

ŠOLSKI CENTER VELENJE
SPLOŠNA IN STROKOVNA GIMNAZIJA VELENJE
MLADI RAZISKOVALCI ZA RAZVOJ ŠALEŠKE DOLINE

RAZISKOVALNA NALOGA

**UGOTAVLJANJE GENOTOKSIČNOSTI METIL TETRA-BUTIL
ETRA (MTBE) Z *ALLIUM* TESTOM**

Biologija in ekologija z varstvom okolja

Avtorica:
Ana Špes, 4. letnik

Mentorici:
mag. Nataša Kopušar, univ. dipl. inž. agr.
Meta Zaluberšek, dipl. inž. zooteh.

Velenje, 2008

Raziskovalna naloga je bila opravljena na ERICo Velenje – Inštitut za ekološke raziskave in je plod lastnega raziskovalnega dela.

Mentorici:

mag. Nataša Kopusar, univ. dipl. inž. agr.

Meta Zaluberšek, dipl. inž. zooteh.

Datum predstavitve:

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- KG Genotoksičnost / Metil tetra-butil eter / MTBE / *Allium* test / Mitotski indeks / Kromosomske aberacije / Aberacijski indeks
- AV ŠPES, Ana
- SA KOPUŠAR, Nataša ment. / ZALUBERŠEK, Meta soment.
- KZ 3320 Velenje, SLO, Trg mladosti 3
- ZA Šolski center Velenje, Splošna in strokovna gimnazija Velenje
- LI 2008
- IN UGOTAVLJANJE GENOTOKSIČNOSTI METIL TETRA-BUTIL ETRA (MTBE) Z *ALLIUM* TESTOM.
- TD RAZISKOVALNA NALOGA
- OP XIII, 60 s., 10 preg., 45 sl., 8 graf., 2 pril.
- IJ SL
- JI sl/en
- AI Genotoksičnost metil tetra-butil etra (MTBE) v pitni vodi z *Allium* testom je raziskovalna naloga pri kateri smo želeli ugotoviti v katerih koncentracijah vodne raztopine MTBE, ta vpliva na spremembe pri delitvi celic koreninskih vršičkov čebulic šalotke (*Allium cepa* L. var. *ascalonicum*). Ugotavljali smo, kako se dolžina koreninic čebulic spreminja glede na koncentracijo onesnažila, kako se kromosomske napake povečujejo s povečevanjem koncentracije MTBE v vodi in kako to vpliva na delitev celic. Raziskava temelji na *Allium* testu, kjer gre za obsežen postopek, tako priprave preparatov, kot tudi opazovanja le-teh. Čebulice smo izpostavili za 14 dni v določenih koncentracija vodne raztopine MTBE, nato smo jih vzorčili in fiksirali. Priprava posameznega preparata je vključevala hidrolizo, obarvanje v folgenu oz. Schifferjevemu reagentu ter priprava vzorca t. i. mečkanca za opazovanje pod mikroskopu. Pri vsaki posamezni koncentraciji smo opazovali tri preparate. Za določitev mitotskega indeksa smo pregledali 1000 celic na preparat, torej skupno 3000. Pri določevanju aberacijskega indeksa smo imeli cilj pregledati 90 anafaz in 90 metafaz, v treh preparatih. Čebulice, ki smo jih izpostavili v koncentracijah MTBE imajo za 15 odstotka nižje prirastke kot tiste v destilirani vodi in pitni vodi, kar dokazuje, da MTBE stresno vpliva na delitev celic. Pri vseh koncentracijah smo izračunali nizek mitotski indeks, ki v povprečju znaša 2,6 odstotka. Ugotovili smo, da z večanjem koncentracije MTBE v pitni vodi narašča tudi odstotek aberantnih metafaz in anafaz, najvišji aberacijski indeks koncentracij MTBE ima koncentracija 1000 µg/l (AI = 34,4 %). V povprečju je poškodovanih več anafaz.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- CX Genotoxicity / Methyl tert-butyl ether / MTBE / *Allium* test / Mitotic index / Chromosome aberrations / Aberration index
- AU ŠPES, Ana
- PP 3320 Velenje, SLO, Trg mladosti 3
- PB Šolski center Velenje, Splošna in strokovna gimnazija Velenje
- PY 2008
- TI DEFINING THE GENOTOXICITY OF METHYL TERT-BUTYL ETHER (MTBE) IN DRINKING WATER WITH *ALLIUM* TEST
- DT RESEARCH WORK
- NO XIII, 60 p., 10 tab., 45 fig., 8 gr., 2 app.
- LA SL
- AL sl/en
- AB Genotoxicity of methyl tert-butyl ether (MTBE) in drinking water with *Allium* test is a research work, with which we wished to ascertain, which concentrations of aqueous solutions of MTBE have an influence on division of meristematic cells of shallot (*Allium cepa* L., var. *ascalonicum*). We wished to discover, how it changes the length of root, depend on changing value of MTBE concentration in drinking water, how it multiplies chromosome defects depended on increase of MTBE concentration and also, how this influences the divisions of cells. Our research is founded on *Allium* test, which is an extensive procedure of: preparing of preparation and analysis of preparations. Shallots have been exposed for 14 days to different values of MTBE concentrations. After this period of time, they have been sampled and fixed. Preparing of each preparation included hydrolysis, coloration in Schiffer's reagent and also the preparation of a sample for observation under microscope. We observed the samples per each concentration. We counted 3000 cells, 1000 per sample, to define mitotic index (MI). To define index of chromosome aberrations, we planed to analyse 90 anaphases and 90 metaphases in three samples. Shallots that have been exposed to different values of MTBE have 15 percent lower root accretions, than the ones, exposed to drinking or distilled water. Those prove that MTBE influences cell diversion. We calculated very low mitotic index in all of the concentrations, in average 2,6 %. We ascertained that with the increase of MTBE value in drinking water, the percent of chromosome aberrations is also increased. The highest chromosome aberration index has concentration of 1000 µg/l (CA = 34,4 %). In average, we find, there is more damage to anaphases than metaphases.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO GRAFOV	VIII
KAZALO SLIK IX	
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
SLOVARČEK XIII	
1 UVOD	2
1.1 Cilji:.....	3
1.2 Hipoteze:.....	3
2 PREGLED OBJAV IN DOSEDANJIH RAZISKAV	4
2.1 Metil tetra-butil eter.....	4
2.1.1 <i>Kemijska opredelitev MTBE</i>	4
2.1.2 <i>Vstop MTBE v okolje in posledice</i>	6
2.1.3 <i>Izpostavitve ljudi MTBE-ju</i>	6
2.1.4 <i>Učinki MTBE na zdravje in stranski učinki pri zastrupitvi</i>	6
2.1.5 <i>MTBE v gorivih in emisijah iz prometa</i>	7
2.1.6 <i>Pridobivanje MTBE</i>	7
2.1.7 <i>MTBE v vodi in mejne vrednosti</i>	7
2.1.8 <i>MTBE v rastlinah</i>	8
2.1.9 <i>Raziskave o MTBE v Sloveniji</i>	9
2.1.10 <i>Zakonodaja</i>	9
2.2 TESTIRANJE UČINKOV ONESNAŽIL NA DEDNINO.....	10
2.2.1 <i>Ekotoksikologija</i>	10
2.2.2 <i>Allium test</i>	11
2.2.3 <i>Citogenetska bioindikacija</i>	11
2.3 Celični cikel (AL-SABTI, 1993).....	12
2.3.1 <i>Interfaza</i>	12
2.3.2 <i>Profaza</i>	13
2.3.3 <i>Prometafaza</i>	13
2.3.4 <i>Metafaze</i>	13
2.3.5 <i>Zgodnja anafaza in pozna anafaza</i>	14
2.3.6 <i>Telofaza</i>	15
2.4 Kromosomi in njihova morfologija.....	15
2.4.1 <i>Vrste kromosomskih aberacij</i>	16
2.4.2 <i>Mikronukleus</i>	17
3 MATERIALI IN METODE DELA.....	19
3.1 Izbira in priprava koncentracij MTBE.....	19
3.2 Izbor objektov raziskovanja, čebulic šalotk (<i>Allium cepa</i> L. var. <i>ascalonicum</i>)	20
3.3 Izpostavitve čebulic in merjenje dolžin korenin.....	20
3.4 Jakost svetlobnega toka in energija fotonov.....	23
3.5 Dolžinski prirastek korenin za ocenitev toksičnosti.....	24
3.6 Fiksiranje in priprava mečkancev koreninskih vršičkov	25
3.6.1 <i>Priprava mečkanca</i>	25

3.7	Analiza vzorcev	27
3.7.1	<i>Mitotski indeks</i>	27
3.7.2	<i>Kromosomske aberacije</i>	28
3.7.3	<i>Delež aberantnih metafaz</i>	28
3.7.4	<i>Analiza aberantnih anafaz</i>	29
4	REZULTATI	30
4.1	Pogoji izpostavitve	30
4.2	Dolžinski prirastek koreninic.....	31
4.3	Mikroskopiranje	32
4.4	Mitotski indeks	32
4.5	Aberacijski indeks	33
5	REZULTATI IN RAZPRAVA	36
5.1	Merjenje temperature, relativne vlažnosti, jakosti svetlobe in energije svetlobnega toka	36
5.2	Dolžinski prirastki korenin	36
5.3	Mitotski indeks	38
5.4	Aberacijski indeks	40
5.5	Vrste poškodb, ki smo jih opazili v koncentracijah.....	43
5.5.1	<i>Fragmenti</i>	43
5.5.2	<i>Špranje in fragmenti</i>	44
5.5.3	<i>Mostički</i>	44
5.5.4	<i>Zlepljenja</i>	46
5.5.5	<i>Sateliti</i>	48
5.5.6	<i>Zaostali kromosomi, nesimetrična delitev</i>	49
5.5.7	<i>Mikronukleus</i>	50
6	ZAKLJUČKI	52
7	POVZETEK	54
8	ZAHAVALA	56
9	VIRI IN LITERATURA.....	57
10	PRILOGE	60

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Kemijske in fizikalne lastnosti povzete po ATSDR, 1996:.....	5
Preglednica 2: Shematska ponazoritev izpostavitve čebulic in izločitve neuporabnih.	22
Preglednica 3: Rezultati meritev temperature in vlažnosti na različnih mestih v laboratoriju.....	30
Preglednica 4: Rezultati meritve jakosti svetlobnega toka za rdečo svetlobo in energije fotonov za modro svetlobo	30
Preglednica 5: Izmerjene dolžine najkrajših in najdaljših koreninic vsake koncentracije. ...	31
Preglednica 6: Popis dela s preparati od priprave, mikroskopiranja in pregleda aberacij....	32
Preglednica 7: Rezultati štetja celic za mitotske indekse ter mitotski indeksi koncentracij.....	32
Preglednica 8: Delež aberantnih metafaz in anafaz pri posamezni koncentraciji MTBE izpostavitve šalotke v primerjavi s pitno vodo in destilirano vodo.	33
Preglednica 9: Analiza kromosomskih poškodb v izpostavitvah.	34
Preglednica 10: Mitotski in aberacijski indeksi izpostavitve, prikazani za vse koncentracije.....	35

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Povprečni dolžinski prirastki koreninic šalotke izpostavljenih različnim koncentracijam MTBE v pitni vodi in posebej samo v destilirani vodi.	37
Graf 2: Povprečni dolžinski prirastek koreninic šalotke v posamezni številki merilnega valja v 7 dneh izpostavitve.	38
Graf 4: Število skupaj sešteti celic po fazah brez interfaze.	38
Graf 5: Rezultati mitotskih indeksov posameznih koncentracij, vključno s pitno in destilirano vodo.	39
Graf 6: Število analiziranih celic v posameznih koncentracijah.	40
Graf 7: Prikaz aberacijsega indeksa metafaze (AI_{mph}) in anafaze (AI_{mph}) po koncentracijah.	41
Graf 8: Prikaz aberacijskih indeksov v primerjavi z indeksoma iz literature (KOPUŠAR, N. s sod., 2006).....	42

KAZALO SLIK

Slika 1: 3-D molekula MTBE (http://chemical-quantum-images.blogspot.com/2007_02_01_archive.html , 10.12.2007).....	5
Slika 2: Shematski prikaz telofaze (http://sl.wikipedia.org/wiki/Mitoza , 4. 3. 2008).....	12
Slika 3: Interfaza slikana v konc. 0,01 µg/l, pri 600 × povečavi (foto. A. Špes).	12
Slika 4: Shematski prikaz profaze v dveh stadijih (http://sl.wikipedia.org/wiki/Mitoza , 4. 3. 2008).	13
Slika 5: Profaza slikana v konc. 0,01 µg/l, pri 400 × povečavi (foto. A. Špes).	13
Slika 6: Shematski prikaz metafaze (http://sl.wikipedia.org/wiki/Mitoza , 4. 3. 2008).....	14
Slika 7: Dve metafazi slikani v konc. 0,01 µg/l, pri 400 × povečavi (foto. A. Špes).....	14
Slika 8: Shematski prikaz zgodnje anafaze (zgoraj) in anafaze (spodaj) (http://sl.wikipedia.org/wiki/Mitoza , 4. 3. 2008).	14
Slika 9: Anafaza slikana v konc. 0,01 µg/l, pri 600 × povečavi (foto. A. Špes).	14
Slika 10: Shematski prikaz telofaze v dveh stadijih (http://sl.wikipedia.org/wiki/Mitoza , 4. 3. 2008).	15
Slika 11: Telofaza slikana v konc. 0,01 µg/l, pri 400 × povečavi (foto. A. Špes).	15
Slika 12: Diagramska predstavitev nastanka mikronukleusa (AL-SABTI, 1993).	17
Slika 13: Diagramska predstavitev, kako je treba pod mikroskopom analizirati mikronukleus in binuklearne celice, med raziskovanjem (AL-SABTI, 1993).....	18
Slika 14: Priprava koncentracija MTBE v pitni vodi, za steklom digestorija, ki preprečuje vdihavanje strupenih hlapov (foto. A. Špes).....	20
Slika 15: Ovijanje bučk v aluminijasto folijo in zapisovanje koncentracij na njih (foto. N. Kopušar).....	20
Slika 16: Dve šablони z največjim in najmanjšim obsegom (Skenirano, A. Špes)	20
Slika 17: Priprava čebulic, čiščenje in lupljenje (foto. A. Špes).	21
Slika 18: Priprava merilnih valjev na izpostavitvev čebulic v raztopinah (foto. A. Špes)....	21
Slika 19: Polnjenje merilnih valjev z ustreznimi raztopinami (foto. N. Kopušar).	21
Slika 20: Izpostavljene čebulice (foto. A. Špes).....	23
Slika 21: Merjenje dolžin koreninic (foto. A. Špes).....	25
Slika 22: Priprava mečkanca, prvi postopek (narisala A. Špes).....	26
Slika 23: Priprava mečkanca, postopek odstranitve zračnih mehurčkov (narisala A. Špes).	26
Slika 24: Priprava mečkanca, postopek razmazanja celic koreninskega vršička po objektu stekelcu (narisala A. Špes).....	26
Slika 26: Obročast fragment v metafazi, koncentracija 1000 µg/l, 400 × povečava (foto. A. Špes)	43
Slika 27: Fragment v anafazi, koncentracija 50 µg/l, 400 ×, povečava (foto. A. Špes).....	43
Slika 28: Fragment v metafazi, koncentracija 0,5 µg/l, 400 × povečava (foto. A. Špes).....	44

Slika 29: Špranja in fragmenti vidni v metafazi, koncentracija 0,5 µg/l, 400 × povečava (foto. A. Špes).....	44
Slika 30: Mostiček v anafazi v nesimetrični celici, koncentracija 100 µg/l, 400 × povečava (foto. A. Špes).....	45
Slika 31: Dva mostička v anafazi, koncentracija 100 µg/l, 400 × povečava (foto. A. Špes)	45
Slika 32: Več mostičkov, koncentracija 1000 µg/l, 400 × povečava (foto. A. Špes).....	45
Slika 33: Neпоškodovani kromosomi v anafazi, koncentracija 5 µg/l, 1000 × povečava (foto. A. Špes).....	46
Slika 34: Zlepljenje in oblikovanje t. i. amorfnih mas, tipična aberacija v destilirani vodi, 1000 × povečava (foto. A. Špes)	46
Slika 35: popolnoma zlepljena anafaza, nezmožna nadaljevati delitev, zaradi prevelike aberacije, destilirana voda, 1000 × povečava (foto. A. Špes).....	47
Slika 36: Zlepljena metafaza, koncentracija 0,01 µg/l, 400 × povečava (foto. A. Špes)	47
Slika 37: Satelit v metafazi, koncentracija 10 µg/l, 630 × povečava (foto. A. Špes).....	48
Slika 38: Satelit in obroček v metafazi, koncentracija 1000 µg/l, 630 × povečava (foto. A. Špes)	48
Slika 39: Anafaza, ki je asimetrična, prepletена, koncentracija 100 µg/l, 400 × povečava (foto. A. Špes).....	49
Slika 40: Dve metafazi, ki sta poškodovani, kromosomi so premalo odebeljeni, koncentracija 1000 µg/l, 400 × povečava (foto. A. Špes)	49
Slika 41: Anafaza z zaostalimi kromosomi in nesimetrično delitvijo, koncentracija 5 µg/l, 400 × povečava (foto. A. Špes).....	50
Slika 42: Metafaza na desni ima zaostali kromosom, koncentracija 100 µg/l, 400 × povečava (foto. A. Špes).....	50
Slika 43: Mikronukleus v koncentraciji 0,5 µg/l, pri 400 × povečavi (foto. A. Špes)	51
Slika 44: Jasno viden mikronukleus, ki je nastal med delitvijo jedra, destilirana voda, 400 × povečava (foto. A. Špes)	51
Slika 45: Mikronukleus, ki ni popolnoma jasno odcepljen od jedra celice, destilirana voda, 400 × povečava (foto. A. Špes).....	51

KAZALO PRILOG

Priloga 1: Tabela za štetje celic in izračun mitotskega indeksa

Priloga 2: Tabela za analizo celic za izračun aberacijskega indeksa

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

MTBE	metil tetra-butil eter
CO ₂	Ogljikov dioksid
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
EPA	Environmental Protection Agency
DHHS	The Department of Health and Human Services
IARC	Internacional Agency for Research on Cancer
PV	Pitna voda
DV	destilirana voda
AI	Aberacijski indeks [%]
MI	Mitotski indeks [%]

SLOVARČEK

Mitotski indeks	Delež delečih celic na 100 celic
Aberacijski indeks	Delež aberantnih celic na 100 celic
Aberantna celica	Celica, ki ima poškodovane kromosome
Aberacija	Kromosomska poškodba
Kariotip	Kromosomski izvid
Kancerogene snovi	Snov, ki povzročajo raka
Opozorilna vrednost	Koncentracija snovi, pri kateri bi se naj začelo s priporočili ter opozarjanjem

prebivalstva in povzročitelja obremenitve preventivno varovati zdravje ljudi pred škodljivimi vplivi MTBE

Mejna vrednost

Je predpisana raven onesnaženosti, ki ne sme biti presežena oz. mora biti v določenem roku dosežena, če jo dejanska raven onesnaženosti presega. Mejna vrednost se določa na podlagi znanstvenih spoznanj z namenom, da se preprečijo, odpravijo ali zmanjšajo škodljivi učinki na zdravje ljudi in okolje.

1 UVOD

Zdi se, da vemo vse, kar se dogaja okoli nas, da smo osveščeni o onesnaževanju okolja, posledicah onesnažil na organizme. A kaj, ko se hkrati moramo zavedati tudi, koliko stvari nam je še neznanih, kaj vse nam proizvajalci na trgu ponujajo, vendar sploh ne vemo za kaj gre. Morda je eden izmed teh tudi metil tetra-butil eter. Večini neznan kemikalija z dneva v dan postaja vse večji onesnaževalec okolja in nam je vsak trenutek bližje. Metil tetra-butil eter (MTBE) uporabljajo v naftni industriji, kot dodatek bencinskemu gorivu namesto svinca, za zvišanje oktanskega števila. Prometa je danes vedno več in vse bolj onesnažuje okolje. Torej, lahko sklepamo, da se vrednost MTBE v okolju (zrak, tla, pitna voda ...) tudi povišuje. V okolje se lahko sprošča pri skladiščenju, pretakanju ali izgorevanju goriva. Torej so emisije MTBE izključno antropogenega izvora. Zaenkrat je MTBE uvrščen med potencialno rakotvorne snovi. V Sloveniji o prisotnosti MTBE v okolju in vplivih na organizme skoraj nič ne vemo. Niti v evropskem prostoru si o vplivih MTBE na organizme niso enotni, predvsem zaradi malega števila raziskav. Te so sicer pokazale, da je prisoten tudi v pitni vodi v manjših koncentracijah, manj kot 0,5 µg/l. Vendar ali lahko tej koncentraciji sploh upravičeno rečemo, da je manjša, če zaradi majhnega števila raziskav o vplivu MTBE na organizme, sploh ne vemo kakšne razsežnosti ima ta kemikalija.

V Evropi MTBE zakonsko ni določen kot obvezno spremljana kemikalija pri monitoringih vode, Slovenija je prevzela pravilnik in ga poenotila z Evropskim. Poleg tega MTBE ni uvrščen na seznam kemikalij, katerim so določeni parametri oz. mejne vrednosti. Danska je v obdobju od 1993 do 2001 v okviru nacionalnega programa monitoringa podtalnice analizirala in spremljala tudi MTBE. V 10 odvzetih vzorcih od 7671 je bila izmerjena koncentracija MTBE višja od 5 µg/l (Kopušar s sod. 2006). Takrat so se začeli zavedati potencialne ogroženosti ljudi, ki so to vodo pili.

Ameriška okoljska agencija (EPA) je prva začela izvajati študije o MTBE-ju. Kar ne preseneča, saj so prav Združene države Amerike prve začele uporabljati ta nadomestek svinca v bencinskem gorivu. Na podlagi rezultatov so zaprli več kot 20 vodnjakov, ki so bili vir pitne vode, saj je koncentracija presegala določeno mejno vrednost onesnažila, ki je v ZDA med 20 – 40 µg/l. Nekatere zvezne ameriške države so prevzele višje vrednosti. EPA je MTBE klasificirala kot možno kancerogeno snov za človeka, katere genotoksičnost še ni popolnoma raziskana (Kopušar s sod., 2006).

Slovenija ni edina država, ki v monitoringih ne spremlja tega onesnažila, vendar je morda čas, da se tudi MTBE uvrsti na seznam onesnažil spremljanih v monitoringih, ter da se na podlagi raziskav tudi pri nas določi mejna vrednost onesnažila. Ker je MTBE v industriji v uporabi razmeroma kratek čas, še ni bilo opravljenih dolgoročnih raziskav, o vplivih te kemikalije na zdravje (DWA, 1997). Možno je lahko, da tudi manjše koncentracije, katerim bi bil človek izpostavljen dalj časa, vplivajo na njegovo zdravje. Opravljenih je bilo premnogo premalo raziskav, da bi lahko kar koli trdili. Vendar je prav, da se vsi zavedamo, da smo izpostavljeni tudi tej kemikaliji in kakšne so posledice. Prav to si tudi prizadevamo v naši raziskovalni nalogi, posredno vplivati na vladne organizacije in ozavestiti ljudi o kvaliteti pitne vode, ki jo pijemo in kemikalijah v njej. Ter določiti, ali je MTBE res nevaren organizmom in v kakšnih količinah.

Namen našega dela je bil s citogenetsko bioindikacijo in ugotovljenim mitotskim indeksom ter frekvenci kromosomskih aberacij ugotoviti ali je MTBE genotoksičen ali ne ter kako vpliva na delitev celic šalotke (*Allium cepa* L. var. *ascalonicum*). Postavili smo naslednje cilje in hipoteze.

1.1 Cilji:

- Ugotovitev v katerih koncentracijah vodne raztopine MTBE, ta vpliva na spremembe v delitvi koreninskih vršičkov.
- Določiti okvirno mejno vrednost koncentracije MTBE v pitni vodi, kjer ni značilnega negativnega vpliva na celične delitve.

1.2 Hipoteze:

- Koreninice čebulice šalotke v vodi z večjimi koncentracijami MTBE bodo krajše, saj pričakujemo, da bodo aberacije vse bolj negativno vplivale na njihovo rast.
- Mitotski indeksi se bodo s povečevanjem koncentracije MTBE v vodi manjšali.
- S povečevanjem koncentracije MTBE v pitni vodi se bo premo sorazmerno povečevalo število kromosomskih aberacij in anomalij v delitvi koreninskih celic.

2 PREGLED OBJAV IN DOSEDANJIH RAZISKAV

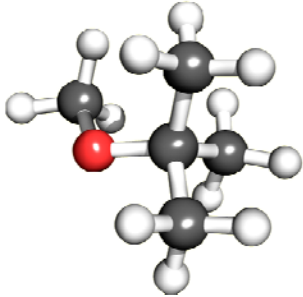
2.1 Metil tetra-butil eter

MTBE je okrajšano ime za molekulo metil tetra-butil eter. Sintetizirana je iz kombinacije elementov in spojin, kot sta izobuten in metanol. V tekočem stanju je močno vnetljiva in ima značilen, za mnoge neprijeten vonj. Prvič predstavljen je bil kot dodatek neosvinčenemu bencinu v 90-ih, za izboljšanje oktanskih sposobnosti (povečanje oktanskega števila) in redukcijo emisij ogljikovega monoksida. V mestih z veliko onesnaženostjo, predvsem z ogljikovim monoksidom, je EPA po predvidevanjih težila k uporabi MTBE ali etanola kot predstavnika spojin v gorivih, ki nase vežejo kisik. Na podlagi tega povzročata, da bencin zgori bolj čisto predvsem v zimskih mesecih, ko se vrednosti onesnažil v mestih zaradi klimatskih razmer bolj koncentrirajo in povečajo. Goriva, ki vsebujejo te dodatke so imenovana izboljšana ali popravljena goriva. Predvsem MTBE je na podlagi številnih dobrih kemijskih in fizikalnih lastnosti prevladoval kot tovrsten dodatek. Uporabljajo ga tudi v kemijskih laboratorijih in v medicini za topljenje žolčnih kamnov. (ATSDR, 1996)

2.1.1 Kemijska opredelitev MTBE

Metil tetra-butil eter je hitro hlapljiva in vnetljiva organska zmes, znana kot oksigen. Molekula je majhna in topna v vodi, kot tudi v nekaterih organskih topilih. V vodi ga je topnega 10 krat manj kot je topnega sladkorja, a dovolj da se prenese v podtalnico in jo onesnaži. Je precej nestabilna molekula in hitro razpade, ter postane del kakšne druge molekule, kot so butil alkohol, metil-alkohol, formaldehid, mravljična kislina in ogljikov dioksid (ATSDR, 1996).

Preglednica 1: Kemijske in fizikalne lastnosti povzete po ATSDR, 1996:

Značilnost	Izsledki	Reference
Kemijsko ime	metil tetra-butil eter	Merck, 1989
Sinomimi	<i>tetra</i> -butil metil eter, 2-metoksi-2-metilpropan, MTBE, metil <i>t</i> -butil eter	Merck, 1989
Kemijska formula	C ₅ H ₁₂ O	
Kemijska struktura	 <p>Slika 1: 3-D molekula MTBE (http://chemical-quantum-images.blogspot.com/2007_02_01_archive.html, 10.12.2007).</p>	
Teža molekule	88,15 g/mol	Lide, 1994
Specifična teža (pri 20 °C)	0,7405 g/cm ³	Lide, 1994
Barva	brezbarven	HSDB, 1994
Osnovno stanje	tekoče	Merck, 1989
Tališče	-109 °C	Lide, 1994
Vrelišče	55,2 °C	Lide, 1994
Meja topljivosti v vodi <i>Glede na nihanja temp.:</i>	48g/l vode 40 – 50 g/l vode	Merck, 1989; Gilbert in Calabrese, 1992
Topljivost v organskih topilih	v alkoholu in eter	Lide, 1994
plemenišče	-28 °C – 28 °C (zaprta čaša)	Merck, 1989; Gilbert in Calabrese, 1992
Hlapljivost (parni pritisk)	245 mm Hg	Merck, 1989
Porazdelitveni koeficient ^(1*) Log K _{ow}	1,24	

^(1*) Je merilo za lipidotopnost, kar je topnost v organskih topilih oziroma netopnost v vodnem okolju (<http://sl.wikipedia.org/wiki/Lipidotopnost>, 2. 1. 2008). Večja kot lipidotopnost snovi, večja je njena absorpcija skozi plast lipidov na celični membrani (DWA, 1997)

2.1.2 Vstop MTBE v okolje in posledice

Njegovo vrelišče je zelo nizko in izhlapi že pri sobni temperaturi iz odprtih posod. V zraku se hitro porazdeli med druge kemijske zmesi. V polovici od teh izgine v približno 4 urah. Kot večina etrov in alkoholov, se MTBE za lahkoto raztopi v vodi. Če se razlije po zemlji, ga dež raztopi in raznosi čez kamnine v podtalnico. Ob razlitjih ali puščanjih iz skladiščnih posod ali rezervoarjev lahko pronica skozi kamninske plasti v najgloblje in onesnaži podtalnico. Med razlitja moramo prištevati tudi razlitja cistern z oplemenitenim bencinom. Zaenkrat pa še ni raziskano, kako se kopljiči živalih, kot so ribe (ATSDR, 1996).

2.1.3 Izpostavitve ljudi MTBE-ju

Manjše koncentracije MTBE-ja so lahko prisotne v zunanem ali notranjem zraku in tja pridejo predvsem kot izpušni plin avtomobilov. Trenutno ni uvrščen med največje onesnaževalce, večinoma tudi ni predmet raziskovanja v rutinskih nacionalnih monitoringih pitne vode. Zato je težko določiti kakšnim količinam te spojine smo izpostavljeni. Dokazano je, da je človek izpostavljen MTBE v zraku in tudi v podtalnici, povsod je zastopan v majhnih količinah. Učinkom MTBE so izpostavljeni pacienti z žolčnimi kamni, ki so zdravljeni s terapijo, ki vključuje MTBE.

V telo človeka lahko MTBE vstopi z vdihanim zrakom, s pitno vodo ali z zaužito hrano, v kateri je prisoten. V telo lahko pride tudi skozi kožo, vendar počasneje in v manjših količinah. Večino MTBE dobimo v telo z vdihavanjem v osnovni zgradbi kot MTBE, ostalo pa po določenih kemijskih reakcijah kot del novonastalih molekul, kot so butil alkohol, metil-alkohol, formaldehid, mravljična kislina in ogljikov dioksid (ATSDR, 1996).

2.1.4 Učinki MTBE na zdravje in stranski učinki pri zastrupitvi

Do sedaj še ni bilo opravljenih nobenih raziskav o dolgoročnih vplivih kemikalije na zdravje. Sklicujemo se lahko na izsledke kratkoročnih testov ali na rezultate preizkusov na živalih (DWA, 1997).

Spojino lahko zaradi značilnega neprijetnega vonja hitro zavohamo ali začutimo kot draženje v nosu ali ustne sluznice. Pojavljajo se lahko glavobol, slabost, vrtoglavica, bolečine v želodcu, zmedenost, utrujenost. Pri pacientih zdravljenih z MTBE, ki jim je bil vstavljen s posebno cevko v žolčnik za razgradnjo žolčnih kamnov, so se pojavili stranski učinki, če je vnesena kemikalija zapustila žolčnik. Pojavila se je zmedenost, vrtoglavica, slabost, bruhanje, utrujenost in tudi manjše poškodbe ledvic ter znižana stopnja levkocitov v krvi.

Dosedanje raziskave so opravili le na živalih in na podlagi rezultatov so Oddelek za zdravje in pomoč ljudem (The Department of Health and Human Services, DHHS), Mednarodna agencija za raziskave raka (Internacional Agency for Research on Cancer, IARC) in EPA uvrstile MTBE med kancerogene snovi – snovi, ki povzročajo raka.

Zaenkrat v zdravstvu še niso razvili specifičnega testa, ki bi pokazal, da smo izpostavljeni MTBE. Zaznamo ga lahko v krvi, v urinu ali izdihanem zraku, običajno zapusti telo v roku

1 ali 2 dni v spremenjeni obliki. Meritve nam pokažejo samo, da smo bili nedavno izpostavljeni kemikaliji. Stranski učinki pri ljudeh, ki so bili zaznani, so skupni večini stranskih učinkom mnogih kemikalij (kot je alkohol) ali boleznim, torej tudi simptomi niso reprezentativni pokazatelj zastrupitve z MTBE (ATSDR, 1996).

2.1.5 MTBE v gorivih in emisijah iz prometa

MTBE se v naftni industriji uporablja kot nadomestek svinca v bencinu. Izbira prav tega kot dodatka proti klenkanju motorja, je bila opravljena na podlagi številnih dobrih lastnosti. Med drugim tudi zato, ker je poceni kemikalija, ki jo enostavno izdelati in ima ugodne prenosne in mešalne lastnosti. Poleg tega MTBE in drugi oksigenati omogočajo popolnejšo izgorevanje, kar pomeni manj emisij CO in snovi, ki povzročajo nastanek ozona (KOSHLAND s sod., 1998). V gorivih služi predvsem zaradi zvišanja oktanskega števila in povečanja deleža kisika.

Slabost dodajanja MTBE v gorivo je, da z večanjem vsebnosti MTBE v gorivu povečamo vsebnost kisika, ki neugodno vpliva na tvorbo dušikovih oksidov pri izgorevanju, prav tako narašča tudi vrednost aldehydov v izpušnih plinih. Obe negativni posledici je mogoče odpraviti z uporabo katalizatorjev, ki emisije omenjenih plinov učinkovito zmanjšuje (PRAKASH, 1989).

Dejanske koncentracije MTBE v bencinu močno nihajo, med 0 in 15%, odvisno od vrste bencina, naftne družbe in države (Finska agencija za okolje, 2001) V običajnem bencinu pri nas znaša odstotek tega dodatka med 2 do 3%. Vendar je že leta 1998 EU sprejela predpise o kakovosti goriv, ki veljajo za bencin in plinsko olje in zahteva postopno zmanjšanje uporabe spojin, kot so benzen (1. razred radioaktivnosti) in vsi aromati, med letoma 2000 in 2005. To pa bi povzročilo povečano uporabo MTBE v Evropi. Pričakuje se, da se bodo oktanske zahteve v EU po MTBE ustalile v območju 1 in 4 vol. odstotke, odvisno od razpoložljivega oktanskega števila (KOPUŠAR s sod., 2006).

2.1.6 Pridobivanje MTBE

Pridobivajo ga s katalitično reakcijo metanola in izobutilena, njegova proizvodnja pa se je začela v začetku sedemdesetih let prejšnjega stoletja. Trenutno spada med 50 organskih spojin, ki jih v svetu izdelajo v največji količini. Samo v letu 1996 so v ZDA izdelali 10,6 milijonov ton te spojine, podatki pa kažejo, da je proizvodnja v porastu, tudi zaradi že prej omenjenega razloga (PRAKASH, 1989).

2.1.7 MTBE v vodi in mejne vrednosti

V zadnjem obdobju je bilo po svetu opravljenih veliko študij onesnaženosti podtalnice z različnimi možnimi organskimi onesnažili, med katere se uvršča tudi MTBE. V Sloveniji obsežne raziskave onesnaženosti podtalnice in pitne vode z MTBE do sedaj še nismo opravili (KOPUŠAR s sod., 2006).

Ker se na Danskem in v nekaterih drugih državah podtalnica še vedno uporablja kot vir pitne vode je bilo zato v okviru danskega programa monitoringa podtalnice 1993 in 2001

odvzetih in analiziranih 7671 vzorcev podtalnice. V desetih vzorcih vzetih med letoma 1998 in 2001 je bila izmerjena koncentracija MTBE višja od 5 µg/l. V študiji je bilo tudi ugotovljeno, da se lahko MTBE nahaja do 60 m pod površino, najbolj pa je prisoten med 10 m in 40 m (JUHLER R. K. s sod., 2003).

MTBE je zelo topen v vodi, zato ga lahko najdemo tudi v podtalnici. Poseben riziko za podtalnico predstavljajo predvsem fizikalne, kemijske in biološke lastnosti MTBE. Širi se mnogo hitreje in dalje kot ostali ogljikovodiki, ki se nahajajo v bencinu. Prisotnost MTBE v vodi daje tej neprijeten okus in vonj, ter se lahko zazna v nizkih koncentracijah (med 5 in 15 µg/l). Ameriška okoljska agencija EPA je postavila mejo koncentracije tega dodatka med 20-40 µg/l, a so nekatere zvezne države prevzele višje vrednosti (http://www.ukpia.com/industry_issues/environment_air_quality_health_safety/methyl_tertia, 11. 12. 2006).

V ZDA je bilo na podlagi tega kasneje zaprtih več kot 20 javnih vodnjakov, katerih pitna voda je presegala določene vrednosti vsebovanega MTBE. EPA je namreč MTBE klasificirala kot možno kancerogeno snov za človeka (<http://www.llnl.gov/str/Happel.html>, 10. 12. 2007).

Od študije analize pitnih vod na celotnem območju ZDA, ki je bila izvedena v okviru ameriškega nacionalnega laboratorija (U.S. Geological Survey National Water Quality Laboratory), ki se ukvarja z analizami vod v letih 1993 in 1994 je bil MTBE uvrščen med možna onesnažila podtalnice (SQUILLANCE s sod., 1995).

V Avstraliji je mejna vrednost MBTE v vodi 38 µg/l, na Danskem je 30 µg/l, na Japonskem pa 5,9 µg/l (KOPUŠAR N. s sod., 2006).

2.1.8 MTBE v rastlinah

Glede vplivov in učinkov MTBE na rastline in človeka je ta zelo slabo raziskan (KOPUŠAR s sod., 2006). Raziskave tečejo predvsem v smeri selekcije rastlin za fitoremediacijo tal in podtalnice (WINNIKE-MCMILLAN s sod., 2003).

Vsebnosti MTBE v rastlinah (v analizo sta bila vključena regrat in ozkolistni trpotec) so tudi ob cestno najbolj izpostavljenih cestnih odsekih (na travntem pasu od 0 do 5 m ob cesti) tako majhne, ali pa jih ni, da ne predstavljajo problema za zdravje ljudi z vidika kopičenja v prehrabeni verigi. Da so vsebnosti MTBE v rastlinah pod mejo zaznavnosti je pričakovano na osnovi izmerjenih vsebnosti MTBE v izpušnih plinih avtomobilov. V izpušnih plinih avtomobilov s katalizatorjem ali brez njega so vsebnosti MTBE že tako majhne (od 2,6-6,9 µg/m³), kasneje še ta ostanek molekul MTBE vstopa v atmosferi v fotokemijske razgradnje procese, pri katerih imajo velik vpliv zlasti v pomladansko-poletnem obdobju tudi višje temperature zraka in intenzivnost sončnega sevanja. Zato je depozicija MTBE na rastline pričakovano zelo majhna (KOPUŠAR, N. s sod., 2006).

2.1.9 Raziskave o MTBE v Sloveniji

Za vpliv MTBE na kromosomske aberacije je bila v Sloveniji opravljena raziskava na Inštitutu za ekološke raziskave ERICo v okviru razvojno raziskovalnega projekta *Vpliv cestnega prometa na obremenjenost okolja s PAH in MTBE*, kjer so ugotavljali genotoksičnost MTBE v koncentracijah, ki se pojavljajo v okolju. Test genotoksičnosti je bil opravljen v dveh koncentracijah 2 mg/l (AI = 68,9 %) in 4 mg/l (AI = 62,2 %). Pri merjenju vrednosti MTBE v gorivih pri štirih izbranih ponudnikih goriv v Sloveniji, so ugotovili, da so vse vrednosti MTBE, znotraj dovoljenih zakonskih predpisov (Ur. L. RS 37/4; 98/70/ES Annex I). Ugotovili so, da vrednosti MTBE v izpušnih plinih ni mogoče primerjati s podatki iz literature, ker teh niso zasledili, sklepajo pa, da glede na koncentracije MTBE v izpušnih plinih ni glavni vir onesnaževanja okolja z MTBE. Povprečna izmerjena koncentracija MTBE v izpušnih plinih je bila 4,5 µg/m³. Višje vrednosti MTBE v zraku so bile na prometnem bolj izpostavljenem cestnem odseku, kjer je bila izmerjena tudi najvišja koncentracija MTBE v podtalnici (0,5 µg/l). Na s prometom različno obremenjenih cestnih odsekih so bili odvzeti tudi vzorci tal v treh različnih razdaljah od roba cestišča. Na odseku Šoštanj-Pesje je bila na globini 6-20 cm izmerjena najvišja koncentracija MTBE, to je 0,004 µg/kg.

Po primerjavi rezultatov in rezultatov iz literature, so ugotovili, da zelo visoke vrednosti MTBE v vodni raztopini (konc. 2 mg/l in 4 mg/l) pri šalotki (*Allium cepa* L. var. *ascalonicum*) stresno vplivajo na celično delitev (mitotski indeks) v koreninskih vršičkih in povzročijo aberacije na kromosomih (KOPUŠAR s sod., 2006).

Drugih raziskav o koncentracijah MTBE v okolju v Sloveniji nisem zasledila.

2.1.10 Zakonodaja

Področje monitoringa podzemnih vod v Sloveniji urejajo naslednji predpisi:

1. Pravilnik o emisijskem monitoringu podzemne vode (Ur. l. RS, št. 42/02);
2. Pravilnik o metodologiji za določanje vodnih teles podzemnih voda (Ur. l. RS, št. 64/03);
3. Pravilnik o določitvi vodnih teles podzemnih voda (Ur. l. RS, št. 63/05);
4. Uredba o standardih kakovosti podzemne vode (Ur. l. RS, št. 100/05);
5. Pravilnik o obratovalnem monitoringu onesnaževanja podzemne vode (Ur. l. RS, št. 49/06);
6. Pravilnik o pitni vodi (Ur. l. 19/04).

V Sloveniji MTBE ni bil spremljan v monitoringih pitne vode, ki jih določa Pravilnik o pitni vodi, Ur. l. 19/04 in ga ni na seznamu parametrov z mejnimi vrednostmi (Ur. l. RS, št. 19/04, priloga 1). Prav tako ni omenjen v zakonodaji Evropske unije za pitno vodo - The Drinking Water Directive (DWD), Council Directive 98/83/EC.

2.2 TESTIRANJE UČINKOV ONESNAŽIL NA DEDNINO

(povzeto po GLASENČNIK, E., 2003 in drugih, posebej označenih virih)

Za testiranje onesnažil na dednino se uporablja več metod. Vede, ki se ukvarjata z ugotavljanjem onesnažil na dednino sta ekotoksikologija in citogenetska bioindikacija.

2.2.1 Ekotoksikologija

Je veda, ki proučuje vpliv onesnažil na strukturo in funkcijo ekoloških sistemov. Namen toksikologije je v osnovi ugotavljanje odnosa med množino kemikalij, katerim je organizem izpostavljen in naravo ter stopnjo nastalih škodljivih učinkov. V skrajnem primeru lahko onesnažila povzročijo poškodbe, ki so za organizme smrtne, vendar v naravi najpogosteje prihaja do izpostavljenosti dolgotrajnemu delovanju majhnih koncentracij genotoksičnosti snovi, ki lahko učinkujejo na morfološko, biokemijsko, fiziološko in reprodukcijsko raven organizmov, kakor tudi genetski material.

Od leta 1970 so biološki testi toksičnosti na višjih rastlinah priporočeni za uporabo pri iskanju mutagenosti, pri monitoringu zasledovanja genotoksičnosti emisij, iztokov ali obdajajočega okolja od Royal Swedish Academy of Science (1973), World Health Organization (1985) in National Swedish Environmental Protection Board (1989) (WHO, 1985a, 1985b; FISKESJO, 1993). V osemdesetih letih (1982) je US EPA Genetie Toxicology (Gene-Tox) v šestih laboratorijih primerjala nekaj največjih bioloških sistemov za določanje učinkov onesnažil iz okolja in potrdila primernost višjih rastlin za dokazovanje mutagenosti, klastogenosti in karcinogenosti. Ocenitev rastlinskih testov je v letu 1991 in 1994 podal Mednarodni program o kemijski varnosti (IPCS - International Program of Chemical safety) (RANK in NIELSEN, 1997). Med testi, vključenimi v raziskavo, je tudi navadna čebula (*Allium cepa* L.) (GRANT, W. F. 1982; FISKESJO, 1985).

Nekatere vrste iz rodu *Allium* L., kot so *A. cepa* L., *A. cepa* L. var. *ascalonicum*, *A. cepa* L. var. *proliferum*, *A. carinatum* L., *A. jistulosom* L., *A. sativum* L. so pogosto uporabljene kot bioindikatorski testni organizmi in so izvrstne rastline za določanje kromosomskih aberacij, mitotskega indeksa, mitotskih abnormalnosti in genomskih aberacij, ki so lahko dobra toksična merila za testirane kemikalije (VIDAKOVIČ s sod., 1993 z navedbami).

Genotoksičnost različnih substanc v okolju lahko preizkušamo tudi s šalotko (*Allium cepa* L. var. *ascalonicum*). Življenjska oblika šalotke (geofit) in determinirana rast (razvije določeno število listov in čebulic) so lastnosti, ki šalotko uvrščajo med rastline primerne za citogenetsko bioindikacijo (GLASENČNIK, E., 2003). Glasenčnikova (2003) je v svoji doktorski disertaciji prva uporabila šalotko za ugotavljanje genotoksičnosti onesnaženega zraka v Šaleški dolini in je v ta namen v laboratoriju ERICo razvila modificirano obliko *Allium* testa.

Po svojih fizioloških lastnostih je šalotka podobna čebuli, vendar se od nje razlikuje po tem, da se pri šalotki na čebulnem krožcu razvije več genetsko identičnih čebulic, klonov. Običajno zraste 2 do 15 čebulic. Je odpornejša proti nizkim temperaturam, zato jo lahko

sadimo že jeseni. Nastanek čebule in rast pospešijo dolg dan in višje temperature (ČERNE M., 1992)

2.2.2 *Allium* test

Ta test je nedvoumno med najstarejšimi rastlinskimi testi biotoksičnosti. Znanstvene razprave o njegovi zanesljivosti in občutljivosti pa so skoraj po stotih letih njegove zelo množične uporabe še vedno burne. Prvi ga je uporabil Levan leta 1938. Rank in Nielsen sta leta 1993 izvedla primerjavo z drugimi testi mutagenosti in genotoksičnosti in dokazala 82 % občutljivost v primerjavi z drugimi rastlinskimi testnimi sistemi in zelo veliko občutljivost testa *Allium* glede na dozo izpostavitve (RANK in NIELSEN, 1997; GLASENČNIK, E., 2003).

S testom *Allium* ugotavljamo genotoksičnost na dveh stopnjah:

- Na osnovi kromosomskih okvar definiramo neznano mutageno snov v okolju;
- z znanimi genotoksičnimi snovmi različnih koncentracij določamo vrsto in stopnjo kromosomskih okvar.

Do leta 1982 je bilo s testom *Allium* na genotoksične učinke testiranih 148 različnih kemikalij. 72 % testiranih kemikalij je dokazljivo vplivalo na izpostavljene rastline. Zaradi dobljenih rezultatov je bil test *Allium* predlagan kot test za rutinsko ocenitev kromosomskih poškodb, ki jih povzročajo kemikalije (GRANT, W. F. 1982). Test *Allium* je glede na dobljene rezultate primerljiv s testom fibroblastnih V79 pri kitajskem hrčku in s testom na človeških limfocitih (CONSTANTIN and OWENS, 1982; SOFRADŽIJA s sod., 1989; PAVLICA s sod., 1992; GRANT, W. F. 1994; FISKESJÖ, 1995; KRISTEN, 1997; GLASENČNIK, E., 2003).

Z uporabo modificiranega testa *Allium* so bili testirani učinki insekticidov, herbicidov ter drugih pesticidov, zdravil (antibiotiki, analgetiki, kontracepcijska sredstva) in drugih kemikalij, pa tudi odpadne vode, rečne vode, deževnice in snežnice, ki največkrat povzročajo naslednje genotoksične učinke na izpostavljenih rastlinah: zlepljanje kromosomov, »grudanje« kromosomske mase, c-metafaze, neurejene anafaze, multipolarne anafaze, kromosome zunaj delitvenega vretena, mostičke v anafazi, fragmente, zmanjšanje mitotskega indeksa in interfazna jedra nepravilnih oblik (SMAKAKINCL, 1993 z navedbami).

2.2.3 Citogenetska bioindikacija

Citogenetika je veda, ki temelji na dveh povsem samostojnih vedah - citologiji (preučevanje kromosomov) in genetiki (proučevanje dednosti), ter ju združuje. Citogenetika vključuje tehnike barvanja kromosomov, obravnava število in zgradbo kromosomov (analize kariotipa), proučuje funkcijo in delitve kromosomov (celična delitev: mitoza, mejoza) in mnoge spremembe v strukturi in izvoru kromosomov glede na rekombinacije, transmisije in ekspresije genov (fenotip) (SINGH, 2003).

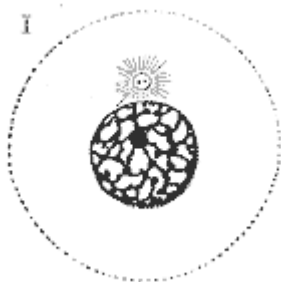
Med metode za zgodnejše odkrivanje posledic onesnažil v okolju prav gotovo sodi tudi citogenetska bioindikacija, ki temelji na obsežnih citogenetskih analizah in raziskavah rastlinskega genetskega materiala (kromosomov in celičnih delitev) kot kazalnika genetskih poškodb zaradi onesnaženosti okolja (DRUŠKOVIČ, 1988a, 1988b; MILLER, 1991; PARADIŽ, 1996). Spremembe v celični delitvi praviloma nakazujejo prisotnost citotoksičnih ali/in genotoksičnih agensov v okolju. Če za analizo genotoksičnosti uporabimo t.i. ekofiziološke kazalnike, kot so število kromosomskih aberacij, mitotski indeks, kromosomske abnormalnosti (mostovi v anafazi in zlepjanje kromosomov) in napake delitvenega vretena (izgubljeni kromosomi, aneuploidija in poliploidija), je zanesljivo možno oceniti testne kemikalije (GRANT, W. F. 1982, 1994; FISKESJÖ, 1985, 1988, 1993; RANK in NIELSEN, 1993, 1994; DRUŠKOVIČ, 1994, 1996; PARADIŽ in DRUŠKOVIČ, B., 2001, GLASENČNIK, E. s sod., 2002).

2.3 Celični cikel (AL-SABTI, 1993)

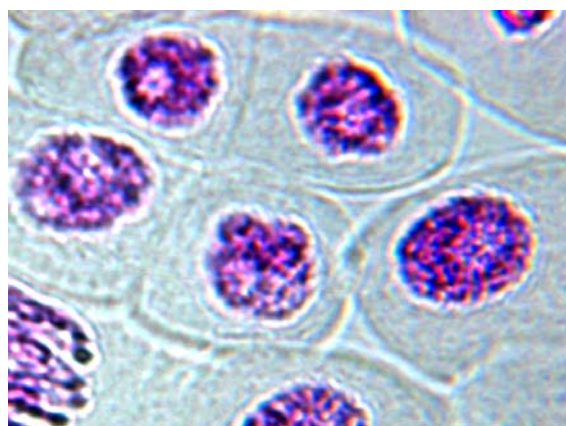
V vsakem celičnem ciklu se večina celic hkrati identično podvoji in s segregacijo razporedi tudi maso in organele v citoplazmi. Delitev jedra (kariokinezo) oz. mitozo in delitev citoplazme (citokinezo) imenujejo skupaj tudi M faza (GLASENČNIK, E., 2003). Poškodbe kromosomov velikokrat nastanejo zaradi podvajanja DNA in delitve celičnega jedra, zato moramo temeljito poznati celični cikel, ki obsega interfazo in mitozo. Mitozo delimo v profazo, prometafazo, metafazo, anafazo in telofazo.

2.3.1 Interfaza

Pred začetkom jedrne delitve, v interfazi, se v jedru s pomočjo encimov (ligaza, DNK-polimeraza) podvoji dedni material celice (DNK), kromatinske niti pa se začnejo zbijati v kromosome (<http://sl.wikipedia.org/wiki/Mitoza>, 10. 3. 2007). V tej fazi so vidne spremembe v naraščanju volumna nukleusa (jedra) in nukleolusa (jedrca) Opazne so tudi velike spremembe v razporeditvi kromatina.



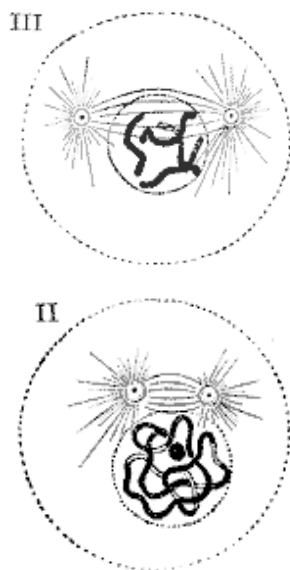
Slika 2: Shematski prikaz telofaze
(<http://sl.wikipedia.org/wiki/Mitoza>, 4. 3. 2008).



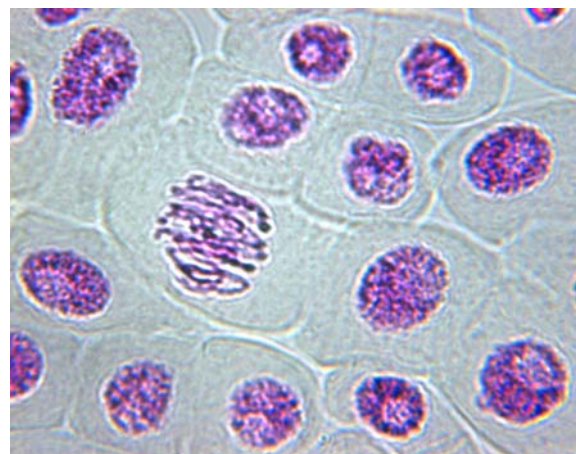
Slika 3: Interfaza slikana v konc. 0,01 µg/l, pri 600 × povečavi (foto. A. Špes).

2.3.2 Profaza

Začne se delitev jedra, kromosomi se krajšajo z zvijanjem (spiralizacijo) znotraj jedrne ovojnice. Med kromosomi so že vidne posamezne razlike, nekateri so podvojeni in sestavljeni iz dveh kromatid. Ob koncu te faze se jedro vedno bolj zmanjšuje in nazadnje tudi izgine, prav tako se razpade jedrna ovojnica in postane neločljiva od endoplazmatskega ratiikuluma.



Slika 4: Shematski prikaz profaze v dveh stadijih (<http://sl.wikipedia.org/wiki/Mitoza>, 4. 3. 2008).



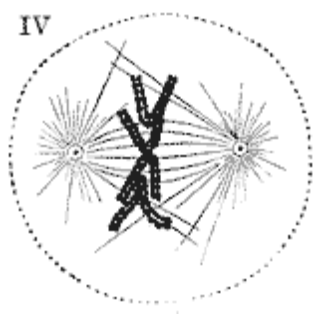
Slika 5: Profaza slikana v koncu 0,01 µg/, pri 400 × povečavi (foto. A. Špes).

2.3.3 Prometafaza

Oblikuje se delitveno vreteno in mikrotubole. Mikrotuboli potekajo od vsakega para centriolov k centromeram vsakega kromosoma. Položaj vsakega kromosoma določa autoorientacija.

2.3.4 Metafaze

Centromere so bolj ali manj razporejene vzdolž ekvatorja in hčerinski centromeri sta še vedno pritrjeni druga na drugo. Zvijanje (uvijanje, gubanje) kromatid je končano. To je zelo kratko obdobje.



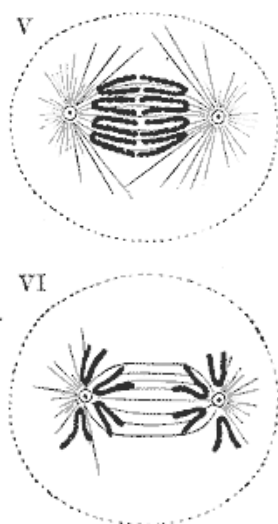
Slika 6: Shematski prikaz metafaze
(<http://sl.wikipedia.org/wiki/Mitoza>, 4. 3. 2008).



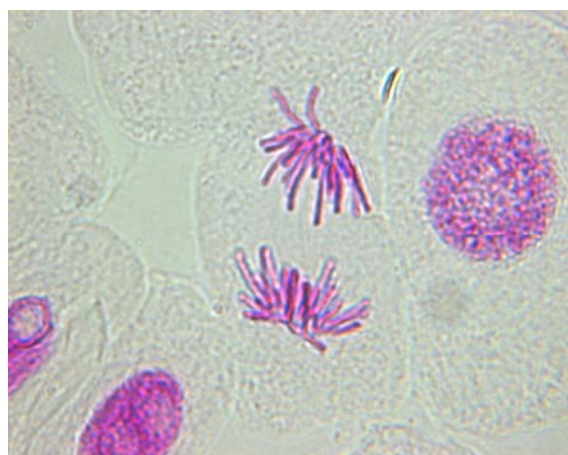
Slika 7: Dve metafazi slikani v konc. 0,01 µg/l, pri 400 × povečavi (foto. A. Špes).

2.3.5 Zgodnja anafaza in pozna anafaza

Ločitev centromer je popolna in vsak kromosom se loči v dva hčerinska kromosoma. Gibanje kromosomov k polom je povezano z gibanje centromere vzdolž vretena. Zato so verjetno odgovorni proteini kinetohora. Gibanje se konča, ko se vse centromere zberejo blizu polov.



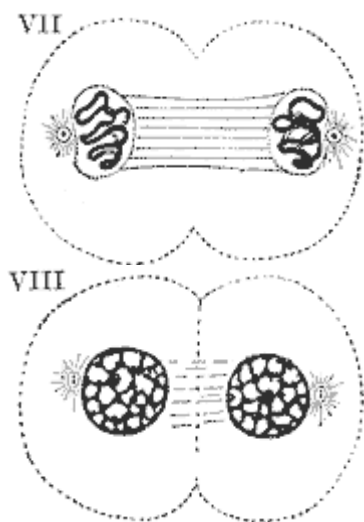
Slika 8: Shematski prikaz zgodnje anafaze (zgoraj) in anafaze (spodaj)
(<http://sl.wikipedia.org/wiki/Mitoza>, 4. 3. 2008).



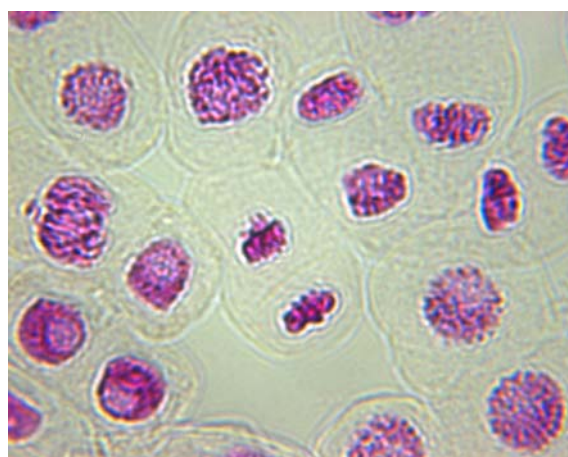
Slika 9: Anafaza slikana v konc. 0,01 µg/l, pri 600 × povečavi (foto. A. Špes).

2.3.6 Telofaza

Ponovno se oblikuje jedrna ovojnica, in sicer najprej na polarnih straneh kromosomov. Vidne so že membrane, kot na primer endoplazmatski retikulum, ob nukleolarnem organizatorju pa se tudi formira nukleolus.



Slika 10: Shematski prikaz telofaze v dveh stadijih (<http://sl.wikipedia.org/wiki/Mitoza>, 4. 3. 2008).



Slika 11: Telofaza slikana v konc. 0,01 $\mu\text{g/l}$, pri 400 \times povečavi (foto. A. Špes).

2.4 Kromosomi in njihova morfologija

Kromosomi so strukture v naših celicah, ki postanejo vidne zaradi zvijanja in gubanja kromatina pri mitozni. S svetlobnim mikroskopom so najboljše vidni v metafazi mitoze. Vse dedne informacije celotnega organizma na kromosomih predstavljajo genom.

Zgradbo kromosomov proučujemo s standardnimi metodami barvanja (acetokarmin, Feulgen in orcein), ki dajejo dobre rezultate pri morfologiji, določanju stadijev delitev in števila kromosomov. Za razlikovanje posameznih kromosomov iste vrste se danes največ uporabljajo tehnike diferencialnega barvanja z Giemso oz. tehnika prog, ki je bila prenesena in modificirana iz humane citogenetike v zgodnjih sedemdesetih letih (obarvan G-proge, v katerih je velik delež A-T nukleotidnih parov) (SINKOVIČ, 1992; VERANIČ s sod., 2000) in omogoča indentificiranje posameznih kromosomov (GLASENČNIK, E., 2003).

Metafazni kromosomi imajo centromero (tudi zožitev, začetek ali konstrikcija), ki jo opažamo kot zoženje in je obarvana svetleje od ostalih delov kromosoma ter deli kromosom na dva kraka. Lega centromere je zelo pomembna in določa morfologijo kromosoma.

2.4.1 Vrste kromosomskih aberacij

Za citogenetiko so najpomembnejše kromosomske mutacije, ker za razliko od genskih zajemajo večje predele z manj ali več geni. Tudi kromosomske aberacije so lahko zelo majhne (t. i. točkovne mutacije), lahko zajemajo le nekaj genov in so zato podobne genskim in jih pri citološki raziskavi sploh ne moremo odkriti (GLASENČNIK, E., 2003; VERANIČ s sod., 2000)

Mutacija je vsaka stabilna in dedna sprememba genetskega materiala celice. Poznamo dve veliki skupini mutacij: kromosomske mutacije, kjer gre za spremembo števila ali strukture kromosomov, in točkovne mutacije, katerih posledice so spremembe posameznih genov. (AL-SABTI, 1993).

Spremembe v številu kromosomov

Normalno število kromosomov, ki je karakteristično za posamezno vrsto, se imenuje osnovno število. Pri človeku to pomeni haploidno število ($2n = 23$) v spolnih celicah in diploidno število ($2n = 46$) v telesnih celicah. Pri vrsti *Allium cepa* je haploidno število ($2n = 8$) ali diploidno število kromosomov ($2n = 16$). Polovično število je značilno za spolno generacijo in spolne celice oz. gamete, dvakratno število kromosomov pa je značilno za somatske celice (telesne celice) (GLASENČNIK, E., 2003).

Aneuploidija

Povečanje števila ali izguba kromosomov, pri čemer se njihovo število razlikuje od njihovega normalnega haploidnega (n) ali diploidnega ($2n$) števila. Ponavadi nastaja kot posledica napak pri delitvi jedra. Najpogostejša vzroka zanjo sta:

- nerazdvajanje kromosomov (Non-disjunction): v zgodnji anafazi pride do napak pri ločevanju homologidnih kromosomov;
- izguba kromosoma ali več: Kromosomi se izgubijo med delitvijo jedra, kot posledica nerazdvajanja v anafazi, saj se nekateri kromosomi ne pomaknejo proti polom celice, ostanejo v anafazi, ko pa se formira jedrna membrana se izločijo od ostalih kromosomov na polih in se izgubijo. Običajno postanejo mikronukleusi;

Poliploidija

V primeru, da se poveča celotna garnitura za večkratnik n , dobimo euploidijo ali poliploidijo. To so t. i. genomske mutacije. Na primer: tetraploidija pomeni štiri garniture kromosomov, $4n$. Poliploidija se pojavlja zaradi velikih sprememb temperature ali kot posledica kemijskih vplivov.

Strukturne kromosomske aberacije

Strukturne aberacije nastanejo zaradi preloma kromosomov in ponovnega zlepljanja nekaterih delov kromosomov (GLASENČNIK, E., 2003).

a) Zlom kromosoma - fragmenti

Ti so lahko enojni, kadar nastane kromosomska razpoka, ki vodi v zlom kromosoma. Če pride pri posameznem kromosomu do zloma v predelu centromere, se pri tem oblikuje

isokromosom. Dvojni zlom pa vključuje dva mesta zloma. Posledice so podaljšan krak ene izmed kromatid, skrajšanje obeh krakov ali tvorbe obročastih kromosomov.

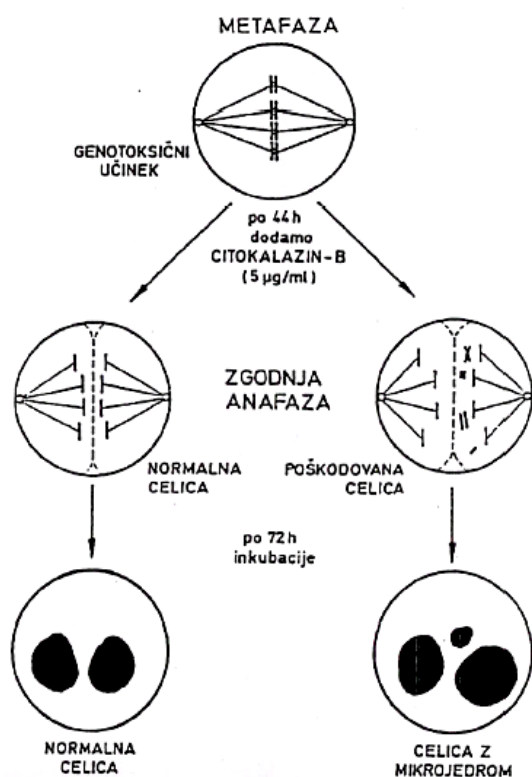
Kromatidne aberacije nastajajo zaradi ionizirajočega sevanja ali zaradi citotoksičnih kemičnih dejavnikov. Gre za zlome in razpoke, ki se pojavljajo, kot neobarvani in zoženi predeli na kromatidih. Nastanejo lahko:

- Zlomi kromatide
- Fragmenta kromatide
- obročasti acentrični kromatidi (fragmenti, ki se združijo)
- zaokrožena kromatida (vključena je tudi acentromera)

Višje rastline so dokaj tolerantne za kromosomske aberacije za razliko od živalskih organizmov, pri katerih so take spremembe večinoma smrtno in povezane s hudimi anomalijami.

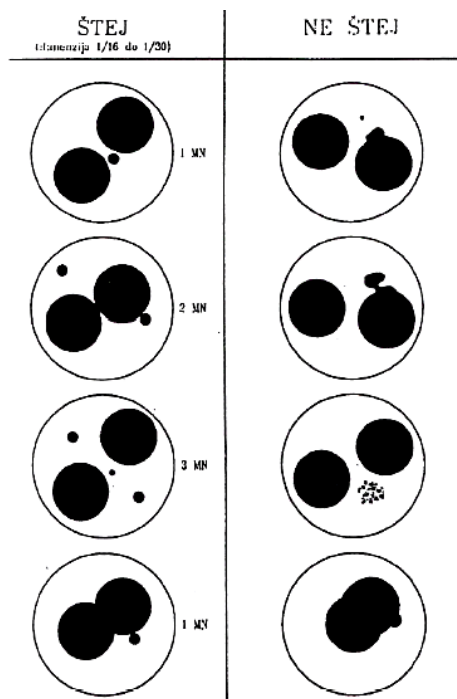
2.4.2 Mikronukleus

Mikronukleusi (MCN) nastanejo, kot posledica pojava kromosomskih aberacij, t. i. acentričnega kromosomskega fragmenta. MCN lahko vključujejo celoten kromosom, ki je zaostal zaradi napake pri delitvi celice in se zato razlikujejo tudi po velikosti. V primeru napak pri delovanju delitvenega vreten lahko v celici dobimo tudi več mikronukleusov, čeprav imajo celice večinoma le enega. Spontano pojavljanje MCN-jev je majhno in dokaj konstantno 3 % v polikromatskih eritrocitih (1-2 MCN/1000 celic) (SAVKOVIČ, 1990).



Slika 12: Diagramska predstavitev nastanka mikronukleusa (AL-SABTI, 1993).

Pri štetju celic za mitotski indeks je potrebno biti pozoren, na mikronukleuse in binuklearne celice. To nazorno prikazuje spodnji diagram:



Slika 13: Diagramska predstavitev, kako je treba pod mikroskopom analizirati mikronukleus in binuklearne celice, med raziskovanjem (AL-SABTI, 1993).

3 MATERIALI IN METODE DELA

Testiranje genotoksičnosti smo povzeli po Glasenčnik (2003). V laboratorijsko delo in delo z mikroskopom me je vpeljala Meta Zaluberšek, ERICo d.o.o. Velenje. Pri delu in klasifikaciji poškodb materiala in določanju mitotske aktivnosti smo uporabili metodo določanja kromosomskih aberacij, ki jo je razvil Fiskesjö (1993, 1994), kasneje je pa bila prilagojena uporabi za šalotko (Glasenčnik in sod., 2002).

3.1 Izbira in priprava koncentracij MTBE

Odločili smo se, da bomo šalotko izpostavili naslednjim koncentracijam MTBE v pitni vodi:

1. 0,001 $\mu\text{g/l}$
2. 0,01 $\mu\text{g/l}$
3. 0,1 $\mu\text{g/l}$
4. 0,5 $\mu\text{g/l}$
5. 1 $\mu\text{g/l}$
6. 5 $\mu\text{g/l}$
7. 10 $\mu\text{g/l}$
8. 50 $\mu\text{g/l}$
9. 100 $\mu\text{g/l}$
10. 1000 $\mu\text{g/l}$
11. Destilirana voda
12. Pitna voda iz pipe

Dodali smo še dve kontrolni epruveti, eno z destilirano vodo (zap. št. 11) , drugo s pitno vodo (zap. št. 12). Koncentracije smo pripravili v kemijskem laboratoriju ERICo d.o.o, Velenje. Pri pripravi koncentracij smo uporabili pipete, čaše, 1000 ml laboratorijske bučke in 10 ml igle. Takoj, ko smo raztopine pripravili smo laboratorijske bučke zavili v aluminijasto folijo in tako preprečili razpad MTBE zaradi učinka svetlobe.



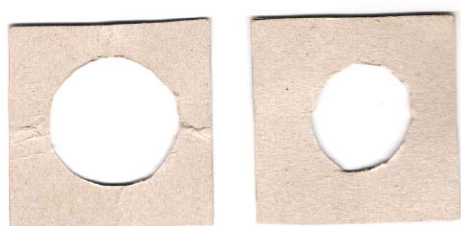
Slika 14: Priprava koncentracija MTBE v pitni vodi, za steklom digestorija, ki preprečuje vdihavanje strupenih hlapov (foto. A. Špes).



Slika 15: Ovijanje bučk v aluminijasto folijo in zapisovanje koncentracij na njih (foto. N. Kopusar).

3.2 Izbor objektov raziskovanja, čebulic šalotk (*Allium cepa* L. var. *ascalonicum*)

Zapisali smo, da se pri šalotki na čebulnem krožcu razvije več genetsko identičnih čebulic, klonov. Kljub temu smo želeli zagotoviti, da bodo čebulic zares identične, zato smo izdelali dve šabloni s mejnima vrednostima premerov (min.: $2r = 27\text{mm}$ in max.: $2r = 35\text{mm}$).



Slika 16: Dve šabloni z največjim in najmanjšim obsegom (Skenirano, A. Špes) .

Čebulice smo nato olupili, očistili in tako pripravili za izpostavitve v različnih koncentracijah MTBE.

3.3 Izpostavitvev čebulic in merjenje dolžin koreninic

Čebulice smo namočili v pripravljene koncentracije in sicer po 6 čebulic v vsaki koncentraciji. Tudi merilne valje, ki so služili za izpostavitve čebulic, smo ovili v aluminijasto folijo. Namakali smo jih 14 dni (od 6. 12. 2006 do 20. 12. 2006), v laboratoriju, pred oknom, da bi s tem zagotovili enakomeren dostop sončne svetlobe do vseh čebulic. Povprečna temperatura v prostoru je bila $20,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ in relativna vlažnost 25 % (Preglednica: Popisa temperature in vlažnosti). Vsak dan smo čebulicam dolili ustrezno koncentracijo raztopine MTBE, tako da je bil koreninski del čebulice ves čas izpostavitve v vodni raztopini.



Slika 17: Priprava čebulic, čiščenje in lupljenje (foto. A. Špes).



Slika 18: Priprava merilnih valjev na izpostavitve čebulic v raztopinah (foto. A. Špes).



Slika 19: Polnjenje merilnih valjev z ustreznimi raztopinami (foto. N. Kopusar).

Zap.št. in konc. razredčitve		Zaporedna številka izpostavljene čebulice					
1.	0,001 µg/l	1.	2.	3.	4.	5.	6.
2.	0,01 µg/l	1.	2.	3.	4.	5.	6.
3.	0,1 µg/l	1.	2.	3.	4.	5.	6.
4.	0,5 µg/l	1.	2.	3.	4.	5.	6.
5.	1 µg/l	1.	2.	3.	4.	5.	6.
6.	5 µg/l	1.	2.	3.	4.	5.	6.
7.	10 µg/l	1.	2.	3.	4.	5.	6.
8.	50 µg/l	1.	2.	3.	4.	5.	6.

o k n o

Preglednica 2: Shematska ponazoritev izpostavitve čebulic in izločitve neuporabnih.

9.	100 µg/l	1.	2.	3.	4.	5.	6.
10.	1000 µg/l	1.	2.	3.	4.	5.	6.
11.	Pitna voda 0 µg/l	1.	2.	3.	4.	5.	6.
12.	Destilirana voda 0 µg/l	1.	3.	5.			
		2.	4.	6.			

LEGENDA:

- Senzorja za meritev fotosinteze in spektra;
- izločene čebulice, ki so zgnile;
- izločene čebulice, hranjene v fiksirni mešanici, ki je zmrznila.

Ob okno smo namestili tudi senzorja za meritev fotosinteze in sončnega spektra (●), pred izpostavljene čebulice pa tudi termometer s hidrometrom.



Slika 20: Izpostavljene čebulice (foto. A. Špes).

3.4 Jakost svetlobnega toka in energija fotonov

V času izpostavitve smo v laboratoriju merili tudi jakost svetlobnega sevanja. Senzorja za merjenje gostote svetlobnega toka rdeče svetlobe ($\lambda = 760 - 620 \text{ nm}$) in energije fotonov modre svetlobe ($\lambda = 510 - 450 \text{ nm}$).

Rezultati nam povedo kakšna je jakost svetlobnega toka rdeče svetlobe na določeno ploskev, kar je razvidno iz enačbe:

$$j = \frac{P}{S} \left[\frac{W}{m^2} \right]$$

Energija fotonov modre svetlobe je razvidna iz naslednje enačbe:

$$Q = \frac{N}{t \cdot S} \left[\frac{\mu mol}{s \cdot m^2} \right]$$

3.5 Dolžinski prirastek korenin za ocenitev toksičnosti

Za določanje strupenosti snovi v okolju se pogosto uporabljajo tudi testi merjenja dolžine in prirastka rastlinskih organov. Pri raziskovalni nalogi smo izmerili povprečno dolžino dolžinskega prirastka korenin. Po 7 dneh izpostavitve v koncentracijah (13. 12. 2006) smo čebulicam zmerili dolžino koreninic. Izmerili smo najmanjšo in največjo koreninico ter rezultate tabelirali. Ker smo ta dan čebulice že prvič fiksirali, dolžinski prirastek po 14. dneh ni primerljiv, saj ob fiksiranju porežeš 1,5 – 2 cm dveh ali teh koreninic.

Povprečni prirastek koreninic smo izračunali po formuli:

$$\bar{d} = \left| \frac{d_{max} + d_{min}}{2} \right|$$

\bar{d} = povprečni prirastek

d_{max} = dolžina najdaljše koreninice

d_{min} = dolžina najkrajše koreninice



Slika 21: Merjenje dolžin koreninic (foto. A. Špes).

3.6 Fiksiranje in priprava mečkancev koreninskih vršičkov

Vzorčenje korenin in fiksiranje je potekalo dvakrat, 6. 12. 2006 in 20. 12. 2006. Koreninske vršičke, približno dolžine 1,5 cm smo odrezali z zdravih, nepoškodovanih korenin in jih, po 3 vzorce, fiksirali v fiksirni raztopini, mešanici absolutnega etanola, C_2H_5OH (Riedel-de-Haen), in očetne kisline, CH_3COOH (Fluka), v razmerju 3:1, med 6 in 9 uro zjutraj. Fiksirane koreninske vršičke smo shranili pri $-18\text{ }^{\circ}C$.

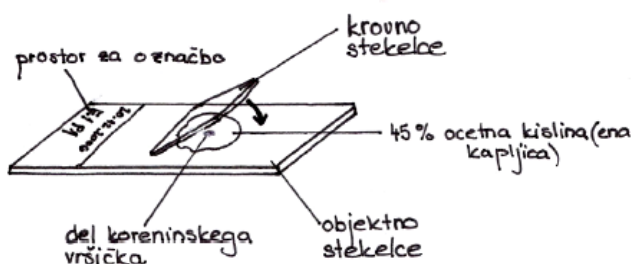
Pred izdelavo preparatov smo koreninske vršičke hidrolizirali v 0,1 molarnem HCl (Merk). Hidroliza je trajala točno 10 minut, zatem smo jih ohladili ter obarvali v Schiffovim reagentom (folgen). V reagentu smo vršičke pustili 1 uro v temnem prostoru, da so se lepo obarvali. Nato smo jih pod stereomikroskopom (Carl Zeiss) prerezali medialno longitudinalno, odstranili koreninsko čepico in odrezali apikalni del do 1,5 – 2 mm (aktivno deleče se celice so v meristemu koreninskega vršička med 0,5 – 1,5 mm). Za analizo smo pripravili klasične preparate, mečkance, iz enega koreninskega vršička vsake izpostavitve. Pri vsaki koncentraciji smo izdelali po tri preparate iz treh različnih koreninic čebulic, ki smo jih izpostavili v merilnih valjih od 1 do 6.

Nekatere čebulice so v času izpostavitve (14 dni) zgnile in niso bile primerne za pripravo preparatov. Prav tako, smo nekatere fiksirne raztopine s koreninicami v času hranjenja zmrznile, kar je posledica koncentracije vode v fiksirni raztopini, ki se je dodala, ko smo izpirali pipeto. Zato smo čebulice, katerih koreninice smo uporabili za pripravo preparatov izbirali selektivno, glede na to, katere smo zgnile in katere smo bile hranjene v zmrznjeni fiksirni raztopini po naslednjem vzorcu. Pri vsaki koncentraciji naredili citogenetsko analizo izpostavitve št. 1 (če ta ni bila uporabna, je bila nadomestna izpostavitve št. 2), izpostavitve št. 3 (nadomestna št. 4) in izpostavitve št. 6 (nadomestna št. 5). S tem smo zagotovili tudi, da so vsi vzorci, posameznih izpostavitve prijemali zadostno in podobno količino svetlobe. Neprimerljivo bi bilo, če bi pri koncentraciji št. 1 uporabili vzorca izpostavitve št. 1, 2 in 3, pri naslednji koncentraciji pa izpostavitve št. 4, 5. in 6. Mitotski indeksi bi se v tem primeru utegnili razlikovati.

3.6.1 Priprava mečkanca

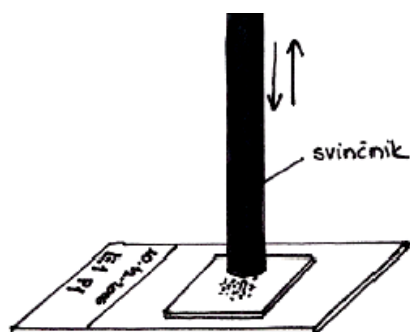
Mečkanec za analizo in gledanje pod mikroskopom se pripravi po naslednjem postopku:

- a) Potem ko smo že odrezali del koreninskega vršička, po zgoraj opisanem postopku, tega položimo na objektno stekelce, kamor smo že kanili kapljico 45 % (v/v) očetne kisline. To previdno prekrijemo s krovnim stekelcem.



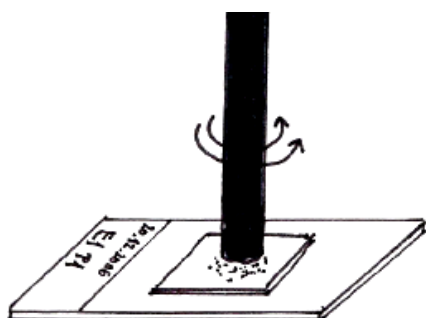
Slika 22: Priprava mečkanca, prvi postopek (narisala A. Špes).

- b) Vzamemo navaden svinčnik in z njim previdno in nežno potolčemo po krovnem stekelcu, razkropimo celice in se znebimo nastalih mehurčkov zraka pod njim. V dobrem preparatu ne najdemo mehurčkov zraka.



Slika 23: Priprava mečkanca, postopek odstranitve zračnih mehurčkov (narisala A. Špes).

- c) Vse skupaj prekrijemo s papirnato brisačo, da popivnamo odvečno očetno kislino.
- d) Mečkanec naredimo s svinčnikom, s katerim nežno pritiskamo in krožimo iz centra krovnega stekelca navzven.



Slika 24: Priprava mečkanca, postopek razmazanja celic koreninskega vršička po objektnem stekelcu (narisala A. Špes).

- e) Preparat lahko tudi za nekaj dni fiksiramo z lakom za nohte. Robove krovnega stekelca premažemo z lakom za nohte in preparat ostane uporaben še približno mesec dni, če ga hranimo pri temperaturi -18°C .

Če premočno pritiskamo lahko povzročimo mehanske poškodbe celic in raztrg posameznih, če smo prenežni ali ne delamo pravilno, celic ne razporedimo enakomerno po površini objektnega stekelca in opazovanje je nemogoče.

Med postopkom priprave mečkancev mora raziskovalec poskrbeti za ustrezno zaščito z gumijastimi rokavicami ter masko za obraz, da prepreči možno vdihavanje hlapov očetne kisline ali/in HCl-a.

3.7 Analiza vzorcev

Analize vzorcev so bile opravljene na ERICo Velenje, Inštitutu za ekološke raziskave z uporabo mikroskopov Option, West Germany Axiophot in Microstar IV, ter fotoaparatom Carl Zeiss Vision, Axiocam MR, Version 5.07.03 s pripadajočim računalniškim programom Carl Zeiss, Axio Vision 3.1.2.1.



Slika 25: Raziskovalka Ana Špes med mikroskopiranjem, analizo vzorcev na ERICo d.o.o. Velenje v mikroskopirnici (foto. T. Špes)

3.7.1 Mitotski indeks

Mitotski indeks (MI) je delež deležih se celic v mitozii. MI smo določili glede na frekvenco posameznih faz mitoze za vsako vzorčno mesto v treh preparatih s 1000 celicami na preparat.

Mitotski indeks smo izračunali po formuli:

$$MI[\%] = \frac{\sum_{i=1}^3 (P_{ph} + M_{ph} + E_{ph} + A_{ph} + T_{ph})}{D} \cdot 100\%$$

$$D = \sum_{i=1}^3 P_{pg}, M_{ph}, E_{ph}, A_{ph}, T_{ph}, I_{ph}$$

D = vsota vseh opazovanih celic
 Pph = frekvenca profaz
 Mph = frekvenca metafaz
 $Eaph$ = frekvenca zgodnjih anafaz
 Aph = frekvenca anafaz
 Tph = frekvenca telofaz

3.7.2 Kromosomske aberacije

Test kromosomskih aberacij (CA) v metafazi je test za določanje števila in vrste kromosomskih poškodb v meristemskih celicah koreninskih vršičkov izpostavljenih rastlin. Vrednost za CA smo določili v treh preparatih vsake koncentracije glede na frekvenco aberantnih metafaznih celic (30 na preparat) in aberantnih anafaznih celic (30 na preparat). Celice v metafazi in anafazi smo klasificirali v naslednje kategorije:

- metafaze (Mph)
- zgodnje anafaze ($Eaph$, anafaza I)
- anafaze (Aph , anafaza II)
- fragmenti ali obročev v anafazi ali metafazi
- mostički v anafazi
- špranje v anafazi ali metafazi
- zlepljenja v anafazi ali metafazi
- sateliti v anafazi ali metafazi
- izgubljeni oz. zaostali kromosomi zunaj delitvenega vretena

Delež vseh celic s poškodovanimi kromosomi smo izračunali po naslednji formuli:

$$CA[\%] = \frac{\sum_1^3 (Mph_a + Aph_a) \cdot 100\%}{\sum_1^3 Mph, Aph}$$

Mph = frekvenca metafaz
 Aph = frekvenca anafaz
 Mph_a = frekvenca aberantnih metafaz
 Aph_a = frekvenca aberantnih anafaz

3.7.3 Delež aberantnih metafaz

Analiza aberantnih metafaz (Mph_a) vključuje določanje frekvence aberacij. Vrednosti za Mph_a smo določili glede na frekvenco aberantnih metafaz na vsako koncentracijo v treh preparatih, 30 celic na preparat.

Delež aberantnih metafaz smo izračunali po formuli:

$$CA_{Mph_a} [\%] = \frac{\sum_1^3 (F + \check{S} + Z + S + I) \cdot 100\%}{\sum_1^3 Mph}$$

- F = frekvenca fragmentov
- Š = frekvenca špranj
- Z = frekvenca zlepljenj
- S = frekvenca satelitov
- I = frekvenca izgubljenih oz. zaostalihi kromosomov zunaj delitvenega vretena

3.7.4 Analiza aberantnih anafaz

Analiza aberantnih anafaz (Aph_a) vključuje določanje frekvence aberacij. Vrednosti za Aph_a smo določili glede na frekvenco aberantnih anafaz na vsako koncentracijo v treh preparatih, 30 celic na preparat.

Delež aberantnih anafaz smo izračunali po formuli:

$$CA_{Aph_a} [\%] = \frac{\sum_1^3 (F + M + \check{S} + Z + S + I) \cdot 100\%}{\sum_1^3 Aph}$$

- F = frekvenca fragmentov
- M = frekvenca mostičkov
- Š = frekvenca špranj
- Z = frekvenca zlepljenj
- S = frekvenca satelitov
- I = frekvenca izgubljenih oz. zaostalih kromosomov zunaj delitvenega vretena

4 REZULTATI

4.1 Pogoji izpostavitve

Med izpostavitvijo smo merili temperaturo in vlažnost, s senzorjema tudi jakost svetlobnega toka rdeče svetlobe in energijo fotonov modre svetlobe. Dobili smo naslednje rezultate:

Preglednica 3: Rezultati meritev temperature in vlažnosti na različnih mestih v laboratoriju.

Št.	Datum	Ura	RV [%]	T [°C]	Mesto merjenja
1.	6.12.2006	11.00	27	21,2	miza
2.	12.12.2006	12.40	27	21,2	zunanje okno
3.	12.12.2006	12.50	27	21,2	notranje okno
4.	12.12.2006	15.18	28	20,3	okno
5.	12.12.2006	15.23	28	20,5	vrata
6.	13.12.2006	9.34	30	21,9	miza
7.	13.12.2006	14.34	25	19,6	vrata
8.	14.12.2006	9.03	26	19,0	okno
9.	14.12.2006	9.40	26	19,3	okno
10.	14.12.2006	11.50	26	20,4	miza
11.	14.12.2006	12.23	26	20,6	miza
12.	14.12.2006	13.52	26	21,2	miza
13.	20.12.2006	8.57	27	19,0	vrata
14.	20.12.2006	11.06	27	19,1	miza
15.	20.12.2006	11.18	27	19,4	miza
16.	21.12.2006	8.12	26	15,6	miza
17.	21.12.2006	8.14	26	16,7	miza
18.	21.12.2006	14.30	24	21,0	miza
19.	21.12.2006	16.00	25	21,7	miza
20.	21.12.2006	19.05	25	21,8	miza
22.	27.12.2006	12.28	23	18,3	miza

Preglednica 4: Rezultati meritve jakosti svetlobnega toka za rdečo svetlobo in energije fotonov za modro svetlobo.

Št. mer.	Datum	Ura	Q modre svetlobe [μmol/s m ²]	J rdeče svetlobe [W/m ²]	Opombe
1.	20. 12. 2006	11.06	14,26	3,864	Brez luči
2.	20. 12. 2006	11.18	14,91	4,582	Brez luči
3.	21. 12. 2006	8.12	16,22	3,470	Prižgane luči
4.	21. 12. 2006	14.30	16,00	3,560	Prižgane luči
5.	21. 12. 2006	16.00	13,56	2,800	Brez luči
6.	21. 12. 2006	11.20	204,2	47,86	Kalilnik
7.	21. 12. 2006	15.06	202,8	47,71	Kalilnik

4.2 Dolžinski prirastek koreninic

Preglednica 5: Izmerjene dolžine najkrajših in najdaljših koreninic vsake koncentracije.

Zap. št	Konc.	Kore-ninica	Zaporedna številka merilnega valja					
			1.	2.	3.	4.	5.	6.
1.	0,001	min.	2	1,5	3	2	3	1
		maks.	40	57	48	62	24	7
2.	0,01	min.	2	3	5	2	3	1
		maks.	72	68	65	26	60	54
3.	0,1	min.	4	2	1	1	4	2
		maks.	49	50	67	57	51	65
4.	0,5	min.	5	1	2	7	3	4
		maks.	54	68	44	54	51	56
5.	1	min.	2	1	3	3	3	4
		maks.	38	54	65	66	64	64
6.	5	min.	3	3	3	3	1	2
		maks.	40	53	46	64	34	55
7.	10	min.	2	4	6	2	3	3
		maks.	45	53	52	50	50	48
8.	50	min.	2	3	3	5	5	5
		maks.	53	70	62	58	64	54
9.	100	min.	2	2	3	3	3	4
		maks.	65	73	62	48	54	54
10.	1000	min.	8	2	3	2	4	4
		maks.	42	60	44	70	61	53
11.	PV	min.	2	1	1	3	1	2
		maks.	70	57	55	65	62	59
12.	DV	min.	5	3	1	2	2	4
		maks.	75	73	73	72	62	55

Preglednica št. prikazuje dvanajst različnih izpostavitvev, z različnimi koncentracijami MTBE ter izmerjene dolžine njihovih najkrajših (min.) in najdaljših (maks.) koreninic.

4.3 Mikroskopiranje

Preglednica 6: Popis dela s preparati od priprave, mikroskopiranja in pregleda aberacij.

Zap. št.	Št. izp.	Konc. [µg/l]	Oznaka prep.	Datum nastanka	ŠTETJE datum	ABERACIJE datum
1.	1.	0,001	E1P1	16. 8. 2007	16. 8. 2007	17. 8.2007
2.	1.	0,001	E3P2	16. 8. 2007	16. 8. 2007	17. 8.2007
3.	1.	0,001	E6P1	16. 8. 2007	16. 8. 2007	17. 8.2007
4.	2.	0,01	E1P1	29. 10. 2007	29. 10. 2007	29. 10.2007
5.	2.	0,01	E4P1	29. 10. 2007	29. 10. 2007	29. 10.2007
6.	2.	0,01	E5P1	29. 10. 2007	29. 10. 2007	29. 10.2007
7.	3.	0,1	E1P2	30. 10. 2007	30. 10. 2007	12. 3. 2007
8.	3.	0,1	E4P1	30. 10. 2007	30. 10. 2007	12. 3. 2007
9.	3.	0,1	E6P1	30. 10. 2007	30. 10. 2007	12. 3. 2007
10.	4.	0,5	E1P1	22. 2. 2007	22. 2. 2007	22. 2. 2007
11.	4.	0,5	E3P1	21. 2. 2007	22. 2. 2007	22. 2. 2007
12.	4.	0,5	E6P2	21. 2. 2007	22. 2. 2007	22. 2. 2007
13.	5.	1	E1P1	30. 10. 2007	30. 10. 2007	30. 10. 2007
14.	5.	1	E3P1	29. 10. 2007	29. 10. 2007	29. 10. 2007
15.	5.	1	E6P1	30. 10. 2007	30. 10. 2007	30. 10. 2007
16.	6.	5	E1P2	17. 8. 2007	17. 8. 2007	20. 8. 2007
17.	6.	5	E3P2	17. 8. 2007	21. 8. 2007	20. 8. 2007
18.	6.	5	E6P1	20. 8. 2007	21. 8. 2007	22. 8. 2007
19.	7.	10	E1P2	22. 8. 2007	23. 8. 2007	23. 8. 2007
20.	7.	10	E4P1	22. 8. 2007	23. 8. 2007	23. 8. 2007
21.	7.	10	E5P1	22. 8. 2007	23. 8. 2007	29. 10. 2007
22.	8.	50	E1P1	12. 3. 2007	12. 3. 2007	12. 3. 2007
23.	8.	50	E4P1	12. 3. 2007	12. 3. 2007	12. 3. 2007
24.	8.	50	E5P1	12. 3. 2007	12. 3. 2007	12. 3. 2007
25.	9.	100	E1P1	12. 3. 2007	12. 3. 2007	12. 3. 2007
26.	9.	100	E3P1	12. 3. 2007	12. 3. 2007	12. 3. 2007
27.	9.	100	E4P1	12. 3. 2007	12. 3. 2007	12. 3. 2007
28.	10.	1000	E1P2	14.8.2007	14.8.2007	16.8.2007
29.	10.	1000	E3P1	14.8.2007	14.8.2007	16.8.2007
30.	10.	1000	E6P1	23.2.2007	23.2.2007	17.8.2007
31.	11.	PV	E1P1	20.8.2007	21.8.2007	22.8.2007
32.	11.	PV	E3P2	20.8.2007	21.8.2007	22.8.2007
33.	12.	DV	E1 P1	14.12.2006	20.12.2006	27.12.2006
34.	12.	DV	E4P1	23.2.2007	23.2.2007	23.2.2007
35.	12.	DV	E5 P3	20.12.2006	22.12.2006	23.12, 27.12.2006

*OZNAKE PREPARATOV: npr. E1 (Epruveta številka 1), P1 (Preparat številka 1).

Pri pripravi preparatov, štetju celic in citogenetski analizi gre za obsežen in dolg postopek dela, zato je nemogoče vse opraviti v enem tednu. Ves čas smo vodili evidenco dela s preparati, ki je zapisana v zgornji tabeli, kjer se pregledno vidi preparate katerih epruвет oz. merilnih valjev smo pripravili, katere zavrgli, kdaj smo opravili štetja, kdaj citogenetsko analizo z opazovanjem aberacij na kromosomih.

4.4 Mitotski indeks

Preglednica 7: Rezultati štetja celic za mitotske indekse ter mitotski indeksi koncentracij.

Zap. št.	Konc. [$\mu\text{g/l}$]	Interfaze	Profaze	Metafaze	Zgodnje anafaze	Pozne anafaze	Telofaze	Σ	MI [%]
1.	0,001	2950	23	8	6	5	8	3000	1,7
2.	0,01	2918	38	19	2	5	18	3000	2,7
3.	0,1	2866	45	37	8	13	31	3000	4,5
4.	0,5	2930	30	18	6	15	1	3000	2,3
5.	1	2905	51	13	6	14	11	3000	3,2
6.	5	2930	24	25	12	8	1	3000	2,3
7.	10	2959	12	10	5	11	3	3000	1,4
8.	50	2893	38	35	2	19	13	3000	3,6
9.	100	2887	41	40	5	16	11	3000	3,8
10.	1000	2931	25	19	12	7	6	3000	2,3
11.	PV	1924	37	27	7	1	4	2000	3,8
12.	DV	2937	27	15	12	6	3	3000	2,1

Zgornja preglednica št. prikazuje koliko faz mitoze smo popisali med štetjem celic. Pri vsaki koncentraciji smo prešteli 3000 celic (3×1000), pri pitni vodi 2000 (2×1000). V zadnjem stolpcu preglednice smo izračunali mitotski indeks (MI) vsake koncentracije.

4.5 Aberacijski indeks

Preglednica 8: Delež aberantnih metafaz in anafaz pri posamezni koncentraciji MTBE izpostavitve šalotke v primerjavi s pitno vodo in destilirano vodo.

Zap. št.	Konc. [$\mu\text{g/l}$]	ΣMph	ΣAph	$\Sigma\text{Mph,Aph}$	ΣMpha_a	ΣAph_a	$\Sigma\text{Mph}_a,\text{Aph}_a$	AI_{Mpha} [%]	AI_{Apha} [%]	AI [%]
1.	0,001	36	27	63	0	1	1	0,0	3,7	1,6
2.	0,01	88	61	149	4	2	6	4,5	3,3	4,0
3.	0,1	66	62	128	3	5	8	4,5	8,1	6,3
4.	0,5	82	76	158	8	6	14	9,8	7,9	8,9
5.	1	62	61	123	9	10	19	14,5	16,4	15,4
6.	5	90	90	180	15	19	34	16,7	21,1	18,9
7.	10	84	79	163	16	16	32	19,0	20,3	19,6
8.	50	90	81	171	16	19	35	17,8	23,5	20,5
9.	100	90	67	157	17	16	33	18,9	23,9	21,0
10.	1000	69	62	131	28	21	49	40,6	33,9	37,4
11.	PV	60	50	110	5	3	8	8,3	6,0	7,3
12.	DV	64	32	96	34	21	55	53,1	65,6	57,3

Preglednica št. 8 prikazuje koliko metafaz in anafaz smo pregledali v vsaki koncentraciji, koliko od teh je bilo aberantnih, na podlagi dobljenih rezultatov smo nato izračunali še aberacijske indekse (AI).

Preglednica 9: Analiza kromosomskih poškodb v izpostavitvah.

Zap. št.	Konc. [$\mu\text{g/l}$]	Fragmenti		Mostiček	Špranje		Zlepljenja		Sateliti		Nesimetrični, zunaj del. vret		Posebnosti		Opis posebnosti	$\Sigma\text{Mph}_a, \text{Aph}_a$	ΣMph_a	ΣAph_a
		Mph	Aph	Aph	Mph	Aph	Mph	Aph	Mph	Aph	Mph	Aph	Mph	Aph				
1.	0,001			1												1	0	1
2.	0,01			1		1	3		1							6	4	2
3.	0,1			2			1	1			1	2	1		neodebeljeni	8	3	5
4.	0,5	5	2	1	1	1	2	2								14	8	6
5.	1	2	1	7	2	1	5					1				19	9	10
6.	5	8	1		2		5	18								34	15	19
7.	10	6	2	2			8	6	2	4		2				32	16	16
8.	50	4	3	4			4	12	2		6					35	16	19
9.	100	2		4			2		4	1	6	11	3		neodebeleni	33	17	16
10.	1000	9	3	8			15	7			4	3			neodebeleni	49	28	21
11.	PV	3	1	1			1	1	1							8	5	3
12.	DV			34			21									55	21	34

Pri analizi kromosomskih poškodb smo opazovali naslednje: Fragmente, mostičke, špranje, zlepljenja, satelite, nesimetrične delitve/kromosome zunaj delitvenega vretena. Poleg teh smo analizirali še nekaj posebnosti, ki smo jih v analizi tudi navedli.

Zbrani rezultati, prikazani v posameznih preglednicah, so zbrani v preglednici št. .

Preglednica 10: Mitotski in aberacijski indeksi izpostavitvev, prikazani za vse koncentracije.

Zap. št.	Konc. [$\mu\text{g/l}$]	MI [%]	AI _{Mpha} [%]	AI _{Apha} [%]	AI [%]
1.	0,001	1,7	0,0	3,7	1,6
2.	0,01	2,7	4,5	3,3	4,0
3.	0,1	4,5	4,5	8,1	6,3
4.	0,5	2,3	9,8	7,9	8,9
5.	1	3,2	14,5	16,4	15,4
6.	5	2,3	16,7	21,1	18,9
7.	10	1,4	19,0	20,3	19,6
8.	50	3,6	17,8	23,5	20,5
9.	100	3,8	18,9	23,9	21,0
10.	1000	2,3	40,6	33,9	37,4
11.	PV	3,8	8,3	6,0	7,3
12.	DV	2,1	53,1	65,6	57,3

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 Merjenje temperature, relativne vlažnosti, jakosti svetlobe in energije svetlobnega toka

Koreninice smo izpostavili za 14 dni v koncentracijah MTBE in dveh kontrolnih merilnih valjih, s pitno vodo in destilirano vodo. Med tem smo večkrat na različnih mestih v sobi izmerili temperaturo ter relativno vlažnost. Nekajkrat smo ob različnih pogojih, brez luči, z lučjo, izmerili tudi jakost svetlobe (rdeč spekter) in energijo fotonov (moder spekter). Za primerjavo smo meritev izvedli tudi v kalilniku.

Ugotovili smo, da se energija fotonov pri prižgani luči poveča za 12 %, v kalilniku pa je ta vrednost kar 93 % večja od povprečne vrednosti izmerjene v laboratoriju brez luči. V teh pogojih so bile koreninice izpostavljene večino časa. Pri jakosti svetlobe ugotovimo, da se vrednosti v laboratoriju z prižgano lučjo in brez luči ne razlikujejo. Razlika se pojavi, ko primerjamo vrednosti izmerjene v kalilniku, ki so za 93 % večje. Ugotovimo, da sta energija fotonov in jakost svetlobe v kalilniku 93 % večji. Ti rezultati deloma pojasnjujejo tudi nizke mitotske indekse, če bi bili idealni pogoji za izpostavitvev kar 93 % višji in boljši (v kalilniku), bi bili tudi mitotski indeksi posledično višji.

Povprečna temperatura v laboratoriju je bila 20 °C in relativna vlažnost 26 %.

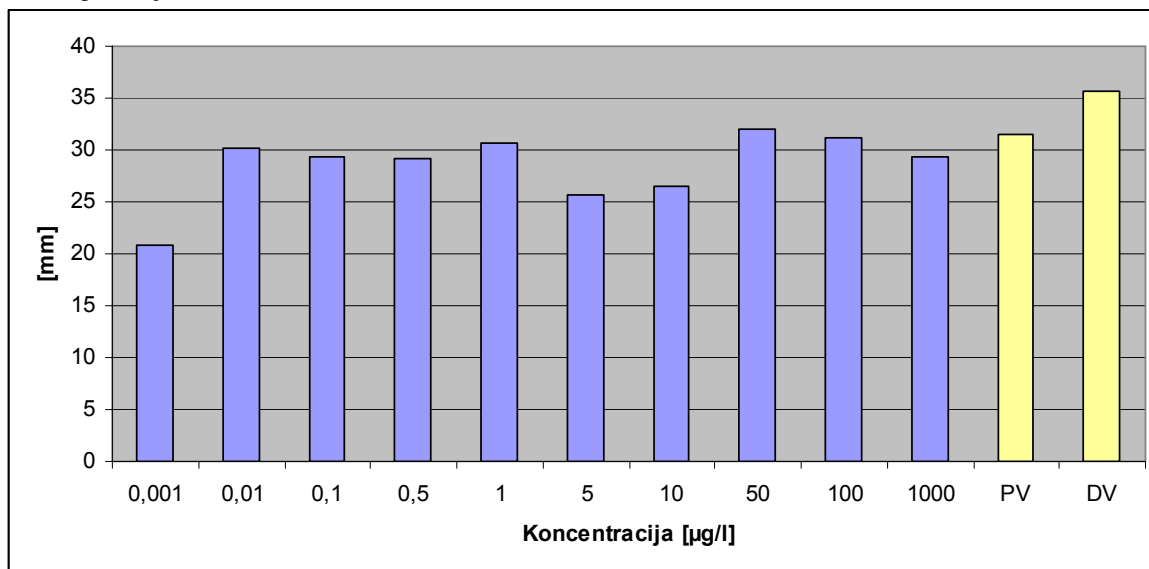
5.2 Dolžinski prirastki korenin

Po 7. dneh izpostavitve smo prvič izmerili koreninice. Merili smo najkrajšo in najdaljšo in izračunali dolžinski prirastek vsake posamezne. Takoj zatem smo že prvič vzorčili koreninice, zgolj za uporabo kot material za naslednje raziskave. Merjenje po vzorčenju, t. j. po 14 dneh izpostavitve, ni več relevantno, saj pri odvzemu vzorcev odrežemo naključne koreninice, morda celo najdaljše.

Največje dolžinske prirastke imajo čebulice, izpostavljene v destilirani vodi (35,6 mm), sledi jim pitna voda (31,5 mm). Največji prirastek v koncentracijah MTBE v pitni vodi ima koncentracija 50 µg/l (31 mm), najmanjšega pa imajo čebulice koncentracije 0,001 µg/l (20,9 mm). Čebulice, ki smo jih namakali v koncentracijah MTBE imajo nižje prirastke kot tiste v destilirani vodi in pitni vodi, kar dokazuje da MTBE stresno vpliva na delitev celic. Kot smo predpostavljali, so koreninice čebulic izpostavljenih v raztopinah MTBE-ja, krajše. Razlika med povprečnima vrednostnima izpostavitvev z MTBE in tistih brez (destilirana voda, pitna voda) je 5,1 mm. To pomeni, da so koreninice čebulic v koncentraciji MTBE v pitni vodi v večini za 15 % krajše. Vendar ugotavljamo, da je dolžina prirastka koreninic zelo spremenljiva glede na koncentracijo MTBE in da za te meritve nismo mogli ugotoviti logične zakonitosti.

Na osnovi teh ugotovitev smo hipotezo, ki pravi da so koreninice čebulice šalotke v vodi z večjimi koncentracijami MTBE krajše od tistih z manjšimi koncentracijami MTBE, ovrgli. Potrdimo pa lahko, da MTBE vpliva na manjšo delitev celic, saj so imele čebulice v destilirani vodi in pitni vodi daljše dolžinske prirastke.

Graf 1: Povprečni dolžinski prirastki koreninic šalotke izpostavljenih različnim koncentracijam MTBE v pitni vodi in posebej samo v destilirani vodi.

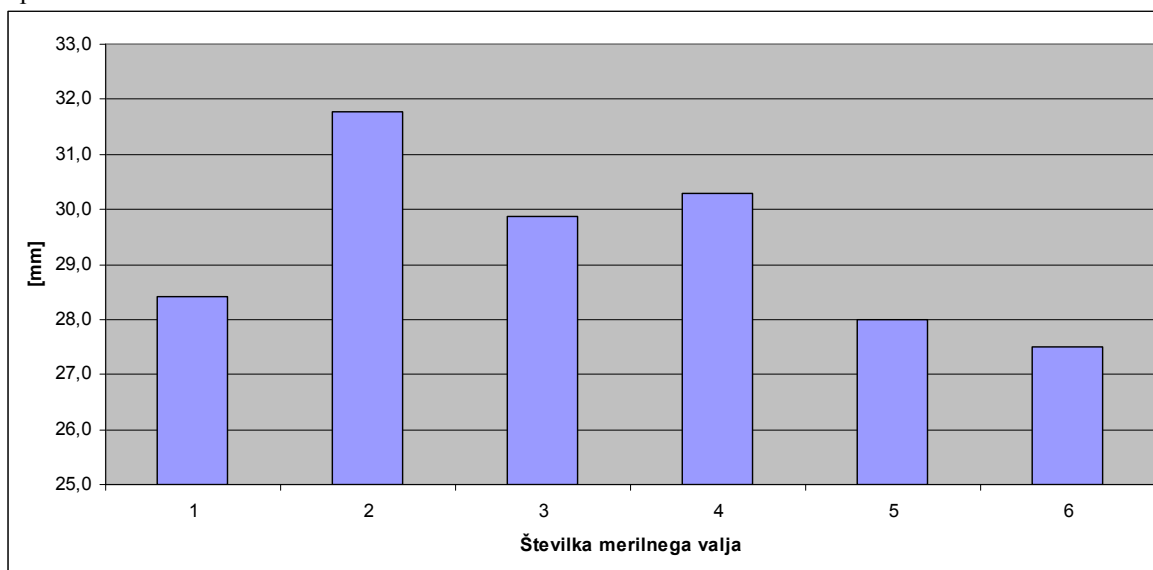


Čebulice smo izpostavili v 6. vrstah merilnih valjev (glej shemo izpostavitve). Menili smo, da bodo, kljub temu, da poskušamo zagotoviti enakomerne pogoje, tiste čebulice, v merilnih valjih št. 6 bolj mitotsko aktivne, tudi koreninski prirastki bodo daljši. Zato smo tudi izbrali selektivni vzorec pripravljanja preparatov.

Največji povprečni dolžinski prirastek ima valj št. 2 (31,8 mm), najmanjšega merilni valj št. 6 (27,5 mm).

Povprečni dolžinski prirastki posameznih valjev kažejo, da postavitve ni imela ključne vloge, to pomeni, da koreninice v merilnih valjih št. 6 niso dobivale več svetlobe, ker so bile ob oknu, kot tiste zadaj ali na sredini.

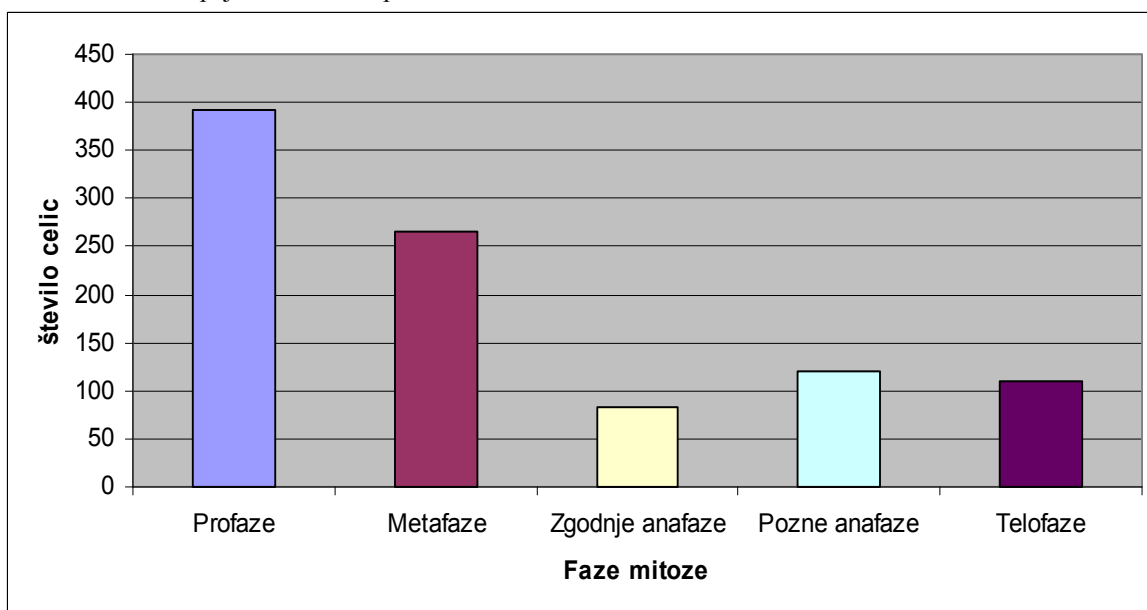
Graf 2: Povprečni dolžinski prirastek koreninic šalotke v posamezni številki merilnega valja v 7 dneh izpostavitve.



5.3 Mitotski indeks

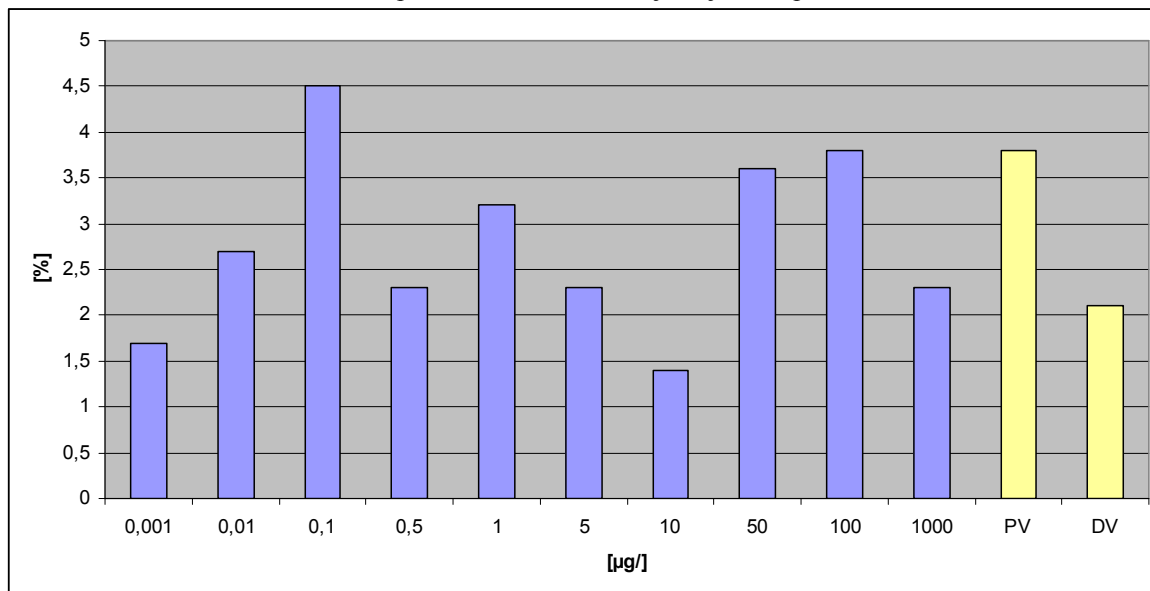
Pri štetju celic za izračun mitotskega indeksa smo prešteli 3000 celic v vsaki izpostavitvi, 1000 celic v enem preparatu. Celotni rezultati, kažejo, da smo skupaj prešteli največ interfaz (34030) izmed vseh celičnih faz. Kjer se celice aktivno delijo pa smo določili največ profaz (391) in najmanj zgodnjih anafaz (83). Sklepamo lahko, da smo najverjetneje vzorčili tik pred tem, ko so se celice začele aktivno deliti, saj delež sešteti celic pada proti zadnji fazi (profazi), če anafaze ne delimo na zgodnjo in pozno.

Graf 4: Število skupaj sešteti celic po fazah brez interfaze.



Beležimo nizko mitotsko aktivnost, ki je povezana s časom izpostavitve čebulic, jakostjo svetlobnega toka in energijo fotonov, ki so jo čebulice v času izpostavitve prijemale. Najvišji mitotski indeks imajo čebulice v koncentraciji 0,1 $\mu\text{g/l}$, ta znaša 4,5 %, najmanjši mitotski indeks pa smo beležili pri čebulicah v koncentraciji 10 $\mu\text{g/l}$, 1,4 %.

Graf 5: Rezultati mitotskih indeksov posameznih koncentracij, vključno s pitno in destilirano vodo.



Mitotski indeksi so različni in ne moremo reči, da koncentracija onesnažila vpliva na število delečih se celic. Če rezultate primerjamo s pitno vodo ugotovimo, da so tudi mitotski indeksi večjih koncentracij primerljivi z njo. Pitna voda ima MI = 3,8 %, takšnega ima tudi koncentracija 100 $\mu\text{g/l}$.

Dokažemo, da mitotski indeks ni pokazatelj genotoksičnosti MTBE in s tem ovržemo drugo hipotezo: Mitotski indeksi bodo s povečevanjem koncentracije MTBE v vodi vedno manjši.

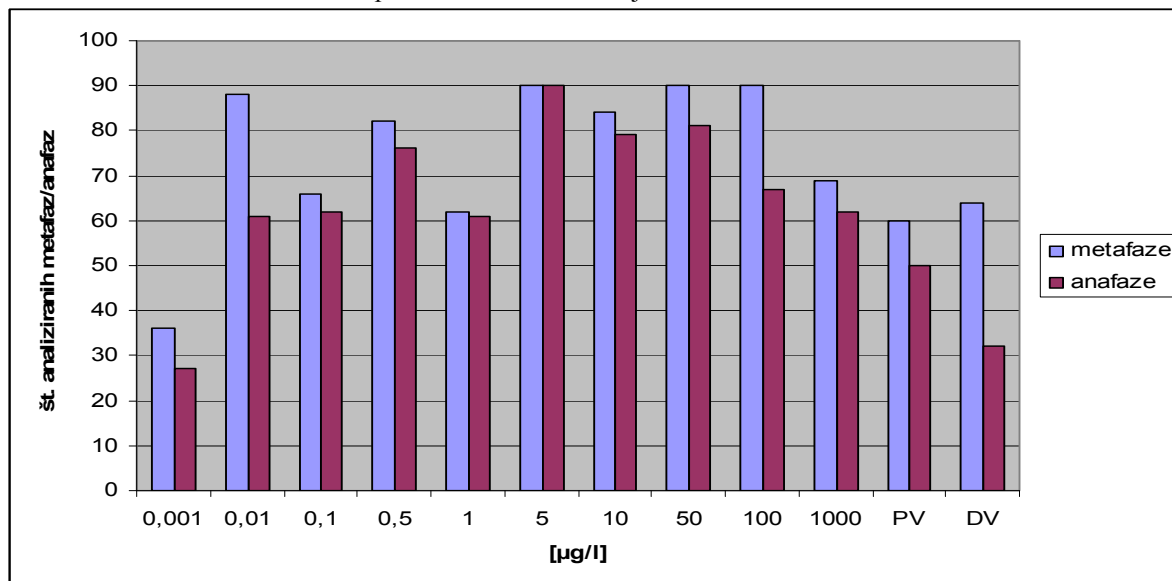
Hipotezo, da se bodo mitotski indeksi s povečevanjem koncentracije MTBE v vodi povprečju manjšali, smo ovrgli.

Te rezultate lahko primerjamo z rezultati dolžinskih prirastkov. Koncentracija 0,001 $\mu\text{g/l}$ ima najmanjši dolžinski prirastek (20,9 mm) in tudi MI je med manjšimi (1,7 %). Podobno velja za koncentracijo 10 $\mu\text{g/l}$, ki ima MI najnižji (1,4 %), hkrati ima tudi manjši dolžinski prirastek (26,5 mm). Vendar se pojavljajo tudi odstopanja pri konc. 0,5 $\mu\text{g/l}$ ($d = 29,1$ mm), MI = 2,3 %) in destilirani vodi ($d = 35,6$ mm, MI = 2,1 %), ki imata nizke mitotske indekse, ter velike dolžinske prirastke. Med tema dvema koncentracijama na podlagi dobljenih rezultatov ne moremo vzpostaviti vzročne zveze.

5.4 Aberacijski indeks

Analizirali smo odstotek vseh aberacij v metafazi in anafazi, v vzorcu in posamezne aberacijske indekse, za aberantne anafaze in aberantne metafaze. Načrt smo imeli pregledati skupno v vsakem preparatu 30 metafaz in 30 anafaz. Le pri koncentraciji 5 $\mu\text{g/l}$ smo uspeli v vseh treh vzorcih analizirati skupaj 90 celic, povsod drugje to zaradi nizkih mitotskih indeksov ni bilo mogoče.

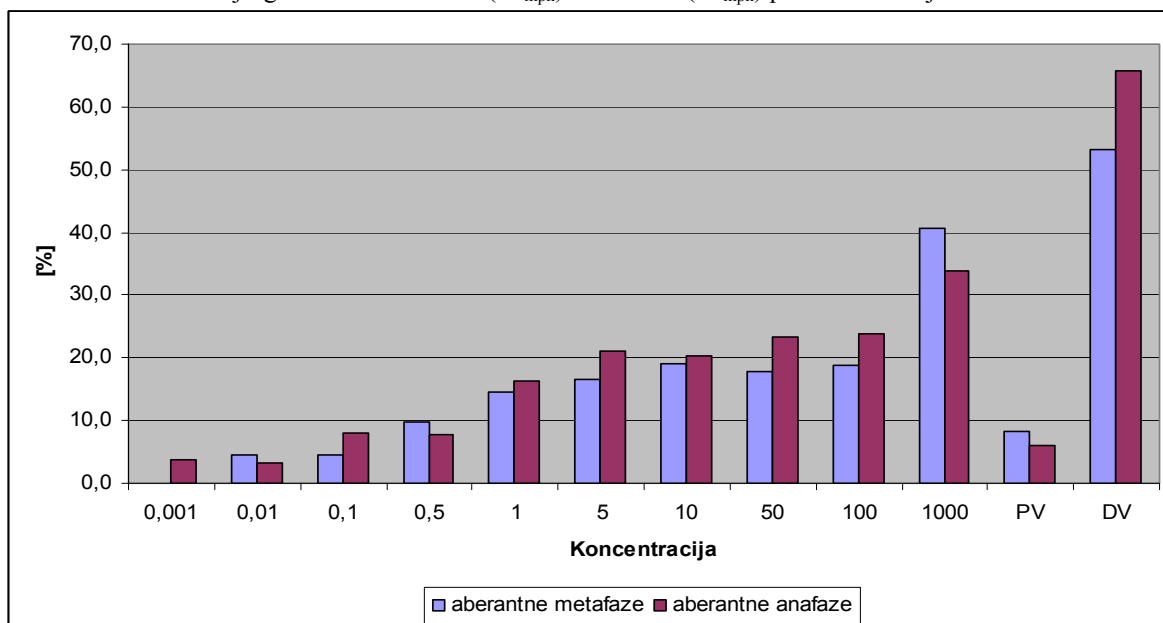
Graf 6: Število analiziranih celic v posameznih koncentracijah.



Skupno smo za ta namen pregledali 882 metafaz in 748 anafaz, od tega je bilo 155 metafaz ($AI_{\text{mph}} = 17,3$) in 139 ($AI_{\text{aph}} = 19,3$) anafaz aberantnih. Povprečen aberacijski indeks vseh pregledanih vzorcev je bil 18,2 %.

Osem je takšnih izpostavitvev, kjer je bilo poškodovanih več anafaz, kar je pričakovano, saj je to faza, kjer se dogajajo najvidnejše spremembe med kromosomi. Možno je tudi, da posamezne napake pri metafazi še ne pridejo do izraza, pridejo pa v anafazi, kjer se kromosomi pomikajo proti poloma. Največ poškodovanih anafaz je imela destilirana voda, ki je imela najvišji tako AI (57,3 %), kot tudi AI_{mph} (53,1 %), AI_{aph} (65,6 %). Koncentracija 1000 $\mu\text{g/l}$ je koncentracija, kjer je delež aberantnih metafaz višji, kot delež aberantnih anafaz, kar je posledica učinka MTBE, ki je povzročil premajhno skrajšanje in odebeljene kromosomov.

Graf 7: Prikaz aberacijskega indeksa metafaze (AI_{mph}) in anafaze (AI_{mph}) po koncentracijah.

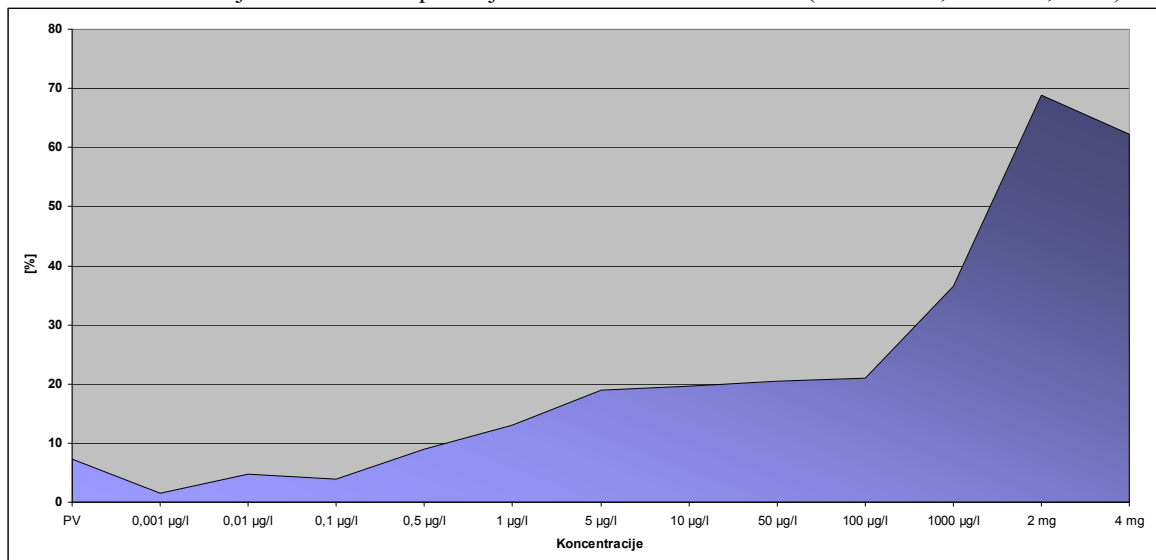


Našo raziskavo smo opravili na osnovi pitne vode, ki pa tudi ima nek odstotek aberacij ($AI = 7,3 \%$), ki je sicer majhen, a lahko vpliva na delitev. Teoretično bi bilo mogoče vendar zelo malo verjetno, da se že v vodi izpod pipe pojavlja MTBE v zelo majhnih koncentracijah. Poskušali smo dobiti kakršne koli meritve MTBE v pitni vodi v Šaleški dolini vendar teh podatkov na Komunali Velenje še nimajo. Ker je MTBE molekula, ki je občutljiva na svetlobo, višje temperature in hitro razpade v aerobnih pogojih in ker je pitna voda tretirana s klorom je možnost, da smo uporabili pitno vodo onesnaženo z MTBE po našem mnenju enaka nič. V vseh izpostavitvah smo uporabili vodo iz iste pipe, tako, da so rezultati razlik v aberacijah med koncentracijami MTBE primerljivi.

Dobljene rezultate smo pri analizi primerjali še z že dobljenimi rezultati raziskave na Erico d.o.o., Velenje, Vpliv cestnega prometa na obremenjenost okolja s PAH in MTBE, 2006.

Oni so v raziskavi analizirali dva vzorca MTBE, s koncentracijo 2 mg/l in 4mg/l z aberacijskima indeksoma 68,9 % in 62,2 %. V naši raziskavi smo uporabili mnogo manjše koncentracije, a je ta podatek primerljiv z našimi rezultati.

Graf 8: Prikaz aberacijskih indeksov v primerjavi z indeksoma iz literature (KOPUŠAR, N. s sod., 2006)



V graf destilirane vode nismo vključili, saj nam se služila le kot primerjava. Iz grafa je razvidno, da se delež aberantnih celic povečuje glede na povečanje koncentracije MTBE. Do koncentracije 0,5 µg/l so vrednosti še primerljive s pitno vodo. Nato se začne število aberacij s koncentracijo MTBE povečevati. S primerjavo podatkov iz literature lahko rečemo, da onesnažilo MTBE med 2 in 4 mg/l pitne vode povzroči največ poškodb.

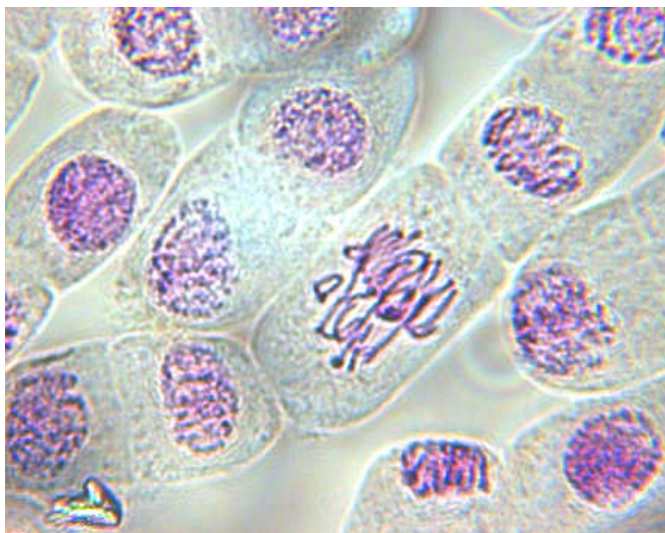
Na osnovi teh podatkov lahko potrdimo tretjo hipotezo, da se s povečevanjem koncentracije MTBE v pitni vodi, premosorazmerno povečevala število kromosomskih aberacij in anomalij v delitvi koreninskih celic.

5.5 Vrste poškodb, ki smo jih opazili v koncentracijah

5.5.1 Fragmenti

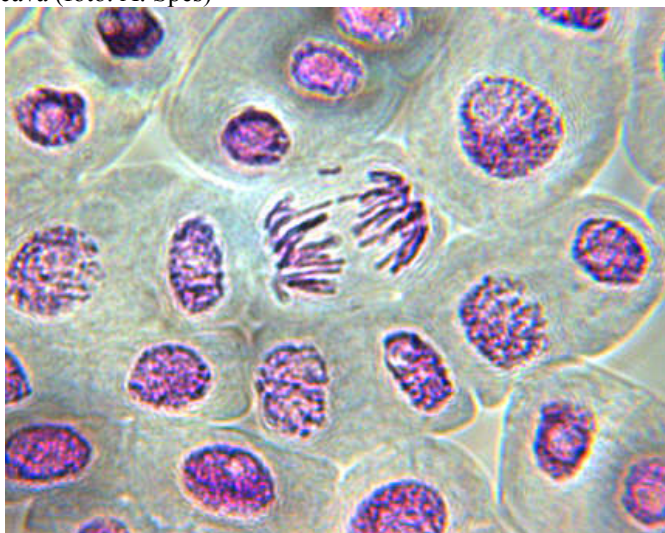
Ta napake se začne pojavljati po koncentraciji 0,5 $\mu\text{g/l}$. Dalje so bili fragmenti opaženi prvi vseh izpostavitvah. Največ jih je bilo v koncentraciji 1000 $\mu\text{g/l}$. Več smo jih popisali v metafazah (39), v anafazah (13). Fragmenti se pojavljajo v različnih oblikah.

Obroč nastane, kadar se oba dela fragmenta zlepita, pri tem se del kromosoma zaokroži. Pri analizi moramo biti pozorni, na to ali se morda dela kromosoma oz. fragmenta le dotikata in nista zlepljena. Metafaza je nesimetrična, opazimo tudi, da so kromosomi premalo odebeljeni in skrajšani, zato prihaja do vozlanj.



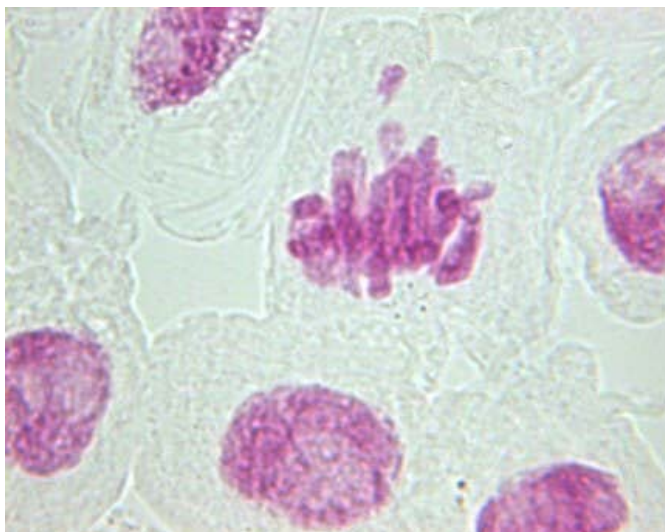
Slika 26: Obročast fragment v metafazi, koncentracija 1000 $\mu\text{g/l}$, 400 \times povečava (foto. A. Špes)

V zgornjem delu anafaze je viden majhen delček odlomljenega kromosoma. Sklepamo lahko, da bi se iz njega oblikoval mikronukleus, ko bi bil manjšega velikostnega reda, saj bi nastal le iz fragmenta, in postal tako imenovana hčerinska celica.



Slika 27: Fragment v anafazi, koncentracija 50 $\mu\text{g/l}$, 400 \times , povečava (foto. A. Špes)

Nad celico je viden odlomljeni del kromosoma v metafazi.



Slika 28: Fragment v metafazi, koncentracija 0,5 $\mu\text{g/l}$, 400 \times povečava (foto. A. Špes)

5.5.2 Špranje in fragmenti

Špranje niso bile tako pogoste kot fragmenti. Skupaj smo jih analizirali 8, med tem ko fragmentov 52. špranje so zelo težko opazljive, največkrat pa jih opazimo kot svetleči se del v kromosomu.

Poleg treh fragmentov, opazimo tudi špranjo, ki je začetek nastanka fragmenta. Označena je s puščico. Izgleda, kot da je to že samostojen del kromosoma, vendar ko raziskovalec izostri sliko, opazi majhen spoj na spodnji strani.

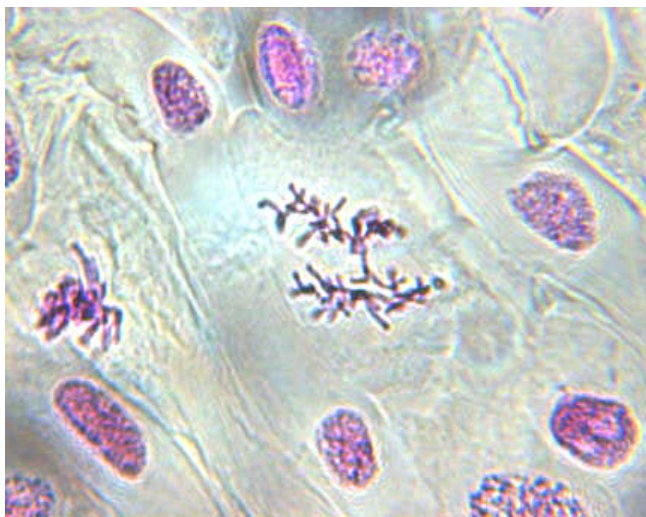


Slika 29: Špranja in fragmenti vidni v metafazi, koncentracija 0,5 $\mu\text{g/l}$, 400 \times povečava (foto. A. Špes)

5.5.3 Mostički

To aberacijo smo beležili le v anafazah. Literatura navaja tudi pojavljanje te aberacije v metafazi. Analiza mostičkov v metafazi pa zahtev veliko predznanja in potrebnih izkušenj z mikroskopiranjem. Če se pojavi mostiček v metafazi, se ta pojavi tudi kasneje v anafazi. Mostički so prevladovali v destilirani vodi (52%), ki je nagnjena k zlepljenju, zato so te poškodbe nastale toliko lažje.

Na sredini med obema deloma kromosomov v anafazi je viden mostiček, ki je zlepljen. Pri opazovanju mostičkov mora biti raziskovalec pozoren na to, ali se morda dva dela kromosomov le prekrivata, ali se bosta ločila in je med njima že vidna špranja.



Slika 30: Mostiček v anafazi v nesimetrični celici, koncentracija 100 µg/l, 400 × povečava (foto. A. Špes)

Dva mostička v anafazi, lepo viden je tudi tretji podaljšan kromosom, ki pa ni mostiček, ampak je prišlo le do nesomernega premika kromosomov na pola.



Slika 31: Dva mostička v anafazi, koncentracija 100 µg/l, 400 × povečava (foto. A. Špes)

Na sliki, je vidna anafaza, ki se sicer v ozadju prekriva interfaza. Nastalo je več mostičkov. Aberacija lahko vodi v aneuploplodijo ali aneuplodijo, ki nastaneta v hčerinskih celicah.



Slika 32: Več mostičkov, koncentracija 1000 µg/l, 400 × povečava (foto. A. Špes)

Neizkušen raziskovalec bi lahko morda to delitev prišteval kot poškodovano, definirano kot mostiček v anafazi, vendar je pri slednji vidno, da kromosoma nista zlepljena in mostička ni, med njima je vidna svetleča špranja.

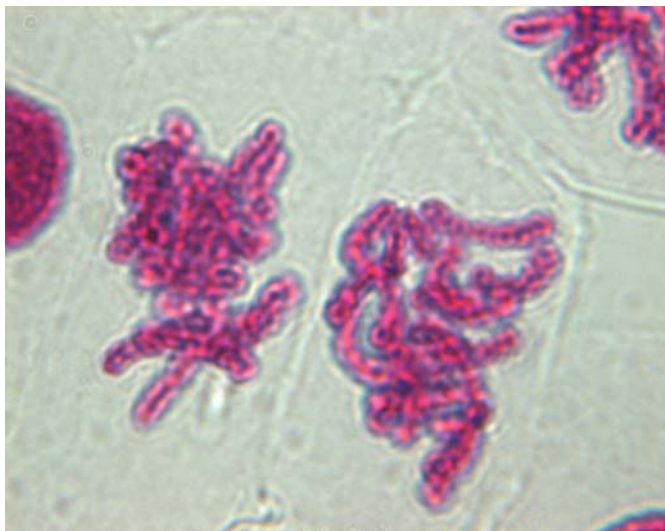


Slika 33: Nepoškodovani kromosomi v anafazi, koncentracija 5 $\mu\text{g/l}$, 1000 \times povečava (foto. A. Špes)

5.5.4 Zlepljenja

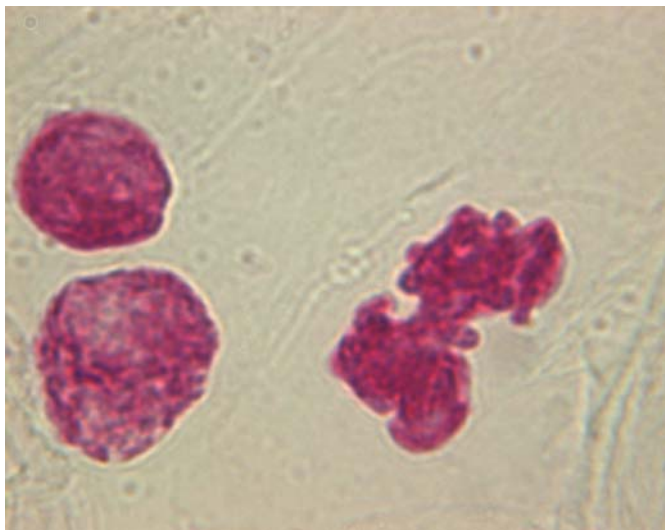
Ta aberacija je bila pogosta in najbolj tipična za destilirano vodo, kar 31% zlepljenj je pripadalo tej izpostavitvi. Sklepamo, da je to posledica primanjkovanja mineralnih snovi v destilirani vodi. Prav tako je to pokazatelj, da je bila naša odločitev uporabiti pitno in ne destilirano vodo za pripravo različnih koncentracij MTBE pametna.

Na metafazi (levo) je vidna popačenost, zlepljenje in popolna nejasnost. Kromosome je težko oz. nemogoče razločiti in definirati. Zelo težko je tudi trditi, da je na tej sliki levo metafaza, saj je aberacija izkazala obliko faze.



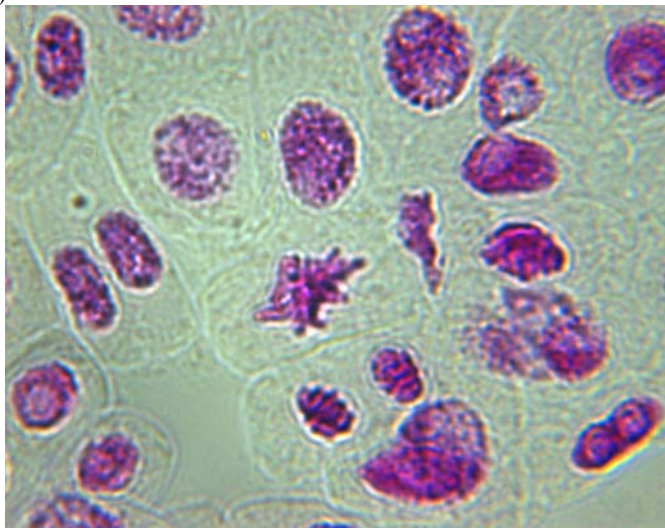
Slika 34: Zlepljenje in oblikovanje t. i. amorfnih mas, tipična aberacija v destilirani vodi, 1000 \times povečava (foto. A. Špes)

Popolnoma zlepljena anafaza, iz slike ne moremo več razbrati posameznih kromosomov. Takšna aberacija, kot je to je usodna za celico, saj se je ta nezmožna deliti. Propade.



Slika 35: popolnoma zlepljena anafaza, nezmožna nadaljevati delitev, zaradi prevelike aberacije, destilirana voda, 1000 × povečava (foto. A. Špes)

Zlepljenja so značilna tako za metafaze, kot za anafaze (analizirali smo več zlepljeni anafaz– 59 %). Vendar je na sliki vidna metafaza, ki je zlepljena in nemogoče je videti posamezne kromosome.



Slika 36: Zlepljena metafaza, koncentracija 0,01 µg/l, 400 × povečava (foto. A. Špes)

5.5.5 Sateliti

Pogostejši so bili za metafaze (10), v anafazah smo jih popisali 5.

Sateliti se pojavljajo kot majhne pikice nad kromosomi. Označen s puščico.



Slika 37: Satelit v metafazi, koncentracija 10 $\mu\text{g/l}$, 630 \times povečava (foto. A. Špes)

Metafaza, ki ima poškodovane kromosome, viden je fragment v obliki obroča in satelit (označen s puščico) na enim izmed kromosomov.



Slika 38: Satelit in obroček v metafazi, koncentracija 1000 $\mu\text{g/l}$, 630 \times povečava (foto. A. Špes)

5.5.6 Zaostali kromosomi, nesimetrična delitev

Ta napaka se je pojavljala pri višjih koncentracijah MTBE v pitni vodi. Več kot je bilo MTBE, bolj stresno je to vplivalo na delitev kromosomov. Aberacije se kažejo v nesimetriji, zaostajanju kromosomov, tudi v neodebelitvi in neskrajšanju kromosomskih niti med delitvijo, ker poveča možnost napake. Te aberacije se začnejo pojavljati že pri koncentraciji 0,1 μg MTBE/l, najbolj izrazite pa so po koncentraciji 10 μg MTBE/l pitne vode.

Na sliki viden stresen vpliv MTBE na delitev celic. Anafaza je nesimetrična, vidi se možnost vozlanja, tudi kromosomi so premalo debeli za to fazo delitve.



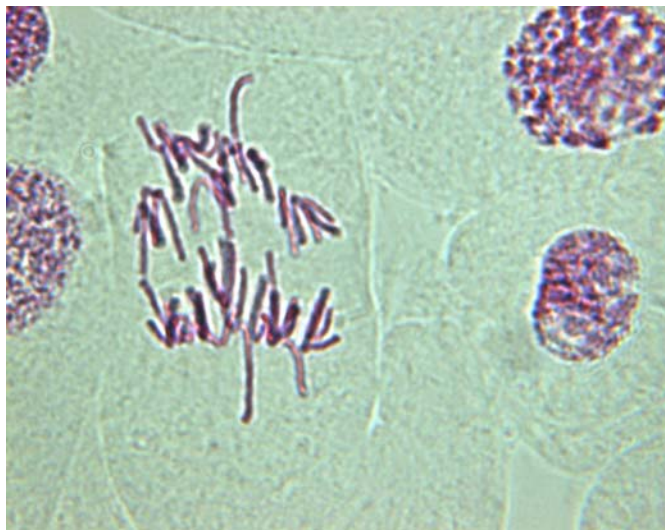
Slika 39: Anafaza, ki je asimetrična, prepletena, koncentracija 100 $\mu\text{g}/\text{l}$, 400 \times povečava (foto. A. Špes)

Slika desno prav tako prikazuje obnašanje kromosomov med delitvijo, kot vzrok temu lahko pojasnimo s koncentracijo MTBE. Tudi pri posameznih kromosomih ni vidno, kako jih nit delitvenega vretena vleče proti sredini.



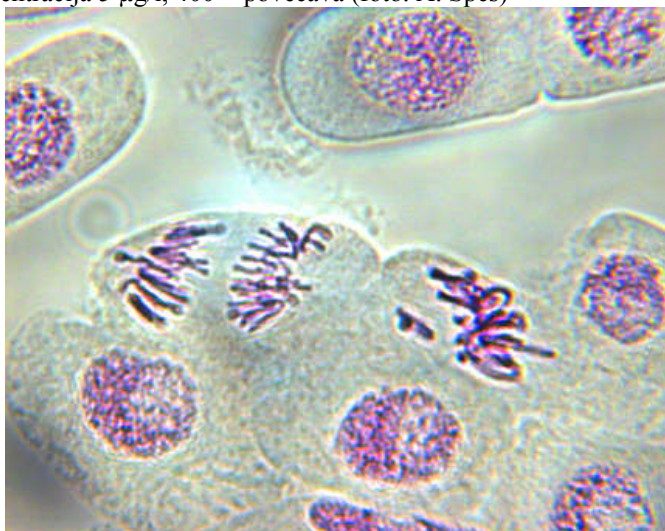
Slika 40: Dve metafazi, ki sta poškodovani, kromosomi so premalo odebeljeni, koncentracija 1000 $\mu\text{g}/\text{l}$, 400 \times povečava (foto. A. Špes)

Vidno, je kako nekateri kromosomi zaostajajo oz. so simetrični. Takšna napaka lahko pripelje do izgube kakšnega kromosoma, kar vodi v aneuploidijo.



Slika 41: Anafaza z zaostalimi kromosomi in nesimetrično delitvijo, koncentracija 5 $\mu\text{g/l}$, 400 \times povečava (foto. A. Špes)

Metafaza na desni strani ima zaostali kromosom, ki morda na prvi pogled daje vtis, da gre za fragment, ki pa po izostritvi ni.



Slika 42: Metafaza na desni ima zaostali kromosom, koncentracija 100 $\mu\text{g/l}$, 400 \times povečava (foto. A. Špes)

5.5.7 Mikronukleus

Predmet naše raziskave ni bil test mikronukleus (test MCN), ki je po mnenju Ranka in Nielsena (1993, 1994, 1997) dovolj hiter in prav toliko zanesljiv, kot metode z določanjem aberacij.

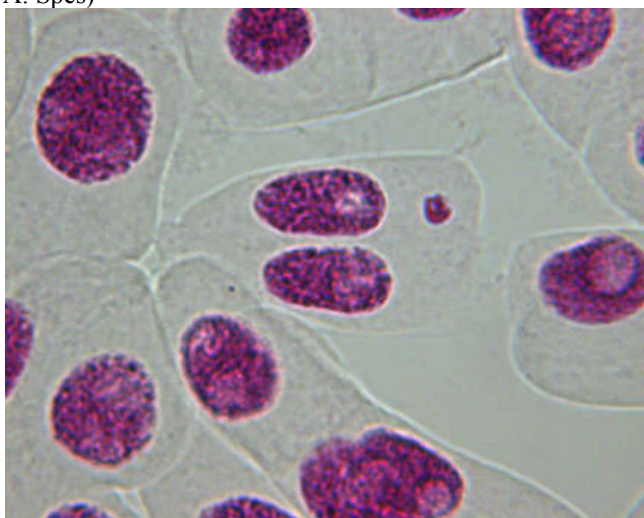
Na mikronukleuse je potrebno biti pozoren pri štetju. Zato je navedenih nekaj primerov:

Opazimo en mikronukleus (ki je označen s puščico). Tega štejemo, zgornji, pa je le del binuklearne celice.



Slika 43: Mikronukleus v koncentraciji 0,5 µg/l, pri 400 × povečavi (foto. A. Špes)

Mikronukleuse smo popisali tudi v destilirani vodi. Jasno sta v tem primeru vidni binuklearni celici.



Slika 44: Jasno viden mikronukleus, ki je nastal med delitvijo jedra, destilirana voda, 400 × povečava (foto. A. Špes)

Kadar mikronukleus ni popolnoma odcepljen od pripadajočega jedra celice, moramo biti pozorni na njegovo obliko. V kolikor je pravilne okrogle oblike, kot ta na sliki, ga štejemo, če pa je popačen, ali sploščen ali kako drugače nenavaden, ga ne štejemo.



Slika 45: Mikronukleus, ki ni popolnoma jasno odcepljen od jedra celice, destilirana voda, 400 × povečava (foto. A. Špes)

6 ZAKLJUČKI

- Izpostavili smo 72 čebulic šalotke (*Allium cepa* L. var. *ascalonicum*) v 10 različnih koncentracijah MTBE, pitni vodi ter destilirani vodi.
- Postavitev čebulic ni vplivala na delitev njihovih celic (tiste, ki so bile čisto ob oknu se niso delile hitreje).
- Skupaj smo pripravili 35 vzorcev iz 12 izpostavitvev in jih analizirali pod mikroskopom.
- Največje dolžinske prirastke so imele čebulice, izpostavljene v destilirani vodi (35,6 mm). Najmanjši dolžinski prirastek so imele čebulice koncentracije 0,001 µg/l (20,9 mm).
- Čebulice, ki smo jih namakali v koncentracijah MTBE imajo nižje prirastke kot tiste v destilirani vodi in pitni vodi, kar dokazuje da MTBE stresno vpliva na delitev celic. Razlika med povprečnima vrednostnima izpostavitvev z MTBE in tistih brez (destilirana voda, pitna voda) je 5,1 mm. To pomeni, da so koreninice čebulic v koncentraciji MTBE v pitni vodi za 15 % krajše.
- Vendar ugotavljamo, da je dolžina prirastka koreninic zelo spremenljiva glede na koncentracijo MTBE in da za te meritve nismo mogli ugotoviti logične zakonitosti, koreninice čebulice šalotke v vodi z večjimi koncentracijami MTB niso bile krajše od tistih z manjšimi koncentracijami MTBE.
- Pri šteju celic za izračun mitotskega indeksa smo prešteli 3000 celic v vsaki izpostavitvi, 1000 celic v enem preparatu.
- Najvišji mitotski indeks imajo čebulice v koncentraciji 0,1 µg/l, ta znaša 4,5 %, najmanjši mitotski indeks pa smo beležili pri čebulicah v koncentraciji 10 µg/l, 1,4 %.
- Mitotski indeksi so različni in ne moremo reči, da koncentracija onesnažila vpliva na število delečih se celic. Če rezultate primerjamo s pitno vodo ugotovimo, da so tudi mitotski indeksi večjih koncentracij primerljivi z njo. Pitna voda ima MI = 3,8 %, takšnega ima tudi koncentracija 100 µg/l.
- Mitotski indeks ni pokazatelj genotoksičnosti MTBE, saj se s povečevanjem koncentracije MTBE v vodi ni manjšal mitotski indeks.
- Za določitev aberacijskega indeksa smo pregledali 882 metafaz in 748 anafaz, od tega je bilo 155 metafaz ($AI_{mph} = 17,3$) in 139 ($AI_{aph} = 19,3$) anafaz aberantnih. Povprečen aberacijski indeks vseh pregledanih vzorcev je bil 18,2 %.
- Najvišji aberacijski indeks smo izračunali pri destilirano vodi, $AI = 57,3$ %, izmed izpostavitvev v raztopini MTBE pa pri koncentraciji 1000 µg/l, $AI = 37,4$ %. Najmanjši aberacijski indeks ima koncentracija 0,001 µg/l, $AI = 1,6$ %.

- Največ poškodovanih anafaz je imela destilirana voda, $AI_{aph} = 65,3 \%$, prav tako smo v tej izpostavitvi zabeležili največ poškodovanih metafaz $AI_{mph} = 51,3 \%$.
- Pri analizi celic, jih je bilo največ poškodovanih zaradi zlepljenj, 65 primerov, sledijo mostrički v anafazi, 67 primerov.
- Delež aberantnih celic povečuje glede na povečanje koncentracije MTBE. Do koncentracije $0,5 \mu\text{g/l}$ so vrednosti še primerljive s pitno vodo. Nato se začne število aberacij s koncentracijo MTBE povečevati.
- Glede na to bi koncentracijo $0,5 \mu\text{g/l}$ določili kot opozorilno vrednost MTBE v pitni vodi, koncentracijo, pri kateri bi se naj začelo s priporočili ter opozarjanjem prebivalstva in povzročitelja obremenitve preventivno varovati zdravje ljudi pred škodljivimi vplivi MTBE.
- Za določitev mejne vrednosti, bi morali narediti še več raziskav v območju koncentracij MTBE v vodi, od $5 \mu\text{g/l}$ do $100 \mu\text{g/l}$. Tu se aberacijski indeksi gibljejo okoli 20% in je zelo težko določiti mejo med temi rezultati, saj so razlike med njimi minimalne.

7 POVZETEK

Genotoksičnost metil tetra-butil etra v pitni vodi z *Allium* testom je raziskovalna naloga pri kateri smo želeli ugotoviti v katerih koncentracijah vodne raztopine MTBE, ta vpliva na spremembe pri delitvi celic koreninskih vršičkov čebulic šalotke (*Allium cepa* L. var. *ascalonicum*). Ugotavljali smo torej, kako se kromosomske napake povečujejo s povečevanjem koncentracije MTBE v vodi in prav tako, kako se dolžina koreninic čebulic spreminja glede na koncentracijo onesnažila.

Raziskava temelji na *Allium* testu, kjer gre za obsežen postopek, tako priprave preparatov, kot tudi opazovanja le-teh. Za opazovanje preparatov, določevanje mitotskega indeksa in ugotavljanje aberacij, ki se utegnejo pojavljati pri delitvah celic, potrebuje raziskovalec dobro predznanje. Čebulice smo izpostavili za 14 dni v določenih koncentracijah vodne raztopine MTBE, nato smo jih vzorčili in fiksirali. Priprava posameznega preparata je vključevala hidrolizo, obarvanje v folgenu oz. Schifferjevemu reagentu ter priprava vzorca t. i. mečkanca za opazovanje pod mikroskopu. Pri vsaki posamezni koncentraciji smo opazovali tri preparate. Za določitev mitotskega indeksa smo pregledali 1000 celic na preparat, torej skupno 3000. Pri določevanju aberacijskega indeksa, ki nam pove koliko izmed določenih opazovanih celic je aberantnih, smo imeli cilj skupno pregledati 90 anafaz in 90 metafaz, v treh preparatih. Pri tem smo opazovali naslednje kromosomske aberacije: aneuplodijo, poliploidijo, strukturne kromosomske aberacije (fragmenti, špranje, mostički v anafazi, lepljenja, pojavljanje satelitov).

Pri vseh preparatih, vseh koncentracij, smo izračunali zelo nizek mitotski indeks, ki v povprečju znaša le 2,6 odstotka, kar je posledica izpostavitve čebulic v času izven vegetativnega obdobja šalotke in v času, ko je bila, zaradi vremenskih pogojev, jakost sončnega sevanja izredno nizka. Najvišji mitotski indeks imajo čebulice v koncentraciji 0,1 $\mu\text{g/l}$, ta znaša 4,5 %, najmanjši mitotski indeks pa smo beležili pri čebulicah v koncentraciji 10 $\mu\text{g/l}$, 1,4 %. Mitotski indeksi so bili po izpostavitvah različni in ne moremo reči, da koncentracija onesnažila vpliva na število delečih se celic, torej ta ni pokazatelj genotoksičnosti MTBE, saj se s povečevanjem koncentracije MTBE v vodi ni manjšal mitotski indeks.

Delež aberantnih celic povečuje glede na povečanje koncentracije MTBE. Najvišji aberacijski indeks smo izračunali pri destilirano vodi, AI = 57,3 %, izmed izpostavitvev v raztopini MTBE pa koncentracija 1000 $\mu\text{g/l}$, AI = 37,4 %. Najmanjši aberacijski indeks ima koncentracija 0,001 $\mu\text{g/l}$, AI = 1.6 %.

Do koncentracije 0,5 $\mu\text{g/l}$ so vrednosti še primerljive s pitno vodo. Nato se začne število aberacij s koncentracijo MTBE povečevati. Glede na to bi koncentracijo 0,5 $\mu\text{g/l}$ določili kot opozorilno vrednost MTBE v pitni vodi, koncentracijo, pri kateri bi se naj začelo s priporočili ter opozarjanjem prebivalstva in povzročitelja obremenitve preventivno varovati zdravje ljudi pred škodljivimi vplivi MTBE. Za določitev mejne vrednosti, bi morali narediti še več raziskav v območju koncentracij MTBE v vodi, od 5 $\mu\text{g/l}$ do 100 $\mu\text{g/l}$. Tu se aberacijski indeksi gibljejo okoli 20 % in je zelo težko določiti mejo med temi rezultati, saj so razlike med njimi minimalne.

Glede vplivov in učinkov MTBE na rastline in človeka je ta zelo slabo raziskan in prav to je bil glavni razlog, da smo se odločili za to obsežno raziskavo, ki je zelo zanimiva, saj ponuja pogled svet, človeku s prostim očesom neviden. MTBE je spojina, ki jo dodajajo bencinskemu gorivu kot nadomestek svinca. V okolje se lahko sprošča pri skladiščenju, pretakanju in izgorevanju goriva, zato smo pravzaprav ves čas v stiku z njim, o njem pa vemo zelo malo oz. skoraj nič. In upamo, da bomo s to raziskavo pripomogli k nadaljnjim raziskavam o vplivih in učinkih MTBE tako na rastline, kot tudi na ljudi ter osveščanju ljudi o kvaliteti vode, ki jo pijemo ter snoveh, ki so v njej.

8 ZAHVALA

Ko se raziskovalec odloči raziskati nek problem, to še ni najtežja stvar, ki jo je storil. Za tem še sledi veliko dela, ki je lahko včasih tudi zelo utrujajoče in obupavajoče. Narediti raziskovalno nalogo še zdaleč ni lahka stvar. Koliko je takšnih stvari, na katere raziskovalec ne sme pozabiti, koliko je materiala, ki ga mora uporabiti in dobiti vse potrebne inštrumente, s katerimi merimo. Dvomim, da jih ima kdo, vse doma. Skratka narediti raziskovalno nalogo ni samo rešiti problem, raziskovati, pač pa tudi obvladati logistiko, organizacijo dela. In tukaj se nam, raziskovalcem, večinoma zalomi. Kje najdemo sploh kaj časa, razmišljati še o tem. Zato imamo ves čas ob sebi nekoga, ki nam pomaga, svetuje, tako po strokovni plati, kot tudi praktični, nam pomaga uskladiti potek dela. To je mentor. Menim, da so te naloge zrcalo sodelovanja med mentorji in raziskovalci.

Imela sem dve zelo dobri mentorici, mag. Natašo Kopušar in Meto Zaluberšek, ki sta mi vsaka strokovno pomagali reševati probleme, me uvajali v delo, mi svetovali in pomagali. Naloga, kakršna je ta, zagotovo ne bi bila takšna, če ju ne bi bilo. Zato se jima iskreno zahvaljujem.

Zahvalila bi se tudi Erico d. o. o., Inštitutu za ekološke raziskave, Velenje, ki mi je pomagal pri izvedbi raziskovane naloge, ki je zahtevala uporabo kar nekaj strokovnih merilcev in aparatov, mi odstopil prostore, kjer sem lahko opravila vso moje raziskovalno delo, mikroskopirnico in biološke laboratorije, ter mi priskrbel in omogočil uporabo materialov, ki sem jih pri delu potrebovala. Hvala tudi ge. Vlasti Landekar, ki mi je v kemijskih laboratorijih svetovala in pomagala zmešati koncentracije MTBE v pitni vodi.

Družine v tej točki ne bom omenila, ker je to že skoraj rutina. Pač pa imam veliko upravičenih razlogov, da se jim zahvalim. Imela sem strokovno dokaj zapleteno nalogo in nekdo, ki se ne ukvarja s tem področjem, verjamem, ne sledi teoriji, ki jo naloga zahteva. Družini bi se zahvalila predvsem, kar so me doma vsi, tudi po eno uro na dan poslušali, kaj počnem, kaj sem našla, kaj ugotovila in pri tem pokazali veliko zanimanja. Čeprav vem, da mi je oče rekel, da sploh ni vedel o čem govorim. Če ne bi bilo njih, bi že obupala na nalogo, saj se mi bi zdela brezupna utopija dokončati zastavljeno.

Skratka, hvala vsem, ki so pripomogli k nastanku naloge, pa čeprav le z besedo ali spodbudo. Brez ljudi, kakršni so okoli mene mi ne bi nikoli uspelo.

9 VIRI IN LITERATURA

- AL-SABTI, K. 1993. Sevanje in citogenetske poškodbe. Inštitut Jožef Štefan. Ljubljana. 84 str.
- ATSDR. 1996. Toxicological Profile for Methy tert-Butyl Ether. Atlanta, U. S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 223 str.
- CONSTANTIN, M. J., OWENS, E. T. 1982. Introduction and perspectives of plant genetic and cytogenetic assay. A report of teh US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation research, 99: str. 1 – 12
- ČERNE, M. 1992. Čebulnice; čebula, česen, por, timski luk, drobnjak, šalotka. Ljubljana, Kmečki glas, 61 str.
- DRUŠKOVIČ, B. 1988a. Citogenetska bioindikacija I. – Efekti genotoksičnih pulantov in možnost njihovega odkrivanja (Materiali in metode). Biol. vest., 36, 3, str. 1-18
- DRUŠKOVIČ, B. 1988b. Citogenetska bioindikacija II. – Prikaz načina ocenjevanja obremenjenosti genetskega materiala in ocena ogroženosti smreke na posamezni lokaliteti (Primer: Relacija Mežica-Črna-Javorje-Zavodnje). Biol. vest., 36, 4, str. 31-34
- DRUŠKOVIČ, B. 1994. možnost in pomen odkrivanja prikritega vpliva onesnaženega okolja. V: varstvo zraka: stanje in ukrepi za izboljšanje stanja v Sloveniji. Batič, F. (ur.). Ljubljana, 18. 1. – 18. 12.
- DRUŠKOVIČ, B. 1996. Citogenetske spremembe in ogroženost rastlin. V: narava Slovenije, stanje in perspektive. Zbornik prispevkov o naravni dediščini Slovenije. Ljubljana, Društvo ekologov Slovenije, str. 69 – 82
- DWA. 1997. Drinking Water Advisory: Consumer; Acceptability Advice and Health Effects; Analysis on Methyl Tertiary-Butyl Ether, (MtBE), december
- FISKESJÖ, G. 1988. The *Allium* Test – An Alternative in Environmental Studies: The relative Toxicity of metal ions. Mutation research, 197, str. 243 – 260
- FISKESJÖ, G. 1985. The *Allium* Test as a Standard in Environmental Monitoring, Hereditas, 64, str. 142 – 146
- FISKESJÖ, G. 1993. Technical Methods Section – *Allium* Test I. Environmental Toxicology and Water Quality, 8, str. 461 – 471
- FISKESJÖ, G. 1995. *Allium* Test. – V: In Vitro Toxicity testing protocols. Fiskesjö, G. (ur.). Meth. Mol. Biol., 43, str. 119 – 127
- GLASENČNIK, E. s sod. 2002. Vpliv onesnaženega zraka na citogenetski material bioindikatorskih rastlin – na vplivnem območju termoenergetskih objektov na ozemlju Slovenije. Velenje, ERICo d. d. o., Velenje, DP – 8/02/02, 65 str.
- GLASENČNIK, E. 2003. Vpliv onesnaženega zraka na celične delitve v koreninskih vršičkih šalotke (*Allium cepa* L. var. *ascalonicum*) na emisijsko ogroženih območjih Slovenije, doktorska dezertacija, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo. 199 str.
- GRANT, W. F. 1982. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. EPA gene – Tox Program. Mutation Research, 99, str. 273 – 291
- GRANT, W. F. 1994. The presents status of higher plant bioassay for detection of environmental mutagens, Mutation Research, 310, str. 175 – 185

- JUHLER, R.K., Felding, G. 2003. Monitoring Methyl Tertiary Butyl Ether (MTBE) and other Organic Micropollutants in Groundwater: Results from The Danish National monitoring program. *Water, Air and Soil Pollution* 149, str. 145-161
- KOPUŠAR, N., Kozinc, J., Justin, B., Zaluberšek, M., Druks Gajšek, P., Vanovšek, S., Videmšek, M. 2006. Vpliv cestnega prometa na obremenjenost s PAH in MTBE, končno poročilo. Ljubljana, ERICo, 56 str.
- KOSHLAND C.P., Sawyer, R.F., Lucas, D., FRANKLIN, P. 1998. Evulation of automotive MTBE combustion byproducts. V: Health and enviromental assessment of MTBE, Vol. 2, UC raziskovalni in izobraževalni program o strupenih snoveh, University of California, Davis.
- KRISTEN, U. 1997. Use of higher Plants as Screens for Toxicity Assessment. *Toxicology in Vitro*, 11: str. 181 – 191
- MÜLLER, M., Gutenberger, H., Grill, D., Druškovič, B., Paradiž, J. 1991. A cytogenetic method for exmaninig the vitality of spaces. *Phyton*, 31: str. 134 – 155
- PARADIŽ, J., DRUŠKOVIČ, B. 2001. Assessment of cytogenetic hazard for plants caused by highway traffic. *Acta Biologica Slovenica* 44, 4: str. 3 – 12
- PARADIŽ, J. 1996. Učinki ionizirajočega sevanja na celice meristema čebule (*Allium cepa* L.). Doktorska dezertacija. Univerza Ljubljana. Biotehniška fakulteta. Oddelek za biologijo: 89 str.
- PAVLICA, M., Papeš, D., Franekič, J., Nagy, B. 1992. Effects of benzyladenin on prokaryotic and euaryotic cells. *Mutation Research*, 281: str. 277 – 282
- PRAKASH CB. 1989. motor vehicle emissions from gasoline containing MTBE. Ottawa, Ontario, Environment Canada, Environmental Protection Dierectorate, Conservation and Protection, Industrial Programs Branch, Report No. IP-97, 22 str.
- Pravilnik o določitvi vodnih teles podzemnih voda (Ur. l. RS, št. 63/05)
- Pravilnik o imisijskem monitoringu podzemne vode (Ur. l. RS, št. 42/02)
- Pravilnik o metodologiji za določanje vodnih teles podzemnih voda (Ur. l. RS, št. 64/03)
- Pravilnik o obratovalnem monitoringu onesnaževanja podzemne vode (Ur. l. RS, št. 49/06)
- Pravilnik o pitni vodi (Ur. l. 19/04)
- RANK, J., NIELSEN, M. H. 1993. A modified *Allium* test in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. *Heriditas*, 118: str. 49 – 53
- RANK, J., NIELSEN, M. H. 1994. Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. *Mutation research*, 312: str. 17 – 24
- RANK, J., NIELSEN, M. H. 1997. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aerration assay on N-mehyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide and ethyl methanesulfonate. *Mutation Research*, 390: str. 121 – 127
- SAVKOVIĆ, N. 1990. Mikronukleus test. V: Genotoksični agensi. Efekti, principi i metodologija detekcije. Zimonjić, D. B., Savković, N.m Anđelković, M. Beograd, Naučna knjiga: str. 306 – 321
- SINGH, R. J. 2003. Plant cytogenetic. 2. izdaja. Boca raton, CRC Press. 463 str.
- SINKOVIČ, T. 1992. Citološke analize somatskih kromosomov B-genoma navadne pršice (*Triticum aestivum* L.) z diferencialnim barvanjem z Giemso (N-banding). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo. 62 str.

- SMAKA-KINCL, V. 1993. Ocenitev kvalitete odpadnih, površinskih in podtalnih voda z *Allium* testom. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo. 154 str.
- SOFRADŽIJA, A., Hadžiselimović, R., Maslić, E. 1989. Genotoksičnost pesticida. Sarajevo, »Svetlost« OOUR zavod za zdčbenike i nastavna sredstva. 150 str.
- SQUILLANCE P. J., Pope, D. A., Price, C. V. 1995. Occurrence of the gasoline additive MTBE in shallow ground water in urban and agricultural areas. U. S. Geological Survey Fact Sheet, str.114-195
- The Drinking Water Directive (DWD), Council Directive 98/83/EC
- Uredba o standardih kakovosti podzemne vode (Ur. l. RS, št. 100/05)
- VERANIČ, P., Pšeničnik, M., Romih, R., Sterle, M. Kralj, M. 2000. Osnove celične biologije. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije. 115 str.ž
- VIDAKOVIĆ, Ž., Papeš, D., Tomić, M. 1993. Toxicity of waste drilling fluids in modified *Allium* test. Water, Air and Spoil Pollution, 69. Str. 413 – 423
- WHO. 1985a. Environmental Health Criteria 46. Guidelines for the study of genetic effects in human populations. Geneva, World Health Organization. 126 str.
- WHO. 1985b. Environmental Health Criteria 51. Guide to short-term tests for detecting mutagenic and carcinogenic chemicals. Geneva, World Health Organisation: 208 str.
- WINNIKE-MCMILLAN S. K., Zhang, Q., Davis, L. C., Erickson, L. E., Schnoor, J. L. 2003. Phytoremediation of methyl tertiary-butyl ether. V: Phytoremediation: Transformation and control of Contaminants. Ed. Steven C. McMutcheon & Jerald L. Schnoor, John Wiley & Sons Inc., str. 805-802
- http://www.ukpia.com/industry_issues/environment_air_quality_health_safety/methyl_tertia, 11. 12. 2006
- <http://www.llnl.gov/str/Happel.html>, 10. 12. 2007
- <http://sl.wikipedia.org/wiki/Mitoza>, 10. 3. 2007
- <http://sl.wikipedia.org/wiki/Mitoza>, 4. 3. 2008
- http://chemical-quantum-images.blogspot.com/2007_02_01_archive.html, 10.12.2007
- <http://sl.wikipedia.org/wiki/Lipidotopnost>, 2. 1. 2008

10 PRILOGE