

Poliklorbifenili u Željavi

Želimira Vasilić i Davor Želježić

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb

Poliklorbifenili (PCB) spadaju u skupinu postojanih organskih onečišćenja okoliša (engl. *persistent organic pollutants*, POPs). POPs su kemikalije rasprostranjene širom naše planete, koje se dugo nepromijenjene zadržavaju u okolišu, sorbiraju na prirodnim sorbensima poput tla i sedimenta ili iglica crnogorice te akumuliraju u masnom tkivu ljudi i životinja. PCB-i su aromatski, sintetski spojevi koji se prirodno ne pojavljuju u okolišu. Kemijska im je formula $C_{12}H_{10-n}Cl_n$ gdje n može biti od 1 do 10. Strukturu PCB-a čine dva povezana benzenska prstena u kojima su neki ili svi vodikovi atomi supstituirani klorovim atomima. Ovisno o broju i položaju klorovih atoma postoji 209 pojedinačnih spojeva koji se nazivaju kongenerima. Svi kongeneri PCB-a su nepolarni, lipofilni spojevi, slabo topljivi u vodi. Niske su električne i visoke toplinske vodljivosti. Visoko su otporni na termičku razgradnju, nisu zapaljivi i izrazito su postojani. Intenzivno su se proizvodili i primjenjivali u prošlom stoljeću. Procjenjuje se da je u razdoblju od 1929. do sredine 1970-ih proizvedeno oko 1.5 milijuna tona. Zbog svojih fizičkih i kemijskih svojstava PCB-i su upotrebljavani kao dielektrične tekućine u električnim transformatorima i kondenzatorima, kao dodaci bojama i mazivima, a i u proizvodnji papira za kopiranje. Nikada se nisu upotrebljavali pojedinačno, nego uvijek u komercijalnim smjesama koje su sadržavale i stotinjak kongenera. Smjese PCB-a međusobno se razlikuju po sadržaju klora, što je obično naznačeno već u njihovim trgovačkim imenima. Tako smjesa pod imenom Aroclor 1248 sadrži 48% klora, Clophen A60 i Aroclor 1260 oko 60% klora. Sredinom sedamdesetih godina prošlog stoljeća uočeni su potencijalno štetni učinci PCB-a na zdravlje ljudi i životinja, pa je u razvijenim zemljama započelo ograničavanje korištenja i zabrana proizvodnje. U našoj je zemlji upora-

ba PCB-a dozvoljena još samo u zatvorenim sustavima starih postrojenja do njihove konačne zamjene. Ministarstvo zaštite okoliša, prostornog uređenja i graditeljstva izradilo je, a Vlada RH prihvatila Nacionalni plan za provedbu Stockholmske konvencije o postojanim organskim onečišćujućim tvarima, koji je stupio na snagu u prosincu 2008. godine (1). Stockholmska konvencija izrađena je u sklopu Programa Ujedinjenih naroda za okoliš, a cilj Konvencije je uvođenje sustavnog praćenja i nadzora nad proizvodnjom i uporabom 12 POPs-spojeva. Hrvatska ju je potpisala 2001.

Zbog raširene i nekontrolirane industrijske primjene u prošlosti, PCB-i su postali jedan od glavnih perzistentnih organskih zagađivala okoliša te ih danas nalazimo u zraku, vodi, tlu i sedimentu površinskih voda, u biljkama, životinjama i ljudima, čime se indirektno ugrožava ljudsko zdravlje. Stalna zračna strujanja, taloženje lebdećih čestica i ispiranje iz zraka oborinama pridonose prijenosu PCB-a na velike udaljenosti od primarnog izvora, a time i globalnom onečišćenju okoliša. Postoji nekoliko potencijalnih izvora emisije PCB-a u okoliš: upotreba i nekontrolirano odlaganje proizvoda koji sadrže PCB-e (transformatori, kondenzatori, druga električna oprema), sagorijevanje materijala koji sadrže PCB-e, recikliranje proizvoda onečišćenih PCB-ima (papir za kopiranje) i oslobađanje PCB-a iz odlagališta i spremišta otpada. U zatvorenim prostorima pronalaze se više razine PCB-a nego na otvorenom prostoru. U stambenim zgradama sagrađenim u Europi između 1960. i 1975. utvrđene su visoke koncentracije PCB-a čiji je izvor bila boja na zidovima i cement (2).

U Hrvatskoj se proteklih tridesetak godina prati koncentracija PCB-a u rijekama, podzemnim i pitkim vodama, u tlu, u Jadranskom moru i morskome sedimentu te oborinama, zraku i bi-

ljrkama, kao i u morskim i kopnenim organizmi-
ma i ljudima. U većini obrađenih uzoraka odre-
đene su razine PCB-a karakteristične za globalno
onečišćenje okoliša. Razine PCB-a više od osno-
vnog, globalnog zagađenja zabilježene su u tlima
skupljenim u hrvatskim zračnim lukama te uz
neka industrijska postrojenja (3). Maseni udjeli
ukupnih PCB-a u 18 uzoraka tla skupljenim uz
piste zračnih luka bili su u rasponu od $3 \mu\text{g kg}^{-1}$
do $41327 \mu\text{g kg}^{-1}$ (medijan: $533 \mu\text{g kg}^{-1}$). PCB-i
su kvantitativno određeni prema standardu
Aroclor 1242 + Aroclor 1260.

Glavni uzroci onečišćenja tla PCB-ima
u Hrvatskoj su ratna razaranja u Domovin-
skom ratu (1991. - 1995.) kada su oštećena ili
uništena mnoga vojna vozila, elektroenergetski,
industrijski i drugi objekti iz kojih je moglo
doći do curenja PCB-a (4). Razine PCB-a u
tlu određivane su na više kontaminiranih lo-
kacija, a najviše su bile uz trafostanicu »Bilice«
kod Šibenika. Medijan masenih udjela PCB-a u
uzorku tla skupljenom ispod transformatora je
 2094 mg kg^{-1} , a u uzorku skupljenom 2.5 m od
transformatora 470 mg kg^{-1} (5). U dva uzorka
tla iz podzemnog vojnog aerodroma Željava,

Picer N. i suradnici (6) odredili su PCB-e (164 mg kg^{-1} i 106 mg kg^{-1}) prema standardu Aro-
clor 1248 + Aroclor 1254.

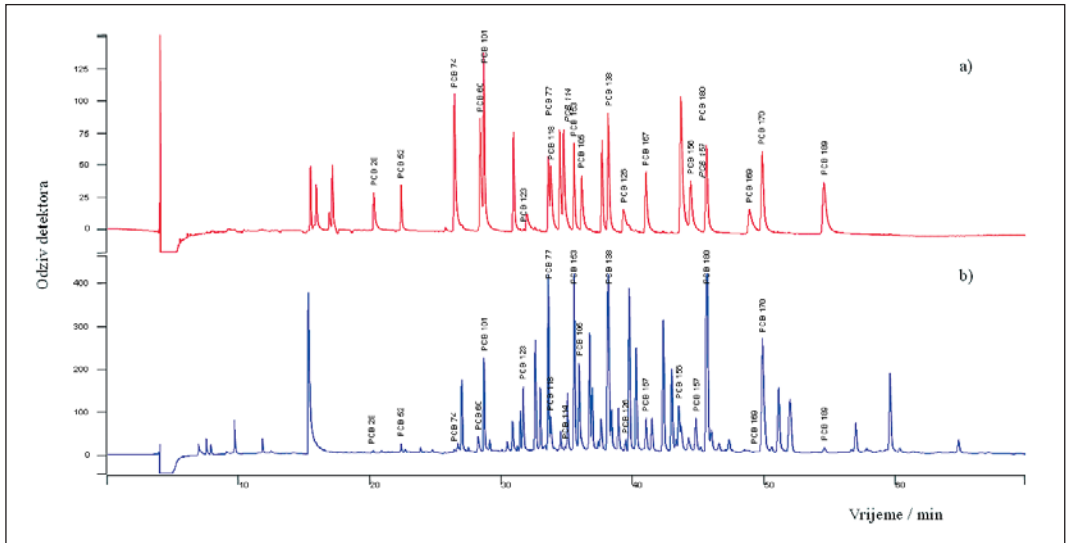
PCB-i u tlu i borovim iglicama

Podzemni vojni aerodrom Željava na grani-
ci između Hrvatske i Bosne i Hercegovine (do
1992. vojna baza tadašnje Jugoslavije) uništen
je te se s pravom sumnjalo na kontaminaciju tla
PCB-ima. Hrvoje Grgić je u dva navrata tamo
skupio ukupno 12 uzoraka tla (3 uzorka 2007.
i 9 uzoraka 2008.) kao i uzorak borovih iglica.
Igllice crnogoričnog drveća dobar su pasivni po-
kazatelj (bioindikator) onečišćenja zraka, jer se
lipofilni spojevi iz zraka, kao što su PCB-i, sor-
biraju na vosak kojim su iglice prekrivene (7).
Poliklorbifenili su iz iglica ekstrahirani mikro-
valnom ekstrakcijom diklormetanom, a iz tla
ultrazvučnom ekstrakcijom smjesom otapala
n-heksan:acetona te analizirani kapilarnom plin-
skom kromatografijom uz detektor zahvata elek-
trona, selektivan za organske spojeve koji sadrže
klor. Rezultati su izraženi kao zbroj masenih
udjela 17 kongenera PCB-a (PCB-28, PCB-52,
PCB-60, PCB-74, PCB-101, PCB-105, PCB-114,



Hrvoje Grgić

Jedan od eksplozijom otvorenih prolaza u prirodno podzemlje



a) Kromatogram standarda 20 kongenera PCB-a (crveno), b) Kromatogram uzorka tla Željava (plavo)

PCB-118, PCB-123, PCB-138, PCB-153, PCB-156, PCB-157, PCB-167, PCB-170, PCB-180 i PCB-189) u suhim iglicama, odnosno u suhom tlu. Na slici su prikazani kromatogrami standarda PCB-a (a) i uzorka tla (b).

Maseni udjel PCB-a u suhim iglicama je 0.033 mg kg^{-1} . U uzorcima tla (jedan uzorak iz 2007. i 5 uzoraka iz 2008.) iz protuudarne komore ulaza 2 određene su najviše razine PCB-a (1.1 mg kg^{-1} do 282.2 mg kg^{-1} , medijan 15.9 mg kg^{-1}). Najniže razine PCB-a određene su u dva uzorka tla uz trafostanicu TS1 (0.06 mg kg^{-1} i 0.09 mg kg^{-1}), dok su bitno više razine bile u tlu iz zrakoplovno-tehničke radionice (14.2 mg kg^{-1}), klima komore (70.4 mg kg^{-1}) i klima komore nasuprot operativnom centru - Zvijezde (17.2 mg kg^{-1}). Maseni udjel PCB-a u uzorku skupljenom na otvorenom, pored stajanke broj 1 (APRON 1) bio je 1.2 mg kg^{-1} . Dobiveni rezultati uspoređivi su s rezultatima analize dva uzorka tla s ove lokacije, koju su proveli Picer N. i suradnici te objavili 2005. (6).

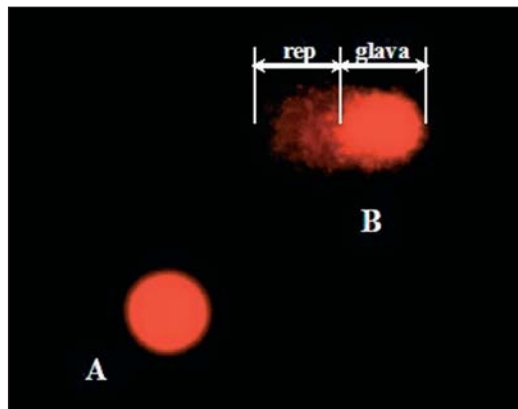
Razine globalnog onečišćenja okoliša PCB-ima su oko $0.0001 \text{ mg kg}^{-1}$, pa slijedi da su maseni udjeli PCB-a određeni u uzorcima tla vojnog aerodroma Željava i nekoliko milijuna puta viši od globalnog onečišćenja.

Maseni udjel PCB-a preliminarno određen u jednom uzorku iglica bora koji raste iznad podzemnog objekta Željava na razini je globalnog

onečišćenja, pa ovaj nalaz ide u prilog mišljenju da PCB-i čvrsto sorbirani na tlo u podzemnom objektu ne predstavljaju opasnost za okoliš izvan objekta.

Jesu li uzorci tla iz Željave genotoksični?

Studije profesionalne izloženosti PCB-ima radnika zaposlenih u proizvodnji akumulatora (8, 9), kao i u slučajevima trovanja konzumacijom kontaminiranog jestivog ulja (10) ukazale su na povećan rizik od razvoja malignih bolesti probavnog trakta, limfatičkog i krvotvornog sustava. Studije su provedene u Sjedinjenim američkim državama, Italiji i Švedskoj i obuhvaćale su osobe koje su svakodnevno tijekom više godina bile izložene PCB-ima. Na temelju tih spoznaja, kao i ispitivanja učinka PCB-a na genetički materijal ljudskih stanica (molekulu DNA), Međunarodna agencija za istraživanje raka (engl. *International Agency on Research on Cancer, IARC*) svrstala je PCB-e u 2A skupinu karcinogena, odnosno u skupinu spojeva koji su vjerojatno karcinogeni po čovjeka i mogu dovesti do razvoja malignih bolesti (11). Jedan od testova kojima se ispituje štetan učinak spoja na genetički materijal stanica jest kometski test. S obzirom na izvedbu on pripada skupini jednostavnijih citogenetičkih tehnika kojima je moguće dobiti rezultate testiranja za nekoliko sati. Ako je neki spoj oštetio molekulu DNA, ona tijekom postupka izvođenja



Prikaz stanice s neoštećenom molekulom DNA (A) i oštećenom molekulom DNA (B) nakon njihove obrade tehnikom kometskog testa

kometskog testa na mjestima oštećenja puca i oslobađaju se maleni fragmenti koji prilikom izlaganja električnom polju putuju prema anodi. Nakon bojanja, glavnina molekule DNA promatrana epifluorescentnim mikroskopom izgleda poput narančasto obojene kugle, a oštećeni dijelovi koji su putovali nalikuju na rep kugle te takva DNA nalikuje kometu na zvjezdanom nebu. Otuda i potječe naziv tehnike – kometski test. Izravna mjera intenziteta oštećenja genoma, a time i genotoksičnosti spoja, jesu dužina nastalog repa i postotak molekule DNA koji je uslijed oštećenja otputovao. (12)

U ovom istraživanju željelo se ispitati mogu li skupljeni uzorci tla štetno djelovati na molekulu DNA ljudskih stanica. Kao eksperimentalni model korišteni su limfociti izolirani iz periferne krvi. Te stanice često se koriste u ovakvim ispitivanjima zbog jednostavnosti izolacije iz živog organizma i zbog reprezentativne osjetljivosti njihovog genoma na izvanjske spojeve (ne predstavljaju niti izuzetno osjetljive, niti izuzetno otporne stanice). Limfociti su na 30 minuta izloženi djelovanju ekstrakata (aceton:*n*-heksan) dvaju uzoraka tala s visokim masenim udjelom PCB-a (protuudarna komora ulaza 2, uzorak iz 2007.): 282.2 mg kg⁻¹ i (protuudarna komora ulaza 2, uzorak iz 2008.): 68.9 mg kg⁻¹ i jednog uzorka tla s niskim masenim udjelom PCB-a (tlo uz trafostanicu TS 1: 0.09

mg kg⁻¹). Kontrolne stanice nisu izlagane uzorcima tla, već puferskoj otopini, za koju je poznato da ne oštećuje DNA. Iz stanica je potom izolirana molekula DNA, obrađena nizom lužnatih otopina i izložena električnom polju. Nakon analize utvrđeno je da je jedino u slučaju ekstrakta uzorka tla iz protuudarne komore (uzorak iz 2007.), u kojemu je određena najviša razina PCB-a, parametar dužine repa ukazivao na značajno oštećenje molekule DNA (17.1 μm ± 7.43 μm). Nešto veće oštećenje u odnosu na kontrolu (14.9 μm ± 2.36 μm) izazvao je uzorak iz protuudarne komore, uzorak iz 2008. (15.5 μm ± 3.17 μm), a uzorak uz trafostanicu nije djelovao na DNA (14.2 μm ± 8.21 μm).

Kako bismo ispitali i učinak anorganske komponente uzoraka tala na molekulu DNA, limfociti su na 30 minuta izloženi djelovanju vodenih ekstrakata tala. U ovom slučaju i uzorak iz protuudarne komore, uzorak iz 2007. (18.0 μm ± 4.51 μm) i uzorak iz protuudarne komore, uzorak iz 2008. (16.5 μm ± 6.53 μm) značajno su oštetili molekulu DNA, dok uzorak tla uz trafostanicu nije pokazao štetno djelovanje (14.8 μm ± 2.61 μm). Oštećenja utvrđena djelovanjem vodenih ekstrakata bila su većeg intenziteta od onih uzrokovanih ekstraktima smjesom otapala *n*-heksan:acetone, sugerirajući da su u uzorcima tla prisutne i anorganske komponente s genotoksičnim djelovanjem, najvjerojatnije soli metala. Međutim, niti vodeni niti ekstrakti organskim otapalima nisu povećali parametar postotka molekule DNA koja je prešla u rep (kontrola 1.50% ± 3.02%; najveće odstupanje 2.58% ± 5.02%).

Iz navedenoga možemo zaključiti da ispitivani uzorci tla podzemnog dijela aerodroma Željava mogu dovesti do oštećenja molekule DNA, ali da je to oštećenje ograničeno na mali udio od ukupnog genoma stanice. Stoga kratkotrajan kontakt čovjeka s njima ne bi imao značajnog biološkog učinka na genetički materijal. Mogući štetni učinak pojavio bi se tek nakon višegodišnjeg učestalog izlaganja uzorcima tla, najvjerojatnije udisanjem čestica prašine koje se dižu s podloge u zatvorenom prostoru podzemnog aerodroma.



Pogled iz unutrašnjosti prilaznog hodnika na ulazu 2 - armiranobetonski zastor s prorezom za vertikalni stabilizator aviona dodatno je štiti unutrašnjost objekta

Literatura

1. VLADA RH, 2008.: Nacionalni plan za provedbu Stockholmske konvencije o postojanim organskim onečišćujućim tvarima. Narodne ovine broj 145.
2. WORLD HEALTH ORGANISATION, KOPENHAGEN, 2000: Air Quality Guidelines for Europe, Second edition, Chapter 5.10: Polychlorinated Biphenyls (PCBs). WHO Regional Publications, European Series, No. 91.
3. VASILIC, Ž., PERIŠ, N., WILKEN, M., DREVENKAR, V., 2004.: Polychlorinated biphenyls, dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in soil samples from airport areas of Croatia. Intern. J. Environ. Anal. Chem., Vol. 84, broj 14-15, str. 1093-1103.
4. PICER, M., PICER, N., ČALIĆ, V., HODAK KOBASIĆ, V., CENCIĆ KODBA, Z., 2006.: Posljedice rata kao potencijalna opasnost za ekosustav krškog dijela Hrvatske. Arh Hig Rada Toksikol, vol. 57, str. 275-288.
5. HODAK KOBASIĆ, V., PICER, M., PICER, N., SRAKA, M., KOVAČ, T., 2006.: Behaviour of polychlorinated biphenyls contaminating soil near Zadar. Arh Hig Rada Toksikol, vol. 57, str. 289-296.
6. PICER, N., ČALIĆ, V., MIOŠIĆ, N., PICER, M., KOVAČ, T., CENCIĆ KODBA, Z., HODAK KOBASIĆ, V., HRVATOVIĆ, H., 2005: Ratni otpad i zagađenje tla krških područja Bosne i Hercegovine polikloriranim bifenilima. Voda i mi, broj 43, str. 44-50.
7. KOŽUL, B., HERCEG ROMANIĆ, S., 2007: Analiza poliklorbifenila i organoklorovih pesticida u borovim iglicama. Arh Hig Rada Toksikol, vol 58, str. 461 - 469
8. BROWN, D.P., JONES, M., 1981: Mortality and industrial hygiene study of workers exposed to polychlorinated biphenyls. Arch Environ Health, vol. 36, str. 120-129
9. BERTAZZI, P.A., RIBOLDI, L., PESATORI, A., RADICE, L., ZOCCHETTI, C., 1987: Cancer mortality of capacitor manufacturing workers. Am J Ind Med, vol. 11, str. 165-176.
10. KURATSUNE, M., NAKAMURA, Y., IKEDA, M. & HIROHATA, T., 1986: Analysis of deaths seen among patients with Yusho (Abstract FL17). U: Dioxin 86. Proceedings of the VI International Symposium on Chlorinated Dioxins and Related Compounds, Fukuoka, Japan, 1986, str. 179.

11. INTERNATIONAL AGENCY ON RESEARCH ON CANCER – IARC., 1987: Polychlorinated Biphenyls, U: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 18, suppl. 7, str. 322-326.
12. SINGH, N.P., MCCOY, M.T., TICE, R.R., SCHNEIDER, E.L., 1988: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, vol. 175, str. 184-191.

Polychlorinated biphenyls in the former military airbase Željava

Polychlorinated biphenyls (PCB) belong to the widespread semi-volatile, non-polar, highly lipophilic and persistent environmental micropollutants with a high tendency to bioconcentration. The commercial PCB mixtures were extensively used until the early 1970s in the so-called closed (e.g. in electrical transformers and capacitors) and open systems (e.g. additives in plasticizers, carbonless copy paper, paints, fire retardants etc.). In the late 1970s, their production and use ceased or were severely restricted in many countries, reflecting the concern for harmful effects of increasing residues in the environment. The global recycling of PCBs is substantially influenced and retarded by strong sorption of these pollutants in most soils. The usage of PCBs in Croatia is today limited to still existing closed systems in older electricity facilities until their final substitution. Over the last 30 years, the occurrence and levels of PCBs were studied in Croatian river, ground and drinking waters, sea water, marine sediment, wet deposition, ambient air, and vegetation samples. In most of these samples, the concentrations were at levels (cca $0.0001 \text{ mg kg}^{-1}$) characteristic for the global environmental pollution. Extremely high PCB mass fraction ($> 2000 \text{ mg kg}^{-1}$) were determined in several soils collected in the Croatian coastal karst region in the vicinity of electrical transformer stations damaged during the 1991-1995 war.

The aim of the work presented in this article was to investigate the levels and patterns of PCBs in soil samples collected within the former underground airport and military airbase Željava destroyed by explosive during the 1991 – 1995 war. PCBs were quantified against a standard of 17 individual PCB congeners (IUPAC No.: 28, 52, 60, 74, 101, 105, 114, 118, 123, 138, 153, 156, 157, 167, 170, 180, and 189). The mass fractions of PCBs in 12 analysed samples of dry soils ranged from 0.06 mg kg^{-1} to 282.2 mg kg^{-1} pointing to the local sources of contamination within the former military airbase.

Since PCBs are categorized as possible carcinogens for humans, we decided to evaluate genotoxic potential of two soil samples with highest and a single with lowest PCB mass fraction (282.2 mg kg^{-1} , 68.9 mg kg^{-1} , 0.09 mg kg^{-1} , respectively). Both, organic and water extracts of soil samples were tested by exposing isolated human lymphocytes to them, and applying comet assay. The method detects lesions in genomic DNA molecule that are highly correlated with the risk of cancer development. Detected DNA damage was significantly higher in the soil from antiblast chamber, collected in 2007 ($17.1 \mu\text{m} \pm 7.43 \mu\text{m}$) compared to the sample in vicinity of substation ($14.2 \mu\text{m} \pm 8.21 \mu\text{m}$), that did not differ from the background level of damage in untreated cells. Inorganic extract of soil taken in antiblast chamber, collected in 2007 exhibited higher genotoxic potential compared to the organic one ($18.0 \mu\text{m} \pm 4.51 \mu\text{m}$), while no difference was observed for the sample in the vicinity of substation ($14.8 \mu\text{m} \pm 2.61 \mu\text{m}$). Results indicate possible presence inorganic compounds in the soil samples that may induce DNA damage (metal ions). However, according to comet assay, only up to $2.58 \% \pm 5.02 \%$ of the genome was affected by the adverse soil extract effect. Thus, detected DNA damage could pose a certain health risk only in a frequent multiannual exposure to soil through inhalation of dust particles.