

*LABORATORIJA RASTLINSKO
APLIKATIVNOCITOGENETIKO*



*ALLIUM METODA ZA TESTIRANJE OKOLJSKIH VZORCEV, PITNE VODE IN
KEMIČALI*

Naročnik:

**Bojan Vrhovec, Blatna Brezovica 22
SI – 1360 Vrhnika**

Kakovost kapnice v Blatni Brezovici 22 in poljske zemljine-prsti Zalaze

Raziskani vzorci:

1. Kapnica
2. Poljska zemljina-prst

Negativna kontrola in Pozitivna kontrola

Vzor enje 06. junij 2017

Citogenetske raziskave so potekale od 07. 06. do 12. 06. 2017

Domflale
16. junij 2017

TESTNO PORO ILO Z REZULTATI RAZISKAV

1. Protokol, Material in Metode *Allium M* testa
2. Rezultati raziskav
3. Poro ilo obsega 9 strani, 2 preglednici in 8 fotografij.

Raziskave v rastlinski aplikativni citogenetiki
PETER FIRBAS *univ. dipl. biol.*
Ljubljanska c. 74, SI . 1230 Dom0ale

Kako zdrava je voda ó Kako zdrava je voda je vpra-anje, ki ne pu-a ravnodu-nosti. Njeno sporo ilo zamotano v biolo-ko znanost, nam odpira svet, da lahko z danes znanim biolo-kim opazovanjem razlik v dolfini rasti korenin testne rastline (*Allium cepa* L.) in po-kodbah kromosomov v njihovih celicah v odvisnosti od okolja dolo a kakovost vode.

õThink before you drinkö ó Samo fizikalno-kemi ne analize ne dajo dovolj zanesljivega odgovora na vpra-anje kako zdrava je voda. Komplementarna raziskava skupno z biolo-kimi in kemi nimi raziskavami pa podaja popolnoma drugo sliko, kajti tefko je identificirati na tiso e kemi nih snovi v vodi. Biolo-ka metoda *ALLIUM* razkriva celosten vpliv na rast in razvoj flivih celic ali organizmov ter zaznava prisotnost -kodljivih snovi v koncentracijah, na mejnih sposobnosti analitskih metod. Od priblifno 700 prepoznavnih toksih nih in genotoksi nih snovi, ki se lahko znajdejo na primer v pitni vodi, jih z obi ajnimi fizikalno-kemijskimi analizami nadzorujemo le slabih 10 odstotkov (*Vir: EU Chemical Bureau, Natural Resources Defence Council: Think before you drink ó Preverite preden pijete*).

Splo-na strupenost ó Razli na odzivnost rasti korenin testne rastline (*Allium cepa* L.) je splo-ni pokazatelj kakovosti okoljskega vzorca. Rast naravnost pokafle v kako za flivljenje primerni vodi so zrasle. Dalj-e ko so korenine bolj-a je kakovost okoljskega vzorca in kraj-e ko so korenine slab-a je kakovost vzorca.

Raven genotoksi nosti ó Pogled na celi no raven v rastnih vr-i kih korenin testne rastline, -e bolj pa pregledovanje celic, ter njihovo razmerje brez po-kodovanih kromosomov in celic s po-kodbami kromosomov v njej, pa daje fle zelo natan no sliko o kakovosti vode oziroma kar odgovor na vpra-anje, kako zdrava je voda.

Ocena tveganja ó Ni dovolj le ugotoviti, kaj nas ogrofla (koncentracije dolo enih onesafljenih snovi v okolju), temve , kako resno je (kako prihaja do -kodljivih u inkov v biolo-kih sistemih). S tem nesporno dokazujejo, da ni varnih doz, torej da so MDK (Mejne Dovoljene Koncentracije) nek sporazum podrejen prakti ni uporabi. Na te izzive pa odgovarjajo biolo-ki testi, ki pokaflejo aditivne u inke -kodljivih snovi, mehanizme prenosa in tudi pretvorb teh -kodljivih snovi v biolo-kih sistemih.

Soodvisnost kemizacije okolja ó Obstajajo tehtni dokazi da kemikalije, ki povzro ajo kromosomske po-kodbe; znane kot genotoksi ne snovi izkazujejo lastnosti kancerogenosti, kakor tudi citokemi no zna ilnost EDC-s (*Endocrine Disturber Chemicals*) hormonskih motenj.

PROTOKOL METODE

**ALLIUM METAFAZNI GENOTOKSI NI TEST
ZA TESTIRANJE OKOLJSKIH VZORCEV,
KEMIKALIJ IN PITNE VODE**

Peter Firbas, univ. dipl. biol., Zasebni raziskovalec, Laboratorij za rastlinsko aplikativno citogenetiko
E-po-ta: peter.firbas@gmail.com

1. Uvod

ALLIUM metafazni test je test za ugotavljanje splošne celi ne strupenosti (citotoksi nosti) in ravni genotoksi nosti v vodnih, kopenskih in zra nih ekosistemih, kjer dokazujemo potencialne genotoksi ne snovi. Test je kratkotrajen in pokafle usklajen in celokupen u inek onesnaflevanja in medsebojno delovanje med testno rastlino (Allium cepa L.) in potencialnimi genotoksiki. Rezultati se nato –e statisti no ovrednotijo, ki ji prikazuje Fisher's Exact Test. V 2x2 frekven nih tabelah dvosmerna p-vrednost determinira statisti no zna ilnost ali nezna ilnost dveh kategori nih vzorcev.

Biolo–ki test ALLIUM ali ebulni test razkriva celosten vpliv na rast in razvoj flivih celic ali organizmov ter zaznava prisotnost –kodljivih snovi v koncentracijah, manj–e od 0,1 µg/l ali 0,1 ppb. 1 ppb (part per billion ó en del snovi na eno milijardo raztopine ali 1 µg na liter ali kilogram). Od približno 700 prepoznavnih snovi, ki se lahko znajdejo na primer v pitni vodi, jih z obi ajnimi fizikalno-kemijskimi analizami nadzorujemo le okrog 10 odstotkov (Vir: EU Chemical Bureau, Natural Resources Defence Council: Think before you drink).

Vi–je rastline so odli ni genski modeli za odkrivanje citotoksi nih in/ali mutagenih v okolju; in se pogosto uporabljajo za biomonitoring (oz. spremljanje kakovosti okolja, predvsem vodnih vzorcev) v razli nih ekosistemih (Leme in Marin-Morales 2009). Med rastlinami ima vodilno mesto navadna ebula (*Allium cepa L.*), ki je indikatorska testna rastlina za oceno motenih procesov v celi ni delitvi (mitozi), kar na makroskopski ravni zavira rast korenin; na mikroskopski ravni pa povzro a –tevil ne in strukture po–kodbe kromosomov (Firbas 2011; Firbas in Amon 2013, 2014). Meristemske celice koreninskih vr–i kov vsebujejo reduktazne encime (*MFO ó mixed function oxidase*), ki pretvorijo promutagene snovi v mutagene, kar tudi zasledimo v flivalskih organizmih in tako omogo ajo spremljanje pretvorb genotoksi nih snovi in njihovih metabolitov v drugimi biolo–kih testnih sistemih. Mednarodni program rastlinskih biolo–kih testov (*IPPB ó International Program on Plant Bioassays*) je ebulni (*Allium*) test sprejel za biomonitoring in testiranje okoljskih vzorcev (z morebitnimi onesnaflevalci).

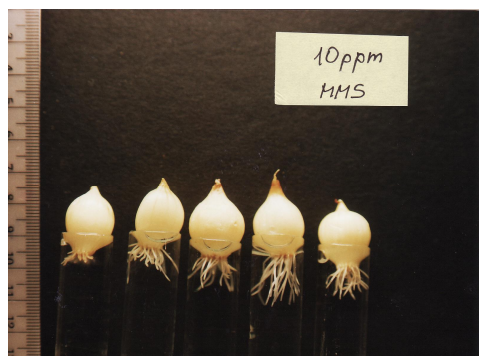
2. Material in metode

Test se izvaja po metodi: Al-Sabti 1989; Firbas 2004, 2011; Firbas in Amon, 2014; Kumar in Panneerselvam 2007; Ragunathan in Panneerselvam 2007; Panneerselvam in sod. 2012.

Citogenetske raziskave potekajo na raziskovalnem mikroskopu znamke OLYMPUS ó BX 41 (Japonska) s samodejnim foto sistemom PM 10 SP, pri pove avi 400X in 1000X.

Parametri *ALLIUM* metafaznega testa podajajo: splo–no strupenost in raven genotoksi nosti

SPLOŠNA STRUPENOST (Slika 1 in 2) podaja dolfino korenin testnih rastlin mlade ebule (*Allium cepa* L.); je obratno sorazmerni z dolfino korenin testnih rastlin. Daljše kot so korenine manjše je splošna toksičnost in krajše kot so korenine testnih rastlin večja je splošna strupenost (toksičnost).



Slika 1 – Inhibicijsko stimulacijski test mlade ebule *A. cepa* L. gojen 72 ur v 10 ppm (10 mg/l) oz. 1 ppm (part per milion) MMS



Slika 2 – Inhibicijsko stimulacijski test mlade ebule *A. cepa* L. gojen 72 ur v 1 ppb (1 µg/l) oz. 1 ppb (part per bilion) MMS.

RAVEN GENOTOKSIČNOSTI (Slike 3 in 4) podaja poškodbe kromosomov v celicah koreninskih vršičkov testnih rastlin mlade ebule (*Allium cepa* L.); je odstotkovno razmerje med vsemi metafaznimi celicami in s celicami s poškodbami kromosomov (Al-Sabti 1989; Firbas 2004, 2006). Identificira se 200 ali več metafaznih celic. Pri visoki ravni genotoksičnosti pa manj. Rezultati se podajajo v odstotnih točkah (Odst. t.)

METAFAZNI INDEKS: število metafaznih celic na 1000 pregledanih celic. Rezultati se podajajo v promilnih točkah (prom. t. ‰)

STATISTIČNA KALKULACIJA: Fisher's Exact Test. V 2x2 frekvenčnih tabelah dvosmerna p-vrednost determinira statistično značilnost ali neznačilnost dveh kategorijnih vzorcev.

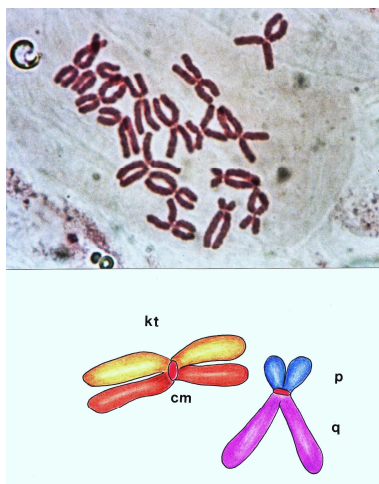
Preglednica 1. Primerjava rezultatov ravni genotoksičnosti različnih kakovosti pitnih voda (Firbas P. 2011)

Raven genotoksičnosti (izražena v odst. t.) je razmerje med vsemi metafaznimi celicami in celicami s poškodbami kromosomov; n = 200)	Raven Ogroženosti (ocena tveganja)	Vzorci pitnih voda in nekaterih kemikalij
2	naravna mutagenost testnih organizmov	Kakovostna pitna voda
3-7	Nišelna do Nizka	5 mg NO ₃ /l
9	Srednja	0,01 µg/l biocidov, 25 mg/l nitratov
12		
15	Visoka	0,1 µg/l biocidov, 40 mg/l nitratov
20		
23	Kritična	(>0,1 µg/l biocidov, 50 mg/l nitratov)

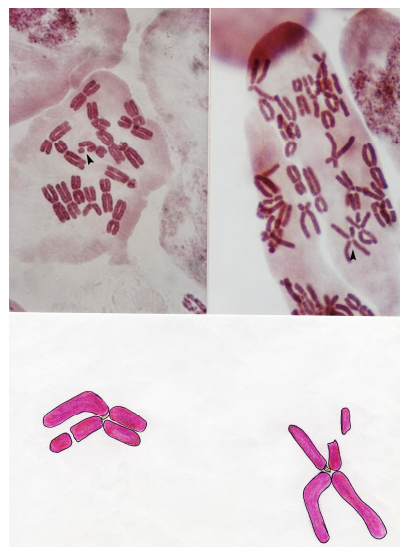
2. 1. Kontrola ALLIUM metafaznega testa in inhibicija rasti korenin

Ugotovitev, da test ALLIUM sploh deluje, potekata vzporedno ob raziskanem vzorcu – dva testa, ki nam zagotavljata: kakšna je sama odzivnost testa ALLIUM in to, ali test ALLIUM sploh deluje. Negativna kontrola je vodovodna voda, filtrirana s tri stopenjsko filtracijsko napravo (AQUA KRISTAL 6 AK 500 R.O.). Za pozitivno kontrolo pa 10 mg/L ali 10 ppm metil metansulfonat 66-27-3

200-625-5 ó MMS 4016 SIGMA. Negativna kontrola pokafe, kolik-na je stopnja strupenosti pri ne izpostavljenih ebulah in hkrati kontrola, da test sploh deluje. Pozitivna kontrola pa se uporablja z znano kemi no snovjo, ki v ve ji meri povzro a stopnjo strupenosti in je potrebna za kontrolo odzivnosti testa (Slika 1 in 2).



Slika 3. Nepoýkodovani metafazni kromosomi navadne ebule (*Allium cepa* L.) v koreninskih celicah. Celica vsebuje 16 kromosomov ($2n = 16$). Kromosom tvori ta dve vzdoljni kromatidi (kt) ali vzdoljni polovici. Centromera (cm) razmeji kromosom v krajíji (p) krak in daljíji (q) krak. Kraka kromosoma sta lahko tudi enaka.



Slika 4. Poýkodovani kromosomi v metafaznih celicah koreninskih vríi kov mlade ebule (*Allium cepa* L.).

2. 2. Parametri *ALLIUM* metafaznega testa

Parametri podajajo: splo-no strupenost (toksi nost), raven genotoksi nosti, metafazni indeks. in statisti no kalkulacijo s Fisher's Exact Testom (Agresti 1992), ki v 2×2 frekven nih tabelah dvosmerna p-vrednost dolo a statisti no zna ilnost ali nezna ilnost dveh kategori nih vzorcev.

2. 3. Po-kodbe kromosomov mlade ebule *Allium cepa* L.

(Firbas in Amon, 2014; Firbas, 2015)

KROMATIDNE PO-TKODBE

Enojni lom kromatide (ELK) ó *Single break chromatid (SBCt)*

Dvojni lom kromatide (DLK) ó *Double break chromatid (DBCt)*

Ve kratni lomi kromatide (VLK) ó *Multiple break chromatid (MBCt)*

CENTROMERNE PO-TKODBE

Lom v centromeri (LC) ó *Break centromere (BCm)*

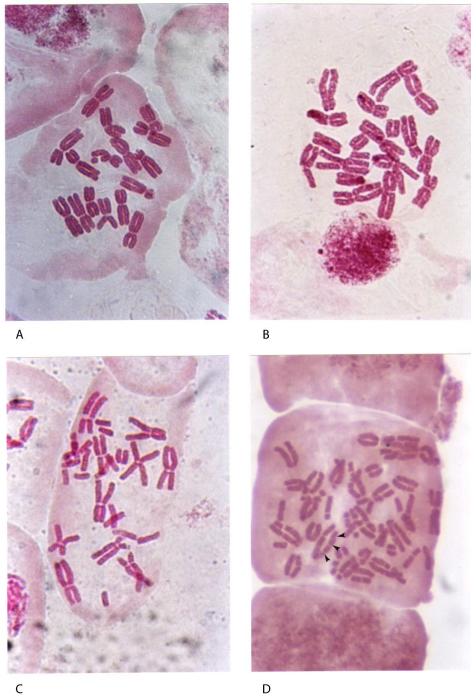
Vrzelni (gap) lom kromatide (GK) ó *Gap break chromatid (GBCt)*

KROMOSOMSKE PO-TKODBE

Kroflni kromosom (KK) ó *Ring Chromosom (RCs)*

Dicentri ni kromosom (DK) ó *Dicentric Chromosom (DCs)*

Po-kodbe v kromosomskem setu prizadenejo enega do dva kromosoma, nadalje 3 do 7 ali 8, redkeje tudi do 12. Po-kodovani pa so lahko tudi vsi kromosomi v kromosomskem setu. Vi-ja kot je raven genotoksi nosti, ve je tudi po-kodovanih kromosomov v garnituri. Prav tako se pojavlja tudi ve razli nih po-kodb na posami nem kromosomu v setu. Celica je po-kodovana, ko je v kromosomskem setu po-kodovan vsaj en kromosom (Slika 5).



Slika 5 Ě Razli no ýtevilu poýkodovanih kromosomov v metafaznih celicah koreninskih vrýi kov mlade ebule (*Allium cepa* L.): ena kromosomska poýkodba (5A), ýtiri kromosomske poýkodbe (5B), osem kromosomskih poýkodb (5C), poýkodovani vsi kromosomi v kromosomski garnituri (5D).

3. Rezultati raziskav splošne strupenosti in ravni genotoksičnosti

Citogenetske raziskave so potekale od 07. 06. do 12. 06. 2017. (Vzorca sta bila odvzeta poslednji no zaradi poftara v Kemis Vrhnika 15. maja 2017)

S testom *Allium* so bili raziskani naslednji vzorci:

- I. Poljska zemljina-prst, Zalaze Blatna Brezovica
- II. Kapnica , Blatna Brezovica 22
- III. Negativna kontrola (filtrirana voda z R.O. ó revezna osmoza)
- IV. Pozitivna kontrola (10 mg/l ali 10 ppm metil metansulfonat ó MMS 4016 SIGMA)



Slika 6. Dolfina korenin testnih rastlin v zemljini-prsti - Zalaze (Blatna Brezovica).



Slika 7. Testne rastline v vzorcu kapnice (Blatna Brezovica 22).



Slika 8. Testni vzorec (-K), negativne kontrole za prelivanje na zemljino

3. 1. Splo-na strupenost in raven genotoksi nosti

Rezultati splo-ne strupenosti (toksi nosti) in ravni genotoksi nosti so podani v preglednici 2 in fotografijah od 1 do 8.

Splo-na strupenost (dolffina korenin testnih rastlin) med poljska zemljino-prstjo (Vzorec I) in kapnico (Vzorec II) statisti no signifikantno je zna ilno ($p < 0.05$), oziroma nastopi razlika v dolffini korenin. Vzorec zemljine kafe nekoliko pove ano splo-no strupenost (kraj-a dolffina korenin testnih rastlin) v primerjavo z vzorcem prelite vode (-K, kontrola) na poljsko zemljino-prst.

Oba vzorca poljska zemljino-prst in kapnica (Vzorec I. II.) sta statisti no signifikantno razli na od mutagenega vzorca +K - pozitivne kontrole (Vzorec III); $p < 0,05$. To splo-no pomeni da *Allium* M test deluje in da se testne rastline razli no odzivajo na razli ne raziskane vzorce.

Preglednica 2. Citološki u inki raziskanih vzorcev: - generalna strupenost (dolžina korenin testne rastline *Allium cepa* L.) in raven genotoksi nosti (indukcija kromosomskih poškodb v meristemskih celicah korenin testne rastline *Allium cepa* L.)

Vzorec	Število metafaznih celic	Število celic s poškodbami kromosomov	Raven Genotoksi nosti (odst. t.)	Povpre na dolžina korenin (mm)
I	200	9	4,5	20-22
II	200	6	3,0	33-36
III*	200	5	2,5	28-30
IV*	200	42	21,0	19,0

*K : kontrola (III ó negativna kontrola; IV ó pozitivna kontrola)

Raven genotoksi nosti (po-kodbe kromosomov v metafaznih celicah) med vzorcema zemljine in kapnice (Vzorec I in Vzorec II) statisti no signifikantno ni zna ilno ($p = 1$).

4. Fisherjev eksaktni test (Fisher's Exact Test).

Raziskana vzorca poljske zemljine-prsti in kapnice (Vzorec I in Vzorec II) se v *p vrednost* razlikuje po naslednji stopnji zna ilnosti:

- z negativno kontrolo: $p = 1,0000 > 0,05$ (raziskana vzorca ne kafia razlike z negativno kontrolo)

- z pozitivno kontrolo: $p = 1,6e^{-8} < 0,05$ (raziskana vzorca se zelo razlikujeta z pozitivno kontrolo).

5. Zaključek

Iz rezultatov je razvidno, da je raven genotoksi nosti poljske zemljine-prsti in kapnice v kakovostnem obmoju z nizko do ni elno oceno tveganja (od 3,0 do 4,5 odst. t.) zdravstvene varnosti. (Primerjava preglednic 1 in 2).

6. Cilji raziskav in statisti na zna ilnost

Cilj raziskav je nedvomno ta, da nam rezultati raziskav pokazljejo ali onesnaflenje je ali ga ni ter predvsem kak-no je tudi tveganje za organizme, vklju no z ljudmi. Omenjeni *ALLIUM* test pa nas tudi pripelje kaj je vzrok onesnaflevanju oz. kje je vir. Tle z znanimi izvori lahko preidemo k ukrepom in tako prispevamo im ve ji delefk ohranjanju zdravega okolja.

Statisti no ugotovljeno signifikantno razliko med preiskanimi vzorci potrjuje statisti na kalkulacija analiza parnih podatkov s dvosmernim *Fisherjevim eksaktnim testom*, ki podaja lastnost *p vrednosti* med paroma podatkov in sicer ali sta para (raziskana vzorca) razli na (statisti no zna ilna) ali se ne razlikujeta (statisti no nezna ilna) in kak-no je tudi tveganje.

Katero tveganje pa je dovolj majhno. Najpogostej-e vrednosti so 0,05 nato 0,01 in 0,001. Glede na te meje govorimo tudi o 5%, 1% in 0,1% stopnji zna ilnosti rezultatov. Katerega od teh nivojev izberemo, je precej odvisno od narave podatkov in od problema, ki ga obravnava osnovna domneva. Statisti na zna ilnost pa naj nebi bila edini odlo ilni dejavnik pri vrednotenju rezultatov.

7. Literatura

LEVAN A., FREDGA K., SANDBERG A.A. (1964). Hereditas, 52, 201-220.

AL-SABTI K (1989). Cytobios, 58, 71-78.

AGRESTI A. (1992). Statistical Sci, 7,131-153

FIRBAS P (2004). ARA zalofba, Ljubljana

KUMAR P, PANNEERSELVAM N (2007). Facta Universitatis Series: Med Biol. 14(2), 60-63.

RAGUNATHAN I, PANNEERSELVAM N (2007). J Zhejiang Univ Sci B. 8(7), 470-475.

LEME D, MARIN-MORALES A. (2009). Mut Res, 682 (1), 71-81.

FIRBAS P. (2011). Kemizacija okolja in citogenetske po-kodbe. ALLIUM METODA: indikativna metoda za identifikacijo ksenobiotikov v okoljskih vzorcih. 1. ponatis; EKSLIBRIS, Ljubljana.

PANNEERSELVAM N, PALINIKUMAR L, GOPINATHAN S (2012). Int J Pharma Sci Res. 3, 300-304

FIRBAS P, AMON T. (2013). Allium Chromosome Aberration Test for Evaluation Effect of Cleaning Municipal Water with Constructed Wetland (CW) in Sveti Tomaž, Slovenia. J Biorem Biodeg, 4 (4),189-193.

FIRBAS P, AMON T. (2014). Chromosome damage studies in the onion plant *Allium cepa* L. Caryologia, 67 (1), 25-35.

FIRBAS P. (2015). A Survey of *Allium cepa* L. Chromosome damage in Slovenian Environmental Water, Soil and Rayfall Samples. Int. J. Curr. Res. Biosci. Plant Biol. 2 (1), 63-83.

Domžale, 16. oktober 2017

Peter Firbas

