

INSTITUTE OF ECOLOGY OF NATURE RESEARCH CENTRE
VILNIUS UNIVERSITY

Laura Andreikėnaite

**GENOTOXIC AND CYTOTOXIC EFFECTS OF CONTAMINANTS
DISCHARGED FROM THE OIL PLATFORMS IN FISH AND MUSSELS**

Summary of doctoral dissertation
Biomedical Sciences, Ecology and Environmental Sciences (03B)

Vilnius, 2010

The dissertation research was carried out at the Institute of Ecology of Nature Research Centre in 2006-2010.

Scientific Supervisor:

Dr Habil. Janina Baršienė (Institute of Ecology of Nature Research Centre, Biomedical Sciences, Ecology and Environmental Sciences – 03B)

Scientific Consultant:

Dr Steinar Sanni (International Research Institute of Stavanger, Norway)

The defence of the doctoral dissertation is held at the Vilnius University Ecology and Environmental Research Council:

Chairman:

Prof. Dr Habil. Vincas Būda (Vilnius University, Biomedical Sciences, Ecology and Environmental Sciences – 03B)

Members:

Dr Habil. Janina Šyvokienė (Institute of Ecology of Nature Research Centre, Biomedical Sciences, Ecology and Environmental Sciences – 03B)

Prof. Dr Algimantas Paulauskas (Vytautas Magnus University, Biomedical Sciences, Ecology and Environmental Sciences – 03B)

Ass. Prof. Dr Virginijus Sruoga (Vilnius Pedagogical University, Biomedical Sciences, Zoology – 05B)

Dr Dalius Butkauskas (Institute of Ecology of Nature Research Centre, Biomedical Sciences, Ecology and Environmental Sciences – 03B)

Opponents:

Prof. Dr Gražina Slapšytė (Vilnius University, Biomedical Sciences, Biology – 01B)

Prof. Dr Habil. Aniolas Sruoga (Vytautas Magnus University, Biomedical Sciences, Ecology and Environmental Sciences – 03B)

The official defence of the dissertation will be held at the open session of the Research Council on the 21st October 2010 at 2.00 p.m. at the Institute of Ecology of Nature Research Centre,

Address: Akademijos 2, LT-08412 Vilnius-21, Lithuania

Tel. +370 5 2729257, fax. +370 5 2729352

The summary of the doctoral dissertation was distributed on 21st September 2010.

The dissertation is available at the libraries of Vilnius University and of the Institute of Ecology of Nature Research Centre.

GAMTOS TYRIMŲ CENTRO EKOLOGIJOS INSTITUTAS
VILNIAUS UNIVERSITETAS

Laura Andreikėnaitė

**NAFTOS PLATFORMŲ TARŠOS GENOTOKSINIO IR CITOTOKSINIO
POVEIKIO ĮVERTINIMAS ŽUVŲ IR MOLIUSKŲ LĄSTELĖSE**

Daktaro disertacijos santrauka
Biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra (03B)

Vilnius, 2010

Disertacija rengta 2006-2010 metais Gamtos tyrimų centro Ekologijos institute.

Mokslinis vadovas:

habil. dr. Janina Baršienė (Gamtos tyrimų centro Ekologijos institutas, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03B)

Mokslinis konsultantas:

dr. Steinar Sanni (Stavangerio tarptautinių tyrimų institutas, Norvegija)

Disertacija ginama Vilniaus universiteto Ekologijos ir aplinkotyros krypties taryboje:

Pirmininkas:

prof. habil. dr. Vincas Būda (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03B)

Nariai:

habil. dr. Janina Šyvokienė (Gamtos tyrimų centro Ekologijos institutas, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03B)

prof. dr. Algimantas Paulauskas (Vytauto Didžiojo universitetas, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03B)

doc. dr. Virginijus Sruoga (Vilniaus pedagoginis universitetas, biomedicinos mokslai, zoologija – 05B)

dr. Dalius Butkauskas (Gamtos tyrimų centro Ekologijos institutas, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03B)

Oponentai:

prof. dr. Gražina Slapšytė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01B)

prof. habil. dr. Aniolas Sruoga (Vytauto Didžiojo universitetas, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03B)

Disertacija bus ginama viešame Ekologijos ir aplinkotyros mokslo krypties tarybos posėdyje, 2010 m. spalio mėn. 21 d. 14 val. Gamtos tyrimų centro Ekologijos instituto salėje.

Adresas: Akademijos 2, LT-08412 Vilnius-21, Lietuva.

Tel. +370 5 2729257, fax. + 370 5 2729352

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2010 m. rugsėjo mėn. 21 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto ir Gamtos tyrimų centro Ekologijos instituto bibliotekose.

INTRODUCTION

Relevance of the study. Despite new technological inventions in offshore oil platforms, aquatic ecosystems are still being polluted with crude oil and other technogenic contaminants (PAHs, alkylphenols, heavy metals, sulphur and nitrogen compounds, and radionuclides). In 2007, about 20000 tones of crude oil were spilled to the marine environment during the oil drilling processes (GESAMP, 2007), and 162 million m³ of produced water (PW) were discharged in the Norwegian sector of the North Sea (OLF, 2008).

Many of pollutants produced by oil industry are genotoxic to the aquatic organisms. The interaction of these compounds or their metabolites with DNA can cause various genetic effects, which are often irreversible, can be transmitted to the next generations and thus affect the organisms up to population level. The number of biomarkers is applied to evaluate biological effects of oil pollution, in order to evaluate genotoxic and cytotoxic impact, micronucleus test and analysis of the other nuclear abnormalities is rather frequently being used (Lehtonen et al., 2006). There are literature data on genotoxicity induction in aquatic organisms inhabiting the oil platform zones or areas affected by the oil spills (Bolognesi et al., 2004, 2006; Baršienė et al., 2006; Laffon et al., 2006; Hylland et al., 2008; Rybakovas et al., 2009). Caging is more and more frequently used tool for the assessment of contaminants impacts *in situ* in areas with pollution gradient (Bolognesi et al., 2004; Aarab et al., 2008; Bocchetti et al., 2008; Klobučar et al., 2008). Furthermore, in aquatic ecosystems contaminants usually discharged in complex mixtures, can provoke interactions between unknown substances and lead to the unpredictability in genotoxic responses to pollution (Jha, 2008).

Objective and main tasks of the study. The main objective of the study is assessment of genotoxicity and cytotoxicity effects in fish and bivalves exposed to the crude oil and other technogenic contaminants discharged from the different oil platforms.

The following tasks were set to achieve this objective:

- To examine genotoxicity (induction of micronuclei and nuclear buds) and cytotoxicity (formation of fragmented-apoptotic and bi-nucleated cells) in cells of fish and mussels deployed to different zones of the Statfjord B and Ekofisk oil platforms and in polluted Karmsund fjord area of the North Sea;
- To investigate genotoxicity and cytotoxicity (geno-cytotoxicity) of crude oil extracted from different oil platforms (North Sea, Barents Sea and Lithuania) and other technogenic contaminants in various fish and bivalve species under laboratory conditions;
- To define inter-specific peculiarities of geno-cytotoxicity responses after treatment with crude oil and other technogenic contaminants discharged from the oil platforms;
- To assess inter-tissue differences in fish after treatment with oil platform contaminants (crude oil, produced water and different mixtures of alkylphenols and PAHs).

Novelty of the study. For the first time, the genotoxicity and cytotoxicity effects of contaminants discharged from oil platforms were analyzed in fish and bivalves under

field and laboratory conditions. Environmental genotoxicity was assessed using micronuclei (MN) and nuclear buds (NB), and environmental cytotoxicity was evaluated by measuring the frequencies of fragmented-apoptotic (FA) and bi-nucleated cells (BN) in hemocytes and gill cells of *M. edulis* and in liver erythrocytes of *G. morhua*. In the study, for the first time were assessed:

- Environmental genotoxicity and cytotoxicity in the blue mussels and Atlantic cod caged in the Statfjord B and Ekofisk oil platforms and in Karmsund fjord areas;
- Regularities of genotoxicity and cytotoxicity in fish and mussels after experimental treatment with crude oil from the North Sea oil platforms and Minija well in Lithuania;
- The formation of nuclear abnormalities in turbot liver erythrocytes after treatment with arctic oil;
- The impact of microorganism infection on genotoxicity and cytotoxicity induction in gill cells of mussels;
- Regularities of genotoxicity and cytotoxicity induction in cod liver and kidney erythrocytes after exposure to crude oil, produced water (PW) from the Oseberg C platform, to different mixtures simulating content of alkylphenols (AP) and PAHs in the PW, as well as to mixture of crude oil+AP+PAH;
- Inter-specific differences between mussels, turbot, Atlantic cod, clams and perch exposed to crude oil;
- Peculiarities of geno-cytotoxicity in different fish tissues after treatment with contaminants discharged from the oil platforms;
- Geno-cytotoxicity effects in rainbow trout *O. mykiss*, caused by the model mixtures of the heavy metals.

Scientific and practical significance. The study results provide new information on environmental genotoxicity and cytotoxicity in different zones of oil platforms in the North Sea and in Karmsund fjord system, polluted by PAHs and heavy metals. In different fish and bivalve species, geno-cytotoxicity of crude oil (from the North Sea and Barents Sea, from Minija oil-well) and other oil industry contaminants was investigated under laboratory conditions. There were determined time-tissue-species-concentration-related relationships in induction of nuclear abnormalities in studied fish and mussels. The levels of geno-cytotoxicity in mussels were significantly higher than in fish; consequently, mussels are more relevant indicators in assessment of environmental genotoxicity and cytotoxicity in zones impacted by the oil industry. Nevertheless, consider induction of genotoxicity and cytotoxicity at significant levels in experimental treatment with crude oil and other contaminants, indigenous fish species should be used to monitor distribution of aneugenic and clastogenic compounds in zones of offshore oil platforms. The study results revealed usefulness of genotoxicity endpoints, as well as cytotoxicity endpoints for the evaluation of damage, caused by the contamination discharged from the marine oil industry. The statement was proved when genotoxicity was studied participating in numerous of projects, financed by the Norwegian Science Council and different oil companies. Geno-ecotoxicological risk was identified in environment of oil platforms, and, also recovery of organisms was shown after installation of modern technologies in the Norwegian oil industry. The used endpoints of environmental genotoxicity could be successfully implemented in monitoring systems as

early biomarkers for the investigation of effects caused by accidental spills of oil and other compounds. Additionally, the relevance of the study could be suggested as at first time it was shown impact of microorganism infection on genotoxicity and cytotoxicity induction in gill cells of mussels.

Defended statements:

- Geno-cytotoxicity approach can be used in assessment of environmental pollution effects in areas close to offshore oil platforms *in situ* and it is sensitive tool in prediction of eco-genotoxicological risk for the indigenous organisms inhabiting oil platform zones;
- Crude oil and other technogenic contaminants discharged to the North Sea from oil platforms provoke geno-cytotoxicity effects in mussels and fish;
- Induction of nuclear abnormalities in mussel and fish cells depends on exposure time and concentration, and differences also defined as a tissue-species related process;

Scientific approval and publications. The results of the present study were published in 9 scientific papers in Lithuanian and international peer-reviewed scientific journals and discussed during 10 presentations on international conferences and symposiums: 7th and 10th Lithuanian Young Scientist Conferences (2005, Anykščiai; 2007, Molėtai); 3rd International Conference „Metals in the Environment“ (Vilnius, 2006), 2nd Regional Student Conference „Biodiversity and Functioning of Aquatic Ecosystems in the Baltic Sea Region“ (Klaipėda, 2006); World Congress of Malacology (Antwerp, 2007), ICES Annual Science Conference (Helsinki, 2007); Scientific-practical Conference “Sea and coastal research (Palanga, 2008), “BONUS” Joint Baltic Sea Research Annual Conference (Vilnius, 2010).

Structure of dissertation. The dissertation manuscript is composed of the following chapters: introduction, literature review, material and methods, results, discussion, conclusion, references and list of author’s publications. The material and results of the dissertation are presented in 172 pages. The text contains 23 figures and 10 tables. The list of references contains 440 sources; the list of author’s publications comprises 9 publications.

Acknowledgements. I am sincerely grateful to the supervisor of my work, Dr habil. Janina Baršienė for every kind support, valuable advices, ideas, comments, huge patience, understanding and assistance. I am much obliged to Research advisor Steinar Sanni, Dr Rolf Sundt, Dr Anne Bjornstad, Dr Nadia Aarab and to all IRIS scientists, who planned, arranged samplings, prepared slides for the cytogenetic studies in the projects, which results on genotoxicity and cytotoxicity is presented in my PhD thesis. I would also like to thank EC for access to samples in the project ‘BEEP’, Research Council of Norway for access to samples from the projects ‘Comparative Cod exposure’, and ‘Biomarker Bridges’, and to the Norwegian Oil Industry Association and in particular StatoilHydro, ConocoPhillips, Total and Eni for access to samples in several programs ‘BECPELAG’, ‘Water Column Monitoring program’, ‘BioSea I’. I give thanks to the personnel of the Genotoxicology and Hydrobionts Ecology and Physiology laboratories and also to my fellows.

LITERATURE REVIEW

This chapter deals with marine environment pollution (polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), alkylphenols, heavy metals), with description of the sources of pollution due to oil industry activities in the North Sea, including produced water. There were presented peculiarities of bioaccumulation and biological effects of contaminants (PAHs, alkylphenols and heavy metals) and most popular exposure and effect biomarkers in mussels and fish. In details were reviewed the formation of micronuclei and other nuclear abnormalities in marine organisms. Other genetic methods and bioindicators used in genotoxicity assays are reviewed.

MATERIAL AND METHODS

For the assessment of the genotoxicity and cytotoxicity of discharged pollutants in the North Sea oil platforms, fish and mussels were caged in the gradient towards the Statfjord B and Ekofisk oil platforms. In order to examine the potential contamination by PAHs and heavy metals, geno-cytotoxicity parameters were analyzed in mussels caged in the Karmsund fjord area.

Table 1. Material for genotoxicity and cytotoxicity analysis in mussels and fish caged in different study sites.

1 lentelė. Aktyvaus monitoringo tyrimų vietos ir medžiaga.

Species (number of specimens), studied cells	Study area/ exposure time	Caging sites/distance from the pollution source
<i>Gadus morhua</i> (60), liver erythrocytes <i>Mytilus edulis</i> (60), hemocytes	Statfjord B 6 weeks	500,1000 and 10000 meters Pre-exposure, Reference
<i>Mytilus edulis</i> (93), hemocytes	Ekofisk 6 weeks	1 st*. (1600m SW*), 2 st. (600m SW) 3 st. (close to discharger (southern flare), 4 st. (close to discharger/ 2/4J) 5 st. (1100m NE*), 6 st. (2000m NE), Reference (20000m)
<i>Mytilus edulis</i> (50) gill cells	Karmsund 4 weeks	1 st. (to SW* from discharger) 2 st. (to E* from discharger) 3 st. (close to discharger) Reference (Forlandsfjorden) Pre-exposure (Forlandsfjorden)

*st – station, SW – to the south west from discharger, NE – to the north east from discharger, E – to the east from discharger.

Geno-cytotoxicity of crude oil processed from the Statfjord B and Oseberg C platforms in the North Sea and the arctic crude oil from the Barents Sea and Minija oil well (Lithuania) were studied under laboratory conditions. Moreover, geno-cytotoxic effects of Oseberg C oil platform produced water (PW), different alkylphenols and crude oil, PAH and alkylphenol mixtures, as well as different concentrations of heavy metals mixtures were analyzed in fish tissues.

Table 2. Material for genotoxicity and cytotoxicity analysis in mussels and fish after experimental exposure.

2 lentelė. Naftos pramonės teršalų genotoksinio ir citotoksinio poveikio eksperimentinių tyrimų medžiaga.

Species (specimens) studied cells	Time of exposure/ compound/concentrations
<i>Scophthalmus maximus</i> (44) blood and kidney erythrocytes <i>Gadus morhua</i> (56) blood and kidney erythrocytes	3 weeks exposure to Statfjord B crude oil 0.5 ppm oil 0.5 ppm oil+8AP*(0.1 µg/l)+11PAH*(0.0915 µg/l), 30 ppb NP*, Control
<i>Mytilus edulis</i> (41) gill cells	3 weeks exposure to Statfjord B crude oil 0.5 ppm oil, 0.5 ppm oil+8AP (0.1 µg/l)+11PAH (0.0915 µg/l), 30 ppb NP, Control
<i>Mytilus edulis</i> (40) gill cells	1, 2, 4 and 8d.*exposure to Statfjord B crude oil 0.5 ppm oil, Control
<i>Scophthalmus maximus</i> (120) liver erythrocytes	4, 8 weeks exposure to Arctic crude 10, 40, 120, 360 and 720 ppb oil, Control
<i>Perca fluviatilis</i> (40) blood erythrocytes	10-day exposure to Minija crude oil (Lithuania) 0.25, 0.5 and 1.0 ppm oil, Control
<i>Anodonta anatina</i> (40) gill cells	10d. exposure to Minija crude oil (Lithuania) 0.25, 0.5 and 1.0 ppm, Control
<i>Gadus morhua</i> (140) liver and kidney erythrocytes	2 weeks exposure to Oseberg C crude oil and PW* Mixture of 4 alkylphenols (AP) – 2, 10 and 2000 ng/l Mixture of 9AP (37 µg/l) 0.2 ppm oil+9AP (37 µg/l)+21PAH (12 µg/l) Produced water–1:200 PW; 1:1000 PW dilutions Crude oil 0.2 ppm, Control
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (40) blood erythrocytes	14 d. exposure to mixture of heavy metals 21.79%, 10.89%, 5.45% and 1.1% concentrations, Control
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (104) blood erythrocytes	4-day exposure to mixture of (Zn+Cu) 0.06, 0.125 and 0.25 mg/l concentrations and 4, 8, 12- day recovery, Control

*AP – alkylphenols, PAH – polycyclic aromatic hydrocarbons, NP – nonylphenol, d – days, PW – produced water.

Preparation and analysis of slides. The arch of *M. edulis* and *A. anatina* gills was placed in a drop of 3:1 ethanol acetic acid solution on clean microscopic slide and gently nipped with tweezers for 2-3 minutes. Then the cell suspension was softly smeared on a surface of the slide. Smears of fish blood from caudal vessels and mussels hemolymph were directly overspread on slides and air-dried. After the sacrifice, a small piece of fish liver and cephalic kidney was dissected, softly dragged along clean slide and allowed to dry for 1–2 h. Smears were subsequently fixed in methanol for 10 min., and were stained with 10% Giemsa solution in phosphate buffer pH=6.8 for 8 min. (Baršienė et al., 2004). The stained slides were analyzed under the light microscope Olympus BX51 at a final magnification of 1000×. Micronuclei were identified according to the following criteria: (1) round and ovoid-shaped non-refractory particles in the cytoplasm, (2) color and structure similar to chromatin of the nucleus, (3) a diameter of 1/3-1/20 of the main nucleus, (4) particles completely separated from the main nucleus (Fig. 1). Nuclear buds, bi-nucleated and fragmented-apoptotic cells were identified using criteria described by M. Fenech with co-authors (2003). The morphological features of studied nuclear abnormalities are shown in Fig. 1. For each studied specimen of mussels, 2000 cells with intact cytoplasm were scored. A total of 10000 erythrocytes with intact cellular and nuclear membrane were examined for each fish specimen (5000 mature erythrocytes from peripheral blood and 5000 immature erythrocytes – from cephalic kidney and

liver). Nuclear abnormalities were photographed with Olympus DP 700 digital camera. The frequency of micronuclei and other nuclear abnormalities was evaluated as the number of abnormalities per 1000 cells scored (Baršienė et al., 2004).

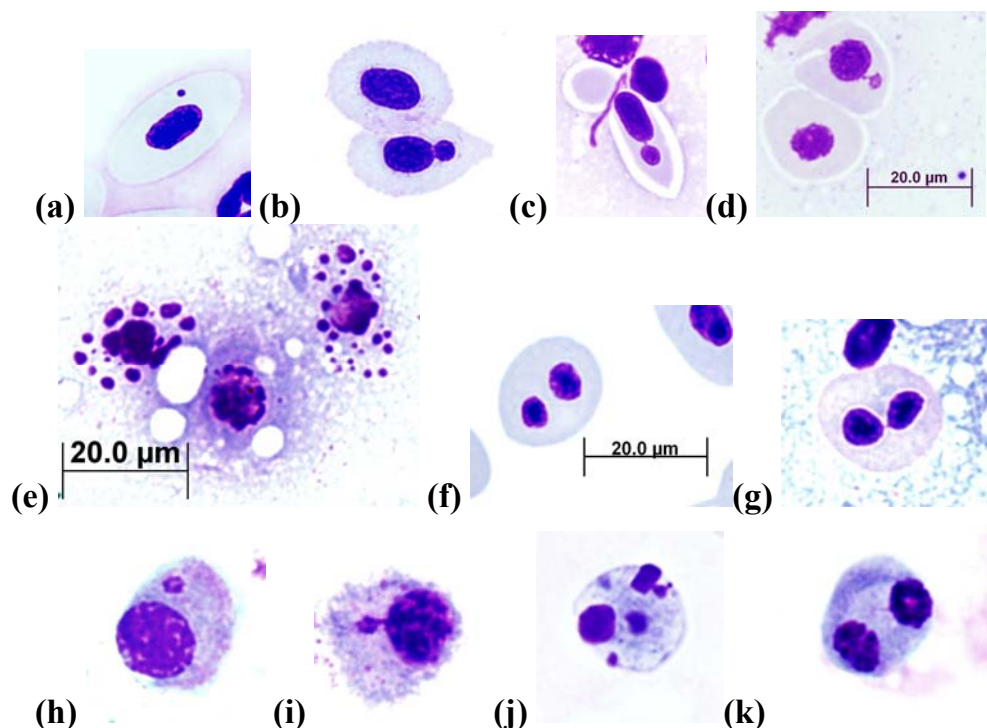


Figure 1. (a) micronucleus (MN), (b) cell with nuclear bud (NB), (c-d) nuclear-bud with nucleoplasmic filament (NB_f), (e) fragmented-apoptotic cell (FA), (f) bi-nucleated erythrocyte (BN), (g) bi-nucleated erythrocyte with nucleoplasmic bridge (BN_b) – in fish; (h) MN, (i) NB_f, (j) FA, (k) BN – in mussels.

1 paveikslas. (a) mikrobranduolys (MB), (b) branduolio pumpuras (BP), (c-d) branduolio pumpurai susijungę su branduoliu nukleoplazmine jungtimi (BP_s), (e) fragmentuota-apoptozinė ląstelė (FA), (f) dvibranduolė ląstelė (DB), (g) dvibranduolė ląstelė, kurios branduoliai susijungę nukleoplazminiu tiltu (DB_t) – žuvų eritrocituose; (h) MB, (i) BP, (j) FA, (k) DB ląstelės – moliuskuose.

Statistical analysis was carried out using PRISM 5.0 statistical package. Mean and standard error was calculated for each experimental group. Data was analyzed with one way ANOVA. Non-parametric Mann-Whitney U-test was used to compare alteration frequencies between control and treatment groups.

RESULTS AND DISCUSSION

Assessment of environmental genotoxicity and cytotoxicity by caging approach *in situ*

After 6-week caging of *M. edulis* and *G. morhua* in the **Statfjord B oil platform** zones, the gradient – 500 m >1000 m >10000 m by the frequency of MN and BN in mussels and by the MN and NB – in cod was found. The induction of MN in mussel hemocytes was 13-19 times higher, induction of NB – 2-11 times higher than in liver

erythrocytes of Atlantic cod. The lowest frequency of micronuclei (MN) in mussel's hemocytes was observed in pre-exposure (2.13‰) group and in that caged in a distance 10000 meters from the platform (2.58‰), the highest – in mussels caged close to the platform (7.66‰). Comparatively high MN level was detected in mussels caged in 1000 meters from the Statfjord B platform (Fig. 2).

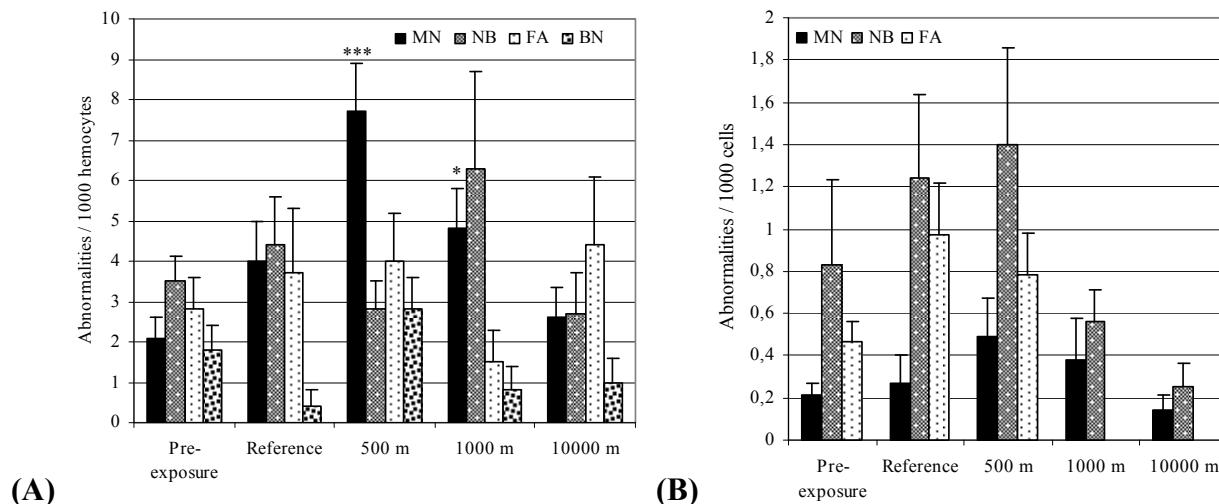


Figure 2. (A) Frequencies of MN, NB, FA and BN hemocytes of *Mytilus edulis* and (B) the frequencies of MN, NB and FA erythrocytes in liver of *Gadus morhua* caged for 6 week in different zones of Statfjord B oil platform. Asterisks show statistically significant differences compared to reference group of the mussels: *P<0.01 and ***P<0.0001 levels of significance.

2 paveikslas. (A) Branduolio pažaidų dažniai valgomųjų midijų (*Mytilus edulis*) hemocituose ir (B) Atlantinė menkių (*Gadus morhua*) kepenų eritrocituose po 6 savaičių laikymo skirtingose Statfjord B naftos platformos zonoje, *P<0,01 ir ***P<0,0001 patikimumo lygis tarp kontrolinės ir prie naftos platformos laikytų midijų grupių.

Significant induction of MN levels was found in mussels caged in 500 and 1000 distance from the oil platform. The highest frequency of nuclear buds (NB) was in the mussels deployed to the site in 1000 m distance from the oil platform (Fig. 2). The highest level of cytotoxicity (BN=2.78‰) was determined in mussels caged in 500 m from the platform. In *G. morhua* liver erythrocytes, a clear genotoxicity gradient was observed too. The lowest frequencies of MN (0.14‰) and NB (0.25‰) were found in liver erythrocytes from fish group, which were caged in 10000 m distance from the Statfjord B oil platform (Fig. 2). Therefore, the impacts of genotoxins were detected in a distance up to 1000 meters from the Statfjord B oil platform, but the differences were not statistically significant.

6-week caging of mussels in **Ekofisk oil platform** area (Fig. 3) showed 4.8-fold increase of MN (5.97‰) induction in mollusks caged in station 3 (Fig. 4A). In station 4 the frequency of MN was 3.2 times higher than in reference group of the mussels (1.24‰). These two stations were located close to Ekofisk oil platform discharges.

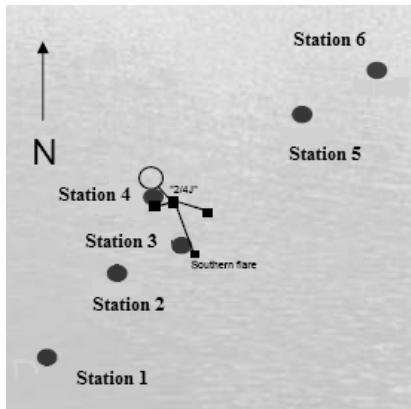


Figure 3. Caging stations of mussels in Ekofisk oil platform area.

3 paveikslas. Moliuskų laikymo varžose stotys esančios Ekofisk naftos platformos zonoje.

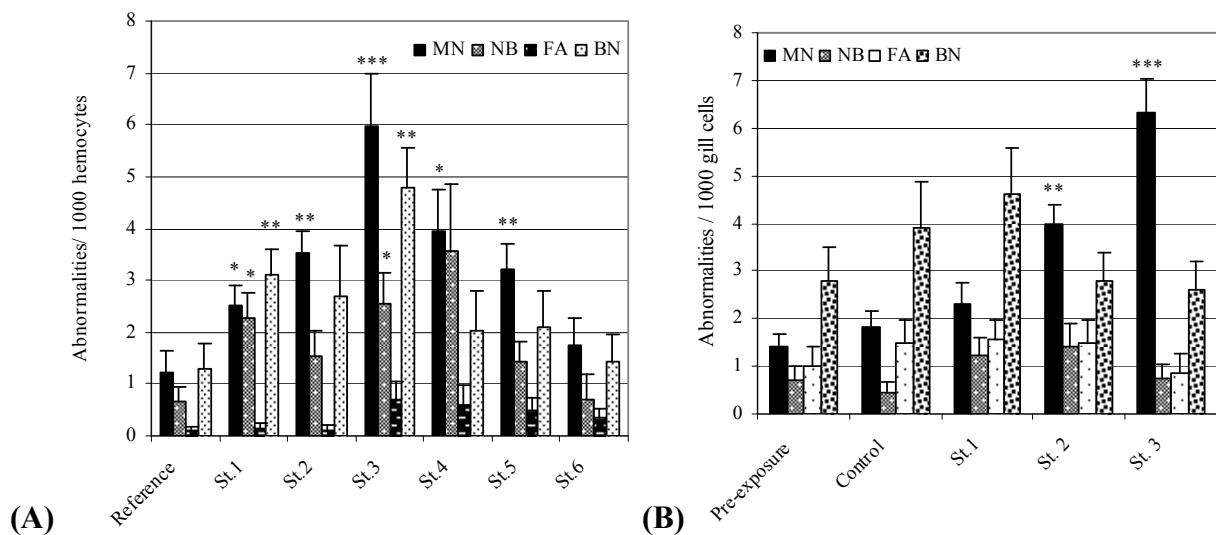


Figure 4. (A) Frequencies of MN, NB, FA and BN haemocytes of *M. edulis* caged for 6 weeks in different zones of Ekofisk oil platform and **(B)** in gill cells of blue mussels caged for 4 weeks in different zones of Karmsund fjord area. Asterisks show statistically significant differences compared to reference group of the mussels: ** $P < 0.001$ level of significance.

4 paveikslas. (A) Branduolio pažaidų dažniai midijų hemocituose, laikant moliuskus 6 savaites skirtingose varžose Ekofisk naftos platformos zonoje bei **(B)** midijų žiaunų ląstelėse laikant moliuskus 4 savaites skirtingose varžose Karmsund fjordų sistemoje. ** $P < 0,0001$ patikimumo lygis tarp kontrolinės ir užterštose vietose laikytų midijų grupių.

From 2 up to 2.9-fold increase of MN incidences was found in hemocytes of *Mytilus edulis* caged in stations 2, 1 and 5 comparing to the reference group. The level of NB in hemocytes ranged from 0.68‰ in reference group to 3.57‰ – mussels from station 4. Environmental cytotoxicity effects according to FA incidences varied from 0.1‰ (station 2) to 0.46‰ (station 5). The lowest frequency of BN cells was observed in reference group (1.28‰) and in station 6 (1.44‰), the highest – in hemolymph cells of mussel deployed to station 3, the nearest station to the oil platform (Fig. 4A).

Furthermore, genotoxicity (MN and NB induction) gradient was found in gill cells of mussels, which were translocated for 4 weeks to **Karmsund fjord** area. The study

stations were located in zones near the aluminum smelter and were heavily polluted with heavy metals (Andersen et al., 2003) and PAHs. Induction of MN varied from 1.40‰ in pre-exposure group to 6.33‰ in gill cells of the mussels caged in station 3, which was nearest to the discharger (Fig. 4B). The highest frequency (1.4‰) of NB was found in hemocytes of mussels from station 2, and the lowest one (0.46‰) in the reference group. Analysis of cytotoxicity in mussels deployed to station 3 showed low responses, evidently resulting from the suppression of their induction, due to overwhelming of the contaminant threshold. There were tremendously increased (3464-fold) concentrations of genotoxic benzo(a)anthracene and 2384-fold, increase of benzo(a)pyrene compared to the concentration in control group of molluscs. Genotoxic fluoranthene was at the level of 4489-fold, chrysene – of 2226-fold, dibenzo(a,h)anthracene – of 174-fold increment. Elevated concentrations of these genotoxic compounds (about 100-388-fold increase compared to control group) were found also in mussels caged at station 2 and in station 1 (about 5-40-fold increase). Increased levels of Al, Zn, Pb and Hg were identified also in mussels caged at station 3 (IRIS data). It has been reported data on genotoxicity of 10 polycyclic aromatic hydrocarbons (anthracene, benz[a]anthracene, 7,12-dimethylbenz[a]anthracene, dibenz[a,h]anthracene, dibenz[a,c]anthracene, 3-methylcholanthrene, benzo[a]pyrene, benzo[e]pyrene, chrysene and pyrene) in organisms and was pointed that genotoxicity of these compounds in general correlated with their reported carcinogenicity (Nishikawa et al., 2005).

Experimental studies of geno-cytotoxicity effects of oil industry contaminants

Statfjord B oil platform. There were performed two experimental exposures of mussels to the Statfjord crude oil, as in the first exposure, microorganism infection was identified in gills of control group. Analysis of geno-cytotoxicity in mussels from the control group showed exceptionally high levels of MN and FA in gills. Therefore second treatment to oil using the native mussels from the reference Forlandsfjorden site was carried out; the results on responses in second exposure are shown in Fig. 5.

Statistically significant MN induction was observed in gill cells of *M. edulis*, in kidney erythrocytes of *G. morhua*, and in kidney and peripheral blood erythrocytes of *S. maximus* after 3-week exposure to Statfjord B 0.5 ppm of crude oil, alkylphenols (AP) and PAH mixture (0.5 ppm oil+AP+PAH; AP+PAH – spike) (Figs. 5, 6). Significant differences in NB ($P=0.0232$) and FA ($P=0.0029$) induction in mussels, also FA and BN cells in kidney and NB in blood of turbot were detected after treatment to 0.5 ppm oil+spike. Furthermore, genotoxicity (MN induction) was found in gill cells of mussels and both turbot tissues after treatment with 0.5 ppm oil and it was statistically significant. Significant induction of FA cells ($P=0.0115$) in mussels, and BN cells (in kidney of turbot) was observed after exposure to 0.5 ppm crude oil. Dispersion analysis (ANOVA) showed statistical significant differences in MN ($P=0.003$, $F=7.25$, $R^2=0.3494$) and NB ($P=0.0264$, $F=4.168$, $R^2=0.2359$) between studied mussels groups (Fig. 5).

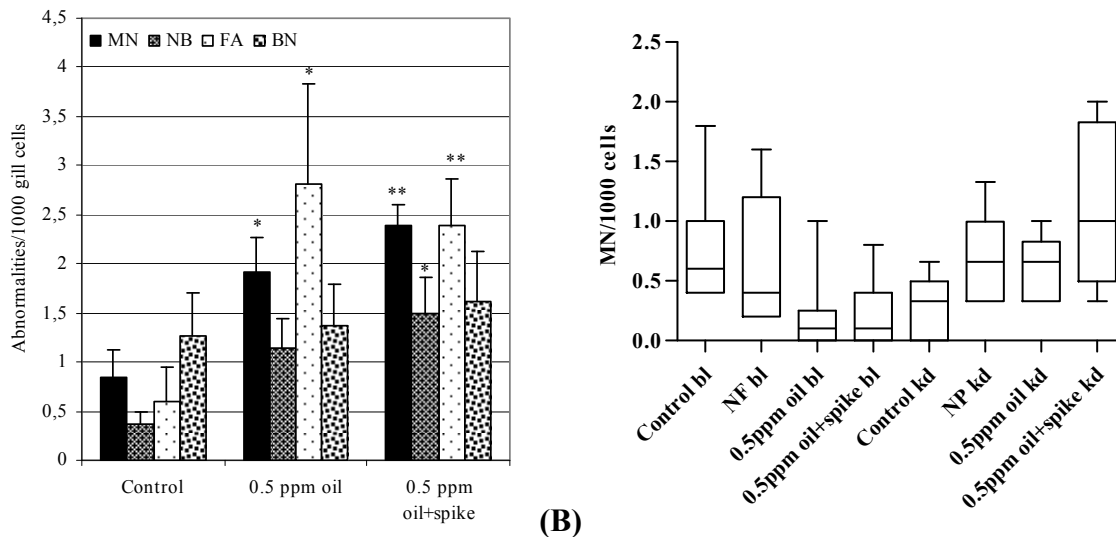


Figure 5. (A) Frequencies of MN, NB, FA and BN gill cells of *M. edulis* and **(B)** MN induction in *Gadus morhua* blood (bl) and kidney (kd) erythrocytes after exposure to nonylphenol (NP), crude oil (from Statfjord B oil platform) and mixture (spike) of oil, alkylphenol (AP) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) for 3 weeks. Shown are max, min, in box – 25 percentile, average values and 75 percentile.

5 paveikslas. (A) Branduolio pažaidos moliuskų žiaunų ląstelėse bei **(B)** MB indukcija Atlantiųjų menkių kraujo ir inkstų eritrocituose, po 3 savaičių poveikio nonilfenoliu, bei Statfjord B platformoje išgaunama žaliavine nafta, naftos, alkilfenolių (AF) ir poliaromatiųjų angliavandenilių (PAA) mišiniu.

In blood erythrocytes of *S. maximus*, the lowest frequencies of MN and NB were in control group, the highest MN (0.66‰) – in blood erythrocytes after exposure to 0.5 ppm oil+spike, and 0.54‰ – to nonylphenol (NP). Treatment with 0.5 ppm oil+spike mixture induced also highest levels of BN erythrocytes (0.82‰) (Fig. 6A). **In kidney** erythrocytes of control group of *S. maximus*, the lowest frequency of geno-cytotoxicity effects was observed. The highest induction of FA cells was in turbot after treatment to 0.5 ppm oil+spike mixture (Fig. 6B). Significant differences in MN and BN incidences were found in turbot kidney after 3 weeks exposure to NP, 0.5 ppm oil and 0.5 ppm oil+spike mixture compared to control group.

Comparison of MN frequency in mussels, turbot and Atlantic cod showed that in all treatment groups of mussels MN levels were 4 times higher than in turbot and 10 times higher than in cod blood erythrocytes. Inductions of NB in gill cells of *M. edulis* were 4-times higher than in turbot peripheral blood and 7.5-times higher than in turbot kidney erythrocytes. Similar inter-specific differences were found between *M. edulis*, *G. morhua* and *S. maximus* after exposure to certain organic pollutant (bisphenol A, diallyl phthalate and tetrabromodiphenyl ether-47) (Baršienė et al., 2006).

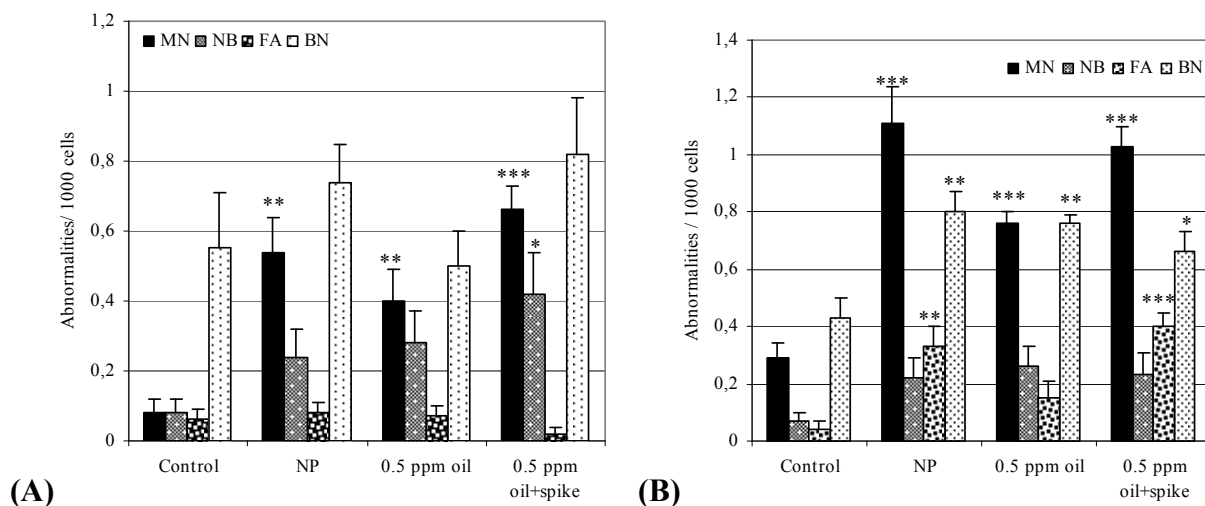


Figure 6. (A) Frequencies of MN, NB, FA and BN erythrocytes in peripheral blood and (B) kidney of *Scophthalmus maximus* after 3 weeks exposure to nonylphenol (NP), Statfjord B crude oil, and spiked oil.

6 paveikslas. (A) Branduolio pažaidų dažniai otų (*Scophthalmus maximus*) kraujo ir (B) inkstų eritrocituose po 3 savaičių poveikio nonilfenoliu, bei Statfjord B platformoje išgaunama žaliavine nafta, naftos, AF ir PAA (ŽN+AF+PAA) mišiniu.

The time-dependent induction of geno-cytotoxicity effects in gill cells of *M. edulis* was analyzed after 1, 2, 4 and 8 days exposure to Statfjord B 0.5 ppm of crude oil. Time-related elevation of MN was detected in all experimental groups compared to control group of mussels. Significant induction of MN was found even after 1-day exposure, and MN elevation levels increased progressively with increasing duration of exposure, from 1.9-fold increase after 1-day to 2.4-fold - after 8-day exposure (Fig. 7).

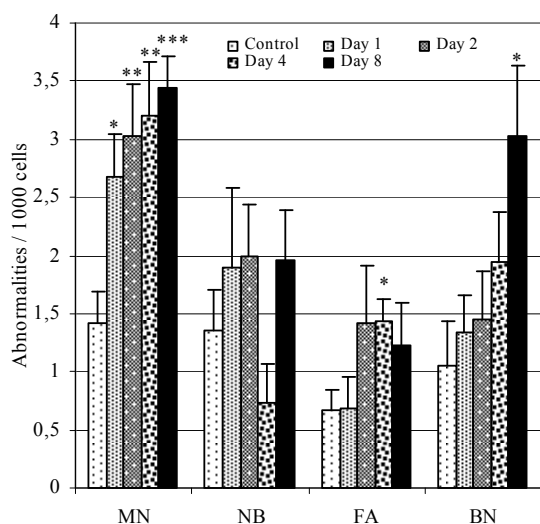


Figure 7. Frequencies of MN, NB, FA and BN gill cells of *M. edulis* after 1-,2-,4- and 8-day treatment with 0.5 ppm of crude oil extracted in Statfjord B oil platform.

7 paveikslas. Branduolio pažaidų dažniai valgomųjų midijų žiaunų ląstelėse po 1, 2, 4 ir 8 dienų ekspozicijos.

Significant induction of FA cells ($P=0.0115$) was detected in *M. edulis* gills after 4-day exposure and bi-nucleated cells - after 8-day treatment ($P=0.0232$). Sundt et al. (2006) pointed that the naphthalenes constitute about 87.7% of all PAHs of the Statfjord B crude oil used in all experiments. An increase in genotoxic response, measured as erythrocytic nuclear abnormalities, was observed during the first 8 h in *Anguilla anguilla* treated with naphthalene (Teles et al., 2003). Genotoxic potential of naphthalene was described in *Dicentrarchus labrax* (Gravato, Santos 2002).

Arctic crude oil. After 4-week exposure of turbot to arctic crude oil, the highest genotoxicity (according to MN and NB frequency) in liver erythrocytes was found in turbot group treated to 40 ppb concentration and there was MN and NB suppression after exposure to 120, 360 and 720 ppb concentrations (Fig. 8A). The same tendency was found in analysis of cytotoxicity (FA, BN). Moreover, additional type of bi-nucleated erythrocytes was identified – BN_b where two nuclei are connected with nucleoplasmic bridge (Fig. 8B).

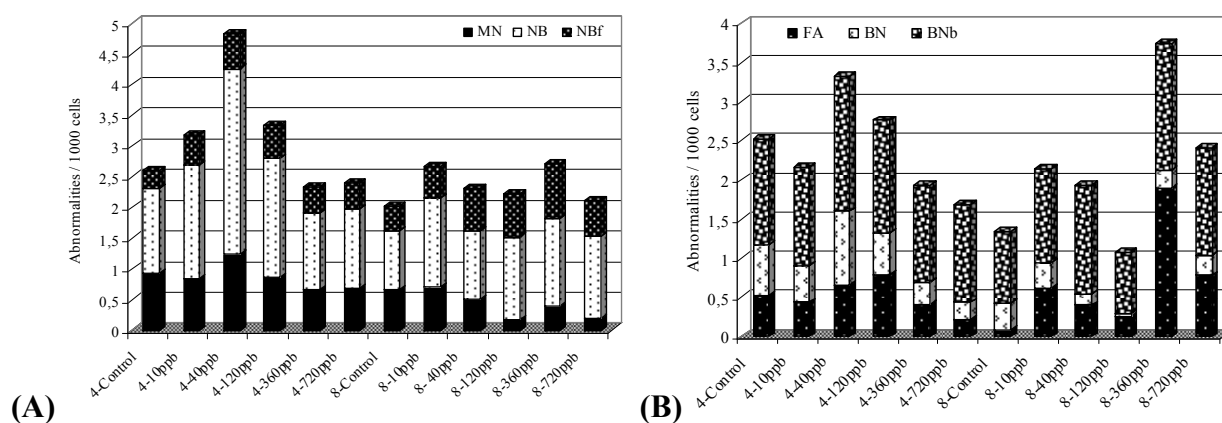


Figure 8. (A) Frequencies of MN, NB and NB_f , (B) frequencies of FA, BN and BN_b in liver erythrocytes of *S. maximus* exposed for 4 and 8 weeks to different concentrations of arctic crude oil extracted in the Barents Sea. NB_f nuclear-buds with nucleoplasmic filament, (BN_b) – bi-nucleated erythrocytes with nucleoplasmic bridge.

8 paveikslas. (A) MB, BP ir BP_s , (B) FA, DB ir DB_t dažniai otų kepenų eritrocituose po 4 ir 8 savaitių ekspozicijos. BP_s – branduolio pumpurai su nukleoplazmine jungtimi, (DB_t) – dvibranduoliai eritrocitai, kurių branduoliai susijungę nukleoplazminiu tiltu.

Interestingly, the highest induction of NB with nucleoplasmic filament (NB_f), FA and BN_b were after 8-weeks exposure to 360 ppb of arctic crude oil (Figs. 8AB). In the arctic oil, two rings naphthalenes constitute about 90.3% of all PAHs (IRIS data). It should be pointed, that after treatment with arctic oil, different types of nuclear buds in turbot liver erythrocytes were observed. The formation of nuclear buds may reflect unequal capacity of organisms to expel damaged, amplified, failed replication or condensed improperly DNA, chromosome fragments without telomeres and centromeres from the nucleus (Lindberg et al., 2007). Therefore, the formation of other nuclear abnormalities in marine organisms is useful markers for pollution effects assessment and in order to validate the battery of genotoxicity and cytotoxicity biomarkers in aquatic media (Guilherme et al., 2008). Recently high levels of micronuclei and other nuclear abnormalities were found in fish exposed to crude oil (Baršienė et al., 2006; Baršienė, Andreikėnaitė, 2007), to

different PAHs (Maria et al., 2002; Gravato, Santos, 2002; 2003; Teles et al., 2003), to diesel oil (Pacheco, Santos, 2001). Significantly increased levels of micronuclei, nuclear buds and fragmented-apoptotic cells have been found in bivalves inhabiting the Baltic Sea closely to the Būtingė oil terminal (Baršienė et al., 2006) and in close to the Russian oil platform D-6 (Baršienė et al., 2008). Increased MN levels have been described in zones affected by oil spills (Parry et al., 1997; Harvey et al., 1999; Baršienė et al., 2004, 2006). Environmental genotoxicity and cytotoxicity was studied in different zones of the Baltic and the North Sea by the analysis of MN, NB, FA and BN in blood and kidney erythrocytes of *Platichthys flesus*, *Limanda limanda*, *Gadus morhua* (Rybakovas et al., 2009).

In order to assess geno-cytotoxicity of **oil from the Minija well** (Lithuania), 10-day exposure of freshwater bivalve (*Anodonta anatina*) and perch (*Perca fluviatilis*) to 0.25 ppm, 0.5 ppm and 1 ppm of the crude oil was carried out. Nuclear abnormalities were studied in bivalve gills and perch peripheral blood. The non-parametric Mann-Whitney U-test showed the significant differences in MN induction between mussels or perch from the control groups and those treated with 0.5 ppm. MN levels found in bivalve gills were 2.4-3.5 times, NB levels – 10-25 times higher than in perch blood erythrocytes (Fig. 9). Earlier species-specific pattern in genotoxicity response to crude oil exposure has been shown in bivalve molluscs (Hamoutene et al., 2002) and in fish (Baršienė et al., 2006).

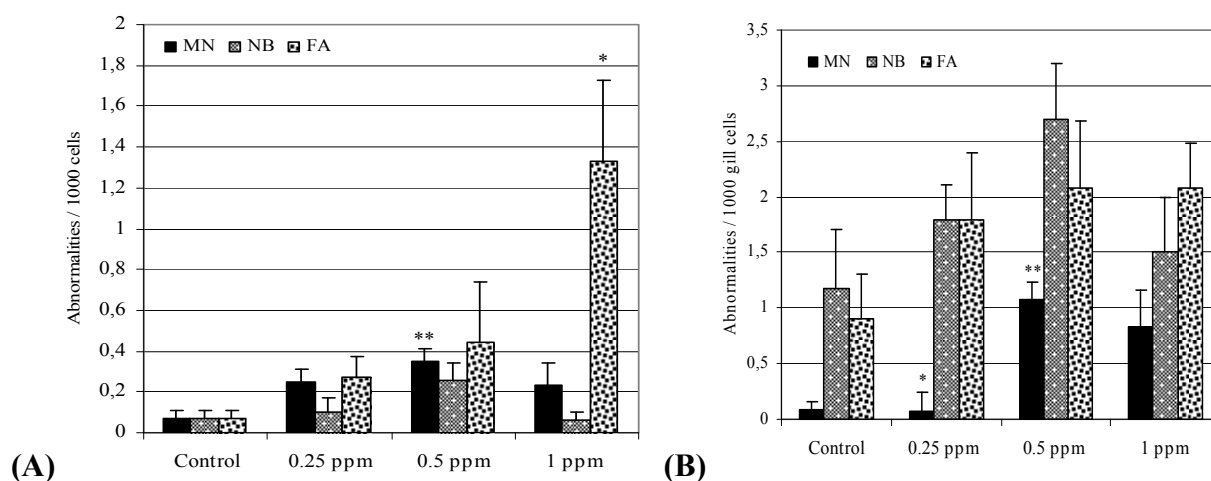


Figure 9. (A) Frequencies of MN, NB and FA erythrocytes in blood of *Perca fluviatilis*; (B) in gill cells of *Anodonta anatina* exposed for 10 days to different concentrations of Minija crude oil (Lithuania).

9 paveikslas. (A) Branduolio pažaidų dažniai paprastojo ešerio (*Perca fluviatilis*) kraujo eritrocituose; (B) antinės geldenės (*Anodonta anatina*) žiaunų ląstelėse 10 dienų veikiant žuvis ir moliuskus skirtingomis Minijos žaliavinės naftos (Lietuva) koncentracijomis.

Genotoxicity and cytotoxicity effects caused by produced water (PW). Produced water (PW), discharged from oil and gas platforms contains oil-derived substances such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), alkylphenols (APs), and metals. It is known that certain compounds are geno-cytotoxic to aquatic organisms. Significantly increased levels of micronuclei were detected in mussels and cod deployed in 500 meters from the platform, compared to the reference site (Hylland et al., 2008). The induction of

genotoxicity after exposure to PW from the North Sea oil platform has been described earlier. The highest frequencies of MN were detected in the kidney and peripheral blood erythrocytes of cod exposed to 1:200 PW and 2000 ng/l of C4–C7 mixture (Bagni et al., 2005).

In the present study, geno-cytotoxicity of produced water, different mixtures of alkylphenols, alkylphenols, crude oil and PAH mixture (0.2 ppm oil+spike), 0.2 ppm of crude oil from the Oseberg C oil platform was analyzed in kidney and liver erythrocytes of *G. morhua*. In cod liver erythrocytes frequency of MN ranged from 0.13‰ (in control group) to 0.63‰ after treatment to 9AF mixture. 3.7-fold higher induction of MN was in liver erythrocytes of cod exposed to 2000 ng/l of 4AP mixture and 1:200 of PW (Fig. 10).

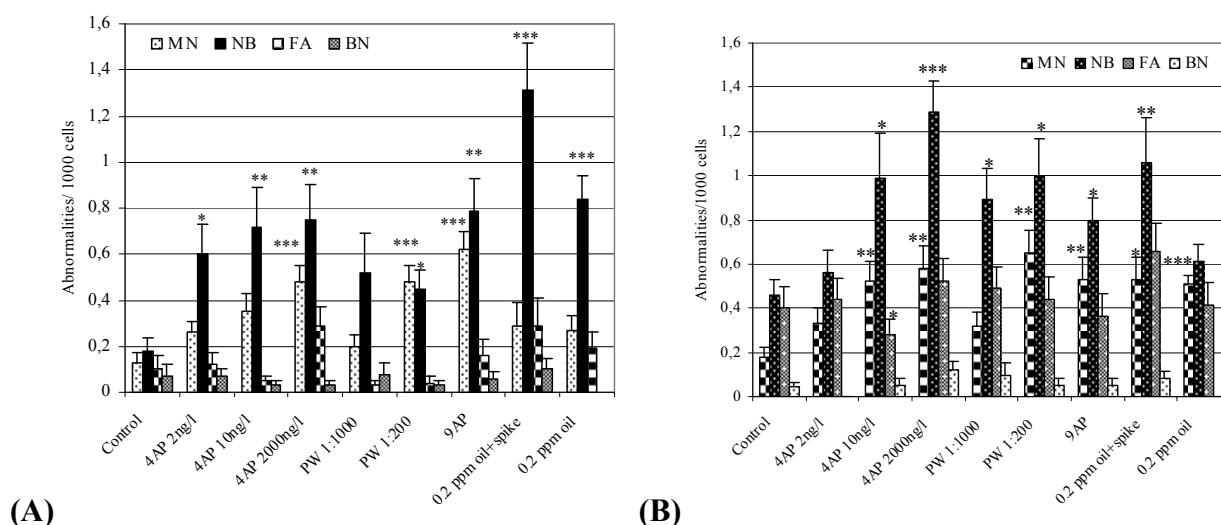


Figure 10. (A) Frequencies of nuclear abnormalities in liver and (B) kidney erythrocytes of *G. morhua* exposed for 2 weeks to PW 1:1000 and PW 1:200, different concentrations of 4AP mixtures, 9 alkylphenol mixture (9AP), crude oil and spike (AP+PAH) and 0.2 ppm of Oseberg C crude oil.

10 paveikslas. (A) Branduolio pažaidų dažniai Atlantinių menkių kepenų ir (B) inkstų eritrocituose, 2 savaites veikiant menkes skirtingomis Oseberg C platformos gamybinių vandenių, 4AF mišinio koncentracijomis, 9AF bei ŽN+AF+PAA mišiniu, taip pat žaliavinės naftos 0,2 ppm koncentracija.

In all treated groups the frequencies of NB were 2-4 folds higher than MN. The highest induction of NB (1.31‰) was observed in fish exposed to 0.2 ppm oil+spike, it was 7.3-fold higher than in control group. Statistically significant differences of MN were in fish exposed to 10 and 2000 ng/l concentrations of 4AP mixture (P=0.0084 and P=0.0015), 9AP mixture (P=0.0087), 0.2 ppm oil+spike mixture (P=0.0105), 0.2 ppm oil (P=0.0002) and 1:200 of PW (P=0.0014), compared to control. The frequencies of NB in most exposure groups were statistically different (P ranged from 0.0236 to 0.0003) compared to control group, except groups exposed to 0.2 ppm oil and 2 ng/l of 4AP mixture. In kidney erythrocytes of *G. morhua*, MN ranged from 0.18‰ in control group to 0.65‰ in those exposed to 1:200 of PW, NB – from 0.46‰ (control) to 1.29‰ (2000 ng/l of AP) (Fig. 10).

Tissue-specific differences were observed in liver and kidney erythrocytes of *G. morhua*. MN and FA cells induction was higher in the kidney erythrocytes; meanwhile, the inductions of NB were similar in both analyzed tissues (Fig. 11). The highest frequency of FA erythrocytes was found in fish kidney after exposure to PW 1:1000 and it was 16.5-folds higher than frequency observed in liver erythrocytes. After treatment to PW 1:200, the frequency of FA cells was 10-folds higher in kidney erythrocytes than in liver ones. It should be emphasized that the frequencies of nuclear buds were higher (up to 4.5-fold) than MN incidences in all cod groups exposed to three different concentrations of 4AP mixtures, 9AP and to mixture of 0.2 ppm oil+spike, as well as to used dilutions of PW. Shimizu et al. (1998, 2000) showed that amplified DNA is localized selectively to specific sites at the periphery of the nucleus and can be eliminated via the nuclear budding process. Therefore, the formation of nuclear buds may indicate clastogenic action of agent and capacity of organisms to expel damaged DNA and non-telomeric or non-centromeric, chromosome fragments from the nucleus (Lindberg et al., 2007). Hereby, exceptionally high induction of nuclear buds in Atlantic cod treated with Oseberg C produced water or PW components present evidence on clastogenic compounds existing in the PW. Comparatively high induction of MN evidently appeared under the action of aneugenic and clastogenic compounds in the PW. The induction of MN and the absence of nuclear buds in fish have been suspected as a result of aneugenic agent action. The correlation between MN and nuclear buds induction has been identified as the result of agent clastogenicity (Cavas, 2008). Differences were occurred in cod responses to PW exposure, which could arise as a result activity of PAH metabolic reactions in cod kidney and liver. In kidney of flounder, unexpectedly high of 2- and 3-ring PAH metabolites have been detected, and consequently was pointed on importance of kidney in PAH's metabolism (Kreistberg, Tuvikene, 2009).

Exposure of fish to heavy metals (HM) was carried out considering HM presence in crude oil and PW of oil platforms. After exposure to model mixture of heavy metals (Vosylieniè, Jankaitè, 2006), the highest induction of micronuclei in blood erythrocytes of *Oncorhynchus mykiss* was found in the fish treated with the highest concentration (21.79%) and it was 4.3-fold increased compared to the control group of fish (Fig. 11). A 3.4-fold elevation of MN level was detected after exposure of fish to the 10.89%. A statistically significant increase in MN frequency was observed in the rainbow trout after exposure to 21.79% (P=0.0147) and 10.89% (P=0.0068). Comparatively low levels of NB were identified only in the groups treated with 21.79% (0.10‰) and 5.45% (0.14‰). There was very low induction of FA erythrocytes in blood of certain *O. mykiss* specimens. Induction of MN by heavy metals is likely related to the accumulation of free DNA - damaging radicals or simultaneously to clastogenic and aneugenic actions in aquatic organisms (Nepomuceno et al., 1997).

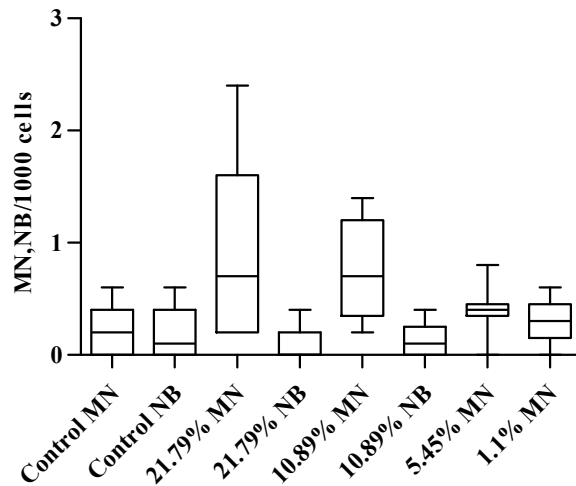


Figure 11. Frequencies of MN and NB in blood erythrocytes of *Oncorhynchus mykiss* exposed for 14 days to different concentrations of heavy metal mixture. Shown are max, min, in box – 25 percentile, average values and 75 percentile.

11 paveikslas. MB ir BP dažniai vaivorykštinio upėtakio (*Oncorhynchus mykiss*) kraujo eritrocituose, 14 dienų veikiant žuvis skirtingomis sunkiųjų metalų koncentracijomis.

In the other experimental treatment using 4-day exposure of Zn+Cu mixture, MN frequency in blood erythrocytes of rainbow trout varied from 0.27‰ in control group to 1.40‰ in the fish treated with a mixture of 0.25 mg/l. In fish, treated with a mixture of 0.125 mg/l, 2-fold increase of micronuclei was found compared to the control level. Statistically significant increase of MN frequencies was found only in fish exposed to the highest concentration of the Zn+Cu mixture. 4-day depuration resulted in slight decrease of MN frequency in fish group exposed to 0.25 mg/l (Fig. 12). After 4-day depuration, significantly increased MN frequencies remained in erythrocytes of fish, previously exposed to Zn and Cu mixture consisting of 0.125 and 0.06 mg/l concentrations. Further post-treatment depuration during 8 days, fish recovery reached maximum level, but after 12-day depuration, the levels of MN were increased significantly again. Whilst, One way ANOVA analysis with post Tukey test showed significant differences in MN values between exposure and recovery groups of the rainbow trout ($P < 0.0001$, $F = 8.010$). The values of nuclear buds (NB) were rather lower than the frequency of micronuclei in all exposed and control groups of rainbow trout (Fig. 12).

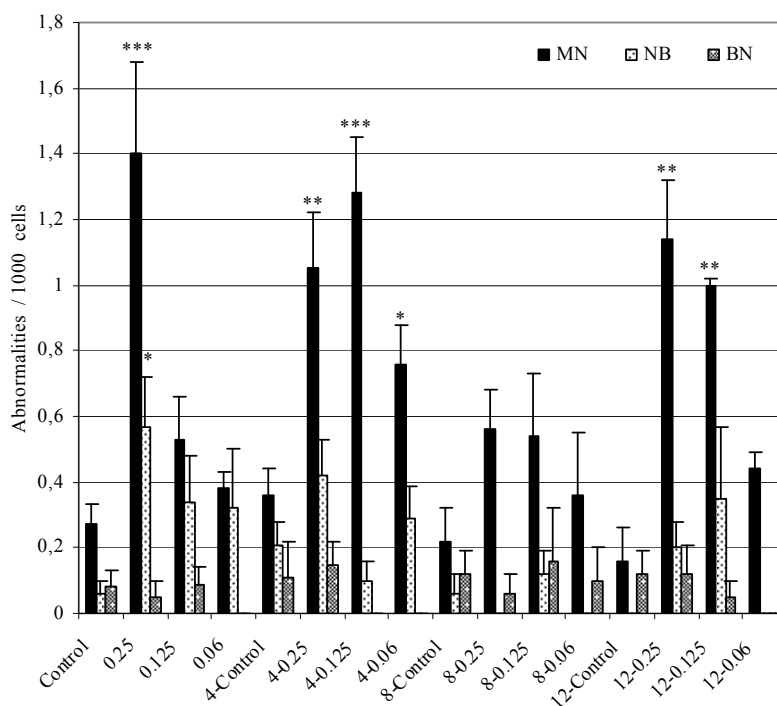


Figure 12. Frequencies of MN, NB and BN erythrocytes in blood of *O. mykiss* exposed for 4 days to different concentrations of Zn and Cu mixture and after 4, 8 and 12 days recovery.

12 paveikslas. Branduolio pažeidimų dažniai vaivorykštinio upėtakio kraujo eritrocituose, po 4 dienų poveikio Zn ir Cu skirtingomis koncentracijomis, bei 4, 8 ir 12 dienų atsistatymo laikant žuvis švariame vandenyje.

The non-parametric Mann-Whitney U-test showed statistically significant increase of NB in blood erythrocytes of rainbow trout after 4-day exposure to Zn and Cu 0.25 mg/l compared to the control level ($P=0.0110$). Cytotoxicity parameters (FA and BN cells) were at very low levels. Summing up the results on geno-cytotoxicity in both HM exposures, can be stated, that used experimental heavy metal mixtures did not induce cytotoxicity at all. Only the induction of MN was at statistically significant level, while NB induction in general was low. The absence of nuclear buds (NB) in fish has been suspected as a result of aneugenic agent action, the correlation between MN and NB induction – the result of agent clastogenicity (Strunjak-Perovic et al., 2003; Cavas, 2008). There are many studies describing the genotoxicity effects of heavy metals in fish under laboratory and field conditions (de Lemos et al., 2001; Sanchez-Galan et al., 2001; Ferraro et al., 2004; Arkhipchuk, Garanko, 2005; Porto et al., 2005; Ergene-Gozukara et al., 2007). Geno-cytotoxicity effects in different fish species after treatment with various concentrations of Cd (Ayllon, Garcia-Vazquez, 2000; Sanchez-Galan et al., 2001; Arkhipchuk, Garanko, 2005; Cavas et al., 2005, 2008), Cu (Arkhipchuk, Garanko, 2005; Bopp et al., 2008; Oliveira et al., 2008), Hg (Sanchez-Galan et al., 2001; Cavas, 2008), Cr (Cavas et al., 2005) and Pb (Cavas, 2008) have been previously described.

CONCLUSIONS

1. The caging of *Mytilus edulis* and *Gadus morhua* in the Statfjord B oil platform zones (the North Sea) revealed the environmental geno-cytotoxicity gradient reliant on the distance 500 m > 1000 m > 10000 m to the source of pollution.
2. In the North Sea Ekofisk oil platform zones, the highest level of environmental genotoxicity and cytotoxicity was evaluated in *M. edulis*, which were caged closest to the produced water discharges. Significant differences of nuclear abnormalities were detected in mussels caged in 600 m SW (P=0.0014), 1100 m NE (P=0.0076) and 1600 m SW (P=0.0437) distance from the oil platform.
3. Induction of micronuclei (MN) was detected in gill cells of the blue mussels also in turbot blood and kidney erythrocytes after treatment with Statfjord B 0.5 ppm crude oil under laboratory conditions. While treatment with Statfjord B 0.5 ppm crude oil+spike (PAH+AP) mixture induced statistically significant increase of frequency of micronuclei in gill cells of *M. edulis*, blood and kidney erythrocytes of *Scophthalmus maximus* and kidney erythrocytes of *G. morhua*. Statistically significant differences of nuclear buds (NB) and fragmented-apoptotic (FA) cells were detected in mussels, bi-nucleated (BN) and fragmented-apoptotic erythrocytes in turbot kidney and nuclear buds in turbot blood erythrocytes.
4. Time-related MN frequency gradient: control < 1-, 2-, 4-, 8-day exposure was found in gill cells of *M. edulis*, treated with Statfjord B 0.5 ppm crude oil. Significant induction of FA was determined after 4-day, BN – after 8-day exposure to the crude oil.
5. After 4 and 8 weeks exposure of turbot to different concentrations of arctic oil, the highest induction of genotoxicity was found in liver erythrocytes after 4-week, whilst cytotoxicity – after 8-week treatment. After 4-week exposure, an extensive induction of different types of nuclear buds and bi-nucleated erythrocytes with nucleoplasmic bridge was found.
6. Exposure to 0.5 ppm Statfjord B oil platform and to 0.5 ppm oil+spike mixture revealed interspecific differences in genotoxicity responses. MN induction in mussels was 4-fold higher than in turbot blood and 10-fold higher than in Atlantic cod blood. NB incidences in gill cells of *M. edulis* were 4-times higher than in turbot blood and 7.5-times higher than in turbot kidney erythrocytes.
7. The geno-cytotoxicity analysis of produced water, different mixtures of alkylphenols, alkylphenols, crude oil and PAH mixture (0.2 ppm oil+spike), 0.2 ppm of crude oil from the Oseberg C oil platform revealed exceptionally high induction of nuclear buds (up to 4.5-fold higher than MN). The frequencies of NB and MN were significantly elevated in most of exposed groups (P range from 0.01

to $P < 0.0001$) compared to control group. No significant induction of cytotoxicity was found.

Statistically significant tissue-specific differences of MN frequencies were observed in liver and kidney erythrocytes of *G. morhua* treated with Oseberg C 0.2 ppm crude oil, and 0.2 ppm oil+spike. The induction of MN and FA cells was higher in cod kidney erythrocytes; meanwhile, the level NB was similar in both analyzed tissues.

8. Experimental heavy metal model mixtures induced genotoxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) blood erythrocytes, but the induction of cytotoxicity was not observed.

IVADAS

Darbo aktualumas. Nepaisant naujų technologijų įdiegimo intensyviai besivystančioje naftos pramonėje, į vandens ekosistemas vis dar patenka dideli kiekiai žaliavinės naftos bei naftos išgavimo technologinių procesų metu susidarančių teršalų, savo sudėtyje turinčių įvairų spektrą organinių rūgščių, angliavandenilių, fenolių, sunkiųjų metalų, sulfatinių ir azoto junginių, radionuklidų. Vien 2007 metais į jūrinę aplinką pateko apie 20000 tonų gavybos metu išgaunamos naftos (GESAMP, 2007), o į Šiaurės jūrą Norvegijos teritorijoje buvo išleista apie 162 milijonai m³ gamybinio vandens (OLF, 2008).

Daugelis naftos pramonės teršalų pasižymi genotoksiniu vandens organizmams poveikiu (Gorbi et al., 2009; Nahrgang et al., 2009). Taršos agentams sąveikaujant su organizmų genetinė medžiaga formuojasi įvairūs pažeidimai, kurie dažnai yra negrįžtami, paveldimi ir gali įtakoti populiacijų ir genetinės įvairovės struktūrinius pokyčius (Johnsen et al., 2000; Belfiore et al., 2001; Jha, 2004). Norint įvertinti aplinkos teršalų neigiamą poveikį vandens ekosistemoms *in situ* pastaraisiais metais vis dažniau taikoma vandens organizmų laikymo varžose technika (Bolognesi et al., 2004; Aarab et al., 2008; Bocchetti et al., 2008; Klobučar et al., 2008). Vertinat genotoksinį naftos taršos poveikį hidrobiontams gan dažnai naudojama mikrobranduolių bei kitų branduolio pažaidų analizė, kurios rezultatai koreliuoja ir su kitais biologiniais žymenimis (Lehtonen et al., 2006). Literatūroje yra duomenų apie naftos taršos indukuotą genetinį poveikį vandens organizmams gyvenantiems naftos platformų aplinkoje ar po naftos avarinių išsiliejimų (Baršienė, 2002; Bolognesi et al., 2004, 2006a; Laffon et al., 2006; Baršienė et al., 2006a; Hylland et al., 2008; Rybakovas et al., 2009).

Naftos pramonės teršalai yra sudaryti iš įvairių skirtingomis cheminėmis savybėmis pasižyminčių junginių ir aplinkoje pasklidę kompleksinių mišinių pavidalu. Norint įvertinti atskirų naftos komponentų žalingą poveikį organizmams tikslinga atlikti eksperimentinius tyrimus. Šiame darbe analizuojant naftos pramonės teršalų genotoksinį ir citotoksinį poveikį, mikrobranduolių bei kitų branduolio pažaidų susiformavimas buvo nagrinėtas vandens organizmuose po poveikio iš įvairių jūrinių platformų išgaunama žaliavine nafta, skirtingais gamybinių vandenų atskiedimais, įvairių poliaromatinių angliavandenilių ir alkilfenolių bei sunkiųjų metalų mišiniais laboratorinėmis sąlygomis. Įvertintas Šiaurės jūroje esančių Statfjord B ir Ekofisk naftos platformų aplinkos genotoksiškumas ir citotoksiškumas *in situ*. Šiuose tyrimuose nagrinėtų citogenetinių pažaidų analizė yra jautrus ir informatyvus metodas vertinant biologinį aplinkos teršalų poveikį vandens organizmų ląstelėse, tiek lauko, tiek ir laboratorinėmis sąlygomis (Dixon et al., 2002).

Darbo tikslas ir uždaviniai:

Pagrindinis šio darbo tikslas – ištirti skirtingose naftos platformose išgaunamos žaliavinės naftos bei naftos išgavimo technologiniuose procesuose į aplinką patenkančių teršalų genotoksinį ir citotoksinį poveikį žuvų ir moliuskų ląstelėse.

Darbo uždaviniai:

- Taikant aktyvaus monitoringo principus Šiaurės jūros naftos platformų aplinkoje bei Karmsund fjordų sistemoje nustatyti genotoksinių (pagal mikrobranduolių ir branduolio pumpurų dažnius) ir citotoksinių (pagal fragmentuotų-apoptozinių ir

dvibranduolių ląstelių dažnius) pažaidų lygį valgomųjų midijų (*Mytilus edulis*) žiaunų ląstelėse ir Atlantinių menkių (*Gadus morhua*) eritrocituose.

- Eksperimentinių tyrimų pagalba nustatyti įvairiose Šiaurės ir Barenco jūrų naftos platformose, taip pat Lietuvos Minijos naftos gręžinyje išgaunamos žaliavinės naftos indukuotą branduolio pažaidų lygį skirtingose žuvų ir moliuskų rūšyse.
- Nustatyti pagrindinių naftos pramonės teršalų genotoksinio ir citotoksinio poveikio ypatumus moliuskuose ir žuvyse.
- Įvertinti naftos pramonės teršalų genotoksinio ir citotoksinio efektų pobūdį skirtinguose žuvų audiniuose.

Darbo naujumas:

Pirmą kartą kompleksiskai lauko ir laboratorinėmis sąlygomis buvo įvertintas naftos pramonės teršalų genotoksinis ir citotoksinis poveikis įvairių žuvų ir moliuskų ląstelėse. Aplinkos genotoksiškumas nagrinėtas pagal mikrobranduolių (MB) ir branduolio pumpurų (BP) susiformavimą, o aplinkos citotoksiškumas buvo tiriamas nustatant fragmentuotų-apoptozinių (FA) ir dvibranduolių (DB) ląstelių dažnius midijų *Mytilus edulis* žiaunų ir hemolimfos ląstelėse, bei įvairių žuvų rūšių kraujo, kepenų ir inkstų eritrocituose. Atliekant šiuos tyrimus pirmą kartą nustatyta:

- Genotoksinis ir citotoksinis Šiaurės jūros Statfjord B ir Ekofisk naftos platformų bei Karmsund fjordų taršos poveikis midijoms ir Atlantinėms menkėms *in situ* taikant aktyvaus monitoringo principus;
- Mikrobranduolių indukcijos midijų *Mytilus edulis* žiaunų ląstelėse ypatumai, atsirandantys laikant šiuos dvigeldžius moliuskus Šiaurės jūros Statfjord B naftos platformos išleidžiamų gamybinių vandenių įtakos zonose;
- Genotoksinis ir citotoksinis skirtingose Šiaurės jūros naftos platformose išgaunamos žaliavinės naftos poveikis žuvims ir moliuskams vykdant eksperimentinius tyrimus;
- Branduolio pažaidų susiformavimo tendencijos veikiant paprastuosius otus (*Scophthalmus maximus*) Barenco jūroje išgaunama arktine žaliavine nafta;
- Mikroorganizmų įtaka genotoksinio ir citotoksinio poveikio susidarymui midijų žiaunų ląstelėse;
- Genotoksinis ir citotoksinis Šiaurės jūros Oseberg C naftos platformoje produkuojamo gamybinio vandens, žaliavinės naftos, įvairių alkilfenolių koncentracijų, alkilfenolių ir poliaromatinių angliavandenilių mišinio poveikis žuvims laboratorinėmis sąlygomis;
- Tarprūšiniai genotoksinio ir citotoksinio poveikio ypatumai midijose, otuose, menkėse bei antinėse geldenėse (*Anodonta anatina*) ir paprastuose europiniuose ešeriuose (*Perca fluviatilis*) veikiant žaliavine nafta;
- Genotoksinio ir citotoksinio naftos teršalų poveikio ypatumai skirtinguose jūrinių žuvų audiniuose;
- Modelinių sunkiųjų metalų mišinių genotoksinis ir citotoksinis poveikis vaivorykštiniams upėtakiams (*Oncorhynchus mykiss*).

Mokslinė ir praktinė tyrimų reikšmė:

Šio darbo tyrimų rezultatai suteikia esminės informacijos apie Šiaurės jūroje veikiančių naftos platformų (Statfjord B ir Ekofisk) bei Karmsund fjordų zonoje išleidžiamų teršalų genotoksinį ir citotoksinį poveikį midijoms ir Atlantinėms menkėms

in situ. Eksperimentinėmis sąlygomis nustatyti Šiaurės ir Barenco jūrose bei Minijos gręžinyje išgaunamos žaliavinės naftos bei kitų pagrindinių naftos pramonės taršos agentų genotoksinio ir citotoksinio poveikio dėsningumai įvairių moliuskų ir žuvų ląstelėse. Nustatyta priklausomybė nuo žaliavinės naftos poveikio laiko, koncentracijos, organizmų rūšies bei audinio. Moliuskų ląstelėse nustatytas susiformavusių branduolio pažaidų lygis buvo kelis kartus aukštesnis negu tirtų žuvų rūšių ląstelėse. Gauti tyrimų rezultatai parodė, kad moliuskai yra jautresni naftos pramonės išleidžiamų ir genotoksinėmis savybėmis pasižyminčių teršalų poveikiui, taigi, *M. edulis* turėtų būti naudojama kaip bioindikatorinė rūšis vykdant naftos platformų taršos monitoringą. Šiame darbe naudoti teršalų genotoksiškumą ir citotoksiškumą apibūdinantys parametrai yra tinkami įvertinant naftos pramonės teršalų (poliaromatinių angliavandenilių, alkilfenolių, sunkiųjų metalų) aneugeninius ir klastogeninius efektus hidrobiontų ląstelėse. Dalyvaujant įvairiose Norvegijos mokslo tarybos ir naftos kompanijų užsakomuosiuose projektuose gauti duomenys apie Šiaurės ir Barenco jūros naftos platformose išmetamų teršalų genotoksinį ir citotoksinį poveikį buvo naudojami kaip pagrindas aplinkos taršos ekologinės rizikos vertinimui, naftos platformų technologinių procesų tobulinimui. Darbe aprašyti metodai gali būti sėkmingai naudojami kaip ankstyvieji biožymenys įvairių avarijų (naftos, kenksmingų cheminių junginių išsipylikimo atvejais) poveikio aplinkai vertinimuose. Be to, atlikti eksperimentiniai naftos pramonės taršos genetinių pasekmių įvertinimai turi didelę reikšmę tiek nustatant įvairių taršos komponentų genetinę riziką jūrinių naftos platformų zonose, tiek išryškinant taršos citogenetinio poveikio svarbą bei naftos taršos genotoksiškumo dėsningumus *in situ*. Praktinę šio darbo reikšmę sudaro ir tai, kad aprašyta mikroorganizmų infekcijos įtaka genotoksiškumo ir citotoksiškumo susiformavimui, kas parodo būtinybę vertinti biologinių stresorių efektus vykdant eksperimentinius bei ekotoksikologinius *in situ* tyrimus.

Ginamieji teiginiai:

- Mikrobranduolių ir kitų branduolio pažaidų tyrimo metodai gali būti taikomi aktyvaus aplinkos monitoringo programose vertinant genotoksinį ir citotoksinį taršos poveikį vandens organizmams *in situ* bei nustatant eko-genotoksikologinę riziką jūrinių naftos platformų zonose.
- Skirtingose Šiaurės ir Barenco jūrų naftos platformose išgaunama žaliavinė nafta, taip pat kiti technologiniuose procesuose susidarantys teršalai pasižymi genotoksinėmis ir citotoksinėmis savybėmis.
- Genotoksinis ir citotoksinis žaliavinės naftos poveikis priklauso nuo koncentracijos, poveikio laiko, tyrimuose naudojamų bioindikatorinių organizmų rūšies bei tiriamo audinio.
- Moliuskai žymiai jautriau nei žuvis atspindi genotoksinį ir citotoksinį naftos platformose technogeninių procesų metu susidarantių teršalų bei žaliavinės naftos poveikį.

Rezultatų aprobavimas ir publikacijos. Šio darbo rezultatai paskelbti 9 straipsniuose Lietuvos ir užsienio moksliniuose recenzuojamuose žurnaluose. Disertacijos tema skaityti 10 pranešimų, regioninėse ir tarptautinėse konferencijose bei simpoziumuose. 7-ojoje Lietuvos jaunųjų hidroekologų konferencijoje „Vandens ekosistemų įvairovė, funkcionavimas ir kaita“ (Anykščiai, 2005), 3-ojoje tarptautinėje

konferencijoje „Metalai aplinkoje“ (Vilnius, 2006), 2-oje Regioninėje konferencijoje „Baltijos jūros regiono vandens ekosistemų bioįvairovė ir funkcionavimas“ (Klaipėda, 2006), Pasaulio malakologijos kongrese (Antverpenas, 2007), ICES kasmetinėje mokslinėje konferencijoje (Helsinkis, 2007), 10-ojoje Lietuvos jaunųjų hidroekologų konferencijoje „Vandens ekosistemų įvairovė, funkcionavimas ir kaita“ (Molėtai, 2007), mokslinėje – praktinėje konferencijoje „Jūros ir krantų tyrimai“ (Palanga, 2008); tarptautiniame seminare „Rizikos analizė ir aplinkosauga Baltijos jūros regione“ (Vilnius, 2008), tarptautiniame jūrose paskandintų cheminių ginklų problemai skirtame seminare „Perspektyvos ir tarptautinis bendradarbiavimas“ (Vilnius, 2008), Jungtinės Baltijos jūros mokslinių tyrimų programos „BONUS“ metinė konferencija (Vilnius, 2010).

Disertacijos struktūra. Disertacijos rankraštį sudaro šie skyriai: įvadas, literatūros apžvalga, medžiaga ir metodai, tyrimų rezultatai, rezultatų aptarimas, išvados, literatūros sąrašas, paskelbtų darbų sąrašas. Disertacijos medžiaga ir rezultatai pateikti 172 puslapiuose. Tekste pateikti 23 paveikslai ir 10 lentelių. Literatūros sąrašas 440 šaltiniai, autoriaus publikacijų sąrašas 9 publikacijos.

LITERATŪROS APŽVALGA

Šiame skyriuje analizuojama vandens ekosistemų tarša naftos junginiais (poliaromatiniais angliavandeniliais (PAA), alkilfenoliais (AF), sunkiaisiais metalais), apibūdinama tarša Šiaurės jūros naftos platformų aplinkoje didesnę dėmesį skiriant naftos išgavimo metu susidarantiems gamybiniams vandenims ir jų cheminei sudėčiai. Apžvelgti naftos pramonės taršos pagrindinių komponentų (PAA, AF ir sunkiųjų metalų) biotransformacija ir bioakumuliacija žuvyse ir moliuskuose, taip pat jų biologinis poveikis bei dažniausiai naudojami poveikio biožymenys. Pateikiami literatūros duomenys apie tyrimuose naudotą mikrobranduolių ir kitų branduolio pažaidų susiformavimą moliuskuose bei žuvyse. Trumpai aprašomi kiti genetiniai metodai bei vandens ekosistemų genotoksiškumo tyrimuose naudojami bioindikatoriai.

MEDŽIAGA IR METODAI

Aplinkos genotoksiškumo ir citotoksiškumo (geno-citotoksiškumo) tyrimai buvo atlikti Statfjord B ir Ekofisk naftos platformų zonose taikant aktyvaus monitoringo principus. Statfjord ir Ekofisk yra ne tik seniausiai atrasti, ilgiausiai eksploatuojami, bet ir didžiausi naftos telkiniai Norvegijos ekonominėje zonoje. Geno-citotoksinis iš šių platformų pasklindančių teršalų poveikis vertintas *M. edulis* hemocituose ir *G. morhua* kepenų eritrocituose. Išvengiant organizmų adaptacijų prie chroniškai iš naftos gręžinių teršiamos aplinkos, tyrimuose naudotas aktyvus monitoringas t.y. organizmų perkėlimas iš švarių vietų į skirtingas naftos platformų zonas, atsižvelgiant į vandens sroves, naftos platformos artumą bei išleidžiamuosius gamybinius vandenis (**1 lentelė**). Genocitotoksinis pirogeninių poliaromatinių angliavandenilių (PAA) bei sunkiųjų metalų, patenkančių į aplinką dėl intensyvios laivybos ir iš aliuminio gamyklos produkuojamais vandenimis (Bayer et al., 1998) poveikis tirtas midijose Karmsund fjordų sistemoje ties Hogevarde (Šiaurės jūra). *M. edulis* moliuskai buvo surinkti Forlandsfjorden zonoje, ir perkelti į 3 stotis atsižvelgiant į atstumus nuo taršos šaltinio. Kontrolinė grupė perkelta

atgal į Forlandsfjorden zoną, kuri ankstesniuose ekotoksikologiniuose tyrimuose naudota kaip kontrolinė vieta (Baršienė et al., 2004, Baršienė, Andreikėnaitė, 2007).

Iš skirtingų Šiaurės ir Barenco jūrose esančių naftos gręžinių išgaunamos žaliavinės naftos geno-citotoksinių savybių įvertinimui buvo atlikti laboratoriniai tyrimai Stavangerio tarptautinių tyrimų institute (International Research Institute of Stavanger – IRIS), naudojant automatizuotą vandens ir teršalų padavimo sistemą. Minijos gręžinio (Lietuva) žaliavinės naftos ir sunkiųjų metalų geno-citotoksiniis poveikis nagrinėtas žuvyse ir moliuskuose pusiau statinėmis laboratorinėmis sąlygoms Gamtos tyrimų centro Ekologijos instituto Hidrobiontų ekologijos ir fiziologijos laboratorijoje (**2 lentelė**).

Laboratoriniuose eksperimentuose buvo analizuotas Statfjord B ir Oseberg C platformose (Šiaurės jūra), taip pat Barenco jūroje išgaunamos arktinės bei Minijos gręžinio (Lietuva) žaliavinės naftos poveikis. Tiriant geno-citotoksinių Statfjord B naftos platformos poveikį, buvo naudojamas modelinis mišinys iš žaliavinės naftos, alkilfenolių ir PAA (ŽN+AF+PAA), kurio sudėtis sudaryta atsižvelgiant į Statfjord B naftos platformos gamybiniuose vandenyse esančių alkilfenolių sudėtį. PAA mišinio nominali koncentracija buvo 0,0915 µg/l, o alkilfenolių 0,1 µg/l (Sundt et al., 2006).

Tam, kad ištirti Oseberg C platformoje naftos išgavimo technologinių procesų metu susidarantių gamybinių vandenių (GV) bei į jų sudėtį įeinančių alkilfenolių, poliaromatinių angliavandenilių mišinio organizmuose indukuotą efektą geno-citotoksiniis poveikis analizuotas *G. morhua* inkstų ir kepenų eritrocituose. Tuo tikslu buvo sumodeliuoti alkilfenolių bei PAA mišiniai, kurių sudėtis ir kiekis pasirinkta atsižvelgiant į alkilfenolių ir poliaromatinių angliavandenilių koncentracijas randamas Oseberg C naftos gręžinio gamybiniuose vandenyse. Tyrime naudotos 2, 10 ir 2000 ng/l keturių alkilfenolių mišinio (4-tert-butilfenolio, 4-n-pentilfenolio, 4-n-heksilfenolio ir 4-n-heptilfenolio) koncentracijos. Taip pat naudota devynių alkilfenolių (9AF) mišinio 37 µg/l koncentracija, kurio sudėtyje buvo: 2-metilfenolis, 4- metilfenolis, 3,5-dimetilfenolis, 2,4,6-trimetilfenolis, 4-tert-butilfenolis, 4-tert-butil-2-metilfenolis, 4-n-pentilfenolis, 4-n-heksilfenolis ir 4-n-heptilfenolis. PAA mišinys sudarytas iš 21 skirtingo poliaromatinio junginio, bei naudota 12 µg/l koncentracija. Atlantinės menkės buvo veikiamos 0,2 ppm žaliavine nafta ir dvejomis gamybinių vandenių (GV) koncentracijomis (1:200 bei 1:1000), kurios apskaičiuotos imituojant 200 ir 1000 metrų atstumus nuo Oseberg C naftos platformos (**2 lentelė**).

Sunkiųjų metalų geno-citotoksiniis poveikis įvertintas *O. mykiss* kraujo eritrocituose paveikus sumodeliuoto sunkiųjų metalų modelinio mišinio (SMMM), kurio 100 % sudėtį sudarė: Cu 0,874; Zn 0,93; Pb 4,7; Ni 0,66; Cr 0,33 ir Mn 18 mg/l. Eksperimente naudotos 21,79%, 10,89%, 5,45% ir 1,1% SMMM koncentracijos (Vosyliienė, Jankaitė, 2006). Norint įvertinti sunkiųjų metalų geno-citotoksinių poveikį žuvims ir žuvų atsistatymo galimybes buvo atliktas eksperimentas, kurio metu, Zn ir Cu (1:1) mišinio, 0,06; 0,125 bei 0,25 mg/l koncentracijų poveikis įvertintas *O. mykiss* kraujo eritrocituose po 4 dienų veikimu mišiniu ir po 4, 8 ir 12 dienų *O. mykiss* laikymo švariame vandenyje (**2 lentelė**).

Žuvų ir dvigeldžių moliuskų ląstelių preparatų paruošimas ir jų mikroskopinė analizė buvo atliekama pagal anksčiau aprašytas metodikas (Baršienė et al., 2004). Geno-citotoksiniai efektai buvo nagrinėjami Olympus BX 51 mikroskopu, naudojant 1000× padidinimą. Mikrobranduolių ir kitų branduolio pažaidų identifikavimas atliktas pagal Fenech ir bendraautorių (2003) aprašytus kriterijus.

Statistinė duomenų analizė buvo atlikta naudojant PRISM 5.0 statistinį paketą. Apskaičiuotas kiekvienai tyrimų vietai būdingas branduolio pažaidų dažnio vidurkis 1000 ląstelių, nustatytos paklaidos. Dispersinė duomenų analizė atlikta ANOVA testu. Skirtumai tarp grupių buvo įvertinti naudojant neparametrinį Mann-Whitney U-testą.

REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Geno-citotoksinio teršalų poveikio įvertinimas organizmuose taikant aktyvaus monitoringo būdą

M. edulis hemocituose atlikta mikrobranduolių analizė parodė **Statfjord B naftos platformos** aplinkos genotoksiškumo gradientą – 500 m >1000 m >10000 m. Žemiausias mikrobranduolių (MB) dažnis nustatytas moliuskų ląstelėse iki poveikio grupėje (2,13‰) bei laikytuose 10000 m atstumu nuo platformos (2,58‰), o aukščiausias – arčiausiai (500 m) prie Statfjord B naftos platformos laikytų midijų hemocituose (7,66‰). Santykinai aukšta MB indukcija (4,8‰) buvo ir 1000 m atstumu laikytose midijose. Moliuskuose laikytuose 500 ir 1000 metrų atstumu nuo platformos nustatyti statistiškai patikimi MB dažnių skirtumai. Aukščiausias branduolio pumpurų (BP) dažnis (6,31‰) nustatytas midijose laikytose 1000 m atstumu nuo naftos platformos. Didžiausia citotoksiškumo indukcija pagal dvibranduolių (DB) ląstelių susiformavimą nustatytas 500 m atstumu nuo platformos laikytų moliuskų hemocituose (2,78‰). Tokiu būdu nustatyta, kad genotoksiniškas iš šios naftos platformos į aplinką patenkančių teršalų poveikis išplinta iki 1 km atstumu pasroviui, todėl šią zoną galima priskirti prie genetinės rizikos zonų. Tokia pati genotoksiškumo gradiento tendencija nustatyta ir *G. morhua* kepenų eritrocituose. Žemiausia MB (0,14%) ir BP (0,25%) indukcija rasta toliausiai nuo Statfjord B platformos (10000 m) varžose laikytų žuvų eritrocituose (2 pav.). Palaikius eksperimentinius organizmus įvairiose Statfjord B naftos platformos zonose *M. edulis* hemocituose nustatytas 13-19 kartų didesnis MB dažnis ir 2-11 kartų didesnis branduolio pumpurų dažnis negu tirtų menkių kraujo eritrocituose.

Nagrinėjant **Ekofisk naftos platformos** geno-citotoksiniį poveikį (pasroviui ir prieš sroves) *M. edulis* hemocituose, 4,8 karto didesnė MB indukcija nustatyta moliuskuose laikytuose 3 stotyje (5,967‰) ir 3,2 karto – 4 stotyje, palyginus su kontrole (1,24‰). Šios abi stotys buvo išdėstytos arčiausiai Ekofisk naftos platformos išleidėjų (3 pav.). Lyginant su kontroline grupe, nuo 2 iki 2,9 karto daugiau MB registruota hemocituose tų moliuskų grupių, kurios laikytos varžose 1, 2 bei 5 stotyse. Branduolio pumpurų dažnis svyravo nuo 0,68‰ (kontrolinėje grupėje) iki 3,57‰ (midijose laikytose 4 stotyje). Ekofisk naftos platformoje varžose laikytų moliuskų bei jų hemocituose nustatytų fragmentuotų-apoptozinių (FA) ląstelių dažnis kito nuo 0,1‰ (2 stotyje) iki 0,46‰ (5 stotyje) ir 0,36‰ (4 stotyje), kuri buvo arti platformos (4 pav.). Žemiausi DB ląstelių dažniai rasti kontrolinėje (1,28‰) ir labiausiai nutolusioje nuo platformos 6 stotyje (1,44‰). Aukščiausias DB dažnis 4,77‰ rastas 3 stotyje laikytų moliuskų hemocituose.

Aplinkos genotoksiškumo gradientas nustatytas midijų žiaunų ląstelėse, kuomet moliuskai buvo perkelti į skirtingas varžas ir 4 savaites laikyti **Karmsund fjordu sistemoje**, kurioje buvo nustatyti aukšti PAA ir sunkiųjų metalų kiekiai. MB dažniai midijų žiaunų ląstelėse kito nuo 1,40‰ (iki poveikio grupėje) iki 6,33‰ (3 stotyje, kuri buvo pasirinkta arčiausiai teršalų išleidėjo). Žemas MB dažnis taip pat buvo ir kontrolinėje grupėje – 1,8‰. Didžiausias BP (1,4‰) dažnis rastas moliuskų žiaunų

ląstelėse, kurie laikyti 2 stotyje, žemiausias – kontrolinės grupės moliuskuose (0,46%) (4 pav.). Žemas BP (0,75%) ir FA ląstelių (0,87%) dažnis rastas 3 stotyje laikytų moliusku žiaunose.

Ankstesniuose tyrimuose nustatyta, kad Šiaurės jūroje tos pačios Statfjord B (2004 m.) bei Troll B (2003 m.) platformų aplinkoje MB indukcija taip pat buvo priklausoma nuo užterštumo gradiento (Hylland et al., 2008). Padidėjęs aplinkos genotoksiškumo lygis nustatytas ir naftos avarinių išsipylimų vietose (Parry et al., 1997; Harvey et al., 1999; Baršienė, 2002; Baršienė et al., 2004, 2006, 2006; Frenzilli et al., 2004; Bolognesi et al., 2006), laikant moliuskus varžose skirtingose dujų platformų įtakos zonos (Gorbi et al., 2008). Aplinkos taršos gradientas nustatytas *Mytilus galloprovincialis* moliuskuose atliekant vakarinės Viduržemio jūros dalies monitoringą (Magni et al., 2006).

Ekspimentiniai geno-citotoksinio naftos platformų taršos komponentų poveikio tyrimai

Statfjord B naftos platforma. *M. edulis*, *G. morhua* ir *S. maximus* po 3 savaitių poveikio Statfjord B naftos platformoje išgaunamos 0,5 ppm žaliavinės naftos (ŽN) bei 0,5 ppm žaliavinės naftos, alkilfenolių ir poliaromatinių angliavandenilių (ŽN+AF+PAA) mišiniu statistiškai patikima MB indukcija gauta visose tirtose rūšyse. Žemiausios tirtų parametrų vertės rastos *M. edulis* kontrolinėje grupėje, aukščiausios nustatytos po 3 savaitių poveikio 0,5 ppm ŽN+AF+PAA mišiniu. (5 pav.) Naudojant neparametrinį Mann-Whitney U-testą gauti statistiškai patikimi MB ir FA ląstelių dažnio skirtumai tarp kontrolinės ir midijų grupių, kurios buvo veiktos 0,5 ppm ŽN ($P=0,0288$ MB; $P=0,0115$ AF) ir 0,5 ppm ŽN+AF+PAA mišiniu ($P=0,0015$ MB; $P=0,0029$ FA). Patikimai aukštesnis BP dažnis nustatytas *M. edulis* žiaunų ląstelėse po poveikio ŽN+AF+PAA mišiniu ($P=0,0232$). ANOVA dispersinė analizė parodė, kad patikimi skirtumai tarp tirtų midijų grupių buvo pagal MB ($P=0,003$, $F=7,25$, $R^2=0,3494$) ir BP ($P=0,0264$, $F=4,168$, $R^2=0,2359$).

G. morhua žuvyse po 3 savaitių poveikio 0,5 ppm ŽN ir 0,5 ppm ŽN+AF+PAA mišiniu MB indukcija buvo 3,2 karto bei 4,5 karto didesnė inkstų negu kraujo eritrocituose. Mann-Whitney U-testas parodė statistiškai patikimus MB dažnio skirtumus Atlantinių menkių inkstų eritrocituose po poveikio 0,5 ppm ŽN+AF+PAA mišiniu, lyginant su kontrole (5 pav.). *S. maximus* kraujo eritrocituose, po poveikio 0,5 ppm ŽN ir 0,5 ppm ŽN+AF+PAA mišiniu žemiausi MB ir BP dažniai nustatyti kontrolinės grupės žuvyse. Aukščiausi mikrobranduolių dažniai rasti otų kraujo eritrocituose po poveikio ŽN+AF+PAA mišiniu (MB – 0,66%) bei paveikus nonilfenoliu (NF) – 0,54%. Be to, ŽN+AF+PAA mišinys indukavo aukščiausius BP (0,42%) ir DB (0,82%) dažnius. FA ląstelių dažnis buvo labai žemas visose eksperimentinėse otų grupėse (6 pav.). Lyginant su kontrole, statistiškai patikimi MB dažnių skirtumai rasti visose eksperimentinėse grupėse – NF ($P=0,0024$), 0,5 ppm ŽN ($P=0,0054$) ir 0,5 ppm ŽN+AF+PAA mišinys ($P=0,0001$). Branduolio pumpurų indukcija otų kraujo eritrocituose nustatyta tik po poveikio 0,5 ppm ŽN+AF+PAA ($P=0,0172$). Kontrolinės grupės otų **inkstų** eritrocituose visų tirtų branduolio pažaidų dažniai buvo žemiausi: MB (0,29%), BP (0,07%), FA (0,04%) ir DB (0,43%). Didžiausias FA ląstelių lygis inkstų eritrocituose buvo po poveikio ŽN+AF+PAA mišiniu (6 pav.). Statistiškai patikimi MB ir DB inkstų eritrocitų skirtumai, rasti otuose po poveikio NF, 0,5 ppm ŽN bei

ŽN+AF+PAA mišiniu, lyginant su kontrolinės grupės žuvimis. Gauti statistiškai patikimi BP dažniai – veikiant otus 0,5 ppm žaliavine nafta, o FA – paveikus nonilfenoliu bei ŽN+AF+PAA mišiniu. Eksperimentinėse midijų grupėse MB dažnis buvo 4 kartus didesnis negu otų ir net 10 kartų negu menkių kraujo eritrocituose. BP indukcija midijose buvo 4 kartus didesnė negu otų kraujyje ir 7,5 kartų didesnė negu otų inkstuose. Tarprūšiniai organizmų skirtumai nustatyti paveikus midijas, Atlantines menkes, otus ir kitais organiniais teršalais (bisfenoliu A, dialilftalatu bei tetrabromodifenileteriu-47) (Baršienė et al., 2006).

Tiriant Statfjord B naftos platformoje išgaunamos naftos geno-citotoksiškumą, su midijomis buvo atlikti du eksperimentai, kadangi pirmojo metu kontrolinės grupės moliuskų žiaunose buvo nustatyti mikroorganizmai, kurie sąlygojo santykinai didelį atsaką, tad eksperimentas buvo pakartotas. Pirmojo eksperimento duomenys pateikti disertaciniame darbe. Rezultatai tiesiogiai rodo infekcijų sukeltą genotoksinę ir citotoksinę poveikį moliuskuose, kas yra svarbu žinoti atliekant tiek eksperimentinius, tiek ir lauko tyrimus.

Nagrinęjant 0,5 ppm Statfjord B žaliavinės naftos geno-citotoksiškumą *M. edulis* žiaunų ląstelėse po 1-, 2, 4 ir 8 dienų ekspozicijos nustatytas palaipsninis MB ir DB dažnių didėjimas priklausomai nuo poveikio trukmės **kontrolinė gr. < po 1-dienos < po 2-dienų < po 4-dienų < po 8-dienų** (7 pav.). Statistiškai patikimi MB dažnių skirtumai rasti tarp kontrolinės grupės moliuskų ląstelėse nustatytų dažnių bei pirmos (P=0,0185), antros (P=0,0039), ketvirtos (P=0,0068) ir aštuntos dienos (P<0,0001) ekspozicijų. *M. edulis* moliuskų grupių. FA ląstelių indukcija nustatyta po 4 dienų (P=0,0115), o DB – po 8 dienų ekspozicijos (P=0,0232). Tyrimuose naudotos žaliavinės Statfjord B naftos sudėtyje vyravo mažos molekulinės masės PAA (naftalenai sudarė – 87,7%). Disertaciniame darbe pateikiami Statfjord B naftos platformoje išgaunamos žaliavinės naftos PAA sudėtis ir jų kiekiai (Sund et al., 2006).

Arktinės žaliavinės naftos poveikis. Po 4 savaitių poveikio otų kepenų eritrocituose rasta didžiausia MB ir BP indukcija veikiant žuvis 40 ppb naftos koncentracija, tuo tarpu veikiant didesnėmis koncentracijomis (120, 360 ir 720 ppb) registruota genotoksiškumo supresija (8 pav.). Ta pati tendencija gauta analizuojant citotoksinę šios naftos poveikį – didžiausios FA, DB ir DB_t su nukleoplazmine jungtimi (DB_t) reikšmės buvo po poveikio 40 ppb ŽN koncentracija, šiek tiek mažesnės paveikus 120 ppb ir žymiai mažesnės – po poveikio 360 ppb ir 720 ppb (8 pav.). Tačiau po 8 savaitių poveikio aukščiausia BP_s (0,89‰), FA (1,9‰) ir DB_t (1,62‰) indukcija nustatyta otuose po poveikio 360 ppb ŽN (8, 9 pav.). Ryškų geno-citotoksinę Barenco jūroje išgaunamos arktinės naftos poveikį parodė otų kepenų eritrocituose registruotas labai intensyvus įvairių tipų branduolio pumpurų taip pat dvibranduolių eritrocitų su nukleoplazmine jungtimi formavimasis. Tokių branduolio pažaidų nesukėlė Šiaurės jūroje Statfjord B ir Oseberg C platformose bei Minijos grėžinyje išgaunama nafta. Arktinės žaliavinės naftos sudėtyje dar didesnę dalį (90,3%) negu Statfjord B naftoje, sudarė 2 žiedus turintys naftalenai (IRIS duomenys). Naftaleno (0,3; 0,9 ir 2,7 μM) koncentracijos indukuoja aukštus MB bei kitų branduolio pažaidų dažnius ungiurių *Anguilla anguilla* ląstelėse (Teles et al., 2003).

Branduolio pumpurų su nukleoplazmine jungtimi susiformavimo mechanizmai aprašyti Lindberg ir bendraautorių (2007) darbe, kur pabrėžta, kad mikrobranduoliai ir branduolio pumpurai su nukleoplazmine jungtimi susiformuoja ląstelių dalijimosi proceso eigoje ar S fazės metu. Susidarant BP vyksta DNR iš branduolio išstūmimas,

todėl kaip ir mikrobranduoliai, BP atspindi juos sukeliančių agentų genotoksinius efektus. BP indukciją tikslinga yra nagrinėti tiriant taršos genotoksinę poveikį žuvyse, ar kituose vandens organizmuose (Guilherme et al., 2008). Literatūroje yra pateikiami duomenys apie teigiamą koreliaciją tarp MB ir BP indukcijos midijose (Bolognesi et al., 2006; Ergene et al., 2007). Įvairių branduolio pažaidų analizė žuvyse buvo atlikta po poveikio žaliavine nafta (Baršienė et al., 2006), skirtingais PAA junginiais (Maria et al., 2002; Gravato, Santos, 2002, 2003; Teles et al., 2003), naftos distiliacijos produktais (Pacheco, Santos, 2001) bei kitais junginiais (Pacheco, Santos, 1998; Ayllon, Garcia-Vazquez, 2000, 2001; Gravato, Santos, 2002). Vertinat skirtingų Baltijos ir Šiaurės jūrų zonų genotoksiškumą buvo nagrinėjamas MB, BP ir FA ląstelių susiformavimas *Platichthys flesus*, *Limanda limanda*, *Gadus morhua* inkstų ir kraujo eritrocituose (Rybakovas et al., 2009).

Minijos grėžinio žaliavinės naftos poveikis.

Vertinant Lietuvoje išgaunamos naftos skirtingų (0,25; 0,5 ir 1 ppm) koncentracijų geno-citotoksiškumą, *A. anatina* žiaunų ląstelėse nustatytas 2,7-3,5 kartus didesnis MB dažnis ir 10-25 kartų didesnis branduolio pumpurų dažnis negu, kad ešerio *P. fluviatilis* kraujo eritrocituose (9 pav.). Tokie rezultatai gauti dėl biologinių bei fiziologinių tirtų rūšių ypatumų, taršos komponentų kaupimo, transformavimo ir šalinimo žuvyse ir moliuskuose skirtumų (Baršienė et al., 2006).

Naftos platformose susidarančių gamybinių vandenų geno-citotoksiškumas

Su jūrinių naftos ir dujų platformų gamybiniais vandenimis (GV) į aplinką patenka genotoksinėmis savybėmis pasižymintys PAA, alkilfenoliai ir sunkieji metalai. Stipriai užterštose GV Šiaurės jūros zonose aprašytas mikrobranduolių dažnio menkių eritrocituose padidėjimas (Hylland et al., 2006). Aukščiausia MB dažnio indukcija nustatyta menkių inkstų ir kepenų eritrocituose po poveikio GV 1:200, šiek tiek žemesni MB dažniai rasti veikiant C4–C7 alkilintų fenolių mišinio 2000 ng/l koncentracija (Bagni et al., 2005). Šiame darbe tiriant geno-citotoksinę Oseberg C naftos platformos GV ir atskirų jo komponentų poveikį menkės kepenų eritrocituose nustatyta, kad MB dažnis kito nuo 0,13‰ kontrolinėje grupėje iki 0,63‰ paveikus žuvis 9AF mišiniu, kas sudarė 4,8 karto daugiau nei kontrolėje. 3,7 karto aukštesni MB dažniai rasti po poveikio didžiausia (2000 ng/l) 4AF mišinio bei GV (1:200) koncentracija (10 pav.).

Didžiausia BP indukcija (1,31‰) Atlantinių menkių kepenų eritrocituose rasta paveikus žuvis (ŽN+9AF+PAA) mišiniu, kuri buvo 7,3 karto didesnė nei kontrolinėje žuvų grupėje (10 pav.). Citotoksinis poveikis, ir ypač dvibranduolių eritrocitų dažnis visose tirtose menkių grupėse buvo gan žemas. Statistiškai patikimi MB dažnių skirtumai inkstų eritrocituose gauti žuvų grupėse veiktose 4AF mišinio 10 ng/l ir 2000 ng/l koncentracijomis (P=0,0084 ir P=0,0015), 9AF (P=0,0087), ŽN+9AF+PAA (P=0,0105) bei 0,2 ppm ŽN (P=0,0002) ir GV (1:200) koncentracija (P=0,0014), lyginat su kontrolinės grupės menkėmis. BP dažniai patikimai skyrėsi tarp kontrolės ir visų eksperimentinių grupių (P reikšmės kito nuo 0,0236 iki 0,0003) išskyrus 0,2 ppm naftos ir 4AF 2 ng/l koncentracijos grupes, FA ląstelių – po poveikio 4AF mišinio 10 ng/l koncentracija (P=0,4045). Atlantinių menkių inkstų eritrocituose MB dažnis svyravo nuo 0,18‰ kontrolėje iki 0,65‰ paveikus GV 1:200, BP – nuo 0,46‰ kontrolėje iki 1,29 ‰ paveikus 4AF mišinio 2000 ng/l koncentracija. FA ir DB indukcija daugumoje menkių grupių buvo labai maža (10 pav.). Lyginant branduolio pažaidų lygius Atlantinių menkių

inkstų ir kepenų eritrocituose išryškėjo, kad MB ir FA indukcija yra didesnė inkstuose negu kepenyse. Abejuose audiniuose rasta labai nedaug dvibranduolių ląstelių ir maždaug vienodas BP dažnis. Didžiausi FA eritrocitų indukcijos skirtumai tarp audinių rasti po poveikio GV 1:1000, kur FA dažnis inkstuose buvo 16,5 karto didesnis nei kepenyse, o paveikus GV 1:200, šis skirtumas siekė 10 kartų.

Pabrėžtina tai, kad visose eksperimentinėse grupėse branduolio pumpurų buvo 2-4 kartus daugiau negu mikrobranduolių tose pačiose menkių grupėse. Yra žinoma, kad branduolio pumpurai susiformuoja iš branduolio šalinamos amplifikuotos DNR (Shimizu et al., 1998, 2000), ar vykstant pažeistos DNR reparacijai (Haaf et al., 1999). Aneugeninių junginiai sukelia didelę MB ir nesukelia BP indukcijos, o klastogeniniai junginiai iššaukia MB ir kitų branduolio pažeidimų indukciją (Cavas, 2008). Mūsų tyrimuose nustatyta, kad Oseberg C naftos platformos gamybiniai vandenys, ir modeliniai alkilfenolių mišiniai sukelia ypač didelę branduolio pumpurų indukciją. Gautus duomenis galima būtų paaiškinti tuo, kad Oseberg C naftos platformos gamybiniuose vandenyse yra gausu klastogeninius efektus sukeliančių junginių.

Genotoksinis ir citotoksinis sunkiųjų metalų poveikis

Technologinių procesų metu iš jūrinių naftos platformų į aplinką patenka įvairūs sunkieji metalai, dažniausiai kartu su gamybiniais vandenimis ir nafta. Vertinat sunkiųjų metalų įtaką geno-ekotoksikologinės rizikos susidaryme naftos platformų aplinkoje, šiame darbe buvo nagrinėtas sunkiųjų metalų modelinių mišinių (SMMM) geno-citotoksinis poveikis žuvisms. Modelinio mišinio, kurio 100% sudarė – Cu 0,874 mg/l; Zn 0,93 mg/l; Pb 4,7 mg/l; Ni 0,66 mg/l; Cr 0,33 mg/l ir Mn 18 mg/l, naudotos 21,79% ir 10,89% koncentracijos (Vosyliene, Jankaitė, 2006) indukavo statistiškai patikimą MB dažnio padidėjimą vaivorykštinio upėtakio kraujo eritrocituose, tačiau BP, DB ir FA indukcijos nesukėlė (11 pav.). Lyginant su kontroline grupe, 4,3 karto aukštesnis MB dažnis nustatytas veikiant žuvis 21,79% ir 3,4 karto – veikiant 10,89% SMMM koncentracija. Kitame eksperimente, paveikus 4 dienas Cu ir Zn modelinio mišinio 0,06; 0,125 ir 0,25 mg/l koncentracijomis vaivorykštinius upėtakius, MB indukcija buvo 5 kartus didesnė 0,25 mg/l grupėje, o 2 kartus – 0,125 mg/l žuvų grupėje lyginant su kontroline grupe (12 pav.) Šias žuvis palaikius 4, 8 ir 12 dienų švariame vandenyje, didžiausias MB dažnių sumažėjimas buvo po 8 dienų. Tačiau po 4 ir 12 d. laikymo švariame vandenyje 0,25, 0,125 ir 0,06 mg/l eksperimentinėse žuvų grupėse buvo gauti statistiškai patikimi MB dažnio skirtumai nuo kontrolinio lygmens. Apibendrinus abiejų eksperimentų rezultatus išryškėjo, kad sunkieji metalai vaivorykštinio upėtakio kraujo eritrocituose sukelia tik MB indukciją, kuri stebima net esant žemoms sunkiųjų metalų koncentracijoms, o perkėlus žuvis į švarų vandenį, net po 12 d. išlieka gan dideli MB dažniai. Tai rodo aneugeninį sunkiųjų metalų poveikį. Literatūroje yra aprašytas įvairių Cd koncentracijų (Ayllon, Garcia-Vazquez, 2000; Sanchez-Galan et al., 2001; Arkhipchuk, Garanko, 2005; Cavas et al., 2005, 2008), Cu (Arkhipchuk, Garanko, 2005; Bopp et al., 2008; Oliveira et al., 2008), Hg (Sanchez-Galan et al., 2001; Çavaş, 2008), Cr (Cavas et al., 2005), Pb (Cavas, 2008) genotoksinis ir citotoksinis poveikis įvairioms žuvų rūšims.

IŠVADOS

1. Šiaurės jūros Statfjord B platformos skirtingose zonose palaikius midijas (*Mytilus edulis*) ir Atlantines menkes (*Gadus morhua*) varžose, nustatytas aplinkos genotoksiškumo ir citotoksiškumo lygių gradientas priklausantis nuo atstumo iki taršos šaltinio (500 m > 1000 m > 10000 m).
2. Šiaurės jūros Ekofisk naftos platformos aplinkoje aukščiausias genotoksiškumo ir citotoksiškumo lygis nustatytas moliuskuose *M. edulis*, kurie laikyti varžose arčiausiai gamybinio vandens išleidėjų. Statistiškai patikimi branduolio pažaidų skirtumai taip pat rasti midijose, kurios buvo laikytos 600 m į PV (P=0,0014), 1100 m į ŠR (P=0,0076) ir 1600 m į PV (P=0,0437) atstumais nuo šios naftos platformos.
3. Eksperimentinėmis sąlygomis organizmus paveikus Statfjord B 0,5 ppm žaliavine nafta, mikrobranduolių indukcija nustatyta otų kraujo ir inkstų eritrocituose bei midijų žiaunų ląstelėse. Tuo tarpu, tos pačios naftos 0,5 ppm, alkilfenolių bei poliaromatinių angliavandenilių mišinys, indukavo statistiškai patikimą mikrobranduolių dažnio padidėjimą *M. edulis* žiaunų ląstelėse, otų (*Scophthalmus maximus*) kraujo ir inkstų bei *G. morhua* inkstų eritrocituose. Taip pat rastas patikimas branduolio pumpurų ir fragmentuotų-apoptozinių ląstelių dažnių skirtumas nuo kontrolinės grupės midijų žiaunose, dvibranduolių ir fragmentuotų-apoptozinių ląstelių – otų inkstų bei branduolio pumpurų – otų kraujo eritrocituose.
4. Statistiškai patikimas mikrobranduolių dažnio didėjimas nustatytas *M. edulis* žiaunų ląstelėse veikiant 1, 2, 4 ir 8 dienas 0,5 ppm Statfjord B nafta. Fragmentuotų-apoptozinių ląstelių dažnis patikimai skyrėsi nuo kontrolės po 4 dienų, o dvibranduolių ląstelių - po 8 dienų poveikio.
5. Didžiausias arktinės Barenco jūros naftos genotoksinis poveikis *S. maximus* kepenų eritrocituose nustatytas po 4 savaitių, o citotoksinis – po 8 savaitių. 40 ppb šios naftos koncentracija sukėlė didžiausią geno-citotoksiškumo indukciją. Arktinė nafta indukavo išskirtinai didelį dvibranduolių eritrocitų ir branduolio pumpurų su nukleoplazminėmis jungtimis formavimąsi.
6. Po poveikio 0,5 ppm Statfjord B žaliavine nafta bei naftos, alkilfenolių ir poliaromatinių angliavandenilių mišiniu nustatyti tarprūšiniai genotoksiškumo lygių skirtumai. *M. edulis* žiaunų ląstelėse mikrobranduolių dažniai buvo 4 kartus aukštesni negu *S. maximus* ir 10 kartų negu *G. morhua* kraujo eritrocituose, o branduolio pumpurų dažniai – 4 kartus aukštesni negu otų kraujo ir 7,5 kartų negu otų inkstų eritrocituose.
7. Oseberg C platformos gamybiniai vandenys, jų komponentai (AF, PAA) ir žaliavinė nafta *G. morhua* kepenų ir inkstų eritrocituose indukavo iki 4,5 kartų aukštesnį branduolio pumpurų nei mikrobranduolių dažnį. Eksperimentinėse grupėse gauti patikimi branduolio pumpurų ir mikrobranduolių formavimosi

skirtumai (P kito nuo 0,01 iki $P < 0,0001$), palyginus su kontroline grupe. Statistiškai patikimų citotoksiškumo pokyčių nerasta.

8. *G. morhua* kepenų ir inkstų eritrocituose, statistiškai patikimi mikrobranduolių dažnių skirtumai nustatyti žuvyse veiktose 0,2 ppm Oseberg C platformos žaliavinės naftos koncentracija bei 0,2 ppm naftos, alkilfenolių ir poliaromatinių angliavandenilių mišiniu. Aukštesnis mikrobranduolių ir fragmentuotų-apoptozinių eritrocitų dažnis rastas *G. morhua* inkstų eritrocituose, o branduolio pumpurų dažniai buvo panašūs abejuose audiniuose.
9. Sunkiųjų metalų modeliniai mišiniai *Oncorhynchus mykiss* kraujo eritrocituose indukavo genotoksinių pažaidų formavimąsi, o citotoksinio poveikio nenustatyta.

LIST OF PUBLICATIONS

Scientific papers

1. Baršienė J., Dedonytė V., Rybakovas A., Andreikėnaitė L., Andersen O.K. Induction of micronuclei in Atlantic cod (*Gadus morhua*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) after treatment with bisphenol A, diallyl phthalate and tetrabromodiphenyl ether-47. *Ekologija*. 2005. Vol. 4. P. 1-7.
2. Baršienė J., Andreikėnaitė L., Rybakovas A. Cytogenetic damage in perch (*Perca fluviatilis* L.) and Duck mussel (*Anodonta anatina* L.) exposed to crude oil. *Ekologija*. 2006. Vol.1. P. 25-31.
3. Baršienė J., Dedonytė V., Rybakovas A., Andreikėnaitė L., Andersen O.K. Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil. *Aquatic Toxicology*. 2006. Vol. 78. P. S99-104.
4. Baršienė J., Andreikėnaitė L. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in blue mussels exposed to crude oil from the North Sea. *Ekologija*. 2007. Vol. 53. N. 3. P. 9-15.
5. Andreikėnaitė L., Baršienė J., Vosylienė M.Z. Studies of micronuclei and other nuclear abnormalities in blood of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) treated with heavy metal mixture and road maintenance salts. *Acta Zoologica Lituanica*. 2007. Vol.17. N.3. P. 213-219.
6. Baršienė J., Rybakovas A., Andreikėnaitė L. Environmental genotoxicity studies in marine fish and mussels. ICES 2007 Annual Science Conference. CM 2007 Documents. Theme Session on Effects of hazardous substances on ecosystem health in coastal and brackish-water ecosystems: present research, monitoring strategies, and future requirements (I) ICES CM 2007/I:05.
7. Baršienė J., Andreikėnaitė L., Garnaga G., Rybakovas A. Genotoxic and cytotoxic effects in bivalve mollusks *Macoma balthica* and *Mytilus edulis* from the Baltic Sea. *Ekologija*. 2008. Vol. 54. N.1. P. 44-50.
8. Vosylienė M.Z., Kazlauskienė N., Baršienė J., Andreikėnaitė L., Milukaitė A., Taujanskis E. „Untreated and treated wastewater effluents toxicity and genotoxicity to fish at different stages of development“. Paper of „Proceedings International Conference on Xenobiotics in the Urban Water Cycle XENOWAC 2009“.
9. Baršienė J., Andreikėnaitė L., Vosylienė M.Z., Milukaitė A. Genotoxicity and immunotoxicity of wastewater effluents discharged from Vilnius wastewater treatment plant. *Acta Zoologica Lituanica*. 2009. Vol.19. N.3. P. 188-196.

PADĖKA

Už suteiktą galimybę ir sąlygas studijuoti doktorantūroje dėkoju Gamtos tyrimų centro Ekologijos instituto vadovybei.

Nuoširdžiausią padėką reiškiu savo darbo vadovei **habil. dr. Janinai Baršienei**. Dėkoju Jums už vertingus patarimus ir pastabas ruošiant šią disertaciją, ačiū Jums ir už motinišką rūpestį, didelę kantrybę bei visokeriopą paramą ir pagalbą kasdienėje veikloje.

Dėkoju savo konsultantui **dr. Steinar Sanni** (Stavangerio tarptautinių tyrimų institutas, Norvegija) už pagalbą, naudingus patarimus ir šiltą bei nuoširdų bendradarbiavimą. Labai esu dėkinga **dr. Rolf Sundt**, **dr. Anne Bjornstad**, **dr. Nadia Aarab** bei visiems IRIS (Stavangerio tarptautinių tyrimų institutas, Norvegija) mokslo darbuotojams.

Nuoširdžiausiai dėkoju visam Gamtos tyrimų centro Ekologijos instituto Hidrobiontų ekologijos ir fiziologijos laboratorijos kolektyvui – **dr. Mildai Zitai Vosylienei**, **dr. Nijolei Kazlauskienei**, **dr. Gintarui Svecevičiui** ir kitiems. Ačiū Jums visiems!!!

Dėkoju Genotoksikologijos laboratorijos darbuotojoms – **habil. dr. Janinai Šyvokienei**, **dr. Lionginai Mickènienei** už mikroorganizmų identifikavimą bei naudingus patarimus ruošiant disertacijos rankraštį. Didelis ačiū – **dr. Aleksandrui Rybakovui** – už patarimus, pamokymus ir pastabas.

Taip pat dėkoju savo draugams ir kolegoms – **dr. Simonai Smilgevičienei**, **dr. Audrutei Matusevičiūtei**, **dr. Daivutei Kalytytei**, **dr. Sandrai Radžiūtei**, **dr. Vaidui Palinauskui**. Ačiū Jums už draugiškumą, pagalbą ir moralinę paramą doktorantūros studijų metu!!!

Už palaikymą ir supratimą, ypač esu dėkinga savo šeimai ir artimiesiems.

LAURA ANDREIKĖNAITĖ
CURRICULUM VITAE

Date and place of birth:

1 July 1980, Molėtai, Lithuania

Office address:

Institute of Ecology of Nature Research Centre, Akademijos 2, LT-08412 Vilnius-21, Lithuania

E-mail: laura@ekoi.lt

Education:

2006-2010 PhD studies at the Institute of Ecology Nature Research Centre.

2002-2004 Master's Degree in Ecology, Vilnius University Ecology and Environmental Research, Faculty of Natural Sciences, Vilnius University.

1998-2002 Bachelor's Degree in Biology, Faculty of Natural Sciences, Vilnius University.

Scientific publications:

9 articles and 10 conference abstracts.