

*LABORATORIJA RASTLINSKO  
APLIKATIVNOCITOGNETIKO*



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

**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
3. reka Ljubljanica (lok. Sinja Gorica, ribi-ki dom)

*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. Dve prilogi z rezultati raziskav: 1999-2009
4. Poro ilo obsega 11 strani, 3 preglednici in 9 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.

**Think before you drink** 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 teffko 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 približno 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 onesnaflenih 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).

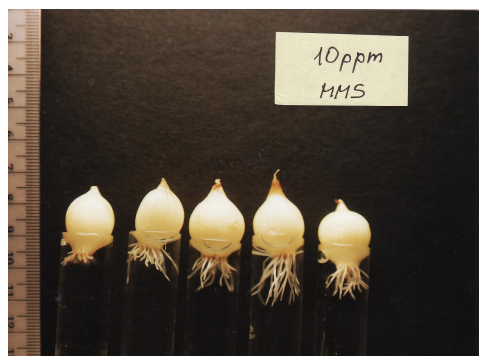
**2. Material in metode**

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 vrvi kov 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 kategorij vzorcev.

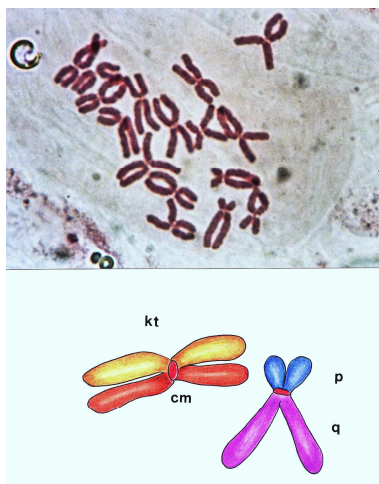
Preglednica 1. Primerjava rezultatov ravni genotoksičnosti različnih kakovosti pitnih voda (Firbas P. 2011)

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 <sub>3</sub> /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)

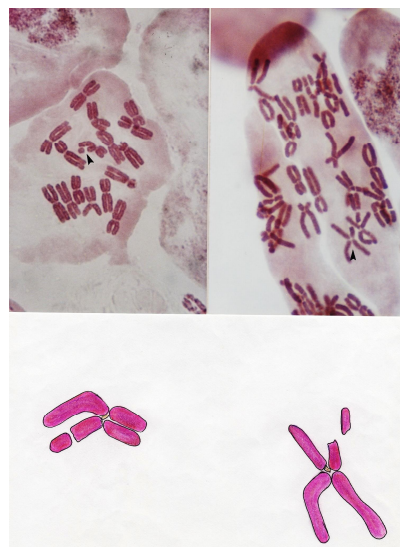
## 2. 1. Kontrola ALLIUM metafaznega testa in inhibicija rasti korenin

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  $2 \times 2$  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)*

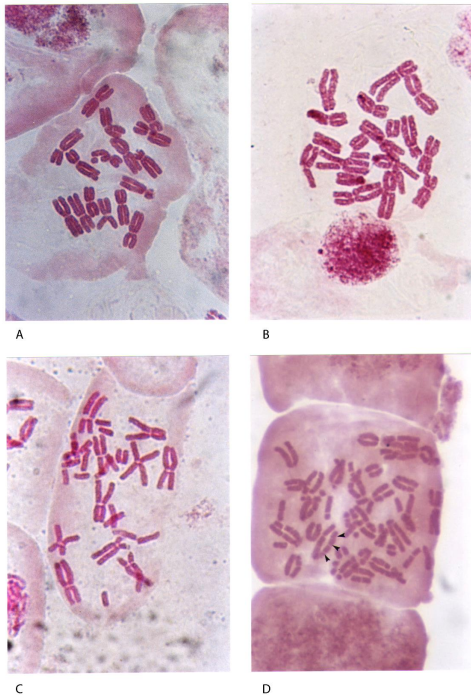
Vrzelni (gap) lom kromatide (GK) ó *Gap break chromatid (GBCt)*

### 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 Ė 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. Reka Ljubljanica, Sinja Gorica (lok. ribi-ki dom)
- IV. Negativna kontrola (filtrirana voda z R.O. ó revezna osmoza)
- V. 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



Slika 9. Testne rastline *A. cepa* L. v re nem vzorcu reke Ljubljani

### 3. 1. Splošna strupenost in raven genotoksi nosti

Rezultati splošne strupenosti (toksi nosti) in ravni genotoksi nosti so podani v preglednici 2 in fotografijah od 1 do 9.

Splošna strupenost (dolžina 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 dolžini korenin. Vzorec zemljine kafe nekoliko pove ano splošna strupenost (krajša dolžina korenin testnih rastlin) v primerjavo z vzorcem prelite vode (-K, kontrola) na poljsko zemljino-prst.

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

Reka Ljubljanica v kraju Sinja Gorica (30 m za izlivom potoka Tojnica) dosega raven genotoksi nosti 17,5 odst. t., kar je dale najve z primerjavo zemljine-prsti. V primerjavi z pozitivno kontrolo (+K, znana kemikalija ó MMS: metan metil sulfamid) se re ni vzorec statisti no signifikantno -e razlikuje ( $p = 0,0316 < 0,05$ ). V prilogi 1. In prilogi 2. Podajam rezultate raziskav reke Ljubljanice in Mo ilnika v obdobju od 1999 do 2009.

**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	25	17,5	22-31
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 (poškodb 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 in reke Ljubljanice z visoko oceno (17,5 odst. t.) tveganja zdravstvene varnosti (Primerjava preglednic 1 in 2).

### 6. Cilji raziskav in statisti na zna ilnost

Cilj raziskav je nedvomno ta, da nam rezultati raziskav pokafejo 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 onesnafevanju oz. kje je vir. Tle z znanimi izvori lahko preidemo k ukrepom in tako prispevamo im ve ji delefl k 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.

### Priloga1: Biomonitoring reke Ljubljanice od 1999 do 2009

Primerjava rezultatov raziskav od 1999 do 2008

Genotoksi ne raziskave v Mo ilniku neprekinjeno potekajo od leta 1999. Leta 2001 pa se je dodala ze lokaliteta reke Ljubljanice v kraju Sinja Gorica. Rezultati raziskav v obdobju od leta 1999 do vklju no z letom 2003 do 2008 so podani v Preglednici 1.

Preglednica 1. Primerjava rezultatov ravni genotoksi nih raziskav Ljubljanice v Mo ilniku in kraju Sinja Gorica na obmo ju ob ine Vrhnika v obdobju od 1999 do 2008.

Lokaciji in leto raziskave	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Mo ilnik - Izvir reke Ljubljanice	23,0	26,50	19,82	14,89	7,64	10,0	5,0	5,5	6,0	6,5	<b>18,5</b>
Reka Ljubljanica Sinja Gorica	-	-	23,68	24,08	14,00	14,0	12,0	9,5	9,0	5,0	<b>9,0</b>

#### Leto 1999 Ė 2008 in 2009

V letu 2003 dosega voda v izviru Mo ilnik najni0ji raven genotoksi nosti v primerjavi z preteklimi leti. Po letu 2001 se opazno zni0uje raven genotoksi nosti v Mo ilniku, kakor tudi v kraju Sinja Gorica. Vizji raven genotoksi nosti pa ze vedno dosega reka Ljubljanica v kraju Sinja Gorica glede na izvir Mo ilnik. V letu 2004 se je raven genotoksi nosti v izviru Mo ilnik ponovno pove al, vendar se reki Ljubljanici v kraju Sinja Gorica raven genotoksi nosti nasproti letu 2003 ni pove ala.

Vodostaji voda so leta 2004 v krazkem izviru Mo ilnik v primejavi (april-maj) v z letom 2003 veliko vizji. Saj voda izvirala na ve mestih (v letu 2003 so bili ti izviri v enakem obdobju v primerjavi z letom 2004 0e suhi).

Po sklepanju rezultatov in primerjavi med njimi se ugotavlja, da kraj Vrhnika po letu 2003 dodatno ni vplivala na kakovost (ni obremenila) reke Ljubljanice.

Visoke vode v izviru Mo ilnik leta 2004 v primerjavi z nizkimi v letu 2003; in odkod vse prite ejo ne vemo, kar je tudi zna ilnost vseh podzemnih krazkih voda.

Izvirna voda v Mo ilniku je po vodostaju enako visoka, kot v letu 2004. Z raziskavami je bilo ugotovljeno, da je kakovost v izviru Mo ilnik ze vizja v primerjavi z letom 2004; enako se je izboljšala kakovost reke Ljubljanice v kraju Sinja Gorica. (Kaj ta kakovost pomeni je najbolj primerljivo s kakovostjo omenjenih vzorcev izpred nekaj let in primerljivost s pozitivno kontrolo mutagenega vzorca). V letu 2006 se bele0i ponovno izboljšanje reke Ljubljanice v kraju Sinja Gorica.

Iz rezultatov ztudije v letu 2007 lahko zaklju imo, da je sanacijski programi dobro delujejo, sploh e 0elimo dr0ati tako visoko kakovost reke Ljubljanice, ko reka zapuz a obmo je ob ine Vrhnika.

**V I. 2008 se kakovost reke Ljubljanice v primerjavi z letom 2007 kakovostno rahlo izbolj0ala (vzor enje konec marca !).**

Iz rezultatov je razvidno, da reka Ljubljanica ne kaže negativnega strupenostnega (toksičnega) in genotoksičnega vpliva obremenitev za krajem Vrhnika saj je raven genotoksičnosti v Mo ilniku 6,5 odst. t. v Sinji Gorici pa 5 odst. t.

Iz rezultatov študije lahko zaključimo, da je sanacijski programi dobro delujejo, sploh se želimo dobiti tako visoko kakovost reke Ljubljanice kot zapuščajo območje Vrhnika z zelo nizko stopnjo tveganja (Preglednica 2).

### Leto 2009

Vzorčenje je potekalo 09. marca 2009 (po predhodnem dvodnevem deževju pred 6 marcem). Že pogled na skupino izvirov je kazal nekoliko nenavadno sliko. Iz vzhodnih izvirov so na vodi plavale veje do manjše penaste tvorbe, ki so v srednjem delu voda tvorile veje do 2m v premeru bolj gosto belo stojajočo penasto tvorbo. Od tod so se ločevali skupki pene in z rečnim tokom tekli naprej po strugi reke. Črne prav pogosti so bili vidni pod mostom pri izvirov. Iz zahodnih izvirov Mo ilnika pojavnost penastih tvorbo ni bila prisotna.

Vsem je znano, kje Ljubljanica, že vedno pa je deloma neznanka od kod vse v tem podzemljem prevotlenem in ob utljevem ničinskem krazkem svetu voda priteče do izvira, ne glede na to ali je ta pot kratka ali daljša.

Vzroke za spreminjanje kakovosti reke v Mo ilniku je potrebno iskati prav gotovo v zbirnem zaledju krazke reke.

## Priloga 2. KRATKA VERZIJA TESTNEGA POROČILA

1. Rezultate raziskav in primerjavo rezultatov vzorčenja 09. 03. 2009 in 26. 04. 2009

2. Iz rezultatov raziskav je razvidno, da je raven genotoksičnosti izvira Mo ilnik kakor tudi reke Ljubljanice odvisna od kakovosti vodotokov krazkega zaledja, deževnih vremenskih razmer in najverjetneje manj od termina vzorčenja

Rezultati raziskav Primerjava rezultatov 2006 in 2009

Vzorčenje: 09. 03. 2009 in 26. 04. 2009; (primerjava z vzorčenjem 13. 08. 2006 . Reka Ljubljanica od izvira do izliva v reko Savo; naročnik: MOL\*)

Preglednica 1. Primerjava rezultatov ravni genotoksičnosti raziskav Ljubljanice v Mo ilniku in kraju Sinja Gorica na območju območje Vrhnika.

Lokaciji in leto raziskave	2006 maj	2006 avgust	2009 marec	2009 april
Mo ilnik - Izvir reke Ljubljanice	5,5	17,5*	18,5	6,5
Reka Ljubljanica Sinja Gorica	9,5	-	9,0	7,0

### Leto 2009

Vzorčenje 09. marca 2009 (po predhodnem dvodnevem deževju pred 6 marcem). Že pogled na skupino izvirov je kazal nekoliko nenavadno sliko. Iz vzhodnih izvirov so na vodi plavale veje do manjše penaste tvorbe, ki so v srednjem delu voda tvorile veje do 2m v premeru bolj gosto belo stojajočo penasto tvorbo. Od tod so se ločevali skupki pene in z rečnim tokom tekli naprej po strugi reke. Črne prav pogosti so bili vidni pod mostom pri izvirov. Iz zahodnih izvirov Mo ilnika pojavnost penastih tvorbo ni bila prisotna.

Vzorčenje 26. aprila (po predhodnem suhem vremenu) je pokazalo popolnoma drugo sliko. Raven genotoksičnosti v izvirov Mo ilnik se je bistveno zmanjšala (iz 18,5 odst. t. na 6,5 odst. t.).

Iz rezultatov je razvidno, da reka Ljubljanica ne kaže negativnega strupenostnega (toksičnega) in genotoksičnega vpliva urbane obremenitve kraja Vrhnika saj je raven genotoksičnosti v Mo ilniku 6,5 odst. t. v kraju Sinja Gorica pa 7 odst. t.

### Leto 2006

Primerjava ravni genotoksičnosti v izvirov Mo ilnik (maj 2006) in povprečne ravni genotoksičnosti (avgust 2006) je najverjetneje posledica obilnega dežja, ki je v izvirov prineslo genotoksične snovi iz velikega krazkega zaledja reke Ljubljanice in to predvsem iz Planinskega in ničelnega Cerkniškega polja. Pretok reke Ljubljanice na merni postaji Ljubljana . Moste je v času odvzema vodnih vzorcev (13. 08. 2006) znašal 80 m<sup>3</sup>/s.

Vsem je znano, kje Ljubljanica, že vedno pa je deloma neznanka od kod vse te vode v tem podzemljem prevotlenem in ob utljevem ničinskem krazkem svetu voda priteče do izvira, ne glede na to ali je ta pot kratka ali daljša. Vzroke za spreminjanje kakovosti reke v Mo ilniku je potrebno iskati prav gotovo v zbirnem zaledju krazke reke Ljubljanice.

## 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. junij 2017

Peter Firbas

