

LUK I VODA
ONION AND WATER
Ana Azinović 4.r, Lara Krkanić 4.r, Petra Zovko 4.r
Mirjana Krpan, prof.
Ženska opća gimnazija Družbe sestara milosrdnica s pravom javnosti, Zagreb

Sažetak rada

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi razlike u kvaliteti vode s različitih postaja i njihov utjecaj na promjene u mitozu te utjecaj na broj i intenzitet rasta korjenčića *Allium cepa* L. Određivali smo pH vode, količinu otopljenog kisika, nitrate, nitrite, amonijeve i fosfatne ione. Istraživanjem smo dokazali našu pretpostavku da postoje razlike u kvaliteti vode u fizikalnim i kemijskim parametrima između vodovodne vode, vode iz potoka Jelenovac, jezera Jarun i Bundek te rijeke Save. Za svaki uzorak vode korišteno je 5 lukovica postavljenih u ispitivanu vodu u predjelu korjenčića. Nakon 14 dana na lukovicama su izbrojeni i izmjereni korjenčići. Mikroskopskim promatranjem vršnih dijelova korjenčića određene su faze mitoze te je izračunat mitotički indeks. Prebrojane su i kromosomske anomalije. Korjenčići luka su bili slabijeg rasta u vodi slabije kakvoće. Onečišćena voda je uzrokovala smanjenu mitotsku aktivnost i povećala pojavu kromosomskih aberacija u stanicama luka. U istraživanju je uočen usporen rast korjenčića i najmanji broj korjenčića u vodi iz rijeke Save. Prema izmjerenim fizikalno-kemijskim parametrima voda iz rijeke Save je najviše onečišćena, mitotski indeks je bio najmanji, a broj aberacija najveći.

Summary

The aim of this project was to determine the differences in water quality from different stations and their influence on changes in mitosis and on the number and growth intensity of *Allium cepa* L. roots. We determined the pH of water, dissolved oxygen, nitrate, nitrite, ammonia and phosphate ions. In this project, we have proved our assumption that there are differences in water quality in physical and chemical parameters between tap water, water from Jelenovac stream, lakes Jarun and Bundek and the Sava River. For each sample of water, five bulbs were placed in the examined water with their basal parts. After 14 days the roots were counted and measured. By microscopic observation of the root tips sections were determined mitosis phases and we calculated the mitotic index. Chromosomal abnormalities were also evaluated. Root lengths were smaller in water having lower quality. The contaminated water caused decreased mitotic activity and increased the occurrence of chromosomal aberrations in the root cells. The project has shown slow growth of root tips and the smallest number of roots in the water of the Sava River. According to the measured physico-chemical parameters, the water from the Sava River was the most polluted, the mitotic index was the smallest and the number of aberrations was the greatest.

Istraživačka pitanja i hipoteze

Voda dominira površinskim dijelom planeta Zemlje. Ona je najzastupljeniji spoj u građi svih živih bića pa se s pravom može tvrditi da je voda nužna za život. Zbog goleme potrošnje i sve većih onečišćenja, čiste vode sve je manje te je zato neki već nazivaju plavim zlatom.¹ Učinci onečišćenja voda su dalekosežni i utječu ne samo na okoliš nego i na ljude, životinje i biljke. Voda se smatra zagađenom kada su otkriveni uzročnici zbog kojih je došlo do kontaminacije. Kvaliteta voda je vrlo promjenjiva jer ovisi o širokom rasponu prirodnih i ljudskih utjecaja.² Za procjenu kvalitete površinskih voda, osim kemijskih metoda, koriste se i biološke metode. Kemijske analize vode mogu nam pokazati sastav i koncentraciju kemijskih

opasnih tvari, ali ne i učinke na žive organizme. Postoje brojne metode za određivanje toksičnih učinaka vode u kojima se mogu koristiti različiti testni organizmi. Često su testovi na živim organizmima vrlo složeni. Određene iznimke su testovi na višim biljkama, koji su relativno jednostavni i jeftini jer se najčešće koriste sjemenke, a uzgoj i održavanje nisu potrebni.³

Toksičnost (grč. *toxicon* = otrov) označava bilo kakav štetan utjecaj na žive organizme ili okoliš. Citotoksičnost obuhvaća sve negativne promjene vezane uz rast, diferencijaciju ili smrt stanica. Genotoksičnost se odnosi na promjenu na razini nasljedne tvari, a genotoksične tvari oštećuju molekulu DNA i/ili kromosome.⁴ Sam biotest ne može odgovoriti na pitanje koji je od mnogih zagađivala odgovoran za promjenu biološke aktivnosti odabranog eksperimentalnog organizma.

Jedan od najstarijih i najčešće upotrebljivanih biljnih testova za proučavanje djelovanja različitih kemijskih spojeva na genom viših biljaka je *Allium*-test, kojeg je 1938. godine uveo Levan, upotrijebivši korjenčiće zdravih lukovica običnog luka (*Allium cepa* L.). *Allium*-test pokazao se pogodan za utvrđivanje inhibicije rasta korjenčića, kromosomskih aberacija kao i za ispitivanje raznih tvari iz okoliša na proces mitoze.⁵ Kromosomske aberacije su promjene kromosoma koje se javljaju zbog loma kromosoma, grešaka prilikom razdvajanja kromosoma u pojedinim fazama diobe ili zbog grešaka tijekom krosingovera.⁶ Kromosomske aberacije dijelimo na delecije, duplikacije, inverzije i translokacije. Te se promjene mogu pratiti pomoću mikroskopa koji daje uvid u izgled kromosoma u točno određenim fazama.

Obični luk je višegodišnja jednosupnica iz porodice Liliaceae, ljljani. U jezgri somatskih stanica se nalazi 16 kromosoma. Stanice su relativno velike, stoga je luk pogodan materijal za citogenetička istraživanja kao i demonstraciju mikroskopiranja u nastavnim aktivnostima.

Cilj našeg istraživanja bio je utvrditi razlike u kvaliteti vodovodne vode, vode iz potoka Jelenovac, jezera Jarun i Bundeke te iz rijeke Save i njihov potencijalni utjecaj na mitozu, broj i intenzitet rasta korjenčića *Allium cepa* L. U cilju ispitivanja kvalitete vode proveli smo fizikalna i kemijska GLOBE mjerenja vode.

Istraživanjem smo željeli odgovoriti na slijedeća istraživačka pitanja: Postoji li razlika u fizikalnim i kemijskim parametrima vode s navedenih mjernih postaja? Postoji li razlika u intenzitetu rasta i broju korjenčića luka? Kakav će biti utjecaj vode s različitih mjernih postaja na mitotsku aktivnost i pojavu kromosomskih anomalija u stanicama korjenčića luka?

Naša je pretpostavka da ćemo dokazati razlike u kvaliteti vode. Korjenčići luka će biti slabijeg rasta ili će rast izostati ako je voda slabije kakvoće. Onečišćena voda će uzrokovati smanjenu mitotsku aktivnost i povećati pojavu kromosomskih aberacija u stanicama luka. Pretpostavljamo da će najviše biti onečišćena voda iz rijeke Save, zatim voda iz jezera Jarun i Bundeke, a da onečišćenja neće biti u vodovodnoj vodi i vodi iz potoka Jelenovac.

Metode istraživanja

Određena je geografska dužina i širina postaja na kojima su uzeti uzorci vode. Za određivanje pH, količine otopljenog kisika, nitrita i nitrata korišteni su GLOBE protokoli za analizu vode. Kemijska analiza vode rađena je pomoću kompleta za analizu vode (analiza 2, Educa). Analizirani su i amonijak i fosfati pomoću kitova. Analizu vode smo proveli u razdoblju od 1. rujna do 1. listopada 2018., a mjerili smo jednom tjedno.

Pokus je postavljen u dva ponavljanja. Za svaki uzorak vode koji je ispitivan korišteno je 5 lukovica težine 4-5 grama i ne tretiranih sredstvima protiv klijanja. Lukovice su postavljene u plastične posudice volumena 20 do 50 mL s uzorcima vode. Temperatura vode koja se želi ispitati na toksičnost mora biti približno jednaka sobnoj temperaturi prije postavljanja

eksperimenta pa je ispitivana voda ostavljena nekoliko sati na sobnoj temperaturi. Posudice su bile obilježene s markerom. Skalpelom je skinut površinski sloj u predjelu korjenčića. Nakon četrnaest dana na lukovicama su izbrojeni i izmjereni korjenčići. Izračunata je srednja vrijednost broja korjenčića.

Pomoću ravnala i milimetarskog papira izmjerena je duljina korjenčića i izračunata je prosječna vrijednost duljine korjenčića.

Korjenčići luka se pripremaju za mikroskopiranje tako da se ostave stajati u destiliranoj vodi oko jednu minutu, a nakon toga u staklenu posudu s fiksativom pripremljenim od ledene octene kiseline i etanola u omjeru 1:3. Nakon 24 sata korjenčići se iz fiksativa prebacuju u acetokarmin gdje se zagrijavaju 2-3 minute do vrenja te se ostave ohladiti. Obojeni vršni dio odvoji se žiletom od korijena, postave na predmetno stakalce i zgnječe tupim krajem laboratorijske iglice te se na tako macerirano tkivo stavi pokrovnica i tehnikom gnječenja palcem se dobiju stanice u jednom sloju. Promatranim mikroskopskim preparatima tkiva korijena luka određene su faze mitoze te je izračunat mitotički indeks koji govori koliki je udio stanica promatranog luka u mitozu u odnosu na ukupan broj stanica promatranog uzorka. Prebrojane su i aberacije. One su uočene u u korjenčićima luka koji su rasli u uzorku vode iz rijeke Save.

Mitotički indeks izračunat je prema slijedećem izrazu u postotcima

MI = broj stanica u mitozu / ukupan broj stanica

Prikaz i analiza podataka

Na mjernim postajama Jarun, Bundek i Sava smanjene su koncentracije otopljenog kisika, a povećane koncentracije nitratnih, nitritnih, amonijevih te fosfatnih iona (Tablica 1).

Tablica 1. Fizikalno-kemijski parametri uzoraka vode
Table 1. Physico-chemical parameters of water samples

	pH	O ₂ (mg/L)	N-NO ₃ ⁻ (mg/L)	N-NO ₂ ⁻ (mg/L)	NH ₄ ⁺ (mg/L)	PO ₄ ³⁻ (mg/L)
Jelenovac	7	5	2	0	0,2	0,5
Jarun	8	3	6	0,2	0,5	0,9
Bundek	8	3	5	0,3	0,2	1,2
Sava	6	2	8	0,5	0,5	3
Vodovodna voda	7	5	0	0	0	0,1

Rezultati mjerenja prikazani u tablici 2 pokazuju da je rast korjenčića bio najvećeg intenziteta u vodi iz potoka Jelenovac, a najmanji u uzorku vode iz rijeke Save.

Tablica 2. Prosječna duljina korjenčića *Allium cepa* L. u uzorcima vode nakon 14 dana
Table 2. The average length of *Allium cepa* L. roots in water samples after 14 days

	Dužina korjenčića u mm
Jelenovac	18,4
Jarun	17,2
Bundek	15,4
Sava	11,8
Vodovodna voda	17,6

Prema podacima navedenim u tablici 3 najveći broj korjenčića zabilježen je u uzorku vodovodne vode i vode iz potoka Jelenovac.

Tablica 3. Prosječan broj korjenčića *Allium cepa* L. u uzorcima vode nakon 14 dana
Table 3. The average number of *Allium cepa* L. roots in water samples after 14 days

	Broj korjenčića
Jelenovac	22
Jarun	19
Bundek	20
Sava	14
Vodovodna voda	24

U tablici 4 je vidljivo da je broj korjenčića u uzorku vode iz rijeke Save znatno manji u odnosu na ostale postaje. Sukladno tome, manji je i broj stanica u mitozu te mitotski indeks, a najveći broj aberacija. Uočeni su lutajući kromosomi, mikronukleus, sljepljenost kromosoma i anafazni most.

Tablica 4. Prosječne vrijednosti mitotskog indeksa u korjenčićima luka u uzorcima vode
Table 4. The average values of mitotic index in root tips from water samples

	Jelenovac	Jarun	Bundek	Sava	Vodovodna voda
Ukupan broj stanica	110	115	100	80	120
Broj stanica u mitozu	65	60	55	30	65
Mitotski indeks	59%	52%	55%	38%	54%
Broj aberacija	0	1	3	6	0

U tablici 5 je vidljivo da se udio stanica u mitozu smanjuje s povećanjem onečišćenja vode. Najmanji udio stanica u mitozu uočen je u vodi rijeke Save što je i bilo za očekivati jer je ona prema ovom istraživanju najviše onečišćena. Uočeno je da je najviše stanica u profazi u svim uzorcima. Zbroj stanica nije uvijek 100% budući da nismo mogli odrediti koja je faza u pitanju.

Tablica 5. Udio pojedine faze u mitozu korjenčića kod *Allium cepa* L u uzorcima vode

Table 5. The proportion of each mitotic phase of *Allium cepa* L roots in water samples

	Jelenovac	Jarun	Bundek	Sava	Vodovodna voda
Ukupan broj stanica u mitozu	65	60	55	30	60
Profaza %	96,7	90,7	92,4	79,6	95,6
Metafaza%	1,5	1,8	0,0	3,00	3
Anafaza %	1,6	0,0	0,0	0	1,4
Telofaza %	2,5	0,0	0,0	4,2	1,00

Rasprava i zaključci

Cilj ovog istraživanja bio je uz pomoć *Allium*-testa i fizikalnih i kemijskih GLOBE mjerenja utvrditi utjecaj onečišćenja vode na broj i intenzitet rasta korjenčića te na promjene u mitozu. U istraživanju je uočen usporen rast korjenčića i najmanji broj korjenčića u vodi iz rijeke Save. Rijeka Sava je najvećim dijelom u III.kategoriji onečišćenja, a nizvodno od Zagreba i Siska čak i u IV. kategoriji onečišćenja⁹. Razlog tome su otpadne vode iz industrije, kanalizacijski ispusti te ilegalno odlaganje otpada uz i u rijeku. Prema izmjeranim fizikalno-kemijskim parametrima u našem projektu, ona je najviše onečišćena što potvrđuju izmjerene koncentracije nitratnih, nitritnih, amonijevih i fosfatnih iona te pH vrijednosti i količine otopljenog kisika. pH-vrijednost je broj koji služi kao mjera kiselosti vodenih otopina. Određuje se prema koncentraciji iona vodika. Pri 25 °C vrijednost pH-vrijednost neke otopine može biti između 0 i 14. Topljivost plinova u tekućinama u pravilu opada s porastom temperature. To općenito pravilo vrijedi i za topljivost kisika u vodi: što je viša temperatura, topljivost kisika bit će manja. Količina otopljenog kisika ispod 3 mg/L opasna je za većinu vodenih organizama.¹⁰ Problem visoke koncentracije nitrata u vodi najčešće se pojavljuje u izrazito poljoprivrednim krajevima. Posljedica može biti preopterećenje vodenih ekosustava. Amonijak je jedan od najvažnijih indikatora zagađenja vodenih ekosustava. Količina amonijaka u vodi je u normalnim uvjetima vrlo mala. Za praćenje promjena u mitozu korišten je mitotski indeks i on je bio najmanji u vodi iz rijeke Save (37.5%), uz najveći broj aberacija (6) tipa lutajući kromosomi, mikronukleus, sljepljenost kromosoma i anafazni most. Takve kromosomske aberacije uočila je i Roša⁷ u svom istraživanju utjecaja fosfogipsa na *Allium cepa* L. Udio pojedinih faza mitoze također se razlikuje. Uočeno je da je najviše stanica u profazi. Stanica se za vrijeme staničnog ciklusa najduže i nalazi u interfazi i profazi.⁸ Istraživanjem smo potvrdili našu hipotezu da postoje razlike u kvaliteti vode s obzirom na fizikalne i kemijske parametre. Korjenčići luka su bili slabijeg rasta u vodi slabije kakvoće. Onečišćena voda je uzrokovala smanjenu mitotsku aktivnost i povećala pojavu kromosomskih aberacija u stanicama luka. Trebalo bi provesti dodatna ispitivanja da se utvrdi postoje li genotoksični spojevi u vodi.

Literaturni izvori

1. World Health Organization (WHO) (2004): *Guidelines for Drinking Water Quality, third ed.* WHO, Geneva.
2. Byatt A., Fothergill A., Holmes M. (2002): Vodeni svijet, U Byatt A. (ur.), Plavi planet: Priroda zemljinih mora i oceana. Izvori, Zagreb, str.16-21.
3. Szczerbińska, N., Gałczyńska, M. (2015): Biological methods used to assess surface water quality. *Archives of Polish Fisheries* 24: 185-196.
4. Russel P. J. (2002): Chromosomal mutation. Cummings B. (Ed.), *Genetics*. Pearson Education Inc., San Francisco, 595-621.
5. Fiskesjö G. (1985): The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas* 102: 99-112.
6. Grant W.F. (1982): Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the US environmental protection agency gene-tox program. *Mutation Research* 99: 273-291.
7. Roša J.(1998):Utjecaj fosfogipsa iz industrijskog odlagalištana hrast lužnjak, *Šumarski list*, 11-12:491-506.

8. Krsnik Rasol M., Krajačić M., Lukša Ž.,(2015):Organizacija nasljedne tvari stanični ciklus, Život 1, Školska knjiga d.d., Zagreb, str.120 – 122.

9. <http://www.geografija.hr/hrvatska/zagreb-grad-na-savi/>

10. <http://globe.pomsk.hr/prirucnik/voda.PDF>