

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

ZAKLJUČNA NALOGA

ALLIUM TEST NA IZCEDNIH VODAH
ODLAGALIŠČA HIDROMETALURŠKE JALOVINE
BORŠT

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Zaključna naloga

***Allium* test na izcednih vodah odlagališča hidrometalurške jalovine Boršt**

(*Allium* Test of the Leachate from the Borst Mill Tailing Dumping Ground)

Ime in priimek: Eva Žun

Študijski program: Biodiverziteteta

Mentor: doc. dr. Helena Poličnik

Somentor: asist. Felicita Urzi

Koper, avgust 2014

Ključna dokumentacijska informacija

Ime in PRIIMEK: Eva ŽUN

Naslov zaključne naloge: *Allium* test na izcednih vodah odlagališča hidrometalurške jalovine Boršt

Kraj: Fužine

Leto: 2014

Število listov:	55	Število slik:	24	Število preglednic:	9
Število prilog:	5	Št. strani prilog:	5		
Število referenc:	22				

Mentor: doc. dr. Helena Poličnik

Somentor: asist. Felicita Urzi

Ključne besede: uran, *Allium* test, kromosomske aberacije, *Allium cepa* L, mitotski indeks, aberacijski indeks

Izvleček: Rudnik Žirovski vrh se nahaja v Poljanski dolini v vasi Todraž ob potokih Todraščica in Brebovščica. Naloga Rudnika Žirovski vrh je sedaj le še vzdrževanje saniranih objektov in nadzor nad vplivi na okolje. Z namenom spremljanja vplivov urana na okolje smo uporabili metodo bioindikacije, tj. spremljanje sprememb v živem organizmu. Kot bioindikatorski organizem smo uporabili šalotko (*Allium cepa* L.) in izvedli biološki test, in sicer *Allium* test. Za analizo mitotskega indeksa in kromosomskih aberacij čebulic šalotke smo uporabili obliko standardnega *Allium* testa po Fiskesjö (1985). *Allium* test poteka v dveh fazah. Prva faza temelji na opazovanju dolžine korenin čebulic šalotke in določanju mitotskega indeksa, kar nam poda rezultate toksičnosti. Druga faza pa podaja raven genotoksičnosti, kjer se v celicah koreninic šalotke ugotavlja poškodbe kromosomov. Za ugotavljanje vpliva genotoksičnosti smo določili aberacijski indeks. Šalotko smo izpostavili vzorcem izcednih vod iz šestih lokacij iz odlagališča hidrometalurške jalovine Boršt. Računali smo dolžinski prirast koreninic, mitotski indeks in aberacijski indeks. Opazovali smo naslednje kromosomske aberacije: mostičke, fragmente, zaostale kromosome, izgubljene kromosome, C-mitotze, zlepljenja. Z analizo metafaz in anafaz smo ugotovili, da so v vzorcih z višjimi koncentracijami urana pogoste naslednje aberacije: zlepljenja, C-mitotze ter izgubljeni kromosomi. Ugotovili smo, da na kromosomske aberacije vpliva že zelo majhna koncentracija urana v izcednih vodah, nato se vpliv z večanjem koncentracije bistveno ne spreminja več.

Key words documentation

Name and SURNAME: Eva ŽUN

Title of the final project paper: *Allium* Test of the Leachate from the Borst Mill Tailing Dumping Ground

Place: Fužine

Year: 2014

Number of pages: 55 Number of figures: 24 Number of tables: 9

Number of appendix: 5 Number of appendix page: 5

Number of references: 22

Mentor: Assist.Prof. Helena Poličnik, PhD

Co-mentor: Assist. Felicita Urzi

Keywords: uranium, *Allium* test, chromosomal aberration, *Allium cepa* L., mitotic index, aberratic index

Abstract: The Žirovski vrh Mine, is located in the Poljane valley. Specifically, by the Todraščica and Brebovščica streams in a village called Todraž. Nowadays, the Žirovski vrh Mine maintains the restored objects and controls the possible influence on the environment. The changes in a bioindicator organisms caused by the exposure to uranium were monitored and measured. A biological test, namely the *Allium* test was carried out using a shallot (*Allium cepa* L.) as a biological indicators. For the analysis of the mitotic index and chromosomal aberrations of the shallot bulb the modified form of the standard *Allium* test described in Fiskesjö (1985) was used. The *Allium* test was conducted in two phases. The first phase based on the observation of the shallot bulb root length and the determination of the mitotic index, which provides the toxicity results. Within the second phase, the chromosomal aberrations in the shallot root cells was observed and the level of mutagenicity was determined. In order to determine the effects of mutagenicity an aberration index was estimated. The shallot was exposed to leachate samples taken from six different locations at the Borst mill tailing dumping ground. The lengthening of the roots, mitotic index and aberration index were measured and calculated. The following chromosomal aberrations were observed: chromosome bridges and fragments, vagrant chromosomes, c-mitoses, and stickiness. With the metaphases and anaphases analyse and we connection between higher concentration of uranium and the following aberrations are common: stickiness, c-mitoses, and vagrant chromosomes. It was ascertained that even a very small concentration of uranium in leachate affects the chromosomal aberrations but the mutagenic effect does not significantly increase with the higher concentration.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Heleni Poličnik ter somentorici Feliciti Urzi za pomoč pri pisanju zaključne naloge.

Zahvaljujem se tudi direktorici RŽV d.o.o. Hiacinti Klemenčič in vsem zaposlenim v RŽV d.o.o. za vso podporo in pomoč.

Zahvala gre tudi družini za nesebično podporo in potrpežljivost skozi celotno mojo izobraževalno potjo in pisanju tega dela.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
1.1	Vpliv Rudnika Žirovski vrh na okolje	2
1.1.1	Zračna prenosna pot.....	2
1.1.2	Tekoče emisije RŽV.....	2
1.1.3	Podtalnica	2
1.2	Uran in potomci njegove razpadne vrste	3
1.3	Sevanje radioaktivnih snovi	4
1.4	Biomonitoring in citogenetska bioindikacija	4
1.5	<i>Allium</i> test	6
1.6	Celični cikel	11
1.6.1	Interfaza	11
1.6.2	Profaza	11
1.6.3	Metafaza	11
1.6.4	Anafaza.....	12
1.6.5	Telofaza	12
1.7	Kromosomi in kromosomske aberacije	12
1.7.1	Kromosomske aberacije	12
1.8	Namen in cilji.....	13
1.8.1	Cilji.....	13
1.9	Hipoteze	13
2	METODE DELA.....	14
2.1	Opis območja	15
2.2	Izbira in nastavitev čebulic v vzorce izcednih vod	16
2.3	Merjenje prirasta korenin.....	19
2.4	Fiksiranje ter priprava mečkancev	19
2.5	Analiza vzorcev	20
2.5.1	Mitotski indeks	20
2.5.2	Aberacijski indeks	21
3	REZULTATI Z DISKUSIJO	22
3.1	pH vrednosti.....	22
3.2	Dolžinski prirast korenin.....	23

3.3	Mitotski indeks.....	25
3.4	Aberacijski indeks.....	27
3.5	Kromosomske aberacije.....	30
3.5.1	Mostički.....	34
3.5.2	Fragmenti.....	35
3.5.3	Zaostali kromosomi	35
3.5.4	Izgubljeni kromosomi.....	36
3.5.5	C-mitoza	36
3.5.6	Zlepljenja	37
4	ZAKLJUČEK.....	38
5	LITERATURA.....	39

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Onesnažila, ki vplivajo na številčnost in vrsto kromosomskih aberacij in opis vrst aberacij ki so značilne za določeno onesnažilo.....	7
Preglednica 2: Rezultati meritev pH vrednosti v vzorcih.....	22
Preglednica 3: Izračunana povprečja rasti koreninic šalotke.....	23
Preglednica 4: Izračunane povprečne vrednosti mitotskih indeksov za posamezen vzorec po 96 urah.....	25
Preglednica 5: Izračunane povprečne vrednosti mitotskih indeksov za posamezen vzorec po 168 urah.....	25
Preglednica 6: Izračunane povprečne vrednosti aberacijskih indeksov za posamezen vzorec po 96 urah.....	27
Preglednica 7: Izračunane povprečne vrednosti aberacijskih indeksov za posamezen vzorec po 168 urah.....	27
Preglednica 8: Rezultati dolžinskih prirastov koreninic, mitotskih in aberacijskih indeksov ter deleži kromosomskih aberacij čebulic, ki so bile izpostavljene 96 ur.....	28
Preglednica 9: Rezultati dolžinskih prirastov koreninic, mitotskih in aberacijskih indeksov ter deleži kromosomskih aberacij čebulic, ki so bile izpostavljene 168 ur.....	28

KAZALO SLIK

Slika 1: Odlagališče hidrometalurške jalovine Boršt (arhiv RŽV).....	15
Slika 2: Vzorčno mesto BPG (Avtor: Eva Žun).....	16
Slika 3: Vzorčno mesto SDB (Avtor: Eva Žun).....	16
Slika 4: Vzorčno mesto SDIJ (Avtor: Eva Žun).....	16
Slika 5: Vzorčno mesto TUNEL (Avtor: Eva Žun).....	17
Slika 6: Vzorčno mesto TODRAŽ (Avtor: Eva Žun).....	17
Slika 7: Vzorčno mesto ZDZ (Avtor: Eva Žun).....	17
Slika 8: Izpostavljene čebulice (Avtor: Felicita Urzi).....	18
Slika 9: Povprečni dolžinski prirastki koreninic v vzorcih izcednih voda ter pitni vodi (K).	24
Slika 10: Primerjava mitotskega indeksa med dnevom 4 in dnevom 7.....	26
Slika 11: Primerjava aberacijskega indeksa med dnevom 4 in dnevom 7.....	29
Slika 12: Delež kromosomskih aberacij, ki smo jih zabeležili v vzorcu BPG.	30
Slika 13: Delež kromosomskih aberacij, ki smo jih zabeležili v vzorcu SDB.	31
Slika 14: Delež kromosomskih aberacij, ki smo jih zabeležili v vzorcu SDIJ.....	31
Slika 15: Delež kromosomskih aberacij, ki smo jih zabeležili v vzorcu TODRAŽ.....	32
Slika 16: Delež kromosomskih aberacij, ki smo jih zabeležili v vzorcu TUNEL.....	32
Slika 17: Delež kromosomskih aberacij, ki smo jih zabeležili v vzorcu ZDZ.	33
Slika 18: Delež vseh kromosomskih aberacij, ki smo jih zabeležili v posameznih vzorcih.	33
Slika 19: Mostiček v anafazi, vzorec SDB, 1000x povečava (Avtor: Eva Žun).	34
Slika 20: Fragment v anafazi, vzorec TUNEL, 400x povečava (Avtor: Eva Žun).	35
Slika 21: Zaostali kromosomi v anafazi, 400x povečava (Avtor: Eva Žun).	35
Slika 22: Izgubljeni kromosom v anafazi, 400x povečava (Avtor: Eva Žun).	36
Slika 23: C–mitoza, 400x povečava (Avtor: Eva Žun).	36
Slika 24: Zlepljena metafaza, 400x povečava (Avtor: Eva Žun).	37

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Dolžine koreninic šalotke izmerjene v vsakem vzorcu po 96 urah

PRILOGA B: Rezultati prešteti celic po 96 urah (4 dan), ki so bile preštete za izračun mitotskega indeksa

PRILOGA C: Rezultati prešteti celic po 168 urah (7 dan), ki so bile preštete za izračun mitotskega indeksa

PRILOGA D: Rezultati pregledanih metafaz in anafaz ter analiza kromosomskih aberacij po 96 urah

PRILOGA E: Rezultati pregledanih metafaz in anafaz ter analiza kromosomskih aberacij po 168 urah

1 UVOD

Rudnik Žirovski vrh, nekoč Rudnik urana Žirovski vrh (v nadaljevanju RŽV), se nahaja v Poljanski dolini v vasi Todraž ob potokih Todraščica in Brebovščica. Po koncu obratovanja rudnika so leta 1992 začeli s sanacijo rudniških objektov in uporabljenih površin z namenom ponovne vzpostavitve območja v prvotno stanje. Sedanja naloga Rudnika Žirovski vrh je vzdrževanje saniranih objektov in nadzor nad vplivi na okolje.

Med obratovanjem Rudnika urana Žirovski vrh so z odkopavanjem uranove rude in proizvodnjo uranovega koncentrata – rumene pogače pridobili 452 ton uranovega oksida v obliki rumene pogače iz izkopanih 610.000 ton rude (Petkovšek in sod., 2008).

Radioaktivnost in onesnaženost s toksičnimi kovinami se v okolje širi oziroma se je širila preko izcednih ter meteornih vod iz odlagališča rudarske jalovine Jazbec in odlagališča hidrometalurške jalovine Boršt ter preko iztoka jamske vode. Po zračni poti pa se je širila iz ventilatorskih postaj in z odnašanjem prašnih delcev zaradi urejevalnih in vzdrževalnih del. Jamske in izcedne vode rudarske jalovine Jazbec in odlagališča hidrometalurške jalovine Boršt imata praviloma povečane vrednosti urana ter potomcev njegove razpadne vrste (Petkovšek in sod., 2008).

Ker se radioaktivnost in onesnaženost z uranom širi tudi preko iztoka jamskih vod, smo za raziskavo uporabili vzorce izcednih vod odlagališča hidrometalurške jalovine Boršt.

Z namenom ugotavljanja vplivov urana na okolje smo merili ter spremljali spremembe v živem organizmu – bioindikatorju. Kot bioindikatorski organizem smo uporabili šalotko (*Allium cepa* L.), na kateri smo izvedli biološki test, in sicer standardni *Allium* test po Fiskesjö (1985).

1.1 Vpliv Rudnika Žirovski vrh na okolje

Javno podjetje za zapiranje rudnika urana, d.o.o., nadzira standardne prenosne poti širjenja radioaktivnosti iz območja RŽV na okolje (Rojc, 2007):

- Zračna prenosna pot: emisije obeh odlagališč in vpliv na njuno neposredno okolje, občasno aerosoli na odlagališčih Jazbec in Boršt.
- Vodna prenosna pot: iztok jamske vode, izcedne in meteorne vode iz odlagališč Jazbec in Boršt, kontrolno pa še iz sanirane površine nekdanjega začasnega odlagališča P-9.
- Zunanje (gama) sevanje: ob odlagališčih Jazbec in Boršt.

1.1.1 Zračna prenosna pot

Rudniški objekti k izpostavljenosti sevanju največ prispevajo po zračni prenosni poti, in sicer z ^{222}Rn in njegovimi kratkoživimi potomci, medtem ko je prispevek dolgoživih potomcev urana v aerosolih zelo majhen. Pomembni viri emisij radona v RŽV so bili odlagališče rudniške jalovine Jazbec, propust pod odlagališčem Jazbec v času izvajanja del in odlagališče hidrometalurške jalovine Boršt. Na prispevek radona iz rudniških virov v okolje pomembno vplivajo meteorološke razmere, posebno gibanje zraka (Rojc, 2010).

1.1.2 Tekoče emisije RŽV

Tekoči izpusti iz rudniških objektov so vezani na iztok jamske vode in iztok izcednih voda odlagališča Jazbec, ki se izlivata v potok Brebovščica ter na tri iztoke izcednih voda odlagališča Boršt, ki se izlivajo v potok Todraščico. V uporabi je 8 vzorčevalno-merilnih mest. Vzorčevalno-merilna mesta so namenjena meritvi pretoka izcednih vod odlagališč, meteornih vod s površine odlagališča in zalednih tekočih vod.

Do končne ureditve odlagališča so izcedne vode iz merilnega mesta SDIJ (skupna drenaža izpod jalovine) na spodnjem robu odlagališča odtekale v merilno mesto vzhodni Boršt potok in od tu dalje v potok Brebovščico (Rojc, 2010).

1.1.3 Podtalnica

Monitoring podtalnice se izvaja na obeh odlagališčih, v njuni neposredni okolici in v dolini potokov Todraščica in Brebovščica. Monitoring izvajajo sezonsko. Monitoring vključuje meritve višine podtalnice, njene kemične sestave in radioaktivnosti. Izmerjene vrednosti triuranov oktaoksida (U_3O_8) in kemičnih parametrov so v zadnjih letih enake izmerjenimi vrednostmi preteklih let (Rojc, 2010).

Maksimalne vrednosti U_3O_8 so v notranjosti (telesu) odlagališča Boršt, v notranjosti (telesu) odlagališča Jazbec in v dolini potoka Brebovščica v Todražu.

Maksimalne koncentracije v notranjosti (telesu) obeh odlagališč so po vgradnji prekrivke nekoliko večje kot so bile pred tem, saj je s tem zmanjšan dotok čiste meteorne in tudi zaledne vode v odlagališči, zaradi česar je zmanjšana možnost redčenja koncentracij posameznih parametrov v podtalnici odlagališč. V odvzetih vzorcih se v sklopu monitoringa določajo različni kemijski parametri, in sicer: ^{238}U , kloridi, sulfati, itd. (Rojc, 2010).

1.2 Uran in potomci njegove razpadne vrste

Leta 1789 je Martin Heinrich Klaproth odkril uran. Uran je mehka kovina srebrno bele barve. Je naravni radioaktiven element in ga uvrščamo v družino aktinidov (Periodni sistem, 2014).

^{238}U kot začetnik uranove razpadne vrste je poleg sevalca tudi toksična kovina in ima dvojen genotoksičen vpliv zaradi njegovih radioaktivnih in kemičnih lastnosti (Morais Leme in Marin-Morales, 2009).

Uran je v naravi prisoten kot radioaktiven element, ki ga lahko v manjših količinah najdemo v kamninah in tleh, manj ga najdemo v vodah, v rastlinskih in živalskih tkivih ter v telesu človeka.

Naravni uran sestavljajo trije izotopi, in sicer uran ^{238}U (99,27 %), ^{235}U (0,72 %) in ^{234}U (0,0055 %). Razpadna vrsta ^{238}U vsebuje 14 različnih radionuklidov, ki sevajo α , β in γ žarke. Končna, stabilna oblika, je izotop ^{206}Pb . Vsi potomci so v trdni obliki, z izjemo radona ^{222}Rn , ki je radioaktiven plin. Od potomcev uranove razpadne vrste je pomemben ^{226}Ra , ki je predhodnik ^{222}Rn (plin), slednji pa razpade na 4 kratkožive potomce, ki imajo zelo kratek razpolovni čas, in sicer od 0,164 ms do 27 minut. Razpolovni čas ^{238}U je 4,5 milijarde let, razpolovni čas ^{222}Rn pa je samo 3,8 dni.

1.3 Sevanje radioaktivnih snovi

Radioaktivno sevanje nastane pri razpadu nestabilnih atomskih jeder ali po vrnitvi jeder iz vzbujenega stanja v osnovno stanje. Radioaktivno sevanje imenujemo tudi ionizirajoče sevanje zato, ker v snovi skozi katero prodira, povzroči ionizacijo (Stritar in Istenič, 1997).

Poznamo tri vrste radioaktivnega sevanja in sicer alfa (α), beta (β), in gama (γ). Sevalci *alfa* so radioaktivna jedra, ki pri razpadu oddajajo delce *alfa* – jedra helija-4. To sta dva protona in dva nevtrona (Stritar in Istenič, 1997).

Sevanje *alfa* ni zelo prodorno in ga ustavi že tanka plast snovi (npr. list papirja). Nevarno je le, če je vir sevanja *alfa* znotraj organizma. Sevalci *beta* so radioaktivna jedra, ki pri razpadu oddajajo delce beta (elektrone). En nevtron se spremeni v proton tako, da odda elektron. Sevanje *beta* ima v zraku doseg nekaj metrov. Ustavi ga nekaj milimetrov debela plast trdne snovi (Stritar in Istenič, 1997).

Sevalci *gama* so radioaktivna jedra, ki pri prehodu iz vzbujenega v osnovno stanje izsevajo kratkovalovno elektromagnetno valovanje – izsevajo foton. Sevanje *gama* je zelo prodorno, ustavi ga vsaj pet centimetrski plast svinca ali več deset centimetrov debela plast betona (RŽV, 2005).

Radioaktivno sevanje lahko pri prehodu skozi snov neposredno poškoduje dedne informacije v celičnem jedru (DNK). Učinki sevanja so lahko somatski (na obsevani osebi) in genetski (na potomcih obsevane osebe) (Stritar in Istenič, 1997).

1.4 Biomonitoring in citogenetska bioindikacija

Bioindikatorski organizmi so organizmi, ki jih uporabljamo za oceno stanja določenega ekosistema. Po navadi je to skupina organizmov, katerih številčnost in fiziološko stanje odraža spremembo okolja v katerem se nahajajo. Zaradi občutljivosti bioindikatorskih organizmov na spremembe v okolju se jih uporablja tudi kot indikatorje stopnje toksičnosti (Blasco in Pico, 2009).

Biomonitoring uporabljamo kot orodje za oceno izpostavljenosti onesnaževalom v ekosistemih. Podatki, ki jih pridobimo z biomonitoringom, odražajo celotno izpostavljenost določeni kemikaliji. Z zbiranjem bioloških vzorcev v določenem časovnem obdobju pridobimo podatke o spremembah in trendih izpostavljenosti (Bickham in sod., 2000).

Za uspešen biomonitoring je poleg kemijskih analiz vse pomembnejša biološka analiza toksičnosti in genotoksičnosti. Za natančnejšo interpretacijo rezultatov vplivov kemikalij na žive organizme se je začel razvoj bioloških testov in biomonitoringa. Z izbiro bioindikatorskega organizma in ustreznega testa lahko opazujemo vpliv onesnažil na organizme z vidika genotoksičnosti, citotoksičnosti in mutagenosti (Wolska in sod., 2007).

Za zgodnje odkrivanje posledic izpostavljenosti onesnaževalom na celični ravni se uporablja metoda citogenetske bioindikacije; z njo skušajo na osnovi ugotovljene stopnje poškodovanosti genetskega materiala določiti stopnjo ogroženosti zaradi prisotnosti citotoksičnih in/ali genotoksičnih snovi v okolju (Blasco in Pico, 2009; Wolska in sod., 2007).

Med najpomembnejše in najbolj proučene dejavnike okoljskega stresa, katerih prisotnost in intenziteto lahko ugotavljajo z metodo citogenetske bioindikacije, spadajo različni viri ionizirajočega sevanja. Izpostavljenost ionizirajočemu sevanju povzroča nastanek mutagenih in genotoksičnih učinkov (Blasco in Pico, 2009; Wolska in sod., 2007).

Genotoksičnost nakazuje na vpliv kemičnih in fizikalnih dejavnikov v procesu prenosa dednih lastnosti in je le eden od možnih škodljivih učinkov, ki povzročajo spremembo DNK, mutacije in poškodbe DNK. Genotoksičen vpliv ocenjujemo na podlagi mutacij genov, strukturnih sprememb kromosomov in številskih sprememb kromosomov (Kirkland in sod., 2005).

Z ugotavljanjem citotoksičnosti, ugotavljamo strupenost onesnažila za celice, kar se običajno odraža v zmanjšanju mitotskega indeksa in prirasta korenin. Mutagenost se odraža v spremembi gena ali skupine genov, spremembi strukture kromosoma ali števila kromosomov (Morais Leme in Marin-Morales, 2009).

Biološki testi so lažji za izvedbo, cenejši, mogoče je delo z večjim številom vzorcev hkrati, možna je ponovitev testa (Wolska in sod., 2007). Z biološkimi testi nam je omogočeno npr. izvajanje biomonitoringa v ekosistemih, hkrati pa lahko uporabimo kemijske analize ter teste, s katerimi lahko analiziramo vpliv nekega onesnažila na določen ekosistem. Med biološke teste spada tudi *Allium* test, s katerim se ugotavlja toksičnost in genotoksičnost v ekosistemih (Blasco in Pico, 2009).

1.5 *Allium* test

Pri izvedbi *Allium* testa se uporablja testno rastlino iz rodu *Allium* in sicer šalotko (*Allium cepa*), ki ima diploidno število kromosomov ($2n = 16$) in razvije več genetsko identičnih čebulic oziroma klonov, hkrati pa so kromosomi lepo vidni in primerni za opazovanje kromosomskih okvar (Firbas, 2011).

Allium test razkriva vpliv na rast in razvoj celic in organizmov. Z njim lahko zaznavamo prisotnost škodljivih snovi v koncentracijah, ki so nižje od mejnih sposobnosti analitskih metod. Z *Allium* testom ugotavljamo splošno toksičnost in raven genotoksičnosti v vodnih, kopenskih in zračnih ekosistemih, kjer dokazujemo potencialne genotoksične snovi. Test je kratkotrajen in nam pokaže vpliv ter medsebojno delovanje med testno rastlino in potencialnimi genotoksiki (Firbas, 2011).

Test poteka v dveh fazah. Prva faza temelji na opazovanju dolžine korenin čebulic šalotke, kar nam poda rezultate toksičnosti. Daljše so koreninice šalotke, manjša je toksičnost in obratno, krajše so koreninice šalotke večja je toksičnost. Druga faza pa podaja raven genotoksičnosti, kjer se v celicah koreninic šalotke ugotavlja aberacije kromosomov (Firbas, 2011)

Allium test je bil uporabljen, z namenom detekcije raznolikosti okoljskih onesnažil in v večini primerov se je test izkazal za uspešnega. Onesnažila, na katerih se lahko izvaja *Allium* test so kovine (npr. baker, živo srebro, kadmij, aluminij, mangan, cink), pesticidi, radioaktivni elementi (celzij, stroncij), industrijske odpadne vode, itd. (Morais Leme in Marin-Morales, 2009).

Na območju Černobilske nesreče so prvič uporabili *Allium* test z namenom, da bi ugotovili genotoksičnost in citotoksičnost zaradi radioaktivnosti v onesnaženi prsti. Za to so se odločili, ker je bilo predhodno z različnimi študijami dokazano, da radioaktivno sevanje povečuje pojavljanje kromosomskih aberacij v celicah, ter da vpliva radioaktivno sevanje tudi na rast in razvoj koreninic (Kovalchuk in sod., 1998).

Allium test je bil uporabljen za ugotavljanje raznolikosti okoljskih onesnažil. Morais Leme in Marin-Morales sta naredili pregled vseh dosedanjih objavljenih raziskav ter naredili razvrstitev vseh onesnažil v preglednico, s katere je jasno razvidno za katera onesnažila je *Allium* test dobra metoda za ugotavljanje genotoksičnosti, citotoksičnosti ter mutagenosti. Na podlagi dobljenih podatkov še predlagata, da se v nadaljnje kot merilo upošteva aberacijski indeks za ugotavljanje vpliva radioaktivnih snovi (Morais Leme in Marin-Morales, 2009).

Za namene okoljskega monitoringa sta preglednico še podrobneje razčlenili Khanna in Sharma (2013), ki sta natančneje razvrstili vsa onesnažila, ki vplivajo na številčnost ter vrsto kromosomskih aberacij; tako sta natančno opisali katere vrste aberacij so značilne oziroma specifične za določeno onesnažilo.

Preglednica 1: Onesnažila, ki vplivajo na številčnost in vrsto kromosomskih aberacij in opis vrst aberacij ki so značilne za določeno onesnažilo (Khanna in Sharma, 2013).

S.No	Agent/s studied	Nature	Type of aberrations
1.	Hospital effluents	Chemical mixture of pollutants	chromosomal disruptions, anaphasic bridge/s and micronuclei
2.	Coal fly ash	Mixture of chemicals	root growth and mitotic indices inhibition; binucleated cells formation.
3.	Industrial wastewater	Wastewater	mitotic division reduction; mitotic anomalies
4.	Lead	Heavy metal	decrease root growth and mitotic index; Induce chromosome bridge/s, laggard chromosome/s and micronuclei.
5.	Nano-silver	Anti-bacterial	mitotic index decrease, c-metaphase, stickiness, bridge/s, laggard/s and micronuclei
6.	Magnesium sulphate	Fertilizers	cytostatic and clastogenic properties [
7.	Industrial effluents contaminated with azo dyes	Mutagenic chemicals	mitotic index reduce; bridge/s, laggard/s, c-metaphase, binucleated cells; loss of chromosomes
8.	Maleic hydrazide	Herbicide	chromosomal aberrations like bridge/s, laggard/s etc.
9.	Petroleum hydrocarbon	Complex chemical mixture	nuclear bud, micronuclei, mini cells, polynucleated cells, chromosomal bridge/s, c-metaphase and break/s
10.	Extracts of <i>Psychotria</i> (<i>P. myriantha</i> and <i>P. leiocarpa</i>)	Herbal medicine	chromosomal aberrations, inhibition of cell division was more in <i>P. leiocarpa</i> than <i>P. myriantha</i>

11.	Quizalofop-P-ethyl	Herbicide	stickiness, bridge/s, vagrant/s, canaphase, multipolarity, micronuclei
12.	Cadmium	Metal	inhibition of mitotic index; CA, MA and micronucleus
13.	Maleic hydrazide	Metal	mutagenic events reduce and induce translocation of chromosomes
14.	Atrezine	Herbicide	inhibit mitotic index; micronucleus, chromosomes and mitotic aberrations
15.	Aluminium	Metal	oxidative stress, damage DNA and cell death
16.	Aqueous extracts of <i>Azadirachta indica</i> , <i>Morinda lucida</i> , <i>Cymbopogon citratus</i> , <i>Mangifera indica</i> and <i>Carica papaya</i>	Medicinal plants	mitotic spindle disturbance, inhibitory, mitodepressive, turbagenic and inhibition of root growth
17.	Curcumin	Antimutagen	chromosome break/s, gap/s and fragment/s
18.	Potassium metabisulphite	Food preservative	mitotic index reduce; break/s, gap/s
19.	Sodium benzoate, boric acid, citric acid, potassium citrate and sodium citrate	Food preservative	mitotic division reduce, anaphase bridge/s, c-mitosis, micronuclei, break/s, lagging, stickiness, and unequal distribution
20.	<i>Plantago lanceolata</i>	Medicinal plant	decrease mitotic index; induce breaks, bridges, stickiness
21.	Vanadium	Metal	chromosomal aberrations
22.	Avenoxan	Herbicide	abnormal cell increased, stickiness, bridge/s, laggard/s
23.	Acetaminophen	Analgesic	roots did not grow at high concentration, mitotic index declined
24.	Fumonisin	Toxic	genetic damage occurs, chromosomal aberrations, sister chromatid exchanged
25.	Leachates from solid waste	Heavy metal contamination	mitotic index inhibition, chromosomal aberrations and micronuclei

26.	Heavy metal contaminated river water	Heavy metal decreased	decreased cell reproduction; bridge/s, fragment/s, laggard/s, cmitosis, micronuclei
27.	Dinocap	Fungicides	stickiness, c-mitosis, laggard/s, multipolarity, micronuclei, polyploidy fragment/s
28.	Air pollution	Cytotoxic substance	mitotic cell division decreased, genotoxic substance found
29.	Diuron contaminated soil	Urea herbicide	break/s, micronucleated and binucleated cells; mitotic index declined
30.	Atrazine	Pesticide	break/s
31.	BDE-99	Flame retardant	chromosomal aberrations
32.	Industrial wastewater from Shawa, Meet EI, Akrad, Telbana, Belgay	Industrial wastewater	mitotic division inhibition, chromosome ring/s, fragment/s, bridge/s, disturbed metaphase
33.	Sewage water	Toxic metals	growth inhibition occur, wilting appears on root tip/s, abnormal dividing cell increased
34.	Aqueous extract of <i>Aristolochia triangularis</i> , <i>Cayaponia bonariensis</i> , <i>Solanum granulsoleprosum</i>	Antihypertensive agents	micronuclei, asynchronic divisions
35.	Sodium metabisulfite	Food preservatives	mitotic index decreased, c- mitosis, stickiness
36.	<i>Azadirachta indica</i>	Insecticide	micronucleus, multinucleated cells, bridge/s, stickiness, laggard/s
37.	Lead	Metal	mitotic activity inhibition, level of DNA synthesis declined, c-mitosis
38.	Sewage and industrial effluents from the Amritsar	Domestic and industrial wastewater	high number of micronuclei and anaphase aberrations
39.	Cypermeth-rin and fenvalerate	Insecticides	mitotic index inhibition; chromosomal and mitotic aberrations

40.	Cs and Sr	Radioisotopes	germination rate of onions decrease; aberrations like stickiness, vagrant
41.	Waste, surface and ground water	Toxic substances	root growth inhibition; metaphase and anaphase aberrations
42.	Polluted water sample	Industrial and municipal wastewater, water from treatment plant	fragment/s, c-mitosis, stickiness
43.	Alkyl benzene, sulphonate and citowett	Surfactants	root length declined; mitotic index decreased; chromosomal aberrations
44.	Wastewater samples	Mixture of toxic substances	inhibition of mitotic activity, chromosomal and genomic aberrations
45.	Phosphine gas	Fumigative agent	root length and viability of seeds reduced, frequency of aberrated cells increase
46.	Carbetamide	Pesticide	c-mitosis, break/s and bridge/s
47.	Chlorophenoxy acids	Herbicide	c-tumors, stickiness, vagrant/s, fragment/s; mitotic index decreased
48.	Carboxin, Oxycarboxin	Pesticide	micronuclei
49.	2, 4, 5-T	Herbicides	cell enlargement and chromosome aberrations; duration of mitotic cycle increased

1.6 Celični cikel

Celični cikel obsega mitozo (M fazo) in interfazo. Pri rastlinskih celicah traja povprečno od 20 do 30 ur, sama mitozna predstavlja krajši del cikla, in sicer 1 do 2 uri. Po končani mitozni se lahko v celicah začne nov celični cikel (embrionalna tkiva) ali pa celice preidejo v trajno stanje (trajna tkiva). Mitozo lahko pri rastlinah največkrat opazujemo v koreninskih rastnih vršičkih, saj so za opazovanje pod mikroskopom najprimernejši. Pri mitozni ločimo 4 faze, in sicer: profazo, metafazo, anafazo in telofazo (Sinkovič, 2008).

1.6.1 Interfaza

Interfaza poteka najdalj časa, in sicer traja povprečno 9-krat dalj kot delitev celic ali M faza. Interfazo delimo na tri podobdobja:

G_1 = prva rastna faza, v njej se vrši priprava na sintezo DNK;

S = obdobje sinteze DNK (podvojevanje); v njej se dvojni vijačnici odvijeta in po vzorcu matrične DNK sintetizirata novi kopiji;

G_2 = druga rastna faza; v njej se vrši sinteza beljakovin delitvenega vretena (Sinkovič, 2008).

1.6.2 Profaza

V začetku profaze je kromatin v obliki tankih, dolgih odvitih niti. Proti koncu profaze se kromatinske niti zgostijo, niti se zavijejo in krajšajo, zaradi tega so po mikroskopom dobro vidni kromosomi. Prične se tudi vzdolžna delitev profaznih kromosomov na dve sestrski kromatidi, ki ležita tesno druga ob drugi. Kromatidi ostaneta spojeni na mestu kromosoma, imenovanem primarna zožitev ali centromera. Ob koncu profaze se prične tvoriti ovoj kromosomov (Sinkovič, 2008).

1.6.3 Metafaza

V metafazi se dokončno izoblikuje delitveno vreteno, tvorijo se polni mikrotubuli. Kromosomi so v metafazi najkrajši, najbolj zgoščeni in primerni za opazovanje in štetje. Metafazni kromosomi se dokončno razdelijo v dve sestrski kromatidi, ki sta spojeni le še v centromeri. V idealnem primeru so kromosomi razporejeni v ekvatorialni ravnini celice. (Sinkovič, 2008).

1.6.4 Anafaza

Sestrski kromatidi se v tej fazi dokončno ločita z nitmi delitvenega vretena. Kromatidi vleče proti nasprotnima poloma celice in dedna snov se enakomerno prerazporedi na hčerinski celici. Ko sta kromatidi vsaka na svojem celičnem polu, se anafaza konča (Sinkovič, 2008).

1.6.5 Telofaza

V telofazi se kromosomi despiralizirajo, odvijajo, podaljšajo, izgubijo ovoj in preidejo v kromatin. Dedna snov z odvijanjem preide v delovno obliko. Niti delitvenega vretena razpadejo. Po opisanih procesih v jedru celice je telofaza nasprotna profazi (Sinkovič, 2008).

1.7 Kromosomi in kromosomske aberacije

Kromosomi so strukture v celicah, ki postanejo vidne zaradi zvijanja kromatina v mitози. Vse dedne informacije celotnega organizma na kromosomih predstavljajo genom. S pomočjo metod barvanja kromosomov (npr. acetokarmin) lahko opazujemo in preučujemo strukturo kromosomov. Proučujemo lahko morfologijo, določamo stadije delitev in število kromosomov (Firbas, 2011).

1.7.1 Kromosomske aberacije

Kromosomske aberacije se lahko pojavijo na celotnem kromosomu ali le na kromatidi kromosoma. Genotoksičen vpliv lahko poškoduje samo en kromosom ali več kromosomov, lahko pa so poškodovani vsi kromosomi. Pojav kromosomskih aberacij je pogojen s spremembami v strukturi in/ali številu kromosomov. To se lahko zgodi popolnoma spontano, lahko pa so kromosomske aberacije posledica izpostavljenosti onesnaževalom. Na spremembo v strukturi kromosomov vpliva več različnih dejavnikov (DNK zlomi, inhibicija DNK sinteze). Kromosomske aberacije so vidne v fazi mitoze. Med kromosomske aberacije, ki jih povzroči sprememba v številu kromosomov, npr. spadata poliploidija in aneuploidija (Morais Leme in Marin-Morales, 2009).

Ker je ^{238}U poleg sevalca tudi težka kovina, vpliva na pojav klastogenih kromosomskih in aneugenih kromosomskih aberacij. Klastogene kromosomske aberacije so strukturne aberacije, med katere spadajo mostički in fragmenti. Pri aneugenih kromosomskih aberacijah pa je sprememba v številu kromosomov, med katere spadajo zaostali kromosomi, izgubljeni kromosomi, zlepljenja, C-mitotiza, multipolarnost (Khanna in Sharma, 2013).

1.8 Namen in cilji

Namen zaključne naloge je bil, da s preprostim *Allium* testom, ki smo ga izvedli na koreninicah čebule šalotke, ugotovimo, ali koncentracija urana (U) v vzorcih izcednih vod vpliva na prirast koreninic ter na mitotski in aberacijski indeks.

1.8.1 Cilji

- Ugotoviti v katerih vzorcih izcednih vod uran najbolj vpliva na celično delitev, ter kromosomske aberacije.
- Ugotoviti katere kromosomske aberacije so dober pokazatelj vpliva urana oziroma ali so sploh katere kromosomske aberacije specifično značilne za uran.

1.9 Hipoteze

- Pri večjih koncentracijah urana v vzorcu izcedne vode je prirast koreninic čebulice šalotke manjši.
- Večja kot je koncentracija urana, manjši je mitotski indeks.
- Prisotnost urana v vzorcih izcednih vod vpliva na večji aberacijski indeks.
- Določene vrste kromosomskih aberacij so dobri pokazatelji prisotnosti urana.

2 METODE DELA

Allium test je prvi uporabil Levan, leta 1938, zaradi njegove enostavne izvedbe ga je kasneje Fiskesjö predlagala kot standardno metodo za testiranje citotoksičnosti in genotoksičnosti kemikalij ter njegovo vključitev kot del okoljskega monitoringa (Fiskesjö, 1985).

Fiskesjö predlaga dve obliki izvedbe standardnega *Allium* testa. Pri prvi izvedbi *Allium* testa se čebulice šalotke izpostavi rasti v čisti vodi, ko koreninice dosežejo dolžino 2 cm, se čebulice izpostavi testnim vzorcem vod. Pri drugi izvedbi *Allium* testa pa čebulice šalotke takoj izpostavimo testnim vzorcem vode, s poudarkom, da se testne vzorce vode v celoti menjava dnevno oziroma se samo dolije toliko vode, kolikor jo izhlapi (Fiskesjö, 1985).

Rank in Nielsen sta predlagala izvedbo modificiranega *Allium* testa, ki omogoča strokovno še nepodkovanim raziskovalcem lažje ter zanesljivo štetje celic, ter lažje prepoznavanje in ločevanje kromosomskih aberacij. Sam test je izveden tako, da se opazuje samo 3 vrste aberacij v anafazi in telofazi, ki so najlažje za prepoznavanje (Rank in Nielsen, 1993).

Za analizo mitotskega indeksa in kromosomskih aberacij čebulic šalotke smo uporabili drugo obliko standardnega *Allium* testa po Fiskesjö (1985). Pri drugi izvedbi *Allium* testa se čebulice šalotke predhodno ne izpostavi v čisto vodo, ampak se jih takoj izpostavi v testne vzorce vode, s poudarkom, da se testne vzorce vode v celoti dnevno zamenja oziroma se dolije toliko vode, kolikor jo izhlapi (Fiskesjö, 1985).

Odločili smo se, da bomo med izvajanjem *Allium* testa čebulicam menjavali vodo v celoti vsak dan. Za ugotavljanje vpliva genotoksičnosti smo določili aberacijski indeks (Morais Leme in Marin-Morales, 2009).

2.1 Opis območja

Na odlagališču hidrometalurške jalovine Boršt (slika 1), ki predstavlja ostanek izluževanja urana iz uranove rude, je bilo v času izgradnje odlagališča jeseni 1984 do konca meseca junija 1990, ko je bila trajno zaustavljena proizvodnja uranovega koncentrata v RUŽV, odloženo 610.000 ton hidrometalurške jalovine s povprečno specifično aktivnostjo 78,2 kBq/kg. Za izgradnjo transportnih poti do odlagališča za potrebe odlaganja hidrometalurške jalovine je bilo odloženo še 111.000 t jamske jalovine s povprečno specifično aktivnostjo 10,2 kBq/kg (Rojc, 2010).

Specifična aktivnost odloženega kontaminiranega materiala iz postopka dekontaminacije površin in objektov zunaj odlagališča Boršt ni znana, saj ni bilo izvedenih ustreznih meritev, skupni volumen le teh znaša 6.543 m³, skupna masa pa 9.450 t. Skupna masa odloženih kontaminiranih materialov je na odlagališču 730.450 t, skupna aktivnost pa 48,8 TBq (Rojc, 2007).

Vzorci izcednih vod so bili odvzeti s strani zaposlenih v Rudniku Žirovski vrh dne 18.3.2014.



Slika 1: Odlagališče hidrometalurške jalovine Boršt (arhiv RŽV).

2.2 Izbira in nastavitvev čebulic v vzorce izcednih vod

Šalotko smo izpostavili vzorcem izcednih vod iz šestih lokacij:

1. Boršt glavni potok (BPG) – slika 2, združene vse vode iz tunela, zaledna drenaža zahod (ZDZ), skupne drenaže Boršt (SDB), skupna drenaža odlagališča hidrometalurške jalovine Boršt (SDIJ) ter same okolice. To mesto Rudniku Žirovski vrh služi kot mesto kjer izvajajo kontrolo vpliva na okolje



Slika 2: Vzorčno mesto BPG (Avtor: Eva Žun).

2. Skupna drenaža Boršt (SDB) – slika 3, skupna drenaža iz celotnega odlagališča Boršt



Slika 3: Vzorčno mesto SDB (Avtor: Eva Žun).

3. Skupna drenaža odlagališča hidrometalurške jalovine Boršt (SDIJ) –slika 4 , leži na dnu odlagališča Boršt; skupna drenaža iztoka iz jalovine



Slika 4: Vzorčno mesto SDIJ (Avtor: Eva Žun).

4. TUNEL – slika 5, kontrola iztoka vode iz plazu



Slika 5: Vzorčno mesto TUNEL (Avtor: Eva Žun).

5. TODRAŽ – slika 6, merilno mesto v potoku Todraščica



Slika 6: Vzorčno mesto TODRAŽ (Avtor: Eva Žun).

6. Zaledna drenaža zahod (ZDZ) – slika 7, vzorčno mesto, ki leži na vrhu odlagališča Boršt



Slika 7: Vzorčno mesto ZDZ (Avtor: Eva Žun).

Čebulice šalotke *Allium cepa* L., smo izpostavili pitni vodi ter vzorcem izcednih vod. Vzorcem izcednih vod smo izmerili pH vrednost. Pitna voda nam je služila kot kontrolni vzorec.

Pred nastavitvijo čebulic v vzorce izcednih vod, smo izbrali 42 čebulic, s približno enako velikostjo in razvitim koreninskim delom. Čebulicam smo olupili luskoliste, ter odstranili suhe koreninice in jih s tem pripravili na izpostavitvev.

Čebulice smo nato izpostavili vzorcem izcednih vod in kontrolnemu vzorcu, in sicer po šest čebulic za vsak vzorec. Za to smo uporabili 50 ml centrifugirke, katere smo predhodno ovili v aluminijasto folijo ter jih označili. Čebulice smo postavili na centrifugirke tako, da so bile koreninice namočene v vzorcih vod (slika 8).

Vzorce s čebulicami smo nato postavili v komoro, v katero smo namestili svetilko z modro in rdečo svetlobo ter jih s treh strani obdali z aluminijasto folijo, in sicer z namenom, da smo šalotkam zagotovili enakomerno osvetlitev. Svetlobni cikel smo nastavili na 16 ur svetlobe in 8 ur teme. Povprečna temperatura prostora je bila 20°C. Vsak dan smo čebulicam zamenjali celotno količino izcedne vode, tako da je bil koreninski del čebulic ves čas izpostavljen izcednim vodam oz. pitni vodi (v kontroli). Vzorce izcednih vod smo hranili v hladilniku. Vsak dan smo vzorce izcednih vod vzeli iz hladilnika vsaj 3 ure pred zamenjavo zato, da se je voda ogrela na temperaturo prostora, se pravi na 20°C.

Koreninice čebulic smo za nadaljnje analize odvzeli (porezali) po štirih in sedmih dnevih.



Slika 8: Izpostavljene čebulice (Avtor: Felicita Urzi).

2.3 Merjenje prirasta korenin

Pri zaključni nalogi smo izmerili povprečni dolžinski prirast koreninic. Po štirih dneh izpostavitve koreninskega dela čebulic v vzorcih izcednih vod ter pitne vode, smo čebulicam zmerili dolžino koreninic. Z geometrijskim trikotnikom smo izmerili najdaljšo ter najkrajšo koreninico. Pri tem smo si pomagali s stekelcem pod katerim smo imeli temno podlago za lažje ter čim bolj natančno merjenje dolžin koreninic.

Povprečni prirastek koreninic smo izračunali po formuli:

$$\bar{d} = |d_{max} - d_{min}|$$

\bar{d} = povprečni prirastek

d_{max} = dolžina najdaljše koreninice

d_{min} = dolžina najkrajše koreninice

2.4 Fiksiranje ter priprava mečkancev

Vzorčenje in fiksiranje je potekalo dvakrat, in sicer po četrtem dnevu (96 ur) ter po sedmem dnevu (168 ur) izpostavitve šalotk. Čebulicam šalotke smo pri vsaki ponovitvi vsakega vzorca postrigli po pet zdravih, nepoškodovanih koreninic. Za vsak vzorec izcedne vode smo izdelali pet preparatov iz petih različnih koreninic.

Koreninice smo dali v epruvice ter jih fiksirali v fiksirni raztopini, mešanici 70 % etanola (C_2H_5OH) in očetne kisline (CH_3COOH) (Fluka) v razmerju 3:1. Fiksirane koreninice v epruvcakah smo pokrili s parafilmom ter jih nato shranili v zamrzovalniku (-18 C).

Koreninico posameznega vzorca smo sprali z deionizirano vodo in jo dali v novo epruvetko v katero smo dodali mešanico očetne kisline (CH_3COOH) in klorovodikove kisline (1M HCl). Pred izdelavo preparatov smo koreninske vršičke hidrolizirali z 2 ml hidrolizne raztopine (45 % CH_3COOH in 1M HCl (9:1)). Vse skupaj smo segreli za 5 minut pri 50 C in s tem koreninice fiksirali in macerirali.

Koreninico smo nato dali na objektno stekelce ter ji pod lupo (Leica EZ4) z britvico in s pomočjo pincete odstranili koreninsko čepico in odrezali 2 mm končnega (apikalnega) dela. Nato smo končni del koreninice prerezali še medialno vzdolžno (longitudinalno). Ko smo končali z rezanjem, smo koreninske vršičke obarvali z acetokarminom. Barvanje je trajalo 10 minut. Pred pripravo mečkancev smo na objektno stekelce kapnili nekaj kapljic 45 % očetne kisline, nanj položili razrezane in obarvane koreninske vršičke in jih nato prekrili s krovnim stekelcem. Čezenj smo nato dali papirnato brisačo, narahlo pritisnili s palcem, da smo koreninico zmečkali, ter hkrati popivnali odvečno očetno kislino.

Pri tem smo pazili, da nismo premaknili krovnega stekelca. Na koncu smo še previdno, da ne bi polomili krovnega stekelca, potolkli s svinčnikom, da smo odstranili nastale zračne mehurčke. Preparat smo na koncu fiksirali s prozornim lakom za nohte z namenom, da bo ostal čim dlje uporaben. Preparate smo do mikroskopske analize hranili v hladilniku (8 C).

2.5 Analiza vzorcev

Analize vzorcev smo opravili v študentski laboratorijski vajalnici z uporabo mikroskopa Leica DM 500, na katerem je bila nameščena kamera Infinity 1 in z računalniškim programom Infinity analyze, Lumenera 6.3.

2.5.1 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 petih preparatih s 1000 pregledanimi celicami na preparat ali manj pri vzorcih z manjšim številom celic.

Mitotski indeks smo izračunali po formuli (Tedesco in Laughinghouse, 2012):

$$MI[\%] = \frac{\sum_1^5 (Pph + Mph + Aph + Tph)}{D}$$

Pph= frekvenca profaz

Mph= frekvenca metafaz

Aph= frekvenca anafaz

Tph= frekvenca telofaz

D= vsota vseh opazovanih celic

2.5.2 Aberacijski indeks

Aberacijski indeks (AI) je delež poškodovanih kromosomov (kromosomskih aberacij) v delečih se celicah. Vrednost AI smo določili v petih preparatih vsakega vzorca, in sicer glede na frekvenco metafaznih in anafaznih celic, kjer so se pojavljale poškodbe kromosomov. Pregledali smo skupno 100 anafaz in metafaz na preparat. Celice v metafazi in anafazi smo razdelili v naslednje kategorije (opisi posameznih faz so podani v uvodnem poglavju):

- normalne metafaze
- normalne anafaze
- mostički v anafazi in metafazi
- fragmenti v anafazi in metafazi
- zaostali kromosomi v anafazi in metafazi
- izgubljeni kromosomi v anafazi in metafazi
- C-mitoza
- zlepljenja v anafazi in metafazi

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

$$AI[\%] = \frac{\sum_1^5(M + F + ZA + ZG + CM + Z) * 100\%}{\sum_1^5(Mph + Aph)}$$

Mph= frekvenca metafaz

Aph= frekvenca anafaz

M= frekvenca mostičkov

F= frekvenca fragmentov

ZA= frekvenca zaostalih kromosomov

ZG= frekvenca izgubljenih kromosomov

CM= frekvenca c-mitoz

Z= frekvenca zlepljenih kromosomov

3 REZULTATI Z DISKUSIJO

3.1 pH vrednosti

Preglednica 2: Rezultati meritev pH vrednosti v vzorcih izcednih vod, ki smo jih uporabili za izpostavitve šalotke.

Številka vzorca	Vzorec	pH
1	K	ni bilo merjeno
2	BPG	7,41
3	SDB	7,24
4	SDIJ	7,22
5	TUNEL	7,51
6	TODRAŽ	7,82
7	ZDZ	7,33

Iz preglednice pH vrednosti je razvidno, da so vrednosti v okviru normalnih vrednosti, nekoliko je povečan le pH v vzorcu Todraž. Zaradi zgolj enkratne meritve ne moremo govoriti o povečanju.

3.2 Dolžinski prirast koreninic

Preglednica 3: Izračunana povprečja rasti koreninic šalotke.

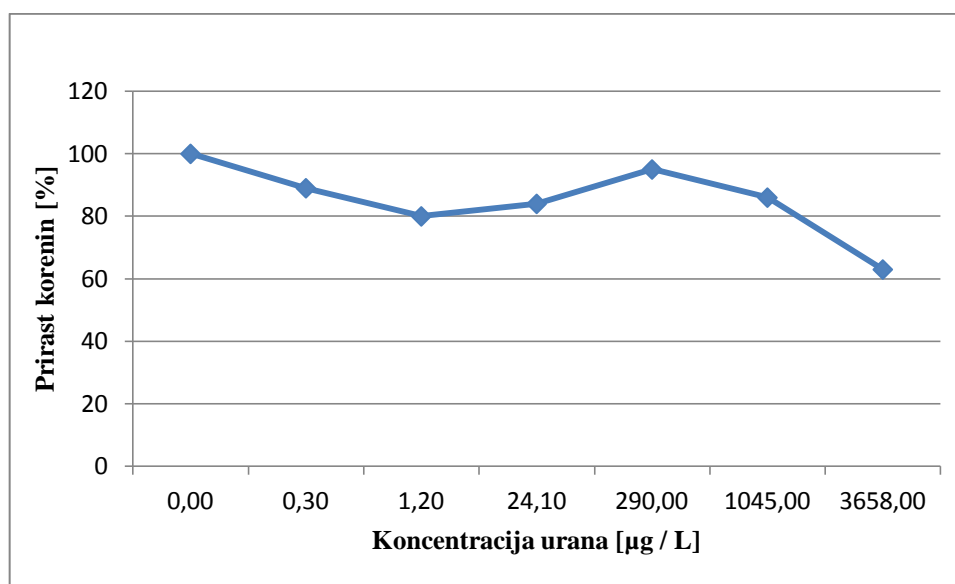
Številka vzorca	Vzorec	Zaporedna številka merilnega valja					Povprečje	Standardna deviacija
		1	2	3	4	5		
1	K	4,8	5,1	5,2	4,6	5,4	5,02	± 0,32
2	BPG	3,8	4,2	4,7	3,6	4,9	4,24	± 0,56
3	SDB	4	3,7	2,6	2,4	3,2	3,18	± 0,69
4	SDIJ	4,5	3,8	5	4,4	3,9	4,32	± 0,49
5	TUNEL	3,6	3,6	4,8	3,7	4,5	4,04	± 0,57
6	TODRAŽ	5	4,4	5,4	4	3,6	4,48	± 0,73
7	ZDZ	4,4	4,8	6,1	3,8	4,9	4,8	± 0,85

Opombe: K-kontrola, BPG-Boršt glavni potok, SDB-skupna drenaža Boršt, SDIJ-skupna drenaža odlagališča hidrometalurške jalovine Boršt, ZDZ-zaledna drenaža zahod.

Preglednica 3 prikazuje povprečje prirasta pri posameznih ponovitvah vsakega vzorca.

Koreninice šalotke smo izmerili po 96 urah rasti v šestih vzorcih izcednih vod z območja odlagališča hidrometalurške jalovine Boršt ter enemu vzorcu pitne vode (kontrola). Izmerili smo najdaljšo in najkrajšo koreninico pri vseh petih ponovitvah vsakega vzorca ter izračunali njihov dolžinski prirast. Po 168 urah rasti in izpostavitve čebulic v vzorcih vod merjenja nismo mogli ponoviti, ker smo najdaljše in najkrajše koreninice porezali po 96 urah.

Ugotovili smo, da imajo čebulice, ki so bile izpostavljene pitni vodi, največji dolžinski prirast koreninic (5,7 cm). V vzorcih izcednih vod smo zabeležili največji dolžinski prirast čebulicam vzorca izcedne vode ZDZ (6,8 cm), najmanjšega pa čebulicam v vzorcu izcedne vode SDB (2,9 cm). V primerjavi s kontrolnim vzorcem so imele čebulice, izpostavljene izcednim vodam manjši dolžinski prirast.



Slika 9: Povprečni dolžinski prirastki koreninic v vzorcih izcednih voda ter pitni vodi (K).

Iz slike 9 je razvidno, da dolžinski prirast koreninic ne kaže linearnega trenda upadanja s poviševanjem koncentracije urana. Dolžinski prirast je bil v vzorcu ZDZ (95,62 %) večji kakor v vzorcu TUNEL (80,48 %), kljub temu, da vzorec izcedne vode ZDZ vsebuje večjo koncentracijo urana (290 $\mu\text{g}/\text{L}$) kakor vzorec TUNEL (1,20 $\mu\text{g}/\text{L}$). Ugotovitve nakazujejo, da dolžinski prirast koreninic ni dober pokazatelj toksičnega vpliva urana (U).

Zaradi tega sklepamo, da dolžinski prirast koreninic ni dober pokazatelj toksičnega vpliva ob prisotnosti urana. Na podlagi teh ugotovitev prve hipoteze ne moremo potrditi v celoti, saj že nižja koncentracija urana v vzorcu izcedne vode povzroči manjši prirast koreninic čebulic šalotke.

3.3 Mitotski indeks

Preglednica 4: Izračunane povprečne vrednosti mitotskih indeksov za posamezen vzorec po 96 urah.

Številka vzorca	Vzorec	MI (%)	Stand. deviacija	Stand. napaka
1	K	5,98	± 0,85	± 0,43
2	BPG	4,75	± 1,71	± 0,86
3	SDB	4,95	± 0,77	± 0,38
4	SDIJ	4	± 0,34	± 0,17
5	TUNEL	2,93	± 1,64	± 0,82
6	TODRAŽ	2,6	± 1,56	± 0,78
7	ZDZ	3,29	± 0,99	± 0,49

Opombe: K-kontrola, BPG-Boršt glavni potok, SDB-skupna drenaža Boršt, SDIJ-skupna drenaža odlagališča hidrometalurške jalovine Boršt, ZDZ-zaledna drenaža zahod.

Preglednica 5: Izračunane povprečne vrednosti mitotskih indeksov za posamezen vzorec po 168 urah.

Številka vzorca	Vzorec	MI (%)	Stand. deviacija	Stand. napaka
1	K	4,12	± 1,27	± 0,63
2	BPG	1,73	± 1,32	± 0,66
3	SDB	4,92	± 0,70	± 0,35
4	SDIJ	3,86	± 0,63	± 0,32
5	TUNEL	1,29	± 2,59	± 1,29
6	TODRAŽ	1,89	± 2,59	± 1,29
7	ZDZ	2,31	± 1,79	± 0,89

Opombe: K-kontrola, BPG-Boršt glavni potok, SDB-skupna drenaža Boršt, SDIJ-skupna drenaža odlagališča hidrometalurške jalovine Boršt, ZDZ-zaledna drenaža zahod.

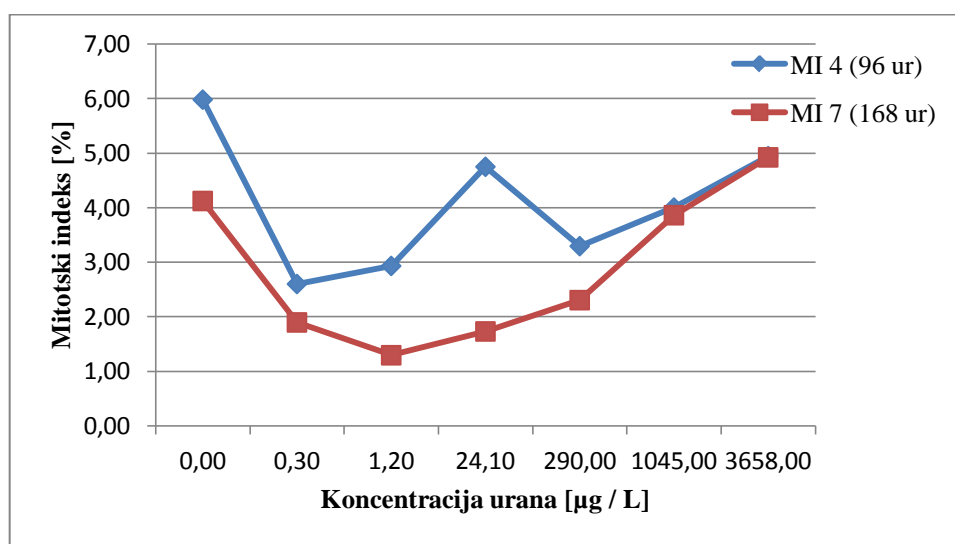
*rezultate sedmega dne smo uporabili kot primerjavo citogenetskim raziskavam – *Allium* testa, ki ga je ERICo d.o.o. zvedel leta 2008 na območju Rudnika Žirovski Vrh in jih v diskusiji nismo natančneje interpretirali.

Preglednici 4 in 5 prikazujeta izračunane povprečne vrednosti mitotskih indeksov za posamezen vzorec.

Za izračun mitotskega indeksa, smo prešteli 5000 celic v vsakem izpostavljenem vzorcu in sicer 1000 celic na en pregledan preparat. Izmed vseh celičnih faz smo imeli največ prešteti interfaz. V koreninah čebulic, ki so bile izpostavljene 96 ur, so se vse celice aktivno delile. Pri koreninah čebulic, ki so bile izpostavljene 168 ur, v nekaterih ponovitvah vzorcev nismo zabeležili niti ene aktivno deleče celice.

Največji mitotski indeks po 96 urah so imele čebulice v vzorcu kontrole (5,98 %), največji mitotski indeks od vzorcev izcednih voda pa je imel vzorec SDB (4,95 %). Najmanjši mitotski indeks smo zabeležili pri čebulicah v vzorcu TODRAŽ (2,60 %).

Pri čebulicah, ki so bile izpostavljene 168 ur je imel največji mitotski indeks vzorec SDB (4,92 %) in najmanjši mitotski indeks vzorec BPG (1,30 %).



Slika 10: Primerjava mitotskega indeksa med dnevom 4 in dnevom 7.

Z dobljenimi mitotskimi indeksi po 96 in 168 urah ne moremo trditi, da izcedne vode z različnimi koncentracijami urana, ne vplivajo na število aktivno se delečih celic. Povečane vrednosti toksičnih snovi naj bi vplivale na zmanjšanje števila delečih se celic in s tem na zmanjšanje mitotskega indeksa. Izračunan mitotski indeks, v naših vzorcih ne nakazuje trenda, da ima vzorec z večjo koncentracijo urana posledično manjši mitotski indeks. To je razvidno iz slike 10, saj ima vzorec SDB največji mitotski indeks med vsemi vzorci izcednih voda, kljub temu da vsebuje največjo koncentracijo urana.

S tem smo ovrgli našo drugo hipotezo, v kateri smo predpostavili, da večja koncentracija urana vpliva na manjšanje mitotskega indeksa, saj imajo že manjše koncentracije urana negativen vpliv na mitotski indeks.

3.4 Aberacijski indeks

Preglednica 6: Izračunane povprečne vrednosti aberacijskih indeksov za posamezen vzorec po 96 urah.

Št. Vzorca	Vzorec	AI (%)	Stand. Deviacija	Stand. Napaka
1	K	1,98	$\pm 0,98$	$\pm 0,44$
2	BPG	9,57	$\pm 1,71$	$\pm 0,77$
3	SDB	13,65	$\pm 3,18$	$\pm 1,42$
4	SDIJ	10,5	$\pm 2,02$	$\pm 1,55$
5	TUNEL	11,13	$\pm 1,06$	$\pm 1,01$
6	TODRAŽ	6,9	$\pm 1,58$	$\pm 0,53$
7	ZDZ	7,38	$\pm 4,15$	$\pm 0,79$

Opombe: K-kontrola, BPG-Boršt glavni potok, SDB-skupna drenaža Boršt, SDIJ-skupna drenaža odlagališča hidrometalurške jalovine Boršt, ZDZ-zaledna drenaža zahod.

Preglednica 7: Izračunane povprečne vrednosti aberacijskih indeksov za posamezen vzorec po 168 urah.

Št. Vzorca	Vzorec	AI (%)	Stand. Deviacija	Stand. Napaka
1	K	1,8	$\pm 0,84$	$\pm 0,37$
2	BPG	11,63	$\pm 6,50$	$\pm 3,75$
3	SDB	14	$\pm 8,66$	$\pm 3,87$
4	SDIJ	9,6	$\pm 1,7$	$\pm 0,85$
5	TUNEL	12	$\pm 0,00$	$\pm 0,00$
6	TODRAŽ	8,3	$\pm 2,40$	$\pm 1,69$
7	ZDZ	12,62	$\pm 6,65$	$\pm 3,32$

Opombe: K-kontrola, BPG-Boršt glavni potok, SDB-skupna drenaža Boršt, SDIJ-skupna drenaža odlagališča hidrometalurške jalovine Boršt, ZDZ-zaledna drenaža zahod.

* rezultate sedmega dne smo uporabili kot primerjavo citogenetskim raziskavam – *Allium* testa, ki ga je ERICo d.o.o. zvedel leta 2008 na območju Rudnika Žirovski Vrh in jih v diskusiji nismo natančneje interpretirali.

Pri analizi kromosomskih aberacij smo opazovali naslednje kromosomske aberacije: mostičke, fragmente, zaostale kromosome, izgubljene kromosome, C-mitozo ter zlepljenja. Preglednici 6 in 7 prikazujeta izračunane povprečne vrednosti aberacijskih indeksov za posamezen vzorec.

Preglednica 8: Rezultati dolžinskih prirastov koreninic, mitotskih in aberacijskih indeksov ter deleži kromosomskih aberacij čebulic, ki so bile izpostavljene 96 ur.

VZOREC	U(μg/L)	PK(%)	DK(cm)	MI(%)	AI(%)	MO(%)	FR(%)	ZA(%)	ZG(%)	CM(%)	ZL(%)
K	0,00	100,00	5,02	5,98	1,98	0,59	0,00	0,79	0,59	0,00	0,00
BPG	24,10	84,00	4,24	4,75	9,57	1,36	1,14	1,14	2,95	1,14	1,59
SDB	3658,00	63,00	3,18	4,95	13,65	2,26	1,32	1,51	3,20	3,58	1,69
SDIJ	1045,00	86,00	4,32	4,00	10,50	1,50	2,00	2,50	1,75	0,50	2,25
TUNEL	1,20	80,00	4,04	2,93	11,13	0,23	2,29	2,52	3,89	1,14	0,92
TODRAŽ	0,30	89,00	4,48	2,60	6,90	0,19	0,78	1,57	3,33	0,78	0,39
ZDZ	290,00	95,00	4,80	3,30	7,35	0,86	0,64	1,71	2,36	0,86	1,07

Opombe: K-kontrola, BPG-Boršt glavni potok, SDB-skupna drenaža Boršt, SDIJ-skupna drenaža odlagališča hidrometalurške jalovine Boršt, ZDZ-zaledna drenaža zahod.

Preglednica 9: Rezultati dolžinskih prirastov koreninic, mitotskih in aberacijskih indeksov ter deleži kromosomskih aberacij čebulic, ki so bile izpostavljene 168 ur.

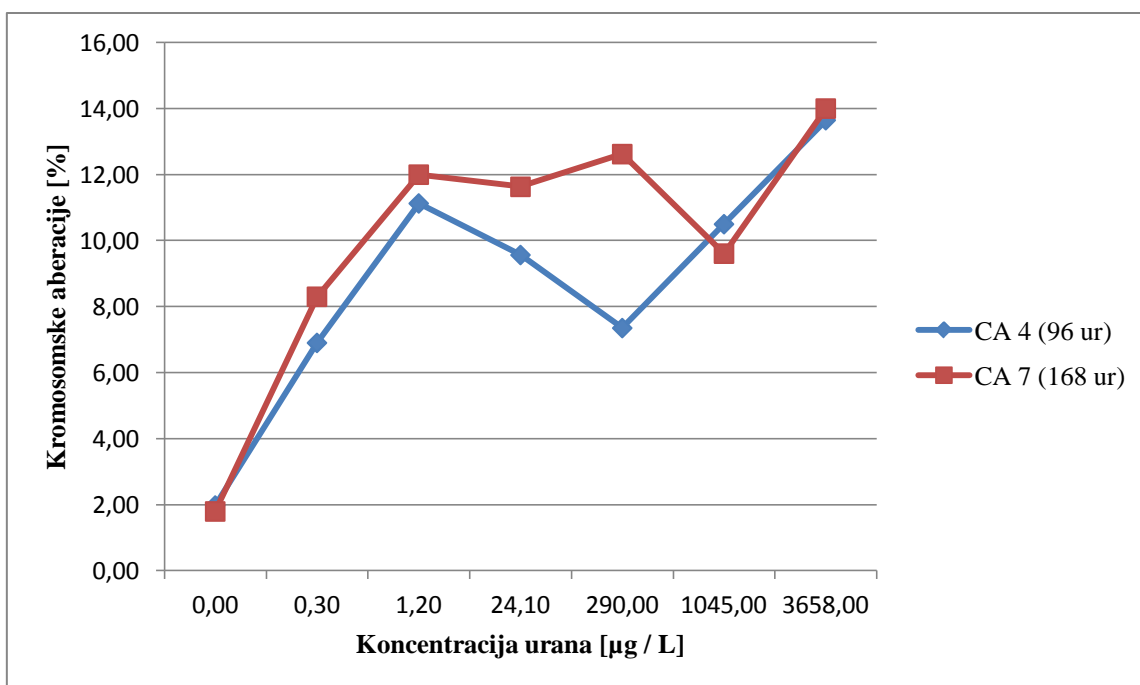
VZOREC	U(μg/L)	PK(%)	DK(cm)	MI(%)	AI(%)	MO(%)	FR(%)	ZA(%)	ZG(%)	CM(%)	ZL(%)
K	0,00	100,00	5,02	4,12	1,80	0,00	0,00	0,60	0,80	0,20	0,20
BPG	24,10	84,00	4,24	1,73	11,63	0,00	3,24	2,70	2,70	0,00	0,00
SDB	3658,00	63,00	3,18	4,92	14,00	0,75	1,00	3,50	3,25	1,25	1,50
SDIJ	1045,00	86,00	4,32	3,86	9,61	0,99	1,72	1,97	2,71	0,25	1,97
TUNEL	1,20	80,00	4,04	1,30	12,00	1,50	1,00	0,00	6,00	0,50	3,00
TODRAZ	0,30	89,00	4,48	1,90	8,30	2,91	0,49	1,94	0,97	0,00	1,94
ZDZ	290,00	95,00	4,80	2,31	12,62	1,07	0,71	2,86	2,86	0,71	0,43

Opombe: K-kontrola, BPG-Boršt glavni potok, SDB-skupna drenaža Boršt, SDIJ-skupna drenaža odlagališča hidrometalurške jalovine Boršt, ZDZ-zaledna drenaža zahod.

* rezultate sedmega dne smo uporabili kot primerjavo citogenetskimi raziskavam – *Allium* testa, ki ga je ERICo d.o.o. zvedel leta 2008 na območju Rudnika Žirovski Vrh in jih v diskusiji nismo natančneje interpretirali

Za izračun aberacijskega indeksa smo pregledali 500 metafaznih in anafaznih celic vsake izpostavitve in sicer 100 metafaz in anafaz na en pregledan preparat (ena koreninica). AI smo izračunali za vsako koreninico posebej, kot rezultat smo podali povprečno vrednost podatkov petih preparatov (pet koreninic).

V preparatih, ki smo jih naredili iz čebulic, izpostavljenih 96 ur, nam je uspelo v vseh vzorcih pregledati 500 metafaz in anafaz, medtem, ko nam pri čebulicah, ki so bile izpostavljene 168 ur, to ni uspelo povsod zaradi majhnega deleža aktivno delečih se celic.



Slika 11: Primerjava aberacijskega indeksa med dnevom 4 in dnevom 7.

Za vsak vzorec posebej smo izračunali aberacijski indeks, ločeno po samem času izpostavitve. Pri čebulicah, ki so bile izpostavljene 96 ur je imel največji aberacijski indeks vzorec SDB (13,65 %), kateri je vseboval največjo koncentracijo urana, najmanjšega pa kontrolni vzorec (1,98 %). Pri čebulicah, ki so bile izpostavljene 168 ur je imel prav tako največji aberacijski indeks vzorec SDB (14,00 %), najmanjšega pa kontrolni vzorec (1,80 %).

Pri najmanjši koncentraciji urana (0.3 $\mu\text{g}/\text{l}$) v vzorcu izcedne vode TODRAŽ opazimo znatno povečan AI (6.9 %) v primerjavi s kontrolo (1.98 %). Z naraščanjem koncentracije v ostalih vzorcih TUNEL (1,2 $\mu\text{g}/\text{l}$), BPG (24,1 $\mu\text{g}/\text{l}$), ZDZ (290 $\mu\text{g}/\text{l}$), SDIJ (1045 $\mu\text{g}/\text{l}$) in SDB (3658 $\mu\text{g}/\text{l}$), aberacijski indeksi le malo naraščajo TUNEL (11,3 %), BPG (9,57 %), ZDZ (7,35 %), SDIJ (10,5 %) in SDB (13,65 %). To kaže na to, da že zelo majhne koncentracije urana imajo vpliv na aberacijski indeks, nadaljnje povečanje koncentracije pa dodatnega negativnega vpliva nima.

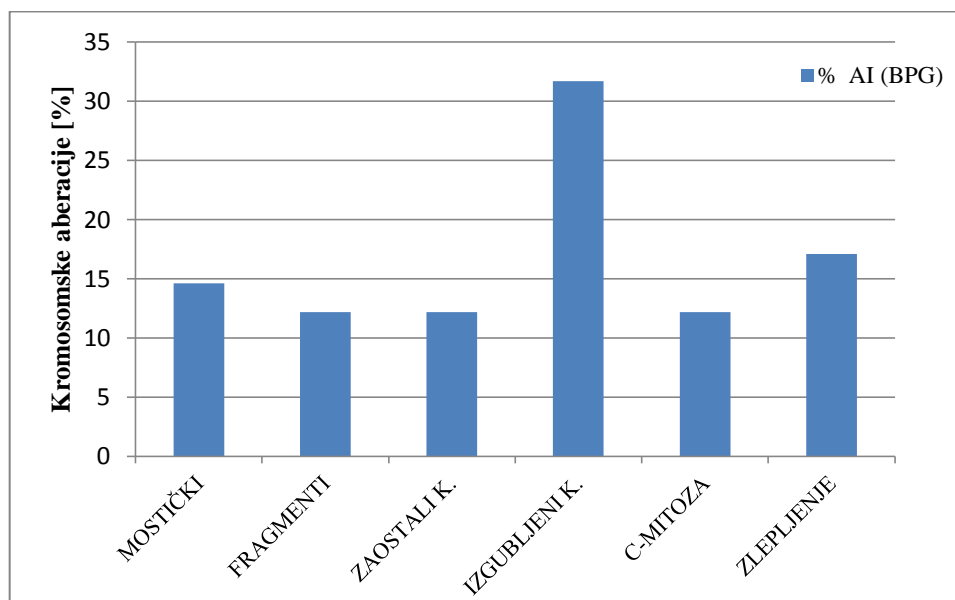
TUNEL je imel majhen mitotski indeks in velik aberacijski indeks kljub majhnim koncentracijam urana, kar nakazuje na morebitni vpliv drugih dejavnikov, kateri nam niso poznani.

Aberacijski indeksi, ki smo jih dobili po analizi čebulic, ki so bile izpostavljene 168 ur, so v vseh vzorcih izcednih voda veliki, ne glede na samo koncentracijo urana v vzorcih. Na to vpliva tudi manjše število prešteti metafaz in anafaz, saj smo v nekaterih vzorcih lahko prešteli samo 200 metafaz in anafaz in da je bilo samo število aberantnih metafaz in anafaz še majše. Zato dobljenih rezultatov po 168 urah izpostavitve, nismo upoštevali v nadaljnjih analizah.

Na podlagi rezultatov, ki smo jih dobili smo potrdili tretjo hipotezo: Prisotnost urana v vzorcih izcednih vod vpliva na večji aberacijski indeks.

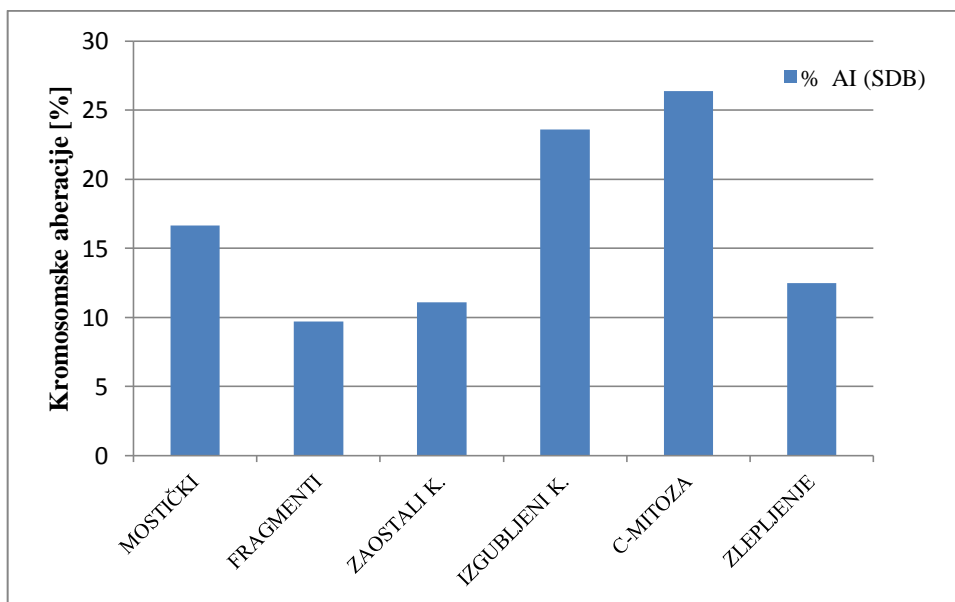
3.5 Kromosomske aberacije

Pred pregledom preparatov smo določili katere kromosomske aberacije bomo iskali oziroma jih opazovali. Beležili smo naslednje kromosomske aberacije: mostički, fragmenti, zaostali kromosomi, izgubljeni kromosomi, C – mitoza ter zlepljenja.



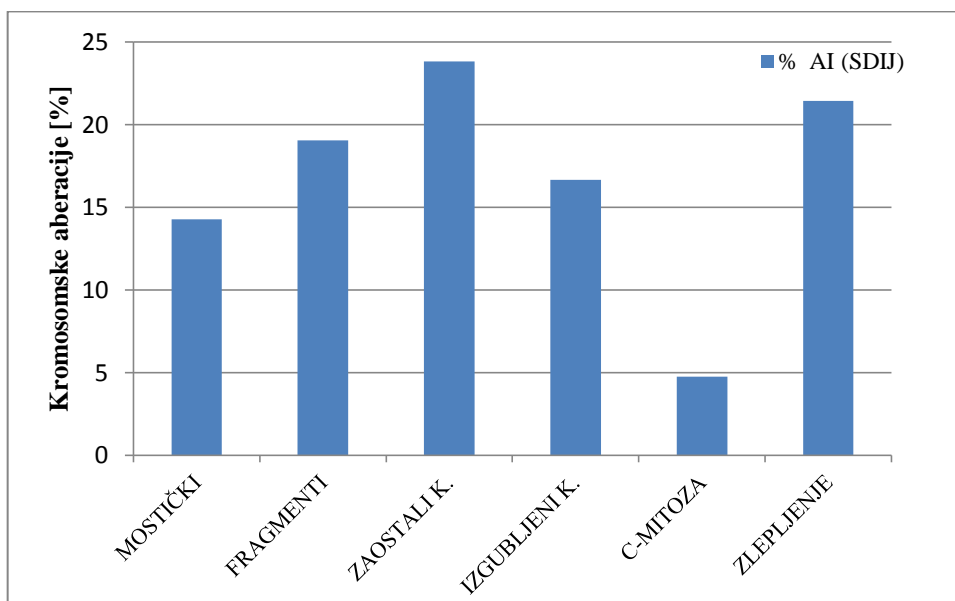
Slika 12: Delež kromosomskih aberacij, ki smo jih zabeležili v vzorcu BPG.

Iz slike 12 so razvidni deleži kromosomskih aberacij, ki smo jih zabeležili v vzorcu BPG. Po analizi aberacij smo ugotovili, da je največji delež izgubljenih kromosomov (29,5 %), deleži ostalih aberacij so bili: mostički (13,6 %), fragmenti (11,4 %), zaostali kromosomi (11,4 %), c-mitoza (11,4 %), zlepljenja (15,9 %).



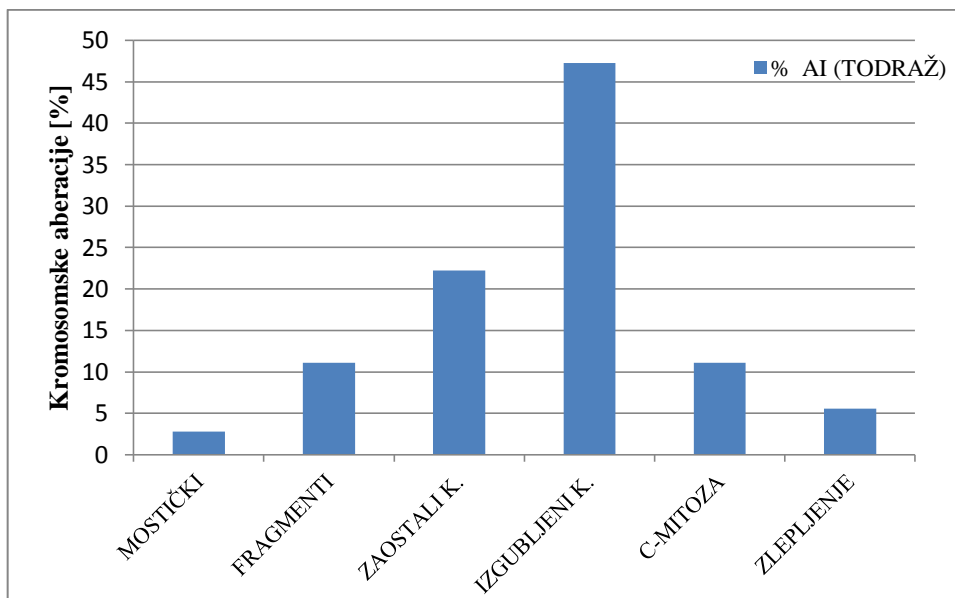
Slika 13: Delež kromosomskih aberacij, ki smo jih zabeležili v vzorcu SDB.

Iz slike 13 je razvidno, katere kromosomske aberacije smo zabeležili v vzorcu SDB; v tem vzorcu so prevladovali c-mitoze z največjim deležem (3,58 %), prav tako pa smo našli tudi veliko izgubljenih kromosomov (3,20 %). Najmanj pa je bilo zaostalih kromosomov (1,51 %). Deleži ostalih aberacij pa so bili: mostički (2,26 %), fragmenti (1,32 %), zlepljenja (1,69 %).



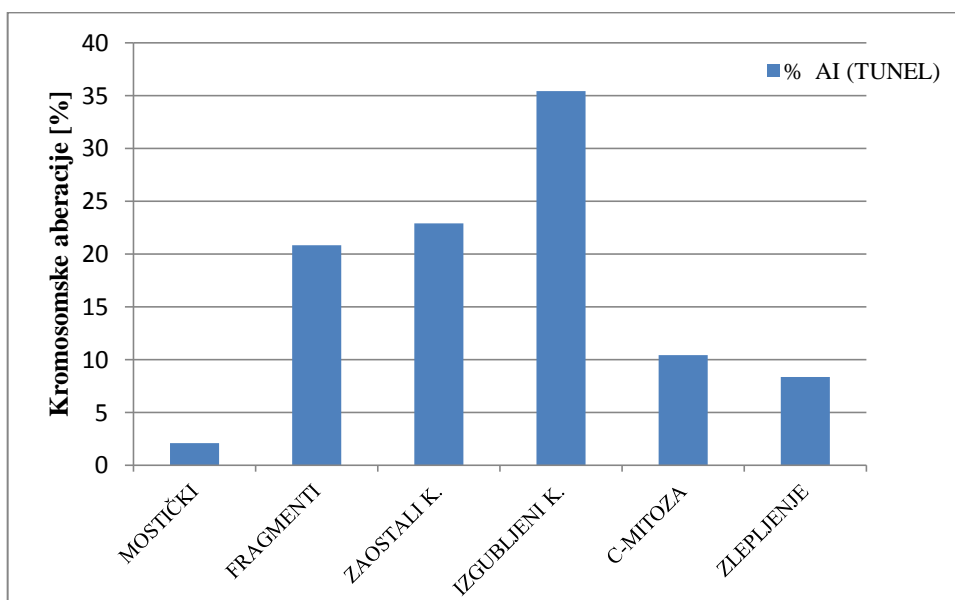
Slika 14: Delež kromosomskih aberacij, ki smo jih zabeležili v vzorcu SDIJ.

V SDIJ smo imeli največ zabeleženih zaostalih kromosomov (2,50 %) ter zlepljenj (2,25 %). Najmanjši delež smo zabeležili pri c-mitozah (0,50 %). Deleži ostalih aberacij so bili: mostički (1,50 %), fragmenti (2,00 %), izgubljeni kromosomi (1,75 %).



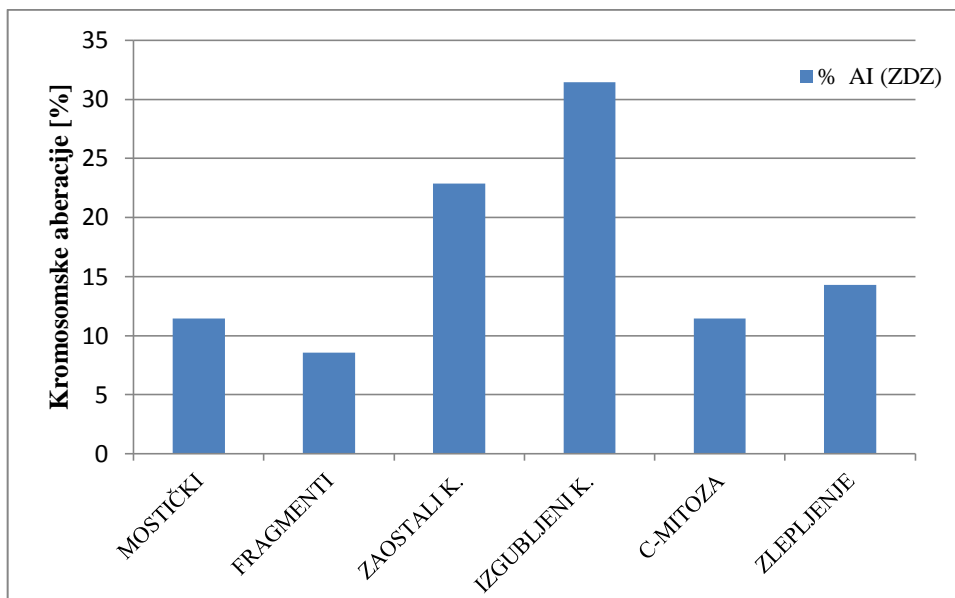
Slika 15: Delež kromosomskih aberacij, ki smo jih zabeležili v vzorcu TODRAŽ.

V vzorcu Todraž, smo zabeležili največ izgubljenih kromosomov (3,33 %), najmanj pa mostičkov (0,19 %). Deleži ostalih aberacij so bili: fragmenti (0,78 %), zaostali kromosomi (1,57 %), c-mitoza (0,78 %), zlepljenja (0,39 %).



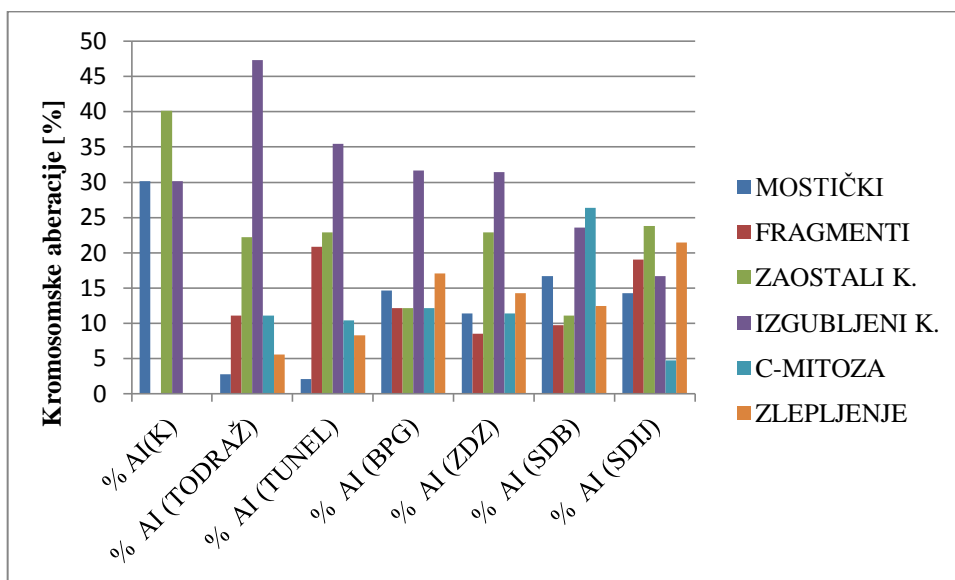
Slika 16: Delež kromosomskih aberacij, ki smo jih zabeležili v vzorcu TUNEL.

Prav tako kot v vzorcu TODRAŽ, je imel tudi vzorec TUNEL največji delež izgubljenih kromosomov (3,89 %), najmanj pa je bilo mostičkov (0,23 %). Deleži ostalih aberacij so bili: fragmenti (2,29 %), zaostali kromosomi (2,52 %), c-mitoza (1,14 %), zlepljenja (0,92 %).



Slika 17: Delež kromosomskih aberacij, ki smo jih zabeležili v vzorcu ZDZ.

Tudi v vzorcu ZDZ smo zabeležili največ izgubljenih kromosomov (2,36 %). Najmanjši delež smo zabeležili pri fragmentih (0,64 %) prav tako so imeli majhen delež mostički (0,86 %) in c-mitoza (0,86 %). Deleži ostalih aberacij so bili: zaostali kromosomi (1,71 %), zlepljenja (1,07%).



Slika 18: Delež vseh kromosomskih aberacij, ki smo jih zabeležili v posameznih vzorcih.

Slika 18 prikazuje delež vseh kromosomskih aberacij, ki smo jih našli v izcednih vodah z območja odlagališča hidrometalurške jalovine Boršt. Iz slike je razvidno, da izgubljeni kromosomi prevladujejo v vseh vzorcih, edino v SDIJ ne (tu prevladujejo zaostali kromosomi). Sami deleži aberacij variirajo, saj se njihovi deleži spreminjajo od enega vzorca do drugega.

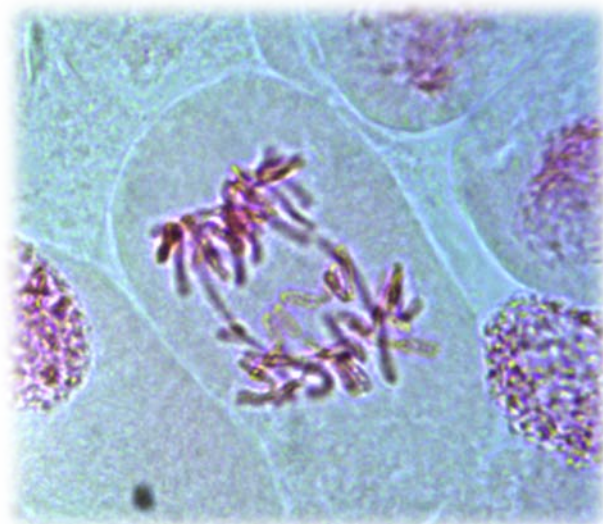
Po analizi kromosomih aberacij smo ugotovili, da večja koncentracija urana nima velikega vpliva na povečanje številčnosti klastogenih (strukturnih) kromosomskih aberacij; le-te so posledica radioaktivne snovi, saj je delež fragmentov v vseh vzorcih izcednih vod majhen.

Po pregledu aneugenih (sprememba v številu kromosomov) kromosomskih aberacij smo ugotovili, da je v vseh vzorcih izcednih vod velik delež izgubljenih kromosomov BPG (2,95 %), SDB (3,20 %), SDIJ (1,75 %), TUNEL (3,89 %), TODRAŽ (3,33 %), ZDZ (2,36 %). Ugotovili smo tudi, da so deleži vseh ostalih aneugenih kromosomskih aberacij v vseh vzorcih izcednih vod majhni.

Ugotovili smo, da se s povečevanjem koncentracije urana delež zlepljenj (aneugena kromosomska aberacija) in mostičkov (klastogene kromosomske aberacije) poveča v primerjavi z ostalimi aberacijami, delež izgubljenih kromosomov pa se zmanjša. Vzorec SDB, ki vsebuje največjo koncentracijo urana, ima tudi največji delež mostičkov (2,26 %) in velik delež zlepljenj (1,69 %). Prav tako velik delež mostičkov (1,50 %) in največji delež zlepljenj (2,25 %) vsebuje vzorec SDIJ.

3.5.1 Mostički

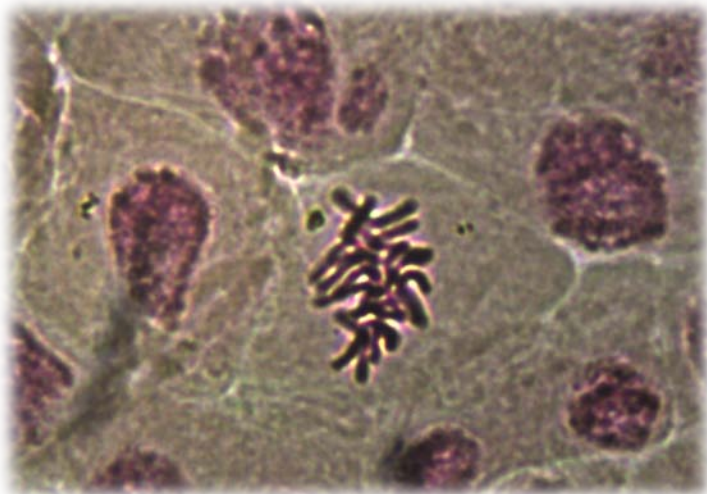
Mostičke smo opazili v vseh izpostavitvah vzorcev. Največ smo jih zabeležili v vzorcu SDB (2,26 %).



Slika 19: Mostiček v anafazi, vzorec SDB, 1000x povečava (Avtor: Eva Žun).

3.5.2 Fragmenti

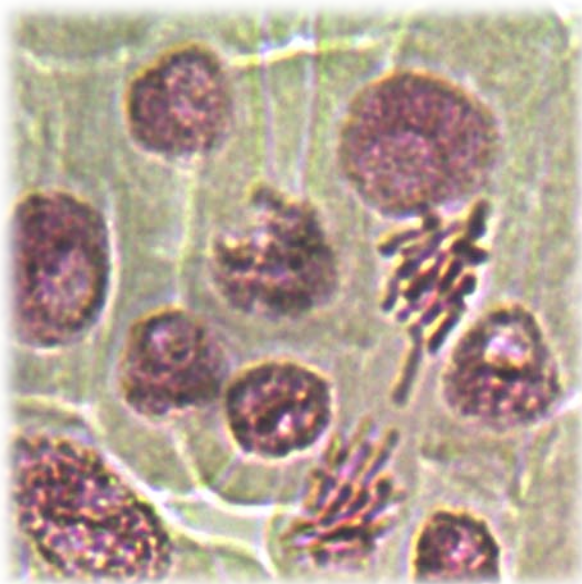
Fragmente smo zabeležili v vseh vzorcih izcednih vod, nismo pa jih opazili v kontrolnem vzorcu. Največji delež fragmentov je imel vzorec TUNEL (2,29 %).



Slika 20: Fragment v anafazi, vzorec TUNEL, 400x povečava (Avtor: Eva Žun).

3.5.3 Zaostali kromosomi

Zaostale kromosome smo zabeležili v vseh vzorcih vod. Največji delež smo zabeležili v vzorcu TUNEL (2,50 %).



Slika 21: Zaostali kromosomi v anafazi, 400x povečava (Avtor: Eva Žun).

3.5.4 Izgubljeni kromosomi

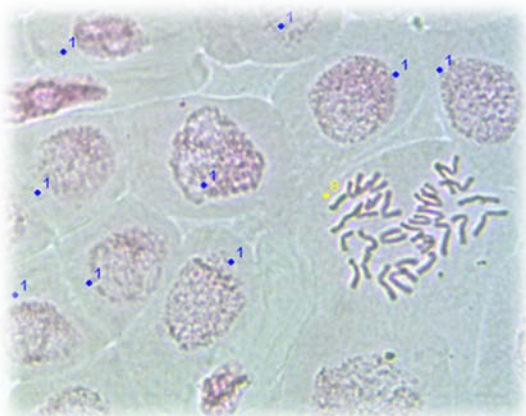
Delež izgubljenih kromosomov je bil v vseh vzorcih dokaj velik, največji je bil v vzorcu TUNEL (3,89 %)



Slika 22: Izgubljeni kromosom v anafazi, 400x povečava (Avtor: Eva Žun).

3.5.5 C-mitoza

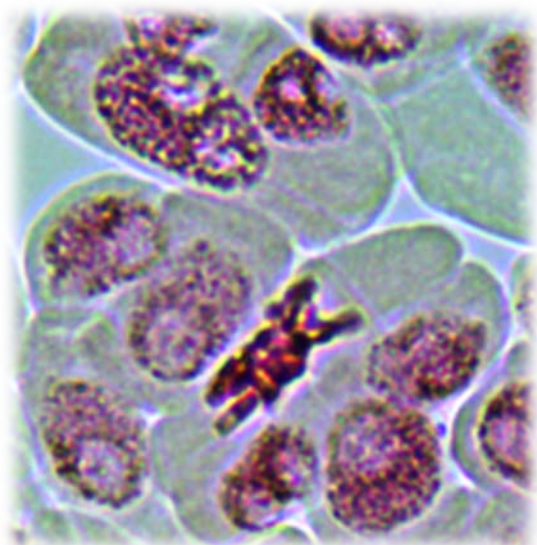
C-mitozo smo zabeležili v vseh vzorcih izcednih voda, ne pa tudi v kontrolnem vzorcu. Največji delež je bil v vzorcu SDB (3,58 %).



Slika 23: C-mitotiza, 400x povečava (Avtor: Eva Žun).

3.5.6 Zlepljenja

Zlepljenja smo zabeležili v vseh vzorcih izcednih voda, ne pa tudi v kontrolnem vzorcu. Največji delež zlepljenj je bilo v vzorcu SDIJ (2,25 %).



Slika 24: Zlepljena metafaza, 400x povečava (Avtor: Eva Žun).

Iz dobljenih deležev posameznih kromosomskih aberacij lahko sklepamo, da večja koncentracija urana najbolj vpliva na pojav zlepljenj in mostičkov. Medtem pa za ostale kromosomske aberacije ne moremo zaključiti, da različne koncentracije urana vplivajo na njihovo pojavljanje ali številčnost – že zelo majhne koncentracije imajo vpliv, nadaljnje povečanje pa ne kaže vpliva

Iz dobljenih rezultatov lahko delno potrdimo četrto hipotezo: Določene vrste kromosomskih aberacij so dobri pokazatelji prisotnosti urana.

4 ZAKLJUČEK

Za izvedbo *Allium* testa smo izpostavili 42 čebulic *Allium cepa* L. v šestih različnih vzorcih izcednih vod iz območja odlagališča Boršt (BPG, ZDZ, SDB, SDIJ, TUNEL, TODRAŽ) in enemu vzorcu pitne vode, ki nam je služil kot kontrola.

Za analizo vzorcev smo pripravili 35 preparatov iz sedmih vzorcev. Za vsak vzorec smo opravili pet ponovitev.

Po pregledu dolžinskega prirasta koreninic smo ugotovili, da imajo čebulice, ki so bile izpostavljene v pitni vodi najdaljše koreninice, najmanjši dolžinski prirast pa smo zabeležili pri vzorcu SDB.

Za izračun mitotskega indeksa smo prešteli 5000 celic pri vsakem vzorcu, 1000 celic na preparat. Največji mitotski indeks smo zabeležili v vzorcu kontrole, od vzorcev izcednih vod, pa je imel največji mitotski indeks vzorec SDB, najmanjšega pa vzorec TODRAŽ. Ugotovili smo, da na mitotski indeks vpliva že zelo majhna koncentracija urana v izcednih vodah, nato se vpliv z večanjem koncentracije bistveno ne spreminja več.

Z namenom določitve aberacijskega indeksa smo prešteli in pregledali 500 metafaz in anafaz v vsaki izpostavitvi, in sicer 100 metafaz in anafaz na en pregledan preparat. Največji aberacijski indeks smo izračunali pri vzorcu SDB, najmanjšega pri kontrolnem vzorcu.

Največji delež kromosomskih aberacij smo zabeležili v vzorcu SDB. Ugotovili smo, da na kromosomske aberacije vpliva že zelo majhna koncentracija urana v izcednih vodah, nato se vpliv z večanjem koncentracije bistveno ne spreminja več.

Po pregledu metafaz in anafaz smo opazovali naslednje kromosomske aberacije: mostičke, fragmente, zaostale kromosome, izgubljene kromosome, C-mitose, zlepljenja. Po analizi metafaz in anafaz smo ugotovili, da so v vzorcih z večjimi koncentracijami urana pogoste naslednje aberacije: zlepljenja in mostički.

Zaključili smo, da *Allium test* ni najbolj primerna metoda za ugotavljanje vpliva urana na mitotske indekse, aberacijske indekse ter kromosomske aberacije v vodi. Predlagali bi, da se na tem območju naredijo raziskave vpliva urana na mitotske indekse, aberacijske indekse ter kromosomske aberacije v prsti oziroma tleh, kjer je omogočen direktni privzem urana v koreninski del rastline.

5 LITERATURA

Barberio A., Voltolini J.C., Mello M.L.S., 2011, Standardization of bulb and root sample sizes for the *Allium cepa* test, *Ecotoxicology* 20, 927 – 935

Bickham, J. W., Sandhu, S., Hebert, P. D., Chikhi, L., & Athwal, R. (2000). Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutation research/Reviews in Mutation research*, 463(1), 33-51.

Blasco, C., & Picó, Y. (2009). Prospects for combining chemical and biological methods for integrated environmental assessment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28(6), 745-757.

Firbas P. 2011. Kemizacija in citogenetske poškodbe. Innova Eu d.o.o.

Fiskesjö G. 1985, The *Allium* test as a standard in environmental monitoring, *Hereditas* 102, 99-112

Grant W.F., 1999, Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations – a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals, *Mutation Research* 426, 107 – 112

Ivanova E., Staykova T., Velcheva I., 2008, Cytotoxicity and genotoxicity of heavy metal and cyanide – contaminated waters in some regions for production and processing of ore in Bulgaria, *Bulgarian journal of agricultural science* 14, 262 – 268

Khanna N., Sharma S. 2013, *Allium Cepa* Root Chromosomal Aberration Assay: A Review, *Indian J. Pharm. Biol. Res* Vol. 1 (3), 2013, str: 105-119

Kirkland, D. J., Henderson, L., Marzin, D., Müller, L., Parry, J. M., Speit, G., ... & Williams, G. M. (2005). Testing strategies in mutagenicity and genetic toxicology: an appraisal of the guidelines of the European Scientific Committee for Cosmetics and Non-Food Products for the evaluation of hair dyes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 588(2), 88-105.

Kovalchuk O., Kovalchuk I., Arkhipov A., Telyuk P., Hohn B., Kovalchuk L. 1998, The *Allium cepa* chromosome aberration test reliably measures genotoxicity of soils of inhabited areas in the Ukraine contaminated by the Chernobyl accident, *Mutation Research* 415, 1998, 47-57

Morais Leme D., Marin – Morales M.A., 2009, *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application, *Mutation Research* 682, 71-81

Petkovšek S.A.S., Zaluberšek M., Pokorny B. (2008), Biološki monitoring vpliva odlagališč rudniške jalovine Jazbec in hidrometalurške jalovine Boršt – citogenetske analize, Poročilo, ERICo Velenje, Velenje, 1 – 13, 15 – 16, 18, 26 – 37, 47 – 52

Rank J., Nielsen M.H., 1993, A modified *Allium* test as a tool in the screening of genotoxicity of complex mixtures, *Hereditas* 118, 46 – 53

Rank J., Nielsen M.H., 1998, Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase – telophase chromosome aberration assay, *Mutation Research* 418, 113 – 119

Rojc J. (2007), Poročilo o izvajanju nadzora vpliva Rudnika Žirovski vrh na okolje za leto 2006, RŽV d.o.o., Todraž, 5 – 25

Rojc J. (2010), Letno poročilo o izvajanju varstva pred IO sevanji in o vplivu Rudnika Žirovski vrh na okolje za leto 2010, RŽV d.o.o., Todraž, 12 – 32

RŽV (2011), Prospekt – Sanacija in končna ureditev, dolgoročno upravljanje

RŽV (2005), Prospekt – Spremljanje vplivov ionizirajočega sevanja rudnika urana Žirovski vrh na okolje

Sinkovič T., 2008, Mitoza in celični cikel pri višjih rastlinah, *Acta Agruculturae Slovenica* 91, 465 - 477

Stritar A., Istenič R. (1997), Najpogostejša vprašanja in odgovori o radioaktivnih odpadkih, 14 – 19

Tedesco S.B., Laughinghouse IV H.D. (2012), Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* test, *Environmental Contamination* 8, 137 - 156

Wolska, L., Sagajdakow, A., Kuczyńska, A., & Namieśnik, J. (2007). Application of ecotoxicological studies in integrated environmental monitoring: possibilities and problems. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26(4), 332-344.

PRILOGE

PRILOGA A: Dolžine koreninic šalotke izmerjene v vsakem vzorcu po 96 urah.

Številka vzorca	Vzorec	Koreninica	Zaporedna številka merilnega valja (cm)				
			1	2	3	4	5
1	K	max	5,4	5,4	5,7	5	5,7
		min	0,6	0,3	0,5	0,4	0,3
2	BPG	max	4,5	4,7	5,2	4,1	5,8
		min	0,7	0,5	0,5	0,5	0,9
3	SDB	max	4,6	4,2	2,9	3	3,8
		min	0,6	0,5	0,3	0,6	0,6
4	SDIJ	max	5,3	4,6	5,4	4,8	4,5
		min	0,8	0,8	0,4	0,4	0,6
5	TUNEL	max	4,2	4,1	5,6	4,3	5
		min	0,6	0,5	0,8	0,6	0,5
6	TODRAŽ	max	5,4	5,1	5,9	4,6	4,3
		min	0,4	0,7	0,5	0,6	0,7
7	ZDZ	max	4,8	5,5	6,8	4,3	5,4
		min	0,4	0,7	0,7	0,5	0,5

Opombe: K-kontrola, BPG-Boršt glavni potok, SDB-skupna drenaža Boršt, SDIJ-skupna drenaža odlagališča hidrometalurške jalovine Boršt, ZDZ-zaledna drenaža zahod.

PRILOGA B: Rezultati prešteti celic po 96 urah (4 dan), ki so bile preštete za izračun mitotskega indeksa.

Številka vzorca	Vzorec	Interfaze	Profaze	Metafaze	Anafaze	Telofaze
1	K1	1014	35	15	4	20
	K2	1049	26	12	7	13
	K3	1056	39	14	14	8
	K5	1100	34	17	3	7
2	BPG1	960	36	17	3	4
	BPG2	990	43	14	6	6
	BPG 3+4	1998	52	15	5	3
	BPG5	1007	19	10	1	1
3	SDB1	946	30	8	5	12
	SDB2	962	31	18	2	5
	SDB 3+4	2145	70	14	15	12
	SDB5	1069	19	12	2	10
4	SDIJ1	1010	25	7	7	4
	SDIJ2	1003	23	5	1	8
	SDIJ 3+4	2074	51	21	9	5
	SDIJ5	958	25	10	2	7
5	TUNEL1	985	10	4	1	0
	TUNEL2	971	17	3	4	5
	TUNEL 3+4	1993	69	19	10	12
	TUNEL5	979	12	6	2	1
6	TODRAŽ1	984	2	10	4	0
	TODRAŽ2	986	9	5		
	TODRAŽ 3+4	1992	46	21	11	19
	TODRAŽ5	974	16	5	4	1
7	ZDZ1	967	25	1	5	2
	ZDZ2	972	12	6	7	3
	ZDZ 3+4	1975	66	19	8	4
	ZDZ5	976	14	6	1	3

Opombe: K-kontrola, BPG-Boršt glavni potok, SDB-skupna drenaža Boršt, SDIJ-skupna drenaža odlagališča hidrometalurške jalovine Boršt, ZDZ-zaledna drenaža zahod.

PRILOGA C: Rezultati prešteti celic po 168 urah (7 dan), ki so bile preštete za izračun mitotskega indeksa

Številka vzorca	Vzorec	Interfaze	Profaze	Metafaze	Anafaze	Telofaze
1	K1	967	22	5	5	1
	K2	966	19	8	3	4
	K3	990	30	18	0	7
	K4	892	50	9	1	5
	K5	962	16	16	3	3
2	BPG1	1000	0	0	0	0
	BPG2	972	13	8	3	4
	BPG3+4	1070	23	4	2	1
	BPG5	986	6	3	4	1
3	SDB1	961	39	0	0	0
	SDB2	949	22	14	8	7
	SDB3	907	42	13	4	5
	SDB4	1020	30	11	2	5
	SDB5	948	22	19	6	5
4	SDIJ1	967	7	17	6	3
	SDIJ2	953	33	4	8	2
	SDIJ3	982	36	6	1	1
	SDIJ4	752	17	0	0	1
	SDIJ5	960	18	12	5	5
5	TUNEL1	1000	0	0	0	0
	TUNEL2	1000	0	0	0	0
	TUNEL3	1003	47	10	6	1
	TUNEL4	900	25	7	6	2
	TUNEL5	1000	0	0	0	0
6	TODRAŽ1	1000	0	0	0	0
	TODRAŽ2	979	10	5	4	2
	TODRAŽ3	1000	0	0	0	0
	TODRAŽ4	1085	31	13	7	12
	TODRAŽ5	1000	0	0	0	0
7	ZDZ1	982	5	2	7	4
	ZDZ2	998	2	0	0	0
	ZDZ3	965	12	9	3	3
	ZDZ4	1000	0	0	0	0
	ZDZ5	955	26	11	7	1

Opombe: K-kontrola, BPG-Boršt glavni potok, SDB-skupna drenaža Boršt, SDIJ-skupna drenaža odlagališča hidrometalurške jalovine Boršt, ZDZ-zaledna drenaža zahod.

*rezultate sedmega dne smo uporabili kot primerjavo citogenetskim raziskavam – *Allium* testa, ki ga je ERICo d.o.o. zvedel leta 2008 na območju Rudnika Žirovski Vrh in jih v diskusiji nismo natančneje interpretirali.

PRILOGA D: Rezultati pregledanih metafaz in anafaz ter analiza kromosomskih aberacij po 96 urah.

ŠT. VZORCA	VZOREC	METAFAZA	ANAFAZA	MO	FR	ZA	IZG	CM	ZL
1	K1	70	30			1			
	K2	73	27			1	1		
	K3	73	30	2			1		
	K4	73	28	1					
	K5	79	21			2	1		
2	BPG1	75	24	3	1	1	3	1	
	BPG2	74	26		3	3			1
	BPG3	60	30	1			5	2	2
	BPG4	55	33	2	1		3		4
	BPG5	39	4			1	2	2	
3	SDB1	78	20	2	1	3		1	3
	SDB2	75	16	1	2	3	4	7	
	SDB3	70	30	5	2		4	2	1
	SDB4	67	36	4	1		4	2	3
4	SDB5	71	20		1	2	5	7	2
	SDIJ1	78	17	1	3	3	2	1	4
	SDIJ2	78	21	2	1	3			1
	SDIJ3+4	72	19	2	2		1		4
	SDIJ5	77	22	1	2	4	4	1	
5	TUNEL1	27	9			4		1	
	TUNEL2	63	35		2	3	3	2	
	TUNEL3+4	120	56	1	6		12	1	4
	TUNEL5	77	22		2	4	2	1	
6	TODRAŽ1	74	26			4	2		
	TODRAŽ2	80	18		1	1	4	2	
	TODRAŽ3+4	138	56	1	1		11	2	1
	TODRAŽ5	79	20		2	3			1
7	ZDZ1	60	29	2	1	2	3		
	ZDZ2	67	32			4	1		1
	ZDZ3+4	120	43	1	2		5	4	3
	ZDZ5	70	29	1		2	2		1

Opombe: K-kontrola, BPG-Boršt glavni potok, SDB-skupna drenaža Boršt, SDIJ-skupna drenaža odlagališča hidrometalurške jalovine Boršt, ZDZ-zaledna drenaža zahod.

PRILOGA E: Rezultati pregledanih metafaz in anafaz ter analiza kromosomskih aberacij po 168 urah.

ŠT. VZORCA	VZOREC	METAFAZE	ANAFAZE	MO	FR	ZA	IZG	CM	ZL
1	K1	80	20				1		
	K2	76	23			1			1
	K3	70	30				2	1	
	K4	73	25				1		
	K5	75	25			2			
2	BPG2	75	25		3	2	1		
	BPG3+4	12	1				3		
	BPG5	52	17		3	3	1		
3	SDB1	18	1	1			1	5	
	SDB2	75	25	1	2	4	1		
	SDB3	64	24		1	6			5
	SDB4	50	17				8		1
	SDB5	68	32	1	1	4	3		
4	SDIJ1	76	24	1	2	2	3		
	SDIJ2	71	27	1	1	3	2		2
	SDIJ3+4	69	27	2	1		2	1	4
	SDIJ5	76	22		3	3	4		2
5	TUNEL3	66	22	3	1		5		3
	TUNEL4	66	22		1		7	1	3
6	TODRAŽ2	70	26	1		4	1		4
	TODRAŽ3+4	73	26	5	1		1		
7	ZDZ1	70	30	2	1	5	2		
	ZDZ2	8				1			1
	ZDZ3+4	46	17				3	2	3
	ZDZ5	75	25	1	1	2	3		

Opombe: K-kontrola, BPG-Boršt glavni potok, SDB-skupna drenaža Boršt, SDIJ-skupna drenaža odlagališča hidrometalurške jalovine Boršt, ZDZ-zaledna drenaža zahod.

*rezultate sedmega dne smo uporabili kot primerjavo citogenetskim raziskavam – *Allium* testa, ki ga je ERICo d.o.o. zvedel leta 2008 na območju Rudnika Žirovski Vrh in jih v diskusiji nismo natančneje interpretirali.