

58. srečanje mladih raziskovalcev Slovenije 2024

HITROST RAZGRADNJE CINKOVEGA PIRITIONA POD VPLIVOM UVB IN TOKSIČNOST FOTOLITSKIH PRODUKTOV

Raziskovalna naloga

Raziskovalno področje: kemija in kemijska tehnologija

Avtorica: Živa Kovačič

Mentorica: Sanja Cvar



II. GIMNAZIJA MARIBOR

Maribor, april 2024

Kazalo vsebine

Povzetek	V
Ključne besede	V
Zahvala	VI
1 UVOD	1
1.1 Raziskovalna vprašanja	1
1.2 Hipoteze	2
2 TEORETIČNI DEL.....	3
2.1 Cinkov pirition	3
2.2 Cinkov sulfat	5
2.3 UV svetloba in fotoliza	6
2.4 Absorbanca in spektrofotometrija	7
2.5 Allium test	9
2.6 Mitotski indeks	9
2.7 Pregled objav.....	10
3 MATERIAL	12
3.1 Zaščitna oprema	12
3.2 Osnovni material	12
3.3 Kemikalije	12
3.4 Laboratorijski pribor	12
3.5 Laboratorijske aparature.....	13
4 EKSPERIMENTALNI DEL	14
4.1 EKSPERIMENT 1: MERJENJE HITROSTI RAZGRADNJE ZNPT POD VPLIVOM SVETLOBE	14
4.1.1 Potek eksperimenta	14
4.1.2 Rezultati z razpravo.....	16

4.1.3	Izboljšave in nadaljne raziskave.....	20
4.2	EKSPERIMENT 2: ALLIUM TEST	21
4.2.1	Potek eksperimenta	21
4.2.2	Rezultati z razpravo.....	26
4.2.3	Izboljšave in nadaljne raziskave.....	31
5	ZAKLJUČKI.....	32
6	DRUŽBENA ODGOVORNOST.....	34
7	VIRI IN LITERATURA	35
	Priloge	1

KAZALO SLIK

Slika 1: Skeletna struktura in 3D molekularna struktura ZnPT.	3
Slika 2: Struktura cinkovega sulfata.....	6
Slika 3: Planckova enačba in svetlobna enačba.	7
Slika 4: Vernier UV-VIS spektrofotometer (Vernier, 2019).....	8
Slika 5: Celice koreninskega vršička čebule <i>Allium cepa</i> L. iz raztopine $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (lastni vir).	10
Slika 6: Zaščiten digestorij (lastni vir).....	15
Slika 7: Obsevanje raztopin z UV lučjo (lastni vir).	15
Slika 8: Nastavitev čebulic, začetek poskusa (lastni vir).....	22
Slika 9: Čebulice v obsevanih raztopinah, 2. dan (lastni vir).....	22
Slika 10: Čebulice v obsevanih raztopinah, 3. dan (lastni vir).	22
Slika 11: Pripomočki za merjenje korenin (lastni vir).	22
Slika 12: Pripomočki za pripravo preparatov, mikroskopiranje in štetje celic (lastni vir).....	23
Slika 13: Korenine v fiksativu (lastni vir).	23
Slika 14: Segrevanje orceina med barvanjem korenin (lastni vir).	24
Slika 15: Korenine v orceinu (lastni vir).	24
Slika 16: Fotografija neobsevane 2 mg/L raztopine ZnPT (lastni vir).	25
Slika 17: Štetje celic na iPad-u (lastni vir).	25

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Absorpcijski spektri raztopin ZnPT obsevanih z UVB.	16
Graf 2: Absorpcijski spektri raztopin ZnPT obsevanih z vidno svetlobo.	17
Graf 3: Absorbanca pri 243 nm v odvisnosti od časa.	18
Graf 4: Absorbanca pri 272,7 nm v odvisnosti od časa.	18
Graf 5: Absorbanca pri 325 nm v odvisnosti od časa.	19
Graf 6: Povprečna dolžina korenin (cm) čebule (<i>Allium cepa</i> L.) pri različnih raztopinah.	27
Graf 7: Mitotski indeks (%) delečih se celic koreninskega vršička čebule (<i>Allium cepa</i> L.) pri različnih raztopinah.	28

KAZALO TABEL

Tabela 1: Legenda grafa 1.....	16
Tabela 2: Legenda grafa 2.....	17
Tabela 3: Povprečna dolžina korenin (cm) čebule (<i>Allium cepa</i> L.) pri različnih raztopinah.	26
Tabela 4: Mitotski indeks (%) delečih se celic koreninskega vršička čebule (<i>Allium cepa</i> L.) pri različnih raztopinah.	27
Tabela 5: Dolžina 30 najdaljših korenin (cm) čebulic pri različnih raztopinah oz. koncentracijah cinkovega piritiona (mg/L).....	1
Tabela 6: Število celic koreninskega vršička čebule (<i>Allium cepa</i> L.) v mitozu in v interfazi pri različnih koncentracijah cinkovega piritiona.	2
Tabela 7: Absorbanca raztopin ZnPT različno dolgo obsevanih z vidno svetlobo.	3
Tabela 8: Absorbanca raztopin ZnPT različno dolgo obsevanih z UV svetlobo.	3

POVZETEK

Znana snov proti prhljaju in vegetaciji na ladjah, cinkov pirition (ZnPT), je zaradi svojih škodljivih učinkov za ljudi od leta 2022 naprej v Evropski Uniji in Veliki Britaniji prepovedana za uporabo v kozmetiki. Izdelki s ZnPT so še zmeraj dostopni potrošnikom po spletu in njihova uporaba škoduje organizmom, ki pridejo v stik z njimi, zato ZnPT še zmeraj predstavlja nevarnost okolju. Z nalogo smo hoteli preučiti kinetiko razpada ZnPT pod vplivom UVB svetlobe in vidne svetlobe ter potencialno toksično delovanje razgradnih produktov na rast organizmov. Za raziskavo smo uporabili Allium test in UV-VIS spektrofotometrijo.

Rezultati so nam pokazali, da se hitrost razkroja postopoma manjša in da UVB svetloba, ki ZnPT razgradi v približno 70 minutah, hitreje in učinkovitejše razgradi ZnPT kot vidna svetloba, ki ga tudi po 3 urah ne razgradi popolnoma. Z Allium testom smo ugotovili, da ZnPT močnejše zavira rast korenin in zmanjšuje mitotski indeks v primerjavi z njegovi fotolitskimi produkti.

Ključne besede

Cinkov pirition

Kinetika UVB fotolize

UV-VIS spektrofotometrija

Allium test

ZAHVALA

Zahvaljujem se predvsem mentorici za vso pomoč, nasvete, trud in pripravljenost, tudi ob zelo poznih in zgodnjih urah. Zahvala gre tudi laborantki, ki mi je pogosto pomagala pri poskusih in drugim profesoricom za posredovano znanje in pomoč. Hvaležna sem tudi staršem in bratu za vso podporo, pomoč in potrpežljivost, ki sem je bila deležna.

1 UVOD

Cinkov piriton (ZnPT) je ena izmed svetovno najpogosteje uporabljenih sestavin v zdravilnih šamponih proti prhljaju in bolezni, seboroičnemu dermatitisu. Pogosto se uporablja tudi v ladijskih barvah proti biološkemu obraščanju. Marca 2022 sta Evropska unija (EU) in oktobra 2022 Velika Britanija (VB) zaradi potencialne toksičnosti cinkovega piritiona in tveganja za zdravje ljudi in okolja ter zaradi razpoložljivosti alternativ uvedli prepoved uporabe cinkovega piritiona v vseh kozmetičnih izdelkih, kot so šamponi in kreme za kožo. Študije na živalih naj bi dokazovale, da ima lahko cinkov piriton negativne učinke na človeško reprodukcijo in plodnost, saj povzroči poškodbe DNK in poslabša funkcijo kožne pregrade (Anders, 2024; Santacatterina, 2023). Raziskave dokazujejo tudi toksičnost cinkovega piritiona na druge organizme, predvsem morske, saj pride ZnPT preko vodnih odplak in ladijskih trupov v vodne ekosisteme. Študije kažejo, da se, če je cinkov piriton izpostavljen UV sevanju, popolnoma razgradi.

Cilj naše raziskovalne naloge je ugotoviti, kakšna je kinetika razgradnje ZnPT pod vplivom UVB svetlobe v primerjavi z vidno svetlobo in kakšna je potencialna toksičnost razkrojnih produktov na organizme, saj je kljub formalni prepovedi v EU in VB možno preko spleta dobiti izdelke, ki vsebujejo ZnPT in z uporabo ogrožajo okolje.

1.1 Raziskovalna vprašanja

- 1) Kako hitro se cinkov piriton razgradi pod vplivom UVB svetlobe in do kakšne mere ter kako se hitrost spreminja s časom?
- 2) Kako hitro se cinkov piriton razgradi pod vplivom vidne svetlobe in do kakšne mere v primerjavi z UV?
- 3) Kakšen je vpliv različnih koncentracij razkrojnih produktov cinkovega piritiona pod vplivom UVB svetlobe na rast in dolžino korenin čebule (*Allium cepa* L.) v primerjavi z enakimi koncentracijami cinkovega piritiona?
- 4) Kakšen je vpliv razkrojnih produktov cinkovega piritiona pod vplivom UVB svetlobe na delitev celic koreninskega vršička čebule (*Allium cepa* L.) v primerjavi s cinkovim piritonom?

1.2 Hipoteze

- 1) **Cinkov pirition se bo pod vplivom UVB svetlobe večinoma razgradil v manj kot 2 urah. Hitrost reakcije bo s časom padala.**

Okamura s sodelavci (2006) je dokazal, da se ZnPT med obsevanjem z UVA svetlobo bistveno razgradi že v 2 urah. Ker ima UVB svetloba krajšo valovno dolžino in zato večjo frekvenco in več energije, smo sklepali, da bo lažje in hitreje razgradila ZnPT. Hitrost reakcije se s časom najpogosteje zmanjšuje, saj s potekom reakcije koncentracija reaktantov pada, torej je v prostorninski enoti vedno manj delcev in zato manj možnosti za uspešne trke reaktantov, ki so potrebni za potek reakcije.

- 2) **Cinkov pirition se bo pod vplivom vidne svetlobe razgradil nepopolno in v veliko dlje kot 2 urah.**

Ker ima vidna svetloba nižjo frekvenco in ima zato nižjo energijo, smo sklepali, da bo povzročila počasnejši in nepopoln/manjši razpad kot UVB svetloba.

- 3) **Produkti fotolize bodo imeli v primerjavi s ZnPT manjši zaviralni učinek na rast in dolžino korenin čebule, ki se bo sprti s koncentracijo manjšal.**

To smo predpostavili na podlagi sledečih raziskav: Arambašič in ostali (1994) so v svoji raziskavi ugotovili, da imajo težke kovine kot npr. tudi cink, zaviralni učinek na rast in dolžino korenin čebule. Keglevič in Škopalj (2018) sta ugotovili, da večje koncentracije ZnPT bolj zavirajo rast korenin čebule. Manjšanje toksičnosti na določene morske organizme z razpadom ZnPT pod vplivom svetlobe pa so med drugim dokazali Okamura in sodelavci (2006) ter Turley in drugi (2000).

- 4) **Večja kot bo koncentracija razkrojnih produktov cinkovega piritiona pod vplivom UVB svetlobe, manjši bo mitotski indeks pri čebulicah (*Allium cepa* L.), a bo večji od ZnPT.**

Demir s sodelavci (2014) je dokazal, da ima ZnO genotoksični učinek, ki kaže na neposredno povezavo med količino odmerka in učinkom. Keglevič in Škopalj (2018) sta ugotovili tudi, da večje koncentracije ZnPT povzročijo manjši mitotski indeks. Zaradi prej omenjenih člankov pa sklepamo, da bo mitotski indeks vseeno večji kot pri ZnPT.

2 TEORETIČNI DEL

2.1 CINKOV PIRITION

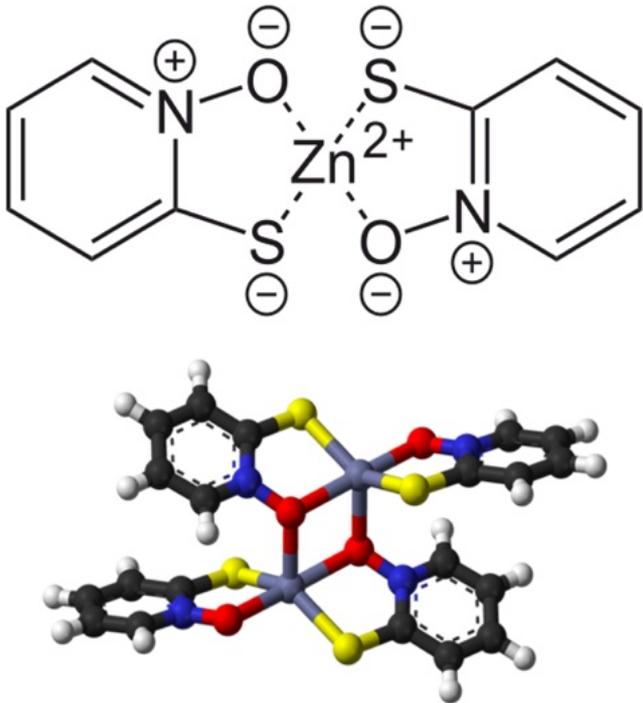
 <p>Slika 1: Skeletna struktura in 3D molekularna struktura ZnPT.</p>		FIZIKALNE LASTNOSTI
Kemijska formula	$C_{10}H_8N_2O_2S_2Zn$	Izgled: brezbarvna trdnina
Ime (IUPAC)	bis(2-piridiltio)cinkov 1,1'-dioksid	Tališče: 240 °C
Molska masa	317,70 g/mol	Topnost v vodi: slabo topen (<1 mg/ml pri 21°C)

Tabela 5: Osnovni podatki ZnPT. (DrugBank, 2024; PubChem, 2024).

Cinkov piriton (ZnPT) je koordinacijski kompleks, sestavljen iz piritionskih ligandov, kelatiranih na cinkove ($2+$) ione preko kisikovih in žveplovih centrov. V kristalnem stanju obstaja kot centrosimetrični dimer, kjer je vsak cink vezan na dva žveplova in tri kisikove centre. (DrugBank, 2024).

Koordinativna vez je kovalentna vez, v kateri oba elektrona oz. cel skupni par elektronov prispeva isti atom. Vez nastane, ker elektronski par privlačita obe jedri (LibreTexts, 2013). V koordinacijskih kompleksih je osrednji atom ali ion s koordinacijsko vezjo povezan z enim ali več ligandi, ki prispevajo oba elektrona. Osrednji atomi koordinacijskih kompleksov so najpogosteje kationi (pozitivni ioni), kot npr. cinkovi kationi, lahko pa so tudi nevtralni atomi. Večji ligandi, kot npr. pirition, lahko vsebujejo več kot en atom, ki se lahko koordinira z osrednjim ionom, in so opisani kot polidentatni. Polidentatni ligandi, katerih geometrija jim omogoča, da zasedejo več kot en koordinacijski položaj osrednjega iona, delujejo kot kelatna sredstva in težijo k tvorbi izjemno stabilnih kompleksov, znanih kot kelati. Vezi kovina-ligand so na splošno veliko šibkejše od običajnih kovalentnih vezi (Simon Fraser University, 2013).

Zaradi dinamičnih fungistatskih in bakteriostatskih lastnosti se cinkov pirition pogosto nahaja v zdravilih proti prhljaju in seboroičnemu dermatitisu. Pred prepovedjo je bil npr. zelo pogosto glavna antimikrobna sestavina v šamponih Head & Shoulders. Čeprav natančen mehanizem delovanja še ni popolnoma razjasnjen, se zdi, da ZnPT moti membranski transport ionov in metabolitov, kar vodi do izgube presnovnega nadzora. Povzroči tudi priliv bakra, kar povzroči zmanjšanje aktivnosti železo-žveplovih beljakovin, ki so med drugim bistvene za presnovo in rast gliv in posledično povzroči zaviranje rasti (DrugBank, 2024; PubChem, 2024). To nakazujejo raziskave, v katerih ZnPT zavira rast kvasovk tako, da poveča koncentracijo drugih kovin kot npr. bakra (Reeder in drugi, 2011) ali jo manjša, kot npr. v primeru železa (Yasokawa in drugi, 2010). Med druge uporabe sodijo tudi kozmetični produkti in sredstva za zaviranje rasti bakterij in gliv na npr. tkaninah in barve ladij proti obraščanju z vegetacijo, čeprav veliko raziskav dokazuje, da ZnPT povzroča škodo vodnim organizmom (PubChem, 2024).

Čeprav je presežek cinka, dela cinkovega piritiona, škodljiv, je v manjših količinah bistven element za življenje, saj je kofaktor za več kot 300 encimov in ga najdemo v prav toliko transkripcijskih faktorjih.

- **OSHA Klasifikacija nevarnosti:** dražilno za oči in dihala, strupeno pri vdihavanju, dražilno za kožo.

Takojšnji (akutni) učinki na zdravje:

- **Vstopna pot:** vdihavanje, koža, oči, zaužitje.
- **Zaužitje:** Zmerno strupeno pri zaužitju. Če se zaužijejo majhne količine, bo prišlo do bruhanja (običajno v 5-10 minutah). Ta izdelek je sredstvo za bljuvanje in zaradi te lastnosti je malo verjetno, da bi se absorbirale velike količine materiala čez gastrointestinalni trakt in povzročile resne toksične učinke. Vendar, zaužitje lahko povzroči gastrointestinalno draženje s slabostjo, bruhanjem, letargijo in drisko.
- **Draženje kože:** Pri dermalnem stiku ni pričakovati pomembnih škodljivih učinkov na zdravje.
- **Draženje oči:** Po izpostavljenosti lahko pride do hudega draženja in/ali opeklin. Neposreden stik lahko povzroči poslabšanje vida in poškodbo roženice. Izpiranje oči je treba izvesti takoj.
- **Vdihavanje:** Visoke koncentracije lahko rahlo dražijo oči, nos, grlo in pljuča (Scienccedirect, 2018).

2.2 CINKOV SULFAT

Cinkov sulfat je anorganska spojina s formulo $ZnSO_4$. Brezvodni cinkov sulfat je brezbarvna kristalinična trdna snov. Pridobiva se tudi kot heksahidrat $ZnSO_4 \cdot 6H_2O$ in kot heptahidrat $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. Vse oblike so topne v vodi in negorljive. Glavna nevarnost je nevarnost za okolje. Med drugim se uporablja kot dodatek krmi, kot sestavina gnojila in kot sredstvo za zaščito pred ognjem (PubChem, 2024).

- **OSHA Klasifikacija nevarnosti:** jedka snov, akutna strupenost, draži oči, okolju nevarno.
- Zdravju škodljivo pri zaužitju.
- Povzroča hude poškodbe oči.
- Zelo strupeno za vodne organizme z dolgotrajnimi učinki (PubChem, 2024).

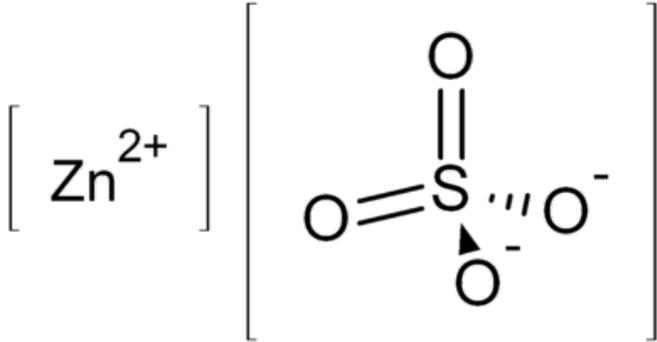
 <p>Slika 2: Struktura cinkovega sulfata.</p>		FIZIKALNE LASTNOSTI
Kemijska formula	ZnSO ₄ · 7H ₂ O (heptahidrat)	
Ime (IUPAC)	cinkov sulfat	
Molska masa	287,53 g/mol (heptahidrat)	
		Izgled: brezbarvni prah
		Tališče: 100 °C (heptahidrat)
		Topnost v vodi: 96,5 g/100 mL pri 20°C

Tabela 5: Osnovni podatki ZnSO₄ (Wikipedia contributors, 2017).

2.3 UV SVETLOBA IN FOTOLIZA

Svetloba je elektromagnetno sevanje, ki prihaja od sonca in se prenaša v valovih ali delcih različnih valovnih dolžin in frekvenc. Ta razpon valovnih dolžin je znan kot elektromagnetni (EM) spekter, ki ga delimo na sedem območij po padajoči valovni dolžini ter naraščajoči energiji in frekvenci. Imenujejo se radijski valovi, mikrovalovi, infrardeči (IR), vidna svetloba, ultravijolični (UV), rentgenski žarki in žarki gama. Ultravijolična (UV) svetloba spada v območje EM spektra med vidno svetlobo in rentgenskimi žarki. Ima frekvence od približno 800 THz in do 30,000 THz in valovne dolžine od približno 380 nm do približno 10 nm. UV svetlobo delimo na UVA (315–400 nm), UVB (280–315 nm) in UVC (180–280 nm). Od sončne UV svetlobe, ki doseže ekvator, je 95 % UVA in 5 % UVB. Zemeljske površine ne doseže noben merljiv UVC spekter sončnega sevanja, ker ozon, molekularni kisik in vodna para v zgornji atmosferi popolnoma absorbirajo te najkrajše valovne dolžine UV svetlobe. Kljub temu je sevanje UV svetlobe zelo škodljivo za živa bitja. Za kožo in oči je najbolj škodljivo visokoenergijsko sevanje UVB in UVC (Lucas, 2017).

Fotoliza je kemijska reakcija, pri kateri se molekule razgradijo pod vplivom fotonov oz. svetlobe. Ko svetloba prehaja skozi snov, elektroni v molekuli absorbirajo energijo fotonov in za kratek čas spremenijo konfiguracijo molekule (iz osnovnega stanja v vzbujeno stanje). Molekule v vzbujenem stanju pogosto niso kinetično stabilne, saj večja energija povzroči močnejše vibriranje atomov v molekuli, kar ošibi vezi, zato se lahko v prisotnosti O₂ ali H₂O spontano razgradijo (oksidirajo ali hidrolizirajo) (Wikipedia contributors, 2023).

UV-sevanje ima dovolj energije, da pretrga kemijske vezi. Zaradi višje energije lahko UV-fotoni povzročijo ionizacijo, proces, pri katerem se valenčni elektroni postopoma odcepijo od atomov. Nastala 'praznina' vpliva na kemijske lastnosti atomov in povzroči, da tvorijo ali prekinajo vezi, ki jih sicer ne bi.

Energija svetlobe je premo sorazmerna s svojo frekvenco in obratno sorazmerna z valovno dolžino, kar potrjujeta enačbi:

$$E = h\nu$$
$$\lambda = \frac{c}{\nu}$$

Slika 3: Planckova enačba in svetlobna enačba.

s pomočjo katerih lahko razložimo, zakaj le svetloba določenih valovnih dolžin povzroča določene reakcije (LibreTexts, 2013).

2.4 ABSORBANCA IN SPEKTROFOTOMETRIJA

Izraz absorpcija se nanaša na fizikalni proces absorpcije svetlobe, absorbanca pa je merilo količine svetlobe, ki jo absorbira vzorec. Meri se s spektroskopijo, zlasti za kvantitativno analizo. Absorbanca se izračuna ali na podlagi količine svetlobe, ki jo vzorec odbije ali razprši, ali na podlagi količine, ki jo vzorec prepusti. Če npr. vsa svetloba preide skozi vzorec oz. se je nič ne absorbira, je absorbanca 0 in prepustnost 100 %. Po drugi strani pa, če svetloba ne prehaja skozi vzorec, je absorbanca neskončna in prepustnost 0 % (Helmenstine, 2008).

Spektrofotometrija je metoda za merjenje, koliko svetlobe absorbira snov, z merjenjem intenzivnosti svetlobe, ko žarek svetlobe preide skozi raztopino vzorca, v odvisnosti od njene frekvence ali valovne dolžine. Osnovno načelo je, da vsaka spojina absorbira ali prepušča svetlobo v določenem območju valovnih dolžin. Intenzivnost absorpcije se spreminja kot funkcija frekvence in ta sprememba je absorpcijski spekter. Spektrofotometrija je ena najbolj uporabnih metod kvantitativne analize na različnih področjih, kot so kemija, fizika, biokemija, materialno in kemijsko inženirstvo ter klinične aplikacije (LibreTexts, 2013; Wikipedia contributors, 2023).



Slika 4: Vernier UV-VIS spektrofotometer (Vernier, 2019).

Spektrofotometer je instrument, ki meri količino fotonov (intenzivnost svetlobe), ki se absorbirajo, ko preidejo skozi raztopino vzorca. S spektrofotometrom lahko ugotovimo, katera spojina se nahaja v naši raztopini in kolikšna je njena koncentracija. Ločimo UV-VIS spektrofotometer (UV in vidna svetloba) in IR spektrofotometer (infrardeča svetloba) (LibreTexts, 2013).

2.5 ALLIUM TEST

Čebula (*Allium cepa* L.) je rastlina, ki se široko uporablja v prehrani. V testu se uporablja podzemna čebulica, ki jo pogosto uporabljajo tudi pri pouku biologije za demonstracijo uporabe mikroskopa, ker ima relativno velike celice (Keglevič in Škopalj, 2018).

Toksikološki testi se izvajajo, da se določi stopnja, do katere snov lahko škoduje organizmom in da lahko pravilno ukrepamo. Uporabili smo toksikološki test Allium, ki je poceni, enostaven in zelo občutljiv za testiranje splošne strupenosti okoljskih vzorcev, obremenjenih z različnimi kemikalijami, zato je lahko koristen za hitro preverjanje kemikalij, ki povzročajo okoljske težave. Rezultati testa so primerljivi z rezultati podobnih testov (Firbas, 2010).

Temelji na različno hitri rasti in dolžini korenin testnih mladih čebulic v različnih vodnih raztopinah kemikalij, kjer strupene kemikalije upočasnjujejo rast korenin. Odzivnost testne rastline na testno snov, ki se kaže z dolžino njenih korenin, imenujemo splošna toksičnost. Rezultati so obratno sorazmerni z dolžino korenin testnih rastlin. Daljše kot so korenine, manjša je splošna strupenost in obratno (Firbas, 2010).

Testni sistem vključuje občutljivo metodo za ocenitev genotoksičnih učinkovin na celičnem nivoju testne rastline *Allium cepa* L. zaradi vplivov najrazličnejše kemizacije okolja. Poznamo več tipov Allium testa, ki ali bolj podrobno analizirajo citotoksične in genotoksične učinke, kot so omejena rast, celična smrtnost in poškodbe kromatina ali so namenjeni ugotavljanju splošne celične toksičnosti (citotoksičnosti) in ravni genotoksičnosti (mutagenosti) v različnih ekosistemih (Keglevič in Škopalj, 2018).

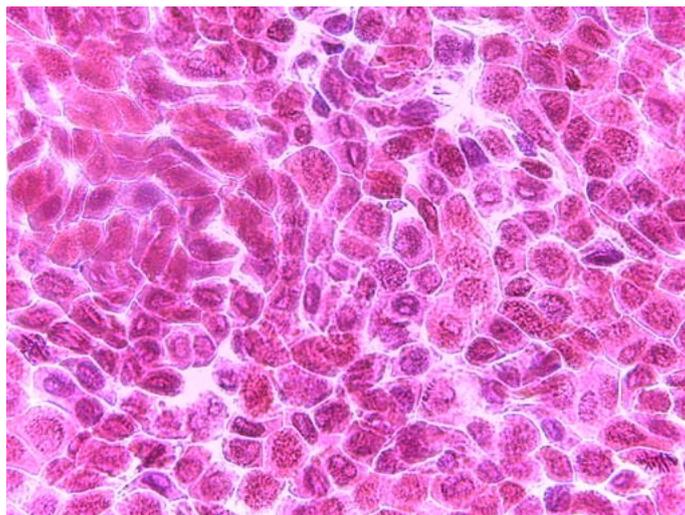
2.6 MITOTSKI INDEKS

Mitotski indeks, ki ga ponavadi izražamo v %, se uporablja za merjenje hitrosti razmnoževanja celične populacije. Definiran je kot razmerje med številom celic v mitozu oz. celic, ki vsebujejo vidne kromosome in skupnim številom celic v vidnem polju.

Celična populacija raste, ko celice preidejo skozi interfazo in mitozo ter zaključijo celični cikel. Nekatere celice s staranjem izgubijo zmožnost delitve ali se le redko delijo. Ko korenine rastejo, se celice na koreninskem ravnem vršičku delijo hitreje, da potisnejo korenino skozi zemljo. Z merjenjem rasti celične populacije lahko opazujemo, kako se celice razlikujejo po hitrosti

delitve. V preizkusih lahko spremenimo lastnosti celičnega okolja in izmerimo njihov vpliv na delitev celic. Pri celični populaciji, ki se hitro deli, pričakujemo, da bo velik delež celic v fazi mitoze. Pri tistih, ki pa se ne ali se delijo redko, pa pričakujemo velik delež celic v interfazi v celičnem ciklu (G1). Višji mitotski indeks pomeni hitrejšo rast ali pa raka oz. nekontrolirano rast (Keglevič in Škopalj, 2018).

FORMULA: mitotski indeks = število celic v delitvi/skupno število celic (%)



Slika 5: Celice koreninskega vršička čebule *Allium cepa* L. iz raztopine $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (lastni vir).

2.7 PREGLED OBJAV

Razpolovne čase (čase potrebne za razpad natanko polovice snovi) ZnPT so raziskovali številni članki. Turley (2000) je objavil, da se cinkov pirition v naravni morski vodi hitro razgradi z razpolovnim časom < 24 ur. Thomas (2009) je npr. napisal, da je fotoliza ZnPT izredno hitra ($t_{1/2} < 1$ h), nasprotno pa je razpolovni čas hidrolize od 96 do 120 dni. Stopnje fotolize se lahko močno zmanjšajo na globinah, kjer je svetlobe manj. Poročal je tudi, da se razpolovna doba ZnPT poveča na 200 h na globinah več kot 25 m.

Sakkas in sodelavci (2007) so z uporabo tekočinske kromatografije–masne spektrometrije (LC-MS) izmerili fotolitični razpolovni čas med 9,2 in 15,1 min in ugotovili tudi, da naraščanje koncentracije raztopljenih organskih snovi v raztopini ZnPT pospešuje reakcijo.

Yamaguchi in sodelavci (2009) so s spektroskopsko tehniko raziskovali fotolizo ZnPT v vodni raztopini. Raztopine ZnPT, obsevane s ksenonsko svetilko, so analizirali z UV-VIS

absorpcijsko spektroskopijo. Ugotovili so, da se ZnPT najprej razgradi na piridin-2-sulfonsko kislino (PSA) in nadaljnje razpadne produkte in da se stopnja fotorazgradnje drastično spreminja s časom, geografsko lokacijo in globino vode. Da je primarni produkt razgradnje ZnPT 2-piridin sulfonska kislina, pri čemer se Zn (2+) ioni sprostijo v vodo, je ugotovil tudi Turley (2000).

Glavni produkti razkroja, ki so jih Sakkas idr. (2007) izolirali in identificirani z uporabo ekstrakcije v trdni fazi in LC-MS, so: piridin-N-oksidi (PO), 2-merkaptopiridin (HPS), piridin-2-sulfonska kislina (PSA), 2-merkaptopiridin-N-oksidi (HPT), 2,2-dipiridil disulfid, 2,2'-ditiobispiridin mono-N-oksidi in 2,2'-ditiobispiridin-N-oksidi ([PT](2)).

Okamura s sodelavci (2006) je dokazal, da se ZnPT med obsevanjem z UVA svetlobo bistveno razgradi že v 2 urah in da se z razpadom toksičnost ZnPT manjša, kar je ugotavljal tudi Turley (2000). Onduka s sodelavci (2010) so raziskovali akutno toksičnost CuPT, ZnPT in 6 glavnih produktov njune fotorazgradnje; (PO), (HPS), (PSA), (HPT), 2,2'-ditiobispiridin ([PS](2)) in ([PT](2)) na več vrst morskih organizmov (morskih alg, rakov, rib). Ugotovili so, da so bili (z izjemo HPT) razkrojni produkti bistveno manj toksični od kovinskih piritionov.

Tudi Carballo s sodelavci (2002) v svoji raziskavi ugotavlja, da so lahko že majhne koncentracije cinkovega piritiona toksične za vodne organizme in da lahko cinkov pirition že pri majhnih koncentracijah (0.078 mg/L) povzroča visoko smrtnost testnih organizmov.

Maraldo in Dahllöf (2004) sta dokazala, da popolna in mikrobna razgradnja v morski vodi v kombinaciji s fotorazgradnjo ni dodatno skrajšala časa razgradnje, kar kaže na odsotnost biodegradacije. Tudi biorazgradnja brez vpliva sončne svetlobe je bila v raziskanem časovnem obdobju zanemarljiva.

Arambašič s sodelavci (1994) je v raziskavi ugotovil, da ima cink zaviralni vpliv na dolžino korenin čebule. Tudi Lin in Xing (2007) sta v strokovnem članku zapisala, da sta Zn in ZnO inhibirala rast korenin. Demir s sodelavci (2014) je dokazal, da delci ZnO povzročijo primarno škodo na DNK v meristemskih celicah korenin čebule *Allium cepa* L. V raziskovalni nalogi sta Keglevič in Škobalj (2018) dokazali zaviralni učinek ZnPT tudi na rast korenin čebule *Allium cepa* L. in na delitev celic v meristemskem tkivu koreninskih vršičkov.

Liu idr. (1995) so v raziskavi učinkov različnih koncentracij 11 različnih kovin, med drugim cinkovega sulfata, ugotovili, da kovinski ioni zelo negativno vplivajo na celično delitev in nukleole v celicah konice korenin *Allium cepa* L., saj povzročijo razne mutacije.

3 MATERIAL

3.1 Zaščitna oprema

- zaščitne rokavice (velikost M, Kimtech),
- zaščitni plašč,
- zaščitna očala.

3.2 Osnovni material

- Aluminijska folija,
- lepilni trak,
- alkoholni flomaster,
- čebula vrste *Allium cepa* L. s premerom 2,0-3,0 cm.

3.3 Kemikalije

- Cinkov pirition (Zinc Pyrithione - pharmaceutical secondary standard, Sigma-Aldrich),
- 98 % etanol (Carl Roth),
- 99,9 % acetonitril (Honeywell - Riedel-de Haën),
- 99,8 % očetna kislina (Honeywell - Fluka),
- 99,0% cinkov sulfat heptahidrat (Fluka),
- destilirana voda,
- kisli orcein (barvilo; Sigma-Aldrich).

3.4 Laboratorijski pribor

- Epruvete,
- milimetrsko ravnilo,

- kapalke,
- petrijevka,
- vžigalnik,
- čaše (100 ml, 250 ml, 600 ml),
- merilni valj (100 ml),
- pipete,
- plastični pokrovčki za epruvete,
- lesena prijemalka,
- kremenčeve kivete,
- steklene bučke,
- pincete,
- nož,
- steklena palčka,
- kovinska žlička,
- mikroskopska stekelca.

3.5 Laboratorijske aparature

- prenosni računalnik z računalniškima programoma Logger Pro 3 in Excel,
- iPad Air z aplikacijo Goodnotes,
- gorilnik (Usbeck),
- grafoskop,
- UV-VIS spektrofotometer (Vernier),
- UVB luč (Philips, 36W),
- analitična tehtnica (Kern ABJ; z natančnostjo 0.0001 g),
- mikroskop (Leica DM500) in pribor za mikroskopiranje.

4 EKSPERIMENTALNI DEL

4.1 EKSPERIMENT 1: MERJENJE HITROSTI RAZGRADNJE ZNPT POD VPLIVOM SVETLOBE

4.1.1 Potek eksperimenta

Za potrebe te raziskave smo se odločili, da se bomo zgledovali po delu eksperimenta H. Okamura in drugih (2006), ki so raziskovali manjšanje toksičnosti cinkovih in bakrovih piritionov pod vplivom UVA sevanja. Hitrost razpadanja ZnPT smo zato izmerili s pomočjo spreminjanja absorbance med razpadanjem in z uporabo UV-VIS spektrofotometra povezanega na prenosni računalnik in programa Logger Pro 3.

4.1.1.1 Priprava raztopine

Izhodiščno raztopino ZnPT s koncentracijo 100 mg/L smo pripravili tako, da smo stehali 2,5 mg ($2,6 \text{ mg} \pm 0,1 \text{ mg}$) ZnPT in ga v 25 mL bučki raztopili v 25 ml acetonitrila. To raztopino smo z acetonitrirom v 100-mililitrski bučki razredčili v razmerju 1:100, da smo dobili koncentracijo 1 mg/L. Ker je bila absorbanca te koncentracije prenizka za zanesljivo analiziranje sprememb, smo izhodiščno raztopino razredčili v razmerju 1:10 in dobili osnovno koncentracijo 10 mg/L.

4.1.1.2 Merjenje UV absorpcijskih spektrov raztopin ZnPT

Ko smo spektrofotometer kalibrirali z acetonitrirom, smo približno 3,5 ml raztopine z 2-mililitersko pipeto nalili v kiveto in s spektrofotometrom izmerili njen absorpcijski spekter ter ga shranili v programu Logger Pro 3. Vzorec (4 ml) osnovne raztopine ZnPT smo kot kontrolo zavili v folijo in jo pustili v temi v hladilniku, da smo izločili vpliv biodegradacije, kot sta že potrdila Maralda in Dahllöf leta 2004, in mu UV absorpcijski spekter izmerili naslednji dan. Da bi potrdili, da razpad poglavitno res povzroča UV svetloba, smo polovico osnovne raztopine (10 mg/L) nato prenesli v čašo in jo nenehno obsevali z grafoskopom oz. vidno svetlobo,

preostanek v bučki pa smo obsevali z UVB lučjo. UVB luč smo postavili v digestorij, čigar okna so bila zavita z aluminijasto folijo, zaradi zaščite naših oči. Da bi videli čim boljši učinek svetlobe, smo obe posodi nastavili tako, da je svetloba zadela neposredno v tekočino, torej ne čez steklo. Vsakih 5 minut smo iz UV-obsevane posode vzeli vzorec (3,5 ml) raztopine in izmerili njen spekter. Raztopino obsevano z vidno svetlobo smo merili na vsakih 10 minut. Da bi videli do kod se ZnPT razgradi po daljšem obsevanju z vidno svetlobo oz. koliko časa potrebujemo, da z njo razgradimo celoten ZnPT, smo zadnjo meritev dodatno obsevali še za 2,5 h.



Slika 6: Zaščiten digestorij (lastni vir).

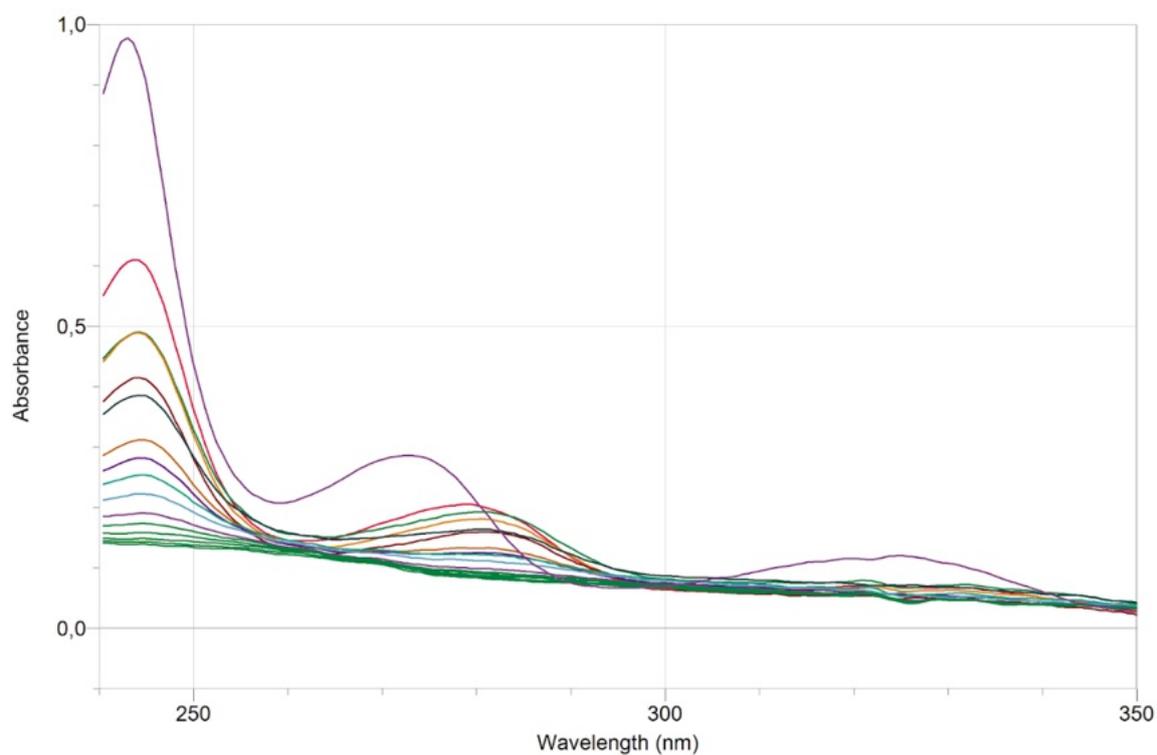


Slika 7: Obsevanje raztopin z UV lučjo (lastni vir).

4.1.1.3 Analiza podatkov

Za analizo vpliva obsevanja raztopin ZnPT z UVB in vidno svetlobo smo v programu Logger Pro naredili graf s pripadajočimi absorpcijskimi spektri. Za analizo spreminjanja absorbance smo izbrali meritve pri 3 valovnih dolžinah (243, 272,7 in 325 nm - vsako iz enega vrha grafa), kjer so bile prvotne meritve najvišje in v programu Excel naredili grafe absorbance v odvisnosti od časa za posamezno valovno dolžino ter jim določili najboljše prilegajoče se krivulje.

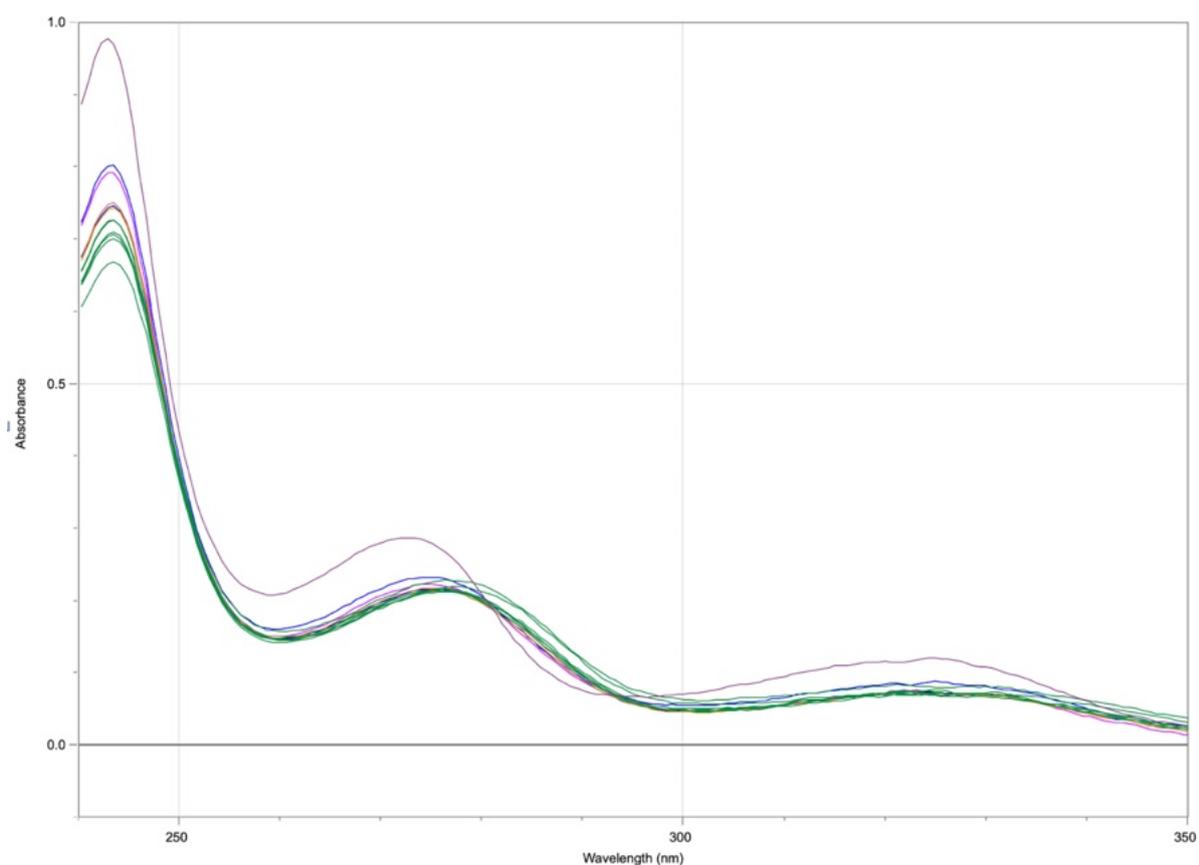
4.1.2 Rezultati z razpravo



Graf 1: Absorpcijski spektri raztopin ZnPT obsevanih z UVB.

Barva	Čas obsevanja (min)	Barva	Čas obsevanja (min)
vijolična	0	turkizna	40
rdeča	5	svetlo modra	45
zelena	10	vijolična	50
oranžna	15	zelena	55
rjava	20	zelena	60
črna	25	zelena	65
oranžna	30	zelena	70
vijolična	35	zelena	75

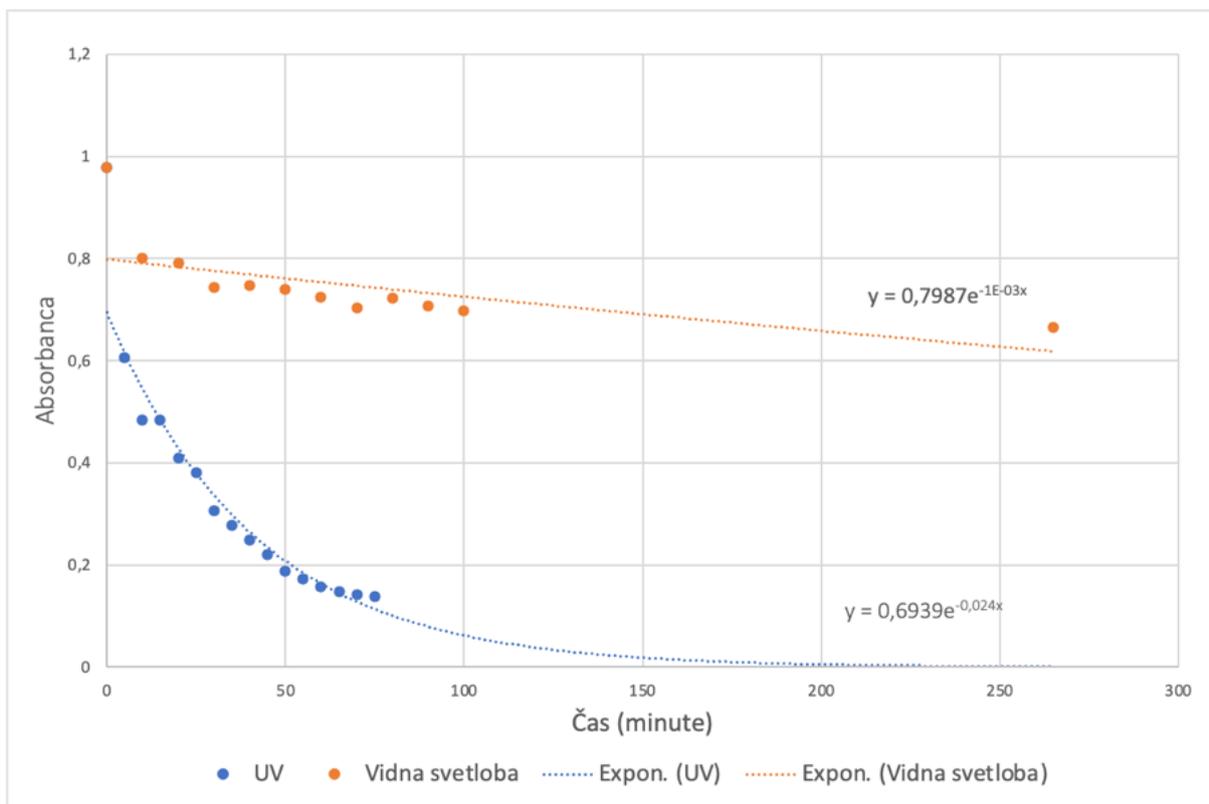
Tabela 1: Legenda grafa 1.



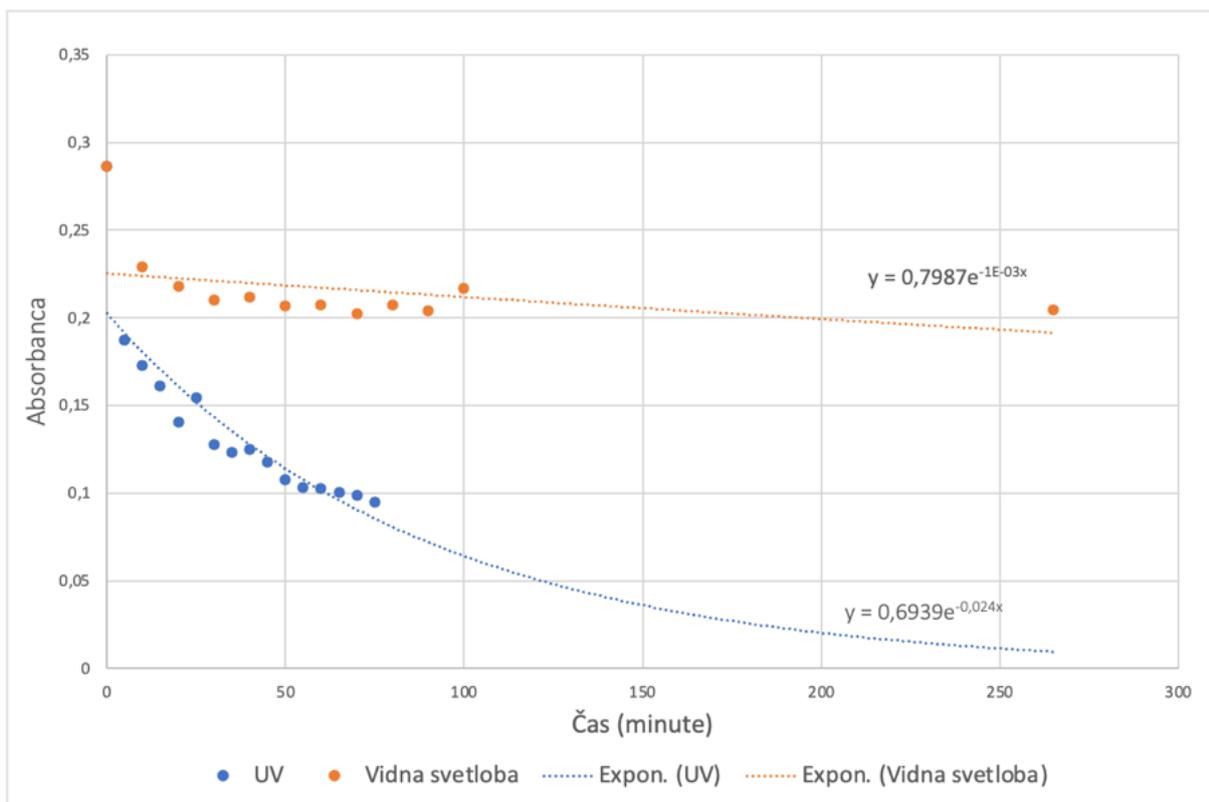
Graf 2: Absorpcijski spektri raztopin ZnPT obsevanih z vidno svetlobo.

Barva	Čas obsevanja (min)	Barva	Čas obsevanja (min)
vijolična	0	zelena	60
modra	10	zelena	70
roza	20	zelena	80
modra	30	zelena	90
oranžna	40	zelena	100
rumena	50	zelena	265

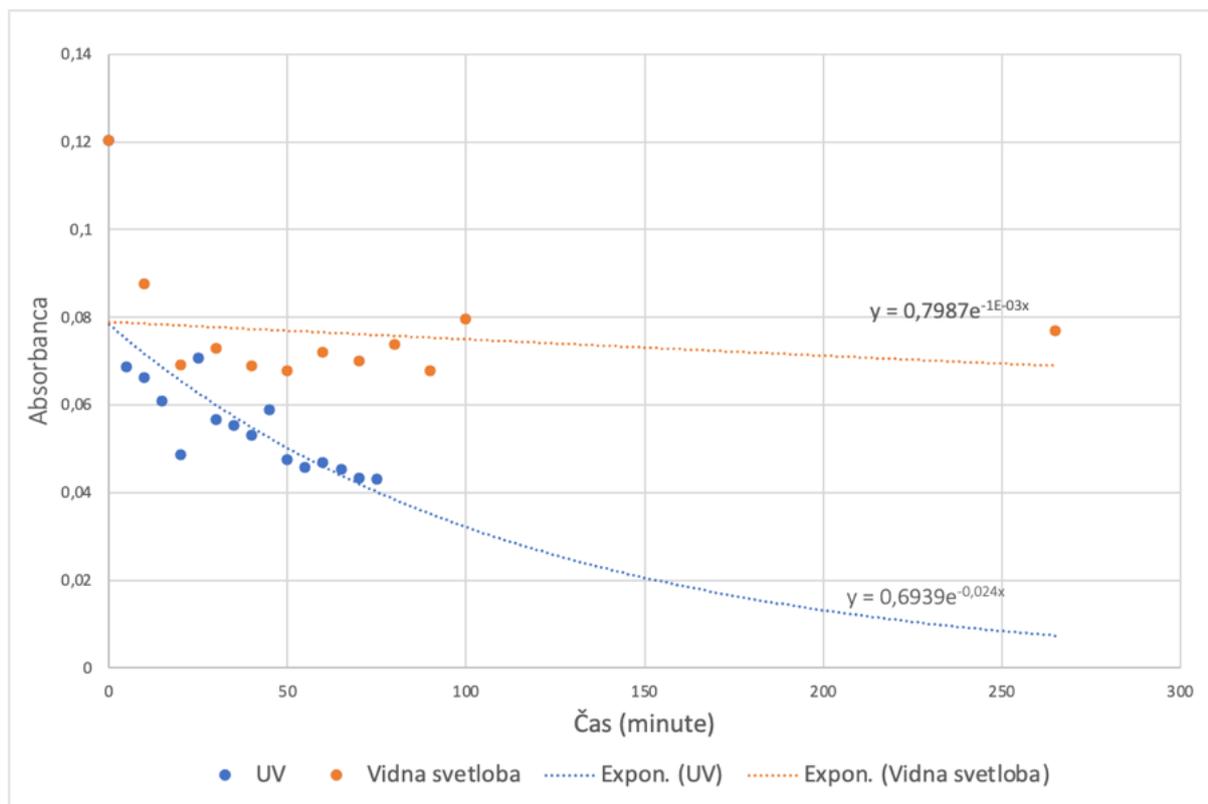
Tabela 2: Legenda grafa 2.



Graf 3: Absorbanca pri 243 nm v odvisnosti od časa.



Graf 4: Absorbanca pri 272,7 nm v odvisnosti od časa.



Graf 5: Absorbanca pri 325 nm v odvisnosti od časa.

Iz grafa 1 je razvidno, da je ZnPT pod vplivom UV svetlobe razpadel bolj kot pod vplivom vidne svetlobe, saj se je zadnjih nekaj krivulj grafa 1 skoraj uravnalo oz. je izgubilo značilen absorpcijski spekter ZnPT, kar nakazuje, da se je ZnPT večinoma razgradil. Ker so razlike v absorbancah zadnjih 3 meritev grafa 1 v primerjavi s prejšnjimi zelo majhne, lahko sklepamo, da se snov ne bo več znatno razgradila. To potrди del prve hipoteze, kot jo tudi 3 zadnje modre točke na grafih 3, 4 in 5, s pomočjo katerih lahko določimo okvirni čas fotolize ZnPT - 70 min, saj so od tam naprej razlike v absorbancah zelo majhne.

Na grafih 3, 4 in 5 vidimo iz črt za UV, da hitrost razkroja ni enakomerna, ampak se postopoma upočasnjuje, saj se črtam, ki prikazujejo potek reakcije, naklon manjša. Manjši kot je, manjša je hitrost reakcije v določenem trenutku in manjša je koncentracija ZnPT, saj ga je bilo že več razgrajenega. To se sklada s teorijo trkov, saj je ob manjši koncentraciji tudi manj možnosti za uspešen trk in potek reakcije, če ostale spremenljivke (npr. temperatura) ostanejo enake. S tem smo odgovorili na prvo raziskovalno vprašanje in potrdili hipotezo 1. Spreminjanje hitrosti fotolize ZnPT so ugotovili tudi že Yamaguchi in sodelavci (2009).

Ker imajo krivulje grafa 2 tudi po več kot 3 urah obsevanja, ko se ne spreminjajo več veliko, še zmeraj značilne vrhove spektra ZnPT, to dokazuje, da se je cinkov pirition pod vplivom vidne svetlobe razgradil manj in veliko počasneje kot pod UVB, kjer teh vrhov ni, čeprav smo z njo snov obsevali za vsaj 2-krat krajši čas. S tem smo torej odgovorili na raziskovalno vprašanje 2 in potrdili hipotezo 2, saj se ZnPT pod vplivom vidne svetlobe ni popolnoma razgradil in če se bi, bi potreboval veliko več kot 4 ure.

Iz tega lahko sklepamo, da v razpadu res igra poglobitno vlogo UV svetloba. Ker ima vidna svetloba zaradi višjih valovnih dolžin in posledično nižjih frekvenc fotone z nižjo energijo kot UV svetloba, elektroni najverjetneje absorbirajo premalo energije in zato ne pride do spremembe konfiguracije/prehoda iz osnovnega stanja v vzbujeno stanje in je posledično manj trganja vezi med cinkovimi ioni in piritionskimi ligandi. Majhen vpliv vidne svetlobe je jasen tudi iz razlik v naklonu črt v grafih 3, 4 in 5, kjer ima UV črta veliko večji naklon, torej reakcija poteče veliko hitreje.

4.1.3 Izboljšave in nadaljnje raziskave

Da bi določili bolj natančen čas konca razpada ZnPT pod vplivom UVB, bi morali raztopino obsevati za daljši čas, npr. 4 ure, da bi videli, kdaj se absorbanca res ne spreminja več.

Lahko bi tudi bolj podrobno raziskali in primerjali vpliv različnih vrst UV na razpad ZnPT in tako še bolj točno določili razpad, ki bi se zgodil v naravi, saj UVB predstavlja le 5 % sončne svetlobe, medtem ko UVA predstavlja 95 %.

Da bi natančno preučili potek razkroja ZnPT, bi bilo potrebno narediti analizo raztopine po obsevanju tako, da bi določili razkrojne produkte. Uporabili bi lahko tehniko, s katero bi zaporedno ločili posamezne komponente v raztopini in jih analizirali z masno spektrometrijo oz. nuklearno magnetno resonanco.

4.2 EKSPERIMENT 2: ALLIUM TEST

4.2.1 Potek eksperimenta

Za analizo toksičnosti fotolitskih produktov ZnPT v primerjavi s ZnPT smo izbrali Allium test, s katerim sta Keglevič in Škobalj (2018), po katerih smo se zgledovali, dokazali zaviralni učinek ZnPT na rast in dolžino korenin čebule *Allium cepa* L. Test smo izbrali, ker je kratkotrajen, saj zaradi hitre rasti korenin traja le 3-4 dni, in ker je zelo občutljiv na strupenost okolja, kar omogoča enostavno analizo toksičnosti snovi. Z obravnavo mitotskega indeksa, zaviranja rasti korenin ter pogostosti poškodb DNA (kromosomov in jeder celic) test omogoča oceno genotoksičnosti in citotoksičnosti snovi na čebulo. Po svetu se zato pogosto uporablja tudi za analizo vode (Wijeyaratne, 2019), ocenjevanje onesnaženosti ozračja, za preučevanje toksičnosti herbicidov in pesticidov, za ugotavljanje mutagenih učinkov zdravil,... (Saradjen, 1993).

4.2.1.1 Priprava raztopin in čebulic

V 600 mL čaši smo stehali 0,0150 g ($0,0152 \text{ g} \pm 0,0001 \text{ g}$) ZnPT in ga s stekleno palčko čim boljše zmešali v 300 mL vode. Namesto acetonitrila smo kot topilo uporabili vodo, ki ni bila destilirana, da ne bi prišlo do dodatnih poškodb čebulic ali osmoze celic. Ker je ZnPT slabo topen v vodi, smo dobili izhodiščno suspenzijo s koncentracijo 50 mg/L. Nato smo v 5 manjših čaš odpipetirali po 4, 8, 12, 16 in 20 mL izhodiščne suspenzije in vanje dolili toliko vode, da smo dobili 200 mL vsake raztopine s koncentracijami 1 mg/L, 2 mg/L, 3 mg/L, 4 mg/L in 5 mg/L. Polovico vsake izmed 6 tekočin smo 2 h obsevali z UVB lučjo in tako dobili enake koncentracije produktov fotolize ZnPT. V novi čaši smo v 300 mL raztopili 0,0136 g ($0,0137 \text{ g} \pm 0,0001 \text{ g}$) cinkovega sulfata heptahidrata $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, da smo dobili koncentracijo 10 mg/L. V eksperiment smo ga vključili, da bi preverili, ali zaviranje rasti korenin poglavitno povzročajo cinkovi kationi, ki se sprostijo ob fotolizi in ob raztapljanju $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ v vodi, ali to povzročijo drugi produkti fotolize.



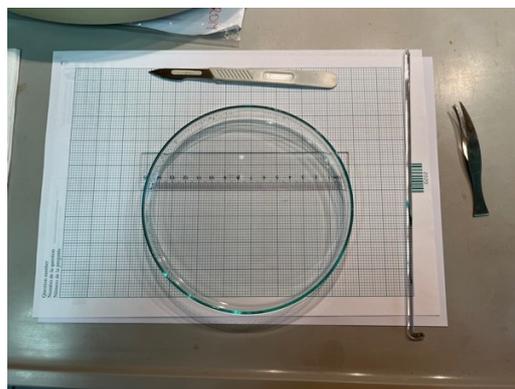
Slika 8: Nastavitev čebulic, začetek poskusa (lastni vir).



Slika 9: Čebulice v obsevanih raztopinah, 2. dan (lastni vir).



Slika 10: Čebulice v obsevanih raztopinah, 3. dan (lastni vir).



Slika 11: Pripomočki za merjenje korenin (lastni vir).

Izbrali smo 42 približno enako velikih čebulic, ki so se lepo usedle na vrat epruvet, da je bilo izhlapevanje tekočin čim manjše. Čebulicam smo na spodnji strani s skalpelom postrgali rjavo plast s posušenimi koreninami. Pri tem smo pazili, da je čebulni krožec ostal nepoškodovan (Klančnik, 2009). Vsako prej pripravljeno tekočino smo do vrha nalili v 3 epruvete v stojalu in na vrh vsake postavili čebulico. V 3 epruvete s čebulicami smo za kontrolo nalili tudi nedestilirano vodo. Stojala smo postavili v prostor, kjer raztopine niso bile neposredno izpostavljene svetlobi, da smo preprečili dodaten razkroj ZnPT, a so čebulice imele dovolj svetlobe, da so lahko normalno rastle. Čaše z neporabljenimi tekočinami smo pokrili s parafilmom in shranili. Neobsevane smo zaprli v škatlo, da ZnPT ne bi razpadel pod vplivom svetlobe. Čebule smo pustili v tekočinah približno 3 dni (70 h). Vsak dan smo jim dvakrat s kapalko dodali tekočine, ki so jih čebulice zaradi rasti hitro porabljele.



Slika 12: Pripomočki za pripravo preparatov, mikroskopiranje in štetje celic (lastni vir).

4.2.1.2 Merjenje korenin in mitotskega indeksa

Po treh dneh smo čebulice odstranili iz epruvet, jim odrezali korenine in tiste, ki so rastle v enaki tekočini, položili v isto petrijevko. S pomočjo pincet in milimetrskega ravnila smo izmerili 30 najdaljših korenin čebulic vsake tekočine. To smo naredili, da smo se izognili upoštevanja korenin čebulic, ki bi lahko, zaradi drugih poškodb, imele krajše korenine.



Slika 13: Korenine v fiksativu (lastni vir).

Po izmerjenih dolžinah najdaljših korenin čebulic iz vseh tekočin, smo te korenine za en dan pomočili v fiksativ, sestavljen iz 96% etanola in 99,8 % očetne kisline v razmerju 3:1. Naslednji dan smo polovico (količinsko) korenin obarvali z barvilom kisli orcein. V nove epruvete smo nalili toliko orceina, da je pokril korenine in jih nato z leseno prijemalko držali nad plamenom gorilnika, dokler ni orcein enkrat zavrel (približno 30 sekund). Iz tako obarvanih korenin smo nato odrezali koreninske vršičke in enega iz vsake tekočine posamično prenesli na objektna stekla, nanje kanili kapljico kislega orceina in preko položili krovno steklo (Keglevič in Škopalj, 2018). Z ravnim delom ročaja lesene prijemalke smo vršičke preko stekla nežno zmečkali ter vsak preparat vsake tekočine preučili pod mikroskopom.



Slika 14: Segrevanje orceina med barvanjem korenin (lastni vir).

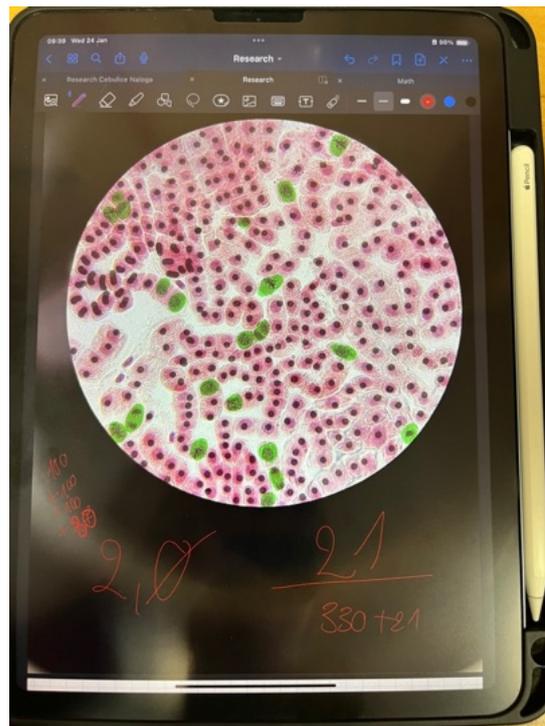


Slika 15: Korenine v orceinu (lastni vir).

Poiskali smo meristemsko regijo koreninskih vršičkov in v vidnem polju (na 40x povečavi) prešteli celice v mitozu ter vse takrat vidne celice. Za lažje štetje celic smo vsako vidno polje, ki smo ga hoteli uporabiti za računanje mitotskega indeksa, skozi okular fotografirali s telefonom, sliko naložili na aplikacijo Goodnotes na iPad-u in s sprotnim preverjanjem celic na mikroskopu, na sliki označevali celice v mitozu. Nato smo izračunali mitotski indeks.



Slika 16: Fotografija neobsevane 2 mg/L raztopine ZnPT (lastni vir).



Slika 17: Štetje celic na iPad-u (lastni vir).

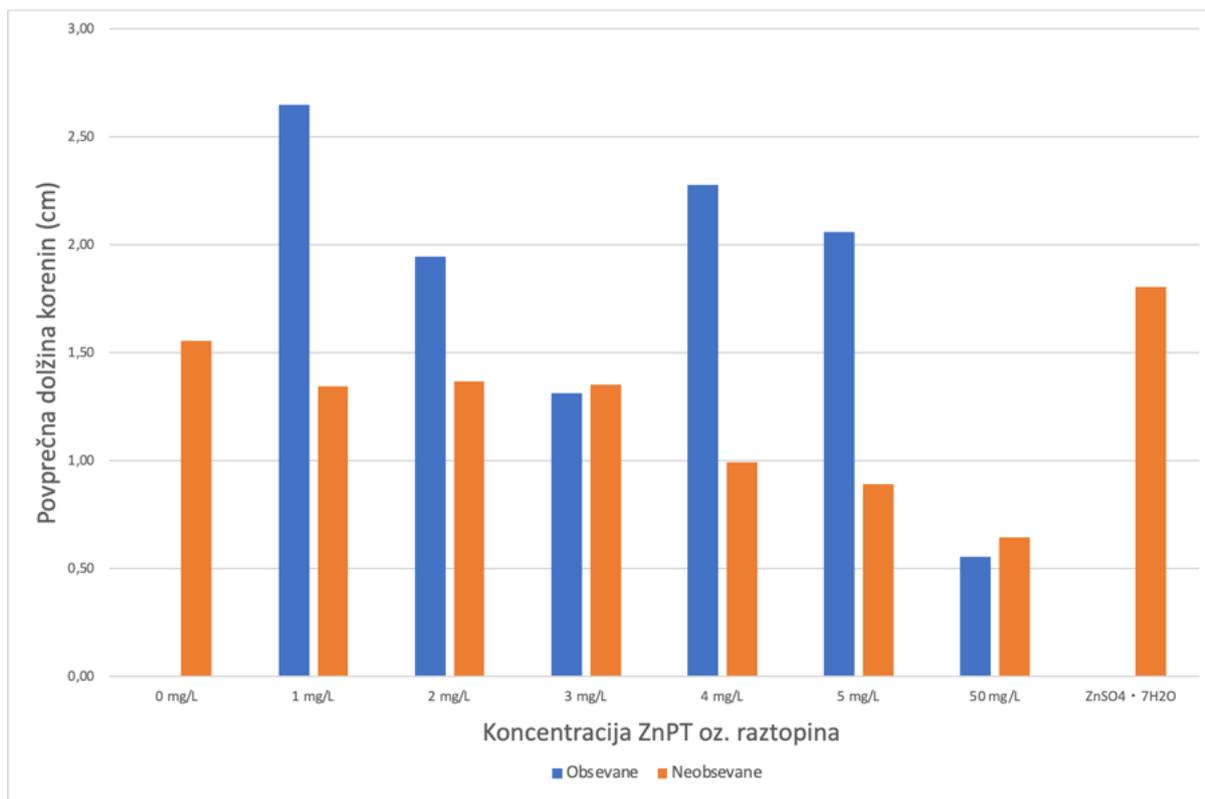
4.2.1.3 Analiza podatkov

Za analizo toksičnosti različnih koncentracij fotolitskih razkrojnih produktov ZnPT v primerjavi z enakimi koncentracijami ZnPT, smo v programu Excel naredili 2 stolpična grafa, ki prikazujeta povprečne dolžine korenin in mitotski indeks pri različnih tekočinah, v katerih so čebulice rastle. S pomočjo funkcij '=AVERAGE', '=QUARTILE' in '=STDEV' smo določili povprečje, statistična odstopanja od povprečja in standardno deviacijo meritev dolžin korenin.

4.2.2 Rezultati z razpravo

Koncentracija ZnPT (mg/L)	Povprečna dolžina korenin \pm standardna deviacija (cm)
1, obsevano	2,65 \pm 0,72
2, obsevano	1,94 \pm 0,28
3, obsevano	1,31 \pm 0,33
4, obsevano	2,28 \pm 0,45
5, obsevano	2,06 \pm 0,55
50, obsevano	0,55 \pm 0,12
1, neobsevano	1,34 \pm 0,20
2, neobsevano	1,37 \pm 0,25
3, neobsevano	1,35 \pm 0,30
4, neobsevano	0,99 \pm 0,34
5, neobsevano	0,89 \pm 0,22
50, neobsevano	0,64 \pm 0,14
H ₂ O	1,55 \pm 0,51
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1,80 \pm 0,56

Tabela 3: Povprečna dolžina korenin (cm) čebule (*Allium cepa* L.) pri različnih raztopinah.



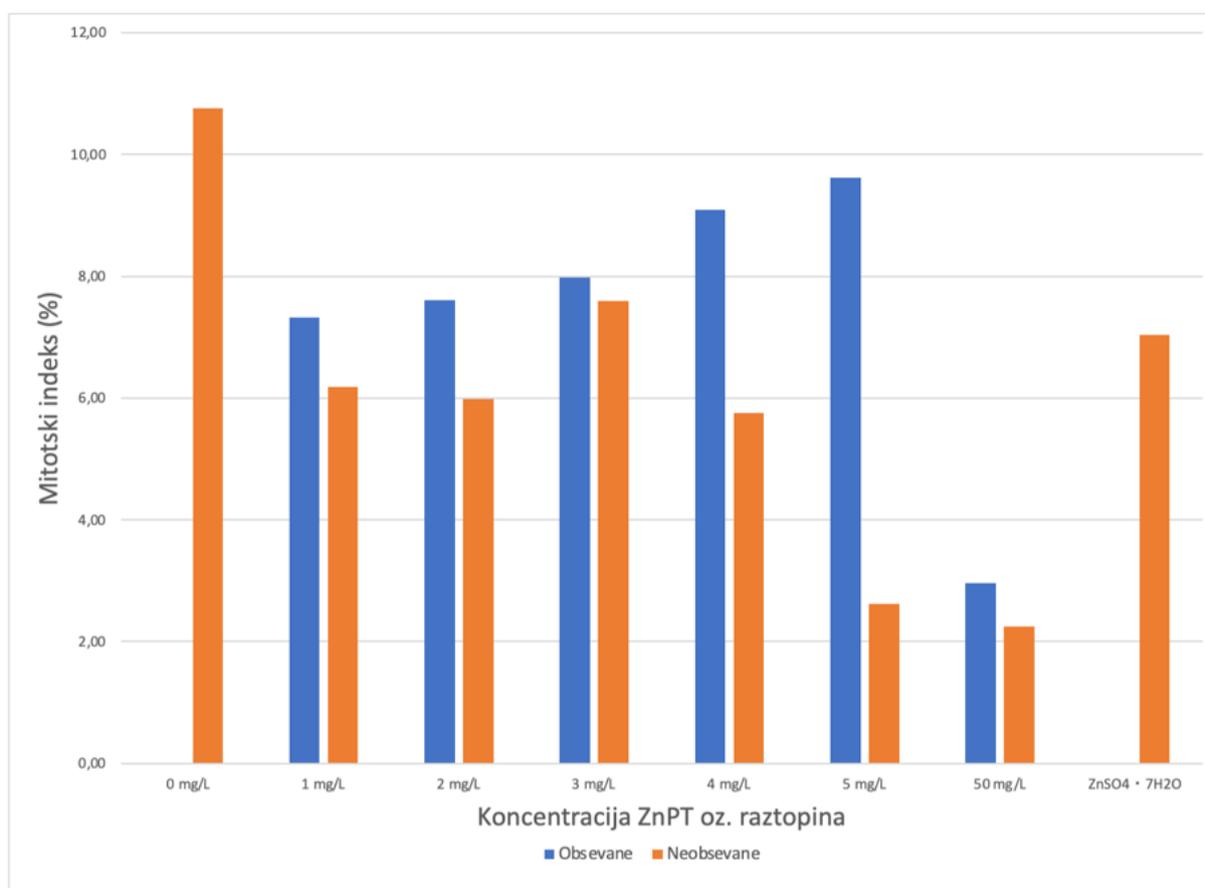
Graf 6: Povprečna dolžina korenin (cm) čebule (*Allium cepa* L.) pri različnih raztopinah.

Tabela 4: Mitotski indeks (%) delečih se celic koreninskega vršička čebule (*Allium cepa* L.) pri različnih raztopinah.

Koncentracija ZnPT (mg/L)	Mitotski indeks (%)
1, obsevano	7,32
2, obsevano	7,62
3, obsevano	7,98
4, obsevano	9,09
5, obsevano	9,62
50, obsevano	2,97
1, neobsevano	6,18
2, neobsevano	5,98

3, neobsevano	7,59
4, neobsevano	5,76
5, neobsevano	2,62
50, neobsevano	2,24
H ₂ O	10,76
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	7,03

(nadaljevanje tabele 4)



Graf 7: Mitotski indeks (%) delečih se celic koreninskega vršička čebule (*Allium cepa* L.) pri različnih raztopinah.

V grafih 6 in 7 je kar nekaj nepričakovanih rezultatov, do katerih je najverjetneje prišlo zaradi neenakosti čebulic, ponesrečenih poškodb korenin med dnevnim dolivanjem tekočin in neenakosti odrezanih koncev, saj je možno, da so nekatere čebulice bile poškodovane, pravilno in enako odrezati spodnji sloj vsem čebulicam pa je bilo težko, saj jih je bilo 42, izkušenj s tem procesom pa nismo imeli. Sklepamo lahko, da je bila rast čebulic z bolj odrezanimi konci, zaradi večjega stika z zaviralnimi snovmi, bolj zavirana. Če pa je bila čebulica premalo obrezana, bi to lahko povzročilo počasnejšo ali manjšo rast korenin.

Negotovost in variabilnost v času segrevanja korenin v kislem orceinu je najverjetneje eden izmed glavnih virov napak, saj so bili nekateri preparati tudi po 3-kratni ponovitvi barvanja, najverjetneje zaradi predolgega segrevanja, precej slabi in pogosto neuporabni. Slabša ločljivost notranjosti celic določenih preparatov in posledična težavnost v ločevanju med npr. celico v profazi in 'zažgano' oz. preveč segreto/obarvano celico sta najverjetneje dodatno vplivali na nepričakovane vrednosti (določenih) mitotskih indeksov.

Sklepamo lahko, da so imele čebulice, ki so rastle v vodi, poškodovane korenine ali so bile kako drugače zavirane, saj bi, v nasprotju z našimi rezultati, zaradi odsotnosti vsakršnjih dodatnih snovi, morale imeti najdaljše korenine. Povprečno dolžino korenin kot diskrepanco potrjuje tudi mitotski indeks vode v grafu 7, saj lahko jasno razberemo, da je bil največji, torej okolje ni imelo genotoksičnega učinka na čebulico, zatorej bi morale korenine nepoškodovane čebulice rasti najbolje.

Iz grafov 6 in 7 lahko razberemo, da so bili večinoma povprečne dolžine korenin in mitotski indeksi opazno manjši, če ZnPT ni bil obsevan z UVB. To nakazuje večjo splošno toksičnost in genotoksičnost ZnPT v primerjavi z njegovimi fotolitskimi produkti. Povprečne dolžine korenin in mitotski indeksi ZnPT (z izjemo neobsevane raztopine 3 mg/L v grafu 7) so manjši tudi od povprečja $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Ker je negativen vpliv na rast korenin in delitev celic pri približno enaki koncentraciji opazno večji pri ZnPT, lahko sklepamo, da je ZnPT bolj (geno)toksičen kot cinkovi kationi. Iz padanja vrednosti dolžin korenin neobsevanih koncentracij ZnPT v grafu 6 in mitotskega indeksa v grafu 7 (z izjemo neobsevane raztopine 3 mg/L) je lepo razvidno večanje toksičnosti oz. zaviranja rasti korenin z večanjem koncentracije ZnPT.

V primerjavi s tem, trend večanja toksičnosti s koncentracijo pri obsevanih raztopinah ni tako razviden. Če upoštevamo vpliv poškodb in neenakosti med čebulicami, ki so najverjetneje vplive na krajše povprečne vrednosti korenin obsevanih koncentracij 2 in 3 mg/L na grafu 6, in to, da se povprečne dolžine korenin z večanjem koncentracij manjšajo, lahko iz grafa 6 sklepamo, da se z večanjem koncentracije fotolitskih produktov ZnPT poveča tudi toksičnost oz. učinek zaviranja rasti korenin. Ker so vrednosti koncentracij neobsevanega ZnPT na grafu 6 opazno nižje od vrednosti obsevanih koncentracij, lahko potrdimo hipotezo 3, saj smo s tem dokazali, da imajo produkti razkroja ZnPT pod vplivom UVB manjši zaviralni učinek na rast in dolžino korenin kot ZnPT.

Rezultati genotoksičnega testa (graf 7) potrjujejo tudi del hipoteze 4, saj so mitotski indeksi cinkovega piritiona opazno manjši od indeksov fotolitskih produktov ZnPT, torej so imeli produkti manjši zaviralni vpliv na delitev celic čebule vrste *Allium cepa* L. Čeprav se vrednosti mitotskega indeksa v grafu 7 s koncentracijo obsevanih raztopin (vse do 50 mg/L) veča, lahko to pripišemo napakam štetja, neločljivost preparatov in velikemu skoku med koncentracijami 5 in 50 mg/L, ki ne prikazuje vmesnih koncentracij in njihovih mitotskih indeksov. Ker je mitotski indeks pri (obsevani) koncentraciji 50 mg/L veliko manjši kot indeksi manjših koncentracij, lahko sklepamo, da so produkti fotolize ZnPT vseeno škodljivi in se njihov učinek zaviranja mitoze res veča s koncentracijo, kar dokončno potrjuje hipotezo 4.

Možno je tudi, da imajo razkrojni produkti ZnPT pod vplivom UVB v zelo nizkih koncentracijah pospeševalne ali koristne učinke na rast korenin, saj je večina povprečnih dolžin korenin večja kot tistih iz vode. Cinkovi ioni so v majhnih količinah potrebni za metabolizem, delovanje encimov in transport ionov v rastlinah, a so v večjih lahko zelo škodljiv (Hamzah Saleem, 2022), kar bi lahko razložilo manjši mitotski indeks in krajše korenine pri večji koncentraciji (50 mg/L) produktov in večje vrednosti pri nižjih koncentracijah. Toksičnost večje količine cinkovih ionov dokazuje tudi relativno nižja vrednost meritev pri raztopini $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Iz trenutnih podatkov ne moremo določiti, kaj so fotolitski produkti ZnPT in kateri so glavni zaviralci rasti in celične delitve, kar skupaj s pomanjkanjem konkretnih povezav med naraščanjem koncentracije produktov in boljšo oz. slabšo rastjo korenin in delitvijo celic preprečuje končno ugotovitev, če so koristni ali ne in če je cink glavni povzročitelj toksičnosti.

Zaradi pomanjkanja časa, informacij in izkušenj ni bilo možno narediti in analizirati več preparatov vsake koncentracije ali ponoviti celega eksperimenta, s čimer bi zagotovili boljšo kakovost in natančnost vseh meritev.

4.2.3 Izboljšave in nadaljnje raziskave

Da bi izboljšali natančnost rezultatov, bi morali izvesti več ponovitev eksperimenta z več čebulicami za vsako raztopino in uporabiti več koncentracij med 5 in 50 mg/L, da bi izboljšali prepoznavnost trendov v grafih ter pregledati več preparatov enake koncentracije in izračunati mitotski indeks na več mestih preparata. Da bi lahko potrdili, kateri produkti fotolize ZnPT vplivajo na rast korenin in delitev celic čebule *Allium cepa* L. in kako, bi morali točno določiti produkte in posamično ponoviti poskus.

Čeprav sta Keglevič in Škobalj (2018) v procesu barvanja korenin počakali, da je orcein dvakrat zavrel, je v našem prvem poskusu barvanja to povzročilo, da so bile korenine pretrde za pripravo preparatov, zato smo čas segrevanja zmanjšali. Da bi izboljšali kvaliteto preparatov in natančnost rezultatov, bi morali na začetku izvesti več poskusov barvanja z različnimi časi, da bi našli najbolj primerne za naše korenine, saj je najverjetneje še kaj drugega, česar se ne zavedamo, vplivalo na mehko koreninskih vršičkov.

5 ZAKLJUČKI

Cilj raziskovalne naloge je bilo raziskati škodljivost razkrojnih produktov cinkovega piritiona za okolje pod vplivom UVB svetlobe in kinetiko njegove fotolize, saj njegova pogosta uporaba v različnih izdelkih po svetu in posledično večja pojavnost v naravi predstavlja nevarnost okolju in organizmom v njem.

Preučevali smo hitrost in obseg razgradnje ZnPT pod vplivom UVB svetlobe z uporabo spektrofotometrije in jo primerjali z razgradnjo ZnPT pod vplivom vidne svetlobe. Zanimal nas je tudi vpliv teh razkrojnih produktov na rast in dolžino korenin ter na delitev celic koreninskega vršička čebule (*Allium cepa* L.). Osredotočili smo se predvsem na njihovo genotoksičnost in splošno toksičnost v primerjavi s cinkovim piritionom.

Iz prvega eksperimenta smo ugotovili, da se ZnPT večinoma razgradi v približno 70 minutah, da se hitrost razkroja postopoma upočasnjuje in da UVB svetloba ZnPT razkroji veliko hitreje kot vidna svetloba, ki ga tudi po več kot 3 urah sploh popolnoma ne razgradi. Rezultati so pokazali tudi, da UV spekter svetlobe zaradi svoje največje energije v sončni svetlobi, ki doseže Zemljino površino, res igra glavno vlogo v razkroju. Rezultati drugega testa pa so pokazali, da imajo razkrojni produkti v primerjavi s ZnPT manjši zaviralni učinek na rast, dolžino korenin in delitev celic čebule *Allium cepa* L. ter da se njihov vpliv z večanjem koncentracije večja. S tem smo potrdili vse svoje hipoteze in vsaj okvirno odgovorili na raziskovalna vprašanja. Možno je tudi, da imajo določeni razkrojni produkti ZnPT pod vplivom UVB svetlobe, kot npr. cinkovi ioni, v manjših količinah pospeševalne/koristne učinke na rast korenin, saj so v majhnih količinah potrebni za metabolizem, delovanje encimov in transport ionov v rastlinah, a bi za potrditev te trditve morali izvesti dodatne eksperimente.

Menimo, da so rezultati, ki smo jih pridobili do sedaj, kljub diskrepancam in negotovostim določenih meritev, obetajoči, saj se skladajo z drugimi raziskavami, ki so tudi dokazale manjšo toksičnost razkrojnih produktov ZnPT na druge organizme v primerjavi s ZnPT, še posebej na vodne, saj pride večina izdelkov, ki vsebujejo ZnPT, prej kot slej v stik z vodnimi (eko)sistemi. V primeru, da ZnPT v odtokih ni dovolj razredčen oz. da njegove količine niso dovolj majhne, da ne bi povzročile škode drugim organizmom, se lahko ZnPT, če je na dosegu zadostne svetlobe, hitro razgradi na manj toksične komponente. A to ne pomeni, da vsi razkrojni produkti

niso škodljivi, saj raziskave kažejo, da so tudi cinkovi ioni in 2-merkaptopiridin-N-oksid (HPT) za določene organizme lahko toksični.

V nadaljevanju nameravamo izboljšati našo metodologijo dela in bolj podrobno raziskati vpliv različnih vrst UV svetlobe na razpad in vpliv posameznih fotolitskih produktov na rast čebule ali drugih organizmov, s čimer bi izboljšali znanje in lažje uvedli potrebne ukrepe za varnost okolja. Želeli bi si, da bi nadaljnje raziskave pokazale tudi, kako spreminjanje svetlobe vpliva na razpad ZnPT na različnih globinah in na posledično daljši čas razpada in njegovo daljšo toksičnost.

V raziskovalni nalogi smo se seznanili s kinetiko fotolize ZnPT in nekaterimi negativnimi učinki cinkovega piritiona in njegovih fotolitskih produktov na čebulo in prišli do podatkov, ki kažejo na njihovo zmanjšano toksičnost. Zaradi tega večina teh razpadnih produktov predstavlja (bistveno) manjšo potencialno grožnjo za okolje in organizme v njem.

6 DRUŽBENA ODGOVORNOST

Dolga leta smo ZnPT uporabljali v kozmetiki zaradi njegovih pozitivnih lastnosti in premalo upoštevali njegove škodljive učinke na okolje in ljudi. Od leta 2022 je njegova uporaba v kozmetiki za ljudi v EU in VB prepovedana. Kljub zavedanju načel o družbeni odgovornosti se še vedno uporablja npr. v barvah proti vegetativni obrasti ladij in tudi potrošnikom je še zmeraj na voljo nakup kozmetike s ZnPT preko spleta. Četudi ima ZnPT za ljudi koristi, ne bi smeli ignorirati njegovih škodljivih učinkov na okolje in njegove organizme. S to raziskovalno nalogo smo hoteli prispevati k znanju o toksičnosti in delovanju ZnPT in njegovih fotolitskih produktov ter spodbuditi nadaljnje raziskave, ki bi zmanjšale škodljivost naravi. Ker veliko raziskav dokazuje, da so ZnPT in določeni njegovi fotolitski produkti škodljivi za okolje, bi morali, tako kot sta EU in VB zaradi njegove toksičnosti prepovedali uporabo ZnPT za ljudi, zaradi odgovornosti za varovanje narave omejiti uporabo ZnPT in poiskati njegove alternative.

7 VIRI IN LITERATURA

- Anders, M. (2024, January 28). The banning of zinc pyrithione in Europe: A research summary. SkinDrone; *SkinDrone Media Group*. <https://skindrone.com/articles/the-banning-of-zinc-pyrithione-in-europe-a-research-summary/>
- Arambašić, M., Bjelić, S., & Subakov, G. (1995). Acute toxicity of heavy metals (copper, lead, zinc), phenol and sodium on *Allium cepa* L., *Lepidium sativum* L. and *Daphnia magna* St.: Comparative investigations and the practical applications. *Water Research*, 29(29), 497–503. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(94\)00178-A](https://doi.org/10.1016/0043-1354(94)00178-A)
- Clark, J. (2013a, October 3). Coordinate (dative covalent) bonding. Chemistry LibreTexts; *Libretexts*.
[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Chemical_Bonding/Fundamentals_of_Chemical_Bonding/Coordinate_\(Dative_Covalent\)_Bonding](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Chemical_Bonding/Fundamentals_of_Chemical_Bonding/Coordinate_(Dative_Covalent)_Bonding)
- Clark, J. (2013b, October 3). What causes molecules to absorb UV and visible light. *Chemistry LibreTexts; Libretexts*.
[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy_Basics/What_Causes_Molecules_to_Absorb_UV_and_Visible_Light](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy_Basics/What_Causes_Molecules_to_Absorb_UV_and_Visible_Light)
- Demir, E., Kaya, N., & Kaya, B. (2014). Genotoxic effects of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles on root meristem cells of *Allium cepa* by comet assay. *Türk Biyoloji Dergisi [Turkish Journal of Biology]*, 38(1), 31–39.
<https://doi.org/10.3906/biy-1306-11>
- DrugBank. (2024). Pyrithione. (Pridobljeno 11.2.2024 iz <https://go.drugbank.com/drugs/DB06815>)
- Firbas, P. (2010). Kemizacija okolja in citogenetske poškodbe, Ekslibris: 2010.
- Hamzah Saleem, M., Usman, K., Rizwan, M., Al Jabri, H., & Alsafran, M. (2022). Functions and strategies for enhancing zinc availability in plants for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 13.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1033092>

- Helmenstine, A. M. (2008, March 14). What does absorbance mean in chemistry? *ThoughtCo*. <https://www.thoughtco.com/definition-of-absorbance-604351>
- How exactly does UV light break bonds? (n.d.). Chemistry Stack Exchange. (Pridobljeno 11.2.2024 iz <https://chemistry.stackexchange.com/questions/153417/how-exactly-does-uv-light-break-bonds>)
- Klančnik, K. (2009). Učinki nanodelcev titanovega dioksida na korenine navadne čebule (*Allium cepa* L.). *Uni-Lj.Si*. (Pridobljeno 11.2.2024 iz <https://repozitorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=138362&lang=slv>)
- Lin, D., & Xing, B. (2007). Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 150(2), 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.01.016>
- Liu, D., Jiang, W., Wang, W., & Zhai, L. (1995). Evaluation of metal ion toxicity on root tip cells by the *Allium* test. *Israel Journal of Plant Sciences*, 43(2), 125–133. <https://doi.org/10.1080/07929978.1995.10676598>
- Lower, S. (2013, October 3). 9.9: Bonding in coordination complexes. Chemistry LibreTexts; *Libretexts*. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/General_Chemistry/Chem1_\(Lower\)/09%3A_Chemical_Bonding_and_Molecular_Structure/9.09%3A_Bonding_in_Coordination_Complexes](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/General_Chemistry/Chem1_(Lower)/09%3A_Chemical_Bonding_and_Molecular_Structure/9.09%3A_Bonding_in_Coordination_Complexes)
- Lucas, J. (2017, September 15). What is ultraviolet light? *Livescience.com*; *Live Science*. (Prezeto 11.2.2024 iz: <https://www.livescience.com/50326-what-is-ultraviolet-light.html>)
- Maraldo, K., & Dahllöf, I. (2004). Indirect estimation of degradation time for zinc pyrithione and copper pyrithione in seawater. *Marine Pollution Bulletin*, 48(9–10), 894–901. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2003.11.013>
- Okamura, H., Kobayashi, N., Miyanaga, M., & Nogami, Y. (2006). Toxicity reduction of metal pyrithiones by near ultraviolet irradiation. *Environmental Toxicology*, 21(4), 305–309. <https://doi.org/10.1002/tox.20183>
- Onduka, T., Mochida, K., Harino, H., Ito, K., Kakuno, A., & Fujii, K. (2010). Toxicity of metal pyrithione photodegradation products to marine organisms with indirect evidence for their presence in seawater. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 58(4), 991–997. <https://doi.org/10.1007/s00244-009-9430-8>

- PubChem. (2024a). Pyrithione Zinc. *Nih.gov*. (Pridobljeno 11.2.2024 iz from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pyrithione-Zinc>)
- PubChem. (2024b). Zinc Sulfate. *Nih.gov*. (Prevzeto 11.2.2024 iz: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/24424>)
- Reeder, N. L., Kaplan, J., Xu, J., Youngquist, R. S., Wallace, J., Hu, P., Juhlin, K. D., Schwartz, J. R., Grant, R. A., Fieno, A., Nemeth, S., Reichling, T., Tiesman, J. P., Mills, T., Steinke, M., Wang, S. L., & Saunders, C. W. (2011). Zinc pyrithione inhibits yeast growth through copper influx and inactivation of iron-sulfur proteins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(12), 5753–5760. <https://doi.org/10.1128/aac.00724-11>
- Sakkas, V. A., Shibata, K., Yamaguchi, Y., Sugawara, S., & Albanis, T. (2007). Aqueous phototransformation of zinc pyrithione. *Journal of Chromatography A*, 1144(2), 175–182. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.049>
- Santacatterina, F. (2022, March 23). Lilial and Zinc pyrithione banned in the EU & UK. *Obelis Group*. (Prevzeto 11.2.2024 iz: <https://www.obelis.net/news/lilial-and-zinc-pyrithione-banned-in-the-eu/>)
- Spectrophotometry. (2013, October 2). *Chemistry LibreTexts; Libretexts*. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Kinetics/02%3A_Reaction_Rates/2.01%3A_Experimental_Determination_of_Kinetics/2.1.05%3A_Spectrophotometry](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Kinetics/02%3A_Reaction_Rates/2.01%3A_Experimental_Determination_of_Kinetics/2.1.05%3A_Spectrophotometry)
- Thomas, K. (2009). The use of broad-spectrum organic biocides in marine antifouling paints. (Pridobljeno 11.2.2024 iz <https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/zinc-pyrithione>)
- Turley, P. A., Fenn, R. J., & Ritter, J. C. (2000). Pyrithiones as antifoulants: Environmental chemistry and preliminary risk assessment. *Biofouling*, 15(1–3), 175–182. <https://doi.org/10.1080/08927010009386308>
- Vernier UV-VIS spectrophotometer. (2019, November 11). *Vernier*. <https://www.vernier.com/product/vernier-uv-vis-spectrophotometer/>

- Wijeyaratne, W. M. D. N., & Wadasinghe, L. G. Y. J. G. (2019). *Allium cepa* bio assay to assess the water and sediment cytogenotoxicity in a tropical stream subjected to multiple point and nonpoint source pollutants. *Journal of Toxicology*, 2019, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2019/5420124>
- Wikipedia contributors. (2017). Cinkov sulfat. *Wikipedia, The Free Encyclopedia*. (Prezveto 11.2.2024 iz: https://sl.wikipedia.org/w/index.php?title=Cinkov_sulfat&oldid=4766058)
- Wikipedia contributors. (2023a, November 28). Photodegradation. *Wikipedia, The Free Encyclopedia*. (Pridobljeno 11.2.2024 iz <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Photodegradation&oldid=1187240474>)
- Wikipedia contributors. (2023b). Spektrofotometrija. *Wikipedia, The Free Encyclopedia*. (Prezveto 11.2.2014 iz: <https://sl.wikipedia.org/w/index.php?title=Spektrofotometrija&oldid=5944596>)
- Wikipedia contributors. (2024, January 25). Zinc pyrithione. *Wikipedia, The Free Encyclopedia*. (Prezveto 11.2.2024 iz: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Zinc_pyrithione&oldid=1198966621)
- Wypych, A., Wypych, G. (2015). Reputain B30 - Zinc Omadine ZOE. (Pridobljeno 11.2.2024 iz <https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/zinc-pyrithione>)
- Yamaguchi, Y., Kojima, R., Kumakura, A., Yamada, Y., Shibata, K., & Senda, T. (2009). Spectroscopic study on photolysis of aqueous solution of zinc pyrithione. *Journal of Environmental Chemistry*, 19(2), 207–213. <https://doi.org/10.5985/jec.19.207>
- Yasokawa, D., Murata, S., Iwahashi, Y., Kitagawa, E., Kishi, K., Okumura, Y., & Iwahashi, H. (2010). DNA microarray analysis suggests that zinc pyrithione causes iron starvation to the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109(5), 479–486. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.10.025>

PRILOGE

Raztopina	Column1	Column2	Column3	Column4	Column5	Column6	Column7	Column8	Column9	Column10
1, obsevano	1,6	1,7	1,9	2	2	2	2	2	2,1	2,1
2, obsevano	1,5	1,6	1,6	1,6	1,6	1,7	1,7	1,8	1,8	1,8
3, obsevano	0,8	0,8	0,8	0,8	1	1	1,1	1,1	1,2	1,2
4, obsevano	1,5	1,5	1,7	1,7	1,7	1,7	1,8	2	2	2,1
5, obsevano	1,4	1,4	1,4	1,5	1,6	1,6	1,6	1,7	1,7	1,8
50, obsevano	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5
1, neobsevano	1	1	1	1,1	1,1	1,2	1,2	1,2	1,2	1,3
2, neobsevano	1	1	1	1	1	1,1	1,2	1,2	1,2	1,2
3, neobsevano	1	1	1	1	1	1	1	1	1,1	1,1
4, neobsevano	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,7	0,7	0,8
5, neobsevano	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
50, neobsevano	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
H ₂ O	0,8	0,9	1	1	1	1,1	1,1	1,2	1,2	1,2
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,4	1,4	1,4	1,4
Raztopina oz. Column11	Column12	Column13	Column14	Column15	Column16	Column17	Column18	Column19	Column20	
1, obsevano	2,2	2,2	2,3	2,4	2,4	2,5	2,6	2,6	2,8	2,8
2, obsevano	1,9	1,9	1,9	1,9	2	2	2	2	2	2
3, obsevano	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,3	1,3	1,3	1,4	1,4
4, obsevano	2,1	2,1	2,1	2,2	2,3	2,3	2,3	2,5	2,5	2,6
5, obsevano	1,8	1,8	1,8	1,8	2	2	2	2,1	2,1	2,1
50, obsevano	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
1, neobsevano	1,3	1,3	1,3	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
2, neobsevano	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,4	1,5	1,5
3, neobsevano	1,1	1,1	1,2	1,3	1,3	1,4	1,4	1,5	1,5	1,5
4, neobsevano	0,8	0,8	0,9	0,9	0,9	0,9	1	1	1	1,2
5, neobsevano	0,8	0,8	0,8	0,8	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	1
50, neobsevano	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,7	0,7	0,7	0,7
H ₂ O	1,2	1,2	1,3	1,3	1,3	1,4	1,5	1,5	1,8	1,9
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1,4	1,4	1,5	1,5	1,5	1,5	1,6	1,6	1,7	1,8
Raztopina oz. Column21	Column22	Column23	Column24	Column25	Column26	Column27	Column28	Column29	Column30	
1, obsevano	2,9	3,1	3,1	3,4	3,6	3,6	3,7	3,7	3,8	4,3
2, obsevano	2	2	2	2	2	2,1	2,2	2,4	2,6	2,7
3, obsevano	1,4	1,5	1,5	1,6	1,7	1,7	1,8	1,8	1,9	1,9
4, obsevano	2,6	2,6	2,6	2,7	2,7	2,7	2,8	2,9	2,9	3,1
5, obsevano	2,1	2,2	2,2	2,3	2,5	2,7	2,7	3	3,3	3,6
50, obsevano	0,6	0,6	0,6	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,8
1, neobsevano	1,4	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	2	1,4
2, neobsevano	1,5	1,6	1,6	1,6	1,6	1,7	1,7	1,7	1,8	1,8
3, neobsevano	1,6	1,6	1,6	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	2
4, neobsevano	1,2	1,3	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,5	1,5	1,6
5, neobsevano	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,2	1,3	1,3
50, neobsevano	0,7	0,7	0,7	0,7	0,8	0,8	0,8	0,9	0,9	1
H ₂ O	1,9	1,9	2	2,1	2,2	2,2	2,2	2,3	2,4	2,5
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	2,1	2,1	2,2	2,4	2,4	2,5	2,8	2,8	2,9	3

Tabela 5: Dolžina 30 najdaljših korenin (cm) čebulic pri različnih raztopinah oz. koncentracijah cinkovega piritiona (mg/L).

Raztopina oz. koncentracija ZnPT (mg/L)	Število celic v mitozih	Število celic v interfazi
1, obsevano	405	32

2, obsevano	279	23
3, obsevano	438	38
4, obsevano	310	31
5, obsevano	310	33
50, obsevano	425	13
1, neobsevano	410	27
2, neobsevano	330	21
3, neobsevano	292	24
4, neobsevano	360	22
5, neobsevano	520	14
50, neobsevano	392	9
H ₂ O	390	47
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	304	23

Tabela 6: Število celic koreninskega vršička čebule (*Allium cepa* L.) v mitози in v interfazi pri različnih koncentracijah cinkovega piritiona.

Čas obsevanja (min)	243 nm	272,7 nm	325 nm
0	0,97732997	0,28641697	0,12045678
10	0,80074589	0,22926111	0,08763159
20	0,7911121	0,21808862	0,06920052
30	0,74323242	0,20992901	0,07282866
40	0,74759128	0,21181063	0,0688462
50	0,73962862	0,20673765	0,06791121
60	0,72407467	0,20742878	0,072044
70	0,70344875	0,20209404	0,07004774
80	0,72290984	0,20758763	0,07388232
90	0,70677217	0,20412966	0,06784029

100	0,69768486	0,21666426	0,07956816
265	0,66434415	0,20468047	0,07692634

Tabela 7: Absorbanca raztopin ZnPT različno dolgo obsevanih z vidno svetlobo.

Čas obsevanja (min)	243 nm	272,7 nm	325 nm
0	0,97732997	0,28641697	0,12045678
5	0,6063465	0,18711012	0,06879069
10	0,48405897	0,17301067	0,06622194
15	0,48320125	0,16114518	0,06100605
20	0,40942748	0,14082393	0,04875157
25	0,38146742	0,1545782	0,07060079
30	0,30713579	0,12777334	0,05657121
35	0,27793658	0,12323049	0,05528945
40	0,24995996	0,12481297	0,05303708
45	0,21954731	0,11788699	0,05889554
50	0,18835345	0,10748782	0,04761254
55	0,17203675	0,10329845	0,0457685
60	0,15734375	0,10277331	0,04677865
65	0,14736099	0,10056125	0,04536031
70	0,14312682	0,09894868	0,04320775
75	0,13851931	0,09509393	0,04317756

Tabela 8: Absorbanca raztopin ZnPT različno dolgo obsevanih z UV svetlobo.