LABORATORIJ ZA
RASTLINSKO
CITOGENETIKO

ALLIUM METODA ZA TESTIRANJE OKOLJSKIH VZORCEV, PITNE VODE IN KEMIKALIJ

Naročnik:
Gordana Yra Lesjak
Gorenjska c. 1A
SI – 1234 Mengeš

Testni material:
- Vodni vzorec: Mengeš, SI – 1234 Mengeš
- Isto; vodni vzorec traktiran z informacijskim elementom - ENERGONIT

Negativna kontrola in Pozitivna kontrola

Vzorčenje: 4. september 2025

Citogenetske raziskave so potekale od 06. 09. do 10. 09. 2025

Domžale
11. september 2025

TESTNO POROČILO Z REZULTATI RAZISKAV OBRAVNAVA:

1. Parametre *ALLIUM* metafaznega testa podajajo: splošno strupenost (fitotoksičnost) in raven poškodb kromosomov (genotoksičnost) na testni rastlini navadne čebule (*Allium cepa* L), sorta Stuttgarter Riesen.
2. Kakovost kontrolnega in traktirane vzorca vode z *Allium* M testom.
3. Povzetek
4. Poročilo obsega 1+6 strani, 2 preglednici in 6 fotografij.

Povzetek

Po spektru rezultatov splošne strupenosti (fitotoksičnosti) in ravni poškodb kromosomov (genotoksičnosti) med pozitivno in negativno kontrolo ima vzorec vode (Mengeš, SI – 1234 Mengeš) kakovost z nizko do srednjo vrednost zdravstnene varnosti; Isto: voda traktirana z informacijskim elementom ENERGONIT se kakovost vode izboljša na ničelno do nizko oceno tveganja zdravstvene varnosti (primerjava v Preglednici 1: Firbas 2011, Firbas 2014).

Kako zdrava je voda – Kako zdrava je voda je vprašanje, ki ne pušča ravnodušnosti. Njeno sporočilo zamotano v biološko znanost, nam odpira svet, da lahko z danes znanim biološkim opazovanjem razlik v dolžini rasti korenin testne rastline (*Allium cepa* L.) in poškodbah kromosomov v njihovih celicah v odvisnosti od okolja določa kakovost vode.

"Preverite preden pijete" – Samo fizikalno-kemične analize ne dajo dovolj zanesljivega odgovora na vprašanje kako zdrava je voda. Komplementarna raziskava skupno z biološkimi in kemičnimi raziskavami pa podaja popolnoma drugo sliko, kajti težko je identificirati na tisoče kemičnih snovi v vodi. Biološka metoda *ALLIUM* razkriva celosten vpliv na rast in razvoj živih celic ali organizmov ter zaznava prisotnost škodljivih snovi v koncentracijah, na 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 – Preverite preden pijete*).

Splošna strupenost – Različna odzivnost rasti korenin testne rastline (*Allium cepa* L) je splošni pokazatelj kakovosti okoljskega vzorca. Rast naravnost pokaže v kako za življenje primerni vodi so zrasle. Daljše ko so korenine manjša je splošna strupenost in krajše ko so korenine večja je splošna strupenost vzorca.

Raven genotoksičnosti – Pogled na celično raven v rastnih vršičkih korenin testne rastline, še bolj pa pregledovanje celic, ter njihovo razmerje brez poškodovanih kromosomov in celic s poškodbami kromosomov v njej, pa daje že zelo natančno sliko o kakovosti vode oziroma kar odgovor na vprašanje, kako zdrava je voda.

Ocena tveganja – Ni dovolj le ugotoviti, kaj nas ogroža (koncentracije določenih onesnaženih snovi v okolju), temveč, kako resno je (kako prihaja do škodljivih učinkov v bioloških sistemih). S tem nesporno dokazujejo, da ni varnih doz, torej da so MDK (Mejne Dovoljene Koncentracije) nek sporazum podrejen praktični uporabi. Na te izzive pa odgovarjajo biološki testi, ki pokažejo aditivne učinke škodljivih snovi, mehanizme prenosa in tudi pretvorb teh škodljivih snovi v bioloških sistemih.

Soodvisnost kemizacije okolja – Obstajajo tehtni dokazi da kemikalije, ki povzročajo kromosomske poškodbe; znane kot genotoksične snovi izkazujejo lastnosti kancerogenosti, kakor tudi citokemično značilnost EDC-s (*Endocrine Disruptor Chemicals*) hormonskih motenj.

Kaj pa voda, ki jo pijemo – Kakovost npr. pitne vodovodne vode je odvisna od treh dejavnikov: (i) prvi je kakovost na zajetju in/ali črpališču, (ii) drugi je vodovodni sistem od črpališča naprej in (iii) tretji je sama hišna vodovodna napeljava.

PROTOKOL METODE

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

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

1. Uvod

ALLIUM metafazni (M) test je test za ugotavljanje splošne celične strupenosti (citotoksičnosti) *in ravni poškodb kromosomov (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 (ksenobiotiki). Rezultati se nato še statistično ovrednotijo, ki ji 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, do 1 ppb (**p**art **p**er **b**illion – en del snovi na eno milijardo raztopine ali 1 µg na liter ali kilogram).*

*Biološki test ALLIUM ali čebulni test razkriva celosten vpliv na rast in razvoj živih celic ali organizmov ter zaznava prisotnost škodljivih snovi v koncentracijah, manjše od 1 ppb (**p**art **p**er **b**illion – en del snovi na eno milijardo raztopine ali 1 µg na liter ali kilogram). Od približno 700 prepoznavnih snovi, ki se lahko znajdejo na primer v pitni vodi, jih z običajnimi fizikalno-kemijskimi analizami nadzorujemo le okrog 10 odstotkov (Vir: EU Chemical Bureau, Natural Resources Defence Council: Think before you drink).*

Višje rastline so odlični genski modeli za odkrivanje citotoksičnih in/ali mutagenih v okolju; in se pogosto uporabljajo za biomonitoring (oz. spremljanje kakovosti okolja, predvsem vodnih vzorcev) v različnih ekosistemih (Leme in Marin-Morales, 2009). Med rastlinami ima vodilno mesto navadna čebula (*Allium cepa L.*), ki je indikatorska testna rastlina v testnem sistemu pa je *Allium* M test prednosten in zanesljiv (Firbas 2011; Firbas in Amon, 2013, 2014; Bonciu, Firbas in sod. 2018). Mednarodni program rastlinskih bioloških testov (*IPPB – **I**nternational **P**rogram on **P**lant **B**ioassays*) je čebulni (*Allium*) test sprejel za biomonitoring in testiranje okoljskih vzorcev (z morebitnimi onesnaževalci).

2. Material in metode

Test se izvaja po metodi: Al-Sabti 1989, Firbas 2004, 2011, 2015; Bonciu, Firbas in sod. 2018; Kumar in Panneerselvam (2007); Ragunathan in Panneerselvam (2007); Panneerselvam in sod. (2012).

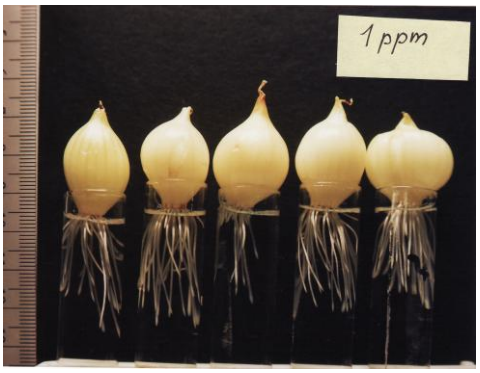
Citogenetske raziskave potekajo na raziskovalnem mikroskopu znamke OLYMPUS – BX 41 (Japonska) s samodejnim foto sistemom PM 10 SP, pri povečavi 400X in 1000X.

Preglednica 1. Primerjava rezultatov ravni genotoksičnosti različnih kakovosti pitnih voda (Firbas P. 2011, Firbas P. 2014)

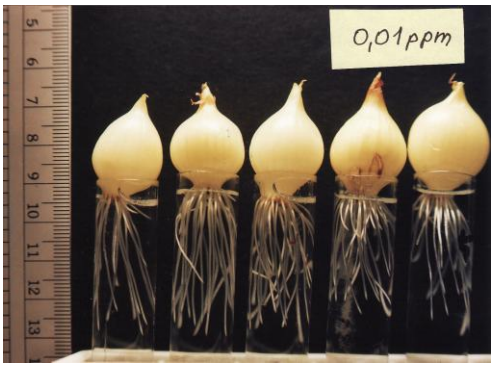
Raven genotoksičnosti (izražena v odst. t. – je razmerje med vsemi metafaznimi celicami in celicami s poškodbami kromosomov; n = 200) **(%)**	Raven Ogroženosti (ocena tveganja)	Vzorci pitnih voda in nekaterih kemikalij
2	naravna mutagenost testnih organizmov	Kakovostna pitna voda
3 5	Ničelna do Nizka	5 mg NO_3/l
9 13	Srednja	0,01 µg/l biocidov, 25 mg/l nitratov
15 18	Visoka	0,1 µg/l biocidov, 40 mg/l nitratov
20 23	Kritična	(>0,1 µg/l biocidov, 50 mg/ll nitratov

Parametri *ALLIUM* metafaznega testa podajajo: splošno strupenost in raven genotoksičnosti

SPLOŠNA STRUPENOST (Slika 1 in 2) podaja dolžino korenin testnih rastlin mlade čebule (*Allium 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 (fitotoksičnost).



Slika 1 – Inhibicijsko stimulacijski test mlade čebule *A. cepa* L. gojen 72 ur v 1 ppm (1mg/l) MMS



Slika 2 – Inhibicijsko stimulacijski test mlade čebule *A. cepa* L. gojen 72 ur v 0.01 ppm (0,01mg/l) MMS.

RAVEN GENOTOKSIČNOSTI (Slika 3 in 4) 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 (Al-Sabti 1989; Firbas 2011). Identificira se 200 ali več metafaznih celic. Pri visoki ravni genotoksičnosti pa manj. Rezultati se podajajo v odstotnih točkah (Odst. t.)

STATISTIČNA KALKULACIJA: Fisher's Exact Test. V 2x2 frekvenčnih tabelah dvosmerna *p-vrednost* determinira statistično značilnost ali neznačilnost dveh kategoričnih vzorcev.

KONTROLA ALLIUM TESTA: 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.

3. Rezultati raziskav

Raziskan je bil naslednji vzorci (*Vzorčenje 04.september 2025*)

I. **Voda: Mengeš, SI – 1234 Mengeš**
II. **Isto –voda traktirana z informacijskim elementom ENERGONIT**
III. *Negativna kontrola in Pozitivna kontrola: Firbas & Amon. 2014. Caryologia. 67(1):25-35.*

Preglednica 2. Citološki učinki raziskanih vzorcev: - splošna strupenost (dolžina korenin testne rastline *Allium cepa* L.) in raven genotoksičnosti (indukcija kromosomskih poškodb v meristemskih celicah korenin testne rastline *Allium cepa* L.)

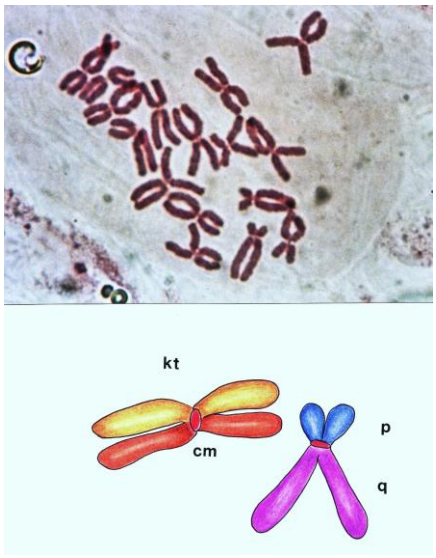
Vzorec	Število metafaznih celic	Število celic s poškodbami kromosomov	Raven Genotoksičnosti (odst. t.)	Povprečna dolžina korenin (mm)
I	**200**	**18**	**9,0**	**20-30**
II	**200**	**7**	**3,5**	**33-39**
*II**			*2,0-2,5*	*40-44*
*III**			*19,5-23,5*	*23,0*

– K (II); *+K (III). Citat: Firbas & Amon. 2014. Caryologia. 67(1):25-35.

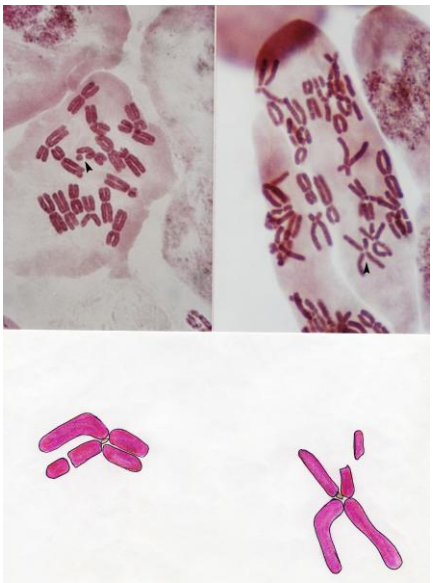
Slika 3. Testne rastline vodnega vzorca - Mengeš

Slika 4. Dolžina korenin testne rastline navadne čebule (*Allium cepa* L.) v vzorcu traktirane vode z informacijskim elementom ENERGONIT, Mengeš, SI – 1234 Mengeš.

Raziskana vzorca pitne vodovodne vode (Vzorec I in Vzorec II) se statistično signifikantno razlikuje s stopnjo značilnosti: ($p = 0{,}0369 < 0{,}05$)
Ko je raziskani vzorec po rezultatu bliže rezultatu vzorcu –K (negativne kontrole) boljša je kakovost vode; bliže ko je raziskani vzorec vzorcu +K (pozitivne kontrole) slabša je kakovost vode (Primerjava: Preglednica 1).



Slika 5. Nepoškodovani metafazni kromosomi navadne čebule (*Allium cepa* L.) v koreninskih celicah. Celica vsebuje 16 kromosomov (2n = 16). Kromosom tvorita dve vzdolžni kromatidi (kt) ali vzdolžni polovici. Centromera (cm) razmeji kromosom v krajši (p) krak in daljši (q) krak. Kraka kromosoma sta lahko tudi enaka.



Slika 6. Poškodovani kromosomi v metafaznih celicah koreninskih vršičkov mlade čebule (*Allium cepa* L.).

4. Zaključek

Po spektru rezultatov splošne strupenosti ali fitotoksičnosti (dolžina korenin testne rastline) in ravni genotoksičnosti (poškodb kromosomov v celicah testne rastline) med pozitivno in negativno kontrolo ima voda Mengeš, SI – 1234 Mengeš (Vzorec I) kakovost

z nizko do srednjo oceno tveganja zdravstvene varnosti. Isto – voda traktirana z informacijskim elementom ENERGONIT (Vzorec II) pa ima ničelno do nizko oceno tveganja zdravstvene varnosti.

Allium M (M – metafazni) test je monitor za detekcijo rakastih obolenj. Poškodbe kromosomov v čebuli so enake kot v humanih celicah. Tovrstne poškodbe kromosomov pa povzročajo različne klinične učinke pri človeku (Firbas & Amon, 2014).

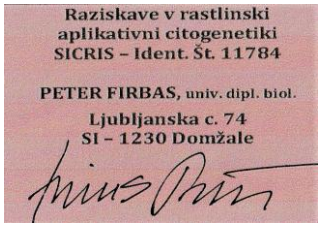
5. Cilji raziskav in statistična značilnost

Cilj raziskav je nedvomno ta, da nam rezultati raziskav pokažejo ali onesnaženje jé ali ga ni ter predvsem kakšno je tudi tveganje za organizme, vključno z ljudmi. Omenjeni *ALLIUM* test pa nas tudi pripelje kaj je vzrok onesnaževanju oz. kje je vir. Šele z znanimi izvori lahko preidemo k ukrepom in tako prispevamo čim večji delež k ohranjanju zdravega okolja.

Statistično ugotovljeno signifikantno razliko med preiskanimi vzorci potrjuje statistična kalkulacija analiza parnih podatkov s dvosmernim *Fisherjevim eksaktnim testom*, ki podaja lastnost *vrednosti* med paroma podatkov in sicer ali sta para (raziskana vzorca) različna (statistično značilna *p vrednost*) ali se ne razlikujeta (statistično neznačilna *p vrednost*) in kakšno je tudi tveganje. Statistična značilnost pa naj nebi bila edini odločilni dejavnik pri vrednotenju rezultatov.

6. Literatura

LEVAN A, FREDGA K, SANDBERG AA. 1964. Hereditas. 52:201-220.
AL-SABTI K. (1989. Cytobios. 58:71-78.
AGRESTI A. 1992. Statistical Sci. 7:131-153.
FIRBAS P. 2004. ARA založba. Ljubljana.
KUMAR P, PANNEERSELVAM N. 2007. Facta Universitatis Series: Med Biol. 14(2):60-63.
RAGUNATHAN I, PANNEERSELVAM N. 2007. J Zhejiang Univ Sci B. 8(7):470-475.
LEME D, MARIN-MORALES A 2009. Mut Res. 682 (1):71-81.
PANNEERSELVAM N, PALINIKUMAR L, GOPINATHAN S. 2012. Int J Pharma Sci Res. 3:300-304.
FIRBAS P. 2011. Kemizacija okolja in citogenetske poškodbe. Ekslibris. Ljubljana.
FIRBAS P, AMON T. 2013. *Allium Chromosome Aberration Test for Evaluation Effect of Cleaning Municipal Water with Constructed Wetland (CW) in Sveti Tomaž, Slovenia.* J Biorem Biodeg. 4 (4):189-193.
FIRBAS P, AMON T. 2014. *Chromosome damage studies in the onion plant Allium cepa* L. Caryologia, 67 (1):25-35.
FIRBAS P. (2014) . Laboratory of plant cytogenetics: use of Allium test for purpose of establishing quality of waters; since 1998. Domžale, Slovenia. (The quote of this work is in the magazine) **Citat tega dela je v reviji:** Malakahmad, A., Manan, T.S.B.A., Sivapalan, S. et al. *Genotoxicity assessment of raw and treated water samples using Allium cepa assay: evidence from Perak River, Malaysia*. Environ Sci Pollut Res (2018) 25: 5421-5436. https://doi.org/10.1007/s11356-017-0721-8 .
FIRBAS P. 2015. *A Survay of Allium cepa L. Chromosome damage in Slovenian Enviromnental Water, Soil and Rayfall Samples.* Int J Curr Res Biosci Plant Biol. 2 (1): 63-83.
FIRBAS P. 2016. ARA založba. Ljubljana.
BONCIU E, FIRBAS P. FONTANETTI CS, WUSHENG J, KARAISMAILOGLU MC, LIU D, MENICUCCI F, PESNYA DS, POPESCU A, ROMANOVSKY AV, SCHIFF S, SLUSARCZYK J, SUOZA CP, SKRIVASTAVA A, SUTAN A, PAPINI A. 2018. *An evaluation for the standardization of the Allium cepa test as cytotoxicity and genotoxicity assay.* Caryologia. 71(3):191-209.

6

Domžale, 11.september 2025
Peter Firbas