

Genotoksičnost eluata tla onečišćenog rudarsko-industrijskim aktivnostima na području Istre

Jezidžić, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:645860>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-21**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Petra Jezidžić

Genotoksičnost eluata tla onečišćenog rudarsko-industrijskim
aktivnostima na području Istre

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj rad, izrađen u Botaničkom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izvanredne profesorice dr. sc. Željke Vidaković-Cifrek i izvanredne profesorice dr. sc. Gordane Medunić, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra znanosti o okolišu.

ZAHVALA

Zahvaljujem mentoricama dr. sc. Željki Vidaković-Cifrek i dr. sc. Gordani Medunić na stručnom vodstvu i potpori prilikom izrade ovog rada.

Veliko hvala dr. sc. Petri Cvjetko na nesebičnom trudu, susretljivosti i pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela.

A najveće hvala mami i tati. Hvala što ste najbolji na svijetu.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Genotoksičnost eluata tla onečišćenog rudarsko-industrijskim aktivnostima na području Istre

PETRA JEZIDŽIĆ
Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Područje istočne Istre desetljećima je bilo izloženo onečišćenjima uslijed rudarsko-industrijskih aktivnosti na tom prostoru. Geokemijskom analizom prikupljenih uzoraka tala na istraživanim lokalitetima Štrmac i Krapan utvrđeno je da sadrže povećanu količinu metala. Ciljevi ovog istraživanja bili su utvrditi učinak vodenih eluata tla na rast korijena kozjaka *Allium ascalonicum* L. i procijeniti genotoksičnost na temelju pojave mitotskih i kromosomskih aberacija te komet-testom. Nadalje, određivanjem stupnja lipidne peroksidacije procijenila sam dolazi li uslijed djelovanja uzoraka do oksidacijskog stresa u stanicama korijena. Rezultati provedenih testova pokazali su genotoksični učinak istraživanih uzoraka. Usporedbom negativne kontrole i kontrolnog tla s ispitivanim uzorcima najvišu genotoksičnost pokazalo je tlo prikupljeno na lokaciji Štrmac, uzorkovano na dvije dubine - na dubini do 10 cm te na dubini 10-20 cm. Tlo uzorkovano na lokaciji Krapan u većini testova nije izazvalo značajne učinke na stanice kozjaka, dok je kontrolno tlo, za koje se smatralo da nije onečišćeno pokazalo oprečne rezultate. Naime, komet-test te učestalost pojedinih faza mitoze ukazali su na prisutnost tvari koje su uzrokovale promjene u stanicama korijena kozjaka.

(41 stranica, 15 slika, 3 tablice, 55 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: Allium test, komet-test, lipidna peroksidacija, mitotske aberacije, oštećenje DNA, tlo.

Voditelj rada 1: Dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, izv. prof.

Voditelj rada 2: Dr. sc. Gordana Medunić, izv. prof.

Ocjenitelji: Dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, izv. prof.

Dr. sc. Gordana Medunić, izv. prof.

Dr. sc. Mirjana Pavlica, red. prof.

Dr. sc. Danijel Orešić, izv. prof.

Rad je prihvaćen: 14. rujna 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Genotoxicity of soil water extracts contaminated by mining and industrial activities in Istria

PETRA JEZIDŽIĆ

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb, Croatia

The area of Eastern Istria has been exposed to contamination by mining and industrial activities for decades. Geochemical analysis of the soil samples collected at the investigated sites of Štrmac and Krapan showed increased amounts of metals. The aim of this study was to determine the effect of soil water extracts on the growth of shallot (*Allium ascalonicum* L.) root, to evaluate genotoxicity based on the occurrence of mitotic and chromosomal aberrations and by a comet-assay. Moreover, to determine the effect of oxidative stress, the level of lipid peroxidation was evaluated. Comparison of the negative control and control soil with the investigated samples showed that the most genotoxic was the soil collected at the Štrmac site, sampled at two depths - at 10 cm and 10-20 cm. Soil sampled at the Krapan site in most of the tests did not cause significant changes to the root cells, while the control soil, which was considered unpolluted, showed contradictory results. The results of comet-assay and frequency of phases of mitosis showed the presence of substances which could cause disturbances in shallot root tip cells.

(41 pages, 15 figures, 3 tables, 55 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central biological library.

Key words: Allium test, comet assay, lipid peroxidation, mitotic aberrations, DNA damage, soil.

Supervisor 1: Dr. Željka Vidaković-Cifrek, assoc. prof.

Supervisor 2: Dr. Gordana Medunić, assoc. prof.

Reviewers: Dr. Željka Vidaković-Cifrek, assoc. prof.

Dr. Gordana Medunić, assoc. prof.

Dr. Mirjana Pavlica, prof.

Dr. Danijel Orešić, assoc. prof.

Thesis accepted: September 14, 2017

Sadržaj

1.	UVOD	1
1.1.	Opća obilježja prikupljenih uzoraka tala	1
1.2.	Biotestovi za procjenu genotoksičnosti	2
1.2.1.	Allium-test	2
1.2.2.	Komet-test	4
1.3.	Lipidna peroksidacija	5
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA	7
3.	MATERIJAL I METODE	8
3.1.	Istraživačke postaje	8
3.1.1.	Geografski položaj	8
3.1.2.	Geološke karakteristike	9
3.2.	Uzorkovanje tla	9
3.3.	Allium-test	12
3.4.	Komet-test	14
3.5.	Lipidna peroksidacija	16
3.6.	Statistička analiza	17
4.	REZULTATI	18
4.1.	Allium-test	18
4.1.1.	Duljina korjenčića	18
4.1.2.	Mikroskopski parametri	18
4.2.	Komet-test	26
4.3.	Lipidna peroksidacija	28
5.	RASPRAVA	30
6.	ZAKLJUČAK	35
7.	LITERATURA	36
8.	ŽIVOTOPIS	43

Popis kratica:

ANOVA	analiza varijance (engl. Analysis of Variance)
ICP	induktivno spregnuta plazma (engl. Inductively Coupled Plasma)
KR	Krapan
KT	kontrolno tlo
LOD	granica detekcije (engl. Limit of Detection)
LMP	niska temperatura tališta (engl. Low Melting Point)
MDA	malondialdehid
MI	mitotski indeks
NMP	normalna temperatura tališta (engl. Normal Melting Point)
PAH	policiklički aromatski ugljikovodici (engl. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons)
ROS	reaktivni kisikovi oblici (engl. Reactive Oxygen Species)
ŠA	Štrmac A
ŠB	Štrmac B
TBA	tiobarbituratna kiselina
TCA	trikloroetena kiselina
TE	termoelektrana

1. UVOD

1.1. Opća obilježja prikupljenih uzoraka tala

Tlo je površinski sloj Zemljine kore sastavljen od organske tvari, mineralnih čestica, vode, zraka i živih organizama. Formiranje tla dug je i kompleksan proces, a za nastanak tla visine 1 cm potrebno je 1000 godina te se zbog izrazito sporog procesa nastanka smatra neobnovljivim ili uvjetno obnovljivim resursom. U izravnom je dodiru s atmosferom, hidrosferom i litosferom te je stoga prijemnik (akceptor) niza različitih tvari koje u njega dopijevaju iz atmosfere oborinama, gravitacijskim taloženjem ili ih čovjek unosi pri korištenju tla u razne svrhe (Sofilić 2014). Razvojem tehnike i tehnologije naglo se povećao stupanj zagađenja tla, a zadnjih desetljeća sve se više razvija svijest ljudi o potrebi njegove zaštite i remedijacije. Kako bi se onečišćeno tlo saniralo potrebno je najprije procijeniti stupanj onečišćenja pomoću fizikalnih, kemijskih ili bioloških metoda analize tla (Blaise 2000).

Na istočnom dijelu istarskog poluotoka od 18. stoljeća sve do 1999. godine nalazila su se gospodarski najvrjednija ležišta kamenog ugljena, tzv. Istarski ugljenokopi. Četiri ugljenonosna bazena: Karojba, Sveti Martin, Pićan i Labin sastoje se od sedam rudnika: Tupljak, Potpićan, Kožljak, Štrmac, Raša, Ripenda i Krapan (Medunić i sur. 2016b). Uslijed višegodišnje izloženosti rudarskim aktivnostima te industriji povezanoj s iskorištavanjem ruda, tlo je na ovim prostorima onečišćeno metalima i drugim potencijalno toksičnim elementima (Fiket i sur. 2016; Medunić i sur. 2016a). Toksični elementi, prisutni u tlu, mogu dospjeti u biljke te životinje u tlu, a zatim se putem hranidbenih mreža prenijeti u druge organizme pa i čovjeka. Takve tvari mogu uzrokovati brojne promjene u organizmima, npr. mogu djelovati na enzime uključene u biokemijske procese kao i na genetički materijal stanice (Leme i Marin-Morales 2009).

U svrhu procjene učinka onečišćenog tla često se provode biotestovi. Biotestovi su postupci u kojima se biološki organizmi izlažu ispitivanim tvarima kako bi se zabilježile i proučile potencijalne promjene ili bioakumulacija koje te tvari izazivaju. Biljni biotestovi se često koriste zbog osjetljivosti i kratkoće trajanja. Među najčešće korištene biljke u biotestovima ubrajaju se *Allium cepa*, *Vicia faba*, *Zea mays*, *Tradescantia*, *Nicotiana tabacum*, *Crepis capillaris* i *Hordeum vulgare* (Grant 1994). Uzorci tala se mogu testirati tako da se npr. prati klijanje sjemenki ili rani rast biljaka u uzorku tla ili se koriste eluati tla (Soodan i sur. 2014).

1.2. Biotestovi za procjenu genotoksičnosti

Biotestovi za procjenu genotoksičnosti se koriste za otkivanje genskih oštećenja, uključujući mutacije gena i kromosomske aberacije. Molekularno-citogenetičke metode omogućuju analizu genotoksičnog djelovanja na razini kromosoma i molekule DNA. Citogenetički testovi na biljkama često se primjenjuju za praćenje genotoksičnosti zagađivača okoliša zbog brzine izvođenja i jednostavnosti testova (Khanna i Sharma 2013). Također, uslijed sličnosti kromosomske morfologije i odgovora na mutagene između biljaka i drugih organizama, rezultate je u određenoj mjeri moguće ekstrapolirati, što znači da na temelju rezultata dobivenih na biljnim organizmima možemo pretpostaviti mogući učinak istraživane tvari na druge organizme (Leme i Marin-Morales 2009). Među često korištene citogenetičke testove ubrajaju se Allium-test koji omogućuje praćenje citotoksičnosti i genotoksičnosti na temelju rasta korijena i učestalosti aberacija u meristemskim stanicama te komet-test koji se izvodi kao gel-elektroforeza pojedinačnih stanica u cilju procjene oštećenja molekule DNA (Yildiz i sur. 2009).

1.2.1. Allium-test

Allium-test se koristi za praćenje potencijalnog učinka mješavine onečišćujućih tvari (Radić i sur. 2010). Provedena su brojna istraživanja u kojima se analiza kromosomskih aberacija u meristemske regiji korijena luka *A. cepa* opisuje kao učinkoviti sustav za procjenu genotoksičnog potencijala otopina čistih kemikalija (Fiskesjö 1981; Seth i sur. 2008; Yildiz i sur. 2009), pesticida (Yildiz i sur. 2009; Şuţan i sur. 2014) i soli različitih metala (Fiskesjö 1988; Leme i Marin-Morales 2009). Također, Allium-test se koristi u svrhu biomonitoringa, tj. praćenja kvalitete otpadnih voda (Nielsen i Rank 1994; Radić i sur. 2010; Firbas 2011; Firbas 2013; Olorunfemi i sur. 2012; Roa i sur. 2012), ispitivanja zagađenja poljoprivrednih površina (Dragoeva i sur. 2009; Soodan i sur. 2014) te tala (Cotelle i sur. 1999; Katnoria i sur. 2011).

Za izvedbu testa koriste se lukovice kojima se najprije pažljivo očisti baza kako se ne bi oštetila primordija korijena. Lukovice se zatim postavljaju na epruvetu ili sličnu staklenu posudu tako da je baza uronjena u odstajalu vodovodnu vodu. Kada narastu korjenčići duljine 1-2 cm, za što je najčešće potrebno 72 sata, lukovice se prebacuju na 24-satni tretman – stavljaju se na posude u kojima se nalaze testirane otopine. Istovremeno s tretmanom lukovica ispitivanim otopinama, u pokusu se nalazi niz lukovica na otopinama koje služe kao negativna

i pozitivna kontrola, a važne su za usporedbu rezultata. Za negativnu kontrolu najčešće se koristi vodovodna voda, pročišćena reverznom osmozom, a pozitivna kontrola može biti otopina vodikovog peroksida (H_2O_2) ili otopina soli, npr. bakrovog sulfata ($CuSO_4 \times 5H_2O$). Negativna i pozitivna kontrola koriste se za usporedbu, tj. rangiranje rezultata dobivenih za ispitivane eluate. Nakon provedenog tretmana lukovicama se izmjeri duljina korjenčića. Određeni broj korjenčića se odvoji od lukovica i prebaci u fiksativ gdje će ostati do bojanja i izrade mikroskopskih preparata. Nekoliko lukovica se stavi na 24-satni oporavak na vodovodnoj vodi, nakon čega se također korjenčići odvoje i stave u fiksativ (Fiskesjö 1988). Primjenom Allium-testa određuje se mitotska aktivnost (mitotski indeks) te mitotske i kromosomske aberacije u meristemske regiji korijena luka. Na temelju duljine korijena procjenjuje se učinak istraživanih tvari na rast korijena (Fiskesjö 1997). S obzirom da je korijen luka direktno izložen istraživanim uzorcima, promatranjem makroskopskih promjena korijena te analizom mikroskopskih parametara moguće je donijeti zaključke o kvantitativnom i kvalitativnom utjecaju istraživanih tvari. Uobičajeno promatrani mikroskopski parametri su mitotske i kromosomske aberacije (c-mitoza, multipolarna anafaza, anafazni i telofazni mostovi, sljepljivanje kromosoma, kromosomi koji su zaostali ili izdvojeni iz anafaznih grupa, fragmenti i mikronukleusi). Pored spomenutih aberacija, u okviru Allium-testa često se analizira učestalost pojedinih faza mitoze - interfaze, profaze, metafaze, anafaze i telofaze. Sljepljivanje kromosoma posljedica je toksičnog djelovanja na kromatin dok kao posljedica lomova kromosoma nastaju fragmenti i mikronukleus. Promjene koje nastaju kao posljedica narušavanja strukture i funkcije diobenog vretena ili kinetohora su c-mitoza, zaostali i izdvojeni kromosomi i multipolarna anafaza (Fiskesjö 1997). Pojedina oštećenja vidljiva su tek nakon druge diobe stanica i to je razlog zašto se nakon tretmana lukovice često premještaju na 24-satni oporavak u vodi, nakon čega se analiziraju mikroskopski parametri.

Neke od prednosti korištenja vrsta iz roda *Allium* kao testnih organizma su osjetljivost dinamike rasta korijena na onečišćujuću tvar, jasno vidljive mitotske faze zbog malobrojnih ($2n=16$) i relativno velikih kromosoma koji su dobro vidljivi svjetlosnim mikroskopom. Uz najčešće korištenu vrstu *A. cepa*, zbog jednake osjetljivosti i istih svojstava i broja kromosoma često se koriste i druge vrste iz roda *Allium*.

1.2.2. Komet-test

Komet-test omogućuje detekciju i mjerenje oštećenja molekule DNA te omogućuje procjenu toksičnog potencijala tvari koje mogu onečistiti okoliš (Guzy i sur. 2012). Relativno je jednostavna metoda koja omogućuje mjerenje oštećenja DNA na razini pojedinačnih jezgara stanica. Rydberg i Johanson (1978) razvili su metodu kvantificiranja oštećenja DNA na razini pojedinačnih stanica. Stanice limfocita uklopili su u agarozni gel te ih lizirali u blago lužnatim uvjetima kako bi izazvali djelomičnu denaturaciju molekule DNA. Stanice su bojali bojom akridinoranž, a oštećenje DNA su procijenili fotometrijski - jednolančana DNA fluorescirala je crveno, a dvolančana zeleno. Nekoliko godina kasnije Östling i Johanson (1984) su unaprijedili ovu metodu i uveli lizu stanica i elektroforezu u neutralnim uvjetima. To je omogućilo detekciju dvolančanih lomova te su tada prvi puta od jezgara dobivene strukture nalik kometu. Uvođenjem alkalnih uvjeta Singh i sur. (1988) dodatno su unaprijedili metodu omogućivši detekciju jednolančanih i dvolančanih lomova DNA te se uz neke preinake ona izvodi i danas (Cotelle i Féraud 1999).

Izvedba komet-testa sastoji se od nekoliko koraka: izolacija jezgara i uklapanje u agarozni gel, liziranje stanica (taj korak se može preskočiti pri radu s biljnim stanicama), denaturacija molekule DNA, elektroforeza pri kojoj primijenjena pH vrijednost ovisi o načinu izvedbe, neutralizacija uz korištenje pufera, bojanje jezgara fluorescencijskom bojom, fotografiranje jezgara pomoću fluorescencijskog mikroskopa te analiza slika jezgara pomoću računalnog programa za analizu oštećenja DNA (Guzy i sur. 2012).

Kretanje molekule DNA kroz agarozni gel u električnom polju ovisi o njejoj veličini pri čemu se fragmenti i slobodni krajevi DNA lakše „probijaju“ kroz gel i brže putuju prema pozitivno nabijenoj katodi čineći „rep“ kometa dok neoštećena DNA čini kompaktniju strukturu koja nakon bojenja čini „glavu“ kometa. Stoga duljina „repa“ ovisi o broju i veličini fragmenata, što je veći broj fragmenata, fluorescencija boje u repu je intenzivnija. Računalnom analizom može se procijeniti razina oštećenja molekule DNA na osnovu mjerenja sljedećih parametara: (1) dužine repa tj. udaljenosti na koju su otputovali fragmenti DNA tijekom elektroforeze, (2) postotka DNA u repu i (3) repnog momenta koji se izražava kao umnožak duljine repa i postotka DNA u repu. Obzirom da duljina repa ovisi o trajanju elektroforeze, koje ovisi o stanicama na kojima se test izvodi, za procjenu oštećenja DNA najčešće se koristi parametar postotka DNA u repu (Azqueta i Shaposhnikov 2009).

Prednosti komet-testa su visoka osjetljivost za detekciju oštećenja, jednostavnost izvođenja, mogućnost izvedbe u relativno kratkom vremenskom periodu te relativno mali broj stanica potrebnih za analizu, koje ne moraju biti mitotski aktivne.

1.3. Lipidna peroksidacija

Oksidacijski stres u stanici posljedica je nastajanja prevelike količine reaktivnih oblika kisika (ROS, prema engl. reactive oxygen species). Prisutnost toksičnih tvari u stanici može inducirati nastanak ROS koji uzrokuju oštećenje molekula DNA, RNA i proteina, tj. neselektivnu oksidaciju makromolekula (Ünyayar i sur. 2006; Arya i Mukherjee 2014). Na taj način narušavaju njihovu strukturu i funkciju (npr. enzima, nukleinskih kiselina). Također, prisutnost ROS može prouzročiti i citotoksično djelovanje, što može dovesti do stanične smrti, induciranja mutacija i kromosomskih aberacija, te kancerogeneze (Štefan i sur. 2007).

Polarni lipidi su strukturne komponente staničnih membrana koji zajedno s membranskim proteinima sudjeluju u formiranju barijere koja regulira propusnost u stanicu i subcelularne organele. Glavni tip lipida koji formiraju lipidni dvosloj u gotovo svim tipovima membrana su fosfolipidi, ali u građi membrana sudjeluju i glikolipidi te steroli (npr. kolesterol). Te su molekule ciljevi štetnih modifikacija (Ayala i sur. 2014) koje se događaju u prisutnosti ROS. Lipidna peroksidacija može se općenito opisati kao proces u kojem oksidansi poput slobodnih radikala i ostalih ROS djeluju na lipidne molekule koji sadrže jednu ili više dvostrukih veza između dvaju atoma ugljika. Reakcije započinju napadom ROS, što rezultira izdvajanjem atoma vodika iz metilenske skupine. Na taj način se nezasićene masne kiseline prevode u slobodne lipidne radikale. Prisutnost dvostrukih veza u masnim kiselinama oslabljuje C-H veze na atomu ugljika u blizini dvostruke veze, te tako premještanje vodika čini lakšim. Ugljikov radikal nastoji se stabilizirati reorganizacijom molekule te oblikuje konjugirane diene. Lipidni radikali u aerobnim uvjetima brzo reagiraju s kisikom i stvaraju lipidne peroksidne radikale, koji oduzimaju vodik iz drugih molekula lipida pa na taj način generiraju nove lipidne radikale i lipidne hidroperokside. Pod utjecajem iona željeza ili bakra lipidni peroksidi stvaraju mnogobrojne razgradne produkte među kojima je i malondialdehid (MDA) koji se u laboratorijskim procjenama stupnja lipidne peroksidacije koristi kao pokazatelj oštećenja lipida (Radetski i sur. 2004; Bhattacharjee 2014). Jedna molekula MDA reagira s dvije molekule

tiobarbituratne kiseline (TBA), a time se stvara crvenkasti kromogen koji se mjeri spektrofotometrijski.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja bio je utvrditi genotoksični učinak uzoraka tala prikupljenih na istočnom dijelu istarskog poluotoka na kojem je u prošlosti bila prisutna rudarska industrija - iskapanje i prerada ruda. Prikupljeni su uzorci na dva lokaliteta, za koje se na temelju prethodnih analiza pretpostavlja da su zagađena, te na lokaciji koja nije onečišćena, a taj uzorak služi kao kontrolno tlo. Pripremljeni su eluati tala kojima su izloženi korjenčići kozjaka *A. ascalonicum* L. Korjenčići su korišteni za mjerenje rasta te analizu pojave mitotskih i kromosomskih aberacija provedbom Allium testa, za procjenu stupnja oštećenja molekule DNA komet testom te za određivanje stupnja lipidne peroksidacije metodom mjerenja količine MDA. Na temelju rezultata dobivenih primjenom spomenutih biotestova i mjerenja lipidne peroksidacije procijenit ću i usporediti genotoksični učinak istraživanih uzoraka.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Istraživačke postaje

Prikupljanje uzoraka tla provedeno je na istočnom dijelu istarskog poluotoka na prostoru nekadašnjih ugljenokopa iz kojih se vadio raški ugljen, specifičan zbog visokog sadržaja organskog sumpora čiji udio može biti i do 14% (Medunić i sur. 2016b). Uzorci tala prikupljeni su u 11 mjesecu 2015. godine na lokacijama Štrmac ($45^{\circ} 7' 19''$ N, $14^{\circ} 7' 32''$ E) i Krapan ($45^{\circ} 5' 14''$ N, $14^{\circ} 5' 45''$ E) (Slika 1) te na 30-ak km sjevernijoj lokaciji u Mošćeničkoj Dragi ($45^{\circ} 14' 13.2''$ N, $14^{\circ} 15' 0''$ E) koja služi kao kontrolna lokacija.



Slika 1. Geografski 3D prikaz lokacija Štrmac i Krapan; pripremio: dr. Borna Lužar Oberiter

3.1.1. Geografski položaj

Najveći jadranski poluotok Istra smješten je na zapadnom dijelu Republike Hrvatske. Od unutrašnjosti je odijeljena gorjem Tršćanskog krša i gorskim masivom Ćićarije. Geografska granica Istre proteže se linijom od uvale Milje do uvale Preluk. Najzapadnija točka Istre, a i cijele Hrvatske je rt Lako, a najjužnija rt Kamenjak. Sjeverozapadni dio okružen je Tršćanskim zaljevom, istočni Plominskim i Raškim zaljevom, a na jugozapadnoj i zapadnoj obali nalaze se Limski kanal i Tarski zaljev. Niska zapadna obala Istre plića je i bolje razvedena, dok je istočna strma, kamenita i slabo razvedena. Ukupna površina Istre iznosi 3476 km^2 .

3.1.2. Geološke karakteristike

Prostor istočne Istre, na kojem se nalaze ležišta ugljena, sadržava naslage paleogenske starosti tj. četvrte taložne cjeline. Podizanje morske razine uzrokovalo je istodobno izdizanje velikih nakupina podzemne slatke vode, koja je potopila najniže dijelove reljefa pretvarajući ih u močvare. U močvarama je između karbonatnih sedimenata taložen izvorišni materijal za debele naslage ugljena čineći slojeve debljine od nekoliko cm do preko 3 m. Na pojedinim mjestima nalazi se i do 100 slojeva ugljena, vjerojatno tektonski ponavljano, a na prostoru Labina ukupna debljina čistog ugljena iznosi i do 15 m (Miko i sur. 2013).

3.2. Uzorkovanje tla

Za ovo istraživanje dobila sam uzorke tala koji su prikupljeni na području istočne Istre na lokalitetima Štrmac i Krapan te na brdu oko Mošćeničke Drage koja je odabrana kao kontrolna lokacija (referentno tlo, nadalje u tekstu kontrolno tlo, KT). Nakon uklanjanja vegetacijskog pokrova, čistom lopatom uzorkovano je vršnih 10 cm tla, 1-2 kg (Slika 2). Na lokaciji Štrmac tlo je uzorkovano na dvije dubine; Štrmac A (ŠA) na dubini do 10 cm, a Štrmac B (ŠB) na dubini 10-20 cm. Prikupljeni uzorci osušeni su na zraku, razmravljeni te prosijani kroz sito s otvorima promjera 1 mm. Za istraživanja u ovom radu od prikupljenog su tla na Geološkom odsjeku PMF-a pripremljeni eluati tala. Odvaganom tlu (4,5 g) dodano je 45 ml MilliQ vode (omjer 1:10) te je suspenzija 24 sata mehanički miješana na tresilici (300 rpm), a nakon toga je centrifugirana 2 x 20 min pri 2 000 g te filtrirana kroz membranski filter promjera pora 0,45 µm. Eluati su spremljeni u čiste plastične bočice i čuvani do upotrebe na temperaturi +4 °C. Sadržaj glavnih i sporednih metala te elemenata u tragovima (Tablica 1) u uzorcima eluata tla analiziran je na Institutu „Ruđer Bošković“ ICP-MS metodom (Medunić i sur. 2016a). U tu svrhu je po 10 ml svakog eluata i kontrole zakiseljeno nitratnom kiselinom (HNO₃ 65% supra pur, Kemika, Zagreb) tako da udio kiseline bude 0,5% HNO₃ s.p. (v/v). Osim uzoraka ŠA, ŠB, KR i KT analizirana je i vodovodna voda prethodno podvrgnuta reverznoj osmozi na uređaju Biom reverzna osmoza 280 L koja će u pokusu imati ulogu negativne kontrole.



Slika 2. Uzorkovanje tla; snimila: G. Medunić

Tablica 1. Sadržaj elemenata ($\mu\text{g/L}$) u eluatima tla analiziranim na Institutu „Ruđer Bošković“ metodom ICP-MS (KN- Negativna kontrola; KT- Kontrolno tlo, ŠA- Štrmac A, ŠB- Štrmac B, KR- Krapan)

Element	KN	KT	ŠA	ŠB	KR
Li	0,387	0,22	0,843	1,243	0,88
Be	<LOD*	0,006	0,003	0,161	0,003
Rb	0,419	6,566	7,554	7,099	3,835
Mo	0,091	0,655	3,355	2,203	505,208
Ag	<LOD*	0,135	0,494	0,027	1,9
Cd	0,005	0,135	0,358	0,813	2,75
Sn	0,024	0,063	2,199	1,085	0,11
Cs	0,004	0,029	0,029	0,067	0,067
Tl	0,001	0,154	0,042	0,052	0,02
Pb	2,554	0,222	10,254	47,678	0,488
Bi	<LOD*	0,004	0,011	0,027	0,004
U	0,153	0,156	2,211	0,768	0,185
Al	1,116	48,443	193,964	1456,191	516,054
Sc	<LOD*	0,292	0,113	0,069	0,127
Ti	0,042	4,587	11,411	17,511	13,221
V	0,066	5,835	26,377	44,23	13,799
Cr	0,032	0,52	2,483	4,113	3,859
Mn	0,094	22,064	33,364	84,477	34,636
Fe	0,331	110,053	237,139	545,94	357,584
Co	0,012	0,564	0,264	0,988	128,535
Ni	0,169	1,77	1,794	5,961	17,115
Cu	6,307	6,968	400,008	775,702	79,36
Zn	10,95	2,139	346,321	2862,647	8,437
Sr	88,19	27,196	129,777	127,062	120,591
Y	0,003	0,813	0,505	1,837	0,302
Sb	0,04	0,408	2,269	2,845	0,834
Ba	17,984	11,685	42,356	51,74	65,201
La	0,001	0,488	0,489	1,571	0,269
Ce	0,001	0,881	0,763	2,684	0,397
Pr	0	0,149	0,114	0,409	0,06
Nd	0	0,69	0,458	1,628	0,258
Sm	0,003	0,161	0,103	0,356	0,057
Eu	0,007	0,035	0,026	0,079	0,024
Tb	0	0,022	0,013	0,05	0,007
Dy	<LOD*	0,128	0,07	0,284	0,041
Ho	<LOD*	0,025	0,011	0,055	0,006
Er	0,002	0,084	0,046	0,163	0,029
Tm	<LOD*	0,011	0,005	0,021	0,003
Yb	<LOD*	0,071	0,032	0,131	0,018
Lu	0	0,013	0,005	0,019	0,004
As	<LOD*	1,031	2,202	2,918	1,47
Se	<LOD*	2,538	1,541	1,27	0,217
Gd	<LOD*	0,149	0,085	0,327	0,046

* ispod granice detekcije uređaja

3.3. Allium-test

Kao testni organizam za istraživanje učinaka vodenih filtrata tla izabrala sam kozjak *Allium ascalonicum* L. koji pripada *Allium cepa* Aggregatum grupi (Puizina 2013). Pokus sam provela prema prilagođenoj metodi Fiskesjö (1985). Koristila sam male lukovice (promjera 1-2 cm), koje nisu tretirane zaštitnim sredstvima. Prethodno početku pokusa, očistila sam nožem bazu lukovice pazeći da ne oštetim primordiju korijena. Za svaki ispitivani uzorak tla (eluat) te pozitivnu i negativnu kontrolu pripremila sam sedam staklenih posudica volumena 22 ml i napunila ih vodovodnom vodom koja je prethodno bila podvrgnuta reverznoj osmozi pomoću uređaja Biom reverzna osmoza 280 L. Na te posudice nasadila sam lukovice i ostavila 72 sata da izrastu korjenčići duljine 1-2 cm, te sam nakon svaka 24 sata mijenjala vodu. Pet najboljih lukovica za svaki tretman i kontrole izabrala sam za nastavak testa (Slika 3). Lukovice kojima korjenčići nisu izrasli ili su bili dulji od 2 cm nisu korištene u pokusu.

Lukovice s korjenčićima sam tretirala eluatima tla, uzorcima KR, ŠA, ŠB i KT te kontrolnim otopinama u trajanju od 24 sata. Za negativu kontrolu koristila sam vodovodnu vodu pročišćenu reverznom osmozom, a za pozitivnu kontrolu odabrala sam tretman otopinom vodikovog peroksida (H_2O_2) koncentracije 300 mM i otopinom bakrovog sulfata ($CuSO_4 \times 5H_2O$) koncentracije $5,0 \mu mol dm^{-3}$.



Slika 3. Lukovice u staklenim posudicama tijekom izvedbe Allium-testa; snimila: P. Jezidžić

Po isteku 24 sata dio korjenčića sam otkinula i stavila u fiksativ (koji sadrži etanol (96%) i octenu kiselinu (99-100%) u omjeru 3:1) a lukovice stavila na oporavak na vodovodnu vodu pročišćenu reverznom osmozom na dodatna 24 sata. Vodu sam mijenjala svaka 24 sata tijekom trajanja pokusa. Pokus sam provela pod kontroliranim uvjetima, na sobnoj temperaturi 23-25°C te izvan utjecaja direktnog sunčevog zračenja. Nakon završetka pokusa najprije sam ravnalom izmjerila duljinu korjenčića, a zatim sam ih prebacila u fiksativ istog sastava kao i nakon 24-satnog tretmana. U fiksativu su korjenčići bili do pripreme za mikroskopsku analizu. Duljinu korjenčića pojedine lukovice izmjerila sam kao duljinu do koje je narastao najveći broj korjenčića na toj lukovici prema uputi Fiskesjö (1985). Kao što sam ranije napomenula, korjenčiće sam tijekom pokusa fiksirala dva puta. Nekoliko korjenčića uklonila sam nožićem s lukovice nakon završetka 24-satnog tretmana, a preostale korjenčiće nakon 24-satnog oporavka lukovica. Prethodno bojanju korjenčiće sam na kratko uronila u destiliranu vodu i stavila na 10 min u epruvete koje su se nalazile u termobloku i sadržavale HCl koncentracije 1 mol dm⁻³ zagrijane na 60°C. Za postupak bojanja koristila sam Schiffov reagens priređen prema uputi koju su Feulgen i Roosenbeck predložili 1924. godine (Sharma i Sharma 1972). Otopinu boje sam stavila u tamne staklene posudice i u boju uronila korjenčiće. Začepljene posudice sam ostavila dva sata u tamnom prostoru na sobnoj temperaturi (23-25 °C). Nakon toga sam stanice na vršku korjenčića, tj. u meristemskoj regiji korijena pregledavala mikroskopom Olympus CX21. Preparate sam izradila metodom „squash“. Korjenčić sam iz staklene posudice pincetom prebacila na predmetno stakalce na koje sam prethodno stavila jednu kap 45%-tne octene kiseline. Žiletom sam odvojila meristemsku regiju od ostatka korjenčića i smrvila ju staklenim štapićem. Usitnjene stanice sam na kraju prekrila pokrovnim stakalcem i filter papirom te pritisnula palcem. Mikroskopska analiza uključivala je određivanje mitotskog indeksa (MI), mitotskih i kromosomskih aberacija te udjela pojedinih faza mitoze u ukupnom broju stanica u mitozu (Fiskesjö 1993). Po tretmanu sam pregledala jedan do dva korjenčića za svaku od pet replika, tj. prosječno 8 korjenčića po tretmanu. Brojala sam oko 500 stanica po preparatu, odnosno prosječno 4 500 stanica po tretmanu. Mitotski indeks izračunala sam za svaki tretman kao udio ukupnog broj stanica koje su bile u diobi (u profazi, metafazi, anafazi i telofazi) u odnosu na ukupni broj promatranih stanica, prema Tedesco i Laughinghouse (2003):

$$MI = \frac{P+M+A+T}{\text{ukupan broj stanica}} .$$

Kromosomske aberacije izrazila sam kao ukupni broj nepravilnosti koje uključuju mitotske nepravilnosti (c-mitoza, multipolarna anafaza, anafazni i telofazni mostovi, sljepljivanje kromosoma, izdvojeni i zaostali kromosomi) i ostale nepravilnosti (mikronukleus i lomovi), a izračunate su kao broj stanica s nepravilnostima podijeljen s ukupnim brojem stanica u mitozu. Udio stanica u pojedinim fazama mitoze izrazila sam za svaku fazu posebno, npr. broj stanica u profazi izračunala sam prema sljedećoj formuli kao broj stanica zabilježenih u profazi u odnosu na ukupan broj stanica u diobi:

$$P = \frac{P}{P+M+A+T}.$$

3.4. Komet-test

Oštećenje molekule DNA procijenila sam pomoću komet-testa. Za provedbu testa koristila sam korjenčiće kozjaka *Allium ascalonicum* L., uzgojene na isti način kao i za Allium-test. Za svaki tretman i kontrole nasađene su po tri lukovice. Pokus sam provela prema prilagođenoj metodi Guzy (2012). Prije izolacije jezgara pripremila sam djelomično brušena predmetna stakalca (ESCO Erie Scientific) na koja sam nanijela prvi sloj agaroze tako da sam stakalca uronila u vodenu otopinu 1%-tne agaroze normalne temperature tališta (engl. Normal Melting Point, NMP). Stakalca sam zatim ostavila na zraku 20 minuta kako bi se agarozna polimerizirala i osušila.

Postupak mehaničke izolacije jezgara iz stanica korjenčića kozjaka radila sam na ledu kako bih smanjila mogućnost dodatnog oštećenja molekule DNA. U Petrijevu zdjelicu stavila sam 180 μ L pufera za izolaciju jezgara (Tris-HCl, pH = 7,5). Odrezala sam nekoliko korjenčića s lukovice i usitnila ih pomoću žileta kako bi oslobodila jezgre iz stanica. Nakon toga lagano sam nagnula Petrijevu zdjelicu kako bi se što više jezgara skupilo u puferu na dnu zdjelice. Mikro-pipetom sam prenijela 100 μ L uzorka u eppendorf epruvetu. U istu epruvetu dodala sam 100 μ L prethodno pripremljene agaroze koja čini drugi sloj preparata (1%-tna agarozna niskog tališta (engl. Low Melting Point, LMP) u fosfatnom puferu PBS, pH = 7,0, temperature 42°C). Mikro-pipetom sam prenijela 100 μ L smjese jezgara i agaroze na predmetno stakalce sa prvim slojem agaroze te sam sve poklopila pokrovnim stakalcem. Tako pripremljeni uzorak prebacila sam u kadicu s ledom na oko 15 min kako bi se agarozna što prije polimerizirala i jezgre fiksirale u gelu. Kadicu sam prekrila pamučnom tkaninom kako bih smanjila djelovanje svjetla koje bi

moglo uzrokovati oštećenje molekule DNA. Prije denaturacije i elektroforeze pokrovna stakalca sam uklonila s preparata.

Pufer za elektroforezu alkalne izvedbe komet-testa sadržavao je 10 mmol dm^{-3} NaOH, 200 mmol dm^{-3} EDTA, pH vrijednosti iznad 13. Pufer ohlađen na 4°C ulila sam u kadicu za elektroforezu (Biorad) te u nju posložila predmetna stakalca u horizontalni položaj. U puferu za elektroforezu provela sam alkalnu denaturaciju DNA u trajanju 10 min, a zatim i elektroforezu u trajanju od 15 min. Tijekom elektroforeze napon je bio 26 V, a jakost struje 300 mA (Slika 4).

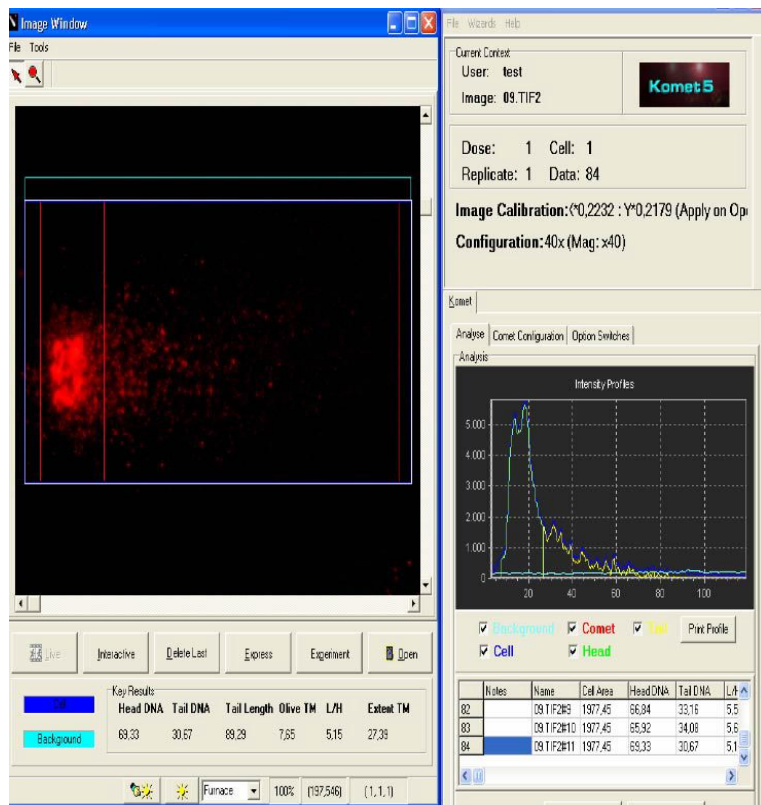


Slika 4. Kadica za elektroforezu s uzorcima

Nakon elektroforeze, preparate sam neutralizirala pomoću pufera Tris-HCl (pH = 7,5) 3 puta po 5 min, isprala destiliranom vodom i ostavila da se osuše na sobnoj temperaturi. Tako pripremljene preparate posložila sam u tamnu kutiju i ostavila na sobnoj temperaturi do analize.

Neposredno prije analize, stakalca sam 5 min rehidrirala destiliranom vodom, osušila na zraku te bojala fluorescencijskom bojom etidij bromid ($10 \mu\text{g/mL}$). Boju sam nanosila nakapavanjem (oko $70 \mu\text{l}$ otopine boje po preparatu). Na tako pripremljen preparat, stavila sam pokrovno stakalce i analizirala ga fluorescencijskim mikroskopom Olympus BX 51. Jezgre sam snimala digitalnom kamerom kod povećanja objektiva $40\times$. Analizirala sam 150-170

jezgara po tretmanu. Oštećenja molekule DNA analizirala sam računalnim programom Komet (Kometversion 5, Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, UK). Kao glavni parametar za procjenu nastalog oštećenja molekule DNA koristila sam podatak o postotku DNA u repu koji se izražava na temelju intenziteta fluorescencije u repu kometa (Slika 5) (Gichner i sur. 2004).



Slika 5. Program za analizu Komet 5 Kinetic Imaging

3.5. Lipidna peroksidacija

Stupanj lipidne peroksidacije odredila sam mjerenjem količine malondialdehida (MDA) u ekstraktima korjenčića kozjaka. Koristila sam korjenčiće kozjaka *A. ascalonicum* tretirane na isti način kao u Allium-testu. Nakon tretmana lukovicama sam odrezala cijele korjenčiće te za svaki tretman i kontrolu odvagala 5 replika po 200 mg tkiva. Tijekom vaganja uzorke sam držala na ledu, a na kraju sam ih spremila u ledenicu na -80°C do daljnjih laboratorijskih postupaka (Heath i Packer 1968; Cvjetko i sur. 2010).

U svrhu određivanja MDA korjenčiće sam homogenizirala u tarioniku u 1300 μl reakcijske smjese koja je sadržavala 0,25% tiobarbituratne kiseline otopljene u 10%-tnoj trikloroctenoj kiselini (0,25% TBA u 10% TCA). Spomenutu reakcijsku smjesu koristila sam kao slijepu probu. Uzorke i slijepu probu prelila sam u staklene semimikroeprovete te zagrijavala

u sušioniku 30 min na 95°C. Nakon zagrijavanja semimikroeprevete sam stavila u usitnjeni led radi naglog hlađenja, zatim prelila sadržaj u eppendorf epruvete te centrifugirala 10 min na 15 000 g. Dobivenom supernatantu očitala sam apsorbanciju na 532 te na 600 nm zbog korekcije na nespecifično zamućenje.

Stupanj lipidne peroksidacije izražen je kao koncentracija nastalog MDA, u jedinicama $\mu\text{mol/g}_{\text{sv.t}}$. Molarni apsorpcijski koeficijent (ϵ) iznosi $155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, a duljina optičkog puta (l) je 1 cm. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost pet replika \pm standardna devijacija. Koncentracija MDA izračunata je prema formuli:

$$\text{MDA} = \left(\frac{A_{532} - A_{600}}{155 \times m \times l} \right) \times 10^3$$

3.6. Statistička analiza

Za statističku obradu podataka koristila sam računalni program STATISTICA 13.1. U cilju utvrđivanja razlike između tretmana i kontrole provela sam Mann-Whitney test za usporedbu rezultata MI, ukupnih nepravilnosti i pojedinih faza mitoze. Rezultate mjerenja duljine korjenčića, stupnja lipidne peroksidacije te rezultate dobivene komet-testom usporedila sam analizom varijance (one-way ANOVA) te sam Newman-Keuls testom utvrdila koji se uzorci značajno razlikuju. Statistički značajnim smatraju se rezultati koji se razlikuju na razini $p \leq 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Allium-test

4.1.1. Duljina korjenčića

Za svaki uzorak eluata tla i kontrolne otopine duljinu korjenčića na lukovicama izmjerila sam kao duljinu koju je dostigla većina korjenčića na pojedinoj lukovici, a rezultate sam izrazila kao srednju vrijednost svih pet lukovica (replika) izloženih istom tretmanu ili kontrolnoj otopini (Tablica 2). Značajnu razliku u duljini korjenčića, prema Newman-Keuls testu pokazale su samo lukovice izložene pozitivnoj kontroli 2, tj. otopini bakrovog sulfata koja je uzrokovala inhibiciju rasta u odnosu na negativnu kontrolu. Prosječna duljina korjenčića na tim lukovicama bila je 1,18 cm. Lukovice koje su poslužile kao negativna kontrola imale su najveću prosječnu duljinu korjenčića, a iznosila je 3,06 cm, dok su kod ostalih tretiranih lukovica vrijednosti bile nešto niže. U morfološkom izgledu korjenčića nisam uočila makroskopske promjene (npr. zadebljanja, oštećenja), no korjenčići obiju pozitivnih kontrola su u usporedbi s korjenčićima negativne kontrole i tretmana bili tanji. Također, tkivo im je bilo manje turgescentno u odnosu na negativnu kontrolu i tretmane.

Tablica 2. Duljina korjenčića (cm) izražena kao srednja vrijednost duljine korjenčića 5 lukovica \pm standardna devijacija. KN - Negativna kontrola (vodovodna voda pročišćena reverznom osmozom), KT - Kontrolno tlo, ŠA - Štrmac A, ŠB- Štrmac B, KR- Krapan, KP1- Pozitivna kontrola 1 (300 mmol dm⁻³ H₂O₂), KP2 - Pozitivna kontrola 2 (5,0 μ mol dm⁻³ CuSO₄ x 5H₂O).

Uzorci	Prosječna duljina korjenčića (cm)
KN	3,06 \pm 0,48
KT	2,48 \pm 0,5
ŠA	3,18 \pm 0,17
ŠB	2,9 \pm 0,17
KR	2,36 \pm 0,33
KP1	1,94 \pm 0,11
KP2	1,18 \pm 0,09*

*vrijednost označena zvjezdicom značajno je različita od ostalih tretmana i kontrolnih grupa, prema Newman-Keuls testu, $p \leq 0,05$

4.1.2. Mikroskopski parametri

Mikroskopska analiza uzoraka (fiksiranih odmah nakon 24-satnog tretmana te nakon 24-satnog oporavka) obuhvaćala je analizu oko 3300 do 5300 stanica (Tablica 3) u

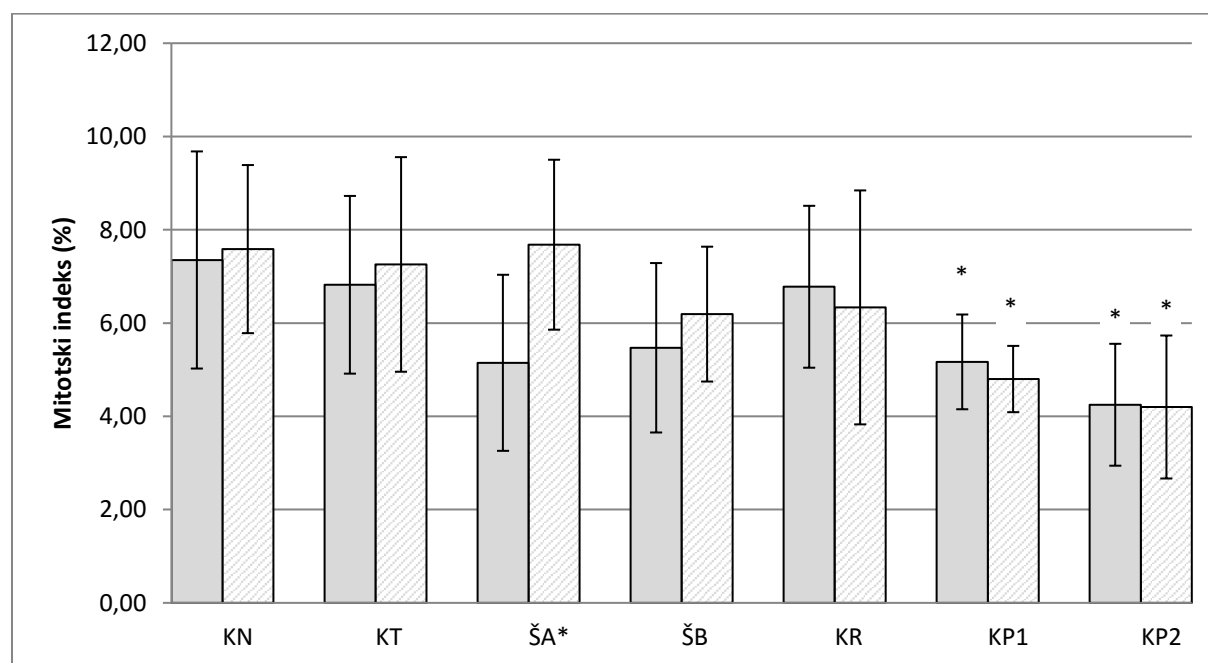
meristemskom dijelu korijena luka. Najveći broj stanica u mitozu izbrojala sam u korjenčićima negativne kontrole (24-satni tretman: 359, nakon 24-satnog oporavka: 401), a najmanji u pozitivnoj kontroli 2 (24-satni tretman: 185, nakon 24-satnog oporavka: 141). Vrijednosti mitotskog indeksa tretiranih korjenčića prema Mann-Whitney testu nisu bile značajno različite od negativne kontrole, dok su se obje pozitivne kontrole značajno razlikovale od negativne (Slika 6). Nakon 24-satnog oporavka mitotski indeksi korjenčića koji su bili izloženi uzorcima ŠA, ŠB, KT i negativnoj kontroli pokazali su blago, ali ne statistički značajno povećanje u odnosu na mitotske indekse korjenčića nakon 24-satnog tretmana. Statistički značajno povećanje zabilježeno je samo kod korjenčića izloženog uzorku ŠA sa 5,27% u tretmanu na 7,55% nakon oporavka (Slika 6). Prema Mann-Whitney testu, mitotski indeksi tretiranih korjenčića nakon 24-satnog oporavka, osim pozitivnih kontrola, nisu se značajno razlikovali od negativne kontrole (Slika 6).

Mitotske nepravilnosti promatrala sam u profazi, metafazi, anafazi i telofazi. Među najčešće zapažene mitotske nepravilnosti uočene nakon 24-satnog tretmana te 24-satnog oporavka korjenčića ubrajaju se kromosomi koji su izdvojeni iz grupa kromosoma u metafazi i anafazi, zaostali kromosomi u anafazi te sljepljivanje. Tih je nepravilnosti najviše zabilježeno u korjenčićima tretiranim uzorcima ŠA i KR (Slika 7). Od ukupno 13 zabilježenih ostalih nepravilnosti (lomovi i mikronukleus) u korjenčićima izloženim istraživanim uzorcima i korjenčićima nakon oporavka, tek dva se odnose na mikronukleuse, koji su uz c-mitozu i multipolarnu anafazu najrjeđe zabilježene nepravilnosti. Na Slika 8 prikazano je nekoliko pravilnih faza mitoze.

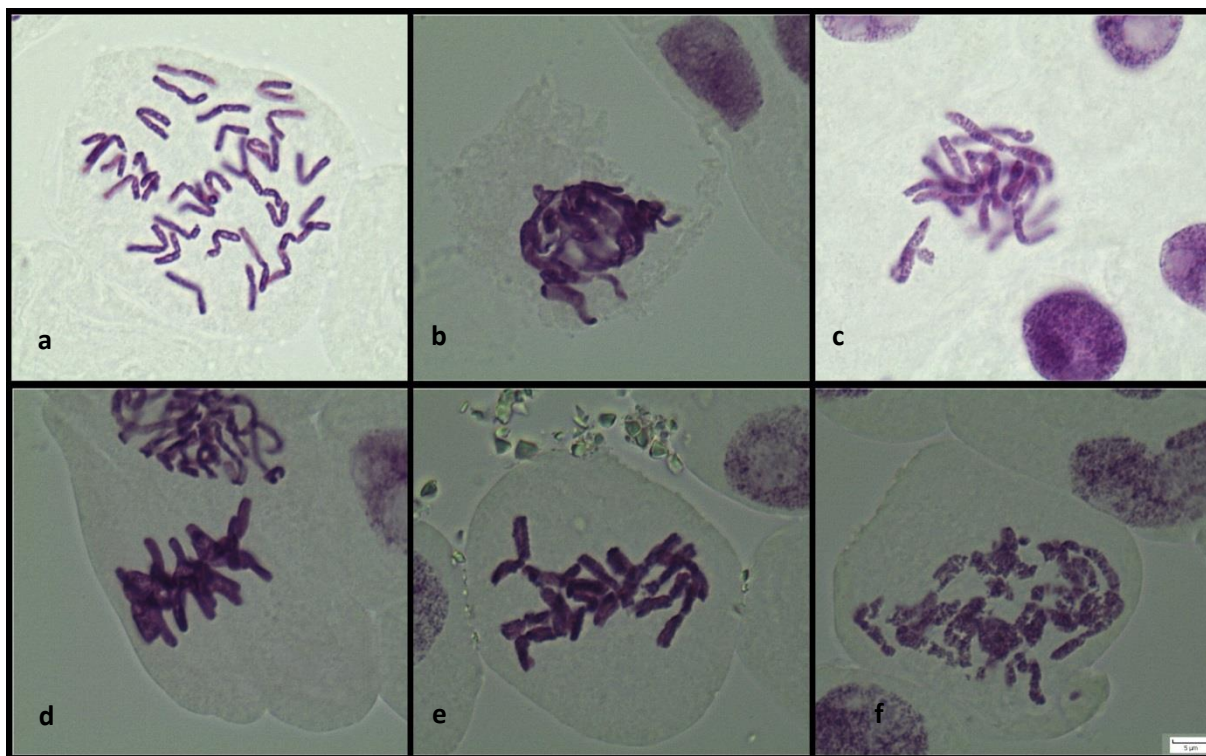
Ukupan broj nepravilnosti nakon 24-satnog tretmana bio je očekivano najniži u korjenčićima negativne, a najviši u korjenčićima pozitivne kontrole (Tablica 3). Kod korjenčića nakon 24-satnog oporavka najniža je bila vrijednost ukupnog broja nepravilnosti u korjenčićima tretiranim uzorkom kontrolnog tla - 19, dok je vrijednost negativne kontrole bila nešto viša i iznosi 29, a najviša je kod pozitivne kontrole 1 gdje je iznosila 105.

Tablica 3. Broj pregledanih stanica, broj stanica u mitozu i zapažene mitotske nepravilnosti te pojava mikronukleusa u korjenčićima kozjaka *A. ascalonicum* nakon 24-satnog tretmana eluatima tla te nakon 24-satnog oporavka na vodovodnoj vodi obrađenoj reverznom osmozom. Za svaki tretman analiziran je minimalno jedan korjenčić od svake replike (ukupno je bilo pet replika). Opisi tretmana navedeni su u Tablica 2.

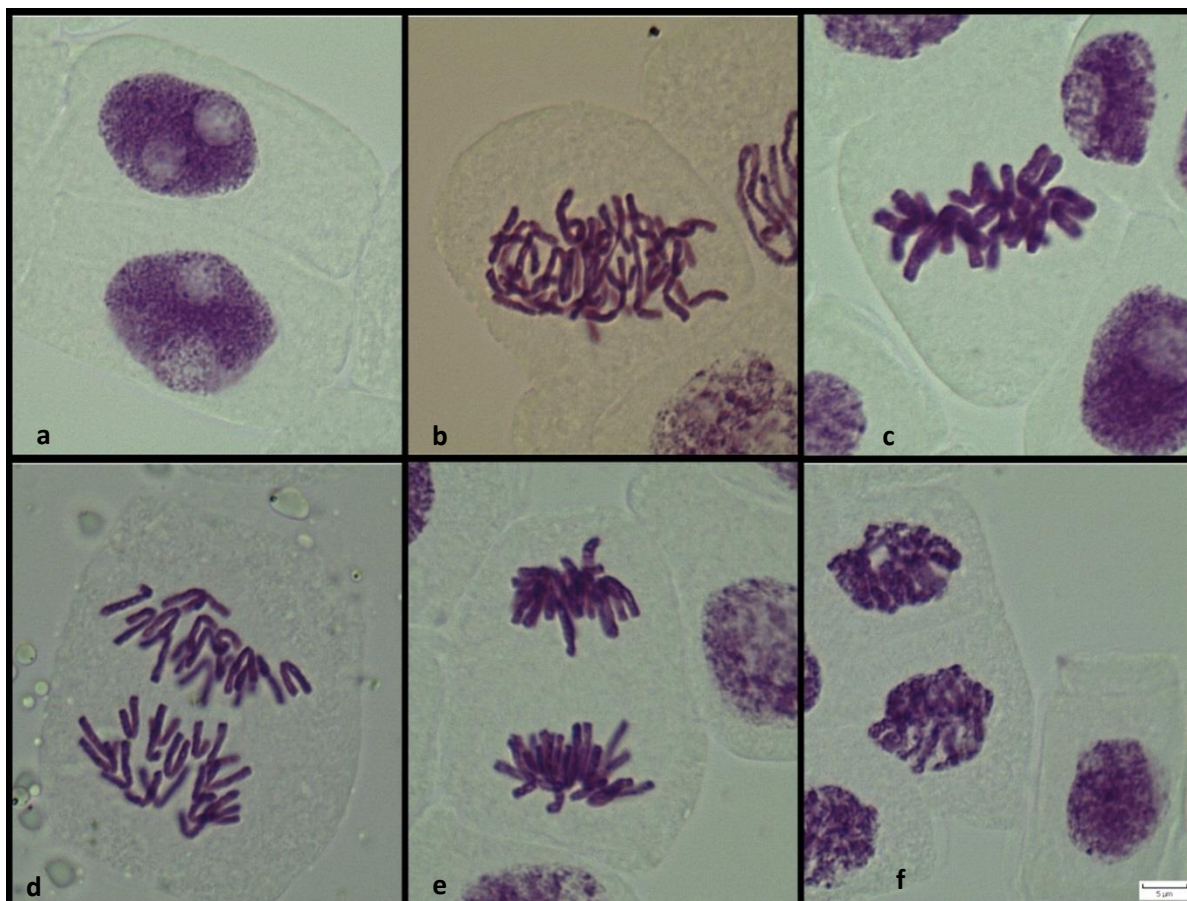
	uzorci	ukupan broj stanica	broj stanica u mitozu	mitotske nepravilnosti	ostale nepravilnosti (mikronukleus, lomovi)	ukupan broj nepravilnosti
TRETMAN	KN	4695	359	18	2	20
	KT	5041	342	32	0	32
	ŠA	5258	277	40	1	41
	ŠB	4801	238	38	0	38
	KR	4713	326	50	1	51
	KP1	4475	231	60	2	62
	KP2	4267	185	72	1	73
OPORAVAK	KN	5374	401	28	1	29
	KT	4642	340	19	0	19
	ŠA	4501	340	48	0	48
	ŠB	3772	234	28	0	28
	KR	4791	300	46	0	46
	KP1	4843	234	100	5	105
	KP2	3354	141	75	0	75



Slika 6. Mitotski indeks (%) u meristemsom dijelu korjenčića kozjaka *A. ascalonicum* nakon 24-satnog tretmana eluatima tla (tamnije sivi stupići) te mitotski indeks nakon 24-satnog oporavka u destiliranoj vodi pročišćenoj reverznom osmozom (svjetlije sivi stupići). Opisi oznaka navedeni su u naslovu Tablica 2. Stupci označeni zvjezdicom statistički se razlikuju od negativne kontrole. Kod uzorka označenog zvjezdicom (na apscisi) utvrđena je statistički značajna razlika između vrijednosti dobivenih nakon tretmana i vrijednosti dobivenih nakon oporavka ($p \leq 0,05$, Mann-Whitney test).



Slika 7. Stanice korijena kozjaka *Allium ascalonicum* ($2n=16$) nakon 24-satnog tretmana eluatima tla: (a) nepravilna anafaza (KR), (b) sljepljivanje kromosoma u kasnoj profazi (KP2), (c) izdvojeni kromosom u metafazi (KP1), (d) sljepljivanje kromosoma u metafazi (KP2), (e) izdvojeni kromosom (KP1), (f) lezije kromatina (KP1). Opisi tretmana navedeni su u Tablica 2.

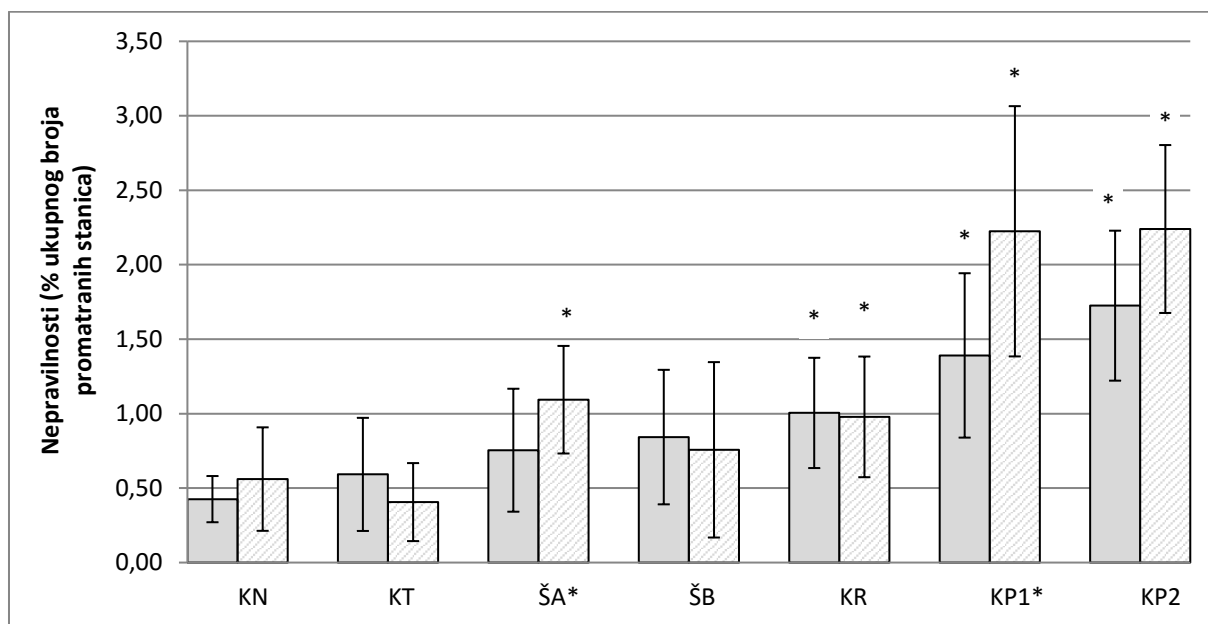


Slika 8. Stanice korijena kozjaka *Allium ascalonicum* ($2n=16$) nakon 24-satnog tretmana eluatima tla sa lokaliteta Krapan – interfaza i nekoliko primjera pravilnih faza mitoze: (a) interfaza, (b) rana anafaza, (c) metafaza, (d) anafaza, (e) kasna anafaza, (f) telofaza.

Ukupan broj nepravilnosti izražen kao postotak nepravilnosti od ukupnog broja pregledanih stanica po uzorku nakon 24-satnog tretmana najniži je bio u negativnoj kontroli (0,43%), a najviši u pozitivnoj kontroli 2 s 1,73% (Slika 9). Od negativne kontrole statistički značajno su se razlikovali korjenčići tretirani uzorcima KR te obje pozitivne kontrole, dok su ostali tretmani imali malo povišene vrijednosti, ali razlike nisu bile statistički značajne.

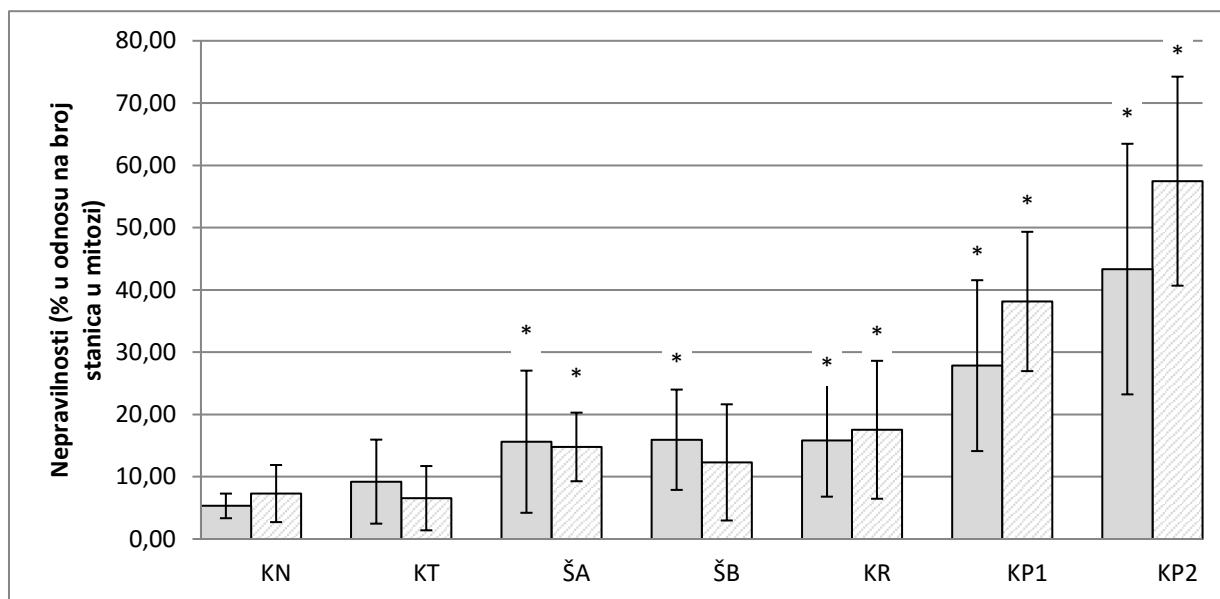
Najniža vrijednost ukupnog broja nepravilnosti u korjenčićima nakon 24-satnog oporavka zabilježena je u korjenčićima izloženim eluatima kontrolnog tla - 0,41%, a najviša u pozitivnim kontrolama 1 i 2 sa vrijednostima 2,22% odnosno 2,24% (Slika 9). Osim obje pozitivne kontrole, od negativne kontrole statistički su se značajno razlikovali korjenčići tretirani uzorcima ŠA i KR. Nakon 24-satnog oporavka ukupan broj nepravilnosti (%) uzoraka negativne kontrole, ŠA i pozitivnih kontrola bio je viši u odnosu na korjenčiće nakon 24-satnog

tretmana. Korjenčići tretirani uzorcima kontrolno tlo, ŠB i KR pokazuju niže vrijednosti ukupnog broja nepravilnosti (%) nakon 24-satnog oporavka u usporedbi s korjenčićima nakon 24-satnog tretmana. Prema Mann-Whitney testu statistički značajno povećanje zabilježeno je kod ŠA, sa 0,75% nakon 24-satnog tretmana na 1,09% nakon 24-satnog oporavka te kod pozitivne kontrole 1, sa 1,39% na 2,22% (Slika 9).



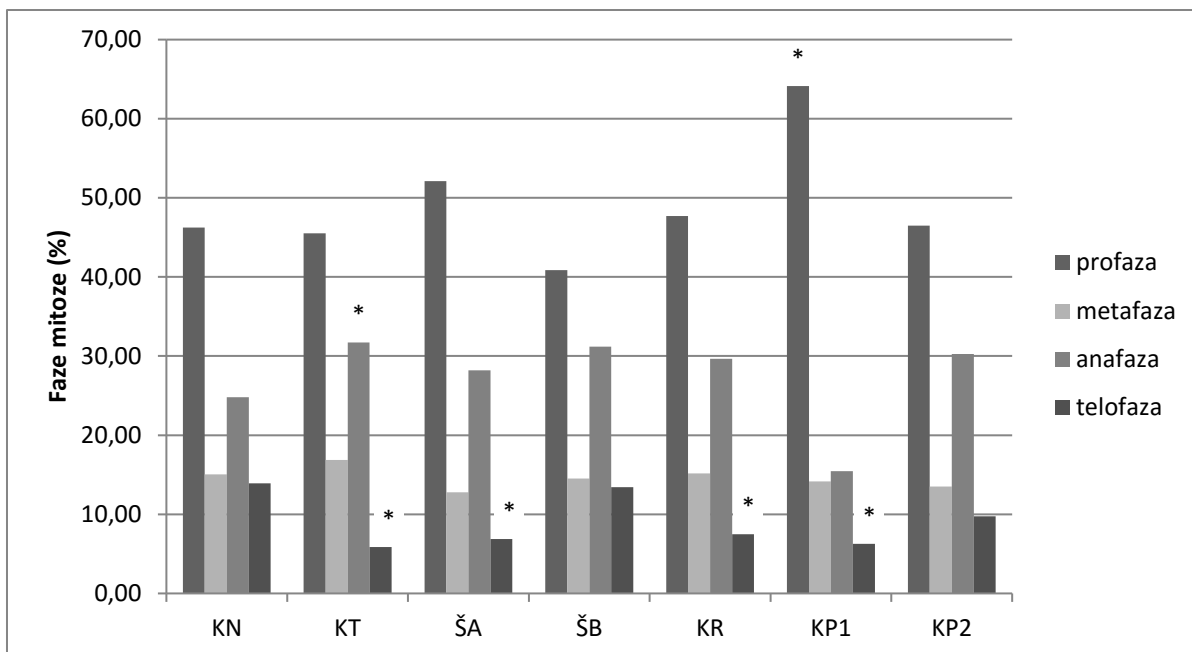
Slika 9. Ukupan broj mitotskih nepravilnosti te pojava mikronukleusa (izražen kao % nepravilnosti od ukupnog boja pregledanih stanica po uzorku) u meristemskom dijelu korjenčića kozjaka *A. ascalonicum* nakon 24-satnog tretmana eluatima tla (tamnije sivi stupići) te broj nepravilnosti nakon 24 oporavka destiliranom vodom pročišćenom reverznom osmozom (svjetlije sivi stupići). Opisi oznaka navedeni su u naslovu Tablica 2. Stupci označeni zvjezdicom statistički se razlikuju od negativne kontrole ($p \leq 0,05$, Mann-Whitney testu). Kod uzoraka označenih sa zvjezdicom (na apscisi) utvrđena je statistički značajna razlika između vrijednosti dobivenih nakon tretmana i vrijednosti dobivenih nakon oporavka ($p \leq 0,05$, Mann-Whitney test).

Broj stanica s mitotskim nepravilnostima izražen kao postotak od ukupnog broja stanica u mitozu kod svih je korjenčića nakon 24-satnog tretmana, osim kontrolnog tla, bio statistički različit od negativne kontrole (Slika 10). Nakon 24-satnog oporavka, od negativne kontrole značajno su se razlikovali korjenčići tretirani uzorcima ŠA, KR i pozitivne kontrole (Slika 10). Najnižu vrijednost mitotskih nepravilnosti nakon 24-satnog tretmana imala je negativna kontrola - 5,31%, a nakon 24-satnog oporavka korjenčići izloženi eluatima kontrolnog tla - 6,55% dok su u oba slučaja najvišu vrijednost imali korjenčići tretirani uzorcima pozitivne kontrole 2 - vrijednosti su bile 43,34%, odnosno 57,46%.

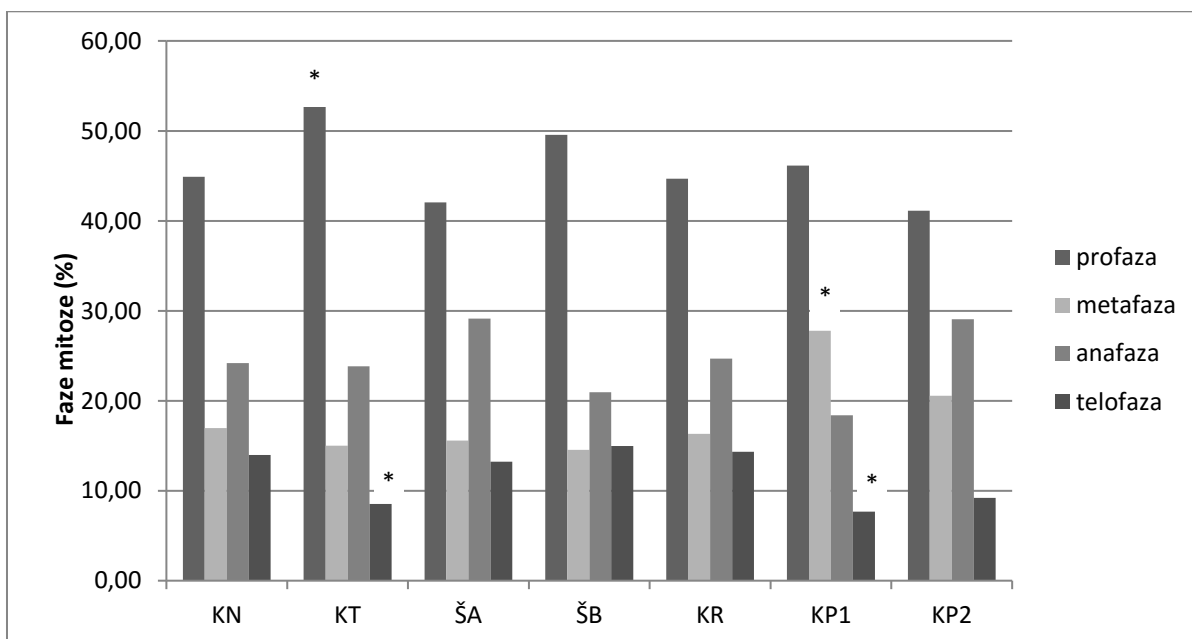


Slika 10. Mitotske nepravilnosti (izražene kao % od ukupnog broja stanica u mitozii) korjenčića kozjaka *A. ascalonicum* nakon 24-satnog tretmana eluatima tla (tamnije sivi stupići) te mitotske nepravilnosti nakon 24-satnog oporavka destiliranom vodom pročišćenom reverznom osmozom (svjetlije sivi stupići). Opisi oznaka navedeni su u naslovu Tablica 2. Stupci označeni zvjezdicom statistički su različiti od negativne kontrole ($p \leq 0,05$, Mann-Whitney test).

Usporedbom broja pojedinih faza mitoze nakon 24-satnog tretmana kod korjenčića izloženih tretiranim uzorcima KT, ŠA i KR te pozitivne kontrole 1 s negativnom kontrolom Mann-Whitney testom, statistički se značajno različitom pokazala samo učestalost telofaza. Od ostalih faza mitoze nakon 24-satnog tretmana ispitivanim uzorcima statistički se značajno razlikovala učestalost anafaze u korjenčićima tretiranim uzorcima kontrolnog tla, te učestalost profaze u korjenčićima tretiranim pozitivnom kontrolom 1 (Slika 11). Nakon 24-satnog oporavka od korjenčića negativne kontrole statistički se značajno razlikovala učestalost profaze u korjenčićima tretiranim uzorcima kontrolnog tla, te učestalost metafaze u korjenčićima tretiranim uzorcima pozitivne kontrole 1 (Slika 12). Telofaza izražena kao postotak od ukupnog broja stanica u mitozii nakon 24-satnog tretmana kod svih je tretiranih uzoraka, osim ŠB i pozitivne kontrole 2, bila statistički različita od negativne kontrole (Slika 11). Kod 24-satnog oporavka se od korjenčića negativne kontrole, osim pozitivne kontrole 1, značajno razlikuju korjenčići tretirani uzorcima kontrolno tlo s vrijednošću od 8,18% (Slika 12).



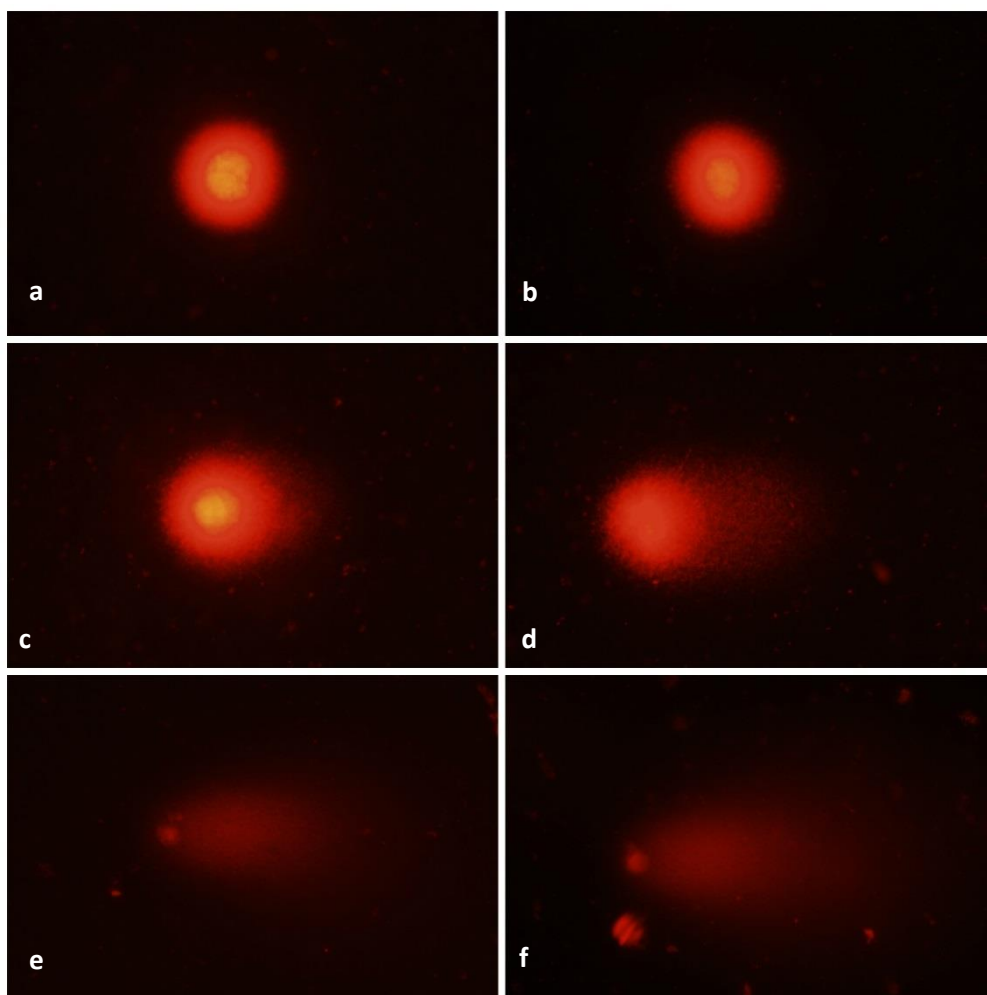
Slika 11. Faze mitoze (izražene kao % od ukupnog broja stanica u mitozu) u meristemsom dijelu korjenčića kozjaka *A. ascalonicum* nakon 24-satnog tretmana eluatima tla i kontrolnim otopinama. Opisi oznaka navedeni su u naslovu Tablica 2. Stupci označeni zvjezdicom statistički su značajno različiti od negativne kontrole ($p \leq 0,05$, Mann-Whitney test).



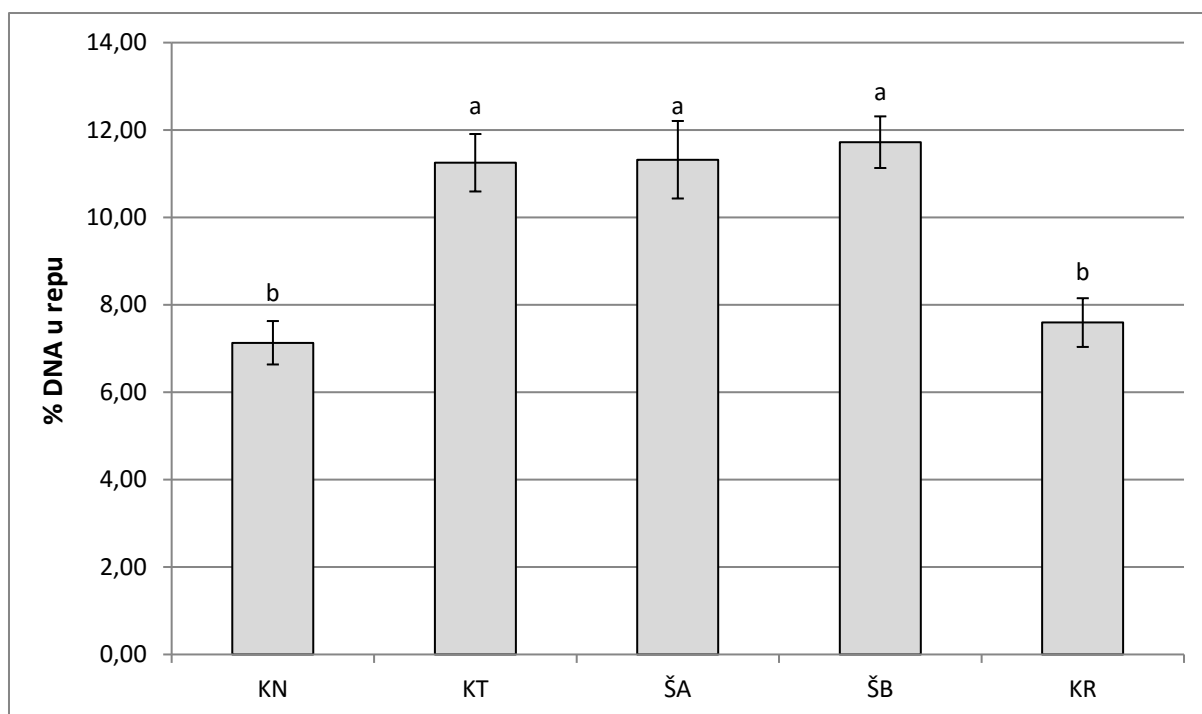
Slika 12. Faze mitoze (izražene kao % od ukupnog broja stanica u mitozu) korjenčića kozjaka *A. ascalonicum* nakon 24-satnog oporavka vodovodnom vodom pročišćenom reverznom osmozom. Opisi oznaka navedeni su u naslovu Tablica 2. Stupci označeni zvjezdicom statistički su različiti od negativne kontrole ($p \leq 0,05$, Mann-Whitney test).

4.2. Komet-test

U okviru analize rezultata komet-testa, po svakom sam tretmanu prebrojala 150-170 jezgara, a prikaz rezultata testa je na Slika 13. Pravilne jezgre u kojima nije došlo do oštećenja molekule DNA i pojave repa kometa prikazane su na Slika 13 a, b, dok slike c i d prikazuju jezgre u kojima je došlo do djelomičnog oštećenja molekule DNA i formiranja repa. Najveći broj pravilnih jezgara zabilježen je kod korjenčića tretiranih uzorcima KR, dok je kod jezgara tretiranih uzorcima kontrolno tlo, ŠA i ŠB zabilježen nešto veći broj jezgara s repom. Pozitivne kontrole nisu uzete u obzir jer su izazvale prevelika oštećenja jezgara (eng. hedgehogs), te njihova analiza nije bila moguća. „Hedgehogs“ su stanice s opsežnom DNA migracijom, a karakterizira ih mala ili odsutna glava s vrlo raspršenim repom (oblak) koji je fizički odvojen od glave (Slika 13 e, f). Rezultati komet-testa na korjenčićima kozjaka *A. ascalonicum* nakon 24-satnog tretmana pokazuju da su tretmani uzorcima ŠA i ŠB te kontrolno tlo izazvali veće oštećenje jezgara stanica u korjenčićima od negativne kontrole. Suprotno tome, korjenčići tretirani uzorkom KR ne razlikuju se statistički od negativne kontrole. Najveći postotak DNA u repu prisutan je kod korjenčića tretiranih uzorcima ŠB, a iznosi do 11,72% (Slika 14). Nešto niže vrijednosti zabilježene su na korjenčićima izloženim uzorcima ŠA i kontrolnog tla no nisu statistički značajno različite od ŠB. Međusobno slični KR i negativna kontrola značajno se razlikuju od ŠA i ŠB te kontrolnog tla.



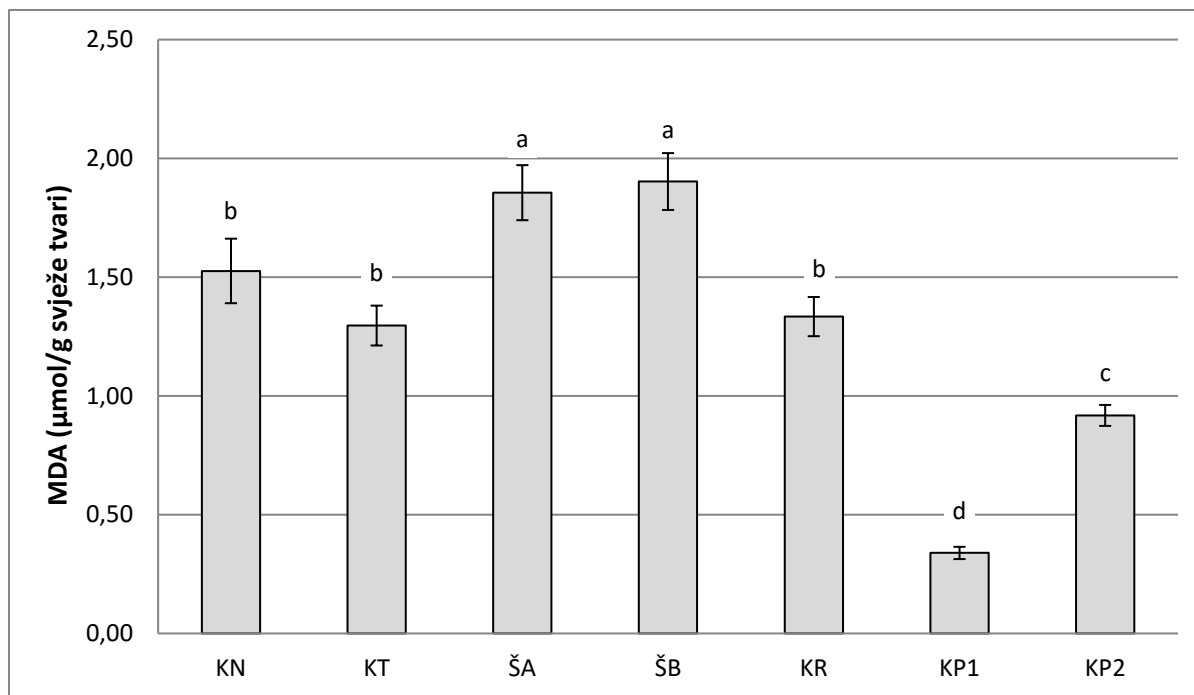
Slika 13. Jezgre korjenčiča kozjaka snimljene digitalnom kamerom Olympus DP 50 na fluorescencijskom mikroskopu Olympus BX 51 kod povećanja objektiva 40x: (a-d) snimka preparata jezgara tretiranih uzorcima Krapan, (e, f) snimka preparata jezgara tretiranih pozitivnom kontrolom 2 (eng. hedgehogs).



Slika 14. Postotak DNA u repu jezgara korjenčića kozjaka *A. ascalonicum* nakon 24-satnog tretmana eluatima tla. Opisi oznaka tretmana navedeni su u naslovu Tablica 2. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički razlikuju ($p \leq 0,05$, Newman-Keuls test).

4.3. Lipidna peroksidacija

Stupanj oštećenja lipidne komponente stanične membrane korjenčića kozjaka *Allium ascalonicum* procijenjen je pomoću sadržaja MDA (Slika 15). U lukovicama tretiranim uzorcima ŠA i ŠB zabilježeno je značajno povećanje koncentracije MDA u odnosu na negativnu kontrolu. Dok je kod lukovica tretiranih uzorcima KR zabilježena manja koncentracija MDA nego u negativnoj kontroli, no razlika nije statistički značajna. Koncentracija MDA u lukovicama tretiranim kontrolnim tlom manja je u odnosu na lukovice tretirane uzorcima KR. Svi rezultati mjerenja kod tretiranih lukovica statistički su se razlikovali od pozitivnih kontrola, koje su i međusobno različite. ŠA i ŠB imaju najveći izmjereni sadržaj MDA u vrijednosti od 1,86, odnosno 1,90 $\mu\text{mol/g}$ svježe tvari te međusobno nisu značajno različiti, no značajno su različiti od negativne kontrole. Nadalje, između izmjerenih vrijednosti za KR, kontrolno tlo i negativnu kontrolu nije bilo značajne razlike ali su se te tri grupe uzoraka statistički značajno razlikovale od ŠA i ŠB. Najmanji sadržaj MDA (0,34 $\mu\text{mol/g}$ svježe tvari) izmjeren je kod pozitivne kontrole 1.



Slika 15. Sadržaj malondialdehida ($\mu\text{mol/g}$ svježe tvari) u korjenčićima kozjaka *A. ascalonicum* nakon 24-satnog tretmana eluatima tla. Opisi oznaka tretmana navedeni su u naslovu Tablica 2. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost 5 replika \pm standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički razlikuju ($p \leq 0,05$, Newman-Keuls testu).

5. RASPRAVA

U ovom su istraživanju učinci eluata tala procijenjeni analizom rasta korijena i morfologije korijena kozjaka *A. ascalonicum*. Citotoksičnost i genotoksičnost procijenjeni su promatranjem citoloških parametara kao što su mitotski indeks i broj kromosomskih abnormalnosti, uključujući c-mitozu, zaostale i izdvojene kromosome, lomove kromosoma, anafazne mostove i sljepljivanje kromosoma te procjenom oštećenja molekule DNA komet-testom. Uz njih određen je stupanj lipidne peroksidacije spektrofotometrijskim mjerenjem količine MDA, budući da metali prisutni u uzorcima mogu izazvati oksidacijski stres.

Neke tvari koje su prirodni sastojci tla, mogu imati štetan ili inhibitorni učinak na rast biljaka i određene procese u njihovim stanicama. Određivanjem ukupnog sadržaja teških metala u tlu te njihove biopristupačnosti i mobilnosti možemo odrediti stupanj onečišćenja tla. Poznato je da su termoelektrane na ugljen jedan od najvažnijih izvora onečišćenja i generatori potencijalno opasnog otpada. TE Plomin je za proizvodnju električne energije do početka devedesetih godina prošloga stoljeća rabila ugljene koji sadrže 10-15% nesagorivog ostatka (Oreščanin i sur. 2009). Izgaranjem ugljena u termoelektranama teški metali koji su u njemu prirodno vezani koncentriraju se u ostacima izgaranja, pepelu, dok se manji dio smjese hlapljivih metala i drugih izgorjelih tvari ispušta u atmosferu. Uzorci eluata tala korišteni u ovom ispitivanju s područja Štrmca i Krapna sadržavaju znatno veće količine Al, Fe, Cu, Zn, Pb i Sr u odnosu na uzorak kontrolnog tla. Osim toga, u uzorku s područja Krapna zabilježeno je znatno povećanje koncentracije Mo u usporedbi s uzorkom kontrolnog tla i Štrmca. Koncentracije Cu i Zn znatno su veće u uzorku iz Štrmca u odnosu na uzorak Krapan. Najveća koncentracija Al, Pb, Cu i Zn pronađena je u uzorku Štrmac B, koji sadrži znatno veće količine metala od ostalih ispitivanih uzoraka. Povećana koncentracija ovih elemenata može biti posljedica dugogodišnje rudarsko-industrijske aktivnosti na tom području, te postupnog raspada ugljena (Medunić i sur. 2016b).

Duljina korijena koristan je parametar za procjenu opće toksičnosti različitih koncentracija ispitivanih spojeva na rast i razvoj biljaka (Fiskesjö 1985). Toksični spojevi i elementi mogu, ovisno o koncentraciji u kojoj su prisutni, u potpunosti inhibirati ili djelomično usporiti rast korjenčića. Mjerenje rasta korijena nije pokazalo statistički značajnu razliku između korjenčića tretiranih ispitivanim uzorcima i negativne kontrole, dok je pozitivna kontrola - tretman otopinom bakrova sulfata koncentracije $5,0 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{ CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$,

očekivano uzrokovala značajne razlike u usporedbi s učinkom negativne kontrole i istraživanih uzoraka eluata tala. Yildiz i sur. (2009) su analizirali učinak bakrovog sulfata na duljinu korjenčića vrsta iz roda *Allium* te zaključili da djeluje toksično i inhibirajuće na rast korjenčića. Došli su do rezultata da je efektivna koncentracija bakrovog sulfata nakon 96-satnog tretmana 1,5 ppm, koja uzrokuje 50%-tnu redukciju rasta korjenčića u odnosu na negativnu kontrolu. Bakrove soli, zbog svog su brzog djelovanja na biljne stanice, često korištene kao pozitivna kontrola (Roa i sur. 2012). Iako su u uzorcima eluata tla s područja Štrmca zabilježene povećane koncentracije Cu u vrijednostima od 400 µg/L (6,294 µmol dm⁻³) za Štrmac A, odnosno 775 µg/L (12,195 µmol dm⁻³) za Štrmac B, moguće je da zbog kratkotrajne izloženosti korjenčića ispitivanim otopinama nije došlo do značajnijeg utjecaja bakra na rast korijena, ali možda bi produljeni tretman mogao imati značajnije učinke. Korjenčići tretirani vodikovim peroksidom (koncentracije 300 mmol dm⁻³ H₂O₂) nakon 24-satnog tretmana nisu izazvali statistički značajno smanjenje rasta korjenčića, ali korjenčići su ipak primjetno kraći u usporedbi s negativnom kontrolom iz čega se može zaključiti da bi produljeni tretman pokazao značajniju razliku. Izlaganje korjenčića tvarima koje su u pokusu imale ulogu pozitivne kontrole uzrokovalo je morfološke promjene - korjenčići su tanji i tkivo im je manje turgescentno u odnosu na negativnu kontrolu i tretmane. To ukazuje na činjenicu da bi rast korjenčića u duljem vremenskom periodu bio značajno usporen. Dvije pozitivne kontrole, tj. dva različita spoja u ulozi pozitivne kontrole izabrala sam radi preciznije analize i usporedbe rezultata.

Citogenetička analiza otkrila je genotoksični učinak testiranih uzoraka eluata tla. Usporedba mitotskog indeksa korjenčića tretiranih ispitivanim eluatima nije pokazala značajnu razliku, no ovakav je rezultat očekivan, budući da nije bilo značajne razlike ni u rastu korjenčića. Poznato je da diobena aktivnost meristemske regije korijena zajedno s procesom produženog rasta određuje ukupnu stopu rasta korijena. Nadalje, u korjenčićima tretiranim uzorcima Štrmac A i B te Krapan zapažene su kromosomske aberacije od kojih su najčešće bile one koje nastaju kao posljedica narušene funkcije diobenog vretena i kromatina: zaostali i izdvojeni kromosomi te sljepljivanje. Najčešći tip abnormalnosti kod korjenčića pozitivne kontrole tretiranih vodikovim peroksidom je sljepljivanje, a fragmenti i mikronukleus su bili rijetko uočeni. Druga pozitivna kontrola bila je tretman korjenčića bakrovim sulfatom koji je također najviše djelovao na funkciju diobenog vretena te na kromatin ali je izazvao veći broj abnormalnosti u usporedbi s tretmanom vodikovim peroksidom. Također, i drugi su autori u svojim istraživanjima koristili vodikov peroksid kao pozitivnu kontrolu i uočili iste vrste

abercija koje sam i ja zabilježila u ovom istraživanju (Leme i Marin-Morales 2009; Radić i sur. 2010).

Pojava atipičnih metafaza i anafaza može ukazivati na narušenu strukturu diobenog vretena i „ljepljivost“ kromatina. Sljepljivanje kromosoma upućuje na utjecaj zagađivača na organizaciju kromatina. Taj je učinak povezan sa stvaranjem određenih veza između kromatida, formiranjem nukleoproteina u većoj mjeri od uobičajene te neodgovarajućim interakcijama među proteinima odgovornim za pravilnu strukturu kromatina u jezgri (Nefić i sur. 2013). Sljepljivanje kromosoma se smatra znakom toksičnih učinaka na kromosome koji mogu dovesti do smrti stanica (Fiskesjö 1997). Fiskesjö (1988) je analizirala učinke pojedinih soli metala na stanice korijena luka, te u tretmanima s Mn i Al zabilježila povećanu učestalost pojave sljepljivanja kromosoma. Narušavanje procesa formiranja diobenog vretena glavni je uzrok nastanka mitotskih nepravilnosti poput mikronukleusa i zaostalih kromosoma, što je uglavnom posljedica prisutnosti Cu, Cr i Pb (Hala i sur. 2007). Soli nekih metala, npr. Al, mogu imati i negativne učinke na kinetohor, što također može izazvati nepravilnosti, npr. zaostajanje kromosoma za grupom kromosoma u anafazi (Fiskesjö 1988).

Analizom korjenčića tretiranih eluatima kontrolnog tla uočila sam nepravilnosti. Nakon 24-satnog tretmana najčešće sam zapazila pojavu slijepljenih kromosoma, anafaznih mostova te poremećenih profaza, dok su nakon 24-satnog oporavka najčešće nepravilnosti bili kromosomi izdvojeni iz grupa kromosoma u metafazi i anafazi. Analizom sadržaja elemenata u uzorku kontrolnog tla zabilježena je povećana koncentracija Al i Fe. Učestalost aberacija u korjenčićima tretiranim kontrolnim tlom izražena kao postotak stanica s aberacijama u ukupnom broju stanica u mitozu iznosila je 9,36%, dok je kod tretmana eluatima s lokacija Štrmac i Krapan ta vrijednost bila oko 15%. Povećan broj mitotskih nepravilnosti u korjenčićima tretiranim eluatima kontrolnog tla može biti posljedica relativno male udaljenosti lokacije izabrane za kontrolno tlo od mjesta uzorkovanja zagađenih tala. Nalazi se 30 km sjeveroistočno od lokacija Štrmca i Krapna. Nadalje, blizina ceste te blizina morske obale, što može dovesti do povećanog saliniteta tla, također mogu biti uzrok pojave aberacija u kontrolnom tlu, ali bez dodatnih analiza to ne mogu sa sigurnošću tvrditi.

Studija o procjeni fitoremedijacije teških metala (Fe, Pb, Cr, Cu) iz toksičnih industrijskih voda pokazala je veliku osjetljivost korjenčića vrsta iz rodova *Allium* i *Vicia* na ispitivane komponente (Hala i sur. 2007). Kemijskom analizom uzoraka industrijske vode dobiveni su podatci o koncentracijama prisutnih metala: Fe 1,3 mg/L, Pb 1,5 mg/L, Cr 0,8 mg/L te Cu

0,12 mg/L. Uzorak s područja Štrmca sadrži slične koncentracije tih metala: Fe 0,546 mg/L, Pb 0,048 mg/L, Cr 0,0041 mg/L, Cu 0,775 mg/L, dok su u uzorku s područja Krapna zabilježene nešto niže koncentracije: Fe 0,358 mg/L, Pb 0,00049 mg/L, Cr 0,0039 mg/L te Cu 0,0794 mg/L. Prethodno procesima fitoremedijacije u spomenutoj studiji u stanicama korijena vrste *Allium* zabilježene su kromosomske aberacije koje se mogu grupirati u dvije skupine: prva obuhvaća one koje ukazuju da su inhibitori vretena prouzrokovali neorijentirane kromosome u metafaznim i anafaznim stanicama, zaostajanje kromosoma te mikronukleuse, a druga uključuje formiranje mostova te kasno razdvajanje kromosoma (Hala i sur. 2007). S obzirom da sam u svojim istraživanjima uočila isti tip nepravilnosti velika je vjerojatnost da su spomenuti metali odgovorni za narušavanje strukture diobenog vretena.

Tragovi metala (Zn, Cu, Cd, Al, Fe, Pb) i ostali zagađivači mogu uzrokovati smanjenje mitotskog indeksa u korjenčićima vrste *Allium* izloženim industrijskim otpadnim vodama (Leme i Marin-Morales 2009). Glińska i sur. (2007) smatraju da je mitotski indeks korjenčića vrste *Allium* tretiranih metalima smanjen vjerojatno zbog poremećaja u staničnom ciklusu ili narušavanja funkcije kromatina uzrokovane interakcijama metala i molekule DNA. U ovom su istraživanju svi tretmani eluatima uzoraka tala na korjenčićima izazvali smanjenje mitotskog indeksa, ali ta promjena nije bila statistički značajna u usporedbi s negativnom kontrolom. Nije bilo niti značajne razlike u zastupljenosti pojedinih faza mitoze, ako usporedimo korjenčiće odmah nakon tretmana i nakon 24-satnog oporavka. Najzastupljenija je bila profaza, a nakon nje slijede anafaza i metafaza te posljednja telofaza koja je zabilježena u najmanjem broju pregledanih stanica. Postotak stanica u telofazi u korjenčićima tretiranim uzorcima kontrolnog tla, Štrmca A i Krapna, nakon 24-satnog tretmana bio je značajno manji od korjenčića negativne kontrole.

Rezultati komet-testa pokazali su da ispitivani eluati tala uzrokuju oštećenje molekule DNA. Korjenčići kozjaka nakon 24-satnog tretmana uzorcima kontrolnog tla te Štrmca A i B pokazali su statistički značajan porast oštećenja DNA, izražen kao postotak DNA u repu kometa, u usporedbi s negativnom kontrolom. Nasuprot tome, korjenčići tretirani uzorcima s područja Krapna, iako su uzrokovali oštećenje molekule DNA, ono nije bilo statistički značajno u odnosu na negativnu kontrolu. Tretman korjenčića pozitivnim kontrolama (vodikov peroksid i bakrov sulfat) izazvali su izrazito oštećenje jezgara, tzv. „oblak“, te njihova analiza nije bila moguća. Točno podrijetlo „oblaka“ nije jasno, ali se pretpostavlja da njegovom nastanku doprinose stanice u apoptozi (Kumaravel i sur. 2009). Rezultati komet-testa podudaraju se s

rezultatima dobivenim mjerenjem stupnja oštećenja lipidne komponente staničnih membrana ispitivanih uzoraka. Lipidna peroksidacija ukazuje na indukciju oksidacijskog stresa u biljnom organizmu do kojeg dolazi ukoliko stvaranje reaktivnih oblika kisika premaši mogućnosti mehanizma za njihovo uklanjanje (Štefan i sur. 2007). Povećanje opsega lipidne peroksidacije objašnjava se djelovanjem iona Fe i Cu koji zbog promjene redoks stanja uzrokuju nastanak hidroksilnih radikala i drugih ROS (Arora i sur. 2002). Suprotno tim redoks aktivnim metalima, metali poput Zn, Ni, Cr i Pb ne uzrokuju neposredno nastajanje ROS, ali povećavaju oksidacijski stres inhibirajući antioksidacijske obrambene mehanizme biljke te na taj način doprinose povećanju stupnja lipidne peroksidacije (Aravind i Prasad 2003). Usporedbom količine ovih metala u istraživanim uzorcima Štrmac i Krapan vidljiva je njihova povećana koncentracije u odnosu na uzorak kontrolnog tla (Tablica 1). Sadržaj MDA u korjenčićima tretiranim uzorcima Štrmca A i B pokazuje statistički značajno povećanje u odnosu na negativnu kontrolu, što može biti posljedica prisutnosti metala. Sinergistički učinak tvari prisutnih u ispitivanim uzorcima eluata tla može inducirati nastanak ROS koji dovode do oštećenja molekule DNA i proteina (Bhattacharjee 2014). Suprotno tome, sadržaj MDA izmjeren u korjenčićima tretiranim uzorcima Krapan i kontrolno tlo nije statistički značajno različit od negativne kontrole.

Rezultati svih testova provedenih tijekom ovog istraživanja pokazali su istovjetan učinak, tj. prisutnost genotoksičnih elemenata u istraživanim eluatima tla. Najosjetljivijima su se pokazali komet-test i određivanje stupnja lipidne peroksidacije u kojima je najveće oštećenje stanica zabilježeno u korjenčićima tretiranim uzorcima prikupljenim na području Štrmca. Praćenje duljine korjenčića kozjaka, nije pokazalo značajne razlike. Analiza mitotskog indeksa u sklopu Allium-testa također nije pokazala statistički značajne razlike u odnosu na negativnu kontrolu, iako je u svim korjenčićima tretiranim istraživanim uzorcima tla zabilježena prisutnost mitotskih i kromosomskih aberacija. Broj mitotskih nepravilnosti izraženih kao postotak od ukupnog broja stanica u mitozu u korjenčićima tretiranim uzorcima Štrmca i Krapna statistički je značajno različit od negativne kontrole.

Rezultati nekih od mjerenih parametara (npr. mitotski indeks i duljina korjenčića u Allium-testu) nakon 24-satnog izlaganja ispitivanim uzorcima pokazuju određene promjene u odnosu na negativnu kontrolu, međutim one nisu bile statistički značajne. Moguće je da bi produljenim vremenom tretmana dobili drugačije rezultate.

6. ZAKLJUČAK

Allium-test, komet-test i stupanj lipidne peroksidacije, nakon 24-satnog tretmana korjenčića kozjaka *Allium ascalonicum* ispitivanim eluatima tla, pokazali su genotoksični učinak istraživanih uzoraka. Usporedbom negativne kontrole i kontrolnog tla s uzorcima zagađenih tala, utvrđeno je da su jači genotoksični učinak imali eluati uzoraka tala prikupljenih na lokaciji Štrmac. Rezultati testova nisu pokazali značajnu razliku s obzirom na dubinu uzorkovanja na toj lokaciji. Eluati uzoraka tla prikupljenih na lokaciji Krapan u većini testova nisu izazvali statistički značajne promjene u stanicama kozjaka, dok je kontrolno tlo, za koje se smatralo da nije onečišćeno, pokazalo oprečne rezultate.

7. LITERATURA

Aravind P. i Prasad M. N. V. (2003): Zinc alleviates cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* L.: a free floating freshwater macrophyte. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 391–397.

Arora A., Sairam R. K. i Srivastava G. C. (2002): Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science* 82 (10): 1227–1238.

Arya S. K. i Mukherjee A. (2014): Sensitivity of *Allium cepa* and *Vicia faba* towards cadmium toxicity. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 14: 447–458.

Ayala A., Muñoz M. F. i Argüelles S. (2014): Lipid peroxidation : Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 1-31

Azqueta A., Shaposhnikov S. i Collins A. R. (2009): DNA oxidation: Investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. *Mutation Research* 674: 101–108.

Bhattacharjee S. (2014): Membrane lipid peroxidation and its conflict of interest: The two faces of oxidative stress. *Current Science* 107 (11): 1811–1823.

Bispo A., Jourdain M. J. i Jauzein M. (1999): Toxicity and genotoxicity of industrial soils polluted by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Organic Geochemistry* 30 (8): 947–952.

Blaise C. (2000): Canadian application of microbiotests to assess the toxic potential of complex liquid and solid media, U: Persoone G., Janssen C., De Coen W. M., (ur.) *New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring*. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers, str. 3–12.

Cotelle S., Masfaraud J. F. i Férard J. F. (1999): Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia* micronucleus and the *Tradescantia* micronucleus assays. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 426 (2): 167–171.

Cotelle S. i Férard J. F. (1999): Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 34 (4): 246–255.

Cvjetko P., Tolić S., Šikić S., Balen B., Tkalec M., Vidaković-Cifrek Ž. i Pavlica M. (2010): Effect of copper on the toxicity and genotoxicity of cadmium in duckweed (*Lemna minor* L.). *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 61: 287-296.

Dragoeva A., Kalcheva V. i Stoicho S. (2009): Genotoxicity of agricultural soils after one year of conversion period and under conventional agriculture. 2: 163–166.

Fiket Ž., Medunić G. i Kniewald G. (2016): Rare earth elements distribution in soil nearby thermal power plant. *Environmental Earth Sciences* 75: 598.

Firbas P. (2011): Test report for Flaška. Use of genotoxicity *Allium* anaphase-telophase genotoxicity assay with common onion (*Allium cepa* L.) grown in taken water samples. Laboratory of plant cytogenetics.

Firbas P. i Amon T. (2013): *Allium* chromosome aberration test for evaluation effect of cleaning municipal water with constructed wetland (CW) in Sveti Tomaž, Slovenia. *Journal of Bioremediation & Biodegradation* 4 (4): 198.

Fiskesjö G. (1981): *Allium* test on copper in drinking water. *Vatten* 17 (3): 232–240.

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

Fiskesjö G. (1988): The *Allium* test - an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. *Mutation Research* 197: 243–260.

Fiskesjö G. (1993): The Allium test - A potential standard for the assessment of environmental toxicity, U: Gorsuch J. W., Dwyer F. J., Ingersoll C. G., La Point T. W., (ur.) Environmental Toxicology and Risk Assessment: 2nd volume, American Society for Testing and Materials. STP 1216, Philadelphia, str. 331-345.

Fiskesjö G. (1997): Allium test for screening chemicals; evaluation of cytological parameters. U: Wang W., Gorsuch J. W., Hughes J. S. (ur.) Plants for Environmental Studies. New York, CRC Press LLC, str. 308-333.

Gichner T., Patková Z., Száková J. i Demnerová K. (2004): Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage, somatic mutations or homologous recombination in tobacco leaves. Mutation Research 559: 49-57.

Glińska S., Bartczak M., Oleksiaka S., Wolska A., Gabara B., Posmyk M. i Janas K. (2007): Effects of anthocyanin-rich extract from red cabbage leaves on meristematic cells of *Allium cepa* L. roots treated with heavy metals. Ecotoxicology and Environmental Safety 68: 343–350.

Grant W. F. (1994): The present status of higher plant bioassays for detection of environmental mutagens. Mutation Research 310: 175–185.

Guzy J., Zgórska A. i Ziemińska A. (2012): Comet assay optimization with *Allium cepa* as an indicator for ecotoxicological usage. ACEE Journal 3: 109–116.

Hala M. Abdel Migid, Yehia A. Azab i Waeel M. Ibrahim (2007): Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent. Ecotoxicology and Environmental Safety 66 (1): 57–64.

Heath R. L. i Packer L. (1968): Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics 125: 189-98.

Katnoria J. K., Arora S., Bhardwaj R. i Nagpal A. (2011): Evaluation of genotoxic potential of industrial waste contaminated soil extracts of Amritsar, India. *Journal of Environmental Biology* 32 (3): 363–367.

Khanna N. i Sharma S. (2013): *Allium cepa* root chromosomal aberration assay: a review *Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research* 1 (3): 105–119.

Kumaravel T. S., Vilhar B., Faux S. P. i Jha A. N. (2009): Comet Assay measurements: a perspective. *Cell Biology and Toxicology* 25 (1): 53–64.

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

Medunić G., Ahel M., Božičević Mihalić I., Gaurina Srček V., Kopjar N., Fiket Ž., Bituhe T., Mikac I. (2016a): Toxic airborne S, PAH, and trace element legacy of the superhigh-organic sulphur Raša coal combustion: Cytotoxicity and genotoxicity assessment of soil and ash. *Science of the Total Environment* 566-567: 306-319.

Medunić G., Rađenović A., Bajramović M., Švec M., Tomac M. (2016b): Once grand, now forgotten: what do we know about the superhigh-organic- sulphur Raša coal. *The Mining-Geology-Petroleum Engineering Bulletin* 31 (3): 27-45.

Miko S., Kruk B., Dedić Ž., Kruk Lj., Peh Z., Kovačević-Galović E., Gabrić A. (2013): Rudarsko-geološka studija potencijala i gospodarenja mineralnim sirovinama Istarske županije. 10.

Mustafa Y. i Arian E. S. (2008): Genotoxicity testing of quizalofop-P- ethyl herbicide using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Caryologia* 61 (1): 45-52.

Nefić H., Mušanović J., Metović A. i Kurteshi K. (2013): Chromosomal and nuclear alterations in root tip cells of *Allium cepa* L. induced by alprazolam. *Medical Archives* 67(6): 388-392.

Nielsen M. H. i Rank J. (1994): Screening of toxicity and genotoxicity in wastewater by the use of the *Allium* test. *Hereditas* 121 (3): 249–254.

Olorunfemi D., Duru E. i Okieimen F. (2012): Induction of chromosome aberrations in *Allium cepa* L. root tips on exposure to ballast water. *Caryologia* 65 (2): 147–151.

Oreščanin V., Nađ K., Bartolinčić A. i Valković V. (2009): Chemical profile of Plomin bay sediments. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju* 60: 281–287.

Östling O. i Johanson K. J. (1984): Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 123 (1): 291–298.

Puizina J. (2013): Shallots in Croatia – genetics, morphology and nomenclature. *Acta Botanica Croatica* 72 (2): 387–398.

Radetski C. M., Ferrari B., Cotellet S., Masfaraud J. F. i Ferard J. F. (2004): Evaluation of the genotoxic, mutagenic and oxidant stress potentials of municipal solid waste incinerator bottom ash leachates. *Science of the Total Environment* 333: 209–216.

Radić S., Stipaničev D., Vujčić V., Rajčić M. M., Širac S. i Pevalek-Kozlina B. (2010): The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the *Allium cepa* test. *Science of the Total Environment* 408 (5): 1228–1233.

Roa O., Yeber M. C. i Venegas W. (2012): Genotoxicity and toxicity evaluations of ECF cellulose bleaching effluents using the *Allium cepa* L. test. *Brazilian Journal of Biology* 72 (3): 471–477.

Rydberg B. i Johanson K. J. (1978): Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. U: Philip Hanawalt (ur.) *DNA Repair Mechanisms*. New York: Academic Press, 465–468.

Seth C. S., Misra V., Chauhan L. K. S. i Singh R. R. (2008): Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*: cytogenetic and Comet assay approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71 (3): 711–716.

Sharma A. K. i Sharma A. (1972): *Chromosome Techniques: Theory and Practice*. London, Velika Britanija: Butterworth & Co. Limited.

Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R. i Schneider E. L. (1988): A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175 (1): 184–191.

Soodan R. K., Katnoria J. K. i Nagpal A. (2014): *Allium cepa* root chromosomal aberration assay : an efficient test system for evaluating genotoxicity of agricultural soil. *International Journal of Science and Research* 3 (8): 245–250.

Sofilić T. (2014): Onečišćenje i zaštita tla. Sveučilište u Zagrebu, Metalurški fakultet, Sisak 1-146.

Şuţan N. A., Popescu A., Mihăescu C., Soare I. C. i Marinescu M. V. M. (2014): Evaluation of cytotoxic and genotoxic potential of the fungicide Ridomil in *Allium cepa* L. *Scientific Annals of Alexandru Ioan Cuza University of Iasi* 60 (2): 5–12.

Štefan L., Tepšić T., Zavidic T., Urukalo M., Tota D. i Domitrović R. (2007): Lipidna peroksidacija - uzroci i posljedice. *Medicina Fluminensis* 43 (2): 84–93.

Tedesco S. B. i Haywood Dail Laughinghouse (2003): Bioindicator of genotoxicity : the *Allium cepa* test. *Environmental Contamination* 137–153.

Ünyayar S., Çelik A., Çekiç F. Ö. i Gözel A. (2006): Cadmium-induced genotoxicity, cytotoxicity and lipid peroxidation in *Allium sativum* and *Vicia faba*. *Mutagenesis* 21 (1): 77–81.

Yildiz M., Ciğerci I. H., Konuk M., Fatih Fidan A. i Terzi H. (2009): Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. Chemosphere 75 (7): 934–938.

8. ŽIVOTOPIS

Moje ime je Petra Jezidžić. Rođena sam 16.3.1994. godine u Čapljini, Bosna i Hercegovina. Školovanje sam započela 2000. godine u Osnovnoj školi „Dragutin Tadijanović“ u Petrinji. Godine 2008. upisala sam opću gimnaziju „Srednja škola Petrinja“ u Petrinji. 2012. godine upisala sam smjer Znanosti o okolišu na Biološkom odsjeku, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Tijekom 2011./12. godine volontirala sam u osnovnoj školi „Dragutin Tadijanović“ u Petrinji na odjelu za djecu s posebnim potrebama. Sudjelovala sam u pripremi i izvedbi kreativnih radionica. Godine 2015. započela sam volontirati u domu za starije osobe „Dom za starije osobe Maksimir“ u Zagrebu, gdje sam aktivna i danas. Sudjelujem u individualnom druženju sa slabije pokretnim i ležećim korisnicima, pratnji korisnika u bolnicu, različitim manifestacijama doma te kao koordinator volontera tijekom provođenja volonterskih aktivnosti.

Tijekom studiranja sudjelovala sam na manifestaciji „Noć biologije“ kao koordinatorica grupa, te na „Smotri sveučilišta“ kao predstavnica Biološkog odsjeka. Godine 2014./15. bila sam demonstrator iz kolegija Vertebrata.