



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

Naročnik
4VIVUS d.o.o.
Zgoša 23, SI – 4275 Begunje

Testni material: steklenica FLAŠKA 0,50

Raziskani vzorec:

Pitna vodovodna voda; Muretinci 14, SI – 2272 Gorišnica (vzorčenje 05. 06. 2011)

Isto – traktacija v testnem materialu

Citogenetske raziskave so potekale od 25. 06. do 28. 06. 2011

DOMŽALE
28. JUNIJ 2011

TESTNO POROČILO Z REZULTATI RAZISKAV PODAJA

1. Protokol *ALLIUM* metode
2. Rezultate splošne strupenosti (toksičnosti) in raven genotoksičnosti vzorca pitne vodovodne vode traktirane v steklenici FLAŠKA 0,5
3. Traktirani Pitni vodovodni vodi v steklenici FLAŠKA 0,50 kakovost vode izboljšša (iz 20,0 odst. t. na 11,0 odst. t.; $p = 0,0183 < 0,05$)
4. Poročilo obsega 4 strani in 3 tabele in 4 fotografije v prilogi.

Raziskave v rastlinski aplikativni citogenetiki

PETER FIRBAS *univ. dipl. biol.*

Ljubljanska c. 74, SI – 1230 Domžale

E-pošta: peter.firbas@siol.net

PROTOKOL TESTA

ALLIUM METAFAZNI GENOTOKSIČNI TEST ZA TESTIRANJE OKOLJSKIH VZORCEV, KEMIKALIJ IN PITNE VODE

Peter Firbas

Peter Firbas, univ. dipl. biol., Zasebni raziskovalec
Laboratorij za rastlinsko citogenetiko, E-pošta: peter.firbas@siol.net

1. Uvod

ALLIUM metafazni test je test za ugotavljanje splošne celične strupenosti (citotoksičnosti) in ravni genotoksičnosti v vodnih, kopenskih in zračnih ekosistemih, kjer dokazujemo potencialne genotoksične snovi. Test je kratkotrajen in pokaže usklajen in celokupen učinek onesnaževanja in medsebojno delovanje med testno rastlino (*Allium cepa* L.) in potencialnimi genotoksiki, nakar se še rezultati statistično ovrednotijo. Rezultate raziskav s statistično kalkulacijo prikazuje Fisher's Exact Test. V 2x2 frekvenčnih tabelah dvosmerna p-vrednost determinira statistično značilnost ali neznačilnost dveh kategoričnih vzorcev.

Biološki test *ALLIUM* ali čebulni test razkriva celosten vpliv na rast in razvoj živih celic ali organizmov ter zaznava prisotnost škodljivih snovi v koncentracijah, ki so bistveno nižje od mejnih sposobnosti analitskih metod. Od približno 700 prepoznavnih toksičnih in genotoksičnih snovi, ki se lahko znajdejo na primer v pitni vodi, jih z običajnimi fizikalno-kemijskimi analizami nadzorujemo le slabih 10 odstotkov (Vir: EU Chemical Bureau, Natural Resources Defence Council: Think before you drink).

2. Material in metode

Test se izvaja po: Technical Methods Section 1993, 1994; INVITTOX - Protokol No. 8, 1989, Fiskesjö, 1985, Al-Sabti 1989, Nielsen & Rank 1994, Rank 2003, Firbas 2004, 2006, 2011; Kumar P. in Panneerselvam N. (2007); Ragunathan I. in Panneerselvam N. (2007).

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

2.1. Parametri *ALLIUM* metafaznega testa

Parametri: splošna strupenost, raven genotoksičnosti, metafazni indeks, statistična kalkulacija

SPLOŠNA STRUPENOST podaja dolžino korenin testnih rastlin mlade čebule (*Alliu cepa* L.); je obratno sorazmerni z dolžino korenin testnih rastlin. Daljše kot so korenine manjša je splošna toksičnost in krajše kot so korenine testnih rastlin večja je splošna strupenost (toksičnost) (fotografiji 1 in 2).

RAVEN GENOTOKSIČNOSTI podaja poškodbe kromosomov v celicah koreninskih vršičkov testnih rastlin mlade čebule (*Allium cepa* L.); je odstotkovno razmerje med vsemi metafaznimi celicami in s celicami s poškodbami kromosomov. Rezultati se podajajo v odstotnih točkah (odst. t.). Identificira se do 200 metafaznih celic. V primeru velike ravni genotoksičnosti zadostuje pregled manjšega števila celic. Rezultati se prav tako podajajo v odstotnih točkah (odst. t.), (fotografiji 3 in 4).

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 kategoričnih 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
3	Ničelna do Nizka	5 mg NO ₃ /l
5		
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. 2. Kontrola *ALLIUM* metafaznega testa in inhibicija rasti korenin

Ugotovitev, da test *ALLIUM* sploh deluje potekata vzporedno ob raziskanem vzorcu še 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 – AK 500 R.O.). Za pozitivno kontrolo pa 1 mg/L ali 1 ppm metil metansulfonat 66-27-3 200-625-5 – MMS 4016 SIGMA. **Negativna kontrola** pokaže kolikšna je stopnja strupenosti pri ne izpostavljenih čebulah in hkrati kontrola, da test sploh deluje. **Pozitivna kontrola** pa se uporablja z znano kemično snovjo, ki v večji meri povzroča stopnjo strupenosti in je potrebna za kontrolo odzivnosti testa (preglednica 2).

Preglednica 2. Odzivnost in delovanje testa *ALLIUM* v pozitivni in negativni kontroli

ALLIUM TEST	SPLOŠNA STRUPENOST	RAVEN GENOTOKSIČNOSTI
NEGATIVNA KONTROLA	41,4 mm SD ±2	2,0 % SD ±1
POZITIVNA KONTROLA	21,7 mm SD ±2	21,50 % SD ±3

1 ppm (10⁻⁶) je en del snovi na milijon delov raztopine (1mg/L)

1 ppb (10⁻⁹) je en del snovi na milijardo delov raztopine (1µg/L)

1 ppm = 1000 ppb

MMS 4016 SIGMA – metil metansulfonat (Methaensulfonic Acid Methyl)

SD – Standardna deviacija (Standardni odklon)

