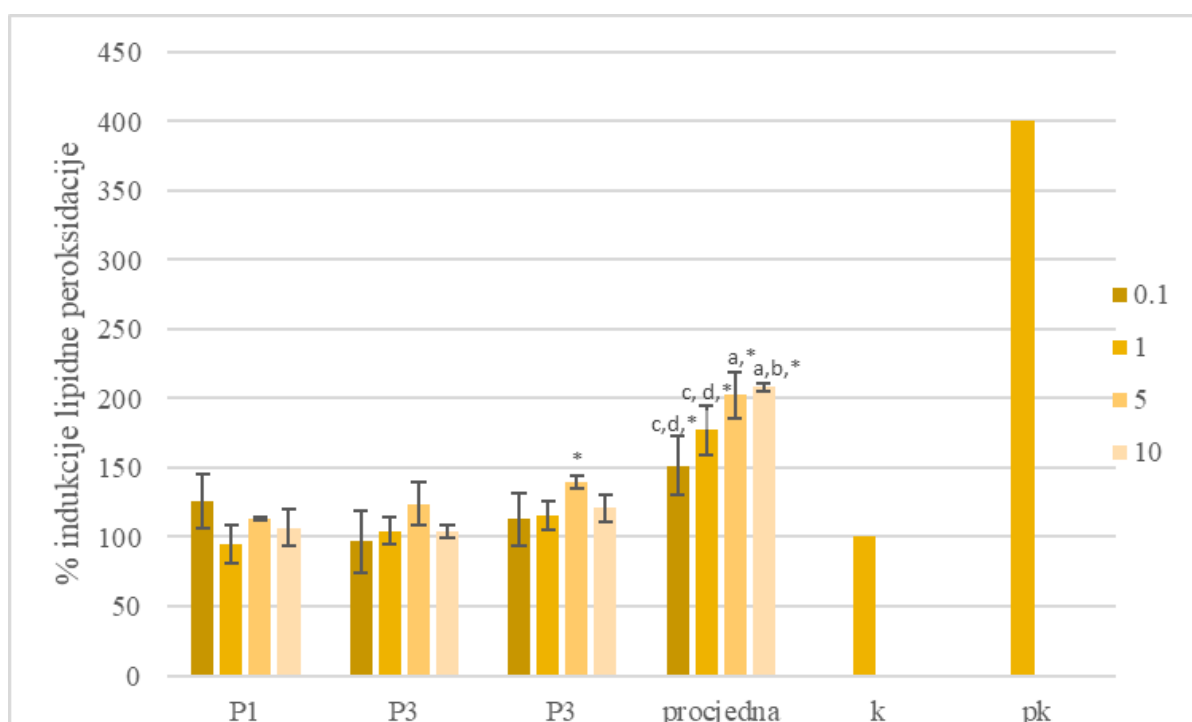


Slika 11. Postotak indukcije lipidne peroksidacije mjereno u odnosu na negativnu kontrolu. Kod pijezometra P1 (% indukcije između 80% – 121%) i pijezometra P2 (% indukcije između 93% – 121%) ne postoji statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu, dok kod pijezometra P3 (% indukcije između 100% – 132%) najveća koncentracija (10x), a kod procjedne vode dvije najveće koncentracije (5x i 10x) pokazale su statistički značajnu promjenu (označeno zvjezdicom) u indukciji lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolu i u odnosu na niže koncentracije (Slika 11).

Uzorci podzemne vode hidrološki uzvodno od odlagališta (uzorak P1) i podzemne vode između sanirane i aktivne plohe odlagališta (uzorak P2) ne izazivaju statistički značajnu promjenu u indukciji lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolu (Slika 12).

Podzemna voda hidrološki nizvodno (uzorak P3) izaziva lipidnu peroksidaciju u doznoj ovisnosti i to kod koncentracije 5,0x koje izazivaju statistički značajnu promjenu u indukciji lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolu (Slika 12).

Procjedna voda izaziva lipidnu peroksidaciju u doznoj ovisnosti i to kod koncentracija 0,1x, 1x 5x i 10x koje izazivaju statistički značajnu promjenu u indukciji lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolu (slika 12).



Slika 12. Postotak indukcije lipidne peroksidacije mjereno u odnosu na negativnu kontrolu. Kod pijezometra P1 (% indukcije između 95% – 126%) i pijezometra P2 (% indukcije između 97% – 124%) ne postoji statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu, dok kod pijezometra P3 (% indukcije između 113% – 139%) koncentracija (5x), a kod procjedne vode dvije najveće koncentracije (5x i 10x) pokazale su statistički značajnu promjenu (označeno zvjezdicom) u indukciji lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolu i u odnosu na niže koncentracije (Slika 12).

4.5 TOČKASTE MUTACIJE IZAZVANE PROCJEDNOM I PODZEMNIM VODAMA NA BAKTERIJSKOM SUSTAVU *Salmonella typhimurium*

U tablicama 12, 13, 14 i 15 nalazi se pregled mutagenog učinka podzemnih i procjednih voda koji se očitao nakon 48 sati inkubacije pri 37 °C. U tablicama je prikazan broj revertanata his⁺ i koeficijent mutacije. Rezultati se odnose na uzorke koji su uzorkovani tijekom jeseni 2013. godine.

Tablica 12. Mutageni učinak podzemne vode hidrološki uzvodno od odlagališta (pijezometar P1) na bakterijski soj *Salmonella typhimurium* TA 98 i TA 100 s i bez dodatka metaboličkog aktivatora (S9) – jesen 2013. godine.

Bakterijski soj <i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i>	koncentracija uzorak P1 (x)	bez metaboličkog aktivatora		sa metaboličkim aktivatorom	
		his ⁺ revertanti**	Qm***	his ⁺ revertanti	Qm
TA 98	0,1	31±19	1,00	58±23	0,96
	1,0	38±18	1,24	56±4	0,93
	5,0	34±12	1,12	61±35	1,01
	10,0	30±10	0,97	22±8	0,36
	NK*	31±5	1	60±14	1
TA 100	0,1	78±8	0,89	120±39	1,09
	1,0	84±6	0,97	97±11	0,88
	5,0	79±4	0,90	30±42	0,27
	10,0	59±5	0,67	116±30	1,05
	NK*	87	1	110±28	1

* - negativna kontrola

** - srednja vrijednost broja poraslih kolonija ± standardna devijacija

*** - (Qm) kvocijent mutacije

Rezultati prikazani u Tablici 12 nam ukazuju da ne postoji mutageno djelovanje podzemne vode na bakterijske sojeve *Salmonella typhimurium* TA 98 i TA 100 s i bez prisustva metaboličkog aktivatora.

Tablica 13. Mutageni učinak podzemne vode između sanirane i aktivne plohe odlagališta (pijezometar P2) na bakterijski soj *Salmonella typhimurium* TA 98 i TA 100 s i bez dodatka metaboličkog aktivatora (S9) – jesen 2013. godine

Bakterijski soj <i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i>	koncentracija uzorak P2 (x)	bez metaboličkog aktivatora		sa metaboličkim aktivatorom	
		his ⁺ revertanti**	Qm***	his ⁺ revertanti	Qm
TA 98	0,1	28±11	0,92	68±13	1,13
	1,0	32±11	1,05	68±13	1,13
	5,0	33±13	1,08	44±5	0,73
	10,0	29±7	0,94	68±28	1,13
	NK*	31±5	1	60±14	1
TA 100	0,1	88±6	1,01	130±33	1,18
	1,0	88±11	1,01	105±11	0,95
	5,0	91±2	1,04	262±22	2,38
	10,0	73±6	0,83	81±16	0,74
	NK*	87	1	110±28	1

* - negativna kontrola

** - srednja vrijednost broja poraslih kolonija ± standardna devijacija

*** - (Qm) kvocijent mutacije

Rezultati prikazani u Tablici 13 nam ukazuju da postoji mutageno djelovanje podzemne vode iz pijezometra P2 na bakterijski soj *Salmonella typhimurium* TA 100 pri koncentracijama 0,1x, 1x, 5x i 10x uz prisustva metaboličkog aktivatora. Na bakterijski soj *Salmonella typhimurium* TA 98 nije uočeno mutageno djelovanje pri niti jednoj koncentraciji

Tablica 14. Mutageni učinak podzemne vode hidrološki nizvodne od odlagališta (pijezometar P3) na bakterijski soj *Salmonella typhimurium* TA 98 i TA 100 s i bez dodatka metaboličkog aktivatora (S9) – jesen 2013. godine

Bakterijski soj <i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i>	koncentracija uzorak P3 (x)	bez metaboličkog aktivatora		sa metaboličkim aktivatorom	
		his ⁺ revertanti**	Qm***	his ⁺ revertanti	Qm
TA 98	0,1	34±12	1,09	72±21	1,19
	1,0	35±12	1,14	138±69	2,29
	5,0	36±18	1,17	45±22	0,74
	10,0	25±13	0,82	32±1	0,53
	NK*	31±5	1	60±14	1
TA 100	0,1	84±7	0,97	98±4	0,89
	1,0	89±10	1,02	95±6	0,86
	5,0	98±5	1,12	100±14	0,91
	10,0	73±4	0,84	143	1,30
	NK*	87	1	110±28	1

* - negativna kontrola

** - srednja vrijednost broja poraslih kolonija ± standardna devijacija

*** - (Qm) kvocijent mutacije

Rezultati prikazani u Tablici 14 nam ukazuju nije uočeno mutageno djelovanje pri niti jednoj koncentraciji na bakterijski soj *Salmonella typhimurium* TA 98 i TA 100 s i bez metaboličkog aktivatora.

Tablica 15 Mutageni učinak procjedne vode na bakterijski soj *Salmonella typhimurium* TA 98 i TA 100 s i bez dodatka metaboličkog aktivatora (S9) – jesen 2013. godine

Bakterijski soj <i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i>	koncentracija procjedna voda (x)	bez metaboličkog aktivatora		sa metaboličkim aktivatorom	
		his ⁺ revertanti**	Qm***	his ⁺ revertanti	Qm
TA 98	0,1	40±18	1,30	54±18	0,89
	1,0	31±12	1,01	252±97	4,20
	5,0	35±15	1,14	128	2,13
	10,0	26±14	0,85	101	1,68
	NK*	31±5	1	60±14	1
TA 100	0,1	94±19	1,07	216±40	1,96
	1,0	98±3	1,13	59±26	0,53
	5,0	94±1	1,07	68±37	0,61
	10,0	200±14	2,30	344±18	3,13
	NK*	87	1	110±28	1

* - negativna kontrola

** - srednja vrijednost broja poraslih kolonija ± standardna devijacija

*** - (Qm) kvocijent mutacije

Rezultati prikazani u Tablici 15 nam ukazuju da postoji mutageno djelovanje na bakterijske sojeve *Salmonella typhimurium* TA 98 i TA 100. Mutageno djelovanje na soj TA 100 je primjećeno na koncentraciji 10x s i bez metaboličkog aktivatora, a na soj TA 98 pri koncentraciji 1x s metaboličkim aktivatorom.

U tablicama 16, 17, 18 i 19 prikazan je pregled mutagenog učinka procjedne i podzemnih voda očitavan nakon 48 sati inkubacije pri 37°C. Prikazan je broj revertanata his⁺ i koeficijent mutacije. Rezultati se odnose na uzorke koji su uzorkovani tijekom zime 2013. godine.

Tablica 16. Mutageni učinak podzemne vode hidrološki uzvodno od odlagališta (pijezometar P1) na bakterijski soj *Salmonella typhimurium* TA 98 i TA 100 s i bez dodatka metaboličkog aktivatora (S9) – zima 2013. godine

Bakterijski soj <i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i>	koncentracija uzorak P1 (x)	bez metaboličkog aktivatora		sa metaboličkim aktivatorom	
		his ⁺ revertanti**	Qm***	his ⁺ revertanti	Qm
TA 98	0,1	30±2	1,11	54±9	1,06
	1,0	29±2	1,07	55±8	1,10
	5,0	31±8	1,15	51±5	1,02
	10,0	22±13	0,82	46±14	0,84
	NK*	27±3	1	50±2	1
TA 100	0,1	137±11	1,12	135±10	0,93
	1,0	141±17	1,16	153±8	1,06
	5,0	121±27	0,99	153±15	1,06
	10,0	101±8	0,83	228±13	1,56
	NK*	122±34	1	150±12	1

* - negativna kontrola

** - srednja vrijednost broja poraslih kolonija ± standardna devijacija

*** - (Qm) kvocijent mutacije

Rezultati prikazani u Tablici 16 nam ukazuju da ne postoji mutageno djelovanje podzemne vode na bakterijske sojeve *Salmonella typhimurium* TA 98 i TA 100 s i bez prisustva metaboličkog aktivatora.

Tablica 17. Mutageni učinak podzemne vode između sanirane i aktivne plohe odlagališta (uzorak P2) na bakterijski soj *Salmonella typhimurium* TA 98 i TA 100 s i bez dodatka metaboličkog aktivatora (S9) – zima 2013. godine

Bakterijski soj <i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i>	koncentracija uzorak P2 (x)	bez metaboličkog aktivatora		sa metaboličkim aktivatorom	
		his ⁺ revertanti**	Qm***	his ⁺ revertanti	Qm
TA 98	0,1	17±7	0,62	63±2	1,26
	1,0	19±8	0,70	47±4	0,94
	5,0	36±5	1,33	52±14	1,04
	10,0	32±4	1,19	54±16	1,08
	NK*	27±3	1	50±2	1
TA 100	0,1	114±10	0,93	143±10	0,96
	1,0	139±13	1,14	155±8	1,01
	5,0	114±18	0,93	139±15	1,03
	10,0	101±10	0,82	140±13	0,93
	NK*	122±34	1	149±12	1

* - negativna kontrola

** - srednja vrijednost broja poraslih kolonija ± standardna devijacija

*** - (Qm) kvocijent mutacije

Rezultati prikazani u Tablici 17 nam ukazuju da ni pri jednoj koncentraciji, s ili bez metaboličkog aktivatora, podzemna voda između sanirane i aktivne plohe odlagališta (pijezometar P2) ne uzrokuje mutageni učinak na bakterijski soj *Salmonella typhimurium* TA 98 i TA 100.

Tablica 18. Mutageni učinak podzemne vode hidrološki nizvodno od odlagališta (uzorak P3) na bakterijski soj *Salmonella typhimurium* TA 98 i TA 100 s i bez dodatka metaboličkog aktivatora (S9) – zima 2013. godine

Bakterijski soj <i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i>	koncentracija uzorak P3 (x)	bez metaboličkog aktivatora		sa metaboličkim aktivatorom	
		his ⁺ revertanti**	Qm***	his ⁺ revertanti	Qm
TA 98	0,1	27±2	1	48±11	0,96
	1,0	27±3	1	61±2	1,22
	5,0	29±8	1,07	57±2	1,14
	10,0	26±7	0,96	46±5	0,92
	NK*	27±3	1	50±2	1
TA 100	0,1	144±16	1,18	138±7	0,86
	1,0	141±21	1,16	179±8	1,11
	5,0	125±13	1,02	149±3	0,93
	10,0	97±14	0,79	169±9	1,05
	NK*	122±34	1	161±37	1

* - negativna kontrola

** - srednja vrijednost broja poraslih kolonija \pm standardna devijacija

*** - (Qm) kvocijent mutacije

Rezultati prikazani u tablici 18 nam ukazuju da ni pri jednoj koncentraciji, s ili bez metaboličkog aktivatora, podzemna voda hidrološki nizvodno od odlagališta (pijezometar P3) ne uzrokuje mutageni učinak na bakterijski soj *Salmonella typhimurium* TA 98 i TA 100.

Tablica 19. Mutageni učinak procjedne vode na bakterijski soj *Salmonella typhimurium* TA 98 i TA 100 s i bez dodatka metaboličkog aktivatora (S9) – zima 2013. godine

Bakterijski soj <i>Salmonella typhimurium</i>	koncentracija uzorak procjedne vode (x)	bez metaboličkog aktivatora		sa metaboličkim aktivatorom	
		his ⁺ revertanti**	Qm***	his ⁺ revertanti	Qm
TA 98	0,1	21 \pm 4	0,78	50 \pm 2	1
	1,0	20 \pm 3	0,74	50 \pm 3	1
	5,0	36 \pm 3	1,33	40 \pm 17	0,80
	10,0	25	0,93	51 \pm 8	1,02
	NK*	27 \pm 3	1	50 \pm 2	1
TA 100	0,1	146 \pm 16	1,19	162 \pm 8	0,98
	1,0	136 \pm 21	1,11	166 \pm 3	1,01
	5,0	129 \pm 13	1,06	172 \pm 7	1,04
	10,0	124 \pm 14	1,02	147 \pm 20	0,89
	NK*	122 \pm 34	1	165 \pm 5	1

* - negativna kontrola

** - srednja vrijednost broja poraslih kolonija \pm standardna devijacija

*** - kvocijent mutacije

Rezultati prikazani u Tablici 19 nam ukazuju da ni pri jednoj koncentraciji, s ili bez metaboličkog aktivatora, procjedna voda ne uzrokuje mutageni učinak na bakterijski soj *Salmonella typhimurium* TA 98 i TA 100.

U tablicama 20, 21, 22 i 23 prikazan je pregled mutagenog učinka procjedne i podzemnih voda očitavan nakon 48 sati inkubacije pri 37°C. Prikazan je broj revertanata his⁺ i koeficijent mutacije. Rezultati se odnose na uzorke koji su uzorkovani tijekom ljeta 2014. godine.

Tablica 20. Mutageni učinak podzemne vode hidrološki uzvodno od odlagališta (pijezometar P1) na bakterijski soj *Salmonella typhimurium* TA 98 i TA 100 s i bez dodatka metaboličkog aktivatora (S9) – ljeto 2014. godine

Bakterijski soj <i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i>	koncentracija uzorak P1 (x)	bez metaboličkog aktivatora		sa metaboličkim aktivatorom	
		his ⁺ revertanti**	Qm***	his ⁺ revertanti	Qm
TA 98	0,1	27±3	1,00	30±4	0,86
	1,0	20±5	0,74	31±2	0,90
	5,0	20±4	0,75	30±2	0,87
	10,0	24±3	0,90	30±6	0,88
	NK*	27±3	1	35±5	1
TA 100	0,1	194±13	1,16	173±12	1,05
	1,0	203±14	1,21	161±17	0,98
	5,0	179±13	1,07	168±14	1,02
	10,0	143±3	0,85	155±12	0,94
	NK*	168±31	1	165±19	1

* - negativna kontrola

** - srednja vrijednost broja poraslih kolonija ± standardna devijacija

*** - (Qm) kvocijent mutacije

Rezultati prikazani u Tablici 20 nam ukazuju da ni pri jednoj koncentraciji, s ili bez metaboličkog aktivatora, podzemna voda hidrološki uzvodno od odlagališta (pijezometar P1) ne uzrokuje mutageni učinak na bakterijski soj *Salmonella typhimurium* TA 98 i TA 100.

Tablica 21. Mutageni učinak podzemne vode između sanirane i aktivne plohe odlagališta (uzorak P2) na bakterijski soj *Salmonella typhimurium* TA 98 i TA 100 s i bez dodatka metaboličkog aktivatora (S9)- ljeta 2014. godine

Bakterijski soj <i>Salmonella typhimurium</i>	koncentracija uzorak P2 (x)	bez metaboličkog aktivatora		sa metaboličkim aktivatorom	
		his ⁺ revertanti**	Qm***	his ⁺ revertanti	Qm
TA 98	0,1	25±1	0,92	28±7	0,82
	1,0	20±1	0,73	38±6	1,11
	5,0	29±7	1,07	34±6	0,99
	10,0	27±9	1,02	33±5	0,96
	NK*	27±3	1	35±5	1
TA 100	0,1	218±16	1,30	159±10	0,97
	1,0	206±9	1,23	165±8	1,00
	5,0	200±15	1,19	173±15	1,05
	10,0	143±3	0,85	192±3	1,17
	NK*	168±31	1	149±12	1

* - negativna kontrola

** - srednja vrijednost broja poraslih kolonija ± standardna devijacija

*** - (Qm) kvocijent mutacije

Rezultati prikazani u Tablici 21 nam ukazuju da ni pri jednoj koncentraciji, s ili bez metaboličkog aktivatora, podzemna voda između sanirane i aktivne plohe odlagališta (pijezometar P2) ne uzrokuje mutageni učinak na bakterijski soj *Salmonella typhimurium* TA 98 i TA 100.

Tablica 22. Mutageni učinak podzemne vode hidrološki nizvodno od odlagališta (uzorak P3) na bakterijski soj *Salmonella typhimurium* TA 98 i TA 100 s i bez dodatka metaboličkog aktivatora (S9) - ljeta 2014. godine

Bakterijski soj <i>Salmonella typhimurium</i>	koncentracija uzorak P3 (x)	bez metaboličkog aktivatora		sa metaboličkim aktivatorom	
		his ⁺ revertanti**	Qm***	his ⁺ revertanti	Qm
TA 98	0,1	31±8	1,14	32±4	0,93
	1,0	20±2	0,76	33±3	0,94
	5,0	27±4	1,00	28±9	0,80
	10,0	25±1	0,92	27±12	0,77
	NK*	27±3	1	35±5	1
TA 100	0,1	219±13	1,31	171±8	1,04
	1,0	238±18	1,42	177±11	1,07
	5,0	204±31	1,21	173±16	1,05
	10,0	210±15	1,26	152±16	0,92
	NK*	168±31	1	165±19	1

* - negativna kontrola

** - srednja vrijednost broja poraslih kolonija \pm standardna devijacija

*** - (Qm) kvocijent mutacije

Rezultati prikazani u tablici 22 nam ukazuju da ni pri jednoj koncentraciji, s ili bez metaboličkog aktivatora, podzemna voda hidrološki nizvodno od odlagališta (pijezometar P3) ne uzrokuje mutageni učinak na bakterijski soj *Salmonella typhimurium* TA 98 i TA 100.

Tablica 23. Mutageni učinak procjedne vode na bakterijski soj *Salmonella typhimurium* TA 98 i TA 100 s i bez dodatka metaboličkog aktivatora (S9) - ljeta 2014. godine

Bakterijski soj <i>Salmonella typhimurium</i>	koncentracija uzorak procjedne vode (x)	bez metaboličkog aktivatora		sa metaboličkim aktivatorom	
		his ⁺ revertanti**	Qm***	his ⁺ revertanti	Qm
TA 98	0,1	25 \pm 3	0,92	38 \pm 8	1,09
	1,0	22 \pm 1	0,82	32 \pm 4	0,91
	5,0	28 \pm 4	1,03	33 \pm 2	0,98
	10,0	26 \pm 6	0,97	32 \pm 3	0,91
	NK*	27 \pm 3	1	35 \pm 5	1
TA 100	0,1	219 \pm 3	1,31	156 \pm 14	0,95
	1,0	157 \pm 19	0,94	172 \pm 18	1,01
	5,0	168 \pm 21	1,00	170 \pm 2	1,03
	10,0	146 \pm 14	0,90	166 \pm 12	1,01
	NK*	168 \pm 31	1	165 \pm 19	1

* - negativna kontrola

** - srednja vrijednost broja poraslih kolonija \pm standardna devijacija

*** - kvocijent mutacije

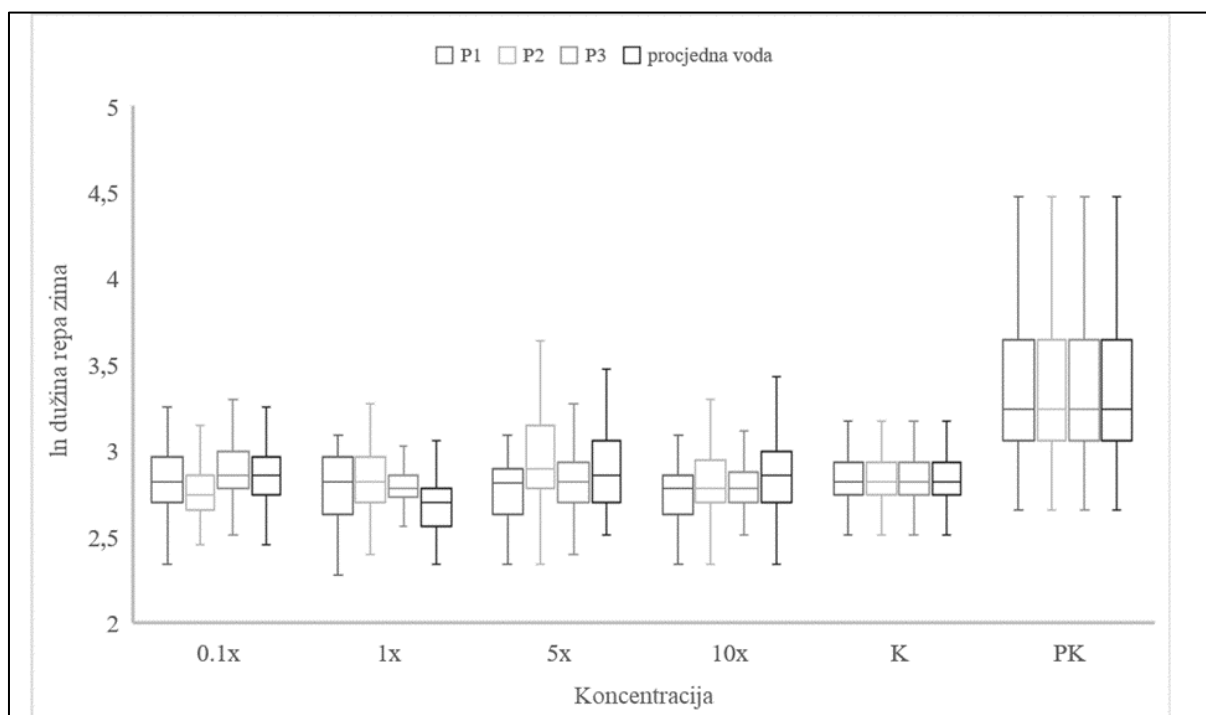
Rezultati prikazani u Tablici 23 nam ukazuju da ni pri jednoj koncentraciji, s ili bez metaboličkog aktivatora, procjedna voda ne uzrokuje mutageni učinak na bakterijski soj *Salmonella typhimurium* TA 98 i TA 100.

4.6. KROMOSOMSKE MUTACIJE IZAZVANE PROCJEDNOM I PODZEMNIM VODAMA NA HEP2 STANIČNOJ LINIJI KOMET TESTOM

Genotoksični učinak procjedne i podzemnih voda se određivao pomoću programa za analizu slike Comet Assay II.

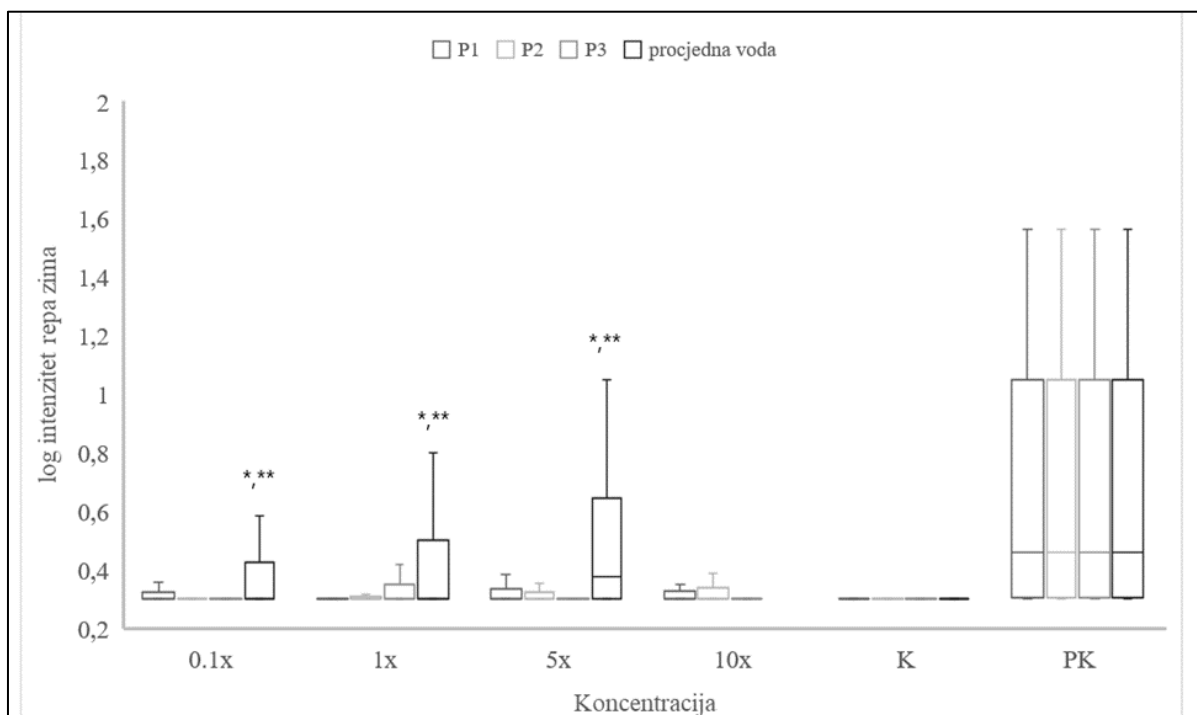
Kromosomska oštećenja su prikazana pomoću parametara dužine repa kometa i intenziteta repa kometa.

Rezultati prikazani na slikama 13 i 14. odnose se na uzorke prikupljene tijekom zime 2013. godine.



Slika 13. Dužina repa kometa stanica HEP2 stanične linije. Rezultati duljine repa kometa uzorka uzetog na piježometru P1 kreću se u rasponu od $2,77 \pm 0,16$ do $2,83 \pm 0,17$, za uzorak uzet na piježometru P2 u rasponu od $2,76 \pm 0,24$ do $2,99 \pm 0,32$, za uzorak uzet na piježometru P3 od $2,80 \pm 0,15$ do $2,92 \pm 0,25$, za procjednu vodu u rasponu od $2,67 \pm 0,20$ do $2,87 \pm 0,23$.

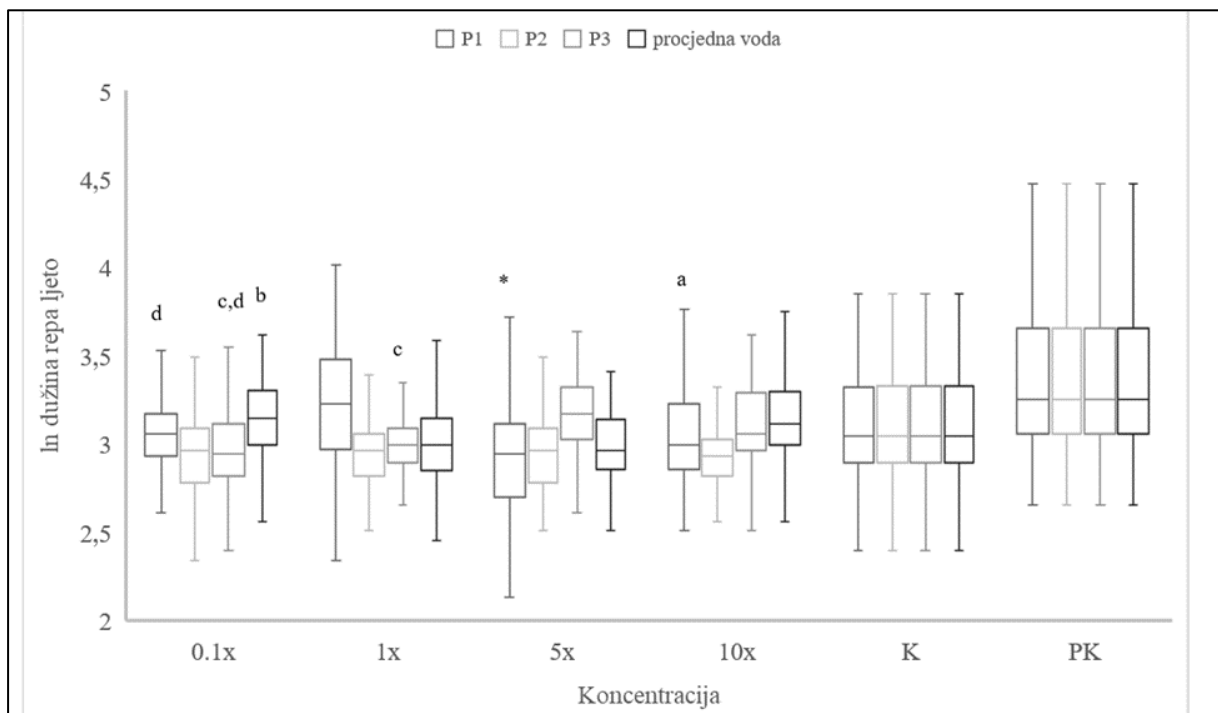
Rezultat (Slika 13) pokazuju da niti jedna koncentracija podzemne vode hidrološki uzvodno od odlagališta (uzorak P1), podzemne vode između sanirane i aktivne plohe odlagališta (uzorak P2), podzemne voda hidrološki nizvodno od odlagališta (uzorak P3) i procjedne vode prije ulaska u pročišćivač ne izazivaju statistički značajnu promjenu u dužini repa kometa u odnosu na kontrolu.



Slika 14. Intenzitet repa kometa stanica HEp2 stanične linije. Rezultati intenziteta repa kometa uzorka uzetog na pijezometru P1 kreću se u rasponu od $0,74 \pm 0,11$ do $0,81 \pm 0,35$, za uzorak uzet na pijezometru P2 u rasponu od $0,77 \pm 0,24$ do $0,84 \pm 0,38$, za uzorak uzet na pijezometru P3 od $0,79 \pm 0,24$ do $0,89 \pm 0,43$, za procjednu vodu u rasponu od $0,83 \pm 0,054$ do $1,25 \pm 0,81$.

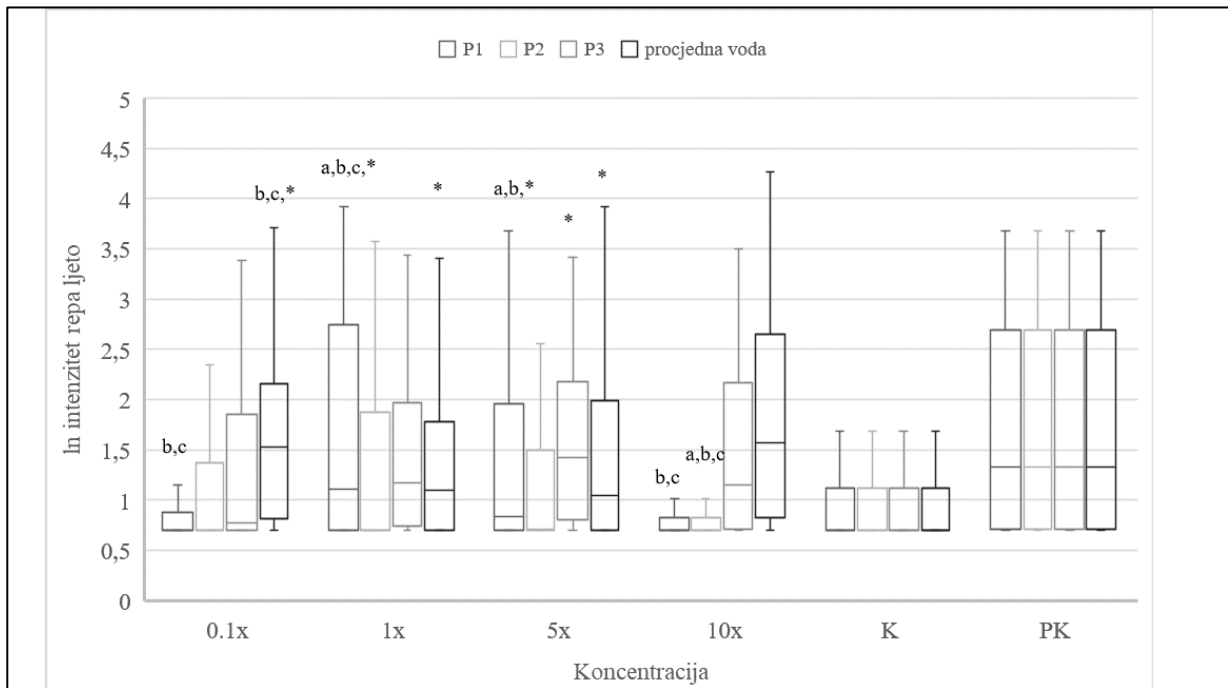
Rezultati (Slika 14) pokazuju da podzemna voda sjeverno od odlagališta (uzorak P1), podzemna voda kod pročišćivača (uzorak P2) i podzemna voda ispod pročišćivača (uzorak P3) ne uzrokuju statistički značajnu promjenu u intenzitetu repa u odnosu na kontrolu. Kod procjedne vode intenzitet repa se statistički značajno mijenja u doznoj ovisnosti.

Rezultati prikazani na slikama 15 i 16. odnose se na uzorke prikupljene tijekom ljeta 2014. godine.



Slika 15. Dužina repa kometa stanica HEp2 stanične linije. Rezultati duljine repa kometa uzorka uzetog na pijezometru P1 kreću se u rasponu od $2,91 \pm 0,39$ do $3,24 \pm 0,32$, za uzorak uzet na pijezometru P2 u rasponu od $2,92 \pm 0,23$ do $2,97 \pm 0,23$, za uzorak uzet na pijezometru P3 od $2,96 \pm 0,23$ do $3,15 \pm 0,21$ za procjednu vodu u rasponu od $2,97 \pm 0,22$ do $3,15 \pm 0,23$.

Rezultati (Slika 15) pokazuju da podzemna voda sjeverno od odlagališta (uzorak P1), podzemna voda kod pročišćivača (uzorak P2) i podzemna voda ispod pročišćivača (uzorak P3) i procjedna voda ne uzrokuju statistički značajnu promjenu u intenzitetu repa u odnosu na kontrolu (Slika 15).



Slika 16. Intenzitet repa kometa stanica HEp2 stanične linije. Rezultati intenziteta repa kometa uzorka uzetog na pijezometru P1 kreću se u rasponu od $0,96 \pm 0,59$ do $1,64 \pm 0,95$, za uzorak uzet na pijezometru P2 u rasponu od $0,96 \pm 0,61$ do $1,35 \pm 0,88$, za uzorak uzet na pijezometru P3 od $1,32 \pm 0,88$ do $1,56 \pm 0,76$ za procjednu vodu u rasponu od $1,36 \pm 0,78$ do $1,78 \pm 1,02$.

Rezultati pokazuju da podzemna voda hidrološki uzvodno od odlagališta (uzorak P1) uzrokuje statistički značajnu promjenu u odnosu na kontrolu, podzemna voda između sanirane i aktivne plohe odlagališta (uzorak P2), podzemna voda hidrološki nizvodno od odlagališta (uzorak P3) ne uzrokuje statistički značajnu promjenu u intenzitetu repa u odnosu na kontrolu, dok procjedna voda uzorkuje statistički značajne promjene u odnosu na kontrolu (Slika 16).

5. RASPRAVA

Procjedna otpadna voda – gospodarenje i procjena rizika za okoliš i ljudsko zdravlje

Rast industrijske proizvodnje i migracija stanovništva iz ruralnih u urbana područja doprinosi kontinuiranom povećanju količine proizvedenog otpada koji svake godine biva odložen na odlagališta otpada kako bi se u kontroliranim uvjetima odvijala njegova razgradnja do inertnog materijala. Godišnje se na nekoliko stotina tisuća odlagališta otpada na svijetu (Jain i sur., 2014) odloži više od 10 milijardi tona miješanog komunalnog otpada (Shu i sur., 2018). Prilikom razgradnje otpada, pod utjecajem oborina, nastaje procjedna voda koja zbog količine i sastava predstavlja potencijalnu opasnost za ljude i okoliš (US EPA 1984). Zbog dotrajalih i neodržavanih brtvenih sustava na odlagalištima otpada postoji realna opasnost da onečišćivala iz procjednih voda prodru u podzemlje i preko podzemnih voda bude transportirana u površinske vode (Baun i sur., 2000). Određivanje potencijalno štetnih tvari u podzemnim i površinskim vodama je složeni zadatak jer izvori zagađena mogu biti različiti, od industrijskih otpadnih voda, poljoprivrede i komunalnog otpada (Gajski i sur., 2012), te je teško utvrditi pravi izvor zagađenja. Dok je utjecaj procjednih voda na podzemne vode bolje istražen i predstavlja glavnu potencijalnu opasnost od zagađenja okoliša vezanu uz odlagalište otpada (Chen i sur., 2016; Han i sur., 2016; Samadder i sur., 2017), broj istraživanja koji se bavi utjecajem procjednih voda na površinske vode je vrlo mali. Istraživanja provedena na njima uglavnom se baziraju na toksičnosti uslijed smanjenja koncentracije kisika i toksičnosti amonija. Jednom kada procjedna voda dospije u okoliš ona posjeduje značajan toksični i genotoksični potencijal za sve vodene organizme (Maqbool i sur. 2011), te s pravom se smatraju jednim od najznačajnijih izvora mogućeg onečišćenja okoliša (Widziewicz i sur., 2012). Toksičnost i količina procjednih voda može varirati ovisno o godišnjem dobu. Tako tijekom ljeta, kada su temperature najviše a količina oborina najniža, očekuje se da će dolaziti do najbrže razgradnje otpada, ali zbog male količine oborina u procjedne vode biti će isprana najmanja količina štetnih tvari. Također tijekom ljetnih mjeseci je i razina podzemnih voda niža nego ostatak godine što dodatno otežava miješanje procjednih i podzemnih voda. Dolaskom jeseni raste i količina oborina, a time i količina štetnih tvari koje se ispiru u procjednu vodu. S povećanjem količine oborina dolazi i do povećanja razine podzemne vode u što dodatno olakšava miješanje procjednih voda s podzemnima i ulazak štetnih tvari u okoliš. Tijekom zime uslijed smanjenja temperatura dolazi do usporavanja razgradnje otpada i smanjuju se koncentracije štetnih tvari u procjednim vodama. Sezonske varijacije i utjecaj oborina na toksičnost procjednih voda potvrđena je i u istraživanju provedenom na

sjemenkama vrste *Sinapis Alba* (Vaverková i sur., 2018). U navedenom istraživanju potvrđeno je da količina oborina utječe na inhibiciju rasta korijena te je zabilježena negativna korelacija (više oborina manja inhibicija rasta korijena) što se dovodi u vezu sa smanjenjem toksičnosti procjednih voda uslijed njihova razrjeđivanja s oborinskim vodama. Utjecaj oborina na toksičnost procjednih voda potvrđuje da je problematika procjene toksičnosti procjednih voda vrlo složena, te da zahtjeva interdisciplinarnu suradnju i upotrebu različitih analitičkih i toksikoloških ispitivanja kako bi što bolje upoznao mehanizam djelovanja procjednih voda na ekosustav.

Uz godišnja doba vrlo važan čimbenik koji utječe na toksičnost procjednih voda je i starost otpada tj. faza razgradnje u kojoj se nalazi otpad koji je odložen na odlagalište. Od trenutka odlaganja otpad prolazi kroz 8 različitih faza razgradnje: aerobna faza, anaerobna (kisela) faza, početna metanogena faza, stabilna metanogena faza, faza oksidacije metana, faza ulaska zraka, faza ugljik dioksida i faza zraka (Kjeldsen i sur. 2002). Trenutno niti jedno odlagalište na Svijetu još nije ušlo u 5 fazu, te podaci o procesu razgradnje otpada u fazama od 5 do 8 su isključivo teorijski. Zato kada govorimo o kontroli i mjerenju utjecaja odlagališta otpada na ekosustav moramo uzeti u obzir da je to područje djelomično neistraženo, te da podaci s kojima raspolažemo o tijeku razgradnje otpada na odlagalištu kroz narednih 50, 100 i više godina su isključivo teorijski. Kako bi se izbjegli mogući negativne posljedice potrebno je razmotriti različite načine i tehnika kontrole utjecaja odlagalište. Moguće je da upravo kombinirani pristup kontrole utjecaja odlagališta na ekosustav, koji uključuje mjerenje fizikalno-kemijskih i bioloških pokazatelja, bude se pokazao kao najbolji za dugoročnu kontrolu utjecaja odlagališta.

Procjedna voda Mraclinska Dubrava – fizikalno-kemijska kakvoća

Procjedne vode odlagališta su složene smjese koje mogu sadržavati veliki broj različitih onečišćivača, a mnogi od njih mogu imati toksične i genotoksične učinke. Kvantifikacija navedenih onečišćivača je otežana jer se može očekivati da veliki broj navedenih komponenti bude prisutan ispod granice detekcije standardnih analitičkih metoda, ali to ne eliminira opasnost za okoliš i bioraznost. Mnoge od tih tvari se smatraju opasnim i u malim količinama i njihov negativni učinak je često uzrokovan višestrukim i sinergističkim djelovanjem više tvari i njihovim produktima transformacije zajedno (Öman i Junestedt, 2008). Ukoliko procjedne vode dospiju u vodonosnik (površinski sloj stijena odgovarajuće poroznosti koji omogućava nakupljanje podzemne vode) dolazi do miješanja procjedne i podzemne vode, te formiranja otopine s potencijalno štetnim učinkom na ekosustav

(Christensen i sur., 2001). Utjecaj odlagališta na kvalitetu podzemne vode bio je predmet brojnih istraživanja, te se pokušao razjasniti s različitih točaka gledišta (Robinson i sur., 1982; Baedeker i Apgar, 1984; Newell i sur., 1990; Kjeldsen i sur., 1993; Meju, 1993; Gailey i Gorelick, 1993; Tejero i sur., 1993; Flyhammar, 1995; Vendrame i Pinho, 1997; Christensen i sur., 2001). Potvrđeno je da i kada su kontaminanti prisutni u vrlo niskim koncentracijama, ispod maksimalno dopuštenih koncentracija prema legislativi za vodu za ljudsku potrošnju, predstavljaju značajnu opasnost za okoliš (Mor i sur., 2006). Prema trenutno važećim zakonima u većini država Svijeta (Sjedinjene Američke Države, Kanada, Europska Unija) kontrola procjednih, podzemnih i površinskih voda provodi se 30 godina nakon prestanka odlaganja otpada na odlagalište. Kako su najstarija odlagališta za koje imamo relevantne podatke stara do 40 godina, i još uvijek su u stabilnoj metanogenoj fazi, s pravom se postavlja pitanje da li je kontrola 30 godina nakon završetka odlaganja dovoljna, te što će biti s utjecajem odlagališta na okoliš nakon 30 godina. Hoće li se on smanjiti ili će i dalje ostati značajan čimbenik i predstavljati potencijalnu opasnost za ljudsku zdravlje i okoliš.

S obzirom na navedene činjenice postoje jasni dokazi da za adekvatnu procjenu rizika kojega procjedne vode odlagališta otpada predstavljaju za ekosustav nije dovoljno samo odrediti fizikalno-kemijski sastav procjedne i podzemne vode, nego je potrebno provesti i ispitivanja na biološkim test sustavima kako bi dobili kompletnu informaciju o toksičnosti procjedne i podzemne vode, te bolje razumjeli složene procese koji se odvijaju u tijelu odlagališta.

Kako su uzorci vode uzeti s odlagališta neopasnog otpada na koje se odlaže uglavnom miješani komunalni otpada, u podzemnoj vodi su se određivale one tvari za koje se smatralo da bi mogle biti prisutne u procjednoj vodi. Prilikom razgradnje i ispiranja otpada nastaju velike količine organske tvari, dušikovi spojevi, kloridi, sulfati i teški metali. Stoga su u uzorcima podzemne vode određivani navedeni pokazatelji kako bi se utvrdilo da li postoji prodiranje procjedne vode u podzemlje, te do koje mjere je procjedna voda opterećena navedenim onečišćivalima.

Procjedna voda Mraclinska Dubrava – biološki test sustavi

Za procjenu genotoksičnog učinka procjedne i podzemnih voda kao biološki test sustav korištena je stanična linija humanog karcinoma grkljana HEP2 na kojoj je određena citotoksičnost, indukcija slobodnih radikala, lipidna peroksidacija i kromosomske aberacije. Za određivanje točkastih mutacija korišteni su sojevi bakterije *Salmonella typhimurium* (TA98 i TA100). Upotrebom navedenih bioanalitičkih tehnika, procjena ukupne toksičnosti uzoraka podzemne i procjedne vode postaje moguća bez određivanja kemijskih spojeva koji su odgovorni za navedeni toksični učinak. Kako su podaci dobiveni navedenim testovima

općeniti ipak mogu poslužiti da se procjeni ukupni toksični učinak nekog uzorka na žive organizme, dok se klasičnim kemijskim metodama može ciljano ispitati pojedini uzorak da se utvrdi koje kemijske komponente uzorka su odgovorne za utvrđenu toksičnost. Kontinuiranim razvojem analitičke opreme granice detekcije i kvantifikacije različitih zagađivala u vodama se znatno spuštaju, te je danas je moguće odrediti koncentracije pojedinih zagađivala koje su u prošlom desetljeću bile nezamislive. Tako se u rutinskim metodama ispitivanja granice detekcije teških metala spuštaju redovno ispod mikrograma po litri, a broj ksenobiotskih tvari koji se određuju je sve veći. Zbog jednostavnijih analitičkih postupaka većina istraživanja ksenobiotskih tvari odnosi se na polarne spojeve kao što su aromatski, klorirani i policiklički ugljikovodici, poliklorirani bifenili, organoklorni pesticidi, dok su istraživanja polarnih ksenobiotika (fenolni spojevi, pesticidi) manje zastupljena. Upravo zbog navedenih mogućnosti toksikoloških ispitivanja da nam ukaže na potencijalno citotoksično i genotoksično djelovanje procjednih voda u ovom istraživanju koristili smo se njima kao alatom za utvrđivanje utjecaja procjednih voda na ekosustav.

Usporedbom dobivenih rezultata, kao i kemijske analize voda, procijenjen je utjecaj procjednih voda na podzemne vode. Odabir lokacija uzimanja uzoraka podzemnih voda temeljio se na smjeru toka podzemne vode i samim time na mogućnost zagađenja podzemnih voda s procjednima. Pijezometar P1 se nalazi hidrološki uzvodno od tijela odlagališta, te procjedne vode ne bi trebale imati utjecaja na podzemne vode uzorkovane na ovom pijezometru. Pijezometar P2 nalazi se hidrološki nizvodno od stare (sanirane i zatvorene) plohe odlagališta, a hidrološki uzvodno od nove plohe (na koju se još odlaže otpad), te bi na podzemne vode uzorkovane na njemu utjecaja trebala imati samo procjedna voda sa starog dijela odlagališta. Pijezometar P3 nalazi se hidrološki nizvodno od odlagališta i na podzemne vode uzorkovane na njemu utjecaj bi trebalo imati cijelo odlagalište.

U provedenim ispitivanjima uočeno je da procjedna voda uzorkovanja tijekom jeseni i zime 2013. godine i ljeta 2014. godine smanjuje vijabilnost stanica, te da se s povećanjem koncentracije procjedne vode pojačava i citotoksični učinak. Iz jednadžbe interpolirane linearne krivulje izračunato je da procjedna voda uzrokovana u jesen 2013. godine ukoncentrirana 7,9x inhibira 50 % stanica HEP2 stanične linije, procjedna voda uzorkovana u ljeto 2014. godine postiže istu inhibiciju pri koncentraciji od 6,9x, dok procjedna voda uzorkovana u zimu 2013. godine u najvećoj ispitanoj koncentraciji od 10x ne postiže 50% inhibiciju stanica HEP2 stanične linije. Uzrok smanjenja citotoksičnosti procjedna vode uzorkovane tijekom zime 2013. godine možda je moguće povezati sa smanjenom koncentracijom amonija u tim uzorcima. Dok je prosječna koncentracija amonija tijekom

2013. godine od siječnja do rujna iznosila 222 mg N L^{-1} , a tijekom 2014. godine 456 mg N L^{-1} koncentracija amonija tijekom listopada, studenog i prosinca 2013. godine iznosila je 130 mg N L^{-1} . Utjecaj amonija na toksičnost procjedne vode utvrđen je i ranije u ispitivanjima provedenim od Clemment i Merlin (2005) i Takuya i sur. (2011), te uklanjanjem amonijaka nitrifikacijom i denitrifikacijom u uređajima za pročišćavanje otpadnih voda moguće je smanjiti toksičnost procjednih voda. Kako unutar tijela odlagališta koja su u početnoj i stabilnoj metanogenoj fazi (3. i 4. faza), zbog metanogenih uvjeta, ne dolazi do razgradnje amonijaka jedini način njegovog uklanjanja je tijekom izluživanja, te koncentracija amonijaka u procjednim vodama može biti vrlo visoko (do 2000 mg N L^{-1}). Jednom kada procjedna voda dospije u lagune u aerobnim uvjetima dolazi do proces nitrifikacije (biološka oksidacija) i amonijak prelazi u nitrite i dalje iz nitrita u nitrate, te se postepeno smanjuje njegova koncentracija u procjednoj vodi. Kako su koncentracije ostalih zagađivala u procjednoj vodi vrlo visoke ona vrlo često, ako nema obrade na UPOV-u, ne zadovoljava kriterije navedene u Pravilniku o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (NN 80/13, 43/14, 27/15 i 3/16) za ispuštane u sustav javne odvodnje, te se vraća na tijelo odlagališta. Vraćanjem vode na tijelo odlagališta dodatno se pospješuje i ubrzava proces razgradnje otpada na odlagalištu, ali se i ponovno povećava koncentracija amonija u procjednim vodama. Istraživanje provedeno na 50 njemačkih odlagališta utvrdilo je da 30 godina nakon prestanka odlaganja otpada nije došlo do značajnijeg smanjenja koncentraciji amonija u procjednoj vodi (Krumpelbeck i Ehrig, 1999). Pošto je vraćanje procjedne vode na tijelo odlagališta koristan proces vrijedilo bi zadržati tu praksu, ali na ovaj način postoji opasnost da se koncentracija amonijaka i ostalih štetnih tvari u procjednoj vodi znatno poveća, te bi bilo dobro zakonski regulirati kriteriji za procjednu vodu koja se smije vratiti na tijelo odlagališta. Tako bi se primoralo odlagališta da investiraju u izgradnju i održavanje različitih tipova uređaja za pročišćavanje otpadnih voda i/ili povećaju kapacitete i funkcionalnost sabirnih bazena, ali pri tome treba voditi računa da nije svaka tehnologija jednako funkcionalan u pročišćavanje procjednih voda odlagališta. Za razliku od većine industrijskih i sanitarno-fekalnih otpadnih voda procjedne vode odlagališta se odlikuju manjom biorazgradivošću, te klasični biološki uređaji za pročišćavanje voda neće biti jednako funkcionalni kod pročišćavanja procjednih voda kao što su kod ostalih otpadnih voda. Istraživanje na procjednim vodama, provedeno od Klauck i sur., 2017., pokazalo je da se primjenom naprednih oksidacijskih tehnika (AOP) u obradi procjednih voda može postići znatno veći stupanj pročišćavanja, nego biološkom obradom. Primjenom elektrokemijske oksidacije pri lužnatom pH postigli su smanjenje organske tvari preko 50% i u potpunosti uklonili amonijak prisutan u procjednoj vodi. Dobiveni produkti razgradnje organske tvari

imali su smanjenju citotoksičnost i genotoksičnost što je potvrđeno ispitivanjima na test sustavu *Allium cepa*.

Uz navedene metode smanjena i kontrole amonijaka u procjednim vodama vrlo važnu ulogu ima razvrstavanje otpada i mehaničko biološka obrada otpada prije odlaganja na deponij. Glavni izvor amonijaka u miješanom komunalnom otpadu su proteini (Kjeldsen i sur. 2002), te ukoliko se na odlagalište otpada odlaže otpad bez prethodnog sortiranja ili mehaničko biološke obrade u regionalnim centrima za gospodarenje otpadom za očekivati je da koncentracija amonijaka u procjednim vodama bude više nego u sortiranom tj. obrađenom otpadu. To je još jedan od razloga zašto je u vrlo je važno što prije započeti sa praksom razvrstavanja otpada na kućnom pragu kako bi se udio kuhinjskog otpada, kojega je trenutno oko 30%, sveo na najmanju moguću mjeru i samim time smanjila koncentracija amonijaka u procjednim vodama.

Istraživanja provedena na biljnim i životinjskim organizmima pokazala su da procjedna voda uzrokuje smrtnost izloženih organizama koja je različita u ovisnosti na koncentraciju procjedne vode. Analizom akutne toksičnosti na *Artemia* sp. utvrđeno je da procjedna voda koja je 70% koncentrirana izaziva 50 %-tno smanjenje preživljenja (Bortolotto i sur., 2009). Li i sur. (2008) i Awasti i sur., (2017) dokazali su da procjedne vode pri visokim koncentracijama inhibiraju klijanje, rast i staničnu diobu kod *Triticum aestivum*. Ovakve razlike u indukciji citotoksičnog učinka se pripisuju različitom kemijskom sastavu otpada i različitim test sustavima. Prema US EPA (1988) kalcijevi, magnezijevi i kalijevi kloridi su toksičniji od natrijevog-klorida te na temelju toga su, prilikom kemijske karakterizacije odlagališne procjedne vode, Öman i Junestedt (2008) zaključili su da je povećana toksičnost vode uzrokovana kloridnim spojevima ($390\text{--}4600\text{ mg L}^{-1}$), ovisno o oborinama i godišnjem dobu. U procjednoj vodi s odlagališta Mraclinska Dubrava koncentracija klorida bila je u prosjeku 440 mg L^{-1} što odgovara vrijednostima kloridnih spojeva dobivenih u istraživanju Öman i Junestedt (2008). Provedena istraživanja na korelaciji između koncentracija fizikalno-kemijskih pokazatelja i akutne toksičnosti procjedne vode na organizme *Daphnia magna* i *Xenopus laevis* potvrdili su vezu između koncentracije amonija, alkaliteta, klorida i kemijske potrošnje kisika s toksičnosti procjedne vode (Pablos i sur, 2011).

Za razliku od procjedne vode podzemna voda kod svih ispitanih koncentracija nije pokazala statistički značajnu citotoksičnost. Što nam potvrđuje da su brtveni sustavi na odlagalištu otpada Mraclinska dubrava funkcionalni i da ne dolazi do prodiranja procjedne vode u tlo, a samim time i u podzemne vode.

Istraživanje provedeno od strane Gill i Tuteja (2010) pokazalo je da oksidativni stres može biti izazvan povećanjem produkcije slobodnih kisikovih radikala i/ili smanjenjem sposobnosti stanica da uklone nastale slobodne kisikove radikale. U istraživanju Siddiquet i sur. (2008) je prikazan podatak da procjedne vode nastale u štavionici kože statistički značajno utječu na indukciju prooksidativnog djelovanja što su zaključili iz povećane koncentracije slobodnih kisikovih radikala, aktivnosti antioksidacijskih enzima i povećane koncentracije MDA. Sang i Li (2005) su dokazali da procjedna voda uzrokuje kromosomske lomove u koštanoj srži miša, a mogući uzrok kromosomskih lomova je formiranje slobodnih radikala preko autooksidacije ili oksidacije organskih spojeva procjedne vode.

U ovom istraživanju prilikom određivanja prooksidativnog učinka iz dobivenih rezultata vidljivo je da procjedna voda uzorkovana u jesen 2013. kod koncentracije 10x i ljeto 2014. godine kod koncentracije 5x i 10x ima statistički značajno povećanje indukcije slobodnih radikala u odnosu na kontrolu, dok uzorci procjedne vode uzorkovani u zimu 2013. godine nisu pokazali statistički značajno povećanje. Kako su dobiveni rezultati u korelaciji s rezultatima određivanja citotoksičnosti, kod kojih je najviši izmjereni postotak preživljavanja stanica, uzimajući u obzir samo koncentracije koje izazivaju statistički značajno smanjenje preživljavanja, bio na uzorcima procjedne vode uzetim u zimu 2013. godine, može se zaključiti da u ispitanim uzorcima dolazi do povećanja indukcije slobodnih kisikovih radikala uslijed smanjenja sposobnosti stanica da uklone nastale radikale nastalog zbog citotoksičnosti. Svi ispitani uzorci podzemne vode i procjedna voda nižih koncentracija (0,1x, 1x) u niti jednom slučaju nisu izazvali statistički značajnu indukciju slobodnih radikala. Prilikom tretiranja stanica nije došlo do narušavanja staničnog integriteta, te je stanični mehanizam za uklanjanje slobodnih kisikovih radikala ostao funkcionalan i uspio ukloniti višak slobodnih kisikovih radikala nastalih uslijed izlaganja stanica podzemnim vodama i procjednim vodama niskih koncentracija (Li i sur., 2016).

Rezultati dobiveni TBARS metodom ukazuju da procjedne vode uzorkovana u jesen i zimu 2013. godine i ljeto 2014. godine uzrokuje peroksidaciju lipida koja je statistički značajna pri koncentracijama 5x i 10x. Malondialdehid je jedan od indikatora oksidativnog oštećenja stanične membrane nastalog kao posljedica prekomjerne produkcije slobodnih kisikovih radikala uslijed oksidativnog stresa (Pompelli i sur., 2010), te se peroksidacija lipida može dovesti u vezu s povećanom produkcijom slobodnih kisikovih radikala tj. smanjenjem sposobnosti stanica da uklone slobodne kisikove radikale. Fluoridi prisutni u procjednim i u podzemnim vodama mogu izazvati kronične degenerativne bolesti, povećanje reaktivnih kisikovih vrsta i lipidne peroksidacije (Inkielewicz-Stepniak i sur., 2008; Gao i sur., 2008).

Iako je fluor sveprisutan element u okolišu i u malim koncentracijama ima profilaktički učinak u višim koncentracijama može imati neželjene posljedice. Istraživanje provedeno od strane (Belle i sur. (2011) pokazalo je da pretjerano izlaganje fluoridu može oštetiti redoks ravnotežu stanica u tkivima, smanjiti antioksidacijski kapacitet u mozgu, te povećati toksične učinke na visceralne organe posredovanjem djelovanja ROS-a i lipidne peroksidacije. Kod uzoraka podzemne vode statistički značajnu lipidnu peroksidaciju pokazali su uzorci uzorkovani na pijezometru između starog i nove plohe (pijezometar 2) u ljeto 2014. godine, no usporedbom dobivenih vrijednosti negativne kontrole koja je u ljeto 2014. godine bila znatno niža nego u zimu 2013. godine možda bi bilo ispravnije zaključiti da niti jedan uzorak uzet u ljeto 2014. godine nije izazvao statistički značajnu lipidnu peroksidaciju.

Mutageni učinak procjedne i podzemnih voda testiran je na bakterijskom soju *Salmonella typhimurium* TA98 i TA100 s i bez metaboličkog aktivatora. Procjedna voda uzorkovana u jesen 2013. godine izazivala je mutageni učinak na sojevima TA 100 (s i bez metaboličkog aktivatora) i na soju TA 98 s metaboličkim aktivatorom. Kod soja TA 100 bez metaboličkog aktivatora mutageni učinak je izmjeren na koncentraciji od 10x, a s metaboličkim aktivatorom mutageni učinak je izmjeren pri koncentraciji 0,1x. Kod soja TA 98 s metaboličkim aktivatorom mutageni učinak je izmjeren pri koncentracijama 1,0x, 5,0x i 10,0x. Na ostalim uzorcima procjedne vode nije zabilježen mutageni učinak, međutim vidljiv je blagi trend pada broja stanica kod oba soja što se može pripisati citotoksičnom učinku procjednih voda. Sama mutagena aktivnost procjedne vode je dosta upitna jer postoji mogućnost da zbog citotoksičnosti ne može biti detektirana povećana mutagenost pri velikim koncentracijama. Osim toga tijekom ispitivanja mutagenosti kod pojedinih koncentracija zabilježena je promjena broja stanica u odnosu na negativnu kontrolu koja nije statistički značajna, te se može pripisati velikim mjernim nesigurnostima kada se radi s biološkim materijalom. Utvrđeni mutageni učinak u procjednim vodama uzorkovanim u jesen 2013. godine možda je moguće povezati sa sinergističkim učinkom niskih koncentracija metala i ksenobiotskih zagađivala kao što su poliklorirani bifenili (PCB), policiklički aromatski ugljikovodici (PAH), poliklorirani dibenzodoksini (PCDD) i poliklorirani dibenzofurani (PCDF) (Wangi sur., 2017). Međutim potrebna su dodatna ispitivanja kako bi pouzdano mogli tvrditi da postoji sinergistički učinak između ksenobiotskih kontaminanata i teških metala. Iako se, u do sada provedenim istraživanjima, teški metali, zbog vrlo male koncentracije, ne smatraju bitnim čimbenikom koji pridonosi toksičnosti procjednih voda (Christensen i sur., 1999; Robinson, 1995; Reinhart i Grosh, 1999; Revans i sur., 1999; Kjeldsen i Christophersen, 2001) sama činjenica da vrlo mali udio metala koji se nalazi u otpadu, zbog uvjeta koji vladaju o tijelu

odlagališta tijekom prve 4 faze i sposobnosti metala da se apsorbiraju i talože, bude izlužen u procjedne vode. Tako se procjenjuje da iz otpada koji je odložen prije 30 godina manje od 0,02% teških metala je do sada izluženo, no postoji mogućnost da različiti procesi koji mogu nastati u kasnijim fazama razgradnje otpada mogu potaknuti izluživanje metala i značajno povećanje njihove koncentracije u mobilnoj vodenoj fazi (Kjeldsen i sur., 2002). Podzemne vode uzorkovane u zimu 2013. godine i ljeto 2014. godine nisu izazvale mutageni učinak. Za razliku od njih podzemna voda uzorkovana u jesen 2013. godine izazvala je mutageni učinak na piježometru između sanirane i aktivne plohe odlagališta (P2) kod soja TA 100 s metaboličkim aktivatorom i na piježometru hidrološki nizvodno (P3) kod sojeva TA 98 i TA 100 s metaboličkim aktivatorom. Fizikalno-kemijski sastav podzemnih voda uzorkovanih u jesen i zimu 2013. godine i ljeto 2014. godine nema bitnih razlika koje bi mogle dovesti do navedenih razlika u mutagenosti, stoga je vjerojatno da utvrđena mutagenost ima drugo porijeklo. U mnogim radovima (Singh i sur., 2007; Chakraborty i Mukherjee, 2009) se mutagena svojstva povezuju se prisutnošću teških metala, a najviše su istaknuti As, Cd, Cu, Fe, Mn, Pb, Zn, Cr i Ni. Većina ovim metala su poznati genotoksični agensi te ispoljavaju individualni ili sinergistički učinak. Upravo međusobni sinergistički učinak metala, kao i sinergistički učinak metala sa ksenobioticima je mogući uzrok povećane mutagenosti podzemnih voda uzorkovanih u jesen 2013. godine. Kako bi se moglo bolje istražiti da li postoji korelacija između koncentracije teških metala i mutagenosti dobro bi bilo dodatno izmjeriti koncentraciju teških metala tehnikama koje imaju bolju osjetljivosti i nižu granicu detekcije. Jedna od takvih tehnika je ICP-MS koji omogućava detekcije i kvantifikacije elemenata u nanogramskim količinama.

Procjedna voda uzorkovana u zimu 2013. godine ne uzorkuje statistički veću duljinu repa kometa u odnosu na kontrolu, ali uzrokuje statistički veći intenzitet repa kometa u odnosu na kontrolu pri koncentracijama od 1,0x i 5,0x. Uzorci podzemne vode uzorkovane u ljeto 2014. godine na piježometru P1 uzorkuju statistički značajno povećanje intenziteta i duljine repa u odnosu na kontrolu. Pošto se navedeni piježometar nalazi hidrološki uzvodno od tijela odlagališta genotoksični učinak je vjerojatno posljedica primjene pesticida na poljoprivrednim površinama u okolici. Uzorci uzeti na piježometru P2 i P3 ne pokazuju statistički značajnu razliku, dok uzorci podzemne vode pokazuju statističku značajnu razliku u odnosu na kontrolu. Utvrđeni genotoksični učinak procjedne vode u skladu s rezultatima sličnih istraživanja koja su također utvrdili genotoksični učinak procjednih voda (Gajski i sur, 2012). Kemijski sastav procjednih voda u istraživanju od Gajski i sur. (2012) se razlikovao od procjednih voda u ovom istraživanju, te je imao nešto više koncentracije amonijaka i željeza, te

je izraženiji genotoksični učinak tih procjednih voda povezan s navedenim zagađivalima. Nadalje, istraživanja provedena na vinskoj mušici *Drosophila melanogaster* tretiranoj s procjednim vodama iz štavionice pokazuju proporcionalno povećanje dužine repa kometa povećanjem koncentracije procjednih voda iz štavionice, odnosno ukazuju na njihovu genotoksičnost (Siddique i sur., 2005). Ove vode za razliku od procjednih voda s odlagališta otpada Mraclinska Dubrava sadrže znatno veće količine teških metala poput kroma, željeza, mangana, nikla, olova i cinka, dok procjedne vode s odlagališta Mraclinska Dubrava ne sadrže detektabilne vrijednosti navedenih metala.

Podzemne vode uzorkovane u zimskom periodu na pijezometru koji se nalazi hidrološki uzvodno (P1), između sanirane i aktivne plohe (P2) i hidrološki nizvodno (P3) ne uzrokuju promjenu u dužini i intenziteta repa koja bi bila statistički značajna, te se ne smatraju genotoksičnima.

Kako je dosadašnja praksa kontrole utjecaja odlagališta na okoliš vezana uz propisivanje obaveznih periodičnih mjerenja podzemne, površinske i procjedne vode prema okolišnoj dozvoli, te uspoređivanje dobivenih koncentracija s maksimalno dopuštenim koncentracijama (MDK) prema hrvatskim pravilnicima i uredbama moguće je da potencijalno toksične vode budu ispuštene u okoliš čime bi se moglo ugroziti zdravlje ljudi. Iako je provedeno dosta istraživanja još uvijek nije moguće jasno kvantificirati opasnost koju odlagališta otpada predstavljaju na zdravlje ljudi. Do sada je poznato da visoke koncentracije toksičnih metala i metaloida (arsen, živa) i drugih kontaminanata (nitrati) ukoliko im ljudi budu izloženi mogu izazvati bolesti kao što su minamata sindrom i sindrom plave bebe (Samadder i sur., 2017). Iz provedenih ispitivanja mutagenosti podzemnih voda vidljivo je da iako su koncentracije ispitanih fizikalno-kemijskih tvari unutar maksimalno dopuštenih granica, vode ipak imaju mutageni učinak koji može biti posljedica toksičnog djelovanja spojeva koji nisu uključeni u istraživanje i/ili sinergističkog djelovanja različitih kontaminanata. Dodatno proširivanje popisa pokazatelja koji se ispituju u redovnoj kontroli voda odlagališta nije idealno rješenje, vjerojatno bi trebalo uvesti nove tehnike ispitivanja koje bi mogle utvrditi da li je voda opasna za okoliš i ljude. Ako se na ovaj način utvrdi potencijalna toksičnost podzemnih voda u blizini odlagališta, onda bi bilo moguće napraviti daljnja fizikalno-kemijska ispitivanja s ciljem utvrđivanja spojeva koji su doveli do toksičnog učinka. Upravo zbog toga ovo istraživanje može poslužiti kao polazišna točka za slična istraživanja koja bi se mogla provesti na podzemnim i površinskim vodama u blizini drugih odlagališta u Hrvatskoj s ciljem utvrđivanja trenutnog stanje, a imajući na umu dugoročno i održivo upravljanje odlagalištima

otpada kako bi se rizici koje oni predstavljaju za okoliš sveli na najmanju moguću mjeru i zaštitilo vodno bogatstvo koje Hrvatska posjeduje.

6. ZAKLJUČAK

Rezultati dobiveni u ovom radu dokazuju citotoksično, genotoksično i mutageno djelovanje procjednih voda odlagališta neopasnog otpada Mraclinska Dubrava, s time da je mutageno djelovanje dokazano i kod podzemnih voda uzorkovanih tijekom jeseni 2013. godine.

Odlagalište neopasnog otpada Mraclinska Dubrava predstavljaju potencijalnu ekološku opasnost, te postoji realna potreba za provođenjem kombiniranog monitoringa stanja podzemnih voda odlagališta i nakon sanacije i zatvaranja odlagališta.

Postoje značajne razlike u koncentracijama tvari između procjedne i podzemnih voda. Procjedna voda ima veći pH, KPK, BPK te povišene koncentracije fosfora, klorida, dušikovih spojeva i sulfata koji su dokazani genotoksični agensi.

Dokazano je citotoksično djelovanje procjedne vode u koncentracijama od 5,0x i 10,0x na staničnoj liniji HEP2.

Podzemna voda hidrološki uzvodno od odlagališta (uzorak P1), podzemna voda između sanirane i aktivne plohe odlagališta (uzorak P2) i podzemna vode hidrološki nizvodno od odlagališta (uzorak P3) ne pokazuje statistički značajnu citotoksičnost u odnosu na negativnu kontrolu.

Procjedna voda uzrokuje lipidnu peroksidaciju i to pri koncentracijama od 5x i 10x. Uzorci podzemne vode hidrološki uzvodno od odlagališta (uzorak P1), podzemne vode između sanirane i aktivne plohe odlagališta (uzorak P2) i podzemne vode hidrološki nizvodno od odlagališta (uzorak P3) ne izazivaju statistički značajnu promjenu u indukciji lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolu.

Mutageni učinak dokazan je kod procjednih i podzemnih voda uzorkovanih u jesen 2013. godine, dok kod ostalih procjednih i podzemnih voda nije bilo mutagenog učinka.

7. LITERATURA

- Aikens, J., Dix, T.A. (1991) Peroxyl radical (HOO) initiated lipid peroxidation. The role of fatty acid hydroperoxides. *J. Biol. Chem.* **266**, 1591-1598.
- Amahdar, L., Anouar, A., Ababou, B., Verschaeve, L., Hilali, A. (2009) In vitro genotoxicity of Settat town landfill leachate, Morocco. *Arh. Hig. rada Toksiko.* **60**, 179-184.
- Anderson, D. (1996) Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutat. Res.* **350**, 103-108.
- Armstrong, D. (1994) Free radicals in diagnostic medicine. A systems approach to laboratory technology, clinical correlations, and antioxidant therapy. Plenum Press, New York, London, str. 43-58.
- Awasthi, A.K., Pandey, A.K., Khan, J., (2017) Municipal solid waste leachate impact on metabolic activity of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **24**(20), 17250-17254
- Babich, H., Borenfreund, E. (1990) Applications of the neutral red cytotoxicity assay to in vitro toxicology. *Altern. Lab. Anim.* **18**, 129–144
- 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.
- Baedecker, M.J., Apgar, M.A., (1984) Hydrochemical studies at a landfill in Delaware. (Bredehoeft, J. ured.), *Groundwater Contamination*, str. 127-138.
- Baig, S., Coulomb, I., Courant, P. and Liechti, P. (1999) Treatment of landfill leachates: Lapeyrouse and Satrod case studies. *Ozone. Sci. Eng.*, **21**, 1-22.
- Baun, A., Jensen, S.D., Bjerg, P.L., Christensen, T.H., Nyholm, N., (2000) Toxicity of organic chemical pollution in groundwater downgradient of a landfill (Grindsted, Denmark). *Environ. Sci. Technol.* **34**, 1647-1652.
- Barrett, A., Lawlor, J., (1995) *The Economics of Waste Management in Ireland*, Economic and Social Research Institute, Dublin.

- Bortolotto, T., Borges Bertoldo, J., Zanette da Silveria, F., Manganelli Defaveri, T., Silvano J., Tröger Pich, C. (2009) Evaluation of the toxic and genotoxic potential of landfill leachates using bioassays. *Environ. Toxicol. Phar.* **28**, 288-293.
- 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. *Ecotox. Environ. Safe.*, **69** (2), 233-245.
- Blake, D., Winyard, P.G., (1995) Immunopharmacology of free radical species. Academic Press, London, str. 23-37.
- Borenfreund, E., Puerner, J.A., (1984) A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR90). *J. Tissue Cult. Methods* **9**, 7-9
- Bolton, K. A. and Evans, L. J., (1991) Elemental composition and specification of some landfill leachates with particular reference to cadmium. *Water. Air. Soil. Poll.* **60**, 43-53.
- 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.
- Cavallo, D., Ursini, C.L., Setini, A., Chianese, C., Piegari, P., Perniconi, B., Iavicoli, S., (2003) Evaluation of oxidative damage and inhibition of DNA repair in an in vitro study of nickel exposure. *Toxicol. In Vitro* **17**, 603-607.
- Chakraborty, R., Mukherjee, A. (2009) Mutagenicity and genotoxicology of coal fly ash water leachate. *Ecotox. Environ. Safe.* **72**, 838-842.
- Chandra, S., Chauhan, L.K.S., Murthy, R.C., Saxena, P.N., Pande, P.N., Gupta, S.K., (2005) Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using *Allium* test. *Sci. Total Environ.* **347**, 46-52.
- Chen, Y., Xie, H., Zhang, C., (2016) Review on penetration of barriers by contaminants and technologies for groundwater and soil contamination. *Adv. Sci. Technol. WaterResour.* **1**, 1-10.
- Christensen, T. H., Kjeldsen, P., Bjerg, P. L., Jensen, D. L., Christensen, J. B., Baun, A., Albrechtsen, H.-J. and Heron, G. (2001) Biogeochemistry of landfill leachate plumes. *Appl. Geochem.* **16**, 659-718.

Christensen, T.H., Kjeldsen, P., and Stegmann, R., (1992) Effects of landfill management procedures on landfill stabilization and leachate and gas quality. U: Landfilling of Waste Leachate, (Christensen, T.H., Cossu, R., and Stegmann, R., ured., Elsevier Applied Science, London, str. 119.

Klauck, C.R., Giacobbo, A., Diego, E., Oliveira, L., Silva, L.B., Rodrigues, M.A.S., (2017) Evaluation of acute toxicity, cytotoxicity and genotoxicity of landfill leachate treated by biological lagoon and advanced oxidation processes, *J. Environ. Chem. Eng.* (5)6, 6188-6193

Collins A., R., (2004) The comet assay for DNA damage and repair *Mol. Biotechnol.* **26**, 249-261

Crane, D., Masters, C. (1984) On the role of catalase in the oxidation of tissue fatty acids. *Arch. Biochem. Biophys.* **229**, 104-111.

Deguchi, Y., Toyozumi, T., Masuda, S., Yasuhara, A., Mohri, S., Masato, Y., Inoue, Y., Kinae, N., (2007) Evaluation of mutagenic activities of leachates in landfill sites by micronucleus test and comet assay using goldfish. *Mutat. Res-gen. Tox. En.* **627**(2), 178-185

Devasagayam, T.P.A, Bloor, K.K., and Ramsarma, T. (2003) Methods for estimating lipid peroxidation: Analysis of merits and demerits (minireview). *Indian J. Biochem. Bio.* **40**, 300-308.

DIN 38409-1:1987-01 Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung; Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H); Bestimmung des Gesamttrockenrückstandes, des Filtrattrockenrückstandes und des Glührückstandes (H 1)

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.

Esterbauer, H., Schaur, F.J., Zollner, H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free. Radic. Biol. Med.* **11**, 81-128.

Fatta, D., Papadopoulos, A., Loizidou, M. (1999) A study on the landfill leachate and its impact on groundwater quality of the greater area. *Environ. Geochem. Health* **21**, 175-190.

Flyhammar, P., (1995). Leachate quality and environmental effects of active Swedish municipal landfill. Proceeding Sardinia 95: Fifth Int. Landfill Symposium, vol. II, Cagliari, str. 551-557.

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

Fulton, D., McGiff, J.C., Wolin, M.S. (1997) Evidence against cytochrome P450- derived reactive oxygen species as the mediator of the nitricoxide-independent vasodilator effect of bradykinin in the perfused heart of th rat. *J. Pharm. Exp. Therap.* **280**, 702-709.

Foose, G. J., Benson, C. H.and Edil, T. B. (2002) Comparison of solute transport in three composite liners. *J. Geotech. Geoenviron.*, **128**, 391-403.

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 inaequivalvis*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **45**, 350–356.

Gailey, R.M., Gorelick, S., (1993) Design of optimal. Reliable plume capture schemes: application to the gloucester landfill ground-water contamination problem. *Gr. Water.* **31**, 107-114

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

Gao, Q., Liu, Y. J., i Guan, Z. Z. (2008) Oxidative stress might be a mechanism connected with the decreased $\alpha 7$ nicotinic receptor influenced by high-concentration of fluoride in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Toxicol. in Vitro* **22**(4), 837–843.

García-Lestón, J., Roma-Torres, J., Vilares, M., Pinto, R., Cunha, L.M., Prista, J., Teixeira, J.P., Mayan, O., Pásaro, E., Méndez, J., Laffon, B., (2011) Biomonitoring of a population of Portuguese workers exposed to lead. *Mutat. Res.* **721**, 81–88.

Gill, S.S., Tuteja, N., (2010) Reactive oxygen species and antioxidantmachinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* **48** (12), 909–930

Han, Z., Ma, H., Shi, G., He, L., Wei, L., Shi, Q., (2016) A review of groundwater contaminationnear municipal solid waste landfill sites in china. *Sci. Total Environ.* **1255**, 569–570.

Halliwell, B., Gutteridge, JMC. (1989) Free Radicals in Biology and Medicine, 5 izd., Clarendon Press, Oxford 29-32.

HRN ISO 5667-11:2011 Kvaliteta vode-Uzorkovanje-11. dio: Upute za uzorkovanje podzemnih voda

HRN EN 27888:2011 Kakvoća vode–Određivanje električne vodljivosti

HRN EN ISO 10523:2012 Kvaliteta vode-Određivanje pH vrijednosti

HRN EN 872:2008 Kakvoća vode-Određivanje suspendiranih tvari-Metoda filtriranjem kroz filtar od staklenih vlakana

HRN EN ISO 8467:2001 Kakvoća vode-Određivanje permanganatnog indeksa

HRN EN 1899-1:2004 Kakvoća vode-Određivanje biokemijske potrošnje kisika nakon n dana (BPKn) - 1. dio: Metoda razrjeđivanja i nacjepljivanja uz dodatak alitiouree

HRN EN 1899-2:2004 Kakvoća vode-Određivanje biokemijske potrošnje kisika nakon n dana (BPKn)-2. dio: Metoda za nerazrjeđene uzorke

HRN ISO 7150-1:1998 Kakvoća vode - Određivanje amonija-1. dio: Spektrometrijska metoda

HRN EN 26667:1998 Kakvoća vode-Određivanje nitrita-Molekularna apsorpcijska spektrometrijska metoda

HRN ISO 7890-3:1998 Kakvoća vode-Određivanje nitrata-3. dio: Spektrometrijska metoda sa sulfosalicilnom kiselinom

HRN EN ISO 6878:2008 Kakvoća vode-Određivanje fosfora-Spektrometrijska metoda s amonijevim molibdatom

HRN ISO 11083:1998 Kakvoća vode-Određivanje kroma (VI) -Spektrometrijska metoda s 1,5 - difenilkarbazidom

HRN ISO 9297:1998 Kakvoća vode-Određivanje klorida-Volumetrijska metoda sa srebrnim nitratom uz kromatni indikator (Mohrova metoda)

HRN ISO 6058:2001 Kakvoća vode-Određivanje sadržaja kalcija- EDTA titrimetrijska metoda

HRN ISO 6059:1998 Kakvoća vode-Određivanje sume kalcija i magnezija -- Volumetrijska metoda s EDTA

HRN EN ISO 15586:2008 Kakvoća vode-Određivanje elemenata u tragovima atomskom apsorpcijskom spektrometrijom s grafitnom peći

Hrnčić, N., i Hrnčić, M. (2011). Prilog izgradnji brtvenih sustava na odlagalištu otpada, *Tehnički glasnik*, **5(2)**, str. 135-140.

Inkielewicz, I., i Czarnowska, W. (2008) Oxidative stress parameters in rats exposed to fluoride and aspirin. *Fluoride* **41(1)**, 76–82.

Izješće o komunalnom otpadu za 2017. godinu (2018), Hrvatska agencija za okoliš i prirodu, Radnička cesta 80/7, Zagreb

Izješće o podacima iz Registra onečišćavanja okoliša za 2017. godinu (2018), Hrvatska agencija za okoliš i prirodu, Radnička cesta 80/7, Zagreb

Jain, P., Powell, J.T., Smith, J.L., Townsend, T.G., Tolaymat, T., (2014) Life-cycle inventory and impact evaluation of mining municipal solid waste landfills. *Environ. Sci. Technol.* **48** (5), 2920–2927.

Katsumi, T., Benson, C. H., Foose, G. J. and Kamon, M. (2001) Performance-based design of landfill liners. *Engineering Geology*, **60**, 139-148.

Kjeldsen, P., Bjerg Poul Løgstrup Winther, P., Rügge, K., Pedersen, J.K., Skov, B. Foverskov, A., Würtz, S., Christensen, T.H., (1993) Assessing the variability in leachate migration from an old municipal landfill. Proceedings of Sardinia 93: Fourth International Landfill Symposium. Cagliari, str. 1519-1531

Kjeldsen, P., Barlaz, M.A., Rooker, A.P., Baun, A., Ledin, A., Christensen, T.H., (2002) Present and long-term composition of MSW landfill leachate: a review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **32**, 297-336.

Knight, J.A. (2000) Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Annal. Clinic Lab. Sci.* **30**, 145-158.

Koelmel, J. Sebastian, A., Prasad, M.N.V. (2016.) Synthetic biology: an emerging field for developing economies. U: Bioremediation and Bioeconomy, (Prasad, M.N.V, ured.) Elsevier Applied Science, str. 665-685.

Kruempelbeck, L., Ehrig, H.J. (1999), Long-term behavior of municipal solid waste landfills in Germany, Proceedings vol. I Seventh International Waste Management and Landfill Symposium, Cagliari

Kurniawan, T. A., Lo, W. H., and Chan, G. Y. S. (2006a) Radicals-catalyzed oxidation reactions for degradation of recalcitrant compounds from landfill leachate. *Chem. Eng. J.* **125**, 5–57.

Kurniawan, T. A., Lo, W. H., and Chan, G. Y. S. (2006b) Physico-chemical treatments for removal of recalcitrant contaminants from landfill leachate. *J. Haz. Mater.* **129**, 80–100.

Laine, D. L. and Darilek, G. T., (1993) Locating Leaks In Geomembrane Liners of Landfills Covered With a Protective Soil, Proceedings Geosintetics, International Landfill Symposium Geosynthetics, Vancouver, str 1403-1412.

Lee, H.C., Wei, Y.H. (2000) Mitochondrial role in life and death of the cell. *J. Biomed. Sci.* **7**, 2-15.

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, G., Chen, J., Yan, W., Sang, N., (2016) A comparison of the toxicity of landfill leachate exposure at the seed soaking and germination stages on *Zea mays* L. (maize). *J. environ. Sci.* **55**, 206-213

Maqbool, F., Bhatti, Z.A., Malik, A.H., Pervez, A., Mahmood, Q., (2011) Effect of landfill leachate on the stream water quality. *Int. J. Environ. Res.* **5**, 491-500.

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.

Meju, M.A., (1993) Geophysical mapping of polluted groundwater in a closed landfill site. Proceedings of the Third International Congress of Brazilian Geophysical Society (Expanded).

Metodologija za određivanje sastava i količina komunalnog odnosno miješanog komunalnog otpada (2015) Hrvatska agencija za okoliš i prirodu, Radnička cesta 80/7, Zagreb

- Ministarstvo zaštite okoliša i energetike (2019) <https://mzoe.gov.hr/o-ministarstvu-1065/djelokrug-4925/okolis/okolisna-dozvola/1452>, Pristupljeno 05. studenog 2019.
- Mor, S., Ravindra, K., Dahiya, R.P., Chandra, A., (2006) Leachate characterization and assessment of groundwater pollution near municipal solid waste landfill site. *Environ. Monit. Assess.* **118**, 435-456.
- Mortelmans, K., Zeiger, E. (2000) the Ames/Salmonella microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.* **455**, 29-60.
- Mukherjee, S., Mukhopadhyay, S., Ali Hashim, M., & Sen Gupta, B. (2015) Contemporary environmental issues of landfill leachate: Assessment & remedies. *Crit. Rev. Env. Sci. tec.*, **45**(5), 472-590.
- Newell, C., Raun, L., Bedient, P., (1990) A hydrogeologic database for ground-water modeling. *Gr. Water.* **28** (5), 703-714
- Nemes, Z., Dietz, R. & Luth, J.B. (1979) The pharmacological relevance of vital staining with neutral red. *Experientia* **35**, 1475–1476
- Nuić, B. (2008). 'Biološka obrada procjednih voda odlagališta Mraclinska Dubrava', Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet
- Olivero-Verbel, J., Padilla-Bottet, C., De la Rosa, O., (2008) Relationships between physicochemical parameters and the toxicity of leachates from a municipal solid waste landfill. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **70**, 294-299
- Öman, C.B., Junestedt, C. (2008) Chemical characterization of landfill leachates – 400 parameters and compounds. *Waste Manage.* **28**, 1876-1891.
- 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.
- Osaki, K., Kashiwada, S., Tatarazako, N., and Ono, Y. (2006) Toxicity testing of leachate from waste landfills using medaka (*Oryzias latipes*) for monitoring environmental safety *Environ. Monit. Assess.* **117**, 73–84.
- Pablos, M.V., Martini, F., Fernández, C., Babín, M.M., Carbonell, G., San-Segundo, L., García-Hortigüela, P. Tarazona, J. V.; Herraiz, I., Miranda, J., Martínez J., (2011)

Correlation between physicochemical and ecotoxicological approaches to estimate landfill leachates toxicity. *Waste management*, **31** (8), 1841-7

Plan gospodarenja otpadom Republike Hrvatske za razdoblje 2017. - 2022. godine (2017), *Narodne novine* 27, Zagreb

Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (2013), *Narodne novine* 80, Zagreb

Pravilnik o načinima i uvjetima odlaganja otpada, kategorijama i uvjetima rada za odlagališta otpada (2015), *Narodne novine* 80, Zagreb

Pregled podataka o odlaganju i odlagalištima otpada za 2018 (2019), Ministarstvo zaštite okoliša i energetike, Radnička cesta 80/7, Zagreb

Pompelli, M.F., Barata-Luís, R.M., Vitorino, H.S., Endres, L., (2010) Photosynthesis, photoprotection and antioxidant activity of purging nut under drought deficit and recovery. *Biomass Bioenerg.* **34** (8), 1207–1215.

Porter, N. (1984) Chemistry of lipid peroxidation. *Methods. Enzymol* **105**, 273-283.

Prein, A.E., Thie, G.M., Alik, G.M., Poels, C.L.M., Koeman, J.H. (1978) Cytogenetic changes in fish exposed to water of the river Rhine. *Sci. Total Environ.* **9**, 287-291.

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. and Grosh, C.J., (1998) Analysis of Florida MSW landfill leachate quality, Final report, State University System of Florida, University of Central Florida, Gainesville.

Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J.L. (2008) Neutral red uptake for the estimation of cell viability/citotoxicity. *Nat. Protoc.* **3**, 1125-1131.

Renou, S., Givaudan, J. G., Poulain, S., Dirassouyan, F. and Moulin, P. (2008a) Landfill leachate treatment: Review and opportunity. *J. hazard. Mater.*, **150**, 468-493.

Revans, A., Ross D., Gregory, B., Meadows, M., Harries, C., and Gronow, J., (1999) Long-term fate of metals in landfill, Proceedings of Sardinia '99, Seventh International Waste Management and Landfill, Cagliari

- Robinson, H.C., Barber, C., Maris, P.J., (1982) Generation and treatment of leachate from domestic wastes in landfills. *Water Pollut. Control* **52**, 465-478.
- Robinson, H. D., Barr, M. J., and Last, S. D. (1992) Leachate collection, treatment and disposal. *J. Inst. Water Environ. Manage.* **6**, 321–332.
- Robinson, H.D., (1995) The technical aspects of controlled waste management. A review of the composition of leachates from domestic wastes in landfill sites. UK Department of the Environment.
- Samadder, S.R., Prabhakar, R., Khan, D., Kishan, D., Chauhan, M.S., (2017) Analysis of the contaminants released from municipal solid waste landfill site: a case study. *Sci.Total Environ.* **580**, 593–601.
- Sang, N., Li, G., Xin, X. (2006) Municipal landfill leachate induces cytogenetic damage in root tips of *Hordeum vulgare*. *Ecotox. Environ. Safe.* **63**, 469-473.
- Schrab, G.E., Brown, K.W., Donnelly, K., (1993) Acute and genetic toxicity of municipal landfill leachate. *Water Air Soil Pollut.* **69**, 99-112.
- Shu S., Zhu W., Wang S., Wang Ch., Ng C.W.W., Chen Y., Chiu A.C.F. (2018) Leachate breakthrough mechanism and key pollutant indicator of municipal solid waste landfill barrier systems: Centrifuge and numerical modelling approach. *Sci. total Environ.*, **612**, 1123–1131
- Shaily, U.S. (2012) Importance of Genotoxicity & S2A guidelines for genotoxicity testing for pharmaceuticals *Int. J. Pharm. Biol.*, **1**(2), 43-54
- Siddique, H.R., Gupta, S.C., Dhawan, A., Murthy, R.C., Saxena, D.K., Chowdhuri, D.K. (2005) Genotoxicity of industrial solid waste leachates in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutagen.* **46**, 189-197.
- Sies, H. (1991) Oxidative Stress: an introduction in oxidative stress oxidants and antioxidants. Academic Press, London, str. 319-336.
- Singh, A., Chandra, S., Kumar Gupta, S., Chauhan, L.K.S., Kumar Rath, Srikanta (2007) Mutagenicity of leachate from industrial solid wastes using *Salmonella* reverse mutation assay., *Ecotox. Environ. Safe.* **66**, 210-216

Svingen, B.A., O'Neal, F.O., Aust, S.D. (1978) The role of superoxide and singlet oxygen in lipid peroxidation. *Photochem. Photobiol.* **23**, 303-809.

Osada T., Nemoto K., Hiroki Nakanishi H., (2011) Analysis of Ammonia Toxicity in Landfill Leachates *Toxicology*, **2011**

Tejero, M.I., Fantelli, L.M., Diaz, I.R., Azanto, N.M., (1993) Characteristics and treatment of leachate in the Meruleo landfill (Spain). Proceedings of Sardinia 93: Fourth International Landfill Symposium. Cagliari, str. 1033-1042

Thomas, David John Lawrence, Tyrrel, Sean Ferguson, Smith, Richard and Farrow, Steve (2009) Bioassays for the Evaluation of Landfill Leachate Toxicity. *J. tox. Env. health*, **12**(1), 83 - 105

Timbrell, J. (2000) Principles of Biochemical Toxicology. Taylor and Francis group, London and New York

Trzeciak, A., Kowalik, J., Malecka-Panas, E., Drzewoski, J., Wojewódzka, M., Iwanen'ko, 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.

Tülay, A.C. (2018) Cytotoxicity, 1 izd., Intechopen, London

US EPA (1988) Ambient Water Quality Criteria for Chloride. US EPA - U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC

US EPA (1989) Guidelines establishing test procedurs for analysis of pollutants under the celan water act. US EPA - U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC

Vaverková, M.D., Adamcová D., Zloch J.,Radziemska M.,Boas Berg A., Voběrková S, Maxianová A., (2018) Impact of Municipal Solid Waste Landfill on Environment – a Case Study., *J. Ecol. Eng.* **19**(4), 55–68

Vendrame, I., Pinho, M.F., (1997) Groundwater quality in taubate landfill. Brazil. Groundwater in the Urban Environment, 1 izd. Balkema A. A., Rotterdam, str. 559–564

Venitt, S.J.M., Parry (1984) Mutagenivity testing. 1 izd., IRL Press, Oxford

Vulić, A. (2011.) Analitički aspekt odabranih β_2 -adrenergičkih agonista u tkivu jetre i genotoksikološki učinci na biološkim test sustavima, Doktorski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb

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

Wang C., Chen G., Zhu Y., Yao D., Wang W., Wang L. (2017) Assessment of leaching behavior and human bioaccessibility of rare earth elements in typical hospital waste incineration ash in China. *Front. Env. Sci. Eng.*, **11**, 5

Winckler, J. (1974) Vital staining of lysosomes and other cell organelles of the rat with neutral Red. *Prog. Histochem. Cytochem.* **6**, 1–89

Widziewicz, K., Kalka, J., Skonieczna, M., Madej, P., (2012) The comet assay for the evaluation of genotoxic potential of landfill leachate. *Sci. World J.* **43**, 5239

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

Zakon o održivom gospodarenju otpadom (2013), *Narodne novine 94* (NN 94/2010)

DODATAK

ŽIVOTOPIS

Mario Ančić rođen je 1980. godine u Zagrebu. Na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, biološki odsjek, 2007. godine stekao je akademski naziv diplomirani inženjer biologije sa diplomskim radom na temu „Molekularno filogenetski odnosi populacija vrste potočnog raka (*Austropotamobius torrentium* Schrank, 1803)“, pod mentorstvom prof. dr. sc. Gorana Klobučara.

Poslijediplomski sveučilišni doktorski studij Biotehnologija i bioproceno inženjerstvo, na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, upisao je 2009. godine.

Autor je dva znanstvena rada objavljena u znanstvenim časopisima visokog faktora odjeka (SCI), sudjelovao je na dva domaća kongresa s radovima na temu analitičkih ispitivanja iz područja ekologije okoliša.

Od 2013. godine predavač je na Seminarima koje organizira udruga CROLAB iz područja upravljanja kvalitetom laboratorija, te je do sada održao više od 30 predavanja iz različitih područja upravljanja kvalitetom.

Od 2012. godine zaposlen je u laboratoriju Euroinspekt Croatiakontrola d.o.o. na mjestu voditelja odjela Ekologije okoliša.