PROCJENA KVALITETE VODE RIJEKE RIJEČINE-ALLIUM CEPA TEST

Pereza, Josipa

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:177924

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository

zir.nsk.hr

UNIRI DIGITALNA KNJIŽNICA

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI TUDIJ

SANITARNOG INŽENJERSTVA

Bacc.san.ing. Josipa Pereza

PROCJENA KVALITETE VODE RIJEKE RIJEČINE - *ALLIUM CEPA* TEST

Diplomski rad

U Rijeci, 2019

SADRŽAJ

SAŽETAK....3

SUMMARY....4

1. UVOD....5

1.1. Biotestovi....7

1.2. *Allium cepa* test....9

1.3. Karakteristike toka Rječine....12

2. CILJ ISTRAŽIVANJA....14

3. MATERIJALI I METODE....15

3.1. Lokacije uzorkovanja vode....15

3.2. Materijali....16

3.3. Metode....17

3.3.1. *Allium cepa* test....17

3.3.2. Priprema mikroskopskih preparata....19

3.3.3. Mikroskopiranje....19

3.3.4. Procijena citotoksičnosti....20

3.3.4.1. Određevanje inhibicije rasta korijenčića luka....20

3.3.4.2. Određivanje mitotičkog indeksa....21

3.3.5. Procijena genotoksičnosti....21

3.3.6. Statistička analiza....21

4. REZULTATI....22

4.1. Procijena citotoksičnosti....22

4.1.1. Određivanje inhibicije rasta korijena crvenog luka....22

4.2. Mitotički indeks....23

4.3. Procijena genotoksičnosti....24

5. RASPRAVA....27

6. ZAKLJUČAK....31

7. LITERATURA....32

8. PRILOG....36

9. ŽIVOTOPIS....37

DIPLOMSKI RAD

Mentor rada: Doc.dr.sc. Jadranka Vraneković, prof.

Diplomski rad obranjen je dana _____ u/na _____

_____, pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____
2. _____
3. _____

Rad ima _____ stranica, _____slika, _____tablica, _____literaturnih navoda.

SAŽETAK

Uvod :

Kanjon i dolina Rječine predstavlja vrlo značajan ekosustav koji je dijelom uvršten u ekološku mrežu Natura 2020 što obvezuje sačuvati postojeću bioraznolikost. Gospodarski razvoj doveo je do preoblikovanja toka Rječine, a brojna nelegalna odlagališta otpada kao i otpadne vode s komunalnih, industrijskih te poljoprivrednih površina dodatno ugrožavaju usluge ovog ekosustava te imaju utjecaj i na bioraznolikost.

Cilj istraživanja :

Cilj ovog istraživanja je procijeniti kvalitetu vode srednjeg i donjeg toka Rječine upotrebom *Allium cepa* testa.

Materijali i metode :

Uzorkovanje vode obavljeno je na dvije postaje na srednjem i donjem toku Rječine tijekom rujna 2018. godine. Citotoksičnost je procjenjena na temelju rasta korijenčića luka (učestalost inhibicije i mitotičkog indeksa) dok je genotoksičnost procijenjena na temelju broja prisutnih kromosomskih aberacija.

Rezultati :

Utvrđen je smanjen rast meristemskih stanica korjenčića luka te manji mitotočki indeks u uzorcima vode donjeg i srednjeg toka u odnosu na negativnu kontrolu. Broj kromosomskih aberacija najveći je u donjem toku.

Zaključak:

Utvrđeni biološki efekt na meristemske stanice luka srednjeg i donjeg toka Rječine ukazuju na prisutnost citotoksične i genotoksične tvari ili više njih, koje je potrebno dokazati drugim metodama. Sustavni biomonitoring u cilju poboljšanja održivosti usluga ekosustava te njegove bioraznolikosti trebao bi biti dio stalnog praćenja kvalitete svakog vodenog ekosustava.

SUMMARY

Introduction:

The canyon and the Rječina valley is a very important ecosystem, which is partly included in the Natura 2020 ecological network and thus obligates to preserving the existing biodiversity. Economic development has led to the transformation of the Rječina river, and numerous illegal landfills as well as wastewater from municipal, industrial and agricultural areas further impend the services of this ecosystem and have an impact on biodiversity.

The goal of the research:

The aim of this study was to evaluate the water quality of the middle and downstream course of the Rječina river using the *Allium cepa* test.

Materials and methods:

Water sampling was carried out at two stations in the middle and downstream course of Rječina during September 2017. Cytotoxicity was assessed based on onion root growth (incidence of inhibition and mitotic index), while genotoxicity was evaluated based on the number of chromosomal aberrations.

Results:

Decreased growth of meristem cells of the onion root and a lower mitotic index in the middle and downstream courses of the Rječina compared to the negative control were found. The number of chromosomal aberrations is highest in the downstream.

Conclusion:

The measured biological effect of water Rječina on the meristem cells of the onions indicate the presence of cytotoxic and genotoxic substance, which need to be verified by other methods. Systematic biomonitoring of the water ecosystem in order to sustain the ecosystem services and its biodiversity should be included to improve water quality management.

1. UVOD

Vodeni ekosustav dijeli se na slatkovodni ekosustav i morske vode. U slatkovodni ekosustav ubrajaju se kopnene vode koje imaju tri osnovne grupe, a to su stajaćice, podzemne vode i tekućice (1). Svaka grupa slatkovodnog ekosustava ima neke svoje funkcije koje doprinose dobrobiti društva u cjelini što se naziva „usluga ekosustava“ (2). U novije vrijeme velika se pažnja poklanja uslugama ekosustava u sklopu promicanja zaštite okoliša i unaprijeđena kvalitete života. Usluga slatkovodnog, konkretno riječnog ekosustava se očituje u njegovoj važnosti kao izvora pitke vode neprocjenjivog za zdravlje i kvalitetu života čovjeka. Nadalje, značajna usluga riječnog ekosustava očituje se i u njegovoj važnosti u kruženju tvari i energije što je neophodno u održavanju ravnoteže ekosustava, ali i bioraznolikosti istog. Očuvani slatkovodni ekosustavi dugoročno predstavljaju osnovu za očuvanje bioraznolikosti ali neposredno i zdravlja čovjeka (2). Gospodarski razvoj s ciljem porasta životnog standarda, zahtijevao je preoblikovanje okoliša pa su zbog tih razloga mnogobrojni slatkovodni ekosustavi, pogotovo rijeke i jezera izloženi povećanoj eutrofikaciji. Svaka eutrofikacija dovodi do promjena i narušavanja kvalitete staništa kako bentosa tako i površinskih kopnenih voda, limniona (3). Ispuštanjem otpadnih voda kako komunalnih tako i industrijskih, te procjednih voda s neuređenih odlagališta otpada, kao i procjednih voda s poljoprivrednih površina na kojima se koriste ne samo umjetna gnojiva već i različiti pesticidi i herbicidi, čovjek je dodatno opteretio rijeke raznim organskim i anorganskim tvarima (4). Nadalje, različiti zahvati u svrhu regulacije vodotoka zbog obrane od poplava ili navodnjavanja kao i za potrebe hidroelektrana, također imaju negativan utjecaj na staništa površinskih kopnenih voda. Zbog svih tih antropogenih utjecaja, danas su riječni ekosustavi znatno promijenjeni u odnosu na industrijsko vrijeme. Iz tog razloga razvijene su mnogobrojne metode monitoringa površinskih voda koje podrazumijevaju sustavno i organizirano praćenje promjena s ciljem pravovremenog otkrivanja negativnih posljedica u određenom vremenu i prostoru (4).

Naime, sustavno praćenje fizikalno-kemijskih i mikrobioloških parametara na samom izvoru rijeke koji se iskorištava kao izvor pitke vode, zakonski je regulirano (5). Međutim, za očuvanje bioraznolikosti, ali i održivog razvoja usluga riječnog ekosustava nužno je pratiti kvalitetu vode duž cijelog toka što uključuje i srednji i donji tok koji najčešće prolaze kroz urbana i/ili industrijska središta. Obzirom na veliki raspon tvari koje dospijevaju u jedan vodeni ekosustav skupo je provoditi sistemske i analitičke fizikalno –kemijske analize duž cijelog toka. Stoga su metode monitoringa vrlo prihvatljive u svrhu prve procijene stanja kvalitete površinskih voda. Biomonitoring predstavlja relativno jednostavnu i jeftinu metodu kojom se može obuhvatiti veće područje vodenog ekosustava (6). Biomonitoring se definira kao čin promatranja i procjene stanja i stalnih promjena u ekosustavima, komponentama biološke raznolikosti i krajobraza, uključujući vrste prirodnih staništa, populacije i vrste. Može se zasnivati i na fiziološkim metodama kojima se mjeri biološka aktivnost pojedinog organizma. Biomonitoringom se dobiva uvid u promjene u ekosustavu i u slučaju negativnih promjena može se izvršiti kemijska analiza specifičnih supstanci na određenoj lokaciji (7).

S obzirom da vodeni ekosustav može biti opterećen različitim tipovima otpadnih voda neke od njih mogu sadržavati tvari koje su citotoksične, ali i one koje su genotoksične. Onečišćivači okoliša koji su citotoksični uzrokuju promjene u stanici, koje se očituju u promijenjenom rastu i razvoju. Genotoksične tvari ili agensi dovode do promjena u genetičkom materijalu stanice odnosno mutacija. Inducirane mutacije dijelimo na genske mutacije i mutacije na nivou kromosoma (8). Mutacije dovode do promjena u transkripciji gena kao i u regulaciji staničnog ciklusa, i neke od njih se mogu popraviti mehanizmima popravka koje posjeduje stanica dok neke mutacije mogu dovesti i do smrti stanice. Inducirane mutacije najčešće su posljedice djelovanja kemiskih mutagena (8). Metali, fenoli, organski i anorganski spojevi te pesticidi najčešći su zagađivači prisutni u vodi (9). Nadalje, zagađivači prisutni u vodenim ekosustavima mogu imati klastogene učinke što podrazumijeva lomove genetičkog

materijala, ili s druge strane mogu dovesti do nepravilnog razdvajanja kromosoma tijekom mitoze odnosno imati aneugeni učinak. Konačni efekti učinka jednog takvog agensa ovise o koncentraciji i vremenu izloženosti kao i o metaboličkoj pretvorbi u organizmu. Naime, neki organizmi posjeduju enzime koji mogu promutagene tvari metabolizirati u mutagene dok drugi ne posjeduju takve enzime (8). Iz tog razloga dolazi do razvoja nekih bolesti kao i razvoja nekih vrsta tumora u čovjeka. Svaki kemijski mutagen ima drugačiji učinak u ljudskome tijelu. S obzirom na to razlikujemo monitoring biokemijskog učinka koji služi za klasifikaciju reaktivnih štetnih tvari, količinski monitoring kojim se utvrđuju štetne tvari i njihovi metaboliti u ljudskom organizmu te biološki monitoring kojim se utvrđuje učinak uzrokovan štetnim kemijskim čimbenicima (10).

1.1. Biotestovi

Standardne analize kvalitete površinskih voda određuju fizikalno-kemijske i mikrobiološke parametre, ali ne daju informacije o biološkim učincima zagađivača koji mogu biti prisutni u vodi u vrlo malim koncentracijama koje se ne mogu odrediti analitički (4). Saznanja da kemijski spojevi u okolišu mogu dovesti do različitih promjena u genomu organizama glavni je razlog razvoja metoda kojima se mogu determinirati citotoksični i genotoksični učinci kemijskih spojeva i smjesa koje mogu biti prisutne u vodenom ekosustavu (11). Biomonitoring vodenog ekosustava upotrebom biotestova pokazao se vrlo učinkovit u otkrivanju prisutnosti citotoksičnih i genotoksičnih agenasa u vodenom ekosustavu. Biotestovi za procjenu kvalitete vode zasnivaju se na činjenici da biljni i životinjski organizmi različito reagiraju na onečišćenje. Stupanj reakcije na onečišćenje zavisi o osjetljivosti organizma te od vrste i koncentracije kemijske supstance. Za procjenu onečišćenja voda, to jest , za procjenu citotoksičnog ili genotoksičnog onečišćenja koriste se mikroorganizmi, stanice sisavaca i biljke. Kvaliteta vodenog ekosustava procjenjuje se na temelju stope smrtnosti organizma, inhibicije razmnožavanja, fototaksične reakcije kao i rasta korjenčića (12). Neki od biotestova koji se

nalaze u službenoj upotrebi su: *Paramecium* test, gdje je glavni test organizam *Protoza*, odnosno papučica *Paramecium caudatum*. *Tubifeks* test, gdje se kao organizam koristi oligoheta *Tubifex tubifex*. *Dafnia* test, čiji je organizam velika vodena buva ili niži račići kao *Daphnia magna*. *Azelus* test sa glavnim test organizmom *Asellus aqaticus*, odnosno vodena babura. *Gupi* test, gdje je test organizam riba gupi, *Formidium* test, gdje je test organizma modrozelena alga *Phormidium autumnale*. *Test klijavosti*, gdje je test organizam slačica, *Sinapis alba*. *Lepidium* test sa test organizmom *Lepidium sativum*, odnosno vrtna salata. *Allium* test gdje je temeljni test organizam *Allium cepa*, odnosno luk (4).

Senzitivnost, jednostavnost, mogućnost ponavljanja te niska cijena čine biotestove na biljakama pogodnijima za biomonitoring stanja kvalitete vodenog ekosustava u odnosu na testove s mikroorganizmima i sisavacima (4). Testirane biljke mogu biti direktno izložene kompleksnoj mješavini ispitivanih kemikalija ili uzorku iz okoliša kako u laboratoriju tako i u *in situ* uvjetima. Neke biljke zbog dostatno velikih kromosoma pogodne su za citotoksične ali i genotoksične analize uzoraka iz vodenih ekosustava. Naime, kemijski spoj/spojevi prisutan u vodi mogu uzrokovati inhibiciju staničnog ciklusa te promjene u broju i strukturi kromosoma (11). Upotrebu biljnih biotestova u svrhu biomonitoringa genotoksičnosti zagađivača u vodenim ekosustavima odobrila je Svjetska zdravstvena organizacija (WHO), zatim IPCS (engl. International Program Chemical Saftey) i UNEP (engl. United Enviromental Program)(7,12). Za biominitoring genotoksičnosti površinskih voda koriste se biljke kao što su ječam (lat. *Hordeum vulgare - 2n=14*), grašak (lat. *Pisum sativum - 2n=14*), kukuruz (lat *Zea mays - 2n=20*) pomoću kojih se mogu detektirati kako genske tako i kromosomske mutacije. Talijin uročnjak (lat.Arabidopis thaliana – 2n=10) česta eksperimentalna biljka u molekularnoj biologiji za potrebe biomonitoringa kvaliteta površinskih voda koristi se za detekciju isključio genskih mutacija. Bob (lat. *Vicia faba* - 2n=12) je biljka s malim brojem, ali relativno velikim kromosomima pa se mogu detektirati kromosomske aberacije u somatskim stanicama, ali i

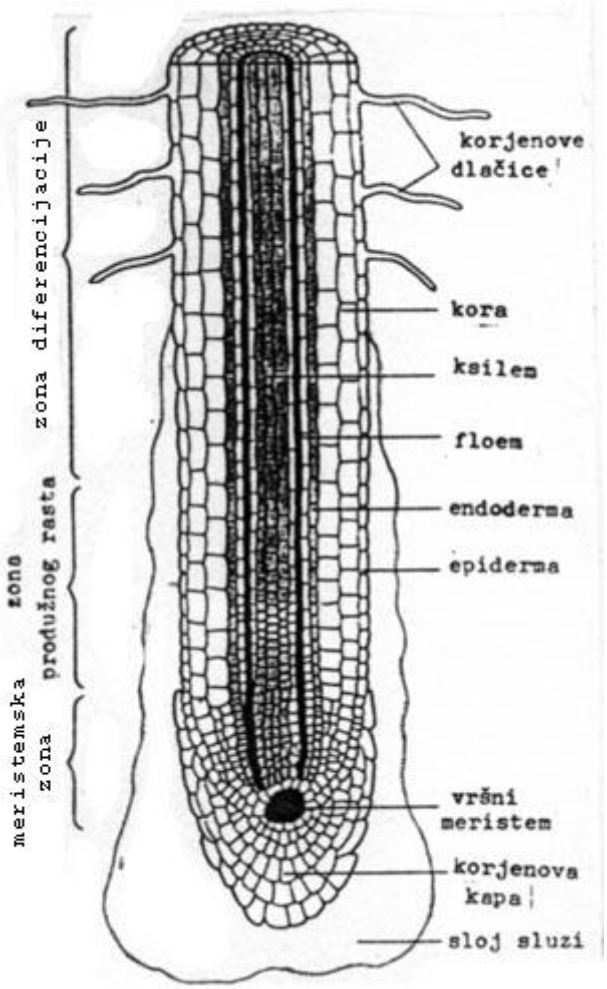
pojava mikronukleusa u stanicama korijena (12). Mikronukleus označava malu jezgricu, odnosno samostalnu kromatinsku strukturu koja se nalazi u citoplazmi, a nastaje kao posljedica nepravilnog razdvajanja kromosoma zbog abnormalnosti diobenog vretena ili loma kromosoma koji rezultira acentričnim fragmentom, dicentričnim kromosomom ili kromatinskim mostom (13). Formiranje mikronukleusa može ukazati na prisutnost kemijskog mutagena u ispitivanom uzorku vode koji ima anaugeni ili klastogeni učinak.

1.2. *Allium cepa* test

Luk ili Allium cepa L. je biljka koja se koristi za procjenu onečišćenja okoliša odnosno slatkovodnih ekosustava koristi već dugi niz godina (4). U odnosu na druge biljne vrste koje se koriste u biotestovima ova biljka posjeduje enzime koji omogućuju metaboličku aktivaciju promutagena u mutagen, što ju čini vrlo senzitivnom u detekciji citotoksičnih i genotoksičnih tvari/spojeva. To je biljka s vrlo pogodnom staničnom kinetikom koja se očituje u brzom rastu korijena, velikim brojem stanica u mitozi, visoke tolerancije na različite uvjete kultivacije, lako se njome rukuje te ima mali broj relativno velikih kromosoma (2n=16). Ovaj test sistem učestalo se koristi za ispitivanje kvalitete površinskih voda, procijeđenih voda iz komunalnih odlagališta, otpadnih voda za koje se sumnja da su onečišćene organskim i anorganskim spojevima te teškim metalima (14). Naime, meristemske stanice korijena luka vrlo su osjetljive na citotoksične i genotoksične spojeve upravo iz razloga što su one prve izložene djelovanju kemijskih mutagena. Meristemske stanice nalaze se u meristemskoj zoni, dijelu korijena s učestalom staničnom diobom, u suprotnom smjeru prema bazi korijena nalaze se stanice koje će kasnije ući u produžni rast. U zoni produžnoga rasta stanična dioba se nastavlja, ali smanjenim intenzitetom (Slika 1) (15). Učinak kemijskih mutagena očituje se u inhibiciji ili usporenom rastu meristemskih stanica korjenčića luka te promjenama u broju i strukturi kromosoma. Inhibicija rasta korijena luka i mitotički indeks su parametri na temelju kojih se procjenjuje prisutnost citotoksičnog agensa u ispitivanom uzorku vode. Mitotički indeks je

parametar koji omogućuje procjenu učestalosti stanica u diobi i povezan je s općim rastom korijena biljke. Ukoliko ispitivani uzorak sadrži veće koncentracije toksične tvari to će mitotski indeks biti manji, a time i rast korijena usporen u odnosu na kontrolu. Kromosomske promijene očituju se kao slijepljeni kromosomi, vise polarne anafaze, anafazni mostovi, kromosomski lomovi, c-mitoza ili c-metafaza i mikronukleus (16). Slijepljeni kromosomi (*engl. stickiness*) pojavljuju se kao posljedica nepravilnog smatanja kromatina koje može uzrokovati toksični agens i takve promjene nisu ireverzibilne. Vise polarne anafaze opisuju aberaciju kod koje dolazi do pojave većeg broja polova diobenog vretena. Nadalje, tijekom anafaze može se dogoditi da se telomere sestrinskih kromatida ne odvoje u potpunosti već ostanu povezane, odnosno segradirane, i takvu formaciju nazivamo anafaznim mostom. Genotoksični učinak neke tvari može rezultirati kromosomskim lomom koji rezultira acentričnim fragmentom te trajnim gubitkom genetičkog materijala. Lomovi se mogu dogoditi na jednoj ili obje kromatide, pa razlikujemo kromatidni i kromosomski lom. Nadalje, uslijed toksičnog djelovanja neke tvari na inaktivaciju mikrotubula diobenog vretena može doći do pojave c-mitoze. Kod c-mitoze, anafazni, jednokromatidni kromosomi ostaju u ekvatorijalnoj ravnini stanice što se često vizualizira kao prsten (12).

Brojni publicirani radovi ukazuju da *Allium cepa* test ima prednost pred ostalim biotestovima zbog svoje senzitivnosti i jednostavnosti, ali i ekonomičnosti. Nedostaci ovog testa u odnosu na biotestove koji koriste bakterije, kvasce ili vinsku mušicu očituju se u dužem životnom ciklusu biljke (14).



Slika 1. Dijelovi korijena luka

(preuzeto iz Praktikum iz fiziologije bilja, Botanički zavod, Prirodoslovno-matematički fakultet)

3.1.Karakteristike toka Rječine

Tok Rječine prolazi kroz krško područje zaleđa grada Rijeke dužinom od oko 17 km. Porječje obuhvaća 234,144750 km2 uključujući vrhove kao što su Obruč, Snježnik i Risnjak. Rijeka Rječina spada u rijeke Jadranskog sliva i ima dva izvora, izvor Rječine i Zvir. Izvor Rječine limnokrenog je oblika i nalazi se na nadmorskoj visini od 323 m. Od 1915.godine izvor Rječine se počeo koristiti za vodoopskrbu grada Rijeke što traje i dan danas. Voda koja izvire izuzetne je kvalitete, a izbija iz krškog podzemlja probijajući se kroz sustav podzemnih kanala te tvori tok na nepropusnoj flišnoj podlozi. Srednji tok rijeke prolazi kroz naseljena mjesta i tu se ulijevaju njeni najveći pritoci Sušica, Lužac i Zala (17). Donji tok karakterizira prisustvo drugog podzemnog izvora Zvir, a prolazi kroz grad Rijeku i sa svojim naplavnim deltastim ušćem ulijeva se u more. U gradu Rijeci račva se na staro (Mrtvi kanal) i novo korito koje je izgrađeno u 19 stoljeću. Na području srednjeg toka Rječine 1968.godine sagrađena je brana i akumulacija Valići, za potrebe proizvodnje električne energije HE Rijeka. Iz tog razloga promijenio se cijeli hidrološki režim u srednjem dijelu toka pa korito Rječine ljeti često presuši (17). Unatoč tome dolina Rječine obiluje bogatstvom flore i faune, a pojedini dijelovi predstavljaju poseban krajolik kao što je dio kanjona sa Žakaljskim slapom. Stoga je prostor uz Rječinu na temelju Zakona o zaštiti prirode uvršten u ekološku mrežu Natura 2000 kao lokalitet u kojem vrijedi očuvati vodenu faunu i vegetacije vapnenačkih litica (18).

S obzirom da je rijeka Rječina važna ne samo u vodoopskrbi šireg Riječkog područja nego je i izvor bioraznolikosti karakterističnog za priobalni krški dio Hrvatske, odnosno Primorsko-goranske županije, važno je sustavno pratiti kvalitetu vode ne samo na njenim izvorima, već i duž njenog toka. Rijeka Rječina ima karakterističan tok u kojem protok vode oscilira tijekom godine kao i dotok vode iz brojnih pritoka koji se protežu duboko u zaleđe. Prostor koji okružuje Rječinu i njene pritoke naseljeno je područje na kojem se još uvijek mogu pronaći ostaci starih, ali i novih nelegalnih deponija s različitim otpadom iz domaćinstava, ali i

automehaničarskih te vulkanizerskih radionica (19). Procijedne vode iz takvih deponija kao i sa privatnih poljoprivrednih površina, ali i otpadne vode iz kućanstava dospijevaju u glavni tok Rječine posebice u srednji i donji koji prolaze kroz naselja Grobinštine i grad Rijeku (19).

S obzirom na važnost ovog ekosustava kao izvora pitke vode standardne fizikalno – kemijske i mikrobiološke analize provode se prema zakonu o pitkim vodama (20). Međutim, tim analizama nisu ispitivani niti srednji, a niti donji tok Rječine koji su pod velikim antropogenim učinkom, a uvelike se koriste u rekreativne svrhe te imaju posebnu prirodnu vrijednost i važnost u očuvanju bioraznolikosti. Stoga smo u ovom radu po prvi puta za procjenu kvalitete vode srednjeg i donjeg toka rijeke Rječine koristili *Alluim cepa* test koji je dovoljno senzitivan da odredi prisutnost zagađivača u vrlo malim koncentracijama, a koji imaju citotoksičan i/ili genotoksičan učinak.



Slika 2. Izvor Rječine

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

U planiranju održivog razvoja, kako društva, tako i prostora Riječkog zaleđa nužno je dugoročno očuvati usluge ekosustava rijeke Rječine što podrazumijeva očuvanje biološke komponente ekosustava kao i abiotičkog okoliša. Stoga je cilj ovog istraživanja bio procijeniti kvalitetu vode srednjeg i donjeg toka rijeke Rječine upotrebom *Allium cepa* testa, S obzirom da je taj dio toka Rječine pod velikim antropogenim utjecajem, a neki dijelovi su i dio ekološke mreže Natura 2020 što obvezuje održavanje, ali i poboljšavanje bioraznolikosti.

Specifični ciljevi istraživanja su:

a) procijeniti citotoksičnost vode srednjeg i donjeg toka Rječine na temelju rasta meristemskih stanica korjenčića luka, odnosno frekvencije inhibicije rasta

b) procijeniti genotoksičnost vode srednjeg i donjeg toka Rječine na temelju detektiranih aberacija kromosoma u meristemskim stanicama korjenčića luka

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Lokacije uzorkovanja vode

Uzorkovanje vode izvršeno je na području srednjeg i donjeg toka rijeke Rječine (slike 3-6) u prvom tjednu rujna 2017. godine. Vrijeme je bilo oblačno, temperatura zraka bila je 21°C, a temperatura vode 15°C u srednjem toku i 17°C na donjem toku. Na svakoj lokaciji odabrane su po dvije mikrolokacije uzorkovanja površinske vode u plastične boce.



Slika 3. Mikrolokacija uzorkovanja na na srednjem toku Rječine



Slika 4. Lokacija uzorkovanja srednjem toku Rječine

Voda srednjeg toka uzorkovana je u mjestu Lukeži koje se nalazi na sredini srednjeg toka. Na mjestu uzorkovanja ulijeva se najveći pritok Rječine, Sušica, koja donosi velike količine procijeđenih voda s ilegalnih odlagališta, ali i poljoprivrednih obradivih površina te otpadnih voda iz kućanstava, a veliki je i prinos i produkcija nanosa. Voda je uzeta iznad i ispod ušća pritoka Sušice. Uzvodno od mjesta uzrokovanja od 1993 godine nalazi se i privatna tvornica TTO Thermotechnik d.o.o. koja proizvodi razdjelnike i prateću opremu za toplo vodna grijanja.

Korito rijeke je na tom području pregrađeno što prirodnim što umjetnim barijerama, dno je pjeskovito, a voda je u trenutku uzorkovanja bila mirna i bistra.



Slika 5. Lokacija uzorkovanja na donjem toku Rječine



Slika 6. Mikrolokacija uzorkovanja na donjem toku Rječine

Voda donjeg toka Rječine uzorkovana je u gradu Rijeci, na području Titovog trga iznad konobe Nebuloza i uz autobusno stajalište na Delti. Oba mjesta uzrokovanja nalaze se uz izrazito prometnu prometnicu u gradu. Dno donjeg toga je muljevito, voda je u trenutku uzrokovanja bila mutna i mirna.

3.2. Materijali

Za potrebe postavljanja *Allium cepa* testa korištene su lukovice luka kupljene na tržnici, te plastične čaše volumena 0.2l kao i otopine 1M klorovodične kiselina (Kemika,Hrvatska), 70 %- tni etilni alkohol (Kemika,Hrvatska), otopina bakar (II) sulfata (1mg/l, $CuSO_4$)(Kemika,Hrvatska), otopina orceina (Kemika,Hrvatska), fiksativ (metanol/ octena kiselina 3:1, Merck, Njemčka).

Priprema fiksativa:

Metanol (Merck, Njemačka) i octena kiselina (Merck, Njemačka) pomiješaju se u omjeru 3:1.

Priprema otopine bakrovog sulfata ($CuSO_4 . 5H_2O$. *p.a.* Kemika, Hrvatska**)** *koncentracije 1mg/l:*

1µL otopina bakrenog sulfata (C1=69,3g/L) otopi se u 100ml destilirane vode.

Priprema 1M klorovodične kiseline:

43,1ml HCl (36,5%, Kemika,Hrvatska) pomiješa se s 456,90ml vode.

Priprema otopine acetoorceina:

4g orceina (Kemika,Hrvatska) otopi se u 100ml 50% octene kiseline (Merck,Njemačka) kuha se dok ne ispari na pola, te drugi dan profiltrira.

3.3. Metode

3.3.1. *Allium cepa* test

Lukovicama crvenog luka ispod vode nježno se ukloni staro korijenje te odstrani ostatk zemlje i nečistoća. Lukovice se nasade u malu, plastičnu čašu volumena 0.2l s vodom iz slavine do 3 dana (slika 7). Tijekom klijanja potrebno je mijenjati vodu dva puta dnevno.

Nakon što proklijaju korjenčići luka na dužinu od 0.5 - 1cm, izabiru se lukovice koje imaju podjednak rast korjenčića, one s jako dugim ili jako kratkim korijenima ne uzimaju se za daljnje testiranje. Odabranim lukovicama izmjeri se dužina korijenja i set od po tri lukovice nasadi se u tri čaše s uzorkovanom vodom (srednji i donji tok), negativnom (voda iz slavine) i pozitivnom kontrolom (otopina bakar-sulfata 1mg/l), 72 sata.



Slika 7. Rast korijena luka u vodi iz slavine





Slika 8. Korijen luka nakon 3 dana

Nakon 72 sata od svake lukovice odreže se desetak korjenčića na distalnom dijelu (1cm) te se stavi u epruvetu s fiksativom (otopina metanola i octene kiseline 3:1). Sadržaj epruvete se potom protrese, te spremi u hladnjak na temperaturu od 4°C, 24 sata. Nakon toga korjenčići se prebace u novu epruvetu sa 70 % - tnim etanolom i čuvaju u hladnjaku na 4°C do pripreme preparata za mikroskopiranje.

Vrlo je bitno da se tijekom pripreme testa pazi na temperaturu prostorije jer zbog previsoke temperature (iznad 25C) lukovice neće proklijati. Isto tako, s obzirom na ritam klijanja korjenčiće je poželjno prikupiti između 13-14 sati poslijepodne ili od 23 do ponoći kada je dioba najintenzivnija (21). Korijenje se u 70 % - tnom etanolom može se čuvati i 2-3 mjeseca na -20C.

3.3.2. Priprema mikroskopskih preparata

Od svake lukovice pripremi se jedan mikroskopski preparat tako što se desetak korjenčića prethodno odrezanih i čuvanih u otopini etanola na 4°C, izreže na dužinu 2-3 mm te se stavi u epruvetu sa klorovodičnom kiselinom i cijeli sadržaj zagrije se u vodenoj kupelji na 60°C, 8 minuta. Nakon toga, korijenu se dodatno na stakalcu odstrani ostatak proksimalnog dijela tako da ostane samo meristemski dio odnosno sam vršni dio korjenčića (meristemske stanice) te se isjecka na što manje komadiće. Zatim se na korjenčiće kapne kap otopine aceto-orceina i pričeka oko 5 minuta te se nakon toga prekrije pokrovnim stakalcem. Predmetno i pokrovno stakalce zamota se filter papirom i pritisne dlanom prenoseći na stakalce težinu gornje polovice tijela tvz. „Squas“ tehnika. Pokrovnica se zaljepi s prozirnim lakom i tako pripremljeno stakalce spremno je za mikroskopiranje, Mikroskopske preparate treba čuvati u hladnjaku na 4°C i mikroskopirati u roku od dva do tri dana. Za svaki ispitivani uzorak (voda donjeg i srednjeg toka, pozitivna i negativna kontrola) pripreme se po tri mikroskopska

preparata, svaki s desetak korjenčića, potrebno je analizirati do 1000 stanica po mjestu uzorkovanja.

3.3.3. Mikroskopiranje

Za mikroskopiranje je korišten svjetlosni mikroskop BX51-Olympus, a slike su dobivene pomoću digitalne kamere i obrađene u računalnom programu Cytovision (Applied Biosistem, Kalifornija, SAD).

3.3.4. Procjena citotoksičnosti

3.3.4.1 Mjerenje rasta i određivanje inhibicije rasta korjenčića luka

Nakon 72 sata kultiviranja lukovica izmjere se dužine svih korjenčića iz svakog testiranog uzorka pomoću milimetarskog papira i ravnala. Po svakom uzorku odredi se ukupan broj izmjerenih korjenčića (N), srednja vrijednost dužine korjenčića u cm (x) te postotak vrijednosti rasta korijena u odnosu na negativnu kontrolu (100%).

Na temelju podataka o postotku vrijednosti rasta korijena izračuna se učestalost inhibicije rasta (IR).

%IR= 100% - % rasta korenčića u odnosu na kontrolu

Temeljem postotka inhibicije rasta korijena luka može se odrediti stupanj toksičnosti vode (Sladiček, 1964) (Tablica 1.).

Tablica 1. Stupanj toksičnosti vode na temelju postotka inhibicije rasta korijena

Stupanj toksičnosti	**Iinhibicija rasta korijena (%)**
oligotoksičnost	0-30
β-mezotoksičnost	30-50
α-mezotoksičnost	50-70
politoksičnost	70-90
eutoksičnost	90-100

3.3.4.2. Određivanje mitotičkog indeksa (MI)

Za svaki uzorak (tri mikroskopska preparata) pregledano je 1000 stanica, posebno su prebrojane stanice u diobi (profaza, metafaza, anafaza, telofaza) na svakom staklu pojedinog uzorka. Mitotički indeks po Sehgalu računa se prema formuli:

MI = broj stanica u diobi / ukupan zbroj stanica x 100

3.3.5. Procjena genotoksičnosti

Procjena genotokičnosti određuje se na temelju učestalosti kromosomskih aberacija kao što su slijepljeni kromosomi, anafazni mostovi, c-mitoza koje su prisutne u stanicama korjenčića luka u odnosu na ukupan broj stanica u diobi.

Učestalost kromosomskih aberacija izračunava se po formuli :

% kromosomskih aberacija = (br. aberiranih stanica / ukupan br.stanica) x 100

3.3.6. Statistička analiza

Za statističku obradu podataka korišten je računalni program Social Science Statistics (https://www.socscistatistics.com/). Razlike u rastu korijena luka, mitotičkom indeksu te kromosomskim aberacijama srednjeg i donjeg toka u odnosu na negativnu kontrolu (voda iz slavine) testirane su x^2 test s $p < 0.05$ razinom vjerojatnosti.

4. REZULTATI

4.1. Procjena citotoksičnosti

4.1.1. Određivanje inhibicije rasta korijena crvenog luka :

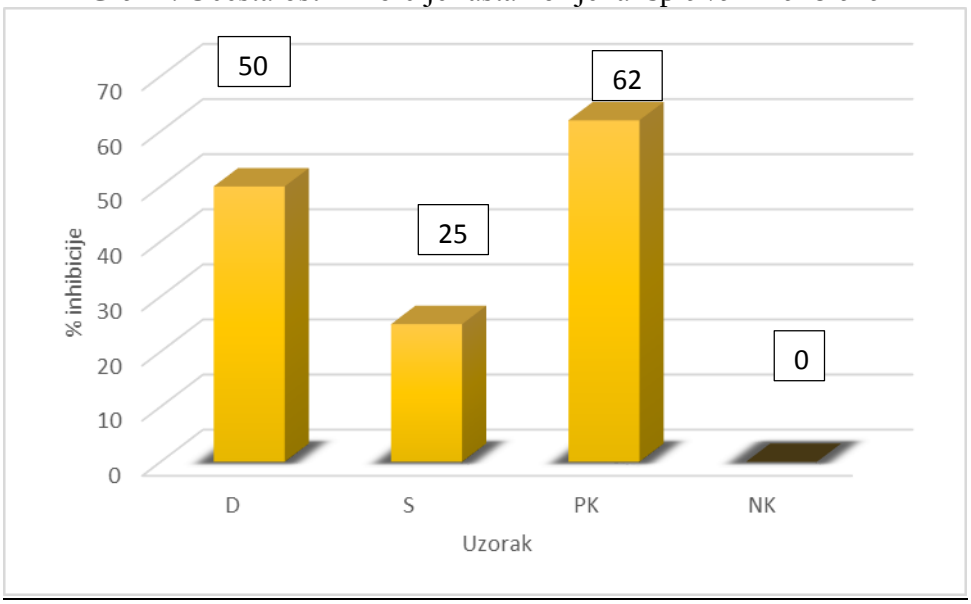
Utvrđen je smanjen rast stanica korijena luka kako u srednjem tako i u donjem toku u odnosu na negativnu kontrolu (tablica 2). Sukladno tome utvrđena je i veća inhibicija rasta stanica korijena luka u donjem toku u odnosu na srednji tok kao i pozitivnu kontrolu (P< 0,05) (Graf 1).

Tablica 2. Rast korijena luka u ispitivanim uzorcima

Uzorak	Ukupan broj korjenčića	Srednja vrijednost rasta korijena (cm)	Rast korijena (%)
D	22	0.8	50*
S	17	1.2	75*
P.K	15	0.6	38
N.K	20	1.6	100

*D – uzorak vode donjeg toka, S - uzorak vode srednjeg toka, PK - otopina bakrovog sulfata, 1mg/l, NK – negativna kontrola, voda iz slavine, * statistička značajnost u odnosu na negativnu kontrolu P< 0,05*

Graf 1. Učestalost inhibicije rasta korijena ispitivanih uzoraka



D – uzorak vode donjeg toka, S uzorak vode srednjeg toka, PK - otopina bakrovog sulfata. NK – negativna kontrola, voda iz slavine, p<0,05

4.1.2. Mitotički indeks

Utvrđen je veći mitotički indeks u srednjem toku u odnosu na donji tok, no u oba toka mitotički indeks je statistički značajno manji u odnosu na negativnu kontrolu (P< 0,05)(Tablica 3). Slika 9 prikazuje faze mitoze u stanicama korjenčića luka.

Tablica 3. Mitotički indeks ispitivanih uzoraka

Uzorak	Broj stanica u diobi	Ukupan broj stanica	Mitotiči indeks (%)
D	265	1000	26,50*
S	404	1000	40,04*
P.K	90	1000	9,00
N.K	632	1000	63,20

*D – uzorak vode donjeg toka, S uzorak vode srednjeg toka, PK - otopina bakrovog sulfata. NK – negativna kontrola, voda iz slavine, *statistička značajnost u odnosu na negativnu kontrolu P< 0,05*

4.2. Procjena genotoksičnosti

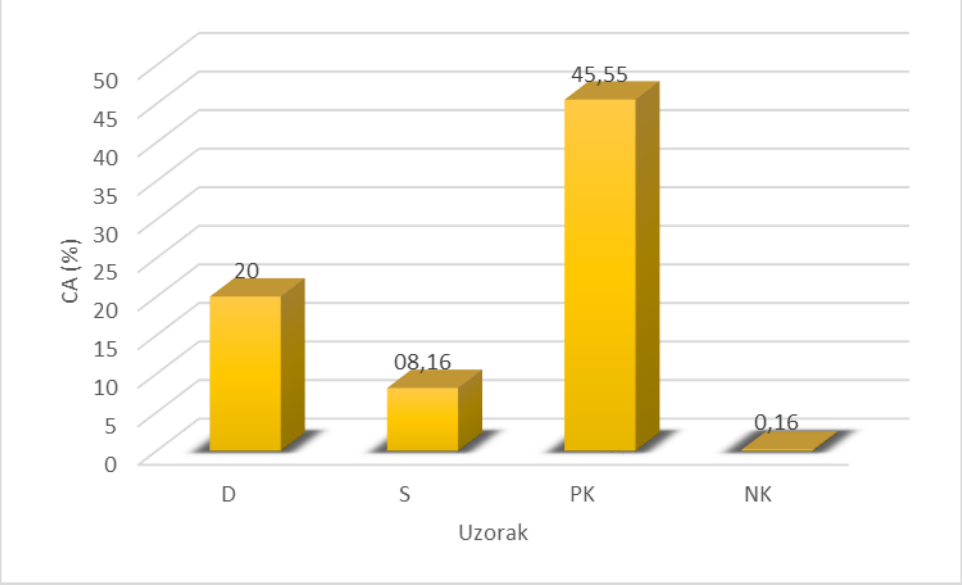
Najzastupljenija kromosomska aberacija utvrđena u meristemskim stanicama luka spada u kategoriju slijepljenih kromosoma zatim slijede anafazni mostovi pa potom c-mitoza, dok je poliploidija prisutna u vrlo malom broju kao i zaostali kromosomi (Tablica 4, Slika 10.). Ukupna učestalost stanica s kromosomskim aberacijama statistički je značajno veća u donjem toku u odnosu na srednji tok kao i u odnosu na negativnu kontrolu (P< 0,05)(Graf 2)

Tablica 4. Kromosomske aberacije u ispitivanom uzorku

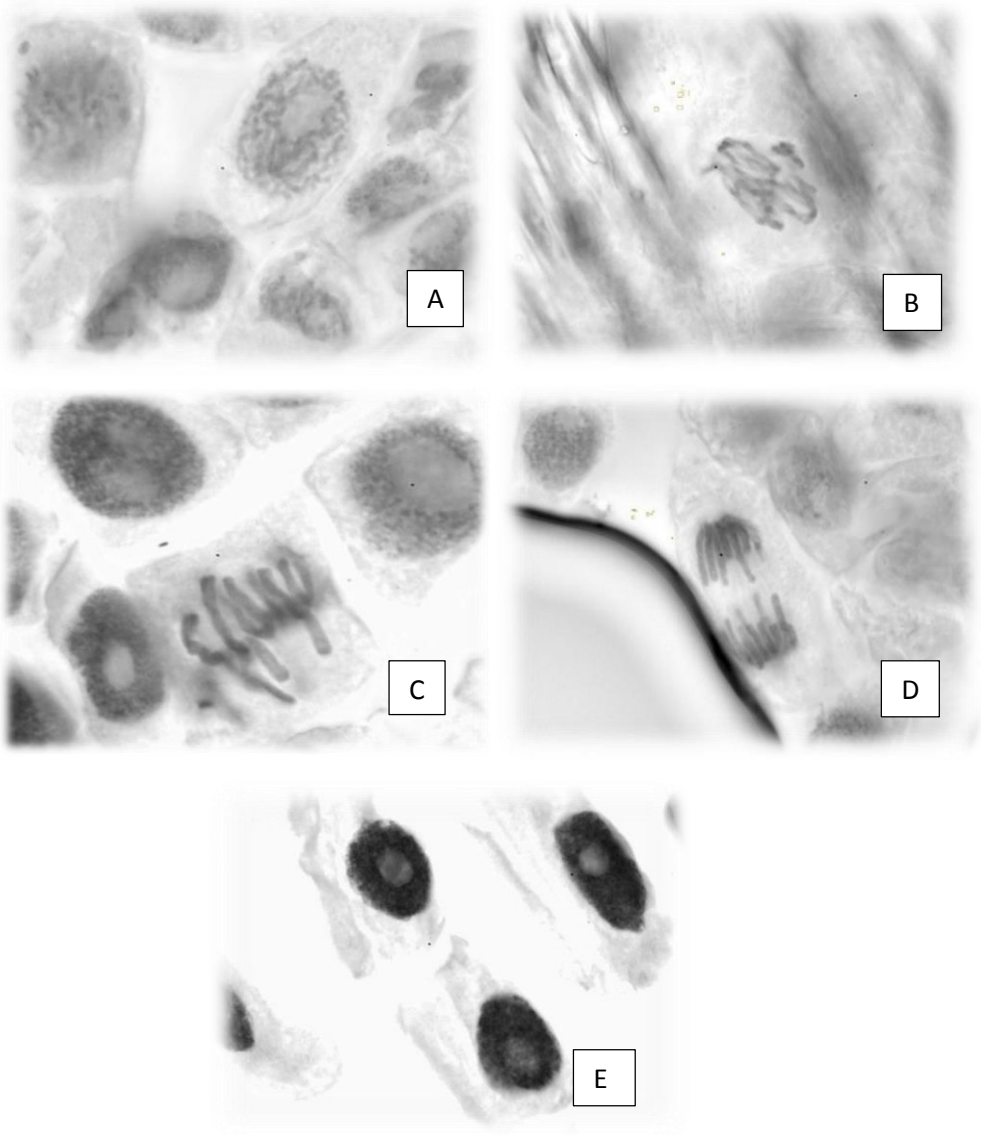
Uzorak	Anafazni most N	Slijepljeni kromosomi N	c-mitoza N	Poliploidija	Zaostali kromosomi	Ukupan Broj aberiranih stanica	Broj stanica u diobi
D	2	38	6	4	0	53*	265
S	13	14	2	3	1	33*	404
P.K	11	25	5	0	0	41	90
N.K	0	0	1	0	0	1	632

*D – uzorak vode donjeg toka, S uzorak vode srednjeg toka, PK - otopina bakrovog sulfata. NK – negativna kontrola, voda iz slavine, aberacije, *statistička značajnost u odnosu na negativnu kontrolu P<0,05*

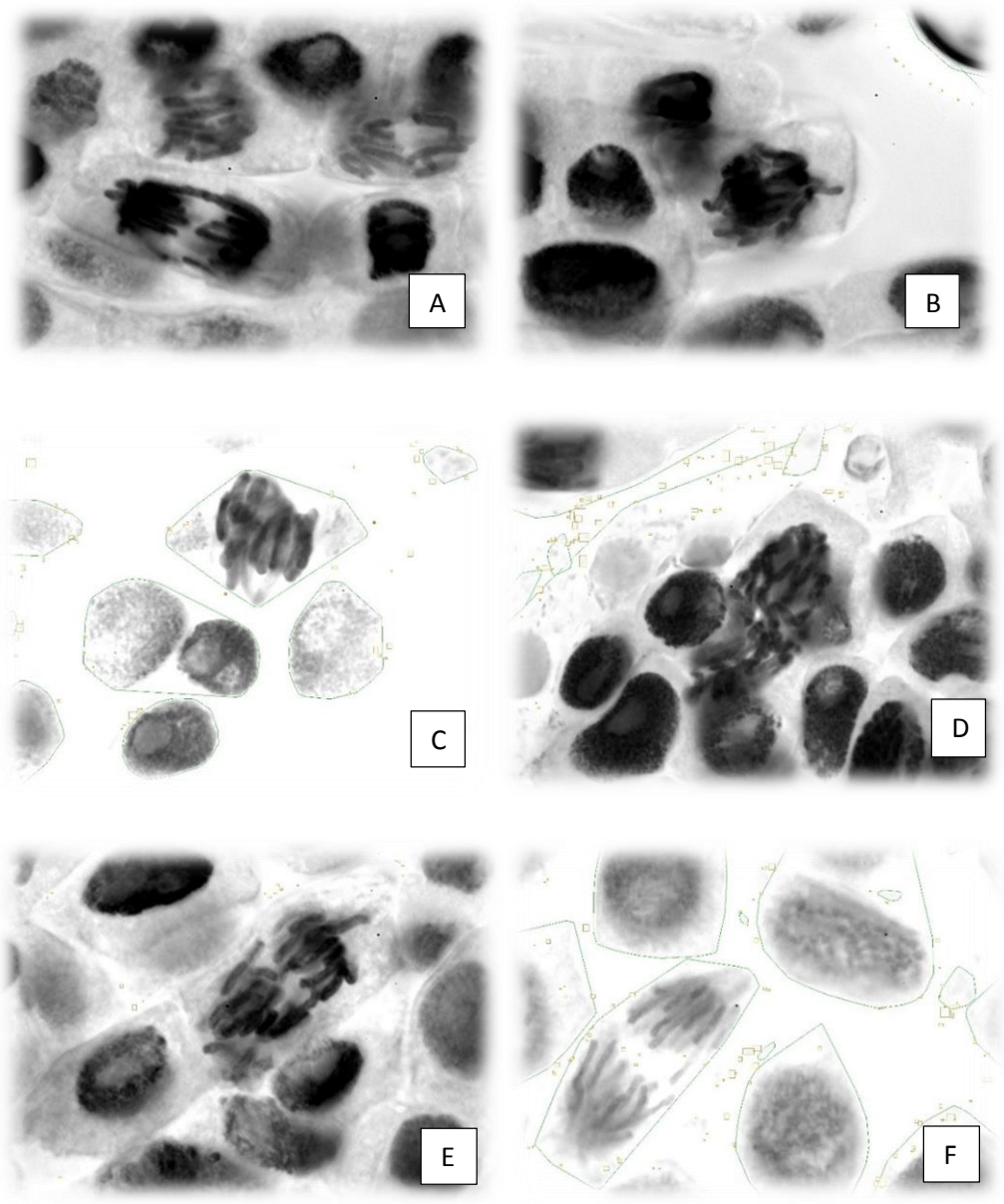
Graf 2. Učestalost kromosomskih aberacija u ispitivanom uzorku



D – uzorak vode donjeg toka, S uzorak vode srednjeg toka, PK - otopina bakrovog sulfata. NK – negativna kontrola, voda iz slavine, CA – frekvencija kromosomskih aberacija izražena u postotku.



Slika 9. Faze mitoze: A) Profaza, B) Prometafaza, C) Metafaza, D) Anafaza, E) Interfaza



Slika 10. Kromosomske aberacije u korijenu luka. A) Anafazni most, B) Slijepljeni kromosomi 1, C) Slijepljeni kromosomi 2, D) C-mitoza 1, E) C-mitoza 2, F) Zaostali kromosom

.

5. RASPRAVA

U analizi toksičnosti površinskih voda osim klasičnih analitičkih metoda koriste se različiti biotestovi koji mogu ukazati na prisustvo toksične/mutagene tvari u vrlo malim koncentracijama koje se često ne mogu ni izmjeriti. U ovom radu po prvi puta, na temelju rasta meristemskih stanica korjenčića luka, evaluirano je prisustvo citotoksičnih i genotoksičnih tvari u srednjem i donjem toku rijeke Riječine. Citotoksičnost i geneotoksičnost procijenjena je temelju mitotičkog indeksa te broja kromosomskih aberacija prisutnih u meristemskim stanicama luka. Rezultati su ukazali da na oba uzorkovana područja postoji prisutnost i citotoksičnih i genotoksičnih supstanci. Naime, uočeno je da je rast korijena luka inhibiran za 50% u donjem toku dok je u srednjem toku rasta korijena luka bio inhibiran svega 25% u odnosu na negativnu kontrolu (voda iz slavine). Sukladno tome uočen je i manji mitotički indeks, ali i znatno veći broj kromosomskih aberacija u donjem toku. Nadalje, u srednjem toku također je uočen nešto manji mitotički indeks odnosu na negativnu kontrolu, dok je u odnosu na donji tok mitotički indeks duplo veći. Mogući uzrok smanjenog mitotičkog indeksa u oba ispitivana uzorka u odnosu na negativnu kontrolu može biti rezultat trenutnog ili dugoročnijeg djelovanja pesticida, ostatka metala ili drugih zagađivača koji dospijevaju u tok putem procijedih voda s ilegalnih odlagališta otpada te poljoprivrednih površina i otpadnih voda iz kućanstava. Istraživanja pokazuju da tretiranje korjenčića luka s metalima dovodi do promjena u staničnom ciklusu ili disfunkciji kromatina zbog interakcije metala s DNA (22, 23, 24).

Kromosomske aberacije u meristemskim stanicama luka koji je rastao u vodi uzrokovanoj na srednjem toku prisutne su u znatno manjem broju u odnosu na donji tok. Dobiveni rezultati ukazuju da je u donjem toku Riječine prisutno više genotoksičnih tvari koje osim što usporavaju rast meristemskih stanica dovode i do većeg broja različitih kromosomskih aberacija. Najučestalija kromosomska aberacija su slijepljeni kromosomi. Takva izražena

ljepljivost kromatina često rezultira atipičnom metafazom ili anafazom. Isto tako, povećana ljepljivost može dovesti do stvaranja ljepljivih mostova u anafazi i telofazi, te time spriječava normalnu citokinezu (14). Broj kromosomskih aberacija u meristemskim stanicama korjenčića luka uzgajanih u uzorkovanoj vodi znatno je manji u odnosu na pozitivnu kontrolu otopine bakar (II) sulfata što ukazuje na prisustvo geno toksičnih tvari u znatno manjoj koncentraciji te može bitno drugog sastava. Istraživanja pokazuju citotoksičnost te genotoksičnost Cu^{2+} iona u malim koncentracija što opravdava njegovo korištenje kao pozitivne kontrole (25). Ovo istraživanje ne daje odgovor o vrsti tvari koja uzrokuje genotoksičnost, ali ukazuje na potrebne daljnje analitičke metode kojima se to može dokazati (4).

Prema dobivenim rezultatima uzorci vode srednjeg toka mogu se prema Sladičeku svrstati u oligosaprobne vode što ukazuje na slabo onečišćenu vodu (4). Naime, oligosaprobna voda je još uvijek bistra te u njoj buja biljni i životinjski svijet (3). Prema istoj referenci uzorci donjeg toka spadaju u alfa-beta-mezosaprobne vode što ukazuje na umjereno onečišćenu vodu. Aerobno stanje je uspostavljeno i nema amonijaka, no u većim količinama prevladava ugljični dioksid. Boja vode ima zelenkastu nijansu. Alfa i beta mezosaprobne zone vrlo slabo se razlikuju te pripadaju glavnim zonama onečišćenja (3).

Ovo istraživanje ukazalo je da su u donjim toku prisutne supstance sa znatno učinkovitijim citotoksičnim kao i genotoksičnim efektom u odnosu na srednji tok. S obzirom na položaj donjeg toka Rječine ovakvi rezultati i nisu iznenađujući budući da su u taj dio Rječine dodatno opterećen. Naime, u donjem toku Rječine djelovale se brojne tvornice i klaonice koje su ispuštale različite kemijske/biološke supstance u rijeku, a koje su se s vremenom nataložile na dnu. Neka od tih postrojenja više ni nisu u pogonu no postojeća i aktivna hidroelektrana svakako narušava prirodni tok Rječine te pospješuje i dalje taloženje toksičnih agenasa. Svakako treba spomenuti povećan promet te ubrzanu urbanizaciju koji također imaju svoj doprinos u povećanom onečišćenju donjeg toka (26). Iako se u donjem toku

Rječine na svega nekoliko kilometara od njenog ušća nalazi drugi vrlo izdašan izvor Zvir očito je da svježa pristigla voda nije dovoljna da ispere nataložene toksične tvari u tlu. Analitičke metode koje se svakodnevno obavljaju na samom izvorištu prema zakonu o pitkim vodama ukazuju da voda zadovoljava sve propisane kriterije te predstavlja glavni izvor pitke vode za šire Riječko područje (20). Međutim, ovo istraživanje ukazuje da voda rijeke Rječine na uzorkovanim postajama nije dovoljno kvalitetna te prisutno onečišćenje svakako utječe na bioraznolikost toka, ali ne i kvalitetu vode za piće jer se sa tih postaja za to i ne koristi. S obzirom da u toku Rječine preživljava veći broj indikatorskih beskralješnjaka te autohtoni krški rak, zbog kojeg je Rječina uvrštena u ekološku mrežu Natura 2000, važno je voditi brigu i očuvanju ovog ekosustava. Stoga ovo istraživanje ukazuje na potrebu za sustavnim interdisciplinarnim istraživanjem toka Rječine koje će dati odgovor na otvorena pitanja koja su proizašla iz ovog istraživanja, a to je koje su to citotoksične i genotoksične tvari i u kojoj koncentraciji prisutne na uzorkovanim lokacijama. Iako ovo istraživanje ima nedostatke u smislu broja uzorkovanih postaja te vremena uzorkovanja (pravilno je imati više uzastopnih ponavljanja uzorkovanja kroz duži vremenski period) ukazalo je da je *Allium test* dovoljno osjetljiv da ukaže na prisutnost citotoksičnih i genotoksičnih agenasa. Njegovu prednost kao prvog testa izbora u procijeni kvalitete onečišćenja vode s obzirom na osjetljivost i ekonomsku pristupačnost pokazuju brojne studije (27,28,29). Na području RH do sada je ovim testom ispitana kvaliteta vode rijeke Save na nekoliko kritičnih točaka duž njenog srednjeg toka (30) kojim je detektirana citokosičnost i genotoksičnost ispitivanih uzoraka.

S obzirom da rijeka Rječina do sada nije bila predmet istraživanja niti jedne slične studije možemo zaključiti da su ovim istraživanjem, bez obzira na nedostatke, dobiveni rezultati koji itekako ukazuju na potrebu za daljnjim istraživanjima kojima će se omogućiti očuvanje postojećeg stanja, što ekološka mreža Natura 2020 ima kao osnovni cilj. Sustavni biomonitoring

u cilju poboljšanja održivosti usluga ekosustava te njegove bioraznolikosti trebao bi postati sastavni dio praćenja kvalitete svakog vodenog ekosustava.

Isto tako dobiveni rezultati ukazuju na potrebu za određenim intervencijama kako bi se sačuvale i poboljšale usluge ovog ekosustava a time i kvalitete života ljudi u gradu Rijeci i njegovom zaleđu, ali i svih ljubitelja prirode koji posjećuju kanjon i dolinu Rječine koja predstavlja izuzetno vrijedan prostor kako prirodoslovno tako i znanstveno.

6. ZAKLJUČCI

Rezultati ovog rada upućuju na donošenje sljedećih zaključaka :

1.) Smanjen rast meristemskih stanica korjenčića luka na donjem i srednjem toku u odnosu na negativnu kontrolu (voda iz slavine) ukazuje na prisutnost citotoksičnih supstanci.
2.) Manji mitotički indeks korjenčića luka uzgajanog u uzorkovanoj vodi srednjeg i donjeg toka u odnosu na negativnu kontrolu ukazuje na prisutnost citotoksičnih tvari.
3.) Veći broj kromosomskih aberacija u meristemskim stanicama korjenčića luka uzgajanih u uzorkovanoj vodi donjeg toka (20%) u odnosu na srednji tok (0,8%) i negativnu kontrolu (0,16%) ukazuju na prisutnost genotoksičnih tvari
4.) Uzorci vode srednjeg toka mogu se prema Sladičeku svrstati u oligosaprobne vode što ukazuje na slabo onečišćenu vodu te prema istoj referenci uzorci donjeg toka spadaju u alfa-beta-mezosaprobne vode što ukazuje na umjereno onečišćenu vodu.
5.) Utvrđena je prisutnost i citotoksičnih i genotoksičnih tvari na uzorkovanim lokacijama srednjeg i donjeg toka, za određivanje točnog sastava potrebne su druge analitičke metode
6.) Rezultati upućuju na važnost biomonitoringa u cilju očuvanja postojeće bioraznolikosti

7. LITERATURA

1. www.vus.hr/Nastavni%20materijali/Ekologija%20vjezbe%2003 04/VJEZBA%2014..pdf (Ekologija i zaštita okoliša; vježba 14.: Vodeni ekosustavi) (citirano 19.03.2018.)
2. https://zastitaokolisa.dashofer.hr/32/trazi/?query=+vodeni+ekosustav#offset=0;max_count=20 – AZZO (Agencija za zažtitu okoliša) (citirano 19.03.2018.)
3. http://www.hlede.net/studentski_radovi/ribe/RibeSveZajedno.pdf (Biologija i patologija riba; str. 7/95, 8/95, 9/95) (citirano 19.03.2018.)
4. https://biolozi.bio.bg.ac.rs/attachments/article/1187/Testovi%20toksicnosti.doc (Testovi toksičnosti; str. 1/7) (citirano 19.03.2018.)
5. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/1998_06_77_1037.html (Zakon o vodama; „Narodne novine“br.107/95) (Uredba o klasifikaciji voda; „Narodne novine“br. 77/98, (članak 2.)) (citirano 19.03.2018.)
6. http://www.bioteka.hr/modules/lexikon/entry.php?entryID=290 (što je to biomonitoring ?) (citirano 19.03.2018.)
7. https://oshwiki.eu/wiki/Biological_monitoring_(biomonitoring) (Definition of biomonitoring.) (citirano 19.03.2018.)
8. Cooper,G.M., Hausman,R.E., Stanica molekularni pristup, Medicinska naklada, Zagreb, 2010.
9. Arambašić, M. (1997). Primjena biološkog materijala kao indikatora zagađivanja životne sredine: Indikatori zagađivanja vodene sredine: Praktična primjena botaničkog materijala (Allium- i Lepidium-test). Druga jugoslavenska konferencija o upravljnju ZSŠ. 264-272.

10. Yasin Eren, Sevim Feyza Erdogmus, Dilek Akyil, Arzu Ozkara, Muhsin Konuk, Esra Saglam : Cytotoxic and genotoxic effects of dioxacarb by human peripheral blood lymphocytes Cas and Allium test.
11. Sandra Radić, Draženka Stipaničev, Valerija Vujčić, Marija Marijanović Rajčić, Siniša Širac, Branka Pevalek-Kozlina : The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the Allium cepa test.
12. Agnes Barberio. Bioassays with Plants in the Monitoring of Water Quality.
13. http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=40768 (Što je mikronukleus?) (citirano 19.03.2018.)
14. Daniela Morais Leme, Maria Aparecida Marin-Morales. Allium cepa test in environmental monitoring: A review on its application. Departamento de Biologia, Instituto de Biociencias, Universidade Estadua Paulista (UNESP), Rio claro, SP, Brazil
15. https://www.scribd.com/doc/311756362/Praktikum-Fiziologija-biljaka. (Praktikum iz fiziologije bilja, Botanički zavod, Prirodnoslovno-matematički fakultet) (citirano 19.03.2018.)
16. Sandra Radić Brkanac, Valerija Vujčić, Petra Cvjetko, Vid Baković, and Višnja Oreščanin : Removal of landfill leachate toxicity and genotoxicity by two treatment methods.
17. Ada Maršanić. Prošlost i sadašnjost općine Jelenje. Urednik: Irvin Likežić-Rijeka: Katedra Čakavskog sabora Grobništine,1997.
18. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_10_124_2664.html (Zakon o zaštiti prirode; Uredba o ekološkoj mreži; „narodne novine“ broj 124/13 (članak 3.)).
19. Dr. Josipa Čaval. Stanovništvo i privreba Grobinštine. Izdavaćki centar Rijeka, Rijeka 1983.

20. https://www.zakon.hr/z/124/Zakon-o-vodama (Zakon o vodama; Zaštita vode; Standard kakvoće voda i utvrđivanje stanja voda (članak 47.)).
21. Sandra Radić Brkanac, Valerija Vujčić, Petra Cvjetko, Vid Baković, and Višnja Oreščanin : Removal of landfill leachate toxicity and genotoxicity by two treatment methods.
22. R Caritá, MA Marin-Morales - Chemosphere, 2008 – Elsevier. Induction of chromosome aberrations in the Allium cepa test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes.
23. Riffat A.Fatima, Masood Ahmad. Genotoxicity of industrial wastewaters obtained from two different pollution sources in northern India: A comparison of three bioassays 2006.
24. S. Glinska, Magdalena Bartczak, S. Oleksiak, A Wolska, B. Gabara, M. Posmyk, K. Janas. Effects of anthocyanin-rich extract from red cabbage leaves on meristematic cells of Allium cepa L. roots treated with heavy metals.
25. Geirid Fiskesjo, 1985. The Allium test as a standard in environmental monitoring.
26. http://www.formula1-dictionary.net/rijeka_povijest_1850-1875.html (Povijest grada Rijeke) (citirano 19.03.2018.)
27. Bertan AS, Baumbach FP, Tonial IB, Pokrywiecki TS, Düsman E. Assessment of phytoremediation potencial of Allium cepa L. in raw sewage treatment. Braz J Biol. 2019 Jul 4.
28. Ranjan J, Mandal T, Mandal DD. Environmental risk appraisement of disinfection by-products (DBPs) in plant model system: Allium cepa. Environ Sci Pollut Res Int. 2019 Mar;26.

29. Albanesi M, Pasculli C, Giliberti L, Rossi MP, Di Bona D, Caiaffa MF, Macchia L. Immunological characterization of onion (Allium cepa) allergy. Postepy Dermatol Alergol. 2019 Feb;36.
30. Radić S1, Stipanicev D, Vujcić V, Rajcić MM, Sirac S, Pevalek-Kozlina B. The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the Allium cepa test.

8. PRILOZI

8.1. Tablice :

Tablica 1. Skladičeva tablica toksićnosti vode

Tablica 2. Rast korijena luka u ispitivanim uzorcima

Tablica 3. Mitotički indeks ispitivanih uzoraka

Tablica 4. Kromosomske aberacije u ispitivanom uzorku uzorka

8.2. Grafički prikazi :

Graf 1. Učestalost inhibicije rasta korijena ispitivanih uzoraka

Graf 2. Učestalost kromosomskih aberacija u ispitivanom uzorku

8.3.Slike :

Slika 1. Dijelovi korijena preuzeto iz Praktikum iz fiziologije bilja, Botanički zavod, Prirodoslovno-matematički fakultet

Slika 2. Prikaz izvora Rječine (prvi izvor)

Slike 3. Stanište uzorkovanja na srednjem toku Rječine

Slika 4. Stanište uzorkovanja na srednjem toku Rječine

Slika 5. Stanište uzorkovanja na donjem toku Rječine

Slika 6. Stanište uzorkovanja na donjem toku Rječine

Slika 7. Rast korijena luka u vodi iz slavine

Slika 8. Rast korijena luka u vodi iz slavine

Slika 9. Prikaz faza normalne diobe stanica. A) Profaza, B) Prometafaza, C) Metafaza, D) Anafaza, E) Interfaza

Slika 10. Prikaz slika kromosomskih aberacija korijena crvenog luka. A) Anafazni most, B) Slijepljeni kromosomi 1, C) Slijepljeni kromosomi 2, D) C-mitoza 1, E) C-mitoza 2, F) Zaostali kromosom

9. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Prezime / Ime	Pereza Josipa
Adresa	Barbat 288, 51280, Rab
E-mail	josipa.pereza@gmail.com
Državljanstvo	Hrvatsko
Datum rođenja	31. siječanj 1993.

OBRAZOVANJE

Datum	2000. – 2008.
Mjesto	Rab
Naziv ustanove	Osnovna škola Rab

Datum	2008. – 2012.
Mjesto	Rijeka
Naziv ustanove	Prva riječka hrvatska gimnazija, opći smjer

Datum	2012. - danas
Mjesto	Rijeka
Naziv ustanove	Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Preddiplomski studij sanitarnog inženjerstva
Naziv stečene kvalifikacije	

OSOBNE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE

Strani jezici

Jezik	Engleski
Govor	Vrlo dobar
Pisanje	Vrlo dobar

TEHNIČKE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE	Poznavanje rada na računalu
	Snalaženje na internetu

POTPIS

Pereza Josipa

_____