

ALLIUM METODA:

**pomembna metoda za
ugotavljanje ksenobiotikov v
okoljskih vzorcih**

**Blatna Brezovica
16. junij 2017**

KEMIZACIJA OKOLJA

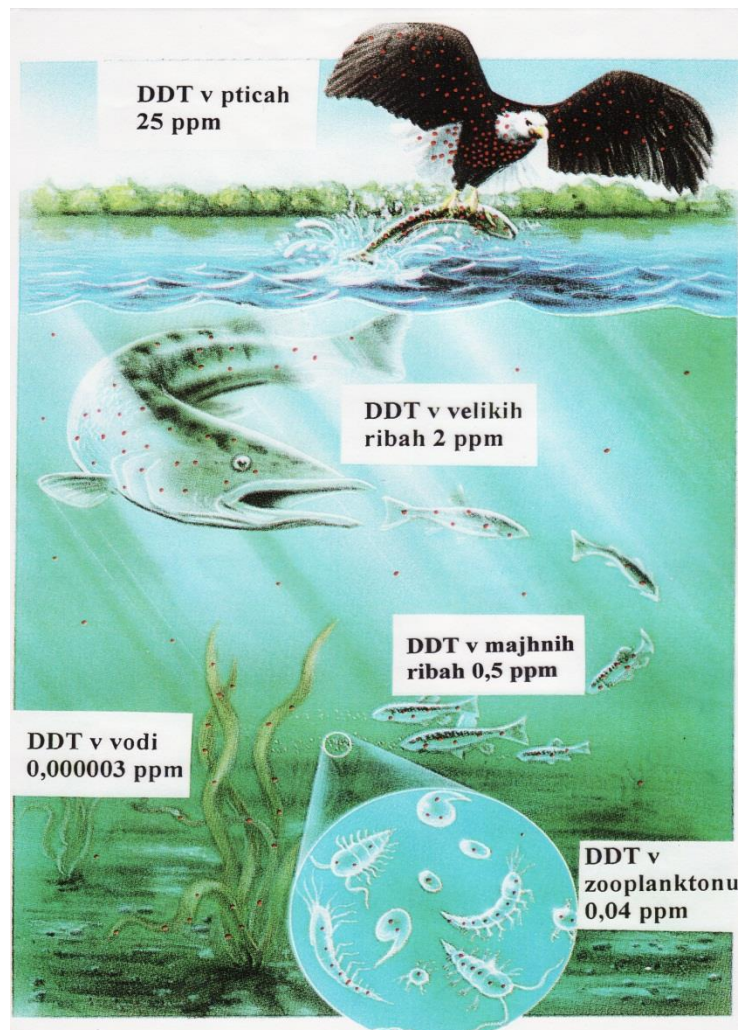
- Izvor, polucija in degradacija okolja
- Fiz-Kem in kemijske analitske metode
- Razlogi za uporabo bioloških poskusov
- Poti prenosov v okolju in bioloških sistemih
- Uporaba višjih rastlin v Ekogenotoksikoloških poskusih



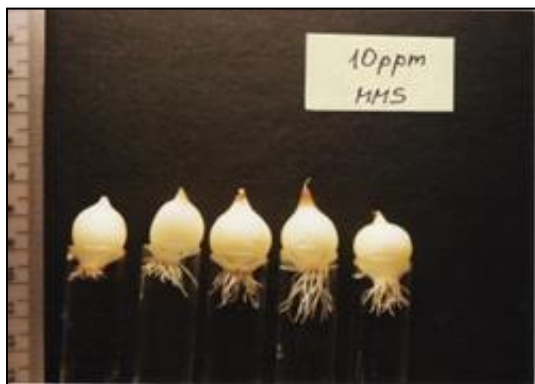
OKOLJSKI VZORCI

Kakovost okoljskih vzorcev
(6 glavnih skupin in
19 podskupin)

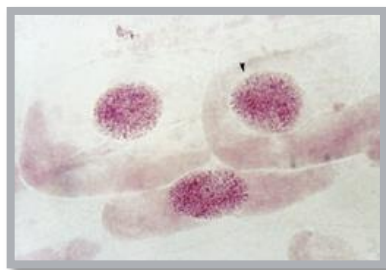
- Pitne vode
- Površinske tekoče vode
- Površinske stoječe vode
- Zemljina-prst
- Padavine
- Odpadne vode, čiščene vode iz ČN in izcedne vode deponij



ZNAČILNOST TESTA IN TESTNE RASTLINE A. CEPA L.



- A. cepa L. ima lastni oksidazno-reduktazni encimski sistem (MFO)



- Številčnost
- Razširjenost
- Preprosto shranjevanje
- Egalizacija in standardizacija testne rastline
- Priročna velikost organizma
- Poznane ekološke, fiziološke in biokemijske lastnosti
- Relativno enostavni eksperimentalni protokol
- Prednost Allium M testa je v izredno nizkih stroških



INHIBICIJSKO – STIMULACIJSKI TEST

TESTNA RASTLINA ALLIUM
CEPA L., SORTA
STUTGARTEN RIESEN
KEMIKALIJA MMS – METIL
METANLSULFONAT
KONCENTRACIJE
OD 100 PPM DO 1PPB
PPM (1 MG/KG)
PPB (1 μ G/KG)

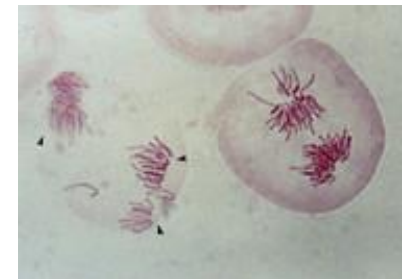
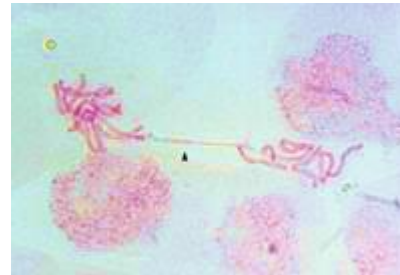
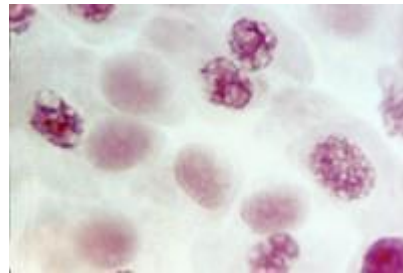


METODE RAZISKOVANJA – ALLIUM METODA

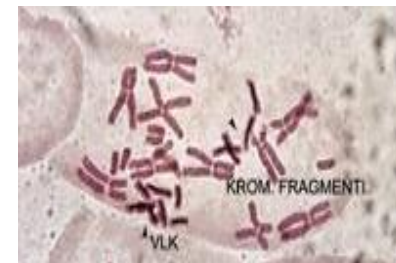
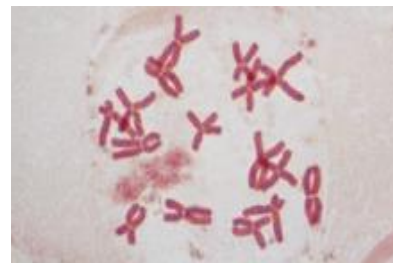
- Splošni strupenostni test



- Mitozni test

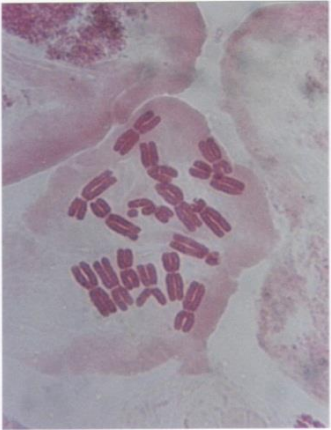
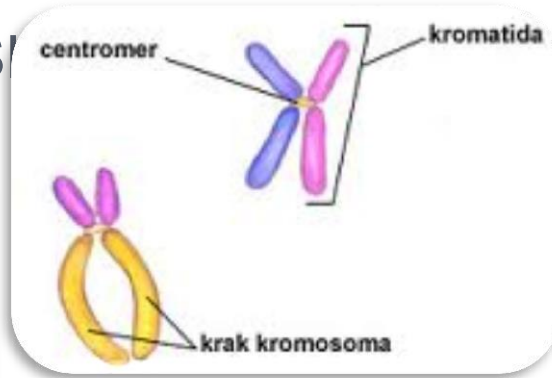


- Kromosomski test

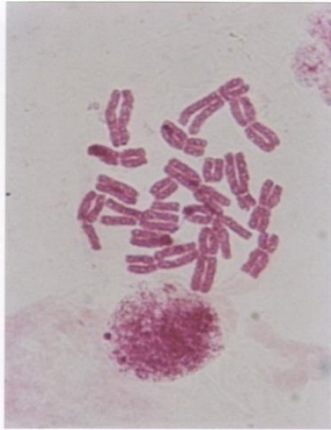


NEPOŠKODOVANI IN POŠKODOVANI

SOMI



A



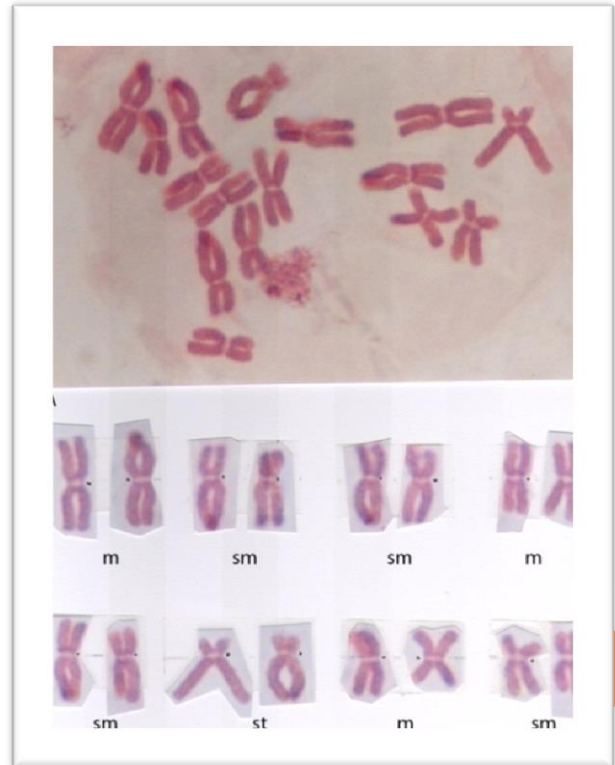
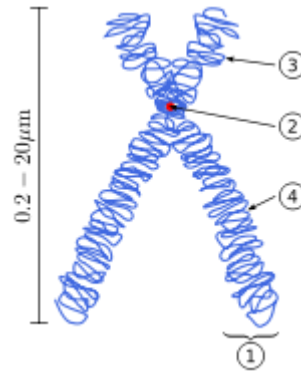
B



C



D

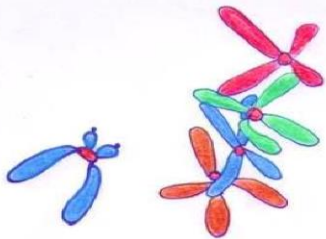
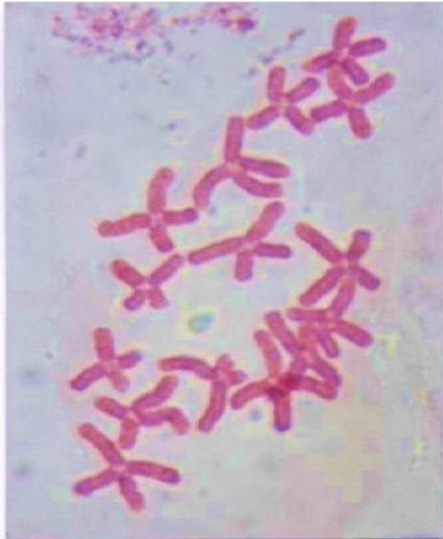


NUMERIČNA ABERACIJA

Monosomija

$$2n=15 \quad (2n=16-1)$$

- Manjka subteločnični kromosom v 6. paru
- Indukcija monosomije v primarnih efluentih (dotočne vode v ČN)



Euploidija

$$(x=8; \quad 6x - 8x)$$

- Osnovno kromosomsko število je 6 do 8 krat povečano

VZROKI ZA ANEUPLOIDIJO

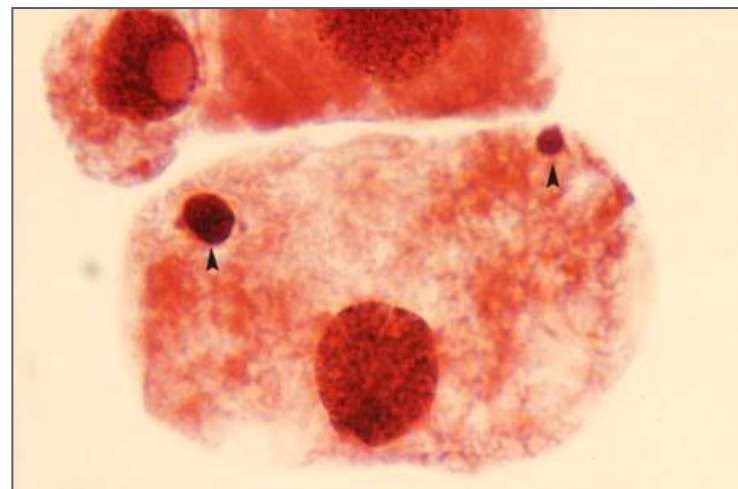


- Anafazno-telofazni most (posledica nerazdvajanja kromatid kromosoma)
- Izgubljen kromosom med celično delitvijo (posledično lahko nastane monosomija ($2n-1$) ali trisomija ($2n+1$))
- DUISBERG P. (2005,2007), GIBBS W.W. (2008) – Obstajajo tehtni dokazi da aneuploidija inducira nastanek raka
- DUISBERG P., 2005 – *Does aneuploidy or mutation start cancer.* Science, 307: 41-42.
- DUISBERG P., 2007 – *Chromosomal Chaos and Cancer.* Sci. Am., 296: 52-59.
- GIBBS W. W., 2008 – *Untangling the Roots of Cancer.* Sci. Am., 18: 30-39.

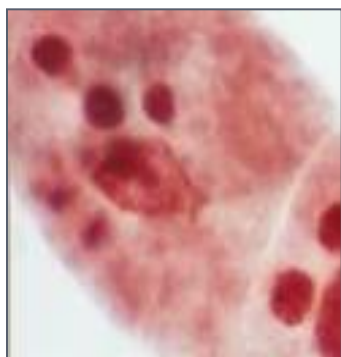


MIKRONUKLEUS (MN) v A. CEPA L.

- Metoda MN je ena najbolj učinkovitih metod za analizo mutagenih učinkov
- Število in velikost MN je učinkovit pokazatelj za vrsto efekta



Večji in manjši MN v meristemski celici korenskih vršičkov *Allium cepa* L.



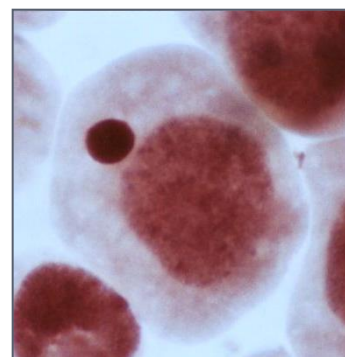
Apoptoza v *Allium*



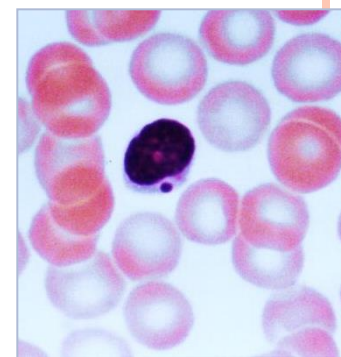
Apoptota v Pisces



MN v eritrocitu Pisces



MN v meristemski celici korenin *Allium c.*

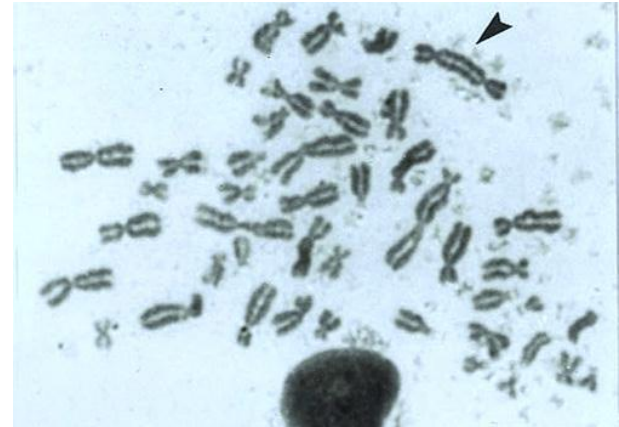


MN v limfocitu periferne krvi *Homo s.*

UNIVERZALNA STRUKTURA GENOMA

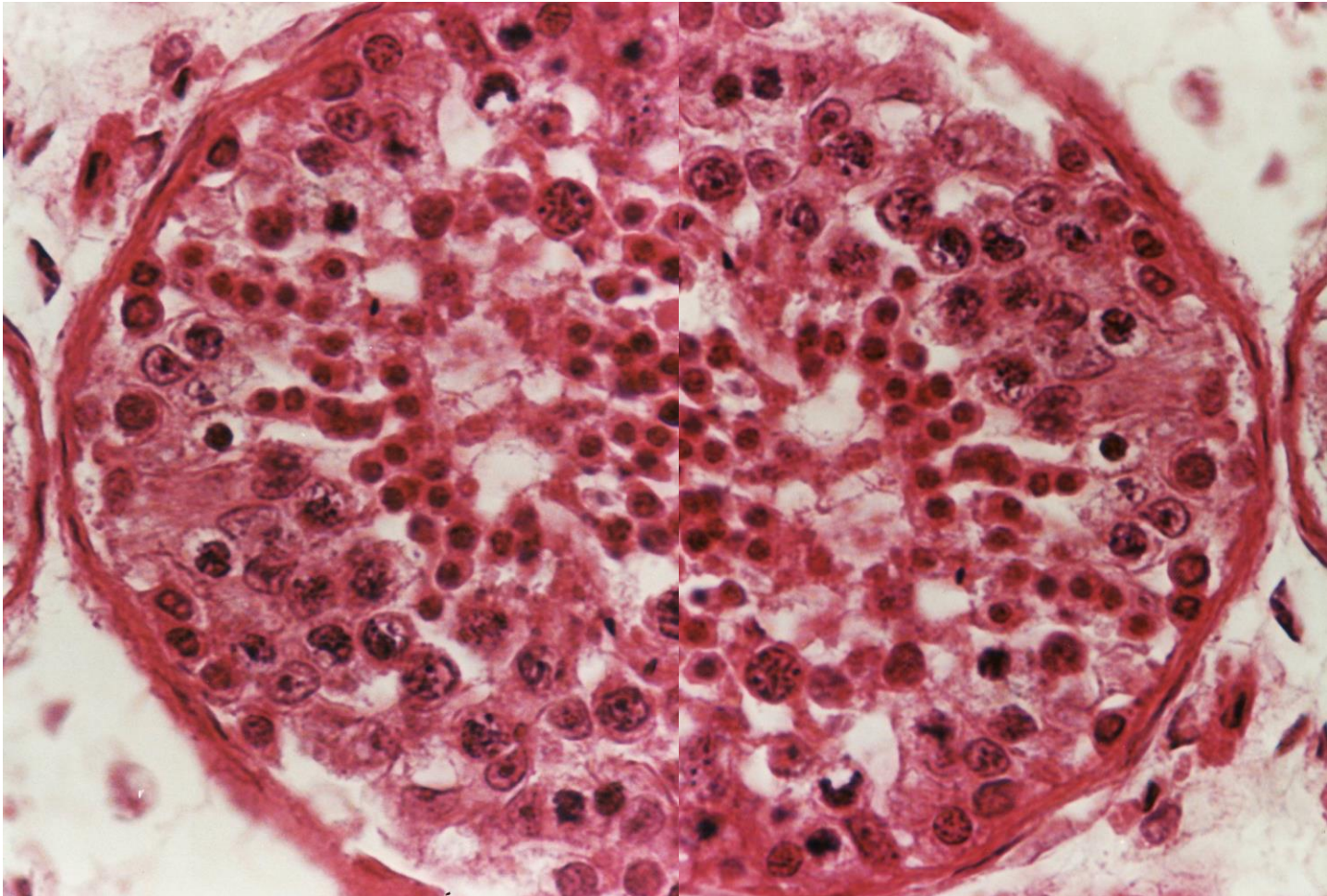
Citogenetika

- Primerjalna citogenetska predikcija/ekstrapolacija rezultatov med kromosomi *Allium cepa* L. in človekom
- Z *Allium M* testom so bile identificirane enake kromosomske poškodbe kot v patološki humani citogenetiki
- Kromosomske aberacije (KA) *Allium M* testa nam kažejo pot do etiologije kliničnih manifestacij pri človeku



SPERMATOGENEZA !?

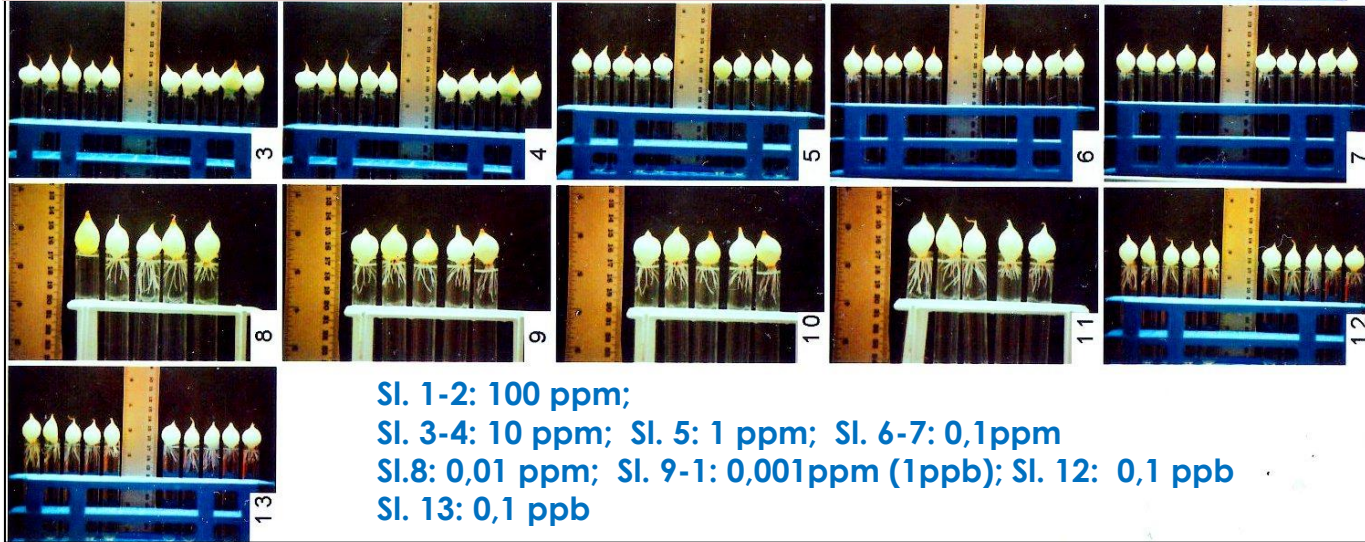
SINDROM GENETIČNE BOLEZNI (KURELEC, 1993)



22.6.2017

Primextra Gold 720 SC

1 ppm	2 – 6 mm	100/51	51
1 ppb	3 – 9 mm	100/42	42
0,1 ppb	18 mm	120/26	21,66
0,01 ppb	21 mm	105/10	9,52

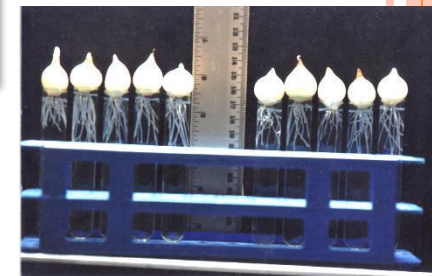


Sl. 1-2: 100 ppm;
 Sl. 3-4: 10 ppm; Sl. 5: 1 ppm; Sl. 6-7: 0,1 ppm
 Sl. 8: 0,01 ppm; Sl. 9-11: 0,001 ppm (1 ppb); Sl. 12: 0,1 ppb
 Sl. 13: 0,1 ppb



10 ppm

Raven mutagenosti se zniža iz 51 odst. t. na 4,5 odst.t.



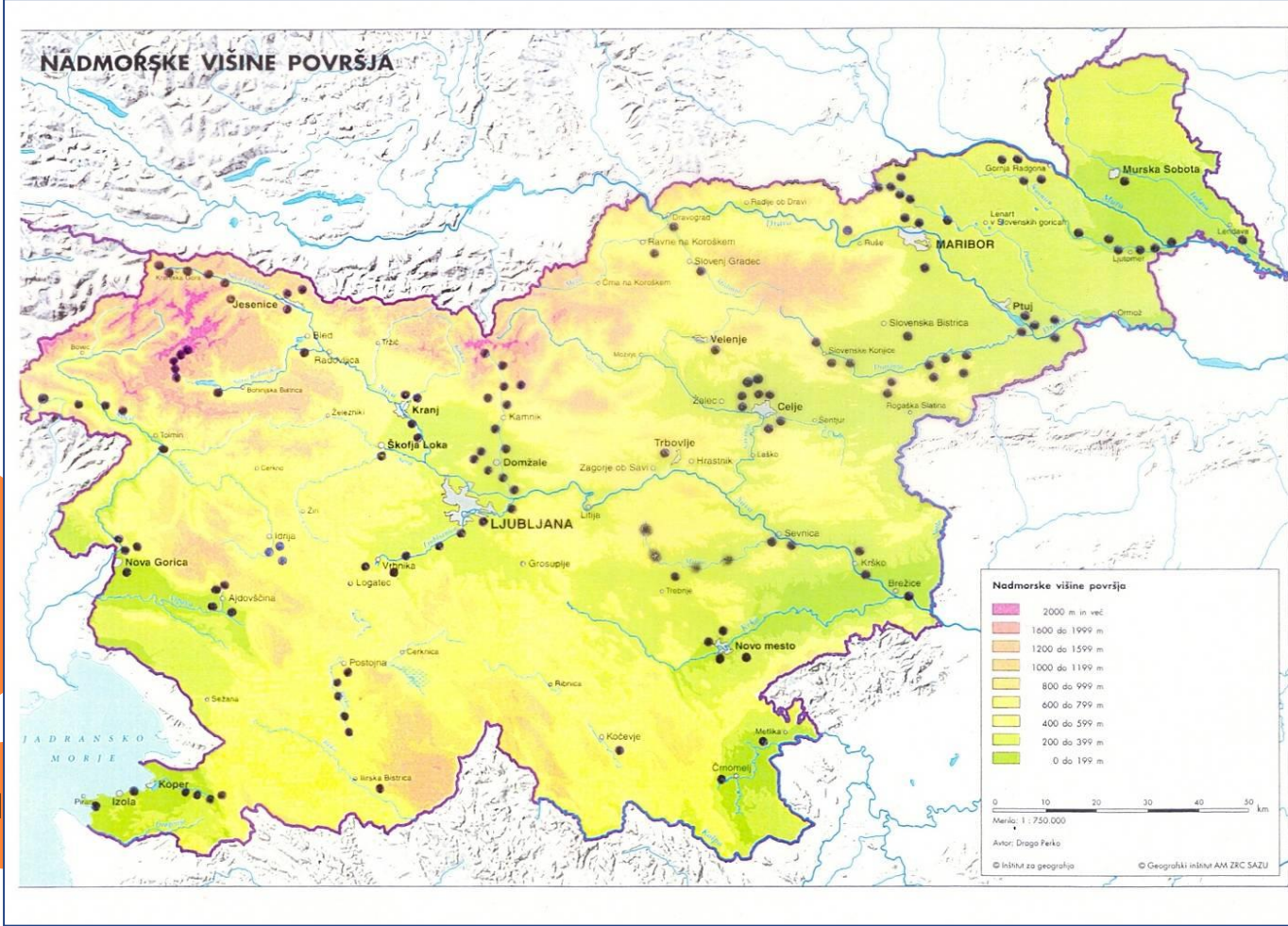
Filtrat R.O.



L: 0,01 ppb; D: 0,001

GENERALNA TOKSIČNOST (100 PPM – 1 PPB – 0,001 PPB)

**PRIMEXTRA GOLD 720 SC VSEBUJE:
 400 G METOLAKLORA IN 320 G ATRAZINA**

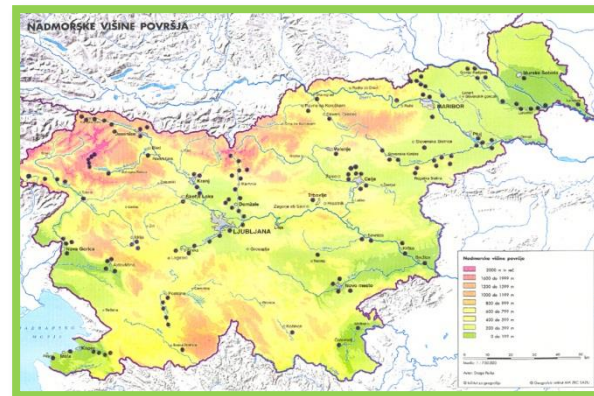
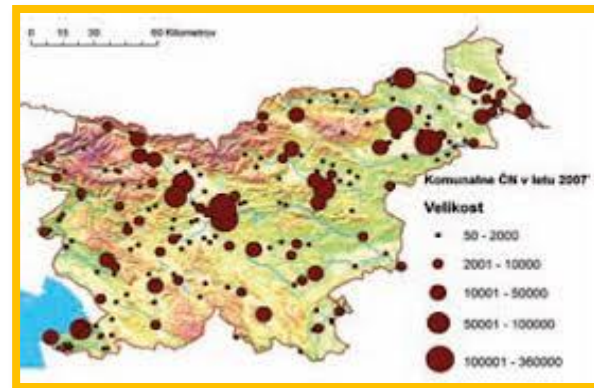
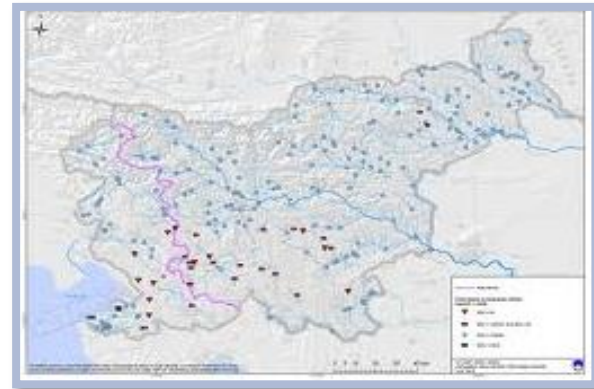


1
Genotoksična karta Slovenije (v pripravi)

CILJI RAZISKAV

Biomonitoring

- Osredotočenje na vrednotenje uporabnosti genotoksičnih in mutagenih testnih metod
- Vzpostavitev učinkovitega biomonitoringa biosfere ekosistemov in človekove tehnosfere
- Na osnovi nizkega praga detekcije Allium M testa je možna identifikacija skupin polutantov, npr. test prisotnosti kancerogenov in hormonskih motilcev



JEZERA V DTJ IN BOHINJSKO JEZERO FISHER'S EXSACT TEST

*(VZOREC X) IN RAZLIČNA STOPNJA ZNAČILNOSTI:

** VZOREC VII (P = 0,077 > 0,05)

*** VZOREC I (P = 0,497 > 0,05).

VZORCI: ZDRAVSTVENA USTREZNOST PITNE VODE

(RAZEN ZELENEGA JEZERA)

(UR. L. RS ŠT. 46/97, 52/97, 54/98, 7/2000).

LABORATORIJ ZA SANITARNO KEMIJO;

ZAVOD ZA ZDRAVSTVENO VARSTVO KRANJ

Stoječa voda	Barva m ⁻¹	Mot. NTU	pH	E. P. μS/cm	KMnO ₄ mg/l	NH ₄ mg/l	NO ₃ mg/l	NO ₂ mg/l	PO ₄ mg/l
Jezero pod Vrščacem	< 0,2	0,7	8,4	150	1,6	0,05	0,90	0,008	< 0,05
Rjavo jezero	< 0,2	0,7	8,4	149	1,6	0,04	0,88	0,009	< 0,05
Snežno jezero	< 0,2	0,5	8,8	122	1,6	0,02	0,15	0,004	< 0,05
Zeleno jezero	< 0,2	2,0	10,1	90	11,1	0,04	0,15	0,007	< 0,05
Veliko jezero	< 0,2	0,4	8,5	150	2,5	0,03	0,57	0,009	< 0,05
Močivec	< 0,2	0,9	8,2	175	1,6	0,02	1,36	0,002	< 0,05
Jezero pod Tičarico	< 0,2	1,1	8,7	167	3,2	0,02	0,94	0,010	< 0,05
Črno jezero	< 0,2	0,5	8,7	154	3,8	0,04	0,91	0,010	< 0,05
Bohinjsko jezero	< 0,2	1,0	8,3	183	3,8	0,03	1,20	0,014	< 0,05
MDK	0,5	5	6,5 do 9,5	2500	10	0,1	50	0,1	-

Vzorec	Povpr. dolžina korenin (mm)	Število metaf. celic	Št. metaf. celic s poškodbami kromosomov	Raven mutagenosti (odst. t.)
J. pod Vrščacem	41,8	116	5	4,31 ***
Rjavo j.	41,4	129	6	4,65
Snežno j.	43,2	115	5	4,34
Zeleno j.	39,8	120	9	7,50
Veliko j.	41,7	137	9	6,56
Močivec	42,8	102	6	5,88
J. pod Tičarico	41,5	112	9	8,03 **
Črno j.	42,1	123	9	7,31
Bohinjsko j.	41,3	110	7	6,36
- K (R. O.)	43,1	118	3	2,54 **
+K (10ppm MMS)	24,7	115	26	22,60

Reka Ščavnica in delovanje SČN Ljutomer

Raven genotoksičnosti

S testom *Allium* so bili raziskani naslednji vzorci (vzorčenje 13. 08. 2006):

- I. Reka ŠČAVNICA – 50 m pred razbremenilnim kanalom, pred krajem Ljutomer
- II. Neprečiščena pritočna voda v SČN Ljutomer
- III. Čiščena iztočna voda iz SČN Ljutomer
- IV. Reka ŠČAVNICA – 30 m pred iztokom čiščene vode iz SČN Ljutomer
- V. Reka ŠČAVNICA – lokacija pod mostom v kraju Pristava
- VI. Negativna kontrola (vodovodna voda prefiltrirana z AQUA KRISTAL PM 500 R.O.)
- VII. Pozitivna kontrola (10 mg/l ali 10 ppm metil metansulfonata – MMS 4016 SIGMA)

Preglednica: Citološki učinki raziskanih vzorcev - raziskava ravni genotoksičnosti (v odst. t.)

Vzorec	Metafazni Indeks (MI)	Število metafaznih celic	Število metafaznih celic s poškodbami kromosomov	Raven Genotoksičnosti (okt. 2006)	Raven genotoksičnosti (avg. 2003)
I	7,1	200	35	17,5	27,81
II	2,0	200	110	55,0	-
III	5,6	200	37	18,5	-
IV	7,3	200	33	16,5	-
V	8,2	200	32	16,0	58,97
VI	8,5	200	5	2,5	
VII	2,40	200	89	44,50	

(* metafazni indeks pri vzorcih v avg. 2003 ni bil izračunan)

Splošna toksičnost

Preglednica: Dolžina korenin testne rastline *Allium cepa* L. – raziskava generalne toksičnosti (okt. 2006)

Vzorec	I	II	III	IV	V	VI	VII
Povprečna dolžina korenin (mm)	34,8	4,7	30,2	32,1	36,4	39,9	11,3



Reka Ščavnica – kraj Pristava
(2003) zg; in (2006) sp.



MENGEŠKO POLJE

SPREMEMBA KAKOVOSTI PITNE VODE



ALLIUM TEST	Leto raziskave	RAVEN GENOTOKSIČNOSTI
Mengeško polje	Do 2000	> 15,0 % SD ± 2,9
Mengeško polje	Po 2006	< 5,50 % SD ± 1,3

PITNE VODE

Vzorec (embalirana voda)	Allium test	V1	V2	V3	V4	+K	-K
Danska raziskava	Allium A-T test	2,20	4,0	2,20	2,0	22,8 (5 ppm MH)	2,60
Slovenska raziskava	Allium M test	2,50	8,50	8,50	9,0	19,5 (1 ppm MMS)	2,50 (R.O.)

Lokacija	Vzorčenje	Splošna strupenost (mm)	Raven genotoksičnosti (Odst. t.)	Ocena tveganja zdravstvene varnosti
Domžale; Ljubljanska c. 74	08. 10. 2010	35	6,50	
Muretinci 14	17. 10. 2010	33	20,50	
Moškanjci 126	24. 07. 2008	28	19,50	
Moškanjci 125 (studenčna voda)	24. 07. 2008	30	7,0	
Prvenci 29	21. 11. 2010	31	21,50	
Moškanjci 9	16. 06. 2010	32	18,5	
Moškanjci 9 (studenčna voda)	16. 06. 2010	40	5,5	
Muretinci 14	01. 11. 2010	36	19,0	
Muretinci 14	19. 12. 2010	33	23,0	
Domžale; Ljubljanska c. 74	16. 02. 2011	41	2,5	
Muretinci 20 A	13. 03. 2011	31	18,5	
Muretinci 14	25. 06. 2011	32	20,0	
Neg. kontr. (- K)	21.11. 2010	42	2,0	Ničelna
Poz. Kontr. (+ K)	21. 11. 2010	21	20.0	Kritična

- I. Mrzli studenec (Kobarid)
- II. Tresilo (Drežniške Ravne)
- III. Repec (Breginj)
- IV. Negativna kontrola (vodovodna voda filtrirana z R.O. - 50 galonska membrana)
- V. Pozitivna kontrola (1 mg/L ali 1 ppm metil metansulfonata – MMS 4016 SIGMA)

Vzorec in datum vzorčenja	I	II	III	IV	V	P vrednost
15. 09. 2004	7,5*	9,5**	6,5**	2,0	21,0	0,356**
21. 10. 2004	6,5	8,0**	6,0**	2,0	21,0	0,557**
16. 11. 2003	4,5*	6,5**	3,5**	2,0	21,0	0,250**
P vrednost	0,292	0,356	0,250			p < 0,05

VZORČNA MESTA

- Vzorčenje: 06. 06. 2017. Z metodo *Allium* so bili raziskani naslednji vzorci:
- Vrtna zemljina-prst in kapnica iz cisterne, Blatna Brezovica 5B
- Kapnica iz cisterne, Blatna Brezovica 22
- Poljska zemljina-prst, ekološka predelava, Blatna Brezovica
- Reka Ljubljanica, Sinja Gorica
- *Negativna kontrola (filtrirana vodovodna voda z reverzno osmozo; R. O.)*
- *Pozitivna kontrola (1 mg/L ali 1 ppm metan metil sulfamid – MMS 4016 SIGMA)*

- Vzorčenje: 10. 06. 2017
- Vrtna zemljina-prst, Jagrova ul. 8, Vrhnika
- Vrtna zemljina-prst, Ob potoku 13, Vrhnika

Citološki (fitotoksični) učinki raziskanih vzorcev in raziskava ravni genotoksičnosti



KAKOVOST OKOLJSKIH VZORCEV

Vzorec	Metafazni indeks (promil. t. – ‰)	Število metafaznih celic	Metafazne celice s poškodbami kromosomov	Raven Genotoksičnosti (odst. t.)	Povprečna dolžina korenin (mm)
I	95	200	8	4,0	16-18
II	101	200	6	3,0	35-37
III	102	200	6	3,0	33-36
IV	99	200	9	4,5	20-22
V	100	200	35	17,5	22(28)-31
VI	101	200	6	3,0	22-27
VII	106	200	5	2,5	28-30
VIII	103	200	6	3,0	28-30
IX	31	200	42	21	19,0

Vzorčenje: 06. 06. 2017 in 10. 06. 2017; Z metodo *Allium* so bili raziskani naslednji vzorci:

- I. Vrtna zemljina-prst , vrt: Blatna Brezovica 5B
- II. Kapnica , Blatna Brezovica 5B
- III. Kapnica , Blatna Brezovica 22
- IV. Poljska zemljina-prst, ekološka predelava, Blatna Brezovica - Zalaze
- V. Reka Ljubljanica, Sinja Gorica (lok. pri ribiškem domu)
- VI. Vrtna zemljina-prst, Jagrova c. 8, Vrhnika
- VII. Vrtna zemljina-prst, Ob potoku 13, Vrhnika
- VIII. *Negativna kontrola (filtrirana vodovodna voda z reverzno osmozo; R. O.)*
- IX. *Pozitivna kontrola (10 mg/L ali 10 ppm metan metil sulfamid – MMS 4016 SIGMA)*

ADITIVNI IN SINERGISTIČNI UČINEK

Vzorec 1

Pitna vodovodna voda

< 0,05 (ustreznost
raziskanega vzorca)

MDK 0,1 za
posamično snov

0,04; 0,04; 0,03; 0,03
(vse hipotetično
predvidene
koncentracije so
manjše od 0,05)
(< 0,05)

$\Sigma = 0,14$
(aditivna vsota je v
fiz-kem analizah
skrita)

Vzorec 2

Pitna vodovodna voda

< 0,05 (ustreznost
raziskanega vzorca)

MDK 0,1 za
posamično snov

0,01; 0,02; 0,01; 0,02
(vse hipotetično
predvidene
koncentracije so
manjše od 0,05)
(< 0,05)

$\Sigma = 0,06$
(aditivna vsota je v fiz-
kem analizah skrita)

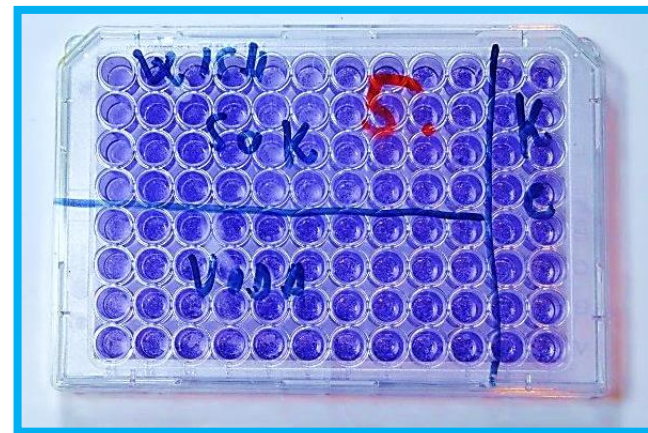
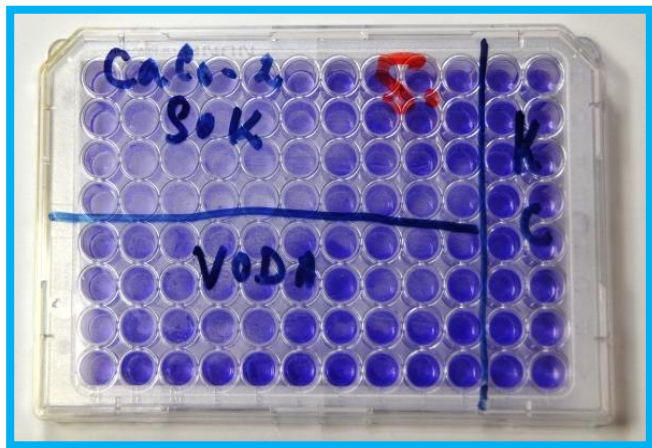


HVALA ZA VAŠO POZORNOST

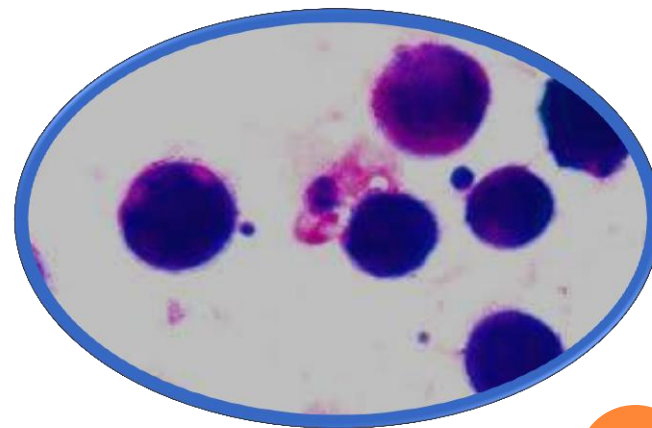
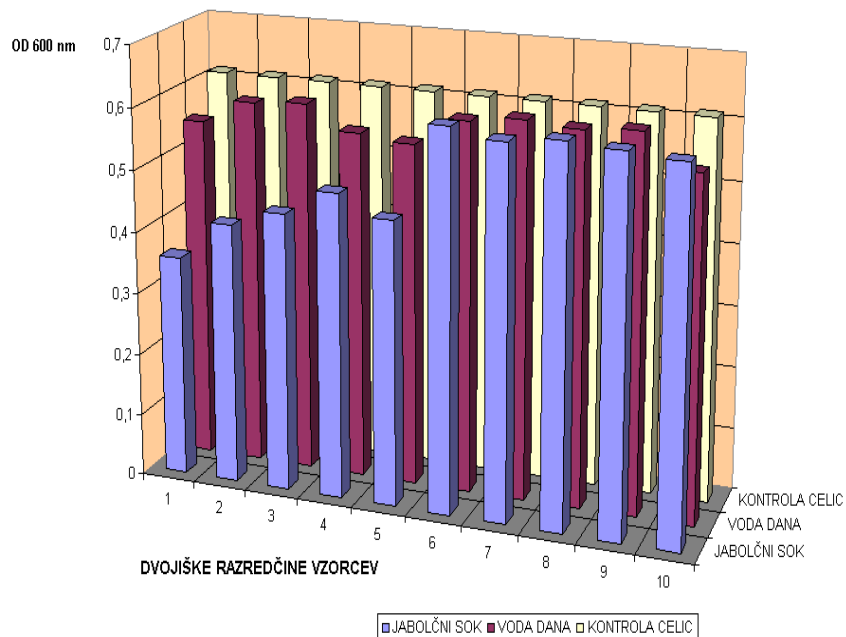
Na zelenih pašnikih mi daje ležišče;
k vodam počitka me vodi

Psalm 23, 2

RAZISKAVA NA RAKASTIH CaCo_2 CELICAH IN HUMANIH AMNIONIJSKIH WISH CELICAH



VPLIV JABOLČNEGA SOKA 100% DAN IN VODE DANA NA RAST CaCo_2 CELIC

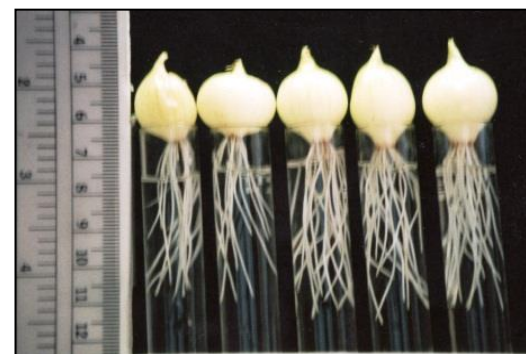


WISH embrionalne celice z MN izolirane iz amnijske tekočine

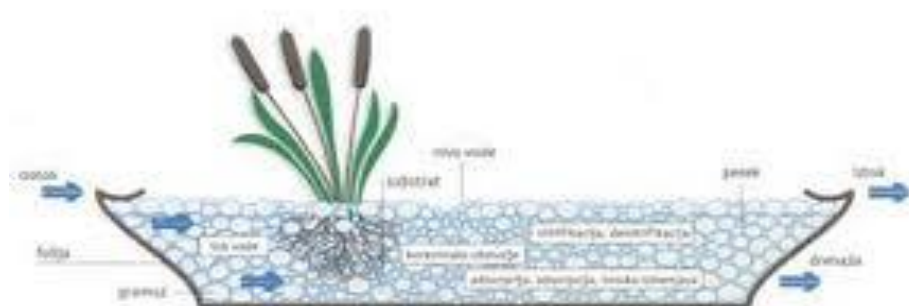
UPORABNOST ALLIUM M TESTA



Influentna voda v RČN



Efluentna voda iz RČN



RČN je oblika ekoremediacije za čiščenje vode s sistemom rastlin in mikroorganizmov

Vzorec	Metafazni indeks (%)	Število metafaznih celic	Metafazne celice s poškodbami kromosomov	Raven Genotoks. (odst. t.)	Povprečna dolžina korenin (mm)
Vtočna voda	37	200	58	29,0*	17
Iztočna voda	95	200	7	3,5*	42
- K	91	200	6	3,0	41
+ K	30	100	31	31,0	12

ZEMLJINA V KRAJU SV. LOVRENC (POSLEDIČNI VPLIV KONTAMINACIJE AGROKEMITACIJE HMELJIŠČ OKOLICO V KRAJU SV. LOVRENC V SAVINSKI DOLINI)

Vzorec	Čas gojenja testnih rastlin (ure)	Število metafaznih celic	Število metafaznih celic s poškodbami kromosomov	Raven mutagen. (odst. t.)	Stopnja stopenosti dolžina korenin (mm)
I	72	200	41	20,5	23,3
II	72	200	37	18,5	25,2
III	72	200	33	16,5	25,4
IV	72	200	21	10,5	32,5
V	72	200	48	24,0	30,4
VI	72	200	39	19,9	31,9
VII	72	200	47	23,5	29,1
VIII	72	200	5	2,50	42,6
IX	72	100	22	22,0	22,5

S testom Allium so bili raziskani naslednji vzorci:

I. Sediment potoka ob travniku 50 m od hmeljišča

II. Talni vzorec zemlje v hmeljišču

III. Talni vzorec zemlje 20 m od hmeljišča

IV. Talni vzorec na travniku 50 m od hmeljišča

V. Isto kot IV (vzorčenje: 16. 07. 2004) – po škropljenju

VI. Talni vzorec na vrtu 100 m od hmeljišča

VII. Isto kot VI (vzorčenje: 16. 07. 2004) – po škropljenju

VIII. Negativna kontrola (vodovodna voda prefiltrirana z R.O. - 50 galonska membrana)

IX. Pozitivna kontrola (1 mg/L ali 1 ppm metan metil sulfamida – MMS 4016 SIGMA)

