

LABORATORIJ ZA RASTLINSKO CITOGENETIKO

Uporaba testa *Allium* za določanje kakovosti voda, 2003

Analitik:

Peter Firbas, univ. dipl. biol.

Zasebni raziskovalec

Raziskovalna organizacija št. 1629 - MŠZŠ

Ljubljanska c. 74

1230 Domžale

Testno poročilo

Uporaba genotoksičnega ALLIUM - testa z navadno čebulo (*Allium cepa* L.), za ocenitev kakovosti pitne vode:

Vodovodna voda (Bežigrad – Ljubljana)
in traktirana z Tahionizacijo

(odvzen in traktiranje vode: 13. 11. 2003)

Naročnik:

Matija Beričič

Pod Plevno 83

4220 Škofja Loka

Domžale, november 2003

LABORATORIJ ZA RASTLINSKO CITOGENETIKO

Uporaba testa Allium za določanje kakovosti voda, 2003

1. IZVLEČEK

*Allium test je test za ugotavljanje genotoksičnosti v vodnih, kopenskih in zračnih ekosistemih in v drugih medijih. Pogostnost kromosomskih okvar (KO) se ugotavlja v celicah rastnih vršičkov korenin testne rastline – navadne čebule (*Allium cepa* L.), kjer dokazujemo potencialne genotoksične snovi. Test upošteva celostne vplive in medsebojno delovanje med genotoksiki in dednim materialom (kromatina, kromosomov).*

*Čebulni testi (*Allium* testi) neprizanesljivo kažejo kakovost vode in se razlikujejo od kemičnih po tem, da pokažejo celokupen učinek onesnaževanja in ne le prisotnosti tistih snovi, ki jih analitska kemija išče s svojimi metodami.*

2. UVOD

Allim test je eden od rastlinskih testov pomemben za raziskave voda (pitne vode, površinske stoječe in tekoče vode, odpadne komunalne vode, izcedne vode deponij in padavinske vode). Že v začetku 70. letih ga je priporočala Kraljevska švedska akademija znanosti (RAYAL SWEDISH ACADEMY OF SCIENCE (1973), kakor tudi GENE - TOX PROGRAM (Grant 1982). Prednost tega testa je tudi v tem, da vodni vzorci ne potrebujejo kakršne koli predhodne obdelave. Istočasno pa se s testom Allium ugotavlja generalna toksičnost in genotoksičnost. Test Allium pokaže odlično korelacijo s testi kjer potekajo raziskave na ribah in sesalcih in vivo (Fiskesjö 1985, Al-Sabti 1992). Rezultati se lahko toko z vso zanesljivostjo ekstrapolirajo na človeka. Test je nadalje primeren za sledenje in nadzor obremenjenosti strupenih snovi v okolju INVITTOX - PROTOKOL 8 (IP - 8 © September 1989). Mednarodni program rastlinskih bioloških testov (International Program on Plant Bioassays IPPS), je test Allium sprejel za biomonitiring in testiranje okoljskih onesnaževalcev. V okviru teh programov je Allim test standardiziran in validiran.

V okolju, zlasti pa v vodah se akumulirajo številne kemikalije, ki jih povzroča industrija z nekontroliranimi izpusti v okolje, nadalje intenzivno kmetijstvo in tudi turizem. Te snovi delujejo v določenih koncentracijah na organizem mutageno, kar povzroča različno stopnjo okvar in poškodb genetskega materiala (Firbas 1999). Da ne govorimo o industrijskih kemikalijah, težkih kovinah, kemikalijah farmacevtskega porekla, hormonskih distruporjih in drugih polutantih. Pesticidni pripravki že v koncentracijah manjših od 0,1 ppb (0,1 µg/l) deloma inhibirajo rast korenin testnih rastlin, ter povzročajo kromosomske in kromatinske poškodbe v celicah (Firbas 2003).

3. MATERIAL IN METODE

Test se izvaja po: Technical Methods Section 1993, 1994; INVITTOX - Protokol No. 8, 1989, Fiskesjö, 1985, Al-Sabti 1989, Nielsen 1994.

Za vsak vzorec in obe kontroli se uporabi pet čebulic *Allium cepa* L. Vsi vzorci, kakor tudi obe kontroli se na določenem mediju gojijo 72 ur. Dolžine korenin testnih rastlin podajajo rezultate generalne toksičnosti. V celicah rastnih vršičkov teh korenin pa se ugotavljajo poškodbe kromosomov, ki podajajo nivo genotoksičnosti. Negativna kontra je vodovodna voda prefiltrirana z dvostopenskim filtrirnim sistemom AQUA CRISTAL 300. Za pozitivno kontrolo pa 10 µg/L metil metan sulfonat - MMS (SIGMA, M 4016).

Citogenetske raziskave potekajo na raziskovalnem mikroskopu znamke OLYMPUS - BX 41 (Japonska) z avtomatskim fotosistemom PM 10 SP, pri povečavi 400X in 1000X.

LABORATORIJ ZA RASTLINSKO CITOGENETIKO

Uporaba testa *Allium* za določanje kakovosti voda, 2003

4. REZULTATI IN DISKUSIJA

Rezultati za generalno toksičnost so podani v Tabeli 1, ter za genotoksičnost v Tabeli 2.

S testom *Allium* so bili raziskani naslednji vzorci:

- I. **Vodovodna voda – Bežigrad - Ljubljana**
- II. **Tahionizacija vode**
- III. Negativna kontrola (vodovodna voda prefiltrirana z AQUA CRISTAL 300)
- IV. Pozitivna kontrola (10 µg/L MMS - SIGMA).

K izvedbi čebulnega (*Allium*) testa še sodita, tako imenovani negativna in pozitivna kontrola.

Negativna kontrola pokaže kolikšen je nivo strupenosti pri neizpostavljenih čebulah in hkrati kontrola, da test sploh deluje.

Pozitivna kontrola pa se uporablja z znano snovjo, ki v večji meri povzroča nivo strupenosti in je potrebna za kontrolo odzivnosti testa. Skratka z drugimi besedami: bliže so rezultati raziskanih vzorcev negativni kontroli boljše je kakovost vode; ali bolj se rezultati oddaljujejo od negativne kontrole in so bliže pozitivni kontroli slabša je kakovost vode.

4. 1. Generalna toksičnost

Tabela 1. Povprečna dolžina korenin testne rastline *Allium cepa* L. – raziskava generalne toksičnosti (odvzem vodnih vzorcev: 13. 11. 2003)

Vzorec	I	II	III	IV
Povprečna dolžina korenin (mm)	38,2	38,4	41,2	22,7

1. Vodovodna voda (Vzorec I) in traktirana vode s tahionizacijo (Vzorec II) se statistično glede na generalno toksičnost minimalno razlikujeta.
2. Vodovodna pitnih voda (Vzorec I) in tahionizirana voda ima glede na povprečno dolžino korenin statistično daljše korenine od vzorcev pozitivne (Vzorec IV) in nekoliko krajše korenine od negativne kontrole (Vzorec III).

4. 2. Genotoksičnost

Rezultati citološke analize so podani v Tabeli 2.

Opažene so bile naslednje poškodbe kromosomov:

najpogostejši so zlomi kromosom v primarni zožitvi (centromerni regiji)

sledijo enojni zlomi kromatid in dvojni zlomi kromatid

najredkejši so acentrični krožni kromosom.

Tabela 2. Citološki učinki raziskanih vzorcev in obeh kontrol - raziskava genotoksičnosti (odvzem vodnih vzorcev: 13. 11. 2003)

LABORATORIJ ZA RASTLINSKO CITOGENETIKO

Uporaba testa Allium za določanje kakovosti voda, 2003

Vzorec	Čas gojenja testnih rastlin (ure)	Število metafaznih celic	Število metafaznih celic s poškodbami kromosomov	Nivo genotoksičnosti (v %)
I	72	141	14	9,92
II	72	162	9	5,55
III	72	262	11	4,23
IV	72	141	33	23,40

Nivo genotoksičnosti (Al-Sabti 1989) se podaja kot odstotkovno razmerje med vsemi metafaznimi celicami in s celicami s poškodbami kromosomov (Za test se pregleda do 130 ali več metafaznih celic, kar je po izračunanem metafaznem indeksu okrog 3 % vseh celic)

Metafazni indeks: Od 1000 celic, jih je 30 v fazi metafaze celične delitve (mitoza).

1. Vzorec pitne vode traktirano z tahionizacijo (Vzorec II) ima statistično zmanjšan nivo genotoksičnosti od predhodne pitne vode (Vzorec I).
2. Vsi vzorci pa imajo nižji nivo genotoksičnosti od vzorca pozitivne kontrole (Vzorec IV).

5. ZAKLJUČEK

1. Traktirana voda z tahionizacijo ima nižji nivo genotoksičnosti od vodovodne vode.
2. Po spektru rezultatov generalne toksičnosti in nivoja genotoksičnosti med pozitivno in negativno kontrolo je traktirana voda višje kakovosti od vodovodne vode.

6. REFERENCE

- ROYAL SWEDISH ACADEMY OF SCIENCE (1973). Ambio 3.
GRANT W. F. (1982). Mutation Research, 99.
FISKESJÖ G. (1985). Hereditas, 102.
INVITTOX - PROTOKOL No. 8, IP - 8 ©. (FISKESJÖ G., 1989)
AL-SABTI K. (1989). Cytobios, 58.
TECHNICAL METHODS SECTION. Environmental Toxicology and Water Quality - © 1993, 1994 John Wiley & Sons, Inc. (FISKESJÖ G. (1993, 1994).
NIELSEN M. H. (1994). Hereditas 121.
FIRBAS P. (1999). DELO - Znanost, 8. Dec. 1999.
FIRBAS P. (2003). DELO - Znanost, 7. Apr. 2003.

Domžale, 22. november 2003

Peter Firbas, univ. dipl. biol.

PETER FIRBAS univ. dipl. biol.
ZASEBNI RAZISKOVALEC
VARSTVO OKOLJA
- CITOGENETIKA

Ljubljanska c. 74
1230 Domžale