

# Genotoksikološki profil površinskih, podzemnih i procjednih voda s područja odlagališta otpada Piškornica

---

Ćurić, Adriana

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:023343>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-04**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, siječanj 2021.

Adriana Ćurić

1284/USH

**GENOTOKSIKOLOŠKI PROFIL  
POVRŠINSKIH, PODZEMNIH I  
PROCJEDNIH VODA S  
PODRUČJA ODLAGALIŠTA  
OTPADA PIŠKORNICA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, te na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada pod mentorstvom prof. dr. sc. Ksenije Durgo.

*Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Kseniji Durgo na strpljenju, trudu i pomoći prilikom izrade ovog rada.*

*Hvala svim kolegama i prijateljima koji su uljepšali moje studentske dane.*

*Najveće hvala mojoj obitelji i zaručniku na strpljenju, podršci i razumijevanju koje su mi pružali tijekom cijelog obrazovanja.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

### GENOTOKSIKOLOŠKI PROFIL POVRŠINSKIH, PODZEMNIH I PROCJEDNIH VODA S PODRUČJA ODLAGALIŠTA OTPADA PIŠKORNICA

*Adriana Ćurić, 1284/USH*

**Sažetak:** Svijet je suočen s nedostatkom zdravstveno ispravne vode za piće prvenstveno radi ugrožavanja vodenih okoliša pri čemu je jedan od glavnih izvora onečišćenja nepravilno gospodarenje otpadom. Danas je najčešća metoda zbrinjavanja otpada odlaganje razvrstanog otpada na za to predviđena mjesta koja se redovito moraju kontrolirati jer vrlo lako može doći do procjeđivanja raznih zagađivača u podzemne i površinske vode. Cilj ovog istraživanja bio je odrediti citotoksičnost, genotoksičnost te oksidacijsko oštećenje staničnih makromolekula proteina i lipida uzrokovanog djelovanjem voda s područja odlagališta otpada Piškornica. Kao biološki test sustav korištene su humane stanične linije hepatocelularnog karcinoma jetre Hep G2 te oralnog pločastog karcinoma Cal 27, a vrijeme izloženosti bilo je 24 sata. Rezultati su pokazali da uzorak procjedne vode djeluje citotoksično te izaziva karbonilaciju proteina i lipidnu peroksidaciju. Zbog smanjenog postotka preživljenja (<75 %) genotoksični učinak za uzorak procjedne vode nije bilo moguće odrediti. Izuzev uzoraka podzemne vode koji su izazvali lipidnu peroksidaciju, ostali ispitivani uzorci nisu djelovali citotoksično ni genotoksično, niti su izazvali oštećenje staničnih makromolekula (proteina, lipida i DNA).

**Ključne riječi:** *odlagalište Piškornica, voda, genotoksičnost, citotoksičnost, testovi in vitro*

**Rad sadrži:** 82 stranice, 35 slika, 1 tablica, 129 literaturnih navoda, 2 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. doc. dr. sc. *Anamarija Štafa*
2. prof. dr. sc. *Ksenija Durgo*
3. dr. sc. *Nevenka Kopjar, znan. savj., Institut za medicinska istraživanja*
4. prof. dr. sc. *Draženko Komes (zamjena)*

**Datum obrane:** 29. siječanj 2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

### GENOTOXICOLOGICAL PROFILE OF SURFACE WATER, GROUNDWATER AND LEACHATE FROM THE AREA OF THE WASTE LANDFILL PIŠKORNICA

*Adriana Ćurić, 1284/USH*

**Abstract:** The world has been facing with the major lack of safe and readily available drinking water because of the endangerment of the aquatic environment mostly caused by inappropriate waste management. Commonly used method is waste disposal at landfills which, under certain circumstances, can cause contamination of surface water or groundwater. The aim of this research is to determine potential cytotoxic and genotoxic effect and to determine possible damage of cellular proteins and lipids caused by different types of water from the area of the waste landfill Piškornica. As the test system, a human hepatocellular carcinoma cell line Hep G2 and oral squamous carcinoma cell line Cal 27 was used, and it was exposed to the examined samples of water for 24 hours. The results have shown that leachate sample has cytotoxic effect and causes protein carbonylation and lipid peroxidation. As in the case of leachate sample the cell viability didn't exceed 75 % and the genotoxic effect couldn't be determined. While the groundwater samples caused increased lipid peroxidation, other samples didn't have cytotoxic nor genotoxic effect or caused the damage of cellular macromolecules (proteins, lipids and DNA).

**Keywords:** *landfill Piškornica, water, genotoxicity, cytotoxicity, in vitro tests*

**Thesis contains:** 82 pages, 35 figures, 1 table, 129 references, 2 supplements

**Original in:** Croatian

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

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

**Reviewers:**

1. PhD. *Anamarija Štafa*, Assistant professor
2. PhD. *Ksenija Durgo*, Full professor
3. PhD. *Nevenka Kopjar*, Associate professor
4. PhD. *Draženka Komes*, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** 29 January 2021

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>3</b>
2.1. VAŽNOST VODE ZA ČOVJEKA I OKOLIŠ .....	3
2.1.1. Ljudski utjecaj na vodene ekosustave.....	3
2.2. GOSPODARENJE OTPADOM .....	4
2.2.1. Odlagališta otpada .....	4
2.3. PROCJEDNE VODE .....	5
2.3.1. Količina i sastav procjedne vode odlagališta otpada .....	6
2.3.1.1. Otopljena organska tvar .....	7
2.3.1.2. Anorganske makrokomponente .....	8
2.3.1.3. Teški metali.....	8
2.3.1.4. Ksenobiotički organski spojevi.....	9
2.4. PODZEMNE VODE .....	9
2.4.1. Uloga podzemne vode u hidrološkom ciklusu.....	10
2.4.2. Izvori onečišćenja podzemnih voda.....	11
2.4.3. Utjecaj odlagališta otpada na stanje podzemnih voda .....	11
2.4.4. Posljedice onečišćenja podzemnih voda.....	11
2.5. ODLAGALIŠTE OTPADA PIŠKORNICA .....	12
2.5.1. Obilježja šireg područja lokacije odlagališta otpada.....	12
2.5.2. Sanacija odlagališta otpada.....	13
2.5.3. Studija utjecaja na vode promatranog područja.....	14
2.6. ISPITIVANJE STANJA PODZEMNIH VODA.....	15
2.6.1. Citotoksičnost i test formiranja kolonija (engl. <i>colony forming assay</i> ) .....	16
2.6.2. Oksidativni stres i slobodni radikali .....	17
2.6.2.1. Oštećenje proteina kao posljedica oksidativnog stresa .....	18
2.6.2.2. Oštećenje lipida kao posljedica oksidativnog stresa .....	18
2.6.3. Kromosomski lomovi .....	18
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>20</b>
3.1. MATERIJALI .....	20
3.1.1. Biološki test sustavi za utvrđivanje genotoksičnog učinka.....	20
3.1.2. Uzorci vode s područja odlagališta otpada Piškornica.....	21
3.1.3. Kemikalije .....	22
3.1.4. Laboratorijska oprema .....	25
3.2. METODE RADA .....	26
3.2.1. Kultivacija staničnih linija Hep G2 i Cal 27 u monosloju .....	26
3.2.2. Priprema stanične suspenzije iz subkonfluentnog monosloja .....	26
3.2.3. Određivanje broja stanica .....	26
3.2.4. Priprema otopina uzoraka za genotoksikološka ispitivanja .....	27
3.2.5. Određivanje preživljenja staničnih linija Hep G2 i Cal 27 testom formiranja kolonija.....	27



3.2.6. Priprema stanica za određivanje genotoksičnog učinka voda s odlagališta na stanične makromolekule (proteine, lipide i DNA).....	28
3.2.7. Određivanje koncentracije ukupnih proteina metodom po Bradfordu.....	29
3.2.8. Određivanje oštećenja proteina na staničnim linijama Hep G2 i Cal 27 testom proteinske karbonilacije .....	29
3.2.9. Određivanje oštećenja lipida na staničnim linijama Hep G2 i Cal 27 testom lipidne peroksidacije..	30
3.2.10. Određivanje oštećenja DNA na staničnim linijama Hep G2 i Cal 27 komet testom .....	31
3.2.11. Statistička analiza rezultata.....	32
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>33</b>
4.1. FIZIKALNO – KEMIJSKA ANALIZA UZORAKA VODA S ODLAGALIŠTA OTPADA .....	35
4.2. CITOTOKSIČNI I ANTIPROLIFERATIVNI UČINAK VODA S PODRUČJA ODLAGALIŠTA OTPADA.....	36
4.3. PROOKSIDACIJSKI UČINAK VODA S PODRUČJA ODLAGALIŠTA OTPADA NA STANIČNE PROTEINE .....	38
4.5. PROOKSIDACIJSKI UČINAK VODA S PODRUČJA ODLAGALIŠTA OTPADA NA STANIČNE LIPIDE .....	40
4.6. GENOTOKSIČNI UČINAK VODA S PODRUČJA ODLAGALIŠTA OTPADA .....	43
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>61</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>62</b>
<b>7. PRILOZI.....</b>	<b>73</b>
Prilog 1. Fizikalno – kemijski sastav voda s područja odlagališta otpada Piškornica .....	73
Prilog 2. Fizikalno – kemijski sastav procjedne vode s odlagališta otpada Piškornica prema Pravilniku o graničnim vrijednostima emisija onečišćujućih tvari otpadnih voda (uzorak 3) (Pravilnik 2019) .....	81

# 1. UVOD

U današnje vrijeme svijet se suočava s nedostatkom zdravstveno ispravne vode za piće prvenstveno radi narušavanja integriteta vodenih okoliša pri čemu je jedan od glavnih izvora onečišćenja upravo neodgovornost prilikom gospodarenja otpadom. Zahvaljujući užurbanom načinu života, promjeni potrošačkih navika i uvođenju inovativnih dostignuća u pakiranju proizvoda kojima se u konačnici nastoji poboljšati životni standard današnjeg stanovništva, dolazi do stvaranja velikih količina krutog otpada. Iako su danas prisutni brojni načini upravljanja otpadom poput spaljivanja, odlaganja, kompostiranja, recikliranja, odlaganja u mora i rijeke, najčešću metodu gospodarenja otpadom predstavljaju odlagališta. Unatoč tome što se prilikom projektiranja odlagališta nastoji u velikoj mjeri smanjiti količina vode koja protječe kroz otpad i procjeđuje se u podzemne i površinske vode, u velikom broju slučajeva odlagališta otpada nemaju izvedenu nepropusnu podlogu ili pokrov te voda slobodno protječe kroz otpad pri čemu prikuplja organske i anorganske zagađivače. Upravo nekontrolirano ispuštanje tako zagađenih voda u površinske i podzemne vode u blizini odlagališta može uzrokovati njihovo onečišćenje te tako ugroziti potencijalne izvore pitke vode. Zbog svega navedenog zabilježen je sve veći rast svijesti o povezanosti ljudskog zdravlja i štetnih učinaka odlagališta otpada.

Kako bi se spriječio nepovoljan utjecaj odlagališta otpada na okolne vode i na okoliš, veliki naglasak se stavlja na kontinuiranu kontrolu kvalitete i sastava istih provođenjem različitih fizikalno - kemijskih analiza koje se posljednje vrijeme nadopunjavaju biotestovima genotoksičnosti i mutagenosti. Takvi se testovi kao *in vivo*, *in vitro* i *in situ* ispitivanja koriste za procjenu svojstava različitih ksenobiotika da različitim mehanizmima uzrokuju oštećenja staničnih makromolekula (proteina, lipida i DNA).

U sklopu ovog rada istražen je genotoksični učinak podzemnih voda te procjedne i površinske vode s područja saniranog odlagališta otpada Piškornica smještenog u blizini grada Koprivnice u čijoj se neposrednoj blizini nalazi vodocrpilište Ivanščak i vodotok Gliboki. Od 1982. godine na ovoj lokaciji se provodi organizirano odlaganje komunalnog i industrijskog otpada, pri čemu se do sanacije odlaganje vršilo na nesantitaran način, odnosno otpad se odlagao na propusno dno bez izvedene odvodnje i pročišćavanja procjednih voda. Iz tog razloga, cilj ovog istraživanja je odrediti citotoksični i genotoksični učinak podzemnih voda uzorkovanih uzvodno i nizvodno od odlagališta, površinske vode nizvodno od odlagališta te procjedne vode uzorkovane na samom odlagalištu. Osim toga, bit će utvrđen prooksidacijski potencijal ovih voda

identifikacijom oksidacijskih promjena na staničnim proteinima i lipidima. Također, dobiveni rezultati biotestova usporediti će se s rezultatima fizikalno – kemijskih analiza. Kao biološki test sustavi za provođenje navedenih ispitivanja koristit će se kontinuirane humane stanične linije hepatocelularnog karcinoma jetre Hep G2 te oralnog pločastog karcinoma Cal 27.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. VAŽNOST VODE ZA ČOVJEKA I OKOLIŠ

Voda je osnovni sastavni dio našeg planeta čija prisutnost u tekućem, čvrstom i plinovitom stanju čini Zemlju jedinstvenom u Sunčevom sustavu (Gereš, 2004). Međutim, voda nije jednoliko raspoređena na Zemlji niti je uvijek raspoloživa za ljudsku upotrebu. Naime, iako je 70 % našeg planeta prekriveno vodom, od toga samo 1 % ostaje dostupno za ljudsku upotrebu (Anonymus 1, 2020). Razlog tome su česte varijacije vodnog ciklusa uzrokovane povećanim potrebama za vodom uslijed naglog rasta broja ljudske populacije, boljeg životnog standarda, industrijskog i ekonomskog rasta te pojavom brojnih elementarnih nepogoda poput suša i poplava što zahtijeva razvoj novih znanja i metoda za učinkovito upravljanje izvorima vode. Upravo ljudska aktivnost može negativno utjecati na količinu i kvalitetu vode u prirodnim resursima čime se izravno dovodi u pitanje raspoloživa količina pitke vode koja je osnovna potreba čovjeka (Gereš, 2004).

#### 2.1.1. Ljudski utjecaj na vodene ekosustave

U posljednje vrijeme svijet je suočen s nedostatkom zdravstveno ispravne vode za piće upravo radi narušavanja stanja slatkovodnih ekosustava. Nekim od glavnih uzroka uništavanja vodenih staništa smatraju se:

- kontinuirani rast svjetske populacije koji značajno utječe na rast potreba za pitkom vodom
- izgradnja brojnih infrastrukturnih objekata poput brana ili nasipa koji narušavaju integritet staništa, mijenjaju temperaturu i dinamiku protjecanja vode čime ugrožavaju kvalitetu i smanjuju količinu dostupne vode
- pretjerani izlov i eksploatacija koja dovodi do narušavanja bioraznolikosti populacije
- prenamjena funkcije zemljišta, npr. isušivanjem močvarnih područja čime se gubi integritet i bioraznolikost staništa
- ispuštanje otpadnih voda koje utječu na promjenu kemijskog i biološkog sastava vode (Mayers i sur., 2009).

Iz tog razloga je pristup količinama vode određene kvalitete od značajne važnosti jer održavanje i briga o integritetu vodenih ekosustava primarno je vezi sa ljudskim zdravljem, ali i opstankom brojnih biljnih i životinjskih zajednica (Vučijak i sur., 2011).

## 2.2. GOSPODARENJE OTPADOM

Uz prethodno navedene parametre koji mogu nepovoljno utjecati na integritet vodenog okoliša, neodgovornost prilikom gospodarenja otpadom je također jedan od izvora onečišćenja. Poznato je da se količina otpada svakodnevno povećava što je glavna posljedica užurbanog načina života, promjene potrošačkih navika i sve inovativnijih dostignuća u pakiranju proizvoda (Anonymus 2, 2019). Tehnološki napredak i ekonomski razvoj kojima se nastoji poboljšati životni standard današnjeg stanovništva posljedično je rezultirao stvaranjem velike količine krutog otpada. Pritom, razne vrste otpada uključujući metalni otpad porijeklom iz industrije čelika i željeza, industrije gume i papira, ulje iz strojeva, tekstil i boje iz tekstilne industrije, farmaceutske industrije, životinjski ili elektronički otpad mogu imati toksična, iritabilna, zapaljiva ili korozivna svojstva (Bakare i sur., 2013). Na taj način, otpad koji se velikoj mjeri proizvodi znatno utječe na okoliš i kvalitetu ljudskog života, te bi iz tog razloga prvenstveno trebalo težiti sprječavanju njegova nastajanja. U slučaju da stvaranje otpada ne možemo spriječiti, u najvećoj mogućoj mjeri snage bi trebalo usmjeriti ka njegovoj ponovnoj uporabi (Anonymus 2, 2019).

Danas postoje brojni načini upravljanja otpadom poput spaljivanja, odlaganja, kompostiranja, recikliranja, odlaganja u mora i rijeke, međutim u 95 % slučajeva otpad se odlaže na za to predviđena odlagališta koja time predstavljaju najčešću metodu gospodarenja otpadom (Kurniawan i sur., 2006).

### 2.2.1. Odlagališta otpada

Odlaganje otpada na odlagališta smatra se najjednostavnijom, najjeftinijom i najisplativijom metodom odlaganja krutog otpada u razvijenim zemljama i zemljama u razvoju širom svijeta (Ikem i sur., 2002). Pritom, u slabije razvijenim zemljama je tek mali broj odlagališta predviđen za zbrinjavanje kućanskog ili industrijskog krutog otpada, dok je većina ipak uređena za odlaganje miješanog otpada. Odlagališta su pretežito smještena na javnim mjestima, okružena stambenim naseljima, močvarnim ili drugim područjima s visokom količinom padalina, te nisu ograđena niti imaju izveden sustav podloge i pokrova (Bakare i sur., 2013).

Iako se danas prilikom projektiranja odlagališta nastoji u velikoj mjeri smanjiti količina vode koja protječe kroz otpad i procjeđuje se u podzemne i površinske vode, to nije slučaj sa starijim odlagalištima otpada koja nemaju nepropusnu podlogu ili pokrov pa voda slobodno protječe kroz otpad pri čemu prikuplja organske zagađivače poput aromatskih ugljikovodika, fenola, kloriranih alifatskih spojeva, ali i anorganske spojeve poput amonijaka, teških metala, klorida i

drugih tvari koje smanjuju udio kisika u vodi. Upravo nekontrolirano ispuštanje tako zagađenih voda u površinske i podzemne vode u blizini odlagališta otpada mogu uzrokovati njihovo onečišćenje i imati štetne posljedice po organizme prisutne u tom ekosustavu (Studija, 2019).

### **2.3. PROCJEDNE VODE**

Procjedne vode odlagališta komunalnog otpada predstavljaju otpadne vode koje nastaju cirkulacijom oborinske vode kroz tijelo odlagališta te biokemijskim procesima u otpadu tijekom njegove razgradnje (Oreščanin, 2014). U prošlosti je velik broj odlagališta otpada bio dizajniran bez izvedenog sustava cjevovoda za odvodnju te sabirnih laguna za sakupljanje procjednih voda, radi čega je procjedna voda odlagališta lako dolazila u doticaj s tlom i tako izravno utjecala na onečišćenje prvenstveno podzemnih, ali i površinskih voda te poljoprivrednih površina okolnog područja (Naveen i sur., 2014).

Procjedne vode su smeđe do crne koloidne otopine koje karakterizira neugodan miris, visoka vodljivost i visoko organsko opterećenje, a sastav im je vrlo složen jer sadrže velik broj različitih komponenti, od čega 80-85 % čini organska tvar, a 5-20 % su tvari anorganskog podrijetla (Oreščanin, 2014; Talalaj, 2014). Procjedne vode se sastoje od otopljene organske tvari, anorganskih spojeva od kojih prevladava amonijak i druge tvari poput željeza, klorida ili sulfata, dok je koncentracija teških metala poput cinka, bakra, željeza, olova ili mangana promjenjiva. Također sadržavaju i ksenobiotičke organske spojeve koji su podrijetlom najčešće iz farmaceutske industrije (Matošić i sur., 2008; Talalaj, 2014). Osim navedenih tvari, procjedna voda odlagališta komunalnog otpada može biti i izvor raznih patogenih i oportunističkih mikroorganizama (Reinhart i Al-Yousfi, 1996).

Upravo zbog svog kompleksnog sastava, provedeni su razni test sustavi kojima su potvrđeni brojni mehanizmi toksičnosti procjednih voda pri čemu spomenuta toksičnost može biti izravna, uzrokovana prisutnošću tvari poput amonijaka, pesticida i teških metala, ali i neizravna, odnosno uzrokovana metaboličkom aktivacijom ksenobiotika koja dovodi do formiranja sekundarnih spojeva poput reaktivnih oksidativnih spojeva (slobodnih radikala) koji mogu uzrokovati oštećenje staničnih makromolekula (Oreščanin, 2014). Upravo su Gajski i sur. utvrdili da pojedinačni, ali također i sinergistički ili antagonistički učinci pojedinih komponenata procjednih voda mogu biti odgovorni za oštećenje stanica i u konačnici oštećenja genoma čime su potvrdili genotoksični potencijal procjednih voda s odlagališta otpada.

Dakle, mala količina procjedne vode u kontaktu s tlom može uzrokovati onečišćenje velikog dijela podzemnih voda okolnog područja i time utjecati na bioraznolikost vodenih ekosustava, ugroziti prehrambeni lanac te izvore pitke podzemne i površinske vode (Gajski i sur., 2012).

### 2.3.1. Količina i sastav procjedne vode odlagališta otpada

Procjedne vode nastaju izvan tijela odlagališta kada je unutarnji sadržaj vlage u otpadu veći od kapaciteta njenog vezanja (Poznyak i sur., 2008). Pritom, količina i sastav procjednih voda mogu znatno varirati između različitih odlagališta, što ovisi o sljedećim čimbenicima:

- karakteristike odloženog otpada, prvenstveno primarni sadržaj vlage
- makroklimatske i mikroklimatske osobine lokacije
- lokalni hidrološki i hidrogeološki uvjeti terena
- stupanj uređenja odlagališta te tehnologija zbrinjavanja i gospodarenja otpadom

Od navedenih čimbenika, stupanj uređenja odlagališta otpada je iznimno važan jer o tome ovisi količina oborina koja će proći kroz masu otpada, a posljedično i količina nastalih procjednih voda. S druge strane, od početka odlaganja do stabilizacije otpad prolazi kroz različite faze razgradnje, a ovisno o fazi mijenja se i sastav eluata (Tablica 1) (Ruk, 2012).

Tablica 1. Faze razgradnje otpada (Ruk, 2012)

Karakteristike faza	Faza razgradnje				
	1.aerobna	fermentativna	acetogeneza	metanogeneza	2.aerobna
Trajanje	dani/tjedni	tjedni	mjeseci	godine	neodređeno
Temperatura	vrlo visoka	visoka	srednja	srednja	okolišna
pH	blago kiselo	kiselo	vrlo kiselo	neutralno	neutralno
Tip procesa	aerobni	anaerobni	anaerobni	anaerobni	aerobni
Produkti razgradnje	CO <sub>2</sub>	org. kiseline	acetat	metan	CO <sub>2</sub>

U svježe odloženom otpadu, koji je u izravnom kontaktu sa zrakom, prevladava aerobna faza razgradnje organskih tvari koja traje dok ima raspoloživog kisika koji se u konačnici prevodi u ugljikov dioksid.

Odlaganjem novih slojeva otpada koji prekrivaju stari, te djelomičnim prekrivanjem zemljom, zatvara se dotok kisika i proces se nastavlja u anaerobnim uvjetima. Time započinje druga, fermentativna faza razgradnje čiji su krajnji produkti ugljikov dioksid, vodik, amonijak te organske kiseline od kojih većinom prevladava octena kiselina.

Na relativno mladim odlagalištima s visokim sadržajem biorazgradive organske tvari, odvija se faza acetogeneze pri čemu su glavni produkti raspada lako isparljive masne kiseline.

U sljedećoj, metanogenetskoj fazi, metanogeni mikroorganizmi razgrađuju masne kiseline u bioplin kojeg čine metan i ugljikov dioksid. U fazi metanogeneze u procjednim vodama

prevladava organska tvar visoke molekulske mase, koja nije podložna biorazgradnji, a to su u prvom redu različite huminske kiseline (Oreščanin, 2014). Upravo se tamna boja procjedne vode pripisuje huminskim tvarima (Naveen i sur., 2014). Na kraju, kada se potroše organske kiseline nastale u ranim fazama i završi metanogeneza ponovno se uspostavljaju (mikro)aerobni uvjeti i ostatak metana se metabolizira u ugljični dioksid i vodu (Oreščanin, 2014).

Također, u procjednim vodama mogu se naći i teški metali čije koncentracije osim o sastavu otpada, ovise i o fazi njegove razgradnje. U fazi acetogeneze njihova je koncentracija viša u odnosu na ostale faze razgradnje, jer se metali lako otapaju u kiseloj sredini, odnosno pri nižoj pH vrijednosti (Yusmartini i sur., 2013). Od ostalih tvari koje mogu biti prisutne u procjednim vodama svakako treba navesti policikličke aromatske ugljikovodike, halogenirane alifatske ugljikovodike, ostatke pesticida i farmaceutika. Iako su te tvari prisutne u relativno niskim koncentracijama, zbog svoje visoke biološke aktivnosti mogu nepovoljno utjecati na okoliš, a shodno tome i na ljudsko zdravlje (Oreščanin, 2014).

Iz svega navedenog moguće je zaključiti da je procjedna voda po svom sastavu vrlo složen medij koji se, zbog velike heterogenosti okoliša u kojem nastaje, ali i raznolikosti biokemijskih procesa, može opisati kao vodena otopina sastavljena od mješavine onečišćujućih tvari koje se mogu svrstati u četiri skupine: otopljena organska tvar, anorganske makrokomponente, teški metali i ksenobiotički organski spojevi (Christensen i sur., 1994; Oreščanin, 2014).

#### *2.3.1.1. Otopljena organska tvar*

Glavninu organskog opterećenja procjednih voda čini otopljena organska tvar s udjelom oko 80 % od koncentracije ukupnog organskog ugljika (TOC). Kao heterogena smjesa tvari posjeduje značajnu biokemijsku i geokemijsku ulogu u odloženom otpadu, jer upravo zahvaljujući spojevima širokog raspona molarnih masa koji sadrže različite funkcionalne skupine, može reagirati s velikim brojem organskih i anorganskih zagađivača (Huo i sur., 2007; Liu i sur., 2015). Kako bi se opisao sadržaj otopljene organske tvari u upotrebi su sljedeći parametri: biokemijska potrošnja kisika (BPK), kemijska potrošnja kisika (KPK) i ukupni organski ugljik (TOC). U pravilu, procjedne vode nastale iz otpada u ranoj fazi razgradnje posjeduju visoku BPK (9500 mg/l) i još višu vrijednost KPK (14000 mg/l) (Kjeldsen i sur., 2002).

Strukturno različiti organski spojevi od ugljikohidrata i proteina, do sastojaka poput huminske ili fluvinske kiseline te brojnih drugih toksičnih spojeva dio su otopljene organske tvari čiji se



sastav prema Xu i sur. može podijeliti u četiri skupine: huminske kiseline (HA), fluvinske kiseline (FA), hidrofobne neutralne tvari (HoN) i hidrofilne kiseline (HA) (Xu i sur., 2006; Yunus i sur., 2011). Neki od tih spojeva zbog svoje iznimne stabilnosti ostaju postojani i nakon pročišćavanja procjedne vode radi čega postoji mogućnost da, ako se tako pročišćena otpadna voda otpušta u prirodne vode, se tijekom dulje izloženosti organski spojevi bioakumuliraju u ribama i ljudskim tkivima što može uzrokovati brojne javnozdravstvene probleme (Kjeldsen i sur., 2002; Yunus i sur., 2011).

### *2.3.1.2. Anorganske makrokomponente*

Procjedne vode odlagališta komunalnog otpada sadrže brojne anorganske makrokomponente od kojih glavninu čine kalcij, magnezij, natrij, kalij, amonij, željezo, mangan, klorid, sulfat i hidrogenkarbonat. Također, mogu biti prisutni i elementi poput bora, arsena, litija, žive, barija, selena ili kobalta, ali u vrlo niskim koncentracijama radi čega nisu od primarne važnosti za istraživanja. Koncentracije pojedinih makrokomponenti u procjednoj vodi ovise o stadiju razgradnje otpada na odlagalištu, pa su tako primjerice u fazi metanogeneze zbog visokog pH i malog udjela otopljenih organskih tvari koje mogu tvoriti komplekse s kationima elemenata poput kalcija, magnezija, željeza ili mangana, oni prisutni u nižim koncentracijama. Isto tako, udio sulfata u procjednoj vodi tijekom metanogenetske faze je niži zbog mikrobne redukcije sulfata u sulfide (Adhikari i Nath Khanal, 2015).

### *2.3.1.3. Teški metali*

Teški metali mogu također biti sastavni dio procjednih voda i od posebnog su interesa za brojna istraživanja s obzirom na opasnost koju predstavljaju za okoliš (Bakare i sur., 2013). Njihove količine prvenstveno ovise o karakteristikama procjedne vode koje uključuju koncentraciju prisutnih liganada, brzinu protoka i njezinu pH vrijednost (Adhikari i Nath Khanal, 2015). Teški metali koji se najčešće mogu naći u procjednim vodama uključuju kadmij, bakar, olovo, nikal, krom, arsen, mangan, cink i živu, te kao takvi vrlo lako mogu stvarati metalne koloide ili komplekse, posebice s organskom tvari što izravno dovodi do povećanja njihove koncentracije (Reinhart, 1993; Jensen i Christensen, 1999). Mogu predstavljati veliki problem radi izuzetno dobre sposobnosti bioakumulacije u tkivima živih organizama (Bakare i sur., 2013). Iako su u procjednim vodama teški metali uglavnom prisutni u niskim koncentracijama i pritom ne

predstavljaju veliku opasnost za podzemne vode, u slučaju visokih koncentracija i mali volumen procjedne vode može biti znatno toksičan (Bjerg i sur., 2003; Sawaitayothin i Polprasert, 2007).

#### *2.3.1.4. Ksenobiotički organski spojevi*

Prisustvo ksenobiotičkih organskih spojeva u procjednoj vodi porijeklom je iz kućanskog i industrijskog otpada koji uključuje razne boje, sredstva za čišćenje, ljudske i veterinarske lijekove, elektroničku opremu, baterije te vrtno pesticide i gnojiva (Slack i sur., 2005; 2007; Adhikari i Nath Khanal, 2015). Ovisno o sastavu i starosti otpada te tehnologiji upravljanja odlagalištem, u procjednoj vodi prisutni su različiti ksenobiotički organski spojevi poput aromatskih ugljikovodika, fenola, kloriranih alifatskih spojeva, pesticida i plastifikatora (Oman i Rosqvist, 1999; Christensen i sur., 2001; Çeçen i Aktas, 2004). Općenito, ovi spojevi su prisutni u visokim koncentracijama u procjednim vodama i pritom se mogu podijeliti u dvije skupine onečišćivača: monokromatske ugljikovodike koji uključuju benzen, etilbenzen, toluen i ksilene, te halogenirane ugljikovodike kao što su tetrakloretilen i trikloretilen (Kale i sur., 2010). Zanimanje javnosti za ove dvije skupine spojeva povećana je otkako ih je US EPA klasificirala kao endokrine disruptore i primarne zagađivače s obzirom da se u okolišu dugo zadržavaju zbog slabe razgradnje te se zato bioakumuliraju u živim organizmima (Schwarzbauer i sur., 2002).

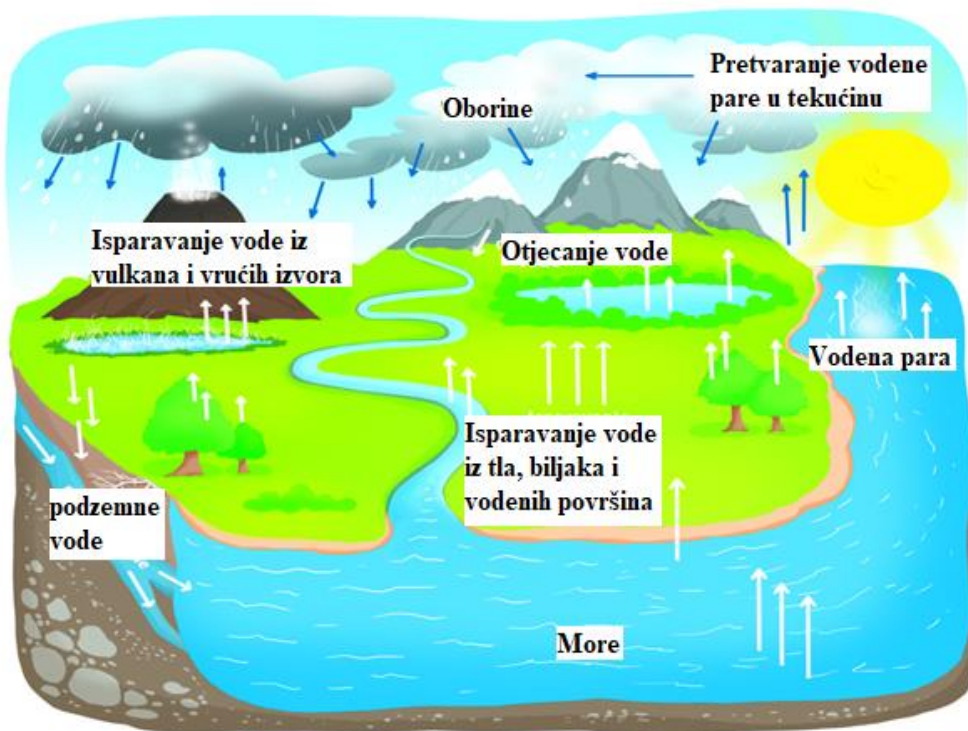
## **2.4. PODZEMNE VODE**

Vode koje se nalaze pod zemljom u pukotinama, pijesku i stijenama te se sporo kreću kroz geološke formacije istih, nazivaju se podzemnim vodama. Sposobnost kretanja vode kroz navedene materijale očituje se u vidu povezanih prostora koji te materijale čine propusnim, pri čemu brzina protoka ovisi o veličini tih prostora u tlu ili stijeni te njihovoj međusobnoj povezanosti. U Sjedinjenim Američkim Državama podzemna voda predstavlja izvor pitke vode za više od 50 % stanovništva, međutim, u najvećoj se mjeri ipak upotrebljava za navodnjavanje poljoprivrednih usjeva. Iako se podzemne vode mogu naći gotovo posvuda, pojedini dijelovi svijeta suočavaju se s ozbiljnim nedostatkom jer se izvori podzemne vode brže iscrpljuju nego što se pune (Anonymus 1, 2020). Podzemne vode, kao glavni izvor zaliha vode za javnu vodoopskrbu u mnogim regijama, predstavljaju vrijedan prirodni resurs i kao takve ih treba zaštititi od kemijskog onečišćenja i ugrožavanja njihove kakvoće (Direktiva, 2006). Naime,

tvori koje se nalaze na površini zemlje mogu se kretati kroz tlo i naći svoj put prema podzemnim vodama. Iako su neki onečišćivači prirodno prisutni u podzemnim vodama, većina ih je ipak posljedica ljudskih aktivnosti. Izvori kontaminacije podzemnih voda su brojni, ali najčešći se odnose na neuređena odlagališta otpada, septičke jame, podzemne spremnike plinova i prekomjernu upotrebu pesticida i gnojiva (Anonymus 1, 2020).

#### 2.4.1. Uloga podzemne vode u hidrološkom ciklusu

Voda na Zemlji u svim svojim oblicima, uključujući vodu iz atmosfere, oceana, površinsku i podzemnu vodu, sudjeluje u prirodnom procesu kruženja koji se naziva hidrološki ciklus (Anonymus 3, 2020) (Slika 1). Pomoću energije sunca, voda isparava s površine zemlje pri čemu nastala vodena para formira oblake. Ovisno o temperaturi i vremenskim uvjetima, vodena para se kondenzira i u vidu različitih vrsta oborina poput kiše, snijega ili tuče, pada na površinu zemlje. Oborine iz visokih područja teče prema nižim područjima zemljine površine pritom završavajući u površinskim vodama poput rijeka, jezera ili mora, dok preostale oborine ulaze u tlo i skladište se kao podzemna voda. Dakle, podzemna voda predstavlja važan dio ovog kontinuiranog ciklusa jer voda najprije isparava iz zemlje, formira oblake i kroz oborine se vraća natrag u zemlju (Anonymus 1, 2020).



Slika 1. Hidrološki ciklus (Anonymus 3, 2019)

#### 2.4.2. Izvori onečišćenja podzemnih voda

Upravo zbog sporijeg protoka podzemne vode onečišćujuće tvari mogu se koncentrirati u velike nakupine koje se većinom kreću istim putem i jednakom brzinom kao i podzemna voda, ali i ovisno o svojim fizikalnim, kemijskim i biološkim svojstvima. Onečišćenje podzemne vode u nekim slučajevima podrijetlom je iz prirodnih izvora, ali većinom je posljedica ljudskog djelovanja. Razne industrijske, komunalne, poljoprivredne i druge aktivnosti mogu uvelike utjecati na kvalitetu podzemnih voda (US EPA, 1993). Izvori onečišćenja podzemnih voda su brojni, ali najčešće se odnose na spremnike raznih kemikalija, ulja ili goriva, neprimjereno smještene i dizajnirane septičke sustave, nepravilno zbrinjavanje opasnog otpada, odlagališta otpada, pesticide te zagađivače porijeklom iz atmosfere (US EPA, 1993; Anonymus 1, 2020).

#### 2.4.3. Utjecaj odlagališta otpada na stanje podzemnih voda

Odlaganje na odlagališta predstavlja uobičajenu praksu gospodarenja čvrstim otpadom u većini zemalja. Međutim, jedan od glavnih razloga zbog kojeg takav način odlaganja otpada predstavlja veliku prijetnju okolišu je neuređenost, posebice starijih odlagališta koja nemaju izvedene zaštitne glinene ili sintetičke podloge niti sustave za odvodnju voda koje dolaze s odlagališta i sadrže onečišćenja. Ukoliko se pritom odlagalište nalazi iznad vodonosnika, u blizini površinskih voda ili na geološki osjetljivom i propusnom tlu, veća je vjerojatnost da će doći do onečišćenja podzemnih voda. Naime, uslijed prodiranja vlage u masu otpada i njegovog raspada dolazi do stvaranja procjedne vode koja sadrži širok spektar onečišćenja koji mogu ozbiljno ugroziti sustav podzemnih voda. Problem predstavljaju i zatvorena odlagališta koja nisu prekrivena nepropusnim materijalom te se procjedna voda nastavlja stvarati i dugi niz godina nakon njihova zatvaranja (US EPA, 1993; Aziz i sur., 2014). Kako bi se smanjilo prodiranje procjedne vode u podzemne vode, danas se u sklopu odlagališta izvode sustavi za skupljanje procjednih voda, obloge i pokrovi kako bi se odlaganje otpada moglo provoditi na sanitaran način (Aziz i sur., 2014). Također, i kod saniranih odlagališta postoji mogućnost ugrožavanja kvalitete podzemnih voda, s obzirom da u određenim situacijama i sustav obloga može s vremenom podbaciti (Banu i Berrin, 2015).

#### 2.4.4. Posljedice onečišćenja podzemnih voda

Posljedice onečišćenja podzemnih voda nerijetko su ozbiljne i najčešće dovode do gubitka opskrbe vodom, smanjenja kvalitete pitke vode, ugrožavanja sustava površinskih voda, visokih

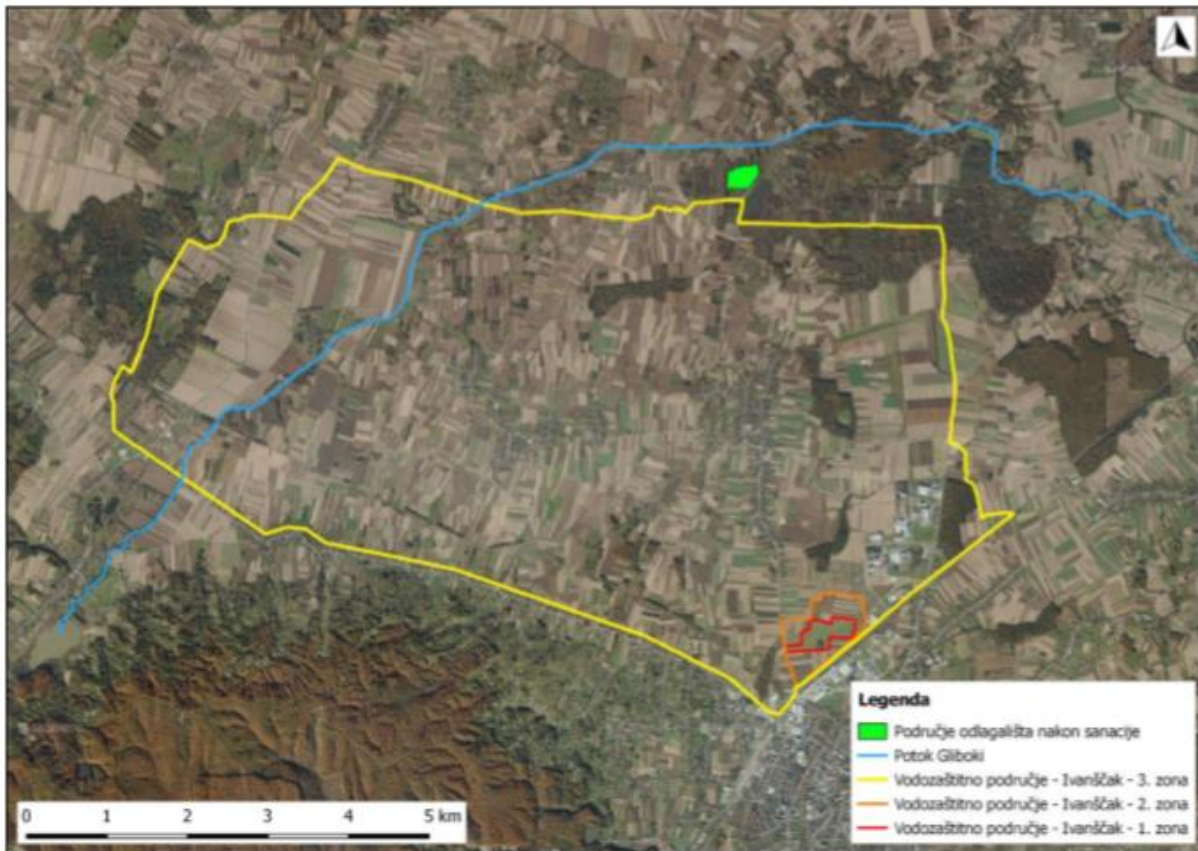
troškova njezinog pročišćavanja te potencijalnih zdravstvenih problema. S obzirom na sporo kretanje podzemne vode, često treba dulje vremena da bi se onečišćenje opazilo, što u konačnici značajno otežava i poskupljuje njezino pročišćavanje. Naime, podzemne vode mogu biti onečišćene velikim brojem raznih kemikalija i mikroorganizama. Shodno tome, voda za piće koja u sebi sadrži bakterije ili viruse može uzrokovati bolesti poput kolere, hepatitisa ili giardijaze, dok visoka koncentracija nitrata u pitkoj vodi može dovesti do razvoja methemoglobinemije ili „sindroma plave djece“. Također, teški metali poput olova mogu uzrokovati ozbiljne zdravstvene probleme jetre ili bubrega, ali i dovesti do poteškoća sa učenjem, dok je benzen kao poznati ljudski karcinogen također potencijalno prisutan u vodi za piće. Iz tog razloga, koncentracije ovih, ali i drugih spojeva u vodi za piće regulirane su državnim zakonima kojima se nastoji nadzirati i time spriječiti onečišćenje podzemnih voda čime se izravno umanjuje zdravstveni rizik povezan s lošom kvalitetom pitke vode (US EPA, 1993).

## **2.5. ODLAGALIŠTE OTPADA PIŠKORNICA**

### **2.5.1. Obilježja šireg područja lokacije odlagališta otpada**

Odlagalište otpada Piškornica smješteno je na području općine Koprivnički Ivanec, 8 km zračne udaljenosti sjeverno od grada Koprivnice, dok je najbliže naselje Pustakovec udaljeno oko 1 km zračne udaljenosti. U sklopu odlagališta se provodi odlaganje miješanog komunalnog otpada s područja spomenute općine te Grada Koprivnice. Sama lokacija odlagališta definirana je prostornim planom Koprivničko - križevačke županije i sukladno lokacijskoj dozvoli zauzima ukupnu površinu od oko 10,5 ha, od čega površina odlagališta unutar ograde iznosi oko 10 ha te se otpad odlaže na površinu od oko 6,7 ha. Šire područje lokacije Piškornica ima razvijenu hidrografsku mrežu sastavljenu od desnih pritoka rijeke Drave, prokopanih kanala, jezerskih površina i podzemne vode koja je izravno povezana s površinskim vodotocima. Ipak, za odlagalište otpada Piškornica najznačajniji je potok Gliboki koji kao pritoka rijeke Drave teče otprilike 250 m sjeverno od lokacije, te vodocrpilište Ivanščak gdje se zahvaćaju vode za ljudsku potrošnju. Na slici 2, vidljivo je da je područje lokacije odlagališta otpada Piškornica smješteno nizvodno i izvan granica vodozaštitnog područja crpilišta Ivanščak. Međutim, iako je danas veći dio odlagališta saniran te odlagalište ima u potpunosti izgrađene brtvene slojeve, i dalje je jedan dio starog odlagališta bez podinske zaštite te je iz tog dijela prema spomenutim

vodnim tijelima moguće širenje oblaka onečišćenja formiranog za vrijeme odlaganja otpada do početka sanacije (Studija, 2019).



Slika 2. Šire područje odlagališta Piškornica (Studija, 2019)

### 2.5.2. Sanacija odlagališta otpada

Od 1982. godine na ovoj lokaciji se provodi organizirano odlaganje komunalnog i industrijskog otpada, pri čemu se do sanacije odlaganje vršilo na nesantaran način, odnosno otpad se odlagao na propusno dno bez izvedene odvodnje i pročišćavanja procjednih voda. Bez postojanja podinske barijere procjedne vode ulaze u vodonosnik i kao oblak zagađenja šire se i putuju nizvodno prema vodnim tijelima. Dakle, procjeđivanjem oborinskih voda kroz tijelo odlagališta stvarao se fluid koji sadrži otpadne vode zasićene s brojnim tvarima opasnim po vodna tijela. Upravo iz tog razloga 2005. godine započinje se s radovima uređenja i sanacije odlagališta otpada Piškornica pri čemu je sanacija predviđena na način da se na ploham za odlaganje otpada izvede donji brtveni sloj i sustav za sakupljanje procjednih voda te se zatim, na takvu uređenu podlogu, provede premještanje postojećeg, odnosno starog otpada. Na tako uređene plohe se osim starog, svakodnevno odlaže i novo-pristigli otpad. Dakle, sanacijom su u potpunosti su izvedeni temeljni brtveni sustavi ploha, sustav upravljanja procjednim vodama,

sustav za sakupljanje i odvodnju procjedne vode, dvije lagune za sakupljanje procjednih voda, kanal za odvodnju oborinskih voda i sustav za recirkulaciju procjednih voda (Studija, 2019).

U sklopu radova koji su se provodili do 2012. godine kroz tri faze, na odlagalištu otpada Piškornica sanirane su plohe 1, 2 i 3 te se otpad od 2018. godine odlaže na plohu 4 na sanitaran način. U trenutnoj situaciji je ostalo nesansirano oko 100 000 m<sup>3</sup> otpada izvan granica, odnosno južno od tijela odlagališta, što je potrebno hitno sanirati kako bi se spriječilo daljnje formiranje oblaka zagađenja koji potencijalno može ugroziti prethodno spomenuta vodna tijela i izvore pitke površinske i podzemne vode (Studija, 2019).

Na lokaciji današnjeg odlagališta otpada Piškornica planirana je izgradnja regionalnog centra za gospodarenje otpadom (RCGO) Piškornica površine 43,6 ha kojem je predviđena obrada i zbrinjavanje komunalnog i neopasnog proizvodnog otpada, te koji bi do 2023. godine trebao zamijeniti postojeće odlagalište otpada (Studija, 2019; Anonymus 4, 2020). Na taj način se nastoji uspostaviti cjeloviti sustav gospodarenja otpadom za sjeverozapadnu Hrvatsku koji će obuhvatiti četiri županije: Koprivničko – Križevačku, Krapinsko – Zagorsku, Međimursku i Varaždinsku županiju (Elaborat, 2019). Takav sustav podrazumijeva različite načine postupanja s otpadom koji se međusobno nadopunjuju u svrhu sigurnijeg i učinkovitijeg upravljanja istim uz smanjenje nepovoljnih utjecaja na okoliš i stanovništvo (Anonymus 2, 2019).

### 2.5.3. Studija utjecaja na vode promatranog područja

Osim samog odlagališta, prirodna obilježja šireg područja također mogu doprinijeti širenju onečišćenja u površinske i podzemne vode. Osim travnjačkih zajednica, šikara, šuma i kultiviranih nešumskih površina, te staništa s korovnom vegetacijom, u neposrednoj blizini lokacije odlagališta Piškornica prevladava i kultivirani krajobraz kojeg karakteriziraju brojne poljoprivredne površine (Studija, 2019). Prilikom obrađivanja poljoprivrednih površina česta je upotreba raznih gnojiva u svrhu ostvarivanja prinosa dobre kakvoće. U Koprivničko-križevačkoj županiji je 2012. godine utrošeno 13,116 tona mineralnih i organskih gnojiva što je svrstava u treću po redu županiju u Hrvatskoj po potrošnji gnojiva u poljoprivredi. Upravo navedene poljoprivredne površine velikim dijelom su obradive, i kao takve okružuju potok Gliboki (Elaborat, 2019).

Naime, prema provedenoj studiji, u uzorcima vode potoka Gliboki uzetim u neposrednoj blizini odlagališta otpada Piškornica utvrđene su povećane koncentracije udjela bakra. S obzirom da je provedena sanacija odlagališta, povećane koncentracije bakra u površinskim vodama dovode

se u izravnu vezu s poljoprivrednim aktivnostima koje se provode u blizini tog područja. Danas se bakar upotrebljava u različitim industrijskim djelatnostima poput uklanjanja merkaptana u preradi nafte, dok se u poljoprivredi koristi kao fungicid i to naročito u vinogradarstvu. Također, bakar je sastavni dio organskih i mineralnih gnojiva, a u vodu također može ući i kao posljedica korozije vodoopskrbne mreže. S druge strane, na odlagalištu otpada bakar je kao teški metal prisutan kao sastavni dio otpada, npr. plastike, ali i iz mulja iz uređaja za obradu otpadnih voda. Iz navedenog možemo zaključiti da će u određenim situacijama biti potrebno razlučiti jesu li određeni kontaminanti porijeklom s odlagališta otpada ili su rezultat povećanih poljoprivrednih aktivnosti u blizini (Studija, 2019).

## **2.6. ISPITIVANJE STANJA PODZEMNIH VODA**

Velika urbanizacija i ubrzani razvoj industrije u svijetu doveli su do značajnog onečišćenja površinskih voda koja se u velikoj mjeri iscrpljivala za potrebe javne vodoopskrbe. Time se počinje javljati potreba za vodom iz drugih izvora pri čemu podzemna voda kao važno prirodno bogatstvo koje se nerijetko koristi u razne svrhe, postaje iznimno dragocjena i kao izvor pitke vode za velik broj stanovništva. Iz tog razloga je postalo izuzetno bitno da njezina kvaliteta bude u skladu s propisanim standardima (Abbulu i Srinivasa Rao, 2013). Međutim, često se događa da odlaganjem otpada na neuređena odlagališta te njegovim ispiranjem dolazi do stvaranja procjednih voda i zagađenja čovjekova okoliša pri čemu su posebno ugrožene podzemne vode jer dolazi do njihovog onečišćenja (Barčić i Ivančić, 2010). Onečišćenje vode odnosi se na unošenje energije i tvari u prirodne vode koje narušavaju njezinu kvalitetu i čine ju manje upotrebljivom, a posebno za opskrbu pitkom vodom. Onečišćenost prirodnih voda može se utvrditi fizikalnim, kemijskim i biološkim analizama (Jambrović, 2013). Fizikalnim ispitivanjem najčešće se određuje mutnoća, boja, miris, temperatura, električna provodljivost i sadržaj krutih čestica, dok se kemijskim analizama većinom prati pH, otopljeni kisik, kiselost, alkalitet, koncentracije klorida, fluorida, toksične anorganske tvari (teški metali, nitrati, cijanidi) i toksične organske komponente (pesticidi, otapala, detergentski). Također, još jedan pokazatelj kakvoće vode može biti prisutnost živih organizama poput bakterija, virusa, algi i protozoa koji se određuju biološkom analizom, pri čemu se mikrobiološkim ispitivanjima često određuje prisutnost koliformnih bakterija poput bakterije *Escherichia coli* koja se smatra indikatorom fekalnog zagađenja (Hassan Omer, 2019).

Sve je veći rast svijesti o povezanosti ljudskog zdravlja i štetnih učinaka odlagališta otpada s obzirom na porast učestalosti karcinoma (Janerich i sur., 1981), nisku masu novorođenčadi (Vianna i Polan, 1984) te kromosomskih promjena (Heath i sur., 1984) među ljudima koji su



izloženi opasnim kemikalijama koje se ispuštaju s odlagališta (Bakare i sur., 2013). S obzirom da procjedne vode sadrže brojne toksične i kancerogene tvari, kroz dugotrajnu izloženost te tvari se mogu bioakumulirati u živim organizmima i tako postati dio prehrambenog lanca (Sang i Li, 2004). Iz tog razloga, navedene analize voda najčešće nisu dovoljne kako bi se mogao procijeniti njihov potencijalni genotoksični učinak na žive organizme u okolišu, pa se u tu svrhu sve češće koriste biotestovi (Siddique i sur. 2005). Izloženost genotoksičnim tvarima može dovesti do značajnih promjena pri čemu one mogu zahvatiti jednu generaciju uzrokujući oštećenja genoma somatskih stanica, ili dovode do dugotrajnih učinaka u vidu oštećenja genoma u germinativnim stanicama. Opisano može rezultirati smanjenom plodnosti populacija koje nastanjuju vodeni okoliš, ugrožavanjem bioraznolikosti ili u konačnici potpunim izumiranjem (Widziewicz i sur., 2012).

Upravo se biotestovi kojima se utvrđuje genotoksičnost i mutagenost, kao *in vivo*, *in vitro* i *in situ* ispitivanja koriste za procjenu svojstva raznih ksenobiotika da različitim mehanizmima uzrokuju oštećenja DNA i kromosoma. Genotoksičnost pojedine smjese tvari obično se određuje izlaganjem prokariotskih ili eukariotskih organizama različitim koncentracijama te smjese nakon čega se ispituje je li došlo do genetičkih oštećenja. Pritom, tvari koje su se pokazale pozitivnim na ove testove ubrajaju se u potencijalne ljudske kancerogene, odnosno mutagene što na kraju upućuje na to da procjedne vode i njima kontaminirana vodna tijela mogu izazvati genotoksične i mutagene učinke u mikrobnim, biljnim i životinjskim organizmima (Bakare i sur., 2013).

#### 2.6.1. Citotoksičnost i test formiranja kolonija (engl. *colony forming assay*)

Obilježje neke tvari da pri određenim koncentracijama značajno umanjuje preživljavanje stanica nekog test sustava naziva se citotoksičnost (Pacadi, 2015). Postoje različiti biološki mehanizmi djelovanja citotoksičnih tvari poput utjecaja na sintezu esencijalnih proteina ili sposobnost stanične diobe, što najčešće rezultira sprječavanjem replikacije stanica ili staničnom smrću (Hegarty i Chisholm, 2002). Citotoksičnost pojedinih tvari se može odrediti putem klasičnih testova toksičnosti koji uključuju istraživanja na životinjama, ili alternativnih testova toksičnosti koji u istraživanjima koriste stanične linije ili mikroorganizme (Pacadi, 2015). U posljednje vrijeme, naglasak je na alternativnim testovima koji su znatno brži i jeftiniji te se njihovom provedbom uvelike smanjuje korištenje životinja. Također, pomoću njih moguće je odrediti i specifični mehanizam toksičnosti neke tvari na pojedini organ ili čak vrstu stanica (Putnam i sur., 2002). U najčešće korištene testove citotoksičnosti i stanične vijabilnosti nakon

izlaganja toksičnim tvarima ubrajaju se MTT test, neutral red test, test oslobađanja enzima LDH i ispitivanje proteina (Fotakis i Timbrell, 2006). Osim navedenog, u svrhu određivanja djelotvornosti pojedinih citotoksičnih agensa često se primjenjuje klonogeni test ili test formiranja kolonija koji predstavlja *in vitro* metodu određivanja sposobnosti preživljavanja stanica temeljenu na mogućnosti izrastanja pojedinačne stanice u koloniju. Pritom, kolonija je okarakterizirana kao skupina od barem 50 stanica. Tijekom testa prati se svojstvo neograničenog rasta, odnosno stvaranja klonova svake pojedine stanice u populaciji. Nakon tretiranja pojedinim agensima samo manji dio izloženih stanica preživi i kao takve stvaraju kolonije u vremenskom rasponu od 1 – 3 tjedna (Franken i sur., 2006).

## 2.6.2. Oksidativni stres i slobodni radikali

Neravnoteža između proizvodnje slobodnih radikala i reaktivnih metabolita, odnosno oksidansa ili reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) koja može utjecati na oštećenje važnih biomolekula i organa naziva se oksidativni stres (Pacadi, 2015). Taj nepovoljni utjecaj reaktivnih kisikovih vrsta umanjuje se djelovanjem antioksidanasa koji štite biološki sustav od toksičnog djelovanja slobodnih radikala (Liguori i sur., 2018). U skupinu reaktivnih kisikovih spojeva najčešće se ubrajaju hidroksilni radikal, superoksidni anionski radikal, vodikov peroksid, kisikov singlet, radikal nitrita, hipoklorit i peroksinitrit radikal (Lobo i sur., 2010). Mogu nastajati tijekom uobičajenih metaboličkih procesa koji se odvijaju u organizmu ili biti porijeklom iz vanjskih izvora u slučaju izloženosti organizma X-zrakama, ozonu, dimu cigarete, zagađivačima zraka ili industrijskim kemikalijama (Liguori i sur., 2018).

Slobodni radikali su visoko reaktivni atomi ili molekule koji u svojoj vanjskoj ljusci sadrže jedan ili više nesparenih elektrona (Chandrasekaran i sur., 2017). Nastaju u stanicama i kao takvi mogu prihvatiti ili donirati elektrone, pri čemu se ponašaju kao oksidansi ili reducensi. Zahvaljujući nesprenom elektronu, slobodni radikali su iznimno nestabilni a time i vrlo reaktivni pri čemu mogu izazvati oštećenja biološki važnih molekula poput proteina, DNA, ugljikohidrata i lipida (Lobo i sur., 2010). Upravo navedeni prijenos elektrona utječe na oksidativno stanje stanica što pospješuje ili zaustavlja aktivnost različitih signalnih puteva i u konačnici mijenja sudbinu stanice, ali i cijelog organizma (Pacadi, 2015). Tako su brojna istraživanja pokazala da oksidativni stres za posljedicu može imati razvoj različitih bolesti poput multiple skleroze, brojnih neurodegenerativnih i kardiovaskularnih bolesti, reumatoidnog artritisa i raka (Katerji i sur., 2019).

### *2.6.2.1. Oštećenje proteina kao posljedica oksidativnog stresa*

Oksidativne modifikacije proteina najčešće uključuju reakcije proteinske karbonilacije i nitriranja tirozina tijekom kojih dolazi do reakcije između proteinskih aminokiselinskih ostataka i reaktivnih kisikovih (ROS) ili reaktivnih dušikovih spojeva (RON). Iako se obje vrste reakcija povezuju s oksidativnim oštećenjima, najčešće se sadržaj karboniliranih proteina primjenjuje kao biomarker prisutnosti oksidativnog stresa u stanicama (Cai i Yan, 2013). Izlaganje aminokiselinskih ostataka proteina i vezanje karbonilnih skupina na iste može dovesti do gubitka strukture, a time i funkcije proteina što u konačnici ima negativan utjecaj na rad cijele stanice. Velik broj studija pokazuje kako se proteinska karbonilacija češće odvija u starijim stanicama, tkivima i organima, te se često povezuje s razvojem pojedinih bolesti poput Parkinsonove ili Alzheimerove, raka, dijabetesa te sepse (Nystrom, 2007).

### *2.6.2.2. Oštećenje lipida kao posljedica oksidativnog stresa*

Osim proteina, reaktivni kisikovi spojevi mogu uzrokovati i oštećenje lipida u vidu lipidne peroksidacije koja se smatra glavnim pokazateljem oštećenja staničnih membrana (Katerji i sur., 2019). Intenzivna lipidna peroksidacija u staničnim membranama dovodi do gubitka fluidnosti, opadanja vrijednosti membranskoga potencijala, povećanja permeabilnosti prema vodikovim i drugim ionima, te do moguće rupture stanice i otpuštanja njezina sadržaja. Iako je proces peroksidacije najčešće uzrokovan hidroksilnim radikalom, također ga mogu pokrenuti i brojni drugi radikali pri čemu su njihova najčešća meta višestruko nezasićene masne kiseline (PUFA) (Štefan i sur., 2007). Oštećenje lipida može se odrediti mjerenjem količine brojnih produkata lipidne peroksidacije, dok se za procjenu statusa oksidativnog stresa često određuje udio nastalog malondialdehida (MDA) (Katerji i sur., 2019).

### *2.6.3. Kromosomski lomovi*

Agensi ili kemikalije različitog porijekla koje mogu uzrokovati oštećenja DNA ili kromosomska oštećenja nazivaju se genotoksini (Pacadi, 2015). Pritom, molekula DNA može biti oštećena izravno, pucanjem kemijskih veza u molekuli, ili neizravno putem stvaranja slobodnih radikala. Izravni učinci na DNA javljaju se u obliku prijeloma jednog (SSB – single strand break) ili obaju lanaca molekule DNA (DBS - double strand break) (Grgić, 1997). Između ostalog, takva oštećenja molekule DNA mogu rezultirati nastankom kromosomskih aberacija gdje na razini kromosoma dolazi do promjena u njihovoj strukturi. Takve strukturne promjene kromosoma obuhvaćaju lomove koji mogu zahvatiti jednu ili dvije kromatide. Kada

je zahvaćena samo jedna od dvije kromatide repliciranog kromosoma, tada govorimo o kromatidnim aberacijama, a ukoliko se lomovi dogode u obje kromatide repliciranog kromosoma radi se o kromosomskom lomu. Kao posljedica kromosomskih lomova mogu nastati stanice s izmijenjenim brojem gena uslijed delecije ili duplikacije, ili može doći do promjene lokacije gena kao rezultat inverzije i translokacije (Durgo, 2019). Spomenute promjene mogu biti uzrokovane djelovanjem različitih fizičkih, kemijskih ili bioloških agenasa. Iako su navedeni agensi često porijeklom iz okoliša, važno je napomenuti kako i ljudski organizam može stvarati spojeve poput prethodno opisanih reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta, produkata lipidne peroksidacije, endogenih alkilirajućih agenasa i metabolita estrogena ili kolesterola od kojih većina posjeduje primarno mutageno, a neki i citostatičko ili citotoksično djelovanje što u konačnici može dovesti do starenja, malignih transformacija ili smrti stanica (Hoeijmakers, 2009). Tako povećan broj kromosomskih oštećenja može poslužiti kao indikator izloženosti različitim genotoksičnim agensima i time upućivati na mogući rizik pojave raka (Garaj-Vrhovac, 2000).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

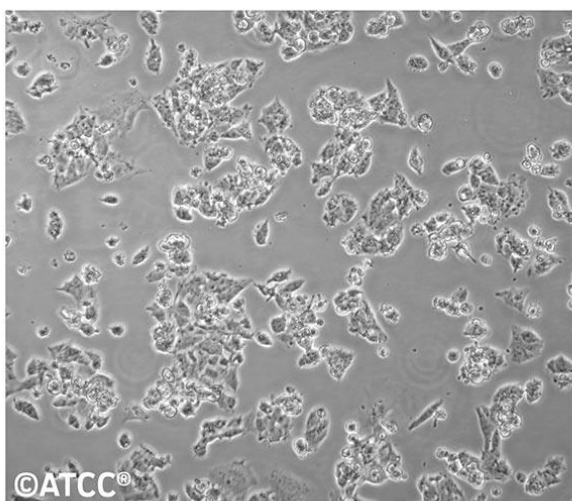
#### 3.1. MATERIJALI

U ovom poglavlju opisani su materijali potrebni za ispitivanje genotoksičnog učinka voda s odlagališta otpada Piškornica na humane stanice karcinoma jezika i jetre. U podpoglavljima od 3.1.1. do 3.1.4. opisani su korišteni biološki test sustavi i uzorci voda, te su navedene sve upotrijebljene kemikalije, otopine i laboratorijska oprema.

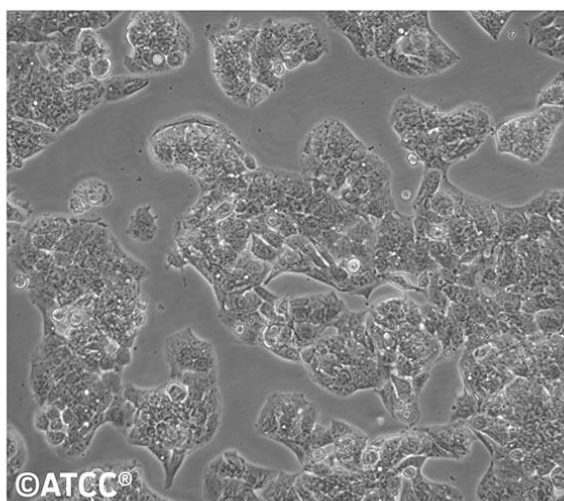
##### 3.1.1. Biološki test sustavi za utvrđivanje genotoksičnog učinka

U svrhu provedbe istraživanja u ovom radu korištene su kontinuirane humane stanične linije hepatocelularnog karcinoma jetre Hep G2 (Slika 3) te oralnog pločastog karcinoma Cal 27 (Slika 4). Navedene stanične linije rasle su u monosloju unutar plastičnih T-boca inkubiranih pri 37 °C u vlažnoj atmosferi te uz 5 % CO<sub>2</sub>. Uzgoj je proveden u kompletiranom mediju Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640, Invitrogen) uz dodatak 10 %-tnog fetalnog goveđeg seruma (engl. *Fetal Bovine Serum*, FBS). Tijekom postupka presađivanja stanica, iste su odvojene od podloge i razdvojene pomoću otopine tripsina koncentracije 0,25 %.

ATCC Number: **HB-8065**  
Designation: **Hep G2**



Low Density

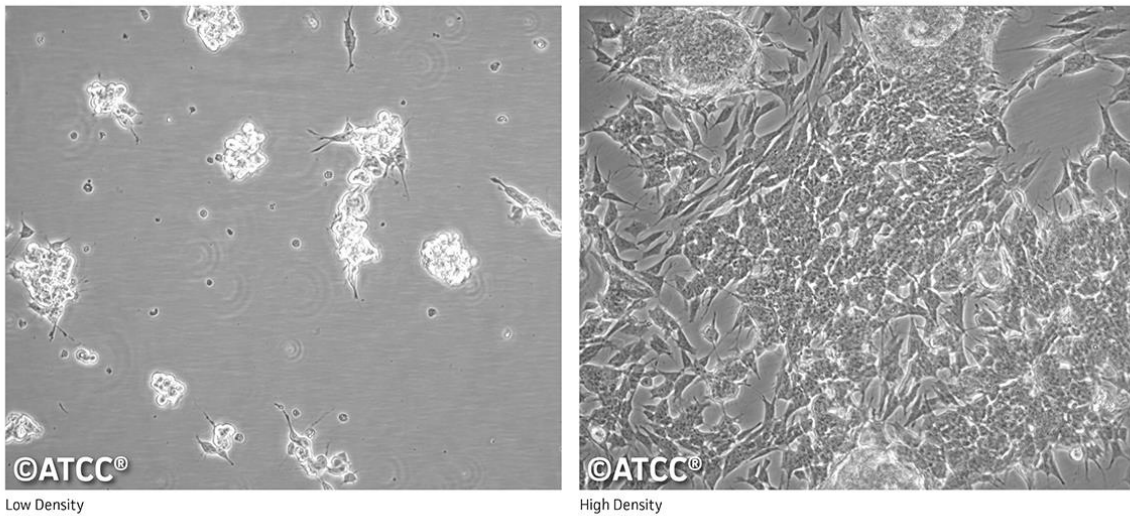


High Density

Slika 3. Komercijalno dostupna stanična linija Hep G2 (Anonymus 5, 2017)

ATCC Number: CRL-2266

Designation: SH-SY5Y (mixed adherent and suspension)



Slika 4. Komercijalno dostupna stanična linija Cal 27 (Anonymus 6, 2020)

### 3.1.2. Uzorci vode s područja odlagališta otpada Piškornica

U svrhu genotoksikoloških istraživanja korišteni su sljedeći uzorci voda:

Uzorak 1 – podzemna voda uzvodno od odlagališta Piškornica

Uzorak 2 – podzemna voda nizvodno od odlagališta Piškornica

Uzorak 3 – procjedna voda odlagališta Piškornica

Uzorak 4 – površinska voda nizvodno od odlagališta Piškornica

Navedeni uzorci voda pripremljeni su za ispitivanje i analizirani na fizikalno-kemijske parametre od strane tvrtke Euroinspekt Croatiakontrola d.o.o.. Rezultati provedene analize se nalaze u Prilogu 1. Uzorkovanje voda je provedeno u lipnju 2020. godine tijekom kojeg su uzorci prikupljeni pomoću potopne pumpe (Grundfos, model MP1) spojene na benzinski agregat. Uzorci su pripremljeni uparivanjem na rotacionom uparivaču (Heidolph, model Elaborata 4000) te na uparivaču dušikom (VLM, model V.649.061.820) gdje je svaki pojedini uzorak koncentriran 100 puta. Određivanje organskog i anorganskog sastava uzoraka voda provedeno je prema akreditiranim ISO metodama na umjerenim uređajima:

- pH metar Mettler Toledo, model Five Easy
- KPK BEHR termoreaktor model TRS 300
- spektrofotometar HACH, model DR 6000

- GF-AAS Perkin Elmer, model AAnalyst 600
- FLAME-AAS Analytik Jena model NOVAA 350

### 3.1.3. Kemikalije

- 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH), Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka
- agarozna niske točke tališta (LMP), Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka
- agarozna normalne točke tališta (NMP), Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka
- bovine serum albumin (BSA), Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka
- coomassie blue, Bio-Rad, SAD
- dimetil-sulfoksid (DMSO), p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- etanol, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- etidij-bromid, Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka
- etil acetat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- fetal bovine serum (FBS), Gibco, Carlsbad, SAD
- fosfatna kiselina, Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka
- giemsa, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- gvanidin hidroklorid, Acros organics, New Jersey, SAD
- kalij-hidrogenfosfat, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- kalij-klorid, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- kristal violet, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- malondialdehid, Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim
- Na<sub>2</sub>EDTA, Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka
- natrij dodecil sulfat (SDS), Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka
- natrij-hidrogenfosfat dodekahidrat, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- natrij-klorid, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- natrij-laurilsarkozinat, Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka
- tiobarbiturna kiselina (TBA), Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka
- trikloroetena kiselina (TCA), Fisher Scientific, Loughborough, Velika Britanija
- tripsin, Gibco, Carlsbad, SAD
- tris-HCl, Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka

*i) Otopine korištene za provođenje klonogenog testa (testa formiranja kolonija)*

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

- natrijev klorid 4,0 g
- kalijev klorid 0,1 g
- natrijev hidrogenfosfat dodekahidrat 1,16 g
- kalijev hidrogenfosfat 0,1 g
- destilirana voda 500,0 mL

Sterilizira se 20 minuta pri 120 °C.

b) Otopina kristal violet/giemsma

*ii) Otopine korištene za provođenje testa proteinske karbonilacije*

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

- natrijev klorid 4,0 g
- kalijev klorid 0,1 g
- natrijev hidrogenfosfat dodekahidrat 1,16 g
- kalijev hidrogenfosfat 0,1 g
- destilirana voda 500,0 mL

Sterilizira se 20 minuta pri 120 °C.

b) Bradford reagens:

- Coomasie blue 10 mg
- etanol (96 %-tni) 5 mL
- fosfatna kiselina 10 mL
- destilirana voda 100 mL

*iii) Otopine korištene za provođenje testa lipidne peroksidacije*

a) Tiobarbiturna kiselina (0,67 %)

- tiobarbiturna kiselina 0,067 g
- destilirana voda 10,0 mL

b) Trikloroctena kiselina (10 %)



- trikloroocetna kiselina 1 g
- destilirana voda 10 mL

*iv) Otopine korištene za provođenje komet testa*

a) Otopina NMP agaroze (1.5 %):

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

b) Otopina NMP agaroze (6 %):

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- tris-HCl 48,5 g

- destilirana voda 1000,0 mL

g) Otopina etidij-bromida:

- etidij-bromid 2,0 µg
- destilirana voda 1,0 mL

### 3.1.4. Laboratorijska oprema

#### *i) Laboratorijski uređaji*

- analitička vaga, MC1 Laboratory LC 62OP, Sartorius, Goetingen, Njemačka
- autoklav, IPIM, Hrvatska
- CO<sub>2</sub> inkubator, Brouwer CH, Luzern, Švicarska
- centrifuga- HC-240, Tehnica, Železniki, Slovenija
- epifluorescencijski mikroskop, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Njemačka
- laminar, IBK 1 V2, Iskra, Šentjernej, Slovenija
- spektrofotometar – microreader, Tecam, Männedorf, Njemačka
- sustav za analizu slike i mjerenje kometa, Comet Assay II, Perceptive Instruments Ltd, UK
- termoblok, ISKRA, Slovenija
- termostat, ISKRA, Slovenija
- tresilica, ISKRA, Slovenija

#### *ii) Laboratorijski pribor*

- brušena predmetna stakalca
- Bürker-Türk komorica
- Eppendorf epruvetice
- Erlenmeyerove tikvice (50 – 200 mL), KIMAX Kimble, Velika Britanija
- kivete za spektrofotometar
- mikropipete, 10-1000 µL, Eppendorf, Hamburg, Njemačka
- mikrotitracijske ploče, Falcon, BD Company, Franklin Lakes, SAD
- Pasteurove pipete, 5-25 mL
- plastične Petrijeve zdjelice, Aptaca, Canelli, Italija
- propipeta
- staklene pipete (5-25 mL)

- T-boce ( 5 mL, 25 mL, 200 mL), Falcon, BD Company, Franklin Lakes, SAD
- tipsevi (0,1-1000  $\mu$ L), FINNTIP, Thermo Electron Corporation

### 3.2. METODE RADA

U ovom poglavlju opisani su svi provedeni postupci potrebni za određivanje genotoksičnog učinka voda s odlagališta otpada Piškornica na kontinuirane stanične linije Hep G2 i Cal 27.

#### 3.2.1. Kultivacija staničnih linija Hep G2 i Cal 27 u monosloju

Stanične linije čuvaju se zamrznute na temperaturi od  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  u krioprotektivnom sredstvu, 10 % glicerolu ili 10 % dimetil-sulfoksidu. Iz tog razloga prije početka rada potrebno ih je odmrznuti koristeći vodenu kupelj temperature  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  te centrifugiranjem (100 rpm/5 min) odvojiti supernatant koji sadrži ostatak medija i krioprotektivnog sredstva. Dobivenom talogu dodaje se svježi medij zagrijan na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , stanice se resuspendiraju i ponovno centrifugiraju. Tako resuspendirani talog stanica nasaduje se u Petrijeve zdjelice promjera 5 cm čime se omogućava stanična propagacija. Nakon vremenskog perioda od 24 h stanice se nasaduju u T-boce većeg volumena i uzgajaju u inkubatoru s kontroliranim uvjetima atmosfere, odnosno pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  uz 95 % zraka i 5 %  $\text{CO}_2$ , do subkonfluentnog stanja kada se mogu koristiti u daljnjim eksperimentima. Kako bi se osigurali aseptički uvjeti, važno je da se svi postupci sa staničnim kulturama odvijaju u komori za sterilan rad (Freshney, 2010).

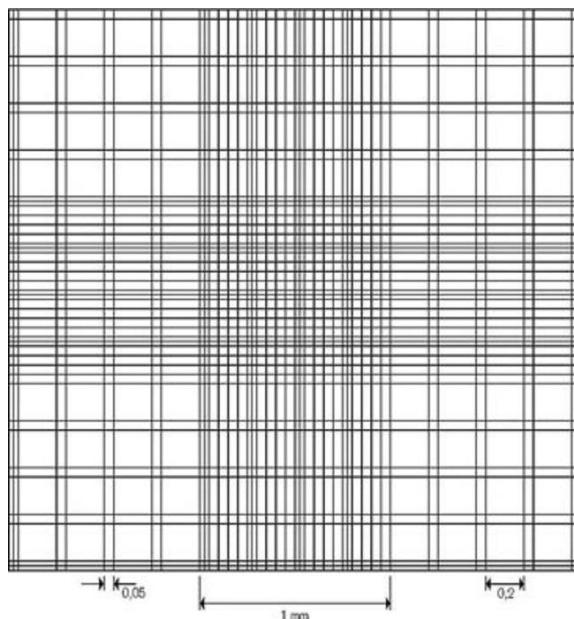
#### 3.2.2. Priprema stanične suspenzije iz subkonfluentnog monosloja

Kada stanice postignu subkonfluentno stanje, iz T-boca se pipetom ukloni medij te se stanice isperu 0,25 %-tnim tripsinom kako bi se iz medija uklonile tvari koje bi mogle inhibirati tripsin. Nakon ispiranja se na stanice dodaje minimalna količina 0,25 %-tne otopine tripsina potrebna da prekrije dno T- boce čime se provodi tripsinizacija stanica prilikom koje se one odvajaju od podloge i poprimaju okrugli oblik. Proteolitički učinak tripsina na stanice zaustavlja se dodatkom medija obogaćenog serumom (Freshney, 2010).

#### 3.2.3. Određivanje broja stanica

Točan broj stanica u pojedinom volumenu uzorka određuje se pomoću Bürker-Türkove komorice i mikroskopa. Nakon provedene tripsinizacije, pomoću mikropipete se uzima 20  $\mu$ L uzorka stanične suspenzije, te se nakon resuspenzije 10  $\mu$ L nanosi na Bürker-Türkovu

komoricu, ispod prethodno postavljenog pokrovnog stakalca. Stanice se broje u četiri velika kvadrata pomoću invertnog mikroskopa pri čemu se svaki veliki kvadrat sastoji od 16 malih kvadrata, a prostor između predmetnog i pokrovnog stakalca iznosi 0,1 mm, dok je površina svakog kvadrata  $1 \text{ mm}^2$ . Prema tome, volumen svakog velikog kvadrata je  $10^{-4} \text{ mL}$ , a konačni broj određuje se kao srednja vrijednost izbrojanih stanica u svakom velikom kvadratu zasebno (Slika 5). Rezultat je izražen brojem stanica po 1 mL stanične suspenzije.



Slika 5. Bürker-Türk komorica (Anonymus 7, 2020)

#### 3.2.4. Priprema otopina uzoraka za genotoksikološka ispitivanja

Svi uzorci voda s odlagališta koncentrirani su 100 puta te prije uporabe filtrirani kroz mikrofilter veličine  $0,45 \mu\text{m}$ . Ispitivane su koncentracije 0,1; 1; 5 i 10x, pri čemu koncentracija 1x predstavlja izvornu koncentraciju svih spojeva prisutnih u vodi prikupljenoj na mjestu uzorkovanja bez prethodnog razrjeđivanja ili koncentriranja. Navedene koncentracije uzoraka voda pripremaju se dodatkom određenog volumena uzorka vode u medij obogaćen serumom.

#### 3.2.5. Određivanje preživljenja staničnih linija Hep G2 i Cal 27 testom formiranja kolonija

Prethodno uzgojene stanične linije Hep G2 i Cal 27 podvrgnute su testu određivanja preživljenja prilikom kojeg je praćena mogućnost njihova razmnožavanja i stvaranja kolonija nakon tretmana uzorcima voda s odlagališta otpada. Za svaku pojedinu staničnu liniju postupak

započinje uklanjanjem starog medija iz T-boca, nakon čega se stanična linija ispere s 2 mL otopine PBS-a i potom joj se doda otopina tripsina kako bi se stanice međusobno razdvojile i odvojile od podloge. Nakon razdvajanja, stanice se pomoću sterilne pipete prebacuju u čistu i sterilnu Erlenmeyerovu tikvicu gdje se u svrhu neutralizacije otopine tripsina stanicama dodaje hranjivi medij. Broj stanica po mililitru podešen je na 30.

Nakon resuspendiranja, stanice se nasađuju na ploču s 24 jažice i provodi se inkubacija u trajanju od 24 sata pri 37 °C. Slijedi uklanjanje medija te se stanice tretiraju uzorcima voda s odlagališta otpada u koncentracijama 0,1; 1; 5 i 10x u trajanju inkubacije od 24 sata, dok se u slučaju negativnih kontrola isti postupak provodi s medijem obogaćenim serumom (1 mL po jažici). Po završetku tretmana iz jažica se uklanjaju uzorci vode i medij, te se stanicama dodaje 1 mL svježeg medija i zatim slijedi inkubacija u trajanju od sedam dana pri 37 °C tijekom koje dolazi do formiranja kolonija.

Nakon provedene inkubacije iz jažica se uklanja medij, te se provodi bojanje stanica dodatkom 200 µL otopine kristal violet/giemsas. Nakon 5 minuta slijedi uklanjanje boje, ispiranje stanica s 1 mL otopine PBS-a te brojanje nastalih kolonija. Postotak preživljenja računa se u odnosu na negativnu kontrolu prema jednačbi [1] (prilagođeno prema Franken i sur., 2006).

*Postotak preživljenja (% u odnosu na kontrolu)*

$$= \left( \frac{N \text{ nastalih kolonija nakon tretmana}}{N \text{ kolonija negativne kontrole}} \right) \times 100$$

[1]

3.2.6. Priprema stanica za određivanje genotoksičnog učinka voda s odlagališta na stanične makromolekule (proteine, lipide i DNA)

U plastične Petrijeve zdjelice promjera 5 cm nacjepljuje se 5 mL staničnih suspenzija Hep G2 i Cal 27 koncentracije  $10^5$  st  $\text{mL}^{-1}$  nakon čega se stanice inkubiraju 24 h pri 37 °C. Po završetku inkubacije, stari medij se zamjenjuje svježim, stanice se tretiraju uzorcima voda s odlagališta koncentracija 0,1; 1 i 5x te se ponovno provodi inkubacija u trajanju od 24 h pri istim uvjetima. U slučaju negativnih kontrola isti postupak provodi s medijem obogaćenim serumom (5 mL po Petrijevoj zdjelici). Nakon završetka tretmana, iz Petrijevih zdjelica se uklanjaju medij i uzorci vode te se stanice ispiru s 1 mL PBS pufera u svrhu uklanjanja ostataka uzoraka vode i medija. Stanice se zatim tripsiniziraju dodatkom 0,5 mL 0,25%- tne otopine tripsina, prebacuju u Eppendorf epruvetice i centrifugiraju (5000 rpm/5 min). Nakon toga, sa staničnog taloga

uklanja se supernatant, a suspenzija stanica se stavi čuvati u led kako bi se mogla upotrijebiti za navedene eksperimente.

### 3.2.7. Određivanje koncentracije ukupnih proteina metodom po Bradfordu

Prooksidativno djelovanje istraživanih voda na stanične proteine i lipide se izražava po ukupnim staničnim proteinima te je stoga u svakom uzorku prvo potrebno odrediti koncentracije ukupnih proteina po Bradfordu. Kako bi se mogla odrediti ukupna koncentracija proteina u uzorcima, prethodno je potrebno napraviti baždarni dijagram pomoću standarda, odnosno telećeg serumskog albumina (BSA). Iz ishodišne otopine BSA potrebno je pripremiti sljedeće koncentracije BSA: 1, 2, 4, 6, 8 i 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . U tako pripremljene otopine, dodaje se 1 mL Bradfordovog reagensa te se mjeri apsorbancija na 595 nm. Iz dobivenih vrijednosti, izradi se baždarni dijagram koji prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji. Nakon što se odredi jednadžba pravca baždarnog dijagrama, mjeri se koncentracija proteina u uzorcima. Iz lizata stanica tretiranih različitim koncentracijama istraživanih uzoraka voda uzorkuje se alikvot od 5  $\mu\text{L}$  koji se stavlja u kivetu skupa s 95  $\mu\text{L}$  destilirane vode i 1 mL Bradfordovog reagensa nakon čega slijedi mjerenje apsorbancije i određivanje ukupne koncentracije proteina u uzorku pomoću jednadžbe baždarnog pravca.

### 3.2.8. Određivanje oštećenja proteina na staničnim linijama Hep G2 i Cal 27 testom proteinske karbonilacije

Velik broj istraživanja potvrdio je kako oksidativni stres, između ostalog, može dovesti do oksidacije proteina uzrokujući njihovo oštećenje a time i gubitak njihove funkcije. Iako postoje brojne metode kojima se može mjeriti razina oksidacije proteina, jedna od najčešće korištenih je određivanje udjela karboniliranih proteina (Castegna i sur., 2003). Međutim, kako bi odredili koliko je proteina karbonilirano kao posljedica izloženosti stanica vodama s odlagališta otpada, prvotno je potrebno definirati ukupnu koncentraciju proteina u uzorku metodom po Bradfordu.

Nakon postupka pripreme opisanog u poglavlju 3.2.6., stanice se tripsiniziraju dodatkom 0,5 mL 0,25 %- tne otopine tripsina, prebacuju u Eppendorf epruvetice i centrifugiraju (5000 rpm/5 min). Nakon toga, sa staničnog taloga uklanja se supernatant i u suspenziju stanica stavi se 100  $\mu\text{L}$  otopine SDS-a pri čemu se dobije smjesa proteina i DNA, dok ostatak stanice postaje liziran.

Nakon što se odredi ukupna koncentracija proteina u uzorcima, pristupa se određivanju udjela karboniliranih proteina prema jednadžbi [2] pri čemu se u preostalu količinu uzorka sa

staničnim linijama dodaje 200  $\mu\text{L}$  2,4, - dinitrifetilhidrazina (10 mmol), dobivena smjesa se homogenizira i ostavi stajati 60 minuta na tamnom mjestu. Nakon toga dodaje se 0,5 mL 10 %-tne otopine trikloroetene kiseline (TCA) kako bi se istaložili proteini, uključujući i one karbonilirane, te se smjesa ostavi na hladnom mjestu tijekom sljedećih 15 minuta. Slijedi centrifugiranje pri čemu se supernatant odvoji a dobiveni talog sačuva i ispere smjesom etanol/etil-acetat u omjeru 1:1. Navedeni postupak centrifugiranja i ispiranja taloga ponovi se ukupno dva puta. Isprani talog se otopi dodatkom 0,5 mL gvanidin hidroklorida nakon čega slijedi mjerenje apsorbancije pri valnoj duljini od 340 nm (prilagođeno prema Colombo i sur., 2015).

$$\text{Koncentracija karboniliranih proteina (mgmL}^{-1}\text{)} = \frac{\left[10^6 \times \left(\frac{A_{340\text{nm}}}{22\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}}\right)\right]}{c \text{ (ukupnih proteina) mgmL}^{-1}}$$

[2]

### 3.2.9. Određivanje oštećenja lipida na staničnim linijama Hep G2 i Cal 27 testom lipidne peroksidacije

Osim na proteine, slobodni radikali u stanicama mogu djelovati i na lipide, odnosno višestruko nezasićene masne kiseline (PUFA) što dovodi do procesa lipidne peroksidacije prilikom kojeg između ostalih produkata, dolazi do nastajanja spoja malondialdehida koji značajno doprinosi oštećenju DNA i nastanku mutacija. Iz tog razloga se količina nastalog malondialdehida često smatra glavnim indikatorom oksidativnog stresa i antioksidativnog statusa u pacijenata s karcinomom (Niedernhofer i sur., 2003; Gawel i sur., 2004). U svrhu određivanja razine lipidne peroksidacije kao posljedicu izloženosti stanica vodama s odlagališta otpada, najprije je potrebno odrediti ukupnu koncentraciju proteina u uzorku metodom po Bradfordu kako bi naposljetku količinu nastalog kompleksa malondialdehid - tiobarbiturna kiselina (TBA) izrazili po ukupnoj koncentraciji proteina. Nakon provođenja postupka pripreme staničnih linija opisanog u poglavlju 3.2.6., pristupa se određivanju ukupne koncentracije proteina opisane u sklopu poglavlja 3.2.7.

Nakon što se odredi ukupna koncentracija proteina, svaki od uzoraka tretira se s 600  $\mu\text{L}$  0,8 %-tnom otopinom tiobarbiturne kiseline (TBA) u trikloroetenoj kiselini (TCA). Pritom se navedena otopina prethodno pripremi tako da se 0,8 g tiobarbiturne kiseline otopi u 100 mL trikloroetene kiseline. Tretirani uzorci se kratko homogeniziraju i stave u vodenu kupelj na 95  $^{\circ}\text{C}$  tijekom sljedećih 60 minuta gdje pri navedenoj temperaturi i kiselom mediju primarno dolazi

do taloženja proteina te stvaranja kompleksa malondialdehid – TBA. Slijedi centrifugiranje uzoraka, nakon čega se po 100  $\mu\text{L}$  supernatanta prebacuje u crnu mikrotitracijsku pločicu s 96 jažica i pristupa se mjerenju intenziteta fluorescencije na spektrofotometru (ekscitacija -560 nm, emisija 585 nm). U međuvremenu, bilo je potrebno napraviti baždarni dijagram pomoću standarda malondialdehida u rasponu koncentracija od 0, 4, 6, 8, 12, 16 i 20  $\mu\text{M}$ . Sve se stavi u vodenu kupelj na 95 °C tijekom sljedećih 60 minuta i dalje postupa na jednak način kao i sa uzorcima. Tako se pomoću jednadžbe pravca ( $y=ax+b$ ) [3] iz dobivenih apsorbancija ( $x$ ), odsječka na osi  $y$  ( $b$ ) i koeficijenta smjera ( $a$ ) u uzorcima odredi koncentracija nastalog kompleksa malondialdehid – TBA ( $y$ ) koji u konačnici upućuje na stupanj razgradnje lipida u stanicama (prilagođeno prema GenWay Biotech, 2020).

*Koncentracija malondialdehid – TBA kompleksa ( $\text{mgmL}^{-1}$ ) =*

$$\frac{\left[ \frac{x(A_{340\text{nm}}) - b}{a} \right]}{c \text{ (ukupnih proteina) } \text{mgmL}^{-1}} \quad [3]$$

### 3.2.10. Određivanje oštećenja DNA na staničnim linijama Hep G2 i Cal 27 komet testom

Jedan od postupaka za otkrivanje oštećenja DNA je komet test ili *single cell gel electrophoresis* (SCGE) koji se kao relativno jednostavna, brza ali osjetljiva i provjerena metoda za mjerenje lomova lanaca DNA u pojedinačnim stanicama, provodi u nekoliko koraka. Najprije se stanice uranjaju u sloj agaroznog gela na mikroskopskom stakalcu gdje se liziraju pomoću detergenta i otopine soli. Ovaj korak otklanja proteine i histone pri čemu zaostaju nukleoidi koji sadrže superuzvojnice DNA vezane na nuklearni matriks (Collins, 2004; Wong i sur., 2005). Ukoliko su lomovi DNA prisutni doći će do lokalne relaksacije superuzvojnice DNA u nukleoidu. Elektroforezom u alkalnim uvjetima se negativno nabijeni, relaksirani dijelovi uzvojnice povlače prema anodi, formirajući „rep“ kometa, dok preostala DNA u nukleoidu daje „glavu“. Slijedi bojanje DNA fluorescentnim bojama kako bi se nastali kometi mogli uočiti pomoću fluorescentnog mikroskopa (Wong i sur., 2005). Pritom se najčešće određuju tri osnovna parametra kometa: dužina repa, intenzitet repa i moment repa. Dužina repa kometa odnosi se na najveću udaljenost na koju su otputovali najkraći fragmenti DNA, a mjeri se od sredine glave ili od ruba glave kometa. Intenzitet repa kometa predstavlja postotak DNA koja je migrirala u rep i izražava se u odnosu na ukupnu količinu DNA u kometu. Moment repa kometa definira se kao umnožak dužine repa i postotka DNA u repu, odnosno intenziteta repa (Collins i sur., 2008).



Dakle, broj lomova u molekuli DNA odraz je intenziteta „repa“ kometa u odnosu na „glavu“ (Collins, 2004). Tako je osnovni princip komet testa kvantifikacija denaturiranih DNA fragmenata koji migriraju iz jezgre tijekom elektroforeze, pri čemu je brzina migracije DNA prema anodi izravno proporcionalna stupnju fragmentacije i oštećenja (Pacadi, 2015). Iako se danas koriste brojne metode kojima je cilj otkriti oštećenja DNA izazvana na razini pojedinačnih stanica, ipak je naglasak na brzim, jeftinim i pouzdanim metodama koje ne zahtijevaju veliku količinu biološkog materijala za analizu (Møller i sur., 2000; Wong i sur., 2005).

Nakon postupka tretmana stanica opisanog u poglavlju 3.2.6., na brušena predmetna stakalca razvuče se 300  $\mu$ L otopine NMP („normal melting point“) agaroze (1.5 %), te se ostavi na hladnom mjestu (4 °C) kako bi polimerizirala. Potom, na polimerizirani sloj NMP agaroze nanese se sloj od 100  $\mu$ L LMP („low melting point“) agaroze (0,5 %) zagrijane na 37 °C u kojoj su resuspendirane stanice. Nakon polimerizacije LMP agaroze, nanese se još jedan sloj od 100  $\mu$ L LMP agaroze, i kada posljednji sloj polimerizira provodi se liza stanica u ohlađenom puferu za lizu stanica (4 °C/1 sat). Potom se stanice tretiraju puferom za denaturaciju i provodi se elektroforeza pri jakosti struje od 300 mA i naponu od 25 V u trajanju od 20 minuta. Po završetku elektroforeze, stakalca se ispiru puferom za neutralizaciju (0,4 M tris-HCl pufer, pH = 7.5) i preparat se boji sa etidij-bromidom. Nakon 10 minuta stakalca se ispiru tris-HCl puferom te se radi stabilizacije boje, do provođenja mikroskopske analize, drže na hladnom i tamnom mjestu (Collins, 2008).

Mikroskopiranje preparata provodi se pomoću epifluorescencijskog mikroskopa s ekscitacijskim filterom podešenim na 515-560 nm, a slika se analizira pomoću programa Comet Assay II (Perceptive instruments Ltd., UK). U svrhu analize genotoksičnog učinka voda s odlagališta otpada korišteni su parametri: dužina, intenzitet te moment repa kometa.

### 3.2.11. Statistička analiza rezultata

Dobiveni rezultati svih provedenih ispitivanja prikazani su grafički kao srednje vrijednosti i njihove standardne devijacije te dodatno statistički obrađeni *one way* ANOVA testom primjenom Tukey i Scheffé *post hoc* testa uz granicu statističke značajnosti  $p < 0,05$  korištenjem programskog sustava JASP 0.14.0.0.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Odlaganje komunalnog čvrstog otpada na velika odlagališta još uvijek predstavlja jedan od najčešćih načina gospodarenja otpadom u Hrvatskoj i u svijetu. Pritom, odlagališta otpada funkcioniraju poput golemih mikrobioloških i kemijskih reaktora pri čemu do potpune stabilizacije odloženog otpada dolazi tek nakon duljeg perioda koje se za pojedina onečišćenja mjeri čak u desetljećima. Ono što predstavlja veliki problem, jesu odlagališta otpada bez izvedenih zaštitnih sustava gdje procjeđivanje različitih organskih i anorganskih sastojaka otpada može dovesti do velikog zagađenja podzemnih i površinskih voda okolnog područja čime se izravno ugrožavaju izvori pitke vode (Ahel, Terzić i Tepić, 2006). Međutim, iako posjeduju zaštitne sustave, veliku prijetnju kvaliteti spomenutih voda mogu predstavljati i sanitarna odlagališta, čijim neredovitim održavanjem može doći do procjeđivanja opasnih kemikalija u vodonosnike (Bannu i Berrin, 2015).

Tako se odlagališta komunalnog čvrstog otpada, upravo zahvaljujući procjednoj vodi kao najznačajnijem štetnom nusproduktu istih, smatraju važnim onečišćivačima podzemnih ali i površinskih voda koje se u velikoj mjeri koriste kao izvor vode za ljudsku potrošnju. Sastav procjedne vode značajno se razlikuje između različitih odlagališta, i primarno ovisi o karakteristikama otpada, njegovom sastavu, fazama razgradnje i tehnologijama odlaganja. Općenito, procjedna voda se može opisati kao kompleksna mješavina onečišćujućih tvari, poput značajne količine otopljenih organskih tvari, anorganskih soli, amonijaka, teških metala i ksenobiotičkih organskih spojeva koji su najčešće porijeklom iz farmaceutskih i kozmetičkih proizvoda, industrijskih kemikalija ili kućanstva (Samadder i sur., 2016). Istraživanja provedena na miševima su pokazala da konzumacija vode onečišćene spojevima koji se nalaze u procjednim vodama uzrokuje povećanu razinu oksidacije proteina, lipidne peroksidacije, oštećenja DNA te promjene antioksidativne obrane organizma u konačnici (Bakare i sur., 2003; Li i sur., 2006, 2010; Ghosh i sur., 2017). Zato, kako bi se procijenio učinak, te ukoliko postoji, umanjio štetan utjecaj odlagališta otpada na okoliš i ljudsko zdravlje, osim fizikalno - kemijskih ispitivanja procjedne vode odlagališta otpada, provode se i biološki *in vivo* ili *in vitro* testovi kojima se nastoji odrediti njezino potencijalno genotoksično djelovanje na žive organizme (Baderna i sur., 2019).

Iako se u velikom broju istraživanja ispitivao učinak isključivo procjednih voda odlagališta otpada, u sklopu ovog rada cilj je bio ispitati ne samo učinak procjednih voda, već i utjecaj odlagališta na obližnje površinske vode te podzemne vode uzvodno i nizvodno od odlagališta otpada iz razloga što su živi organizmi poput ljudi, biljaka i životinja izravno izloženi

djelovanju podzemnih i površinskih voda, odnosno dospijevanje procjednih voda u podzemne i površinske vode bi ih mogao učiniti neupotrebljivim za piće ili druge vodoopskrbne svrhe.

U svrhu procjene genotoksičnog učinka podzemnih, procjedne te površinske vode, kao biološki test sustavi korištene su kontinuirane humane stanične linije hepatocelularnog karcinoma jetre Hep G2 te oralnog pločastog karcinoma Cal 27. Pritom se pristupilo određivanju preživljenja navedenih staničnih linija nakon izlaganja različitim koncentracijama istraživanih voda te ispitivanju potencijalno prisutnih oštećenja staničnih makromolekula (proteina, lipida i DNA). Dobiveni rezultati uspoređeni su s provedenom fizikalno – kemijskom analizom vode te je u konačnici procijenjen utjecaj čvrstog otpada odlagališta Piškornica na okoliš.

#### **4.1. FIZIKALNO – KEMIJSKA ANALIZA UZORAKA VODA S ODLAGALIŠTA OTPADA**

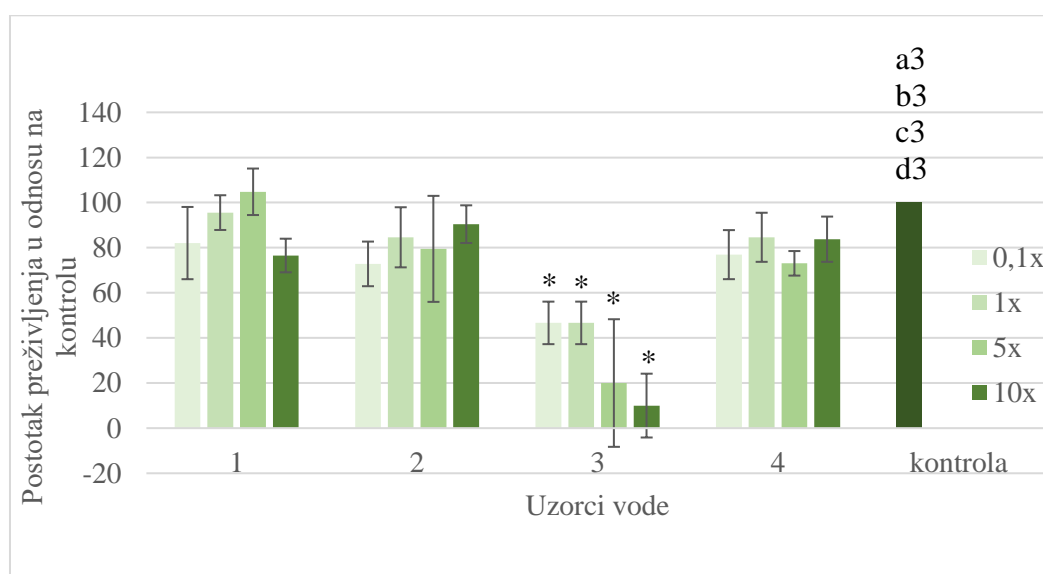
Uzorak 1 ispitivan u sklopu ovog istraživanja uzorkovan je na području starog nesanimiranog otpada te hidrološki gledano uzvodno od odlagališta. Uzorak 2 uzorkovan je na novom dijelu odlagališta smještenom na sjeveroistočnom uglu, te s obzirom na smjer toka podzemne vode nizvodno od odlagališta. Uzorak 3 odnosi se na procjednu vodu istočne strane odlagališta koja se skuplja u šahtovima, dok je uzorak 4 ispitan u vodotoku Gliboki nizvodno od tijela odlagališta.

Prema senzorskim svojstvima uzorak 1, 2 i 4 okarakterizirani su kao bistre tekućine, bez boje i mirisa, za razliku od uzorka 3 procjedne vode koji je opisan kao mutna tekućina, smeđe boje i primjetnog mirisa. Kakvoća uzoraka 1 i 2 ispitana je opažaćkim piezometrima prema Okolišnoj dozvoli, pri čemu je prema ispitanim pokazateljima za parametre nitriti, elektrovodljivost, ukupni fosfor, arsen, kadmij, olovo i živa ekološko stanje sukladno Uredbi o standardu kakvoće vode (NN 96/2019) (Uredba, 2019). Ostali mjerni pokazatelji te granične vrijednosti nisu navedeni u Uredbi za ocjenu kemijskog stanja podzemnih voda ili kao specifične onečišćujuće tvari. Nadalje, uzorak 3 procjedne vode odgovara zahtjevima navedenim okolišnom dozvolom, dok se na lokaciji vrši recirkulacija procjednih voda na tijelo odlagališta te nema nikakvih ispuštanja istih izvan lokacije odlagališta (Prilog 1). Međutim, za slučaj da se provede ispuštanje takvih voda u sustav javne odvodnje, prema Pravilniku o graničnim vrijednostima emisija onečišćujućih tvari otpadnih voda (NN 26/2020) (Pravilnik, 2020) uzorak 3 zadovoljava MDK (minimalno dopuštene koncentracije) osnovnih fizikalno – kemijskih pokazatelja, dok su za organske parametre izmjerene vrijednosti KPK od  $4366 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$  ( $\text{MDK}_{\text{KPK}}=700 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$ ) i  $\text{BPK}_5$  od  $2025 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$  ( $\text{MDK}_{\text{BPK}_5}=100 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$ ) što je puno više od MDK za iste. Također, koncentracija teško hlapljivih lipofilnih tvari, fenola te ukupnih ugljikovodika je bila veća od MDK i iznosila je 290, 118 te  $10,7 \text{ mgL}^{-1}$  ( $\text{MDK}_{\text{TLT}}=100 \text{ mgL}^{-1}$ ;  $\text{MDK}_{\text{F}}=10 \text{ mgL}^{-1}$ ;  $\text{MDK}_{\text{FTIR}}=30 \text{ mgL}^{-1}$ ). Nadalje, kod anorganskih pokazatelja vrijednosti pojedinih parametara su također prelazile one minimalno dopuštene za ispuštanje u sustav javne odvodnje. Tako su zabilježene koncentracije arsena od  $0,105 \text{ mgL}^{-1}$  ( $\text{MDK}_{\text{As}}=0,1 \text{ mgL}^{-1}$ ), ukupnog kroma od  $11,2 \text{ mgL}^{-1}$  ( $\text{MDK}_{\text{Cr}}=0,5 \text{ mgL}^{-1}$ ) i željeza od  $18,3 \text{ mgL}^{-1}$  ( $\text{MDK}_{\text{Fe}}=10 \text{ mgL}^{-1}$ ). Koncentracije metala poput bakra, barija, cinka, mangana, nikla te selena kretale su se ispod vrijednosti MDK, dok su razine žive, olova, kroma (VI) i kadmija bile ispod granice osjetljivosti primijenjene analitičke metode (Prilog 2). Kakvoća uzorka 4, vode ispitane u vodotoku Gliboki prema ispitanim pokazateljima za koje je propisana vrijednost pH ekološko stanje je dobro, a za

pokazatelje KPK, BPK<sub>5</sub>, mangan, ukupni fosfor i ukupni dušik ekološko stanje je vrlo dobro te sukladno Uredbi o standardu kakvoće vode (NN 96/2019) (Uredba, 2019). Ostali mjerni pokazatelji te granične vrijednosti nisu navedeni u Uredbi (Prilog 1).

#### 4.2. CITOTOKSIČNI I ANTIPROLIFERATIVNI UČINAK VODA S PODRUČJA ODLAGALIŠTA OTPADA

Preživljenje stanica nakon izlaganja ispitivanim uzorcima vode određivano je testom formiranja kolonija pri čemu se ispitivao učinak 4 koncentracije (0,1x, 1x, 5x i 10x) podzemne vode uzvodno i nizvodno od odlagališta, procjedne te površinske vode na staničnim linijama Hep G2 i Cal 27 pri koncentraciji stanica  $10^5$  st mL<sup>-1</sup> i nakon 24 sata izloženosti.

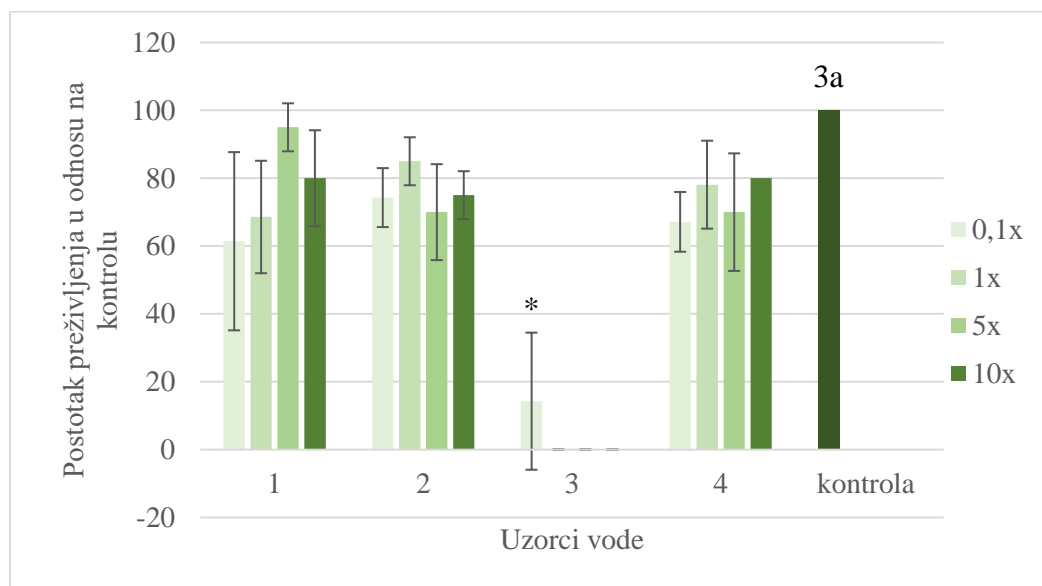


1-podzemna voda uzvodno, 2-podzemna voda nizvodno, 3-procjedna voda, 4-površinska voda nizvodno; a – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,1x; b – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 1x; c – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 5x; d – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 10x; \* - statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu

Slika 6. Postotak preživljenja stanične linije Hep G2 ( $10^5$  st mL<sup>-1</sup>) u odnosu na negativnu kontrolu nakon tretmana uzorcima vode u rasponu koncentracija od 0,1x do 10x

Analiza uzoraka vode na staničnu liniju Hep G2 ukazuje da statistički značajno smanjenje preživljenja u odnosu na negativnu kontrolu (stanice + medij za uzgoj) pokazuju sve koncentracije uzorka 3. Pritom je vidljiva poveznica doza-učinak što vodi do zaključka da veće koncentracije uzorka 3 izazivaju značajnije smanjenje broja stanica, odnosno jači toksični učinak. Ostali uzorci pri svim ispitivanim koncentracijama ne pokazuju statistički značajno

smanjenje preživljenja u odnosu na negativnu kontrolu iz čega se može zaključiti da ne izazivaju toksični učinak (Slika 6).



1-podzemna voda uzvodno, 2-podzemna voda nizvodno, 3-procjedna voda, 4-površinska voda nizvodno; a – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,1x; b – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 1x; c – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 5x; d – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 10x; \* - statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu

Slika 7. Postotak preživljenja stanične linije Cal 27 ( $10^5$  st  $\text{mL}^{-1}$ ) u odnosu na negativnu kontrolu nakon tretmana uzorcima vode u rasponu koncentracija od 0,1x do 10x

Zatim, analiza uzoraka vode na staničnu liniju Cal 27 pokazala je statistički značajno manji broj stanica u odnosu na negativnu kontrolu kod koncentracije 0,1x uzorka 3, dok kod ostalih koncentracija (1x; 5x i 10x) istog uzorka stanične kolonije nisu porasle. Tako se može zaključiti da sve koncentracije uzorka 3 uzrokuju smanjeno preživljenje, tj. izazivaju toksični učinak. Ostali uzorci pri svim ispitivanim koncentracijama ne izazivaju statistički značajno smanjenje preživljenja u odnosu na negativnu kontrolu što upućuje na to da ne uzrokuju toksično djelovanje (Slika 7).

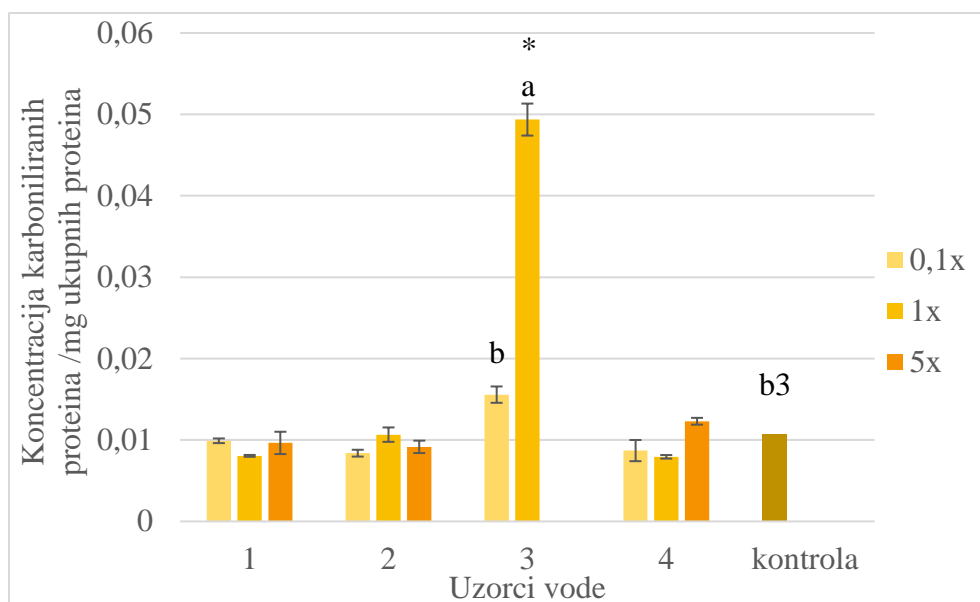
Iako prema kemijskoj analizi uzorak procjedne vode odgovara zahtjevima navedenim u okolišnoj dozvoli, citotoksični učinak se zapravo može pripisati povišenim vrijednostima pojedinih organskih te anorganskih pokazatelja definiranim unutar Pravilnika o graničnim vrijednostima emisija onečišćujućih tvari otpadnih voda u slučaju ispuštanja u sustav javne odvodnje. Kako su povišene vrijednosti navedenih pokazatelja već prisutne u nekoncentriranog uzorka 1x, u slučaju koncentriranijih uzoraka 5x i 10x te vrijednosti su uvećane što objašnjava njihov snažniji toksični učinak.

Složenost sastava procjedne vode uzrokuje višestruke mehanizme toksičnosti koji su potvrđeni na različitim test sustavima. Toksičnost procjedne vode najčešće je uzrokovana prisutnošću, čak i u tragovima, teških metala, amonijaka i različitih organskih spojeva poput pesticida od kojih neki mogu imati potencijalno estrogeno i kancerogeno djelovanje. U sklopu istraživanja provedenog 2018. godine u Kini analizom komunalnog otpada utvrđene su visoke prosječne koncentracije antibiotika poput tetraciklina, oksitetraciklina i sulfometoksazola čije prisustvo procjednu vodu čini rezervoarom brojnih organskih onečišćivača i velikom prijetnjom okolišu te ljudskom zdravlju (Kjeldsen i sur., 2002; Andrews i sur., 2011; Clarke i sur., 2015; Qi i sur., 2018).

Dobiveni rezultati su u skladu sa sličnim eksperimentima koja su dokazala toksični učinak procjednih voda, poput onog gdje su kao test sustav korištene stanice raka jetre, te gdje je pri nižim dozama došlo do inhibicije stanične proliferacije, a pri višim je ispoljeno citotoksično djelovanje (Baderna i sur., 2011; Ghosh i sur., 2014). Također, u sklopu istraživanja provedenog u Hrvatskoj potvrđena je toksičnost na humanim perifernim krvnim limfocitima u slučaju procjedne vode odlagališta otpada Piškornica (Garaj – Vrhovac i sur., 2013).

#### **4.3. PROOKSIDACIJSKI UČINAK VODA S PODRUČJA ODLAGALIŠTA OTPADA NA STANIČNE PROTEINE**

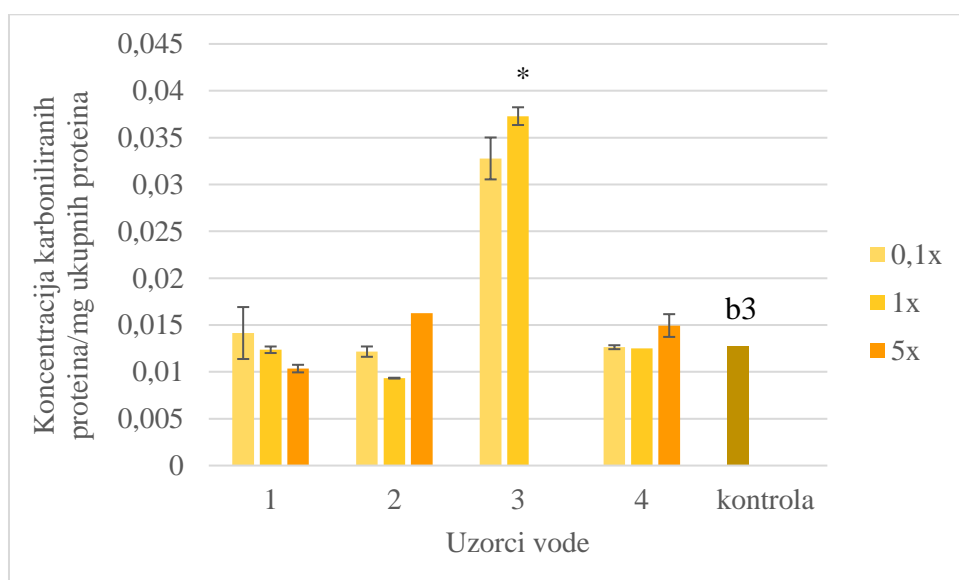
Ispitivanje učinka analiziranih uzoraka vode na stanične proteine provodilo se određivanjem udjela karboniliranih proteina, pri čemu se promatralo djelovanje 3 koncentracije (0,1x; 1x i 5x) podzemne vode uzvodno i nizvodno od odlagališta, procjedne te površinske vode na staničnim linijama Hep G2 i Cal 27 pri koncentraciji stanica  $10^5$  st  $\text{mL}^{-1}$  i nakon 24 sata izloženosti.



1-podzemna voda uzvodno, 2-podzemna voda nizvodno, 3-procjedna voda, 4-površinska voda nizvodno; a – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,1x; b – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 1x; c – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 5x, \* - statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu

Slika 8. Udio karboniliranih proteina stanične linije Hep G2 ( $10^5$  st  $\text{mL}^{-1}$ ) u odnosu na negativnu kontrolu nakon tretmana uzorcima vode u rasponu koncentracija 0,1x do 5x

Analiza vode pokazala je da kod stanične linije Hep G2 statistički značajnu karbonilaciju proteina u odnosu na negativnu kontrolu uzrokuje koncentracija 1x uzorka 3 (Slika 8).



1-podzemna voda uzvodno, 2-podzemna voda nizvodno, 3-procjedna voda, 4-površinska voda nizvodno; a – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,1x; b – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 1x; c – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 5x, \* - statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu



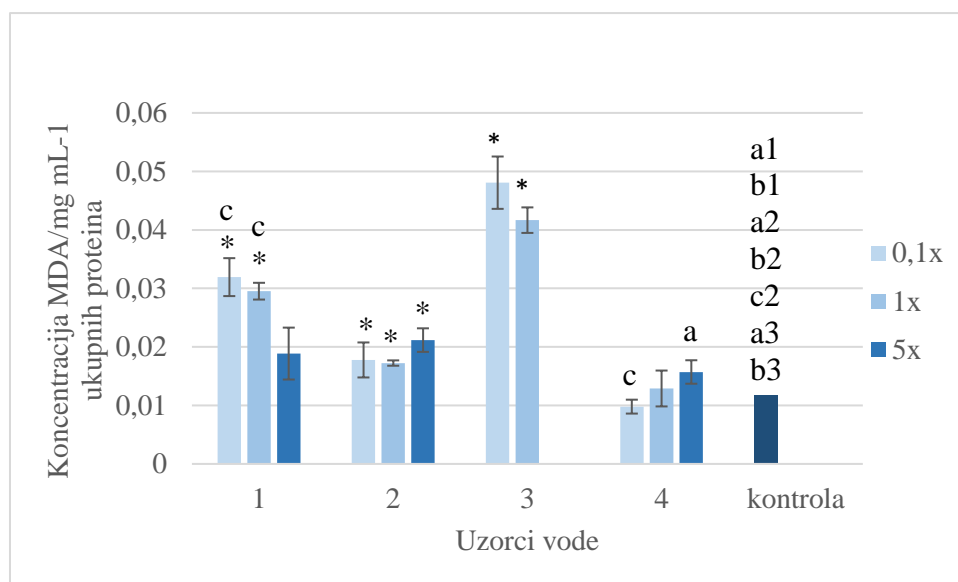
Slika 9. Udio karboniliranih proteina stanične linije Cal 27 ( $10^5$  st  $\text{mL}^{-1}$ ) u odnosu na negativnu kontrolu nakon tretmana uzorcima vode u rasponu koncentracija 0,1x do 5x

Također, kod stanične linije Cal 27 statistički značajno veći udio karboniliranih proteina u odnosu na negativnu kontrolu pokazuje koncentracija 1x uzorka 3 (Slika 9).

Kod uzorka 3 u slučaju obje stanične linije primjećuje se poveznica doza-učinak gdje koncentracija 1x uzrokuje statistički značajno veću karbonilaciju proteina u odnosu na koncentraciju 0,1x i na kontrolu. Dobiveni rezultati mogu se objasniti povećanom koncentracijom pojedinih organskih ali i anorganskih pokazatelja poput arsena, kroma i željeza, s obzirom da je oksidacija katalizirana metalima najprije bila identificirana kao uzrok proteinske karbonilacije (Stadtman i Oliver, 1991).

#### 4.5. PROOKSIDACIJSKI UČINAK VODA S PODRUČJA ODLAGALIŠTA OTPADA NA STANIČNE LIPIDE

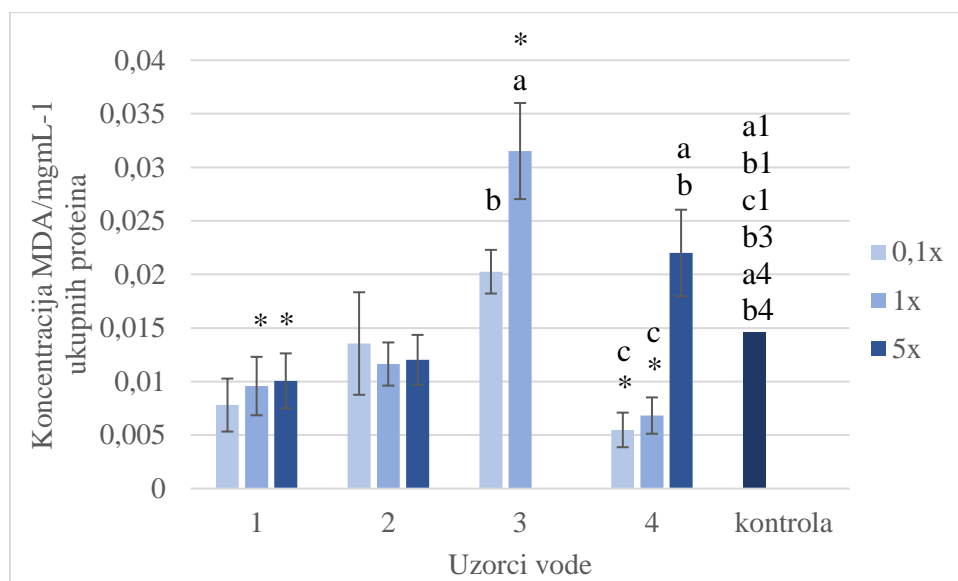
Ispitivanje učinka analiziranih uzoraka vode na lipide provodilo se određivanjem udjela malondialdehida, pri čemu se promatralo djelovanje 3 koncentracije (0,1x; 1x i 5x) podzemne vode uzvodno i nizvodno od odlagališta, procjedne te površinske vode na staničnim linijama Hep G2 i Cal 27 pri koncentraciji stanica  $10^5$  st  $\text{mL}^{-1}$  i nakon 24 sata izloženosti.



1-podzemna voda uzvodno, 2-podzemna voda nizvodno, 3-procjedna voda, 4-površinska voda nizvodno; a – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,1x; b – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 1x; c – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 5x, \* - statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu

Slika 10. Udio malondialdehida stanične linije Hep G2 ( $10^5$  st  $\text{mL}^{-1}$ ) u odnosu na negativnu kontrolu nakon tretmana uzorcima vode u rasponu koncentracija 0,1x do 5x

Provedena analiza vode pokazala je da kod stanične linije Hep G2 statistički značajno nastajanje malondialdehida u odnosu na negativnu kontrolu uzrokuju sve koncentracije uzoraka vode 2 i 3 te gotovo sve koncentracije uzorka 1 pri čemu je iznimka koncentracija 5x. Ipak, najveću indukciju malondialdehida uzrokovao je uzorak 3 pri koncentraciji 0,1x (Slika 10).



1-podzemna voda uzvodno, 2-podzemna voda nizvodno, 3-procjedna voda, 4-površinska voda nizvodno; a – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,1x; b – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 1x; c – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 5x, \* - statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu

Slika 11. Udio malondialdehida stanične linije Cal 27 ( $10^5$  st  $\text{mL}^{-1}$ ) u odnosu na negativnu kontrolu nakon tretmana uzorcima vode u rasponu koncentracija 0,1x do 5x

Nadalje, u stanične linije Cal 27, do statistički značajno većeg nastajanja malondialdehida u odnosu na negativnu kontrolu dovela je koncentracija 1x uzorka 3 (Slika 11).

Kao i kod proteinske karbonilacije, dobiveni rezultati za uzorak 3 procjedne vode mogu se pripisati povećanim koncentracijama pojedinih organskih i anorganskih parametara utvrđenih kemijskom analizom. S druge strane, u stanične linije Hep G2 pojedine koncentracije uzoraka vode 1 i 2 su također dovele do značajnog nastajanja malondialdehida iako su svi pokazatelji kemijske analize odgovarali dopuštenim koncentracijama. Navedena pojava se može objasniti sinergističkim učinkom organskih i anorganskih parametara, koji iako ne prelaze minimalno dopuštene koncentracije, ipak izazivaju statistički značajan učinak.

Brojne studije provedene na stanicama sisavaca pokazale su da unosom vode kontaminirane sastojcima procjednih voda, teški metali i drugi onečišćivači apsorbiraju se u krvotok i tako uzrokuju nastanak slobodnih radikala, bilo u vidu autoksidacije ili oksidacije katalizirane enzimima. Kada koncentracija reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) premaši kapacitet antioksidativnog sustava, stvoreni radikali stupaju u reakcije s proteinima i lipidima različitih tkiva i organa izazivajući njihovu oksidaciju i oštećenje pri čemu nastaju oksidirani proteini i lipidni peroksidi (Li i sur., 2010; Sang i sur., 2010).

Oksidacija staničnih proteina može se dogoditi izravno ili neizravno, odnosno njihovom reakcijom s reaktivnim kisikovim spojevima ili pak drugim, već oksidiranim staničnim makromolekulama poput lipida ili šećera (Li i sur., 2010). Pritom se razina oksidacije određuje sadržajem karboniliranih proteina koji ukazuje na gubitak funkcije proteina uzrokovan visokom razinom oksidativnog stresa, koji u konačnici često rezultira brojnim bolestima ljudskog organizma (Dalle – Donne i sur., 2003).

S druge strane, Toufexi i sur. 2013. godine su utvrdili da visoke koncentracije prooksidativnih spojeva potencijalno prisutne u procjednoj vodi stvaranjem hidroksilnih radikala mogu uzrokovati i lipidnu peroksidaciju gdje malondialdehid kao jedan od produkata iste, između ostalog, dovodi do destabilizacije lizosomalnih membrana izazivajući citotoksični učinak (Toufexi i sur., 2013).

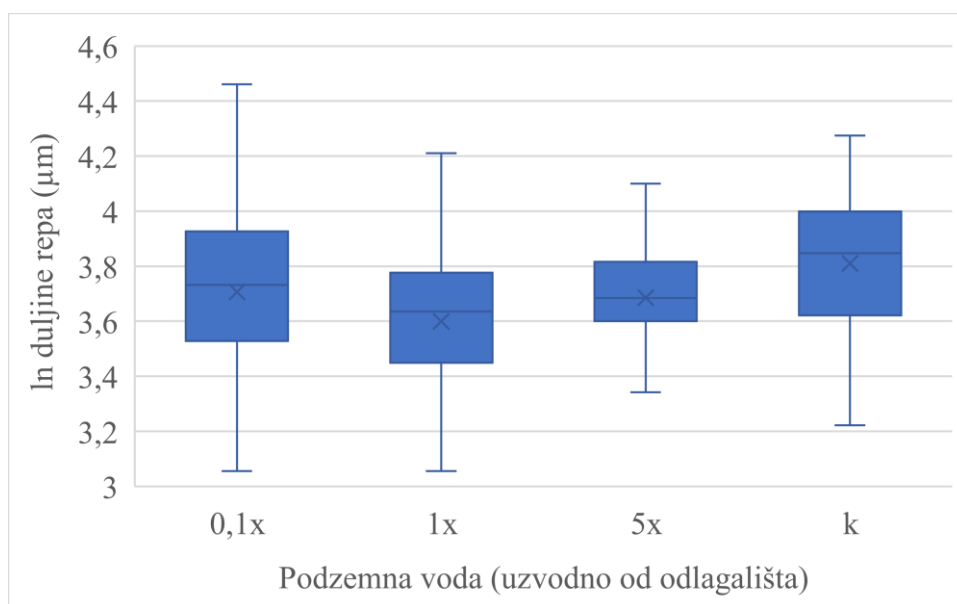
Nadalje, u istraživanju provedenom 2008. godine potvrđen je toksični učinak procjedne vode odlagališta na mozak i jetru miševa nakon izlaganja *per os*. Navedeni učinci su se očitovali kroz lipidnu peroksidaciju te promjene oksidativnog stanja izmjenjenog kao koncentraciju tiobarbituratnih tvari, te kroz povišenu koncentraciju antioksidativnih enzima (Cu, Zn-superoksid dismutaza, Se-ovisna glutation peroksidaza i katalaze) čiji nastanak je uzrokovan visokim razinama slobodnih radikala (Li i sur., 2008). Također, u drugom istraživanju nakon izlaganja procjednim vodama vrste *Drosophila melanogaster* potvrđena je ekspresija gena za hsp70 protein, povećana aktivnost antioksidativnih enzima te veće koncentracije produkata lipidne peroksidacije (Bhargav i sur., 2008). Navedeni rezultati potvrdili su da je oksidacijsko oštećenje stanica uzrokovano nastajanjem slobodnih radikala osnovni mehanizam toksičnog učinka procjednih voda.

S obzirom da je u prethodnom eksperimentu uzorak procjedne vode uzrokovao značajno manji postotak preživljenja, za zaključiti je da isti može dovesti do statistički značajno veće karbonilacije proteina te lipidne peroksidacije ispitivanih test sustava u odnosu na negativnu kontrolu, što u konačnici potvrđuje njegov toksični učinak .

#### 4.6. GENOTOKSIČNI UČINAK VODA S PODRUČJA ODLAGALIŠTA OTPADA

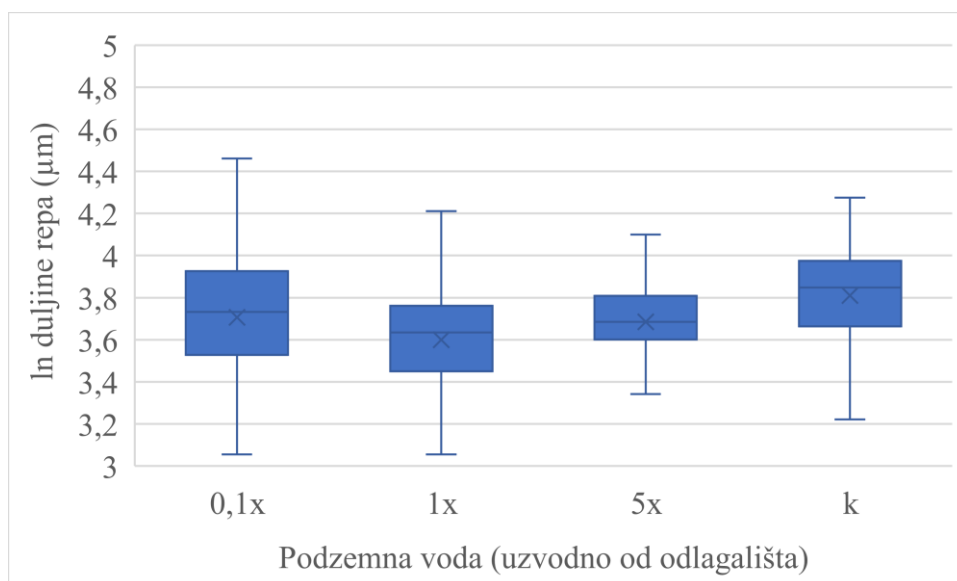
Ispitivanje genotoksičnog učinka analiziranih uzoraka vode provodilo se komet testom pri čemu se promatralo djelovanje 3 koncentracije (0,1x; 1x i 5x) podzemne vode uzvodno i nizvodno od odlagališta, procjedne te površinske vode na staničnim linijama Hep G2 i Cal 27 pri koncentraciji stanica  $10^5$  st  $\text{mL}^{-1}$  i nakon 24 sata izloženosti. Za procjenu oštećenja DNA molekule korištena su 3 parametra: duljina, intenzitet te moment repa kometa.

Razina nastalog oštećenja utvrđuje se mjerenjem količine DNA koja iz glave prelazi u rep kometa. Ukoliko veći udio DNA prijeđe u rep kometa, odnosno što je rep kometa dulji i intenzitet repa veći, oštećenje genetičkog materijala stanice je također veće (Collins i sur., 2008).



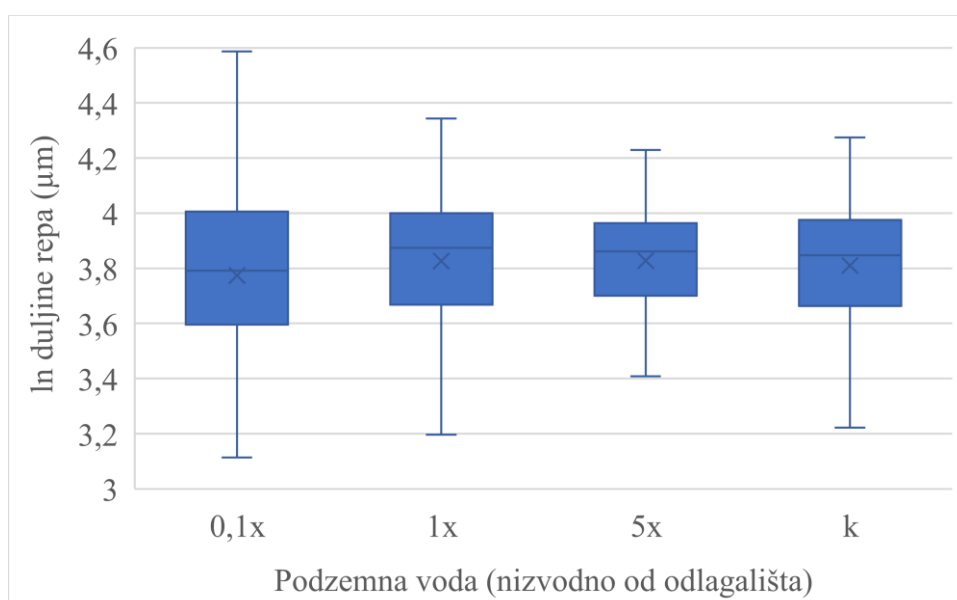
k – negativna kontrola (stanice + medij za uzgoj stanica); a – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,1x; b – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 1x; c – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 5x; \* - statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu

Slika 12. Oštećenje DNA (dužina repa kometa) mjereno komet testom na staničnoj liniji Hep G2 nakon tretmana uzorkom podzemne vode (uzvodno od odlagališta) u rasponu koncentracija 0,1x do 5x ( $p < 0,05$ )



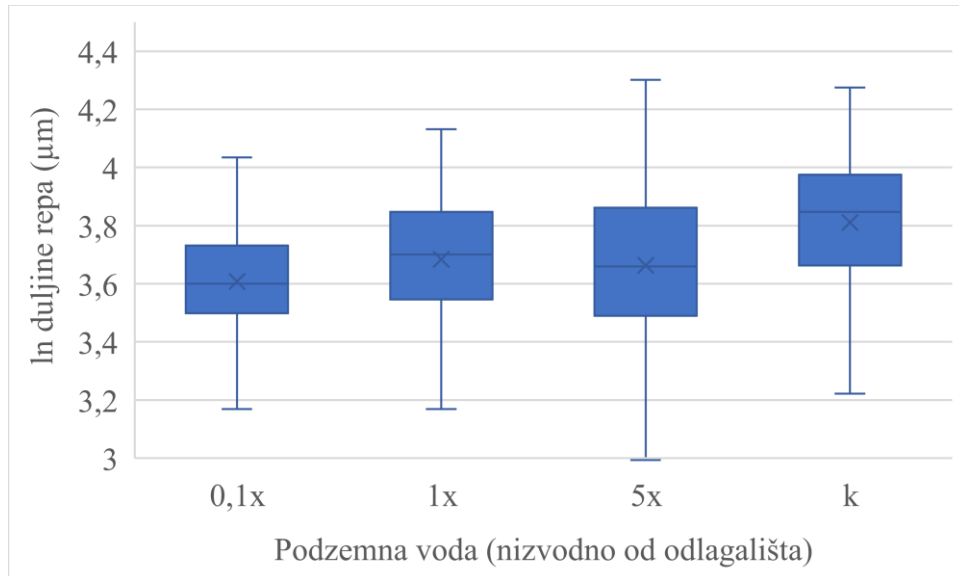
k – negativna kontrola (stanice + medij za uzgoj stanica); a – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,1x; b – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 1x; c – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 5x; \* - statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu

Slika 13. Oštećenje DNA (dužina repa kometa) mjereno komet testom na staničnoj liniji Cal 27 nakon tretmana uzorkom podzemne vode (uzvodno od odlagališta) u rasponu koncentracija 0,1x do 5x ( $p < 0,05$ )



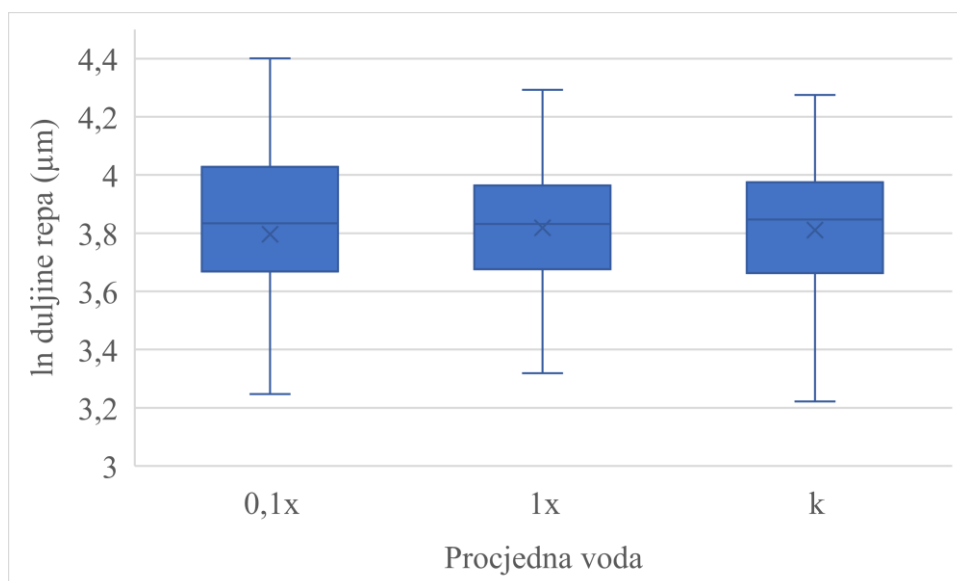
k – negativna kontrola (stanice + medij za uzgoj stanica); a – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,1x; b – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 1x; c – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 5x; \* - statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu

Slika 14. Oštećenje DNA (dužina repa kometa) mjereno komet testom na staničnoj liniji Hep G2 nakon tretmana uzorkom podzemne vode (nizvodno od odlagališta) u rasponu koncentracija 0,1x do 5x ( $p < 0,05$ )



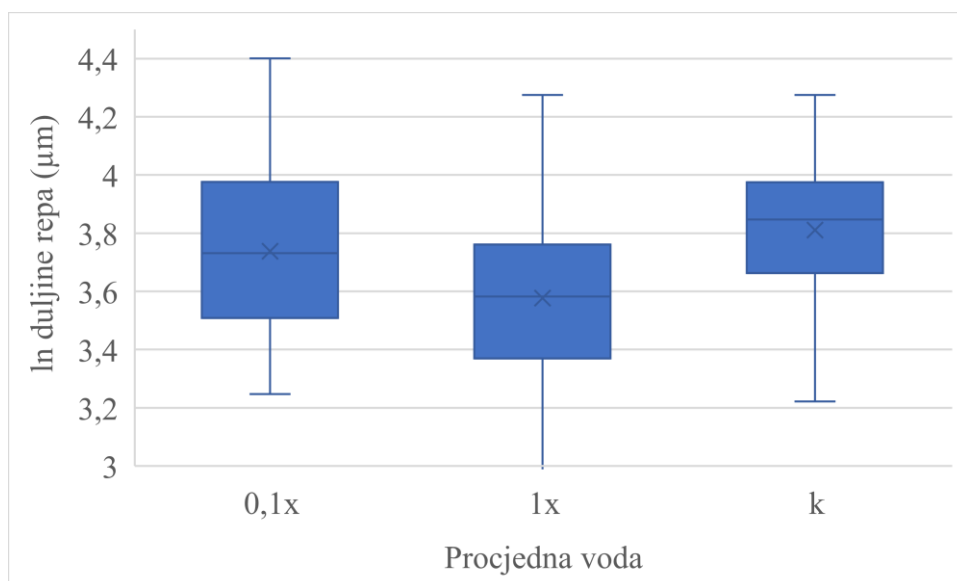
k – negativna kontrola (stanice + medij za uzgoj stanica); a – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,1x; b – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 1x; c – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 5x; \* - statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu

Slika 15. Oštećenje DNA (dužina repa kometa) mjereno komet testom na staničnoj liniji Cal 27 nakon tretmana uzorkom podzemne vode (nizvodno od odlagališta) u rasponu koncentracija 0,1x do 5x ( $p < 0,05$ )



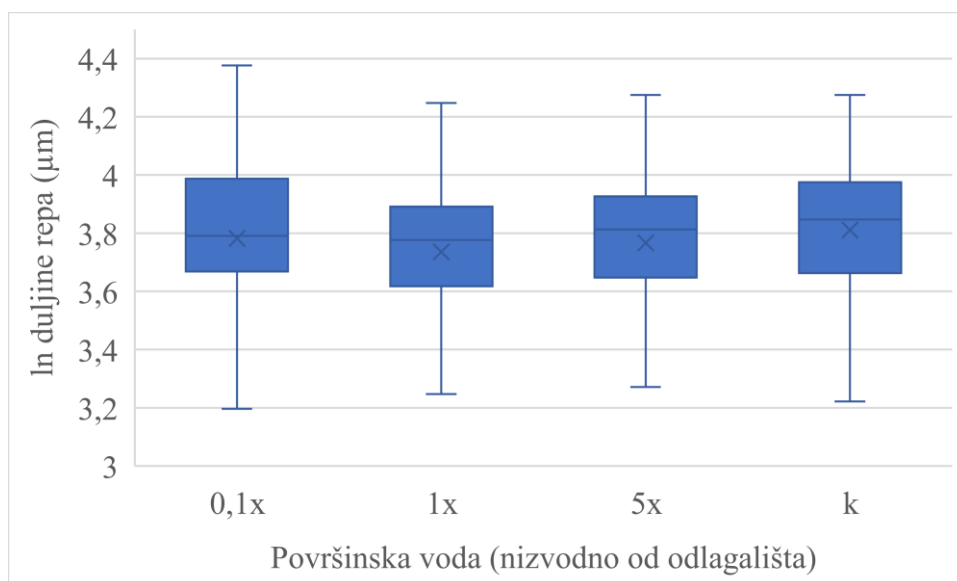
k – negativna kontrola (stanice + medij za uzgoj stanica); a – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,1x; b – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 1x; c – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 5x; \* - statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu

Slika 16. Oštećenje DNA (dužina repa kometa) mjereno komet testom na staničnoj liniji Hep G2 nakon tretmana uzorkom procjedne vode u rasponu koncentracija 0,1x do 1x ( $p < 0,05$ )



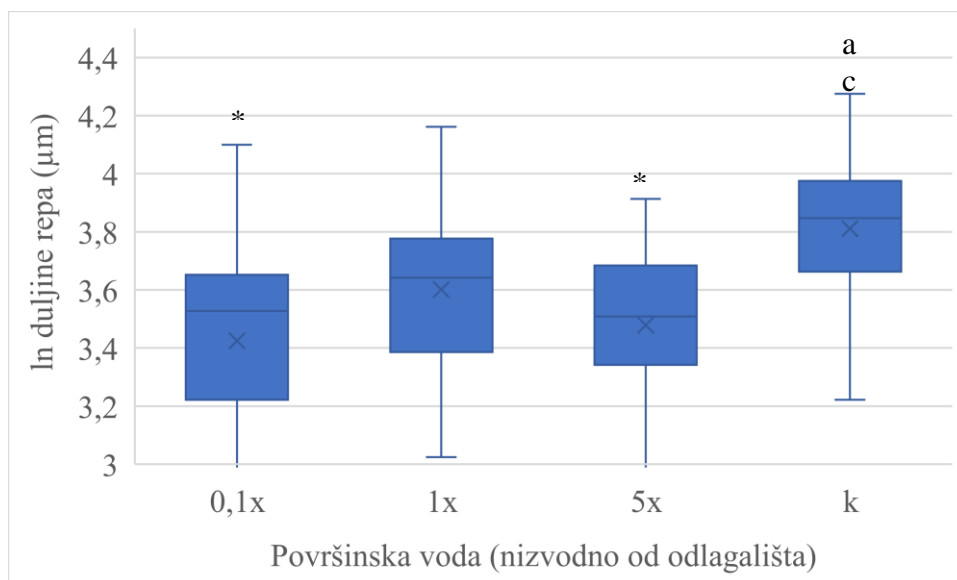
k – negativna kontrola (stanice + medij za uzgoj stanica); a – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,1x; b – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 1x; c – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 5x; \* - statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu

Slika 17. Oštećenje DNA (dužina repa kometa) mjereno komet testom na staničnoj liniji Cal 27 nakon tretmana uzorkom procjedne vode u rasponu koncentracija 0,1x do 1x ( $p < 0,05$ )



k – negativna kontrola (stanice + medij za uzgoj stanica); a – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,1x; b – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 1x; c – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 5x; \* - statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu

Slika 18. Oštećenje DNA (dužina repa kometa) mjereno komet testom na staničnoj liniji Hep G2 nakon tretmana uzorkom površinske vode (nizvodno od odlagališta) u rasponu koncentracija 0,1x do 5x ( $p < 0,05$ )

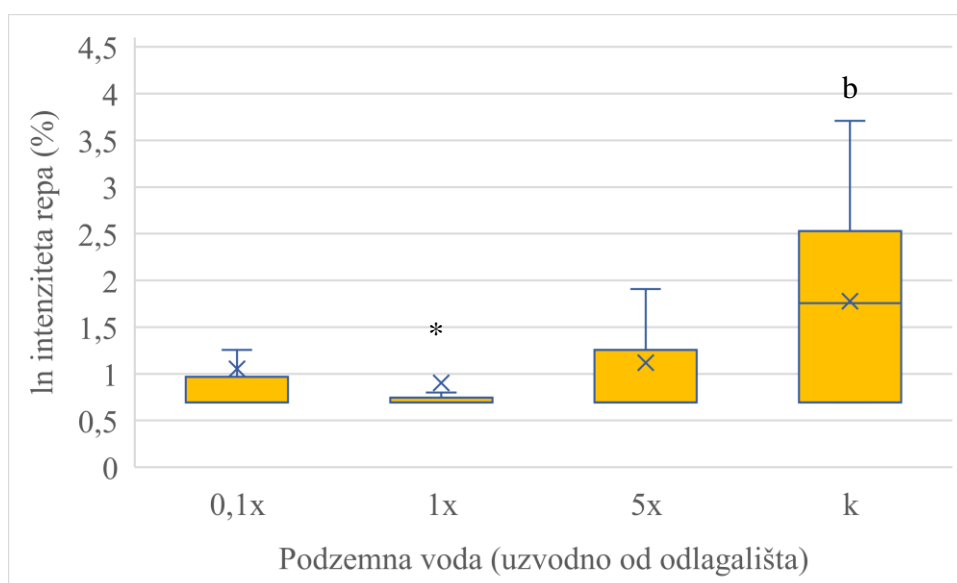


k – negativna kontrola (stanice + medij za uzgoj stanica); a – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,1x; b – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 1x; c – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 5x; \* - statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu



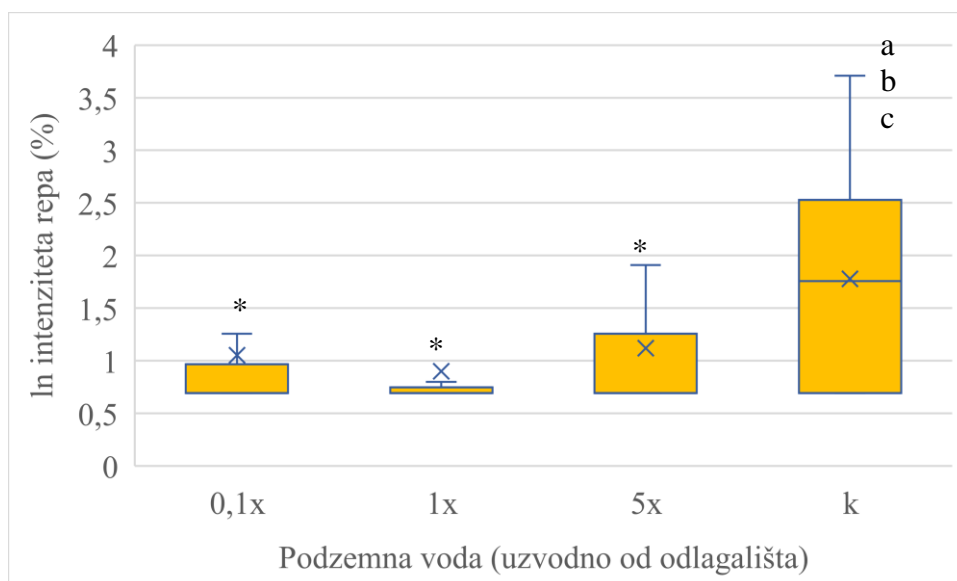
Slika 19. Oštećenje DNA (dužina repa kometa) mjereno komet testom na staničnoj liniji Cal 27 nakon tretmana uzorkom površinske vode (nizvodno od odlagališta) u rasponu koncentracija 0,1x do 5x ( $p < 0,05$ )

Rezultati parametra dužina repa kometa nisu pokazali statistički značajno povećanje dužine repa u odnosu na negativnu kontrolu za sve analizirane uzorke vode, pri svim ispitivanim koncentracijama u obiju staničnih linija (Slika 12 do Slika 19). Uzorak površinske vode (nizvodno od odlagališta) pri koncentraciji 0,1x i 5x izazvao je čak statistički značajno smanjenje dužine repa u odnosu na negativnu kontrolu u stanične linije Cal 27.



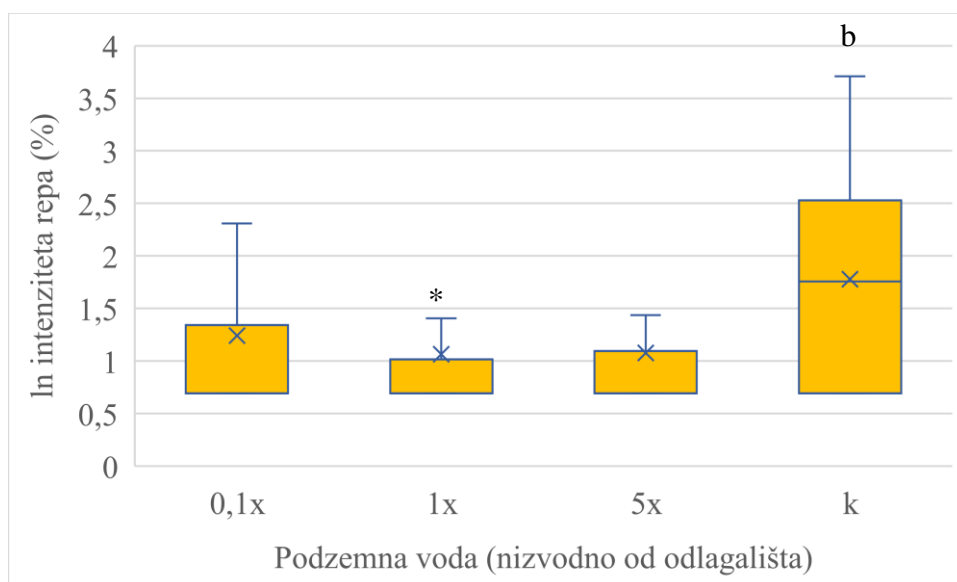
k – negativna kontrola (stanice+medij za uzgoj stanica); a – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,1x; b – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 1x; c – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 5x; \* - statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu

Slika 20. Oštećenje DNA (intenzitet repa kometa) mjereno komet testom na staničnoj liniji Hep G2 nakon tretmana uzorkom podzemne vode (uzvodno od odlagališta) u rasponu koncentracija 0,1x do 5x ( $p < 0,05$ )



k – negativna kontrola (stanice + medij za uzgoj stanica); a – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,1x; b – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 1x; c – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 5x, \* - statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu

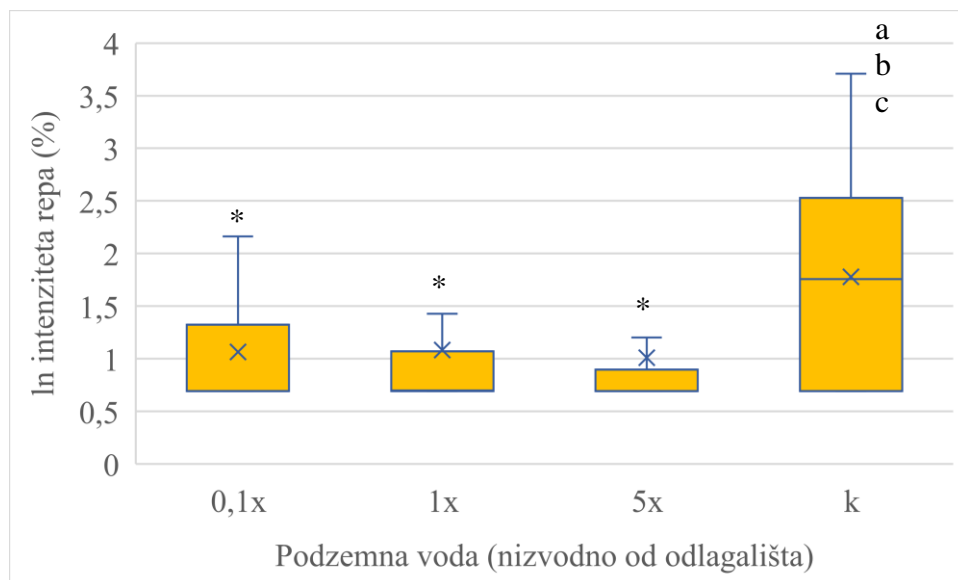
Slika 21. Oštećenje DNA (intenzitet repa kometa) mjereno komet testom na staničnoj liniji Cal 27 nakon tretmana uzorkom podzemne vode (uzvodno od odlagališta) u rasponu koncentracija 0,1x do 5x ( $p < 0,05$ )



k – negativna kontrola (stanice + medij za uzgoj stanica); a – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,1x; b – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 1x; c – statistički

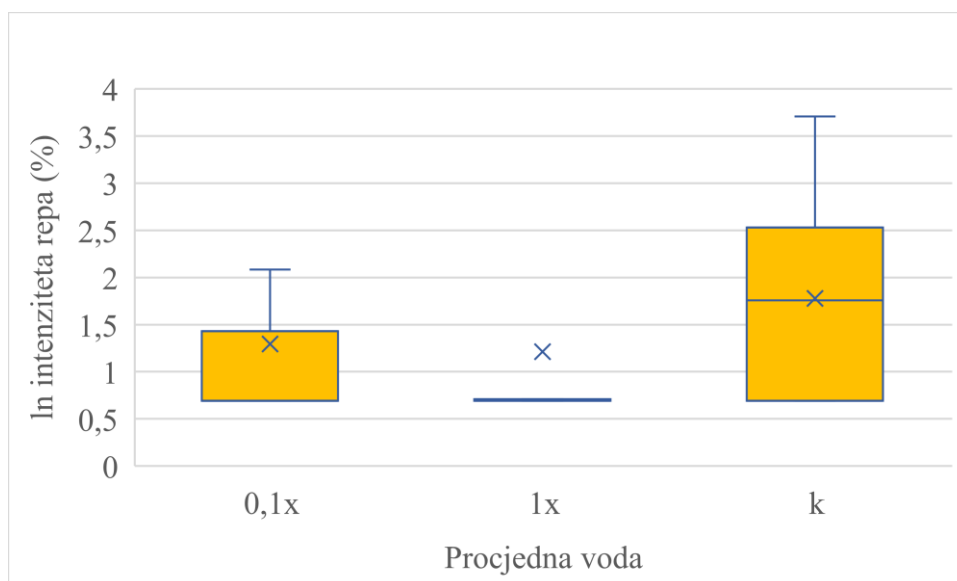
( $p < 0,05$  Tukey i Scheffé test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 5x; \* - statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffé test) značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu

Slika 22. Oštećenje DNA (intenzitet repa kometa) mjereno komet testom na staničnoj liniji Hep G2 nakon tretmana uzorkom podzemne vode (nizvodno od odlagališta) u rasponu koncentracija 0,1x do 5x ( $p < 0,05$ )



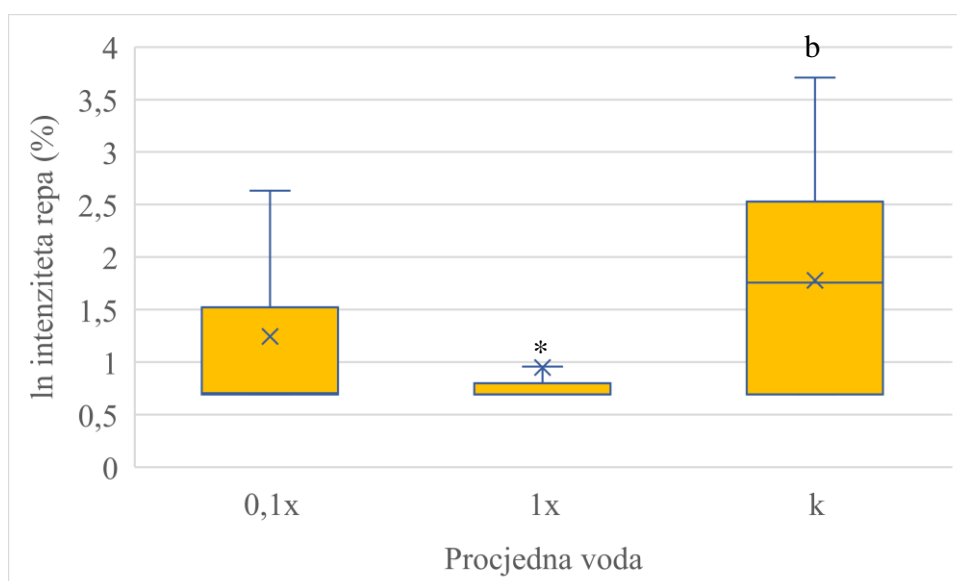
k – negativna kontrola (stanice + medij za uzgoj stanica); a – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffé test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,1x; b – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffé test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 1x; c – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffé test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 5x; \* - statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffé test) značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu

Slika 23. Oštećenje DNA (intenzitet repa kometa) mjereno komet testom na staničnoj liniji Cal 27 nakon tretmana uzorkom podzemne vode (nizvodno od odlagališta) u rasponu koncentracija 0,1x do 5x ( $p < 0,05$ )



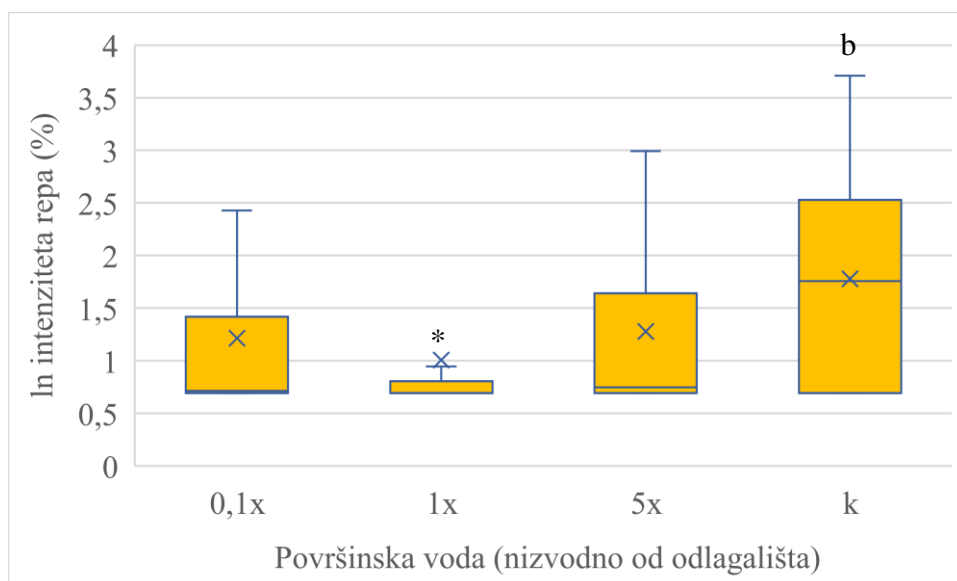
k – negativna kontrola (stanice + medij za uzgoj stanica); a – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,1x; b – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 1x; c – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 5x; \* - statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu

Slika 24. Oštećenje DNA (intenzitet repa kometa) mjereno komet testom na staničnoj liniji Hep G2 nakon tretmana uzorkom procjedne vode u rasponu koncentracija 0,1x do 1x ( $p < 0,05$ )



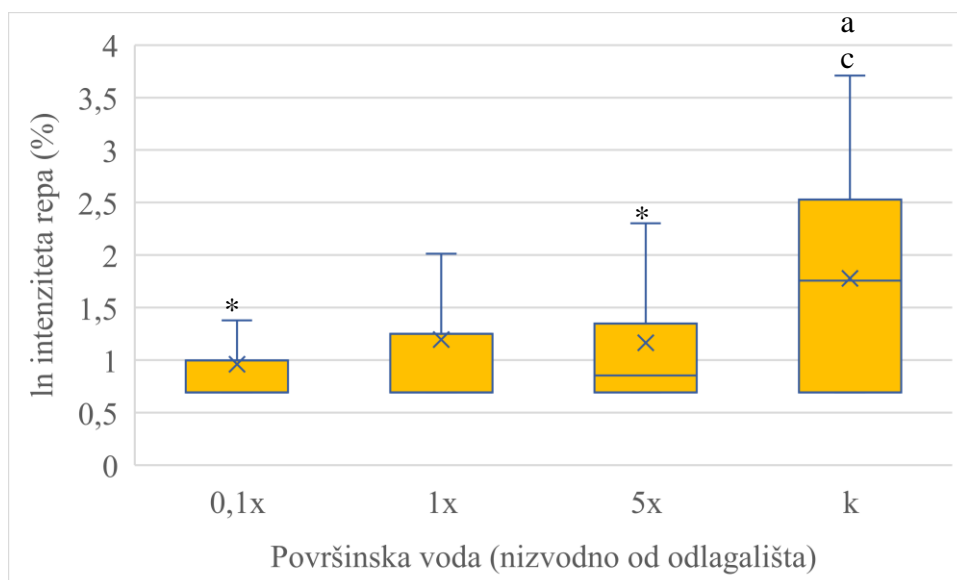
k – negativna kontrola (stanice + medij za uzgoj stanica); a – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,1x; b – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 1x; c – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 5x, \* - statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu

Slika 25. Oštećenje DNA (intenzitet repa kometa) mjereno komet testom na staničnoj liniji Cal 27 nakon tretmana uzorkom procjedne vode u rasponu koncentracija 0,1x do 1x ( $p < 0,05$ )



k – negativna kontrola (stanice + medij za uzgoj stanica); a – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,1x; b – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 1x; c – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 5x; \* - statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu

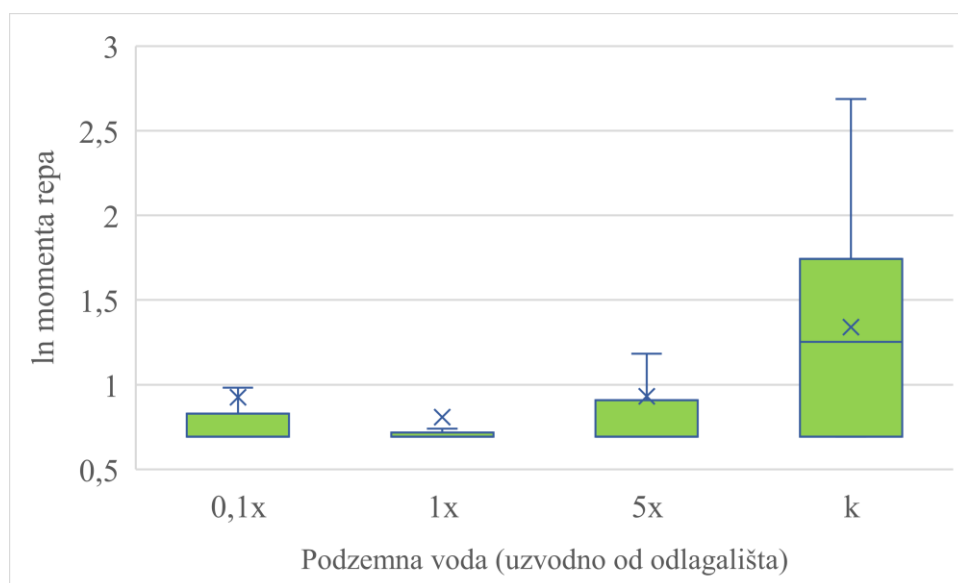
Slika 26. Oštećenje DNA (intenzitet repa kometa) mjereno komet testom na staničnoj liniji Hep G2 nakon tretmana uzorkom površinske vode (nizvodno od odlagališta) u rasponu koncentracija 0,1x do 5x ( $p < 0,05$ )



k – negativna kontrola (stanice + medij za uzgoj stanica); a – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,1x; b – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 1x; c – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 5x; \* - statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu

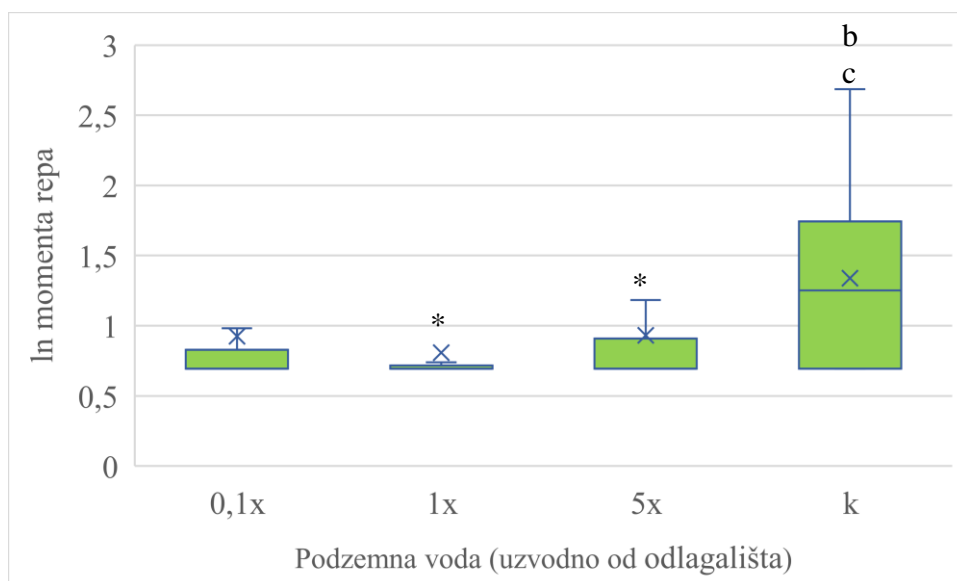
Slika 27. Oštećenje DNA (intenzitet repa kometa) mjereno komet testom na staničnoj liniji Cal 27 nakon tretmana uzorkom površinske vode (nizvodno od odlagališta) u rasponu koncentracija 0,1x do 5x ( $p < 0,05$ )

Vrlo slični rezultati su prisutni i kod parametra intenzitet repa kometa, odnosno postotka DNA u repu koji također nisu pokazali statistički značajno povećanje intenziteta repa u odnosu na negativnu kontrolu za sve analizirane uzorke vode, pri svim ispitivanim koncentracijama u obiju staničnih linija (Slika 20 do Slika 27). Međutim, vidljivo je statistički značajno smanjenje intenziteta repa u odnosu na negativnu kontrolu za uzorke podzemne vode (uzvodno te nizvodno od odlagališta) pri koncentracijama 1x u stanične linije Hep G2, te 0,1x, 1x i 5x kod stanične linije Cal 27. Navedena pojava je prisutna također i kod uzorka procjedne vode pri koncentraciji 1x stanične linije Cal 27, te uzoraka površinske vode (nizvodno od odlagališta) koncentracije 1x za staničnu liniju Hep G2, odnosno koncentracija 0,1x te 5x u stanične linije Cal 27.



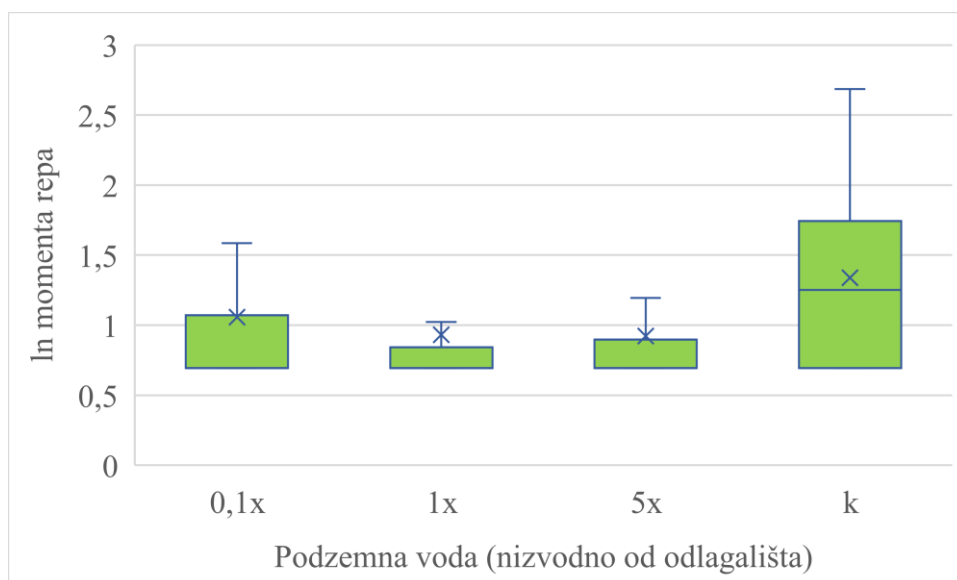
k – negativna kontrola (stanice + medij za uzgoj stanica); a – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,1x; b – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 1x; c – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 5x; \* - statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu

Slika 28. Oštećenje DNA (moment repa kometa) mjereno komet testom na staničnoj liniji Hep G2 nakon tretmana uzorkom podzemne vode (uzvodno od odlagališta) u rasponu koncentracija 0,1x do 5x ( $p < 0,05$ )



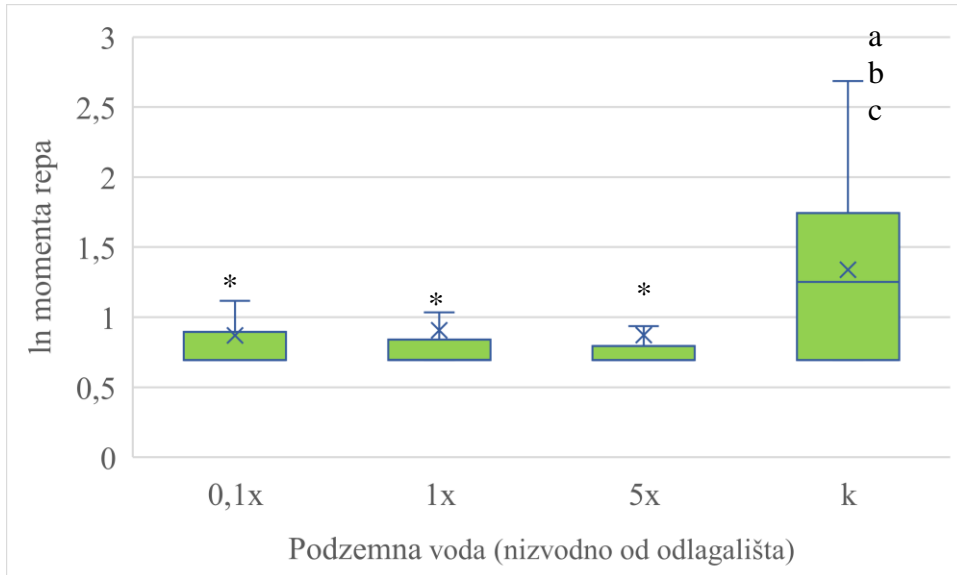
k – negativna kontrola (stanice + medij za uzgoj stanica); a – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,1x; b – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 1x; c – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 5x; \* - statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu

Slika 29. Oštećenje DNA (moment repa kometa) mjereno komet testom na staničnoj liniji Cal 27 nakon tretmana uzorkom podzemne vode (uzvodno od odlagališta) u rasponu koncentracija 0,1x do 5x ( $p < 0,05$ )



k – negativna kontrola (stanice + medij za uzgoj stanica); a – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,1x; b – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 1x; c – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 5x; \* - statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu

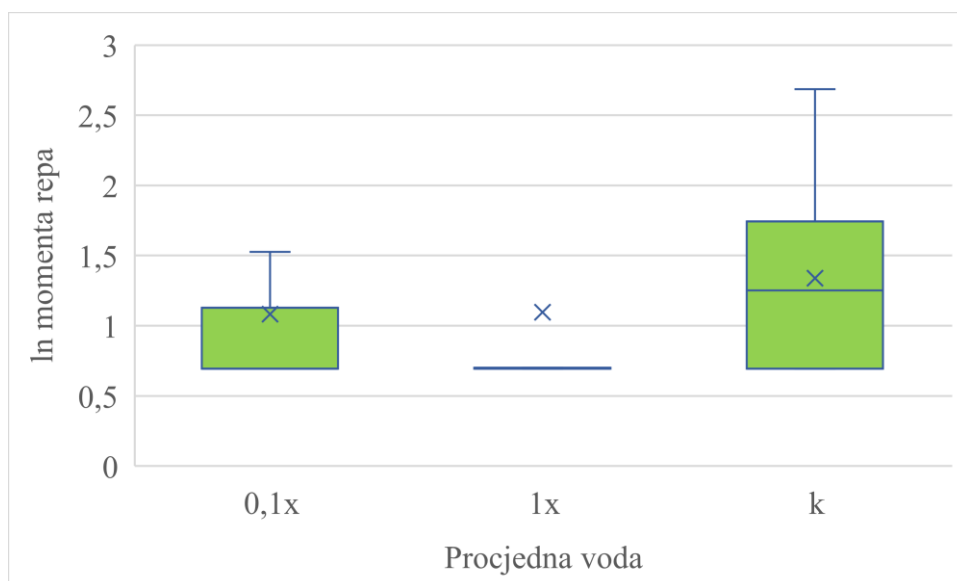
Slika 30. Oštećenje DNA (moment repa kometa) mjereno komet testom na staničnoj liniji Hep G2 nakon tretmana uzorkom podzemne vode (nizvodno od odlagališta) u rasponu koncentracija 0,1x do 5x ( $p < 0,05$ )



k – negativna kontrola (stanice + medij za uzgoj stanica); a – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,1x; b – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 1x; c – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 5x; \* - statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu

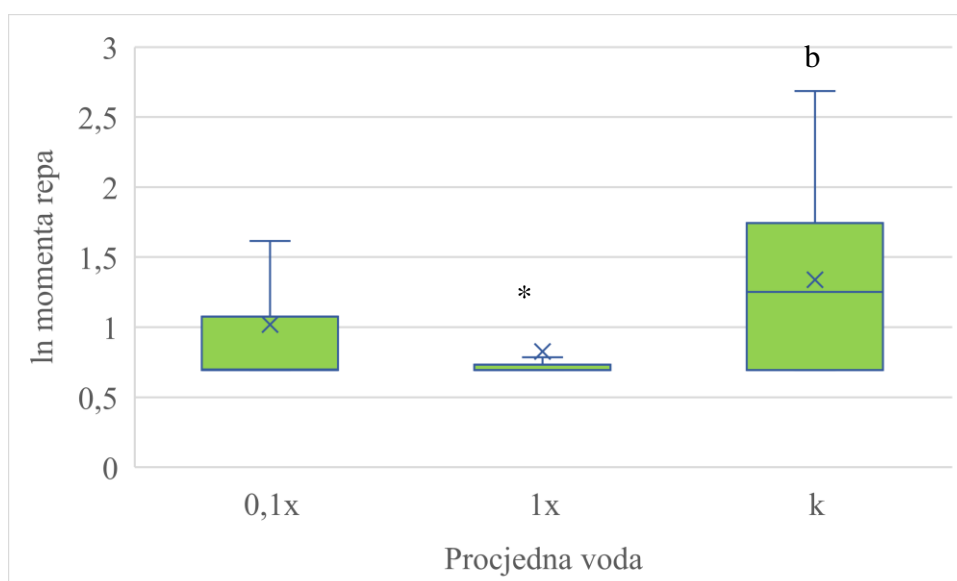
Slika 31. Oštećenje DNA (moment repa kometa) mjereno komet testom na staničnoj liniji Cal 27 nakon tretmana uzorkom podzemne vode (nizvodno od odlagališta) u rasponu koncentracija 0,1x do 5x ( $p < 0,05$ )





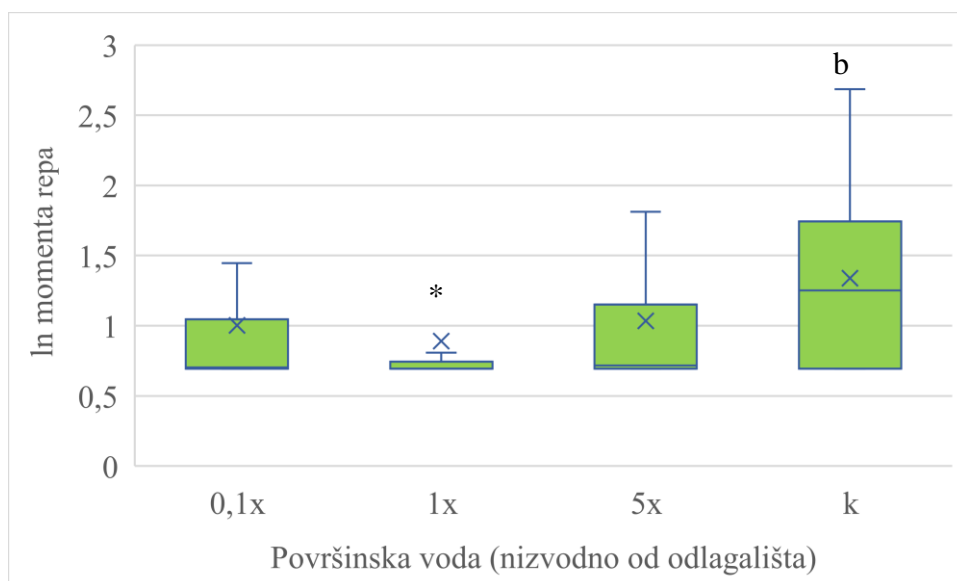
k – negativna kontrola (stanice + medij za uzgoj stanica); a – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,1x; b – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 1x; c – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 5x; \* - statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu

Slika 32. Oštećenje DNA (moment repa kometa) mjereno komet testom na staničnoj liniji Hep G2 nakon tretmana uzorkom procjedne vode u rasponu koncentracija 0,1x do 1x ( $p < 0,05$ )



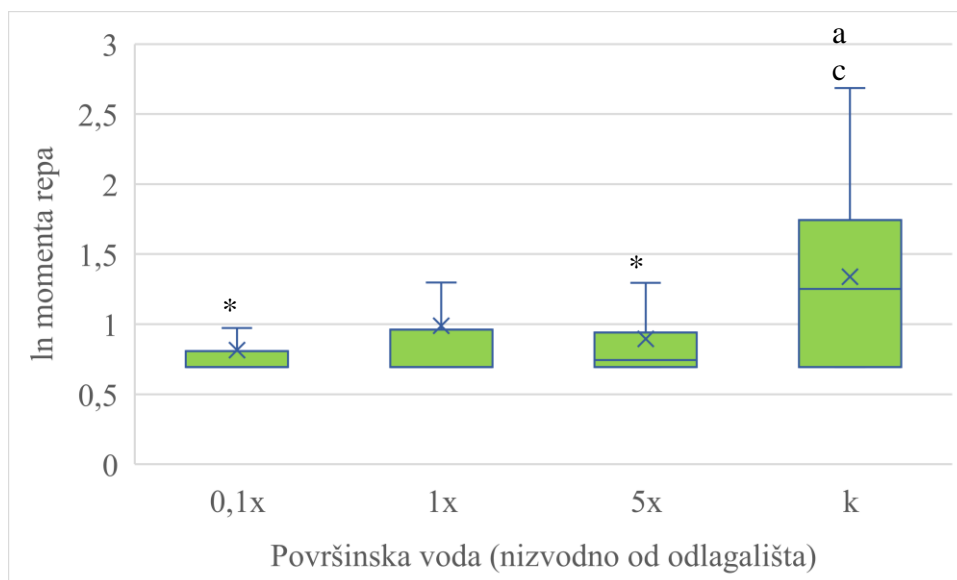
k – negativna kontrola (stanice + medij za uzgoj stanica); a – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,1x; b – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 1x; c – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 5x; \* - statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu

Slika 33. Oštećenje DNA (moment repa kometa) mjereno komet testom na staničnoj liniji Cal 27 nakon tretmana uzorkom procjedne vode u rasponu koncentracija 0,1x do 1x ( $p < 0,05$ )



k – negativna kontrola (stanice + medij za uzgoj stanica); a – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,1x; b – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 1x; c – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 5x; \* - statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu

Slika 34. Oštećenje DNA (moment repa kometa) mjereno komet testom na staničnoj liniji Hep G2 nakon tretmana uzorkom površinske vode (nizvodno od odlagališta) u rasponu koncentracija 0,1x do 5x ( $p < 0,05$ )



k – negativna kontrola (stanice + medij za uzgoj stanica); a – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,1x; b – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 1x; c – statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na koncentraciju 5x; \* - statistički ( $p < 0,05$  Tukey i Scheffe test) značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu

Slika 35. Oštećenje DNA (moment repa kometa) mjereno komet testom na staničnoj liniji Cal 27 nakon tretmana uzorkom površinske vode (nizvodno od odlagališta) u rasponu koncentracija 0,1x do 5x ( $p < 0,05$ )

Moment repa objedinjuje dužinu i intenzitet repa u jednoj vrijednosti čime se smatra najkorisnijim i najčešće upotrebljavanim parametrom komet testa (Lu i sur., 2017). Prema dobivenim rezultatima u obje stanične linije nije prisutno statistički značajno povećanje momenta repa u odnosu na negativnu kontrolu za sve analizirane uzorke vode pri svim ispitivanim koncentracijama (Slika 28 do Slika 35). Isto kao i kod parametara dužine te intenziteta repa, za pojedine uzorke je vidljivo statistički značajno smanjenje momenta repa u odnosu na negativnu kontrolu. Navedenu pojavu pokazuje uzorak podzemne vode (uzvodno od odlagališta) pri koncentracijama 1x i 5x, podzemne vode (nizvodno od odlagališta) pri koncentracijama 0,1x, 1x te 5x te procjedne vode koncentracije 1x u stanične linije Cal 27. Kod uzorka površinske vode (nizvodno od odlagališta) ova pojava je prisutna u obje stanične linije, pri čemu kod Cal 27 za koncentracije 0,1x i 5x a u Hep G2 za koncentraciju 1x.

Na osnovu dobivenih rezultata komet testa se na prvu može reći da ispitivani uzorci voda ne izazivaju genotoksični učinak. Međutim, moguće objašnjenje ove pojave stoji u činjenici da su analizirane stanice zapravo bile otporne i u konačnici preživjele navedeni tretman, te tvrdnju o genotoksičnom učinku pojedinog uzorka treba povezati sa njegovom citotoksičnošću. Dakle, uzorci vode koji posjeduju citotoksično djelovanje izazivajući smanjeno preživljenje stanica, mogu inducirati i genotoksični učinak te tako uzrokovati povećanu migraciju DNA, međutim, to je moguće tvrditi samo u situacijama kada je postotak preživljenja stanica veći od 75 %. U suprotnom, rezultati komet testa nisu valjani (Henderson i sur., 1998). Tako je kod uzorka procjedne vode pri koncentracijama 0,1; 1 i 5x zabilježeno smanjeno preživljenje te za staničnu liniju Hep G2 iznosi 46 % za koncentracije 0,1 i 1x, te 20% za koncentraciju 5x, odnosno za staničnu liniju Cal 27 postotak preživljenja iznosi redom 14, 0 i 0 % u odnosu na negativnu kontrolu. Iz navedenog se može zaključiti da uzorak procjedne vode djeluje toksično i moguće da je inducirao povećanu migraciju DNA, međutim, zbog vrlo malog postotka preživljenja stanica to nije moguće izričito tvrditi jer su takvi rezultati komet testa lažno pozitivni i ne smatraju se valjanima. S druge strane, kod uzoraka podzemnih voda te površinske vode pri svim koncentracijama u obje stanične linije također nije bilo prisutno statistički značajno povećanje dužine repa u odnosu na negativnu kontrolu, ali tu se postotak preživljenja kreće oko 75 % na više, čime rezultate komet testa smatramo valjanima. Na osnovu toga, te provedene fizikalno - kemijske analize gdje uzorci površinske i podzemne vode odgovaraju graničnim vrijednostima

za ispitivane parametre možemo zaključiti da isti ne induciraju genotoksični učinak u ispitivanih staničnih linija.

Unatoč tome što radi smanjenog stupnja preživljenja staničnih linija izazvanog utjecajem sastojaka procjednih voda nije bilo moguće potvrditi genotoksični učinak istih, postoje brojne studije koja su istraživanjem dokazale suprotan ishod. Naime, Sang i Li (2005) su pokazali da procjedne vode prikupljene s odlagališta otpada dovode do povećanja količine DNA u repu u stanicama koštane srži miševa uzrokujući kromosomske lomove, pri čemu su uzrok nastalih lomova pripisali djelovanju slobodnih radikala oslobođenih samooksidacijom ili oksidacijom organskih spojeva topljivih u vodi. Također, prisutnost različitih metala u procjednoj vodi smatra se jednim od čimbenika koji mehanizmom indukcije nastanka reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) može dovesti do oksidativnog oštećenja genetičkog materijala. Tako je nekoliko autora na humanim i životinjskim staničnim linijama dokazalo toksičnost željeza (Prá i sur., 2008), bakra (Gabbianelli i sur., 2003), kroma (Trzeciak i sur., 2000), olova (Martínez-Alfaro i sur., 2012), i nikla (Cavallo i sur., 2003; Wozniak i sur., 2004). Nadalje, nekoliko navedenih istraživanja također je potvrdilo genotoksični potencijal procjednih voda, gdje su prijavili značajan porast frekvencije mikronukleusa, razmjene sestrinskih kromatida te kromosomskih aberacija na različitim vrstama stanica i model sustava (Donnelly i sur., 1990; Ernst i sur., 1994; Monarca i sur., 2002; Sang i Li, 2004; Bakare i sur., 2005; Chandra i sur., 2005; Tewari i sur., 2005; Sang i sur., 2006; Feng i sur., 2007; Li i sur., 2008; Amahdar i sur., 2009; Gajski i sur., 2011).

Međutim, osim navedenih studija važno je spomenuti onu provedenu od strane Garaj – Vrhovac i sur. (2013) u sklopu koje se pomoću fluorescentne mikroskopije i komet testa ispitivao utjecaj procjednih voda upravo odlagališta otpada Piškornica na humane i biljne test sustave prije i nakon pročišćavanja istih. Pritom, kod nepročišćene procjedne vode uočeno je kako ista dovodi do značajnog povećanja parametara komet testa u usporedbi s negativnom kontrolom nakon 24 sata izlaganja, dok je primjena kemijskog i elektrokemijskog pročišćavanja značajno umanjila izmjerene parametre i tako smanjila genotoksični učinak procjednih voda.

Zbog složenog sastava procjedna voda može biti toksična putem brojnih mehanizama pri čemu neki sastojci mogu biti prisutni u tragovima te moguće da pojedinačno nemaju veliki učinak međutim, moguće je pretpostaviti da upravo višestruke interakcije sastojaka poput organskih spojeva, metala i suspendiranih krutina mogu imati sinergistički učinak na molekulu DNA (Garaj – Vrhovac i sur., 2013).

Dobiveni rezultati upućuju na činjenicu da bi ispuštanje procjednih voda odlagališta u okoliš bez postojećih sustava upravljanja koja uključuju i prethodnu obradu iste, moglo predstavljati značajan izvor onečišćenja podzemnih i površinskih voda pri čemu konzumacija tako onečišćene vode može dovesti do oštećenja staničnih makromolekula i time doprinijeti razvoju različitih bolesti. Zato, unatoč provedenoj sanaciji, treba ukazivati na važnost redovite kontrole kvalitete i sastava procjednih, ali i ostalih voda koje se nalaze pod neizravnim utjecajem odlagališta otpada, koja se u konačnici smatra temeljnom i neophodnom za zaštitu okoliša te javnog zdravlja.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Procjedna voda s područja odlagališta otpada Piškornica ima citotoksični učinak te izaziva oksidacijsko oštećenje proteina i lipida u obje stanične linije.
2. Sve istraživane koncentracije uzorka podzemne vode nizvodno od odlagališta (uzorak 2) te koncentracije 0,1x i 1x podzemne vode uzvodno od odlagališta (uzorak 1) izazivaju lipidnu peroksidaciju u staničnoj liniji Hep G2 zbog povišene koncentracije pojedinih anorganskih pokazatelja. Unatoč tome što se nalaze unutar granica minimalno dopuštene koncentracije uzorak 1 bilježi povećane razine žive i mangana, a uzorak 2 povišenu koncentraciju arsena pri čemu bi sinergija navedenih pokazatelja s cinkom kod uzorka 1, odnosno barijem, cinkom i manganom kod uzorka 2 mogla ispoljiti navedeni učinak.
3. Podzemne vode (nizvodno i uzvodno od odlagališta) te uzorak površinske vode nizvodno od odlagališta nemaju genotoksični učinak. Detekcija genotoksičnog učinka procjedne vode nije mogla biti izvršena zbog smanjenog postotka preživljenja (<75 %).
4. Odlagalište otpada Piškornica nema nepovoljan utjecaj na okoliš.

## 6. LITERATURA

Abbulu, Y., Srinivasa Rao, G.V.R. (2013) A Study on Physico-Chemical Characteristics of Groundwater in the Industrial Zone of Visakhapatnam, Andhra Pradesh. *Am J Eng Res.* **2** (10), 112-116.

Adhikari, B., Nath Khanal, S. (2015) Qualitative Study of Landfill Leachate from Different Ages of Landfill Sites of Various Countries Including Nepal. *IOSR J Environ Sci Toxicol Food Technol.* **9**, 23-26.

Ahel, M., Terzić, S., Tepić, N. (2006) Organska onečišćenja u odlagalištu otpada Jakuševac i njihov utjecaj na podzemne vode. *Arh Hig Rada Toksikol.* **57**, 307-315.

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

Andrews, W.J., Masoner, J.R., Cozzarelli, I.M. (2011) Emerging Contaminants at a Closed and an Operating Landfill in Oklahoma. *Ground Water Monit Remediat.* **32** (1), 120-130.

Anonymus 1 (2020) Groundwater. The basics, < <https://www.groundwater.org/get-informed/basics/basics.html>>. Pristupljeno 22. veljače 2020.

Anonymus 2 (2019) Regionalni centar za gospodarenje otpadom sjeverozapadne Hrvatske. O RCGO Piškornica, < <http://www.rcgo-piskornica.hr/defaultcont.asp?id=1&n=2>>. Pristupljeno 25. veljače 2020.

Anonymus 3 (2020) The Hydrologic Cycle, <<https://www.ngwa.org/what-is-groundwater/About-groundwater/the-hydrologic-cycle>>. Pristupljeno 3. ožujka 2020.

Anonymus 4 (2020) Opći podaci. Piškornica sanacijsko odlagalište j.d.o.o. <<http://www.piskornica-sanacijsko-odlagaliste.hr/defaultcont.asp?id=1&n=0>>. Pristupljeno 10. ožujka 2020.

Anonymus 5 (2017) Hep G2. < <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HB-8065.aspx#characteristics>>. Pristupljeno 30. kolovoza 2020.

Anonymus 6 (2020) Cal 27. <<https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-2095.aspx#characteristics>>. Pristupljeno 30. kolovoza 2020.

Anonymus 7 (2020) Brand™ Bürker-Türk Counting Chambers. <<https://www.fishersci.se/shop/products/buerker-tuerk-counting-chambers-2/10297390>>.

Pristupljeno 30. kolovoza 2020.

Aziz, H.A., Zahari, M.S.M., Bashir, M.J.K., Hung, Y-T. (2014) Groundwater Contamination at Landfill Site. U: Handbook of Environment and Waste Management (Hung, Y.-T., Lawrence, K.W., Nazih, K.S., ured.), World Scientific Publishing Co., Terengganu, str. 781-817.

Baderna, D., Caloni, F., Benfenati, E. (2019) Investigating landfill leachate toxicity in vitro: A review of cell models and endpoint. *Environ Int.* **122**, 21-30.

Baderna, D., Maggioni, S., Boriani, E., Gemma, S., Molteni, M., Lombardo, A., Colombo, A., Bordonali, S., Rotella, G., Lodi, M., Benfenati, E. (2011) A combined approach to investigate the toxicity of an industrial landfill's leachate: Chemical analyses, risk assessment and in vitro assays. *Environ Res.* **111** (4), 603-613.

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

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

Bakare, A.A., Mosuro, A.A., Osibanjo, O. (2003) Landfill leachate - induced toxicity in mice. *J Environ Biol.* **24** (4), 429-435.

Banu, S., Berrin, T. (2015) Parametric fate and transport profiling for selective groundwater monitoring at closed landfills: A case study. *J Waste Manag.* **38**, 263-270.

Barčić, D., Ivančić, V. (2010) Utjecaj odlagališta otpada Prudinec/Jakuševac na onečišćenje okoliša. *Šumarski list.* **7-8**, 347-359.

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

Bjerg, P. L., Albrechtsen, H. J., Kjeldsen, P., Christensen, T. H., Cozzarelli, I. M., Heinrich, D. H. (2003) The Groundwater Geochemistry of Waste Disposal Facilities. U: Treatise on Geochemistry, (Turekian, K. K., Holland H. D., ured.), Elsevier Science, Pergamon, Oxford, str. 579-612.



- Cai, Z., Yan, L.-J. (2013) Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health. *J Biochem Pharmacol Res.* **1** (1), 15-26.
- Castegna, A., Drake, J., Pocernich, C., Butterfield, D.A. (2003) Protein Carbonyl Levels— An Assessment of Protein Oxidation. U: *Methods in Pharmacology and Toxicology: Methods in Biological Oxidative Stress* (Hensley, K., Floyd, R.A., ured.), Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, str. 161-168.
- Cavallo, D., Ursini, C. L., Setini, A., Chianese, C., Piegari, P., Perniconi, B., Iavicoli, S. (2003) Evaluation of oxidative damage and inhibition of DNA rapair in an in vitro study of nickel exposure. *Toxicol In Vitro.* **17**, 603-607.
- Çeçen, F., Aktas, Ö. (2004) Aerobic Co-Treatment of Landfill Leachate with Domestic Wastewater. *Environ. Eng. Sci.* **21** (3), 303-312.
- Chandra, S., Chauhan, L. K. S., Murthy, R. C., Saxena, P. N., Pande, P. N., Gupta, S. K. (2005) Comparative biomonitoring of leachate from hazardous solid waste of two industries using Allium test. *Sci Total Environ.* **347**, 46-52.
- Chandrasekaran, A., Sosa Idelchik, M. del P., Andrés Melendez, J. (2016) Redox control of senescence and age-related disease. *Redox Biol.* <<http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2016.11.005>>. Pristupljeno 29. ožujka 2020.
- Christensen, T. H., Kjeldsen, P., Albrechtsen, H. J., Heron, G., Nielsen, P. H., Bjerg, P. L., Holm, P. E. (1994) Attenuation of Landfill Leachate pollutants in Aquifers. *Critical Rev. Environ. Sci. Technol.* **24** (2), 119-202.
- Christensen, T. H., Kjeldsen, P., Bjerg, P. L., Jensen, D. L., Christensen, J. B., Baun, A. (2001) Biogeochemistry of landfill leachate plumes. *Appl. Geochem.* **16**, 659–718.
- Clarke, B.O., Anumol, T., Barlaz, M., Snyder, S.A. (2015) Investigating landfill leachate as a source of trace organic pollutants. *Chemosphere.* **127**, 269-275.
- Collins, A. R. (2004) The comet assay for DNA damage and repair. Principles, Applications, and Limitations. *Mol. Biotechnol.* **26**, 249-261.
- Collins, A. R., Oscoz, A. A., Brunborg, G., Gaivao, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C. C., Stetina, R. (2008) The comet assay: topical issues. *Mutagenesis.* **23**, 143-151.

- Colombo, G., Clerici, M., Garavaglia, M.E., Giustarini, D., Rossi, R., Milzani, A., Dalle-Donne, I. (2015) A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. *J Chromatogr B*. **1019**, 178-190.
- Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R., Milzani, A. (2003) Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med*. **9** (4), 169-176.
- Direktiva Europskog parlamenta i Vijeća o zaštiti podzemnih voda od onečišćenja i pogoršanja kakvoće (2006) Bruxelles, Belgija
- Donnelly, K. C., Brown, K. W., Thomas, J. C. (1990) Bacterial mutagenicity of leachate water from municipal sewage sludge-amended soils. *Environ Toxicol Chem*. **9**, 443-451.
- Durgo, K. (2019) Genotoksikologija. Interna skripta. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu
- Eko Invest (2019) Studija ocjene stanja voda i tla na neposrednom utjecajnom području odlagališta otpada Piškornica, Zagreb
- Elaborat zaštite okoliša u postupku ocjene o potrebi procjene utjecaja zahvata na okoliš (2019) Regionalni centar za gospodarenje otpadom Sjeverozapadne Hrvatske – Piškornica, Koprivnički Ivanec – Izmjena zahvata izgradnje RCGO
- Ernst, W. R., Henningar, P., Doe, K., Wade, S., Julien, G. (1994) Characterization of the chemical constituents and toxicity to aquatic organisms of a municipal landfill leachate. *Water Pollut Res J Can*. **29**, 89-101.
- Feng, S., Wang, X., Wei, G., Peng, P., Yang, Y., Cao, Z. (2007) Leachates of municipal solid waste incineration bottom ash from Macao: Heavy metal concentrations and genotoxicity. *Chemosphere*. **67**, 1133-1137.
- Fotakis, G., Timbrell, J.A. (2006) In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett*. **160**, 171-177.
- Franken, N.A.P., Stap, J., Rodermond, H., Haveman, J., Van Bree, C. (2006) Clonogenic Assay of Cells. *Nat Protoc*. (objavljeno online 21. prosinca 2006.). doi: 10.1038/nprot.2006.339
- Freshney, R. I. (2010) Culture of animalia cells: a manual on basic tehnique and specialized applications. 4. izd., John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.

- Gabbianelli, R., Lupidi, G., Villarini, M., Falcioni, G. (2003) DNA damage induced by copper on erythrocytes of gilthead sea bream *Sparus aurata* and mollusk *Scapharca inaequivalvis*. *Arch Environ Contam Toxicol.* **45**, 350-356.
- Gajski, G., Oreščanin, V., Garaj – Vrhovac, V. (2012) Chemical composition and genotoxicity assessment of sanitary landfill leachate from Rovinj, Croatia. *Ecotoxicol Environ Saf.* **78**, 253-259.
- Gajski, G., Oreščanin, V., Garaj-Vrhovac, V. (2011) Cytogenotoxicity of sewage sludge leachate before and after calcium oxide-based solidification in human lymphocytes. *Ecotoxicol Environ Saf.* **74**, 1408-1415.
- Garaj-Vrhovac, V. (2000) Karcinogenost i mutagenaza: analiza somatskih mutacija. *Arh Hig Rada Toksikol.* **51**, 115-124.
- Garaj-Vrhovac, V., Oreščanin, V., Gajski, G., Gerić, M, Ruk, D., Kollar, R., Radić Brkanac, S., Cvjetko, P. (2013) Toxicological characterization of the landfill leachate prior/after chemical and electrochemical treatment: A study on human and planet cells. *Chemosphere* **93** (6), 939-945.
- Gaweł, S., Wardas, M., Niedworok, E., Wardas, P. (2004) Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiad Lek.* **57** (9-10), 453-455.
- GenWay Biotech (2020) Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit. <<https://www.genwaybio.com/lipid-peroxidation-mda-assay-kit>>. Pristupljeno 4. rujna 2020.
- Gereš, D. (2004) Kruženje vode u zemljinom sustavu, *Grđevinar.* **56**, 355-365.
- Ghosh, P., Das, M. T., Thakur, I. S. (2014) Mammalian cell line-based bioassays for toxicological evaluation of landfill leachate treated by *Pseudomonas* sp. ISTDF1. *Environ Sci Pollut Res.* **21**, 8084-8094.
- Ghosh, P., Shekhar Thakurb, I., Kaushik, A. (2017) Bioassays for toxicological risk assessment of landfill leachate: A review. *Ecotoxicol Environ Saf.* **141**, 259-270.
- Grgić, S. (1997) Djelovanje ionizirajućeg zračenja na žive stanice. Simpozij. Ministarstvo zdravstva RH, Zagreb, str. 87-94.
- Hassan Omer, N. (2019) Water Quality Parameters. U: Water Quality – Science, Assessments and Policy. Licensee IntechOpen, Sudan University for Science and Technology, Khartoum, Sudan (objavljeno *online* 16. listopada 2019.). doi: 10.5772/intechopen.89657

- Heath, C. W., Nadel, M. R., Zack, M. M., Chen, A. T. L., Bender, M. A., Preston, J. (1984) Cytogenetic findings in persons living near the Love Canal. *JAMA*. **251**, 1437-1440.
- Hegarty, M., Chisolm, D. (2002) Chemotherapy and Anaesthesia. *Curr Anaesth Crit Care*. **13**, 168-174.
- Henderson, L., Wolfreys, A., Fedyk, J., Bourner, C., Windebank, S. (1998) The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis*. **13** (1), 89-94.
- Hoeijmakers, J.H.J. (2009) Molecular origins of cancer. DNA Damage, Aging, and Cancer. *N Engl J Med*. **361**, 1475-1485.
- Huo, S., Beidou, X., Haichan, Y., Liansheng, H., Shilei, F., Hongliang, L. (2008) Characteristics of dissolved organic matter (DOM) in leachate with different landfill ages. *Int. J. Environ. Sci*. **20**, 492-498.
- Ikem, A., Osibanjo, O., Sridhar, M. K. C., Sobande, A. (2002) Evaluation of groundwater quality characteristics near two waste sites in Ibadan and Lagos, Nigeria. *Water Air Soil Pollut*. **140**, 307-333.
- Jambrović, F. (2013) Onečišćenje, zaštita i stanje kvalitete vode za piće Međimurske županije. Stručni rad, Osnovna škola Sveta Marija, Sveta Marija
- Janerich, D. T., Burnett, W. S., Feck, G., Hoff, M., Nasca, P., Polednak, A. P., Greenwald, P., Vianna, N. (1981) Cancer incidence in the Love canal area. *Science*. **212**, 1404-1407.
- Jensen, D. L., Christensen, T. H. (1999) Colloidal and dissolved metals in leachates from four Danish landfills. *Water Res*. **33**, 2139-2145.
- Kale, S.S., Kadam, A.K., Kumar, S., Pawar, N.J. (2010) Evaluating pollution potential of leachate from landfill site, from the Pune metropolitan city and its impact on shallow basaltic aquifers. *Environ Monit Assess*. **162**, 327-246.
- Katerji, M., Filippova, M., Duerksen-Hughes, P. (2019) Approaches and Methods to Measure Oxidative Stress in Clinical Samples: Research Applications in the Cancer Field. *Oxid Med Cell Longev*. **2019**, (objavljeno online 12. ožujka 2019.). doi: [10.1155/2019/1279250](https://doi.org/10.1155/2019/1279250)
- Kjeldsen, P., Barlaz, M. A., Rooker, A. P., Baun, A., Ledin, A., Christensen, J. B. (2002) Present and Long-Term Composition of MSW Landfill Leachate: A Review. *Crit. Rev. Environ Sci Technol*. **32** (4), 297-336.

- Kurniawan, T. A., Lo, W. H., Chan, G. Y. S. (2006) Physico-chemical treatments for removal of recalcitrant contaminants from landfill leachates. *J Hazard Mater.* **129**, 80-100.
- Li, G., Sang, N., Wang, Q. (2006) Oxidative damage induced in brains and livers of mice by landfill leachate. *Ecotoxicol Environ Saf.* **65**, 134-139.
- 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, H., Han, M., Hou, L., Li, G., Sang, N. (2010) Landfill leachate ingestion induces protein oxidation and DNA-protein crosslinks in mouse viscera. *J Hazard Mater.* **174**, 54-58.
- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., Abete, P. (2018) Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging.* **13**, 757-772.
- Liu, Z., Wu, W., Shi, P., Guo, J., Cheng, J. (2015) Characterization of dissolved organic matter in landfill leachate during the combined treatment process of air stripping, Fenton, SBR and coagulation. *J. Waste Manag.* **41**, 111-118.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacol Rev.* **4** (8), 118-126.
- Lu, Y., Liu, Y., Yang, C. (2017) Evaluating In Vitro DNA Damage Using Comet Assay. *J Vis Exp.* **128** (objavljeno online 10. studenog 2017.). doi:10.3791/56450
- 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.
- Matošić, M., Terzić, S., Korajlija Jakopović, H., Mijatović, I., Ahet, M. (2008) Treatment of a Landfill Leachate Containing Compounds of Pharmaceutical Origin. *Water Sci Technol.* **58** (3), 597-602.
- Mayers, J., Batchelor, C., Bond, I., Hope, R. A., Morrison, E. and Wheeler, B. (2009) *Water ecosystem services and poverty under climate change: Key issues and research priorities* [online], International Institute for Environment and Development, London, <<http://www.indiaenvironmentportal.org.in/files/Water%20ecosystem%20services.pdf>>
- Pristupljeno 23. veljače 2020.

- Møller, P., Knudsen, L.E., Loft, S., Wallin, H. (2000) The Comet Assay as a Rapid Test in Biomonitoring Occupational Exposure to DNA-damaging Agents and Effect of Confounding Factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **9**, 1005-1015.
- Monarca, S., Feretti, D., Zerbini, I., Alberti, A., Zani, C., Resola, S., Gelatti, U., Nardi, G. (2002) Soil contamination detected using bacterial and plant mutagenicity tests and chemical analyses. *Environ Res.* **88**, 64-69.
- Naveen, B.P., Sivapullaiah, P.V., Sitharam, T.G. (2014) Characteristics of a municipal solid waste landfill leachate. Proceedings of Indian Geotechnical Conference, Kakinada, India
- Niedernhofer, L. J., Scott Daniels, J., Rouzer, C.A., Greene, R.E., Marnett, L.J. (2003) Malondialdehyde, a Product of Lipid Peroxidation, Is Mutagenic in Human Cells. *J Biol Chem.* **278** (33), 31426–31433
- Nystrom, T. (2007) Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J.* **24**, 1311-1317.
- Oman, C., Rosqvist, H. (1999) Transport fate of organic compounds with water through landfills. *Water Res.* **33**, 2247-2254.
- Oreščanin, V. (2014) Procjedne vode odlagališta otpada – kemijski sastav, toksični učinci i metode pročišćavanja. *Hrvatske vode.* **22** (87), 1-12.
- Pacadi, M. (2015) Ispitivanje genotoksičnosti podzemnih voda s područja Međunarodne zračne luke Zagreb na staničnim linijama HEP2 i A549. Diplomski rad, Prehrambeno biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu
- Poznyak, T., Luis Bautista, G., Cha´irez, I., Ivan Cordova, R., Elvira R´ios, L. (2008) Decomposition of toxic pollutants in landfill leachate by ozone after coagulation treatment. *J. Hazard. Mater.* **152**, 1108–1114.
- 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.
- Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (2020) *Narodne novine* **26**, Zagreb
- Putnam, K.P., Bombick, D.W. Doolittle, D.J. (2002) Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. *Toxicol In Vitro.* **16**, 599-607.

- Qi, C., Huang, J., Wang, B., Deng, S., Wang, Y., Yu, G. (2018) Contaminants of emerging concern in landfill leachate in China: A review. *Emerg Contam.* **4** (1), 1-10.
- Reinhart, D. R. (1993) A review of recent studies on the sources of hazardous compounds emitted from solid waste landfills: a US experience. *J Waste Manage Res.* **11**, 257-268.
- Reinhart, D.R., Al-Yousfi, A.B. (1996) The impact of leachate recirculation on municipal solid waste landfill operating characteristics. *J. Waste Manag Res.* **14**, 337-346.
- Ruk, D. (2012) Kemijska i genotoksična svojstva procjednih voda prije i nakon obrade mikrovalovima i elektrokemijskim metodama. Doktorska disertacija, PMF, Zagreb, 101 str.
- Samadder, S.R., Prabhakar, R., Khan, D., Kishan, D., Chauhan, M.S. (2016) Analysis of the contaminants released from municipal solid waste landfill site: A case study. *Sci Total Environ.* **580**, 593-601.
- Sang, N., Han, M., Li, G., Huang, M. (2010) Landfill leachate affects metabolic responses of *Zea mays* L. seedlings. *J Waste Manag.* **30** (5), 856-862.
- Sang, N., Li, G. (2004) Genotoxicity of municipal landfill leachate on root tips of *Vicia faba*. *Mutat Res.* **560** (2), 159-165.
- Sang, N., Li, G. (2005) Chromosomal Aberrations Induced in Mouse Bone Marrow Cells by Municipal Landfill Leachate. *Environ Toxicol Pharmacol.* **20** (1), 219-224.
- Sang, N., Li, G., Xin, X. (2006) Municipal landfill leachate induces cytogenetic damage in root tips of *Hordeum vulgare*. *Ecotoxicol Environ Saf.* **63**, 469-473.
- Sawaithayothin, V., Polprasert, C. (2007) Nitrogen mass balance and microbial analysis of constructed wetlands treating municipal landfill leachate. *Biores Technol.* **98**, 565-570.
- Schwarzbauer, J., Heim, S., Brinker, S., Littke, R. (2002) Occurrence and alteration of organic contaminants in seepage and leakage water from a waste deposit landfill. *Water Res.* **36**, 2275-2287.
- Siddique, H.R., Gupta, S.C., Dhawan, A., Murthy, R.C., Saxena, D.K., Kar Chowduri, D. (2005) Genotoxicity of Industrial Solid Waste Leachates in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mol Mutagen.* **46**, 189-197.
- Sizirici, B., Tansel, B. (2015) Parametric fate and transport profiling for selective groundwater monitoring at closed landfills: A case study. *J Waste Manage Res.* **38**, 263-270.

- Slack, R. J., Gronow, J. R., Hall, D. H., Voulvoulis, N. (2007) Household hazardous waste disposal to landfill: Using Land Sim to model leachate migration. *Environ Pollut.* **146** (2), 501-509.
- Slack, R. J., Gronow, J. R., Voulvoulis, N. (2005) Household hazardous waste in municipal landfills: contaminants in leachate. *Sci Total Environ.* **337**, 119-137.
- Stadtman, E.R., Oliver, C.N. (1991) Metal-catalyzed Oxidation of Proteins. Minireview. *J Biol Chem.* **266** (4), 2005-2008.
- Štefan, L., Tepšić, T., Zavidic, T., Urukalo, M., Tota, D., Domitrović, R. (2007) Lipidna peroksidacija – uzroci i posljedice. *Medicina.* **43**, 84-93.
- Talalaj, I.A. (2014) Removal of organic and inorganic compounds from landfill leachate using reverse osmosis. *Int J Environ Sci Technol.* **17**, 1177-1193.
- Tewari, A., Chauhan, L. K. S., Kumar, D., Gupta, S. K. (2005) Municipal sludge leachate-induced genotoxicity in mice - a subacute study. *Mutat Res.* **587**, 9-15.
- Toufexi, E., Tsarpali, V., Efthimioub, J., Vidali, M.-S., Vlastos, D., Dailianis, S. (2013) Environmental and human risk assessment of landfill leachate: An integrated approach with the use of cytotoxic and genotoxic stress indices in mussel and human cells. *J Hazard Mater.* **260**, 593-601.
- Trzeciak, A., Kowalik, J., Malecka-Panas, E., Drzewoski, J., Wojewódzka, M., Iwanenko, T., Blasiak, J. (2000) Genotoxicity of chromium in human gastric mucosa cells and peripheral blood lymphocytes evaluated by single cell gel electrophoresis (comet assay). *Med Sci Monit.* **6**, 24-29.
- Uredba o standardu kakvoće voda (2019) *Narodne novine* **96**, Zagreb
- US EPA (1993) Getting Up to Speed: Groundwater contamination, US EPA - United States Environmental Protection Agency, Washington, <pa.gov/sites/production/files/2015-08/documents/mgwc-gwc1.pdf>. Pristupljeno 4. ožujak 2020.
- Vianna, N. J., Polan, A. K. (1984) Incidence of low birth weight among Love canal residents. *Science.* **226**, 1217-1219.
- Vučijak, B., Čerić, A., Silajdžić, I., Midžić Kurtagić, S. (2011) Voda za život: osnove integralnog upravljanja vodnim resursima [online], Institut za hidrotehniku Građevinskog fakulteta, Sarajevo,



<<https://www.undp.org/content/dam/unct/bih/PDFs/OsnoveIWRMhr.pdf>>. Pristupljeno 23. veljače 2020.

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

Wong, V.W.C., Szeto, Y.T., Collins, A.R., Benzie, I.F.F. (2005) THE COMET ASSAY: a biomonitoring tool for nutraceutical research. *Curr Top Nutraceutical Res.* **3** (1), 1-14.

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

Xu, Y.D., Yue, D.B., Zhu, Y., Nie, Y.F. (2006) Fractionation of dissolved organic matter in mature landfill leachate and its recycling by ultrafiltration and evaporation combined processes. *Chemosphere.* **64**, 903-911.

Yunus, A., Smallman D.J., Stringfellow, A., Beaven, R., Powrie, W. (2011) Leachate dissolved organic matter characterization using spectroscopic methods. *J Water Reuse Desalination.* **1** (2) 78-87.

Yusmartini, E.S., Setiabudidaya, D., Ridwan, Marsi, Faizal (2013) Characteristics of Leachate at Sukawinatan Landfill, Palembang, Indonesia. *J Phys Conf Ser.* **423**, 1-5.

## 7. PRILOZI

### Prilog 1. Fizikalno – kemijski sastav voda s područja odlagališta otpada Piškornica

- a) Fizikalno – kemijski sastav podzemne vode uzorkovane uzvodno od odlagališta otpada Piškornica (uzorak 1)

#### Ekologija okoliša - fizikalno-kemijski pokazatelji

Parametar	Jedinica mjere	Rezultat	MDK	Odgovara
*Elektrovodljivost	μS / cm	1494	2500	da
*pH	-	6,6 (kod 25°C)	-	
*Suspendirana tvar	mg / l	52	-	

#### Ekologija okoliša - metali

Parametar	Jedinica mjere	Rezultat	MDK	Odgovara
Arsen (As)	μg / l	<1	10	da
Bakar (Cu)	μg / l	<1	-	
Barij (Ba)	μg / l	118	-	
Cink (Zn)	μg / l	46,1	-	
Kadmij (Cd)	μg / l	<1	5	da
Krom (Cr)	μg / l	<1	-	
Mangan (Mn)	μg / l	1733	-	
Nikal (Ni)	μg / l	<1	-	
Olovo (Pb)	μg / l	<1	10	da
Selen (Se)	μg / l	<1	-	
Željezo (Fe)	μg / l	<10	-	
Živa (Hg)	μg / l	17,0	1	ne
*Krom (VI)	mg / l	<0,010	-	

#### Ekologija okoliša - režim kisika

Parametar	Jedinica mjere	Rezultat	MDK	Odgovara
BPK5	mgO <sub>2</sub> / l	6	-	
*KPK	mgO <sub>2</sub> / l	<15	-	

#### Ekologija okoliša - hranjive tvari

Parametar	Jedinica mjere	Rezultat	MDK	Odgovara
Fosfor, ukupni	mg / l	<0,050	0,35	da
Dušik, ukupni	mg / l	<1	-	

#### Ekologija okoliša - organski spojevi

Parametar	Jedinica mjere	Rezultat	MDK	Odgovara
*Teškohlapljive lipofilne tvari (ukupna ulja i masti)	mg / l	<0,1	-	
*Ugljikovodici (C10-C40)	µg / l	<20	-	
Adsorbilni organski halogeni (AOX)	mg / l	<0,050	-	
*Fenoli	mg / l	<0,050	-	

#### Ekologija okoliša - ioni

Parametar	Jedinica mjere	Rezultat	MDK	Odgovara
Nitriti	mgNO <sub>2</sub> / l	<0,015	0,5	da

#### Ekologija okoliša - organski spojevi, plinska kromatografija

Parametar	Jedinica mjere	Rezultat	MDK	Odgovara
*Lakohlapljivi aromatski ugljikovodici, BTEX (zbroj) <sup>o</sup>	µg / l	<1	-	
*Benzen	µg / l	<1	-	
*Etilbenzen	µg / l	<1	-	
*o-ksilen	µg / l	<1	-	
*p+m-ksilen	µg / l	<1	-	
*Toluen	µg / l	<1	-	

<sup>o</sup>Lakohlapljivi aromatski ugljikovodici (BTX) predstavljaju zbroj benzena, toluena, etilbenzena i i orto-, meta – i paraksilena.

- b) Fizikalno – kemijski sastav podzemne vode uzorkovane nizvodno od odlagališta otpada  
Piškornica (uzorak 2)

#### Ekologija okoliša - fizikalno-kemijski pokazatelji

Parametar	Jedinica mjere	Rezultat	MDK	Odgovara
*Elektrovodljivost	μS / cm	1516	2500	da
*pH	-	7,2 (kod 25,0°C)	-	
*Suspendirana tvar	mg / l	3	-	

#### Ekologija okoliša - metali

Parametar	Jedinica mjere	Rezultat	MDK	Odgovara
Arsen (As)	μg / l	2,13	10	da
Bakar (Cu)	μg / l	<1	-	
Barij (Ba)	μg / l	44,8	-	
Cink (Zn)	μg / l	54,8	-	
Kadmij (Cd)	μg / l	<1	5	da
Krom (Cr)	μg / l	<1	-	
*Krom (VI)	mg / l	<0,010	-	
Mangan (Mn)	μg / l	342	-	
Nikal (Ni)	μg / l	<1	-	
Olovo (Pb)	μg / l	<1	10	da
Selen (Se)	μg / l	<1	-	
Željezo (Fe)	μg / l	<10	-	
Živa (Hg)	μg / l	<0,1	1	da

#### Ekologija okoliša - režim kisika

Parametar	Jedinica mjere	Rezultat	MDK	Odgovara
BPK5	mgO <sub>2</sub> / l	5	-	
*KPK	mgO <sub>2</sub> / l	<15	-	

#### Ekologija okoliša - hranjive tvari

Parametar	Jedinica mjere	Rezultat	MDK	Odgovara
Fosfor, ukupni	mg / l	<0,050	0,35	da
Dušik, ukupni	mg / l	<1	-	

#### Ekologija okoliša - organski spojevi

Parametar	Jedinica mjere	Rezultat	MDK	Odgovara
*Teškohlapljive lipofilne tvari (ukupna ulja i masti)	mg / l	<0,1	-	
*Ugljikovodici (C10-C40)	µg / l	<20	-	
Adsorbilni organski halogeni (AOX)	mg / l	<0,050	-	
*Fenoli	mg / l	<0,050	-	

#### Ekologija okoliša - ioni

Parametar	Jedinica mjere	Rezultat	MDK	Odgovara
Nitriti	mgNO <sub>2</sub> / l	<0,015	0,5	da

#### Ekologija okoliša - organski spojevi, plinska kromatografija

Parametar	Jedinica mjere	Rezultat	MDK	Odgovara
*Lakohlapljivi aromatski ugljikovodici, BTEX (zbroj) <sup>o</sup>	µg / l	<1	-	
*Benzen	µg / l	<1	-	
*Etilbenzen	µg / l	<1	-	
*o-ksilen	µg / l	<1	-	
*p+m-ksilen	µg / l	<1	-	
*Toluen	µg / l	<1	-	

<sup>o</sup>Lakohlapljivi aromatski ugljikovodici (BTX) predstavljaju zbroj benzena, toluena, etilbenzena i i orto-, meta – i paraksilena.

c) Fizikalno – kemijski sastav procjedne vode s odlagališta otpada Piškornica (uzorak 3)

#### Ekologija okoliša - fizikalno-kemijski pokazatelji

Parametar	Jedinica mjere	Rezultat	MDK	Odgovara
*pH	-	7,6 (kod 25,0°C)	-	
*Suspendirana tvar	mg / l	24	-	
*Temperatura (na terenu)	°C	20,0	-	

#### Ekologija okoliša - metali

Parametar	Jedinica mjere	Rezultat	MDK	Odgovara
Arsen (As)	mg / l	0,105	-	
Bakar (Cu)	mg / l	0,451	-	
Barij (Ba)	mg / l	0,775	-	
Cink (Zn)	mg / l	0,599	-	
Kadmij (Cd)	mg / l	<0,001	-	
Krom (Cr)	mg / l	11,2	-	
*Krom (VI)	mg / l	<0,010	-	
Mangan (Mn)	mg / l	1,69	-	
Nikal (Ni)	mg / l	0,342	-	
Olovo (Pb)	mg / l	<0,001	-	
Selen (Se)	mg / l	0,007	-	
Željezo (Fe)	mg / l	18,3	-	
Živa (Hg)	mg / l	<0,0001	-	

#### Ekologija okoliša - režim kisika

Parametar	Jedinica mjere	Rezultat	MDK	Odgovara
BPK5	mgO <sub>2</sub> / l	2025	-	
*KPK	mgO <sub>2</sub> / l	4366	-	

#### Ekologija okoliša - hranjive tvari

Parametar	Jedinica mjere	Rezultat	MDK	Odgovara
Fosfor, ukupni	mg / l	15,7	-	
Dušik, ukupni	mg / l	135	-	

#### Ekologija okoliša - organski spojevi

Parametar	Jedinica mjere	Rezultat	MDK	Odgovara
-----------	----------------	----------	-----	----------

*Teškohlapljive lipofilne tvari (ukupna ulja i masti)	mg / l	290	-	
*Ukupni ugljikovodici (FTIR)	mg / l	10,7	-	
Adsorbilni organski halogeni (AOX)	mg / l	0,286	-	
*Fenoli	mg / l	118	-	

#### Ekologija okoliša - ioni

Parametar	Jedinica mjere	Rezultat	MDK	Odgovara
Nitriti	mg N / l	<0,015	-	

#### Ekologija okoliša - organski spojevi, plinska kromatografija

Parametar	Jedinica mjere	Rezultat	MDK	Odgovara
*Lakohlapljivi aromatski ugljikovodici, BTEX (zbroj) <sup>o</sup>	mg / l	0,007	-	
*Benzen	mg / l	0,005	-	
*Etilbenzen	mg / l	<0,001	-	
*o-ksilen	mg / l	<0,001	-	
*p+m-ksilen	mg / l	<0,001	-	
*Toluen	mg / l	0,001	-	

<sup>o</sup>Lakohlapljivi aromatski ugljikovodici (BTX) predstavljaju zbroj benzena, toluena, etilbenzena i i orto-, meta – i paraksilena.

- d) Fizikalno – kemijski sastav površinske vode uzorkovane nizvodno od odlagališta otpada  
Piškornica (uzorak 4)

#### Ekologija okoliša - fizikalno-kemijski pokazatelji

Parametar	Jedinica mjere	Rezultat	MDK	Odgovara
*Elektrovodljivost	μS / cm	559	-	
*pH	pH	7,2 (kod 25,0°C)	7,0 - 7,4	da
*Suspendirana tvar	mg / l	5	-	

#### Ekologija okoliša - metali

Parametar	Jedinica mjere	Rezultat	MDK	Odgovara
Arsen (As)	mg / l	0,003	-	
Bakar (Cu)	mg / l	<0,001	-	
Barij (Ba)	mg / l	0,028	-	
Cink (Zn)	mg / l	<0,001	-	
Kadmij (Cd)	mg / l	<0,001	-	
Krom (Cr)	mg / l	<0,001	-	
*Krom (VI)	mg / l	<0,010	-	
Mangan (Mn)	mg / l	<0,001	-	
Nikal (Ni)	mg / l	<0,001	-	
Olovo (Pb)	mg / l	<0,001	-	
Selen (Se)	mg / l	<0,001	-	
Željezo (Fe)	mg / l	<0,010	-	
Živa (Hg)	mg / l	<0,0001	-	

#### Ekologija okoliša - režim kisika

Parametar	Jedinica mjere	Rezultat	MDK	Odgovara
*KPK(Mn)	mgO <sub>2</sub> / l	0,89	1,8	da
BPK5	mgO <sub>2</sub> / l	0,40	1,2	da

#### Ekologija okoliša - hranjive tvari

Parametar	Jedinica mjere	Rezultat	MDK	Odgovara
Fosfor, ukupni	mg / l	<0,050	0,05	da
Dušik, ukupni	mg / l	<1	1,1	da

#### Ekologija okoliša - organski spojevi



Parametar	Jedinica mjere	Rezultat	MDK	Odgovara
*Fenoli	mg / l	<0,050	-	
*Teškohlapljive lipofilne tvari (ukupna ulja i masti)	mg / l	<0,1	-	
*Ukupni ugljikovodici (FTIR)	mg / l	<0,1	-	
Adsorbilni organski halogeni (AOX)	mg / l	<0,050	-	

#### Ekologija okoliša - ioni

Parametar	Jedinica mjere	Rezultat	MDK	Odgovara
*Nitriti	mgNO <sub>2</sub> / l	0,10	-	

#### Ekologija okoliša - organski spojevi, plinska kromatografija

Parametar	Jedinica mjere	Rezultat	MDK	Odgovara
*Lakohlapljivi aromatski ugljikovodici, BTEX (zbroj) <sup>o</sup>	µg / l	<1	-	
*Benzen	µg / l	<1	-	
*Etilbenzen	µg / l	<1	-	
*o-ksilen	µg / l	<1	-	
*p,m-ksilen	µg / l	<1	-	
*Toluen	µg / l	<1	-	

<sup>o</sup>Lakohlapljivi aromatski ugljikovodici (BTX) predstavljaju zbroj benzena, toluena, etilbenzena i i orto-, meta – i paraksilena.

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

MDK=maksimalno dopuštena količina

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

**Prilog 2. Fizikalno – kemijski sastav procjedne vode s odlagališta otpada Piškornica  
prema Pravilniku o graničnim vrijednostima emisija onečišćujućih tvari otpadnih voda  
(uzorak 3) (Pravilnik 2019)**

**Ekologija okoliša - fizikalno-kemijski pokazatelji**

Parametar	Rezultati		MDK		Odgovara
	Jedinica mjere	Rezultat	Površinske vode	Sustav javne odvodnje	
*pH	-	7,6 (kod 25,0°C)	6,5 - 9	6,5 – 9,5	da
*Suspendirana tvar	mg / l	24	25	-	da
*Temperatura (na terenu)	°C	20,0	30	40	da

**Ekologija okoliša - metali**

Parametar	Rezultati		MDK		Odgovara
	Jedinica mjere	Rezultat	Površinske vode	Sustav javne odvodnje	
Arsen (As)	mg / l	0,105	0,1	0,1	ne
Bakar (Cu)	mg / l	0,451	0,5	0,5	da
Barij (Ba)	mg / l	0,775	5	5	da
Cink (Zn)	mg / l	0,599	2	2	da
Kadmij (Cd)	mg / l	<0,001	0,1	0,1	da
Krom (Cr)	mg / l	11,2	0,5	0,5	ne
*Krom (VI)	mg / l	<0,010	0,1	0,1	da
Mangan (Mn)	mg / l	1,69	2	4	da
Nikal (Ni)	mg / l	0,342	0,5	0,5	da
Olovo (Pb)	mg / l	<0,001	0,5	0,5	da
Selen (Se)	mg / l	0,007	0,02	0,1	da
Željezo (Fe)	mg / l	18,3	2	10	ne
Živa (Hg)	mg / l	<0,0001	0,01	0,01	da

**Ekologija okoliša - režim kisika**

Parametar	Rezultati		MDK		Odgovara
	Jedinica mjere	Rezultat	Površinske vode	Sustav javne odvodnje	
BPK5	mgO <sub>2</sub> / l	2025	20	100	ne
*KPK	mgO <sub>2</sub> / l	4366	100	700	ne

**Ekologija okoliša - hranjive tvari**

Parametar	Rezultati		MDK		
	Jedinica mjere	Rezultat	Površinske vode	Sustav javne odvodnje	Odgovara
Fosfor, ukupni	mg / l	15,7	2	-	ne
Dušik, ukupni	mg / l	135	15	-	ne

#### Ekologija okoliša - organski spojevi

Parametar	Rezultati		MDK		
	Jedinica mjere	Rezultat	Površinske vode	Sustav javne odvodnje	Odgovara
*Teškohlapljive lipofilne tvari (ukupna ulja i masti)	mg / l	290	20	100	ne
*Ukupni ugljikovodici (FTIR)	mg / l	10,7	10	30	ne
Adsorbilni organski halogeni (AOX)	mg / l	0,286	0,5	0,5	da
*Fenoli	mg / l	118	0,1	10	ne

#### Ekologija okoliša - ioni

Parametar	Rezultati		MDK		
	Jedinica mjere	Rezultat	Površinska voda	Sustav javne odvodnje	Odgovara
Nitriti	mg N / l	<0,015			

#### Ekologija okoliša - organski spojevi, plinska kromatografija

Parametar	Rezultati		MDK		
	Jedinica mjere	Rezultat	Površinska voda	Sustav javne odvodnje	Odgovara
*Lakohlapljivi aromatski ugljikovodici, BTEX (zbroj) <sup>o</sup>	mg / l	0,007	0,1	1,0	da
*Benzen	mg / l	0,005	-	-	
*Etilbenzen	mg / l	<0,001	-	-	
*o-ksilen	mg / l	<0,001	-	-	
*p+m-ksilen	mg / l	<0,001	-	-	
*Toluen	mg / l	0,001	-	-	

<sup>o</sup>Lakohlapljivi aromatski ugljikovodici (BTX) predstavljaju zbroj benzena, toluena, etilbenzena i i orto-, meta – i paraksilena.

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

MDK=maksimalno dopuštena količina

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

## **IZJAVA O IZVORNOSTI**

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mog rada te da se prilikom njegove izrade nisam koristila drugim izvorima osim onih navedenih u radu.

*Adriana Ćurić*

---

Adriana Ćurić