

»Mladi za napredek Maribora 2015«
32. srečanje

Analiza izbranih pokazateljev kvalitete površinskih in odpadnih vod Maribora in okolice

Raziskovalno področje: Varstvo okolja
Raziskovalna naloga

PROSTOR ZA NALEPKO

Avtor: OSCAR KRIŽANEC
Mentor: SENKA HUSAR, KATJA HOLNTHANER ZOREC
Šola: II. GIMNAZIJA MARIBOR

2015, Maribor

»Mladi za napredek Maribora 2015«
32. srečanje

Analiza izbranih pokazateljev kvalitete površinskih in odpadnih vod Maribora in okolice

Raziskovalno področje: Varstvo okolja
Raziskovalna naloga

PROSTOR ZA NALEPKO

2015, Maribor

1 KAZALA

1.1 Kazalo vsebine

1	KAZALA.....	3
1.1	Kazalo vsebine.....	3
1.2	Kazalo slik.....	5
1.3	Kazalo tabel.....	6
1.4	Kazalo grafikonov.....	6
2	POVZETEK.....	7
3	ZAHVALA.....	8
4	UVOD.....	9
4.1	Hipoteze.....	10
5	TEORETIČNO OZADJE.....	12
5.1	Antibiotiki.....	12
5.2	Allium test.....	13
5.3	Odpadna voda in čistilna naprava.....	15
5.4	Mikrobiologija.....	16
6	MATERIALI IN METODE DE LA.....	18
6.1	Odvzem vzorcev vode.....	18
6.1.1	Materiali.....	18
6.1.2	Metode.....	18
6.2	Delvotest SP NT.....	19
6.2.1	Materiali.....	19
6.2.2	Metode.....	20
6.3	Allium test.....	22

6.3.1	Materiali.....	22
6.3.2	Metode.....	22
6.4	Določanje skupnega dušika, skupnega fosforja, nitratov, KPK-ja in pH-ja.....	23
6.4.1	Materiali.....	23
6.4.2	Metode.....	24
6.5	Mikrobiološko testiranje vzorcev.....	25
6.5.1	Materiali.....	25
6.5.2	Metode.....	26
7	REZULTATI.....	27
7.1	Rezultati Delvotesta SP NT	27
7.2	Rezultati Allium testa	30
7.3	Rezultati določanje skupnega dušika, skupnega fosforja, nitratov, KPK-ja in pH-ja.....	44
7.4	Rezultati mikrobiološkega testiranja vzorcev	45
8	DISKUSIJA	46
8.1	Hipoteza 1	46
8.2	Hipoteza 2	47
8.3	Hipoteza 3	48
8.4	Hipoteza 4	48
9	ZAKLJUČEK.....	49
10	DRUŽBENA ODGOVORNOST	50
11	LITERATURA	51

1.2 Kazalo slik

Slika 1: Skica Rotavaporja (Petrovič, 2011).....	20
Slika 2: Rezultati Delvotesta pri koncentriranih vzorcih 1. dan	28
Slika 3: Rezultati Delvotesta pri nekoncentriranih vzorcih 1. dan.....	28
Slika 4: Rezultati Delvotesta pri koncentriranih vzorcih in nekoncentriranem sedmem vzorcu 2. dan	29
Slika 5: Nastavitev Allium testa.....	30
Slika 6: Poskus 3. dan.....	31
Slika 7: Dolžina koreninic pri kontrolni skupini ob koncu poskusa	32
Slika 8: Dolžina koreninic pri vzorcu 1 ob koncu poskusa	33
Slika 9: Dolžina koreninic pri vzorcu 2 ob koncu poskusa	33
Slika 10: Dolžina koreninic pri vzorcu 3 ob koncu poskusa	34
Slika 11: Dolžina koreninic pri vzorcu 4 ob koncu poskusa	34
Slika 12: Dolžina koreninic pri vzorcu 5 ob koncu poskusa	35
Slika 13: Dolžina koreninic pri vzorcu 6 ob koncu poskusa	35
Slika 14: Dolžina koreninic pri vzorcu 7 ob koncu poskusa	36
Slika 15: Interfaza (zeleno) in profaza (oranžno) mitoze (1000 X) (lastni vir)	42
Slika 16: Metafaza (zeleno) in nerazdvojeni kromosomi (oranžno) mitoze (1000 X) (lastni vir)	42
Slika 17: Anafaza mitoze (1000 X) (lastni vir).....	43
Slika 18: Telofaza mitoze (1000 X) (lastni vir)	43
Slika 19: Anafazni most mitoze (1000 X) (lastni vir)	44
Slika 20: Kolonije mikroorganizmov zraslih po 24 urah	45

1.3 Kazalo tabel

Tabela 1: Rezultati dveh Delvotestov pri istih vzorcih	27
Tabela 2: Dolžina koreninic čebule 5. dan rasti v cm v različnih vzorcih vode	31
Tabela 3: Število celic v posameznih fazah delitve v različnih vzorcih.....	36
Tabela 4: Mitozni indeks pri posameznih vzorcih	37
Tabela 5: Rezultati kemijskih analiz površinskih in odpadnih vod	44
Tabela 6: Število zraslih kolonij na agarju v posameznih vzorcih.....	45

1.4 Kazalo grafikonov

Grafikon 1: Dolžina koreninic čebule	32
Grafikon 2: Mitozni indeks v %	37
Grafikon 3: Število celic v posameznih fazah delitve v kontrolnem vzorcu	38
Grafikon 4: Število celic v posameznih fazah delitve v vzorcu 1	38
Grafikon 5: Število celic v posameznih fazah delitve v vzorcu 2	39
Grafikon 6: Število celic v posameznih fazah delitve v vzorcu 3	39
Grafikon 7: Število celic v posameznih fazah delitve v vzorcu 4	40
Grafikon 8: Število celic v posameznih fazah delitve v vzorcu 5	40
Grafikon 9: Število celic v posameznih fazah delitve v vzorcu 6	41
Grafikon 10: Število celic v posameznih fazah delitve v vzorcu 7	41

2 POVZETEK

Zaradi človekovega delovanja se lahko v površinskih in odpadnih vodah znajdejo številne kemikalije, katerih prisotnost je slabo nadzorovana, vpliv na okolje in človeka pa nepredvidljiv. Lep primer so antibiotiki, z dobro poznanimi učinki v humani medicini, malo pa je znanega o njihovem pojavljanju v vodnem okolju in vplivu na netarčne organizme. V raziskovalni nalogi smo analizirali izbrane pokazatelje kvalitete nekaterih površinskih in odpadnih vod v Mariboru in okolici. V vodnih vzorcih smo z Delvo testom dokazovali prisotnost antibiotikov, s čebulnim (Allium) testom prisotnost genotoksičnih snovi, opravili pa smo tudi standardno kemijsko in mikrobiološko analizo. Po pričakovanju je bila kvaliteta odpadnih vod (vtok čistilne naprave, bolnica, zavetišče za živali) v vseh merjenih parametrih precej slabša od površinskih vod (Drava, Novi hočki potok, potok Grajena). Zaskrbljujoča je predvsem prisotnost antibiotikov, visoka raven genotoksičnosti pa kaže tudi na prisotnost ostalih škodljivih snovi.

3 ZAHVALA

Voda je življenje, vir energije, ki nam omogoči rast novega organizma v naravi. Tudi pri pisanju raziskovalne naloge sem potreboval vir energije, ki so mi jo brezkompromisno nudili ljudje, ki se jim iskreno zahvaljujem.

Posebej se zahvaljujem mentoricama za pomoč pri izvedbi in pisanju raziskovalne naloge ter pri spodbujanju, da je moja raziskovalna naloga nastala.

Zahvaljujem se mojim staršem za pomoč pri pisanju, oblikovanju ter izvedbi raziskovalne naloge ter za vso potrpežljivost in pomoč pri ustvarjanju naloge.

Iskreno se zahvaljujem tudi vsem drugim, ki jih nisem posebej omenil in so kakorkoli pripomogli k izvedbi in pisanju raziskovalne naloge ter mi olajšali delo.

4 UVOD

Varovanje voda in nasploh okolja, našega najdragocenejšega življenjskega vira v 21. stoletju ni več vprašanje varstva narave, postalo je veliko več; postaja vprašanje etike. Včasih smo morali naravo zavarovati zgolj zaradi njene neokrnjenosti, danes jo moramo ščititi pred človekom, nami samimi. Okoljski problemi v bistvu niso problemi tehnologije, kmetijstva, prometa in industrije, temveč so postali problem človekovega duha, njegove vesti in ozaveščenosti o okoljskih problemih. Vsega, kar se v naravi dogaja res ne moremo pripisati človeku, a vedno bolj se zdi, kot da sta duhovna in etična dimenzija človekove odgovornosti do narave dostikrat odpovedala (Firbas, 2011).

Zaradi človekovega delovanja se lahko v površinskih vodah znajdejo številne kemikalije, katerih prisotnost je slabo nadzorovanja, vpliv na okolje in človeka pa nepredvidljiv. Učinki kemoterapevtikov v humani in veterinarski medicini so dobro poznani, malo pa je znanega o njihovem pojavljanju v okolju in vplivu na netarčne organizme. Po uporabi se lahko z iztrebki in urinom znajdejo v odpadnih vodah in tako v vodnem okolju. V raziskovalni nalogi nas bo zanimala prisotnost antibiotikov in drugih snovi v površinskih in odpadnih vodah Maribora in okolice. Vzorčna mesta za odpadne vode smo izbrali tam, kjer je gostota populacije in uporaba antibiotikov največja, pri večjih zdravstvenih ustanovah (bolnišnicah, veterinarskih ambulantah, živalskih farmah...), v mariborski čistilni napravi. Vzorce smo odvzeli tudi v vodi in sedimentu večjih vodotokov. Analitske metode za določanje antibiotikov so zapletene, zato smo preizkusili uporabnost enostavnih in cenovno dostopnih testov za določanje antibiotikov v mleku (Delvo test), ki delujejo na podlagi testnih mikroorganizmov. Koncentracije antibiotikov v odpadnih vodah so nizke, zato smo preverili, katera metoda bi bila najustreznejša za koncentriranje vodnih vzorcev brez segrevanja, ki lahko uniči nekatere antibiotike. Zato smo se odločili, da uporabimo napravo Rotavapor, ki lahko deluje na nižji temperaturi in tako ne vpliva na antibiotike, ki ostanejo kot delci v zelo majhni količini vzorca.

Ker pa smo posledice toksičnosti in genotoksičnosti hoteli preveriti v popolnoma drugi razsežnosti, smo uporabili poseben biološki test, ki se na to omeji. Allium test, katerega testna rastlina je navadna čebula *Allium cepa* L. nam lahko pokaže vpliv vseh kemikalij, ki so bile prisotne v vodi na čebulo. Primeren je za ugotavljanje strupenosti kemikalij in drugih biocidov. S tem testom lahko ugotavljamo pogostost kromosomskih poškodb, ki smo jih ugotavljali v celicah rastlinskih vršičkov korenin. Preparat, ki smo ga naredili iz vršičkov korenin (preparat-

mečkanec) smo opazovali pod 1000-kratno povečavo pod mikroskopom. Čebulni test nam je pokazal kakovost vode ter celoten učinek onesnaževanja voda. Test je cenovno zelo ugoden saj smo razen pripomočkov (epruvet, kapalk,...) potrebovali zgolj mlado navadno čebulo. Prednost testa pa je, da posamezni vzorci niso potrebovali nobene predhodne obdelave.

Posamezne poskuse smo izvedli tudi na čistilni napravi Maribor (Aquasystem), kjer smo prej vzeli vzorce vtoka in iztoka čistilne naprave. S poskusi smo dobili različne podatke o različnih vzorcih, ki smo jih zbrali, kot so pH vzorca, temperatura vzorca, vsebnost nitratov (NO_3), vsebnost fosforja (P), potrebo po kisiku posameznega vzorca (KPK). Za vzorca vtoka in iztoka čistilne naprave smo pridobili podatke o masi trdnih delcev. Temeljito sem si ogledal tudi čistilno napravo, ob tem sem spoznal njeno delovanje in pomen čistilne naprave za živa bitja ter okolje.

4.1 Hipoteze

Pri naši raziskovalni nalogi smo si postavili naslednje hipoteze:

1. Pričakujemo, da pri nekoncentriranih vzorcih ne bomo zaznali antibiotikov, saj so podobne raziskave pokazale, da se v površinskih in odpadnih vodah nahaja koncentracija, ki je bistveno manjša od koncentracije, ki jo lahko zazna Delvotest SP NT (Godič, 2009) ter, da bomo pri koncentriranih vzorcih odpadne vode iz kanalizacijskega sistema pri Mariborski bolnici, vtoka čistilne naprave in Zavetišča za živali Maribor antibiotike zaznali, saj bo koncentracija antibiotikov nad zaznavno minimalno koncentracijo Delvotesta SP NT.
2. Pri izvedbi Allium testa bodo koreninice navadne čebule (*Allium cepa* L.) krajše pri vzorcih (odpadne vode iz kanalizacijskega sistema pri Mariborski bolnici, vtoka čistilne naprave in Zavetišča za male živali Maribor) z večjo onesnaženostjo in višjo stopnjo genotoksičnosti zaradi tega, ker se celice vršičkov koreninic navadne čebule ne bodo morale normalno razmnoževati. Za takšno hipotezo smo se odločili, saj je tudi Peter Firbas dobil podobne rezultate, kjer je ugotovil, da imajo razne izcedne vode in vtoki čistilnih naprav višjo genotoksičnost (Firbas, 2011).

3. Vzorca s predvideno bolj onesnaženo vodo (odpadna voda iz kanalizacijskega sistema pri Mariborski bolnici in vtok čistilne naprave), bosta vsebovala več skupnega fosforja (P) in več skupnega dušika (N). Njuna kemijska potreba po kisiku pa bo bistveno višja kot pri drugih vzorcih.

4. Pričakujemo, da bomo na agarju BHI na katerega bomo aplicirali bolj onesnaženo vodo (vzorci odpadne vode iz kanalizacijskega sistema pri Mariborski bolnici, vtoka čistilne naprave in Zavetišča za male živali Maribor) našli prisotnost večjega števila mikroorganizmov.

5 TEORETIČNO OZADJE

5.1 Antibiotiki

Ljudje smo v celoti obdani z bakterijami, ki so v vdihanem zraku, na nosni in ustni sluznici, na koži, v črevesju in povsod zunaj in znotraj našega telesa. Z njimi pridemo v stik že ob rojstvu. Pred njimi nas varuje naša telesna obramba. Če se vse te prisotne bakterije, ki nas obdajajo preselijo na občutljivo mesto ali če v telo vdrejo škodljive bakterije, ki jim naš imunski sistem ni kos nastopi infekcijska bolezen. Bakterije se izjemno hitro razmnožujejo, uničujejo tkivo, sproščajo toksine in včasih celo grozijo, da se bodo s krvjo razširile do življenjsko pomembnih organov (Kladnik, 2006).

Protimikrobne učinkovine so učinkovine, ki preprečujejo razvoj patogenih bakterij in drugih mikroorganizmov v človeškem organizmu, ne da bi ga pri tem poškodovale. Gre za tako imenovano selektivno toksičnost, ki bi jo naj izpolnjevala le idealna antiinfektivna zdravila. Ta lahko v strogo določenih terapevtskih koncentracijah povzročitelja bolezni zgolj poškodujejo, v veliko primerih pa povsem uničijo. Bolniku, ki se z njimi zdravi sicer lahko povzročijo škodo, ki pa zanj ni usodna in trajna. Antibiotiki so naravnega izvora, sintetizirajo jih nižji organizmi (različne glivice, bakterije...) (Kladnik, 2006).

Posamezno antiinfektivno sredstvo ima točno določeno protimikrobno delovanje. Na določeno skupino mikroorganizmov delujejo le določene učinkovine. Vendar se le te razlikujejo po molekularnem mehanizmu delovanja. Zato je za uspešno terapijo izjemno pomembna identifikacija povzročitelja bolezni in seveda izbira pravega protimikrobnega zdravila. Nekatera zdravila delujejo pretežno na grampozitivne bakterije (npr. benzilpenicilini), druga pretežno na gramnegativne bakterije (npr. aminoglikozidi), antibiotiki širokega spektra (npr. tetraciklini, kloramfenikol) pa delujejo na grampozitivne in gramnegativne bakterije ter tudi na druge povzročitelje (rikecije, spirohete...) (Kladnik, 2006).

Protimikrobne učinkovine glede na tip delovanja ločimo v dve večji skupini. Ločimo jih na baktericide in bakteriostatike. Prvi bakterije ubijejo, drugi pa inhibirajo njihovo rast in razmnoževanje. Razlika med njima je pogosto zgolj kvantitativna, saj pri nižjih odmerkih opazamo bakteriostatsko, pri višjih pa baktericidno delovanje (Kladnik, 2006).

Antibiotiki in kemoterapevtiki so citotoksična sredstva. Njihova uporaba je pogojena s selektivnim delovanjem, ki temelji na določenih biokemičnih razlikah med celico mikroorganizma in gostitelja. Učinkovine, ki jih vsebujejo antibiotiki in kemoterapevtiki ne malo krat povzročajo biokemično poškodbo. Ločimo tri osnovna mesta delovanja, kot so bakterijska stena, citoplazmatska membrana in celični metabolizem (Kladnik, 2006).

Poznavanje antibiotikov je izjemno pomembno, saj jih le tako lahko racionalno uporabljamo. Antibiotiki so učinkoviti, zgolj če dosežemo na mestu infekcije dovolj veliko koncentracijo antibiotika. Zato moramo tudi poznati značilnosti razširjanja antibiotika (Kladnik, 2006).

V svoji več milijonov let dolgi zgodovini so bakterije razvile veliko naravnih mehanizmov, ki jim omogočajo, da preživijo v prisotnosti sorazmerno visokih koncentracijah zdravil. Velik problem 21. stoletja je pojav rezistentnih bakterij, zaradi katerih postajajo zdravila neučinkovita pri zdravljenju določenih infekcij. Bakterije postajajo rezistentne na zdravila zaradi tega, ker proizvajajo encime, ki razgrajujejo molekule zdravila, ker povečajo sintezo encimov, ki spremenijo zdravila v neaktivno obliko, ker preprečujejo vstop zdravila v celico in ker spremenijo proteine, ki so tarča antibiotikov v bakterijskih celicah. Bakterije so v stiku tudi z različnimi vodami, od podtalnih do površinskih, ker lahko tudi te vsebujejo antibiotike, rezistentne bakterije srečujemo vsepovsod in ne zgolj v zaprtih prostorih z veliko ljudmi kot so bolnišnice. Bakterijsko rezistenco lahko preprečujemo tako, da se izogibamo nepotrebnemu uporabi antiinfektivnih zdravil, da pravilno odmerjamo zdravila in omejimo trajanje terapije in tudi z združevanjem zdravil, ki imajo različen mehanizem delovanja. Vse večja nekritična uporaba antiinfektivnih zdravil lahko povzroči razvoj rezistentnih bakterij, spremembo normalne bakterijske flore, pojav preobčutljivosti proti zdravilu in pojav resnih toksičnih reakcij (Kladnik, 2006).

5.2 Allium test

Kako zdrava je voda je vprašanje, ki si ga danes postavlja vse več ljudi. Biološka znanost, nam odpira svet, da lahko z danes znanim biološkim opazovanjem razlik v dolžini rasti korenin testne rastline (*ALLIUM cepa* L.) in poškodbah kromosomov v njihovih celicah v odvisnosti od okolja določa kakovost vode (Firbas, 2011).

Allium test lahko izvedemo v kratkem času. Rastlinski materiali so se pokazali kot uporabni v temeljnih raziskavah pri monitoringu okolja. Njihova uporabnost se kaže pri raziskavah, kjer hočemo narediti splošen pregled okolja in njegovih temeljnih mehanizmov delovanja. Razlog zakaj uporabljamo rastline je v tem, ker jih lahko enostavno hranimo in spremljamo rast. Kromosomi rastlin so v večini primerov v dobrem stanju in primerni za opazovanje. Rastline so cenovno ugodne in med testi z rastlinami in testi z drugimi živimi organizmi (na primer človek) najdemo odlično korelacijo. (Fiskesjö, 1985).

Zgolj fizikalno-kemične analize nam ne dajo dovolj zanesljivega odgovora na vprašanje kako zdrava je voda. Raziskava, ki pa je komplementarna skupaj z biološkimi in kemičnimi raziskavami pa podaja popolnoma drugo sliko, kajti težko je identificirati na tisoče kemičnih snovi v vodi. Biološka metoda Allium nam razkriva celosten vpliv na razvoj in rast živih celic ali organizmov ter zaznava prisotnost škodljivih snovi v koncentracijah, na mejni sposobnosti analitskih metod. Na primer v pitni vodi lahko od približno 700 prepoznavnih toksičnih in genotoksičnih snovi z običajnimi fizikalno-kemijskimi analizami nadzorujemo le slabih 10 odstodkov. Različna odzivnost rasti korenin testne rastline (*Allium cepa L.*) je splošni pokazatelj kakovosti okoljskega vzorca ter njegove strupenosti oziroma toksičnosti. Rast nam pokaže v kako za življenje primerni vodi so zrasle. Daljše kot so korenine boljša je kakovost okoljskega vzorca in krajše ko so korenine slabša je kakovost vzorca (Firbas, 2011).

S pregledom rastnih vršičkov korenin testne rastline na celični ravni s pregledovanjem celic, ter z razmerjem med nepoškodovanimi in poškodovanimi kromosomi v celici, pa dobimo že zelo natančno sliko o kakovosti vode in o tem kako zdrava je voda (Firbas, 2011).

Vendar pa ni dovolj le ugotoviti kaj nas ogroža, temveč moramo tudi ugotoviti kakšne so posledice. S tem dokazujemo, da ni varnih doz, torej, da so MDK (mejne dovoljene koncentracije) nek sporazum, ki je podrejen praktični uporabi. Zato, da bi ugotovili kakšne so posledice, ki jih povzročajo različne vode pa uporabljamo biološke teste, ki pokažejo sinergistične in kumulativne učinke škodljivih snovi, mehanizme prenosa in tudi pretvorb teh škodljivih snovi v bioloških sistemih (Firbas, 2011).

Celotna populacija genotoksičnih snovi, ki so bile dokazane z biološkimi testi, je prvi genotoksični biomarker. Znanstveniki so našli tehtne dokaze, da kemikalije (genotoksične snovi), ki povzročajo kromosomske poškodbe izkazujejo lastnosti kancerogenosti in citokemično značilnost EDC-s (Endocrine-Disrupting Chemicals) hormonskih motenj (Firbas, 2011).

Analitska kemija s svojimi metodami identificira prisotnost vse več najrazličnejših kemikalij v okoljskih vzorcih, kjer je okolje obremenjeno s strani intenzivnega kmetijstva, industrije, turizma in prometa. V vzorcih ob teh območjih številke strupenih snovi gredo v več sto tisoč. Cilji teh raziskav so bili, da nam rezultati pokažejo ali onesnaževanje je ali ga ni. Uporabnost Allium testa pa je bistveno večja, saj nas tudi pripelje do tega kaj je vzrok, oziroma kje je vir onesnaževanja (Firbas, 2011).

5.3 Odpadna voda in čistilna naprava

Odpadne vode oziroma odplake so tiste vode, v katerih je povečana količina snovi, ki se sicer nahajajo v naravni vodi zraven pa še vključujejo primesi, ki jih v naravni vodi ni. Odpadne vode vsebujejo pesek, plavajoče odpadke, suspendirane delce blata, raztopljene anorganske soli, luge in kisline, ostanke pralnih sredstev, koloidno raztopljene organske snovi, barvila, bakterije in ostanke masti ter olja. Površinske vode in podtalnice se vse bolj onesnažujejo predvsem z uvajanjem nečistih tehnologij, z nekontroliranim odlaganjem odpadkov, odvajanjem odpadnih vod, z uporabo umetnih gnojil in pesticidov. Viri onesnaževanja voda pa so tudi razne pralnice, klavnice ter kemična in tehnična podjetja kot so papirnice, jeklarne, železarne in mnoge druge. Včasih so odpadne vode bile speljane v reke ali zemljo, danes pa jih je večina speljanih v čistilne naprave. Nekateri vodotoki pa imajo tudi samočistilno sposobnost in sicer tisti, ki vsebujejo razgradljive odpadne snovi, tisti kateri vsebujejo razkrojevalce, kot so bakterije in plesni ter tiste, ki so sposobne kot končni produkt razkroja sposobne proizvesti anorganske spojine. Do tega pa lahko pride le če je tok vodotoka dovolj dolg in če onesnaženje ni premočno. Na samočistilno sposobnost pa vpliva tudi sestava onesnažil, obremenitev vodotokov in stanje vodotoka. Zakonodaja s katero so zavarovane vode je zakon o varstvu okolja ter zakon o vodah (Kukec, 2009)

Čiščenje odpadnih vod neposredno prispeva k boljši kakovosti rek in morij, s tem pa se tudi vzpostavljajo boljše razmere za rast in razvoj vodnih rastlin in živali. Hkrati pa zagotavljamo boljšo kakovost podtalnice in pitne vode. V Sloveniji so se že začela pojavljati območja, kjer je pitna voda že zelo onesnažena zaradi različnih kemikalij in hranil, ki se uporabljajo v kmetijstvu in industriji. Na območju Maribora in okolice skrbi za čiščenje odpadnih vod Centralna čistilna naprava Maribor, ki leži med staro strugo Drave in kanalom Hidroelektrarne Zlatoličje. Naprava čisti odpadne vode iz gospodinjstev in industrije iz Maribora in okolice. Od junija 2002 deluje

mehansko prečiščevanje, od februarja 2004 pa obratujeta tudi biološko čiščenje in obdelava blata (Muraus in Husar). Čistilna naprava je najučinkovitejši ukrep za preprečevanje onesnaženja. Poznamo več faz čiščenja, ki so primarna, sekundarna in terciarna. Čistilna naprava uporablja različne postopke čiščenja, ki so fizikalni, kemijski in biološki. Cilji čiščenja vod v čistilnih napravah je odstranjevanje organskih snovi in dušikovih in fosforjevih spojin hkrati pa želimo doseči aerobno stabilizacijo in dehidracijo blata (Kukec, 2009). Proces čiščenja odpadnih vod in obdelave blata se prične v mehanskem predčiščenju. V tem procesu se začne odstanjevanje grobih delcev iz odpadne vode. Mehanski odpadki se izločijo na grobih in finih grabljah, poteka pa tudi odstranjevanje peska in maščob. Čistilna naprava sprejme in mehansko predčisti odpadne vode iz greznic. Med mehanskim predčiščenjem poteka vzorčenje in merjenje pretoka ter čiščenje zraka iz zaprtih prostorov. Nato voda preide v proces biološkega čiščenja katerega namen je, da bakterije in mikroorganizmi raztopljene organske snovi predelajo in se skupaj s produkti presnove izločijo v blatu. V procesu biološkega čiščenja poteka razgradnja ogljikovih, dušikovih in fosforjevih spojin s pomočjo bakterij in mikroorganizmov, ki se nahajajo v aktivnem blatu. Dodatno poteka odstranjevanje fosforja z dodajanjem koagulanta (sredstvo za izločanje fosforja iz raztopine odpadne vode). Poteka tudi vnos zraka in mešanje odpadne vode z aktivnim blatom (blato, v katerem delujejo mikroorganizmi). Med tem procesom se blato useda v naknadnih usedalnikih, odvečno blato se prečrpava na obdelavo blata, prav tako poteka vzorčenje in merjenje pretoka. Namen obdelave blata je, da se blato čim bolj zgosti, oziroma, da se iz njega izloči čim več vode in se tako zmanjša njegova količina. Najprej kosmiči blata s pomočjo mehurčkov splavajo na površino (flotacija), s čimer se blato zgosti na 3-4 % suhe snovi. Nato se blatu s centrifugiranjem (dehidracijo) še dodatno odvzame vodo, kar ga zgosti na 20 % suhe snovi. Blatu se doda živo apno, s čimer vsebnost suhe snovi naraste na 25 %. Blato je tako pripravljeno za odvoz na sežig v sežigalnico. Možno pa ga je odvisno od njegove nadaljnje predelave (sušenje, kompostiranje) gospodarno uporabiti (Muraus in Husar).

5.4 Mikrobiologija

S pitno vodo se lahko prenašajo povzročitelji številnih bolezni. Voda je edina pot za širjenje kolere ter možna pot za prenos tifusa, salmonel, šigel, virusa polio, virusa hepatitisa in ameb, ki povzročajo črevesno dizenterijo. Kvaliteto pitne vode je zato treba stalno nadzorovati.

Predpisane so tudi metode odvzemanja in preiskovanja vzorcev. V pitni vodi ne sme biti alg in drugih organizmov, ki lahko spremenijo videz, vonj in okus vode, bakterij vrste Salmonella, vrste Shigella, Vibrio cholerae in drugih patogenih mikroorganizmov, koliformnih bakterij, streptokokov fekalnega izvora, enterovirusov (npr. virus polio) in kemikalij (55 kemičnih snovi npr. bojni strupi, PCB ...). Določeno je število dovoljenih aerobnih mezofilnih bakterij v 1 ml vode in število koliformnih bakterij (Turk, 2012)

Preiskava vode na vse potencialno patogene mikroorganizme v vodi bi bila zamudna in draga. Mikrobiologi zato ugotavljajo prisotnost določene skupine indikatorskih bakterij (to so lahko koliformne bakterije (celokupne in fekalne), Escherichia coli, fekalni streptokoki, kolifagi in druge skupine) Najpogosteje se pri ugotavljanju mikrobiološke kvalitete vod uporablja skupina koliformnih bakterij. To je skupina črevesnih bakterij, ki so podobne E. coli in so verjetno enterobakterije. Prisotnost fekalnih koliformnih bakterij v vodi kaže na potencialno onesnaženje s fekalnimi odplakami, te pa so eden največjih možnih virov potencialnih patogenih mikroorganizmov. Koliformne bakterije so primeren indikator tudi zato, ker v vodi preživijo dlje kot patogeni mikrobi. Najobičajnejša metoda za ugotavljanje neoporečnosti pitne vode je koli titer. Uporablja se tudi štetje bakterij na filtru ter štetje mikroorganizmov oziroma kolonij na trdnem agarju (Turk, 2012)

Štetje na trdnih gojiščih je najpogosteje uporabljena metoda štetja celic. Ta metoda se uporablja predvsem za ugotavljanje števila mikroorganizmov v tekočinah (voda, mleko, itd.) in v materialih, ki jih je mogoče suspendirati v tekočini. Pri tej metodi štejemo žive celice. V preiskovanem materialu je navadno preveč bakterij, da bi jih lahko šteli in je zato treba material ali kulturo najprej redčiti in primerne razredčine cepiti na plošče hranilnega agarja. Gojitveni pogoji (temperatura, čas inkubacije ter uporabljena gojišča) so odvisni od bakterij, na katere se material preiskuje. Po 24 – 48-urni inkubaciji pri določeni temperaturi (najpogosteje pri 30 °C ali 37 °C) kolonije preštejemo. Običajno štejemo na ploščah, ki imajo od 25 do 300 kolonij. Število kolonij, ki zrastejo na plošči hranilnega agarja ni zmeraj enako številu bakterij v kulturi. Zato pravimo, da na plošči preštejemo enote, ki tvorijo kolonije (colony forming units, CFU) (Habulin in Primožič, 2008).

6 MATERIALI IN METODE DE LA

6.1 Odvzem vzorcev vode

6.1.1 Materiali

Pripomočki:

- 2 vedri
- 14 steklenih posod s pokrovom
- Vrv
- Brizga
- Palica

Laboratorijske aparature:

- Avtomatski vzorčevalnik

Tehnične aparature:

- Fotoaparat

6.1.2 Metode

Vzorke vode smo jemali od novembra leta 2014 do januarja leta 2015. Zbrali smo naslednje vzorce:

1. Iztok čistilne naprave Maribor
2. Reka Drava ob umetnem jezeru Ptuj
3. Novi Hočki potok (Bohova, večje število kmetijskih površin)
4. Vtok čistilne naprave Maribor
5. Odpadna voda iz kanalizacijskega sistema pri Mariborski bolnici
6. Potok Grajena pod Puhovim mostom
7. Odtok zavetišča za živali Maribor

Vzorke vode 2, 3, 5, 6 smo zbrali tako, da smo z vedrom zajeli okrog en liter vode. Nato smo to vodo vlili v drugo vedro. Potem smo na vsakih pet minut postopek ponovili v časovnem intervalu tridesetih minutah. Zbrane posamezne vzorce v drugem vedru smo nato s palico dobro premešali, vzorec pa smo prelili v čisto stekleno posodo s pokrovom. Posamezne vzorce smo označili z krajem vzorčenja, datumom in uro.

Za zbiranje vzorcev odpadne vode na vtoku in prečiščene vode na iztoku smo v čistilni napravi uporabili avtomatsko vzorčenje, ki nam omogoča pretočno proporcionalno zajemanje vzorca glede na pretok v 24 urah. V avtomatskem vzorčevalniku so vzorci shranjeni na temperaturi 4°C, da je razgradnja vzorcev onemogočena. Dvakrat mesečno v čistilni napravi Maribor poteka monitoring, ki ga izvaja pooblaščen inštitut za izvajanje zakonsko predpisanega monitoringa v skladu s Pravilnikom o prvih meritvah in obratovalnem monitoringu odpadnih voda ter o pogojih za njegovo izvajanje (Uradni list RS, št. 94/2014).

Vzorec iz Mariborskega zavetišča za živali smo pridobil iz odtočnega jaška ob kletkah živali iz katerega smo posrkali tekočino, ki se je nahajala po čiščenju v jašku.

6.2 Delvotest SP NT

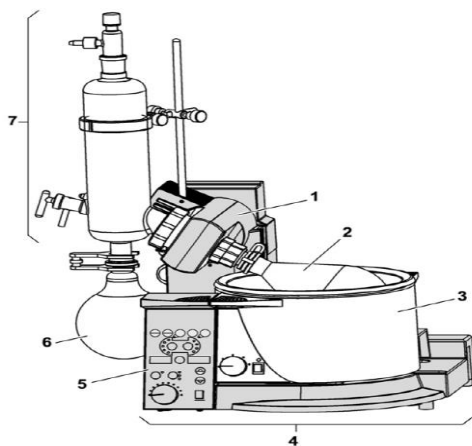
6.2.1 Materiali

- Delvotest SP NT MINI (25 ampul)
- Posoda za segrevanje
- Steklena posoda
- Brizga
- Antibiotik TETRA-DELTA
- Kivete
- Elektronski termometer
- Parafilm »M«
- Avtomatska pipeta s pripadajočimi nastavki (0.1mL)
- Grelnik
- Rotavapor

- Plastične eze
- 3 steklene bučke (izparilne bučke)
- Pipeta (1mL)
- Destilirana voda
- Mikrocentrifugirka
- Petrijevka

6.2.2 Metode

6.2.2.1 Priprava koncentriranih vzorcev



Slika 1: Skica Rotavaporja (Petrovič, 2011)

Vzorec, ki smo ga uparevali je v izparilni bučki (2). Raztopina se upareva z nastavitvijo ustrezne temperature grelne kopeli (3) v našem primeru na 60°C in z vakuumom, prilagojenim termodinamskim lastnostim vzorca. Pri prvem izparevanju smo umerjali pri kateri temperaturi moramo pustiti izparilno bučko v grelni kopeli (3) zato smo temperaturo spreminjali na nadzorni plošči (5) in z gumbom na grelni kopeli (3). Pogon (1) vrti izparilno bučko, s čimer se zmanjša neenakomerno segrevanje raztopine in se poveča površina raztopine. Pare skozi parno cev potujejo v hladilnik (7), kjer se para kondenzira in se tekočina izliva v sprejemno bučko (6). Tako je v izparilni bučki ostal vzorec, ki je vseboval izjemno majhno količino vode. Na koncu smo v izparilne bučke z mililitrsko pipeto dodali 1 mL destilirane vode. S plastično ezo

smo stene bučk dobro postrgali, vzorce pa smo vlili v mikrocentrifugirke, ki smo jih označili s številkami vzorcev, ki smo jih zbrali in do uporabe hranili pri 4°C.

6.2.2.2 Postopek izvedbe Delvotesta SP NT

Najprej smo posamezne ampule oštevilčili s številkami vzorcev. Nato smo iz ampule odstranili aluminijasto folijo. Z 0.1 mL pipeto smo v ampulo odmerili 0.1 mL posameznega vzorca, ki smo jih pred tem dobro premešali. Test smo opravili prvi dan s koncentriranimi in nekoncentriranimi vzorci. Drugi dan pa smo test ponovili le s koncentriranimi vzorci. Koncentrirani vzorci so vzorci, ki smo jih pridobili z laboratorijsko aparaturo Rotavaporjem. Nekoncentrirane vzorce pa so predstavljali nativni vzorci. Po odmerjanju smo vsako ampulo prekrili s parafilmom. Ampule smo za tem namestili v stojalo, ki je bilo priloženo zraven Delvo testa SP NT. Posodo v kateri je bila voda smo položili na grelnik s termostatom in vodo v njej segreli do 64°C. Nato smo ampule v stojalu položili v stekleno posodo nekje do četrtine napolnjeno z vodo, ki smo jo položili v posodo za gretje segreto do 64°C. Temperaturo smo vzdrževali z uravnavanjem termostata na grelniku z odvzemanjem vroče vode ter dodajanjem hladne. Ampule smo inkubirali tri ure.

Po treh urah smo ampule v stojalu vzeli iz steklene posode in preverili rezultate. Ali je test pozitiven in negativen smo določili na podlagi obarvanosti vzorcev po končani inkubaciji. Obarvanost smo opazovali na spodnjih dveh tretjinah vzorca. Obarvanost smo primerjali s standardizirano skalo Delvotesta SP NT, ki je priložena testu. Rumena obarvanost vzorca pomeni, da je test na antibiotike negativen, vijolična obarvanost vzorca pa, da je test pozitiven.

Test za ugotavljanje prisotnosti antibiotikov v vzorcih uporablja hitro rastočo, na temperaturo občutljivo bakterijo *Bacillus stearothermophilus*. Ta bakterija ob rasti sprošča kislino, ki močno spremeni barvo testa. Občutljiva ja na vse najpogosteje uporabljene antibiotike v medicini in veterini in ob prisotnosti antibiotikov hitro umre. Če je v vzorcu antibiotik, se kislina zaradi propada bakterije ne sprošča in barva v testu ostane skoraj nespremenjena. Če pa antibiotika v vzorcu ni, se bakterija v treh urah razmnožuje in sprošča kislino, ki spremeni barvo, da test postane rumen, se pravi je negativen.

6.3 Allium test

6.3.1 Materiali

- epruvete
- navadna čebula (*Allium cepa* L.)
- Vzorci vod
- Destilirana voda (kontrolni vzorec)
- stojala za epruvete
- Pipete
- Karmin očetno barvilo
- Fiksativ (etanol in očetna kislina v razmerju 3:1)
- Predmetna mikroskopska stekelca
- Krovna mikroskopska stekelca
- Gorilnik
- Mikroskop Leica DM750 P

6.3.2 Metode

6.3.2.1 Izvedba *Allium* testa

V vsako vrsto stoyal smo dali po sedem epruvet za vsak vzorec. Nato smo v sedem epruvet nalili posamezen nativni vzorec do vrha. Dodatnih sedem epruvet pa smo napolnili z destilirano vodo in jih uporabili kot kontrolo. Na vsako epruveto smo položili po eno navadno čebulo, ki smo jih predhodno izbrali, da so si bile čim bolj podobne, po zdravju in velikosti. Na dnu vsakega čebulčka smo čebulček malo pristrigili, da so lahko korenine začele normalno rasti. Nato smo vsak dan zjutraj in zvečer pet dni zapored v epruvete dodajali posamezne vzorce vode. Čez 48 ur smo pri vsakem vzorcu vode enemu čebulčku pristrigili koreninico, ki smo jo vstavili v predhodno pripravljen fiksativ, ki je bil sestavljen iz etanola in očetne kisline v razmerju 3:1.

Po petih dneh smo vsem čebulčkom izmerili koreninice in nato izračunali povprečje dolžin koreninic pri posameznem vzorcu vode.

Koreninice, ki smo jih pristrigali čebulčkom, smo nato pogledali pod mikroskopom na 1000x povečavi. Predhodno smo si pripravili karmin očetno barvilo, ki je sestavljeno iz 0.5 g karmina, 45 mL ledocetne kisline in 50 mL destilirane vode. Pripravili smo ga tako, da smo 45 mL ledocetne kisline in 50 mL destilirane vode zavreli. Ko smo ju zavreli, smo dodali 0.5 g karmina. Celotno raztopino smo pustili še 10 minut vreti. Nato smo počakali, da se je barvilo ohladilo, da smo ga lahko prefiltrirali. Koreninice iz fiksativa smo položili v karmin očetno barvilo. Vse skupaj smo segrevali na gorilniku okrog tri do štiri minute oziroma do začetka vretja barvila. Koreninske vršičke smo položili na predmetno mikroskopsko stekelce, preko njih pa smo položili krovno mikroskopsko stekelce. Ob robih smo še popivnali ostanke barvila. Koreninice smo nato zmečkali in dobili smo preparat, ki mu rečemo mečkanec. S celotnim preparatom smo še šli nekaj krat čez gorilnik, da so se celice še bolj obarvale. Pod mikroskopom smo preparat pregledali. Preiskali smo celice in določali ali so v interfazi ali v kateri koli drugi fazi mitoze (profazi, metafazi, anafazi in telofazi). Iskali smo tudi, če v celicah najdemo kakršne koli nepravilnosti. Skupaj smo pregledali okrog 200 celic za vsak vzorec. Za vsak vzorec posebej pa smo tudi izračunali mitozni indeks, ki je količnik med številom celic v mitozni in številom celic, ki smo jih pregledali.

6.4 Določanje skupnega dušika, skupnega fosforja, nitratov, KPK-ja in pH-ja

6.4.1 Materiali

- Homogenizator WTW DISPER D-8
- Fotometer Merck NOVA 60
- Termoreaktor MERCK TR 420
- pH meter WTW 330i
- Avtomatske pipete

6.4.2 Metode

Na čistilni napravi smo določili različne parametre. Skupen dušik smo izmerili pri vzorcih 1, 4 in 5. Prisotnost nitrata smo izmerili pri vzorcih 1, 2, 3, 6. Skupni fosfor, KPK in pH smo izmerili pri vseh šestih vzorcih.

6.4.2.1 Določanje skupnega dušika

V odpadni vodi se dušik pojavlja v štirih oblikah in sicer kot organski dušik, amonij (ioniziran in prosti amoniak), nitrit in nitrat.

Celotni dušik je vsota dušika po Kjeldalhu (organski dušik + N-NH₄), nitratnega dušika (N-NO₃) in nitritnega dušika (N-NO₂).

Organske in anorganske dušikove spojine smo določili na podlagi Koroleff metode z oksidacijsko obdelavo v termoreatorju. Metoda določanja dušika temelji na ISO 7890/1 standardu.

6.4.2.2 Določanje nitratnega dušika

Nitratni ioni tvorijo v raztopini žveplene in fosforjeve kisline z 2,6 dimetilfenolom oranžno obarvan 4-nitro-2,6 dimetilfenol, katerega koncentracijo smo določili s fotometrom. Metoda določanja nitrata temelji na ISO 7890/1 standardu.

6.4.2.3 Določanje skupnega fosforja

Ortofosfatni ioni tvorijo v raztopini žveplene kisline molibdenove ione, torej molibdenfosfatno kislino. Ta se s askorbinsko kislino reducira v fosformolibden moder, ki pa se lahko fotometrično določi. Metoda določanja fosforja je standardizirana na podlagi ISO 6878 standarda.

6.4.2.4 Določanje KPK

KPK je kemijska potreba po kisiku oziroma kemijska poraba kisika (angleško Chemical Oxygen demand).

Vzorec se oksidira z vročo žvepleno kislino raztopine kalijevega dikromata in srebrovega sulfata kot katalizatorja. Metoda določanja KPK (kemijska potreba po kisiku) temelji na ISO 6060 standardu.

KPK je merilo za organsko onesnaženje v površinskih in odpadnih vodah. S KPK določimo vse organske snovi, biološko razgradljive in nerazgradljive.

6.4.2.5 Merjenje pH-ja

pH smo zmerili s pH metrom WTW 330i. Izmerili smo ga tako, da smo v posamezen vzorec pomočili merilni del pH metra in iz zaslona odčitali podatke.

6.5 Mikrobiološko testiranje vzorcev

6.5.1 Materiali

- Inkubator Binder
- Avtomatska pipeta LLG (10-100 µl)
- Agar BHI (Brain heart infusion)
- Petrijevke
- Etanol
- Gorilnik

6.5.2 Metode

Najprej smo pripravili agar BHI tako, da smo zmešali 18,5 g BHI-ja z 500 ml vode in dodali 10g agarja. Nato smo agar sterilizirali v avtoklavu (121°C, 15 minut), ga zlili v petrijevke in ga do porabe hranili pri 4 °C. Na agar smo z avtomatsko pipeto nanesli 100 µl vzorca in ga enakomerno razporedili po agarju v petrijevki. Petrijevke smo položili v inkubator za 24 ur na 37°C. Po enem dnevu smo prešteli število zraslih kolonij na agarju.

7 REZULTATI

7.1 Rezultati Delvotesta SP NT

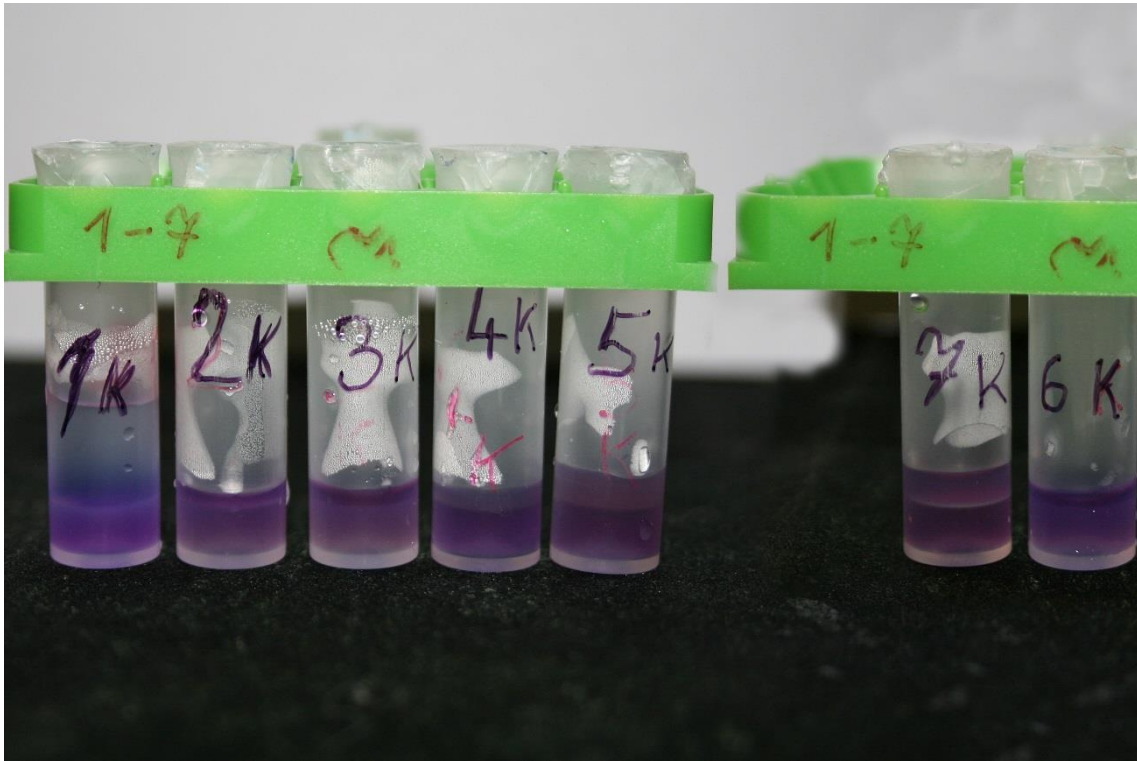
Tabela 1: Rezultati dveh Delvotestov pri istih vzorcih

	Vzorec 1		Vzorec 2		Vzorec 3		Vzorec 4		Vzorec 5		Vzorec 6		Vzorec 7		Pozitivna kontrola
	konc.	nekonc.	konc.	nekonc.	konc.	nekonc.	konc.	nekonc.	konc.	nekonc.	konc.	nekonc.	konc.	nekonc.	
Rez. 1. dan	poz.	neg.	poz.	neg.	poz.	neg.	poz.	neg.	poz.	neg.	poz.	neg.	poz.	poz.	/
Rez. 2. dan	neg.	/	poz.	/	neg.	/	poz.	/	poz.	/	poz.	/	poz.	poz.	poz.

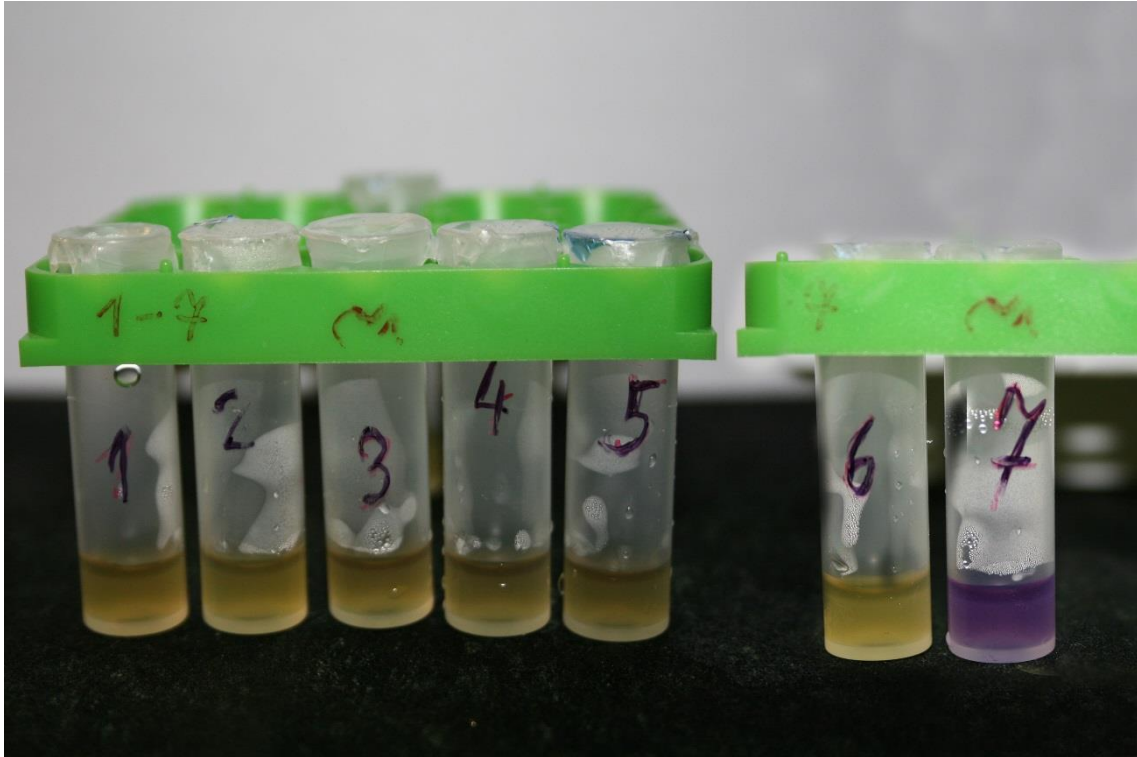
Legenda:

1. Iztok čistilne naprave Maribor
2. Reka Drava ob umetnem jezeru Ptuj
3. Novi Hočki potok (Bohova, večje število kmetijskih površin)
4. Vtok čistilne naprave Maribor
5. Odpadna voda iz kanalizacijskega sistema pri Mariborski bolnici
6. Potok Grajena pod Puhovim mostom
7. Odtok zavetišča za živali Maribor

Če upoštevamo stopnjo koncentriranja vzorca 100X: z rotavaporjem smo iz 100 ml vzorca dobili 1 ml in občutljivost Delvotesta SP NT od 2 (penicilin) - 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (večina ostalih antibiotikov) lahko sklepamo, da je v vodi prisotna nižja od 0.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$.



Slika 2: Rezultati Delvotesta pri koncentriranih vzorcih 1. dan



Slika 3: Rezultati Delvotesta pri nekoncentriranih vzorcih 1. dan



Slika 4: Rezultati Delvotesta pri koncentriranih vzorcih in nekoncentriranem sedmem vzorcu 2. dan

7.2 Rezultati Allium testa



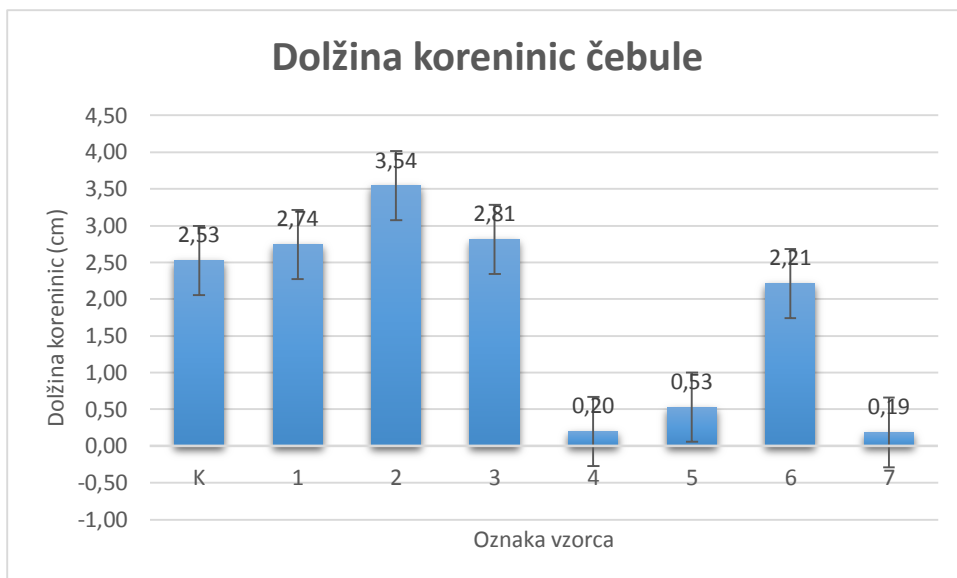
Slika 5: Nastavitev Allium testa



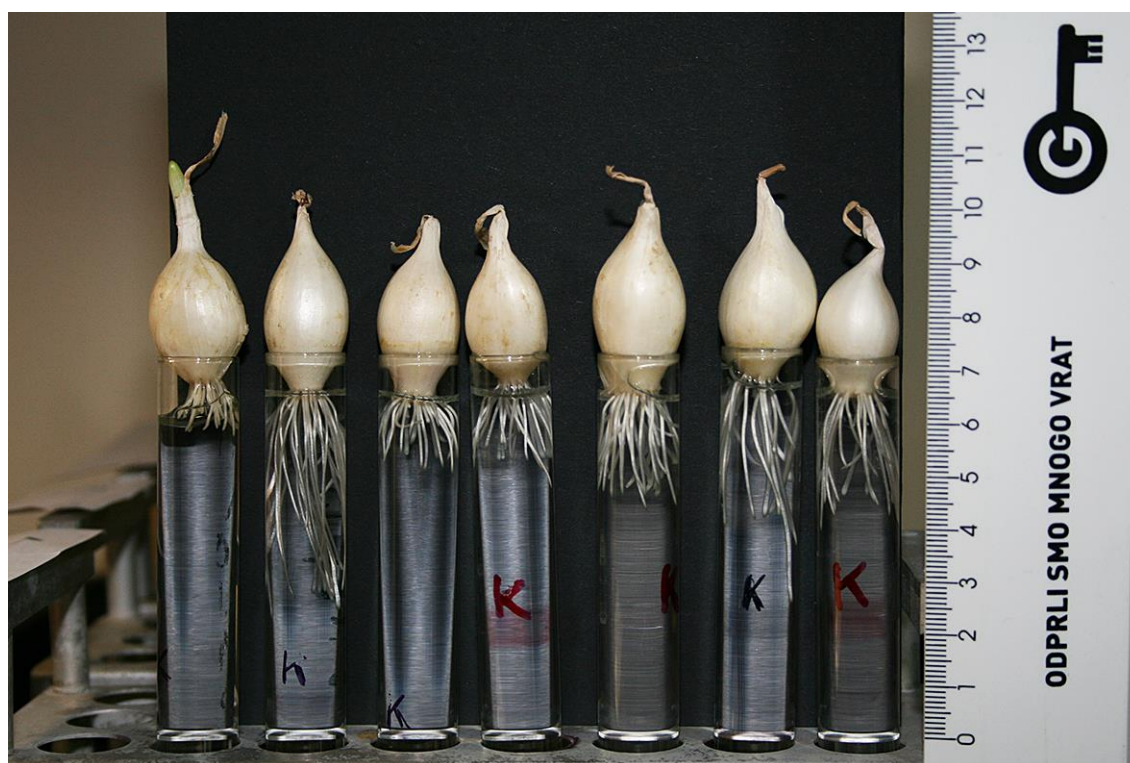
Slika 6: Poskus 3. dan

Tabela 2: Dolžina koreninic čebule 5. dan rasti v cm v različnih vzorcih vode

	Dolžina koreninic v različnih vzorcih vode (mm +/- 0,5 mm)							
	Kontrola	Vzorec	vzorec	vzorec	vzorec	vzorec	vzorec	vzorec
		1	2	3	4	5	6	7
Epruveta 1	1,0	2,2	1,7	0,5	0,1	0,7	3,2	0,1
Epruveta 2	4,0	2,4	2,8	4,7	0,4	0,3	1,5	0,2
Epruveta 3	1,5	4,5	5,0	4,6	0,1	0,8	0,5	0,2
Epruveta 4	2,4	5,6	4,3	2,0	0,2	0,8	2,7	0,2
Epruveta 5	2,2	1,0	2,7	5,1	0,2	0,1	2,0	0,2
Epruveta 6	4,2	0,8	3,7	1,7	0,1	0,2	3,6	0,3
Epruveta 7	2,4	2,7	4,6	1,1	0,3	0,8	2,0	0,1
Povprečje	2,5	2,7	3,5	2,8	0,2	0,5	2,2	0,2



Grafikon 1: Dolžina koreninic čebule



Slika 7: Dolžina koreninic pri kontrolni skupini ob koncu poskusa



Slika 8: Dolžina koreninic pri vzorcu 1 ob koncu poskusa



Slika 9: Dolžina koreninic pri vzorcu 2 ob koncu poskusa



Slika 10: Dolžina koreninic pri vzorcu 3 ob koncu poskusa



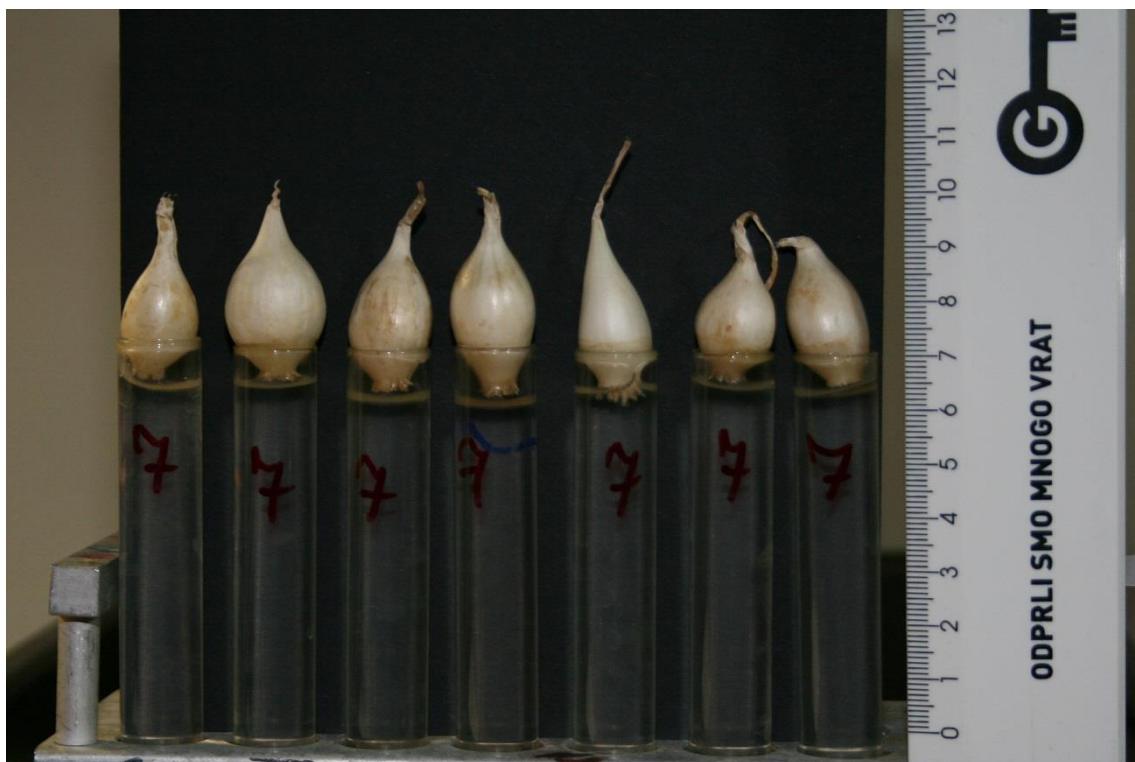
Slika 11: Dolžina koreninic pri vzorcu 4 ob koncu poskusa



Slika 12: Dolžina koreninic pri vzorcu 5 ob koncu poskusa



Slika 13: Dolžina koreninic pri vzorcu 6 ob koncu poskusa



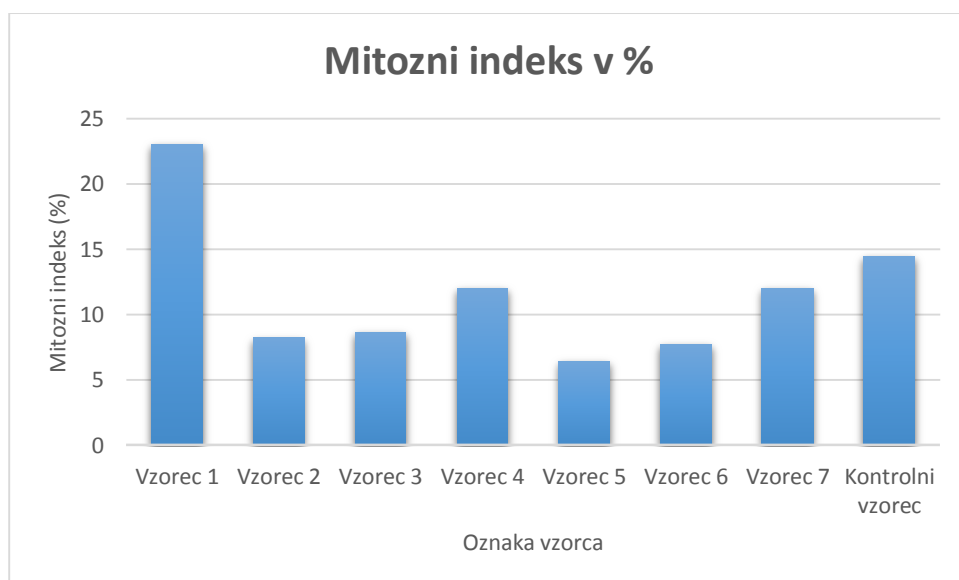
Slika 14: Dolžina koreninic pri vzorcu 7 ob koncu poskusa

Tabela 3: Število celic v posameznih fazah delitve v različnih vzorcih

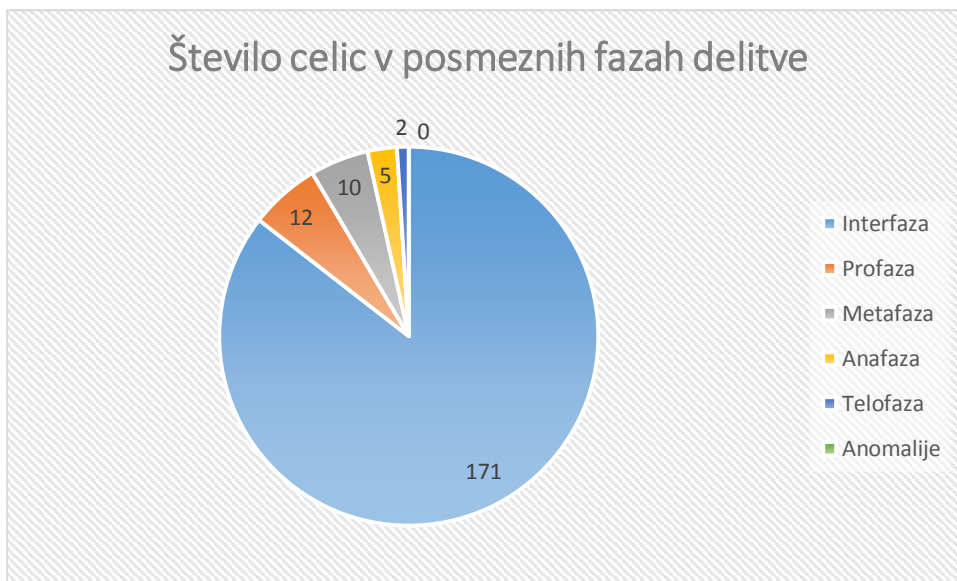
	Število celic v posameznih fazah delitve							
	Kontrola	Vzorec 1	vzorec 2	vzorec 3	vzorec 4	vzorec 5	vzorec 6	vzorec 7
Interfaza	171	153	215	212	173	261	271	176
Profaza	12	21	8	13	10	8	11	24
Metafaza	10	13	4	5	9	3	8	0
Anafaza	5	8	4	3	4	3	3	0
Telofaza	2	4	3	0	1	4	1	0
Anomalije	0	1	2	0	3	2	3	0

Tabela 4: Mitozni indeks pri posameznih vzorcih

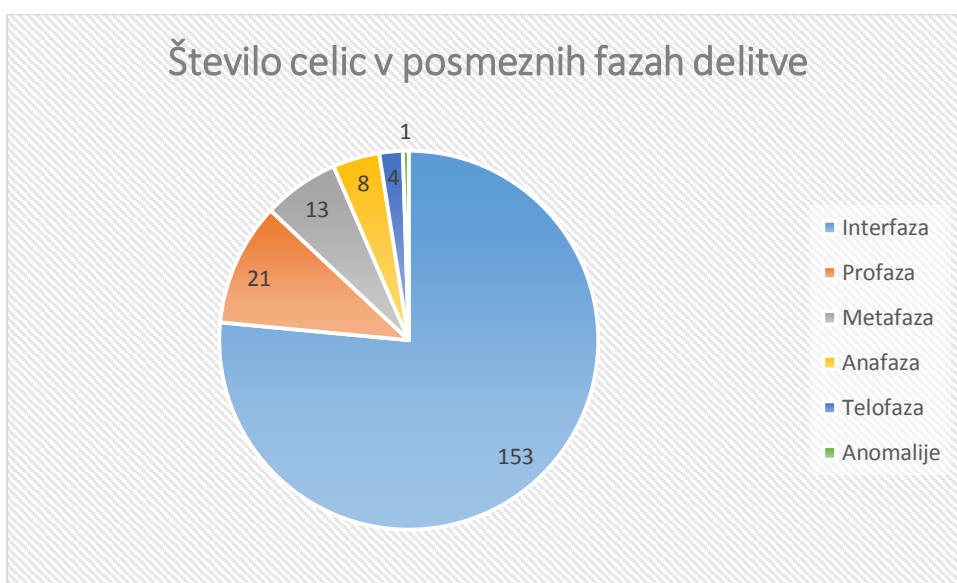
	Mitozni indeks v %
Vzorec 1	23
Vzorec 2	8,2
Vzorec 3	8,6
Vzorec 4	12
Vzorec 5	6,4
Vzorec 6	7,7
Vzorec 7	12
Kontrolni vzorec	14,5



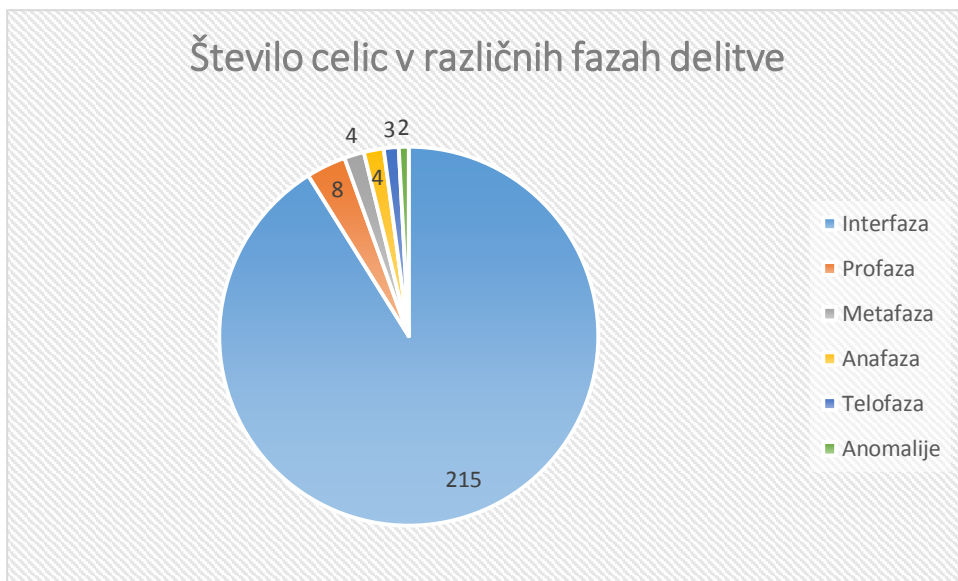
Grafikon 2: Mitozni indeks v %



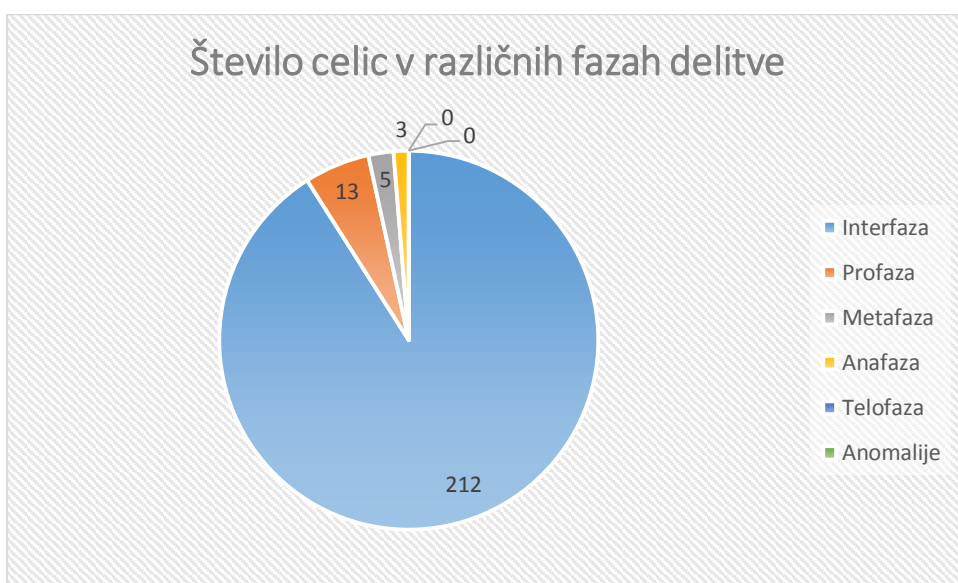
Grafikon 3: Število celic v posameznih fazah delitve v kontrolnem vzorcu



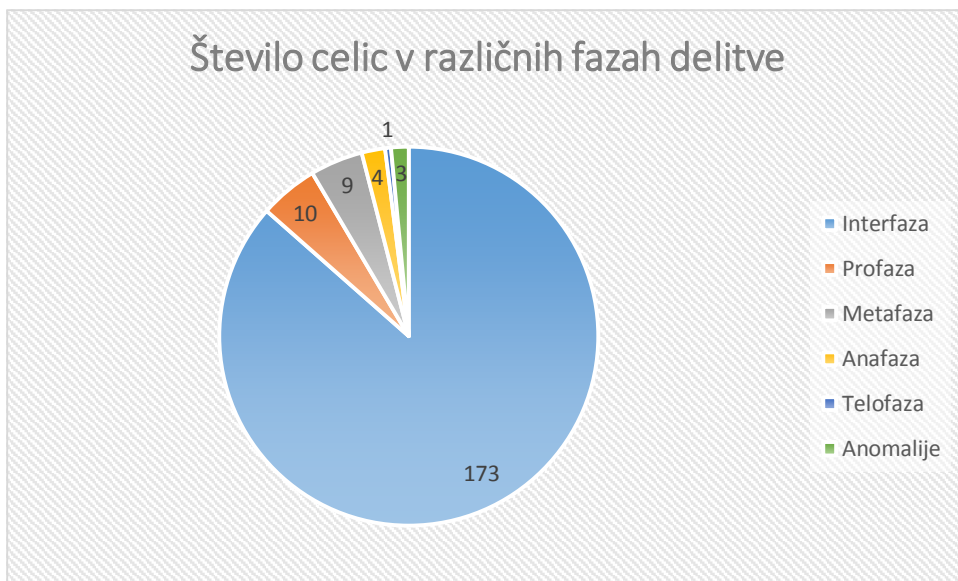
Grafikon 4: Število celic v posameznih fazah delitve v vzorcu 1



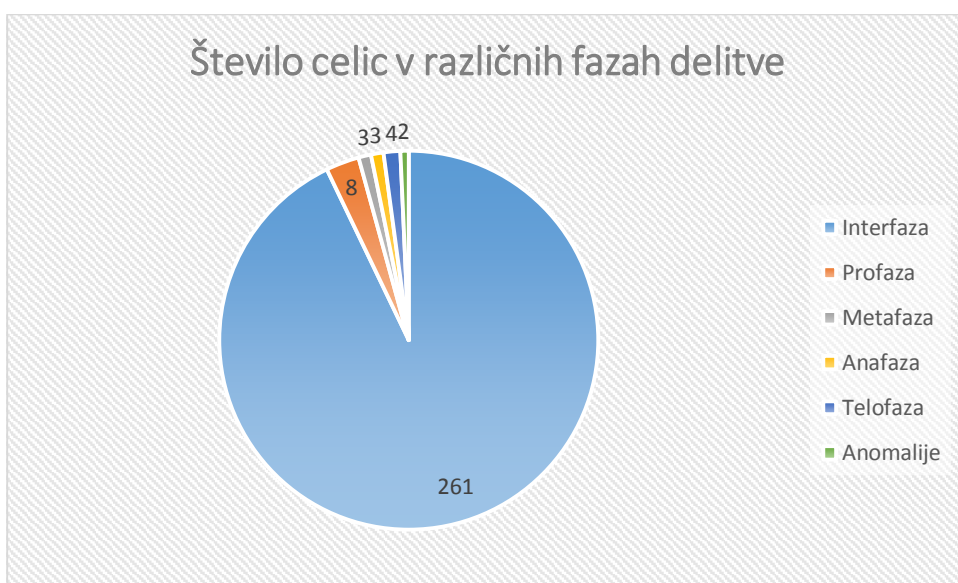
Grafikon 5: Število celic v posameznih fazah delitve v vzorcu 2



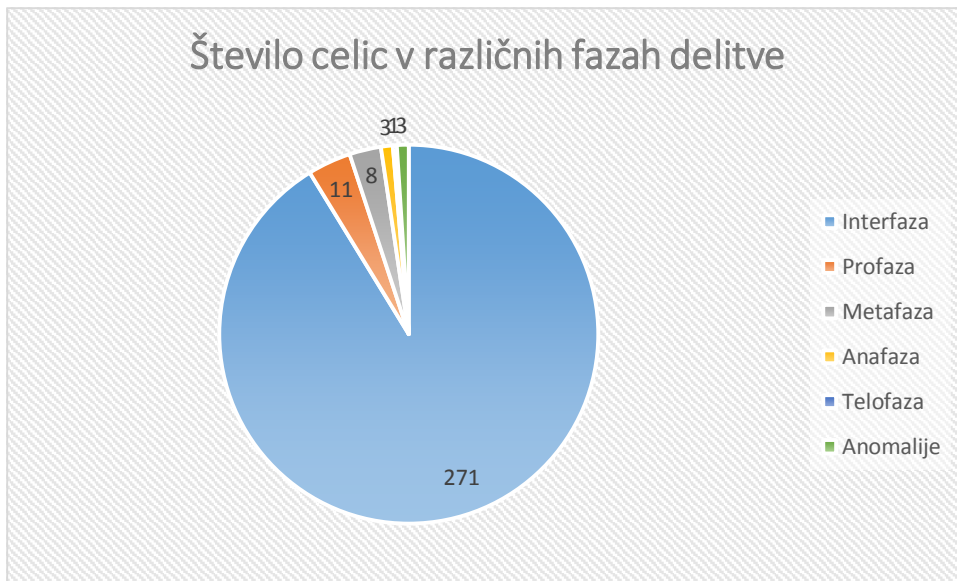
Grafikon 6: Število celic v posameznih fazah delitve v vzorcu 3



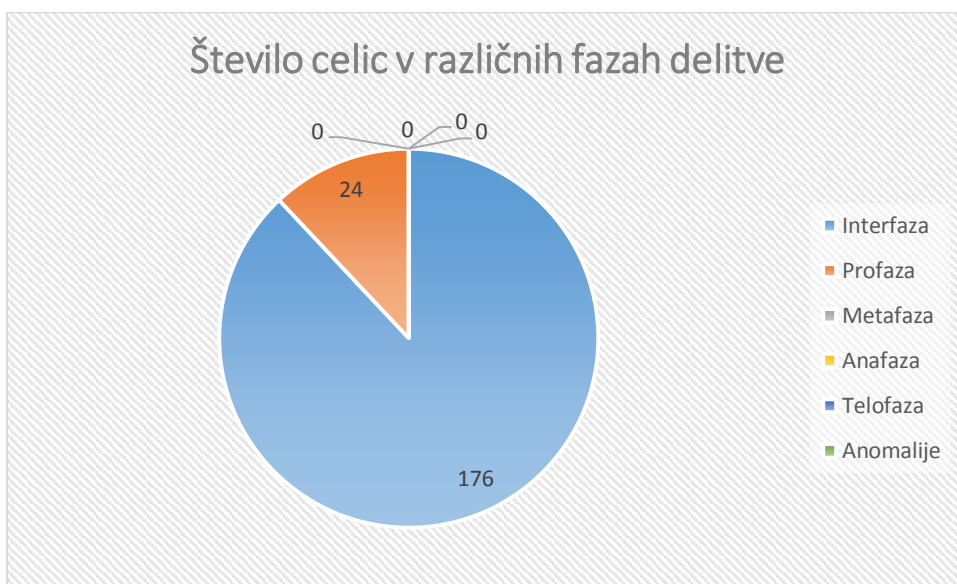
Grafikon 7: Število celic v posameznih fazah delitve v vzorcu 4



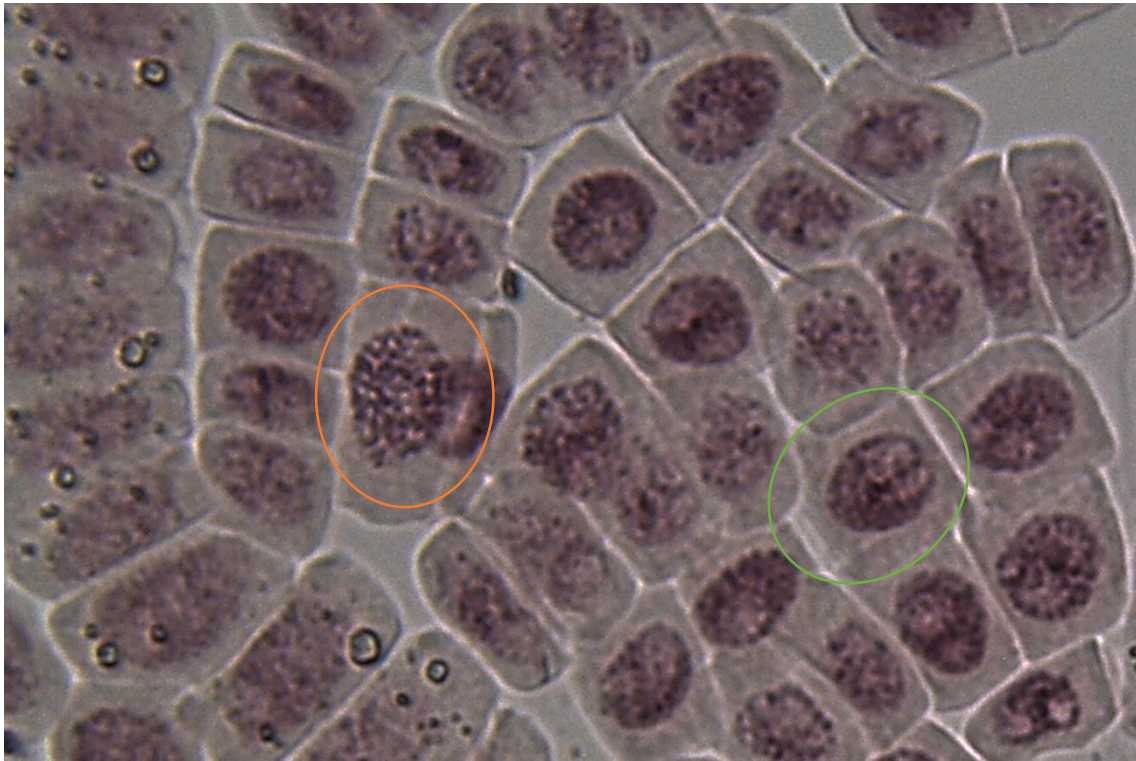
Grafikon 8: Število celic v posameznih fazah delitve v vzorcu 5



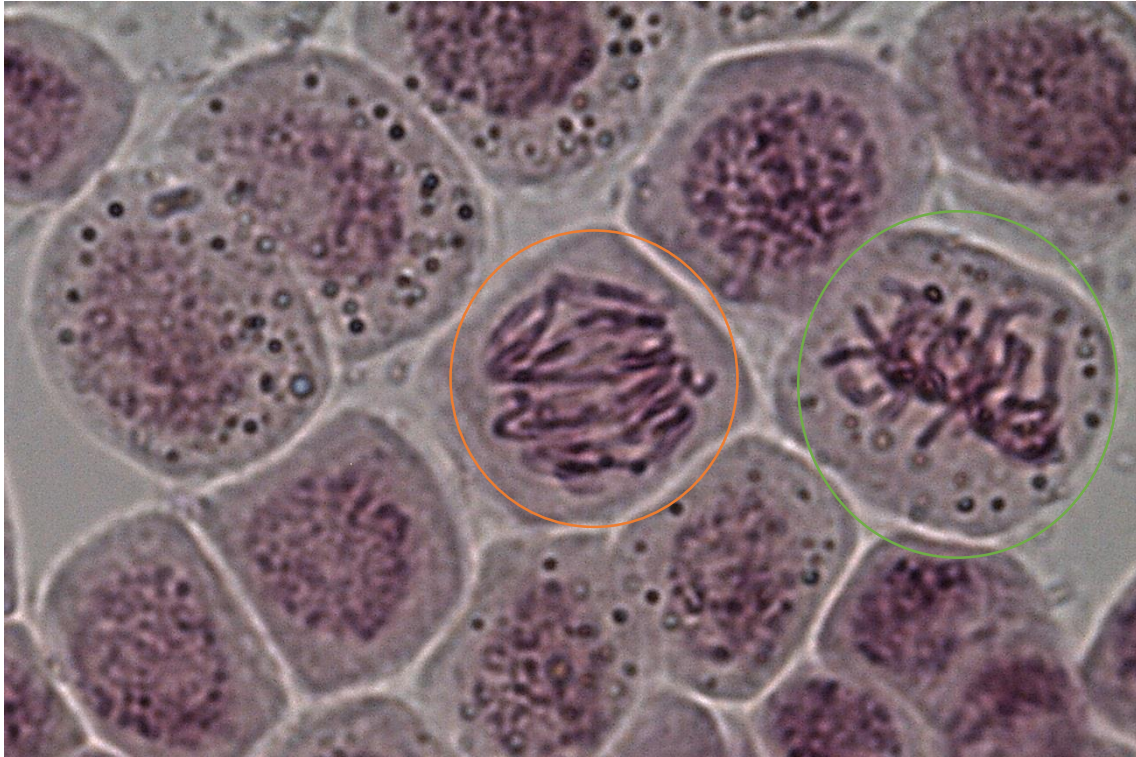
Grafikon 9: Število celic v posameznih fazah delitve v vzorcu 6



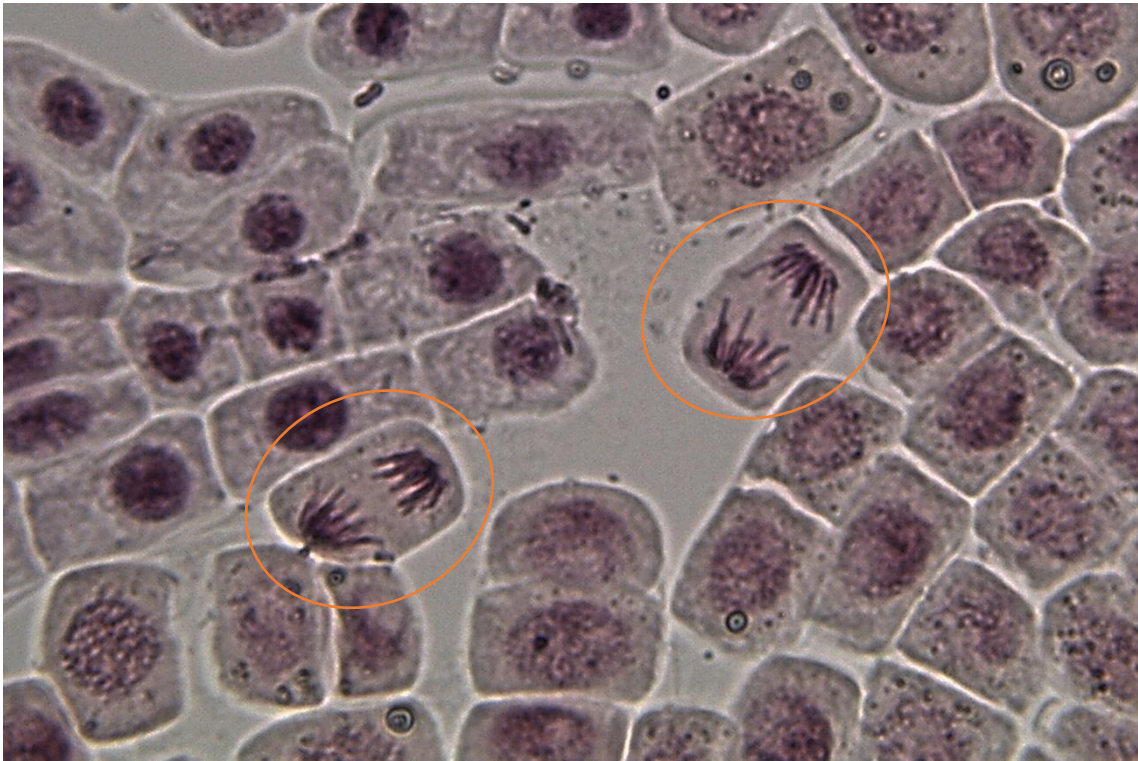
Grafikon 10: Število celic v posameznih fazah delitve v vzorcu 7



Slika 15: Interfaza (zeleno) in profaza (oranžno) mitoze (1000 X) (lastni vir)



Slika 16: Metafaza (zeleno) in nerazdvojeni kromosomi (oranžno) mitoze (1000 X) (lastni vir)



Slika 17: Anafaza mitoze (1000 X) (lastni vir)



Slika 18: Telofaza mitoze (1000 X) (lastni vir)



Slika 19: Anafazni most mitoze (1000 X) (lastni vir)

7.3 Rezultati določanje skupnega dušika, skupnega fosforja, nitratov, KPK-ja in pH-ja

Tabela 5: Rezultati kemijskih analiz površinskih in odpadnih vod

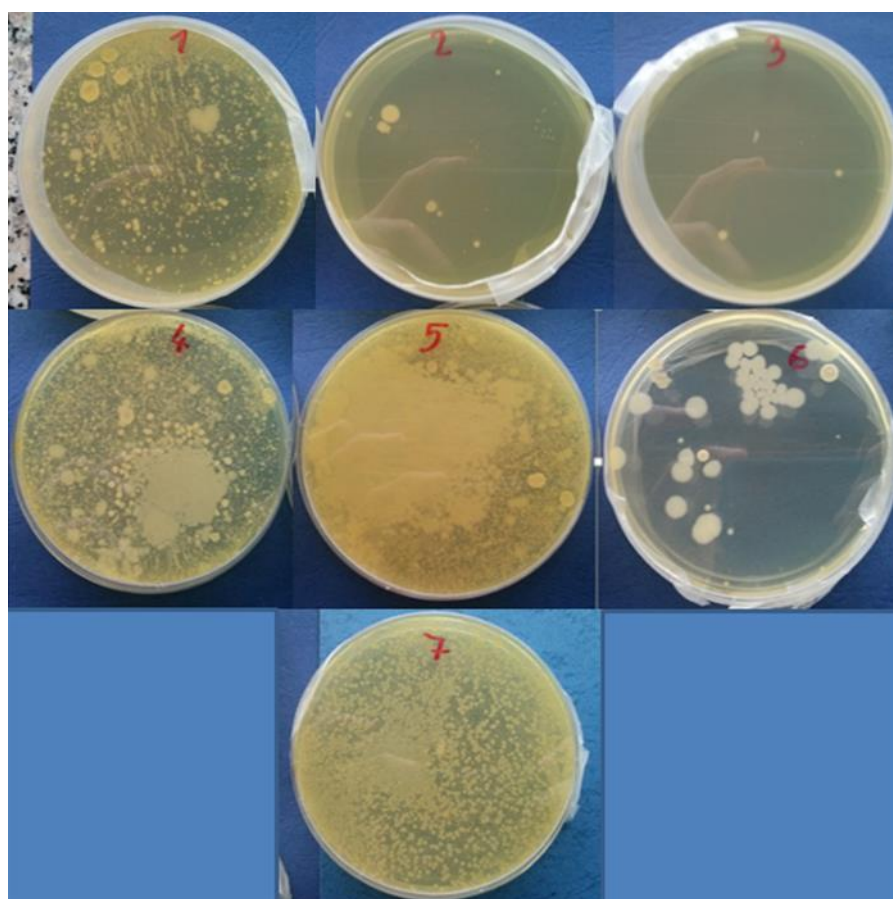
	Vzorec					
	1	2	3	4	5	6
N-skupni (mg/L)	4.3	/	/	70	74	/
P-skupni (mg/L)	0.69	0.24	0.10	13.7	10.6	1.12
Nitrati (mg/L)	2.0	0.9	2.1	/	/	2.9
KPK (mg/L)	43	2	4	994	1109	4
pH	7.861	7.576	7.507	7.706	8.027	7.462

7.4 Rezultati mikrobiološkega testiranja vzorcev

Tabela 6: Število zraslih kolonij na agarju v posameznih vzorcih

	Vzorec						
	1	2	3	4	5	6	7
Št. kolonij	neštevno	35	3	neštevno	neštevno	48	neštevno

neštevno: kolonij zaradi prevelikega števila nismo mogli prešteti



Slika 20: Kolonije mikroorganizmov zraslih po 24 urah

8 DISKUSIJA

8.1 Hipoteza 1

Podobnih raziskav kot smo jih izvedli z Delvotestom SP NT v literaturi nismo zasledili. Iz tabele 1 je razvidno, da smo prvi dan dobili vse teste z koncentriranimi vzorci pozitivne, to pomeni prisotnost antibiotikov. Vsi nekoncentrirani vzorci razen vzorca sedem so bili negativni in so se obarvali rumeno. Za vzorca 2 in 3 lahko na podlagi slike rečemo, da vsebujeta manj antibiotika kod ostali vzorci, vendar sta še vedno nad minimalno vrednostjo antibiotika, ki jo lahko Delvotest SP NT zazna. Ko smo drugi dan poskus ponovili, smo dobili podobne rezultate, ki so se malo razlikovali. Razlike, ki smo jih dobili so bile pri vzorcu 1 in 3. Pri vzorcu 1 smo dobili, da antibiotikov ne vsebuje, saj se je test obarval rumeno, pri vzorcu 3, pa smo dobili sivkasto rumeno barvo, s čim lahko sklepamo, da vzorec vsebuje antibiotike vendar pod merilnim območjem Delvotesta SP NT. Drugi dan smo naredili kontrolni test z antibiotikom, ki smo ga seveda dobili pozitivnega. Ponovili pa smo tudi test z nekoncentriranim vzorcem 7, ki je bil ponovno pozitiven na antibiotike. Hipotezo 1 smo lahko na podlagi dobljenih rezultatov delno potrdili, saj smo antibiotike zaznali pri koncentriranih vzorcih iz odpadne vode iz kanalizacijskega sistema pri Mariborski bolnici, vtoka čistilne naprave in zavetišča za živali Maribor v obeh dnevih testiranja. Tako smo ta del hipoteze lahko potrdili. Nismo pa morali potrditi prvega dela hipoteze, saj smo pri nekoncentriranih vzorcih dobili enega pozitivnega in sicer vzorec, ki smo ga vzeli v Zavetišču za živali Maribor. Da smo se o tem prepričali, smo ta test z vzorcem 7 ponovili in spet smo dobili pozitiven test. Zaradi tega dela hipoteze ne moremo potrditi. Poskus bi lahko izboljšali tako, da bi koncentracijo vzorcev izvajali postopoma in tako ugotovili pri kateri koncentraciji so antibiotiki zaznavni. Spremeniti bi morali način segrevanja ampul Delvotesta SP NT, saj je temperatura nihala, kar je lahko posledično tudi vplivalo na rezultate in se zaradi tega nekateri niso obarvali v rumeno. Najprimernejši bi bil digitalni termostat, ki bi avtomatsko reguliral temperaturo.

Za natančno analizo vzorcev in detekcijo antibiotikov bi bila potrebna HPLC metoda, s katero lahko zaznamo tudi zelo nizke koncentracije le – teh. Metoda je draga in zamudna, aparature pa težko dostopne. Zato smo poskušali antibiotike določiti z cenejšo in enostavnejšo metodo, kar nam je tudi uspelo. Zaskrbljujoče pa je dejstvo, da smo antibiotike sploh zaznali, predvsem

na vtoku v čistilno napravo, ki deluje na podlagi mikroorganizmov, ki pridejo na ta način v kontakt z antibiotiki.

8.2 Hipoteza 2

Na podlagi že znanih raziskav Petra Firbasa (2011) na področju *Allium* testa smo pričakovali, da bo rast rastlin v vzorcih iz potokov in rek potekala normalno in ne bo zaostajanja v rasti. Predvidevali pa smo tudi, da bo v vzorcih, ki so bolj onesnaženi (odpadne vode) in imajo večjo genotoksičnost rast rastlin zavirana, prav tako kot je to potrdil Peter Firbas (Firbas 2011). Rezultate, ki smo jih dobili z *Allium* testom so bili naslednji. Pri kontrolnem vzorcu je bila rast koreninic čebule pričakovana, takšna kot mora biti. Tudi pri vzorcih 1, 2, 3, 6 je bila rast koreninic pričakovana in se ni pomembno razlikovala od kontrole. Podatki, ki smo jih pridobili pri naši raziskavi, so podobni izsledkom ostalih raziskovalcev (Firbas, 2011). Potrdili smo, da vzorci reke in potokov ter iztoka čistilne naprave niso imeli visoke stopnje splošne toksičnosti. Pri vzorcih vtoka čistilne naprave, odtoka mariborske bolnice in Zavetišča za živali Maribor pa smo dobili ravno nasprotno rezultate. Koreninice čebulčkov so bile precej krajše od kontrole, kar nam dokazuje, da so bili ti vzorci zelo onesnaženi in so imeli veliko stopnjo splošne toksičnosti, saj se celice v vršičkih korenin čebule niso mogle razmnoževati, zaradi tega ni bila mogoča normalna rast.

Posamezne koreninice čebule vzorcev smo tudi pogledali pod mikroskopom kjer smo prešteli okrog 200 celic v interfazi in različnih fazah mitoze. Preparat smo tudi pregledali, če se v njem pojavljajo moteni procesi v celični delitvi. Če primerjamo mitozni indeks s kontrolno skupino (rast v destilirani vodi), kjer je znašal 14.5 % ugotovimo, da je pri vseh naših vzorcih bil manjši od te vrednosti razen v vzorcu odvzetem iz iztoka čistilne naprave, kjer je znašal 23 %. Menimo, da je do tega prišlo zaradi obogatitve vode s hranilnimi (mineralnimi) snovmi in kisikom v procesu čiščenja onesnaženih voda, kar pomeni, da čistilna naprava opravlja svojo funkcijo.

Pri vzorcu 7 (odvzetem v Zavetišču za živali Maribor) smo opazili, da mitoza ni normalno potekala, saj smo ugotovili le celice v profazi (začetek delitve jedra) in v nobeni drugi fazi mitoze. Sklepamo, da je do tega prišlo zaradi prisotnosti snovi, ki jih izločajo zdravljenе živali, ki so očitno zaustavile celično delitev in vplivale na nastanek delitvenega vretena, ki je potrebno za nadaljevanje razporejanja kromosomov.

Anomalije v fazah mitoze smo našli v vzorcih 1, 2, 4, 5, 6. Število anomalij, ki smo jih našli, ni bilo veliko, kar pa lahko pripišemo tudi naši neizkušenosti, saj so nekatere za nestrokovnjake težko prepoznavne. Zasedili smo zelo pogosto in znano anomalijo anafazni most, kjer se kromatide ne ločujejo uspešno in zato prihaja do mutacij. Ker smo anomalije našli tudi v vzorcih 1, 2, 6 drugega dela hipoteze ne moremo potrditi, da bomo v celicah koreninic čebulčkov v vzorcih z večjo genotoksičnostjo našli več anomalij. Zato lahko tudi hipotezo 2 le delno potrdimo.

Da bi dobili boljše rezultate bi morali preveriti več celic kot le 200, saj bi tako dobili še natančnejši mitozni indeks. Če bi za posamezni vzorec pregledali tudi več koreninic bi lahko našli večje število anomalij. Prav tako bi bilo bolje, če bi nekaj več časa posvetili »treningu« prepoznavanja posameznih anomalij.

8.3 Hipoteza 3

S kemijskimi analizami smo potrdili naša predvidevanja, da bosta vzorca odvzeta iz vtoka čistilne naprave in odpadna voda iz kanalizacijskega sistema pri Mariborski bolnici vsebovali bistveno več skupnega N in P ter imeli bistveno večjo kemijsko potrebo po kisiku, kar kaže na obremenjenost vode z onesnažili. Z dobljenimi rezultati lahko potrdimo, da sta ta dva vzorca zelo močno onesnažena.

8.4 Hipoteza 4

Pri poskusu smo želeli dokazati, da bomo pri bolj onesnaženi vodi našli veliko večje število zraslih kolonij. Hipotezo 4 smo potrdili, saj so v vzorcih kjer smo pričakovali veliko rast kolonij le te v velikem številu tudi zrasle, kar pomeni tudi večje število mikroorganizmov.

Presenetil nas je rezultat rasti kolonij pri vzorcu iz iztoka čistilne naprave, saj je tudi tukaj neštavno število kolonij. Ta voda se namreč izliva v reko Dravo. Morda bi bilo zaradi tega smiselno vodo tudi sterilizirati pred iztokom (UV sterilizacija).

Voda iz vseh naših vzorcev vsekakor ni pitna, saj vsebuje več bakterij, kot to predpisuje pravilnik o pitni vodi. Ne vemo ali so to bakterije, ki lahko povzročijo bolezen ali ne.

Problematične so predvsem bakterije fekalnega izvora, ki lahko povzročajo črevesne okužbe. Da bi to določili bi morali razširiti bakteriološke analize in determinirati vrsto bakterij. Z redčenjem vzorca bi bilo mogoče bakterije v neštevni kolonijah tudi prešteti.

9 ZAKLJUČEK

Z našo raziskovalno nalogo smo ugotovili, da antibiotike vsebujejo tudi nekatere odpadne in površinske vode. Za dokazovanje smo uporabili cenovno ugoden in dostopen test, ki se uporablja za hitro dokazovanje ostankov antibiotikov v mleku. Menimo, da je ta test primeren za širšo uporabo pri kontroli onesnaženosti voda.

Rezultati Allium testa so nam pokazali, da onesnaženost in genotoksičnost močno vpliva na rast korenin navadne čebule. S pregledom celic vršičkov korenin navadne čebule smo ugotovili, da izpostavljenost korenin bolj onesnaženi in genotoksični vodi bistveno ne spremeni števila napak pri delitvi celic, kar se povsem ne sklada z ugotovitvami drugih raziskav. Da bi ugotovili zakaj so se v celičnih delitvah (mitozi) pojavljale napake pri površinskih vodah in se niso pri nekaterih onesnaženih in genotoksičnih vodah bi morali izvesti nadaljnje raziskave vzorcev, kjer bi natančno raziskali kaj vse vode vsebujejo, da povečajo ali zmanjšajo število napak v delitvah celice. Potrdili smo tudi, da bolj onesnaženi vzorci vsebujejo več fosforja in dušika, njihova kemijska potreba po kisiku pa je bistveno večja kot pri drugih vzorcih.

Ker smo hoteli raziskavo prikazati tudi na mikrobiološki ravni smo izvedli poskus z rastjo bakterij. Tudi tukaj se je pokazalo, da so vzorci z bolj onesnaženo vodo razvili večje število kolonij kar pomeni, da vsebujejo bistveno več bakterij kot drugi vzorci. V nadaljevanju raziskave bi bilo potrebno bakterije tudi identificirati, saj bi le tako lahko umestili v parametre in ugotovili ali se smejo pojavljati.

Prvi dve naši hipotezi smo lahko le delno potrdili, 3 in 4 pa smo lahko potrdili, saj smo dobili enake rezultate kot so bila naša predvidevanja.

Z raziskovalno nalogo smo pokazali, da si tudi v Sloveniji, ki spada med dežele bogate z vodami, ne smemo zatiskati oči pred onesnaževanjem voda. Problem moramo spremljati in vedno znova opozarjati na pomen ohranitve čistih voda.

10 DRUŽBENA ODGOVORNOST

Izbrana tema izpolnjuje osnovna načela družbene odgovornosti, saj se ukvarjamo s temo kvalitete voda od katere je odvisno naše zdravje in kvaliteta našega življenja. Želimo opozoriti na dejstvo, da premalo razmišljamo o onesnažilih, ki jih nevede spuščamo v okolje in s tem povzročamo nepredvidljive učinke, tudi na nas same. Vsa voda na Zemlji je povezana v t.i. vodni krog in tako se lahko vse, kar se v vodi znajde, tudi vrne nazaj.

Zaskrbljujoče se nam je zdelo predvsem pojavljanje antibiotikov v površinskih in odpadnih vodah.

Ob uporabi antibiotikov se manjše količine sprostijo v vodno okolje in s tem vplivajo na organizme, ki tam živijo. Njihovo pojavljanje v odpadnih in površinskih vodah je slabo raziskano, prav tako njihov vpliv na netarčne organizme.

Prekomerna uporaba antibiotikov posledično povečuje vedno večjo odpornost bakterij nanje, kar posredno vpliva tudi na človeka in njegovo zdravje. Rezistenca bakterij na antibiotike predstavlja enega večjih problemov pri zdravljenju bakterijskih bolezni. Ravno zaradi tega se moja naloga pridružuje splošnim prizadevanjem k odgovorni uporabi antibiotikov

11 LITERATURA

1. FIRBAS, Peter. 2004. Kako zdrava je voda : Priročnik za biološki monitoring vode. Ljubljana : ARA Založba. ISBN 961-6005-50-2
2. FIRBAS, Peter. 2011. Kemizacija okolja in citogenetske poškodbe. Grosuplje : Ekslibris. ISBN 978-961-6838-05-4.
3. FISKEŠJÖ, Geirid. 1985. The Allium test as a standard in environmental monitoring. Hereditas. [online]. 102 [Citirano: 27. jan. 2015; 20:15], 99-112. Dostopno na Institute of Genetics, University of Lund, Sweden
<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x/pdf>>. ISSN 0018-0661.
4. GODIČ-Torkar, Karmen. 2009. Vrednotenje metod ugotavljanja prisotnosti kemoterapevtikov v pitni in površinskih vodah. Ljubljana : Univerza v Ljubljani, Zdravstvena fakulteta.
5. HABULIN, Maja, in PRIMOŽIČ, Mateja. 2008. Biokemijska tehnika : Navodila za laboratorijske vaje (zbrano gradivo). Maribor: Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.
6. KLADNIK-Jenuš, Bernarda. 2006. Farmakologija : Učbenik za študente Visoke zdravstvene šole. Maribor : Visoka zdravstvena šola. ISBN 961-6254-31-6
7. KUKEC, Andreja. 2009. Higiena: odpadne vode [online]. [Citirano 25. jan. 2015; 12:46]. Dostopno na spletnem naslovu: <<http://m.mf.uni-lj.si/dokumenti/aad03889c258dd61f5efce0e037731d8.pdf>>.
8. MURAUŠ, Darinka, in HUSAR, Senka Ksenija. Varujmo svojo kapljico vode. Maribor: Aquasystems, d. o. o., Centralna čistilna naprava Maribor.
9. Pravilnik o prvih meritvah in obratovalnem monitoringu odpadnih voda ter o pogojih za njegovo izvajanje. 2015. Uradni list RS, št. 94/2014.
10. SIKOŠEK, Darinka, in PETROVIČ, Iris. 2011. navodilo za delo z Rotavaporjem Laborota 4000/4001 efficient. Maribor: Fakulteta za naravoslovje in matematiko Univerza v Mariboru.
11. TURK, Martina. 2012. Mikrobiologija : Gradivo za vaje. Ljubljana : Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani.

12. Vode [online]. [Citirano: 24. jan. 2015; 10:00] Dostopno na Republika Slovenija ministrstvo za okolje in prostor, Agencija Republike Slovenije za okolje <<http://www.arso.gov.si/vode/>> .