

**GAMTOS TYRIMŲ CENTRO EKOLOGIJOS INSTITUTAS
VILNIAUS UNIVERSITETAS**

LAURA ANDREIKĖNAITĖ

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

Daktaro disertacija

Biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra (03 B)

Vilnius, 2010

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

Darbo mokslinis vadovas:

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

Konsultantas:

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

TURINYS

SANTRUMPOS	5
ĮVADAS	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA	12
1.1. Vandens ekosistemų tarša naftos junginiais	12
1.2. Tarša naftos produktais Šiaurės jūroje.....	15
1.3. Aplinkos taršos komponentų biotransformacija ir bioakumuliacija organizmuose	20
1.4. Pagrindinių taršos komponentų poveikis organizmams	25
1.4.1. Naftos ir jos junginių poveikis	26
1.4.2. Alkilfenolių poveikis	27
1.4.3. Sunkiųjų metalų poveikis.....	28
1.5. Genotoksikologijos metodų taikymas taršos poveikio tyrimuose	29
1.5.1. Mikrobranduolių testas	30
1.5.2. Kitų branduolio pažaidų analizė	34
1.5.3. Kiti genetiniai metodai.....	36
1.6. Pagrindiniai aplinkos genotoksiškumo vandens ekosistemose bioindikatoriai ir jų panaudojimas tyrimuose	39
2. MEDŽIAGA IR METODAI	44
2.1. Tirtos žaliavinės naftos gręžinių trumpa charakteristika	45
2.2. Tyrimuose naudotų organizmų trumpa charakteristika	46
2.3. Aplinkos genotoksiškumo ir citotoksiškumo tyrimai taikant aktyvų monitoringą	50
2.3.1. Statfjord B naftos platformos taršos poveikio analizė	51
2.3.2. Ekofisk naftos platformos taršos zonose išleidžiamų gamybinių vandenų poveikio analizė	51
2.3.3. PAA ir sunkiųjų metalų poveikis taršos gradientė Karmsund fjordų sistemoje	53
2.4. Naftos platformų zonose randamų teršalų genotoksinio ir citotoksinio poveikio laboratoriniai tyrimai	54

2.4.1. Žaliavinės naftos genotoksinio ir citotoksinio poveikio tyrimai.....	56
2.4.2. Žaliavinės naftos ir platformose susidarančių gamybinių vandenų genotoksinio ir citotoksinio poveikio tyrimai	58
2.4.3. Sunkiųjų metalų genotoksinio ir citotoksinio poveikio tyrimai.....	59
2.5. Branduolio pažaidų analizė.....	59
3. TYRIMŲ REZULTATAI	64
3.1. Genotoksinio ir citotoksinio teršalų poveikio nustatymas aktyvaus monitoringo būdu.....	64
3.2. Eksperimentiniai genotoksinio ir citotoksinio naftos pramonės teršalų poveikio tyrimai	69
3.2.1. Skirtingose naftos platformose išgaunamos žaliavinės naftos poveikis .	69
3.2.2. Genotoksinis ir citotoksinis naftos platformose susidarančių gamybinių vandenų poveikis	80
3.2.3. Genotoksinis ir citotoksinis sunkiųjų metalų poveikis	83
4. REZULTATŲ APTARIMAS	85
4.1. Naftos platformų technogeninių teršalų geno-citotoksiškumo įvertinimas aktyvaus monitoringo būdu <i>in situ</i>	87
4.2. Naftos platformų teršalų geno-citotoksinio poveikio ypatumai laboratorinėmis sąlygomis	89
4.2.1. Žaliavinės naftos įvairių koncentracijų poveikis	90
4.2.2. Žaliavinės naftos poveikis priklausomai nuo ekspozicijos laiko.....	95
4.2.3. Naftos platformose susidarančių gamybinių vandenų genotoksiškumas ir citotoksiškumas.....	98
4.2.4. Genotoksiškumo ir citotoksiškumo ypatumai skirtingose organizmų rūšyse	105
4.2.5. Genotoksiškumo ir citotoksiškumo ypatumai skirtinguose organizmų audiniuose	108
IŠVADOS.....	113
LITERATŪROS SĄRAŠAS	115
DISERTACIJOS TEMA PASKELBTŲ DARBŲ SĄRAŠAS	169
PADĖKA.....	172

SANTRUMPOS

AChE – acetilcholinesterazė

AF – alkilfenoliai

BP – ląstelės su branduolio pumpurais

BP_s – ląstelės su branduolio pumpurais, kurie nukleoplazmine jungtimi susijungę su branduoliu

DB – dvibranduolės ląstelės

DNR – deoksiribonukleorūgštis

EROD – 7-etoksirezorufino O-deetilazė

FA – fragmentuotos-apoptozinės ląstelės

GST – glutationo S-transferazė

GV – gamybiniai vandenys

LMS – lizosomų membranų stabilumas

MB – mikrobranduoliai

MFO – mišrių funkcijų oksidazės

MT – metalotioneinai

NADPH – nikotinamido adenino dinukleotido fosfatas

PAA – policikliniai aromatiniai angliavandeniliai

PCB – polichlorinti bifenilai

ppb – viena bilijoninė dalis (ppb) 10^{-9}

ppm – viena milijoninė dalis (ppm) 10^{-6}

SCM – seserinių chromatidžių mainai

ŽN – žaliavinė nafta

IVADAS

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. 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 vandenių 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 pažeidimų 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 genotoksinį (pagal mikrobranduolių ir branduolio pumpurų dažnius) ir citotoksinį (pagal fragmentuotų-apoptozinių ir dvibranduolių ląstelių dažnius) pažeidimų lygį valgomųjų midijų (*Mytilus edulis*) žiaunų ląstelėse ir Atlantinių menkių (*Gadus morhua*) eritrocituose.
- Eksperimentinių tyrimų pagalba nustatyti įvairiose Šiaurės ir Barento jūrų naftos platformose, taip pat Lietuvos Minijos naftos gręžinyje išgaunamos žaliavinės naftos indukuotą branduolio pažeidimų lygį skirtingose žuvų ir moliuskų rūšyse.
- Nustatyti pagrindinių naftos pramonės teršalų genotoksinio ir citotoksinio poveikio ypatumus moliuskuose ir žuvyse.
- Įvertinti naftos pramonės teršalų genotoksinį ir citotoksinį efektų pobūdį skirtinguose žuvų audiniuose.

Darbo naujumas:

Pirmą kartą kompleksiškai derinant lauko ir laboratorines sąlygas 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 vandenų įtakos zonose;
- Genotoksinis ir citotoksinis skirtingose Šiaurės jūros naftos platformose išgaunamos žaliavinės naftos poveikio nustatymas žuvims ir moliuskams vykdant eksperimentinius tyrimus;
- Branduolio pažaidų susiformavimo tendencijos veikiant paprastuosius otus (*Scophthalmus maximus*) Barenco jūroje išgaunama arktine žaliavine nafta;
- Mikroorganizmų įtaka genotoksiniui ir citotoksiniui 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 genotoksiniui ir citotoksiniui 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 citoksinis poveikis vaivorykštiniam upėtakiui (*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 grėžinyje 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 ląstelėse. Gauti tyrimų rezultatai parodė, kad moliuskai yra jautresni naftos pramonės išleidžiamų ir genotoksinėmis savybėmis pasižyminčių teršalų poveikiui, o *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 angliavandenių, 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 išsipyrimo 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 gamtoje. 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 susidarančių teršalų bei žaliavinės naftos poveikį.

Darbo aprobavimas ir publikacijos:

Šio darbo rezultatai paskelbti 9 straipsniuose Lietuvos ir užsienio moksliniuose recenzuojamuose žurnaluose. Disertacijos tema skaityta 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“ metinėje konferencijoje (Vilnius, 2010).

Darbo apimtis ir struktūra:

Disertaciją sudaro: Įvadas, Literatūros apžvalga, Medžiaga ir metodai, Tyrimų rezultatai, Rezultatų aptarimas, Išvados, Literatūros šaltinių sąrašas, Disertacijos tema paskelbtų mokslo darbų sąrašas. Disertacijos apimtis – 172 puslapiai, 10 lentelių ir 23 paveikslai. Disertacija parašyta lietuvių kalba.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Vandens ekosistemų tarša naftos junginiais

Aplinkos tarša – viena iš opiausių šių dienų gamtosauginių problemų, o tarša pasaulio hidrosistemose yra viena iš aktualiausių antropogeninės veiklos pasekmių. Taršos šaltinių rūšys yra įvairios, tačiau viena itin aktuali – tai aplinkos tarša naftos produktais. Taršos kilmė labai įvairi – išaugusios naftos ir dujų gavybos apimtys jūrose, intensyvėjantis vandens transportas, rizikingai gabenami vis didesni žaliavinės naftos kiekiai, per vėlai arba nefunkcionaliai pasibaigęs naftos išsipylimo avarių likvidavimas (Fernandez-Alvarez et al., 2006; Laffon et al., 2006). Dalis naftos produktų į jūras patenka iš sausumos (pramonės įmonių bei transporto priemonių).

Vandenyje atsidurę naftos produktai, esant sąlygoms, gali greitai pasklisti nuo taršos šaltinio ar avarijos vietos dideliu atstumu. Tai tik apsunkina naftos avarių sukeltos taršos likvidavimą bei praplečia įvairių, naftos sudėtyje esančių cheminių junginių poveikio zoną.

Nafta pasižymi didele sudedamųjų dalių įvairove, dominuojantis komponentas – angliavandeniliniai junginiai (iki 98%). Naftos fizikinės savybės bei tirpumas vandenyje priklauso nuo cheminės jos sudėties. Tai nuo geltonos iki juodos spalvos, tirštas, degus ir skystas angliavandenilių mišinys. Sudarytas iš 5 rūšių komponentų: sočiųjų aciklinių angliavandenilių (parafinų), ciklinių angliavandenilių (cikloalkanų), alifatinių (alkenų) ir aromatinių angliavandenilių, sunkiųjų metalų bei sulfatinių, azoto ir deguonies junginių (Cote, 1976). Naftą sudaro: 83-87% anglies (C), 10-14% vandenilio (H), 0,1-2% azoto (N), 0,05-1,5% deguonies (O), 0,05-6,0% sieros (S) ir <0,1% metalai. Didelė dalis į žaliavinės naftos sudėtį įeinančių policiklinių aromatinių angliavandenilių susiformuoja iš organinės medžiagos natūraliai gamtoje. PAA yra sudaryti iš angliavandenilių molekulių su keletu ciklinių žiedų. Patekę į aplinką šie junginiai didina biologinio deguonies suvartojimą, pasižymi toksinėmis savybėmis bei yra kancerogeniški žmogui ir vandens organizmams. Atlikti tyrimai rodo, kad dauguma PAA yra mutageniški bei sukelia

reprodukinius sutrikimus. Todėl svarbu nustatyti, tokių junginių susidarymą bei įvertinti jų toksinį poveikį, gauti rezultatai leistų prognozuoti pasekmes hidrosistemoms (Yamamoto et al., 2003; Harman et al., 2009).

Vandens ekosistemose randamas platus spektras sunkiųjų metalų: gyvsidabrio (Hg), chromo (Cr), švino (Pb), kadmio (Cd), vario (Cu), cinko (Zn), nikelio (Ni) (Nikulina, Dullo, 2009; Hendozko et al., 2010). Dalis metalų hidrosistemose egzistuoja natūraliai, tačiau dalis patenka iš įvairių besiplečiančios antropogeninės veiklos šaltinių: kalnakasybos, metalų perdirbimo pramonės, žemės ūkio bei su valymo ir buitinėmis nuotekomis. Įvairūs metalai vandens sluoksniuose pasiskirsto netolygiai jie gali būti: ištirpę, susijungę su vandenyje esančiomis suspenduotomis dalelėmis arba išsidėstę dugno nuosėdose. Dažniausiai sutinkami jonų, koloidų, suspensijų ar kietų dalelių pavidalu, be to, gali būti surišti su neorganiniais ar organiniais ligandais (Kozelka, Bruland, 1998).

Žaliavinės naftos bei gamybinio vandens sudėtyje esančios metalų koncentracijos priklauso nuo naftos išgavimo regiono, telkinio amžiaus ir geologinių jo susiformavimo savybių. Būdingi metalai – Zn, Pb, Cu, Mg ir Ba. Anot Utvik (2003), sunkiųjų metalų koncentracijos nustatytos gamybiniuose naftos platformų vandenyse yra aukštesnės nei jūros vandenyje, kadangi išleisti į jūrą GV prasiskiedžia. Dalis sunkiųjų metalų yra adsorbuojami ant dalelių paviršių, dalis ištirpsta, tačiau naftos platformų zonose padidėjęs sunkiųjų metalų kiekis neigiamai veikia čia gyvenančius vandens organizmus (Stephenson, 1992). GV bei žaliavinėje naftoje esantys metalai pasižymi toksinėmis, genotoksinėmis savybėmis, gali įtakoti ir reprodukinius organizmų sutrikimus.

Kartu su žaliavine nafta bei GV į jūrą patenka ir alkilfenoliai, apie kurių pasklidimą ir poveikį vandens organizmuose yra žinoma labai nedaug. Didelė dalis su naftos junginiais į vandens sistemas patenkančių AF turi trumpas iki 7 anglies atomų angliavandenilių grandines (Bennett et al., 1996; Utvik, 1999). Macleod su bendraautoriais (1993) darbe nurodo, kad Šiaurės jūroje išgaunamoje žaliavinėje naftoje AF koncentracija būna apie 50 mg/l, ir nors

išleidžiamuose GV alkilfenolių koncentracija sumažėja iki 1 mg/l kai kuriems organizmams tokia koncentracija gali būti letali.

Į vandens sistemas patenka daugybė naftos produktų junginių, pasižyminčių skirtingomis poveikio aplinkai savybėmis. Pavojingiausi lakūs, aplinkoje greitai sklaidytis gebantys naftos produktai. Žaliavinei naftai patekus į vandenį per 24 valandas iš jos išsisikiria apie 80-90% angliavandenilių. Naftos sklidimas priklauso nuo jos klampumo, aplinkos temperatūros, išsiliejimo vietos (Wolfe et al., 1994). Lengvesnių naftos komponentų sklidimas vyksta intensyviau, nei sunkiųjų naftos sudėtyje esančių junginių (Hayakawa et al., 2006). Naftos pasklidimui turi įtakos ir vandens telkinio rūšis. Silpnesne vandens cirkuliacija pasižyminčios priekrantinės zonos (įlankos ir užtėkiai) yra ypač jautrūs taršai (Vlahogianni et al., 2007). Kadangi, naftos junginių migracijos kryptį ir tempą lemia vandens srauto tėkmė, tad dažniausiai naftos komponentai nuo taršos epicentro išplinta tik viena kryptimi (Shui et al., 1990).

Lengvi naftos produktai pvz., kai kurie monocikliniai ar bicikliniai aromatiniai angliavandeniliai, taip pat ir dalis sunkiųjų naftos produktų (apie 20-60%) gali visiškai išgaruoti. Garavimo procesas vyksta per kelias pirmąsias dienas. Nustatyta, kad dėl dispersijos alkenai išgaruoja greičiau, nei aromatiniai angliavandeniliai. Garavimo procesui įtakos turi naftos cheminė sudėtis, vandens paviršiuje susidariusios plėvelės storis, temperatūra, saulės radiacija, vėjo greitis.

Daugelis toksinių naftos produktų, tokių kaip benzenas, toluenas, ksilenas vandenyje tirpsta lengvai, o tekančiuose vandenyse vykstantys vandens turbulencijos procesai ypač padidina šių medžiagų susimaišymo ir tirpimo potencialą. Intensyviausiai nafta tirpsta pirmosiomis po patekimo į vandenį valandomis (Saeed, Al-Mutairi, 2000). Pasklidus naftai, kai kurie naftos produktai linkę formuoti vandenyje emulsijas. Emulgavimo procesas yra lėtesnis nei garavimo, todėl esant tam tikrom sąlygom naftos emulsijos gali skaidytis ir vėl paskleisti naftą (Toyoda, Inagaki, 2000).

Dėl intensyvios ūkinės žmogaus veiklos į vandens aplinką patenka ir kitos antropogeninės kilmės medžiagos t.y. azoto ir fosforo junginiai, pesticidai,

antibiotikai, įvairūs farmacijos pramonėje sintetiniai junginiai. Dalis jų pasižymi, toksiniu, genotoksiniu, mutageniniu ar kancerogeniniu poveikiu (Jha, 2004). Kai kurios iš jų veikia kaip endokrininės sistemos trikdytojai (Kizu et al., 2000).

1.2. Tarša naftos produktais Šiaurės jūroje

Didelę grėsmę jūrinių ekosistemų būklei kelia naftos produktai, kurie patenka į jūras plukdant naftą tanklaiviais, vamzdynų avarijų metu, plaunant tuščias naftos talpyklas laivuose, kartu su GV bei tiesiogiai siurbiant naftą.

Šiaurės jūroje naftos ir dujų gavyba nuo 1960 metų tapo pagrindine šio regiono ekonomine veikla, o pastaraisiais metais dujų ir naftos išgavimo mastai vis auga. Pagrindinė naftos gavybos veikla koncentravosi šiaurinėje šios jūros dalyje, Didžiosios Britanijos ir Norvegijos sektoriuose. Dujų gavyba intensyviausiai vykdoma seklesnėje pietinėje jūros dalyje, regionuose, priklausančiuose Didžiajai Britanijai, Olandijai, Danijai ir Norvegijai. Naftos gavybos proceso metu su naftos išstūmimui panaudotu vandeniu į jūros vandenį patenka įvairūs PAA, sunkieji metalai, AF, organinės rūgštys. Ilgėjant naftos telkinių eksploatacijos laikui tokio vandens kiekiai didėja. Nuolat didėja ir jūros dugnu nutiestų naftotiekių ir dujotiekių ilgis (OSPAR, 2000).

Naftos platformose produkuojamų gamybinių vandenų fizikinės ir cheminės savybės bei jose esančių skystųjų ir dujinės formos angliavandenilių mišinių sudėtis priklauso nuo geografinės vietovės, išgavimo regiono bei telkinio eksploatavimo eigoje vykstančių procesų (Woodall et al., 2001; Lu et al., 2006). GV sudėtyje gausu įvairių vandenyje ištirpusių ir suspenduotų dalelių, kietųjų dalelių (smėlio ar dumblo), bei junginių, kurie dedami angliavandenilių išskyrimui pagreitinti arba reakcijų aktyvumui sustiprinti. Gamybinių vandenų sudėtyje yra: nafta, alkilfenoliai, sunkieji metalai (Ba, Cd, Cr, Cu, Pb, Hg, Zn, Ni ir Ag), radionuklidai (^{226}Ra , ^{228}Ra), medžiagos naudojamos naftos išskyrimo eigoje t.y. įvairūs reakcijų, korozijos inhibitoriai, biocidai, emulsikliai, koagulantai ir flokulantai bei druskos.

Neff (1987) nurodo, jog jūros vandeniui nuolat kontaktuojant su iš uolienu telkinio išgaunama žaliavine nafta į hidrosistemą gali patekti daugiau negu 48 ppm naftos produktų. Anot autoriaus, tokios GV esančios angliavandenilių koncentracijos gali būti pavojingos nuošaliems vandens užutėkiams, įlankoms, kadangi naftos produktų gali būti aptinkama toliau nei 1000 m atstumu nuo jų išmetimo vietos.

Nafta patenkanti su gamybiniais vandenimis, sudaryta iš angliavandenilių mišinio, kurio sudėtyje yra: benzenas, toluenas, etilbenzenas, asilenas, naftalinas, fenantrenas, dibenzotiofenas, poliaromatiniai angliavandeniliai ir fenoliai. Kadangi, vanduo negali ištirpinti visų angliavandenilių, tad didžioji jų dalis būna pasklidę vandenyje (Ekins et al., 2007). Vidutiniškai ištirpusios naftos kiekis GV siekia apie 9,5 mg/l. Įdiegus naftos platformose naujausias valymo technologijas ištirpusios naftos kiekis galėtų būtų sumažintas iki 1,5-2 mg/l (NPD, Press release 28/2008).

Gamybiniuose vandenyse esančios mažos molekulinės masės sudedamosios dalys (riebiosios rūgštys, ketonai, alkoholiai) pasižymi geru tirpumu. Kai kuriose naftos gavybos platformose išleidžiamuose GV gali būti gan didelis acetono, metanolio, acto ir propioninės rūgšties kiekis (Ali et al., 1999). Pasitaiko ir lakių angliavandenilių, tačiau jų koncentracijos dažniausiai aukštesnės dujų gavybos nei iš naftos platformose produkuojamuose vandenyse (Utvik, 2003). Su GV į jūrą patenkančių organinių junginių tirpumą įtakoja vandens temperatūra ir pH (Mc Farlane et al., 2002).

Pusiau tirpiems junginiams priskiriami vidutinės ir didelės (C6 iki C15) molekulinės masės angliavandeniliai. Jie tirpūs esant mažoms koncentracijoms, bet žymiai mažiau tirpūs negu mažos molekulinės masės angliavandeniliai. Juos sunku pašalinti, tad jie paprasčiausiai yra išleidžiami į aplinką. Vandenyje gali sudaryti toksinėmis savybėmis pasižyminčią plėvelę, kuri savo sudėtyje gali turėti alifatinių, aromatinių angliavandenilių, karboksilinių rūgščių, fenolių. Norvegijoje, atviroje jūroje naftos platformų išleidžiamuose GV naftalenai sudaro 95%, t.y. daugiausiai iš visų gamybiniuose vandenyse nustatomų PAA (OLF, 2008).

Nustatyta, kad gamybinių vandenų sudėtyje esantys junginiai sukelia neigiamą poveikį vandens organizmams. Tokio vandens patekimas į vandenį gali turėti rimtas pasekmes ekosistemoms. 2009 metų duomenimis, į hidrosistemas išleidžiamo GV kiekis siekė 250 milijonų m³ per dieną (Fakhrul-Razi et al., 2009). Gamybiniai vandenys produkuojami dujų gavybos platformose yra 10 kartų toksiškesni nei iš naftos gavybos platformų, tačiau dujų gavybos platformose išmetami vandens kiekiai yra mažesni nei naftos, tad tas poveikis sąlyginai išsilygina (Jacobs et al., 1992).

Dar 1978 metais (Hagoje) vykusiame susitikime Paryžiaus Komisija (OSPAR Commission) nustatė leistinas išmetamų į atvirą jūrą GV koncentracijas, tad naujai susikuriančios naftos platformos privalo turėti technologijas, kurių dėka būtų sumažintas išmetamų naftos produktų patekimas į aplinką (Ekins et al., 2007). Kompanijos „Norsk Hydro“ didžiausią GV kiekį 1996 m. į Šiaurės jūrą išpylė iš taip vadinamų „Oseberg“, „Brage“ ir „Troll“ naftos platformų laukų (zonos su gausybe naftos gręžinių). Šių platformų pagaminamos naftos ir išpiltų GV kiekiai pateikti 1.2.1. lentelėje.

1.2.1. lentelė. Naftos platformose išgaunamos naftos ir išpilamų gamybinių vandenų kiekis (pagal Utvik, 1999).

Naftos platformų telkiniai	Išgaunamos naftos (m ³)	Išpilamų gamybinių vandenų (m ³)
Oseberg	29 000 000	1 432 000
Brage	7 000 000	1 856 000
Troll	14 500 000	4 382 000

1993 metais bendras Norvegijos naftos platformų išmetamas GV kiekis buvo 26 mln. tonų (Utvik, 1999). 2007 metų Norvegijos naftos direkcijos (Norwegian Petroleum Directorate) metinėje ataskaitoje pranešama, kad GV kiekis siekė 183 mln. tonų: 162 mln. tonų buvo išpilta į jūrą, o likę 27 mln. tonų – įpurkšti į pamatines uolienas (NPD, Press release 28/2008). Žaliavinės naftos ir gamybinių vandenų cheminė sudėtis priklauso nuo naftos telkinio, tačiau PAA ir AF įvairovė maždaug vienoda, skiriasi tik atskirų komponentų koncentracijos (Utvik, 1999). Žemiau pateikta kai kurių platformų GV cheminė sudėtis (1.2.2. lentelė).

1.2.2. lentelė. Oseberg F, Oseberg C, Brage ir Troll naftos platformų gamybinių vandenų cheminė sudėtis (pagal Utvik, 1999).

Komponentai	Matavimo vienetai	Oseberg C	Oseberg F	Brage	Troll
Benzenas	mg/l	3,7	4,6	4,5	0,8
Toluenas	mg/l	1,5	2,7	3,5	1,0
Etilbenzenas	mg/l	0,3	0,6	0,3	0,4
Ksilenas	mg/l	0,2	0,4	0,7	0,2
Naftalenai	mg/l	1,27	1,60	0,93	1,32
Fenantrenai	μg/l	76,3	99,8	50,9	60,2
Dibenztiofenai	μg/l	nt	37,8	17,5	28,0
Acenaftenas	μg/l	5,1	0,3	1,8	1,5
Fluorenas	μg/l	2,7	16,2	8,9	15,4
Fluorantenas	μg/l	7,8	1,8	0,4	1,7
Pirenas	μg/l	8,6	5,2	0,7	5,1
Chrizenas	μg/l	0,4	0,1	0,5	-
Benz(a)antracenas	μg/l	1,9	2,4	0,6	2,0
Benz(a)pirenas	μg/l	0,1	-	0,2	-
Benz(g,h,i)pirenas	μg/l	0,1	0,6	0,2	-
Benz(k)fluorantenas	μg/l	0,2	0,8	0,2	0,7
Organinės rūgštys	mg/l	717	1135	757	798
Fenoliai	mg/l	10,96	11,45	6,12	0,58
Baris	mg/l	142	107	228	147
Geležis	μg/l	7,7	4,2	11,3	4,3
Gyvsidabris	μg/l	26	20	20	17
Cinkas	mg/l	0,34	0,03	0,20	0,012

nt – netikrinta; „-“ – nerasta

Dažniausiai Šiaurės jūros naftoje pasitaikančių PAA (1.2.3. lentelė) bei gamybiniuose vandenyse randamų AF (1.2.4. lentelė) vidutinės koncentracijos.

1.2.3. lentelė. Poliaromatinių angliavandenilių koncentracijos žaliavinėje naftoje išgaunamoje Statfjord B platformoje (Šiaurės jūra) (pagal, IRIS duomenis).

Poliaromatiniai angliavandeniliai	Koncentracija rezervuaruose (ng/l)
Naftalenas	1863,5
2-metilnaftalenas	3360,2
1,3-dimetilnaftalenas	3513,2
2-izopropilnaftalenas	1868,3
Acenaftilenas	8,7
Acenaftenas	14,3
Fluorenas	211,3
Fenantrenas	189,7
9-metilfenantrenas	307,6
9-etilfenantrenas	265,4

1.2.3. lentelės tęsinys.

Poliaromatiniai angliavandeniliai	Koncentracija rezervuaruose (ng/l)
Dibenzotiofenas	40,6
4-metildibenzotiofenas	88,4
4-etilbenzotiofenas	84,4
Fluorantenas	7,9
Pirenas	15,9
Chrizenas	20,8
5-metilchrizenas	20,0
Benz(a)antracenas	8,7
Benz(b)fluorantenas	3,3
Benz(a)pirenas	1,1
Benz(g,h,i)perilenas	0,8

1.2.4. lentelė. Dažniausiai pasitaikantys alkilfenoliai gamybiniuose vandenyse iš Statfjord B naftos platformos Šiaurės jūroje (pagal, IRIS duomenis).

Alkilfenoliai	Koncentracija (mg/l)
2-metilfenolis	6676,30
4-metilfenolis	2260,08
3,5-dimetilfenolis	667,63
2,4,6-trimetilfenolis	225,97
4-tert-butilfenolis	112,98
4-tert-butil-2-metilfenolis	27,73
4-n-pentilfenolis	55,46
4-n-heksilfenolis	16,46
4-n-heptilfenolis	8,22

Norvegijos naftos pramonės direkcijoje ataskaitoje nurodoma, kad 2007 metais įvyko 166 naftos išsiliejimai, iš kurių 154 buvo mažesni nei 1 tona. Bendras išsiliejusios naftos kiekis buvo 4488 tonos. Didžiausia dalis naftos išsiliejo Statfjord naftos grežinyje. Su avariniu naftos išsiliejimu į jūrą pateko net 109 cheminiai junginiai (NPD, Press release 28/2008).

Šiaurės jūros priekrantėse ir upių žiotyse išsidėstę dauguma Europos didžiųjų uostų. Kasmet į 50 didžiausių iš jų įplaukia daugiau kaip 270 000 laivų. Dėl intensyvios Šiaurės jūros navigacijos intensyvėja vandens ir oro tarša. Apie pusę laivais gabenamų ir prarastų krovinių yra pavojingi aplinkai. Ant Šiaurės jūros krantų sukonzentruota ir įvairaus pobūdžio pramoninė veikla, aplink Šiaurės jūros baseiną išsidėsčiusiuose žemės plotuose vykdoma ūkinė veikla, kuri taip pat turi įtakos Šiaurės jūros ekologijai. Įvairiais keliais į jūrą patenka nitratai, amonis, metanas, pesticidai ir kiti taršos komponentai.

1.3. Aplinkos taršos komponentų biotransformacija ir bioakumuliacija organizmuose

Teršalai vandens ekosistemose egzistuoja kompleksinių mišinių pavidalu ir patiria visą eilę sąveikų ir kitimų. Jų pasiskirstymą gamtoje įtakoja du svarbūs procesai: taršos komponentų migracija ir kaupimasis. Vandens organizmai gali įsisavinti teršalus iš dugno sedimentų, suspenduotų dalelių, tiesiogiai iš vandens stovymės ar per maisto grandines (Livingstone, 1993). Dažniausiai dugno nuosėdose akumuliuojasi žymiai aukštesnis chemikalų kiekis nei vandens stovymėje (Baudo, Muntau, 1990; Burton, 1991; Ahlf et al., 2002; Fracacio et al., 2003). Kelios skirtingos medžiagos gali sustiprinti (sinergizmas) arba susilpninti (antagonizmas) jų poveikio biotai savybes (Ahmad et al., 2008). Genotoksinis poveikis gali sumuotis (adityvus veikimas) (Ma et al., 1992). Genotoksinėmis savybėmis pasižymintys organiniai junginiai organizmuose gali būti lengvai bioakumuliuojami bei pasiekia gan aukštą biokoncentracijos lygį. Dažniausiai tokie junginiai yra: lipofiliški ir sunkiai tirpstantys vandenyje, nejonizuotos molekulės lengvai tirpstančios riebaluose, taip pat junginiai, kurie dėl mažo molekulinio svorio, jonizacijos laipsnio lengvai patenka pro biologines membranas. Dideliu lipofiliškumu pasižymi vandens sedimentuose susikaupiantys PAA, polichlorinti bifenilai (PCB), polichlorinti dibenzo dioksinais ir dibenzo furanais (Van der Oost et al., 1988; Engwall et al., 1999; Otte et al., 2008).

Naftoje vyksta cheminės reakcijos – fotodegradacija ir oksidacija. Iš biologinių – mikrobiologinė biodegradacija, kuri taikoma ir naftos išsiliejimų likvidavimo metu (Hozumi et al., 2000). Naftos junginių degradacijos intensyvumui įtakos turi vandens fizikinės savybės (temperatūra, ištirpęs deguonis kiekis) bei mikroorganizmai (Berthe-Corti, Höfpner, 2005). Naftos junginius skaidančių bakterijų randama visose vandens ekosistemose, net Arkties vandenyne (Sveum, Ladousse, 1989), tačiau biodegradacijos procesai dėl atšiauraus klimato ten vyksta labai lėtai. Literatūroje pateikiami duomenys, apie bakterijų rūšis skaidančias tokius PAA junginius kaip naftalenas, antracenas, fenantrenas (Boldrin et al., 1993).

Poliaromatinių angliavandenių sudėtyje esantys cikliniai aromatiniai žiedai gerai absorbuoja saulės šviesą ir yra jautrūs fotocheminiam jos poveikiui. Mažo molekulinio svorio junginiai patekę į vandens sistemas yra lengviau suskaidomi (Kwon et al., 2009), tuo tarpu didelio molekulinio svorio PAA junginiai gali dar ilgą laiką išlikti vandens telkinių dugno nuosėdose (Bernal-Martinez et al., 2005).

Ypatingai didelį susirūpinimą kelia į aplinką patenkantys įvairūs alkilfenoliai (Naylor et al., 1992; Bennie et al., 1997; Blackburn et al., 1999; Ferguson et al., 2001; Tabata et al., 2001). Hidrofobines šių junginių savybes bei bioakumuliaciją lemia AF grandinės šakotumas. Fotooksidacinių procesų metu bei bakterijų pagalba dalis naftoje, GV bei sedimentuose esančių alkilfenolių ir fenolių yra biodegrazuojami. Vis gi, nustatyta, kad šie junginiai kaupiasi sedimentuose, akumuliuojami vandens organizmų riebaliniame audinyje bei yra toksiški (Safe, Gaido, 1998; Liber et al., 1999).

Vandens organizmai gali įsisavinti aplinkos teršalus ir su maistu. Kenksmingos medžiagos detoksikuojamos ir eliminuojamos iš organizmo įjungiant specifines fermentines sistemas (Livingstone et al., 2000). Šis procesas dažnai sukelia prokancerogenų, promutagenų ir proteratogenų aktyvaciją. Atsako į kenksmingas medžiagas metu gali susidaryti junginiai, kurie tiesiogiai ar per tarpinius junginius sąveikauja su ląstelės makromolekulėmis (DNR, RNR, baltymais) aktyvuodami ar slopindami jų veiklą (De Flora et al., 1991). Žuvų kepenyse ir kituose organuose yra labai efektyvūs I-os ir II-tros biotransformacijos fazių fermentų rinkiniai.

Pirmos fazės fermentinės aktyvacijos reakcijose dalyvauja tokie fermentai, kaip mišrių funkcijų oksidazės (MFO) arba monooksigenazės, hidrolazės, reduktazės ir eilė kitų. Į MFO sistemos sudėtį įeina citochromas P450, citochromas b-5, NADPH-citochromo c (P450) reduktazė, katalazė, superoksiddismutazė, DT-diaforazė, gliutationperoksidazė. Pirmos fazės metu katalizuojamos epoksidinimo, hidroksilinimo ir dealkilinimo reakcijos (Buhler, Williams, 1989). Nustatyta, kad policikliniai aromatiniai angliavandeniai, polichlorinti bifenilai, polibrominti bifenilai ir kiti junginiai indukuoja mišrios

funkcijos oksidazes ir kitus fermentus (Tuvikene, 1995). MFO indukciją paprastai lydi citochromų (P450) kiekio padidėjimas (Hawkins et al., 2002; Shimada, 2006). Matuojant kepenų EROD (etoksirezorufin-O-deetilazės) aktyvumą ir citochromo P450 sudėtį nustatoma žuvų kepenyse vykstanti benz(α)pireno biotransformacija (Maria et al., 2002b). Lyginant su žinduoliuose vykstančia PAA junginių biotransformacija, žuvyse ji vyksta lėčiau, metabolizuoti PAA junginiai šalinami per tulžį bei šlapimą (Stegeman, Lech, 1991). PAA junginių biotransformacija bei genotoksinis jų poveikis nustatytas įvairiose žuvų rūšyse (Pacheco, Santos, 1997; Venier et al., 1997b; Harvey et al., 1999; Gravato, Santos, 2002; Maria et al., 2002a, 2002c; Brown, Steinert, 2003).

Antros fazės reakcijos yra katalizuojamos transferazių, tokių kaip glutation-S-transferazės ar sulfotransferazės. Šie fermentai paverčia pirmos fazės produktus į dihidrodiolius katalizuodami glutationo ar gliukuroninės rūgšties prijungimą (Schlenk et al., 2008). Po konjugacijos su junginiais, turinčiais polines ar jonines grupes, suaktyvėja detoksikuojamų junginių metabolizmas (Foureman, Eling, 1989).

Teršalų akumuliacijos lygis priklauso nuo organizmo fiziologinių ypatumų: kūno svorio, trofinės padėties, hemocianino buvimo organizme (Naimo et al., 1995; Sarkar et al., 2006). Akumuliacijai įtakos turi ir aplinkos veiksniai: vandens druskingumas, temperatūra, pH, organinių medžiagų kiekis, metalų koncentracija, oksidacijos lygmuo ir sąveika su ligandais (Campbell, Evans, 1991). Nustatyta jog, B(α)P metabolizmas vandens oragnizmuose svyruoja priklausomai nuo sezoniškumo (Weinstein, 1995). Žemos vandens temperatūros sumažina žaliavinės naftos produktų skaidymą, kadangi sulėtėja organizmų metabolizmas (Harvey et al., 1999).

Su maistu, per vandenį ir nuosėdas į organizmus patenka įvairūs sunkieji metalai (Burgess, McKinney, 1999; Luoma, Rainbow, 2005). Nors organizmuose jie pasiskirsto netolygiai, vis gi pirminis taršos sunkiaisiais metalais poveikio organas – žuvų ir moliuskų žiaunos (Gundacker, 1999). Per žiaunas ir su maistu patenkantys metalai dažniausiai yra tirpūs vandenyje.

Didžiausia jų dalis įsisavinama pro žiaunas difuzijos ir aktyvaus transporto būdu. Mechanizmai, apsaugantys nuo toksiškų metalų poveikio, apima pernašos, slopinimo, pašalinimo iš organizmo bei detoksikacijos, surišant metalus į kompleksus būdus. Tam tikros metalų koncentracijos gyvūnų organizmuose yra toleruojamos ir kai kuriais atvejais netgi būtinos (Depledge, Fossi, 1994). Divalentinių metalų jonus suriša baltymai, kurie vadinami metalotioneiniais. Metalotioneinai ar į juos panašūs baltymai nustatyti daugelyje žuvų, moliuskų ir vėžiagyvių (Langston et al., 1998; Roeva et al., 1999; Isani et al., 2000; Monserrat et al., 2007; Pytharopoulou et al., 2008). Šie baltymai dalyvauja organizmo homeostazės ir detoksikacijos procesuose, surišdami tokius metalus kaip: Ag, Cd, Cu, Hg ir Zn. Be to, atlieka ir kitą svarbią funkciją – šalina oksiduotus radikalus (Viarengo et al., 2000; 2007). Metalotioneinai rasti jūriniuose moliuskuose: valgomosiose (*Mytilus edulis*) ir Viduržemio jūros (*Mytilus galloprovincialis*) midijose, lėkštelėse (*Patella vulgata*, *P. granularis*), didžiojoje veneroje (*Ruditapes decussatus*) (Mackay et al., 1993; Mourgaud et al., 2002; Simes et al., 2003). Moliuskuose ir vėžiagyviuose šie baltymai sintetinami virškinimo liaukoje ir žiaunose (Raspor et al., 2004). Dvigeldžiai moliuskai pasižymi ir kita detoksikacijos sistema – įjungia metalus į neorganinius kristalus, kurie formuojasi tarpląsteliniame audinyje (Simkiss, 1981; Silverman et al., 1987). Gėlavandeniuose moliuskuose tokiuose dariniuose dažnas kalcis, tuo tarpu jūriniuose bestuburiuose dominuoja švino karbonatas (Marshall, Talbot, 1979), geležies fosfatas arba cinko fosfatas (Buchanan et al., 1980). Staigi metalotioneinų indukcija įvairiose žuvų rūšyse naudojama kaip biožymuo, vertinant sunkiųjų metalų taršą aplinkoje (Cajaraville et al., 2000; Linde et al., 2001).

Sunkiųjų metalų bioakumuliacija vandens organizmuose priklauso nuo geocheminių ir biologinių savybių t.y. koku būdu jie patenka į organizmą, koks jų kiekis, kaip šalinami, visos šios savybės rūšims yra individualios (Luoma, Rainbow, 2005). Dažnai audiniuose sukauptos sunkiųjų metalų koncentracijos koreliuoja ir su aplinkos užterštumo lygiu (Naimo, 1995), tačiau

skirtingi organizmų audiniai, pasižymi skirtinga sunkiųjų metalų akumuliacija (Carriquiriborde, Ronco, 2008).

Didžiausios teršalų koncentracijos nustatomos moliuskų žiaunose ir mantijoje, kituose organuose akumuliacija neretai yra specifiška (Hemelraad, Holwedra, 1987). Jūrinių dvigeldžių moliuskų kraujo plazmoje nustatyti didesni sunkiųjų metalų kiekiai (kur jie yra pasiskirstę kaip laisvi junginiai arba susirišę su plazmos baltymais) nei hemocituose (Hayashi et al., 1998). Didžiausios kadmio koncentracijos nustatomos moliuskų virškinimo liaukoje, žiaunose ir inkstuose, o mažiausios kriauklėje ir raumenyse (Adams et al., 1981). *M. edulis* moliuskus 2 ir 4 savaitėms perkėlus į užterštą Ušujos įlanką, didžiausios geležies ir vario koncentracijos nustatytos jų virškinamajame trakte, tuo tarpu cinko – žiaunose (Giarratano et al., 2010).

Sunkiųjų metalų pasiskirstymas žuvyse yra selektyvus procesas. Audiniuose vykstanti metalų akumuliacija priklauso nuo specifinių junginių prijungimo vietų buvimo bei audinio detoksikacijos mechanizmų (Naimo, 1995). Vienose žuvų rūšyse ženkli sunkiųjų metalų akumuliacija vyksta kepenyse ir inkstuose (Kraal et al., 1995; Cattani et al., 1996), kitose intensyviau vykdoma raumenyse ir kepenyse. Kadmio akumuliacija priklauso nuo žuvų rūšies (Wu et al., 2007; Isani et al., 2009). Tyrimuose atliktuose su amerikiniu upiniu unguriu (*Anguilla rostrata*), Cd daugiau akumuliuosi inkstuose nei kepenyse (Gill et al., 1992). Aukštesnis akumuliuoto Cd kiekis nustatytas inkstuose nei kituose tirtuose organuose ir atlikus tyrimus su margaisiais upėtakiais (*Salmo trutta*) (Brown et al., 1994), japoniškais unguriais (*Anguilla japonica*) (Yang, Chen, 1996), paprastaisiais karpiais (*Cyprinus carpio*) (Brown et al., 1986). Pastebėta, kad auksaspalvis sparus (*Sparus aurata*) 11 dienų paveikus 0,1 mg/l Cd koncentracija, didesnė šio metalo akumuliacija nustatyta kepenyse nei inkstuose ar žiaunose (Isani et al., 2009). Kamunde atliko (2009) eksperimentą, kurio metu vaivorykštinius upėtakius (*Oncorhynchus mykiss*) veikė skirtingomis Cd koncentracijomis. Žiaunose minėtojo metalo susikaupė nuo 2 iki 4 kartų daugiau nei kepenyse. Tuo tarpu, veikiant tą pačią žuvų rūšį variu, didžiausias jo susikaupimas nustatytas kepenyse, žiaunose, virškinamajame

trakte, o mažiausias – kauluose (Kamunde et al., 2001; Handy et al., 2002). Nustatant, Zn, Cu, Cd, As ir Pb akumuliacijos lygį žuvų audiniuose tirti afrikiniai šamai (*Clarias gariepinus*). Gautos tokios sunkiųjų metalų kaupimosi (inkstuose, kepenyse, žiaunose bei širdyje) tendencijos: širdyje (Zn>Cu>Pb>As>Cd); žiaunose (Zn>Cu>Pb>Cd>As); inkstuose (Zn>Cu>Pb>As>Cd); kepenyse (Zn>Cu>Pb>As>Cd). Nustatytas metalų pasiskirstymo eiliškumas: As – inkstai>kepenys>žiaunos>širdis; Zn – žiaunos>kepenys>inkstai>širdis; Pb – kepenys>inkstai>žiaunos>širdis; Cu – inkstai>kepenys>žiaunos>širdis; Cd – kepenys>žiaunos>inkstai>širdis (Farombi et al., 2007). Didesne arseno akumuliacija pasižymėjo jūros organizmai nei gėlavandeniai, kadangi šio metalo lygis jūrose yra aukštesnis (Williams et al., 2009).

1.4. Pagrindinių taršos komponentų poveikis organizmams

Į hidrosistemas patenkantys taršos komponentai gali ne tik sutrikdyti vandens organizmų ląstelėse vykstančią jonų pernašą, bet paveikti ir kitus ląstelėse vykstančius procesus – citoskeleto dinamiką, viduląstelinę medžiagų pernašą, mitochondrijų energijos gamybą, ląstelių genomo stabilumą bei genų aktyvumą. Jūros organizmams naftos teršalų poveikis gali būti letalus (dėl ūmaus apnuodijimo) arba gali sukelti subletalus efektus, kuriuos sunku įvertinti. Naftos sudėtyje esantys angliavandeniliai, sunkieji metalai, alkilfenoliai sukelia pakitimus organizmų ląstelių membranose, turi įtakos kancerogeninių procesų intensyvumui, taip pat gali sukelti toksinius (Faria et al., 2010) ar genotoksinius efektus, įtakojančius įvairių ligų atsiradimą, mirtingumo padidėjimą, taipogi populiacijų reprodukcijos sumažėjimą (Venier et al., 1996). Netoli naftos gręžinių, priedugnyje beismaitinančiose žuvyse nustatyti vis didesni dažniai susidariusių karcinomų (Sanchez-Galan et al., 2001). Yra žinoma, kad nuolat naftos produktais teršiamose zonose gyvenantys organizmai susmulkėja (Wake, 2005). Taršos naftos junginiais, sunkiaisiais metalais, alkilfenoliais bei kitomis cheminėmis medžiagomis genetinis poveikis organizmuose gali pasireikšti seserinių chromatidžių mainų (SCM),

mikrobranduolių (MB) bei kitų DNR pažaidų (aduktų, grandinės trūkių ir t.t.) susidarymu (Venier, Zampieron, 2005).

1.4.1. Naftos ir jos junginių poveikis

Didžiąją žaliavinės naftos sudedamųjų junginių dalį sudaro įvairūs angliavandeniliai. Į aplinką šie junginiai patenka išgaunant žaliavinę naftą su naftos platformose produkuojamais GV, taip pat naftos avarinių išsiliejimų (González-Doncel et al., 2008) ar laivybos metu. Kai kurie PAA yra priskiriami prie promutagenų (Johnson, 1992). Šių junginių pavojingumą lemia tai, kad jų oksidacinės biotransformacijos metu susidaro itin reaktyvūs metabolitai, kurie gali jungtis su organizmo makromolekulėmis (pvz., DNR) (Jonsson et al., 2004). Tokio tipo metabolitams būdingas kancerogeniškumas, mutageniškumas ir citotoksiškumas (Torres-Bugarin et al., 1998; Woodhead et al., 1999). Be to, kai kurie PAA veikia kaip estrogenai ir antiestrogenai, trikdo žuvų steroidų metabolizmą, mažina plazmoje cirkuliuojančių hormonų kiekius (Roy et al., 2003) bei inhibuoja steroidogeninius baltymus (Monteiro et al., 2000).

Aprašytas genotoksinis PAA poveikis organizmams (Akcha et al., 2000; Vanzella et al., 2007; Nogueira et al., 2009). PAA indukuotas genotoksiškumas nustatytas jūriniuose galvakojuose moliuskuose *Cronia contracta* (Sarkar et al., 2008), Viduržemio jūros midijose (*Mytilus galloprovincialis*) ir žoliniuose grunduluose (*Zosterisessor ophiocephalus*) (Venier, Zampieron, 2005). Literatūroje pateikiami duomenys apie PAA indukuotą DNR pažaidų susidarymą raudonosios asterijos (*Asterias rubens*) prievartinės aklosios žarnos ląstelėse (Šiaurės jūra) (Everaarts, Sarkar, 1996). Naftos ir dujų gavybos platformų GV sudėtyje esantys junginiai sukėlė baltymų ekspresiją dėmėtojoje kavaloje (*Carangoides fulvoguttatus*) bei tropiniuose auksadryžiuose rifešeriuose (*Lutjanus carponotatus*) (Zhu et al., 2008). Genotoksinis naftos perdirbimo įmonėje susidarančio gamybinio vandens, poveikis nustatytas ir astianaksuose *Astyanax jacuhiensis* (de Lemos et al., 2008). Naftos perdirbimo įmonių išleidžiamų į aplinką junginių genotoksinis poveikis ichtiofaunai

įvertintas naudojant *in vitro* ir *in vivo* laboratorinius tyrimus (Gravato, Santos, 2003; de Lemos et al., 2001, 2007). Atlikti eksperimentiniai tyrimai parodė, kad naftos sudėtyje esantys junginiai sukelia pokyčius organizmų reprodukciniėje sistemoje, įtakoja išneršiamų ikrelių skaičių bei procentinį išsiritusių ikrelių skaičių, mailiaus išgyvenimą, visa tai gali neigiamai paveikti visą ekosistemą (Wake, 2005).

Naftą disperguojančių medžiagų, taikomų naftos išsipylimo avarių metu, sudėtyje yra įvairių surfaktantinių mišinių, angliavandenilinių tirpiklių, stabilizuojančių medžiagų, kurios taip pat pasižymi genotoksinėmis savybėmis (HELCOM, 2003).

1.4.2. Alkilfenolių poveikis

Alkilfenoliniai ir etoksilatai – tai dar viena plačiai paplitusi teršalų grupių. Patekusios į aplinką šios medžiagos biodegraduojamos į sunkiau skylančius junginius (nonilfenolį, oktofenolį bei alkilfenolius mo-, di-, trietoksilatus) (Giger et al., 1984). Organizmams šie junginiai yra toksiški bei veikia kaip endokrininės sistemos trikdymo (Jobling et al., 1996; Renner, 1997). Nemaža dalis alkilfenolių į hidrosistemas patenka su naftos platformų produkuojamais GV. Nustatyta, kad AF citotoksiškumas priklauso nuo jų koncentracijos ir grandinės šakotumo. Atlikti tyrimai su Atlantinėmis menkėmis (*Gadus morhua*) ir vaivorykštiniais upėtakiais (*O. mykiss*) parodė, kad AF turi įtakos glutathionreduktazės aktyvumui bei glutathiono lygio pokyčiams. Manoma, kad tai oksidacinio streso pasekmė. Ląstelės, kuriose sumažėja glutathiono lygis, tampa jautresnės reaktyvių deguonies radikalų poveikiui, jose dažniau vyksta DNR fragmentacija, indukuojama apoptozė (Sturve et al., 2006). Literatūroje pateikiama duomenų apie 4-nonilfenolio poveikį reprodukcinei žuvų sistemai bei jo indukuotą genotoksinį poveikį nilinės tilapijos (*Oreochromis niloticus*) kraujo eritrocituose (Rivero et al., 2008). Genotoksinis pentachlorfenolio poveikis taikant MB testą nustatytas dreisenų *Dreissena polymorpha* ir raginės skritinukės (*Planorbarius corneus*) hemocituose (Pavlica et al., 2000).

1.4.3. Sunkiųjų metalų poveikis

Vandens ekosistemose aptinkami sunkieji metalai gali įtakoti žuvų metabolizmo, biocheminius, fiziologinius, histologinius pokyčius, inhibuoti baltymų ir nukleorūgščių sintezę (Zelikoff, 1993; Chi et al., 2007; Castro-González, Méndez-Armenta, 2008). Yra žinoma, kad daugybiniis metalų poveikis turi įtakos moliuskų augimui ir reprodukcijai, o tai gali ženkliai paveikti jų populiaciją (Naimo, 1995). Nustatyta, kad Pb, Cr, Hg, Cd ir Cu gali sutrikdyti bendrą metabolinį aktyvumą bei baltymų sintezę Viduržemio jūros midijose (*Mytilus galloprovincialis*) (Gorinstein et al., 2005; Pytharopoulou et al., 2008).

Įvairios organizmų gyvenimo stadijos yra nevienodai jautrios metalų poveikiui. Veikiant moliuskus letaliois metalų dozėmis, poveikiui jautriausios buvo lervinės ir juvenilinės šių organizmų gyvenimo stadijos (Lasee, 1991). Vertinant toksiškumą nustatytas metalų toksiškumo eiliškumas pradedant labiausiai toksiškais: Hg>Ag>Cu, Cd, Zn, Pb, Cr, Ni, Co. Tačiau skirtingų organizmų audiniuose jų poveikis gali būti skirtingas, pvz., metalų toksiškumo eilė pagal poveikį *Mytilus edulis* moliuskams yra: Cu=Hg=Ag>Cd (Nelson, 1991). Garg su bendraautoriais (2009) atliko eksperimentą, kurio metu 45 dienas dumblynų (*Cirrhinus mrigala*) ir indinius (*Catla catla*) karpis bei labėjas *Labeo rohita* veikė sunkiaisiais metalais (Cd, As, Zn). Tirtų žuvų raumenyse bei žiaunose nustatyti lipidų sudėties bei angliavandenių kiekio pokyčiai. Sunkiųjų metalų poveikis stiprėjo (iš kairės į dešinę): Zn<As<Cd<Cd+Zn<As+Zn<Cd+As<Cd+As+Zn (Garg et al., 2009). Nustatyta, kad daugybiniis metalų poveikis neigiamai veikia daugelio organų funkcionavimą, pvz., Cd poveikis žuvims sukėlė patologinius kepenų, sėklidžių, smegenų ir nervų sistemos, inkstų (Novelli et al., 1999), blužnies ir kaulų čiulpų (Yamano et al., 1998) pakitimus.

Literatūroje aprašytas ir genotoksiniis sunkiųjų metalų poveikis (Ferraro et al., 2004; Arkhipchuk, Garanko, 2005; Porto et al. 2005; Bagdonas, Vosylienė, 2006; Ergene-Gözükara et al., 2007; Çavas, 2008). Sunkiųjų metalų genotoksiškumas yra siejamas su DNR pažeidžiančių laisvųjų radikalų

sukaupimu, klastogeniniais procesais arba tuo pat metu vykstančiu klastogeniniu ir aneugeniniu poveikiu vandens organizmams (Nepomuceno, Spano, 1995). Išskiriama keletas metalų poveikio ląstelės genetinei medžiagai formų. Chromo junginiai veikdami tiesiogiai sukelia oksidacines DNR pažeidas. Netiesioginio poveikio metu metalai slopina DNR reparacijos procesą, veikia replikaciją sukeldami DNR pakitimus arba modifikuodami reparacijoje dalyvaujančius baltymus, tai padidina kitų aplinkos mutagenų genotoksinį poveikį (Hartwig, 1995).

Atlikti vario (Cu) genotoksiškumo tyrimai su vaivorykštinio upėtakio (*Oncorhynchus mykiss*) žiaunų kultūrų RTgill-W1 ląstelėmis (Bopp et al., 2008). Nustatyta, kad aukštos šio metalo koncentracijos inicijuoja DNR pažeidų susidarymą (Gabbianelli et al., 2003), lipidų peroksidaciją (Rau et al., 2004), baltymų karbonatizaciją (Parvez, Raisuddin, 2005). Fe, Co, Ni junginiai gali sąveikauti su vandenilio peroksidu, šių reakcijų metu susidaro hidroksi radikalai ir metalo – deguonies kompleksai, galintys sukelti nukleotidų sekai specifines DNR pažeidas. Manoma, kad deguonies radikalai turi įtakos metalų kancerogeniškumą (Kawanishi et al., 1989). Vienas iš Hg poveikio ląstelei mechanizmų yra siejamas su dalijimosi verpstės formavimosi sutrikimais, kurie sąlygoja aneuploidinių ir poliploidinių ląstelių susidarymą (Bolognesi et al., 1999). Veikdami tiesiogiai arba sustiprindami kitų junginių poveikį As, Cr, Ni, Be ir Cd junginiai dalyvauja kancerogeniniuose procesuose (Snow, 1992). Sunkiųjų metalų genotoksinio/mutageninio poveikio nustatymas žinduoliuose ypač svarbus, vertinant ir taršos rizikos laipsnį žmogui (Hartwig et al., 1994; Rozgaj et al., 2002; Sanchez-Chardi, Lopez-Fuster, 2009).

1.5. Genotoksikologijos metodų taikymas taršos poveikio tyrimuose

Aplinkos taršos mastai pasaulyje vis didėja, tad žinios apie taršos šaltinius ir jų pasekmes vandens organizmams ir ekosistemoms yra svarbios ne tik geresniam supratimui, kaip šios ekosistemos reaguoja į taršos poveikį, bet ir prevencinių aplinkosauginių priemonių suformavimui (Islam, Tanaka, 2004).

Nustatant medžiagų toksinį ir genotoksinį poveikį organizmams naudojami įvairūs analitiniai, *in vitro* ir *in vivo* metodai, kuriuose panaudojami skirtingi biožymenys (Ayllón, Garcia-Vasquez, 2000; Pacheco, Santos, 2002; Rank et al., 2007; de Lemos et al., 2007; 2008). Tokie DNR pokyčiai kaip chromosomų aberacijos, mikrobranduoliai, seserinių chromatidžių mainai ar chromosomų skaičiaus pokyčiai, gali būti nustatomi taikant citogenetinius metodus (Shugart, 1996). Genotoksinų poveikio vandens organizmuose įvertinimui dažniausiai naudojama mikrobranduolių, kometų, DNR aduktų, seserinių chromatidžių mainų analizė (Lehtonen et al., 2006; Frenzilli et al., 2008; Binelli et al., 2009).

1.5.1. Mikrobranduolių testas

Aplinkos genotoksiškumo biožymenimis pradėta domėtis pastaraisiais dešimtmečiais ir ypač didelis dėmesys buvo skiriamas mikrobranduolių testo panaudojimui, vertinant branduolio pažaidų susidarymą tiek gėlavandenių, tiek jūrinių organizmų ląstelėse. Tyrimuose šis testas plačiai taikomas dėl savo paprastumo, spartumo bei jautrumo. Paprasta testo metodika tinkama naudoti įvairiose organizmų grupėse, skirtingose rūšyse bei audiniuose. MB testas naudojamas vertinant vandens organizmų atsaką į atskirus genotoksinius junginius ar jų mišinius, skirtingas jų koncentracijas, poveikio trukmę (Venier et al., 1997a; Dolcetti, Venier, 2002; Gravato, Santos, 2002, 2003; Dailianis et al., 2003; Izquierdo et al., 2003). Testas leidžia tiksliai įvertinti klastogeninių ir aneugeninių junginių poveikį, esant net mažoms medžiagų koncentracijoms (Heddle et al., 1991).

Mikrobranduoliai – ląstelės citoplazmoje esantys chromatino dariniai, apsupti membrana ir neturintys jokio stebimo ryšio su pagrindiniu branduoliu (Fenech, 2000; Iarmarcovai et al., 2008). Jų formavimasis vyksta dėl chromosomų aberacijų anafazės metu, kuomet MB susidaro iš acentrinių chromosomų arba centromerą turinčių fragmentų, kurie ląstelės dalijimosi metu nepasiskirsto į dukterines ląsteles. Mikrobranduoliai gali susidaryti ir dėl mitozėje įvykusių branduolio funkcinių bei struktūrinių pažeidimų, kuomet atsitiktinai viena ar kelios branduolio chromosomos yra prarandamos (Fenech

et. al., 2003; Lindberg et al., 2007). Šie du mikrobranduolių tipai gali būti atskirti nustatant centromerų ir kinetochorų būvimą, naudojant imunofluorescencinį (FISH) dažymo metodą (Natarajan et al., 1996). Jeigu 70-100% mikrobranduolių nustatomas kinetochoro būvimas, tuomet tiriamasis junginys pasižymi aneugeniniu poveikiu. Jei mikrobranduolių, turinčių kinetochorą, dažnis yra žemas (0-30%), tiriamasis junginys tikriausiai pasižymi klastogeniniu veikimu (Antoccia et al., 1991). Vertinant MB esančių kinetochorų dažnį, aneugeniniu poveikiu pasižymėjo etanolis, tuo tarpu jo metabolitas acetaldehidas – klastogeniniu (Kayani, Parry, 2010).

Vizualiai mikrobranduoliai nuo pagrindinio branduolio skiriasi tik savo dydžiu (nuo 1/5 iki 1/20 branduolio dydžio). Žuvų ląstelėse susiformuojantys MB gali būti dar mažesni, palyginus su pagrindiniu branduoliu (nuo 1/10 iki 1/50), nes daugumos žuvų chromosomos yra daug smulkesnės nei žinduolių (Al-Sabti, Metcalfe, 1995).

Pirmą kartą mikrobranduolių testas, kaip citogenetinių pažeidimų indikatorius, pradėtas taikyti žinduoliuose. Patobulinus metodiką pritaikytas ir vandens organizmams. Vėliau, genotoksinio teršalų poveikio vandenyje nustatymas taikant MB testą, tapo būtina sąlyga vertinant ekosistemų būklę bei paskirų cheminių medžiagų genotoksiškumą (Burgeot et al., 1996). MB testo metodika ypač tobulėjo per pastarąjį dešimtmetį, kuomet testas buvo pradėtas taikyti genotoksinių medžiagų poveikio žmogui rizikos vertinime (Fenech et al., 1999; de Almeida et al., 2004). Kiek vėliau pradėtas naudoti aplinkos genotoksiškumo tyrimuose gamtinėse įvairių organizmų populiacijose (Mersch, Beauvais, 1997; Rao et al., 1997; Tanzarella et al., 2001). Kadangi vandens ekosistemos nuolat teršiamos antropogeninės veiklos produktais, susidomėta genotoksinių teršalų poveikiu vandens organizmams (Bolognesi, 1990; Venier et al., 1997a,b; Sanchez-Galan et al., 1999; Ayllón, Garcia-Vazquez, 2000). Jūrinėse ir gėlavandenėse sistemose bestuburiai sudaro 90% čia gyvenančių vandens organizmų, tad šių organizmų panaudojimas atliekant genotoksiškumo tyrimus ypač aktualus, kadangi genotoksinis medžiagų poveikis turėtų įtakos visam ekosistemos funkcionavimui. MB testas taikytas

įvairiose taksonominėse grupėse – moliuskuose (Baršienė et al., 2004; Bolognesi et al., 2004; Siu et al., 2004) žuvyse (Hayashi et al., 1998; Baršienė et al., 2005; Bolognesi et al., 2006b), varliagyviuose (Huang et al., 2007; Marques et al., 2009), ropliuose (Poletta et al., 2009), graužikuose (Sanchez-Chardi et al., 2008; Vikram et al., 2008), paukščiuose (Stončius, Lazutka, 2003; Laia Quiros et al., 2008). Testas naudotas nustatant įvairių teršalų genotoksiškumą skirtinguose gėlavandeniuose (Al-Sabti, Metcalfe, 1995; Buschini et al., 2004; Ergene et al., 2007) ir jūriniuose organizmuose (Venier, Zampieron, 2005; Nigro et al., 2006; Klobučar et al., 2008), ar vertinat jūrinės aplinkos genotoksiškumą *in situ* (Bolognesi et al., 1996, 1997; Rodriguez-Cea et al., 2003; Çavaş, Ergene-Gözükara, 2005b, Ergene-Gözükara et al., 2007; Baršienė et al., 2004, 2006a, 2006b; Rybakovas et al., 2009).

Žuvyse MB testas taikytas eksperimentiniuose tyrimuose vertinat įvairių medžiagų genotoksinį poveikį – aflatoksino B1, polichlorintų bifenių (Al-Sabti, 1986), benz(a)pireno (Gravato, Santos, 2003), kadmio (Rodriguez-Cea et al., 2003), chromo (Al-Sabti et al., 1994), cinko ir vario (Bagdonas, Vosylienė, 2006), mitomycino C (Bahari et al., 1994; Palhares, Grisolia, 2002), ciklofosamidų (Rodriguez-Cea et al., 2003, Çavas, Ergene-Gozukara, 2005b), etilmetano sulfonato (Ahmad et al., 2002), kolchicino ir rentgeno spindulių (Bahari et al., 1994; Gustavino et al., 2001), fitotoksinų (Çavas, Könen, 2008), torio (Correa et al., 2008), urano (Barillet et al., 2005). Tyrimuose naudoti įvairūs žuvų būriai: karpžuvės – Cypriniformes (Al-Sabti, 1986; Al-Sabti et al., 1994), ešeržuvės – Perciformes (Ieradi et al., 1996; Palhares, Grisolia, 2002; Gravato, Santos, 2003; Baršienė et al., 2006e), lašišakarpiai – Characiformes (Pantaleao et al., 2006), unguiažuvės – Anguilliformes (Rodriguez-Cea et al., 2003), menkiažuvės – Gadiformes (Baršienė et al., 2005), plekšniažuvės – Pleuronectiformes (Baršienė et al., 2005), lašišaužuvės – Salmoniformes (Rao et al., 1997; Rodriguez-Cea et al., 2003; Andreikėnaitė et al., 2007), šamažuvės – Siluriformes (Bahari et al., 1994).

Taikant MB testą, įvertintas genotoksinis taršos poveikis gėlavandenėms žuvis: žemakūniams ūsoriams (*Barbus plebejus*) (Minissi et al., 1996),

vaivorykštiniams upėtakiams (*Oncorhynchus mykiss*) (De Flora et al., 1993), didžiosioms lašišoms (*Oncorhynchus kisutch*) (Barbee et al., 2008), paprastiesiems zakams (*Zacco platypus*), priekrantiniams gyvavedžiams ešeriams (*Ditrema temmincki*), karosų *Carassius spp.* genties bei *Leiognathus nuchalis* žuvims (Hayashi et al., 1998), rudiesiems (*Salmo trutta fario*) bei margiesiems (*Salmo trutta*) upėtakiams (Sanchez-Galan et al., 1998) *in situ*. Testas taikytas skirtinguose žuvų audiniuose: kraujyje (Al-Sabti et al., 1994; Bahari et al., 1994; Gravato, Santos, 2003; Souza, Fontanetti, 2006; de Lemos et al., 2007; 2008), inkstuose (Palhares, Grisolia, 2002; Rodriguez-Cea et al., 2003; Baršienė et al., 2006c), kepenyse (Rao et al., 1997), blužnyje, žiaunose (Çavas, Ergene-Gozukara, 2005a) bei pelekuose (Arkhipchuk, Garanko, 2005). Atlikus tyrimus, kuriuose buvo lyginama mikrobranduolių indukcija žiaunų ir kraujo ląstelėse nustatyta, kad aukštesnis spontaninis ir indukuotas dažnis būdingas žiaunų ląstelėms (Çavas et al., 2005). Tokie rezultatai gali būti paaiškinti tuo, kad žiaunų epitelis yra pirminis taršos komponentų poveikio taikiny (Dixon et al., 2002), šiame audinyje yra aukštesnis ląstelių mitozinis aktyvumas (Arkhipchuk, Garanko, 2005). Žuvyse vykstantys eritropoezės procesai taip pat turi įtakos MB dažniui (Udroiu, 2006).

Moliuskai dėl sėslaus gyvenimo būdo bei filtracinių ir fiziologinių savybių tyrimuose naudojami dar dažniau. Atlikti tyrimai su *Mytilus spp.* genties moliuskais, kurių metu stebėta vandenyje esančių įvairių genotoksinių junginių įtaka MB indukcijai (Scarpato et al., 1990; Bolognesi et al., 1996). Didžioji dauguma MB tyrėjų nurodo, kad mikrobranduolių testo *M. edulis* ląstelėse naudojimas genotoksiškumo įvertinimui yra jautrus metodas ir tinkamas naudoti biomonitoringui jūrinėse, priekrantės taršos veikiamose vandens ekosistemose *in situ* (Bolognesi et al., 1996, 1997, 2004; Burgeot et al., 1996; Baršienė, 2002; Izquierdo et al., 2003; Baršienė et al., 2004, 2006a,b). Taikant MB bei Kometų testus Viduržemio jūros midijų (*M. galloprovincialis*) hemocituose įvertintas Adrijos jūros priekrančių aplinkos genotoksiškumas (Klobučar et al., 2008). Kaip bioindikatoriai Viduržemio jūros midijos gan dažnai naudojamos vertinat antropogeninį poveikį ekosistemoms (Roméo et

al., 2003; Regoli et al., 2004; Nigro et al., 2006; Damiens et al., 2007; Viarengo et al., 2007; Gorbi et al., 2008).

Biondikatoriniai organizmai bei juose vykstantys akumuliacijos procesai tikslingai panaudoti nustatant aplinkos genotoksiškumą įvairiuose Europos uostuose (Geteborgo, Roterdamo, Genujos, Klaipėdos) po gilavimo bei valymo darbų, taip pat po avarinių teršalų išsiliejimų (Stephensen et al., 2000; Regoli et al., 2002, 2004; Frenzilli et al., 2004; Almroth et al., 2005; Sturve et al., 2005; Baršienė et al., 2006a; Bocchetti et al., 2008). Atlikta darbų, kuomet naudojant kaip bioindikatorius moliuskus bei taikant MB testą kartu su kitais biožymenimis įvertintas Baltijos jūros aplinkos genotoksiškumas (Baršienė et al., 2006a; Kopecka et al., 2006; Schiedek et al., 2006). Dažniausiai dvigeldžiuose moliuskuose mikrobranduolių susidarymas vertinamas hemocituose ir žiaunų ląstelėse (Izquierdo et al., 2003; Bolognesi et al., 2004; Baršienė et al., 2006a,b,d; Villela et al., 2007). Dixon (2002) su bendraautoriais išskyrė moliuskų hemolimfos panaudojimo genotoksikologiniuose tyrimuose privalumus, palyginus su kitais audiniais (žiaunomis). Moliuskuose hemolimfa tirama dėl paprasto preparatų paruošimo bei galimybės taikyti ne tik mikrobranduolių, bet ir kitus metodus, pvz., kometų (Jha et al., 2005; Jha, 2008), acetylcholinesterazės lygio nustatymo (Galloway et al., 2002; Al-Subiai et al., 2009). Atlikti hemolimfos ir žiaunų tyrimai atspindėjo įvairių klastogenų (Mersch et al., 1996), radionuklidų (Jha et al., 2005), sunkiųjų metalų (Bolognesi et al., 2004), organinių junginių (Galloway et al., 2002; Rickwood, Galloway, 2004; Pan et al., 2006) poveikį tiriamiesiems moliuskams.

1.5.2. Kitų branduolio pažeidimų analizė

Analizuojant aplinkos genotoksiškumą be mikrobranduolių testo vandens organizmuose buvo tiriamos ir kitos ląstelės branduolio pažeidos, tokios kaip branduolio pumpurų (BP), dvibranduolių (DB) bei fragmentuotų-apoptozinių (FA) ląstelių susiformavimas. Literatūroje yra duomenų apie tokio pobūdžio pažeidas jūrinėse žuvyse ir moliuskuose (Venier et al., 1997a; Dolcetti, Venier,

2002; Gravato, Santos, 2002, 2003; Dailianis et al., 2003; Izquierdo et al., 2003; Guilherme et al., 2008; Koukouzika, Dimitriadis, 2008; Binelli et al., 2009). Vertinant genotoksinį junginių poveikį tiriamas MB ir BP susiformavimas, o citotoksinį – FA ir DB ląstelių susidarymas (Baršienė et al., 2006c; Baršienė, Andreikėnaitė 2007; Andreikėnaitė et al., 2007). Branduolio pažeidimų susiformavimo priežastys ir mechanizmai iki šiol nėra galutinai aiškūs. Manoma, kad branduolio pažeidimai gali formuotis dėl chromosomų segregacijos sutrikimų. Branduolio pumpurai formuojasi dėl ekstrachromosominės DNR amplifikacijos bei vykstant DNR trūkių reparacijos procesams. Vykstant amplifikuotos DNR ir defektyvių DNR reparacijos kompleksų šalinimui iš branduolio (Shimizu et al., 1998; Haaf et al., 1999).

Ląstelėje vykstančios apoptozės metu susiformuoja mikrokūneliai, kurie vizualiai labai panašūs į mikrobranduolius (Heddle et al., 1991). Nustatyta, kad sunkieji metalai, gali indukuoti apoptozinių ląstelių susidarymo suintensyvėjimą (Rana, 2008; Franco et al., 2009). Manoma, kad apoptozė yra būdas pašalinti iš organizmo genetiškai pažeistas ląsteles (Stopper, Muller, 1997; De Bruin, Medema, 2008).

Fenech 2000 metais pasiūlė morfologinius kriterijus, kuriais rekomenduojama vadovautis vizualiai vertinant apoptozines ląsteles. Apoptozinėse ląstelėse stebima chromatino kondensacija, bet citoplazmos ir branduolio sienelė nepažeista. Kai vyksta branduolio fragmentacija į mažesnius branduolio darinius, citoplazminė membrana išlieka nepažeista.

2003 metais Fenech su bendraautorais suformulavo kriterijus, remiantis kuriais rekomenduojama vertinti ir kitus branduolio pažeidimus. Ląstelės turinčios du branduolius, anot autoriaus pateiktų kriterijų, privalo būti pasidengusios viena ląstelės membrana ir išsidėsčiusios toje pačioje citoplazmoje. Branduolių dydžiai turi būti panašaus dydžio, nusidažę vienodo intensyvumo spalva. Tarpusavyje branduoliai gali jungtis nukleoplazminiais tiltais (iki $\frac{1}{4}$ branduolio diametro). Nukleoplazminiai tiltai susiformuoja iš dicentrinių chromosomų, kurių centromeros anafazės metu yra traukiamos į skirtingus ląstelės polius (Fenech, Crott, 2002; Fenech, 2006). Kai kuriais

atvejais, kai dvibranduolės ląstelės persidengia su kitomis, tampa sunku nustatyti ar jos tarpusavyje jungiasi nukleoplazminiais tiltais, todėl tokios ląstelės neregistruojamos.

1.5.3. Kiti genetiniai metodai

Priklausomai nuo taikinio dydžio yra išskiriamos dvi sąlyginės genotoksinių efektų grupės: mikropažaidos (kur pakitimai pasireiškia biocheminiame ar molekuliniam lygmenyje) ir makropažaidos (kur pakitimai stebimi chromosomų lygmenyje) (Dixon et al., 2002). Mikropažaidos dažniausiai nustatomos naudojant kometų ir DNR aduktų analizę. Makropažaidoms tirti naudojamas mikrobranduolių, chromosomų aberacijų metafazėje ir anafazėje bei seserinių chromatidžių mainų testai. Šios makropažaidos susidaro tik dalijantis ląstelėms.

Seserinių chromatidžių mainai (SCM) yra jautrus citogenetinis metodas, naudojamas įvertinant mutagenų poveikį chromosomoms. SCM – reiškiny, kai vienos chromosomos dvi chromatidės susikeičia savo homologinėmis dalimis, nustatomas mikroskopuojant, panaudojus diferencinį dažymą. SCM metodas taikomas toksikologiniuose testuose vertinat genotoksinių/mutageninių junginių poveikį (Ergene et al., 2007). Jūriniuose ir gėlavandeniuose organizmuose šis metodas naudojamas rečiau (Alink et al., 2007; Cornet, 2007).

SCM gali sukelti įvairūs fizikiniai veiksniai, pvz., jonizuojančioji spinduliuotė, elektromagnetinės bangos, taip pat įvairūs cheminiai junginiai (Tucker et al., 1993, 1996). Tyrimai atliekami metafazinėse chromosomose, tačiau tai sunku pritaikyti visoms žuvų rūšims, nes kai kurių žuvų šeimų kariotipai, pvz., lašišinių (Salmonidae), karpinių (Cyprinidae) pasižymi dideliu skaičiumi mažų chromosomų, kuriose sunku įvertinti struktūrinius pakitimus (Dixon, Clarke, 1982).

Chromosomų aberacijų analizė – atliekama ląstelės ciklo metafazėje ir/arba anafazėje. Ląstelių dalijimosi metu dėl chromosomų trūkių ar neišsiskyrimo, verpstės ir centromeros pažeidimų anafazėje gali atsirasti

atsiliekančios, sulipę fragmentai, chromosomų tiltai ir multipolinės figūros. Iš atsilikusių fragmentų ar pilnų chromosomų gali formuotis mikrobranduoliai (Landolt, Kocan, 1984).

Žuvų chromosomų aberacijų anafazėje eksperimentiniai tyrimai buvo atliekami penktame-šeštame praeito šimtmečio dešimtmėčiuose (Longwell, Hughes, 1980). Vėliau šis metodas buvo panaudotas beveik po 20 metų. Hose ir Brown (1998) taikė aberacijų anafazėje testą tiriant Viduržemio jūroje gyvenančių rytinių silkių (*Clupea pappasi*) ikrų vystymąsi po „Exon Valdez“ tanklaivio katastrofos. Chromosomų aberacijų analizė kartu su MB testu naudota tiriant klastogeninių junginių (pentachlorofenolio ir 2, 4-dichlorofenoksiacetatinės rūgšties) poveikį *Channa punctatus* žuvyse (Farah et al., 2006).

Chromosominių pažaidų metafazėje testas leidžia analizuoti chromosomų struktūrinius ir skaičiaus pakitimus. Struktūriniai pakitimai (aberracijos) gali pasireikšti kaip chromosomų trūkiai ir chromosomų persitvarkymai: inversijos, translokacijos, acentriniai fragmentai, žiedinės bei dicentrinės chromosomos. Acentriniai fragmentai ir dicentrinės chromosomos dažnai prarandami iš ląstelės, jai dalijantis. Chromosomų skaičiaus pakitimai – aneuploidija (hipodiploidija, hiperdiploidija) ir poliploidija. Tiriant ląstelių metafazes, galima įvertinti ir įvairius mejozės sutrikimus – bivalentų skaičiaus pokyčius, univalentų susidarymą, poliploidiją (Landolt, Kocan, 1984).

Yra žinoma, kad mažos chromosomos yra daug dažniau prarandamos ar įgyjamos. Teorijos, aiškinančios šį reiškinį, akcentuoja didžiųjų chromosomų praradimo letalumą, mažųjų akrocentrinių chromosomų vaidmenį organizuojant branduolį (dėl to ilgesnį jų prisitvirtinimą prie branduolėlio). Manoma, kad mažosios chromosomos gali būti dažniau prarandamos, dėl silpnesnio prisitvirtinimo prie objekcinio stiklelio (Ohtaki et al., 1994).

DNR aduktų testas parodo genotoksinių medžiagų poveikį ir galimų nepalankių organizmui efektų indukciją. Egzistuoja tiesioginė koreliacija tarp DNR aduktų susiformavimo ir kancerogenezės (Peakal, 1992). Nustatyti įvairūs piktybinių auglių tipai žuvyse ir kiautuotų vėžiagyvių populiacijose,

kurie gyvena užterštuose vandenyse (Bolognesi et al., 1996). DNR aduktai nustatomi taikant modifikuotą bazių žymėjimą radioaktyviu fosforu (^{32}P), tai – imunofermentinis metodas, atrastas 80-ųjų pradžioje, vėlesniais metais buvo išstobulintas ir patikslintas (Phillips, Castegnaro, 1999; Phillips et al., 2000). Dėl jautrumo ir spartumo sėkmingai pradėtas naudoti aplinkos monitoringo programose vertinant genotoksinių poliaromatinių junginių poveikį (Van der Oost et al., 1996; Xu et al., 1999). Statistiškai patikimi DNR aduktų susidarymai nustatyti įvairiose žuvų ir moliuskų rūšyse vertinant įvairių teršalų poveikį lauko ir laboratorijos sąlygomis (Aas et al., 2000; Ching et al., 2001; Dolcetti et al., 2002; Le Goff et al., 2006; Skarphéðinsdóttir et al., 2007). Padidėjęs DNR aduktų kiekis nustatytas paprastųjų jūros liežuvių (*Solea solea*) kepenyse praėjus 2 mėn. nuo naftos tankerio „Erika“ avarijos (Amat et al., 2006).

Pastaraisiais metais, vis dažniau naudojamas **kometų metodas** (Frenzilli et al., 2009). Šis metodas pasižymi ganėtinai dideliu jautrumu, spartumu bei paprastumu. Taikant kometų metodą nustatomos pirminės DNR pažaidos (Singh et al., 1988; Steiner et al., 1998; Comet Assay interest group website: <http://cometassay.com/>). Kai kurie autoriai pabrėžė šio metodo universalumą naudojant genotoksiloginiuose, ekotoksikologiniuose bei biomonitoringo tyrimuose (Dixon et al., 2002; Lee, Steinert, 2003; Collins, 2004; Çavas, Könen, 2008). Metodas taikytas įvairiems organizmams, tarp jų žemesniesiems ir aukštesniesiems augalams (Gichner et al., 2006), mažašerėms ir daugiašerėms žieduotosioms bei plokščiosioms kirmėlėms, vėžiagyviams, vabzdžiams, dvigeldžiams, pilvakojams, jūrinėms žvaigždėms, ežiams, žuvims, amfibijoms ir žinduoliams. Tyrimai atlikti, nustatant įvairių cheminių bei fizikinių veiksnių poveikį skirtingose organizmų gyvenimo ciklo etapuose bei skirtingose šių organizmų ląstelėse (laboratorinėmis ir lauko sąlygomis) (Mitchelmore, Chipman, 1998; Cotelle, Ferard, 1999; Rank, Jensen, 2003).

Tyrimų metu kompiuterinės programos pagalba suskaičiuojamas ląstelių turinčių pažaidas dažnis, įvertinamas kometų uodegos ilgis, forma. Taikant metodą svarbu įvertinti DNR kiekį, kometų formą ir dydį. Šiuos parametrus

gali įtakoti dažymo procedūros, skaičiavimo kriterijai (Kumaravel et al., 2007; Jha, 2008). Būtina atsižvelgti į tiriamo organizmo amžių, lytį, vystymosi stadiją, tiriamo audinio ypatumus, metabolizmą, ląstelių proliferacijos intensyvumą.

Kometų metodas taikytas naudojant kaip bioindikatorius įvairius moliuskus ir žuvis (Gielazyn et al., 2003; Gwo et al., 2003; De Andrade et al., 2004; Villela et al., 2007; Wessel et al., 2007). Woo su bendraautoriais (2006) atliko tyrimus, kurių metu naudodami kometų metodą azijinių paltusžuvių (*Paralichthys olivaceus*) kraujo ląstelėse įvertino naftos perdirbimo komplekso ir plieno gamyklos išleidžiamų nuotekų bei uosto akvatorijos genotoksinį taršos poveikį. Paprastųjų vėgelių (*Lota lota*) kraujo eritrocituose taikant kometų metodą nustatytas Geteborgo uosto akvatorijos aplinkos genotoksiškumas (Frenzilli et al., 2004). Karpio ląstelių linijose naudojant kometų metodą tirtas Šiaurės ir Baltijos jūros sedimentų genotoksiškumas (Kammann et al., 2004). Paprastosiame katžuvėse (*Ameiurus nebulosus*) kometų metodas taikytas vertinant PAA genotoksinį poveikį šiais junginiais teršiamose vandens ekosistemos zonose (Padrangi et al., 1995).

1.6. Pagrindiniai aplinkos genotoksiškumo vandens ekosistemose bioindikatoriai ir jų panaudojimas tyrimuose

Vandens kokybės tyrimuose poikiloterminių organizmų panaudojimas yra tikslingas, kadangi tai yra labai plačiai paplitę, sudarantys gausias populiacijas gyvūnai, tad teršalų išmetimo ar išsipylimo vietoje gali tiksliau atspindėti neigiamą poveikį vandens sistemoms. Svarbi jų ekologinė ir ekonominė reikšmė. Todėl jūrinės aplinkos taršos poveikio tyrimuose dažniausiai naudojamos žuvis, moliuskai ir vėžiagyviai.

Žuvis vandens sistemose, sudaro paskutinį mitybinės grandinės lygmenį, tad taršos poveikiui yra ypač jautrios (Van der Oost et al., 2003). Be to, žuvis yra maisto šaltinis aukštesniesiems stuburiniams, tarp jų ir žmogui (Elia et al., 2006). Patekę į hidrosistemas teršalai, žuvyse inicijuoja specifinių fiziologinių ir biocheminių procesų pokyčius (Waite et al., 1992; Mattiessen et al., 1995;

Storm et al., 2000), tad žuvų kaip aplinkos užterštumo bioindikatorių panaudojimas yra vienareikšmiškas (Schnell et al., 2008). Tiriant antropogeninės taršos poveikį vandens organizmams monitoringo darbai atlikti naudojant šias bioindikatorines žuvų rūšis: dryžąjį jūrinį karosą (*Boops boop*), europinę barzdotę (*Mullus barbatus*), europinį žvaigždininką (*Uranoscopus scaber*) (Bolognesi et al., 2006a) europinį šapalą (*Leuciscus cephalus*) (Frenzilli et al., 2008), nilinę tilapiją (*Oreochromis niloticus*) (Linde-Arias et al., 2008), europinę upinę plekšnę (*Platichthys flesus*), paprastąją gelsvapelekę plekšnę (*Limanda limanda*), Atlantinę menkę (*Gadus morhua*) (Rybakovas et al., 2009).

Viena iš Šiaurės jūros naftos industrijos zonos sugaunamų rūšių – Atlantinė menkė (*G. morhua*), plačiai naudojama eksperimentiniuose (lauko ir laboratoriniuose) tyrimuose (Schnell et al., 2008). Atliekant Lietuvos priekrantėje esančio Būtingės naftos terminalo daugiamečių monitoringą kaip bioindikatorinės rūšys naudojamos upinės plekšnės (*P. flesus*) ir paprastieji otai (*Scophthalmus maximus*). Praėjus net 8 mėnesiams po Būtingės naftos avarijos, terminalo zonoje sugautų upinių plekšnių (*P. flesus*) eritrocituose nustatyti aukšti MB dažniai, palyginus su kontroline vieta (Baršienė et al., 2004). Padidėjęs MB ir branduolio pažaidų dažnis aptiktas žuvyse sugautose skalūnų apdirbimo įmonės nutekamųjų vandenų išleidimo zonos (Da Silva Souza, Fontanetti, 2006).

Žuvų vystymosi stadijos ne vienodai jautrios teršalams, tad atliekami tyrimai su skirtingomis jų stadijomis (embrionais, lervomis, mailiumi). Naftos ir dyzelinio kuro išsiliejimo vietose pagautų Atlantinių (*G. morhua*) ir ledjūrio (*Pollachius virens*) menkių bei žieminių plekšnių (*Pseudopleuronectes americanus*) embrionuose nustatytas išaugęs chromosomų aberacijų skaičius (Longwell, 1978; Hughes, 1999).

Ekosistemų genotoksiškumo tyrimuose kaip bioindikatoriniai organizmai naudojami ir **moliuskai**. Šių organizmų, kaip bioindikatorių pasirinkimo populiarumą lemia platus jų geografinis paplitimas, populiacijų gausumas, sėslus gyvenimo būdas, adaptacija prie sparčiai kintančių aplinkos sąlygų,

tolerancija įvairiems aplinkos teršalams, aukšta teršalų biokoncentracija, labai žemas organinių teršalų metabolizmo fermentų aktyvumas, stabilios populiacijos, pakankamai ilga gyvenimo trukmė, dydis bei savybė puikiai prisitaikyti prie laboratorinių ar lauko (laikymo skirtingose varžose) sąlygų (Viarengo, Canesi, 1991; Oehlmann, Oehlmann, 2003). Tyrimuose gali būti naudojamos skirtingos moliuskų vystymosi stadijos (Cheung et al., 2006).

Dvigeldžiai moliuskai (*Mytilus spp.* ir *Perna spp.*) yra bene dažniausiai naudojami biologiniai indikatoriai tiriant genotoksinių medžiagų poveikį lauko ir laboratorinėmis sąlygomis, taip pat atliekant monitoringinius stebėjimus (Chase et al., 2001; Nicholson, Lam, 2005; Rank 2009). Atlikta laboratorinių tyrimų, kuomet naudojant *Mytilus* genties moliuskus tirtas genotoksinis įvairių mutageninių, kancerogeninių, toksinių medžiagų poveikis – benz(a)pireno (Venier et al., 1997a), domo rūgšties (Dizer et al., 2001), tričio (Jha et al., 2005), Cd ir Cr (VI) (Emmanouil et al., 2007), fenantreno, Cu, Cd, Hg (Koukouzika, Dimitriadis, 2008). *Mytilus edulis* rūšis plačiai naudota įvairiose pasaulinėse monitoringo programose (Chase et al., 2001; O'Connor, 2002).

Naudojant moliuskus vandens ekosistemų taršos poveikio įvertinimuose dažnai taikomi įvairūs biožymenys (Long, Buchman, 1990; Galgani et al., 1992), t.y. lizosomų membranų stabilumo (LMS) (Marigómez et al., 2007), metalotioneinų, EROD, AchE, GST bei MB testas (Wrisberg, Rhemrev, 1992; Burgeot et al., 1995; Hayashi et al., 1998; Izquierdo et al., 2003; Magni et al., 2006).

Monitoringo tyrimai gali būti atliekami taikant pasyvaus biomonitoringo būdą, kuomet tiriami natūraliai tose vietose gyvenantys organizmai (Claisse, 1989), bei aktyvųjį biomonitoringą (laikymą varžose), kuomet organizmai iš neužterštų zonų ar akvakultūrų perkeliama į teršiamas vietas (Fabris et al., 1994; Andral et al., 2004). Pastaraisiais metais taršos poveikio nustatymui vis dažniau taikoma moliuskų laikymo varžose skirtingomis sąlygomis metodika (Bolognesi et al., 2004; Bocchetti et al., 2008; Klobučar et al., 2008). Tai yra vienas iš tiksliausių lauko eksperimentų, geriausiai atspindinčių taršos lygį vandens ekosistemose, kadangi atliekant bioindikatorinių organizmų perkėlimą

iš neužterštos vietos į užterštą zoną išvengiama ilgalaikių organizmų adaptacijų prie chroniškos taršos. Vykdamas aktyvų monitoringą, teršalų poveikiui įtakos turi ir aplinkos veiksniai – vandens temperatūrą, pH, srovės, sezoniškumas, taip pat organizmų adaptacijos laikotarpis bei eksperimentinių organizmų laikymo varžose trukmė (Rank et al., 2007; Barbee et al., 2008).

Perkėlus *Mytilus galloprovincialis* iš neužterštos vietos į „Prestige“ tanklaivio naftos išsipylikimo zoną, buvo nustatytas padidėjęs DNR pažaidų lygis moliuskų hemocituose (Laffon et al., 2006). Skirtingose varžose laikytų midijų (*M. edulis*) hemocituose bei spermatozoiduose įvertintas DNR pažaidų dažnis, teigiamai koreliavo su teršalų koncentracija nustatyta šių organizmų audiniuose bei jūros sedimentuose (Steinert et al., 1998). Atlikus eksperimentą su *M. edulis*, moliuskų ląstelėse išaugęs DNR pažaidų dažnis buvo glaudžiai susijęs su sedimentuose padidėjusiu sunkiųjų metalų (Cr, Ni ir Cd) kiekiu (Rank et al., 2005).

Bolognesi su bendrautoriais (2004) metais vertindama aplinkos PAA bei sunkiaisiais metalais (Hg ir Cd) taršą atliko *in situ* tyrimą. Iš vienos veisyklos atvežtus vienodo dydžio *M. galloprovincialis* moliuskus 30 dienų perkėlė į keturias Ligurijos priekrantės zonas (skirtingas varžas), be to, vienu metu tyrė ir natūralias šiose zonose gyvenančių moliuskų populiacijas. Nustatyti mikrobranduolių bei DNR viengrandžių trūkių dažniai parodė taršos gradientą, palyginus su naudota kontroline grupe. Iš natūralių populiacijų surinktų moliuskų audiniuose nustatytos aukštesnės PAA bei sunkiųjų metalų koncentracijos, šiuose organizmuose rasti ir aukštesni MB dažniai. Tuo tarpu, iš veisyklos perkeltuose moliuskuose fiksuotas aukštesnis viengrandžių DNR trūkių dažnis. Gauti rezultatai įrodė, kad labai svarbi poveikio teršalais trukmė. Dešimt kartų aukštesni MB dažniai, nei kontrolinėje grupėje, nustatyti moliuskuose, kurie 4 mėn. po naftos išsiliejimo avarijos laikyti skirtingose varžose (Arenzano zonoje) (Bolognesi et al., 2006a). Aktyvaus monitoringo principas taikytas vertinat į upes ir estuarijas patenkančių teršalų genotoksinį poveikį moliuskams (Wepener et al., 2008).

Taikant aktyvaus monitoringo būdą vis plačiau naudojamos ir kitos vandens organizmų grupės. Morales-Caselles su bendraautoriais (2008) atliko eksperimentą, kurio metu įvertino įvykusio naftos išsipyrimo poveikį skirtingo mitybos pobūdžio bestuburiuose – dvigeldėje filipininėje veneroje (*Ruditapes philippinarum*) ir žaliajame krabe (*Carcinus maenas*) panaudodamas skirtingus biožymenis.

Nors žuvis dėl jų judraus gyvenimo būdo rečiau nei moliuskai naudojamos laikymo varžose eksperimentuose, tačiau kai kurie autoriai pabrėžia jų kaip bioindikatorių privalumą (Oikari, 2006).

2. MEDŽIAGA IR METODAI

Taikant aktyvaus monitoringo principus aplinkos genotoksiškumo ir citotoksiškumo (geno-citotoksiškumo) tyrimai buvo atlikti Statfjord ir Ekofisk naftos telkinių zonose. Kaip biondikatoriai naudoti dvigeldžiai aktyviai vandenį filtruojantys sėslūs moliuskai *M. edulis* ir pelaginės žuvys Atlantinės menkės (*G. morhua*). Statfjord ir Ekofisk yra ne tik seniausiai atrasti, ilgiausiai eksploatuojami, bet ir didžiausi naftos telkiniai Norvegijos ekonominėje zonoje. Iš naftos gręžinių išgaunamos žaliavinės naftos genotoksinių ir citotoksinių savybių įvertinimui, buvo atlikti laboratoriniai tyrimai Stavangerio tarptautinių tyrimų instituto eksperimentiniame centre (International Research Institute of Stavanger – IRIS), naudojant automatizuotą vandens ir teršalų padavimo, vandens temperatūros, pH ir druskingumo palaikymo sistemą. Laboratoriniuose eksperimentuose naudota žaliavinė nafta išgaunama iš Statfjord B ir Oseberg C platformų (Šiaurės jūra) bei iš Minijos gręžinio (Lietuva). Taip pat įvertintos Arktinės žaliavinės naftos išgaunamos Barents jūroje genotoksinės ir citotoksinės savybės dugninių žuvų otų (*S. maximus*) kepenų eritrocituose.

Oseberg C platformoje naftos išgavimo technologinių procesų metu susidarančių gamybinių vandens geno-citotoksinis poveikis analizuotas Atlantinės menkių inkstų ir kepenų eritrocituose laboratorinėmis sąlygomis. Gamybinio vandens sudėtyje esančių AF, PAA bei naftos mišinio genotoksinis ir citotoksinis potencialas nagrinėtas Atlantinės menkės eksperimentų metu. PAA ir sunkiųjų metalų taršos poveikis tirtas midijų žiaunų ląstelėse laikant moliuskus varžose taršos gradientu Karmund fjordų sistemoje. Sunkiųjų metalų poveikis *O. mykiss* žuvyse analizuotas pusiaustatinėse laboratorinėse sąlygose Gamtos tyrimų centro Ekologijos instituto, Hidrobiontų ekologijos ir fiziologijos (HEF) laboratorijoje.

2.1. Tirtos žaliavinės naftos gręžinių trumpa charakteristika

Šiaurės jūros naftos pramonės taršos poveikis tirtas Statfjord ir Ekofisk naftos telkinių zonose (aktyvus monitoringas). **Statfjord** naftos telkinys yra pasienyje ties Norvegija ir Didžiąja Britanija (šiaurinėje Šiaurės jūros dalyje) (2.1.1. pav.). Telkinys aptiktas dar 1974 metais (150 m gylyje), pradėtas eksploatuoti 1976-ųjų birželį. Jame buvo įrengtos trys platformos: Statfjord A, Statfjord B ir Statfjord C. Mūsų tyrimuose naudota žaliavinė nafta iš Statfjord B platformos, kuri yra pietinėje naftos telkinio dalyje, nafta šioje platformoje pradėta išgauti nuo 1982 metų.

Atliekant laboratorinius eksperimentus naudota Oseberg C naftos platformoje išgaunama žaliavinė nafta. **Oseberg** naftos ir dujų telkinys išsidėstęs į pietus nuo Statfjord naftos telkinio. Eksploatuojamas nuo 1988 metų. Oseberg naftos telkinyje yra trys, tiltais tarpusavyje sujungtos, naftos platformos (Oseberg A, Oseberg B ir Oseberg D), kurios sudaro bendrą Oseberg centrą. Oseberg C platforma išsidėsčiusi 14 km toliau į šiaurę nuo viso centro, joje yra taikoma integruoto naftos gręžimo technologija. 2005 m. duomenimis, Oseberg naftos telkinyje per dieną buvo išgaunama apie 90,900 barelių naftos ir 7,8 milijonų m³ dujų.



2.1.1. pav. Tyrimuose naudotos žaliavinės naftos išgaunamos iš Statfjord, Oseberg ir Ekofisk naftos platformų laukai.

Į pietus nuo Oseberg naftos telkinio nutolęs ir **Ekofisk** naftos telkinys. Telkinys atrastas dar 1969 metais (75 m gylyje) ir Norvegijos istorijoje laikomas pirmuoju naftos telkiniu. Eksploatuoti pradėtas 1971-aisiais metais. Pirmaisiais naftos išgavimo metais žaliavinė nafta šiame grėžinyje buvo tiesiogiai pompuojama į atplaukiančius tanklaivius ir tik 1973 metais buvo pastatytas rezervuaras naftai surinkti. Statfjord ir Ekofisk naftos telkiniai yra didžiausi, seniausiai atrasti ir ilgiausiai eksploatuojami Norvegijos ekonominėje zonoje. Iš kiekvieno telkinio jau išgauta virš 450 mln. tonų žaliavinės naftos. Planuojama, kad Statfjord platformos bus eksploatuojamos iki 2020, o Ekofisk – iki 2050 metų. Pastarosios kloduose manoma dar likę 1/3 pradinio naftos kiekio (NPD, 2007).

2.2. Tyrimuose naudotų organizmų trumpa charakteristika

Atlantinė menkė – *Gadus morhua morhua* Linnaeus, 1758

Poklasis Actinopterygii
Būrys Gadiformes
Šeima Gadidae
Gentis *Gadus*

Menkės yra paplitusios nuo rytinės Atlanto dalies (Biskajos įlankos) iki Arkties vandenyno. Gyvena Šiaurės jūroje bei ties Islandijos krantais. Svarbiausia žuvų augimo vieta – Barenco jūra, ten randamos didžiausios menkių populiacijos. Šių žuvų kūnas yra verpstiškas, galva didelė, žiotys gilios, ant apatinio žando ilgas ūsas, kūnas žalsvai pilkas ar žalsvai rudas, išmargintas rudomis dėmėmis. Auga gan greitai, vidutiniškai sveria 4,5-11,3 kg, subręsta 2-3 metais, kai kūno ilgis siekia 20-27 cm. Prieš nerštą žuvys gali migruoti. Neršia vieną kartą į metus. Gyvena tuntais, minta vėžiagyviais, moliuskais, jūrų žvaigždėmis, kirmėlėmis ir žuvimis (daugiausiai stintomis, strimėlėmis ir Atlantinėmis silkėmis). Būdingas kanibalizmas (Virbickas, 2000). *G. morhua* diploidinis chromosomų rinkinys $2n=46$ (www.fishbase.org).

Paprastasis otas – *Scophthalmus maximus* Linnaeus, 1758

Poklasis Actinopterygii
Būrys Pleuronectiformes
Šeima Scophthalmidae

Paplitę šiaurės rytų Atlante nuo Viduržemio jūros (ties Europos krantais) iki šiaurės poliarinio rato. Gyvena iki 80 metrų gylio gelmėse ant smėlingo arba dumblingo grunto. Kūnas asimetriškas, beveik apvalus, be žvynu, rudas su tamsiomis dėmėmis, padengtas aštriais raginiais dygleliais. Akys dažniausiai būna kairėje pusėje. Dažniausiai užauga iki 50-80 cm ir sveria 5-12 kg. Subręsta 5 metais, tuomet kūno ilgis būna apie 17-28 cm. Otai neršia porcijomis balandžio – rugpjūčio mėnesiais, priekrantėse 10-40 metrų gylyje. Ikriukai pelaginiai, 0,9-1,2 mm. Vislumas nuo 0,5 iki 14 mln. ikrelių. Lervutės pelaginės. Kūnas simetriškas, pigmentuotas. Užaugusios iki 25 mm lervutės (40-50 parą) akys fiksuojasi į vieną šoną. Mailiumi virsta 5 mėnesį, kai kūno ilgis būna apie 27 mm (Virbickas, 2000). Otai minta kitomis žuvimis, vėžiagyviais bei dvigeldžiais moliuskais. *S. maximus* diploidinis chromosomų skaičius $2n=44$ (www.fishbase.org).

Paprastasis europinis ešeris – *Perca fluviatilis* Linnaeus, 1758

Poklasis Actinopterygii
Būrys Perciformes
Šeima Percidae
Gentis *Percinae*

Plačiai paplitęs visoje Europoje išskyrus Islandiją, Italiją, šiaurinę Skandinaviją (Malison, 2003). Introdukuotas Australijoje, Naujoje Zelandijoje, Pietų Afrikoje. Gyvena vandenyse, kurių temperatūra siekia nuo <4 °C iki 32 °C, pH 7,0-7,5. Gali būti aptinkamas sekliuose Baltijos vandenyse (7-10‰), Aralo jūroje (10‰), tačiau visai netoleruoja didesnio druskingumo (Heyer, 2003). Šios žuvies išgyvenimui yra svarbus ištirpusio deguonies kiekis, optimaliausias 1,1-1,3 ppm (esant 16 °C), mailiui – 7-10 ppm (esant 20°C) (Linlökken, 2003). Paprastojo europinio ešerio patinai subręsta antrais

gyvenimo metais, patelės – metais ar dviem vėliau. Kai kuriose greitai augančiose populacijose patinai subręsta ir pirmais gyvenimo metais. Jaunikliai maitinasi įvairiais bestuburiais pagrindinai iš Chironomidae ir Crustacea šeimų. Suaugę tampa plėšrūnais (Kestemont et al., 2003). Ešerio augimas priklauso nuo įvairių aplinkos veiksnių: temperatūros, mitybinės bazės. Optimaliausios sąlygos yra dideliuose, nepersekliuose, esant pakankamai maisto mezotrofiniuose ežeruose, bendrijoje su paprastąja kuoja (*Rutilus rutilus*), europine stinta (*Osmerus eperlanus*). Chromosomų skaičius $2n=48$ (www.fishbase.org).

Vaivorykštinis upėtakis – *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792

Poklasis Actinopterygii
Būrys Salmoniformes
Šeima Salmonidae
Gentis *Oncorhynchus*

Natūraliai paplitęs Ramiojo vandenyno šiaurinėje dalyje. Būna praeivės ir sėslios gėlavandenės formos. Sėslūs gėlavandeniai upėtakiai Lietuvoje auginami tvenkiniuose nuo XIX a. Įvairios vaivorykštinio upėtakio formos skiriasi tik augimu, vislumu, neršto laiku, atsparumu ligomis, o morfologiškai jie visi gana panašūs. Kūnas verpstės formos, iš šonų kiek plokščias, išmargintas apvaliomis tamsiomis dėmėmis. Galva ir nugara plieno spalvos. Šonai sidabriški, dėmėti. Pilvas pilkšvai baltas. Neršiančių žuvų, ypač patinų, kūno šonuose išryškėja rožinė juosta, kuri pakraščiuose yra blyškesnė. Žvynai nedideli. Subręsta 3-4 metais, kai pasiekia 40-50 cm. Neršia anksti pavasarį ant akmenuoto ar žvyruoto grunto, kai vandens temperatūra $>6^{\circ}\text{C}$. Vislumas – iki 2-3 tūkst. ikrelių. Jaunikliai gyvena upėse apie 2 metus, minta bestuburiais, jūroje – bestuburiais ir žuvimi. Suaugę individai minta zoobentosu ir nektonu, chromosomų skaičius $2n=58$ (www.fishbase.org).

Valgomoji midija – *Mytilus edulis* Linnaeus, 1758

Klasė Bivalvia
Poklasis Heterodonta
Būrys Mytiloidea
Šeima Mytilidae
Pošeimis Mytilinae
Gentis *Mytilus*

Mytilus genties moliuskai plačiai paplitę šiauriniame ir pietiniame žemės pusrutuliuose, vidutinio ir arktinio klimato jūrose. Šiaurės rytų Atlanto vandenyne jie aptinkami nuo Arkties iki Viduržemio jūrų. Midijų dydis labai priklauso nuo vandens druskingumo. Didžiausi *Mytilus* genties moliuskai užauga net iki 15-20 cm, esant mažam druskingumui midijos teužauga tik iki 2-3 cm. Dauguma moliuskų gyvena sublitoralinėje zonoje, tačiau nemažai midijų aptinkama ir jūrų litoralėje. Prie akmenų, uolų ir kitokio substrato midijos tvirtinasi tvirtomis gijomis, bisuso siūlais, kurie susiformuoja iš moliusko kojoje esančių bisuso liaukų gaminamo kietėjančio lipnaus skysčio. Midijos dauginasi gegužės – spalio mėnesiais priklausomai nuo temperatūros ir srovių. Per vieną kartą patelė išleidžia nuo 5 iki 12 mln. ikrelių. Po apvaisinimo vystosi plaukiojanti lerva trochofora. Pas tokią lervą formuojasi žiuželiai. Po kelių dienų trochofora išsivysto į veligerio lervą. Po 4-6 savaičių susiformuoja juvenylinė moliusko stadija. Dar po kelių savaičių moliuskas pradeda dreifuoti vandenyje. Galiausiai bisuso gijomis prisitvirtina prie kieto substrato. Mytilidae šeimos moliuskų diploidinis chromosomų rinkinys $2n=28$ (Thiriot-Quiévreux et al., 1989).

Antinė geldenė – *Anodonta anatina* Müller, 1774

Klasė Bivalvia
Būrys Unionoidea
Antšeimis Unionacea
Šeima Unionidae
Gentis *Anodonta*

Unionacea antšeimio moliuskai viena iš dažniausių ir tankiausiai paplitusių Europoje, Azijoje, Šiaurės Amerikoje (Graf, Cummings, 2007). Užauga iki 23 cm ilgio, gyvena įsirausę dumble ar smėlyje. Lervos tvirtinasi prie žuvų kūno ir taip migruoja, o po kelių savaičių subrendusios, nukrenta ant dugno. Lyginant su kitomis šios šeimos rūšimis, šie moliuskai pasižymi mažu jautrumu aplinkos taršai (Piechocki, Dyduch-Falniowska, 1993). *Anodonta anatina* kariotipas $2n=38$ (Woznicki, Jankun, 2004).

2.3. Aplinkos genotoksiškumo ir citotoksiškumo tyrimai taikant aktyvų monitoringą

Eksploatuojamų Šiaurės jūroje naftos telkinių zonose buvo vertinamas genocitotoksinis į aplinką patenkančių teršalų poveikis. Tam, kad išvengti organizmų adaptacijų prie chroniškai teršiamos naftos grėžinių aplinkos, tyrimuose naudotas aktyvus monitoringas (organizmų perkėlimas iš sąlyginai švarių vietų arba akvakultūrų į skirtingas naftos platformų zonas) (2.3.1. lentelė).

2.3.1. lentelė. Aktyvaus monitoringo tyrimų vietos ir medžiaga.

Tirtų organizmų rūšis/skaičius/ląstelės	Tyrimų vieta/poveikio laikas	Laikymo varžose vieta/atstumas nuo taršos šaltinio
<i>Gadus morhua</i> 60 kepenų eritrocitai <i>Mytilus edulis</i> 60 hemocitai	Staffjord B 6 savaitės	500, 1000 ir 10000 metrų Kontrolinė grupė Iki poveikio grupė
<i>Mytilus edulis</i> 93 hemocitai	Ekofisk 6 savaitės	1 stotis (1600 m PV*) 2 stotis (600 m PV) 3 stotis (arti išleidėjo) 4 stotis (arti išleidėjo) 5 stotis (1100 m ŠR*) 6 stotis (2000 m ŠR) Kontrolinė grupė už 20000 m
<i>Mytilus edulis</i> 50 žiaunų ląstelės	Karmsund 4 savaitės	1 stotis (toli į pietvakarius nuo išleidėjo), 2 stotis (į rytus nuo išleidėjo), 3 stotis (arti išleidėjo) Kontrolinė grupė (Forlandsfjorden) Iki poveikio (Forlandsfjorden)

*PV – į pietvakarius, ŠR – į šiaurės rytus nuo išleidėjo

2.3.1. Statfjord B naftos platformos taršos poveikio analizė

Midijos ir Atlantinės menkės šiam eksperimentui buvo atvežtos iš veisyklos. Bazinis branduolio pažaidų lygmuo nustatytas 20 midijų ir 20 menkių individų. Po 6 parų aklimatizacijos, 2004 metų rugpjūčio-spalio mėn. atskirai po 10 moliuskų ir žuvų individų buvo patalpinta į tinklinius narvus (2.3.1.1. pav.) ir panardinta 500, 1000, 10000 m atstumais nuo Statfjord B naftos platformos. Kontrolinės grupės po 10 midijų ir menkų individų panardintos į sąlyginai švarią piečiau nuo naftos platformos esančią zoną (už 20 km nuo platformos). Tyrimų metu vandens temperatūra siekė 12-15 °C. Tokiu būdu iš viso buvo tiriama 60 *M. edulis* ir 60 *G. morhua* individų. Po 6 savaičių varžose laikytos žuvis bei moliuskai buvo preparuojami. Paruošti menkių kepenų ir moliuskų hemolifmos ląstelių preparatai, žaliavinės Statfjord B naftos platformos genocitotoksiškumo tyrimams atlikti.



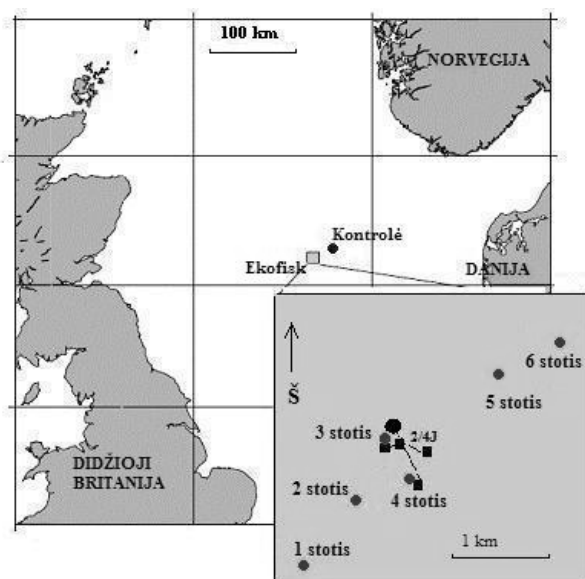
2.3.1.1. pav. Aktyvaus monitoringo metu naudojami tinkliniai narvai.

2.3.2. Ekofisk naftos platformos taršos zonose išleidžiamų gamybinių vandenų poveikio analizė

Tiriant Šiaurės jūroje esančios Ekofisk naftos platformos poveikį biotai, tyrimuose kaip bioindikatoriniai organizmai naudotos veisykloje augintos

midijos. Atvežti moliuskai, prieš perkeliant į Ekofisk naftos platformos zoną, 6 paras aklimatizuoti IRIS eksperimentinio centro akvariumuose. Eksperimento metu, kuris vyko 2006 metų 04.03 – 05.21 dienomis, moliuskai transportuoti į naftos platformos vietą, patalpinti į 7 narvus, kurie nuleisti į skirtingu atstumu nuo Ekofisk naftos platformos nutolusias zonas. Šeši narvai su juose esančiais moliuskais išdėstyti naftos platformos zonoje atsižvelgiant į vandens sroves, naftos platformos artumą bei išleidžiamus gamybinius vandenis (stotys – 1, 2, 3, 4, 5, 6). Kontrolinė (K) moliuskų grupė patalpinta 20 km atstumu nuo naftos platformos.

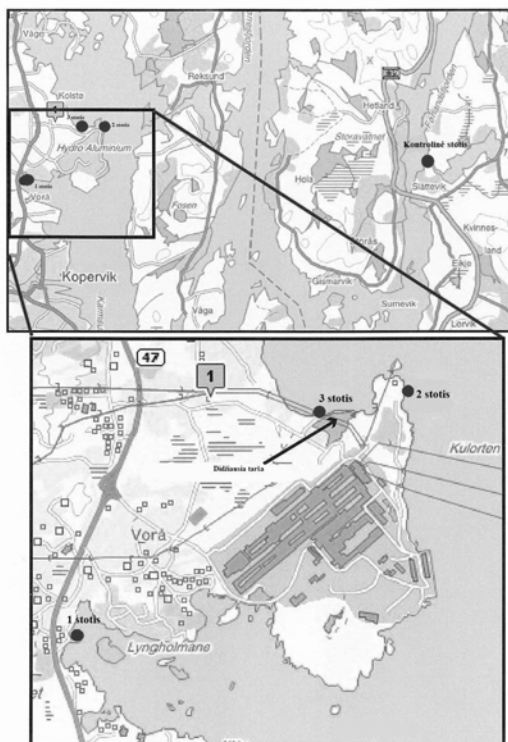
Arčiausiai nuo naftos platformos išleidžiamų GV buvo trečioji (vakarų kryptimi nuo esančio išleidėjo) ir ketvirtoji (pietų kryptimi nuo 2/4J išleidėjo) esančios stotys. Pirmoji (1600 m) ir antroji (600 m) stotys buvo į pietvakarius nuo platformos. Penktoji (1100 m) ir šeštoji (2000 m) stotys į šiaurės rytus nuo naftos platformos (2.3.2.1. pav.). Po 6 savaičių moliuskai iškelti, paimta hemolimfa, paruošti preparatai Ekofisk naftos platformos geno-citotoksiškumo poveikio nustatymui.



2.3.2.1. pav. Moliuskų laikymo varžose stotys esančios Ekofisk naftos platformos zonoje.

2.3.3. PAA ir sunkiųjų metalų poveikis taršos gradiente Karmsund fjordų sistemoje

Naftos platformų aplinkoje nustatomų poliaromatinių angliavandenilų bei sunkiųjų metalų poveikis tirtas Karmsund fjordų sistemoje ties Hogevarde (Šiaurės jūra) (2.3.3.1. pav.).



2.3.3.1. pav. Midijų laikymo varžose Karmsund fjordų sistemoje schema.

Čia dėl intensyvios laivybos į aplinką patenka daug naftos produktų ir stebimas ypač didelis užterštumas PAA ir sunkiaisiais metalais. Be to, aliuminio perdirbimo gamykla kasmet išmeta 450 kg pirogeninių PAA (Beyer et al., 1998). *M. edulis* moliuskai buvo surinkti neužterštoje Forlandsfjorden zonoje ir po 10 individų, 2007 m. rugpjūčio 20 dieną, keturioms savaitėms patalpinti į skirtingas Karmsund fjordų sistemoje pasirinktas stotis (1, 2 ir 3 stotys), atsižvelgiant į atstumus nuo taršos šaltinio. Kontrolinė grupė perkelta atgal į Forlandsfjorden zoną. Prieš perkelti moliuskus į Karmsund zonas

nustatytas bazinis branduolio pažaidų lygis. Po keturių savaičių (2007 m. rugsėjo 18, 20, 21 dienomis) moliuskai iš varžų buvo iškelti, išpreparuotos žiaunos, iš kurių paruošti preparatai PAA ir sunkiųjų metalų genotoksinio ir citotoksinio poveikio nustatymui.

2.4. Naftos platformų zonose randamų teršalų genotoksinio ir citotoksinio poveikio laboratoriniai tyrimai

Laboratoriniai eksperimentai buvo atliekami Norvegijos Stavangerio tarptautinių tyrimų instituto eksperimentinėje bazėje ir Gamtos tyrimų centro Ekologijos instituto, Hidrobiontų ekologijos ir fiziologijos laboratorijoje.

Norvegijos Stavangerio tarptautinių tyrimų instituto eksperimentinėje bazėje žuvis ir moliuskai atliekant tyrimus buvo atvežti iš veisyklų, tačiau eksperimentinės kontrolės patikslinimui naudoti organizmai ir iš natūralių populiacijų. Laboratoriniai tyrimai buvo atlikti šiuolaikiškai įrengtame eksperimentiniame centre, kuriame įrengta automatinė teršalų dispersijos ir padavimo sistema (Sanni et al., 1998). Akvariumuose (400 ir 600 l) naudota automatizuota pratekančio jūros vandens eksperimentinė sistema, kuri palaiko pastovią jūros vandens temperatūrą, teršalų koncentraciją, vandens pH, ištirpusio deguonies kiekį. Vandens temperatūra eksperimentų metu siekė 11 °C, o druskingumas buvo 34‰. Į akvariumus vanduo buvo pompuojamas pro smėlio filtrus iš 80 metrų gylio.

Po aklimatizacijos, eksperimentinės individų grupės buvo veikiamos iš įvairių naftos platformų išgauta žaliavine nafta, naftos platformose susidariusiais gamybiniais vandenimis, poliaromatinių angliavandenilių ir alkilfenolių skirtingų koncentracijų mišiniais. Naftos platformose susidarantys teršalai į visus eksperimentinius akvariumus buvo paduodami automatiškai naudojant peristaltinius *Watson Marlow 2058* siurblius, kurių tefloninių mikrovamzdelių skersmuo 0,76 mm. Tirtų teršalų koncentracijos, buvo sumodeliuotos pagal tas, kurios randamos naftos platformų aplinkoje (2.4.1. lentelė). Tyrimų eigoje moliuskai buvo šeriami kriptofitinių *Rhodomonas baltica* ir izochrizinių *Isochrysis galbana* dumblių mišiniu.

Gamtos tyrimų centro Ekologijos instituto, Hidrobiontų ekologijos ir fiziologijos laboratorijoje tyrimai buvo atliekami naudojant požeminio gręžinio vandenį ir kiekvieną dieną atnaujinant tiriamų medžiagų koncentracijas. Tyrimų metu ištirpusio deguonies kiekis, temperatūra bei pH buvo stabilūs. Eksperimentų metu naudotos Žeimenos žuvų ūkyje įsigytos žuvys.

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

Tirtų organizmų rūšys/ individų skaičius/ląstelės	Poveikio laikas/ medžiaga	Koncentracijos
<i>Scophthalmus maximus</i> 44 <i>Gadus morhua</i> 56 kraujo ir inkstų eritrocitai	3 savaitės Statfjord B žaliavinė nafta	0,5 ppm ŽN* 0,5 ppm ŽN+8AF* (0,1 µg/l) + 11PAA* (0,0915µg/l) 30 ppb NF* , Kontrolė
<i>Mytilus edulis</i> 41 žiaunų ląstelės	3 savaitės Statfjord B žaliavinė nafta	0,5 ppm ŽN* 0,5 ppm ŽN+8AF* (0,1 µg/l) + 11PAA* (0,0915µg/l) 30 ppb NF* , Kontrolė
<i>Mytilus edulis</i> 40 žiaunų ląstelės	1, 2, 4 ir 8 d. Statfjord B žaliavinė nafta	0,5 ppm ŽN , Kontrolė
<i>Scophthalmus maximus</i> 120 kepenų eritrocitai	4 ir 8 savaitės Arktinė žaliavinė nafta (Barento jūra)	10, 40, 120, 360 ir 720 ppb Kontrolė
<i>Perca fluviatilis</i> 40 kraujo eritrocitai <i>Anodonta anatina</i> 40 žiaunų ląstelės	10 d. Minijos žaliavinė nafta	0,25; 0,5 ir 1,0 ppm Kontrolė
<i>Gadus morhua</i> 140 kepenų ir inkstų eritrocitai	2 savaitės Oseberg C žaliavinė nafta ir gamybiniai vandenys	4AF mišinio (2, 10 ir 2000 ng/l) 9AF mišinio (37 µg/l) 0,2 ppm ŽN + 9AF* (37 µg/l) + 21PAA* (12 µg/l) 1:200 ir 1:1000 (GV) 0,2 ppm ŽN , Kontrolė
<i>Oncorhynchus mykiss</i> 40 kraujo eritrocitai	14 d. Sunkiųjų metalų modelinis mišinys	21,79%, 10,89%, 5,45%, ir 1,1% Kontrolė
<i>Oncorhynchus mykiss</i> 104 kraujo eritrocitai	4 d. poveikis Cinko ir vario mišinys 4, 8 ir 12 d. apsivalymas	0,06; 0,125 ir 0,25 mg/l Kontrolės

ŽN – žaliavinė nafta, 8AF – 8 skirtingų alkilfenolių mišinys, 11PAA* – mišinys iš 11 skirtingų PAA, NF – nonilfenolis, 9AF* – 9 skirtingų alkilfenolių mišinys, 21PAA* – mišinys iš 21 skirtingo PAA, GV – gamybiniai vandenys, d. – dienos

2.4.1. Žaliavinės naftos genotoksinio ir citotoksinio poveikio tyrimai

Tyrimuose naudota skirtingose naftos platformose (Statfjord B, Oseberg C – Šiaurės jūra, Arktinė – Barenco jūra ir Minijos grėžinio – Lietuva) išgaunama žaliavinė nafta. Kaip bioindikatoriniai organizmai buvo tirti moliuskai (*M. edulis*, *A. anatina*) ir žuvis (*G. morhua*, *S. maximus*, *P. fluviatilis*).

Statfjord B platformos nafta

Analizuojant žaliavinės Statfjord B platformoje išgaunamos naftos skirtingų koncentracijų geno-citotoksinį poveikį, kaip bioindikatoriai naudotos: *Mytilus edulis*, *Scophthalmus maximus* ir *Gadus morhua* rūšys. Pirmo eksperimento metu midijos buvo išgytos Stavangeryje esančioje „Neptun“ veisykloje. 2002 metų rugsėjo-spalio mėn., 41 *M. edulis* individas, 3 savaites buvo veikiamas 0,5 ppm Statfjord B žaliavinės naftos koncentracija, 0,5 ppm žaliavinės naftos ir alkilfenolių bei PAA mišiniu ($\Sigma=0,1$ ppm) ir 30 ppb nonilfenoliu (2.4.1. lentelė). Žaliavinės naftos sudėtis pateikta Sund su bendraautoriais darbe (2006). Dėl mikroorganizmų infekcijos kontrolinėje midijų grupėje, 2002 metais (lapkričio-gruodžio mėn.) buvo atliktas pakartotinas eksperimentas. Moliuskai tyrimams buvo surinkti kontrolinėje Forlandsfjorden zonoje. Tris savaites, po 11 valgomųjų midijų individų, veikti žaliavinės Statfjord B naftos 0,5 ppm koncentracija, taip pat 0,5 ppm ŽN, alkilfenolių ($\Sigma=0,1$ ppm) ir PAA mišiniu. Žaliavinės naftos, alkilfenolių ir PAA (ŽN+AF+PAA) mišinys sudarytas atsižvelgiant į Statfjord B naftos platformos gamybiniuose vandenyse esančių alkilfenolių sudėtį. PAA mišinio nominali koncentracija buvo 0,0915 $\mu\text{g/l}$, o alkilfenolių 0,1 $\mu\text{g/l}$ (Sundt et al., 2006). Kontrolinė moliuskų grupė buvo laikoma akvariumuose su švariu filtruotu jūros vandeniu.

Statfjord B naftos genotoksinis ir citotoksinis poveikis žuvims nagrinėtas 56 Atlantinių menkių ir 44 otų individuose. Atskiros eksperimentinės žuvų grupės atvežtos iš akvakultūrų ir po 2 savaičių aklimatizacijos, 3 savaites buvo veikiamos 0,5 ppm ŽN koncentracija, taip pat 0,5 ppm ŽN, alkilfenolių ($\Sigma=0,1$ ppm) ir 11 PAA mišiniu bei 30 ppb nonilfenolio koncentracija (2.4.1. lentelė). Žaliavinės naftos, alkilfenolių ir PAA mišinyje, alkilfenolių nominalios koncentracijos buvo 0,1 $\mu\text{g/l}$, o PAA – 0,0915 $\mu\text{g/l}$ (Sundt et al., 2006).

Kontrolinė žuvų grupė buvo laikoma akvariumuose naudojant filtruotą jūros vandenį. Po 3 savaičių poveikio iš žuvų uodeginės venos buvo paimtas kraujas bei išskrodus žuvis – mažas inkstų priekinės dalies gabalėlis preparatų ruošimui.

Papildomai Statfjord B platformoje išgaunamos žaliavinės naftos genocitotoksinis poveikis buvo nagrinėtas midijose po 1, 2, 4 ir 8 dienų poveikio 0,5 ppm ŽN koncentracija. *M. edulis* moliuskai buvo surinkti Forlandsfjorden zonoje, kuri ankstesniuose ekotoksikologiniuose tyrimuose naudota, kaip kontrolinė vieta (Baršienė et al., 2004, Baršienė, Andreikėnaitė, 2007). 9 dienas taikyta aklimatizacija. Kontrolinė moliuskų grupė buvo laikoma akvariumuose su švairiu jūros vandeniu.

Arktinė nafta

2007 metų lapkričio (14-15 d.) pradėtas eksperimentas, kurio metu iki poveikio arktine nafta juvenylinės stadijos otų (*S. maximus*) grupėje atlikta bazinio lygio branduolio pažaidų analizė. Vėliau, eksperimentinės otų grupės 4 ir 8 savaites buvo veikiamos arktinės žaliavinės naftos (išgaunamos Barenco jūroje) 10, 40, 120, 360 ir 720 ppb koncentracijomis (2.4.1. lentelė). Po 4 savaičių poveikio – 2007 m. gruodžio 10 d. ir po 8 savaičių (2008 sausio 9 d.) otai buvo išskrosti. Iš mažo kepenų gabalėlio tolygiai paskirstant ląsteles ant objektinio stiklelio buvo padaryti tepinėliai bei atlikta branduolio pažaidų analizė.

Minijos gręžinio nafta

Tyrimai atlikti Gamtos tyrimų centro Ekologijos instituto laboratorijoje. Tyrimuose naudotos HEF laboratorijoje užaugintos 3 metų žuvis. Moliuskai surinkti iš sąlyginai švarios vietos, kuri ankstesniais tyrimais naudota kaip kontrolinė vieta (Baršienė, 1994). Po kelių dienų aklimatizacijos 40 gėlavandenių moliuskų *A. anatina* ir 40 paprastojo ešerio (*P. fluviatilis*) individų 10 dienų buvo veikiami Minijos naftos gręžinio (Lietuva) 0,25; 0,5 ir 1 ppm žaliavinės naftos koncentracijomis (2.4.1. lentelė). Tyrimai vykdyti 40 l talpos akvariumuose.

2.4.2. Žaliavinės naftos ir platformose susidarančių gamybinių vandenų genotoksinio ir citotoksinio poveikio tyrimai

Atlantinės menkės į IRIS eksperimentinį centrą buvo atvežtos iš Norvegijos „Troms Marine Yngel AS“ žuvinaisos centro. Devynias dienas truko žuvų aklimatizacija, eksperimentinis poveikis vykdytas 15 dienų, naudojant iš Oseberg C platformos į aplinką patenkančius teršalus. Atsižvelgiant į alkilfenolių ir poliaromatinių angliavandenilių koncentracijas randamas šio naftos gręžinio gamybiniuose vandenyse sumodeliuoti alkilfenolių bei PAA mišiniai (IRIS duomenys). Naudotos trys skirtingos keturių alkilfenolių mišinio (4-tert-butilfenolio, 4-n-pentilfenolio, 4-n-heksilfenolio ir 4-n-heptilfenolio) koncentracijos (2, 10 ir 2000 ng/l). Be to, naudota devynių skirtingų alkilfenolių (9AF): 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 mišinio 37 µg/l koncentracija. Taip pat, menkės buvo paveiktos 0,2 ppm disperguota Oseberg C platformos žaliavine nafta bei minėtosios žaliavinės naftos (0,2 ppm) + 9 AF (37 µg/l) + 21 PAA (12 µg/l) modeliniu mišiniu. Mišinyje naudotas 21 skirtingas PAA junginys („Rezultatų aptarimas“ 4.2.3.2. lentelė). Papildomai žuvis buvo veikiamos dvejomis gamybinių vandenų koncentracijomis (1:200 bei 1:1000), kurios apskaičiuotos imituojant 200 ir 1000 metrų nuo Oseberg C naftos platformos atstumus (2.4.1. lentelė).

Oseberg C naftos platformos GV buvo surinkti prie išleidėjo, supilti į plastmasinius 25 l talpos indus ir nugabenti į IRIS tyrimų centrą. Iki pradėdant eksperimentą buvo užšaldyti ir laikyti prie – 30°C. Pradėjus tyrimą, GV buvo atšildyti ir sumaišyti naudojant *Eurostar Power control-visc* maišytuvą. Maišymas vykdytas prie 9°C tam, kad išvengtų junginių degradacijos. Naudojant *Watson Marlow 505 S* peristaltinę pompą, GV paduoti į akvariumus su eksperimentinėmis žuvų grupėmis. Tyrimų metu sunaudota apie 1300 l gamybinio vandens.

2.4.3. Sunkiųjų metalų genotoksinio ir citotoksinio poveikio tyrimai

Sunkiųjų metalų geno-citotoksinis poveikis analizuotas vaivorykštinio upėtakio (*Oncorhynchus mykiss*) kraujo ir inkstų eritrocituose. Sumodeliuoto sunkiųjų metalų modelinio mišinio (SMMM), kurio 100 % tirpalo 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% koncentracijos (2.4.1. lentelė) (Vosyliienė, Jankaitė, 2006).

2008-ųjų metų gegužės ir birželio mėnesiais vykdytas eksperimentas, kurio metu, įvertintas sunkiųjų metalų Zn ir Cu mišinio (1:1), skirtingų koncentracijų (0,06; 0,125 ir 0,25 mg/l) bei skirtingos jų poveikio trukmės geno-citotoksinis poveikis *O. mykiss* eritrocituose. Po 10 vaivorykštinio upėtakio individų 4 dienas veikti skirtingomis cinko ir vario koncentracijomis. Po 4 dienų iš žuvų uodeginės venos buvo paimtas kraujas bei padaryti tepinėliai. Branduolio pažaidų pokyčiai buvo nagrinėjama ir po 4, 8 ir 12 dienų *O. mykiss* laikymo švariame vandenyje.

Gamtos tyrimų centro Ekologijos instituto, HEF laboratorijoje atliktų eksperimentų metu kontrolinės grupės laikytos akvariumuose naudojant giluminio grėžinio vandenį. Vanduo akvariumuose buvo keičiamas kiekvieną dieną, naujai suformuojant tiriamas sunkiųjų metalų koncentracijas. Žuvys eksperimento eigoje buvo maitinamos „DANA FEED“ žuvų maistu.

2.5. Branduolio pažaidų analizė

Mikrobranduolių ir kitų branduolio pažeidimų analizei buvo naudojamos dvigeldžių moliuskų *Mytilus edulis* ir *Anodonta anatina* žiaunų ir hemolimfos ląstelės. Švirksčiu iš moliuskų kiautų suveriamojo raumens buvo paimta hemolimfa ir paruošti tepinėliai analizei. Išskrodus moliuskus paimtas vienas žiaunų lapelis ir patalpintas į Karnua fiksatorių užlašintą ant objekcinio stiklelio. Švelniai su pincetu purtant žiaunų lapelį išgauta ląstelių suspensija, kuri tolygiai paskirstyta po visą objekcinį stiklelį.

Žuvų periferinio kraujo eritrocitų mikrobranduolių ir kitų branduolio pažeidimų analizei kraujas buvo imamas iš uodeginės venos heparinizuotu

švirksčiu. Užlašinus kraujo lašą ant objektinio stiklelio su špateliu padaromas kraujo tepinėlis. Kitų tirtų audinių ląstelių tepinėliai paruošiami naudojant mažą priekinės inkstų ar kepenų dalies gabalėlį ir tiesiogiai paskirstant ląsteles ant objektinio stiklelio (Baršienė et al., 2004).

Paruošti moliuskų ir žuvų ląstelių preparatai džiovinami horizontalioje padėtyje ir fiksuojami metanolyje (ne trumpiau 10–15 min.), vėliau dažomi 4% Gimzos dažų tirpale. Ruošiant dažų tirpalą naudotas fosfatinis buferis (pH=7). Preparatai dažomi 20–60 minučių specialiose kamerose. Nudažyti preparatai buvo perplaunami po vandens srove, džiovinami ir peržiūrimi Olympus BX 51 arba Nikon 50i mikroskopu, naudojant 1000× padidinimą. Tyrimų metu vertinamas mikrobranduolių (MB), branduolio pumpurų (BP), fragmentuotų-apoptozinių (FA) ir dvibranduolių (DB) ląstelių dažnis moliuskuose analizuojant 2000 ląstelių, žuvyse – 5000 ląstelių. Be to, žuvyse įvertintas branduolio pumpurų, kurie susijungę su branduoliu nukleoplazmine jungtimi (BP_s) bei dvibranduolių eritrocitų, kurių branduoliai susijungę nukleoplazminiu tiltu (DB_t) dažnis.

Kai kurios MB ir kitus branduolio pažeidimus turinčios ląstelės buvo fotografuojamos skaitmenine Olympus DP 700 kamera (2.5.1. pav.). Genotoksinės (mikrobranduolių ir branduolio pumpurų) ir citotoksinės pažaidos (fragmentuotos-apoptozinės ir dvibranduolės ląstelės) buvo identifikuotos pagal kriterijus apibūdintus 2003 metais Fenech su bendraautoriais paskelbtame darbe.

Mikrobranduoliai (MB):

- sferinės dalelės citoplazmoje su griežtai apibrėžtu kontūru,
- diametras nuo 1/3 iki 1/20 nuo branduolio diametro,
- panašumas į branduolį pagal struktūrą ir spalvą,
- nėra jokio kontakto su ląstelės branduoliu.

Branduolio pumpurai (BP):

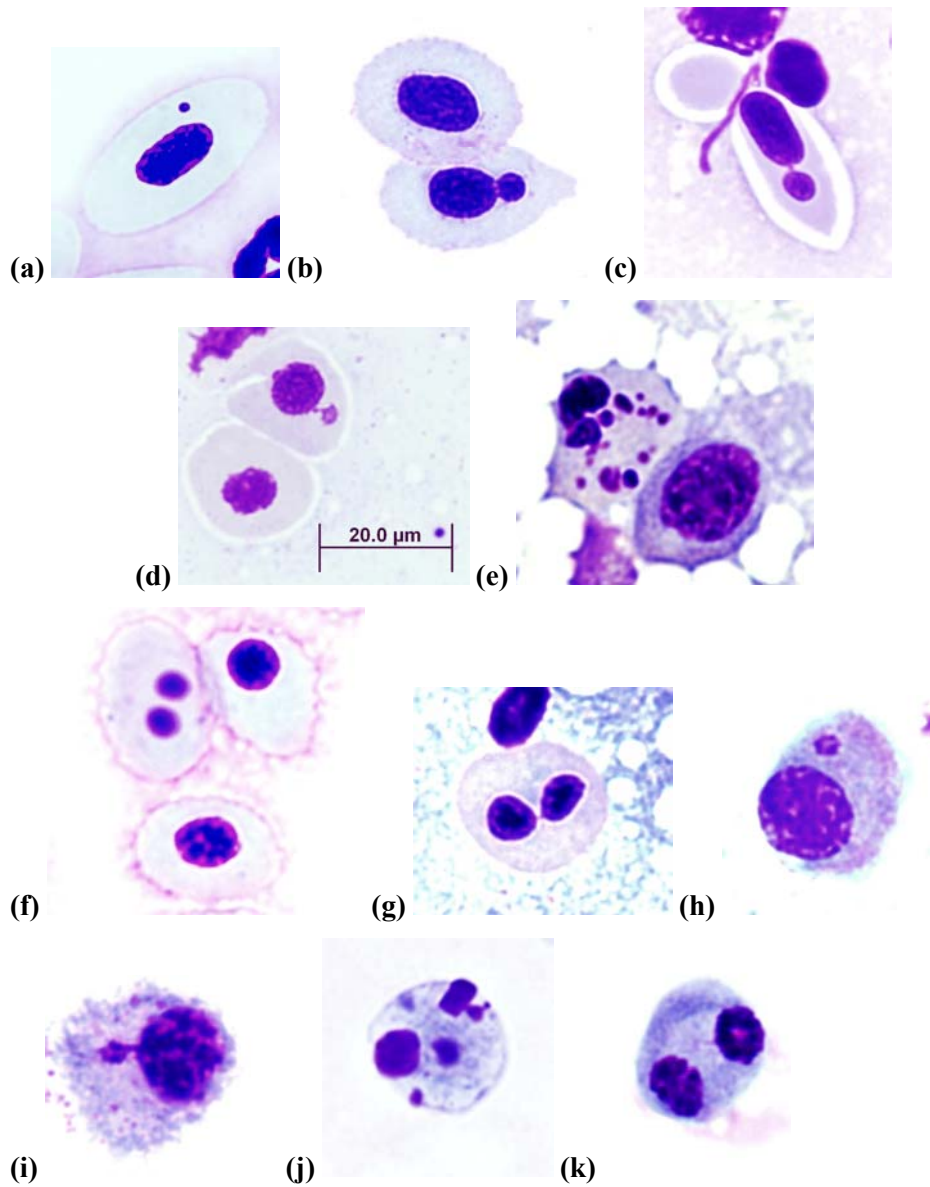
- išsiliesusi iš branduolio chromatino medžiaga, kuri yra vienodos struktūros ir spalvos kaip ir branduolys,
- panašūs į mikrobranduolį, tačiau turintys siaurą nukleoplazmos jungtį su branduoliu (BP_s).

Fragmentuotos-apoptozinės ląstelės (FA):

- ankstyvosiose stadijose – chromatino kondensacija branduolyje su pažeista branduolio membrana,
- vėlyvosiose stadijose – branduolio fragmentacija į atskirus darinius.

Dvibranduolės ląstelės (DB):

- branduoliai panašaus diametro su griežtai apibrėžtu kontūru, apsupti vienos citoplazmos ir pasidengę bendra ląstelės membrana,
- branduoliai vienodos struktūros ir spalvos,
- branduolius gali jungti nukleoplazminis tiltas, kurio diametras ne didesnis nei $\frac{1}{4}$ branduolio diametro (DB_t),
- branduoliai gali liestis, tačiau negali persidengti,
- dvibranduolių ląstelių citoplazma ar membrana, negali persidengti bei privalo raiškiai būti atsiskyrusi nuo gretimų ląstelių.



2.5.1. pav. Branduolio pažaidos: (a) mikrobranduolys (MB), (b) branduolio pumpuras (BP), (c–d) branduolio pumpuras sujungtas su branduoliu nukleoplazmine jungtimi (BP_s), (e) fragmentuota-apoptozinė ląstelė (FA), (f) dvibranduolė ląstelė (DB), (g) dvibranduolė ląstelė, kurios branduoliai tarpusavyje sujungti nukleoplazminiu tiltu (DB_i) – žuvų eritrocituose; (h) MB, (i) BP, (j) FA ir (k) DB – moliuskų ląstelėse.

Statistinė duomenų analizė buvo atlikta naudojant PRISM statistinį paketą. Apskaičiuotas kiekvienai tyrimų vietai būdingas branduolio pažaidų dažnio vidurkis (1000 ląstelių), nustatytos paklaidos. Atlikta dispersinė duomenų analizė (ANOVA) testu. Skirtumai tarp grupių buvo įvertinti naudojant neparametrinį Mann-Whitney U-kriterijų. Patikimumo lygmuo $P < 0,05$.

3. TYRIMŲ REZULTATAI

Taikant mikrobranduolių bei kitų branduolio pažaidų įvertinimo metodą laboratoriniuose eksperimentuose buvo nustatytas genotoksinis ir citotoksinis skirtingose vietose išgaunamos bei skirtingos sudėties ir koncentracijų žaliavinės naftos poveikis žuvims ir moliuskams. Taip pat, ištirtas naftos platformų gamybiniame vandenyje randamų alikilfenolių, poliaromatinių angliavandenilių mišinių bei sunkiųjų metalų poveikis. Taikant aktyvaus monitoringo principus nustatytas naftos platformų zonoje esančių teršalų genotoksinis ir citotoksinis poveikis žuvims ir moliuskams.

Genotoksinis teršalų poveikis buvo vertinamas pagal mikrobranduolių (MB) ir branduolio pumpurų (BP) susiformavimą, o citotoksinis – pagal dvibranduolių (DB) ir fragmentuotų-apoptozinių (FA) ląstelių dažnį.

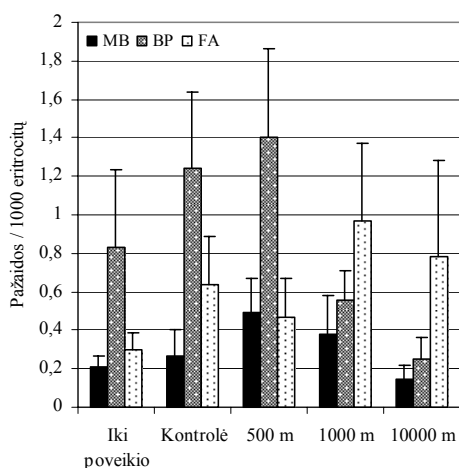
3.1. Genotoksinio ir citotoksinio teršalų poveikio nustatymas aktyvaus monitoringo būdu

Statfjord B naftos platforma. Genotoksiškumas ir citotoksiškumas šios platformos aplinkoje buvo tirtas Atlantinių menkių kepenų eritrocituose ir midijų hemocituose. Žuvys ir moliuskai 6 savaites buvo laikyti varžose nutolusiose 500, 1000 ir 10000 metrų nuo šios naftos platformos atstumais.

Po šešių savaičių laikymo skirtingose Statfjord B platformos zonos varžose Atlantinių menkių eritrocituose nustatytas genotoksinio atsako gradientas. Mažiausias mikrobranduolių (0,14 MB/1000 ląstelių) bei branduolio pumpurų (0,25 BP/1000 ląstelių) dažnis buvo žuvų kepenų eritrocituose, toje menkių grupėje, kuri buvo laikyta varžose toliausiai nutolusioje nuo Statfjord B platformos (10000 m). Didžiausias genotoksiškumo lygis (MB dažnis 0,49 MB/1000 ląstelių, o branduolio pumpurų – 1,40 BP/1000 ląstelių) nustatytas žuvyse laikytose arčiausiai (500 m) nuo Statfjord B naftos platformos. Iki poveikio grupėje bazinis MB dažnis buvo lygus 0,21 MN/1000 ląstelių (‰), BP – 0,83‰. Kontrolinės grupės menkių eritrocituose registruotas žemas MB (0,27‰), bet santykinai didelis branduolio pumpurų dažnis. Statistinis

duomenų apdorojimas parodė, kad patikimų pažaidų skaičiaus padidėjimo tarp varžose ir kontrolinėje vietoje laikytų bei iki poveikio tirtoje menkių grupėje nėra (3.1.1. pav.).

Analizuojant citotoksinį Statfjord B paltformos žaliavinės naftos poveikį, didžiausias dvibranduolių bei fragmentuotų-apoptozinių ląstelių dažnis (DB – 0,48‰, FA – 0,97‰) nustatytas žuvų kepenų eritrocituose, kurios laikytos 1000 m atstumu nuo platformos. Iki poveikio grupėje, menkių eritrocituose rasta žemiausia DB – 0,11‰ ir FA – 0,30‰ indukcija (3.1.1. pav.). Statistiškai patikimų branduolio pažaidų skirtumų nerasta.

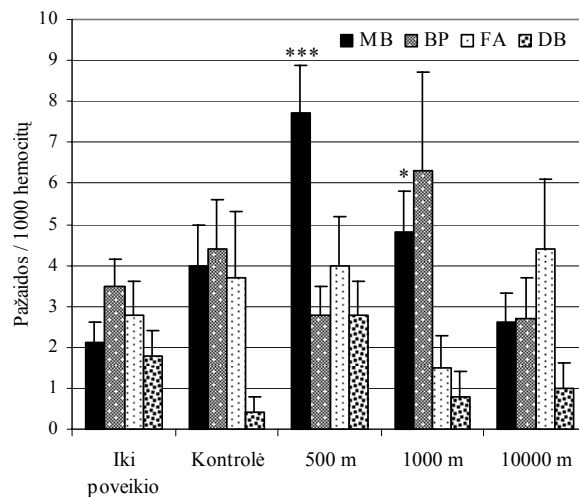


3.1.1. pav. Genotoksinių ir citotoksinių branduolio pažaidų dažnis *Gadus morhua* kepenų eritrocituose po 6 savaičių laikymo skirtingose Statfjord B naftos platformos zonose.

Palaikius 6 savaites midijas skirtingose Statfjord B naftos platformos zonose žemiausias (2,13‰) MB dažnis buvo iki poveikio grupėje bei grupėje, kuri buvo laikyta 10000 m atstumu nuo šios platformos (2,58‰), o aukščiausias atsakas rastas arčiausiai (500 m) prie Statfjord B naftos platformos laikytų moliuskų hemocituose (7,66‰). Arčiausiai naftos platformos laikytų midijų ląstelėse nustatytas MB dažnis buvo 2 kartus didesnis nei kontrolinėje moliuskų grupėje. Santykinai aukšta MB indukcija (4,8‰) buvo ir 1000 m atstumu laikytose midijose. Aukščiausias BP dažnis (6,31‰) nustatytas

midijose laikytose 1000 m atstumu nuo naftos platformos. Didžiausias citotoksinis poveikis pagal DB ląstelių susiformavimą nustatytas 500 m atstumu nuo platformos laikytų moliuskų hemocituose (2,78‰). Statistiškai patikimų citotoksiškumo skirtumų tarp grupių nenustatyta (3.1.2. pav.).

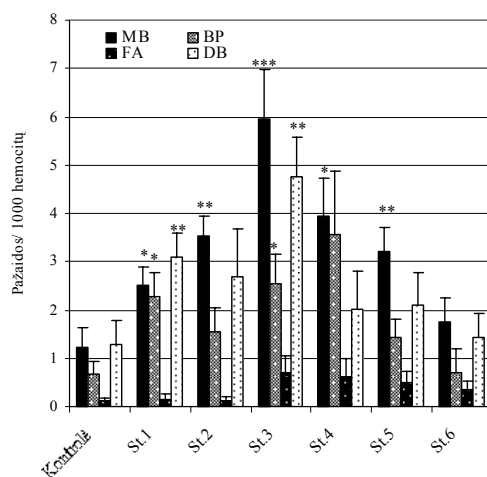
Statistiškai patikimi MB dažnių skirtumai, palyginus su iki poveikio grupe, registruoti moliuskuose laikytuose 500 ir 1000 m atstumais nuo platformos ($P=0,0004$ ir $P=0,0247$). Kontrolinėje moliuskų grupėje registruotas MB dažnis buvo žemas ir statistiškai patikimai skyrėsi ($P=0,0185$), lyginat su šiuo atsaku midijose laikytose 500 m atstumu nuo naftos platformos. Atlikta MB analizė parodė ryškų genotoksiškumo gradientą: 10000 m < 1000 m < 500 m. ANOVA dispersinės analizės testas parodė patikimus skirtumus tarp tirtų midijų grupių tik pagal MB susiformavimą $P=0,0001$, $F=6,996$, $R^2=0,3372$.



3.1.2. pav. Branduolio pažeidimų dažnis *Mytilus edulis* hemocituose po 6 savaičių laikymo skirtingose Statfjord B naftos platformos zonose.

Ekofisk naftos platforma. Naftos platformų aplinkoje susidarančių teršalų geno-citotoksinis poveikis tirtas ir kitame Šiaurės jūros naftos telkinyje. Midijos šešias savaites buvo laikytos 6 stotyse esančiose Ekofisk naftos platformos zonoje ir kontrolinėje stotyje. 3 ir 4 stotys buvo lokalizuotos arčiausiai naftos platformos teršalų išleidėjo (2.3.2.1. pav. „Medžiaga ir metodai“ skyriuje). Analizuojant branduolio pažeidimus, kontrolinės moliuskų

grupės hemocituose MB dažnis siekė 1,24‰, tuo tarpu aukščiausia mikrobranduolių indukcija (5,96‰; 4,8 karto didesnė nei kontrolėje) nustatyta moliškuose laikytuose 3 stotyje, kuri buvo arčiausiai Ekofisk platformos. Kitoje arčiausiai naftos platformos esančios 4 stoties moliškuose MB buvo aukštesnis 3,2 karto negu kontrolinėje grupėje. Nuo 2 iki 2,9 karto daugiau MB registruota moliškų hemocituose ir 2, 1 bei 5 stotyse, lyginant su kontroline grupe. Tuo tarpu, toliausiai nuo platformos nutolusioje 6 stotyje registruotas genotoksiškumo lygis buvo tik truputį aukštesnis (1,76‰) nei kontrolinėje grupėje. BP dažnis tirtų moliškų hemocituose svyravo nuo 0,68‰ (kontrolinėje grupėje) iki 3,57‰ (midijose laikytose 4 stotyje). Panaši BP indukcija kaip ir kontrolinėje midijų grupėje buvo ir toliausiai nuo naftos platformos nutolusioje 6 stotyje (3.1.3. pav.).



3.1.3. pav. Branduolio pažeidimų dažnis *M. edulis* hemocituose po 6 savaičių laikymo skirtingose Ekofisk naftos platformos zonose.

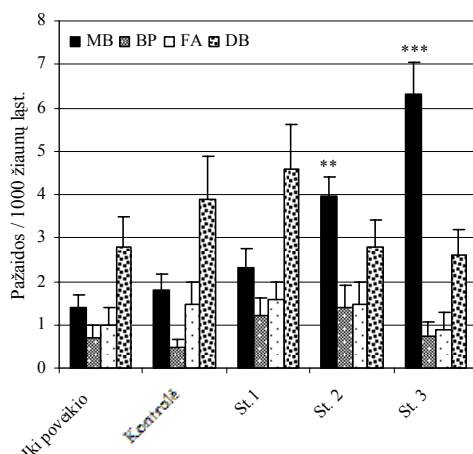
Neparametrinis Mann-Whitney U-testas parodė, kad didžiausi MB dažnių patikimumo skirtumai buvo tarp kontrolinės ir 3 stoties moliškų ($P=0,0006$). Mažesni patikimumo skirtumai registruoti tarp kontrolinės grupės bei antroje ($P=0,0014$), penktoje ($P=0,0076$), ketvirtoje ($P=0,0106$) ir pirmoje ($P=0,0437$) stotyje laikytų midijų. Statistiškai patikimi branduolio pumpurų skirtumai nustatyti 1 ir 3 stotyse ($P=0,0265$ ir $P=0,0236$) laikytose midijose.

Citotoksinis poveikis, t.y. susidariusių fragmentuotų-apoptozinių ląstelių dažnis, moliuskų hemocituose kito nuo 0,11‰ (kontrolinėje stotyje) iki 0,69‰ (3 stotyje) ir 0,61‰ (4 stotyje), kurios buvo arti platformos. Žemiausi dvibranduolių (DB) ląstelių dažniai fiksuoti kontrolinėje (1,28‰) ir 6 stotyje (1,44‰). Aukščiausias (4,77‰) DB dažnis rastas 3 stotyje laikytų moliuskų hemocituose (3.1.3. pav.). Vertinat citotoksinius Ekofiks naftos platformos efektus, Mann-Whitney U-testas parodė statistiškai patikimus DB ląstelių skirtumus moliuskuose laikytuose kontrolinėje, 1 ir 3 stotyse ($P=0,0016$ ir $P=0,0075$). Statistiškai patikimi skirtumai pagal FA rasti lyginant kontrolinės grupės ir 3 bei 4 stoties midijas.

Taršos gradiento Karmsund fjordų sistemoje nustatymas. Šio tyrimo metu *M. edulis* moliuskai iš Forlandsfjorden zonos buvo perkelti į Karmsund fjordų sistemoje esančias 3 zonas. Kontrolinės grupės midijos 4 savaites laikytos švarioje Forlandsfjorden vietoje, kadangi ir kituose projektuose ši vieta laikoma kontroline. MB dažniai midijų žiaunų ląstelėse kito nuo 1,40‰ (iki poveikio grupėje) iki 6,33‰ (3 stotyje), kuri yra arčiausiai teršalų išleidėjo. Aukščiausias branduolio pumpurų dažnis (1,4‰) rastas moliuskų žiaunų ląstelėse, kurie buvo laikyti 2 stotyje, žemiausias kontrolinės grupės moliuskuose (0,46‰). Žemas BP dažnis (0,75‰) registruotas ir 3 stotyje laikytų moliuskų žiaunose. Šioje stotyje tirtų moliuskų žiaunose gautas ir žemas citotoksinis poveikis pagal susiformavusių FA ląstelių dažnį (0,87‰). Apibendrinat Karmsund zonoje gautus rezultatus galima konstatuoti, kad pagal mikrobranduolių indukciją nustatytas aplinkos genotoksiškumo gradientas $1 < 2 < 3$ stotyse (3.1.4. pav.).

Taikant nparametrinį Mann-Whitney U-testą didžiausi MB patikimumo skirtumai rasti tarp iki poveikio grupės bei 3 ir 2 stotyse laikytų midijų, atitinkamai ($P < 0,0001$), ($P = 0,002$). Palyginus kontrolinę bei skirtingose varžose laikytų moliuskų grupes, patikimi MB skirtumai nustatyti tarp kontrolinės ir 3 ($P < 0,0001$) taip pat 2 stoties midijų ($P = 0,0003$). Statistiškai patikimų genotoksiškumo parametrų skirtumų 1 stoties moliuskuose nerasta.

ANOVA dispersinės analizės testas parodė patikimus MB skirtumus tarp tirtų midijų $P < 0,0001$, $F = 19,96$, $R^2 = 0,6396$.



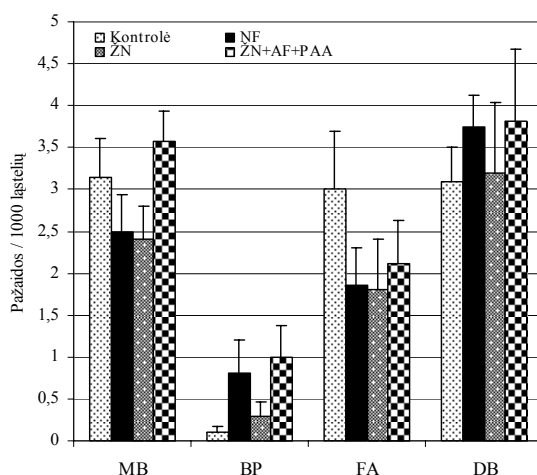
3.1.4. pav. Branduolio pažaidų dažnis *M. edulis* žiaunų ląstelėse po 4 savaičių laikymo Karmsund fjordų sistemoje.

3.2. Eksperimentiniai genotoksinio ir citotoksinio naftos pramonės teršalų poveikio tyrimai

3.2.1. Skirtingose naftos platformose išgaunamos žaliavinės naftos poveikis

Statfjord B nafta – *M. edulis*. Genotoksinis ir citotoksinis šioje platformoje išgaunamos žaliavinės naftos poveikis įvertintas midijų žiaunų ląstelėse, Atlantinių menkių ir otų kraujo bei inkstų eritrocituose. Su midijomis buvo atlikti du eksperimentai, kadangi pirmojo metu kontrolinės grupės moliuskų žiaunose buvo nustatyti mikroorganizmai, kurie sąlygojo santykinai didelį geno-citotoksiškumo atsaką, tad eksperimentas buvo pakartotas. Pirmojo eksperimento duomenis pateikiame savo darbe, kadangi jie tiesiogiai rodo infekcijų sukeltą geno-citotoksinį poveikį moliuskuose, kas yra svarbu žinoti atliekant tiek eksperimentinius, tiek ir lauko tyrimus. Pirmo eksperimento metu *M. edulis* tris savaites buvo veikti 0,5 ppm žaliavinės naftos (ŽN), 0,5 ppm žaliavinės naftos, alkilfenolių (AF) ir poliaromatinių angliavandenilių (PAA) mišiniu (ŽN+AF+PAA) bei 30 ppb nonilfenolio (NF)

koncentracija. Registruoti MB dažniai svyravo nuo 2,40‰ veikiant (ŽN) iki 3,58‰ po poveikio (ŽN+AF+PAA) mišiniu. MB dažniai moliuskų žiaunų ląstelėse po poveikio 30 ppb NF bei 0,5 ppm ŽN buvo – 2,5‰, tuo tarpu kontrolinėje grupėje siekė net 3,15‰. Didžiausia BP ir DB indukcija rasta paveikus midijas ŽN+AF+PAA mišiniu, mažiausia kontrolinėje grupėje. Aukščiausias FA ląstelių dažnis rastas kontrolinės grupės moliuskuose (3.2.1.1. pav.).

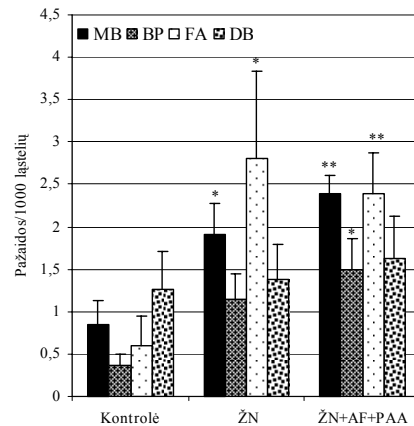


3.2.1.1. pav. Branduolio pažaidų dažnis *M. edulis* žiaunų ląstelėse po 3 savaičių poveikio nonilfenoliu (NF), 0,5 ppm Statfjord B žaliavine nafta (ŽN), taip pat žaliavine nafta, alkilfenolių (AF) ir poliaromatinių angliavandenilių (PAA) mišiniu (pirmasis eksperimentas).

Taikant neparametrinį Mann-Whitney U-testą MB dažnių patikimumo skirtumai gauti tik tarp midijų grupių, kurios buvo paveiktos 0,5 ppm ŽN ir 0,5 ppm ŽN+AF+PAA mišiniu ($P=0,0346$).

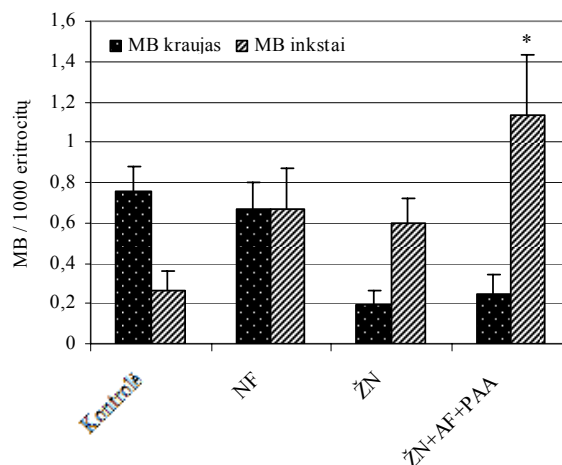
Atlikus antrąjį eksperimentą, kontrolinėje moliuskų grupėje nustatytas DB ląstelių dažnis buvo 2,4 karto, MB bei BP – 3,7 karto, o FA ląstelių dažnis net 5 kartus žemesnis nei pirmojo eksperimento metu. Žemiausios tirtų parametru vertės, antro eksperimento metu, rastos kontrolinėje grupėje, o aukščiausios nustatytos po poveikio 0,5 ppm ŽN+AF+PAA mišiniu (3.2.2.2. pav.). Naudojant neparametrinį Mann-Whitney U-testą gauti statistiškai patikimi MB ir AF 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 rastas *M. edulis* žiaunų ląstelėse po poveikio ŽN+AF+PAA mišiniu (P=0,0232). ANOVA dispersinės analizės testas parodė, kad patikimi skirtumai tarp tirtų midijų grupių buvo pagal MB (P=0,003, F=7,25, R²=0,3494) ir BP (P=0,0264, F=4,168, R²=0,2359).



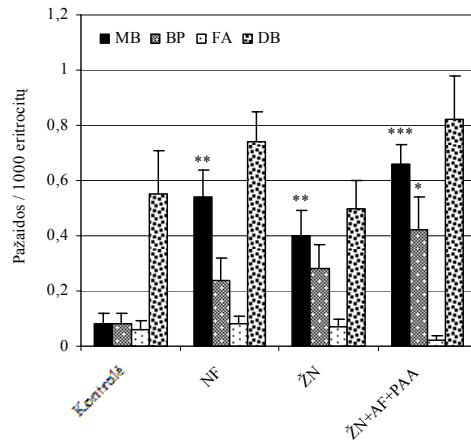
3.2.1.2. pav. Branduolio pažeidimų dažnis *M. edulis* žiaunų ląstelėse po 3 savaičių poveikio, Statfjord B žaliavine nafta (ŽN), taip pat žaliavine nafta, alkilfenolių (AF) ir poliaromatinių angliavandenilių (PAA) mišiniu (antrasis eksperimentas).

Statfjord B nafta – *G. morhua*. Po 3 savaičių poveikio 0,5 ppm ŽN Atlantinių menkių inkstų eritrocituose nustatyta MB indukcija buvo 2,3 karto didesnė negu kontrolinėje grupėje. Aukštesnis MB dažnis (4,3 karto) registruotas inkstų eritrocituose veikiant menkes 0,5 ppm ŽN+AF+PAA mišiniu. Po poveikio 0,5 ppm ŽN bei 0,5 ppm ŽN+AF+PAA mišiniu žuvų kraujo eritrocituose rastas MB dažnio sumažėjimas, palyginus su kontrole. Paveikus žuvis nonilfenoliu abėjuose žuvų audiniuose nustatyti MB dažniai buvo lygūs (0,67%) (3.2.1.3. pav.). Menkių inkstų eritrocituose Mann–Whitney *U*-testas parodė statistiškai patikimus MB skirtumus po poveikio ŽN+AF+PAA mišiniu, palyginus su kontrole.



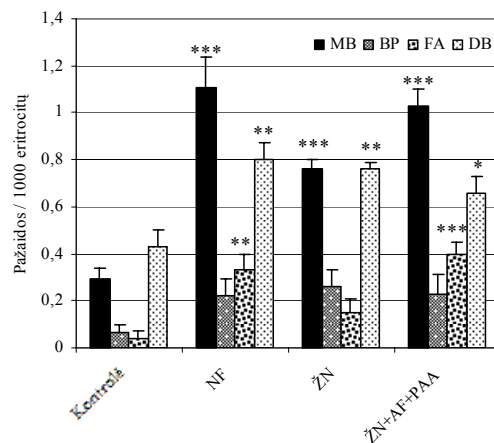
3.2.1.3. pav. MB dažnis *G. morhua* kraujo ir inkstų eritrocituose po 3 savaičių poveikio, nonilfenoliu (NF), Statfjord B žaliavine nafta (ŽN), taip pat žaliavine nafta, alkilfenolių (AF) ir poliaromatinių angliavandenilių (PAA) mišiniu.

Statfjord B nafta – *S. maximus*. Otų **kraujo** eritrocituose, po poveikio tomis pačiomis naftos koncentracijomis kaip ir veikiant Atlantines menkes, žemiausi MB ir BP (0,08‰) dažniai buvo nustatyti kontrolinės grupės žuvyse. Aukščiausi MB dažniai (0,66‰) rasti po poveikio ŽN+AF+PAA mišiniu, paveikus nonilfenoliu – 0,54‰. Be to, ŽN+AF+PAA mišinys indukavo aukščiausius BP (0,42‰) ir DB (0,82‰) lygius. Fragmentuotų-apoptozinių ląstelių dažnis buvo labai žemas visose eksperimentinėse otų grupėse (3.2.1.4. pav.). Palyginus su kontrole, statistškai patikimi MB dažnių skirtumai rasti visose poveikio 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 mišiniu (P=0,0172).



3.2.1.4. pav. Branduolio pažaidų dažnis otų kraujo eritrocituose po 3 savaičių poveikio, nonilfenoliu (NF), Statfjord B žaliavine nafta (ŽN), taip pat žaliavine nafta, alkilfenolių (AF) ir poliaromatinių angliavandenilių (PAA) mišiniu.

Kontrolinės grupės otų **inkstų** eritrocituose branduolio pažaidų dažniai buvo žemiausi: MB (0,29‰), BP (0,07‰), FA (0,04‰) ir DB (0,43‰). Aukščiausias susiformavusių MB (1,1‰) ir DB (0,8‰) dažnis buvo po poveikio 30 ppb nonilfenolio koncentracija. Visose veiktose otų grupėse BP dažniai svyravo nuo 0,22‰ iki 0,26‰. Didžiausias FA ląstelių lygis inkstų eritrocituose buvo po poveikio ŽN+AF+PAA mišiniu (0,4‰) (3.2.1.5. pav.).



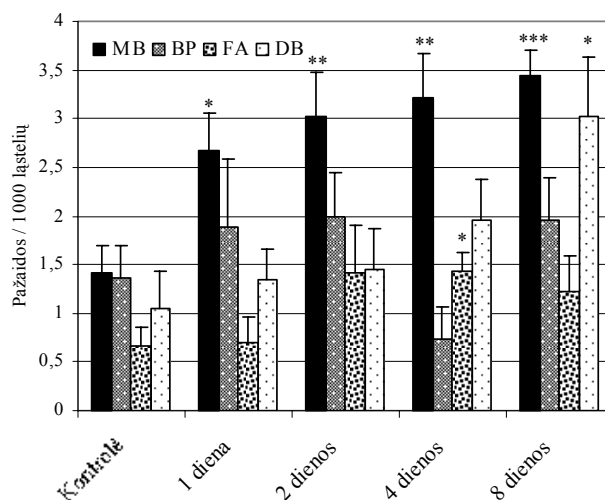
3.2.1.5. pav. Branduolio pažaidų dažnis otų inkstų eritrocituose po 3 savaičių poveikio, nonilfenoliu (NF), Statfjord B žaliavine nafta (ŽN), taip pat žaliavine nafta, alkilfenolių (AF) ir poliaromatinių angliavandenilių (PAA) mišiniu.

Palyginus su kontrolinėje grupėje gautų parametų rezultatais, statistiškai patikimos MB ir DB otų inkstų eritrocitų reikšmės gautos paveikus žuvis nonilfenoliu ir 0,5 ppm ŽN bei ŽN+AF+PAA mišiniu. Veikiant žuvis 0,5 ppm ŽN nustatyti statistiškai patikimi BP skirtumai. Nonilfenolis bei naftos ir alkilfenolių mišinys indukavo statistiškai patikimas FA ląstelių reikšmes.

Vertinant mikrobranduolių susiformavimo dažnius skirtinguose oto audiniuose (kraujo ir inkstų eritrocituose), statistiškai patikimi skirtumai gauti visose eksperimentinėse grupėse (P svyravo nuo 0,0032 iki 0,0076), tuo tarpu FA ląstelių – paveikus nonilfenoliu (P=0,0133) ir naftos, poliaromatinių anglavandenilių ir alkilfenolių mišiniu (P<0,0001) veiktose otų grupėse. Analizuojant tarprūšinius menkių ir otų MB dažnius, patikimi skirtumai nustatyti šių žuvų kraujo eritrocituose po poveikio 0,5 ppm (P=0,0385) taip pat paveikus ŽN+AF+PAA mišiniu – P=0,0067.

Geno-citotoksinio Statford B žaliavinės naftos poveikio laike įvertinimas.

Genotoksinis ir citotoksinis 0,5 ppm žaliavinės naftos poveikis tirtas *M. edulis* žiaunų ląstelėse po 1, 2, 4 ir 8 dienų ekspozicijos. Tirtų parametų mažiausios reikšmės – 1,42‰ (MB), 1,36‰ (BP), 0,67‰ (FA) ir 1,05‰ (DB) buvo nustatytos kontrolinėje grupėje. Po 8 dienų nustatytas MB kiekis buvo 2,4-karto, FA – 2 kartus, o DB – 3 kartus didesnis nei kontrolėje. Buvo stebimas laipsniškas, priklausomai nuo poveikio trukmės MB ir DB dažnio didėjimas: **kontrolinė gr.< po 1-dienos < po 2-dienų < po 4-dienų < po 8-dienų** (3.2.1.6. pav.). Statistiškai patikimi MB dažnių skirtumai rasti tarp kontrolinės ir pirmos (P=0,0185), antros (P=0,0039), ketvirtos (P=0,0068) ir aštuntos dienos (P<0,0001) *M. edulis* grupių. Statistiškai patikimų branduolio pumpurų skirtumų nenustatyta, tuo tarpu po 4 dienų registruota statistiškai patikima FA ląstelių indukcija (P=0,0115), o po 8 dienų ekspozicijos DB – (P=0,0232).



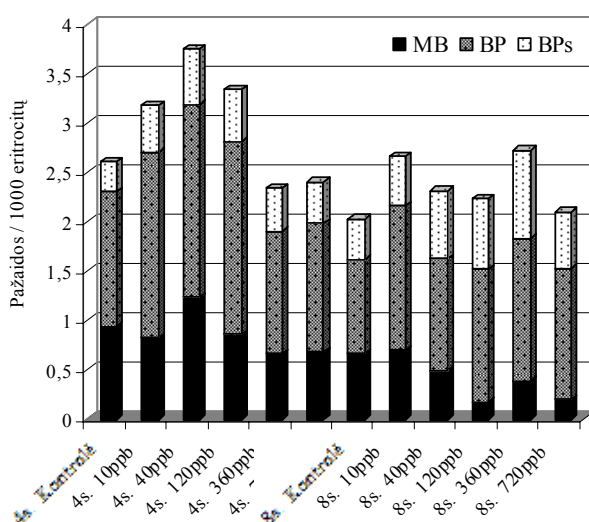
3.2.1.6. pav. Branduolio pažaidų dažnis *M. edulis* žiaunų ląstelėse po 1, 2, 4 ir 8 dienų ekspozicijos.

Analizuojant Statfjord B 0,5 ppm ŽN citotoksinį poveikį, fragmentuotų apotozinių ląstelių dažnis kontrolinėje grupėje buvo 0,67‰, o po keturių dienų siekė 1,43‰ ir buvo statistiškai patikimas ($P=0,0115$). DB dažnis svyravo nuo 1,05‰ (kontrolinėje grupėje) iki 3,02‰ po 8 d. veikimo žaliavine nafta (3.2.1.6. pav.), bei patikimai skyrėsi nuo kontrolinės grupės ($P=0,0232$). ANOVA dispersinės analizės testas parodė patikimus MB ($P=0,0033$, $F=4,615$) ir DB ($P=0,0266$, $F=3,042$) skirtumus tarp tirtų midijų eksperimentinių grupių.

Arktinės žaliavinės naftos poveikis. Otų jaunikliai (13-17 cm ilgio ir 40-73g svorio) 4 ir 8 savaites buvo veikiami žaliavinės naftos 10, 40, 120, 360 ir 720 ppb koncentracijomis. Šių žuvų kepenų eritrocituose analizuojant susiformavusių pažaidų dažnį, buvo išskirtos kai kurios genotoksiškumo parametrų grupės t.y. branduolio pumpurai susijungę su branduoliu ilga ir plona nukleoplazmine jungtimi – BP_s, bei dvibranduoliai kepenų eritrocitai, kurių branduoliai tarpusavyje sujungti nukleoplazmine jungtimi – DB_t. Mikroskopinės analizės metu nustatyti labai aukšti branduolio pumpurų dažniai, kurie svyravo nuo 0,95‰ iki 1,95‰, tuo tarpu otus paveikus Statfjord

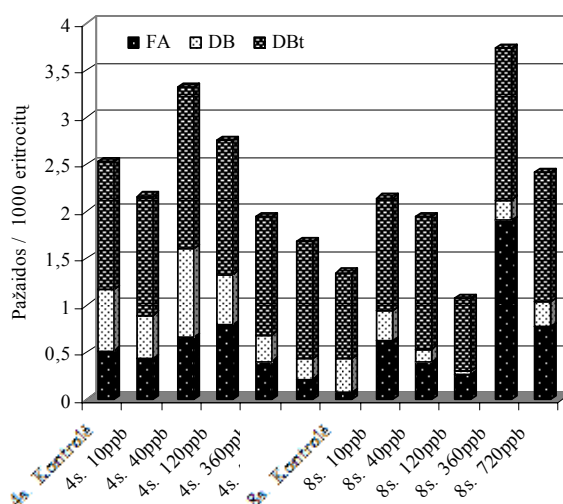
B 0,5 ppm nafta BP dažniai kito nuo 0,07‰ iki 0,42‰ (3.2.1.4. ir 3.2.1.5. paveikslai).

Didžiausi MB (1,24‰), BP (1,94‰) ir BP_s (0,56‰) dažniai žuvyse nustatyti **po 4 savaitių** ekspozicijos, veikiant žuvis arktinės žaliavinės naftos 40 ppb koncentracija (3.2.1.6. pav.). Tuo tarpu, po poveikio didesnėmis 360 ppb ir 720 ppb koncentracijomis MB, BP ir BP_s dažniai buvo žemesni, nei paveikus mažesnėmis arktinės naftos koncentracijomis (3.2.1.6. pav.). Ta pati tendencija stebėta analizuojant citotoksiinį šios naftos poveikį, kai didžiausi FA, DB ir DB_t dažniai registruoti veikiant 40 ppb, šiek tiek mažesnės šių parametru reikšmės gautos po poveikio 120 ppb ir žymiai mažesnės parametru vertės gautos paveikus žuvis 360 ppb ir 720 ppb koncentracijomis (3.2.1.7. pav.). Palyginus su 4 savaitių kontroline otų grupe, statistškai patikimas DB sumažėjimas rastas otuose po poveikio 720 ppb koncentracija (P=0,0355) bei buvo artimas patikimumo lygiui (P=0,0753) – po poveikio 360 ppb. ANOVA dispersinės analizės testas išryškino skirtumus tik pagal dvibranduoles ląsteles P=0,0413, F=2,504, R²=0,1882.



3.2.1.6. pav. Arktinės žaliavinės naftos genotoksiškumo (MB, BP ir BP_s) tyrimai otų kepenų eritrocituose po 4 ir 8 savaitių ekspozicijos.

Vertinat **8 savaičių** poveikio otų grupėje genotoksiškumą, didžiausias MB ir BP dažnis buvo registruotas kepenų eritrocituose po poveikio 10 ppb koncentracija. Mažiausias branduolio pumpurų bei BP_s dažnis aptiktas – kontrolinėje grupėje (3.2.1.6. pav.). Kontrolinėje grupėje rasta ir mažiausias FA ląstelių dažnis (3.2.1.7. pav.). Aukščiausia BP_s (0,89‰), FA (1,9‰) ir DB_t (1,62‰) indukcija nustatyta otuose po poveikio 360 ppb (3.2.1.6. ir 3.2.1.7. paveikslai). Palyginus gautus branduolio pažaidų rezultatus eksperimentinėse ir kontrolinėje 8 savaičių grupėje, statistiškai patikimas MB dažnio sumažėjimas gautas paveikus žuvis 120 ppb (P=0,0021) ir 720 ppb (P=0,0029), o FA ląstelių dažnio padidėjimas po poveikio 10 ppb (P=0,0355), 360 ppb (P=0,0021) ir 720 ppb (P=0,0433) (Mann-Whitney U-testas). Taikant ANOVA testą statistiškai patikimos buvo tik MB (P=0,0031, F=4,117, R²=0,2760) ir FA (P=0,0391, F=2,537, R²=0,1902) parametrų vertės.

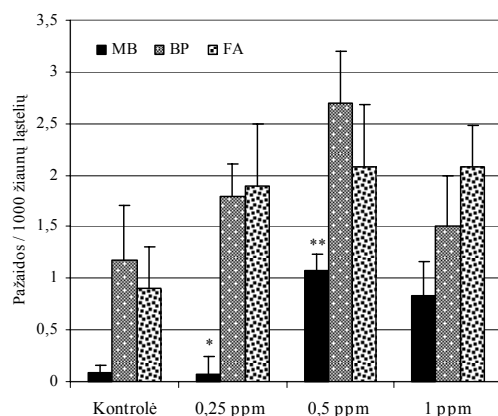


3.2.1.7. pav. Arktinės žaliavinės naftos citotoksiškumo (FA, DB ir DB_t) tyrimai otų kepenų eritrocituose po 4 ir 8 savaičių ekspozicijos.

Lyginant **4 ir 8 savaičių** eksperimentines otų grupes nustatyta, kad po 8 savaičių poveikio žaliavinės naftos 10, 40, 120, 360 ir 720 ppb koncentracijomis, tirtų branduolio pažaidų lygis otų kepenų eritrocituose sumažėjo veikiant 40 ppb ir 120 ppb naftos koncentracijomis. Veikiant 10 ppb

ir 720 ppb koncentracijomis branduolio pažaidų lygis po 4 ir 8 savaičių išliko maždaug toks pats. Tačiau po 8 savaičių poveikio 360 ppb registruotas 4,6 karto didesnis FA ląstelių dažnis (1,90‰), o po poveikio 720 ppb FA ląstelių lygis padidėjo 3,5 karto. Atlikus palyginamąją statistinę analizę 4 ir 8 savaičių poveikio grupėse, patikimi skirtumai pagal MB indukciją gauti po poveikio 120 ppb ($P=0,0011$) ir 720 ppb ($P=0,0147$), pagal dvibranduoles ląsteles veikiant žuvis 40 ppb ($P=0,0001$) ir 120 ppb ($P=0,0185$) naftos koncentracijomis (3.2.1.6. ir 3.2.1.7. paveikslai).

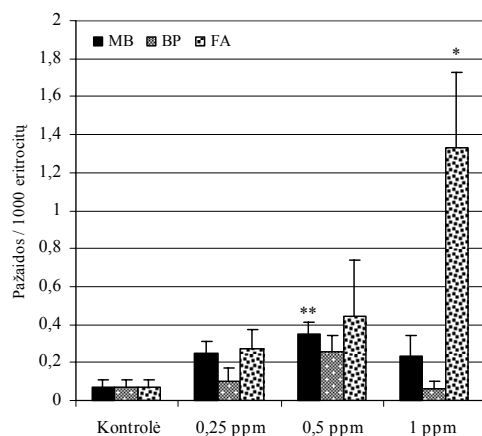
Minijos gręžinio žaliavinės naftos poveikis. Lietuvoje išgaunamos naftos skirtingų (0,25; 0,5 ir 1 ppm) koncentracijų indukuotas branduolio pažaidų dažnis nustatytas gėlavandenių moliuskų *Anodonta anatina* žiaunų ląstelėse bei paprastojo ešerio (*Perca fluviatilis*) kraujo eritrocituose. *A. anatina* žiaunų ląstelėse MB dažnis kito nuo 0,08‰ iki 1,08‰, BP – nuo 1,2‰ iki 2,7‰. Aukščiausias citotoksinis Minijos gręžinio poveikis pagal DB rastas po poveikio 1 ppm (1,8‰), o pagal FA ląsteles – visose trijose poveikio grupėse (2‰-2,1‰) (3.2.1.8. pav.). Mann–Whitney U-test parodė statistiškai patikimus MB dažnių skirtumus poveikus 0,5 ppm ($P=0,0022$) bei 0,25 ppm ($P=0,0260$) lyginant su kontrolinėje grupėje gautais rezultatais. Statistiškai patikimų branduolio pumpurų skirtumų nerasta, o statistiškai patikimi DB ląstelių dažniai gauti po poveikio 1 ppm ŽN koncentracija ($P=0,0411$), palyginus su kontrolinės grupės moliuskais. Pagal ANOVA dispersinės analizės testą statistiškai patikimi buvo MB dažnio skirtumai ($P=0,0176$; $F=4,2620$; $R=0,3900$).



3.2.1.8. pav. Geno-citotoksiškumo tyrimai antinės geldenės žiaunų ląstelėse po poveikio skirtingomis Minijos žaliavinės naftos koncentracijomis.

Atlikus branduolio pažaidų analizę paprastojo ešerio kraujo eritrocituose, MB dažnis kontrolinėje grupėje buvo 0,07‰, o Minijos nafta paveiktose grupėse svyravo nuo 0,23‰ iki 0,35‰. Didžiausias genotoksinis naftos poveikis pagal MB (0,35‰) ir BP (0,26‰) nustatytas veikiant ešerius 0,5 ppm ŽN koncentracija (3.2.1.9. pav.). Labai aukšta FA indukcija (1,33‰) rasta po poveikio 1 ppm žaliavinės naftos koncentracija, be to jis statistiškai patikimai skyrėsi ($P=0,0133$) nuo kontrolinės grupės žuvų. Statistiškai patikimi MB dažnio ($P=0,0057$) skirtumai, lyginant su kontroline grupe, gauti veikiant ešerius 0,5 ppm ŽN koncentracija, tačiau statistiškai patikimų BP dažnių nerasta nei vienoje Minijos grežinio nafta veiktoje žuvų grupėje (Mann–Whitney U-testas).

Palyginus gautus branduolio pažaidų tyrimų rezultatus moliuskuose ir žuvyse, antinės geldenės žiaunų ląstelėse nustatytas 2,7-3,5 kartus didesnis MB dažnis ir 10-25 kartų didesnis branduolio pumpurų dažnis negu, kad ešerio kraujo eritrocituose.

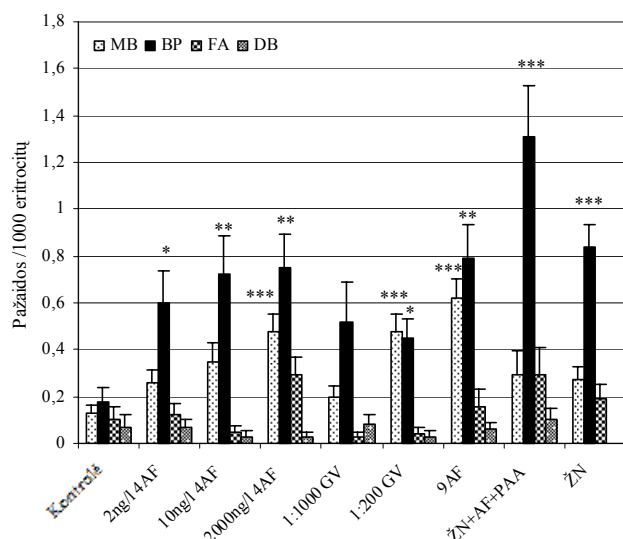


3.2.1.9. pav. Geno-citotoksiškumo tyrimai paprastojo ešerio kraujo eritrocituose po poveikio skirtingomis Minijos žaliavinės naftos koncentracijomis.

3.2.2. Genotoksinis ir citotoksinis naftos platformose susidarančių gamybinių vandenių poveikis

Menkių kepenų ir inkstų eritrocituose nustatytas geno-citotoksinis **Oseberg C** naftos platformoje išgaunamos žaliavinės naftos 0,2 ppm, taip pat sumodeliuoto naftos, alkilfenolių bei poliaromatinių angliavandenilių (ŽN+9AF+PAA) mišinio poveikis. Be to, buvo išnagrinėta branduolio pažaidų indukcija paveikus šias žuvis trimis skirtingomis 4 alkilfenolių (4AF) koncentracijomis ir 9 alkilfenolių (9AF) mišiniu bei dvejomis (1:200 ir 1:1000) gamybinio vandens koncentracijomis.

Kepenų eritrocituose analizuojant genotoksiškumą, MB dažnis svyravo 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. Visose eksperimentinėse grupėse BP dažniai buvo 2-4 kartus didesni negu susiformavusių MB dažnis tose pačiose grupėse. Didžiausia BP indukcija (1,31‰) rasta paveikus (ŽN+9AF+PAA) mišiniu, kuri buvo 7,3 karto didesnė nei kontrolinėje žuvų grupėje. Reikėtų pabrėžti, kad šioje grupėje BP reikšmės buvo 4,5 karto didesnės nei nustatyta MB indukcija (3.2.2.1. pav.).

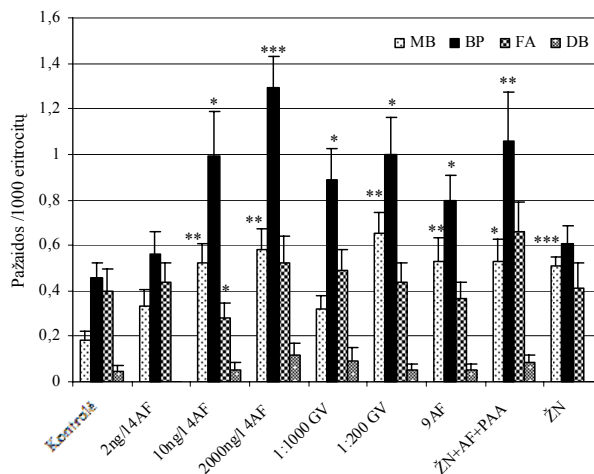


3.2.2.1. pav. Branduolio pažaidų indukcija *G. morhua* kepenų eritrocituose po 2 savaičių poveikio Oseberg C naftos platformoje išgaunama žaliavine nafta (ŽN), žaliavinės naftos, alkilfenolių ir poliaromatinių angliavandenilių (ŽN+AF+PAA) ir 9 alkilfenolių (9AF) mišiniais, skirtingomis 4 alkilfenolių (4AF) mišinio koncentracijomis bei gamybinių vandenų (GV) koncentracijomis.

Citotoksinis poveikis tirtose menkių grupėse buvo gan žemas ir didžiausia FA reikšmė tesiekė 0,29‰ (ŽN+9AF+PAA grupėje), tuo tarpu žemiausia – 0,03‰ (GV 1:1000). Dvibranduolių ląstelių dažnis buvo žemesnis negu fragmentuotų-apoptozinių ląstelių dažnis. DB (0,1‰) registruotas menkėse po poveikio ŽN+9AF+PAA mišiniu (3.2.2.1. pav.). Statistiškai patikimi MB skirtumai buvo menkių grupėse veiktose aukščiausia 4AF mišinio koncentracija ($P=0,0007$), GV 1:200 koncentracija ($P=0,0005$) bei 9AF mišiniu ($P=0,0003$), palyginus su kontrolinės grupės žuvimis. Beveik visose poveikio grupėse gauti patikimi skirtumai pagal BP (P kito nuo 0,01 iki $P<0,0001$), išskyrus GV 1:1000 koncentraciją.

Tiriant geno-citotoksiškumo parametrus Atlantinių menkių **inkstų** eritrocituose nustatyta, kad MB dažnis svyravo nuo 0,18‰ kontrolėje iki 0,65‰ po poveikio GV 1:200 koncentracija, BP – nuo 0,46‰ kontrolėje iki 1,29 ‰ paveikus 4AF mišinio 2000 ng/l koncentracija, FA – nuo 0,28‰

paveikus 4AF mišinio 10 mg/l koncentracija iki 0,66‰ paveikus ŽN+9AF+PAA mišiniu, DB – 0,05‰ kontrolėje iki 0,12‰ paveikus 4AF mišinio 2000 ng/l koncentracija (3.2.2.2. pav.).



3.2.2.2. pav. Branduolio pažaidų indukcija *G. morhua* inkstų eritrocituose po 2 savaitių poveikio Oseberg C naftos platformoje išgaunama žaliavine nafta, naftos, AF ir PAA ir 9AF mišiniais, skirtingomis 4AF mišinio koncentracijomis bei gamybinių vandenų koncentracijomis.

Branduolio pažaidų palyginimas Atlantinių menkių **inkstų** ir **kepenų** eritrocituose išryškino tai, kad MB ir FA indukcija yra didesnė inkstuose negu kepenyse. Inkstuose kaip ir kepenyse, rasta labai nedaug dvibranduolių ląstelių, tuo tarpu BP dažniai inkstų ir kepenų eritrocituose buvo sąlyginai panašūs. Palyginus FA ląstelių lygius kepenyse ir inkstuose, didžiausia jų indukcija buvo rasta inkstų eritrocituose po poveikio GV 1:1000 (16,5 karto) bei GV 1:200 (10 kartų).

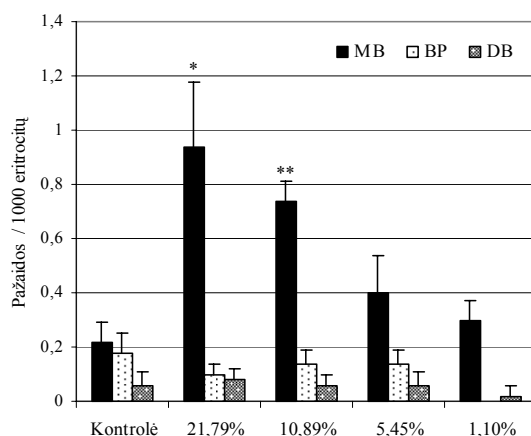
Statistiškai patikimi MB dažnių skirtumai inkstų eritrocituose gauti žuvų grupėse veiktose 4AF mišinio 10 ng/l ir 2000 ng/l koncentracijomis ($P=0,0084$ ir $P=0,0015$), 9AF ($P=0,0087$), ŽN+9AF+PAA ($P=0,0105$) bei 0,2 ppm ŽN ($P=0,0002$) ir GV (1:200) koncentracija ($P=0,0014$), lyginat su kontrolinės grupės menkėmis. BP dažniai patikimai skyrėsi tarp kontrolės ir visų eksperimentinių grupių (P reikšmės svyravo nuo 0,0236 iki 0,0003) išskyrus

0,2 ppm naftos ir 4AF 2 ng/l koncentracijos grupes, fragmentotų-apoptozinių ląstelių – po poveikio 4AF mišinio 10 ng/l koncentracija (P=0,4045).

Vertinant menkių kepenų ir inkstų eritrocituose susiformavusių MB dažnius, jie statistiškai patikimai skyrėsi paveikus žuvis ŽN+9AF+PAA mišiniu (P=0,0478) ir 0,2 ppm ŽN (P=0,0028), palyginus su kontroline grupe.

3.2.3. Genotoksinis ir citotoksinis sunkiųjų metalų poveikis

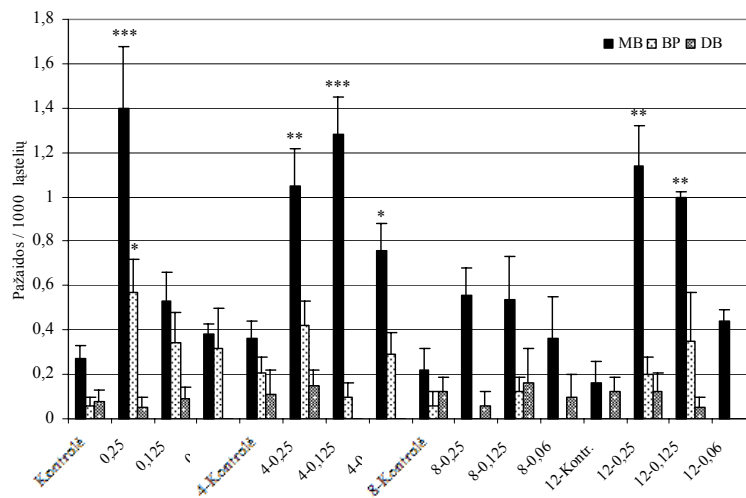
Po poveikio sunkiųjų metalų modeliniu mišiniu (SMMM), žemiausias mikrobranduolių dažnis vaivorykštinio upėtakio kraujo eritrocituose buvo 0,22% (kontrolinėje žuvų grupėje) tuo tarpu aukščiausias 0,9% (esant 21,79% koncentracijai). 4,3 karto aukštesnis MB dažnis nustatytas veikiant žuvis (21,79%) ir 3,4 karto veikiant (10,89%) SMMM koncentracija. Statistiškai patikimas MB dažnis rastas vaivorykštinio upėtakio kraujo eritrocituose po poveikio 21,79% (P=0,0147) ir 10,89% (P=0,0068) koncentracijomis, palyginus su kontrolinės grupės žuvimis (3.2.3.1. pav.).



3.2.3.1. pav. Geno-citotoksiškumo tyrimai *O. mykiss* kraujo eritrocituose po 14 dienų poveikio sunkiųjų metalų modeliniu mišiniu.

Po 4 dienų poveikio cinko ir vario mišinio 0,06; 0,125 ir 0,25mg/l koncentracijomis branduolio pažaidų dažnis analizuotas vaivorykštinių upėtakių *O. mykiss* kraujo eritrocituose, mažiausias MB dažnis nustatytas

kontrolinėje poveikio grupėje (3.2.3.2. pav.). Aukščiausias MB ir BP dažnis rastas upėtakio kraujo eritrocituose veikiant žuvis 0,25 mg/l mišinio koncentracija.



3.2.3.2. pav. Geno-citotoksiškumo tyrimai *O. mykiss* kraujo eritrocituose po 4 dienų poveikio cinko ir vario mišinio skirtingomis koncentracijomis bei 4, 8 ir 12 dienų atsistatymo laikant žuvis švariame vandenyje.

MB indukcija žuvų eritrocituose buvo 5 kartus aukštesnė po poveikio 0,25 mg/l ir 2-kartus po poveikio 0,125 mg/l Cu+Zn koncentracija, palyginus su kontrolinės grupės žuvimis. Po keturių dienų poveikio minėtomis vario ir cinko koncentracijomis ir laikant upėtakius švariame vandenyje nustatyta MB dažnio mažėjimo tendencija. Ryškiausias MB dažnio sumažėjimas buvo po 8 dienų. Statistiškai patikimi MB dažnio skirtumai gauti po 4 dienų poveikio 0,25 mg/l Cu+Zn koncentracija, taip pat po 4 d. laikymo švariame vandenyje paveikus 0,25; 0,125 ir 0,06 mg/l koncentracijomis bei po 12 d. išsivalymo (0,25 ir 0,125 mg/l eksperimentinėse grupėse). BP – statistiškai patikimi skirtumai gauti upėtakiuose po poveikio 0,25 koncentracija (P=0,0110). Statistiškai patikimų FA ir DB dažnio skirtumų nerasta.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Naftos išgavimo technogeninių procesų metu susidarančiuose gamybiniuose vandenyse nustatomas labai platus spektras įvairių junginių, tokių kaip poliaromatiniai angliavandeniliai, alkilfenoliai, sunkieji metalai, taip pat ir žaliavinė nafta. Šie teršalai į vandens organizmus gali patekti tiesiogiai kvėpavimo metu, kontaktuojant su dugno nuosėdose susikaupusiais junginiais bei per mitybines grandines. Lipofilinėmis savybėmis pasižymintys PAA yra intensyviai kaupiami organizmų audiniuose ir gali įtakoti DNR pažaidų susidarymą (Bihari et al., 2006), sukelti mutacijas ar kancerogenezės procesus (IARC, 1993). Mažos molekulinės masės PAA ypač pasižymi geru tirpumu, lengvai kaupiami audiniuose ir vandens organizmams yra toksiški (Lye, 2000), tuo tarpu didėjant PAA junginių molekulinei masei jų tirpumas mažėja (Patnaik, 1999). Apie naftos išgavimo procesų metu į jūrą patekusių alkilintų fenolių pasklidimą ir poveikį vandens organizmams žinoma labai nedaug. Didelė dalis alkilintų fenolių patenkančių su gamybiniais vandenimis turi trumpas iki 7 anglies atomų grandines (Utvik, 1999). *In vitro* ir *in vivo* sąlygomis atlikti tyrimai parodė, kad alkilintiems fenoliams būdingas estrogeninis poveikis, tačiau apie genotoksinį ir citotoksinį jų poveikį organizmams duomenų trūksta. Daugiau tyrimų šioje srityje buvo atlikta su ilgas grandines turinčiais alkilintais fenoliais (nonilfenoliu ir oktilfenoliu), kuriems būdinga savybė pamėgdžioti natūralių hormonų veikimą sąveikaujant su hormonų receptoriais (Nimrod, Benson, 1996). Genotoksinis sunkiųjų metalų poveikis aprašytas įvairiuose vandens organizmuose (Çavas et al., 2005; Maes et al., 2005; Oliveira et al., 2008; Pytharopoulou et al., 2008; Maria et al., 2009).

Atliekant aplinkos genotoksiškumo tyrimus kaip bioindikatoriai dažniausiai naudojami *Mytilus*, *Perna*, *Crassostrea* ir *Mya* genčių moliuskai (Bolognesi et al., 2004, 2006a; Burgeot et al., 1995, 1996; Dopp et al., 1996; Dolcetti, Venier, 2002; Pampanin et al., 2005; Magni et al., 2006). Gėlujų vandenų monitoringo programose dažnai naudojami Dreissenidae šeimos moliuskai

(Klobučar et al., 2008). Mytiliidae šeimos moliuskuose taršos gradiento vertinimas taikant MB testą atliktas Baltijos ir Šiaurės jūrose vykdant BEEP projektą („Aplinkos taršos biologiniai efektai jūrų priekrančių ekosistemose“) (Baršienė et al., 2006a, 2006b; Lehtonen et al., 2006; Schiedek et al., 2006).

Kai kurių autorių nuomone, vertinant bendrą aplinkos taršos įtaką hidrobiontams, ji geriau atsispindi tyrimuose atliktuose su žuvimis (Ayllón et al., 2000; Sanchez-Galan et al., 2001; Pietrapiana et al., 2002; Russo et al., 2004; Porto et al., 2005). Aplinkos genotoksinis poveikis žuvims nustatomas vertinat ne tik MB (Gravato, Santos, 2003), bet ir kitų branduolio pažaidų susiformavimą (Pacheco, Santos, 1998; Baršienė et al., 2006c; Rybakovas et al., 2009).

Vis dažniau aplinkos genotoksiškumo tyrimai atliekami aktyvaus monitoringo būdu. Laikymo skirtingose varžose metodika, naudota tiriant Italijos Cecinos upės žiočių vandens genotoksiškumą (Nigro et al., 2006). Pytharopoulou su bendraautoriais (2006) publikuotame darbe aprašomi Graikijos Patraso įlankos genotoksiškumo tyrimai, kuomet *Mytilus galloprovincialis* moliuskai 30 dienų buvo perkelti į tris skirtingas pagal užterštumą zonas. Moliuskuose nustatyti MB dažniai atspindėjo tiriamų vietų užterštumo lygį. Aktyvaus monitoringo būdu kaip bioindikatorinę rūšį naudojant *Dreissena polymorpha* buvo nustatytas Kroatijos upių genotoksiškumas. Perkeltose iš švarių vietų ir skirtingose varžose mėnesį laikytose dreisenose buvo gauti gan dideli MB dažniai, palyginus su kontrolinės grupės moliuskais. Pirminių DNR pažaidų tyrimai taikant kometų metodą parodė tokias pačias genotoksinio poveikio tendencijas kaip ir MB testas (Klobučar et al., 2003). MB ir kitų branduolio pažaidų analizė taikyta paprastųjų taukžuvių (*Pholis gunnellus*) kraujo eritrocituose nustatant Forto upės (Škotija) aplinkos taršos gradientą (Bombail et al., 2001) bei *Oreochromis niloticus* žuvų kraujo eritrocituose tiriant Tiete upės (Brazilija) genotoksiškumą (Rocha et al., 2009).

Vertinant naftos platformų technologinių procesų metu susidariusių junginių geno-citotoksinį poveikį galima nustatyti ankstyvuosius šios taršos poveikio

signalus tiriamose hidrosistemose ar atskirose jų zonose. Apie aplinkos genotoksiškumo lygį galima spręsti nustačius mikrobranduolių ir branduolio pumpurų dažnius įvairiose taršos gradiento zonose gyvenančių vandens organizmų ląstelėse. Citotoksinį aplinkos taršos poveikį gali atspindėti organizmų audiniuose susiformavusių fragmentuotų-apoptozinių bei dvibranduolių ląstelių dažniai.

4.1. Naftos platformų technogeninių teršalų geno-citotoksiškumo įvertinimas aktyvaus monitoringo būdu *in situ*

Valgomųjų midijų (*M. edulis*) ir Atlantinių menkių (*G. morhua*) perkėlimas iš švarių vietų ir laikymas varžose Statfjord B naftos platformos taršos gradientu pasroviui šiame darbe panaudotas kaip bioindikacinė sistema šio telkinio išmetamų teršalų genotoksiškumo rizikai nustatyti. Mikrobranduolių analizė midijų hemocituose parodė ryškų šios naftos platformos aplinkos genotoksiškumo gradientą – 500 m >1000 m >10000 m. Statistiškai patikimi MB dažnių skirtumai gauti palyginus kontrolinės grupės moliuskus su laikytais varžose 500 ir 1000 metrų atstumu nuo naftos platformos. Tokiu būdu nustatyta, kad išmetamų iš Statfjord B naftos platformos teršalų poveikio genetinės rizikos zona midijoms susiformuoja pasroviui iki 1 km atstumu. Tokia pati aplinkos genotoksiškumo tendencija nustatyta ir Atlantinių menkių kepenų eritrocituose.

Vertinant geno-citotoksinį poveikį Šiaurės jūroje eksploatuojamos Ekofisk naftos platformos aplinkoje, arčiausiai prie gamybinių naftos platformos vandenų išleidėjų laikytų midijų hemocituose nustatytas 3-5 kartus didesnis MB dažnis negu kontrolinėje moliuskų grupėje. Aplinkos genotoksiškumo gradientas pagal mikrobranduolių dažnius nustatytas ir *M. edulis* žiaunų ląstelėse, kuomet moliuskai buvo perkelti ir 4 savaites laikyti PAA ir sunkiaisiais metalais užterštose Karmsund fjordų zonose. Ankstesnių tyrimų rezultatai parodė, kad Šiaurės jūroje prie veikiančių Statfjord B (2004 m.) ir Troll B (2003 m.) naftos platformų varžose laikytų žuvų ir moliuskų ląstelėse

nustatyti MB dažniai priklausė nuo aplinkos užterštumo gradiento (Hylland et al., 2008).

Padidėjęs aplinkos genotoksiškumo lygis nustatytas ir hidrobiontuose, kurie gyveno naftos išsipylimų vietose (Parry et al., 1997; Harvey et al., 1999; Baršienė, 2002; Baršienė et al., 2004, 2006a,b; Frenzilli et al., 2004; Bolognesi et al., 2006a). 1989 m. Princo Viljamo sąsiauryje įvykus „Exxon Valdez“ naftos išsipylimo avarijai į aplinką pateko apie 35 500 tonų žaliavinės naftos. Po šios avarijos žuvų lervutėse nustatyti anafazinių aberacijų kiekiai koreliavo su naftos užlietoje teritorijoje fiksuotomis PAA koncentracijomis (Hose, Brown, 1998). Taikant MB testą buvo įvertintas ilgalaikis Ligurijos įlankoje (Italija) 1991 metais įvykusios „Haven“ tanklaivio avarijos genotoksinis poveikis. Avarijos metu į aplinką išsiliejo apie 10 000 tonų naftos produktų, apie 90 000 tonų nuskendo kartu su laivu. Praėjus nuo avarijos 4 mėn., *Mytilus galloprovincialis* moliuskuose registruotas MB dažnis net iki 10 kartų viršijo kontrolinį lygį (Bolognesi et al., 2006a). Netgi, po 10 metų taikant aktyvaus monitoringo principus, kuomet *Crassostrea gigas* moliuskai 30 dienų laikyti avarijos vietoje, austrių žiaunų ląstelėse vis dar fiksuotas padidėjęs aplinkos genotoksiškumo lygis (Bolognesi et al., 2006a). Įvykus „Haven“ naftos avarijai aukštas aplinkos genotoksiškumo lygis, pagal MB dažnius, nustatytas ir žuvų kepenų eritrocituose (Pietrapiana et al., 2002).

2001 m. lapkričio 23 dieną Lietuvos priekrantėje Būtingės naftos perpylimo terminale įvykusios avarijos metu į Baltijos jūrą pateko daugiau nei 50 tonų naftos produktų, kurie sukėlė visą eilę biologinių žymenų pokyčių tirtose žuvyse ir moliuskuose (Baršienė et al., 2006a,b).

Naftos produktais užterštoje Ria de Aveiro įlankoje (Portugalija) sugautų spalvotųjų kefalių (*Liza aurata*, *L. ramada* ir *L. saliens*) eritrocituose nustatyti branduolio pažaidų dažniai buvo žymiai aukštesni ir statistiškai patikimai skyrėsi nuo branduolio pažaidų nustatytų žuvyse, kurios buvo sugautos neužterštoje įlankos vietos (Pacheco, Santos, 2005).

2002 metų lapkritį šalia Ispanijos krantų avariją patyrė tankeris „Prestige“ į aplinką išsiliejo apie 63 000 tonų žaliavinės naftos. Iš labiausiai nafta užterštų

zonų surinktų *M. galloprovincialis* moliuskų žiaunų ląstelėse pritaikius kometų metodą nustatyti DNR pažaidų dažniai, koreliavo su jų audiniuose rastomis aukštomis PAA koncentracijomis. Galiausiai net ir 7 dienas palaikius iš šių zonų surinktus moliuskus švariame vandenyje, DNR pažaidų lygis žiaunų ląstelėse nesumažėjo iki kontrolinio lygio (Laffon et al., 2006).

Aplinkos genotoksiškumo tyrimai atlikti įvairiose moliuskų rūšyse: Viduržemio jūroje ties Izraelio krantais gyvenusių pilvakojų moliuskų *Patella coerulea* ir dvigeldžių Viduržemio jūros drugenių (*Donax trunculus*), Raudonosios jūros šiaurinėje dalyje (Akabo įlankoje) – pilvakojų *Cellana rota* ir dvigeldžių (*Callista florida*, *Dosinia bistro*) moliuskų ląstelėse (Bresler et al., 1999). Taršos ir MB dažnio gradientas nustatytas gamtinėse *Mytilus galloprovincialis* populiacijose vykdant vakarinės Viduržemio jūros dalies monitoringą (Magni et al., 2006). 1990 metais Genujos uosto akvatorijoje surinktų moliuskų audiniuose nustatyti MB dažniai statistiškai patikimai skyrėsi nuo dažnių, nustatytų kontrolinėje tyrimų vietovėje. Cheminė analizė parodė, kad Genujos uoste PAA koncentracijos yra 50 kartų aukštesnės nei kontrolinėje tyrimų vietoje (Bolognesi, 1990).

4.2. Naftos platformų teršalų geno-citotoksinio poveikio ypatumai laboratorinėmis sąlygomis

Aplinkos tarša naftos produktais yra viena iš opiausių jūrinių ekosistemų aplinkosaugos problemų. Vertinat geno-citotoksinį naftos platformų veiklos pasekoje atsirandančių teršalų poveikį organizmuose *in situ*, labai svarbu nustatyti atskirų junginių esančių teršalų mišinyje įtaką. Tuo tikslu laboratorijose buvo atliekami eksperimentiniai tyrimai siekiant nustatyti genocitotoksinių efektų moliuskų ir žuvų ląstelėse priklausomybę nuo gamybinių vandenų sudėtyje esančių komponentų poveikio, žaliavinės naftos koncentracijos, ekspozicijos laiko, organizmų rūšies bei tiriamo audinio.

4.2.1. Žaliavinės naftos įvairių koncentracijų poveikis

Paveikus midijas *M. edulis*, Atlantinės menkes *G. morhua* ir otus *S. maximus* 3 savaites **Statfjord B** naftos platformos žaliavine nafta bei žaliavinės naftos, alkilintų fenolių ir PAA mišiniu, statistiškai patikima MB indukcija gauta moliuskų žiaunų ląstelėse, otų kraujo ir inkstų eritrocituose bei menkių inkstų eritrocituose po poveikio ŽN+AF+PAA mišiniu. Midijų žiaunų ląstelėse ir otų kraujo bei inkstų eritrocituose statistiškai patikimas mikrobranduolių dažnių skirtumas nustatytas ir paveikus 0,5 ppm ŽN. Citotoksinis Statfjord B naftos poveikis pagal fragmentuotų-apoptozinių (FA) ląstelių indukciją nustatytas midijose veiktose ŽN ir ŽN+AF+PAA mišiniu, veikiant ŽN+AF+PAA mišiniu *M. edulis* gauta ir statistiškai patikima branduolio pumpurų indukcija. Tyrimuose naudotos žaliavinės Statfjord B naftos sudėtyje vyravo mažos molekulinės masės PAA naftalenai, kurie sudarė 87,7% (lentelė 4.2.1.1.). Šie 2 žiedus savo sudėtyje turintys poliaromatiniai angliavandeniliai, vandenyje gerai tirpsta ir pasižymi genotoksinio poveikiu (Maria et al., 2002a,c; Teles et al., 2003).

4.2.1.1. lentelė. Statfjord B žaliavinės naftos PAA sudėtis (Sund et al., 2006)

Komponentai	PAA µg/g	Frakcija %
Naftalenas	1147,0	87,7
C1-Naftalenas	3787,3	
C2-Naftalenas	5288,7	
C3-Naftalenas	3830,3	
Σ PAA su 2 žiedais	14053,3	
Acenaftilenas	10,0	8,2
Acenaftenas	9,7	
Fluorenas	135,9	
Antracenas	252,9	
Fenantrenas	0,0	
C1-Fenantrenas	460,2	
C2-Fenantrenas	439,4	
Σ PAA su 3 žiedais	1308,1	
Dibenzotiofenas	91,9	3,3
C1-Dibenzotiofenas	196,5	
C2-Dibenzotiofenas	232,9	
Σ dibenzotiofenų	521,3	
Fluorantenas	2,6	0,7
Pirenas	8,6	
Chrizenas	23,9	
C1-Chrizenas	37,9	

4.2.1.1. lentelės tęsinys.

Komponentai	PAA $\mu\text{g/g}$	Frakcija %
C2-Chrizenas	41,5	0,7
Benzo(a)antracenas	3,3	
Σ PAA su 4 žiedais	117,8	
Benzo(b)fluorantenas	7,7	0,1
Benzo(k)fluorantenas	0,0	
Benzo(b+k)fluorantenas	6,9	
Benzo(a)pirenas	4,7	
Σ PAA su 5 žiedais	19,3	
Indeno(1,2,3,cd)pirenas	0,0	0,01
Benzo(g,h,i)perilenas	1,7	
Dibenzo(a,h)antracenas	0,0	
Σ PAA su 6 žiedais	1,7	
<i>Viso PAA ($\mu\text{g/g}$)</i>	16020,9	
Σ PAA 1 ppm konc. (μg)	16,0	

Analizuojant arktinės žaliavinės naftos poveikį otų kepenų eritrocituose, didžiausia MB, BP, BP_s, DB ir DB_t indukcija nustatyta 4 savaites veikiant žuvis 40 ppb naftos koncentracija, gan aukštos branduolio pumpurų (BP ir BP_s) bei FA vertės nustatytos ir po poveikio 120 ppb koncentracija, tuo tarpu veikiant didesnėmis koncentracijomis (360 ir 720 ppb) registruota tirtų branduolio parametrų supresija. Po 8 savaičių poveikio aukščiausia BP_s (0,89‰), FA (1,9‰) ir DB_t (1,62‰) indukcija buvo otuose veiktuose 360 ppb koncentracija. Arktinės žaliavinės naftos sudėtyje dar didesnę dalį (90,3%), negu Statfjord B naftoje, sudarė 2 žiedus turintys naftalenai. Laboratoriniuose tyrimuose, kuriuose naudota arktinė nafta nustatyta bendra 2 žiedus turinčių PAA suma buvo 19340 mg/kg, Statfjord B žaliavinėje naftoje – 14053,3 $\mu\text{g/g}$. Reikia pabrėžti, kad arktinės naftos sudėtyje buvo kur kas daugiau tiek 2, tiek 4, 5 ir 6 žiedus turinčių PAA (frakcija %) (4.2.1.1. ir 4.2.1.2. lentelės), kas matyt ir nulėmė geno-citotoksinių efektų supresiją, kadangi buvo viršytos slenkstinės šių junginių ribos.

4.2.1.2. lentelė. Arktinės žaliavinės naftos PAA sudėtis (IRIS duomenys)

Komponentai	PAA mg/kg	Frakcija %
Naftalenas	1520	90,3
C1-Naftalenas	5307	
C2-Naftalenas	7560	
C3-Naftalenas	4953	
Σ PAA su 2 žiedais	19340	
Acenaftilenas	*<	5,6
Acenaftenas	*<	
Fluorenas	151	
Fenantrenas	224	
Antracenas	*<	
C1-Fen/Antracenas	417	
C2-Fen/Antracenas	405	
Σ PAA su 3 žiedais	1197	
Dibenzotiofenas	120	3,7
C1-Dibenzotiofenas	325	
C2-Dibenzotiofenas	349	
Σ dibenzotiofenų	794	0,3
Fluorantenas	6,4	
Pirenas	7,6	
Benzo(a)antracenas	2,7	
Chrizenas/Trifenilenas	11	
C1-Chrizenas	21	
C2-Chrizenas	26	
Σ PAA su 4 žiedais	75	0,04
Benzo(b,j)fluorantenas	3,0	
Benzo(k)fluorantenas	*<	
Benzo(a)pirenas	6,5	
Σ PAA su 5 žiedais	10	
Indeno(1,2,3-cd)pirenas	*<	0
Benzo(g,h,i)perilenas	*<	
Dibenzo(a,h)antracenas	*<	
Σ PAA su 6 žiedais	0	
Viso PAA (mg/kg)	21415	
Viso % PAA naftoje	2,14	

Apie eksperimente naudotos arktinės naftos žymų geno-citotoksinį poveikį rodo ir tas faktas, jog otų kepenų eritrocituose nustatyti dideli branduolio pumpurų dažniai. Branduolio pumpurai išsiskyrė savo morfologija (dydžiu, forma), taip pat buvo aptinkami branduolio pumpurai susijungę su branduoliu nukleoplazmine jungtimi – BP_s bei dvibranduoliai eritrocitai, kurių branduoliai tarpusavyje sujungti nukleoplazmine jungtimi – DB_t. Tokių branduolio pažaidų nebuvo aptinkama otų ląstelėse po poveikio Statfjord B žaliavine nafta. Po 4 savaičių poveikio arktine žaliavine nafta aukščiausi (1,94‰ bei 1,95‰) BP ir BP_s – 0,56‰ ir 0,52‰ dažniai nustatyti veikiant žuvis 40 ir 120 ppb naftos

koncentracijomis. Vertinat susiformavusių branduolio pumpurų dažnius po 8 savaičių, aukščiausias BP dažnis (1,46‰) registruotas kepenų eritrocituose, paveikus žuvis 10 ppb koncentracija, o aukščiausia BP_s indukcija nustatyta otų kepenų eritrocituose po poveikio 360 ppb. Gauti darbo rezultatai liudija apie arktinės naftos sudėtyje esančių genotoksinių medžiagų sukeliama aukštą, bet diferencijuotą genotoksinį poveikį tirtoms žuvims priklausomai nuo naftos koncentracijos ir ekspozicijos laiko.

Lindberg ir bendraautorių (2007) darbe nurodo, kad mikrobranduoliai ir branduolio pumpurai, kurie yra susijungę su branduoliu nukleoplazmine jungtimi, susiformuoja branduolio dalijimosi proceso eigoje ar S – fazės metu. Anot, Shimizu ir bendraautorių (1998, 2000), branduolio pumpurai susiformuoja iš chromosomų šalinamos amplifikuotos DNR, taip pat vykstant pažeistos DNR reparacijai (Haaf et al., 1999). Todėl kaip ir mikrobranduoliai, BP atspindi juos sukeliančių agentų genotoksinius efektus, tad yra tikslinga taikyti BP analizę tiriant taršos genotoksinį poveikį žuvyse, ar kituose vandens organizmuose (Guilherme et al., 2008). Ankstesniuose tyrimuose buvo nustatyta teigiama koreliacija tarp MB ir BP indukcijos (Ergene et al., 2007). Žuvyse susiformavusių branduolio pažaidų analizė parodė žaliavinės naftos (Baršienė et al., 2006c), skirtingų PAA junginių (Maria et al., 2002c; Gravato, Santos, 2002, 2003; Teles et al., 2003), naftos distiliacijos produktų (Pacheco, Santos, 2001) bei kitų junginių indukuotą genotoksinį poveikį (Pacheco, Santos, 1998; Ayllón, Garcia-Vazquez, 2000, 2001). Mikrobranduolių, branduolio pumpurų ir fragmentuotų-apoptozinių ląstelių analizė europinių upinių (*Platichthys flesus*) ir paprastųjų gelsvapelekių (*Limanda limanda*) plekšnių bei menkių (*Gadus morhua*) inkstų ir kraujo eritrocituose įnešė svarų indėlį vertinat Baltijos ir Šiaurės jūrų aplinkos genotoksiškumą (Rybakovas et al., 2009).

Pati didžiausia (1 ppm) žaliavinės naftos koncentracija buvo naudota analizuojant Minijos naftos gręžinio geno-citotoksinį poveikį žuvims (*P. fluviatilis*) ir dvigeldžiams moliuskams (*A. anatina*). Tyrimų duomenys parodė, kad 1 ppm ŽN koncentracija buvo mažiau genotoksiška tiek žuvims, tiek ir

moliuskams nei to paties grežinio 0,5 ppm naftos koncentracija. Didžiausios (360 ir 720 ppb arba 0,36 ir 0,72 ppm) arktinės naftos koncentracijos naudotos eksperimentuose taip pat sukėlė MB supresiją otų kepenų eritrocituose.

Literatūroje yra duomenų kuomet veikiant organizmus aukštesnėmis genotoksiškumu pasižyminčių junginių koncentracijomis nustatomas sąlyginai žemesnis genotoksiškumo parametrų atsakas, nei veikiant žemesnėmis jų koncentracijomis. Paveikus midijas Šiaurės jūroje išgaunamos žaliavinės naftos 0,015 ir 0,06 mg/l koncentracijomis nustatytas, DNR viengrandžių ir dvigrandžių trūkių procento augimas, didėjant koncentracijai, tuo tarpu paveikus *M. edulis* aukštesne 0,25 mg/l koncentracija DNR trūkių procentas sumažėjo (Taban et al., 2004). Atlikus eksperimentą nustatyta, kad branduolio pažaidų dažnis ungurių *A. anquilla* kraujo eritrocituose po poveikio žemiausia 0,3 μM B(a)P koncentracija labiausiai išaugo tik po 216 h, o veikiant aukščiausia 2,7 μM – po 72 h poveikio. Tuo tarpu, eksperimento metu naudota 0,9 μM B(a)P koncentracija didžiausią branduolio pažaidų dažnį ungurių eritrocituose indukavo po 48 ir 72 h poveikio (Maria et al., 2002b). Didžiųjų austrių (*Crassostrea gigas*) lervutes paveikus B(a)P- $1,0 \times 10^{-8}$, $1,0 \times 10^{-7}$, $1,0 \times 10^{-6}$ ir $1,0 \times 10^{-5}$ M koncentracijomis didžiausias chromosomų struktūrinių pakitimų procentas (70%) nustatytas po poveikio $1,0 \times 10^{-6}$ M, tuo tarpu tyrime naudotos $1,0 \times 10^{-7}$ ir $1,0 \times 10^{-5}$ M B(a)P koncentracijos indukavo vienodą aberacijų procentą (40%) (Cheung et al., 2006).

Tris savaites otus *Scophthalmus maximus* paveikus 50 ppb dialilftalato, bisfenolio A ir tetrabromodifeniletario koncentracijomis, taip pat 30 ppb nonilfenolio, 0,5 ppm Šiaurės jūros žaliavinės naftos bei 0,5 ppm naftos ir 0,1 ppm alkilfenolių mišiniu buvo nustatyta, kad didžiausias MB dažnis (2,95%) susidarė kraujo eritrocituose po poveikio Šiaurės jūros naftos ir alkilfenolių mišiniu, palyginus su kontroline žuvų grupe (Bolognesi et al., 2006b). Literatūroje pateikiami duomenys apie 10 skirtingų PAA (antraceno, benz(a)antraceno, 7,12-dimetilbenz(a)antraceno, dibenz(a,h)antraceno, dibenz(a,c)antraceno, 3-metilcholantreno, benzo(a)pireno, benzo(e)pireno, chrizeno ir pireno) genotoksinį poveikį (Nishikawa et al., 2005). PAA turintys

keturis ir daugiau benzeno žiedų, dažniausiai yra mutageniški ir/ar kancerogeniški (IARC, 1983). Skirtingos benzo(a)pireno koncentracijos (nuo 0,22 µM iki 2,7 µM bei nuo 0,01 iki 1,0 ppm ribose) indukavo MB susidarymą upėtakių, karpų ir ungurių eritrocituose (Pacheco, Santos, 2002; Maria et al., 2002a,c; Kim, Hyun, 2006). Išaugusi MB dažnio indukcija registruota moliuskuose po poveikio B(a)P (0,1; 2 ir 10 µg/l) koncentracijomis (Binelli et al., 2009) bei 0,1 µg/l fenantreno koncentracija (Koukouzika, Dimitriadis, 2008). Nustatyta, kad MB dažnis *Perna perna* moliuskuose patikimai koreliuoja su jų audiniuose nustatomomis PAA koncentracijomis, ypač poliaromatinių angliavandenilių turinčių alkilintas formas (Francioni et al., 2007). 0,3; 0,9 ir 2,7 µM naftaleno koncentracijos indukavo aukštus MB bei kitų branduolio pažaidų dažnius ungurių *Anguilla anguilla* ląstelėse (Teles et al., 2003). Paveikus *Paralichthys olivaceus* kraujo ląstelių kultūras 5 skirtingų poliaromatinių angliavandenilių: B(a)P, fluoranteno, antraceno, pireno ir fenantreno (5; 10; 50 ir 100 ppb) koncentracijomis, kometų metodo pagalba nustatyta šių junginių poveikio priklausomybė nuo junginio, jo koncentracijos ir ekspozicijos trukmės. Didžiausi genotoksiškumo pokyčiai nustatyti *Paralichthys olivaceus* žuvų kraujo ląstelių kultūrose veikiant B(a)P, kiek mažesni – fluorantenu ir antracenu, lyginant su kontrolinės grupės žuvimis (Woo et al., 2006). Dvi dienas *M. galloprovincialis* moliuskus veikiant 5, 50, 100, 500 ir 1000 ppb B(a)P koncentracijomis MB dažnis moliuskų žiaunų bei hemolimfos ląstelėse išaugo kartu su tyrimuose didinama B(a)P koncentracija (Venier et al., 1997a). B(a)P koncentracijos ir MB indukcijos priklausomybė nustatyta azijos žalsvajame moliuske (*Perna viridis*) (Siu et al., 2004) bei dreisenose *Dreissena polymorpha* (Binelli et al., 2008).

4.2.2. Žaliavinės naftos poveikis priklausomai nuo ekspozicijos laiko

Šiame darbe pirmą kartą buvo aprašyti Šiaurės jūroje išgaunamos žaliavinės naftos genotoksiškumo ir citotoksiškumo tyrimai po 1, 2, 4 ir 8 dienų, taip pat po 2, 3, 4 ir 8 savaitių ekspozicijos. Po 1, 2, 4 ir 8 dienų poveikio 0,5 ppm Šiaurės jūros Statfjord B gręžinio nafta *M. edulis* žiaunų ląstelėse nustatytas

MB ir DB dažnių didėjimas priklausomai nuo ekspozicijos laiko: kontrolinė gr. < po 1-dienos < po 2-dienų < po 4-dienų < po 8-dienų. Veikiant 3 savaites šio gręžinio 0,5 ppm naftos koncentracija midijų žiaunų ląstelėse taip pat nustatyti statistiškai patikimi tirtų genotoksiškumo ir citotoksiškumo parametrų skirtumai nuo kontrolinės midijų grupės. Tuo tarpu žuvyse po šio poveikio, rasta statistiškai patikima MB indukcija otų kraujo ir inkstų eritrocituose. Po 2 savaičių poveikio Oseberg C žaliavinės naftos 0,2 ppm koncentracija nustatytas statistiškai patikimas MB dažnio padidėjimas Atlantinių menkių inkstų eritrocituose, bei statistiškai patikimas BP dažnio padidėjimas šių žuvų kepenų eritrocituose.

Nagrinėjant skirtingų arktinės Barenco jūros žaliavinės naftos koncentracijų 4 ir 8 savaičių poveikį otų kepenų eritrocituose, aukščiausi MB, BP, DB bei dvibranduolių eritrocitų, kurių branduoliai sujungti nukleoplazmine jungtimi (DB_t) dažniai nustatyti po 4 savaičių. Tuo tarpu po 8 savaičių gauta didžiausia citotoksiškumo indukcija pagal fragmentuotų-apoptozinių ląstelių susiformavimą. Taigi, šio darbo rezultatai parodė, kad iš Šiaurės jūros gręžiniuose (Statfjord B ir Oseberg C) išgaunamos naftos genotoksinis poveikis atsiranda jau po vienos dienos ir išlieka iki 3 savaičių. Arktinės naftos genotoksinis poveikis didesnis po 4 savaičių, o citotoksinis – po 8 savaičių.

Literatūroje pateikiami duomenys apie atskirų naftos komponentų genotoksinį poveikį priklausomai nuo ekspozicijos laiko, pvz., taikant MB testą buvo nustatyti B(a)P poveikio genotoksiškumo pokyčių laike dėsningumai *Mytilus* sp. ir *Perna viridis* rūšyse (Siu et al., 2004). Veikiant dimetilbenzo[α]antracenu statistiškai patikimi MB dažnio pokyčiai *M. galloprovincialis* moliuskuose stebėti jau po 24 h nuo eksperimento pradžios, tačiau aukščiausi MB dažniai nustatyti po 7 dienų (Bolognesi et al., 1996).

Po 15 dienų išaugusi MB indukcija registruota moliuskuose veiktuose 0,1 $\mu\text{g/l}$ fenantreno koncentracija (Koukouzika, Dmitriadis, 2008), bei po 2, 3 ir 4 dienų poveikio 2 $\mu\text{g/l}$ ir 10 $\mu\text{g/l}$ B(a)P koncentracijomis (Binelli et al., 2009). Net ir po 4 mėnesių po naftos išsipylimo *M. galloprovincialis* moliuskuose nustatyti MB dažniai iki 10 kartų viršijo kontrolinį lygį. Aukšti branduolio

pažaidų lygiai nustatyti dvigeldžių moliuskuose net po 10 metų nuo įvykusios naftos išsipylikimo avarijos (Bolognesi et al., 2006a). MB susiformavimo priklausomybė nuo ekspozicijos laiko nustatyta *M. edulis* moliuskų hemocituose, vertinat etilmetansulfonato ir įvairių tričio koncentracijų genotoksinį poveikį. Statistiškai patikimai aukštesni MB dažniai nustatyti jau po 3 dienų poveikio šiomis medžiagomis, o didžiausi MB dažniai fiksuoti po 7 dienų, lyginant su kontroline grupe (Jha et al., 2005).

Eksperimentiniuose tyrimuose kuomet kaip bioindikatoriai naudotos žuvis, nustatyta, kad eritrocituose indukuotas MB dažnis priklauso nuo PAA junginių poveikio laiko ir gali būti registruojamas jau po keletos valandų. Statistiškai patikimas MB bei kitų branduolio pažaidų dažnio padidėjimas žuvyse nustatytas jau po 4 ir 8 h poveikio 0,3; 0,9 ir 2,7 μ M naftaleno koncentracijomis, tačiau po 6 h poveikio patikimi skirtumai rasti veikiant tik 0,9 ir 2,7 μ M koncentracijomis (Gravato, Santos, 2002). Eksperimentinėmis sąlygomis veikiant 4, 8, 16, 24, 48 ir 96 h B(a)P (0 iki 0,1 mM) koncentracijomis paprastuosius vilkešerius (*Dicentrarchus labrax*), aukščiausias MB ir kitų branduolio pažaidų dažnis kraujo eritrocituose buvo po 16 h. Vėliau branduolio pažaidų dažnis žuvų kraujo ląstelėse mažėjo ir po 24 h stabilizavosi (Gravato, Santos, 2003). Neotropinių *Prochilodus lineatus* žuvų mailių 6, 24 ir 96 h bei 15 dienų paveikus tirpia dizelino frakcija didžiausia MB indukcija žuvų eritrocituose nustatyta po 24 h. Po paros poveikio šia frakcija MB dažnis žuvų eritrocituose išaugo 5,12 karto, tuo tarpu po 15 parų poveikio MB dažnis buvo tik 1,8 karto aukštesnis nei kontrolinėje žuvų grupėje (Vanzella et al., 2007).

Aneugeniniai junginiai – mitomicinas C, ciklofosfamidai ir 5-fluoruracilas didžiausią MB dažnį žuvų (*Tilapia rendalli*, *Oreochromis niloticus* ir *Cyprinus carpio*) rūšyse sukėlė po 7 dienų poveikio, o po 14 d. poveikio MB lygis stabilizavosi (Grisolia et al., 2001). Statistiškai patikimas MB dažnio padidėjimas juodosios drūtagalvės rainės (*Pimephales promelas*) kraujo eritrocituose nustatytas po 7 dienų veikiant šias žuvis Cr(VI), tuo tarpu po 21 dienos rastas MB dažnio sumažėjimas (de Lemos et al., 2001).

Po 12 h poveikio B(a)P (0,5; 3 ir 10 µg/l) koncentracijomis rastas išaugęs DNR pažaidų lygis *Chlamys farreri* moliuskų (patelių) gonadose (Jing-jing et al., 2009). 6 dienas *Chlamys farreri* moliuskus veikiant B(a)P (0,5 ir 3 µg/l) koncentracijomis DNR grandinių trūkių dažnis statistiškai patikimai skyrėsi nuo kontrolinio, o po 20 dienų poveikio DNR pažaidų lygis sumažėjo iki kontrolinio lygio (Pan et al., 2008). MB susiformavimo priklausomybė, nuo ekspozicijos trukmės nustatyta *Dreissena polymorpha* hemocituose veikiant triklozano (chlorintas aromatinis junginys, turintis eterių ir fenolių funkcinės grupės) 1, 2 ir 3 nM koncentracijomis. Didžiausia MB indukcija hemocituose registruota po 24 h, o po 48, 72 ir 96 h poveikio grupėse MB dažnis didėjo, tačiau jau ne taip ženkliai lyginat su kontroline grupe (Binelli et al., 2009).

4.2.3. Naftos platformose susidarančių gamybinių vandenų genotoksiškumas ir citotoksiškumas

Kartu su iš naftos ir dujų platformų išleidžiamais gamybiniais vandenimis į aplinką patenka įvairūs PAA, alkilfenoliai, sunkieji metalai ir kiti biotai pavojingi junginiai. Vien 2000 metais su GV į Norvegijos ekonominę zoną pateko apie 44 tonų alkilintų fenolių, kurie pasižymi lipofilinėmis savybėmis (Hasselberg et al., 2004). Neigiamas GV poveikis vandens organizmams aprašytas dar 1989 metais, kuomet atliekant Šiaurės jūros monitoringą buvo nustatytas ryšys tarp produkuojamo GV kiekio ir chromosomų aberacijų kiekio žuvų embrionuose (von Westernhagen et al., 1989), o nuo 1970 m. atliekamas žuvų ligų monitoringas parodė ypač padažnėjusius kancerogeninius susirgimus (Lang, Wosniok, 2003). Naftos platformų gamybiniais vandenimis užterštose Šiaurės jūros zonose (Statfjord ir Troll naftos platformų telkiniuose), taikant aktyvaus monitoringo metodiką, midijų ir Atlantinių menkių ląstelėse buvo aprašytas mikrobranduolių dažnio padidėjimas (Hylland et al., 2006).

Šiaurės jūros platformų zonose sugautų žuvų analizė parodė, kad gamybiniuose vandenyse esančios medžiagos veikia kaip estrogenai (Bateman et al., 2004; Stentiford, Feist, 2005). Tokiu poveikiu pasižymi ilgas alkilo grandines turintys alkilfenoliai (Barse et al., 2006; Tollefsen et al., 2008).

Gamybinių vandenu sudėtyje trumpas alkilo grandines turinčių AF kiekis santykinai didesnis, nei turinčiųjų ilgas (Boitsov et al., 2004). Yra žinoma, kad estrogeniniu poveikiu pasižymi ir Šiaurės jūros naftos paltformų gamybiniuose vandenyse randamas 4-tert-butilfenolis (Tollefsen et al., 2006), tačiau šių junginių genotoksinės ir citotoksinės savybės dar nėra iširtos. Trūksta informacijos ir apie gamybinių vandenu sudėtyje dominuojančių žemos molekulinės masės PAA (<5 žiedai) junginių biologinį poveikį žuvims (Neff, 2002). Literatūroje pateikiami duomenys, kad GV sudėtyje 4 žiedus turintys PAA pvz. fluorantenas inhibuoja CYP1A fermento indukciją paprastajame fundule (*Fundulus heteroclitus*) (Willett et al., 2001). Sumažėjusi šio fermento ekspresija aprašyta veikiant menkes *G. morhua* Šiaurės jūroje išgaunamos naftos ir AF mišiniu (Sturve et al., 2006).

Šiame darbe Šiaurės jūros Oseberg C naftos platformoje produkuojamų gamybinių vandenu geno-citotoksinis poveikis analizuotas Atlantinių menkių inkstų ir kepenų eritrocituose. Šios platformos gamybinių vandenu sudėtyje randami įvairūs PAA, nafta ir AF (lentelė 4.2.3.1.). Tyrimuose naudoti eksperimentiniai alkilfenolių mišiniai buvo sumodeliuoti atsižvelgiant į Oseberg C naftos platformos aplinkoje būdingas jų koncentracijas (lentelė 4.2.3.2.). Laboratorinėmis sąlygomis buvo nustatyta, kad 3 savaites veikiant Statfjord B 0,5 ppm ŽN+8AF(0,1µg/l)+11PAA (0,0915µg/l) mišiniu Atlantinių menkių kepenų eritrocituose susiformavo labai didelis (1,13%) MB dažnis, tuo tarpu to paties tipo mišinio iš Oseberg C gręžinio naftos, alkilfenolių ir PAA poveikyje, menkėse susidarė 2 kartus mažesnis MB dažnis. Palyginus šiuose tyrimuose naudotų dviejų Šiaurės jūros naftos paltformų žaliavinės naftos sudėtyje esančių PAA kiekius (pagal Sund et al., 2006) Statfjord B naftoje nustatytos PAA nominalinės reikšmės buvo didesnės negu Oseberg C naftoje (4.2.1.1. ir 4.2.3.1. lentelės).

Atlantines menkes 2 savaites paveikus Oseberg C platformos GV atskiestais santykiu 1:1000 ir 1:200, statistiškai patikimai padidėjo MB ir BP dažnis po poveikio 1:200 atskiedimu. Paveikus žuvis 4AF mišinio 2000 ng/l koncentracija, menkių kepenų ir inkstų eritrocituose nustatyti didžiausi

genotoksiškumo (MB ir BP) bei citotoksiškumo (FA) lygiai. Dar aukštesnis susiformavusių MB dažnis nustatytas žuvyse po poveikio 9AF(37µg/l) mišiniu, o po poveikio 0,2 ppm ŽN+9AF(37µg/l)+21PAA(12µg/l) mišiniu registruotas didžiausias citotoksiškumo padidėjimas.

4.2.3.1. lentelė Eksperimente naudotų alkilfenolių sudėtis (IRIS duomenys).

Komponentai	4 alkilfenolių mišinio (mg/l)			9 alkilfenolių mišinio (mg/l)
	2	10	2000	
2-metilfenolis	-	-	-	6676
4-metilfenolis	-	-	-	2260
3.5-dimetilfenolis	-	-	-	667
2.4.6-trimetilfenolis	-	-	-	225
4-tert-butilfenolis	0,19	0,951	187	112
4-tert-butil-2-metilfenolis	-	-	-	27,7
4-n-pentilfenolis	0,198	0,99	195	55,4
4-n-heksilfenolis	0,202	1,01	199	16,4
4-n-heptilfenolis	0,198	0,99	195	8,2

4.2.3.2. lentelė Eksperimente naudotos Oseberg C žaliavinės naftos ir gamybiniame vandenyje buvusių PAA sudėtis (IRIS duomenys).

Komponentai	Žaliavinė nafta (ŽN) ng/l	ŽN+AF+PAA mišinys ng/l	Gamybiniai vandenys (GV) 1:1000	Gamybiniai vandenys (GV) 1:200
Naftalenas	164	1541	14	64
C1-Naftalenas	568	3850	9	36
C2-Naftalenas	778	3977	6	21
C3-Naftalenas	515	1307	6	26
Acenaftilenas	2	54	nd	nd
Acenaftenas	2	11	nd	nd
Fluorenas	20	159	0,3	2
Fenantrenas	35	148	1	3
C1-Fenantrenas	76	206	2	9
C2-Fenantrenas	90	136	1	15
Dibenzotiofenas	9	34	nd	1
C1-Dibenzotiofenas	27	65	1	4
C2-Dibenzotiofenas	33	55	1	5
Fluorantenas	2	6	0,3	0,4
Pirenas	3	11	0,3	1
Benzo(a)antracenas	5	7	1	2
Chrizenas	4	15	1	1
C1-Chrizenas	9	17	nd	2
C2-Chrizenas	12	11	nd	3
Benzo(b)fluorantenas	1	2	nd	nd
Benzo(a)pirenas	nd	nd	nd	nd
Benzo(g,h,i)perilenas	nd	nd	nd	nd
Suma PAA	2353	11606	43	190

nd – žemiau randamos ribos;

Šio darbo rezultatai atskleidė ypač didelį naftos platformose susidarančių gamybinių vandenų potencialą sukelti branduolio pumpurų susidarymą, t.y. DNR pažaidas Atlantinių menkių kepenų eritrocituose. Veikiant 2 savaites visomis eksperimente naudotomis modelinėmis 4AF mišinio koncentracijomis, 9AF bei ŽN+9AF+21PAA mišiniais, taip pat GV 1:1000 ir 1:200 koncentracijomis, susiformavusių BP dažnis buvo žymiai aukštesnis negu MB dažnis. Po poveikio Oseberg C naftos platformos ŽN+9AF+21PAA mišiniu BP indukcija buvo net 4,5 karto aukštesnė negu MB dažnis. Kai tuo tarpu po poveikio Statfjord B analogišku mišiniu nustatyta 5,6 karto žemesnė BP dažnio indukcija nei MB. Literatūroje pateikiami duomenys, kad dėl teršalų aneugeninio poveikio susiformuoja didelis MB ir mažas BP dažnis, tuo tarpu klastogeniniai junginiai sukelia vienodą MB ir BP indukciją (Çavas, 2008). Atsižvelgiant į šį teiginį ir remiantis šio darbo rezultatais galima padaryti išvadą apie Šiaurės jūroje eksploatuojamų Statfjord ir Oseberg naftos telkinių taršos genotoksinio poveikio skirtumus. Tuo pačiu išryškėja ir genetinės rizikos susidarymo šių platformų aplinkoje skirtumai.

Darbo tyrimų rezultatai taip pat parodė, kad prie žaliavinės naftos pridėjus AF ir PAA, tirtų žuvų eritrocituose ryškiai padidėjo MB ir BP dažnis. Kita vertus buvo nustatyta, kad pridėjus AF ir PAA, ypač suintensyvėja branduolio pumpurų susidarymas. Tai rodo šių junginių tiesioginę įtaką DNR pažaidų susidarymui bei dėl struktūrinių ar funkcinių DNR pažeidimų sutrikusios genetinės medžiagos intensyvų pašalinimą iš žuvų ląstelių. Tačiau pridėjus santykinai dideles alkilfenolių ir poliaromatinių angliavandenilių junginių koncentracijas prie Oseberg C platformoje išgaunamos žaliavinės naftos, galima ir MB supresija, kuri įvyksta dėl ląstelių mitozinio indekso sumažėjimo.

Literatūros duomenimis, branduolio pumpurai susiformuoja iš chromosomų šalinamos amplifikuotos DNR (Shimizu et al., 1998, 2000), ar vykstant pažeistos DNR reparacijai (Haaf et al., 1999). Mūsų tyrimai parodė, kad Oseberg C naftos platformos GV sukelia ypač didelę branduolio pumpurų indukciją. Remiantis Çavas (2008) duomenimis galima teigti, kad Oseberg C naftos platformos gamybiniuose vandenyse yra gausu klastogeninius efektus

sukeliančių junginių. Literatūroje pateikiami duomenys apie nustatytus BP dažnius sidabrinuose karosuose (*Carassius auratus*) po poveikio sunkiaisiais metalais (Çavas, 2008). Aukštas branduolio pumpurų bei MB dažnis aprašytas žuvyse sugautose Goksu deltoje (Turkija), kurioje rastos didelės sunkiųjų metalų (Cu, Cd, Ni, Pb) koncentracijos (Ergene-Gozukara et al., 2007).

Literatūroje yra duomenų apie eksperimentinius Šiaurės jūros naftos platformų GV efektus *G. morhua* žuvyse, kurios buvo veiktos 1:1000 ir 1:200 gamybinių vandenų atskiedimais, 0,2 ppm žaliavinės naftos bei C4–C7 alkilintų fenolių mišinio 2000 ng/l koncentracija, o taip pat žaliavinės naftos, alkilfenolių ir PAA mišiniu. Aukščiausia MB dažnio indukcija nustatyta menkių inkstų ir kepenų eritrocituose po poveikio GV 1:200 atskiedimu, šiek tiek žemesni MB dažniai rasti veikiant C4–C7 alkilintų fenolių mišinio 2000 ng/l koncentracija (Bagni et al., 2005).

Casini ir bendraautoriai (2006) aprašė multi-biožymenų sistemą, skirtą nustatyti Aquila naftos telkinyje (Adrijos jūra) produkuojamų gamybinių vandenų toksiškumui. Kaip signalinė GV toksiškumo lygio sistema gambuzijose *Gambusia affinis* naudoti skirtingi biožymenys (jų tarpe ir mikrobranduolių testas). Šių žuvų patelių periferinio kraujo eritrocituose buvo rasti padidėję MB dažniai, taip pat gan aukštos kancerogeninių PAA (benz(a)pireno, benz(b)fluoranteno, benz(k)fluoranteno, chrizeno, benz(a)antraceno, dibenz(a,h)antraceno, indeno(1,2,3-c,d)pireno) koncentracijos audiniuose bei aukštas naftalenų tipo PAA metabolitų kiekis tulžyje (Casini et al., 2006).

Šiaurės jūros platformų išleidžiamuose gamybiniuose vandenyse randami C1–C7 alkilo grupes turintys alkilfenoliai (Brendehaug et al., 1992). *Danio rerio* žuvyse tirtas trijų skirtingų koncentracijų, žemos molekulinės masės (C1–C4) bei trumpas alkilo grandines turinčių alkilfenolių mišinio poveikis, kuris sumodeliuotas atsižvelgiant į alkilfenolius randamus 16 naftos gavybos platformų tokių kaip – Ekofisk, Gullfaks, Oseberg, Snorre, Statfjord, Troll, Asgard produkuojamuose GV. Eksperimente naudotų PAA svyravo nuo 0,54 ppb (žemoje koncentracijoje) iki 5,4 ppb (aukščiausioje koncentracijoje). Žuvų

tulžyje nustatytų pireno metabolitų lygis veikiant aukščiausia sumodeliuota GV koncentracija siekė nuo 23 iki 1081 ng/g, tuo tarpu kontrolinėje žuvų grupėje svyravo 17–133 ng/g ribose (Holth et al., 2008).

Jūrinių naftos platformų aplinkoje aptinkama ir įvairių sunkiųjų metalų, kurie išskiriami į vandenį naftos išgavimo technologinių procesų metu su produkuojamais GV ir nafta. Todėl šiame darbe buvo nagrinėtas atskirų sunkiųjų metalų modelinių mišinių gen-citotoksinis poveikis vaivorykštiniams upėtakiams. Sunkiųjų metalų modelinio mišinio (SMMM – Cu 0,874; Zn 0,93; Pb 4,7; Ni 0,66; Cr 0,33 ir Mn 18 mg/l) 21,79% ir 10,89% koncentracijos sukėlė statistiškai patikimą MB dažnio padidėjimą. Palyginus su kontroline žuvų grupe, 4,3 karto didesnis MB dažnis nustatytas kraujo eritrocituose, veikiant žuvis (21,79%) ir 3,4 karto paveikus (10,89%) koncentracija.

Po 4 dienų poveikio Cu ir Zn modelinio mišinio 0,06; 0,125 ir 0,25 mg/l koncentracijomis, MB indukcija vaivorykštinio upėtakio kraujo eritrocituose buvo 5 kartus aukštesnė 0,25 mg/l ir 2-kartus – 0,125 mg/l Cu+Zn poveikio grupėse, palyginus su kontrolinės grupės žuvimis. Statistiškai patikimi branduolio pumpurų skirtumai gauti upėtakiuose po poveikio 0,25 koncentracija ($P=0,0110$). Statistiškai patikimų fragmentuotų-apoptozinių ir dvibranduolių ląstelių dažnio skirtumų nerasta. Vaivorykštinius upėtakius 4, 8 ir 12 dienų palaikius švariame vandenyje, didžiausias MB dažnių sumažėjimas šių žuvų kraujo eritrocituose nustatytas po 8 dienų. Tačiau po 4 ir 12 d. laikymo švariame vandenyje, 0,25 ir 0,125 mg/l eksperimentinėse žuvų grupėse buvo rasti statistiškai patikimi MB dažnio skirtumai nuo kontrolinio lygmens. Tokiu būdu, šių eksperimentų rezultatai rodo sunkiųjų metalų genotoksiškumą esant aplinkoje gan mažomis tirtų metalų koncentracijomis, tačiau taip pat ir ribotas šių žuvų atsistatymo galimybes.

Atlikti tyrimai, kuriuose laboratorinėmis ir lauko sąlygomis buvo vertinamas metalų genotoksinis poveikis žuvis ir moliuskams bei nustatytas glaudus ryšys tarp metalų koncentracijų ir branduolio pažaidų dažnio. Laboratorinių eksperimentų metu nustatyta, kad Cd 3,4-mg/kg dozė gali sukelti branduolių pažaidų susiformavimą žuvų inkstų eritrocituose (Ayllón, Garcia-Vazquez,

2000). Cd ir Hg (1,7 mg metalo/kg sauso kūno svorio) injekcijos iššaukė MB dažnio padidėjimą europiniame upiniame unguryje (*Anguilla anguilla*). MB dažnis padidėjo iki 2,64‰ po poveikio Cd, o veikiant Hg junginiais – iki 2,35‰ (Sanchez-Galan et al., 2001). Cu^{2+} (0,1 ir 2,5 mg/l) bei Cd^{2+} (0,1 ir 1,0 mg/l) tirpalų koncentracijų genotoksinis poveikis nustatytas *Carassius auratus gibelio* žuvų kraujo eritrocituose bei žiaunų ir pelekų ląstelėse (Arkhipchuk, Garanko, 2005). Vaivorykštinio upėtakio žiaunų ląstelių kultūras paveikus CuSO_4 (1 ir 2,5 μM) koncentracijomis registruoti DNR grandinių trūkiai bei apoptozinių ląstelių susidarymas (Bopp et al., 2008). Po 7 dienų poveikio CuCl_2 0,2 $\mu\text{mol/l}$ koncentracija *Anguilla anguilla* žuvyse nustatyta aukšta branduolio pažaidų indukcija, lyginat su kontroline grupe (Oliveira et al., 2008). Veikiant metilintu gyvsidabriu aukšta MB indukcija rasta *Salmo trutta* ir *Anquilla anquilla* kraujo eritrocituose (Sanchez-Galan et al., 2001). Padidėjęs MB dažnis kraujo eritrocituose fiksuotas ir sidabrinuose karosuose (*Carassius auratus gibelio*), kuomet žuvis buvo veikiamos Cr(III) (Al-Sabti, Hårdig, 1990). Statistiškai patikimi MB dažnių skirtumai, lyginant su kontrole, rasti *Oreochromis niloticus* žuvų žiaunų ir kraujo ląstelėse, po poveikio chromo junginiais (Çavas, Ergene-Gozukara, 2005a). Iki 163,5 kartų aukštesnis nei kontrolinėje grupėje MB dažnis nustatytas *Danio rerio* žuvyse po poveikio 5 mg/l arseno koncentracija (Ramirez, Garcia, 2005).

Literatūroje yra duomenų apie sunkiųjų metalų mišinių genotoksinį poveikį žuvis. Vario ir cinko mišinių poveikyje vaivorykštiniuose upėtakiuose (*Oncorhynchus mykiss*) buvo nustatyti patikimai aukštesni MB dažniai nei kontrolinėje žuvų grupėje (Bagdonas, 2006). Cu (0,01–0,25 mg/l), Cd (0,005–0,1 mg/l) ir Cr(VI) 5 mg/l koncentracijų indukuotą mikrobranduolių ir dvibranduolių ląstelių susidarymą *Cyprinus carpio*, *Carassius gibelio* ir *Corydoras paleatus* žuvų kraujo ir kepenų eritrocituose bei žiaunų ląstelėse nustatė Çavas su bendraautorais (2005). Sidabrinio karoso (*Carassius auratus*) kraujo eritrocituose ir žiaunų bei pelekų ląstelėse registruota MB ir BP indukcija veikiant žuvis gyvsidabrio chlorido (1;5 ir 10 $\mu\text{g/l}$) bei švino acetato (10, 50 ir 100 $\mu\text{g/l}$) koncentracijomis (Çavas, 2008). Mikrobranduolių testas M.

galloprovincialis moliuskuose parodė HgCl_2 , CuCl_2 ir CdCl_2 junginių genotoksinį poveikį (Siu et al., 2004).

Costa su bendraautoriais (2008) 28 dienas laboratorinėmis sąlygomis veikė Senegalinio jūrų liežuvio (*Solea senegalensis*) mailių sedimentais, surinktais iš trijų skirtingų taršos lygiu pasižymėjusių Portugalijos priekrantės zonų. Sedimentuose buvo ištirta eilė sunkiųjų metalų (Cr, Ni, Cu, Zn, As, Cd ir Pb), organinių junginių (PAA ir PCB). Zonose kur buvo rastos didelės sunkiųjų metalų ir organinių junginių koncentracijos, tirtųjų žuvų kraujo eritrocituose nustatyti ir aukščiausi branduolio pažaidų bei DNR grandinių trūkių dažniai. Aukščiausias genotoksinis poveikis ir ženkli koreliacija tarp genotoksinų pažaidų dažnio ir teršalų kiekio buvo registruota 14 ir 28 poveikio dieną. Be to, buvo nustatyta, kad sunkieji metalai veikia kaip inhibitoriai (Costa et al., 2008). Aprašyta koreliacija tarp vandenyje registruotų sunkiųjų metalų Hg, Cu, Pb ir Cr koncentracijų ir MB susiformavimo, metalotioninų kiekio bei lizosomų stabilumo *Mytilus galloprovincialis* moliuskuose tiriant Graikijos Patraso įlankos genotoksiškumą. Aukščiausios sunkiųjų metalų koncentracijos 6,10 $\mu\text{g/l}$ (Pb), 14,90 $\mu\text{g/l}$ (Cr) ir 21,40 $\mu\text{g/l}$ (Cu) rastos labiausiai užterštoje stotyje žiemos metu (Pytharopoulou et al., 2006).

4.2.4. Genotoksiškumo ir citotoksiškumo ypatumai skirtingose organizmų rūšyse

Trys žuvų ir dvi moliuskų rūšys buvo naudotos kaip bioindikatoriai vertinat geno-citotoksinį skirtingų naftos platformų poveikį *in situ* bei atliekant laboratorinius tyrimus. Nagrinėjant Statfjord B naftos platformos aplinkoje genotoksinį ir citotoksinį poveikį perkeltų midijų ir Atlantinių menkių audiniuose nustatyta, kad moliuskų žiaunų ląstelėse susiformavusių DB dažnis buvo iki 27,8 kartų, MB – iki 18 kartų, BP – iki 11 kartų, o FA – iki 8,5 karto aukštesnis nei žuvyse.

Laboratorinių eksperimentų metu Statfjord B naftos žaliavinės naftos geno-citotoksinis poveikis tirtas otų ir Atlantinių menkių (kraujo ir inkstų) eritrocituose bei midijų žiaunų ląstelėse. Po poveikio 0,5 ppm Statfjord B

žaliavinės naftos koncentracija bei ŽN, alkilfenolių ir PAA mišiniu otuose nustatyta 2 kartus didesnė MB indukcija nei menkėse. 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. Aukštesnis branduolio pažaidų lygis rastas ir *A. anatina* moliuskuose lyginat su *P. fluviatilis* žuvimis kuomet abi šios rūšys buvo paveiktos tomis pačiomis Minijos gręžinio žaliavinės naftos koncentracijomis.

Tokie tyrimų rezultatai gauti dėl biologinių bei fiziologinių tirtų rūšių ypatumų, taršos komponentų kaupimo, transformavimo ir šalinimo žuvyse ir moliuskuose skirtumų (Baršienė et al., 2006a). Moliuskuose yra primityvios teršalus degraduojančios sistemos (Depledge, Fossi, 1994; Naimo, 1995). Dvigeldžiai moliuskai maitinasi intensyviai filtruodami vandenį, tad žiaunų epitelines ląsteles vandenyje esantys genotoksiniai taršos komponentai gali veikti tiesiogiai. Midijoms būdingas sėslus gyvenimo būdas, todėl užterštoje aplinkoje jos patiria nuolatinę aplinkos taršos genotoksinį poveikį, tuo tarpu žuvims būdingos sezoninės migracijos, jos gali pasitraukti iš užterštų biotopų. Dėl to tiriant dvigeldžius moliuskus žymiai tiksliau įvertinamas tam tikros pasirinktos vietos genotoksiškumas, ypač jei tyrimai atliekami eilę metų. Tuo tarpu MB ar BP tyrimai žuvų ląstelėse gali atspindėti didesnio regiono aplinkos genotoksiškumo ypatumus (Baršienė et al., 2004; Rybakovas, 2007; Rybakovas et al., 2009).

Panašaus pobūdžio tarprūšiniai skirtumai nustatyti paveikus midijas, Atlantinės menkes, otus ir kitais organiniais teršalais (bisfenoliu A, dialilftalatu bei tetrabromodifenileteriu-47). MB dažnis midijų žiaunų ląstelėse buvo iki 6,3 karto aukštesnis negu otų ir 11 kartų aukštesnis negu menkių kraujo eritrocituose registruoti dažniai (Baršienė et al., 2005, 2006c). Analizuojant tarprūšinius MB dažnio svyravimus minėtose žuvų rūšyse, MB indukcija 3,7 karto buvo aukštesnė otų kraujo eritrocituose nei menkių (Baršienė et al., 2005). Tyrimais nustatyta, kad bisfenolis A ir bisfenolis F gali sąveikauti su centrosoma mitozinėje dalijimosi verpstėje bei su chromosomų centromeromis

ir sukelti mutageninį poveikį (Parry et al., 2002), taip pat indukuoti seserinių chromatidžių mainus ir MB susiformavimą periferinio kraujo ląstelėse (Sueiro et al., 2003).

Šio tyrimo rezultatai parodė, kad tarprūšiniai genotoksiškumo efektai midijų, Atlantinių menkių ir otų audinių ląstelėse yra labai panašūs tiek veikiant naftos platformų, tiek kitais organiniais teršalais. Visais atvejais dugninės žuvis pasižymėjo didesniu jautrumu genotoksiniam junginių poveikiui. Kadangi tai eurihalinės žuvis, jos nuolat artimai kontaktuoja su dugno nuosėdomis, kur dažniausiai sukaupiamos didžiausios genotoksinėmis, citotoksinėmis ir kancerogeninėmis savybėmis pasižyminčių junginių koncentracijos. Tokie junginiai į organizmą gali patekti per virškinamąjį traktą bei per visą kūno paviršių, priklausomai nuo junginių klasės ir biologinio prieinamumo (Porte, Albaiges, 1993). Be to, tarprūšinius genotoksiškumo skirtumus žuvyse galėjo sąlygoti DNR reparacijos specifiškumas, skirtingos trukmės ląstelių ciklas, fiziologiniai ypatumai, taršos komponentų biotransformacijos specifika (Baršienė et al., 2005).

Literatūros šaltiniuose tarprūšiniai MB susiformavimo skirtumai nustatyti midijose ir jūrų žvaigždėse *Asterias rubens* po 3, 5 ir 7 dienų poveikio metilmetano sulfonatu ir ciklofosfamidų. MB dažnis jūros žvaigždžių keolomocituose buvo aukštesnis negu midijų hemocituose (Canty et al., 2009). Rūšiai specifinis atsakas buvo nustatytas lyginant DNR pažaidų dažnį *Mytilus galloprovincialis* moliuskuose, *Maja crispata* krabuose ir paprastosiuose gambuzijose (*Gambusia affinis*) po poveikio 10µg/g B(a)P koncentracija (Bihari, Fafandel, 2004). Tarprūšiniai skirtumai po poveikio kolchicinu, ciklofosfamidų ir mitomicinu C bei sunkiaisiais metalais (Cd ir Hg) gauti paprastosiuose rainėse (*Phoxinus phoxinus*) ir plačiapelekėse pecilijose (*Poecilia latipinna*) (Ayllón, Garcia-Vazquez, 2000). *Salmo trutta*, *Phoxinus phoxinus* ir *Anguilla anguilla* žuvis paveikus ciklofosfamidų, kolchicinu bei Cd, didžiausias MB lygis rastas lašišinėse žuvyse (Rodriguez-Cea et al., 2003). Vertinant Danijos uostų užterštumą ir lyginant teršalų susikaupimo dvigeldžių moliuskų *Mytilus edulis* bei pilvakojų *Littorina littorea* audiniuose taip pat

išryškėjo tarprūšiniai skirtumai. Tirtu uosto sedimentuose bei biotoje, buvo nustatytos gan aukštos sunkiųjų metalų (Cd, Cu, Pb ir Zn), butiltino junginių (TBT, DBT ir MBT) bei 19 PAA ir 9 PCB giminingų junginių koncentracijos (Rank, 2009). MB susidarymo tarprūšiniai skirtumai aprašyti gėlavandenėse dvidėmėse grotžuvėse (*Astyanax bimaculatus*) ir tigrinėse trairose (*Hoplias malabaricus*) tiriant Japaratuba upės (Brazilija) aplinkos genotoksiškumą (Pantaleao et al., 2006). Literatūroje pateikiama duomenų apie tarprūšinius MB ir BP susiformavimo ypatumus įvairiose Viduržemio jūros žuvų rūšyse. Europinės barakudos (*Sphyraena sphyraena*), paprastosios stauridės (*Trachurus trachurus*), auksaspalvio sparo (*Sparus auratus*) bei *Pagellus mormyrus*, *Sargus sargus* žuvų kraujo eritrocituose susiformavusių branduolio pumpurų dažnis buvo žymiai aukštesnis nei mikrobranduolių. Tuo tarpu, dryžuosiuose jūriniuose karosuose (*Boops boops*), kininėse geltonuodegėse (*Seriolia dumerili*), europinėse barzdotėse (*Mullus barbatus*) – aukštesnis buvo MB dažnis, nei BP, o paprastųjų vilkešerių (*Dicentrarchus labrax*) eritrocituose branduolio pumpurų visai nenustatyta (Bolognesi et al., 2006b).

4.2.5. Genotoksiškumo ir citotoksiškumo ypatumai skirtinguose organizmų audiniuose

Genotoksinio ir citotoksinio įvairių teršalų poveikio įvertinimui žuvyse dažniausiai naudojami kraujo eritrocitai, kadangi kraujo tepinėlių paruošimo technika bei mikroskopinė analizė sąlyginai lengva. Tačiau šio metodo trūkumas yra tas, kad periferinio kraujo eritrocituose būna žemas mikrobranduolių dažnis, kadangi subrendę eritrocitai nesidalina. Iki šiol nedaug yra žinoma, kokia dalis eritroblastų su branduolio pažaidomis patenka ir cirkuliuoja periferiniame kraujyje, kokie DNR reparacijos mastai bei kiek trunka žuvų kraujo ląstelių ciklas (Buschini et al., 2004). Žuvų hemopoeziniuose audiniuose besiformuojančios kraujo ląstelės pasižymi aukštu mitoziniu aktyvumu, tad atliktų tyrimų duomenimis, jose dažniau nei periferinio kraujo subrendusiuose eritrocituose pasireiškia genotoksiniai ksenobiotikų efektai (Tice, Ivvet, 1985).

Atsižvelgiant į eritropoezės procesų skirtumus žuvų audiniuose, šiame darbe naftos platformų teršalų genotoksiškumo ir citotoksiškumo parametrai vertinti kraujo, inkstų ir kepenų eritrocituose. Analizė kepenų eritrocituose pasirinkta žinant, kad daugelio žaliavinės naftos ir gamybinių vandenų sudėtyje esančių PAA junginių metabolinė aktyvacija vyksta žuvų kepenyse, nes ten išsidėstę efektyvūs I-os ir II-tros biotransformacijos fazių fermentų rinkiniai (Winzer et al., 2002). Branduolio pažaidų analizė žuvų inkstų eritrocituose pasirinkta todėl, kad aktyvuoti genotoksinėmis ir kancerogeninėmis savybėmis pasižyminčių PAA metabolitų šalinimas vyksta ne tik su tulžimi, bet ir per žuvų inkstus. Todėl inkstuose besiformuojantys eritrocitai irgi tampa tiesioginiu naftos metabolitų taikiniu.

Branduolio pažaidų analizė besivystančiuose žuvų kepenų ir inkstų eritrocituose yra gan jautri biožymenų vertinimo sistema, tad gali būti panaudota vykdant hidroekosistemų biomonitoringą naftos produktų genotoksiškumui įvertinti ir ypač po naftos avarinių išsiliejimų. Mikrobranduolių susidarymą žuvų hepatocituose po PAA junginiais poveikio tyrė (Williams, Metcalfe, 1992; Rao et al., 1997; Arcand-Hoy, Metcalfe, 2000; Pietrapiana et al., 2002). Kepenyse vyksta ir kitų organizmui pavojingų junginių biotransformacija, taigi MB ir kitų branduolio pažaidų tyrimai žuvų kepenų ląstelėse yra ypatingai aktualūs nustatant medžiagų poveikį, kurių genotoksinė savybių pasireiškimui būtina metabolinė aktyvacija (Udroiu et al., 2006).

Šiame darbe analizuojant Statfjord B naftos geno-citotoksinį poveikį, branduolio pažaidos tirtos Atlantinių menkių ir otų kraujo ir inkstų eritrocituose. Abi žuvų rūšis paveikus 0,5 ppm žaliavine nafta, taip pat šios naftos, AF ir PAA mišiniu, menkių inkstų eritrocituose MB dažniai buvo iki 4 kartų, o otų – iki 1,6 karto aukštesni nei kraujo eritrocituose. Lyginant geno-citotoksinį poveikį menkių inkstų ir kepenų eritrocituose nustatyta, kad po poveikio Oseberg C naftos platformoje išgaunama nafta, taip pat sumodeliuotais alikilfenolių mišiniais bei gamybiniais vandenimis, MB ir FA

indukcija yra didesnė inkstuose negu kepenyse. Tuo tarpu, BP ir DB dažnių lygiai menkių kepenų ir inkstų eritrocituose buvo artimi.

Literatūroje pateikiami duomenys, kad paveikus skirtingomis Cd ir Cu koncentracijomis, karpių (*Cyprinus carpio*), karosų (*Carassius gibelio*) bei smulkiadėmių šarvuotųjų šamukų (*Corydoras paleatus*) žiaunų epitelinėse ląstelėse ir kepenų hepatocituose susiformuoja aukštesni MB dažniai, negu periferinio kraujo eritrocituose (Çavaş et al., 2005). Naftos ir chromo perdirbimo gamyklų nuotekos sukėlė aukštesnius MB dažnius Nilo tilapijų (*Oreochromis niloticus*) žiaunų epitelinėse ląstelėse nei periferinio kraujo eritrocituose (Çavaş, Ergene-Gözükara, 2005a). Šie tyrimai parodė, kad žuvų žiaunų epitelinės ląstelės ir hepatocitai jautresni genotoksinių junginių poveikiui. Žiaunų ląstelės teršalų yra veikiamos tiesiogiai, be to, šiam audiniui būdingas aukštas mitozinis aktyvumas (Çavaş et al., 2005; Çavaş, Ergene-Gözükara, 2005a). Tačiau atlikus aplinkos genotoksiškumo įvertinimą analizuojant MB susidarymą *Labeo bata* žuvų inkstų ir žiaunų ląstelėse, inkstų eritrocituose rastas didesnis MB dažnis negu žiaunų ląstelėse (Talapatra, Banerjee, 2007).

Kaulinių žuvų priekinė inkstų dalis yra pagrindinis kraujodaros organas, todėl ankstyvosiose eritrocitų formavimosi stadijose dėl aktyvaus ląstelių dalijimosi mikrobranduoliai gali dažniau susiformuoti. Žuvų hemopoezės procesai vyksta ne tik inkstuose, bet kepenyse, blužnyje, žiaunose (Soldatov, 1995). Skirtinguose audiniuose yra skirtingi subrendusių ir nesubrendusių eritrocitų santykiai. Tai gali įtakoti mikrobranduolių tyrimo rezultatus (Udroiu et al., 2006). Tokiu būdu MB dažnis hemopoezės organų nesubrendusiuose inkstų eritrocituose rodo genotoksinius pažeidimus, susiformavusius eritroblastų dalijimosi metu. Periferinio kraujo subrendusių eritrocitų MB dažnis rodo poveikį, vykusį per visą eritrocitų funkcionavimo laikotarpį (Schlegel, MacGregor, 1982). Dėl šių priežasčių MB testas, atliekamas su periferinio kraujo eritrocitais, rodo bendrą genotoksinių junginių poveikį žuvis, įvykusį per visą eritrocito raidos ir cirkuliacijos trukmę. Eritrocitų

gyvavimo trukmė yra nevienoda skirtingose žuvų rūšyse, pvz. vaivorykštinio upėtakio – 105 dienos, o karpio iki 310 dienų (Soldatov, 1995).

Apibendrinant gautus rezultatus ir literatūroje esamus duomenis galima teigti kad dėl fiziologinių ir funkcinių audinių savitumų, žuvų įvairiuose audiniuose gali susiformuoti skirtingi ląstelių branduolio pažaidų dažniai. Skirtinguose audiniuose nustatomi geno-citotoksinių efektų skirtumai yra labai svarbūs, nes suteikia vertingos informacijos ne tik apie organizmų patiriamą genotoksinį ir citotoksinį poveikį, bet ir apie ksenobiotikų metabolizmo, bei pažeistos DNR pašalinimo iš ląstelių specifiką.

Mikrobranduolių susidarymui žuvyse įtakos gali turėti amžius, lytis, sveikatos būklė ir pan. Mitybos būdas taip pat gali įtakoti genotoksinių junginių metabolinę aktyvumą (Livingstone, 1991; Al-Sabti, Metcalfe, 1995). Įtakos mikrobranduolių susiformavimui gali turėti ir aplinkos veiksniai – metų laikas, temperatūra, deguonies kiekis, o MB įvertinimui – dažymo procedūrą ir mikrobranduolių identifikavimo kriterijai (Al-Sabti, Metcalfe, 1995). Apie mikroorganizmų įtaką genotoksinio ir citotoksinio poveikio indukcijai taip pat nėra duomenų. Literatūroje pateikiami duomenys apie parazitų indukuotą biologinį atsaką dreisenose *Dreissena polymorpha*, bei mikroorganizmais užkrėtų individų taikymą ekotoksikologiniuose tyrimuose (Minguez et al., 2009). Dalies iš išvardytų veiksnių įtaka MB bei kitų branduolio pažaidų susiformavimui organizmuose vis dar nėra iki galo ištirta.

Mūsų gauti tyrimų duomenys parodė, kad *in situ* bei eksperimentiniai naftos industrijos teršalų genotoksinio ir citotoksinio poveikio analizė yra būtina siekiant nustatyti galimą genotoksinę riziką vandens aplinkoje gyvenantiems organizmams. Ypač, aktualu vykdyti nuolatinis monitoringo tyrimus naftos platformų zonose, kadangi jos užterštos žaliavine nafta, be to čia į aplinką išmetami dideli kiekiai gamybinių vandenų, kuriuose yra gausu alkilintų fenolių, policiklinių aromatinių angliavandenilių, sunkiųjų metalų bei kitų teršalų. Duomenys apie mikrobranduolių bei kitų branduolio pažaidų indukciją leidžia daryti prielaidas, kad genotoksiškumo bei citotoksiškumo tyrimuose

naudojant šiuos parametrus gali būti gaunama vertinga informacija aplinkos kokybės nustatymui ar ekologinės rizikos vertimui.

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 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, paprastųjų 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 su nukleoplazmine jungtimi ir branduolio pumpurų su nukleoplazmine jungtimi 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, 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 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 bei 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 pažeidimų formavimąsi, o citotoksinio poveikio nenustatyta.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Aarab, N., Pampanin, D.M., Nævdal, A., Øysæd, K.B., Gastaldi, L., Bechmann, R.K. 2008. Histopathology alterations and histochemistry measurements in mussel, *Mytilus edulis* collected offshore from an aluminium smelter industry (Norway). *Marine Pollution Bulletin* 57, 6-12.
2. Aas, A., Baussant, T., Balk, L., Liewenborg, B., Andersen, O.K. 2000. PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod. *Aquatic Toxicology* 51(2), 241-258.
3. Adams, T.G., Atchison, G.J., Vetter, R.J. 1981. The use of the three ridge clam (*Amblema perplicata*) to monitor trace metal contamination. *Hydrobiologia* 83, 67-72.
4. Ahlf, W., Hollert, H., Neumann-Hensel, H., Ricking, M. 2002. A guidance for the assessment and evaluation of sediment quality – a German approach based on ecotoxicological and chemical measurements. *Journal of Soils and Sediments* 2, 37-42.
5. Ahmad, V.L., Oliveira, M.M., Pacheco, M., Santos, M.A. 2008. Modulatory role of copper on b-naphthoflavone-induced DNA damage in European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71, 806-812.
6. Ahmad, W., Ali, M.N., Farra, M.A., Ateeq, B. 2002. Computerized automated morphometric assay including frequency estimation of pentachlorophenol induced nuclear anomalies (micronucleus) in catfish *Heteropneustes fossilis*. *Chromosoma* 110, 570-574.
7. Ayllón, F., Garcia-Vazquez, E. 2000. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. *Mutation Research* 467, 177-186.

8. Ayllón, F., Garcia-Vazquez, E. 2001. Micronuclei and Other Nuclear Lesions as Genotoxicity Indicators in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 49, 221-225.
9. Akcha, F., Izuel, C., Venier, P., Budzinski, H., Burgeot, T., Narbonne, J.F. 2000. Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo[a]pyrene-contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology* 49, 269-287.
10. Ali, S.A., Henry, L.R., Darlington, J.W., Occapinti, J. 1999. Noveliltration Removes Dissolved Organics from Produced Water and Meets Federal Oil and Grease Guidelines, 9th Produced Water Seminar, Houston, TX, January 21-22.
11. Alink, G.M., Quik, J.T.K., Penders, E.J.M., Spenkeliink, A., Rotteveel, S.G.P., Maas, J.L. Hoogenboezem, W. 2007. Genotoxic effects in the Eastern mudminnow (*Umbra pygmaea* L.) after exposure to Rhine water, as assessed by use of the SCE and Comet assays: A comparison between 1978 and 2005. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 631 (2), 93-100.
12. Almroth, B.C., Sturve, J., Berglund, A., Förlin, L. 2005. Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparus*), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. *Aquatic Toxicology* 73(2), 171-180.
13. Al-Sabti, K. 1986. Comparative micronucleated erythrocyte cell induction in three cyprinids by five carcinogenic-mutagenic chemicals. *Cytobios* 47, 147-154.
14. Al-Sabti, K., Hardig, J. 1990. Micronucleus test in fish from monitoring the genotoxic effects of industrial waste products in the Baltic Sea, Sweden. *Compar. Biochem. And Physiol. Part C: Comparative Pharmacology* 97(1), 179-182.
15. Al-Sabti, K., Franko, M., Andrijani, B., Knez, S., Stegnar, P. 1994. Chromium induced micronuclei in fish. *Journal of Applied Toxicology* 14, 333-336.

16. Al-Sabti, K., Metcalfe, C.D. 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutatational Research* 343, 121-135.
17. Al-Subiai, Sh.N., Jha, A.N., Moody, A.J. 2009. Contamination of bivalve haemolymph samples by adductor muscle components: implications for biomarker studies. *Ecotoxicology* 18 (3), 334-342.
18. Amat, A., Burgeot, T., Castegnaro, M., Pfohl-Leszkowicz, A. 2006. DNA adducts in fish following an oil spill exposure. *Environmental Chemistry Letters* 4 (2), 93-99.
19. Andral, B., Stanisiere, J.Y., Sauzade, D., Damier, E., Thebault, H., Galgani, F., Boissery, P. 2004. Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. *Marine Pollution Bulletin* 49, 704-712.
20. Andreikėnaitė, L., Baršienė, J., Vosylienė, M.Z. 2007. 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* 17, 213-219.
21. Antoccia, A., Degrassi, F., Battistoni, A., Ciliutti, P. Tanzrella, C. 1991. In vitro micronucleus test with kinetochore staining: evaluation of test performance. *Mutagenesis* 6, 319-324.
22. Arcand-Hoy, L.D., Metcalfe, C.D. 2000. Hepatic Micronuclei in Brown Bullheads (*Ameiurus nebulosus*) as a Biomarker for Exposure to Genotoxic Chemicals. *Journal of Great Lakes Research* 6 (4), 408-415.
23. Arkhipchuk, V.V., Garanko, N.N. 2005. Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62, 42-52.
24. Bagdonas, E. 2006. Application and perspectives of micronuclei analysis in fish erythrocytes for genotoxicity studies in situ and in vivo. Summary of doctoral dissertation. Vilnius. 9-21.
25. Bagdonas, E., Vosylienė, M.Z. 2006. A study of toxicity and genotoxicity of copper, zinc and their mixture to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biologija* 1, 8-13.

26. Bagni, G., Baussant, T., Jonsson, G., Baršienė, J., Mascini, M. 2005. Electrochemical device for the rapid detection of genotoxic compounds in fish bile samples. *Analytical Letters* 38, 2639-2652.
27. Bahari, I.B., Noor, F.M., Daud, N.M. 1994. Micronucleated erythrocytes as an assay to assess actions by physical and chemical genotoxic agents in *Clarias gariepinus*. *Mutation Research* 313, 1-5.
28. Barbee, G.C., Barich, J., Duncan, B., Bickham, J.W., Matson, C.W., Hintze, C.J., Autenrieth, R.L., Zhou, G.D., McDonald, T.J., Leslie, C., Norton, D., Donnelly, K.C. 2008. *In situ* biomonitoring of PAH-contaminated sediments using juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71(2), 454-464.
29. Barillet, S., Buet, A., Adam, C., Devaux, A. 2005. Does uranium exposure induce genotoxicity in the teleostean *Danio rerio*? First experimental results. *Radioprotection* 40 (1), 175-181.
30. Barse, A., Chakrabarti, T., Ghosh, T.K., Pal, A.K., Jadhao, S.B. 2006. One-tenth dose of LC50 of 4-tert-butylphenol causes endocrine disruption and metabolic changes in *Cyprinus carpio*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 86 (3), 172-179.
31. Baršienė J. 1994. Chromosome set changes in molluscs from highly polluted habitat. In: *Genetic and Evolution of Aquatic Organisms* (ed. Beaumont A.R), 434-447.
32. Baršienė, J. 2002. Genotoxic impacts in Klaipėda marine Port and Būtingė oil terminal areas (Baltic Sea). *Marine Environmental Research* 54, 475-479.
33. Baršienė, J., Lazutka, J., Šyvokienė, J., Dedonytė, V., Rybakovas, A., Bjornstad, A., Andersen, O.K., 2004. Analysis of micronuclei in blue mussels and fish from the Baltic and the North Seas. *Environmental Toxicology* 19, 365-371.
34. Baršienė, J., Dedonytė, V., Rybakovas, A., Andreikėnaitė, L., Andersen, O.K. 2005. Induction of micronuclei in Atlantic cod (*Gadus morhua*)

- and turbot (*Scophthalmus maximus*) after treatment with bisphenol A, diallyl phthalate and tetrabromodiphenyl ether-47. *Ekologija* 4, 1-7.
35. Baršienė, J., Lehtonen, K., Broeg, K., Vuorinen, P.J., Lang, T., Pempkowiak, J., Balk, L., Šyvokienė, J., Dedonytė, V., Rybakovas, A., Repečka, R., Köhler, A., Vountisjarvi, H., Kopecka, J. 2006a. Biomarker responses in mussel (*Mytilus edulis*) and flounder (*Platichthys flesus*) in the Klaipėda-Būtingė area (Baltic Sea). *Marine Pollution Bulletin* 53, 422-436.
36. Baršienė, J., Schiedek, D., Rybakovas, A., Šyvokienė, J., Kopecka, J., Förlin, L. 2006b. Cytogenetic and cytotoxic effects in gill cells of the blue mussel *Mytilus* spp. from different zones of the Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin* 53, 469-478.
37. Baršienė, J., Dedonytė, V., Rybakovas, A., Andreikėnaitė, L., Andersen, O.K. 2006c. Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil. *Aquatic Toxicology* 78S, S99-S104.
38. Baršienė, J., Andreikėnaitė, L., Rybakovas, A. 2006d. Cytogenetic damage in perch (*Perca fluviatilis* L.) and Duck mussel (*Anodonta anatina* L.) exposed to crude oil. *Ekologija* 1, 25-31.
39. Baršienė, J., Andreikėnaitė, L. 2007. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in blue mussels exposed to crude oil from the North Sea. *Ekologija* 53 (3), 9-16.
40. Bateman, K.S., Stentiford, G.D., Feist, S.W. 2004. A ranking system for the evaluation of intersex condition in European flounder (*Platichthys flesus*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 2831-2836.
41. Baudo, R., Muntau, H. 1990. Lesser known in-place pollutants and diffuse source problems. In: Baudo, R., Giesy, J.P., Muntau, H. (Eds.), *Sediments: Chemistry and Toxicity of In-place Pollutants* 1, 1-14.
42. Beyer, J., Aas, E., Brogenvik, H.K., Ravn, P. 1998. Bioavailability of PAH in effluent water from an aluminium works evaluated by transplant

- caging and biliary fluorescence measurements of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Marine Environmental Research* 46, 233-236.
43. Belfiore, N.M., Anderson, S.L. 2001. Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 489 (2-3), 97-122.
 44. Bennett, B., Bowler, B.F.J., Larter, S.R. 1996. Determination of C0-C3 Alkylphenols in Crude Oils and waters. *Analytic Chemistry* 68, 3697-3702.
 45. Bennie, D.T., Sullivan, C.A., Lee, H.B., Peart, T.E., Maguire, R.J. 1997. Occurrence of alkylphenols and alkylphenol mono- and diethoxylates in natural waters of the Laurentian Great Lakes basin and the upper St. Lawrence River. *Science Total Environment* 193, 263-275.
 46. Bernal-Martinez, A., Carrère, H., Patureau, D., Delgenès, J.P. 2005. Combining anaerobic digestion and ozonation to remove PAH from urban sludge. *Process Biochemistry* 40 (10), 3244-3250.
 47. Berthe-Corti, L., Höfner, T. 2005. Geo-biological aspects of coastal oil pollution. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 219 (1-2), 171-189.
 48. Bihari, N., Fafandel, M. 2004. Interspecies differences in DNA single strand breaks caused by benzo(a)pyrene and marine environment. *Mutation Research* 552, 209-217.
 49. Bihari, N., Fafandel, M., Hamer, B., Kralj-Bilen, B. 2006. PAH content, toxicity and genotoxicity of coastal marine sediments from the Rovinj area, Northern Adriatic, Croatia. *Science of The Total Environment* 366 (2-3), 602-611.
 50. Binelli, A., Cogni, D., Parolini, M., Riva, C., Provini, A. 2009. In vivo experiments for the evaluation of genotoxic and cytotoxic effects of Triclosan in Zebra mussel haemocytes. *Aquatic Toxicology* 91 (3), 238-244.

51. Blackburn, M.A., Kirby, S.J., Waldock, M.J. 1999. Concentrations of alkylphenol polyethoxylates entering UK estuaries. *Marine Pollution Bulletin* 38, 109-118.
52. Bocchetti, R., Fattorini, D., Pisanelli, B., Macchia, S., Oliviero, L., Pilato, F., Pellegrini, D., Regoli, F. 2008. Contaminant accumulation and biomarker responses in caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, to evaluate bioavailability and toxicological effects of remobilized chemicals during dredging and disposal operations in harbour areas. *Aquatic Toxicology* 89, 257-266.
53. Boitsov, S., Meier, S., Klungsoyr, J., Svardal, A. 2004. Gas chromatography–mass spectrometry analysis of alkylphenols in producedwater from offshore oil installations as pentafluorobenzoate derivatives. *Journal of Chromatography A* 1059 (1-2), 131-141.
54. Boldrin, B., Tiehm, A., Fritzsche, C. 1993. Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene, and pyrene by a *Mycobacterium* sp. *Applied and Environmental Microbiology* 59(6), 1927-1930.
55. Bolognesi, C. 1990. Carcinogenic and mutagenic effects of pollutants in marine organisms: a review. In: Grandjen E. ed. *Carcinogenic, mutagenic, and teratogenic marine pollutants: impact on human health and the environment*. The Woodland, TX: Portfolio Publishing Company, 67-83.
56. Bolognesi, C., Rabboni, R., Roggieri, P. 1996. Genotoxicity biomarkers in *M. galloprovincialis* as indicators of marine pollutants. *Comparative Biochemistry and Physiology* 113(2), 319-323.
57. Bolognesi, C., Landini, E., Roggieri, P. 1997. Role of biological markers in aquatic organisms: in situ biomonitoring studies along the Ligurian coast. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 379 (1), S120.
58. Bolognesi, C., Landini, E., Roggieri, P., Fabbri, R., Viarengo, A. 1999. Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in

- mussels: experimental studies. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 33, 287-292.
59. Bolognesi, C., Frenzilli, G., Lasagna, C., Perrone, E., Roggieri, P. 2004. Genotoxicity biomarkers in *Mytilus galloprovincialis*: wild versus caged mussels. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 552 (1-2), 153-162.
60. Bolognesi, C., Perrone, E., Roggieri, P., Sciutto, A. 2006a. Bioindicators in monitoring long term genotoxic impact of oil spill: Haven case study. *Marine Environmental Research* 62, 287-291.
61. Bolognesi, C., Perrone, E., Roggieri, P., Pampanin, D.M., Sciutto, A. 2006b. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. *Aquatic Toxicology*, 78, S93-S98.
62. Bombail, V., Aw, D., Gordon, E., Batty, J. 2001. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. *Chemosphere* 44, 383-392.
63. Bopp, S.K., Abicht, H.K., Knauer, K. 2008. Copper-induced oxidative stress in rainbow trout gill cells. *Aquatic Toxicology* 86 (2), 197-204.
64. Brendehaug, J., Johnsen, S., Bryne, K.H., Gjose, A.L., T.H., E., Aamot, E. 1992. Toxicity testing and chemical characterization of produced water – a preliminary study. In: Ray, J.P., Engelhart, F.R. (Eds.), *Produced Water*. Plenum Press, New York, p. 245-255.
65. Bresler, V., Bissinger, V., Abelson, A., Dizer, H., Sturm, A., Kratke, R., Fishelson, L., Hansen, P.D. 1999. Marine mollusks and fish as biomarkers of Red Sea, Mediterranean Sea and North Sea. *Helgoland Marine Research* 53, 219-243.
66. Brown, J.S., Steinert, S.A. 2003. DNA damage and biliary PAH metabolites in flatfish from Southern California bays and harbors, and the Channel Islands. *Ecological Indications* 3, 263-274.

67. Brown, M.W., Thomas, D.G., Shurben, D., Solbe, J.F., Kay, J., Cryer, A. 1986. A comparison of the differential accumulation of cadmium in the tissues of three species of freshwater fish, *Salmo gairdneri*, *Rutilus rutilus* and *Noemacheilus barbatulus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 84C, 213-217.
68. Brown, V., Shurben, D., Miller, W., Crane, M. 1994. Cadmium toxicity to rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum and brown trout *Salmo trutta* L. over extended exposure periods. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 29 (1), 38-46.
69. Buchanan, J.B., Brown, B.E., Coombs, T.L., Pirie, B.J.S., Allen, J.A. 1980. The accumulation of ferric iron in the guts of some spatangoid echinoderms. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 60, 631-640.
70. Buhler, D.R., Williams, D.E. 1989. Enzymes involved in metabolism of PAH by fishes and other aquatic animals: hydrolysis and conjugation enzymes (or phase II enzymes), in: U. Varanasi (Ed.), *Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment*, CRC Press, Boca Raton. 151-184.
71. Burgeot, T., His, E., Galgani, F. 1995. The micronucleus assay in *Crassostrea gigas* for the detection of seawater genotoxicity. *Mutation Research* 343, 125-140.
72. Burgeot, T., Woll, S., Galgani, F. 1996. Evaluation of the micronucleus test on *Mytilus galloprovincialis* for monitoring applications along French coasts. *Marine Pollution Bulletin* 32, 39-46.
73. Burgess, R.M., McKinney, M. 1999. Importance of interstitial, overlying water and whole sediment exposures to bioaccumulation by marine bivalves. *Environmental Pollution* 104, 373-382.
74. Burton, G.A. 1991. Assessing the toxicity of freshwater sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 10, 1585-1627.
75. Buschini, A., Martino, A., Gustavino, B., Monfrinotti, M., Poli, P., Rossi, C., Santoro, M., Dörr, A.J.M., Rizzoni, M. 2004. Comet assay

- and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 557 (2), 119-129.
76. Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *The Science of The Total Environment* 247 (2-3), 295-311.
77. Campbell, J., Evans, D.R. 1991. Cadmium concentrations in the freshwater mussel (*Eliptio complanata*) and their relationship to water chemistry. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 20, 125-131.
78. Canty, M.N., Hutchinson, T.H., Brown, R.J., Jones, M.B., Jha, A.N. 2009. Linking genotoxic responses with cytotoxic and behavioural or physiological consequences: Differential sensitivity of echinoderms (*Asterias rubens*) and marine molluscs (*Mytilus edulis*). *Aquatic Toxicology* 94, 68-76.
79. Carriquiriborde, P., Ronco, A.E. 2008. Distinctive accumulation patterns of Cd(II), Cu(II), and Cr(VI) in tissue of the South American teleost, pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). *Aquatic Toxicology* 86, 313-322.
80. Casini, S., Marsili, L., Fossi, M.C., Mori, G., Bucalossi, D., Porcelloni, S., Caliani, I., Stefanini, G., Ferraro, M., di Catenaja, C.A. 2006. Use of biomarkers to investigate toxicological effects of produced water treated with conventional and innovative methods. *Marine Environmental Research* 62, S347-S351.
81. Castro-González, M.I., Méndez-Armenta, M. 2008. Heavy metals: Implications associated to fish consumption. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 26 (3), 263-271.
82. Cattani, O., Serra, R., Isani, G., Raggi, G., Cortesi, P., Carpena, E. 1996. Correlation between metallothionein and energy metabolism in sea bass,

- Dicentrarchus labrax*, exposed to cadmium. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology 113 (2), 193-199.
83. Çavas, T., Garanko, N.N., Arkhipchuk, V.V. 2005. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. Food and Chemical Toxicology 43, 569-574.
84. Çavas, T., Ergene-Gözükara, S. 2005a. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. Aquatic Toxicology 74, 264-271.
85. Çavas, T., Ergene-Gözükara, S. 2005b. Micronucleus Test in Fish Cells: A Bioassay for *In Situ* Monitoring of Genotoxic Pollution in the Marine Environment. Environmental and Molecular Mutagenesis 46, 64-70.
86. Çavas, T. 2008. *In vivo* genotoxicity of mercury chloride and lead acetate: Micronucleus test on acridine orange stained fish cells. Food and Chemical Toxicology 46(1), 352-358.
87. Çavas, T., Könen, S. 2008. *In vivo* genotoxicity testing of the amnesic shellfish poison (domoic acid) in piscine erythrocytes using the micronucleus test and the comet assay. Aquatic Toxicology 90 (2), 154-159.
88. Chase, M.E., Jones, S.H., Hennigar, P., Sowles, J., Harding, G.C.H., Freeman, K., Wells, P.G., Krahforst, C., Coombs, K., Crawford, R., Pederson, J., Taylor, D. 2001. Gulfwatch: monitoring spatial and temporal patterns of trace metal and organic contaminants in the Gulf of Maine (1991-1997) with the blue mussel, *Mytilus edulis* L. Marine Pollution Bulletin 42, 491-505.
89. Cheung, V.V., Jha, A., Owen, R., Depledge, M.H., Galloway, T.S. 2006. Development of the *in vivo* chromosome aberration assay in oyster (*Crassostrea gigas*) embryo-larvae for genotoxicity assessment. Marine Environmental Research 62, S278-S282.

90. Chi, Q.Q., Zhu, G.W., Langdon, A. 2007. Bioaccumulation of heavy metals in fishes from Taihu Lake, China. *Journal of Environmental Sciences* 19 (12), 1500-1504.
91. Ching, E.W.K., Siu, W.H.L., Lam, P.K.S., Xu, L., Zhang, Y., Richardson, B.J., Wu, R.S.S. 2001. DNA Adduct Formation and DNA Strand Breaks in Green-lipped Mussels (*Perna viridis*) Exposed to Benzo[a]pyrene: Dose- and Time-Dependent Relationships. *Marine Pollution Bulletin* 42 (7), 603-610.
92. Claisse, D. 1989. Chemical contamination of French coasts: the results of a ten years mussel watch. *Marine Pollution Bulletin* 20, 523-528.
93. Collins, A.R. 2004. Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. *Molecular Biotechnology* 26, 249-261.
94. Comet Assay interest group website: <http://cometassay.com/>
95. Cornet, M. 2007. Detection of genotoxicity in the marine environment: A preliminary feasibility study using primary mussel tissue culture. *Science of The Total Environment* 382 (1), 22-29.
96. Correa, L.M., Kochhann, D., Becker, A.G., Pavanato, M.A., Llesuy, S.F., Loro, V.L., Raabe, A., Mesko, M.F., Flores, E.M.M., Dressler, V.L., Baldisserotto, B. 2008. Biochemistry, cytogenetics and bioaccumulation in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to different thorium concentrations. *Aquatic Toxicology* 88 (4), 250-256.
97. Costa, P.M., Lobo, J., Caeiro, S., Martins, M., Ferreira, A.M., Caetano, M., Vale, C., DelValls, T.A., Costa, M.H. 2008. Genotoxic damage in *Solea senegalensis* exposed to sediments from the Sado Estuary (Portugal): Effects of metallic and organic contaminants. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 654 (1), 29-37.
98. Cote, R.P. 1976. The effects of petroleum refinery liquid wastes on aquatic life, with special emphasis on the Canadian environment National Research Council of Canada. NRC Associate Committee on

- Scientific Criteria for Environmental Quality, Ottawa, Ontario, Canada K1A 0R6, publication 15021, 77 pp.
99. Cotelle, S., Ferard, J.F. 1999. Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 34, 246-255.
100. Da Silva Souza, T., Fontanetti, C.S. 2006. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Mutation Research* 605, 87-93.
101. Dailianis, S., Domouhtsidou, G.P., Raftopoulou, E., Kalayianni, M., Dimitriadis, V.K. 2003. Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring. *Marine Environmental Research* 56, 443-470.
102. Damiens, G., Gnassia-Barelli, M., Loquès, F., Roméo, M., Salbert, V. 2007. Integrated biomarker response index as a useful tool for environmental assessment evaluated using transplanted mussels. *Chemosphere* 66 (3), 574-583.
103. de Almeida, T.M.B., Leitão, R.C., Andrade, J.D., Beçak, W., Carrilho, F.J., Sonohara, S. 2004. Detection of micronuclei formation and nuclear anomalies in regenerative nodules of human cirrhotic livers and relationship to hepatocellular carcinoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 150 (1), 16-21.
104. De Andrade, V.M., De Freitas, T.R.O., Da Silva, J. 2004. Comet assay using mullet (*Mugil* sp.) and sea catfish (*Netuma* sp.) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. *Mutation Research* 560, 57-67.
105. De Bruin, E.C., Medema, J.P. 2008. Apoptosis and non-apoptotic deaths in Cancer development and treatment response. *Cancer Treatment Reviews* 34, 737-749.
106. De Flora, S., Bagansco, M., Znacchi, P. 1991. Genotoxic, carcinogenic, and teratogenic hazards in the marine environment, with

- special reference to the Mediterranean Sea. *Mutation Research* 258, 285-320.
107. De Flora, S., Viganò, L., D'Agostini, F., Camoirano, A., Bagnasco, M., Bennicelli, C., Melodia, F., Arillo, A. 1993. Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed *in situ* to polluted river water. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 319 (3), 167-177.
108. de Lemos, C.T., Röedel, P.M., Terra, N.R., Erdtmann, B. 2001. Evaluation of basal micronucleus frequency and hexavalent chromium effects in fish erythrocytes. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 (6), 1320-1324.
109. de Lemos, C.T., Röedel, P.M., Terra, N.R., de Oliveira, N.C.D., Erdtmann, B. 2007. River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66 (3), 391-401.
110. de Lemos, C.T., de Almeida Iranço, F., de Oliveira, N.C.D., de Souza, G.D., Fachel, J.M.G. 2008. Biomonitoring of genotoxicity using micronuclei assay in native population of *Astyanax jacuhiensis* (Characiformes: Characidae) at sites under petrochemical influence. *Science of The Total Environment* 406 (1-2), 337-343.
111. Depledge, M.H., Fossi, M.C. 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates. *Ecotoxicology* 3, 161-172.
112. Dixon, D.R., Clarke, K.R. 1982. Sister chromatid exchange: a sensitive method for detecting damage caused by exposure to environmental mutagens in the chromosome of adult *Mytilus edulis*. *Marine Biology Letters* 9, 163-172.
113. Dixon, D.R., Pruski, A.M., Dixon, L.R.J., Jha, A.N. 2002. Marine invertebrate eco-genotoxicology: methodological overview. *Mutagenesis*, 17, 495-507.
114. Dizer, H., Fisher, B., Harabawy, A.S.A., Hennion, M.C., Hansen, P.D. 1996. Toxicity of domoic acid in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 113 (2), 273-276.

115. Dolcetti, L., Venier, P. 2002. Susceptibility to genetic damage and cell types in Mediterranean mussels. *Marine Environmental Research* 54, 487-491.
116. Dolcetti, L., Zuanna, L.D., Venier, P. 2002. DNA adducts in mussels and fish exposed to bulky genotoxic compounds. *Marine Environmental Research* 54 (3-5), 481-486.
117. Dopp, E., Barker, C.M., Schiffmann, D., Reinisch, C.L. 1996. Detection of micronuclei in hemocytes of *Mya arenaria*: association with leukemia and induction with an alkylating agent. *Aquatic Toxicology* 34 (1), 31-45.
118. Ekins, P., Vanner, R., Firebrace, J. 2007. Zero emissions of oil in water from offshore oil and gas installations: economic and environmental implications. *Journal of Clean Production* 15 (13-14), 1302-1315.
119. Elia, A.C., Galarini, R., Dorr, A.J.M., Taticchi, M.I. 2006. Bioaccumulation of heavy metals, organochlorine pesticides, and detoxication biochemical indexes in tissues of *Ictalurus melas* of lake Trasimeno. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 76, 132-139.
120. Emmanouil, C., Sheehan, T.M.T., Chipman J.K. 2001. Macromolecule oxidation and DNA repair in mussel (*Mytilus edulis* L.) gill following exposure to Cd and Cr(VI). *Aquatic Toxicology* 55 (3-4), 149-156.
121. Engwall, M., Brunström, B., Näf, C., Hjelm, K. 1999. Levels of dioxin-like compounds in sewage sludge determined with a bioassay based on erod induction in chicken embryo liver cultures. *Chemosphere* 38 (10), 2327-2343.
122. Ergene, S., Çelik, A., Çavaş, T., Kaya, F. 2007. Genotoxic biomonitoring study of population residing in pesticide contaminated regions in Göksu Delta: Micronucleus, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges. *Environment International* 33(7), 877-885.

123. Ergene-Gözükara, S., Çavaş, T., Celik, A., Koleli, N., Kaya, F., Karahan, A. 2007. Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. *Ecotoxicology* 16, 385-391.
124. Everaarts, J.M., Sarkar, A. 1996. DNA damage as a biomarker of marine pollution: strand breaks in seastars (*Asterias rubens*) from the North Sea. *Water Science and Technology* 34, 157-162.
125. Fabris, J.G., Richardson, B.J., O'Sullivan, J.E., Brown F.C. 1994. Estimation of cadmium, lead, and mercury concentration in estuarine waters using the Mussel *Mytilus edulis planulatus* L. *Environmental Toxicology and Water Quality* 9, 183-192.
126. Fakhrol-Razi, A., Pendashteh, A., Abdullah, L.C., Biak, D.R.A. Madaeni, S.S., Zurina Zainal Abidin, Z.Z. 2009. Review of technologies for oil and gas produced water treatment. *Journal of Hazardous Materials* 170 (2-3), 530-551.
127. Farah, M.A., Ateeq, B., Ahmad, W. 2006. Antimutagenic effect of neem leaves extract in freshwater fish, *Channa punctatus* evaluated by cytogenetic tests. *Science of The Total Environment* 364 (1-3), 200-214.
128. Faria, M., Huertas, D., Soto, D.X., Grimalt, J.O., Catalan, J., Riva, M.C., Barata, C. 2010. Contaminant accumulation and multi-biomarker responses in field collected zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and crayfish (*Procambarus clarkii*), to evaluate toxicological effects of industrial hazardous dumps in the Ebro river (NE Spain). *Chemosphere* 78 (3), 232-240.
129. Farombi, E.O., Adelowo, O.A., Ajimoko, Y.R. 2007. Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African cat fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2, 158-165.

130. Fenech, M., Holland, N., Chang, W.P., Zeiger, E., Bonassi, S. 1999. The Human MicroNucleus Project—An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humanès. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 428 (1-2), 271-283.
131. Fenech, M. 2000. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research* 455, 81-95.
132. Fenech, M., Crott, J.W. 2002. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes – evidence for breakage – fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 504 (1-2), 131-136.
133. Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E. 2003. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research* 534, 65-75.
134. Fenech, M. 2006. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 600 (1-2), 58-66.
135. Ferguson, P.L., Iden, C.R., Brownawell, B.J. 2001. Distribution and fate of neutral alkylphenol ethoxylate metabolites in a sewage-impacted urban estuary. *Environmental Science and Technology* 35 (12), 2428-2435.
136. Fernandez-Alvarez, P., Vila, J., Garrido-Fernandez, J.M., Grifoll, M., Lema, J.M. 2006. Trials of bioremediation on a beach affected by the heavy oil spill of the Prestige. *Journal of Hazardous Materials B* 137, 1523-1531.
137. Ferraro, M.V.M., Fenocchio, A.S., Mantovani, M.S., de Oliveira Ribeiro, C., Cestari, M.M. 2004. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (P BII) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the

- comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. *Genetics and Molecular Biology* 27, 103-107.
138. Foureman, G.L., Eling, T.E. 1989. Peroxidase-mediated formation of glutathione conjugates from polycyclic aromatic dihydrodiols and insecticides. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 269 (1), 55-68.
139. Fracacio, R., Verani, N.F., Espindola, E.L.G., Rocha, O., Rigolin-Sa, O., Andrade, C.A. 2003. Alterations on growth and gill morphology of *Danio rerio* (Pisces, Cyprinidae) exposed to the toxic sediments. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 46, 685-695.
140. Francioni, E., Wagener, A. de L.R., Scofield, de L., Depledge, M.H., Cavalier, B., Sette, C.B., Carvalhosa, L., Lozinsky, C., Mariath, R. 2007. Polycyclic aromatic hydrocarbon in inter-tidal mussel *Perna perna*: Space-time observations, source investigation and genotoxicity. *Science of The Total Environment* 372 (2-3), 515-531.
141. Franco, R., Sánchez-Olea, R., Reyes-Reyes, E.M., Panayiotidis, M.I. 2009. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 674 (1-2), 3-22.
142. Frenzilli, G., Scarcell,i V., Barga, I.D., Nigro, M., Forlin, L., Bolognesi, C., Sturve, J. 2004. DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Goteborg harbour, *Mutation Research* 552, 187-195.
143. Frenzilli, G., Falleni, A., Scarcelli, V., Del Barga, I., Pellegrini, S., Savarino, G., Mariotti, V., Benedetti, M., Fattorini, D., Regoli, F., Nigro, M. 2008. Cellular responses in the cyprinid *Leuciscus cephalus* from a contaminated freshwater ecosystem. *Aquatic Toxicology* 89, 188-196.
144. Frenzilli, G., Nigro, M., Lyons, B.P. 2009. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 681 (1), 80-92.
145. Gabbianelli, R., Lupidi, G., Villarini, M., Falcioni, G. 2003. DNA Damage induced by copper on erythrocytes of gilthead sea bream

- Sparus aurata* and mollusk *Scapharca inaequalvis*. Archives of Environmental Contaminant Toxicology 45, 350-356.
146. Galgani, F., Bocquene, G., Truquet, P., Bourgeot, T., Chiffolleau, J.F., Claisse, D. 1992. Monitoring of pollutant biochemical effects on marine organisms of the French coasts. Oceanologica Acta 15, 355-364.
147. Galloway, T.S., Sanger, R.C., Smith, K.L., Fillman, G., Readman, J.W., Ford, T.E., Depledge, M.H. 2002. Rapid assessment of marine pollution using multiple biomarkers and chemical immunoassays. Environmental Science and Technology 36, 2219-2226.
148. Garg, S., Gupta, R.K., Jain, K.L. 2009. Sublethal effects of heavy metals on biochemical composition and their recovery in Indian major carps. Journal of Hazardous Materials 163, 1369-1384.
149. GESAMP, 2007. Estimates of oil entering the marine environment from sea-based activities. In: Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution, Reports and Studies 75. International Maritime Organisation, London, p. 83.
150. Giarratano, E., Duarte, C.A., Amin, O.A. 2010. Biomarkers and heavy metal bioaccumulation in mussels transplanted to coastal waters of the Beagle Channel. Ecotoxicology and Environmental Safety 73 (3), 270-279.
151. Gichner, T., Mukherjee, A., Veleminsky, J. 2006. DNA staining with the fluorochromes EtBr, DAPI and YOYO-1 in the comet assay with tobacco plants after treatment with ethyl methanesulphonate, hyperthermia and DNase-I. Mutation Research 605, 17-21.
152. Gielazyn, M.L., Ringwood, A.H., Piegorsch, W.W., Stancyk, S.E. 2003. Detection of oxidative DNA damage in isolated marine bivalve haemocytes using the comet assay and formamidopyrimidine glycosylase (Fpg). Mutation Research 542, 15-22.
153. Giger, W., Brunner, P.H., Schaffner, C. 1984. 4-Nonylphenol in sewage sludge: accumulation of toxic metabolites from non-ionic surfactants. Science 225, 623-625.

154. Gill, T.S., Bianchi, C.P., Epple, A. 1992. Trace metal (Cu and Zn) adaptation of organ systems of the american eel, *Anguilla rostrata*, to external concentrations of cadmium. *Comparative Biochemistry and Physiology* 102C, 361-371.
155. González-Doncel, M., González, L., Fernández-Torija, C., Navas, J.M., Tarazona, H.V. 2008. Toxic effects of an oil spill on fish early life stages may not be exclusively associated to PAHs: Studies with Prestige oil and medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology* 87 (4), 280-288.
156. Gorbi, S., Lamberti, C.V., Notti, A., Benedetti, M., Fattorini, D., Moltedo, G., Regoli, F. 2008. An ecotoxicological protocol with caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, for monitoring the impact of an offshore platform in the Adriatic sea. *Marine Environmental Research* 65 (1), 34-49.
157. Gorinstein, S., Jung, S.T., Moncheva, S., Arancibia-Avila, P., Park, Y.S., Kang, S.G., Goshev, I., Trahtenberg, S., Namiesnik, J. 2005. Partial characterization of proteins from mussel *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of contamination. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 49, 504-510.
158. Graf, D., Cummings, K. 2007. Review of the systematics and global diversity of freshwater mussel species (Bivalvia: Unionoida). *Journal of Molluscan Studies* 73, 291-314.
159. Gravato, C., Santos, M. A. 2002. Juvenile sea bass liver P450, EROD induction, and erythrocytic genotoxic responses to PAH and PAH-like compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 51, 115-127.
160. Gravato, C., Santos, M.A. 2003. Genotoxicity biomarkers association with B(a)P biotransformation in *Dicentrarchus labrax* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 55 (3), 352-358.
161. Grisolia, C.K., Starling, F.L.R.M. 2001. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant

- discharges. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 491 (1-2), 39-44.
162. Guilherme, S., Valega, M., Pereira, M.E., Santos, M.A., Pacheco, M. 2008. Erythrocytic nuclear abnormalities in wild and caged fish (*Liza aurata*) along an environmental mercury contamination gradient. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 70, 411-421.
163. Gundacker, C. 1999. Tissue-specific heavy metal (Cd, Pb, Cu, Zn) deposition in a natural population of the zebra mussel *Dreissena polymorpha pallas*. *Chemosphere* 38 (14), 3339-3356.
164. Gustavino, B., Scornajenghi, K.A., Minissi, S., Ciccotti, E. 2001. Micronuclei induced in erythrocytes of *Cyprinus carpio* (telostei, pisces) by X-rays and colchicine. *Mutatational Research* 494, 151-159.
165. Gwo, J.C., Wu, C.Y., Chang, W.S.P., Cheng, H.Y. 2003. Evaluation of damage in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spermatozoa before and after cryopreservation using comet assay. *Cryoletters* 24, 171-180.
166. Haaf, T., Raderschall, E., Reddy, G., Ward, D.C., Radding, C.M., Golub, E.I. 1999. Sequestration of mammalian Rad51-recombination protein into micronuclei. *Cell Biology* 144, 11-20.
167. Hayakawa, K., Nomura, M., Nakagawa, T., Oguri, S., Kawanishi, T., Toriba, A., Kizu, R., Sakaguchi, T., Tamiya, E. 2006. Damage to and recovery of coastlines polluted with C-heavy oil spilled from the Nakhodka. *Water Research* 40, 981-989.
168. Hayashi, M., Ueda, T., Uyeno, K., Wada, K., Kinae, N., Saotome, K., Tanaka, N., Takai, A., Sasaki, Y.F., Asano, N., Sofuni, T., Ojima, Y. 1998. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. *Mutation Research* 399, 125-133.
169. Handy, R.D., Eddy, F.B., Baines, H. 2002. Sodium-dependent copper uptake across epithelia: a review of rationale with experimental evidence from gill and intestine. *Biochimica et Biophysica. Acta, Biomembrana* 1566, 104-115.

170. Harman, C., Thomas, K.V., Tollefsen, K.E., Meier, S., Bøyum, O., Grung, M. 2009. Monitoring the freely dissolved concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and alkylphenols (AP) around a Norwegian oil platform by holistic passive sampling. *Marine Pollution Bulletin* 58 (11), 1671-1679.
171. Hartwig, A., Krüger, I., Beyersmann, D. 1994. Mechanisms in nickel genotoxicity: the significance of interactions with DNA repair. *Toxicology Letters* 72 (1-3) 353-358.
172. Hartwig, A. 1995. Current aspects in metal genotoxicity. Department of Biology and Chemistry, University of Bremen, Bremen, Germany vol. 8, 3-11.
173. Harvey, J.S., Lyons, B.P., Page, T.S., Stewart, C., Parry, J.M. 1999. An assessment of the genotoxic impact of the Sea Empress oil spill by the measurement of DNA adduct levels in selected invertebrate and vertebrate species. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 441 (1), 103-114.
174. Hasselberg, L., Meier, S., Svardal, A. 2004. Effects of alkylphenols on redox status in first spawning Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquatic Toxicology* 69, 95-105.
175. Hawkins, S.A., Billiard, S.M., Tabash, S.P., Brown, R.S., Hodson, P.V. 2002. Altering cytochrome P4501A activity affects polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism and toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 21 (9), 1845-1853.
176. Heddle, J.A., Cimino, M.C., Hayashi, M., Romagna, F., Shelby, M.D., Tucker, J.D., Vanparys, Ph., MacGregor, J.T. 1991. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 18, 277-291.
177. Heyer, C. 2003. Yellow Perch in the Great lakes: Current status and Future Research Needs Percis III, July.

178. HELCOM (Helsinki Commission – Baltic Marine Environment Protection Commission), 2003. In: Proceedings of the Joint IMO/HELCOM/EU Workshop “Environmental Impacts due to the Increased Density of Shipping in the Baltic Sea Area – Copenhagen plus 1”. Baltic Sea Environment Proceedings No. 86: 98.
179. Hemelraad, J., Holwedra, D.A. 1987. Cadmium kinetics in freshwater clams III. Effect of zinc on uptake and distribution of cadmium in *Anodonta cygnea*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 16, 95-101.
180. Hendozko, E., Szefer, P., Warzocha, J. 2010. Heavy metals in *Macoma balthica* and extractable metals in sediments from the southern Baltic Sea. Ecotoxicology and Environmental Safety 73 (2), 152-163.
181. Hylland, K., Becker, G., Lang, T., McIntosh, A.D., Thain, J.E., Thomas, K.V., Utvik, T.I.R., Vethaak, A.D., Wosniok, W. 2006. Biological effects of contaminants in pelagic ecosystems – the BECPHELAG workshop. In: Hylland, K., Vethaak, D., Lang, T. (Eds.), Biological Effects of Contaminants in Pelagic Ecosystems. SETAC Press, Brussels, pp. 3-8.
182. Hylland, K., Tollefsen, K.E., Ruus, A., Jonsson, G., Sundt, R.C., Sanni, S., Utvik, T.I.R., Johnsen, S., Nilssen, I., Pinturier, L., Balk, L., Baršienė, J., Marigómez, I., Feist, S.W., Børseth, J.F. 2008. Water column monitoring near oil installations in the North Sea 2001–2004. Marine Pollution Bulletin 56 (3), 414-429.
183. Holth, T.F., Nourizadeh-Lillabadi, R., Blaesbjerg, M., Grung, M., Holbech, H., Petersen, G.I., Aleström, P., Hylland, K. 2008. Differential gene expression and biomarkers in zebrafish (*Danio rerio*) following exposure to produced water components. Aquatic Toxicology 90, 277-291.
184. Hose, J.E., Brown, E.D. 1998. Field applications of the piscine anaphase aberration test: lessons from the Exxon Valdez oil spill. Mutation Research 399, 167-178.

185. Hozumi, T., Tsutsumi, H., Kono, M. 2000. Bioremediation on the Shore after an Oil Spill from the Nakhodka in the Sea of Japan. I. Chemistry and Characteristics of Heavy Oil Loaded on the Nakhodka and Biodegradation Tests by a Bioremediation Agent with Microbiological Cultures in the Laboratory. *Marine Pollution Bulletin* 40 (4), 308-314.
186. Huang, D., Zhang, Y., Wang, Y., Xie, Z., Ji, W. 2007. Assessment of the genotoxicity in toad *Bufo raddei* exposed to petrochemical contaminants in Lanzhou Region, China. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 629 (2), 81-88.
187. Hughes, J.B. 1999. Cytological-cytogenetic analyses of winter flounder embryos collected from the benthos at the barge North Cape oil spill. *Marine Pollution Bulletin* 38 (1), 30-35.
188. IARC, 1983. Approaches to Classifying Chemical Carcinogens According to Mechanism of Action (IARC intern. tech. Rep. No. 83/001).
189. IARC, 1993. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 58. IARC, Lyon.
190. Iarmarcovai, G., Bonassi, S., Botta, A., Baan, R.A., Orsiere, T. 2008. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature. *Mutation Research* 658, 215-233.
191. Ieradi, L.A., Meucci, F., Giucca, F., Ciccotti, E., Cardarelli, E., Grossi, R., Campanella, L. 1996. Mutagenicity test and heavy metals in fish from Tiber River. *Journal of Ecology and Chemistry* 5, 287-291.
192. Isani, G., Andreani, G., Kindt, M., Carpenè, E. 2000. Metallothioneins (MTs) in marine mollusks. *Cell Molecular Biology* 46 (2), 311-330.
193. Isani, G., Andreani, G., Cocchioni, F., Fedeli, D., Carpenè, E., Falcioni, G. 2009. Cadmium accumulation and biochemical responses in *Sparus aurata* following sub-lethal Cd exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72 (1), 224-230.

194. Islam, Md.S., Tanaka, M. 2004. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin* 48 (7-8), 624-649.
195. Izquierdo, J.I., Machado, G., Ayllón, F., d'Amico, V.L., Bala, L.O., Vallarino, E., Elias, R., Garcia-Vazquez, E. 2003. Assessing pollution in coastal ecosystems: a preliminary survey using the micronucleus test in the *Mytilus edulis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 55, 24-29.
196. Yamamoto, T., Nakaoka, M., Komatsu, T., Kawai, H., Marine Life Research Group of Takeno, Ohwada, K. 2003. Impacts by heavy-oil spill from the Russian tanker Nakhodka on intertidal ecosystems: recovery of animal community. *Marine Pollution Bulletin* 47, 91-98.
197. Yamano, T., Shimizu, M., Noda, T. 1998. Comparative effects of repeated administration of cadmium on kidney, spleen, thymus, and bone marrow in 2,4 and 8 month old male Wistar rats. *Toxicological Science* 46, 393-402.
198. Yang, H.N., Chen, H.C. 1996. Uptake and elimination of cadmium by Japanese eel, *Anguilla japonica*, at various temperatures. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 56, 670-676.
199. Jacobs, R.P.W.M., Grant, R.O.H., Kwant, J., Marqueine, J.M., Mentzer, E. 1992. The Composition of Produced Water from Shell Operated Oil and Gas Production in the North Sea, Produced water, J.P. Ray and F.R.Englehart (eds.). Plenum Press, New York.
200. Jha, A.N. 2004. Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 552 (1-2), 1-17.
201. Jha, A.N., Dogra, Y., Turner, A., Millward, G.E. 2005. Impact of low doses of tritium on the marine mussel, *Mytilus edulis*: Genotoxic effects and tissue-specific bioconcentration. *Mutation Research* 586, 47-57.
202. Jha, A.N. 2008. Ecotoxicological applications and significance of the Comet assay. *Mutagenesis* 23, 207-221.

203. Jing-jing, M., Lu-qing, P., Jing, L., Lin, Z. 2009. Effects of benzo[a]pyrene on DNA damage and histological alterations in gonad of scallop *Chlamys farreri*. *Marine Environmental Research* 67 (1), 47-52.
204. Jobling, S., Sheahan, D., Osborne, J.A., Matthiessen, P., Sumpter, J.P. 1996. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, 194-202.
205. Johnsen, S., Frost, T., Hjelvold, M., Utvik, T. 2000. The Environmental Impact Factor – A proposed Tool for Produced Water Impact Reduction, Management and Regulation. Society of Petroleum Engineers (SPE), Stavanger, Norway.
206. Johnson, B.T. 1992. Potential genotoxicity of sediments from the great lakes. *Environmental Toxicology and Water Quality* 7, 373-390.
207. Jonsson, G., Bechmann, R.K., Bamber, S.D., Baussant, T. 2004. Bioconcentration, biotransformation, and elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*) exposed to contaminated seawater. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 1538-1548.
208. Kayani, M.A., Parry, J.M. 2010. The in vitro genotoxicity of ethanol and acetaldehyde. *Toxicology in Vitro* 24 (1), 56-60.
209. Kammann, U., Biselli, S., Hühnerfuss, H., Reineke, N., Theobald, N., Vobach, M., Wosniok, W. 2004. Genotoxic and teratogenic potential of marine sediment extracts investigated with comet assay and zebra fish test. *Environmental Pollution* 132 (2), 279-287.
210. Kamunde, C.N., Grosell, M., Lott, J.N.A., Wood, C.M. 2001. Copper metabolism and gut morphology in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chronic sublethal dietary copper exposure. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 58, 293-305.
211. Kamunde, C. 2009. Early subcellular partitioning of cadmium in gill and liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following low-to-

- near-lethal waterborne cadmium exposure. *Aquatic Toxicology* 91 (4), 291-301.
212. Kawanishi, S., Inoue, S., Yamamoto, K. 1989. Site-specific DNA damage induced by nickel (II) ion in the presence of hydrogen peroxide. *Carcinogenesis* 10, 2231-2235.
213. Kestemont, P., Xu, X., Blanchard, G., Melard, C., Gielen, M., Brun-Bellut, J., Fotaine, P. 2003. Feeding and Nutrition in European Percid Fishes-A Review //Percis III, July.
214. Kim, I.Y., Hyun, C.K. 2006. Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64, 288-297.
215. Kizu, R., Ishii, K., Kobayashi, J., Hashimoto, T., Koh, E., Namiki, M., Hayakawa, K. 2000. Antiandrogenic effect of crude extract of C-heavy oil. *Materials Science and Engineering C* 12, 97-102.
216. Klobučar, G.I.V., Pavlica, M., Erben, R., Papeš, D. 2003. Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. *Aquatic Toxicology* 64, 15-23.
217. Klobučar, G.I.V., Štambuk, A., Hylland, K., Pavlicac, M. 2008. Detection of DNA damage in haemocytes of *Mytilus galloprovincialis* in the coastal ecosystems of Kaštela and Trogir bays Croatia. *Science of the Total Environment* 405, 330-337.
218. Kopecka, J., Lehtonen, K.K., Baršienė, J., Broeg, K., Vuorinen, P.J., Gercken, J., Pempkowiak, J. 2006. Measurements of biomarker levels in flounder (*Platichthys flesus*) and blue mussel (*Mytilus trossulus*) from the Gulf of Gdansk (southern Baltic). *Marine Pollution Bulletin* 53, 406-421.
219. Koukouzika, N., Dimitriadis, V.K. 2008. Aspects of the usefulness of five marine pollution biomarkers, with emphasis on MN and lipid content. *Marine Pollution Bulletin* 56, 941-949.

220. Kozelka, P.B., Bruland, K.W. 1998. Chemical speciation of dissolved Cu, Zn, Cd, Pb in Narragansett Bay, Rhode Island. *Marine Chemistry* 60 (3-4), 267-282.
221. Kraal, M.H., Kraak, M.H.S., Degroot, C.J., Davids, C. 1995. Uptake and Tissue Distribution of Dietary and Aqueous Cadmium by Carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 31 (2), 179-183.
222. Kumaravel, T.S., Vilhar, B., Faux, S.P., Jha, A.N. 2007. Comet Assay measurements: a perspective. *Cell Biology and Toxicology* 25, 53-64.
223. Kwon, S.H., Kim, J.H., Cho, D. 2009. An analysis method for degradation kinetics of lowly concentrated PAH solutions under UV light and ultrasonication. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 15 (2), 157-162.
224. Laffon, B., Rabade, T., Pasaro, E., Mendez, J. 2006. Monitoring of the impact of Prestige oil spill on *Mytilus galloprovincialis* from Galician coast. *Environment International* 32, 342-348.
225. Laia Quiros, L., Ruiz, X., Sanpera, C., Jover, L., Pina, B. 2008. Analysis of micronucleated erythrocytes in heron nestlings from reference and impacted sites in the Ebro basin (N.E. Spain). *Environmental Pollution* 155 (1), 81-87.
226. Landolt, M.L., Kocan, R.M. 1984. Fish cell cytogenetic: a measure of the genotoxic effects of environmental pollutants. *Aquatic Toxicology* 78, 336-350.
227. Lang, T., Wosniok, W. 2003. Report BMBF-Projekt, Synthese und Analyse von marinen Daten u̇ber biologische Effekte und deren Ursachen mit Hilfe neuer statistischer Verfahren, EFFSTAT. p. 275.
228. Langston, W.J., Bebianno, M.J., Burt, G.R. 1998. Metal handling strategies in molluscs. In: Langston WJ, Bebianno MJ (eds) *Metal metabolism in aquatic environments*. Chapman & Hall, London., pp. 219-283.

229. Lasee, B.A. 1991. Histological and ultrastructural studies of larval and juvenile *Lampsilis* (Bivalvia) from the upper Mississippi River. PhD Dissertation, Iowa State University, Ames, IA.
230. Le Goff, J.L., Gallois, J., Pelhuet, L., Devier, M.H., Budzinski, H., Pottier, D., André, V., Cachot, J. 2006. Adduct measurements in zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, Pallas: Potential use for genotoxicant biomonitoring of fresh water ecosystems. *Aquatic Toxicology* 79 (1), 55-64.
231. Lee, R.F., Steinert, S. 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/Comet Assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research* 544, 43-64.
232. Lehtonen, K.K., Schiedek, D., Köhler, A., Lang, T., Vuorinen, P.J., Förlin, L., Baršienė, J., Pempkowiak, J., Gercke, J. 2006. The BEEP project in the Baltic Sea: Overview of results and outline for a regional biological effects monitoring strategy. *Marine Pollution Bulletin* 53, 523-537.
233. Liber, K., Knuth, M.L., Stay, F.S. 1999. An integrated evaluation of the persistence and effects of 4-nonylphenol in an experimental littoral ecosystem. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 357-362.
234. Lindberg, H.K., Wang, X., Jarventaus, H., Falck, G.C-M., Norppa, H., Fenech, M. 2007. Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. *Mutation Research* 617, 33-45.
235. Linde, A.R., Sánchez-Galán, S., Vallés-Mota, P., García-Vázquez, E. 2001. Metallothionein as Bioindicator of Freshwater Metal Pollution: European Eel and Brown Trout. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 49 (1), 60-63.
236. Linde-Arias, A.R., Inácio, A.F., de Albuquerque, C., Freire, M.M., Moreira, J.C. 2008. Biomarkers in an invasive fish species, *Oreochromis niloticus*, to assess the effects of pollution in a highly degraded Brazilian River. *Science of the Total Environment* 399, 186-192.

237. Linløkken, A. 2003. Temperature dependence of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) recruitment // Percis III, July.
238. Livingstone, D. R. 1991. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology – Part A: Molecular and Integrative Physiology* 120 (1), 43-49.
239. Livingstone, D.R. 1993. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 57, 195-211.
240. Livingstone, D.R., Chipman, J.K., Lowe, D.M., Minier, C., Mitchelmore, C.L., Moore, M.N., Peters, L.D., Pipe, R.K. 2000. Development of biomarkers to detect the effects of organic pollution on aquatic invertebrates: recent molecular, genotoxic, cellular and immunological studies on the common mussel (*Mytilus edulis* L.) and other mytilids. *International Journal of Environmental Pollution* 13, 56-91.
241. Lye, C.M. 2000. Impact of oestrogenic substances from oil pollution at sea. *Toxicological Letters*. 112-113, 265-272.
242. Long, E.R., Buchman, M.F. 1990. A comparative evaluation of selected measures of biological effects of exposure of marine organisms to toxic chemicals. In: McCarthy, J.F., Shugart, L.R. (Eds.), *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis Publishers, Chelsea, MI, pp. 355-394.
243. Longwell, A.C. 1978. Field and laboratory measurements of stress responses at the chromosome and cell levels in planktonic fish eggs and the oil problem. In the Wake of the Argo Merchant Proceedings of a Symposium Held January 11–13, 1978, Center for Ocean Management Studies, University of Rhode Island, Kingston, RI 02881 pp. 116–125.
244. Longwell, A.C., Hughes, J.B. 1980 Cytological, cytogenetical and developmental state of Atlantic mackerel eggs from the sea surface of

- the New York Bight, and prospects for biological effects monitoring with ichthyoplankton. Rapp. P.-v. Rium. Cons. int. Explor. Mer. 179, 275-291.
245. Lu, J., Wang, X., Shan, B., Li, X., Wang, W. 2006. Analysis of chemical compositions contributable to chemical oxygen demand (COD) of oilfield produced water. Chemosphere 62, 322-331.
246. Luoma, S.N., Rainbow, P.S. 2005. Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept. Environmental Science and Technology 39, 1921-1931.
247. Ma, T.H., Sndhu, S.S., Peng, Y., Chen, T.D. 1992. Synergistic and antagonistic effects on genotoxicity of Chemicals commonly found in hazardous waste sites. Mutation Research 270, 41-77.
248. Mackay, E.A., Overnall, J., Dunbar, B., Davidson, I., Hunziker, P.E., Kagi, J.H.R., Fothergill, J.E. 1993. Complete amino acid sequences of five dimeric and four monomeric forms of metallothionein from edible mussel *Mytilus edulis*. European Journal of Biochemistry 218, 183-194.
249. Macleod, G., Taylor, P.N., Larter, S.R., Aplin, A.C. 1993. Dissolved organic specines in formation waters; insights into rock oil-water ratios in petroleum systems. In: Parnell, J., et al. eds. Geofluids 93, Geol. Soc. Spec. Publ. p.18-20.
250. Maes, G.E., Raeymaekers, J.A.M., Pampoulie, C., Seynaeve, A., Goemans, G., Belpaire, C., Volckaert, F.A.M. 2005. The catadromous European eel *Anguilla anguilla* (L.) as a model for freshwater evolutionary ecotoxicology: Relationship between heavy metal bioaccumulation, condition and genetic variability. Aquatic Toxicology 73 (1), 99-114.
251. Magni, P., De Falco, G., Falugi, C., Franzoni, M., Monteverde, M., Perrone, E., Sgro, M., Bolognesi, C. 2006. Genotoxicity biomarkers and acetylcholinesterase activity in natural populations of *Mytilus galloprovincialis* along a pollution gradient in the Gulf of Oristano (Sardinia, western Mediterranean). Environmental Pollution 142, 65-72.

252. Malison, J., Kestemont, P.R. Summerfelt Percid aquaculture: current status and future research needs Percis III, July 2003.
253. Maria, V.L., Correia, A.C., Santos, M.A. 2002a. Benzo[a]pyrene and b-Naphthoflavone mutagenic activation by European eel (*Anquilla anquilla* L.) S9 liver fraction. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 53, 81-85.
254. Maria, V.L., Correia, A.C., Santos, M.A. 2002b. *Anquilla anquilla* L. biochemical and genotoxic response to benzo[a]pyrene. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 53, 86-92.
255. Maria, V.L., Gravato, C., Correia, A.C., Santos, M.A. 2002c. Biotransformation and genotoxicity responses to PAHs in two teleost species. *Fresenius Environmental Bulletin* 11, 609-615.
256. Maria, V.L., Santos, M.A., Bebianno, M.J. 2009. Contaminant effects in shore crabs (*Carcinus maenas*) from Ria Formosa Lagoon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 150 (2), 196-208.
257. Marigómez, I., Lekube, X., Cajaraville, M.P., Domouhtsidou, G., Dimitriadis, V. 2007. Comparison of cytochemical procedures to estimate lysosomal biomarkers in mussel digestive cells. *Aquatic Toxicology* 75 (1), 86-95.
258. Marques, S.M., Antunes, S.C., Pissarra, H., Pereira, M.L., Goncalves, F., Pereira, R. 2009. Histopathological changes and erythrocytic nuclear abnormalities in Iberian green frogs (*Rana perezi* Seoane) from a uranium mine pond. *Aquatic Toxicology* 91, 187-195.
259. Marshall, A.T., Talbot, V. 1979. Accumulation of cadmium and lead in the gills of *Mytilus edulis*: X-rai microanalysis and chemical analysis. *Chemo-Biological Interactions* 27, 111-123.
260. Mattiessen, P., Sheahan, D., Harrison, R., Kirby, M., Rycroft, R., Turnbull, A., Volkner, C., Williams, R. 1995. Use of a *Gammarus pulex* bioassay to measure the effects of transient carbofuran runoff from farmland. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 30, 111-119.

261. Mc Farlane, J., Bostic, D.T., Luo, H. 2002. Characterization and Modelingo f Produced Water, presented at the 2002 Ground Water Protection Council Produced Water Conference, Colorado Springs, CO, Oct. 16-17 (Paper available at: <http://www.gwpc.org/Meetings/PW2002/Papers-Abstracts.htm>.)
262. Mersch, J., Beauvais, M.N., Nagel, P. 1996. Induction of micronuclei in haemocytes and gill cells of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 371 (1-2), 47-55.
263. Mersch, J., Beauvais, M. 1997. The micronucleus assay in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, to *in situ* monitor genotoxicity in freshwater environments. *Mutation Research* 393, 141-149.
264. Minguez, L., Meyer, A., Molloy, D.P., Giambérini, L. 2009. Interactions between parasitism and biological responses in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): Importance in ecotoxicological studies. *Environmental Research* 109, 843-850.
265. Minissi, S., Ciccotti, E., Rizzoni, M. 1996. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebeius* (teleostei, pisces) from two natural environments: a bioassay for the *in situ* detection of mutagens in freshwater. *Mutation Research* 367, 245-251.
266. Mitchelmore, C.L., Chipman, J.K. 1998. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutation Research Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagens* 399, 135-147.
267. Monserrat, J.M., Martínez, P.E., Geracitano, L.A., Amado, L.L., Martins, C.M.G., Pinho, G.L.L., Chaves, I.S., Ferreira-Cravo, M., Ventura-Lima, J., Bianchini, A. 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 146 (1-2), 221-234.

268. Monteiro, P.R.R., Reis-Henriques, M.A., Coimbra, J. 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit ovarian steroidogenesis in the flounder (*Platichthys flesus* L.). *Aquatic Toxicology* 48, 549-559.
269. Morales-Caselles, C., Martín-Díaz, M.L., Riba, I., Sarasquete, C., Del Valls T.Á. 2008. Sublethal responses in caged organisms exposed to sediments affected by oil spilgs. *Chemosphere* 72, 819-825.
270. Mourgaud, Y., Martinez, E., Geffard, A., Andral, B., Stanisière, J.Y., Amiard, J.C. 2002. Metallothionein concentration in the mussel *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of response to metal contamination: validation in the field. *Biomarkers* 7(6), 479-490.
271. Naimo, T.J. 1995. A review of the effects of heavy metals on freshwater mussels. *Ecotoxicology* 4, 341-362.
272. Naylor, C.G., Mieure, J.P., Adams, W.J., Weeks, J.A., Castaldi, F.J., Ogle, L.D., Romano, R.R. 1992. Alkylphenol ethoxylates in the environment. *Journal of the American Oil Chemists Society* 69, 695-703.
273. Natarajan, A.T., Balajee, A.S., Boei, J.J., Daroudi, F., Dominiguez, J., Hande, M.P., Meijers, M., Slijepcevic, P., Vermeuleu, S., Xiao, Y. 1996. Mechanizms of induction of chromosomae aberration and their detection by fluorescense *in situ* hibridization. *Mutation Reseach* 372, 247-258.
274. Neff, J.M., Sauer, T.C., Maciolek, N. 1987. In: (2nd. ed.), Fate and effects of produced water discharges in nearshore marine waters Vol. 1-2, Report to the American Petroleum Institute, Washington D.C.
275. Neff, J.M. 2002. Produced Water. Bioaccumulation in Marine Organisms Effect of Contaminants from Oil Well Produced Water, p. 1-35.
276. Nelson, J.H. 1991. Use of macroalage and invertebrates as monitors of metal levels in estuaries and costal waters. *Heavy Metals and Marine Environment* 5, 168-174.

277. Nepomuceno, J.C., Spano, M.A. 1995. Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of *Cyprinus carpio* fish by methyl parathion. *Revue of International Contaminant Ambient* 11, 9-12.
278. Nicholson, S., Lam, P.K.S. 2005. Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarkers in the mytilid mussel *Perna viridis* (Mytilidae: Bivalvia). *Environment International* 31 (11), 121-132.
279. Nigro, M., Falleni A., Del Barga I., Scarcelli V., Lucchesi P., Regoli, C., Frenzilli, G. 2006. Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: Transplanted versus native mussels. *Aquatic Toxicology* 77 (4), 339-347.
280. Nikulina, A., Dullo, W.C., 2009. Eutrophication and heavy metal pollution in the Flensburg Fjord: A reassessment after 30 years. *Marine Pollution Bulletin* 58, 905-915.
281. Nimrod, A.C., Benson, W.H. 1996. Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates. *Critical Reviews in Toxicology* 26, 335-364.
282. Nishikawa, T., Nakamura, T., Fukushima, A., Takagi, Y. 2005. Further evaluation of the skin micronucleus test: Results obtained using 10 polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 588 (1), 58-63.
283. Nogueira, P., Lourenço, J., Rodriguez, E., Pacheco, M., Santos, C., Rotchell, J.M., Mendo, S. 2009. Transcript profiling and DNA damage in the European eel (*Anguilla anguilla* L.) exposed to 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Aquatic Toxicology* 94 (2), 123-130.
284. Novelli, E.L.B., Lopes, A.M., Rodrigues, A.S.E., Novelli Filho, J.L.V.B., Ribas B.O. 1999. Superoxide radical and nephrotoxic effect of cadmium exposure. *International Journal of Environmental Health Research* 9, 109-116.
285. NPD, 2007. Facts 2007: 35-189.
286. NPD, Press release 28/2008: <http://www.npd.no/English/Aktuelt/Pressemeldinger/2008/>.

287. O'Connor, T.P. 2002. National distribution of chemical concentrations in mussels and oysters in the USA. *Marine Environmental Research* 53, 117-143.
288. Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U. 2003. Molluscs as bioindicators. *Trace Metals and other Contaminants in the Environment* 6, 577-635.
289. Ohtaki, K., Sposto, R., Rodama, Y., Nakano, M., Awa, A.A. 1994. Aneuploidy in somatic cells of in vitro exposed A – bomb survivors in Hiroshima. *Mutational Research* 316, 49-58.
290. Oikari, A. 2006. Caging techniques for field exposures of fish to chemical contaminants. *Aquatic Toxicology* 78, 370-381.
291. OLF, 2008. Environmental Report 2007. The Norwegian Oil Industry Association, Stavanger. 62 p.
292. Oliveira, M., Serafim, A., Bebianno, M.J., Pacheco, M., Santos, M.A. 2008. European eel (*Anguilla anguilla* L.) metallothionein, endocrine, metabolic and genotoxic responses to copper exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 70 (1), 20-26.
293. OSPAR, 2000. Quality Status Report 2000, Region II – Greater North Sea. OSPAR Commission, London. 5-85 pp.
294. Otte, J.C., Andersson, C., Abrahamson, A., Olsman, H., Keiter, S., Engwall, M., Hollert, H., Brunström, B. 2008. A bioassay approach to determine the dioxin-like activity in sediment extracts from the Danube River: Ethoxyresorufin-O-deethylase induction in gill filaments and liver of three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Environment International* 34, 1176-1184.
295. Pacheco, M., Santos, M.A. 1997. Induction of EROD Activity and Genotoxic Effects by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Resin Acids on the Juvenile Eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 38, 252-259.
296. Pacheco, M., Santos, M.A. 1998. Induction of Liver EROD and Erythrocytic Nuclear Abnormalities by Cyclophosphamide and PAHs in

- Anguilla anguilla* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 40 (1-2), 71-76.
297. Pacheco, M., Santos, M.A. 2001. Biotransformation, endocrine, and genetic responses of (*Anguilla anguilla* L.) to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 49, 64-75.
298. Pacheco, M., Santos, M.A. 2002. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anquilla anquilla* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 53, 331-347.
299. Pacheco, M., Santos, M.A. 2005. Biotransformation and genotoxic biomarkers in mullets species (*Liza* sp.) from a contaminated coastal lagoon (Ria de Aveiro, Portugal). *Environmental Monitoring and Assessment* 107, 133-153.
300. Padrang, R., Petras, M., Ralph, S., Vrzoc, M. 1995. Alkaline single cell gel (Comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 26, 345-356.
301. Palhares, D., Grisolia, C.K. 2002. Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in Tilapia fish, following mitomycin C treatment. *General Molecular Biology* 25, 281-284.
302. Pampanin, D.M., Marangon, I., Volpato, E., Campesan, G., Nasci, C. 2005. Stress biomarkers and alkali-labile phosphate level in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) collected in the urban area of Venice (Venice Lagoon, Italy). *Environmental Pollution* 136, 103-107.
303. Pan, L.Q., Ren, J., Liu, J. 2006. Responses of antioxidant systems and LPO level to benzo(a)pyrene and benzo(k)fluoranthene in the haemolymph of the scallop *Chlamys ferrari*. *Environmental Pollution* 141 (3), 443-451.

304. Pan, L., Miao, J., Wang, J., Liu, J. 2008. AHH activity, tissue dose and DNA damage in different tissues of the scallop *Chlamys farreri* exposed to benzo[a]pyrene. *Environmental Pollution* 153, 192-198.
305. Pantaleao, S.M., Alcântara, A.V., Alves, J.P.H., Spanò, M.A. 2006. The piscine micronucleus test to assess the impact of pollution on the Japarutuba river in Brazil. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 47, 219-224.
306. Parry, E.M., Parry, J.M., Corso, C., Doherty, A., Haddad F., Hermine, T.F., Johnson, G., Kayani, M., Quick, E., Warr, T., Williamson, J. 2002. Detection and characterization of mechanisms of action of aneugenic chemicals. *Mutagenesis* 17, 509-521.
307. Parry, J.M., Harvey, J.S., Lyons, B.P. 1997. The application of genetic toxicology in the analysis of the consequences of a major marine pollution incident. *Mutation Research. Supplement* 1. 379. S91.
308. Parvez, S., Raisuddin, S. 2005. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 20, 112-117.
309. Patnaik, P. 1999. *A Comprehensive Guide to the Properties of Hazardous Chemical Substances* (2nd ed.). John Wiley & Sons Publishers.
310. Pavlica, M., Klobučar G.I.V., Vetma, N., Erben, R., Papeš, D. 2000. Detection of micronuclei in haemocytes of zebra mussel and great ramshorn snail exposed to pentachlorophenol. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 465 (1-2), 145-150.
311. Peakall, D.B. 1992. In: Depledge M.H., Sanders B. (Eds.), *Animal Biomarkers as Pollution Indicators*. Chapman & Hall, London. 201-222.
312. Phillips, D.H., Castegnaro, M., on behalf of the trial participants. 1999. Standardization and validation of DNA adduct postlabeling methods:

- report of interlaboratory trials and production of recommended protocols. *Mutagenesis* 14, 301-315.
313. Phillips, D.H., Farmer, P.B., Beland, F.A., Nath, R.G., Poirier, M.C., Reddy, M.V., Turteltaub, K.W. 2000. Methods of DNA adduct determination and their application to testing compounds for genotoxicity. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35, 222-233.
314. Piechocki, A., Dyduch-Falniowska, A. 1993. Molluscs (Mollusca), bivalvae (Bivalvia). PWN Warszawa. 204 pp.
315. Pietrapiana, D., Modena, M., Guidetti, P., Falugi, C., Vacchi, M. 2002. Evaluating the genotoxic damage and hepatic tissue alterations in demersal fish species: a case study in the Ligurian Sea (NW-Mediterranean). *Marine Pollution Bulletin* 44, 238-243.
316. Pytharopoulou, S., Kouvela, E.C., Sazakli, E., Leotsinidis, M., Kalpaxis D.L. 2006. Evaluation of the global protein synthesis in *Mytilus galloprovincialis* in marine pollution monitoring: Seasonal variability and correlations with other biomarkers. *Aquatic Toxicology* 80, 33-41.
317. Pytharopoulou, S., Sazakli, E., Grintzalis, K., Georgiou, C.D., Leotsinidis, M., Kalpaxis, D.L. 2008. Translational responses of *Mytilus galloprovincialis* to environmental pollution: Integrating the responses to oxidative stress and other biomarker responses into a general stress index. *Aquatic Toxicology* 89 (1), 18-27.
318. Poletta, G.L., Larriera, A., Kleinsorge, E., Mudry, M.D. 2009. Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup (glyphosate) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) evidenced by the Comet assay and the Micronucleus test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 672 (2), 95-102.
319. Porte, C., Albaiges, J. 1993. Bioaccumulation patterns of hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in bivalves, crustaceans and fishes. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 26, 273-281.

320. Porto, J.I.R., Araujo, C.S.O., Feldberg, E. 2005. Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. *Environmental Research* 97, 287-292.
321. Ramirez, O.A., Garcia, F.P. 2005. Genotoxic damage in zebra fish (*Danio rerio*) by arsenic in waters from Zimapan, Hidalgo, Mexico. *Mutagenesis* 20, 291-295.
322. Rana, S.V.S. 2008. Metals and apoptosis: Recent developments. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 22 (4), 262-284.
323. Rank, J., Jensen, K. 2003. Comet assay on gill cells and hemocytes from the blue mussel *Mytilus edulis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54 (3), 323-329.
324. Rank, J., Jensen, K., Jespersen, P.H. 2005. Monitoring DNA damage in indigenous blue mussels (*Mytilus edulis*) sampled from coastal sites in Denmark. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 585 (1-2), 33-42.
325. Rank, J., Lehtonen, K.K., Strand, J., Laursen, M. 2007. DNA damage, acetylcholinesterase activity and lysosomal stability in native and transplanted mussels (*Mytilus edulis*) in areas close to coastal chemical dumping sites in Denmark. *Aquatic Toxicology* 84, 50-61.
326. Rank, J. 2009. Intersexin *Littorina littorea* and DNA damage in *Mytilus edulis* as indicators of harbour pollution. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 1271-1277.
327. Rao, S.S., Neheli, T., Carey, J.H., Cairns, V.W. 1997. Fish hepatic micronuclei as an indication of exposure to genotoxic environmental contaminants. *Environmental Toxicology and Water Quality* 12, 217-222.
328. Raspor, B., Dragun, Z., Erk, M., Ivankovič, D., Pavii, J. 2004. Is the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* a tissue of choice for estimating cadmium exposure by means of metallothioneins? *Science of the Total Environment* 333 (1-3), 99-108.

329. Rau, M.A., Whitaker, J., Freedman, J.H., Di Giulio, R.T. 2004. Differential susceptibility of fish and rat liver cells to oxidative stress and cytotoxicity upon exposure to prooxidants. *Comparative Biochemistry and Physiology C137*, 335-342.
330. Regoli, F., Pellegrini, D., Winston, G.W., Gorbi, S., Giuliani, S., Virno-Lamberti, C., Bompadre, S. 2002. Application of biomarkers for assessing the biological impact of dredged materials in the Mediterranean: the relationship between antioxidant responses and susceptibility to oxidative stress in the red mullet (*Mullus barbatus*). *Marine Pollution Bulletin* 44 (9), 912-922.
331. Regoli, F., Frenzilli, G., Bocchetti, R., Annarumma, F., Scarcelli, V., Fattorini, D., Nigro, M. 2004. Time-course variations of oxyradical metabolism, DNA integrity and lysosomal stability in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment. *Aquatic Toxicology* 68 (2), 167-178.
332. Renner, R. 1997. European bans on surfactant trigger transatlantic debate. *Environmental Science and Technology* 31, 316A-320A.
333. Rickwood, C.J., Galloway, T.S. 2004. Acetylcholinesterase inhibition as a biomarker of adverse effect: A study of *Mytilus edulis* exposed to the priority pollutant chlorfenvinphos. *Aquatic Toxicology* 67 (1), 45-56.
334. Rivero, C.L.G., Barbosa, A.C., Ferreira, M.F.N., Dorea, J.G., Grisolia, C.K. 2008. Evaluation of genotoxicity and effects on reproduction of nonylphenol in *Oreochromis niloticus* (Pisces: cichlidae). *Ecotoxicology* 17 (8), 732-737.
335. Rybakovas, A. 2007. Analysis of genotoxic and cytotoxic effects of environmental pollution in the Baltic and North Sea organisms. Summary of doctoral dissertation. Vilnius. 1-23 p.
336. Rybakovas, A., Baršienė, J., Lang, T. 2009. Environmental genotoxicity and cytotoxicity in the offshore zones of the Baltic and the North Seas. *Marine Environmental Research* 68, 246-256.

337. Rocha, P.S., Luvizotto, G.L., Kosmehl, T., Böttcher, M., Storch, V., Braunbeck, T., Hollert, H. 2009. Sediment genotoxicity in the Tietê River (São Paulo, Brazil): In vitro comet assay versus *in situ* micronucleus assay studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72 (7), 1842-1848.
338. Rodriguez-Cea, A., Ayllón, F., Garcia-Vazquez, E. 2003. Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 442-448.
339. Roeva, N.N., Sidorov, A.V., Yurovitskii, Y.G. 1999. Metallothioneins, proteins binding heavy metals in fish. *Biology Bulletin* 26 (6), 617-622.
340. Roy, A., Steinert, L., Scott Bay, S.M., Greenstein, D., Sapozhnikova, Y., Bawardi, O., Leifer, I., Schlenk, D. 2003. Biochemical effects of petroleum exposure in hornyhead turbot (*Pleuronichthys verticalis*) exposed to a gradient of sediments collected from a natural petroleum seep in CA, USA. *Aquatic Toxicology* 65, 159-169.
341. Roméo, M., Hoarau, P., Garello, G., Gnassia-Barelli, M., Girard, J. P. 2003. Mussel transplantation and biomarkers as useful tools for assessing water quality in the NW Mediterranean. *Environmental Pollution* 122 (3), 369-378.
342. Rozgaj, R., Kašuba, V., Fučić, A. 2002. Genotoxicity of cadmium chloride in human lymphocytes evaluated by the comet assay and cytogenetic tests. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 16 (3), 187-192.
343. Russo, C., Rocco, L., Morescalchi, M.A., Stingo, V. 2004. Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57, 168-174.
344. Saeed, T., Al-Mutairi, M. 2000. Comparative composition of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the sea water-soluble

- fractions of different Kuwaiti crude oils. *Advances in Environmental Research* 4 (2), 141-145.
345. Safe, S.H., Gaido, K. 1998. Phytoestrogens and anthropogenic estrogenic compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 119-126.
346. Sanchez-Chardi, A., Marques, C.C., Gabriel, S.I., Capela-Silva, F., Cabrita, A.S., Lopez-Fuster, M.J., Nadal, J., Mathias, M.L. 2008. Haematology, genotoxicity, enzymatic activity and histopathology as biomarkers of metal pollution in the shrew *Crocidura russula*. *Environmental Pollution* 156, 1332-1339.
347. Sanchez-Chardi, A., Lopez-Fuster, M.J. 2009. Metal and metalloid accumulation in shrews (Soricomorpha, Mammalia) from two protected Mediterranean coastal sites. *Environmental Pollution* 157, 1243-1248.
348. Sánchez-Galán, S., Linde, A.R., Izquierdo, J.I., García-Vázquez, E. 1998. Micronuclei and fluctuating asymmetry in brown trout (*Salmo trutta*): complementary methods to biomonitor freshwater ecosystems. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 412 (3), 219-225.
349. Sanchez-Galan, S., Linde, A.R., Ayllón, F., Garcia-Vazquez, E. 1999. Brown Trout and European Minnow as Target Species for Genotoxicity Tests: Differential Sensitivity to Heavy Metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 43, 301-304.
350. Sanchez-Galan, S., Linde, A.R., Ayllón, F., Garcia-Vazquez, E. 2001. Induction of Micronuclei in Eel (*Anguilla anguilla* L.) by Heavy Metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 49 (2), 139-143.
351. Sanni, S., Óysæd, V., Hóivangli, B., Gaudebert, B. 1998. A Continuous Flow System (CFS) for chronic exposure of aquatic organisms. *Marine Environmental Research* 46 (1-5), 97-101.
352. Sarkar, A., Ray, D., Shrivastava, A.N., Sarker, S. 2006. Molecular Biomarkers: Their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology* 15, 333-340.

353. Sarkar, A., Gaitonde, D.C.S., Sarkar, A., Vashistha, D., D'Silva, C., Dalal, S.G. 2008. Evaluation of impairment of DNA integrity in marine gastropods (*Cronia contracta*) as a biomarker of genotoxic contaminants in coastal water around Goa, West coast of India. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71 (2), 473-482.
354. Scarpato, R., Migliore, L., Alfinito-Cognetti, G., Barale, R. 1990. Induction of micronuclei in gill tissue of *Mytilus galloprovincialis* exposed to polluted marine waters. *Marine Pollution Bulletin* 21 (2), 74-80.
355. Schiedek, D., Broeg, K., Baršienė, J., Lehtonen, K.K., Gercken, J., Pfeifer, S., Vuontisjärvi, H., Vuorinen, P.J., Dedonyte, V., Köhler, A., Balk, L., Schneider, R. 2006. Biomarker responses as indication of contaminant effects in blue mussel (*Mytilus edulis*) and female eelpout (*Zoarces viviparus*) from the southwestern Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin* 53, 387-405.
356. Schlegel, R., MacGregor, J.T. 1982. The persistence of micronuclei in peripheral blood erythrocytes: detection of chronic chromosome breakage in mice. *Mutation Research* 104, 367-369.
357. Schlenk, D., Celander, M., Gallagher, E.P., George, S., James, M., Kullman, S.W., Van der Hurk, P., Willett, K. 2008. Biotransformation in fishes. In: R.T. Di Giulio and D.E. Hinton, Editors, *The Toxicology of Fishes*, CRC Press, Taylor & Francis group, 153–234.
358. Schnell, S., Schiedek, D., Scheider, R., Balk, L., Vuorinen, P.J., Karvinen, H., Lang, T. 2008. Biological indication of contaminant exposure in Atlantic cod (*Gadus morhua*) in the Baltic Sea. *Canadian Journal of Fishery Aquatic Science* 65, 1122-1134.
359. Shimada, T. 2006. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 21 (4), 257-276.
360. Shimizu, N., Itoh, N., Utiyama, H., Vahl, G.M. 1998. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding

- and micronucleation during the S-phase. *Journal of Cell Biology* 140, 1307-1320.
361. Shimizu, N., Shimura, T., Tanaka, T. 2000. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 448 (1), 81-90.
362. Shugart, L.R. 1996. The genotypic diversity approach. *Comparative Biochemistry and Physiology* 2, 273-276.
363. Shui, W.Y., Bobra, M., Bobra, A.M., Maijanen, A., Sunito, L., Mackay, D. 1990. The water solubility of crude oils and petroleum products. *Oil Chemistry and Pollution* 7, 57-84.
364. Silverman, H., McNeil, J.W., Dietz, T.H. 1987. Interaction of trace metals, Zn, Cd, and Mn with Ca concentrations in the gills of freshwater unionid mussels. *Canadian Journal of Zoology* 65, 828-832.
365. Simes, D.C., Bebianno Maria, J., Moura José, J.G. 2003. Isolation and characterisation of metallothionein from the clam *Ruditapes decussatus*. *Aquatic Toxicology* 63 (3), 307-318.
366. Simkiss, K. 1981. Cellular discrimination processes in metal accumulating cells. *Journal of Experimental Biology* 94, 317-327.
367. Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. 1988. A simple technique for the quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175, 184-91.
368. Siu, W.H.L., Cao, J., Jack, R.W., Wu, R.S.S., Richardson, B.J., Xu, L., Lama, P.K.S. 2004. Application of the comet and micronucleus assays to the detection of B[a]P genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussel (*Perna viridis*). *Aquatic Toxicology* 66, 381-392.
369. Skarphéðinsdóttir, H., Ericson, G., Svavarsson, J., Næs, K. 2007. DNA adducts and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) tissue levels in blue mussels (*Mytilus* spp.) from Nordic coastal sites. *Marine Environmental Research* 64 (4), 479-491.

370. Snow, E.T. 1992. Metal carcinogenesis: mechanistic implications. *Pharmacology and Therapeutics* 53, 31-65.
371. Soldatov, A.A. 1995. Peculiarities of organization and functioning of the fish red blood system. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 41, 272-281.
372. Souza, T., Fontanetti, C.S. 2006. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Mutation Research* 605, 87-93.
373. Stegeman, J.J., Lech, J.J. 1991. Cytochrome P450 monooxygenase systems in aquatic species: carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. *Environmental Health Perspectives* 90, 101-109.
374. Steinert, S.A., Streib-Montee, R., Leather, J.M., Chadwick, D.B. 1998. DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 399 (1), 65-85.
375. Stentiford, G.D., Feist, S.W. 2005. First reported cases of intersex (ovotestis) in the flatfish species dab, *Limanda limanda*: Dogger Bank, North Sea. *Marine Ecology Progress Series* 301, 307-310.
376. Stephensen, E., Svavarsson, J., Sturve, J., Ericson, G., Adolfsson-Erici, M., Förlin, L. 2000. Biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*), caught in four harbours on the southwest coast of Iceland. *Aquatic Toxicology* 48 (4), 431-442.
377. Stephenson, M.T. 1992. A Survey of Produced Water Studies, in *Produced Water*, J.P.Ray and F.R. Englehart (eds.), Plenum Press, New York.
378. Stončius, D., Lazutka, J.R. 2003. Spontaneous and benzo[α]pyrene-induced micronuclei in the embryos of black-headed gull (*Larus ridibundus* L.). *Mutation Research* 538, 31-39.
379. Stopper, H., Muller, S.O. 1997. Micronuclei as a Biological Endpoint for Genotoxicity: A Minireview. *Toxicology in Vitro* 11, 661-667.

380. Storm, J.E., Karl, K.R., Doull, J. 2000. Occupational exposure limits for 30 organophosphate pesticides based on inhibition of red cell acetylcholinesterase. *Toxicology* 150, 1-29.
381. Sturve, J., Berglund, Å., Balk, L., Broeg, K., Böhmert, B., Massey, S., Savva, D., Parkkonen, J., Stephensen, E., Köhler, A., Förlin, L. 2005. Effects of dredging in Göteborg harbour assessed by biomarkers in eelpout (*Zoarces viviparus*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 24 (8), 223-230.
382. Sturve, J., Hasselberg, L., Fälth, H., Celander, M., Förlin, L. 2006. Effects of North Sea oil and alkylphenols on biomarker responses in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquatic Toxicology* 78S, S73-S78.
383. Sueiro, R.A., Suarez, S., Araujo, M., Garrido, M.J. 2003. Mutagenic and genotoxic evaluation of bisphenol F diglycidyl ether (BFDGE) in prokaryotic and eukaryotic systems. *Mutation Research* 536, 39-48.
384. Sundt, R.C., Pampanin, D.M., Larsen, B.K., Brede, C., Herzke, D., Bjørnstad, A., Andersen, O.K. 2006. The BEEP Stavanger Workshop: Mesocosm exposures. *Aquatic Toxicology* 78 (1), S5-S12.
385. Sveum, P., Ladousse, A. 1989. Biodegradation of oil in the Arctic: enhancement by oil-soluble fertilizer application. *Proceed. 1989 Int. Oil Spill Conference*. Washington, D.C.: American Petroleum Institute pp. 439-445.
386. Taban, I.C., Bechmann, R.K., Torgrimsen, S., Baussant, T., Sanni, S. 2004. Detection of DNA damage in mussels and sea urchins exposed to crude oil using comet assay. *Marine Environmental Research* 58, 701-705.
387. Tabata, A., Kashiwa, S., Ohnishi, Y., Ishikawa, H., Miyamoto, N., Itoh, M., Magara, Y. 2001. Estrogenic influence of estradiol-17 β , p-nonylphenol and bisphenol A on Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) at detected environmental concentrations. *Water Science and Technology* 43 (2), 109-116.

388. Talapatra, S.N., Banerjee, S.K. 2007. Detection of micronucleus and abnormal nucleus in erythrocytes from the gill and kidney of *Labeo bata* cultivated in sewage-fed fish farms. *Food and Chemical Toxicology* 45 (2), 210-215.
389. Tanzarella, C., Degrassi, F., Cristaldi, M., Moreno, S., Lascialfari, A., Chiuchiarelli, G., Ieradi, L.A. 2001. Genotoxic damage in free-living Algerian mouse (*Mus spretus*) after the Coto Doñana ecological disaster. *Environmental Pollution* 115 (1), 43-48.
390. Teles, M., Pacheco, M., Santos, M.A. 2003. *Anguilla anguilla* L. liver ethoxyresorufin O-deethylation, Glutathione S-transferase, erythrocytic nuclear abnormalities, and endocrine responses to naphthalene and β -naphthoflavone. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 55, 98-107.
391. Thiriot-Quévieux, C., Pombo, A.M.I., Albert, P. 1989. Poliploidie chez un Bivalve inccubat, *Lasea rubra* (Montagu). *Genetics*, 308, 115-120.
392. Tice, R.R., Ivett, J.L. 1985. Cytogenetic analysis of bone marrow damage. In *Toxicology of the Blood and Bone Marrow* (R.D. Irons, Ed.), 119-140. Raven Press, New York.
393. Toyoda, M., Inagaki, M. 2000. Heavy oil sorption using exfoliated graphite new application of exfoliated graphite to protect heavy oil pollution. *Carbon* 38, 199-210.
394. Tollefsen, K.E., Finne, E.F., Romstad, R., Sandberg, C. 2006. Effluents from oil production activities contain chemicals that interfere with normal function of intra- and extra-cellular estrogen binding proteins. *Marine Environmental Research*, 62 (1), S191-S194.
395. Tollefsen, K.E., Eikvar, S., Finne, E.F., Fogelberg, O., Gregersen, I.K. 2008. Estrogenicity of alkylphenols and alkylated non-phenolics in a rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) primary hepatocyte culture. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71 (2), 370-383.
396. Torres-Bugarín, O., De Anda-Casillas, A., Ramírez-Muñoz, M.P., Sánchez-Corona, J., Cantú, J.M., Zúñiga, G. 1998. Determination of

- diesel genotoxicity in firebreathers by micronuclei and nuclear abnormalities in buccal mucosa. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 413 (3), 277-281.
397. Tucker, J.D., Auletta, A., Cimino, M.C., Dearfield, K.L., Jacobson-Kram, D., Tice, R.R., Carrano, A.V. 1993. Sister-chromatid exchange: second report of the Gene-Tox program. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* 297 (2), 101-180.
398. Tucker, J.D., Preston, R.J. 1996. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* 365 (1-3), 147-159.
399. Tuvikene, A. 1995. Responses of fish to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Annales Zoologici Fennici* 32, 295-309.
400. Udroi, I. 2006. The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquatic Toxicology* 79, 201-204.
401. Udroi, I., Ieradi, L.A., Cristaldi, M., Tanzarella, C. 2006. Detection of clastogenic and aneugenic damage in newborn rats. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 47, 320-324.
402. Utvik, T.I.R. 1999. Chemical characterisation of produced water from four offshore oil production platforms in the North Sea. *Chemosphere* 39, 2593-2606.
403. Utvik, T.I.R. 2003. Characteristics of produced water in the North Sea, Produced Water Workshop Aberdeen, Scotland, 26–27 March.
404. Van der Oost, R., Heida, H., Opperhuizen, A. 1988. Polychlorinated biphenyl congeners in sediments, plankton, molluscs, crustaceans and eel in a freshwater lake: implications of using reference chemicals and indication organisms in bioaccumulation studies. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 17, 721-729.
405. Van der Oost, R., Goksoyr, A., Celander, M., Heida, H., Vermeulen, N.P.E. 1996. Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla*

- anguilla*) II. Biomarkers: pollution-induced biochemical responses. *Aquatic Toxicology* 36, 189-222.
406. Van der Oost, R., Beyer, J., Nico, P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment. *Environmental Toxicology Pharmacology* 13, 57-149.
407. Vanzella, T.P., Martinez, C.B., Cólus, I.M. 2007. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. *Mutation Research* 631 (1), 36-43.
408. Venier, P., Canova, S., Levis, A.G. 1996. DNA adducts in mussels and fish collected from the venice lagoon and in mussels treated with benzo[a]pyrene. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 360 (3), 300-300 (1).
409. Venier, P., Maron, S., Canova, S. 1997a. Detection of micronuclei in gill cells and haemocytes of mussels exposed to benzo[a]pyrene. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 390, 33-44.
410. Venier, P., Minisi, S., Voltan, R., Ciccotti, E., Pinna, A. 1997b. Formation and persistence of DNA adducts and micronuclei in rainbow trout after treatment with benzo[a]pyrene. *Mutation Research* 379: 94.
411. Venier, P., Zampieron, C. 2005. Evidence of genetic damage in grass gobies and mussels from the Venice lagoon. *Environment International* 31, 1053-1064.
412. Viarengo, A., Canesi, L. 1991. Mussels as biological indicators of pollution. *Aquaculture* 94 (2-3), 225-243.
413. Viarengo, A., Burlando, B., Ceratto, N., Panfoli, I. 2000. Antioxidant role of metallothioneins: A comparative overview. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-grand)* 46, 407-417.
414. Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A. 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms.

- Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology 146 (3), 281-300.
415. Vikram, A., Tripathi, D.N., Pawara, A.A., Ramarao, P., Jena, G.B. 2008. Pre-bled-young-rats in genotoxicity testing: A model for peripheral blood micronucleus assay. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 52 (2), 147-157.
416. Villela, I.V., de Oliveira, I.M., Silveira, J.C., Dias, J.F., Henriques, J.A.P., da Dilva, J. 2007. Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaiba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions. *Mutation Research* 628, 76-86.
417. Virbickas, J. 2000. Lietuvos žuvys. Vilnius, 192 p.
418. Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M.J., Valavanidis, A. 2007. Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Marine Pollution Bulletin* 54, 1361-1371.
419. von Westernhagen, H., Cameron, P., Dethlefsen, V., Janssen, D. 1989. Chlorinated hydrocarbons in North Sea whiting (*Merlangius merlangus* L.), and effects on reproduction. I. Tissue burden and hatching success. *Helgoländer Meeresuntersuchungen* 43, 45-60.
420. Vosyliienė, M.Z., Jankaitė A. 2006. Effect of heavy metal model mixture on rainbow trout biological parameters. *Ekologija* 4, 12-17.
421. Waite, D.T., Grover, R., Westcott, N.D., Sommerstad, H., Kerr, L. 1992. Pesticides in ground water, surface water and spring runoff in a small Saskatchewan watershed. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11, 741-748.
422. Wake, H. 2005. Oil refineries: a review of their ecological impacts on the aquatic environment. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 62 (1-2), 131-140.

423. Weinstein, J.E. 1995. Seasonal responses of the mixed-function oxygenase system in the American oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791), to urban-derived polycyclic aromatic hydrocarbons. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology and Toxicology* 112 (3), 299-307.
424. Wepener, V., Bervoets, L., Mubiana, V., Blust, R. 2008. Metal exposure and biological responses in resident and transplanted blue mussels (*Mytilus edulis*) from the Scheldt estuary. *Marine Pollution Bulletin* 57, 624-631.
425. Wessel, N., Rousseau, S., Caisey, X., Quiniou, F., Akcha, F. 2007. Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo(a)pyrene, 17 α -ethinylestradiol and endosulfan on *Crassostrea gigas* embryos. *Aquatic Toxicology* 85, 133-142.
426. Willett, K.L., Wassenberg, D., Lienesch, L., Reichert, W., Di Giulio, R.T. 2001. In Vivo and in Vitro Inhibition of CYP1A-Dependent Activity in *Fundulus heteroclitus* by the Polynuclear Aromatic Hydrocarbon Fluoranthene. *Toxicology and Applied Pharmacology* 177 (3), 264-271.
427. Williams, R.C., Metcalfe, C.D. 1992. Development of an in vivo hepatic micronucleus assay with rainbow trout. *Aquatic Toxicology* 23 (3-4), 193-202.
428. Williams, G., West, J.M., Koch, I., Reimer, K.J., Snow, E.T. 2009. Arsenic speciation in the freshwater crayfish, *Cherax destructor* Clark. *Science of The Total Environment* 407 (8), 2650-2658.
429. Winzer, K., Van Noorden, C.J.F., Köhler, A. 2002. Sex-specific biotransformation and detoxification after xenobiotic exposure of primary cultured hepatocytes of European flounder (*Platichthys flesus* L.). *Aquatic Toxicology* 59 (1-2), 17-33.
430. Wolfe, D.A., Hameedi, M.J., Galt, J.A., Watabayashi, G., Short, J., O'Claire, C., Rice, S., Michel, J., Payne, J.R., Braddock, J., Hanna, S.,

- Sale, D. 1994. The fate of oil spilled from the Exxon Valdez. *Environmental Science and Technology* 28, 560A-568A.
431. Woo, S., Kim, S., Yum, S., Yim, U.H., Lee, T.K. 2006. Comet assay for the detection of genotoxicity in blood cells of flounder (*Paralichthys olivaceus*) exposed to sediments and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Marine Pollution Bulletin* 52, 1768-1775.
432. Woodall, D.W., Gambrell, R.P., Rabalais, N.N. 2001. Developing a method to track oil and gas produced water discharges in estuarine systems using salinity as a conservative tracer. *Marine Pollution Bulletin* 42, 1118-1127.
433. Woodhead, R.J., Law, R.J., Matthiessen, P. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments around England and Wales, and their possible biological significance. *Marine Pollution Bulletin* 9, 773-790.
434. Woznicki, P., Jankun, M. 2004. Chromosome Study of *Anodonta anatina* (L., 1758) (Bivalvia, Unionidae). *Folia biologica* 52, 3-4.
435. Wisberg, M.N., Rhemrev, R. 1992. Detection of genotoxins in the aquatic environment with the mussel *Mytilus edulis*. *Water Science and Technology* 35, 317-324.
436. Wu, S.M., Shih, M.J., Ho, Y.C. 2007. Toxicological stress response and cadmium distribution in hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.) upon cadmium exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 145 (2), 218-226.
437. www.fishbase.org.
438. Xu, L., Zheng, G.J., Lam, P.K.S., Richardson, B.J. 1999. Relationship between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and DNA adducts in green-lipped mussels (*Perna viridis*). *Ecotoxicology* 8, 73-82.
439. Zelikoff, J.T. 1993. Metal pollution-induced immunomodulation in fish. *Annual Review of Fish Diseases* 3, 305-325.

440. Zhu, S., King, S.C., Haasch, M.L. 2008. Biomarker induction in tropical fish species on the Northwest Shelf of Australia by produced formation water. *Marine Environmental Research* 65 (4), 315-324.

DISERTACIJOS TEMA PASKELBTŲ DARBŲ SĄRAŠAS

Moksliniai straipsniai

LAUROS ANDREIKĖNAITĖS publikacijų sąrašas:

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. Cytogenetic 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.

Mokslinių pranešimų tezės

1. **Andreikėnaitė L.** Cytogenetic damage in perch (*Perca fluviatilis* L.) and Duck mussel (*Anodonta anatina* L.) exposed to crude oil. VII-oji Lietuvos jaunujų hidroekologų konferencija „Vandens ekosistemų įvairovė, funkcionavimas ir kaita“. 2005. P. 9-10.
2. Baršienė J., Rybakovas A., **Andreikėnaitė L.** Cytogenetic damage in marine organisms as a biomarker of environmental pollution. The third International Conference in Lithuania “Metals in Environment”. 2006. P. 146-147.
3. **Andreikėnaitė L.**, Baršienė J. Studies of cytogenetic damage in perch (*Perca fluviatilis* L.) under field and laboratory conditions. The second Regional Student Conference in Lithuania “Biodiversity and Functioning of Aquatic Ecosystems in the Baltic Sea Region”. 2006. P. 44.
4. Baršienė J., Rybakovas A., **Andreikėnaitė L.** Cytogenetic damage in aquatic mollusks as a biomarker of environmental pollution. World Congress of Malacology, Antwerp, Belgium, 15 – 20 July 2007, p. 19.

5. Baršienė J., Rybakovas A., **Andreikėnaitė L.** Environmental genotoxicity studies in marine fish and mussels. ICES Annual Science Conference 2007. Abstracts of Papers and Posters. p. 163.
6. **Andreikėnaitė L.**, Baršienė J. Studies of micronuclei and other nuclear abnormalities in blood of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) treated with heavy metal mixture and road maintenance salts. X-oji Lietuvos jaunujų hidroekologų konferencija „Vandens ekosistemų įvairovė, funkcionavimas ir kaita“. 2007. P. 30-31.
7. Baršienė J., Rybakovas A., **Andreikėnaitė L.** Aplinkos genotoksiškumo ypatumai Baltijos jūros atviroje ir priekrantės zonose. Mokslinė – praktinė konferencija „JŪROS IR KRANTŲ TYRIMAI“. balandžio 09-11 d. 2008. P.11-13.
8. Baršienė J., Rybakovas A., **Andreikėnaitė L.** Outline of Environmental Genotoxicity and Ecotoxicological Risk of Pollution in Different Zones of the Baltic Sea. EAPC Workshop “Risk Assessment and Environmental Security in the Baltic Sea Region” Vilnius, Lithuania, 6 – 7 May 2008.
9. Baršienė J., Rybakovas A., **Andreikėnaitė L.** Environmental Genotoxicity in the Baltic Sea and the Risk Assessment of Dumped Chemical Weapons for Genetically Unique organisms. International seminars on sea-dumped chemical weapons “Perspectives of international cooperation”. Vilnius, Lithuania 30 September – 1 October, 2008.
10. Lehtonen K.K., Lang T., Baršienė J., **Andreikėnaitė L.**, Berezina N., Golubkov S., Balode M., Purina I., Kholodkevich S., Kuznetsova T., Vuori K., Kanerva M. Integrated multidisciplinary assessment of the ecosystem health of the Gulf of Finland: scheme of the 2009 twin expedition and first results. “BONUS” Joint Baltic Sea Research Annual Conference, 19-21 January 2010 Vilnius, Lithuania.

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 kt. Ačiū Jums visiems!!!

Dėkoju Genotoksikologijos laboratorijos darbuotojoms - **habil. dr. Janinai Šyvokienei, dr. Lionginai Mickėnienei** 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.