



Gimnazija Kranj

Gimnazija Kranj

# **GENOTOKSIČNI UČINKI POTEČIALNO NEVARNIH KOVIN Cu IN Pb NA RAST KORENIN ČEBULE *Allium cepa* L.**

Ekologija z varstvom okolja

Raziskovalna naloga

Avtor:

Nika Kobal

Mentor:

Katarina Rogelj, prof.

Kranj, 2024

## **ZAHVALA**

Mentorici prof. Katarini Rogelj se zahvaljujem za vso pomoč pri zasnovi in izpeljevanju raziskovalnega eksperimenta ter za vse ure, ki so bile vložene v oblikovanje in lektoriranje raziskovalne naloge, da je lahko zavzela svojo končno obliko. Upam, da ste nanjo ponosni toliko kot sem ponosna jaz.

## KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	7
1.1	Raziskovalno vprašanje .....	7
1.2	Hipoteze .....	8
2	TEORETIČNO OZADJE.....	8
2.1	<i>Allium cepa</i> in <i>Allium test</i> .....	8
2.2	Genotoksičnost .....	8
2.3	Potencialno nevarne kovine.....	9
2.3.1	Svinec .....	9
2.3.2	Baker .....	9
3.1	Spremenljivke .....	9
3.2	Metodologija.....	10
3.2.1	Materiali .....	10
3.2.2	Postopek .....	11
3.3	Varnost in nevarnost za okolje.....	12
3.3.1	Spojine potencialno nevarnih kovin.....	12
3.3.2	HCl in glacialna očetna kislina .....	12
3.3.3	Skalpel .....	13
4	SUROVI PODATKI .....	13
4.1	Kvalitativne meritve .....	13
4.2	Kvantitativne meritve.....	14
5	STATISTIČNA ANALIZA IN RAZPRAVA .....	17
5.1	Analiza mikroskopskih slik .....	18
5.2	Pearsonov korelacijski faktor (r) .....	20
6	UGOTOVITVE .....	21
6.1	Evalvacija prednosti poskusa .....	22
6.1.1	Mikroskopija.....	22
6.1.2	Primerjava dveh potencialno nevarnih kovin .....	22
6.1.3	Uporaba <i>Allium</i> testa .....	22
6.2	Evalvacija omejitev poskusa.....	22
6.2.1	Kovinski in sulfatni ioni .....	22
6.2.2	Nedоследna koncentracija v vzorcih istega pogoja.....	22
6.2.3	Vpliv pH .....	22
6.2.4	Neustrezna velikost vzorca .....	23
6.2.5	Napačna razlaga gnitja korenin.....	23

<b>6.3</b>	<b>Koeficient variacije (CV)</b> .....	23
<b>7</b>	<b>ZAKLJUČEK</b> .....	24
<b>8</b>	<b>VIRI IN LITERATURA</b> .....	25
<b>9</b>	<b>PRILOGE</b> .....	27
<b>9.1</b>	<b>Priloga A</b> .....	27
<b>9.2</b>	<b>Priloga B</b> .....	27
<b>9.3</b>	<b>Priloga C</b> .....	28
<b>9.4</b>	<b>Priloga D</b> .....	29
<b>9.5</b>	<b>Priloga E</b> .....	29
<b>9.6</b>	<b>Priloga F</b> .....	29
<b>9.7</b>	<b>Priloga G</b> .....	31
<b>9.8</b>	<b>Priloga H</b> .....	32
<b>9.9</b>	<b>Priloga I</b> .....	33
<b>9.10</b>	<b>Priloga J</b> .....	34

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1:</b> Vse neodvisne, odvisne in kontrolirane spremenljivke, razlog za vključitev spremenljivk v eksperiment ter kako smo jih merili oziroma kontrolirali. ....	10
<b>Preglednica 2:</b> Količine sulfatov $\text{CuSO}_4$ in $\text{PbSO}_4$ , potrebnih za pripravo ustreznih koncentracij raztopin potencialno nevarnih kovin.....	11
<b>Preglednica 3:</b> Povprečne dolžine zdravih korenin za vsak pogoj na vsak dan eksperimenta, skupaj s standardnim odklonom. ....	15
<b>Preglednica 4:</b> Povprečno število zdravih korenin na koncu 7-dnevnega poskusa, skupaj s standardnim odklonom. ....	15
<b>Preglednica 5:</b> Statistična pomembnost razlik v povprečjih dolžin korenin pri različnih koncentracijah potencialno nevarnih kovin na zadnji dan poskusa. ....	17
<b>Preglednica 6:</b> Statistična pomembnost razlik v povprečjih števila korenin pri različnih koncentracijah kovin na zadnji dan poskusa. ....	18
<b>Preglednica 7:</b> Korelacijski koeficient med vrsto potencialno nevarne kovine in dolžino/število korenin. ....	20
<b>Preglednica 9:</b> Koeficienti variacije za vsak pogoj <i>Allium</i> testa. ....	23

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Fotografija kontrolne skupine ob koncu 7-dnevnega eksperimenta.....	13
<b>Slika 2:</b> Fotografija vseh treh Cu pogojev ob koncu eksperimenta.....	13
<b>Slika 3:</b> Fotografija vseh treh Pb pogojev ob koncu eksperimenta. ....	14
<b>Slika 4:</b> Povprečna dolžina zdravih korenin, ki so se razvile ob koncu sedemdnevnega poskusa .....	16
<b>Slika 5:</b> Povprečno število zdravih korenin, ki so se razvile ob koncu 7-dnevnega poskusa za vse pogoje.....	16
<b>Slika 6:</b> Mikroskopska slika celic v kontrolni skupini pod svetlobnim mikroskopom pri 400x povečavi. ....	19
<b>Slika 7:</b> Mikroskopska slika celic v 20 mg Pb pogoju pod svetlobnim mikroskopom pri 400x povečavi. ....	19
<b>Slika 8:</b> Mikroskopska slika celic v 5 mg Cu pogoju pod svetlobnim mikroskopom pri 400x povečavi. ....	20

## POVZETEK

Ta raziskovalna naloga se osredotoča na preučevanje genotoksičnih učinkov dveh potencialno nevarnih kovin, bakra (Cu) in svinca (Pb), na rast korenin čebule *Allium cepa* L. Potencialno nevarne kovine so zaradi industrijskih dejavnosti postale pomemben dejavnik onesnaževanja okolja, ki predstavlja veliko tveganje za zdravje rastlin in ljudi, negativne posledice industrije pa so postale ena od glavnih tem razprav okoljevarstvenikov. Genotoksičnost bakra in svinca na korenine *A. cepa* L. je bila raziskana s čebulnim testom (*Allium* test), uveljavljeno metodo za ocenjevanje genotoksičnosti pri rastlinah. Namen tega raziskovalnega dela je razjasniti možno škodo, ki jo potencialno nevarne kovine lahko povzročijo na rastlinah, razkriti njihov vpliv na okolje in potencialne nevarnosti za ekosisteme. Poleg tega razumevanje genotoksičnih učinkov bakra in svinca na korenine *A. cepa* L. prispeva k razvoju strategij za zmanjšanje negativnih vplivov onesnaženja s potencialno nevarnimi kovinami in k boljšemu varovanju okolja.

**Ključne besede:** genotoksičnost, potencialno nevarne kovine, *Allium* test, *Allium cepa* L.

## ABSTRACT

This research thesis focuses on the investigation of the genotoxic effects of two potentially toxic metals, copper (Cu) and lead (Pb), on the root growth of the onion bulbs *Allium cepa* L. Due to industrial activities, potentially toxic metals have become a major contributor to environmental pollution, posing a significant risk to both plant and human health, and the negative consequences of industry have become one of the main topics of debate among environmentalists. The genotoxicity of copper and lead on the roots of *A. cepa* L. is investigated using the onion test (*Allium* test), a well-established method for the assessment of genotoxicity in plants. This research work serves the purpose of clarifying the potential damage that potentially toxic metals can cause to plants, revealing their impact on the environment and potential threats to ecosystems. In addition, understanding the genotoxic effects of copper and lead on roots of *A. cepa* L. contributes to the development of strategies to reduce the negative impacts of potentially toxic metal pollution and to better protect the environment.

**Key words:** genotoxicity, potentially toxic metals, *Allium* test, *Allium cepa* L.

# 1 UVOD

Ekologija je znanstvena disciplina, ki proučuje interakcije med živimi organizmi in njihovim okoljem. Osredotoča se na razumevanje dinamike ekosistemov, vključno z raziskovanjem odnosov med organizmi in njihovimi življenjskimi prostori, ter vplivov, ki jih imajo različni dejavniki, kot so podnebne spremembe, onesnaževanje in človekove dejavnosti, na naravne ekosisteme. Ekologija preučuje tudi različne ravni organizacije v živih sistemih, vključno z individualnimi organizmi, populacijami, skupnostmi in ekosistemi, ter njihovimi medsebojnimi vplivi. Na podlagi pridobljenega znanja skuša ekologija prispevati k ohranjanju in trajnostnemu upravljanju naravnih virov ter k oblikovanju politik za ohranjanje biotske raznovrstnosti in okolijskega ravnotežja. (The ecological society of America, b.d.)

Od industrijske revolucije dalje je širjenje industrije med okoljevarstveniki sprožilo veliko razprav o njenem vplivu na okolje. V zadnjih nekaj letih se vse pogosteje soočamo z resnimi okolijskimi težavami in povečanim onesnaževanjem zaradi industrijskih izpustov, kar posledično negativno vpliva na naš ekosistem in vse žive organizme v njem. Gre za resen problem, ki pa ga obravnava le malo ljudi. Ene izmed glavnih onesnaževalcev naj bi bile potencialno nevarne kovine, ki so v presežkih močno strupene za ljudi in rastline. Zaradi njihovega prekomernega kopičenja v vodi ali tleh lahko naraščajoča koncentracija teh kovin postane zelo strupena in povzroči škodljive učinke na rastline. Ena najbolj prizadetih lokacij kar se tiče nevarnih kovin v Sloveniji je Mežiška dolina, ki je bila v preteklosti onesnažena zaradi rudarjenja in taljenja svinca. V dolgi zgodovini industrijskih dejavnosti v Mežiški dolini je prst glavno območje, kjer se nabira v večini svinec, poleg tega pa sta kadmij in cink prav tako prisotna. Mežiška dolina je ena izmed najbolj industrializiranih območij v Sloveniji, nevarni industrijski izpusti pa onesnažujejo reko Mežo in se nabirajo v tleh ter tako škodujejo vsem živim organizmom v bližini. (Finžgar idr., 2013) Poleg Mežiške doline pa so zaskrbljujoča območja še Idrija z živim srebrom, Jesenice in Celjska kotlina. (Vlada Republike Slovenije, 2017) Poplave avgusta 2023 so povzročile, da so reke industrijskim izpustom omogočile, da pridejo v še večji stik z naravo in živimi organizmi, zaradi česar so v tistem času izdajali opozorila o nevarnosti in toksičnosti ter pozivali ljudi, da se poplavljenim območjem izogibajo zaradi potencialne nevarnosti.

Pri raziskovanju sem naletela na *Allium* test, ki je test genotoksičnosti različnih snovi z uporabo čebulčkov *Allium cepa* L. Tako sem se odločila, da svojo raziskovalno nalogo izkoristim za raziskavo nevarnih učinkov dveh potencialno nevarnih kovin, svinca in bakra, da preverim, kako genotoksični sta in kakšen vpliv bosta imeli na rast korenin pri *Allium cepa* L.

*Allium* test je standardna metodologija za ugotavljanje genotoksičnosti in je bila uporabljena v mnogih raziskavah za preučevanje genotoksičnosti različnih snovi na *A. cepa* L. *Allium* test je na primer bil uporabljen za preučevanje toksičnosti slovenskih voda, kar je preučeval Firbas (2011) kot posledico industrijskih izpustov v okolje. *Allium* test pa je bil prav tako uporabljen v številnih raziskavah, kjer so preučevali genotoksičnost potencialno nevarnih kovin, na primer Abubacker & Sathya (2017), Alengebawy idr. (2021) in An (2006), ki so preučevali genotoksičnost več potencialno nevarnih kovin, in Fiskesjö (1985; 1988), ki je preučeval različne vplive na rast korenin čebule, med njimi tudi vpliv bakra. Poleg tega je An (2006) primerjal genotoksičnost bakra in svinca ter ugotovil, da je baker bolj genotoksičen in ima večji vpliv na rastline.

## 1.1 Raziskovalno vprašanje

Kako različne koncentracije (5 mg, 10 mg, 20 mg) potencialno nevarnih kovin bakra (Cu) in svinca (Pb) vplivajo na rast korenin *A. cepa* L. v 7 dneh po izpostavljenosti eni izmed kovin z uporabo *Allium* testa, kar kaže na genotoksičnost obeh kovin na celice koreninskih vršičkov?

## 1.2 Hipoteze

- **Ničelna hipoteza ( $H_0$ ):** Prisotnost potencialno nevarnih kovin ne bo pomembno vplivala na rast korenin *A. cepa* L. in ne bo pomembnih razlik v dolžini ali številu korenin med eksperimentalnimi pogoji in kontrolno skupino. Prav tako ne bo vidnih sprememb v celicah, opazovanih pod mikroskopom.
- **Alternativna hipoteza ( $H_1$ ):** Prisotnost obeh kovin Cu in Pb bo zavirala rast korenin.
- **Alternativna hipoteza ( $H_2$ ):** S povečevanjem koncentracije obeh kovin bo rast korenin zaradi njune genotoksičnosti vedno bolj zavirana.
- **Alternativna hipoteza ( $H_3$ ):** Baker bo imel večji vpliv na rast korenin, saj bo njihovo rast zaviral bolj kot svinec.

## 2 TEORETIČNO OZADJE

### 2.1 *Allium cepa* in *Allium test*

*A. cepa* L. spada v kraljestvo Rastlin in je najbolj razširjena ter gojena vrsta rodu *Allium*. (Onion, 2023) Med znanstvenimi vedami je njena uporaba najpomembnejša v biologiji, vse od uporabe v vzorcih in do izvajanja različnih toksikoloških testov. (Čebula, 2023)

*Allium test* je kratkotrajni test, ki nakazuje stopnjo verjetne toksičnosti, opazovane z zaviranjem rasti korenin in spremembami v kromosomih (Fiskesjö, 1995). To je učinkovit test za preučevanje genotoksičnosti okoljskih strupenih snovi (Feretti idr., 2007). S postavljanjem korenin čebulčkov v epruveto lahko opazujemo učinke okolja, v katerem čebulček raste. Veljavne kvantitativne meritve so merjenje dolžine, štetje števila korenin in celo opazovanje dolžine pognanih listov (Fiskesjö, 1985). *Allium test* je dobro poznan in se pogosto uporablja v številnih laboratorijih. Uporablja se za ugotavljanje genotoksičnosti katerega koli vzorca ekosistema. S korelacijo med genotoksičnimi snovmi in genskim materialom lahko nato ugotovimo morebitne snovi, ki škodujejo ekosistemom (Fiskesjö, 1988).

Čebula je primerna za *Allium test*, ker je lahko skladiščena in je relativno poceni. Spremembe, ki se zgodijo na čebuli, so opazne in merljive, zato je čebula idealna za preiskavo, saj ponuja veliko različnih podatkov. (Fiskesjö, 1988) Izkazalo se je, da je sistem koreninskih vršičkov *A. cepa* L. še posebej občutljiv na škodljive učinke kemikalij in okoljskih onesnaževalcev, ki se nahajajo v tleh. Ker je čebulo mogoče gojiti in-vitro, je mogoče test *Allium* enostavno izvesti in ga je enostavno opazovati. (Fiskesjö, 1995)

### 2.2 Genotoksičnost

V genetiki se genotoksičnost nanaša na sposobnost škodljivih snovi, da poškodujejo genetske informacije. Pogosto jo zamenjujemo z mutagenostjo, ki se nanaša na trajne prenosljive spremembe v količini in strukturi genskega materiala celic ali organizmov, ki lahko povečajo pogostost mutacij. Zato genotoksičnost zajema mutagenost, vendar niso vse genotoksične snovi mutagene, saj morda ne povzročajo genetskih sprememb v zaporedjih DNK. (Ren idr., 2017) Glede na to, katere celice so poškodovane, lahko genotoksini povzročijo dedno spremenjeno lastnost (zarodno mutacijo) ali somatsko mutacijo, ki lahko vodi v raka. (Phillips & Arlt, 2009) Genotoksini povzročajo genetske spremembe v zaporedju DNK. Te spremembe ali mutacije nastanejo zaradi neposrednih ali posrednih interakcij genotoksičnih kemikalij z genskim materialom. Noben od znanih testov ne more opredeliti

vseh ustreznih končnih točk genotoksičnosti, zato so najprimernejše oblike testiranja tehnike in-vivo in in-vitro. (Ren idr., 2017)

## 2.3 Potencialno nevarne kovine

Potencialno nevarne kovine so naravno prisotni elementi v vseh ekosistemih. Nekatere so za rastline in živali nujni minerali (npr. železo), druge so razmeroma neškodljive (npr. srebro), nekatere pa veljajo za zelo strupene (npr. svinec). (Heavy metals, 2023) Potencialno nevarne kovine so široko prisotne v ekosistemih, bodisi naravno (npr. kovinski sulfati) bodisi okrepljeno zaradi industrijskih dejavnosti. Določene koncentracije veljajo za strupene in imajo lahko mutagene učinke na organizme. (Firbas, 2011) Kopičenje potencialno nevarnih kovin v rastlinah lahko povzroči različne kromosomske nepravilnosti, ki se pojavijo v celičnem ciklu in delujejo kot okoljski stres za rastline. (Abubacker & Sathya, 2017) Poškodujejo strukturne, encimske in ne-encimske sestavne dele rastlinskih celic ter ovirajo vitalnost, rast in razvoj. V rastlinskih celicah potencialno nevarne kovine povzročajo citotoksične in genotoksične učinke, saj z neposrednim napadom na tiolne skupine v beljakovinah motijo strukturo in delovanje beljakovin. S tem poškodujejo strukturno celovitost beljakovin. (Dutta idr., 2018)

### 2.3.1 Svinec

Čeprav sta svinec in baker v majhnih količinah za rastline nujno potrebna, sta lahko v presežkih zelo škodljiva. Svinec, znan po svoji izjemni strupenosti, moti delovanje encimov, zavira fotosintezo in zmanjšuje rodovitnost tal, kar vodi v odmrlost rastlin, saj je vključen v nepravilno delovanje encimov, prav tako pa lahko poškoduje DNK. (Pourrut idr., 2011; Alengebawy idr., 2021) Toksičnost Pb je za rastline resna že pri nizkih koncentracijah, kar ovira zdravo rast rastlin ter zmanjšuje njeno delovanje. Običajno se ioni Pb prenašajo iz tal v rastlino prek korenin skozi ksilem (Alengebawy idr., 2021) V nizkih koncentracijah se svinec premika po apoplastni poti, v višjih koncentracijah pa je celična membrana, ki deluje kot zapora za prehod snovi, poškodovana in večja količina Pb vstopi v celice. Koncentracija Pb se v nadzemnih delih rastline zmanjšuje z večanjem oddaljenosti od korenin. Do tega pride zaradi večje lokalizacije Pb v celičnih stenah korenin kot v drugih delih rastline. (Sharma in Dubey, 2005)

### 2.3.2 Baker

Baker je potreben za sestavo encimov, ki katalizirajo redoks reakcije, in sodeluje pri fotosintezi. Podobno kot pri svincu, visoke koncentracije bakra negativno vplivajo na fotosintezo, kalitev semen in lahko uničijo celične membrane ter denaturirajo beljakovine, kar vpliva na rast in razvoj rastlin. (Mir idr., 2021; Alengebawy idr., 2021) Toksičnost Cu je vrsta zastrupitve, ki povzroči okvaro v katerem koli sistemu, v katerem so nad-optimalne ravni. Vstop Cu v rastlino je odvisen od več dejavnikov, kot so fizikalno-kemijske lastnosti tal in drugi fiziološki parametri rastline. Seveda je koncentracija Cu v koreninah višja kot v poganjkih, saj je koreninski sistem odgovoren za sprejem ionov Cu iz tal. Koncentracija  $5 \frac{mg}{kg}$  Cu zadostuje, da škoduje rastlini ter zmanjša njeno rast in produktivnost. (Alengebawy idr., 2021)

## 3 EKSPERIMENTALNI DEL

### 3.1 Spremenljivke

Preglednica 1 prikazuje vse spremenljivke, ki so bile med poskusom upoštevane in vključene.

**Preglednica 1:** Vse neodvisne, odvisne in kontrolirane spremenljivke, razlog za vključitev spremenljivk v eksperiment ter kako smo jih merili oziroma kontrolirali.

Spremenljivka	Vrsta	Razlog	Kako jo kontroliramo/merimo
Potencialno nevarne kovine (Pb in Cu)	neodvisna	Primerjava njihove strupenosti za čebulčke	Pripravljene so bile raztopine, ki so vsebovale 5 mg, 10 mg in 20 mg vsake potencialno nevarne kovine.
Dolžina korenin <i>A. cepa</i> L., število zdravih korenin <i>A. cepa</i> L. in spremembe v kromosomih	odvisna	Kazalec stopnje genotoksičnosti dveh potencialno nevarnih kovin	Dolžino sem merila vsak dan z merilnim trakom. Zadnji dan poskusa (7. dan) sem preštela določeno število zdravih korenin. Pripravljena so bila mikroskopska stekelca, da bi preverila morebitne nepravilnosti v celicah in kromosomih.
steklovina - epruvete	kontrolirana	Enaka prostornina za vse poskuse.	Izbrane so bile epruvete iste vrste in prostornine.
okoljski dejavniki (sobna temperatura, izpostavljenost sončni svetlobi)	kontrolirana	Okoljski dejavniki se med pogoji ne razlikujejo.	čebulčki so bili postavljeni na eno mesto v sobi in so tam ostali ves čas poskusa.
Čas eksperimenta	kontrolirana	Narejeno tako, da nekateri čebulčki niso bili dlje/manj izpostavljeni svojim pogojem	Vsi čebulčki so bili vstavljeni v raztopine ob relativno istem času, prav tako pa so bili ob relativno istem času tudi odstranjeni.
fiksativ iz očetne kisline in etanola	kontrolirana	Koncentracija fiksativa se med konicami korenin ni razlikovala (pomembno, če pride do napake v razmerju)	Fiksativ je bil pripravljen enkrat in uporabljen za vse koreninske konice.
Koncentracija klorovodikove kisline (HCl)	kontrolirana	Koncentracija HCl se pri koreninskih vršičkih ni razlikovala	uporabljena je bila HCl iz iste posode
Raztopina toluidin modrega	kontrolirana	Intenzivnost barve pri vseh koreninskih vršičkih je bila enaka.	Raztopino sem pripravila enkrat in jo uporabila za vse vršičke korenin.
Kontrolni poskusi	kontrolirana	služi kot primerjava za oceno pridobljenih podatkov.	Opravljenih je bilo 5 kontrolnih poskusov (5 čebulčkov), ki so bili postavljeni v destilirano vodo.

## 3.2 Metodologija

### 3.2.1 Materiali

- 35 čebulčkov *A. cepa* L.
- 35 20-mililitrskih epruвет
- stojala za epruvete
- 2 plastični kapalki
- 7 plastičnih posod z zamaškom
- 250-mililitrski merilni valj  $\pm 2$  ml
- 184 mg CuSO<sub>4</sub> pentahidrata
- 77 mg PbSO<sub>4</sub>
- 1300 ml destilirane vode
- Marker
- Merilni trak  $\pm 0,1$  mm
- 1 g toluidin modrega

- 4,17 ml 37% HCl
- 2 petrijevki
- Pinceta
- 90 ml 96-odstotnega etanola
- 30 ml glacialne očetne kisline
- Skalpel
- Mikroskop
- Mikroskopska stekelca
- Krovna stekelca
- 7 50-mililitrskih čaš
- 1 50-mililitrska merilna bučka ± 0,05 ml
- 9 300-mililitrske čaše
- Tehtnica ± 0,3 mg

### 3.2.2 Postopek

#### - Allium test

- Najprej je bilo treba pripraviti ustrezne raztopine  $\text{CuSO}_4$  in  $\text{PbSO}_4$ , pri čemer so bile količine Cu in Pb na 100 ml 5 mg, 10 mg in 20 mg. (Abubacker & Sathya, 2017)
- Pripravila sem po 150 ml vsake raztopine, tako da sem v 150 ml destilirane vode zmešala ustrezne količine vsakega sulfata (preglednica 2). Vsako od koncentracij sem zmešala v ločeni 300-mililitrski čaši, s čimer sem dobila ustrezne koncentracije na 100 ml.

**Preglednica 2:** Količine sulfatov  $\text{CuSO}_4$  in  $\text{PbSO}_4$ , potrebnih za pripravo ustreznih koncentracij raztopin potencialno nevarnih kovin.

Koncentracija raztopine	Količina sulfata, potrebna za pridobitev posamezne koncentracije raztopine [mg] ± 0,3 mg		Volumen uporabljene destilirane vode [ml]
	$\text{CuSO}_4$	$\text{PbSO}_4$	
5 mg/100 ml	29,6	10,9	150
10 mg/100 ml	37,2	21,88	150
20 mg/100 ml	117,0	43,94	150

- Ko so bile vse raztopine pripravljene, sem jih prelila v plastične posode in jih zaprla s pokrovčkom.
- V ločeno posodo sem vlila 150 ml destilirane vode za kontrolno skupino.
- Za morebitno dodatno dodajanje raztopin sem pripravila 150 ml raztopin, saj je med poskusom izhlapevala.
- Vzel sem stojala za epruvete in vanje postavil epruvete.
- Za vsak pogoj je bilo potrebnih 5 epruвет (5 za kontrolo, 5 za vsako koncentracijo Cu, 5 za vsako koncentracijo Pb).
- Epruvete sem označila z markerjem, da ne bi pomešala epruвет in pogojev.
- Nato sem vsako epruveto do vrha napolnila z raztopino in vanjo položila čebulo, tako da so bile korenine potopljene v raztopino.
- Sedem dni sem vsak dan merila dolžino korenin in zapisovala rezultate.
- Če sem videla, da se korenine ne dotikajo več raztopine v epruveti, sem s plastično kapalko dodala nekaj raztopine v tem pogoju, tako da so bile korenine vedno v stiku z raztopino.
- Ko sem zbrala podatke, sem jih analizirala z uporabo t-testa, da bi preverila statistično pomembnost rezultatov s programom Excel.
- Zadnji dan eksperimenta sem končen izgled čebulčkov tudi slikala.

- Priprava vzorca

Naslednji postopek za mikroskopiranje je bil povzet in spremenjen po Carolina Knowledge Center (b.d.).

- Ko je minilo 7 dni, sem pripravila vzorec in pod mikroskopom opazovala kromosomske spremembe na konicah korenin.
- Vsi čebulčki so bili hkrati vzeti iz raztopin in v ločenih posodah preneseni v laboratorij v šoli.
- Najprej je bilo treba fiksirati konice korenin.
- Za pripravo fiksativa sem v 300-mililitrski čaši zmešala 90 ml 96-odstotnega etanola s 30 ml glacialne očetne kisline (v razmerju 3:1).
- Nato sem fiksativ prenesla na petrijevko.
- Z ostrim skalpelom sem čebulčkom odrezala do 2 cm konic korenin in jih takoj položila v fiksativ, da bi ustavila vse celične procese, ter jih pustila tam približno eno uro.
- Približno ob istem času sem čebulčkom odrezala vse korenine.
- Nato sem pripravila 1M HCl tako, da sem v 300-mililitrski čaši zmešala 4,17 ml 37-odstotne HCl s 45,83 ml destilirane vode.
- Iz fiksativa sem konice prenesla v raztopino HCl za približno 5 minut.
- Nato sem pripravila barvilo toluidin modro za obarvanje kromosomov.
- V 300 mL čaši sem v 200 mL destilirane vode zmešala 1 g toluidin modrega in barvilo prelila v petrijevko.
- V barvilo sem prenesla konice korenin in ga pustila stati še 2 minuti.
- S pinceto in skalpelom sem previdno odrezala 1-2 mm koreninske konice in jo položila na stekelce.
- S plastično kapalko sem dodala še 1-2 kapljici raztopine toluidin modrega.
- Previdno sem nanj položila krovno stekelce in ga nežno pritisnila, da se celice konic razporedijo v eno plast.
- Celice sem opazovala s svetlobnim mikroskopom pod 400-kratno povečavo.

### **3.3 Varnost in nevarnost za okolje**

#### **3.3.1 Spojine potencialno nevarnih kovin**

Potencialno nevarne kovine so strupene, zato je treba z njimi ravnati previdno. Pri pripravi raztopin je treba vedno nositi zaščitna očala in zaščitne rokavice, da preprečimo morebitne zdravstvene težave. Po opravljenem poskusu jih je treba ustrezno zavreči. Varnostna lista bakra in svinca sta najdena v prilogah G in H.

#### **3.3.2 HCl in glacialna očetna kislina**

Obe sta kislini in lahko v stiku s kožo ali očmi povzročita hudo draženje. Poleg tega je HCl zelo jedek. Zato je treba pri ravnanju z obema kislinama prostor vedno prezračevati, da se hlapi ne vdihavajo, ter ves čas nositi zaščitna očala, zaščitna oblačila in zaščitne rokavice. Varnostna lista obeh kisljin sta najdena v prilogah I in J.

### 3.3.3 Skalpel

Skalpel je oster in lahko povzroči poškodbe kože, če z njim ne ravnamo pravilno. Da bi se izognili poškodbam, je treba korenine vedno rezati stran od sebe in paziti, da so prsti vsaj 2 cm oddaljeni od mesta rezanja korenin. Ko skalpela ne uporabljate več, ga ne smete pustiti za seboj in ga je treba shraniti.

## 4 SUROVI PODATKI

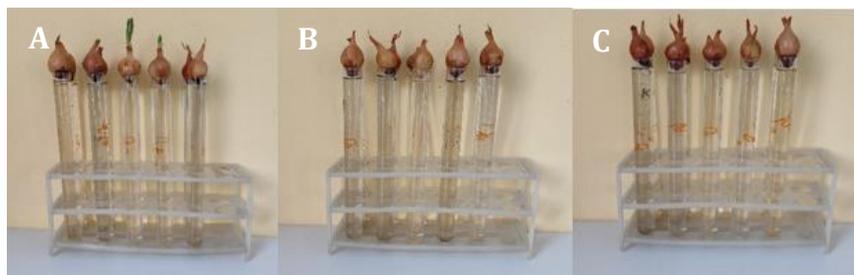
### 4.1 Kvalitativne meritve

Vseh sedem dni poskusa sem opazovala rast čebulčkov in zadnji dan fotografirala vsa stanja.



**Slika 1:** Fotografija kontrolne skupine ob koncu 7-dnevnega eksperimenta.

Pri kontrolni skupini (slika 1) so korenine rasle od samega začetka in vsak dan so bile vidno daljše. Kmalu so začeli izraščati tudi listi. Listi in korenine so bili zelo kmalu vidno daljši v primerjavi s katerim koli drugim stanjem.



**Slika 2:** Fotografija vseh treh Cu pogojev ob koncu eksperimenta.

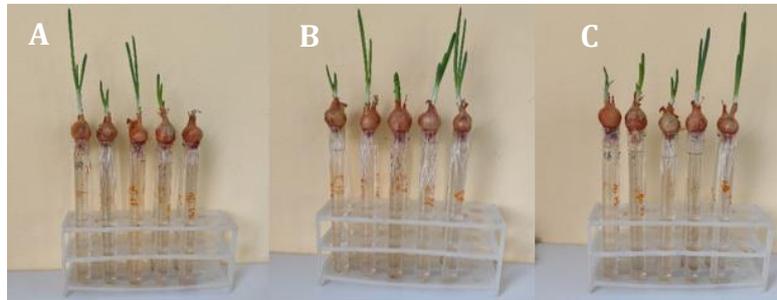
Opomba: A - 5 mg Cu, B - 10 mg Cu, C - 20 mg Cu.

Slika 2 prikazuje čebulčke v Cu pogojih. Čebulčki v stanju s 5 mg Cu so pognali tudi nekaj listov, vendar so ti vidno krajši in jih niso pognali vsi čebulčki. korenine na sliki niso vidne in so komaj vidne v živo, saj so zelo kratke. Večina korenin je do petega dne začela gniti in nobene od njih ni uspelo ohraniti do konca poskusa. Nekaj novih korenin je začelo rasti, vendar so bile tudi te zelo kratke ali pa so začele gniti. Gnitje je bilo opazno s potemnitvijo korenin, pojavljati pa se je začela tudi plesen.

Čebulčki v stanju z 10 mg Cu skoraj niso pognali korenin in, kot je razvidno iz slike, niso pognali nobenih listov. Korenine so bile zelo kratke in jih je bilo težko izmeriti, saj so nenehno gnile. Nekatere

korenine so nadomestile nove, vendar so tudi te kmalu začele gniti. Tudi tu je gnitje bilo vizualno opazno s potemnitvijo korenin, prav tako pa je tudi tu bila opazna plesen.

Tudi čebulčki v stanju 20 mg Cu niso razvili dolgih korenin in ni zrasel noben list. Korenine so začele gniti veliko hitreje kot v drugih pogojih, in sicer že tretji dan. Ko so zgnile, so le nekatere od njih pognale druge korenine, vendar so kmalu začele gniti vse in do konca poskusa noben čebulček ni imel zdravih korenin, vse so zgnile. Plesen se je tu začela pojavljati najhitreje.



**Slika 3:** Fotografija vseh treh Pb pogojev ob koncu eksperimenta.  
Opomba: A - 5 mg Pb, B - 10 mg Pb, C - 20 mg Pb.

Slika 3 prikazuje čebulčke v Pb pogojih. Vsi čebulčki v pogojih s 5 mg Pb so pognali liste in zrasle so bistveno daljše korenine kot pri vseh čebulčkih v pogojih s Cu. Rasle so dosledno, vendar so bile še vedno precej krajše od korenin v kontrolni skupini. Na začetku so rasle počasi, proti koncu poskusa pa so začele rasti hitreje. Listi so začeli kaliti pozneje kot v kontrolni skupini, vendar so na koncu zrasli precej visoko.

Tudi pri čebulčkih v stanju z 10 mg Pb so korenine zrasle precej dolge, vendar so bile bistveno krajše od tistih v stanju s 5 mg Pb. Ne glede na to so tudi tu čebulčki pognali liste, nekateri so bili še vedno precej visoki.

Tudi čebulčki v stanju z 20 mg Pb so pognali liste, vendar so bili ti krajši kot v drugih dveh pogojih s Pb. Korenine so bile bistveno krajše kot v drugih dveh pogojih, vendar nobena korenina ni zgnila, vse pa so dosledno rasle dlje. Rast je bila bolj zavirana, saj so korenine iz dneva v dan rasle manj kot v drugih dveh pogojih.

## 4.2 Kvantitativne meritve

Preglednica 3 prikazuje povprečno dolžino zdravih korenin za vsako stanje na vsak dan poskusa, skupaj s standardnim odklonom. Vključuje tudi število gnilih korenin za vsak dan, kadar so bile prisotne gnile korenine. Povprečne dolžine za vsak dan in njihovi standardni odkloni so bili izračunani s programom Excel, da bi prikazali osrednjo tendenco in razpršenost rezultatov okoli nje.

**Preglednica 3:** Povprečne dolžine zdravih korenin za vsak pogoj na vsak dan eksperimenta, skupaj s standardnim odklonom.

Povprečna dolžina zdravih korenin za vsak pogoj na vsak dan eksperimenta [mm] ± SD														
	dan 1		dan 2		dan 3		dan 4		dan 5		dan 6		dan 7	
Kontrola	11,84 ± 2,54		17,76 ± 3,75		25,54 ± 4,72		37,16 ± 3,30		48,76 ± 4,41		59,34 ± 2,30		68,82 ± 2,27	
5 mg Cu	2,88 ± 1,53		4,12 ± 1,63		4,72 ± 1,53		4,17 ± 2,25	4 G	2,6 ± 1,15	4 G	3,00 ± 0,71	1 G	3,7 ± 0,67	2 G
10 mg Cu	0,9 ± 0,83		1,94 ± 0,66		2,48 ± 0,52	3 G	2,22 ± 0,80		3,07 ± 1,10	3 G	2,75 ± 2,47	4 G	2,4 ± 0,85	5 G
20 mg Cu	1,8 ± 1,79		2,42 ± 1,54	1 G	1,64 ± 0,50	2 G	1,98 ± 0,23		2,1 ± 0,17	3 G	2,35 ± 0,49	4 G	N/A	5 G
5 mg Pb	5,1 ± 1,24		7,46 ± 1,21		9,92 ± 1,77		14,86 ± 4,09		20,6 ± 3,79		28,56 ± 4,96		38,42 ± 1,14	
10 mg Pb	4,94 ± 2,24		6,92 ± 1,88		9,59 ± 1,92		11,58 ± 1,51		16,76 ± 1,72		22,6 ± 2,79		28,78 ± 2,29	
20 mg Pb	3,04 ± 1,84		5,76 ± 1,62		8,44 ± 1,97		11,4 ± 2,10		13,52 ± 2,10		16,08 ± 1,81		18,08 ± 1,54	

Opomba: G = x število gnilih korenin; ni vključeno v izračun povprečja.

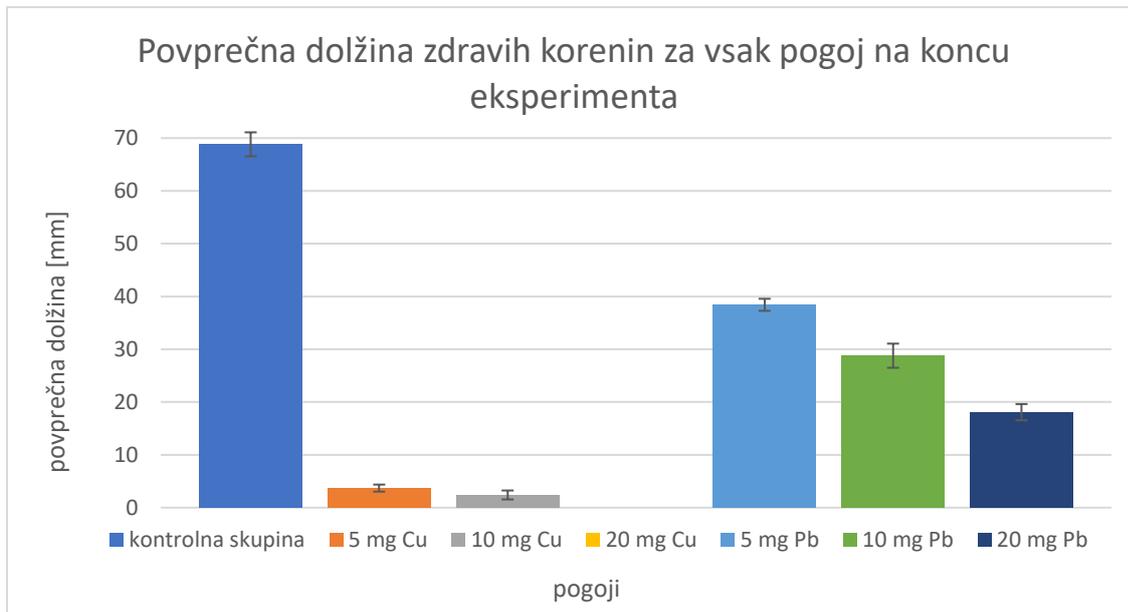
Preglednica 4 prikazuje povprečno število zdravih korenin za vsak pogoj ob koncu sedemdnevnega poskusa skupaj s standardnim odklonom, ki sta bila ponovno izračunana v programu Excel, da bi prikazala osrednjo težnjo in razpršenost rezultatov okoli nje.

**Preglednica 4:** Povprečno število zdravih korenin na koncu 7-dnevnega poskusa, skupaj s standardnim odklonom.

Povprečno število zdravih korenin ob koncu 7-dnevnega poskusa ± SD							
Pogoj	Kontrola	5 mg Cu	10 mg Cu	20 mg Cu	5 mg Pb	10 mg Pb	20 mg Pb
Povprečje	56,0 ± 3,67	3 ± 2	2 ± 1,41	0 ± 0	37,6 ± 3,85	25 ± 5,24	15,2 ± 3,03

### 4.3 Obdelani podatki

Spodnji graf prikazuje povprečne dolžine zdravih korenin, ki so se razvile ob koncu 7-dnevnega poskusa.

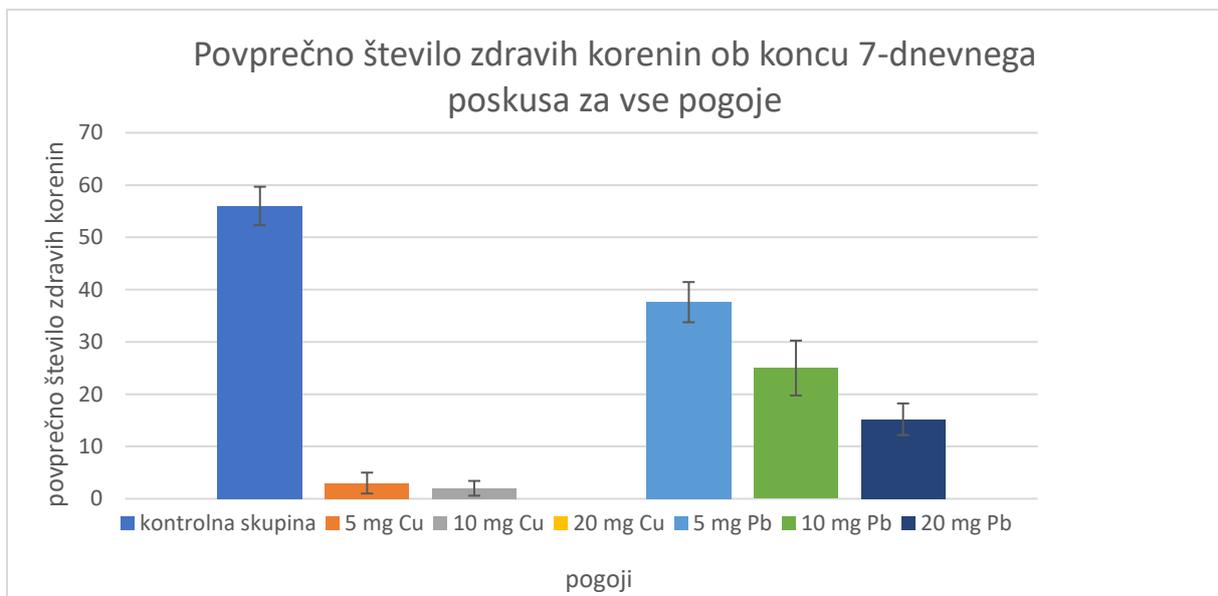


**Slika 4:** Povprečna dolžina zdravih korenin, ki so se razvile ob koncu sedemdnevnega poskusa

Opomba: Napake predstavljajo standardno deviacijo.

Graf kaže, da se ob prisotnosti potencialno nevarne kovine povprečna dolžina korenin manjša. Zmanjšuje se tudi z naraščajočo koncentracijo potencialno nevarnih kovin. Najdaljše korenine je imela kontrolna skupina, sledijo ji vsi pogoji Pb in nazadnje še vsi pogoji Cu. Pri obeh kovinah se z naraščajočo koncentracijo kovin dolžina korenin manjša.

Sledeči graf prikazuje povprečno število zdravih korenin, ki so se razvile na koncu 7-dnevnega poskusa.



**Slika 5:** Povprečno število zdravih korenin, ki so se razvile ob koncu 7-dnevnega poskusa za vse pogoje.

Opomba: Napake predstavljajo standardno deviacijo.

Iz grafa je razvidno, da se s prisotnostjo kovine zmanjša število zdravih korenin, ki jih razvijejo čebulčki, prav tako pa se zmanjšuje tudi z naraščajočo koncentracijo. Po pričakovanjih je imela kontrolna skupina največje število zdravih korenin, sledil je Pb in nazadnje Cu.

V razmerah Pb se je število zdravih korenin zmanjševalo z naraščajočo koncentracijo Pb v okolju. Cu je imel enak učinek, le da je bil močnejši. Zdravih korenin skoraj ni bilo več, v pogoju z 20 mg Cu pa jih sploh ni bilo več.

## 5 STATISTIČNA ANALIZA IN RAZPRAVA

Statistična pomembnost razlik med rezultati je bila ocenjena s t-testom, ki je bil izračunan s programom Excel. Preverila sem pomembnost dobljenih povprečnih dolžin v eksperimentalnih pogojih v primerjavi s kontrolno skupino ter v primerjavi z vsemi eksperimentalnimi pogoji med seboj. Če je vrednost p (vrednost verjetnosti) manjša od 0,05, to pomeni, da so rezultati statistično pomembni pri  $p < 0,05$ . Če je večja, kaže, da obstaja verjetnost, da so rezultati dobljeni po naključju. Rezultate vsakega pogoja za določeno potencialno nevarno kovino sem primerjala z drugimi stanji za to kovino in kontrolno skupino. Poleg tega sem primerjala pogoje obeh potencialno nevarnih kovin med seboj, da bi ugotovila, ali obstaja statistično pomembna razlika med dobljenimi rezultati. Vrednosti statistične pomembnosti so zbrane v preglednici 5.

**Preglednica 5:** Statistična pomembnost razlik v povprečjih dolžin korenin pri različnih koncentracijah potencialno nevarnih kovin na zadnji dan poskusa.

	Kontrola	5mg Cu	10mg Cu	20mg Cu	5mg Pb	10mg Pb
5mg Cu	7,72778E-11	/	/	/	/	/
10mg Cu	4,07841E-10	0,168326723	/	/	/	/
20mg Cu	2,85784E-07	0,019508417	0,080156674	/	/	/
5mg Pb	2,24025E-07	3,06811E-09	1,02899E-10	1,86506E-07	/	/
10mg Pb	3,07595E-09	8,90655E-08	1,64523E-07	9,53205E-06	0,000170833	/
20mg Pb	1,2079E-09	5,90194E-07	1,04809E-07	1,23587E-05	3,00092E-08	5,43279E-05

Opomba: Rdeče obarvana polja = ni statistično pomembno, zeleno obarvana polja = statistično pomembno.

Iz preglednice je razvidno, da so v primerjavi s kontrolno skupino vsi rezultati zelo pomembni in da skoraj ni možnosti, da bi bili rezultati dobljeni po naključju. To pomeni, da baker (Cu) pomembno vpliva in zavira rast korenin že pri nizkih koncentracijah in da je razlika pomembna že pri 5 mg. Podobno tudi svinec (Pb) pomembno zavira rast že pri 5 mg.

Pomembnost rezultatov pri medsebojni primerjavi v pogojih Cu je pomembna pri primerjavi 5 mg in 20 mg ter 10 mg in 20 mg. Pri primerjavi 5 mg in 10 mg pa je vrednost nepomembna. Rezultati v pogojih s 5 mg Cu in 10 mg Cu so lahko naključni, saj so korenine rasle s približno enako hitrostjo, kar je razvidno iz neobdelanih podatkov (priloga B), podobno pa je bilo tudi število zdravih korenin ob koncu poskusa (priloga E). Vendar lahko ob primerjavi vseh pogojev s Cu še vedno sklepamo, da naraščajoče koncentracije Cu bolj zavirajo rast korenin kot nižje koncentracije Cu. Poleg tega lahko sklepamo, da Cu predstavlja toksično okolje za čebulo.

Statistična pomembnost rezultatov v različnih pogojih Pb je ob medsebojni primerjavi v vseh primerih precejšnja. To pomeni, da višje koncentracije Pb res bolj zavirajo rast in da obstaja pomembna razlika v rasti med pogoji. Sklepamo lahko, da pri višjih koncentracijah Pb korenine *A. cepa* L. rastejo manj in da je to v primerjavi s kontrolno skupino toksično okolje za čebulo.

**Preglednica 6:** Statistična pomembnost razlik v povprečnih števila korenin pri različnih koncentracijah kovin na zadnji dan poskusa.

	Kontrola	5mg Cu	10mg Cu	20mg Cu	5mg Pb	10mg Pb
5mg Cu	4,755E-08	/	/	/	/	/
10mg Cu	6,01552E-07	0,407988353	/	/	/	/
20mg Cu	4,4222E-06	0,136945123	0,241981531	/	/	/
5mg Pb	5,62928E-05	1,11495E-06	6,41551E-06	2,59385E-05	/	/
10mg Pb	1,06914E-05	0,000186857	0,000306092	0,000438589	0,003069345	/
20mg Pb	8,68992E-08	7,36409E-05	0,000120836	0,00036116	1,05367E-05	0,009942

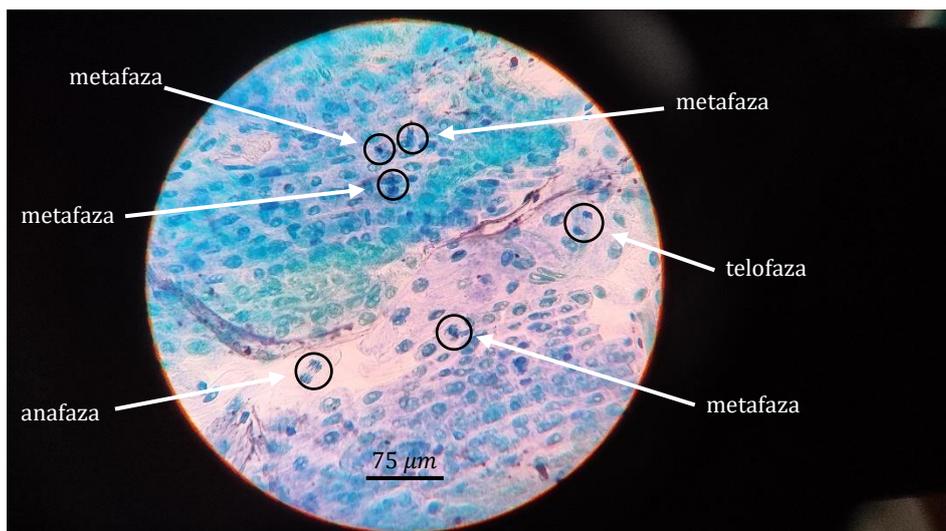
Opomba: Rdeče obarvana polja = ni statistično pomembno, zeleno obarvana polja = statistično pomembno.

V preglednici 6 so prikazane vrednosti t-testa, ki so bile izračunane v programu Excel in prikazujejo pomembnost podatkov. Pri primerjavi kontrolne skupine z vsemi drugimi pogoji se število zdravih korenin pomembno razlikuje in je zato statistično pomembno. To je dodaten pokazatelj, da Cu in Pb negativno vplivata na rast korenin.

Pri primerjavi vseh pogojev Cu med seboj nam t-test pokaže, da razlika v številu zdravih korenin ni pomembna pri  $p < 0,05$ . Pri primerjavi vseh pogojev Pb pa je razlika med vsemi pogoji pomembna. Poleg tega pri primerjavi pogojev Cu s pogoji Pb iz podatkov vidimo, da obstaja pomembna razlika med vsemi primerjanimi pogoji. To dodatno kaže na razliko v toksičnosti obeh potencialno nevarnih kovin, pri čemer je Cu bolj toksičen.

### 5.1 Analiza mikroskopskih slik

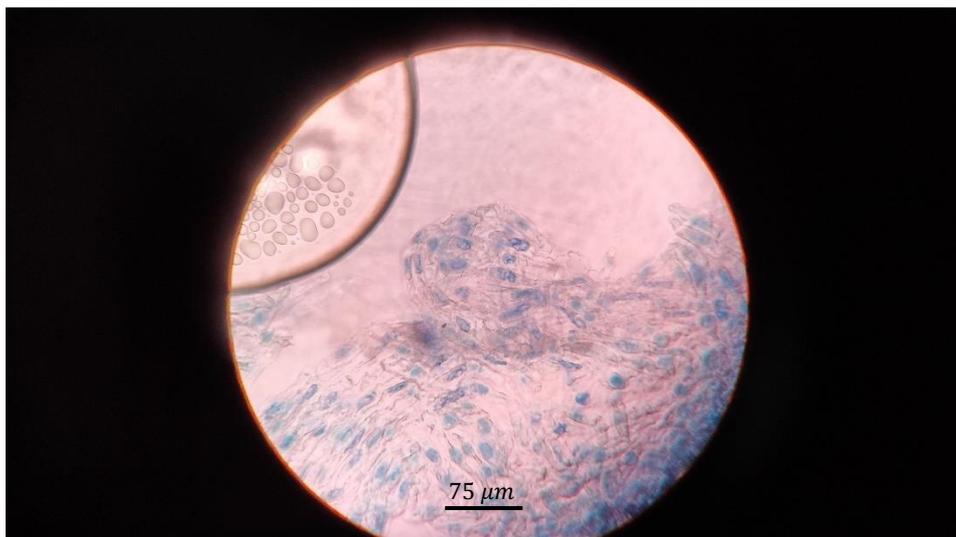
Na naslednjih slikah so pod mikroskopom prikazane celice v kontrolni skupini, v pogoju 20 mg Pb in 5 mg Cu. Slika celic kontrolne skupine je bila izbrana kot osnova za primerjavo z drugima dvema slikama pod mikroskopom. Izbrala sem celice v stanju 20 mg Pb, ker je bil v primerjavi s kontrolno skupino viden vpliv. Podobno sem zato izbrala tudi celice v stanju 5 mg Cu. Poleg tega sem izbrala stanje z največjim vplivom (20 mg) v pogojih Pb in stanje z najmanjšim vplivom (5 mg) v pogojih Cu, tako da je bilo mogoče dodatno določiti stopnjo toksičnosti, saj je imelo stanje z najmanjšim vplivom (5 mg) v pogoju Cu še vedno večji vpliv na celice kot stanje z največjim vplivom (20 mg) v pogoju Pb. Pod mikroskopom sem si želela ogledati mitozo, da bi bile vidne morebitne kromosomske nepravilnosti med celičnim ciklom. Celice v kontrolni skupini so mi pokazale nekaj celic, ki so bile podvržene običajni mitozni in so imele normalno obliko (slika 6) (Abubacker & Sathya, 2017). V nobeni od prikazanih stopenj mitoze ni bilo videti nobenih nepravilnosti. Čeprav na celicah v pogojih z 20 mg Pb in 5 mg Cu ni videti nobenih celic, ki bi bile v procesu mitoze, lahko opazujemo njihov videz (sliki 7 in 8). V primerjavi s celicami v kontrolni skupini se sliki 7 in 8 razlikujeta. Oblika celic je drugačna, same celice so videti nekoliko kašaste, skrčene in podolgovate, skupaj z jedri pa ne ohranjajo svoje normalne strukture. Po podatkih Abubackerja in Sathye (2017) se takšne celice štejejo za nenormalne. Zdi se, da so bile celice v stanju s 5 mg Cu bolj poškodovane v primerjavi s stanjem z 20 mg Pb in kontrolno skupino.



**Slika 6:** Mikroskopska slika celic v kontrolni skupini pod svetlobnim mikroskopom pri 400x povečavi.



**Slika 7:** Mikroskopska slika celic v 20 mg Pb pogoju pod svetlobnim mikroskopom pri 400x povečavi.



**Slika 8:** Mikroskopska slika celic v 5 mg Cu pogoju pod svetlobnim mikroskopom pri 400x povečavi.

## 5.2 Pearsonov korelacijski faktor ( $r$ )

Primerna statistična analiza je prav tako Pearsonov korelacijski faktor. Uporabila sem ga za izračun korelacije med naraščajočo koncentracijo določenih kovin ter dolžino in številom zdravih korenin. Vrednost faktorja je  $-1 \leq r \leq 1$ . Če je faktor negativen, pomeni negativno korelacijo, če je pozitiven, pomeni pozitivno korelacijo med vrednostnima. (Srivastav, b.d.)

Pearsonov korelacijski faktor je bil izračunan z uporabo programa Excel. Za vrednosti  $x$  sem izbrala koncentracije potencialno nevarnih kovin (5 mg, 10 mg, 20 mg), za vrednosti  $y$  pa dolžino korenin oziroma število korenin. Korelacijski faktor je prikazan v preglednici 7.

**Preglednica 7:** Korelacijski koeficient med vrsto potencialno nevarne kovine in dolžino/številom korenin.

Povečevanje koncentracije potencialno nevarne kovine (5 mg, 10 mg, 20 mg)	Korelacijski faktor ( $r$ )	
	Dolžina korenin	Število korenin
Baker	-1 (-0,9998)	-1,000
Svinec	-0,987	-0,966

Iz preglednice je razvidno, da so vrednosti  $r$  negativne in zelo blizu -1, za baker celo -1, kar pomeni, da obstaja močna negativna korelacija med naraščajočimi koncentracijami posameznih kovin ter dolžino in številom zdravih korenin, torej čim večja je koncentracija kovin, tem krajše in manjše so zdrave korenine.

## 6 UGOTOVITVE

Iz rezultatov lahko sklepamo, da sta tako Cu kot Pb strupena za rastline, kar potrjuje hipotezo H<sub>1</sub>, ki pravi, da obe potencialno nevarni kovini zavirata rast korenin. Rezultati kažejo, da sta tako Cu kot Pb toksična že pri koncentraciji 5 mg/100 ml. Oba sta zavirala rast korenin in vplivala tudi na število razvitih zdravih korenin. Statistična analiza je pokazala, da so rezultati v primerjavi s kontrolno skupino zelo pomembni. Cu je poleg tega povzročil tudi precej hitro gnitje korenin. Rezultati torej kažejo, da sta tako Cu kot Pb neugodni okolji za rastline.

Poleg tega je iz rezultatov in stolpčnih grafov razvidno, da naraščajoče koncentracije posameznih potencialno nevarnih kovin povzročajo močnejše zaviranje dolžine in števila korenin. Izračunani korelacijski faktor (preglednica 7) nadalje kaže, da je korelacija med naraščajočo koncentracijo potencialno nevarne kovine ter manjšanjem dolžine in števila korenin močno negativno povezana. Korelacija za baker je za dolžino in število korenin -1, kar velja za popolno korelacijo. Za svinec je korelacija zelo blizu -1, kar prav tako kaže na zelo močno korelacijo. Čeprav si prizadevamo, da bi se čim bolj približali vrednosti (-1), je z velikostjo mojega vzorca nemogoče doseči popolno korelacijo. To nakazuje, da je pri pridobivanju rezultatov lahko prišlo do napake. Ne glede na to, rezultati potrjujejo hipotezo H<sub>2</sub>, ki pravi, da se z naraščajočo koncentracijo obeh potencialno nevarnih kovin dolžina in število korenin zmanjšujeta.

Če primerjamo Cu in Pb, lahko sklepamo, da je Cu veliko bolj strupen kot Pb. Rezultati torej podpirajo hipotezo H<sub>3</sub>, ki pravi, da je baker bolj genotoksičen kot svinec. Vidna je razlika v dolžini končnih korenin in tudi v številu zdravih korenin ob koncu poskusa, pri čemer sta bila število in dolžina zdravih korenin v primerjavi s pogoji Pb v pogojih s Cu najmanjša, kar je pokazalo, da ima Cu v kateri koli koncentraciji veliko večji vpliv na rastline kot Pb in je zato bolj toksičen.

Moje raziskovalno vprašanje raziskuje morebitne genotoksične učinke obeh kovin. Ker je test *Allium* test genotoksičnosti, so dobljeni rezultati in mikroskopske slike celic pokazali, da sta potencialno nevarni kovini Pb in Cu genotoksični, saj sta zavirala rast korenin, mikroskopska analiza pa je pokazala nepravilnosti v celicah. Torej, če odgovorim na raziskovalno vprašanje, naraščajoče koncentracije potencialno nevarnih kovin vplivajo na rast korenin *A. cepa* L. tako, da zavirajo njihovo rast in so genotoksične.

Če primerjamo ugotovitve moje raziskave z ugotovitvami Abubackerja in Sathye (2017), An (2006), ter Alengebawya idr. (2021), se pokažejo zanimive razlike glede relativne toksičnosti bakra in svinca na korenine *A. cepa* L. Medtem ko moja študija kaže, da ima baker večjo genotoksičnost kot svinec, raziskava Abubackerja in Sathye temu nasprotuje in kaže, da je svinec bolj toksičen. Nasprotno pa se Anove ugotovitve ujemajo z mojimi, saj poročajo, da je baker po toksičnosti bolj toksičen od svinca. Poleg tega študija Alengebawya in drugih poudarja dopustne meje teh kovin v rastlinah, saj trdi, da ima baker v primerjavi s svincom višji prag. Te razlike v rezultatih bi lahko izhajale iz razlik v poskusnih postavitvah, uporabljenih koncentracijah kovin, trajanju izpostavljenosti ali celo genetskih razlik med rastlinskimi vzorci. Te razlike poudarjajo kompleksnost toksičnosti potencialno nevarnih kovin v rastlinah in poudarjajo pomen upoštevanja več študij za oblikovanje celovitih zaključkov glede genotoksičnih učinkov bakra in svinca na korenine *A. cepa* L.

## 6.1 Evalvacija prednosti poskusa

### 6.1.1 Mikroskopija

Mikroskopija mi je omogočila analizo celic pod mikroskopom in več podatkov o genotoksičnosti Pb in Cu, kar je pomagalo podpreti moje hipoteze o njuni genotoksičnosti. Slike so omogočile vpogled v strukturo in procese celic ter pokazale pomembne razlike med eksperimentalnimi pogoji in kontrolno skupino, kar mi je pomagalo ugotoviti toksične učinke obeh potencialno nevarnih kovin.

### 6.1.2 Primerjava dveh potencialno nevarnih kovin

Ker sem primerjala dve potencialno nevarni kovini in njune različne koncentracije, sem lahko sprejela pomembne zaključke glede njune genotoksičnosti. Rezultati so mi tako omogočili, da določim, katera od kovin je bolj toksična, poleg tega pa mi je primerjava različnih koncentracij pomagala ugotoviti, kako se toksičnost kovin spreminja z naraščajočo koncentracijo.

### 6.1.3 Uporaba *Allium* testa

*Allium* test je test genotoksičnosti, zaradi česar kakršne koli spremembe v normalnem delovanju čebulčka (zavirana rast korenin, spremembe v celicah...) kaže na genotoksičnost Cu in Pb. To mi je omogočilo, da z opazovanimi spremembami določim njuno genotoksičnost in vpliv na rastline. Prav tako pa *Allium* test omogoča hitro in zanesljivo oceno genotoksičnosti ter hkrati zagotavlja ekonomičnost in preprostost izvedbe.

## 6.2 Evalvacija omejitev poskusa

### 6.2.1 Kovinski in sulfatni ioni

V poskusu sem uporabila kovinske ione skupaj s sulfatnimi in sem tako v resnici preučevala vpliv kovinskih ionov. Vpliv čiste kovine je praktično nemogoče preučevati, saj se tudi v naravi Cu in Pb pojavljata kot spojini in ne v obliki čistih elementov, poleg tega pa sta tudi kot del industrijskih izpustov v spojinah in ne v njihovih čistih oblikah. Koncentracija sulfatnih ionov pa prav tako v presežku negativno vpliva na rast korenin, vendar je to, ker se Cu in Pb pogosto pojavljata kot sulfata tudi v naravi in industrijskih izpustih, bolj kot ne le bolj realistična simulacija okolijskih pogojev, v katerih se rastline po navadi znajdejo.

### 6.2.2 Nedosledna koncentracija v vzorcih istega pogoja

Koncentracija raztopljenega sulfata se lahko lokalizira, kar pomeni, da je bila v enem delu raztopine večja, v drugem pa manjša. To bi vneslo nekonsistentno okolje, ki bi vplivalo na zaviranje rasti korenin in posledično vplivalo tudi na dobljene rezultate. Zato je pomembno, da spojine v epruvetah redno premešamo, da zagotovimo enako koncentracijo spojine v celotni epruveti in omejimo učinek lokalizacije ionov.

### 6.2.3 Vpliv pH

$\text{CuSO}_4$  in  $\text{PbSO}_4$  ne vplivata neposredno na pH raztopine, vendar kljub temu v vodi poteka disociacija  $\text{CuSO}_4$  in  $\text{PbSO}_4$  na ione, pri čemer nastane kovinski hidroksid,  $\text{H}^+$  ioni pa se izločijo in tako znižajo pH. Kljub temu pa je njun vpliv na pH minimalen in ne vpliva bistveno na rezultate.

#### 6.2.4 Neustrezna velikost vzorca

Za vsako stanje je bilo uporabljenih le 5 čebulčkov, kar v biologiji velja za minimum. Tako obstaja možnost velikega odstopanja in vključitve izstopajočih vrednosti v izračun povprečja, kar zagotavlja netočne podatke. Veliko bolje je vključiti čim več ponovitev, po mojem mnenju bi jih bilo potrebnih najmanj 20, da se prepričamo, da so podatki dosledni, in da izključimo morebitna odstopanja, ki bi lahko vplivala na nadaljnje izračune.

#### 6.2.5 Napačna razlaga gnitja korenin

Ko sem izmerila dolžino najdaljše zdrave korenine, sem si lahko napačno razlagala, kako je videti gnitje. Možna je napačna interpretacija gnitja oziroma glede tega, da so korenine zdrave, kar lahko pripelje do merjenja dolžine neustreznih korenin. Da bi to izboljšala, bi lahko določila merila za opredelitev gnijoče korenine (npr. barva, vonj), ki bi bila enotna za vsako korenino.

### 6.3 Koeficient variacije (CV)

Podatki so spremenljivi in za vse potrebne obdelave je bila uporabljena srednja vrednost podatkov. Čeprav so bile izračunane vrednosti pomembnosti, ki podpirajo podatke, je pomembno ugotoviti tudi zanesljivost podatkov. V ta namen sem izračunala koeficient variacije, ki pomaga oceniti, kako velika je razpršenost znotraj ene skupine podatkov.

Za to sem uporabila naslednjo enačbo:

$$CV = \frac{SD}{povprečje} \times 100 [v\%]. \text{ (How to find a coefficient of variation, n. d.)}$$

V preglednici 9 je prikazana razpršenost podatkov okoli srednjih vrednosti končnih dolžin korenin za vsak eksperimentalni pogoj.

**Preglednica 8:** Koeficienti variacije končnih dolžin korenin za vsak pogoj *Allium* testa.

Vrsta pogoja	Koeficient variacije [%]
Kontrolna skupina	3,30
5 mg Cu	18,12
10 mg Cu	35,42
20 mg Cu	N/A
5 mg Pb	2,97
10 mg Pb	7,96
20 mg Pb	8,52

Opazimo lahko, da so največji koeficienti variacije prisotni pri pogojih Cu. To bi pomenilo, da zanesljivost podatkov, pridobljenih v pogojih Cu, ni tako zanesljiva, saj so preveč razpršeni in niso dosledni. Zato ti podatki niso zelo zanesljivi in za izboljšanje zanesljivosti bi bilo treba sprejeti izboljšave, kot sta upoštevanje večjega vzorca ali ponovitev poskusa.

Drugi podatki pa veljajo za precej zanesljive. Obstajajo nekatera odstopanja, ki ne govorijo v prid zanesljivosti podatkov, vendar so ob upoštevanju majhnega vzorca po mojem mnenju sprejemljiva in še vedno govorijo o zanesljivosti.

## 7 ZAKLJUČEK

Rezultati torej kažejo na to, da sta potencialno nevarni kovini Cu in Pb genotoksični rastlinam, pri čemer je Cu bolj toksičen od Pb. Potrjujejo vse tri postavljene hipoteze in zavračajo ničelno hipotezo. Glede na analizo podatkov lahko strnemo, da so podatki statistično pomembni, kar potrjuje, da rezultati niso naključni, ampak odražajo dejanske učinke obravnavanih kovin na rastline. To povečuje zaupanje v veljavnost in zanesljivost rezultatov ter omogoča sklepanje o splošnih trendih in vzorcih v raziskavi.

V svojem raziskovalnem delu sem preučevala genotoksične učinke bakra in svinca na *A. cepa* L. Ker imajo različne rastline tudi različne prage, pri katerih postaneta baker in svinec toksična, je rezultate mojih ugotovitev težje prenesti na ostale rastline. Smiselno bi bilo torej preučiti genotoksičnost teh kovin tudi v drugih rastlinah, kot so *Vicia faba*, *Zea mays* in *Tradescantia*. Poleg tega pa sta redko samo baker in svinec del industrijskih izpustov, najpogosteje se pojavljata v kombinaciji z drugimi kovinami, zato bi prav tako bilo smiselno preučiti skupen vpliv več potencialno nevarnih kovin, ki ga imajo na ekosistem. Poleg industrijskih izpustov pa imajo vpliv na delovanje rastline tudi ostali dejavniki, kot so pH zemlje, vsebnost hranil, temperatura in vlaga, zato bi v nadaljnjem raziskovalnem delu lahko analizirala različne vzorce zemlje in preučevala njihov vpliv, saj bi to predstavljalo dejansko okolje, v katerem se rastline nahajajo.

## 8 VIRI IN LITERATURA

- Abubacker, M. N., & Sathya, C. (2017, September 25). *Genotoxic effect of heavy metals Cr, Cu, pb and Zn using allium Cepa L.* Biosciences Biotechnology Research Asia. Dostopno na: <https://www.biotech-asia.org/vol14no3/genotoxic-effect-of-heavy-metals-cr-cu-pb-and-zn-using-allium-cepa-l/>.
- Alengebawy, A., Abdelkhalek, S. T., Qureshi, S. R., & Wang, M. Q. (2021). *Heavy Metals and Pesticides Toxicity in Agricultural Soil and Plants: Ecological Risks and Human Health Implications.* *Toxics*, 9(3), 42. Dostopno na: <https://doi.org/10.3390/toxics9030042>.
- An Y. J. (2006). Assessment of comparative toxicities of lead and copper using plant assay. *Chemosphere*, 62(8), 1359–1365. Dostopno na: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.07.044>.
- Carolina Knowledge Center. (2022, Februar 28). *Squash an onion and learn the true age of your cells.* Dostopno na: <https://knowledge.carolina.com/discipline/life-science/biology/onion-mitosis/>.
- Čebula. (2023, Junij 6). V *Wikipedija*. Dostopno na: <https://sl.wikipedia.org/wiki/%C4%8Cebula>.
- Feretti, D., Zerbini, I., Zani, C., Ceretti, E., Moretti, M., & Monarca, S. (2007, Maj 8). *Allium cepa chromosome aberration and micronucleus tests applied to study genotoxicity of extracts from pesticide-treated vegetables and grapes.* *Food additives and contaminants*, 24(6), 561–572. Dostopno na: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/02652030601113602>.
- Finžgar N., Erika J., Voglar D., Leštan D. (2013). *Spatial distribution of metal contamination before and after remediation in the Meza Valley, Slovenia.* *Geoderma*. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2013.11.011>.
- Firbas, P. (2011). *Use of Allium test for purpose of establishing quality of waters.* Dostopno na: [https://www.flaska.eu/s/u/pot\\_doc/Flaska-Allium-test.pdf](https://www.flaska.eu/s/u/pot_doc/Flaska-Allium-test.pdf).
- Fiskesjö, G. (1985). *The allium test as a standard in environmental monitoring.* Wiley Online Library. Dostopno na: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdfdirect/10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x>.
- Fiskesjö, G. (1988). *The Allium test--an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions.* Vzeto iz National Library of Medicine. Dostopno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3340086/>.
- Fiskesjö, G. (1995). *Allium Test.* In: O'Hare, S., Atterwill, C.K. (eds) *In Vitro Toxicity Testing Protocols. Methods in Molecular Biology™*, vol 43. Humana Press. Dostopno na: <https://doi.org/10.1385/0-89603-282-5:119>.
- Heavy Metals. (2023, Junij 20). V *Wikipedija*. Dostopno na: [https://en.wikipedia.org/wiki/Heavy\\_metals](https://en.wikipedia.org/wiki/Heavy_metals).
- How to find a coefficient of variation.* (b.d.). Statistics How To. Dostopno na: <https://www.statisticshowto.com/probability-and-statistics/how-to-find-a-coefficient-of-variation/>.

- Onion. (2023, Junij 17). V *Wikipedija*. <https://en.wikipedia.org/wiki/Onion>.
- Phillips, D. H., & Arlt, V. M. (2009). *Genotoxicity: damage to DNA and its consequences*. *EXS*, 99, 87–110. Dostopno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19157059/>.
- Pourrut, B., Shahid, M., Dumat, C., Winterton, P., & Pinelli, E. (2011). Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 213, 113–136. Dostopno na: [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9860-6\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9860-6_4).
- Ren, N., Atyah, M., Chen, W.-Y., & Zhou, C.-H. (2017, Maj 22). *The various aspects of genetic and epigenetic toxicology: Testing methods and clinical applications*. *Journal of translational medicine* 15, 110. BioMed Central. Dostopno na: <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1218-4>.
- Sharma, P., Dubey, R. S. (2005). Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. <https://repositorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=129897&lang=slv>.
- Srivastav, A. K. (b.d.). *Pearson Correlation Coefficient*. WallStreetMojo. Dostopno na: <https://www.wallstreetmojo.com/pearson-correlation-coefficient/>.
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2012). *Heavy metal toxicity and the environment*. *Experientia supplementum* (2012), 101, 133–164. Dostopno na: [https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6).
- The ecological society of America. (b.d.). *What is ecology?*. Dostopno na: <https://www.esa.org/about/what-does-ecology-have-to-do-with-me/>.
- Vlada Republike Slovenije. (2017). *Poročilo o okolju v Republiki Sloveniji 2017*. Dostopno na: [http://mop.arhiv-spletisc.gov.si/fileadmin/mop.gov.si/pageuploads/pomembni\\_dokumenti/porocilo\\_o\\_okolju\\_2017.pdf](http://mop.arhiv-spletisc.gov.si/fileadmin/mop.gov.si/pageuploads/pomembni_dokumenti/porocilo_o_okolju_2017.pdf)

## 9 PRILOGE

### 9.1 Priloga A

#### MERITVE DOLŽIN KORENIN ZA VSEH 5 PONOVIJEV ZA KONTROLNO SKUPINO

KONTROLNA	Dolžina korenin [mm] ± 0,1 mm						
	Poskus	Dan 1	Dan 2	Dan 3	Dan 4	Dan 5	Dan 6
1	9	14,3	25	33	43,5	56,9	67,6
2	13	15,8	22,2	37,6	46,7	57	68,4
3	10,6	15,3	20	35,9	48,2	60,9	66
4	15,6	23	31,4	42,1	55,4	62	70,3
5	11	20,4	29,1	37,2	50	59,9	71,8

### 9.2 Priloga B

#### MERITVE DOLŽIN KORENIN ZA VSEH 5 PONOVIJEV ZA VSE Cu POGOJE

Cu	Dolžina korenin [mm] ± 0,1 mm							
	Poskus	Dan 1	Dan 2	Dan 3	Dan 4	Dan 5	Dan 6	Dan 7
5mg	1	2,1	4,3	5	Gnilo, nova: 4	Gnilo, nova: 1,3	2	2,7
	2	1	2	2,8	gnilo	gnilo	gnilo	gnilo
	3	2,6	3	3,5	Gnilo, Nova: 2	3	3,2	4
	4	5	5,9	6,3	6,5	gnilo	Nova: 3,5	4,1
	5	3,7	5,4	6	gnilo	gnilo	3	4, začetek gnitja
10mg	1	1	2	2,2	2,7	gnilo	1	1,8, začetek gnitja
	2	0	1,4	3	3,4	4,2	4,5, Začetek gnitja	Nova: 3, začetek gnitja
	3	2,2	3,1	Gnilo, Nova: 2	2	3, začetek gnitja	gnilo	gnilo
	4	1,3	2	2, začetek gnitja	Nova: 1	2	gnilo	gnilo

	5	0	1,2	3,2, začetek gnitja	Nova: 2	gnilo	gnilo	gnilo
20mg	1	3	3,4	Gnilo, Nova: 1	2	2	2, začetek gnitja	gnilo
	2	0	0,6	1,2	1,6	2, začetek gnitja	gnilo	gnilo
	3	4	4,1	Gnilo, Nova: 2	2	gnilo	gnilo	gnilo
	4	0	1	2	2,2	gnilo	gnilo	gnilo
	5	2	3, začetek gnitja	Nova: 2	2,1	2,3	2,7	gnilo

### 9.3 Priloga C

#### MERITVE DOLŽIN KORENIN ZA VSEH 5 PONOVIJEV ZA VSE Pb POGOJE

		Dolžina korenin [mm] ± 0,1 mm						
Pb	Poskus	Dan 1	Dan 2	Dan 3	Dan 4	Dan 5	Dan 6	Dan 7
5mg	1	3	6,2	8	11	15,5	24,6	37,2
	2	5,1	9,3	11	12,5	20	27	37,8
	3	6	6,9	8	12,8	19	24,2	38
	4	5,4	8	11,6	21	25,2	36	40,1
	5	6	6,9	11	17	23,3	31	39
10mg	1	1,2	4	7,6	10	16	22,3	29,6
	2	6	8	12	12,6	18	26,6	30
	3	7,1	9	11,1	13,3	15	20,1	25,2
	4	5,4	7	9,2	10	15,7	20	28
	5	5	6,6	8	12	19,1	24	31,1
20mg	1	6,2	8	9	14,2	16	17,7	20
	2	3	6,8	11	13	15,1	18	19,1
	3	2,3	4	5,7	9,3	11	13,7	16,1
	4	1,6	4,7	7,5	10	13,6	16	18
	5	2,1	5,3	9	10,5	11,9	15	17,2

#### 9.4 Priloga D

ŠTEVILO ZDRAVIH KORENIN ZA VSEH 5 PONOVI TEV ZA KONTROLNO SKUPINO OB KONCU POSKUSA

Poskus - kontrola	Število zdravih korenin
1	61
2	58
3	56
4	53
5	52
povprečje	56,0 ± 3,3

#### 9.5 Priloga E

ŠTEVILO ZDRAVIH KORENIN ZA VSEH 5 PONOVI TEV ZA VSE Cu POGOJE OB KONCU POSKUSA

Pogoji Cu	Poskus	Število zdravih korenin
5mg	1	1
	2	0
	3	5
	4	3
	5	0
	povprečje	
10mg	1	1
	2	3
	3	0
	4	0
	5	0
	povprečje	
20mg	1	0
	2	0
	3	0
	4	0
	5	0
	povprečje	

#### 9.6 Priloga F

ŠTEVILO ZDRAVIH KORENIN ZA VSEH 5 PONOVI TEV ZA VSE Pb POGOJE OB KONCU POSKUSA

Pogoji Pb	Poskus	Število zdravih korenin
5mg	1	36
	2	32
	3	40
	4	42
	5	38
	povprečje	36,2 ± 3,4
10mg	1	18
	2	31
	3	22
	4	29
	5	25
	povprečje	25,2 ± 4,7
20mg	1	15
	2	14
	3	17
	4	19
	5	11
	povprečje	15,2 ± 2,7

## 9.7 Priloga G

### VARNOSTNI LIST CuSO<sub>4</sub>

Celoten varnostni list je objavljen na sledeči spletni strani:

Carl Roth. (2016, Avgust 31). Carl Roth. <https://www.carlroth.com/medias/SDB-9948-GB-EN.pdf?context=bWFzZGVyYHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0c3wyODkwNjJ8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0cy9oNmMvaDc1LzkwNjI0MTU3Mjg2NzAucGRmfDhkMDEzNzY3NmFmZjYmYzNzJiODY0ODY4MWI2MDJkNWJkYzdkNTBhZDUyNjcxNjNhNzgzZTY0MzJhODRhOTI>

#### Safety data sheet

according to Regulation (EC) No. 1907/2006 (REACH)



**Copper(II) sulphate solution 0,1 mol/l - 0,1 N volumetric standard solution**

article number: 9948

#### The most important adverse physicochemical, human health and environmental effects

Spillage and fire water can cause pollution of watercourses.

#### 2.2 Label elements

Labelling according to Regulation (EC) No 1272/2008 (CLP)

##### Signal word

Warning

##### Pictograms

GHS07, GHS09



##### Hazard statements

H319 Causes serious eye irritation  
H411 Toxic to aquatic life with long lasting effects

##### Precautionary statements

###### Precautionary statements - prevention

P273 Avoid release to the environment  
P280 Wear protective gloves/eye protection

###### Precautionary statements - response

P305+P351+P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing

##### Labelling of packages where the contents do not exceed 125 ml

Signal word: Warning

Symbol(s)



#### 2.3 Other hazards

##### Results of PBT and vPvB assessment

This mixture does not contain any substances that are assessed to be a PBT or a vPvB.

### SECTION 3: Composition/information on ingredients

#### 3.1 Substances

not relevant (mixture)

#### 3.2 Mixtures

## 9.8 Priloga H

### VARNOSTNI LIST PbSO<sub>4</sub>

Celoten varnostni list je objavljen na sledeči spletni strani:

Carl Roth. (2017, Januar 24). Carl Roth. <https://www.carlroth.com/medias/SDB-2560-GB-EN.pdf?context=bWFVfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0c3wyODQzNDR8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfGg4MS9oNGMvOTE0Mzk4Mzg2NTg4Ni9TREjFmju2MF9HQI9FTi5wZGZ8MjAyY2U2NTBlNDU3YzRhNmY1NmI0YjEyZTgyZGQ5MzJlYjM5N2UwMzg4OGMyNjYxMjAyNGQxYmE3NzJlZWl2Mg>

#### Safety data sheet Safety data sheet

acc. to Regulation (EC) No. 1907/2006 (REACH)



Lead(II) sulphate ≥98 %, extra pure

article number: 2560

#### Classification acc. to GHS

Section	Hazard class	Cat-egory	Hazard class and category	Hazard statement
3.10	Acute toxicity (oral)	4	Acute Tox. 4	H302
3.11	Acute toxicity (inhal.)	4	Acute Tox. 4	H332
3.7	Reproductive toxicity	1A	Repr. 1A	H360Df
3.9	Specific target organ toxicity - repeated exposure	2	STOT RE 2	H373
4.1A	Hazardous to the aquatic environment - acute hazard	1	Aquatic Acute 1	H400
4.1C	Hazardous to the aquatic environment - chronic hazard	1	Aquatic Chronic 1	H410

For full text of abbreviations: see SECTION 16

#### The most important adverse physicochemical, human health and environmental effects

Delayed or immediate effects can be expected after short or long-term exposure. Spillage and fire water can cause pollution of watercourses.

#### 2.2 Label elements

##### Labelling

##### Signal word

Danger

##### Pictograms

GHS07, GHS08,  
GHS09



##### Hazard statements

H302+H332 Harmful if swallowed or if inhaled  
H360Df May damage the unborn child. Suspected of damaging fertility  
H373 May cause damage to organs through prolonged or repeated exposure  
H410 Very toxic to aquatic life with long lasting effects

##### Precautionary statements

##### Precautionary statements - prevention

P273 Avoid release to the environment  
P280 Wear protective gloves/eye protection

##### Precautionary statements - response

P304+P340 IF INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing  
P308+P313 IF exposed or concerned: Get medical advice/attention  
P330 Rinse mouth

For professional users only

## 9.9 Priloga I

### VARNOSTNI LIST KLOOROVODIKOVE KISLINE

Celoten varnostni list je objavljen na sledeči spletni strani:

Carl Roth. (2017, April 7). Carl Roth. <https://www.carlroth.com/medias/SDB-9277-IE-EN.pdf?context=bWFzdGVyfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0c3wzMTMxNzN8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0cy9oN2UvaDZjLzkwODg3ODUyMTk2MTQucGRmfDU1MjE3MzI0NzYjQ5N2EyMGMyZGMzZjNiZThmYTRmNzRkYWYWM3OGM2ZGUxOGMxZjIhNGJhY2Q2OTEwMTI1ODg>

#### Safety data sheet

according to Regulation (EC) No. 1907/2006 (REACH)



Hydrochloric acid 37 %, fuming, extra pure

article number: 9277

#### SECTION 2: Hazards identification

##### 2.1 Classification of the substance or mixture

Classification according to Regulation (EC) No 1272/2008 (CLP)

Section	Hazard class	Category	Hazard class and category	Hazard statement
2.16	Substance or mixture corrosive to metals	1	Met. Corr. 1	H290
3.2	Skin corrosion/irritation	1B	Skin Corr. 1B	H314
3.3	Serious eye damage/eye irritation	1	Eye Dam. 1	H318
3.8R	Specific target organ toxicity - single exposure (respiratory tract irritation)	3	STOT SE 3	H335

For full text of abbreviations: see SECTION 16

##### The most important adverse physicochemical, human health and environmental effects

Skin corrosion produces an irreversible damage to the skin; namely, visible necrosis through the epidermis and into the dermis.

##### 2.2 Label elements

Labelling according to Regulation (EC) No 1272/2008 (CLP)

##### Signal word

Danger

##### Pictograms

GHS05, GHS07



##### Hazard statements

H290 May be corrosive to metals  
H314 Causes severe skin burns and eye damage  
H335 May cause respiratory irritation

##### Precautionary statements

##### Precautionary statements - prevention

P280 Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection

##### Precautionary statements - response

P303+P361+P353 IF ON SKIN (or hair): Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water [or shower]  
P304+P340 IF INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing  
P305+P351+P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing  
P310 Immediately call a POISON CENTER/doctor

**Hazardous ingredients for labelling:** Hydrochloric acid .... %

Labelling of packages where the contents do not exceed 125 ml

Signal word: Danger

## 9.10 Priloga J

### VARNOSTNI LIST GLACIALNE OCETNE KISLINE

Celoten varnostni list je objavljen na sledeči spletni strani:

ThermoFisher Scientific. (2009, Maj 9). ThermoFisher Scientific.

<https://thermofishervn.com/images/products/MSDS/A113.pdf>

SAFETY DATA SHEET	
Acetic acid glacial (aldehyde free)	Revision Date 31-Dec-2020
Flammable liquids	Category 3 (H226)
<b>Health hazards</b>	
Skin Corrosion/Irritation	Category 1 A (H314)
Serious Eye Damage/Eye Irritation	Category 1 (H318)
<b>Environmental hazards</b>	
Based on available data, the classification criteria are not met	

Full text of Hazard Statements: see section 16

#### 2.2. Label Elements



Signal Word

Danger

#### Hazard Statements

H226 - Flammable liquid and vapor  
H314 - Causes severe skin burns and eye damage

#### Precautionary Statements

P280 - Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection  
P301 + P330 + P331 - IF SWALLOWED: Rinse mouth. Do NOT induce vomiting  
P305 + P351 + P338 - IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing  
P310 - Immediately call a POISON CENTER or doctor/physician  
P303 + P361 + P353 - IF ON SKIN (or hair): Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water or shower  
P210 - Keep away from heat, hot surfaces, sparks, open flames and other ignition sources. No smoking

#### 2.3. Other hazards

Substance is not considered persistent, bioaccumulative and toxic (PBT) / very persistent and very bioaccumulative (vPvB)

### SECTION 3: COMPOSITION/INFORMATION ON INGREDIENTS

#### 3.1. Substances

Component	CAS-No	EC-No.	Weight %	CLP Classification - Regulation (EC) No 1272/2008
Acetic acid	64-19-7	200-580-7	>95	Flam. Liq. 3 (H226) Skin Corr. 1A (H314) Eye Dam. 1 (H318)

Component	Specific concentration limits	M-Factor	Component notes
-----------	-------------------------------	----------	-----------------

FSUA0430

Page 2 / 11