

**Toksikološka analiza vsebine vojaških čutar, zakopanih 70 let v kraški jami
na Kočevskem, JV Slovenija**

Toxicological analysis of the content of military canteens buried for 70 years in
the karst cave in Kočevsko, South-Eastern Slovenia

Janez Mulec^{1,2*}, Sara Skok¹, Vesna Zalar Serjun³, Andrej Mihevc^{1,2}

¹ Inštitut za raziskovanje krasa ZRC SAZU, Titov trg 2, 6230 Postojna

² Krasoslovno študijsko središče Unesco, Univerza v Novi Gorici, Glavni trg 8, 5271 Vipava

³ Zavod za gradbeništvo Slovenije, Dimičeva ulica 12, 1000 Ljubljana

* korespondenca: janez.mulec@zrc-sazu.si

Izvleček: Za odkrivanje ostankov materialnih sledi se na dobro ohranjenih predmetih lahko opravijo forenzične preiskave. V Brezno v Debliških livadah je bilo odkritih večje število predmetov, ki so bili odvrženi v jamo v maju in juniju 1945. Med odkritim materialom so bile tudi vojaške čutare. Nekatere izmed čutar so še vsebovale tekočino, nekatere pa tudi poltrdo, gelasto oborino. Tekočina in oborina iz čutar sta vsebovali kovine, ki so se najverjetneje s časom izlužile iz kovinske posode. Korozija čutar nakazuje prisotnost minerala hematita. Vsebina čutar je nadalje vsebovala nekaj raztopljenih organske snovi (celotni organski ogljik – TOC v tekočini 9,22 mg/l, v tekočini ekstrahirane oborine 34,1 mg/l), nekaj mikrobne biomase ter relativno visoke koncentracije nitrata (240 mg/l v tekočini, 55 mg/l v ekstrahirani oborini) in sulfata (18 mg/l v tekočini, 836 mg/l v ekstrahirani oborini). Bakterijskih indikatorjev, *Escherichia coli* in enterokokov, ki bi kazali na fekalno kontaminacijo vsebine, v vzorcih nismo zaznali. Raztopina in oborina sta izkazovali podobno stopnjo toksičnosti, okrog 20% inhibicijo bioluminescence bakterije *Vibrio fischeri*. Glede na Pravilnik o pitni vodi tekočina s sedanjimi kemijskimi lastnostmi ni primerna za uživanje. Rezultati ne kažejo nujno na toksičnost izvornih tekočin iz časa, ko so bile čutare odvržene v jamo, ampak bi se toksičnost lahko razvila postopoma zaradi izluževanja kovin iz posode, zlasti aluminija, in (bio)kemijskih reakcij. Navkljub stabilnim jamskim razmeram, ki so jim bile izpostavljene čutare, ugotovljeni parametri ne podpirajo dolgoročne ohranitve stabilne DNA za morebitne nadaljnje forenzične analize.

Ključne besede: jame, vojaški material, toksičnost

Abstract: Forensic examinations can be performed on well-preserved objects to detect material traces. A large number of objects were discovered in the cave Brezno v Debliških livadah, which were dumped in the cave in May and June 1945. Among the discovered material there were also military canteens (drinking bottles). Some canteens still contained liquids, and some even a semi-hard, gel precipitate. The liquid and precipitate from the analyzed canteens contained metals that were most likely leached from the metal containers. The corrosion of the canteens is indicated by the presence of a hematite mineral. The content of canteens contained some dissolved organic matter (Total Organic Carbon, TOC, in the liquid = 9.22 mg/l, in the liquid

from extracted precipitate = 34.1 mg/l), some microbial biomass and relatively high nitrate concentrations (240 mg/l in liquid, 55 mg/l in extracted precipitates) and sulfate (18 mg/l in liquid, 836 mg/l in extracted precipitate). Bacterial indicators, *Escherichia coli* and enterococci, indicating faecal contamination of the canteens' contents, were not detected. The liquid and precipitate exhibited a similar degree of toxicity, about 20% inhibition of the bioluminescence of *Vibrio fischeri*. According to the Slovenian Rules on drinking water, the liquid with the present chemical properties is not suitable for human consumption. The results do not necessarily indicate that liquids were already toxic when the canteens were thrown into the cave, but the toxicity could have developed progressively due to (bio)chemical reactions and leaching of metals, in particular aluminum, from the canteens. In spite of the stable cave conditions to which canteens have been exposed, the observed parameters do not support long-term preservation of stable DNA for potential future forensic analyses.

Keywords: caves, military material, toxicity

Uvod

Pri raziskovanju jam v bližini množičnega morišča Jama pod Krenom (kat. št. 6158 Katastra jam IZRK ZRC SAZU in Jamarske zveze Slovenije) v Kočevskem Rogu smo raziskali tudi Brezno v Debliških livadah, ki je bilo delno zasuto s komunalnimi odpadki. Odstranjevanje odpadkov nad verjetnim povojnim moriščem je opravila Komisija Vlade Republike Slovenije za reševanje vprašanj prikritih grobišč v oktobru 2018. Po odstranitvi odpadkov se je pojavila plast s predmeti, za katere predpostavljamo, da so bili odvzeti žrtvam pobojev, ki so bile vržene v Jamo pod Krenom v maju ali juniju 1945 (Mihevc 1999, Žajdela 1990). Med različnimi predmeti, žlicami, brivskimi pribori, glavniki, cigaretnicami, kovinskimi ostanki nahrbtnikov in menaškami je bilo odkritih tudi preko 50 kovinskih čutar, med katerimi je bilo precej še originalno zaprtih. V nekaterih čutarah je bila še ohranjena tekoča vsebina, večina pa je bila poškodovanih oziroma preluknjanih. Nekatere čutare so vsebovale tudi oborino v poltrdem stanju. Dve čutari, eno s tekočino in drugo z gelasto, poltrdo oborino je v analizo prevzel Inštitut za raziskovanje krasa ZRC SAZU.

Namen analize je bil ovrednotenje kemijske in mineraloške sestave vsebine čutar za oceno primernosti uporabe materiala za morebitne nadaljnje forenzične raziskave. Na skeletih, izkopanih iz množičnih grobov, je bilo narejenih že precej uspešnih forenzičnih DNA analiz za identifikacijo žrtev na območju nekdanje Jugoslavije (Primorac

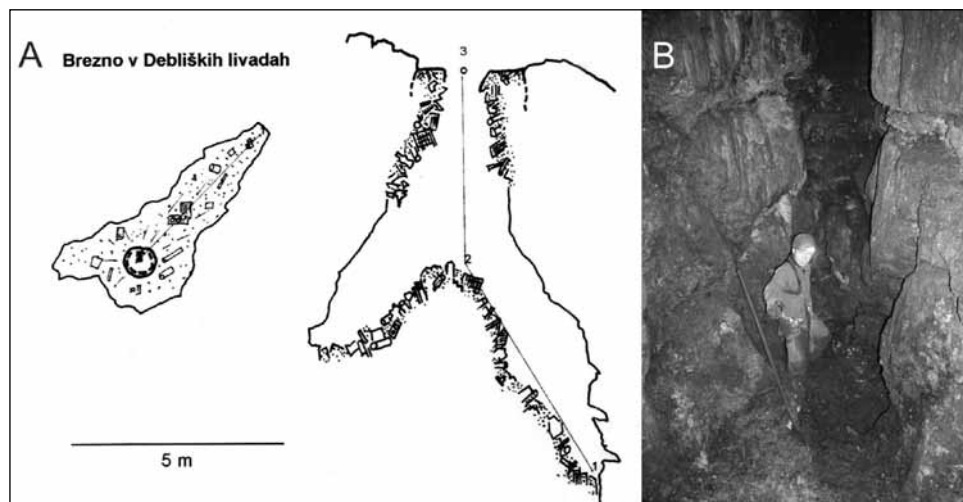
1999, Zupanič Pajnič 2008, Zupanič Pajnič in sod. 2010). Zaradi slabše ohranjenosti jedrne DNA se za identifikacijo žrtev uporablja tudi mitohondrijska DNA (mtDNA), ki je dostopna v večjem številu kopij in zaradi krožne oblike težje razgradljiva. Identifikacija žrtev prek jedrne DNA poteka s preiskovanjem spolnih - Y-STR-jev in avtosomskih STR-jev, pri mtDNA pa hipervariabilnih regij HVI in HVII (Zupanič Pajnič 2008).

Pričujoča raziskava je vključevala tudi oceno primernosti ohranjene tekočine za uživanje na podlagi zdajšnjih kriterijev in oceno toksičnosti vsebine čutar na indikatorskih sistemih, temelječih na inhibiciji bioluminescence bakterije *Vibrio fischeri* ter inhibiciji rasti bakterije *Escherichia coli*. V primerjavi z evkariontskimi celicami in večceličnimi organizmi je prednost ekotoksikoloških testov, temelječih na bakterijskih celicah, njihova občutljivost in enostavnost uporabe na različnih vzorcih (Abbas in sod. 2018). Pri interpretaciji toksičnosti vsebine vojaških čutar je treba upoštevati tudi možnost njenega razvoja zaradi postopnega izluževanja kovin, (bio)kemijskih reakcij ter vpliva konstantnih jamskih pogojev.

Material in metode

Mesto raziskave

Brezno v Debliških livadah (kat. št. 11947 iz Katastra jam IZRK ZRC SAZU in Jamarske zveze Slovenije) ima na nadmorski višini 536 m



Slika 1: Brezno v Debliških livadah: **A** – načrt jame; **B** – na dnu brezna se je po odstranitvi odpadkov razkrila plast z odvrženimi predmeti.

Figure 1: Shaft in Debliške livade: **A** – map of the cave; **B** – at the bottom of the shaft a layer of dumped objects was uncovered after waste was removed.

vertikalen vhod in je globoko okrog 10 m. Vhod ima dimenzije 2x3 m in se proti dnu nekoliko razširi (Slika 1A). Meritve temperature v jami niso bile izvedene, vendar lahko ocenimo, da zaradi majhnega vhoda temperatura na dnu, kjer smo našli čutare, ni nikoli padla pod ledišče, gotovo pa se jamsko dno pozimi ohladi. Temperatura v jamah na tej nadmorski višini je okrog 8°C (Belec in sod. 1998).

Brezno je bilo dlje časa neopazno, saj so odvržene predmete kasneje prekrili z odpadki in tako vhod v brezno izravnali s površjem. Jeseni 2018 so iz jame izvlekli okrog 27 m³ odpadkov, ki so bili odvrženi po letu 1966, o čemer priča nekaj datumov, odtisnjenih na odpadkih. Pod plastjo odpadkov se prične debela plast predmetov, ki so najverjetneje pripadali žrtvam in so bili v jamo odvrženi takoj po pobojih. Ta plast je ostala nedotaknjena za bodoče arheološko-forenzično izkopavanje. Pri odstranjevanju odpadkov iz jame se je nekaj predmetov izluščilo iz spodnje plasti, predvsem so bile to čutare in menažke, ki so jih odnesli iz jame na ustrezno hranjenje (Slika 1B). V tej plasti sta se nahajali tudi čutari, katerih vsebino smo analizirali.

Priprava vzorcev in kemijska analiza

Čutari, ki smo ju analizirali, sta bili iz Brezna v Debliških livadah izneseni 21. oktobra 2018. Zunanost obeh čutar je bila z vodnim curkom očiščena večine nečistoč, za tem pa sta bili do začetka analiz hranjeni pri 4°C. Pred odprtjem sta bili obe čutari površinsko očiščeni s 96% etanolom in površinsko sterilizirani z obžiganjem. Čutara 1 je bila originalno zaprta in je vsebovala tekočino ter nekaj spremljajoče oborine, čutara 2 pa ni vsebovala tekočine, ampak oborino v poltrdem stanju. Oborina, ki je bila v obliki poltrdega, deloma prosojnega gela, je zapolnjevala večji del prostornine čutare.

Po površinski sterilizaciji smo v čutari 1 aseptično napravili odprtino ter vsebino (525 ml) zbrali v sterilni steklenici (Slika 2A). Po površinski sterilizaciji in aseptičnem odprtju čutare 2 (Slika 2B) smo del oborine (20,50 g) prenesli v sterilno 0,5 litrsko čašo ter ji dodali 10-kratno količino (200 ml) sterilne, demineralizirane vode. To zmes smo nato na sobni temperaturi preko noči mešali na magnetnem mešalu (400 RPM). Sledila je sedimentacija pri sobni temperaturi do zbistritve. S tekočino iz čutare 1 in bistrim ekstraktom oborine iz čutare 2 smo nadaljevali z

mikrobiološkimi analizami brez dodatne obdelave vzorcev. Za kemijsko analizo smo vsebino iz čutare 1 po 24-urni sedimentaciji pri 4°C centrifugirali 3 minute pri 14000 RPM, filtrirali preko 0,45 µm filtra (Macherey-Nagel, CHROMAFIL® Xtra H-PTFE-45/25) ter analizirali vodno fazo (Slika 2C). Tudi ekstrakt oborine iz čutare 2 je bil po sedimentaciji na sobni temperaturi enako centrifugiran in filtriran.

Vodnima raztopinama smo izmerili pH in električno prevodnost (Multi 3620 IDS, WTW) ter spektrofotometrično (YSI 9300, YSI) po navodilih proizvajalca izmerili koncentracije: aluminija, amonija, bakra, cinka, fenolov, fluorida, fosfata, kalija, klorida, kroma, mangana, niklja, nitrata, nitrita, silicija, sulfata in železa. Vzorcema smo izmerili tudi koncentracijo celotnega organskega ogljika – TOC (ISO 8245, 1999) (Tabela 1).

Mikrobiološka analiza

Koncentracijo celotnega adenozin trifosfata (ATP) v vodni raztopini, ki običajno služi za oceno celotne mikrobne biomase, smo ovrednotili s sistemom AquaSnap Total (Hygiena, ZDA) in jo izrazili v enotah RLU (1 RLU ustreza 1 fmol ATP).

Za oceno koncentracije heterotrofnih aerobnih bakterij (Compact Dry TC), koliformnih bakterij in bakterij vrste *Escherichia coli* (Compact Dry EC) ter enterokokov (Compact Dry ETC) smo uporabili mikrobiološki komplet Compact Dry (Nissui Pharmaceutical, Japonska). Mikrobiološke plošče (TC, EC, ETC) smo inokulirali z enim mililitrom izhodiščne tekočine oziroma bistrega ekstrakta oborine in jih inkubirali 48 ur pri 37°C oziroma 7 dni, ko so bile plošče TC inkubirane pri 20°C. Zrasle kolonije smo izrazili v enotah CFU na mililiter (kolonijsko število).

Test toksičnosti

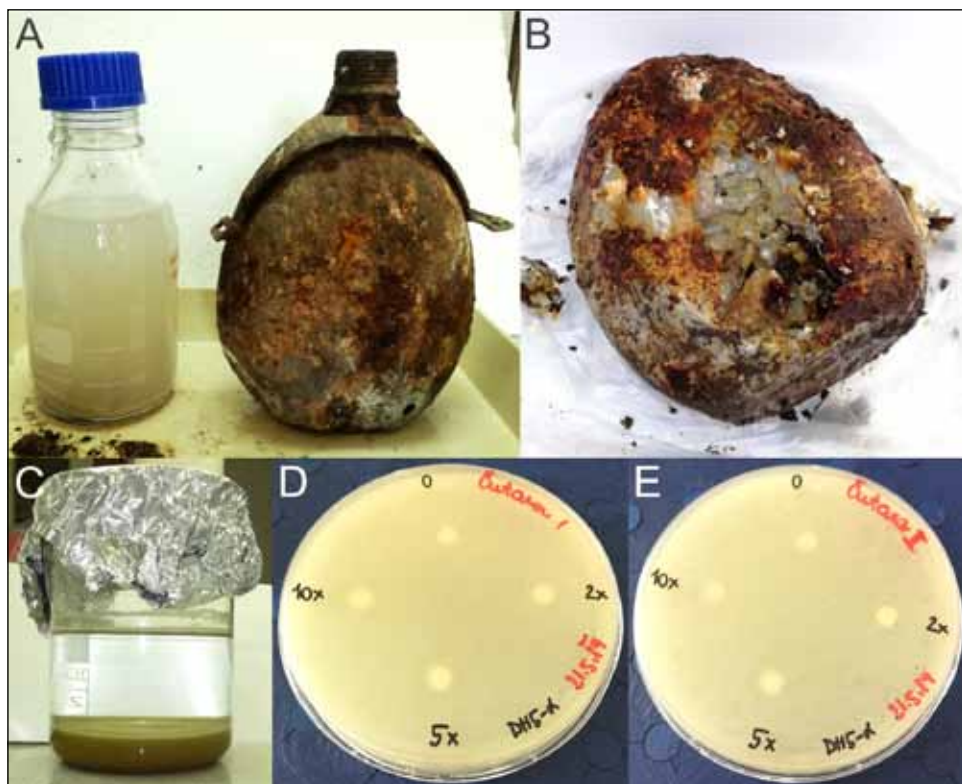
Test toksičnosti smo izvedli s komercialnim kitom S3 Environmental Toxicity test™ in pripadajočim luminometrom (Wilton Biotechnologies, Velika Britanija), ki temelji na inhibiciji emisije svetlobe bioluminiscentne bakterije *Vibrio fischeri* ob kontaktu s toksično snovjo. Za analizo toksičnosti tekočine iz čutare 1 smo uporabili kom-

plet S3.1 Water Toxicity. Test za oborino iz čutare 2 pa komplet S3.1 Environmental Toxicity Test. Procent inhibicije smo izračunali s pripadajočo programsko opremo (Wilton Biotechnologies, Velika Britanija).

Inhibicijo bakterijske rasti za določanje ravni toksičnosti raztopine smo spremljali tudi na kulturi *Escherichia coli*, sev DH5α [*endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 Δlac(lacZYA-argF)* (*φ80 lacZ ΔM15*)]. Morebitne žive mikroorganizme v raztopini, ki bi motili test, smo odstranili s filtracijo preko filtra s porami 0,22 µm (Durapore®, Merck Millipore) ter pripravili gradient redčitev raztopine s sterilno, demineralizirano vodo (koncentriran vzorec, 2-krat, 5-krat, 10-krat). V vsako izmed redčitev smo namočili sterilen disk (premer 6 mm), ki je bil izdelan iz filter papirja (Filtrak 388, Spezialpapierfabrik Niederschlag, Nemčija). Tako pripravljene diske smo položili na petrijevke z 1,5 % agarjem LB (Luria broth base, Sigma, Agar technical, Biomerieux), ki so bile predhodno inokulirane s svežo prekonočno kulturo *E. coli*, resuspendirano v 1 ml sterilne fiziološke raztopine. Cone inhibicije rasti indikatorskega organizma smo preverili po 24 in 48 urah inkubacije pri 37°C (Slika 2D). Poskus smo opravili v dveh ponovitvah.

Mineraloška analiza

Vzorca (čutara 1 – oborina, sedimentirana v tekočini, čutara 2 – poltrda gelasta oborina) sta bila za mineraloško analizo pripravljena tako, da sta bila posušena do konstantne mase pri 40°C, nato pa zdrobljena v ahatni terilnici na velikost zrn pod 63 µm. Med sušenjem se je oborina skrčila. Mineraloška sestava vzorcev je bila izvedena s praškovno rentgensko difrakcijo na rentgenskem praškovnem difraktometru EMPERYAN, PANalytical (Nizozemska). Analizi sta bili izvedeni pri napetosti 45 kV in toku 40 mA, z Cu Kα anodo, v kotnem območju 5–70° 2θ, s korakom 0,01° 2θ in integracijskim časom 150 s. Interpretacija rezultatov je bila izvedena s pomočjo programske opreme HighScore v.4.x LTU in podatkovne baze PDF-4. Semikvantitativna analiza je bila izvedena v privzetem načinu in tako rezultat temelji na relativni generalni oceni vsebnosti posamezne kristalinične komponente.



Slika 2: Analiza vsebine vojaških čutar: **A** – čutara 1 po prenosu tekočine v sterilno steklenico; **B** – odprta čutara 2 z oborino; **C** – ločitev tekoče faze in sedimentnega ostanka vsebine čutare 2 po sedimentaciji; **D** in **E** – odsotnost cone inhibicije okrog diskov na petrijevki kaže na odsotnost vpliva testiranih redčitev vzorca čutare 1 in čutare 2 (koncentriran vzorec ter redčen 2-krat, 5-krat, 10-krat) na rast *E. coli*.

Figure 2: Analysis of the contents of military canteens: **A** – canteen 1 after transferring of the liquid into a sterile bottle; **B** – open canteen 2 with a precipitate; **C** – separation of the liquid phase and the sedimentary residue of the content of canteen 2 after sedimentation; **D** and **E** – absence of the inhibition zone around disks on a Petri dish indicates the absence of impact of tested dilutions from canteen 1 and canteen 2 (concentrated sample and diluted 2-times, 5-times, 10-times) on the growth of *E. coli*.

Rezultati in diskusija

Kemijska analiza tekočine iz čutare 1 in tekočine iz čutare 2 po vodni ekstrakciji je glede na mejne vrednosti za pitno vodo pokazala, da tekočini ne bi bili primerni za uživanje. Tekočina iz čutare 1 je imela prenizek pH ter previsoke vrednosti aluminija, kroma, mangana, niklja, nitrata in nitrita, tekočina iz čutare 2 po vodni ekstrakciji pa je imela previsoke vrednosti aluminija, fluorida, kroma, nitrata in sulfata. V tekočini iz čutare 1 smo zaznali prisotnost vseh testiranih kemikalij, prisotnost kovin pa je bila najverjetneje posledica postopnega, večdesetletnega izluževanja le-teh iz kovinske

čutare. V manjši meri je bila prisotna oborina tudi v tekočini te čutare (Slika 2A). Raztopljene kovine so bile zaznane tudi v ekstraktu oborine iz čutare 2. Rezultat visoke vsebnosti aluminija v čutari 1, na katero kaže kemijska analiza, je nadalje potrdila tudi mineraloška analiza, ki je pokazala, da sta aluminijevi fazi – sulfat hidrat (felsoebanyait) ter hidroksid (gibsit) najobilnejši fazi tega vzorca (Tabela 2, Slika 3).

V obeh čutarah je bila koncentracija nitrata precej visoka, v ekstraktu čutare 2 zlasti izstopa visoka koncentracija sulfata, zanimivost tega vzorca je tudi prisotnost fluorida (Tabela 1). V tekočini obeh čutar je bila nizka koncentracija mikrobne biomase,

Tabela 1: Rezultati kemijskih, mikrobioloških in toksikoloških analiz vsebine čutare 1, ki je vsebovala tekočino, ter čutare 2 z oborino po ekstrakciji (1:11 w/v) in v izhodiščni tekočini ob upoštevanju stopnje redčenja (1:1 w/v).

Table 1: Results of chemical, microbiological and toxicological analyzes of the contents of canteen 1 which contained liquid, and of canteen 2, which contained precipitate after extraction (1:11 w/v), and in the initial liquid after consideration the dilution rate (1:1 w/v).

Parameter	Enota	Čutara 1	Čutara 2 (1:11 w/v)	Čutara 2 (1:1 w/v)	Pitna voda- mejna vrednost*
Električna prevodnost	μS/cm	497	220		2500
pH		4,33	6,69		6,5-9,5
Aluminij	mg/l	46,0	0,1	1,1	0,2
Amonij	mg/l	0,40	0,03	0,33	0,50
Baker	mg/l	0,3	0,1	1,1	2,0
Cink	mg/l	0,2	<<	<<	
Fenoli	mg/l	0,5	0,0	0,0	
Fluorid	mg/l	0,00	0,47	5,17	1,5
Fosfat	mg/l	0,20	0,02	0,22	
Kalij	mg/l	24,00	1,10	12,1	
Klorid	mg/l	39,0	2,0	22,0	250
Krom (VI)	mg/l	0,05	0,01	0,11	0,05
Mangan	mg/l	0,230	0,001	0,011	0,05
Nikelj	mg/l	0,50	0,00	0,00	0,02
Nitrat	mg/l	240,00	5,00	55,00	50
Nitrit	mg/l	0,66	0,00	0,00	0,50
Silicij	mg/l	0,90	0,08	0,88	
Sulfat	mg/l	18,0	76,0	836,0	250
Železo	mg/l	0,10	0,00	0,00	0,2
Celotni organski ogljik	mg/l	9,22	3,1	34,1	brez neobičajnih sprememb
ATP, celotni	RLU	0	3		
ATP, celotni	CFU/ml	<10 ⁴	10 ⁴		
Bakterije (37°C)	CFU/ml	2 (1 ml)	1 (1 ml)		20 (1 ml)
Bakterije (20°C)	CFU/ml	0 (1 ml)	0 (1 ml)		100 (1 ml)
<i>E. coli</i>	CFU/ml	0 (1 ml)	0 (1 ml)		0 (100 ml)
Koliformi	CFU/ml	0 (1 ml)	0 (1 ml)		0 (100 ml)
Enterokoki	CFU/ml	0 (1 ml)	0 (1 ml)		0 (100 ml)
Inhibicija <i>V. fischeri</i>	%	20,05	18,80 (19,90)**		
Inhibicija rasti <i>E. coli</i>		negativno	negativno		

* – Pravilnik o pitni vodi (Uradni list RS, št. 19/04, 35/04, 26/06, 92/06, 25/09, 74/15 in 51/17)

** – rezultat za oborino

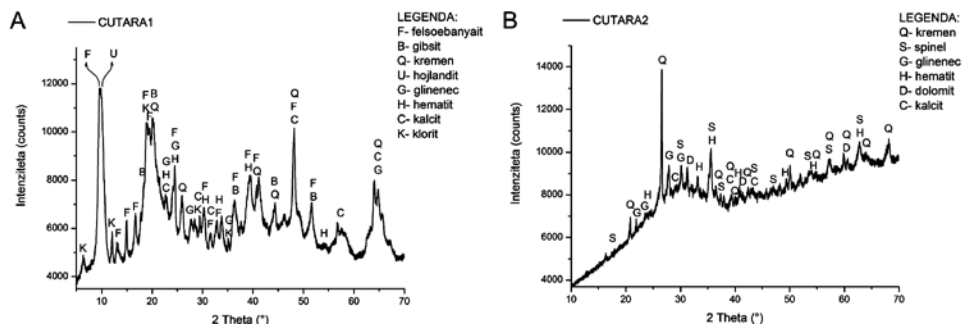
kreprok – presežene vrednosti glede na mejne vrednosti iz Pravilnika o pitni vodi

indikatorjev fekalne kontaminacije pa nismo zaznali. Pogosto uporabljen ekotoksikološki test, temelječ na inhibiciji bioluminiscence *V. fischeri* ob kontaktu s toksično snovjo (Abbas in sod. 2018), je bil pozitiven za tekočino iz čutare 1, vodni ekstrakt oborine iz čutare 2 in oborino iz čutare 2. Odstotek inhibicije je bil v vseh primerih primerljiv, ~20% (Tabela 1). Test inhibicije rasti *E. coli* je bil negativen (Slika 2D), kar kaže, da vzorca nista bila toksična za ta testni organizem.

Stabilne jamske razmere z nizko temperaturo in s tem povezana upočasnjena korozivnost ter morebitna robustnejša izdelava so najverjetneje omogočile, da se je do odkritja leta 2018 ohranila tekoča vsebina čutare 1, medtem ko je čutara 2 najverjetneje utrpela mehansko poškodbo, ki je omogočila določeno stopnjo izmenjave plinov in tekočine z okolico. S korozijo je najverjetneje povezana tudi prisotnost minerala hematita v obeh vzorcih. Stalno visoka vlaga v jami pa je omogočila ohranitev oborine v stanju »gel«. Rezultati fazne

sestave potrjujejo prisotnost gelaste faze vzorca, ki nastopa v nekristalinični (amorfn) obliki (Slika 3, Tabela 2).

Makroskopsko je oborina po sestavi predstavljala mešanico anorganske mineralne komponente in mehkejših organske osnove. Glavne faze, prisotne v vzorcu čutare 1, so bile aluminijev sulfat hidrat (felsoebanjait), aluminijev hidroksid (gibsit) in silicijev oksid (kremen). Prisotni so bili tudi alumosilikati (hojlandit in glinenec), železov oksid (hematit), karbonat (kalcit) in glineni minerali (minerali iz kloritne skupine) (Slika 3A). Oblika difraktograma vzorca čutare 2 (dvignjeno ozadje v obliki rame v območju od 25 do 40 °2θ) kaže na prisotnost nekristalinične amorfn faze. Silicijevi in železovi oksidi (kremen in faze iz špinelove skupine) ter alumosilikati (glinenci) so bile kristalinične faze, zastopane v vzorcu v največji meri. V vzorcu so bili prisotni tudi karbonati (apnenec in dolomit) (Slika 3B, Tabela 2).



Slika 3: Difraktograma vzorcev čutar: **A** – čutara 1, oborina sedimentirana v tekočini; **B** – čutara 2, poltrda gelasta oborina.

Figure 3: Diffractograms of the samples from canteens: **A** – canteen 1, precipitate sedimented in the liquid; **B** – canteen 2, semi-solid gel precipitation.

Tabela 2: Fazna sestava vzorcev.

Table 2: Phase composition of the samples.

Čutara 1	Čutara 2
Felsoebanjait ($\text{Al}_4(\text{SO}_4)(\text{OH})_{10} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	Dolomit ($\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$)
Gibsit ($\text{Al}(\text{OH})_3$)	Glinenec ($(\text{K}, \text{Na})\text{AlSi}_3\text{O}_8 - \text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8$)
Glinenec ($(\text{K}, \text{Na})\text{AlSi}_3\text{O}_8 - \text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8$)	Hematit (Fe_2O_3)
Hematit (Fe_2O_3)	Kalcit (CaCO_3)
Hojlandit ($\text{Ca}[\text{Al}_2\text{Si}_7\text{O}_{18}] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	Kremen (SiO_2)
Kalcit (CaCO_3)	Špinel ($(\text{Fe}, \text{Cr}, \text{Mg})_3\text{O}_4$)
Klorit ($(\text{Mg}, \text{Fe})_6(\text{Si}, \text{Al})_4\text{O}_{10}(\text{OH})_8$)	
Kremen (SiO_2)	

Izhodiščna vodna tekočina v vojaških čutarah je vsebovala nekaj organskega materiala in mikroorganizmov, kar npr. nakazujejo parametra TOC in ATP. Čutare so bile prvenstveno namenjene shranjevanju in transportu vode za pitje, obstaja pa možnost, da so občasno v njih shranjevali tudi druge tekočine, npr. juho ali vino, kar bi lahko poleg TOC razložile tudi visoke vrednosti oksidiranih oblik dušika in žvepla. Predvidevamo, da je po odvzemu čutar v jamo v izhodiščni vodni raztopini potekala nitrifikacija, ko je še bila prisotna dovoljšna koncentracija kisika. V raztopini je bil še vedno prisoten amonij, razgradni produkt organskih dušikovih spojin (amonifikacija), ki se pri nevtralnem pH ohranja kot NH_4^+ . V anoksičnih pogojih je stabilna tudi oblika NH_3 , ki je sicer hlapna, vendar so se ob predpostavki, da je bila čutara zaprta, v čutari ohranjale zaloge dušika, ključne za mikrobní metabolizem. Nizek pH v čutari 1 je tudi prispeval k ohranitvi oblike NH_4^+ , ki pa je lahko posledica zakisanja zaradi mikrobnega metabolizma ali prisotnosti ostankov kisle vsebine, npr. soka, vina ali jogurta.

Zlasti v ekstraktu oborine iz čutare 2 je bila ugotovljena relativno visoka koncentracija sulfata. V temu vzorcu ni prisotne nobene (topne) sulfatne mineralne faze, ki bi predstavljala potencialen vir sulfata. Možen vzrok za visoke vrednosti je lahko mikrobná, encimska transformacija aminokislin iz organskega materiala in nastanek vodikovega sulfida – H_2S (Yoshida in sod. 2010), ki se spontano ali mikrobnó transformira v sulfat.

Rezultati ne kažejo nujno na toksičnost izhodiščnih tekočin v čutarah v času, ko so bile odvzete v jamo. Za ugotovitev tistih ključnih snovi, ki delujejo toksično, bi bilo treba nadaljevati s forenzičnimi raziskavami (Budowle in sod. 2005). Navsezadnje ni rečeno, da so za podoben učinek toksičnosti na indikatorski organizem (~ 20% inhibicija bioluminiscence *V. fischeri*) odgovorne iste kemijske snovi iz obeh čutar. Posledično so možni tudi drugačni mehanizmi toksičnosti, kot so npr. interakcije s celičnimi receptorji, prekinitev normalnega delovanja celične membrane, kemijske reakcije s celičnimi komponentami, inhibicija oziroma kompeticija za encimske sisteme, antagonistične oziroma sinergistične interakcije z znotrajceličnimi in zunajceličnimi komponentami, nastanek toksičnih snovi, vplivanje na spremenjene parametre okolja, kot je nizek ali visok pH

(Jennings in sod. 2001). Zanimiv je mehanizem nastanka gelaste oborine, pri kateri bi lahko imeli vlogo mikroorganizmi, npr. z nižanjem parcialnega tlaka kisika in ustvarjanjem reduktivnih razmer, pri katerih se oborijo minerali.

Ob nakazanih mikrobnih in mineraloških transformacijah ter kemijskih značilnostih tekočin obeh čutar je pomembno vprašanje, vezano na ohranitev morebitne humane DNA v vzorcih. Po smrti organizma oziroma celic na DNA molekuli kljub njeni stabilnosti prihaja do poškodb, ki destabilizirajo njeno strukturo in so zaradi nedelujočih popravilnih mehanizmov nepopravljive (Willerslev in Cooper 2005). K razgradnji DNA pomembno prispevajo nukleaze iz lizosomov celic in mikroorganizmi (Bajželj in Zupanič Pajnič 2017), katerim DNA lahko predstavlja ključen vir hranil – ogljika, dušika in fosforja (Finkel in Kolter 2001, Mulcahy in sod. 2010, Pinchuk in sod. 2008).

Tekočina in vodni ekstrakt oborine sta vsebovala povišane koncentracije nekaterih kovinskih ionov. Določeni divalentni, kovinski ioni, npr. Mg^{2+} stabilizirajo vijačnico DNA. Molekula DNA vsebuje dve negativno nabiti mesti za vezavo kovinskih kationov, in sicer fosfatno skupino in dušikovo bazo. Medtem ko vezava kovinskega kationa na fosfatno skupino povzroči stabilizacijo molekule DNA, pa vezava na dušikovo bazo destabilizira molekulo. Posledica vezave na DNA je torej odvisna od koncentracije kationa in njegove afinitete do posameznega vezavnega mesta. V primeru Mn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} in Zn^{2+} nizke koncentracije vodijo v stabilizacijo vijačnice, ob presežku pa vodijo v destabilizacijo. Afiniteta vezave Ni^{2+} do fosfatne skupine je nižja od afinitete Mg^{2+} in višja od Mn^{2+} , Zn^{2+} in Cu^{2+} (Shamsi in Kraatz 2013). Tudi Al^{3+} imajo sposobnost vezave na obe vezavni mesti za kovinske katione na DNA. Že nizke $[\text{Al}^{3+}]$ ob vezavi povzročijo razprtje vijačnice, spremembo konformacije in T_m DNA ter posledično spremenijo stabilnost molekule (Bharathi in sod. 2008). Prisotnost organske snovi in kisel pH povišata toksičnost Al^{3+} (Jaishankar in sod. 2014). Tudi pH tekočine v čutari 1 ne prispeva k stabilnosti DNA, v kislem pH namreč pogostejše poteka depurinacija in s tem destabilizacija vijačnice (An in sod. 2014). Ob previsoki koncentraciji tudi F^- povzroča poškodbe na DNA (He in Chen 2006). Rezultati nakazujejo,

da kemija okolja v tekočini čutar ne zagotavlja dobrih pogojev za dolgoročno ohranitev stabilne DNA za nadaljnje forenzične raziskave.

Zaključek

Proučevani vsebini čutar sta vsebovali nekaj organske snovi ter sledi mikrobnega metabolizma. Ohranjena tekočina in oborina sta imeli toksičen učinek na indikatorski organizem *V. fischeri*, ne pa na *E. coli*. Tekočina iz čutare, ki je bila odvržena v Brezno v Debliških livadah, po 70 letih ni primerna za uživanje. Dolgoročne interakcije tekočine s kovinsko posodo pri jamskih pogojih so pomembne za nastanek toksičnosti. Kisel pH in prisotnost povišanih koncentracij kovinskih ionov v tekočini izrazito povečujeta možnost destabilizacije morebitne humane DNA v čutarah.

Summary

During the exploration of caves near to the mass killing ground Jama pod Krenom in Kočevski Rog, we also explored the cave Brezno v Debliških livadah, which was partially covered with municipal wastes. A large number of military objects were discovered in this cave, which were dumped into the cave in May and June 1945. More than 50 military canteens were discovered among spoons, shaving accessories, combs, cigarettes, rucksacks and backpacks, and many of these canteens were still closed. Some canteens still contained liquids, and some even a semi-hard, gel precipitate. We carried out chemical, microbiological, toxicological and mineralogical analyzes on the content of two canteens. The first canteen was originally closed and contained liquid and some accompanying precipitate, while the second canteen contained no liquid, but a semi-solid precipitate. Both canteens contained some dissolved organic matter (TOC of the liquid was 9.22 mg/l, and in the extracted precipitate 34.1 mg/l). The concentration of nitrate was relatively high in both canteens (240 mg/l in liquid, 55 mg/l from the extracted precipitate). The extract of the precipitate was particularly high in sulfate, 836 mg/l, and interestingly, this sample contained 5 mg/l of fluorides. Both canteens expressed low level of

microbial biomass; faecal contamination indicators, such as *Escherichia coli* and enterococci were not detected. The liquid and precipitate from the analyzed canteens contained metals (e.g. aluminum, copper, manganese) that were most likely leached from the metal containers. Corrosion of the canteens was indicated by the presence of the hematite mineral (Fe_2O_3). The macroscopic precipitate was a mixture of an inorganic mineral component and a softer organic base. The main mineral phases in the precipitate sedimented from the liquid were aluminum sulfate hydrate (felsesbanyait), aluminum hydroxide (gibbsite) and silicon oxide (silica). Silicon and iron oxides (quartz, and spinel group phases), and aluminosilicates (clay) were predominantly present in the semi-solid gel precipitate. The contents of both canteens were toxic to the test system, based on the inhibition of bioluminescence of *Vibrio fischeri*. The liquid exhibited 20.05% of inhibition, and precipitate 18.80%. The intriguing question remained, which are the key toxic compounds for the test organism. The *E. coli* growth inhibitory test was negative for both samples. The results do not necessarily indicate that liquids were already toxic when the canteens were thrown into the cave, but the toxicity could have developed progressively due to leaching of metals from canteens, in particular aluminum, and (bio) chemical reactions. According to the Slovenian Rules on drinking water, the liquid with the present chemical properties is not suitable for human consumption due to low pH, and high concentrations of aluminum, chromium, manganese, nickel, nitrate and nitrite. Given the indicated microbial and mineralogical transformations, and chemical characteristics of the liquids from both canteens, the important issue related to if the preservation of possible human DNA in the samples still remains. In spite of the stable cave conditions to which the canteens were exposed, the observed parameters do not support long-term preservation of stable DNA for potential future forensic analyzes. The liquid and aqueous extract of the precipitate contained elevated concentrations of some metal ions that are known to destabilize DNA. Furthermore, the evident low pH of the liquid would have likely enhanced the depurination of DNA which can further result in destabilization of the DNA double helix.

Zahvala

Raziskovalni program št. P6-0119 je sofinancirala Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije iz državnega proračuna. Za

pomoč pri izvedbi poskusa se avtorji zahvaljujejo Boštjanu Geohelliju in Jerneji Ambrožič Avguštin ter za jezikovni pregled Saši Bergoč ter Vanessi Johnston.

Reference

- Abbas, M., Adil, M., Ehtisham-ul-Haque, S., Munir, B., Yameen, M., Ghaffar, A., Shar, G.A., Tahir, M.A., Iqbal, M., 2018. *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review. *Science of the Total Environment*, 626, 1295-1309.
- An, R., Jia, Y., Wan, B., Zhang, Y., Dong, P., Li, J., Liang, X.G., 2014. Non-enzymatic depurination of nucleic acids: factors and mechanisms. *PLOS One*, 9.
- Bajželj, M., Zupanič Pajnič, I., 2017. Genetska identifikacija pogrešanih oseb. *Slovenian Medical Journal*, 86, 318-329.
- Belec, B., Fridl, J., Gabrovec, M., Hrvatina, M., Kert, B., Kladnik, D., Lovrenčak, F., Mihelič, L., Mihevc, A., Mihevc, B., Mrak, J., Natek, M., Natek, M., Olas, L., Orožen Adamič, M., Pak, M., Pavlin, B., Pavšek, M., Pelc, S., Perko, D., Plut, D., Počkaj Horvat, D., Požేశ, M., Rejec Brancelj, I., Repolusk, P., Šebenik, I., Topole, M., Urbanc, M., Vovk Korže, A., Zupančič, J., Žiberna, I., 1998. Slovenija: pokrajine in ljudje. Mladinska knjiga, Ljubljana, 735 pp.
- Bharathi, Vasudevaraju, P., Govindaraju, M., Palanisamy, A., Sambamurti, K., Rao, K., 2008. Molecular toxicity of aluminium in relation to neurodegeneration. *Indian Journal of Medical Research*, 128, 545-556.
- Budowle, B., Wilson, M.R., Burans, J.P., Breeze, R.G., Chakraborty, R., 2005. Microbial forensics. In: Budowle, B., Schutler, S., Breeze, R. (eds.): *Microbial forensics*, 1st ed. Elsevier Academic Press, London, pp. 1-25.
- Finkel, S., Kolter, R., 2001. DNA as a nutrient novel role for bacterial competence gene homologs. *Journal of Bacteriology*, 183, 6288-6293.
- He, L., Chen, J., 2006. DNA damage, apoptosis and cell cycle changes induced by fluoride in rat oral mucosal cells and hepatocytes. *World Journal of Gastroenterology*, 12, 1144-1148.
- ISO 8245, 1999. Water quality – Guidelines for the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC). International Organization for Standardization, Geneva, pp. 1-11.
- Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B., Beeregowda, K., 2014. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary Toxicology*, 7, 60-72.
- Jennings, V., Rayner-Brandes, M., Bird, D., 2001. Assessing chemical toxicity with the bioluminescent photobacterium (*Vibrio fischeri*): A comparison of three commercial systems. *Water Research*, 35, 3448-3456.
- Mihevc, A., 1999. Brezno v Debliških livadah. *Naše jame*, 41, 89-93.
- Mulcahy, H., Charron-Mazenod, L., Lewenza, S., 2010. *Pseudomonas aeruginosa* produces an extracellular deoxyribonuclease that is required for utilization of DNA as a nutrient source. *Environmental Microbiology*, 12, 1621-1629.
- Pinchuk, G., Ammons, C., Culley, D., Li, S., McLean, J., Romine, M., Nealson, K.H., Fredrickson, J.K., Beliaev, A.S., 2008. Utilization of DNA as a sole source of phosphorus, carbon, and energy by *Shewanella* spp.: Ecological and physiological implications for dissimilatory metal reduction. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 1198-1208.
- Primorac, D., 1999. Identification of human remains from mass graves found in Croatia and Bosnia and Herzegovina. 10th International Symposium on Human Identification. Promega Corporation, Madison, WI, Lake Buena Vista, Florida, USA.

- Shamsi, M., Kraatz, H., 2013. Interactions of metal ions with DNA and some applications. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 23, 4-23.
- Willerslev, E., Cooper, A., 2005. Ancient DNA. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 272, 3-16.
- Yoshida, Y., Ito, S., Kamo, M., Kezuka, Y., Tamura, H., Kunimatsu, K., Kato, H., 2010. Production of hydrogen sulfide by two enzymes associated with biosynthesis of homocysteine and lanthionine in *Fusobacterium nucleatum* subsp *nucleatum* ATCC 25586. *Microbiology*, 156, 2260-2269.
- Zupanič Pajnič, I., 2008. Molekularno genetska identifikacija domobranskih žrtev (Molecular genetic identification of Slovenian home guard victims). *Zdravniški vestnik*, 77, 745-750.
- Zupanič Pajnič, I., Gornjak Pogorelc, B., Balažic, J., 2010. Molecular genetic identification of skeletal remains from the Second World War Konfin I mass grave in Slovenia. *International Journal of Legal Medicine*, 124, 307-317.
- Žajdela, I., 1990. Kočevski Rog. Založba za alternativno teorijo, Maribor, 136.