

UNIVERZA V LJUBLJANI
PEDAGOŠKA FAKULTETA
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
Program: Biologija in gospodinjstvo

**CITOLOŠKE ANALIZE PITNIH VODA V ŠALEŠKI DOLINI Z UPORABO
BIOTESTA (*ALLIUM TEST*)**

Diplomsko delo

Kandidatka: Andreja Tkavc
Mentorica: prof. dr. Alenka Gaberščik
Somentorica: dr. Erika Glasenčnik

Ljubljana, januar 2008

Zahvala

Najlepša hvala dr. Eriki Glasenčnik, ki me je prijazno in vzpodbudno spremljala na poti nastajanja diplomskega dela ter pomagala s koristnimi nasveti.

Zahvaljujem se tudi prof. dr. Alenki Gaberščik za vso pomoč in dobro voljo.

Prof. dr. Alenki Gaberščik, prof. dr. Marini Dermastia in prof. dr. Barbari Bajd se zahvaljujem za hiter in strokovnen pregled diplomske naloge.

Hvala tudi vsem prijateljicam in prijateljem, ki so mi in mi še popestrijo življenje in stojijo ob meni v dobrem in slabem, ter sošolkam, ki so mi krajšale študijske dni in mi še vedno polepšajo dan.

Mojci, Gorazdu in Janci se zahvaljujem za podporo, ki bi jo morala dobiti drugje.

Nazadnje pa gre srčna hvala še mojemu Žigcu, brez katerega mi nikoli ne bi uspelo...

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija Biologije in gospodinjstva. Opravljeno je bilo na Katedri za ekologijo rastlin Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, ter na inštitutu ERICo v Velenju.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je potrdila temo in naslov diplomskega dela ter za mentorico potrdila prof. dr. Alenko Gaberščik ter za somentorico dr. Eriko Glasenčnik.

Komisija za zagovor in oceno:

Predsednica: prof. dr. Marina Dermastia

Nacionalni inštitut za biologijo in Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Barbara Bajd

Univerza v Ljubljani, Pedagoška fakulteta

Članica: prof. dr. Alenka Gaberščik

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 25.1.2008

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Andreja Tkavc

Kazalo vsebine:

1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ONESNAŽENJE OKOLJA.....	3
2.2 GENOTOKSIČNOST.....	3
2.3 BIOINDIKACIJA, BIOTEST.....	4
2.4 PITNA VODA	5
2.5 CELIČNI CIKEL	7
2.6 KROMOSOMI.....	10
2.7 GENOTOKSIČNI UČINKI NA KROMOSOME	10
3 MATERIALI IN METODE DELA	14
3.1 OPIS VZORČNIH MEST	14
3.2 ŠALOTKA KOT OBJEKT RAZISKOVANJA	14
3.3 NASTAVITEV IN POTEK TESTA.....	15
3.4 LABORATORIJSKE ANALIZE VZORČENIH VOD	16
3.5 DOLŽINSKI PRIRASTEK KORENIN ZA OCENITEV TOKSIČNOSTI	16
3.6 CITOLOŠKE ANALIZE.....	16
3.6.1 Priprava mečkancev	16
3.6.2 Mitotski indeks	17
3.6.3 Kromosomske aberacije.....	18
3.6.4 Mikronukleus	19
4 REZULTATI	20
4.1 REZULTATI KEMIJSKE ANALIZE VODE	20
4.2 DOLŽINSKI PRIRASTEK KORENIN ZA OCENITEV TOKSIČNOSTI	21
4.3 REZULTATI CITOGENETSKE ANALIZE	23
4.3.1 Mitotski indeks	23
4.3.2 Kromosomske aberacije.....	26
4.3.3 Mikronukleus	37
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	38
5.1 ONESNAŽENOST PITNE VODE.....	38
5.2 DOLŽINSKI PRIRASTEK KORENIN	38

5.3	MITOTSKI INDEKS	39
5.4	KROMOSOMSKE ABERACIJE.....	40
5.5	MIKRONUKLEUS.....	41
5.6	UPORABA TESTA V PEDAGOŠKEM PROCESU – ANALIZA UČNIH NAČRTOV ZA DEVETLETNO OSNOVNO ŠOLO V POVEZAVI S TEMO DIPLOMSKEGA DELA	41
6	POVZETEK	45
7	SUMMARY	46
8	VIRI IN LITERATURA.....	47
9	PRILOGE	50

Kazalo slik:

Slika 1	Vodotoki Šaleške doline	7
Slika 2	Faze celičnega cikla	8
Slika 3	Mitoza.....	9
Slika 4	Zaostali kromosom v metafazi	11
Slika 5	Zaostali kromosomi v anafazi.....	11
Slika 6	Mostiček v anafazi	12
Slika 7	Zlepljenje v metafazi.....	12
Slika 8	Diagonalno postavljena celica.....	12
Slika 9	Mikronukleusa	13
Slika 10	Zunanji izgled in prerez koreninskega vršička	17

Kazalo tabel:

Tabela 1	Rezultati terenskih, kemijskih in mikrobioloških meritev vzorčenih vod	20
Tabela 2	Povprečni dolžinski prirastek korenin (mm) glede na dolžino koreninic kontrole za ocenitev toksičnosti (48 in 120 h) pri izbranih vzorcih vode.....	21
Tabela 3	Povprečen mitotski indeks vzorca	23
Tabela 4	Značilnosti razlik v mitotskih deležih med vodnimi vzorci (medparni test Mann-Whitney U)	25
Tabela 5	Delež kromosomskih aberacij vzorcev vode	26
Tabela 6	Značilnosti razlik v deležih kromosomskih aberacij med vodnimi vzorci (medparni test Mann-Whitney U)	28

Kazalo grafov:

Graf 1	Relativna dolžina korenin šalotke po 48-ih in 120-ih urah glede na kontrolo	22
Graf 2	Delež profaz, metafaz, anafaz, telofaz in interfaz glede na povprečno število preštetih celic	24
Graf 3	Mitotski indeks	24
Graf 4	Delež vseh aberacij	27
Graf 5	Delež zaostalih kromosomov v anafazi in metafazi	29
Graf 6	Delež zaostalih kromosomov	30
Graf 7	Delež mostičkov v anafazi in metafazi	31
Graf 8	Delež mostičkov	32
Graf 9	Delež zlepiljenj v anafazi in metafazi	33
Graf 10	Delež zlepiljenj	34
Graf 11	Delež fragmentov	35
Graf 12	Delež diagonalno postavljenih celic	36

Kazalo prilog:

Priloga 1	Popisni list štetja celic	51
Priloga 2	Popisni list štetja kromosomskih aberacij.....	52
Priloga 3	Primer rezultatov terenskih, kemijskih in mikrobioloških analiz vzorčenih vod za V1.....	53
Priloga 4	Primer delovnega lista za učence za dan nastavitev čebulnega testa	54
Priloga 5	Primer delovnega lista za učence ob koncu čebulnega testa.	55

1 UVOD

Voda je najpomembnejša sestavina človeškega telesa, saj je telo vsebuje do 75 %. Za normalno delovanje funkcij organizma in posledično zdravja dnevno potrebujemo 2,5 litra vode. Nekaj vode dobimo s hrano, ostalo moramo zagotoviti s pitjem. Kemijsko čista voda je sestavljena iz dveh atomov vodika in enega atoma kisika, vsi so povezani v molekule vode (H_2O) in brez drugih molekul predstavljajo demineralizirano (destilirano) vodo. V naravi le redko najdemo vodo v taki čisti obliki. Voda v naravi kroži, zato lahko vanjo pridejo številni minerali in toksične snovi. Slovenija je ena izmed držav sveta, kjer (še) lahko pijemo vodo neposredno iz vodovodnega omrežja. Nakup embalirane vode pri nas še ni potreben, čeprav se trend kupovanja ustekleničene vode iz leta v leto vztrajno povečuje.

Živimo v času, ko na okolje in organizme deluje mnogo različnih dejavnikov. Mnogih med njimi niti še ne poznamo, nekatere smo že spoznali za kancerogene, nekatere šele spoznavamo. Testov, ki bi lahko dokazali škodljivost substanc, ki bi bili hitri, poceni in bi podali dejanske rezultate, je malo. Največkrat se zanašamo na kemijske teste, ki pa nam podajo omejene rezultate. Na podlagi kemijskih rezultatov je vplive na celoten organizem težko predvideti. Citogenetski testi nam povedo ali snov škodljivo deluje na organizem ali ne.

Eden izmed njih je tudi *Allium test*, ki je bil priporočen tudi kot rutinski preiskovalni test z mnogimi prednostmi. Kot rutinski test ga je priporočila tudi Royal Swedish Academy of Sciences leta 1973.

Višje rastline so zelo primerni testni sistemi za monitoring mutagenov v okolju, kakor tudi za raziskave osnovnih mehanizmov delovanja posameznih znanih mutagenov v znanih koncentracijah. Razlogov za uporabo rastlinskih testnih sistemov je mnogo in sicer: rastline je lahko skladiščiti, z njimi je lahko rokovati, kromosomi so zaradi velikosti primerni za citološke analize, so relativno poceni testni material in kar je

najvažnejše, kažejo dobro korelacijo z drugimi testnimi sistemi (Smaka-Kincl, 1993; Glasenčnik, Ribarič-Lasnik in sod., 2002).

V diplomskem delu smo z uporabo biotesta skušali dokazati, da je vodovodna voda v Šaleški dolini primerna za pitje tudi s cito in genotoksičnega vidika. Glede na deleže posameznih faz mitoze smo izračunali mitotski indeks, glede na število aberantnih faz pri celičnih delitvah pa delež kromosomskih aberacij. Pričakujemo normalen mitotski indeks, malo mikronukleusov ter neizstopajoče podatke o posameznih kromosomskih aberacijah. To bi potrdilo domnevo, da v vodi ni prekomernih koncentracij onesnažil, ki bi vplivale tudi na človeški organizem.

Test je bil razvit v namen nacionalnega raziskovalnega projekta šifra L4-6222, z naslovom »Biološki testi za ugotavljanje toksičnosti in genotoksičnosti vode, zemlje in hrane«, narejenega pod okriljem Agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije in izvajalci: Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani; ERICo, Velenje, Inštitut za ekološke raziskave; Kemijski inštitut Ljubljana in Inštitut za fizikalno biologijo d.o.o.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ONESNAŽENJE OKOLJA

Onesnaženje okolja je neposredno ali posredno vnašanje snovi ali energije v zrak, vodo ali tla ali povzročanje odpadkov in je posledica človekove dejavnosti, ki lahko škoduje okolju ali človekovemu zdravju ali posega v lastninsko pravico tako, da poškoduje ali uniči predmet lastninske pravice ali posega v njeno uživanje ali v pravico do rabe okolja (Ur. l. RS 41/2004).

Šaleška dolina je bila v preteklih desetletjih med okoljsko najbolj obremenjenimi regijami v Sloveniji. Vodilni gospodarski dejavnosti sta s svojim delovanjem pustili velike okoljske posledice. Premogovništvo in pridobivanje električne energije spremnjata kvaliteto in fiziognomijo regij z emisijami nevarnih dimnih plinov, pepela in drugih produktov, ki nastanejo šele pri pridobivanju termoenergije ter s spremenjanjem reliefa montanogenega ugrezanja površja. Šaleška dolina je zaradi svoje obremenjenosti z raznolikimi onesnaževali vzorčni primer, kjer na kontaminacijo vplivajo številne toksične snovi, zapletene in nam pogosto nepoznane strukture in kjer za potrebe izvajanja ukrepov izboljševanja stanja okolja zgolj izvajanje rutinskih fizikalno-kemijskih raziskav ni dovolj. Biološke metode, ki se v takšnih primerih izkažejo primerne za vrednotenje (geno)toksičnosti, se v nadaljevanju lahko uporabijo za dopolnitev monitoringa okolja na državni ravni (Osojnik-Črnivec, Marinšek-Logar, 2004).

Res pa je, da zaradi lege in vremenskih razmer v dolini ni intenzivnega kmetijstva, ki bi podtalnico onesnaževalo s pesticidi ali pa gnojili.

2.2 GENOTOKSIČNOST

Genotoksičnost je vpliv dejavnikov, ki toksično (škodljivo, strupeno) vplivajo na dedni material (kromosome) organizma.

Genotoksičnost lahko izražamo v odstotkih. Višja stopnja genotoksičnosti pomeni slabšo kakovost vode z vidika genotoksičnosti.

Spremembe dednega materiala v organizmih se v naravi pojavljajo v majhnih deležih same po sebi, vendar obstajajo popravni mehanizmi organizmov, ki škodo popravijo ali pa jo omejijo. Le redko lahko take poškodbe povzročijo nefunkcionalnost organizma in posledično njegov propad, zato stopnja genotoksičnosti ne more biti 0 %. Genotoksičnost se pokaže, kadar je stopnja poškodb dednega materiala višja od normalnih vrednosti. V literaturi zasledimo normalne vrednosti za pitno vodo od 3 do 5 % (Vidakovič s sod., 1993).

2.3 BIOINDIKACIJA, BIOTEST

Bioindikacija je metoda uporabe indikatorskih organizmov za ugotavljanje kakovosti njihovega življenjskega okolja in je uporabna za sledenje sprememb okolja, ki so naravnega ali antropogenega izvora (Batič, 1997a, 1997b).

Bioindikatorji so organizmi, ki nam kažejo, kako se določeni dejavniki okolja spremenjajo. Pojem bioindikacije sta dokončno opredelila Schubert (1985) in Arndt (1987), ki definirata bioindikator kot organizem, ki s svojo zgradbo, kemično sestavo, razširjenostjo in življenjskimi funkcijami specifično odraža vpliv delovanja enega ali več onesnažil. Z uporabo bioindikatorjev lahko direktno ovrednotimo vplive škodljivih snovi na živa bitja. Bioindikacija oziroma biomonitoring ne more nadomestiti fizikalno-kemijskih meritev onesnažil, ampak služi zgolj za dopolnjevanje in boljšo interpretacijo le-teh. Bioindikacija in biomonitoring igrata pomembno vlogo pri indikaciji in dokazovanju učinkov snovi, katerih vsebnost je pod mejo detekcije analitskih metod ter pri ocenjevanju učinkov po zaključeni izpostavitvi v normalnih razmerah. Izraza bioindikacija ali bioindikator se danes največkrat pojavljata v povezavi z onesnaženjem okolja, vendar je njuna uporaba smotrna v vseh primerih,

kadar na osnovi informacij organizmov sklepamo, kakšne so razmere v njihovem življenjskem okolju (Glazenčnik, 2007; Batič, 1997a, 1997b).

Za razliko od kemijo-fizikalnih analiz so druga skupina analiz biotesti (ekotoksikološki pristop), s katerimi dokazujemo biološke vplive v vzorcih prisotnih toksičnih (ki kvarno vplivajo na organizem) in genotoksičnih (ki kvarno vplivajo na dednino, torej DNK) snovi na žive organizme. Z biotesti dobimo hiter, zanesljiv, nedvoumen ter celovit odgovor o škodljivem delovanju toksičnih snovi. Kljub izrednemu napredku še vedno nimamo instrumenta za merjenje toksičnosti. Vedno moramo uporabiti živ organizem in »izmeriti« njegov odgovor. Z biotesti za (geno)toksičnost dobimo celovit odgovor na to, kako se organizem počuti v vodi ali tleh in izmerimo intenzivnost njegovega odgovora (Marinšek-Logar in sod., 2003; Lah in sod., 2007).

2.4 PITNA VODA

Pitna voda je: 1. voda v njenem prvotnem stanju ali po pripravi, namenjena pitju, kuhanju, pripravi hrane ali za druge gospodinjske namene, ne glede na njeno poreklo in ne glede na to, ali se dobavlja iz vodovodnega omrežja sistema za oskrbo s pitno vodo, cistern ali kot predpaketirana voda, 2. vsa voda, ki se uporablja za proizvodnjo in promet z živili (Ur. l. RS 19/2004).

Predpis, ki ureja kakovost pitne vode, je Pravilnik o pitni vodi (Ur. l. 19/04). Usklajen je z ustrezno direktivo Evropske unije. Kakovost mora biti pod stalnim nadzorom, ki je po naši zakonodaji dvojen: notranji in zunanji.

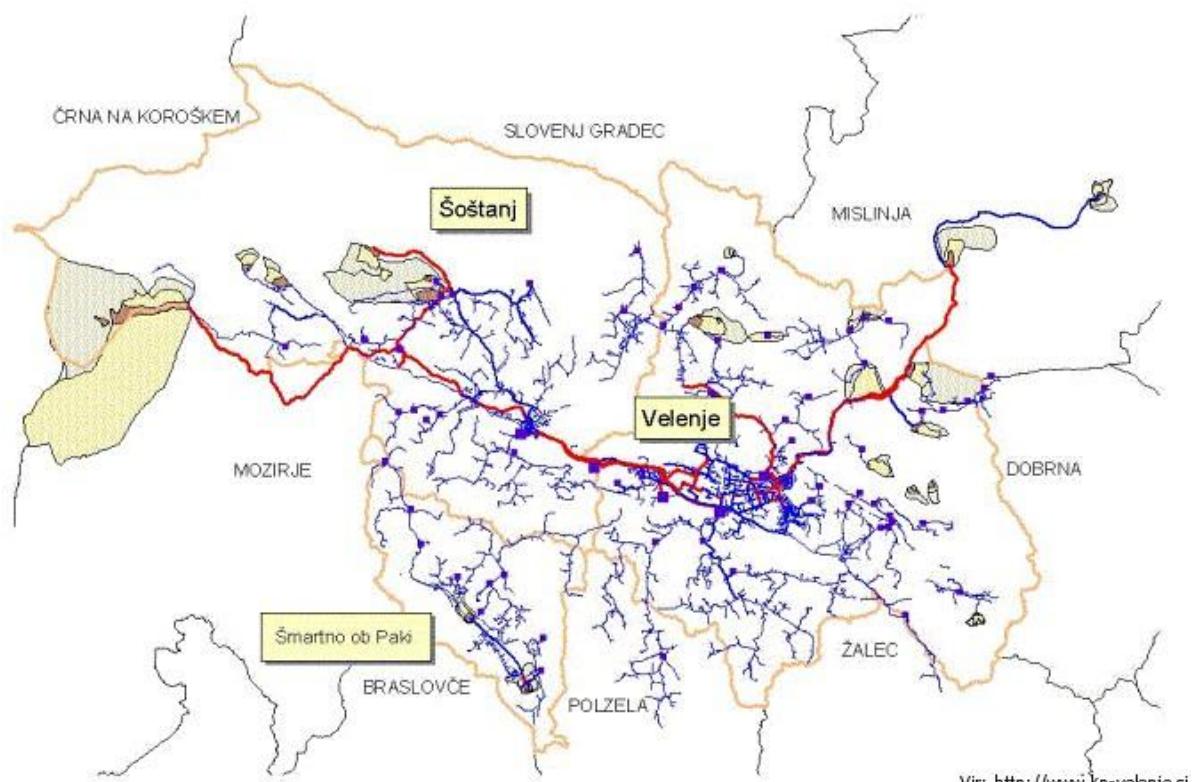
Notranji nadzor zagotavlja upravljalec vodovoda. Ta nadzor mora biti urejen glede na direktive HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point - analiza tveganja in obvladovanje kritičnih kontrolnih točk) sistema, kar pomeni, da je treba vodo

spremljati od zajema do porabe (Ur. l. 52/00). Nadzor zagotavlja stalen visok nivo varnosti pitne vode, ki ga samo z vzorčenjem ne bi mogli zagotoviti.

Monitoring (spremljanje) je oblika zunanjega nadzora oziroma preverjanje ali pitna voda izpolnjuje zahteve Pravilnika o pitni vodi (Ur. l. 19/04), zlasti zahteve za mejne vrednosti parametrov (skladnost – pomeni, da so izmerjene vrednosti v okviru v pravilniku predpisanih mejnih vrednosti). Zagotavlja ga državni organ: Ministrstvo za zdravje. V ta namen je minister imenoval nosilca monitoringa – Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije in izvajalca monitoringa – Zavod za zdravstveno varstvo Maribor, ki pripravita in izvedeta program monitoringa. Le-ta določa mesta vzorčenja, pogostost vzorčenja, vzorčevalce in laboratorije, ki izvajajo preskušanje vzorcev. Glede parametrov mora biti izdelan v skladu s pogoji Pravilnika o pitni vodi. Vzorci iz posameznega sistema za oskrbo s pitno vodo morajo biti reprezentativni za pitno vodo, ki se uporablja prek celega leta. Mesto vzorčenja je objekt, ki je opredeljen z imenom objekta in naslovom. Praviloma se določi javni objekt, kot so vrtci, šole, restavracije idr., prednostno vrtci, ki obratujejo vse leto. Če v oskrbovanem območju ni javnega objekta se določi bivalni objekt. Mesto vzorčenja se praviloma ne spreminja. Na mestu vzorčenja vzorčevalec določi odvzemno mesto – pipo. Vzorčenje mora biti opravljeno po navodilih v programu, ki natančneje določa kriterije za vzorčenje in tehniko odvzema vzorca. Navodila so objavljena na spletni strani <http://www.ivz.si/ivz> (<http://www.gov.si/pitna-voda/faq/faq1.html>).

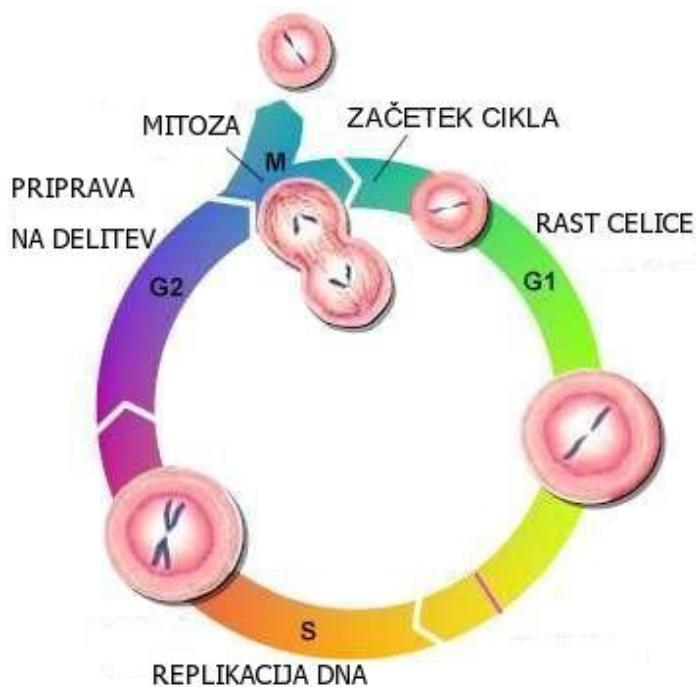
V Šaleški dolini imajo kar 47 črpališč ter 29 vodnih virov (zajetij in vrtin), ki jih varujejo z vodovarstvenimi pasovi. Vodotoki Šaleške doline so vidni na Sliki 1. V PE Vodovod-kanalizacija stanje vodooskrbnih sistemov kontrolirajo s pomočjo daljinskega nadzora. Na njihovih zajetjih v skladu z monitoringom za pitne vode kontinuirano izvajajo meritve za kontrolo kvalitete vode: motnost, pH vrednost, elektroprevodnost, količino klora, ki se dodaja v vodo in količino prostega klora v vodi, prisotnost klora v prostoru in še druge meritve. Na zajetju Ljubija in na zajetju v Topolšici imajo tudi biološki kontrolnik vode. Ti podatki se preko celega dne

kontinuirano zbirajo v njihovem oskrbovalnem centru na Čistilni napravi za pripravo pitne vode Grmov Vrh. Oskrbovalci so tako ves čas seznanjeni s stanjem na omrežju in v primeru potrebe lahko takoj ukrepajo. V skladu z monitoringom izvajajo tudi tedenske meritve klora v vodi pri številnih porabnikih po celotnem omrežju (www.kp-velenje.si).



2.5 CELIČNI CIKEL

Celični cikel je proces, ki poteka od nastanka celice do njene delitve. Sestavlja ga zaporedje štirih faz, ki se ciklično ponavljajo v istem vrstnem redu (zato celični cikel) (glej Sliko 2).



Slika 2: Faze celičnega cikla

(Vir: <http://learninglab.co.uk/headstart/cycle3.htm>).

Po delitvi materinske celice v dve hčerinski se slednje nahajajo v fazi rasti G₁ (growth). To je faza kjer kot proces prevladuje transkripcija dednega materiala v proteine. Služi izgradnji celice.

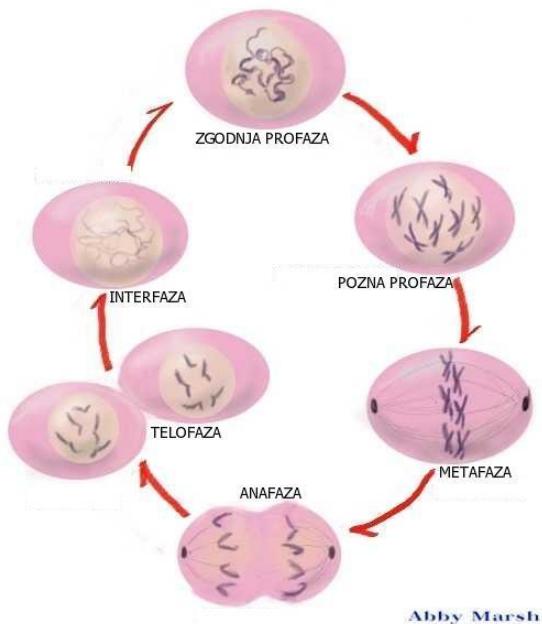
G₁ fazi sledi S (synthesis) faza, kjer je osrednji proces podvajanje dednega materiala.

S fazi sledi G₂ faza. V njej se celica pripravi na mitozo. Sintetizirajo se proteini, ki so potrebni za mitozo: za kondenzacijo kromosomov in formacijo delitvenega vretena.

Faza M je faza mitotske delitve.

Celica lahko preide tudi v stanje G_0 , ki je stanje mirovanja celice.

Pri *Allium* testu je pomembna faza mitoze (M), Slika 3, saj se v njej podvoji dedni material in takrat lahko nastajajo kromosomske aberacije – poškodbe dednega materiala.



Slika 3: Mitoza

(Vir: <http://www.dartmouth.edu/~cbbc/courses/bio4/bio4-lectures/theCell.html>).

Začetek mitoze se začne s profazo. Kromatin, ki je nosilec dednih lastnosti sestavljen iz DNK in histonskih beljakovin, se kondenzira – krči in zvija. Kondenzacija kromatina se v naslednji fazi, prometafazi, nadaljuje. V metafazi se iz kromatina dokončno oblikujejo kromosomi, ki so razporejeni v ekvatorialni ravnini celice. Vsak kromosom je zgrajen iz dveh kromatid. Kromatidi vsakega kromosoma se v anafazi ločita in se premakneta na nasprotna pola celice, kamor ju vlečeta niti delitvenega vretena. Tam bosta nastali hčerinski celici. V telofazi se kromatidi ponovno oblikujeta v kromatin –

se dekondenzirata. Med obema kromatinoma začne nastajati celična plošča, ki omogoča da v času citokineze iz ene materinske nastaneta dve hčerinski celici. Sledi obdobje interfaze, kjer se celica ponovno pripravlja na celično delitev. Interfaza je sestavljena iz zgoraj omenjenih ciklov G_1 , S in G_2 .

2.6 KROMOSOMI

Kromosomi so nosilci dednega materiala. Vidni postanejo zaradi zvijanja in gubanja kromatina pri mitozi in še posebej v metafazi so lepo vidni s svetlobnim mikroskopom. Vse dedne informacije celotnega organizma na kromosomih predstavljajo genom.

Šalotka (*Allium cepa* L. var *ascalonicum*) ima diploidno število kromosomov $2n=2x=16$.

2.7 GENOTOKSIČNI UČINKI NA KROMOSOME

Spremembe, ki jih genotoksični dejavniki povzročajo v strukturi in funkciji genetskega materiala, se imenujejo genotoksični učinki. Pod tem najpogosteje razumemo mutacije (mutageni učinki), čeprav je to samo ena od oblik delovanja genotoksičnih učinkov. Mutacija je vsaka stabilna in dedna sprememba genetskega materiala celice. Mutacije so posledica kemijskih in fizikalnih dejavnikov, ionizirajočega sevanja ali dejavnikov naravnega okolja (biološki dejavniki). Glede na vpliv dejavnikov ločimo:

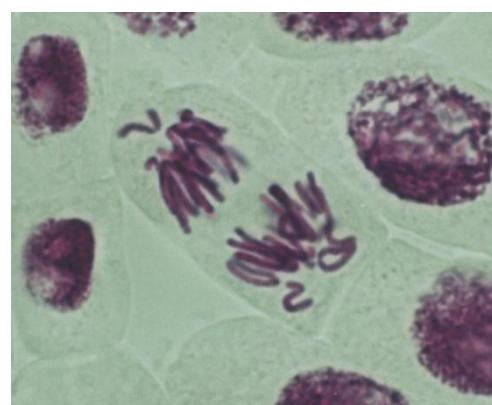
- učinke na kromosomih – kromosomske aberacije,
- citološke učinke,
- mitotske učinke (Glasenčnik, 2004).

Za potrebe diplomskega dela sem beležila število in vrste kromosomskih aberacij. Med njimi so bili: zaostali kromosomi v metafazi (Slika 4) in anafazi (Slika 5), mostički v metafazi in anafazi (Slika 6), zlepljenja v metafazi (Slika 7) in anafazi, fragmenti,

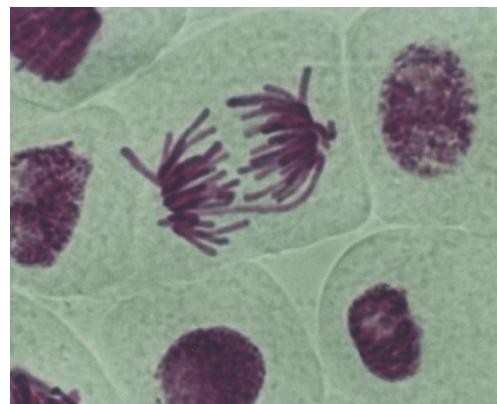
diagonalna postavitev celice (Slika 8) , večjedrne celice ter prisotnost mikronukleusa (Slika 9).



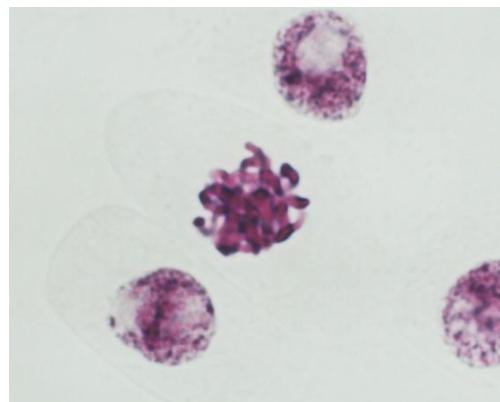
Slika 4: Zaostali kromosom v metafazi
(Vir: Andreja Tkavc in Erika Glasenčnik).



Slika 5: Zaostali kromosomi v anafazi.
(Vir: Andreja Tkavc in Erika Glasenčnik)



Slika 6: Mostiček v anafazi
(Vir: Andreja Tkavc in Erika Glasenčnik).

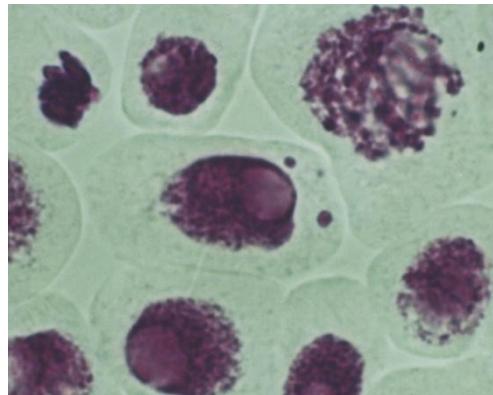


Slika 7: Zlepjenje v metafazi
(Vir: Andreja Tkavc in Erika Glasenčnik).



Slika 8: Diagonalno postavljena celica
(Vir: Andreja Tkavc in Erika Glasenčnik).

Tvorba mikronukleusov predstavlja za celico izgubo dela dednega materiala in lahko nastane kot posledica tvorbe fragmenta v metafazi in kasneje v anafazi, lahko zaradi napake v delovanju delitvenega vretena, pri čemer se tvorijo multipolarne anafaze ter kot posledica pojava kromosomov zunaj delitvenega vretena v anafazi (Smaka-Kincl, 1993).



Slika 9: Mikronukleusa
(Vir: Erika Glasenčnik).

3 MATERIALI IN METODE DELA

3.1 OPIS VZORČNIH MEST

Vzorčenje je potekalo v 49. tednu leta 2004 od 29. novembra do 3. decembra.

Vzorčenje je izvedel Zavod za zdravstveno varstvo Celje (ZZVC) v okviru rednega monitoringa pitnih voda v Sloveniji. Vzorce vode smo povzorčili 29.11.2004 pri enakih razmerah hkrati s pooblaščenim vzorčevalcem ZZVC.

Vzorci so bili odvzeti v javnih objektih:

- V1: Vrtec Čebelica Velenje, Konovska cesta 21, 3320 Velenje,
- V2: Vrtec Lučka Velenje, Kardeljev trg 12, 3320 Velenje,
- V3: Pekarna Vodončnik, Paka pri Velenju 43b, 3320 Velenje,
- V4: Bistro Calypso, Bevče 20a, 3320 Velenje,
- V5: Gostišče Obirc, Črnova 35a, 3320 Velenje,
- V6: Osnovna šola Škale, 3320 Velenje,
- V7: Vrtec Vrtiljak Velenje, Cesta talcev 20, 3320 Velenje,
- V8: Osnovna šola Karla Destovnika Kajuha Šoštanj, 3325 Šoštanj,
- V9: Osnovna šola Topolšica, 3326 Topolšica,
- V10: Hotel Vesna Topolšica, Topolšica 77, 3326 Topolšica.

V nadaljevanju bodo vzorci označeni od V1 do V10 po zgornjem razporedu.

3.2 ŠALOTKA KOT OBJEKT RAZISKOVANJA

Za raziskavo je bila izbrana šalotka (*Allium cepa* L. var. *ascalonicum*, $2n=2x=16$). Čebulice so bile kupljene v prosti prodaji in niso bile tretirane ali razkužene, ker so bile uvožene kot izdelek namenjen prehrani ljudi. Šalotka (*Allium cepa* L. var. *ascalonicum* ali *A. ascalonicum* auct., non L. ali *A. salota* Dostal.) je uvrščena kot kulturna sorta navadne čebule (*Allium cepa* L.) v družino *Alliaceae* ali lukovke (Martinčič in sod., 1999). Vse čebulnice so zelo razširjena skupina vrtnin, v zemlji

oblikujejo čebulo, to je močno skrajšano odebeleno podzemno steblo, in omesenele nožnice zelenih listov, listi so prosti ali zrasli, cvet je cikličen in tromeren, ima šest prašnikov, plodnica je nadrasla in sestavljena iz treh plodnih listov, plod je eno- do tripredalasta glavica, seme je trioglat in nekoliko nagubano (Glasenčnik, 2004).

Raziskave na čebuli (*Allium cepa* L.) so primerne predvsem zaradi:

- hitre rasti korenin,
- stalnega števila kromosomov,
- hitrega odziva na genotoksične snovi,
- majhnega števila spontanih kromosomskih poškodb in
- velikosti celic s kromosomi, ki so obarvani lepo vidni pod svetlobnim mikroskopom (Glasenčnik, 2004; Smaka-Kincl, 1993).

3.3 NASTAVITEV IN POTEK TESTA

Vodnih vzorcev je bilo 10 (V1 – V10), zraven pa še kontrolni vzorec (K). Kot kontrolni vzorec smo uporabili pitno vodo na Inštitutu ERICo, kjer smo nastavili test. Vsak vodni vzorec smo do vrha nalili v pet (5) epruvet, ki smo jih prej označili. Tako smo dobili 55 epruvet na katere smo položili čebulice, da je bil njihov spodnji del v vzorčni vodi. Vsako epruveto s čebulico smo označili. Oznaka je bila sestavljena iz treh delov:

- številka vodnega vzorca (V1 – V10, K),
- številka epruvetke oziroma čebulice za določen vodni vzorec (1-5),
- datuma nastavitve testa.

Za namen testa smo vzeli le čebulice, ki so bile v dobri kondiciji. Plesnive, suhe in poškodovane čebulice smo odstranili. Pred začetkom poskusa smo čebulicam olupili luskoliste in postrgali rjavkasto plast s posušenimi koreninami, pazili pa smo, da nismo poškodovali koreninskega stožca.

Čebulice smo gojili v laboratoriju pri sobni temperaturi 7 dni, vsak dan pa smo v epruvetke dolivali vodne vzorce, ki smo jih hrаниli v hladilniku, pred dolitjem pa segreli na sobno temperaturo.

3.4 LABORATORIJSKE ANALIZE VZORČENIH VOD

Analize vzorčenih vod so naredili na Zavodu za zdravstveno varstvo v Celju po standardnih in predpisanih metodah (Ur. l. 19/04).

3.5 DOLŽINSKI PRIRASTEK KORENIN ZA OCENITEV TOKSIČNOSTI

Dolžinske prirastke smo merili po 48-ih in 120-ih urah po nastavitev poskusa. Merili smo dolžino najdaljše koreninice v koreninskem svežnju (Fiskjesjö, 1985; modificirano Glasenčnik, 2004). Tako koreninic ni bilo potrebno odstraniti in se je poskus po merjenju lahko nadaljeval.

Glede na dolžino koreninic lahko ocenimo stopnjo toksičnosti. Znano je, da onesnažila vplivajo na dedni material in s tem na deljenje celic. Več, ko je v vodi onesnažil, manj je delitev celic in posledično krajsa je koreninica.

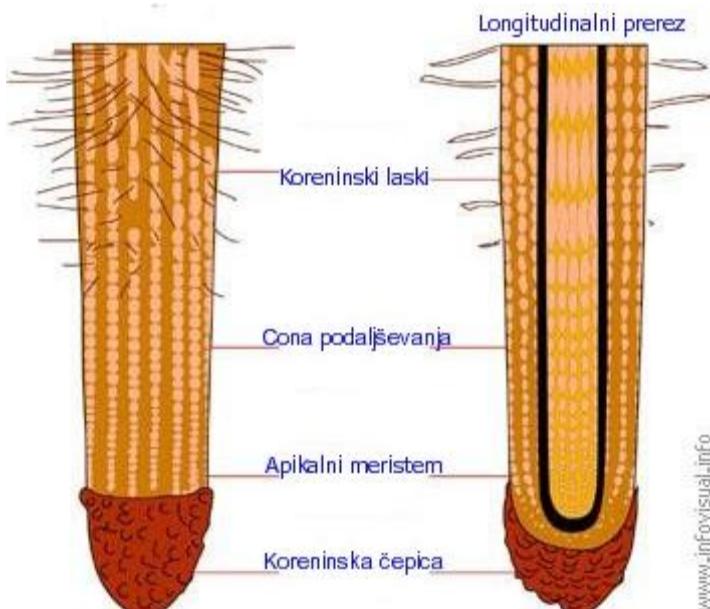
Glede na dolžino koreninic (in posledično na prirastek po 48-ih in 120-ih urah) in na odstopanja je mogoče sklepati na onesnaženost oziroma neprimernost vode za pitje.

3.6 CITOLOŠKE ANALIZE

3.6.1 Priprava mečkancev

Za citološke analize je bilo potrebno koreninske vršičke primerno pripraviti. Za vsak vodni vzorec smo vzorčili koreninske vršičke petih čebulic. Vzorčenje korenin in fiksiranje je potekalo za vsak vodni vzorec na isti dan ob istem času. Koreninske

vršičke smo fiksirali v fiksirni raztopini, mešanici treh delov absolutnega etanola in enega dela ocetne kisline med 6. in 9. uro zjutraj. Fiksirane preparate smo do priprave citoloških preparatov shranili pri -18 °C. Koreninske vršičke sem pred izdelavo preparatov hidrolizirala (0,1N HCl) in barvala s Schiffovim reagentom. Koreninski vršiček sem prerezala medialno longitudinalno, odstranila koreninsko čepico in odrezala apikalni del do 1,5-2 mm, kajti aktivno deleče se celice so v meristemu koreninskega vršička med 0,5 in 1,5 mm (glej Sliko 10). Za citogenetsko analizo sem izdelala klasične preparate mečkance, po dva koreninska vršička iste čebulice na eno objektno steklo v kapljici 45 % (v/v) ocetne kisline (Glasenčnik, 2004).



Slika 10: Zunanji izgled in prerez koreninskega vršička

(Vir: http://www.infovisual.info/01/017_en.html).

3.6.2 Mitotski indeks

Mitotski indeks (MI) je delež delečih se celic v mitozi. MI sem določila glede na frekvenco posameznih faz mitoze in glede na število vseh celic za vsak preparat koreninskih vršičkov. Za primerljivost rezultatov smo si izbrali metodo štetja do 200

metafaz na preparat, kar je v povprečju 11258 celic na preparat. MI sem izračunala po formuli:

$$MI[\%] = \frac{\Sigma_1^5(P+M+A+T)}{\Sigma_1^5(P+M+A+T+I)} \times 100 \quad \dots (1)$$

- P = frekvenca profaz,
- M = frekvenca metafaz,
- A = frekvenca anafaz,
- T = frekvenca telofaz,
- I = frekvenca interfaz.

3.6.3 Kromosomske aberacije

Test kromosomskih aberacij (KA) v metafazi in anafazi je test za določanje števila in vrste aberacij v meristemskih celicah koreninskih vršičkov testnih čebulic. Vrednosti za KA sem določala v petih preparatih za vsak vodni vzorec glede na frekvenco 200 metafaznih celic. Celice v metafazi in anafazi sem klasificirala v naslednje kategorije: zaostali kromosomi, mostički, zlepljenja, poleg tega pa še fragmenti, diagonalna postavitev celice in večjedrne celice. Delež vseh kromosomskih aberacij (KA) sem izračunala po formuli:

$$KA[\%] = \frac{\Sigma_1^5(zk_M + zk_A + m_M + m_A + z_M + z_A + f + dp + vc)}{\Sigma_1^5(M+A)} \times 100 \quad \dots (2)$$

- KA[%] = delež vseh kromosomskih aberacij (stopnja genotoksičnosti),
- zk_M = frekvenca zaostalih kromosomov v metafazi,

- zk_A = frekvenca zaostalih kromosomov v anafazi,
- m_M = frekvenca mostičkov v metafazi,
- m_A = frekvenca mostičkov v anafazi,
- z_M = frekvenca zlepljenj v metafazi,
- z_A = frekvenca zlepljenj v anafazi,
- f = frekvenca fragmentov,
- dp = frekvenca diagonalnih postavitev celic,
- vc = frekvenca večjedrnih celic,
- M = frekvenca metafaz,
- A = frekvenca anafaz.

3.6.4 Mikronukleus

Za identifikacijo interfaznih celic z mikronukleusi (MN) sem uporabila naslednje kriterije:

- ista jakost obarvanja mikronukleusa kot je obarvanost mase jedra,
 - mikronukleus mora biti popolnoma ločen od jedra,
 - premer mikronukleusa mora biti manjši od 1/5 premera glavnega jedra
- (Smaka-Kincl, 1993).

Vrednosti za MN sem določala v petih preparatih za vsak vodni vzorec. Delež interfaznih celic z mikronukleusi sem izračunala po formuli:

$$MN [\%] = \frac{MN}{I} \times 100 \quad \dots (3)$$

- $MN[\%]$ = delež mikronukleusov,
- MN = frekvenca mikronukleusov,
- I = frekvenca interfaz.

4 REZULTATI

4.1 REZULTATI KEMIJSKE ANALIZE VODE

Vzorčenje je izvedel Zavod za zdravstveno varstvo Celje. Vsi vodni vzorci so bili vzorčeni skladno s predpisi.

Iz Tabele 1 je razvidno, da meritve različnih parametrov vodnih vzorcev ne presegajo mejnih vrednosti, zato so vzorčene vode po pravilniku primerne za pitje.

Tabela 1: Rezultati terenskih, kemijskih in mikrobioloških analiz vzorčenih vod.

Parameter:		Mejna vrednost (Ur. l. 19/2004)	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10
Terenske meritve 29.11.2004	Temperatura vode pri odvzemu [°C]	-	7,8	15,6	5,8	8,1	5,9	13,1	5,5	14,9	13,8	11,8
	pH	6,5-9,5	7,47	7,55	7,39	7,59	7,48	7,71	7,62	7,83	7,82	7,78
	Električna prevodnost [µS/cm]	2500	419	416	418	415	426	414	236	226	312	310
	Preostali prosti klor [mg/L]	-	0,23	0,23	0,23	0,19	0,12	0,12	0,17	0,08	0,2	0,18
Kemijske meritve 30.11.2004	Barva [m^{-1}]	0,5	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
	Okus [/]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Vonj [/]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Motnost [NTU]	5	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
	Amonij [mg/L]	0,5	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02
Mikrobiološke meritve 2.12.2004	<i>Clostridium perfringens</i> (vključno s sporami) [št/100mL]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Escherichia coli</i> (E. coli) [št/100mL]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Koliformne bakterije [št/100mL]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Št. kolonij pri 22°C [št/mL]	100	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1
	Št. kolonij pri 37°C [št/mL]	100	1	1	3	6	1	0	1	0	1	1

V1 – V10 so oznake odvzemnih mest (glej 3.1), K je kontrola.

Glede na mejne vrednosti lahko vidimo, da so izmerjene vrednosti terenskih, kemijskih ali mikrobioloških meritev v vseh vodnih vzorcih nižje. Precej izstopa le število kolonij pri 37 °C za vodni vzorec V4 Bistro Calypso, kjer je bilo preštetih 6 kolonij na 1 mL, vendar glede na dovoljeno mejno vrednost 100/mL ni zaskrbljujoče.

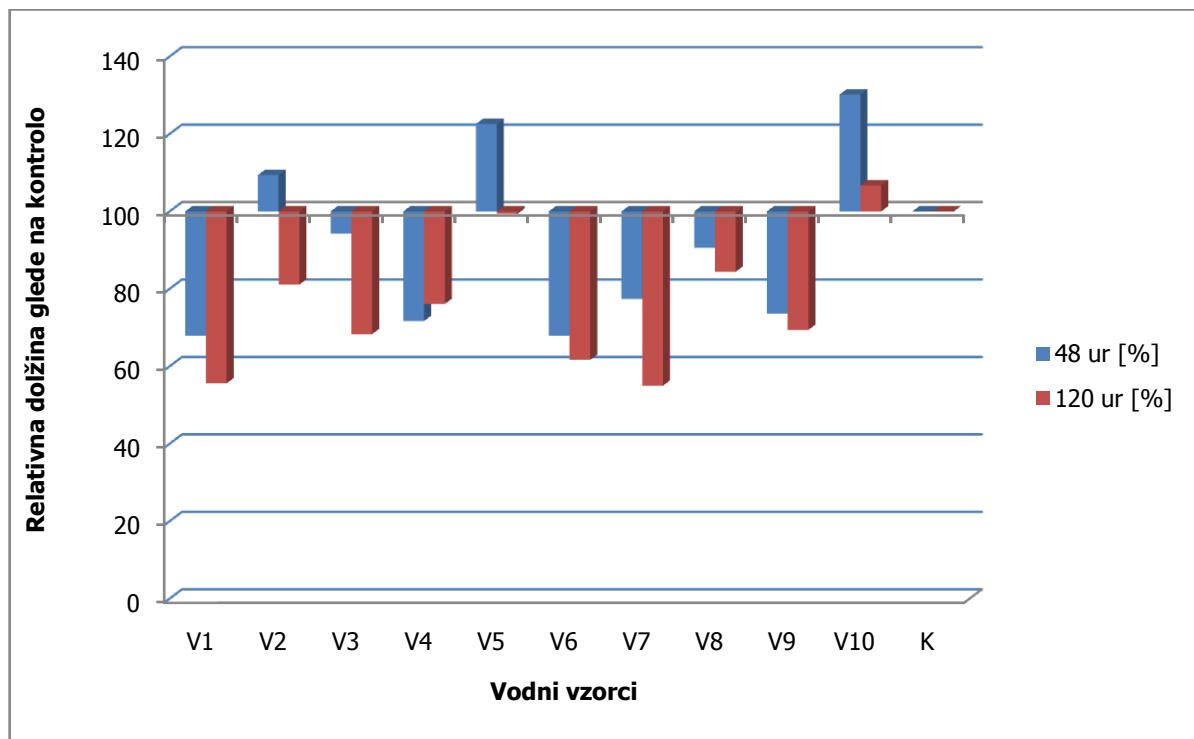
4.2 DOLŽINSKI PRIRASTEK KORENIN ZA OCENITEV TOKSIČNOSTI

Po 48 urah je najmanjši prirastek na lokacijah Vrtec Čebelica (V1) in OŠ Škale (V6), kjer je oba vzorca dosegata prirastek 67,9 % glede na kontrolo (Tabela 2, Graf 1). Najdaljši prirastek je bil izmerjen pri vodnem vzorcu V10 Hotela Vesna, kar 130,2 %. Po 120 urah izpostavitve so najdaljše koreninice zopet pri vodnem vzorcu Hotela Vesna (106,7 %), najkrajši prirastek pa na vzorcu V7 lokacije Vrtca Vrtiljak.

Tabela 2: Povprečni dolžinski prirastek korenin (mm) glede na dolžino koreninic kontrole za ocenitev toksičnosti (48 in 120 h) pri izbranih vzorcih vode.

Vzorec	48 ur ±SD	120 ur ±SD	Prirastek (mm)
V1	7,2 3,35	20,0 6,36	12,8
V2	11,6 1,82	29,2 9,65	17,6
V3	10,0 4,69	24,6 10,06	14,6
V4	7,6 2,88	27,4 8,32	19,8
V5	13,0 4,74	35,8 14,18	22,8
V6	7,2 3,11	22,2 8,41	15,0
V7	8,2 3,35	19,8 11,05	11,6
V8	9,6 2,88	30,4 5,03	20,8
V9	7,8 3,77	25,0 5,56	21,2
V10	13,8 4,44	38,4 5,96	24,6
K	10,6 4,28	36,0 13,87	25,4

V1 – V10 so oznake odvzemnih mest (glej 3.1), K je kontrola.



Graf 1: Relativna dolžina korenin šalotke po 48-ih in 120-ih urah glede na kontrolo.
V1 – V10 so oznake odvzemnih mest (glej 3.1), K je kontrola.

4.3 REZULTATI CITOGENETSKE ANALIZE

4.3.1 Mitotski indeks

V povprečju je bilo na vsak preparat preštetih 11224 celic. Najmanj celic je bilo preštetih pri vodnem vzorcu V6 OŠ Škale, 10714, največ pa pri vodnem vzorcu V4 Bistro Calypso, 12186 (Tabela 3).

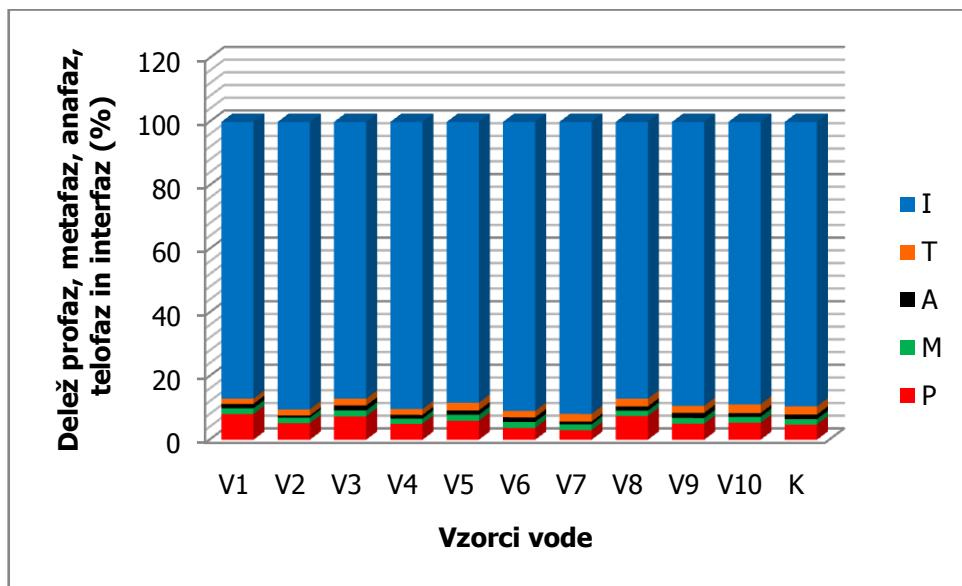
Tabela 3: Povprečen mitotski indeks vzorca.

Vzorec	Število preštetih celic	I	P	M	A	T	MI [%]	±SD
V1	11073	9642	897	200	155	179	13,06	2,55
V2	11641	10528	607	200	80	225	9,60	3,33
V3	10895	9488	802	200	172	233	12,82	2,96
V4	12186	11010	612	200	142	222	9,52	4,57
V5	10769	9514	644	200	152	259	11,80	3,77
V6	10714	9642	396	200	153	213	9,06	2,86
V7	10857	9974	326	200	95	262	7,96	3,77
V8	11943	10400	893	200	160	289	13,08	3,68
V9	11267	10065	571	200	184	247	10,38	3,07
V10	10891	9677	582	200	133	298	11,02	2,84
K	11605	10384	5562	200	161	303	10,38	3,16

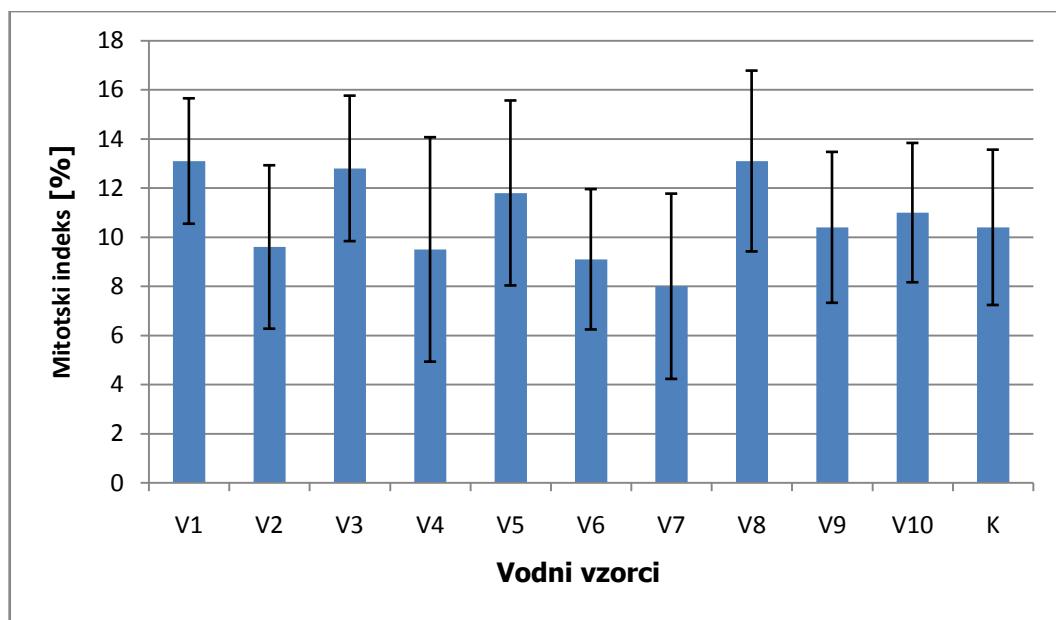
Legenda: I – interfaza, P – profaza, M – metafaza, A – anafaza, T – telofaza, MI – mitotski indeks, SD – standardna deviacija; V1 – V10 so oznake odvzemnih mest (glej 3.1), K je kontrola.

Mitotski indeks je podrobneje predstavljen v Grafu 3.

V povprečju v vseh vodnih vzorcih znaša mitotski indeks (MI) 10,4 %. Najnižji je pri vodnem vzorcu V7 Vrtca Vrtiljak, 7,9 %, najvišji pa pri vzorcu V10 Hotela Toplošica, kjer znaša 13,1 %.



Graf 2: Delež profaz, metaphaz, anafaz, telofaz in interfaz glede na povprečno število preštetih celic.
V1 – V10 so oznake odvzemnih mest (glej 3.1), K je kontrola.



Graf 3: Mitotski indeks.
V1 – V10 so oznake odvzemnih mest (glej 3.1), K je kontrola.

Z medparnim testom Mann-Whitney U (Tabela 4) smo ugotovili, da v večini vrednosti MI glede na vrednost v različnih vodnih vzorcih razlike statistično niso značilne (NZ). Se pa pojavljajo v primerjovah V6 OŠ Škale z V1 Vrtcem Čebelica, V7 Vrtec Vrtiljak z V1 Vrtcem Čebelica in V2 Vrtcem Lučka ter V8 OŠ Karla Destovnika – Kajuha z V7 Vrtcem Vrtiljak, kjer so statistično značilne (*: $p<0,05$). Statistično zelo značilnih razlik (**: $p<0,01$) med vodnimi vzorci ni bilo (Glasenčnik, 2007).

Tabela 4: Značilnosti razlik v mitotskih deležih med vodnimi vzorci (medparni test Mann-Whitney U).

Vzorec:	Mitotski indeks										
	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	K
V1		NZ	NZ	NZ	NZ	*	*	NZ	NZ	NZ	NZ
V2			NZ	NZ	NZ	NZ	*	NZ	NZ	NZ	NZ
V3				NZ	NZ						
V4					NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
V5						NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
V6							NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
V7								*	NZ	NZ	NZ
V8									NZ	NZ	NZ
V9										NZ	NZ
V10											NZ
K											

Tveganje: **: $p<0,01$; *: $p<0,05$; NZ: razlike niso značilne.

V1 – V10 so oznake odvzemnih mest (glej 3.1), K je kontrola.

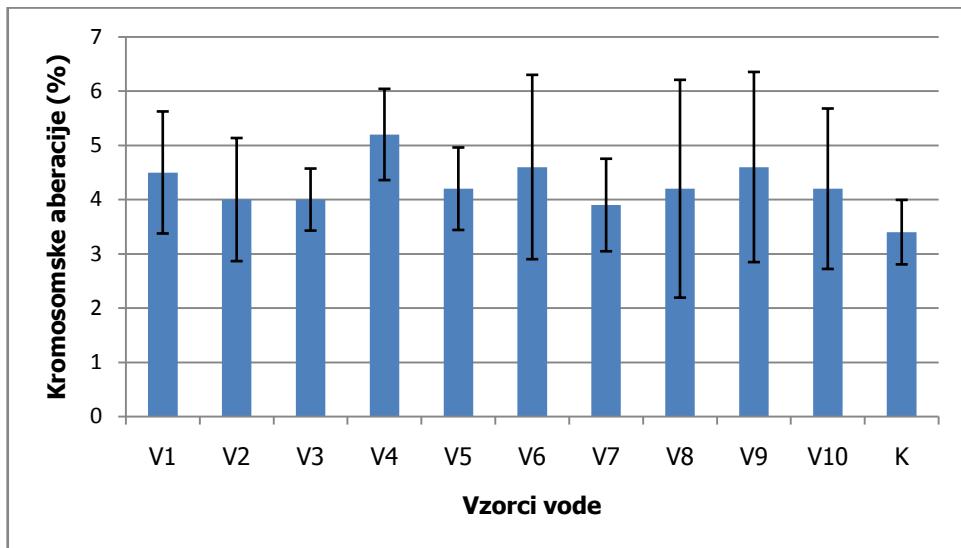
4.3.2 Kromosomske aberacije

Iz Tabele 5 lahko razberemo, da je bila najvišja vrednost KA izračunana za vodni vzorec V4 Bistro Calypso, 5,18 %, najnižja vrednost pa znaša 3,92 % pri vodnem vzorcu V7 Vrtca Vrtiljak (glej tudi Graf 4). Kontrolni vzorec ima s 3,44 % najnižji delež kromosomskih aberacij.

Tabela 5: Delež kromosomskih aberacij vzorcev vode.

Vzorec	zk		m		z		f	dp	vc	KA [%]	±SD
	zk _M	zk _A	m _M	m _A	z _M	z _A					
V1	1,2	2,2	1	4,2	2	0,8	0,8	4,2	0	4,50	1,13
V2	0,4	1,4	0,6	2,6	1	0,2	2,8	2	0	3,96	1,14
V3	0,6	1	0,6	2,4	2,6	0,2	3,4	4	0	3,98	0,57
V4	0,8	0,6	1	4,8	2,6	1,8	3	3	0	5,18	0,84
V5	1,4	0,6	0,8	3,2	0,8	0,2	3,8	4,4	0	4,24	0,76
V6	1,4	1	1	4,2	0,2	0,6	5	3,8	0	4,64	1,70
V7	1	1,2	1,4	2,8	0,4	1	1,4	2,6	0	3,92	0,85
V8	1	1	1,2	3,4	0,8	1	4	3,6	0	4,1	1,91
V9	1,4	0,2	1,2	3,6	1,6	1,4	4	5	0	4,64	1,75
V10	0,8	0,4	0,6	1,8	0,6	0,8	4	5,4	0	4,22	1,48
K	0,4	0,2	0,4	1,8	0,6	0,4	2,4	6,4	0	3,44	0,59

Legenda: zk_M – zaostali kromosomi v metafazi, zk_A – zaostali kromosomi v anafazi, m_M – mostički v metafazi, m_A – mostički v anafazi, z_M – zlepljenja v metafazi, z_A – zlepljenja v anafazi, f - fragmenti, dp – diagonalno postavljenne celice, vc – večjedrne celice, KA – kromosomske aberacije, SD – standardna deviacija; V1 – V10 so oznake odvzemnih mest (glej 3.1), K je kontrola.



Graf 4: Delež vseh aberacij.

V1 – V10 so oznake odvzemnih mest (glej 3.1), K je kontrola.

Z medparnim testom Mann-Wihtney U so v Tabeli 6 navedene statistično značilne razlike (*: $p<0,05$) kromosomskih aberacij med V4 Bistrojem Calypso in V7 Vrtcem Vrtiljak ter kontrolnim vzorcem. Ostale primerjave KA med različnimi vodnimi vzorci ne pokažejo statistično zelo značilnih razlik (**: $p<0,01$), zato so označene z NZ (Glasenčnik, 2007).

Tabela 6: Značilnosti razlik v deležih kromosomskih aberacij med vodnimi vzorci (medparni test Mann-Whitney U).

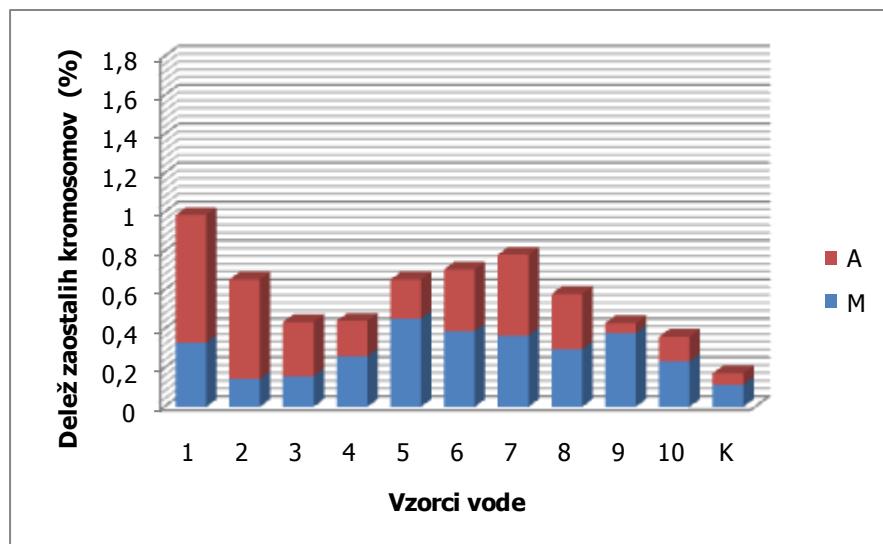
Kromosomske aberacije												
Vzorec:	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	K	
V1		NZ	NZ									
V2			NZ	NZ								
V3				NZ	NZ							
V4					NZ	NZ	*	NZ	NZ	NZ	*	
V5						NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	
V6							NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	
V7								NZ	NZ	NZ	NZ	
V8									NZ	NZ	NZ	
V9										NZ	NZ	
V10											NZ	
K												

Tveganje: **: $p<0,01$; *: $p<0,05$; NZ: razlike niso značilne.

V1 – V10 so označke odvzemnih mest (glej 3.1), K je kontrola.

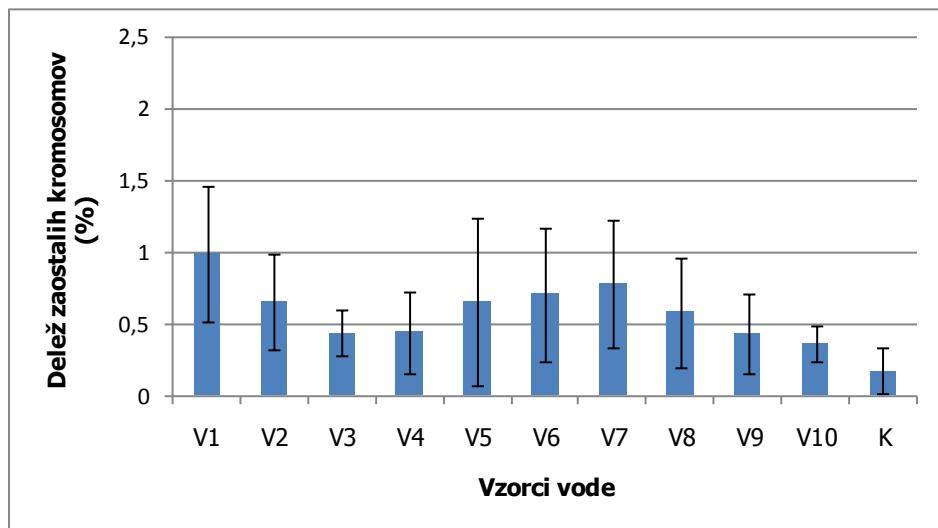
Največ zaostalih kromosomov v metafazi je bilo zaslediti v preparatih vodnega vzorca V5 Gostišča Obirc, 0,45 %, najmanj pa v vzorcu V2 Vrtca Lučka, 0,14 %, čeprav je tudi kontrolni vzorec imel 0,11 % delež zaostalih kromosomov v metafazi. Razlika med vrednostmi je minimalna (Graf 5).

Največ zaostalih kromosomov v anafazi je bilo v vzorcu V1 Vrtca Čebelica, 0,66 %, najmanj pa v vodnem vzorcu V9 OŠ Topolšica, 0,05 %. V primerjavi s kontrolo, ki znaša 0,06 %, je to le minimalna razlika (Graf 5).



Graf 5: Delež zaostalih kromosomov v anafazi in metafazi.
V1 – V10 so označke odvzemnih mest (glej 3.1), K je kontrola.

Glede na skupni delež zaostalih kromosomov v metafazi in anafazi v primerjavi s kontrolo lahko vidimo, da je pojavljanje le-tega najvišje v vodnem vzorcu V1 Vrtca Čebelica, 0,99 %, najmanjši pa v V10 Hotel Vesna, 0,36 %, kontrola ima 0,17 % (glej Graf 6).

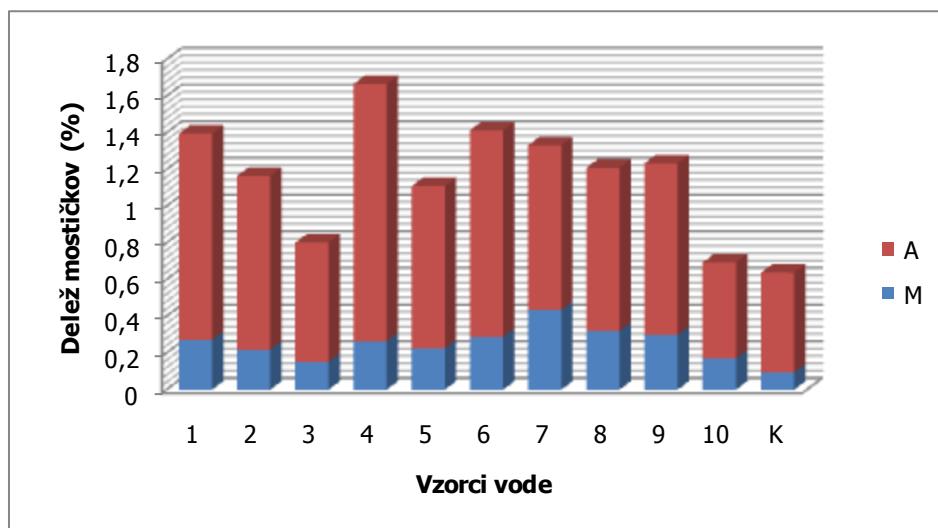


Graf 6: Delež zaostalih kromosomov.

V1 – V10 so oznake odvzemnih mest (glej 3.1), K je kontrola.

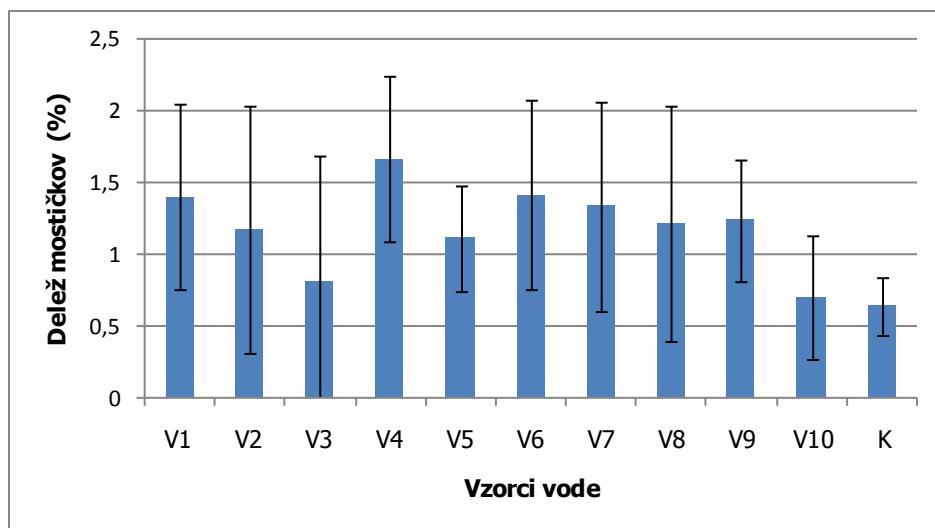
Najvišji delež mostičkov v metafazi ima vzorec iz V7 Vrtca Vrtiljak, 0,43 %, najmanjši pa je iz Pekarne Vodončnik (V3), 0,15 %. Glede na kontrolo z 0,09 % so razlike minimalne (Graf 6).

Najvišji delež mostičkov v anafazi ima V4 Bistro Calypso, 1,40 %, najmanjši pa je iz Hotela Vesna (V10), 0,52 %. Kontrola ima 0,54 % (Graf 6).



Graf 7: Delež mostičkov v anafazi in metafazi.
V1 – V10 so oznake odvzemnih mest (glej 3.1), K je kontrola.

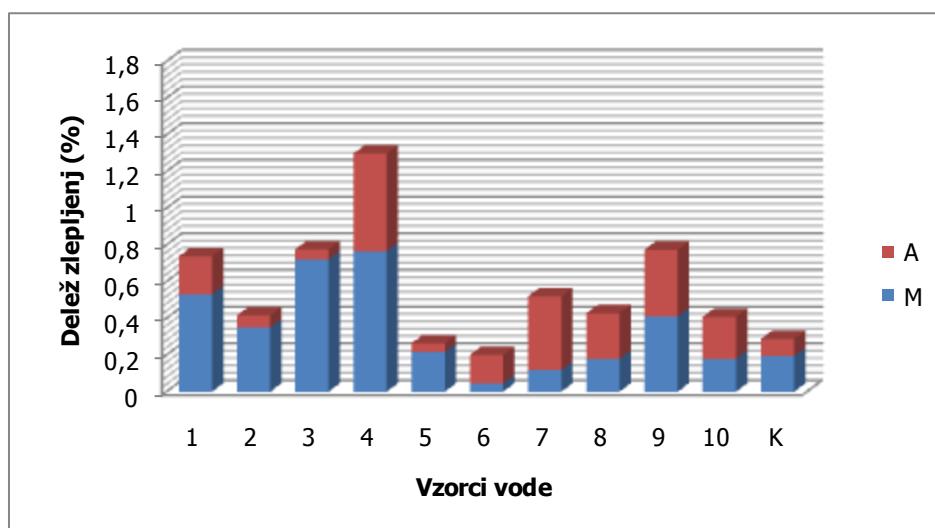
Skupni delež mostičkov v metafazi in anafazi je najvišji iz vzorca V4 Bistroja Calypso in znaša 1,67 %, najnižji pa je bil vzorčen v Hotelu Vesna (V10) in ima 0,69 %. Kontrolni vzorec je bil malenkost nižji, 0,64 %. Glede na razlike med najvišjim in najnižjim deležem sklepam, da so v vodi, odvzeti v Bistroju Calypso, onesnažila, ki povzročajo nastanek mostičkov (glej Graf 8).



Graf 8: Delež mostičkov.
V1 – V10 so oznake odvzemnih mest (glej 3.1), K je kontrola.

Z Grafa 9 lahko vidimo, da ima najvišji delež zlepljenj v metafazi Bistro Calypso (V4), katerih delež je 0,77 %, najnižji delež pa najdemo v V6 OŠ Škale, le-ta ima 0,05 %. Kontrolni vzorec ima 0,19 %.

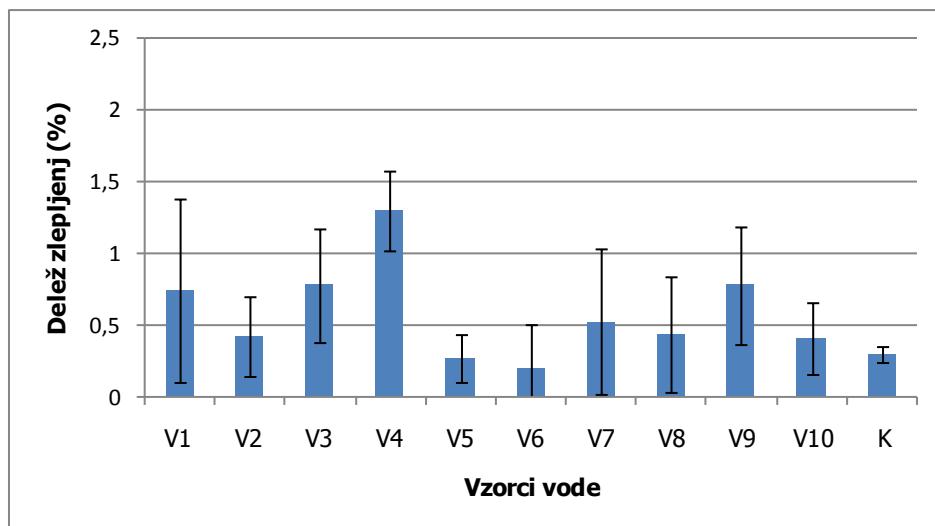
Delež zlepljenj v anafazi je najvišji za V4 Bistro Calypso z 0,53 %, najnižji pa za V5 Gostišče Obirc z 0,05 %. Kontrolna vrednost je 0,09 % (Graf 9).



Graf 9: Delež zlepljenj v anafazi in metafazi.

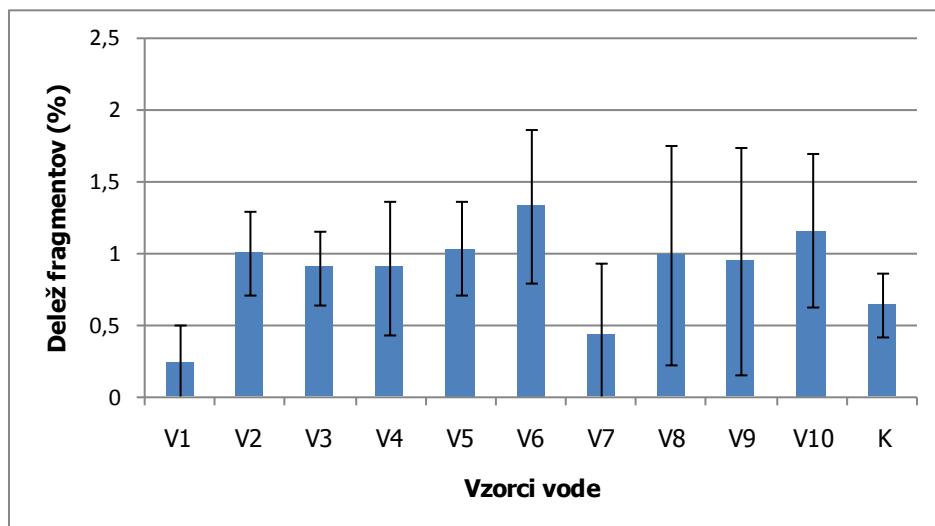
V1 – V10 so označke odvzemnih mest (glej 3.1), K je kontrola.

Skupni delež zlepljenj v metafazi in anafazi je najvišji pri V4 Bistroja Calypso in znaša 1,3 %, najnižjo vrednost 0,2 % pa zasledimo v OŠ Škale (V6). Kontrolna vrednost je 0,3 % (Graf 10).



Graf 10: Delež zlepljenj.
V1 – V10 so oznake odvzemnih mest (glej 3.1), K je kontrola.

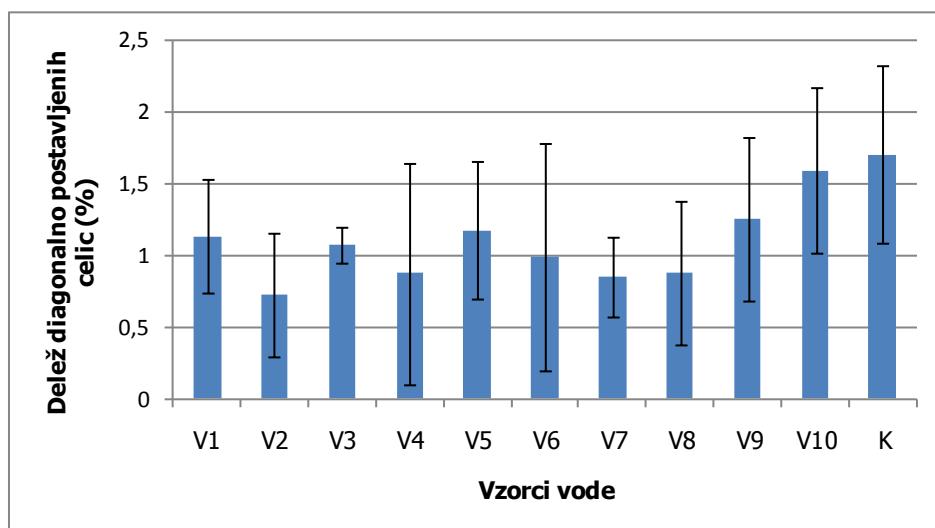
Graf 11 nam pove, da ima najvišji delež fragmentov, 1,33 %, vzorčena voda OŠ Škale (V6), najnižjega pa voda vzorčena v Vrtcu Čebelica (V1), 0,24 %. Vrednost kontrolnega vzorca je 0,64 %.



Graf 11: Delež fragmentov.

V1 – V10 so označke odvzemnih mest (glej 3.1), K je kontrola.

Z Grafa 12 lahko razberemo, da ima najvišji delež diagonalno postavljenih celic ravno kontrola (1,71 %). Drugo najvišjo vrednost, 1,59 %, je dosegla vzorčena voda iz Hotela Vesna (V10), najnižjo pa iz Vrtca Lučka (V2), 0,72 %.



Graf 12: Delež diagonalno postavljenih celic.
V1 – V10 so oznake odvzemnih mest (glej 3.1), K je kontrola.

4.3.3 Mikronukleus

Od pregledanih koreninic 55 čebulic je bil prisoten mikronukleus le v dveh preparatih. Vzorca vode sta bila vzeta v Pekarni Vodončnik (V3) in OŠ Škale (V6). Delež mikronukleusov je pri obeh 0,002 %.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 ONESNAŽENOST PITNE VODE

Glede na podatke dobljene iz terenskih, kemijskih in mikrobioloških meritev lahko ugotovimo, da je voda v Šaleški dolini neonesnažena tako s kemijsko-fizikalnega kot tudi z vidika biotoksičnosti. Analizirani vzorci vode so glede na spremljane parametre primerni za pitje oziroma nadaljno uporabo v prehranski industriji, kot narekuje Pravilnik o pitni vodi iz Uradnega lista Republike Slovenije (Ur. l. 19/04).

5.2 DOLŽINSKI PRIRASTEK KORENIN

Dolžinski prirastek korenin je enostavna in hitra metoda ugotavljanja vpliva genotoksičnih snovi v vodi. Ne zahteva posebnih aparatur, je poceni, rezultati pa so vidni v nekaj dneh. Če je rast korenin izredno zmanjšana, lahko sklepamo na močnejšo onesnaženost vode.

V splošnem se kaže posebna oblika odvisnosti med zmanjšanjem rasti korenin ter značilnimi odkloni v zgradbi in obliki kromosomov (genotoksičnost); velja pravilo, da pojav kromosomskih aberacij vedno prinese tudi zmanjšano rast rastlinskih organov (Glasenčnik, 2004).

V diplomskem delu smo pričakovali normalno rast korenin, ker smo testirali pitno vodo. Glede na rezultate, dobljene z analizo dolžinskega prirastka korenin lahko sklepamo, da vodni vzorci vsebujejo minimalno količino genotoksičnih snovi, saj analizirane vrednosti ne presegajo mejnih vrednosti 50 in 90 % zmanjšane rasti.

Rezultati, dobljeni z uporabo metode koreninskega prirastka, potrjujejo podatke dobljene s terenskih, kemijskih in mikrobioloških analiz.

Glede na dobljene rezultate menimo, da bi ta test lahko uporabljali kot dodaten test pri monitoringu pitne vode.

5.3 MITOTSKI INDEKS (MI)

Metoda analize mitotske aktivnosti se, poleg dolžinskega prirastka korenin, pogosto uporablja za določanje citotoksičnosti izbranih substanc. Vrednost mitotskega indeksa pri kontroli se po navedbah v literaturi giblje med 10-15 %, nekateri avtorji navajajo 5-10 % (Oud in Rickards, 1999; Paradiž, 1996; Glasenčnik, Grill in sod., 2003).

Za kontrolni vzorec smo uporabili vodovodno vodo na Inštitutu ERICo, kjer za potrebe biotestov vedno uporabijo enak postopek. Vodovodna voda je namreč po Fiskjesjö-ju (1985) najbolj primeren kontrolni gojitveni medij, primerna je tudi za testiranje kemikalij. Za potrditev metode je Fiskjesjö primerjal dolžine korenin, ki so rasle na pitni vodi in na testni tekočini, ki je vsebovala 0,57 mg Cu/L vode. Po štirih dneh gojenja so bile izmerjene dolžine korenin pri 10 čebulicah skoraj enake (Glasenčnik, 2004).

Glede na to, da so bile vzorčene pitne (vodovodne) vode smo pričakovali, da bodo mitotski indeksi znotraj zgoraj omenjenih meja.

Mitotski indeks vzorčenih voda se giblje od 7,96 % (Vrtec Vrtljak), do 13,08 % (OŠ Karla Destovnika Kajuha). Vse vrednosti so znotraj meja vrednosti navedenih v literaturi. Ker analizirane vrednosti minimuma in maksimuma MI ne presegajo mejnih vrednosti 50 in 90 % lahko sklepamo, da so vodni vzorci med seboj glede vsebnosti citotoksičnih snovi primerljivi. Glede na navedbe lahko sklepamo, da analizirane vrednosti ne odstopajo od povprečnih vrednosti in o izraziti citotoksičnosti pri izbranih vzorcih v primeru mitotskega indeksa ne moremo govoriti.

Povezave med analiziranimi parametri so z uporabo medparnega testa Mann-Whitney U predstavljeni v Tabeli 4. Rezultati statistične analize potrjujejo razliko med nekaterimi izbranimi lokacijami in mitotsko aktivnostjo.

5.4 KROMOSOMSKE ABERACIJE (KA)

V literaturi najdemo podatke, da je delež KA za šalotko kot kontrolno rastlino od 3 do 5 % (Vidakovič s sod., 1993). V splošnem je znano, da se tako v živalskih kot rastlinskih organizmih pojavljajo spontane mutacije (do 4 %). Višje vrednosti kažejo na genotoksičnost, ki je posledica delovanja onesnažil, kar negativno vpliva na delitve celic in s tem vpliva na funkcije organizma. Aberacije v vodovodni vodi se lahko pojavijo tudi zaradi pretiranega kloriranja vode (Glasenčnik, 2004).

Glede na to, da so bile vzorčene vodovodne vode, smo pričakovali, da bodo deleži KA znotraj omenjenih meja.

V intervalu 3-5 % se gibljejo vsi vodni vzorci, razen vzorca Bistro Calypso, ki za 0,18 % preseže priporočeno zgornjo mejo. Najnižja vrednost je bila pri vodnem vzorcu Vrtca Vrtljak 3,92 %, kar je sicer 0,52 % več od kontrolnega vzorca. Glede na dobljene podatke lahko sklepamo, da v vzorčenih vodah ni izrazitih onesnažil, ki bi vplivali na genotoksičnost. Ker pa vrednost vodnega vzorca Bistroja Calypso minimalno preseže mejno vrednost, bi bilo smiselno z biomonitoringom spremljati vodo tega vzorčnega mesta. Če se bodo rezultati ponavljali lahko sklepamo na dejavnike, ki vplivajo na nastanek različnih aberacij. Za bolj podrobno razlago bi potrebovali tudi še podrobnejše kemijske teste.

Povezave med analiziranimi parametri so z uporabo medparnega testa Mann-Whitney U predstavljeni v Tabeli 6. Rezultati medparnega testa potrjujejo razliko med nekaterimi izbranimi lokacijami in kromosomskimi aberacijami.

Sicer pa je voda v Šaleški dolini zelo čista in vsebuje minimalno količino parametrov, ki vplivajo na kromosomske aberacije. Rezultati odlično dopolnjujejo izmerjene terenske, kemijске in biološke rezultate. Menimo, da bi bilo smiselno biomonitoring v določenih intervalih ponavljati, saj bi tako lahko hitro in dokaj poceni izvedeli za vnos cito in genotoksičnih substanc v vodovodno omrežje.

5.5 MIKRONUKLEUS

Mikronukleusi so posledica nastanka acentričnih fragmentov in zaostalih kromosomov v anafazi. Mikronukleus je dokaz, da je med mitozo prišlo do velike izgube dednega materiala zaradi prelomov, okvare kinetohora ali poškodbe niti delitvenega vretena (Glasenčnik, 2004).

Ker se v vseh vzorcih mikronukleus pojavi le v dveh primerih (Pekarna Vodončnik in OŠ Škale) ugotavljam, da vzorčena voda vsebuje minimalno količino toksičnih snovi, ki vplivajo na nastanek mikronukleusa. Če bi z nadaljnimi biotesti ugotovili, da se mikronukleusi pojavljajo v večji meri, bi lahko predlagali podrobnejše kemijске teste za ugotovitev vzroka za pojav mikronukleusov.

5.6 UPORABA TESTA V PEDAGOŠKEM PROCESU – ANALIZA UČNIH NAČRTOV ZA DEVETLETNO OSNOVNO ŠOLO V POVEZAVI S TEMO DIPLOMSKEGA DELA

Učenci pri pouku biologije, naravoslovja, gospodinjstva in izbirnih predmetih pridobijo znanje, ki jim omogoča osnovno razumevanje narave in življenja. Pomembno je, da so teoretične osnove prepletajo z metodami neposrednega opazovanja, s terenskim in laboratorijskim delom. To daje učencem možnost aktivnega pridobivanja znanja, tako vzpostavijo neposreden stik z živo in neživo naravo in prihajajo do določenih spoznanj preko lastnih izkušenj.

Pregledala sem učne načrte za Naravoslovje in tehniko v 4. in 5. razredu, Gospodinjstvo v 5. in 6. razredu, Naravoslovje v 6. in 7. razredu, Biologijo v 8. in 9. razredu ter Izbirne naravoslovne predmete za 7., 8. in 9. razred. Analiza učnih načrtov je pokazala, da se lahko tema mojega diplomskega dela večkrat vključi v učni proces. Že v splošnih ciljih je kar nekaj naštetih ciljev, ki se lahko povežejo s temo diplomskega dela in sicer:

- vzbuditi spoštovanje do vseh oblik življenja ter razviti razumevanje o medsebojni povezanosti žive in nežive narave,
- razvijati sposobnosti za zaznavanje in razumevanje ekoloških problemov,
- razviti odgovoren odnos do okolja in narave ter spodbuditi interes za njegovo aktivno varovanje,
- vzpodbuditi spoznanje, da je človek del narave in od nje tudi odvisen,
- doseči, da z lastnim iskanjem in preučevanjem pridejo do nekaterih spoznanj in si oblikujejo odgovoren odnos do narave in okolja,
- doseči razumevanje različnih, popravljivih in nepopravljivih sprememb ob človekovem posegu v naravo in okolje, problemov, ki pri tem nastajajo ter naravnih načinov njihovega reševanja.

V 5. razredu pri predmetu Naravoslovje in tehnika lahko učence v učni temi »Voda« seznamim s podrobnejšim opisom oskrbe s pitno vodo, o onesnaženju voda ter o kroženju vode. Pri tem lahko na začetku tedna nastavimo poizkus, kjer v epruvete nalijemo vodovodno vodo, destilirano vodo ter več vrst različnih voda (bližnji potok, deževnica, voda z gnojilom...). Pri naslednji učni uri oziroma naslednji teden pa preverimo, koliko so zrasle korenine in rezultate ovrednotimo (glej Prilogi 4 in 5).

Pri predmetu Gospodinjstvo v 6. razredu pri modulu »Hrana in prehrana« glede na učni načrt preverjam kakovost živil in se pogovarjam o zdravi prehrani. Ker je zadnje čase v porastu nakup embalirane pitne vode lahko pri pouku naredimo test rasti korenin za različne predpaketirane pitne oziroma mineralne vode v primerjavi z destilirano, vodovodno in neko zelo onesnaženo vodo (potok...). Učenci bi glede na

rezultate doumeli smisel kupovanja embalirane vode; opozorjeni bi bili na ekološki problem plastenk, ki potrebujejo veliko energije za izdelavo, po izpraznjenju pa postanejo odpadek. Le-tega bilo mogoče ponovno uporabiti, če bi plastenke odlagali v za to primerne zabojnike ločenega zbiranja odpadkov. Tema se povezuje tudi z ostalimi moduli predmeta Gospodinjstvo v 6. razredu, naprimer »Bivanje in okolje«, kjer učenci pri učni temi Ekološko osveščen potrošnik razmišljajo o pravilnem ravnanju z odpadki, pri temi Proizvodnja in poraba pa obnovijo znanje o surovinah za izdelavo plastenk in steklenic... Primerna je tudi ponovitev znanja pri predmetu Gospodinjstvo iz 5. razreda, kot ponovitev potreb in smiselnega ravnanja z denarjem.

Pri Naravoslovju v 6. razredu lahko pri učni temi »Vrt« obravnavamo čebulo kot objekt gojenja za spoznavanje začimbnic. Spremljamo lahko razvoj rastline in njenih organov, pomembno pa je, da lahko ugotovimo pogoje, potrebne za rast rastlin in razvoj rastlinskih organov.

V 8. razredu je pri predmetu Biologija učna tema »Temelji ekologije« s cilji spoznavanja vpliva človekovih posegov v ekosistem. Pri tem bi lahko zopet uporabili test rasti dolžine koreninic.

V 9. razredu je pri predmetu Biologija učna tema »Celice – tkiva – organi«, kjer pa je možno narediti kompleten čebulni test. Najprej bi lahko opazovali rast korenin, nato pa še spoznali delovanje mikroskopa ter mikroskopirali rastlinsko (čebula) in živalsko celico ter tako prišli do razlik med obema tipoma celice. Ker je v učnem načrtu tudi delitev celice, bi lahko pregledali različne faze mitoze. Ob zanimanju učencev (izbirne vsebine ali dodatni pouk) bi bilo mogoče tudi pregledati in morebiti prešteti kromosomske aberacije.

Nenazadnje bi lahko preparat koreninskega vršička opazovali tudi pri izbirnem predmetu Genetika, saj so kromosomi veliki in lepo vidni pod svetlobnim mikroskopom.

Zgoraj naštete možnosti se lahko prilagajajo tehničnim razmeram v šoli, da pa ne bi prišlo do podvajanja istega testa pri različnih predmetih, pa je zelo pomembno timsko delo profesorjev. Upoštevati je potrebno tudi zanimanje učencev in njihove sposobnosti, nenazadnje pa tudi številčnost učencev ter število mikroskopov, ki jih ima šola na razpolago. Sam test rasti koreninic je enostaven za izvedbo, šola ne potrebuje posebnih aparatur, čebulice pa so na vedno na voljo. Poleg tega je test popolnoma neškodljiv, uporablja se snovi, na katere učenci ne morejo biti alergični. Razen pri mikroskopiranju, ki ga priporočam za učence višjih razredov, je možnost poškodb minimalna ozziroma je ni.

6 POVZETEK

V novembru 2004 so bili vzeti vzorci vodovodne vode na 10 različnih lokacijah v Šaleški dolini. Z uporabo *Allium* testa smo želeli določiti kvaliteto vodovodne vode z uporabo testa dolžinskega prirastka korenin, z določanjem mitotskega indeksa, z določanjem deleža kromosomskih aberacij in s pojavljanjem mikronukleusov. Za bioindikacijo smo izbrali šalotko, ker je enostavna za gojenje, ima genetsko enovit material, dovolj velike kromosome za citološko analizo in je poceni. Poleg tega smo želeli potrditi primernost *Allium* testa kot biotesta.

Po izvedbi testa in mikroskopskem pregledu mitotskih celic koreninskih vršičkov smo ugotovili, da izmerjene vrednosti dolžinskega prirastka, določene vrednosti za mitotski indeks in kromosomske aberacije ter pojavljanje mikronukleusov ne izstopajo od povprečja in je vodovodna voda v Šaleški dolini tudi z vidika uporabe biotestov primerna za pitje.

Potrdili smo tudi primernost *Allium* testa kot biotesta in ga priporočamo kot primeren test za splošno bioindikacijo k rednemu monitoringu vodovodne vode.

Ključne besede:

biotest, šalotka (*Allium cepa* L. var *ascalonicum*), pitna voda, dolžinski prirastek korenin, mitotski indeks, kromosomske aberacije, mitoza, celični cikel

7 SUMMARY

In November 2004 samples of tap water on 10 different locations of The Šalek Valley were taken. With the use of *Allium* test we determined the quality of tap water regarding to root addition through growth, mitotic index, value of chromosomal aberrations and the presence of micronuclei. The shallot was chosen as a bioindicator because it is easy to grow, has genetically uniform material, chromosomes are large enough for cytogenetic analyses and it is cheap to buy. The aim was also to confirm the adequacy of *Allium* test as a biotest.

After microscopic analysis of mitotic cells of root tips were found that the values of root growth, mitotic index, value of chromosomal aberrations and the presence of micronuclei do not exceed normal limits and the tap water from this area is suitable to drink.

The adequacy of the *Allium* test as a biotest is confirmed and it could be recommended as an additional biotest to other monitorings of tap water.

Key words:

biotest, shallot (*Allium cepa* L. var *ascalonicum*), drinking water, root addition through growth, mitotic index, chromosomal aberrations, mitosis, cell cycle

8 VIRI IN LITERATURA

Batič F., 1997a., Pomen bioindikacije pri spremeljanju stanja okolja, V: Sanacija termoenergetskih objektov (Zbornik 1. mednaravnega simpozija), Rogaška Slatina, 28-30. maj 1997, Dejanovič B., Ribarič-Lasnik C. (ur.), Velenje, TEŠ-CEE-ERICo: 291-294

Batič, F., 1997b., Bioindikacija in stresna fiziologija – princip pri ekosistemskih raziskavah gozdnih ekosistemov, V: Znanje za gozd, Zbornik ob 50. letnici Gozdarskega inštituta Slovenije, Ljubljana, 93-102

Fiskejö, G., The *Allium* Test as a standard in environmental monitoring, *Hereditas*, 1985, 102:99-112

Glaserčnik, E., Biotesti za ugotavljanje toksičnosti in genotoksičnosti vode, zemlje in hrane: končno poročilo, Velenje, ERICo, 2007, 12 strani

Glaserčnik, E., Vpliv onesnaženega zraka na celične delitve v koreninskih vršičkih šalotke (*Allium cepa* L. var *ascalonium*) na emisijsko ogroženih območjih Slovenije, doktorska disertacija, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Oddelek za biologijo, 2004, 200 strani

Glaserčnik, E., Grill, D., Müller, M., Ribarič-Lasnik, C., Batič, F., Impact of air pollution on the mitotic activity in meristematic cells in shallot (*Allium cepa* L. var *ascalonium*), *Acta Biologica Slovenica*, 2003, 46(1):27-33

Glaserčnik, E., Ribarič-Lasnik, C., Müller, M., Grill, D., Batič, F., Impact of Air Pollution on Genetic Material of the Shallot (*Allium cepa* L. var. *ascalonicum*), Exposed in the Vicinity of Major Slovene Local Emission Sources in 1999, *Phyton*, 2002, 42(Fasc. 2):237-250

Glasenčnik, E., Ribarič-Lasnik, C., Savinek, K., Zaluberšek, M., Mueller, M., Batič, F.,
Impact of Air Pollution on Genetic Material of (*Allium cepa* L. var. *ascalonicum*)
Exposed at Differently Polluted Sites of Slovenia, Journal of Atmospheric
Chemistry, 2004, 49:363-376

<http://learninglab.co.uk/headstart/cycle3.htm>

<http://www.dartmouth.edu/~cbbc/courses/bio4/bio4-lectures/theCell.html>

<http://www.gov.si/pitna-voda/faq/faq1.html>

http://www.infovisual.info/01/017_en.html

<http://www.kp-velenje.si>

Lah, B., Vidic, T., Glasenčnik, E., Cepeljnik, T., Gorjanc, G., Marinšek-Logar, R.,
Genotoxicity evaluation of water soil leachates by Ames test, comet assay, and
preliminary *Tradescantia* micronucleus assay, Environ Monit Assess, 2007, 12
strani

Marinšek-Logar, R., Tišler, T., Drobne, D..., Vloga za (so)financiranje raziskovalnega
projekta za leto 2004, Domžale, Obrazec: Ministrstva za šolstvo, znanost in
šport, 2003, 25 strani

Osojnik-Črnivec, I., G., Marinšek-Logar, R., Analiza toksičnosti in genotoksičnosti
jezerskih voda z biotesti, Domžale, Acta agriculturae Slovenica, 2004:84, 12
strani

Oud, O., Rickards, G., Understanding Mitosis and Meiosis: an interactive education tool, Amsterdam, Springer-Verlag & UNESCO, ISBN 3-540-14819-1, 1999, CD-ROM

Paradiž, J., Učinki ionizirajočega sevanja na celice meristema čebule (*Allium cepa L.*), doktorska disertacija, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Oddelek za biologijo, 1996, 89 strani

Pravilnik o pitni vodi, Uradni list Republike Slovenije, št. 19/2004

Smaka-Kincl, V., Ocenitev kvalitete odpadnih, površinskih in podtalnih voda z *Allium testom*, doktorska disertacija, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, 1993, 154 strani

Vidaković, Ž., Papeš, D., Tomić, M., Toxicity of waste drilling fluids in modified *Allium test*, Water, Air and Soil Pollution, 1993, 69:413-423

Zakon o varstvu okolja, Uradni list Republike Slovenije, št. 41/2004

Zakon o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živili, Uradni list Republike Slovenije, št. 52/2000

9 PRILOGE

Priloga 1: Popisni list štetja celic

<i>Allium test – Mitotski indeks</i>		Vzorec:			Datum:		
		I	P	M	A	T	Mikronukleus
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14							
15							
16							
17							
18							
19							
20							
21							
22							
23							
24							
25							
26							
27							
28							
29							
30							
31							
32							
33							
34							
35							
36							
37							
38							
39							
40							
41							
42							
43							
44							
45							
46							
47							
48							
49							
50							

Priloga 2: Popisni list štetja kromosomskeih aberacija

Priloga 3: Primer rezultatov terenskih, kemijskih in mikrobioloških analiz vzorčenih vod za V1REZULTATI MERITEV za vzorec št. **5397**

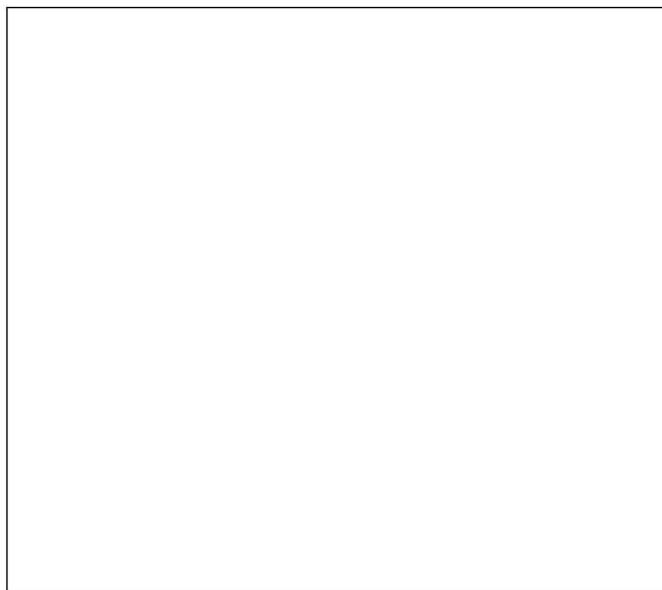
<i>tip preskusa:</i>	redni preskusi		
<i>upravljevec:</i>	KOMUNALNO PODJETJE VELENJE d.o.o. (ID-upr : 94)		
<i>vodni sistem:</i>	VELENJE - ŠOŠTANJ (ID-sis : 3)		
<i>oskrbovalno območje:</i>	RI Velenje (ID-obm : 209)		
<i>mesto vzorčenja:</i>	Vrtec Čebelica Velenje		
<i>naslov mesta vzorčenja:</i>	3320, VELENJE, Konovska cesta 21		
<i>odvzemno mesto:</i>			
<i>parameter:</i>	<i>meritev:</i>	<i>mejna vrednost:</i>	<i>čas meritve:</i>
<i>terenske meritve:</i>			
temperatura vode pri odvzemu [°C]	7.8	-	29.11.2004
pH vrednost []	7.47	6.5 - 9.5	29.11.2004
električna prevodnost [µS cm]	419	2500	29.11.2004
preostali prosti klor [mg l]	0.23	-	29.11.2004
<i>kemijske meritve:</i>			
Barya [mg l]	<0.1	0.50	30.11.2004
Okus []	1	1	30.11.2004
Vonj []	1	1	30.11.2004
Motnost [NTU]	<0.2	5	30.11.2004
Amonij [mg l]	<0.02	0.50	30.11.2004
<i>mikrobiološke meritve:</i>			
<i>Clostridium perfringens</i> (vključno s sporami) /število 100ml/	0	0	2.12.2004
<i>Escherichia coli</i> (E. coli) /število 100ml/	0	0	2.12.2004
Koliformne bakterije /število 100ml/	0	0	2.12.2004
število kolonij pri 22°C /število ml/	1	100	2.12.2004
število kolonij pri 37°C /število ml/	1	100	2.12.2004
<i>opombe laboratorija:</i>			
<i>skladnost:</i>	vzorec JE skladen s predpisi!		

Priloga 4: Primer delovnega lista za učence za dan nastavitev čebulnega testa.

Delovni list: ČEBULNI TEST ZA UGOTAVLJANJE KVALITETE VODE

Dan 1, Skupina 3: voda iz bližnjega potoka

1. Nariši kako smo nastavili test!



2. K skici pripiši kaj smo uporabili za nastavitev testa!

3. Ali imajo čebulice že koreninice?

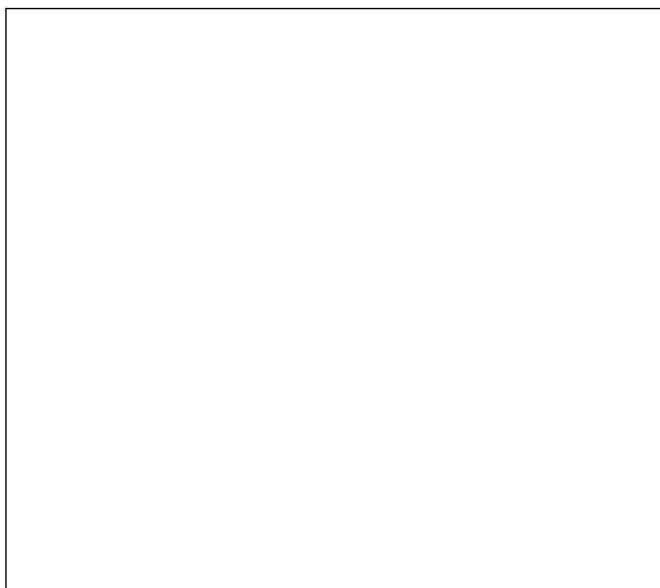
DA

NE

4. Kaj misliš, koliko časa potrebujejo čebulice, da jim začnejo rasti koreninice?

Priloga 5: Primer delovnega lista za učence ob koncu čebulnega testa.**Delovni list: ČEBULNI TEST ZA UGOTAVLJANJE KVALITETE VODE****Dan 5, Skupina 3: voda iz bližnjega potoka**

- Nariši kako izgleda čebulica ob koncu testa!



- Izmeri dolžino najdaljše koreninice!

Dolžina najdaljše koreninice je _____ mm.

- V spodnjo tabelo vpiši izmerjene dolžine najdaljših koreninic vseh skupin!

Ustekleničena voda	Voda iz pipe (vodovodna voda)	Destilirana voda	Voda iz potoka
mm	mm	mm	mm

- V kateri vodi je zrasla najdaljša koreninica?

Koreninice najbolj rastejo v kvalitetni, neonesnaženi vodi. Primernost za pitje nam povedo ostali obvezni testi (poglej nalepko na steklenici).