

Mladi za napredek Maribora 2018

35. srečanje

Ocena vpliva cinkovega piritiona na izbrane vrste rastlin in živali

Raziskovalno področje: biologija

Raziskovalna naloga

Avtor: KAJA KEGLEVIČ, SATJA ŠKOBALJ

Mentor: KATJA HOLNTHANER ZOREC

Šola: II. GIMNAZIJA MARIBOR

Maribor, februar 2018

Mladi za napredek Maribora 2018

35. srečanje

Ocena vpliva cinkovega piritiona na izbrane vrste rastlin in živali

Raziskovalno področje: biologija

Raziskovalna naloga

Maribor, februar 2018

KAZALO

POVZETEK	4
ABSTRACT	4
ZAHVALA.....	5
1 UVOD	6
1.1 Raziskovalna vprašanja	6
1.2 Delovne hipoteze.....	7
2 TEORETIČNE OSNOVE	9
2.1 Toksikološki testi	9
2.1.1 Lepidium test.....	9
2.1.2 Allium test	9
2.1.3 Artemia test	11
2.2 Javanski mah	13
2.3 Cinkov pirition	14
2.3.1 Pregled objav.....	17
3 MATERIAL IN METODE DE LA.....	19
3.1 MATERIAL	19
3.1.1 Zaščitna oprema	19
3.1.2 Osnovni material	19
3.1.3 Kemikalije	19
3.1.4 Laboratorijski pribor.....	20
3.1.5 Laboratorijske aparature.....	21
3.2 METODE DE LA.....	22
3.2.1 LEPIDIUM TEST	22
3.2.2 Čebulni test (ALLIUM TEST).....	24
3.2.3 METODA S SPEKTROSKOPIJO	26
3.2.4 ARTEMIA TEST	28

4 REZULTATI.....	30
4.1 Lepidium test.....	30
4.2 Allium test.....	31
4.2.1 Merjenje dolžine koreninic.....	31
4.2.2 Mitotski indeks.....	32
4.3 Metoda s spektroskopijo.....	34
4.4 Artemia test.....	35
5 RAZPRAVA.....	38
6 MOŽNI VIRI NAPAK IN IZBOLJŠAVE METOD.....	40
7 ZAKLJUČEK.....	42
8 DRUŽBENA ODGOVORNOST.....	44
9 VIRI IN LITERATURA.....	45
10 PRILOGE.....	48
10.1 Lepidium test.....	48
10.2 Allium test.....	49
10.2.1 Mitotski indeks.....	51
10.3 Metoda s spektroskopijo.....	53
10.4 Artemia test.....	55

POVZETEK

V prosti prodaji je mnogo produktov, ki vsebujejo škodljive kemikalije. Ena izmed teh je tudi cinkov pirition, zdravilna učinkovina šamponov proti prhljaju in sestavina premazov za ladje. Z izpiranjem las po uporabi šampona in barvanjem ladijskih trupov prehaja ta kemikalija v vodno okolje in prihaja v stik s številnimi netarčnimi organizmi. Z različnimi testi smo želeli preučiti vpliv cinkovega piritiona na različne organizme in oceniti njegovo potencialno toksičnost.

Test z vrtno krešo je pokazal, da cinkov pirition ni zaviralno vplival na % kalitve semen, ampak zgolj na dolžino korenčic. Z Allium testom smo ugotovili, da je povečana koncentracija cinkovega piritiona povzročila krajšanje korenin čebul in nižji mitotski indeks. Ob povečani koncentraciji kemikalije se je število preživelih solinskih rakcev zmanjševalo. V javanskem mahu smo ob prisotnosti cinkovega piritiona izmerili povečanje količine klorofila a in b ter zmanjšanje količine karotenoidov.

ABSTRACT

In over-the-counter transactions, there are many products that contain harmful chemicals. One of these is zinc pyrithione, the active substance found in anti-dandruff shampoos and also found in the coatings for ships (protection against fouling). When we rinse our hair after using the shampoo and paint the hulls of ships, this chemical passes into the aquatic environment and comes into contact with many unintended organisms. In this research project, we want to assess the impact of this chemical on various living organisms. With various tests, we wanted to determine the influence of zinc pyrithione on various organisms and to evaluate its potential toxicity.

The Lepidium test showed that zinc pyrithione did not inhibit the germination of seeds of garden cress, but merely the growth and length of their roots. With the Allium test we have proven that the increased concentration of zinc pyrithione causes a decrease in the roots of onions and a lower mitotic index. With the method of spectroscopy, the higher concentration of zinc pyrithione resulted in the formation of a higher amount of chlorophyll a and b and smaller quantities of carotenoids. At the Artemia test, however, with the increased concentration of the chemical, the number of survivors was reduced.

ZAHVALA

Zahvaljujeva se svojim profesorjem za posredovano znanje, predvsem najini mentorici za inspiracijo, vložen trud in pogon za delo, ki ga črpava od nje.

1 UVOD

Milijoni potrošnikov po vsem svetu vsak dan uporabljajo različne proizvode za osebno nego, čistila in fitofarmacevtska sredstva s pestro kemijsko sestavo. Tako se lahko v odplakah iz hišnih kanalov znajde raznolika mešanica detergentov, šamponov in ostalih kemikalij, ki na tak način vstopajo v vodno okolje. Ena izmed teh je tudi cinkov pirition, ki se že leta uporablja v številnih šamponih proti prhljaju, od nedavno pa ga zaradi prepovedi tributilina vključujejo tudi v antivegetativne premaze (premazi proti obrasti, t.i. »antifouling« premazi) za velike ladje. Z izpiranjem las, po uporabi šampona in s premazovanjem ladijskih trupov prehaja cinkov pirition v vodno okolje in lahko vpliva na druge žive organizme, ki prihajajo z njim v stik.

Ob vseh teh podatkih nas je zanimalo kakšen je vpliv te kemikalije na naše zdravje in druge žive organizme. Raziskovalno nalogo smo se odločili napisati z namenom pritegniti pozornost ljudi na to kemikalijo, ki ima lahko kljub svoji koristni večnamenski uporabi tudi potencialne škodljive učinke. Z raziskavo pa smo želeli razširiti znanje o cinkovem piritionu ter tako pripomoči k ohranjanju zdravja, zaščiti okolja in organizmov v njem.

1.1 Raziskovalna vprašanja

Z nalogo smo želeli odgovoriti na naslednja raziskovalna vprašanja:

1. Kakšen je vpliv različnih koncentracij cinkovega piritiona na % kalitve vrtno kreše (*Lepidium sativum L.*)?
2. Kakšen je vpliv različnih koncentracij cinkovega piritiona na dolžino korenčic kalčkov vrtno kreše (*Lepidium sativum L.*)?
3. Kakšen je vpliv različnih koncentracij cinkovega piritiona na dolžino korenin čebule (*Allium cepa L.*)?
4. Kakšen je vpliv cinkovega piritiona na delitev celic koreninskega vršička čebule (*Allium cepa L.*)?
5. Kakšen je vpliv cinkovega piritiona na količino fotosintetskih pigmentov pri vodni rastlini javanski mah (*Vesicularia dubyana*)?
6. Kakšen vpliv ima cinkov pirition na preživetje solinskih rakcev vrste *Artemia salina* in kakšna je njegova LC50 vrednost za to vrsto?

Učinek cinkovega piritiona in njegovo potencialno toksičnost smo preverili z različnimi testi. To so *Lepidium* test (test z vrtno krešo), *Allium* test (čebulni test), *Artemia* test (s solinskimi rakci), za merjenje količine klorofila pa smo uporabili metodo s spektroskopijo.

1.2 Delovne hipoteze

1. Z večanjem koncentracij cinkovega piritona bo % kalitve semen vrtno kreše manjši.

V raziskavi o fitotoksični aktivnosti različnih cinkovih pripravkov ugotavljajo, da imajo le-ti pomemben inhibitorski učinek na kalitev vrtno kreše (Moukrad, 2014).

2. Z večanjem koncentracije cinkovega piritona bodo dolžine korenčic kalčkov vrtno kreše vrste *Lepidium sativum* krajše.

Moukrad in ostali (2014) so v svoji raziskavi ugotovili, da ima cinkov oksid zaviralni učinek na rast semen *Lepidium sativum*. Aktivna inhibitorska aktivnost je zelo pomembna in nepovratna v prisotnosti cinkovega oksida, sintetiziranega iz cinkovega sulfata heptahidrata. ZnO se zdi učinkovit pri zaviranju mitotske aktivnosti celic v delitvi korenin. Zato predpostavljamo, da bodo koreninice vrtno kreše ob dodatku cinkovega piritona počasneje rasle.

3. Cinkov piriton bo zaviralno vplival na rast korenin čebule.

Arambašič s sodelavci (1994) v svoji raziskavi ugotavlja, da imajo težke kovine, med njimi tudi cink, zaviralni vpliv na dolžino korenin čebule. Lin in Xing (2007) sta preučevala učinek 5 nanodelcev na rast korenin šestih različnih višjih rastlin (med njimi so krompir, kumara in solata ...) in ugotovila, da sta Zn in ZnO inhibirala rast korenin. Zato ob teh raziskavah predpostavljamo, da bodo koreninice čebule ob dodatku cinkovega piritona počasneje rasle.

4. Večja kot bo koncentracija cinkovega piritona nižji bo mitotski indeks pri čebulah (*Allium cepa*).

Demir s sodelavci (2014) je dokazal, da delci ZnO povzročijo primarno škodo na DNA v meristemskih celicah korenin *A. cepa*. Rezultati kažejo, da ima genotoksični učinek, ki kaže na neposredno razmerje med odmerkom in učinkom.

5. Večje koncentracije cinkovega piritiona bodo pri javanskem vodnem mahu (*Taxiphyllum barbieri*) povzročile zmanjšanje količine fotosintetskih pigmentov.

Rastline hitro absorbirajo veliko strupenih težkih kovin. Ko so te enkrat absorbirane, prodrejo v rastlinska tkiva (vključno z listi) in pri višjih koncentracijah lahko preprečijo fotosintezo. Cink se lahko vključi v razgradnjo stromalnih beljakovin kloroplastov (Zvezdanović in Marković, 2009). Tudi Bertrand in Poirier (2005) v svoji raziskavi ugotavljata, da so v prisotnosti cinka in ostalih težkih kovin na ravni kloroplasta opazne spremembe vsebnosti pigmentov in peroksidacije lipidov. Neorganizirani tilakoidi zmanjšujejo učinkovitost fotosinteze. Calvinov cikel je tudi manj učinkovit in fotosintetski organizem počasneje raste. Zato smo sklepali, da se bo dodatku cinkovega piritiona količina fotosintetskih pigmentov zmanjšala.

6. Z daljšanjem izpostavljenosti in višanjem koncentracije cinkovega piritiona se bo večala smrtnost navplijev solinskih rakcev (*Artemia salina*), pričakovana 24 urna LC50 vrednost bo v okviru od 2 – 4 mg/L.

Montanher in Pizzolatti (2002) ter Carballo s sodelavci (2002) so v raziskavah ugotovili, da ima cinkov pirition toksičen učinek na vodne organizme in da lahko že pri majhnih koncentracijah (0.0078 mg/L) povzroča visoko smrtnost testnih organizmov. Koutsaftis in Aoyama (2007) sta v svoji raziskavi vpliva sredstev za obraščanje na solinske rakce določila 24 urno LC50 za cinkov pirition v mejah med 2.45 do 3.88 mg/L, na podlagi česar tudi mi pričakujemo podobne vrednosti.

2 TEORETIČNE OSNOVE

2.1 Toksikološki testi

Kemična onesnažila v okolju lahko vplivajo na vse ravni življenja – od mikroorganizmov, rastlin, gliv, živali do človeka. Za oceno njihovega vpliva in potencialno nevarnost za žive organizme so razvili več metod, ki obsegajo tudi standardizirane toksikološke teste za specifično skupino organizmov v različnih življenjskih okoljih.

2.1.1 *Lepidium* test

Test z vrtno krešo (*Lepidium sativum* L.) je eden izmed bolj znanih toksikoloških testov.

Vrtna kreša je enoletnica in jo uvrščamo v družino križnic. Seme vrtno kreše raste zelo hitro in kali od tri do pet dni, njen plod je lušček (Martinčič in ostali, 1999). Od spomladi do jeseni raste na prostem kjerkoli v zelenjavnem vrtu. Pozimi jo sejemo v lončke, ki jih postavimo na svetlo okensko polico. Je nezahtevna in hitro raste. Režemo jo, ko je visoka okrog 6 cm. Je izrazitega okusa in zdrava zelenjava za celo leto. Kalčki najbolje uspevajo pri sobni temperaturi, to je od 21 °C do 22 °C, prenizka ali previsoka temperatura pa bi lahko upočasnila kaljenje (Semenarna, 2018). Vrtna kreša je občutljiva vrsta, ki se pogosto uporablja v toksikoloških testih, saj hitro kali in raste, je poceni in enostavna za analiziranje.

2.1.2 *Allium* test

Čebula (znanstveno ime *Allium cepa*) je rastlina iz družine lukovk (Alliaceae), ki se široko uporablja v prehrani. Del čebule, ki se uporablja v prehrani, je podzemna čebulica, ki jo gradijo sočni luskolisti - odebeljene listne nožnice, v katerih rastlina hrani založne in obrambne snovi. Je ena najstarejših zelenjav, ki jih pozna človek in jih lahko najdemo v veliko receptih in pripravkih vseh kultur na svetu.

Čebulno tkivo se pogosto uporablja pri pouku biologije za demonstracijo uporabe mikroskopa, saj ima čebula relativno velike celice, ki jih je lahko opazovati pri majhni povečavi.

Ta metoda je lahka, dostopna, enostavna in zelo občutljiva za ugotavljanje in ocenitev splošne strupenosti okoljskih vzorcev, obremenjenih z različnimi kemikalijami. Kaj hitro ugotovimo

odzivnost rasti testne rastline mlade čebule vrste *Allium cepa* L. Rezultati testa so pomembni in pomirjeno rečeno zelo primerljivi z rezultati podobnih testov (Firbas, 2010). Splošni *Allium* toksični test temelji na različno hitri rasti in dolžini korenin testnih rastlin mlade čebule vrste *Allium cepa* L. v preiskanih vodnih medijih, ki so obremenjeni z najrazličnejšimi kemikalijami, saj strupene kemikalije zaustavljajo in inhibirajo oziroma 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 krajše kot so korenine testnih rastlin večja je splošna strupenost (Firbas, 2010).

Testni sistem vključuje občutljivo metodo za ocenitev genotoksičnih učinkovin na celičnem nivoju testne rastline *Allium cepa* L. zaradi vplivov najrazličnejše kemizacije okolja. Citološke raziskave dajejo dragocene podatke o celični delitvi (mitozi) in posledicah motenj v mitozi sami (Levan, 1938, Fiskesjö, 1985). Samo ime testa *Allium* anafazno-telofazni test pove, da se morebitne poškodbe najbolje in najpogosteje pokažejo v anafazi in telofazi celične delitve (Rank, 2003). Negativni učinki se odražajo s citotoksičnimi in genotoksičnimi posledicami. Toksični učinki se zaznajo v omejeni rasti ali celični smrtnosti; genotoksični učinki pa v poškodbah kromatina, kot na primer: anafazni most in fragmenti kromosomov, izgubljen (vagrant chromosome) kromosom, piknoze v profazi in anafazi, semilunarna, tripolarna (multipolarna) anafaza in c-mitoza (Firbas, 2010). Gre torej za odstotkovno razmerje med vsemi metafaznimi celicami in s metafaznimi celicami s poškodbami kromosomov (Al-Sabti 1985, 1989; Firbas 2004, 2006). Pregleda se do 200 metafaznih celic, pri visoki ravni genotoksičnosti pa največ do 100 celic.

Allium metafazni test služi ugotavljanju splošne celične toksičnosti (citotoksičnosti) in ravni genotoksičnosti (mutagenosti) v vodnih, kopenskih in zračnih ekosistemih, kjer dokazujemo prisotnost genotoksičnih (mutagenih) snovi. Test je kratkotrajen (72 + 5 ur) in pokaže celovit in sinergičen učinek vseh prisotnih nevarnih snovi. Test temelji na sinergičnih učinkih na dedni zapis testne rastline *Allium cepa* L. Glede na univerzalnost genetskega koda je test aplikabilen na človeka. Postopek dela je enak kot pri *Allium* anafazno-telofaznem testu, le da pred fiksiranjem, cele čebule s koreninami vred tretiramo v vodni raztopini kolhicina. Rezultati se ob koncu statistično ovrednotijo. Gre za število metafaznih celic na 1000 pregledanih celic. Indeks ima vrednosti med 20 in 100 ‰ (promilnih točk).

2.1.2.1 Mitotski indeks

Mitotski indeks se uporablja za merjenje hitrosti razmnoževanja celične populacije. Definiran je kot razmerje med številom celic v mitotični fazi in skupnim številom celic. Indeks je število celic, ki vsebujejo vidne kromosome, deljeno s skupnim številom celic v vidnem polju. Mitotski indeks je pogosto izražen v %. Celična populacija raste, ko celice preidejo skozi interfazo in mitozo ter zaključijo celični cikel. Mnoge celice s staranjem izgubijo zmožnost delitve ali se le redko delijo. Druge celice so sposobne hitro deliti. Na primer, ko korenine rastline rastejo, se celice na koreninskem rastnem vršičku, apikalnem meristemu, delijo hitreje, zato da potisnejo korenino skozi zemljo. Korenina zazna silo gravitacije in ukaže hitro delitev celic v bližini koreninskega rastnega vršička. 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 skupini celic, ki redko dopolnijo celični cikel, pričakujemo, da bo velik delež celic v interfazi v celičnem ciklu (G1). Pri celični populaciji, ki se hitro deli, pa lahko pričakujemo, da bo velik delež celic v fazi mitoze. Delitev celic lahko izračunamo s pomočjo mitotskega indeksa. Večanje mitotskega indeksa je po navadi povezano s krajšanjem interfaze (Jagodič, 2014). Višji mitotski indeks pomeni hitrejšo rast ali pa raka (nekontrolirano rast – pri človeku).

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

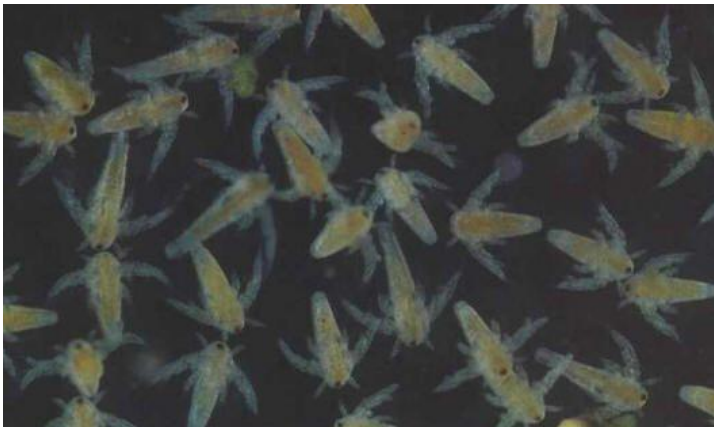
2.1.3 Artemia test

Solinski rakci (*Artemia salina*) so izjemno stara vrsta od 8 – 10 mm velikih vodnih rakov iz skupine škrgonožcev (Anostraca). Tolerirajo velike spremembe slanosti okolja, znani so predvsem po tem, da lahko preživijo tudi v ekstremno slanih območjih. Zato so pogosti v slaniščih, tudi v Sečoveljskih solinah. Razmnožujejo se hitro, lahko tudi partenogenetsko. V neugodnih razmerah odložijo oplojena jajčeca, ki so izsušena in obdana z debelo steno (ciste), ki lahko počakajo na ugodne razmere tudi do 50 let. Po izvalitvi se razvije ličinka, imenovana navplij, ki se že v enem tednu preobrazi v odraslo žival (Banister, 1985).

Zaradi dostopnosti, nizke cene in enostavnega gojenja so solinski rakci eni najpomembnejših organizmov za ekotoksikološke teste. Predlagani so tudi kot testni organizem za toksikološke raziskave nanodelcev (Rajabi, 2015).

Pri Artemia testu izpostavimo 24 ur stare ličinke, navplije različnim koncentracijam potencialno toksičnih snovi in ugotavljamo preživetje po eni uri, 24 in 48 urah. Določimo lahko tudi vrednost LC50 za določeno substanco. Primeren je tudi za določanje toksičnosti težkih kovin, ki se akumulirajo v organizmih vzdolž prehranjevalnih verig (Montanher in ostali, 2002).

Ličinke med Artemia testom ne prejmejo hrane, zato je treba zagotoviti, da se smrtnost, ugotovljena v biološkem testu, lahko pripiše bioaktivnim spojinam in ne stradanju; to se stori s primerjavo mrtvih ličink pri vsaki koncentraciji z mrtvimi ličinkami v kontroli. V vsakem primeru lahko navpliji preživijo do 48 ur brez hrane, ker se še vedno hranijo na jajčni vrečki. Vendar pa se v primerih, ko so odkrite smrti v kontroli, odstotek smrtnosti (% M) izračuna kot: $\% M = \text{odstotek preživetja pri kontroli} - \text{odstotek preživetja pri različnih koncentracijah}$ (Carballo in ostali, 2002).



Slika 1: Navpliji solinskih rakcev (<http://www.aquareja.si/izdelek/47/artemija>)

2.2 Javanski mah

Pri metodi s spektroskopijo sva uporabili javanski vodni mah. Ta rastlina je dolgo časa bila zaznamovana pod napačnim latinskim imenom *Vesicularia dubyana*, ki pa so ga pred kratkim preimenovali v *Taxiphyllum barbieri* (Kukovec, 2017).



Slika 2: Javanski mah (<http://www.aquaticplantcentral.com/forumapc/plantfinder/images/Hypnaceae/Javamoss.jpg>)

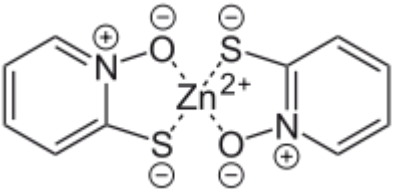
Rastlina je temno zelene barve, ki se nato glede na pogoje spreminja v svetlejšo zeleno. Pojavijo se tudi odtenki rjave in rdeče. Mah raste v vodi, delno v vodi in delno na kopnem, ter v celoti na kopnem. Torej ga lahko uporabimo tako v akvaristiki kot v teraristiki. V akvariju ima značilno zeleno barvo, na kopnem pa se pogosto pojavita tudi rjava in rdeča barva. Na nitkah, ki jih vidimo, je ogromno majhnih lističev, ki skupaj tvorijo značilen videz vseh mahov. Pravih korenin nima razvitih. Javanski vodni mah je med akvaristi zelo razširjen. Lahko ga je vzdrževati in dokaj hitro raste. Zelo prav pride v drstnih akvarijih in na sploh v skupinskih akvarijih, ker se mladice lahko skrijejo vanj pred plenilci, ki prežijo nanje. Poleg zatočišča lahko male ribice v mahu najdejo tudi svojo prvo hrano, saj se med strukturo naselijo male živalice, ki so tako ali drugače pomembne za obstoj ekosistema oziroma v akvariju pomagajo vzdrževati biološko ravnovesje. Raste na vseh površinah, zato ga lahko z nitko, laksom oziroma ribiško vrvico ali pa kar z gumico pritrdimo na različne površine, kot so korenine, kamni, plastika, glineni lonci itd. Tako dobimo zelo razgibano in lepo razraščeno okolje. Lahko ga celo pritrdimo na tla in nam služi kot preproga. Za vzdrževanje prave višine, ga nato s škarjami obrezujemo na željeno velikost.

Sistematika: *Plantae* (Haeckel, 1866 – rastline) - *Viridaeplantae* (Cavalier-Smith, 1981 – zelene rastline) - *Bryophyta* (A. Braun in Ascherson, 1860 – mahovi) - *Musci* (Linnaeus, 1753; Cavalier-Smith, 1998) - *Bryatae* (Cavalier-Smith, 1998) - *Bryopsida* (pravi mahovi) – *Hypnales* – *Hypnaceae* – *Taxiphyllum* - *barbieri* (Cardot & Coppey in Coppey; Iwatsuki, 1982).

- Tuja imena: Java moss, Wassermoos
- Domovina: jugovzhodna Azija, Indija, Filipini
- Ogroženost: v naravi vrsta ni ogrožena; vir: IUCN rdeča lista 2006
- Velikost: zraste ~ 10 cm v višino, v širino neomejena razrast
- Temperatura: 15° – 28°
- Voda: pH 5.0 – 9.0; dGH 5 – 15
- Osvetlitev: od šibke do srednje močne; pri šibkejši osvetlitvi je barva maha temno zelena, lahko se pokažejo tudi odtenki rjavkaste barve
- Hitrost rasti: srednje hitra; viri navajajo tako počasno kot hitro rast, odvisno je od pogojev, ki jih rastlina ima.

(Kukovec, 2017)

2.3 Cinkov piriton

		FIZIKALNE LASTNOSTI
Kemijska formula	C ₁₀ H ₈ N ₂ O ₂ S ₂ Zn	Izgled: brezbarvna trdnina
Ime (IUPAC)	bis(2-piridiltio)cinkov 1,1'-dioksid	Tališče: 240 °C
Molska masa	317.70 g/mol	Topilo: voda

(DrugBank, 2010)

Cinkov piriton je koordinacijski kompleks, sestavljen iz piritionskih ligandov, kelatiranih na cinkove (2+) ione preko kisikovih in žveplovih centrov. Gre za kompleks cinkovega iona in piritiona, derivata naravne antibiotične aspergilne kisline z antimikrobnimi, protiglivičnimi in anti-seboroičnimi učinki (PubChem, 2018). V kristalnem stanju obstaja kot centrosimetrični

dimer. Zaradi njegovih fungističnih in bakteriostatičnih lastnosti, se uporablja kot aktivna sestavina za zdravljenje prhljaja in seboroičnega dermatitisa (DrugBank, 2010). Ponavadi se pojavlja v šamponih za lajšanje prhljaja (na primer Fitoval - šampon za poškodovane lase). Nahaja pa se tudi v zdravilih proti luskavici, glivičnim okužbam, suhi koži, uporablja pa se tudi za zaščito pred plesnijo (Sanchez-Bayo in Goka, 2006). Druge uporabe cinkovega piritiona vključujejo dodatke v barvah in algecidih. Čeprav natančen mehanizem delovanja še vedno ni popolnoma pojasnjen, se zdi, da cinkov piriton moti membranski transport ionov in metabolitov, kar vodi v izgubo presnovnega nadzora. Poleg tega to sredstvo povzroči priliv bakra, kar vodi v zmanjšanje aktivnosti železo-žveplovih beljakovin, kar povzroči inhibicijo rasti (PubChem, 2018).

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

- Poti vstopa: vdihavanje, koža, oči, zaužitje.
- Kemijske interakcije: ni znanih interakcij.
- Oteženi zdravstveni pogoji: boleznimi mišic in živcev.

Takojšnji (akutni) učinki na zdravje:

- Vdihavanje - strupenost: zmerno strupeno pri vdihavanju.
- Vdihavanje - draženje: visoke koncentracije lahko rahlo dražijo oči, nos, grlo in pljuča.
- Stik s kožo: pričakovati je, da ne bo prišlo do pomembnih neželenih učinkov na zdravje zaradi dermalnih stikov.
- Absorpcija kože: lahko se absorbira skozi kožo, vendar ni verjetno, da bo prišlo do škodljivih učinkov razen če je kontakt podaljšan, ponovljen in obsežen.
- Stik z očmi: lahko povzroči hudo draženje, ki ga sestavljajo rdečina, oteklina in izcedek sluznice v konjunktivo. Za vsako okvaro vida ali poškodbo roženice se pričakuje, da se bo počistila v nekaj dneh.
- Zaužitje - strupenost: 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.

- Akutna toksičnost ciljnega organa: oči.

Dolgotrajni (kronični) zdravstveni učinki:

- Kancerogenost: ta snov ni povzročila raka pri dolgotrajnih študijah na živalih.
- Reprodukтивna in razvojna toksičnost: opazili so ju pri laboratorijskih živalih samo pri velikih odmerkih, ki so bili materno strupeni.
- Preobčutljivost: ta material je pokazal negativne rezultate za preobčutljivost kože pri ljudeh in laboratorijskih živalih.
- Vdihavanje: ni znanih ali poročanih učinkov kronične izpostavljenosti, razen za učinke, podobne kot pri akutni izpostavljenosti.
- Koža - absorpcija: pri glodavcih so opazili mišično oslabelost pri dolgotrajni in podaljšani izpostavljenosti ustne votline in kože. Pri testiranju opic se takšne ugotovitve niso zgodile.
- Zaužitje: proizvodnja bruhanja bi zagotovila zaščito pred sistemsko toksičnostjo. Kronična toksičnost preko te poti je zelo malo verjetna.
- Toksičnost za kronični ciljni organ: ni znanih ali poročanih učinkov za človeka ob ponavljajočem izpostavljanju temu izdelku.

Toksičnost za živali:

- Akutna toksičnost: za vrednost LD50 ustne votline pri opicah je bilo ugotovljeno, da je $> 1.000 \text{ mg / kg}$ in temelji na študiju akutne toksičnosti, pri kateri je bil prašek cinkovega piritiona ustno dajan v želatinski kapsuli dvema moškima opicama (Javanski makak).
- Subkronična / kronična toksičnost: atrofija skeletnih mišic je bila opažena pri peroralni in dermalni izpostavljenosti podgan piritionskim spojinam. Izpostavljenost opic, ob večkratnem dajanju odmerka, ki so ga uporabili na podganah, ni pokazala nobene poškodbe mišic ali živcev. Čeprav so ti učinki možni pri izpostavljenosti človeka, ocena toksikoloških podatkov o živalih pove, da zgornji učinki niso verjetni glede na uporabo industrijskih izdelkov.
- Reprodukтивna in razvojna toksičnost: reprodukтивно ali razvojno toksičnost so opazili pri živalih le pri velikih odmerkih, ki so bili materno toksični.

- Mutagenost in kancerogenost: Ta kemikalija je pokazala, da ni mutagena, kar temelji na testnih preskusih in ni povzročila raka pri dolgotrajnih študijah na živalih.

(Arch Chemicals, Inc., 2003)

2.3.1 Pregled objav

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 (0.0078 mg/L) povzroča visoko smrtnost testnih organizmov. Do enakih sklepov sta prišla v svoji raziskavi tudi Koutsaftis in Aoyama (2007) (Toxicity of four antifouling biocides and their mixtures on the brine shrimp *Artemia salina*), kjer sta med drugim določala tudi toksičnost cinkovega piritiona na solinske rakce. V svojem članku opozarjata tudi na vse večjo splošno nevarnost vpliva biocidov na netarčne organizme.

Sanchez-Bayo in Goka (2006) sta v raziskavi z naslovom Ecological effects of the insecticide imidacloprid and a pollutant from antidandruff shampoo in experimental rice fields, opazovala ekološke spremembe, ki jih povzroča cinkov pirition na riževih poljih skozi kultivacijsko obdobje. Opazovali so ličinke mušic in ugotovili, da je toksičnost cinkovega piritiona povzročila na teh poljih dramatično zmanjšanje ličink.

Sanchez-Bayo in Goka (2005) sta v raziskavi Unexpected effects of zinc pyriithione and imidacloprid on Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*) preučevala vpliv cinkovega piritiona na ribe vrste japonska medaka (*Oryzias latipes*). Ugotovila sta, da je kemikalija strupena za te ribe in povzroča tudi teratogene učinke, kot so deformacije hrbtenjače v zarodkih pri zelo nizkih, subletalnih koncentracijah. Povzroči pa tudi stresni sindrom pri mladoletnih ribah, pri čemer so ribe z riževih polj, tretiranih s cinkovim piritionom, imele znatno manjšo maso glede na razmerje z dolžino telesa kot tiste iz kontrolnih polj.

Arch Chemicals, Inc. (2003) so v članku ZINC OMADINE® FPS AQ. DISP. IND. BACTERICIDE & FUNGICIDE opredelili akutne in kronične učinke cinkovega piritiona na zdravje in njegovo toksičnost za živali.

PubChem (2018) pa v članku ZnPT zapiše, da cinkov pirition moti membranski transport ionov in metabolitov, kar vodi v izgubo presnovnega nadzora. Poleg tega to sredstvo povzroči priliv bakra, kar vodi v zmanjšanje aktivnosti železo-žveplovih beljakovin, kar povzroči inhibicijo rasti.

Številni članki obravnavajo tudi negativne vplive ostalih spojin, ki vsebujejo cink in se sproščajo v vodno okolje.

Moukrad in ostali (2014) so v svoji raziskavi dokazali, da imajo nanodelci cinkovega oksida pomemben inhibitorni učinek na kalitev in rast semen vrtna kreše *Lepidium sativum*.

Arambašič s sodelavci (1994) v svoji raziskavi - 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 ugotavlja, da imajo težke kovine, med njimi tudi cink, zaviralni vpliv na dolžino koreninic čebule. Tudi Lin in Xing (2007) sta v strokovnem članku (Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth) zapisala, da sta Zn in ZnO inhibirala rast koreninic.

Demir s sodelavci (2014) je v članku Genotoxic effects of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles on root meristem cells of Allium cepa by comet assay dokazal, da delci ZnO povzročijo primarno škodo na DNA v meristemskih celicah koreninic *A. cepa*. Tudi Tsonev in Lidon (2012) sta v članku Zinc in plants - An overview prišla do enakih zaključkov.

Bertrand in Poirier (2005) v svoji raziskavi Photosynthetic organisms and excess of metals ugotavljata, da so v prisotnosti cinka na ravni kloroplasta opazne spremembe vsebnosti pigmentov in peroksidacije lipidov. Neorganizirani tilakoidi zmanjšujejo učinkovitost fotosinteze. Calvinov cikel je tudi manj učinkovit in fotosintetski organizem počasneje raste.

3 MATERIAL IN METODE DELA

3.1 MATERIAL

3.1.1 Zaščitna oprema

- Zaščitne rokavice za enkratno uporabo (velikost M, Sogeva),
- zaščitna halja (Lauffenmühle),
- zaščitna očala (3M).

3.1.2 Osnovni material

- Voda iz pipe,
- aluminijasta folija,
- alkoholni flumaster.

3.1.3 Kemikalije

- Cinkov piriton (Zinc Omadine 48 % FPS je f. Arch Chemicals, Inc., Velika Britanija),
- 96 % etanol (Sigma-Aldrich),
- 99,8 % led očetna kislina (Sigma-Aldrich),
- destilirana voda,
- kisli orcein (barvilo; Sigma-Aldrich),
- kuhinjska sol (NaCl).



Slika 3: Kisli orcein in prenosni gorilnik (lastni vir)

3.1.4 Laboratorijski pribor

- Steklena palčka,
- tapetniški nožek,
- posoda za vodno kopel,
- milimetrsko ravnilo,
- kapalka,
- bireta
- injekcijska brizgalka,
- filtrirni MN 615, premera 125 mm),
- epruvete (premera 1,5 cm; dolžine 10 cm),
- terilnica in pestilo,
- merilni valj (250 mL),
- erlenmajerice (100 mL),
- plastične petrijevke (premera 6 cm),
- centrifugirke (15 mL)
- lesena prijemalka,
- vžigalice,
- alkoholni flomaster,
- kivete,
- pinceta in nož,
- čaše (1 L),
- avtomatska pipeta Transferpette S (1-10 mL, 100-1000 μ L, 10-100 μ L)
- sterilni nastavki za pipeto (1-10 mL, 100-1000 μ L, 10-100 μ L).



Slika 4: Bireta, terilnica in pestilo (lastni vir)



Slika 5: Stereomikroskop (lastni vir)



Slika 6: Petrijevke, čaše, kapalka (lastni vir)



Slika 7: Avtomatske pipete (lastni vir)

3.1.5 Laboratorijske aparature

- Centrifuga (LC - 321; Tehtnica Železniki),
- prenosni računalnik z računalniškim programom LoggerPro,
- prenosni gorilnik (Campinggaz),
- spektrofotometer (Vernier),
- hladilnik (+4°C, Gorenje),
- elektronska tehtnica (Kern; z natančnostjo 0,01 g),
- mikroskop (Leica ICC50) in pribor za mikroskopiranje.



Slika 8: Centrifuga (lastni vir)



Slika 9: Tehtnica (lastni vir)

3.2 METODE DE LA

3.2.1 LEPIDIUM TEST

3.2.1.1 Material

- 16 enako velikih petrijevk (90 x 15 mm),
- 8 litrskih čaš,
- filtrirni papir,
- brizga,
- kapalka,
- cinkov pirition (Zinc Omadine 48 % FPS je f. Arch Chemicals, Inc., Velika Britanija),
- ravnilo,
- avtomatske pipete s pripadajočimi nastavki (1-10 μ l in 100 – 1000 μ l),
- semena vrtna kreše (*Lepidium sativum*),
- navadna voda,
- alkoholni flomaster,
- škarje.



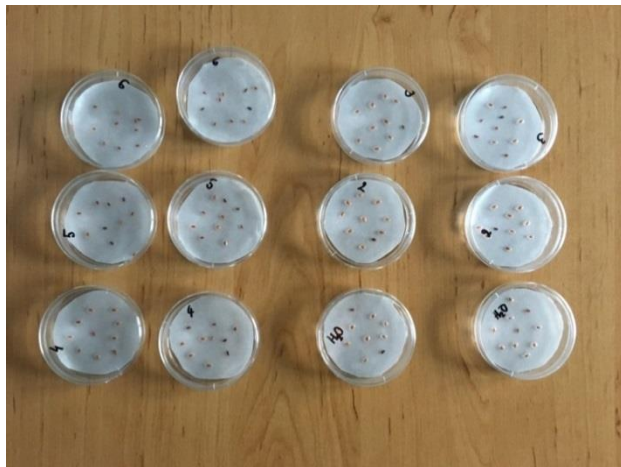
Slika 10: Semena vrtna kreše (lastni vir)

3.2.1.2 Priprava koncentracij

Za koncentracijo 2 $\mu\text{l/L}$ smo v čašo nalili 1 liter vode, nato pa vanjo odpipetirali 2 μl 48% suspenzije cinkovega piritiona in vse skupaj s stekleno palčko dobro premešali. Postopek smo ponovili in tako naredili še koncentracije 3 $\mu\text{l/L}$, 4 $\mu\text{l/L}$, 5 $\mu\text{l/L}$ in 6 $\mu\text{l/L}$. Naredili smo še dve koncentraciji z nekoliko povečano količino cinkovega piritona, in sicer 0,1 ml/L in 0,3 ml/L. Čaše z raztopinami smo želeli shraniti za ponovno uporabo, zato smo jih zavili v folije in shranili v temnem prostoru, saj naj bi cinkov piriton na svetlobi razpadal (Thomas in ostali, 2001 in 2009).

3.2.1.3 Priprava petrijevke

Izrezali smo ustrezno velike kroge iz filtrirnega papirja, da so se natančno prilegali dnu petrijevke. Nato smo s pomočjo brizge podlago vsake izmed petrijevke namočili z različnimi koncentracijami cinkovega piritona, kontrolni petrijevki pa z vodo (2 mL/petrijevko). Za vsako koncentracijo smo pripravili dve ponovitvi. Nato smo na omočeno podlago v vsako petrijevko enakomerno razporedili po deset semen vrtne kreše. Petrijevke smo položili v temen prostor. Po 24 h smo v petrijevke dodali po 1 mL raztopine ustrezne koncentracije, po dveh dneh pa smo izmerili dolžino korenčic in določili % kaljivosti.



Slika 11: Petrijevke s po 10 semeni vrtne kreše (lastni vir)

3.2.2 Čebulni test (ALLIUM TEST)

Metoda povzeta po Arambašiču in ostalih (1994).

3.2.2.1 Material

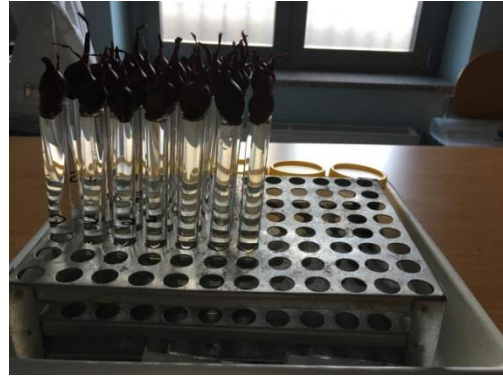
- Čebula vrste *Allium cepa* L. (trgovina Kalia; Semenarna Ljubljana) s premerom 1,5-2,0 cm,
- 96 % etanol (Sigma-Aldrich),
- 99,8 % led očetna kislina (Sigma-Aldrich),
- kisli orcein (barvilo; Sigma-Aldrich),
- gorilnik, vžigalice, lesena prijemalka,
- epruveta, steklena petrijevka in pinceta,
- mikroskop (Leica ICC50) in pribor za mikroskopiranje.

3.2.2.2 Nastavitev čebulic

Izbrali smo 56 čebulic, ki morajo biti približno enake velikosti. Vsaki čebulici smo z nožem previdno odrezali 2 do 3 mm sloja spodnje rjave plasti s posušenimi koreninami, zato da je tkivo izvorne korenine izpostavljeno vplivu preskusne raztopine. Pri tem smo pazili, da je čebulni krožec ostal nepoškodovan (Klančnik, 2009). Pripravili smo koncentracije z enakim postopkom kot pri *Lepidium* testu in naredili 2 $\mu\text{l/L}$, 3 $\mu\text{l/L}$, 4 $\mu\text{l/L}$, 5 $\mu\text{l/L}$, 6 $\mu\text{l/L}$ in 0.1 mL/L ter 0.3 mL/L. Kontrolo je predstavljala voda. Za vsako koncentracijo smo uporabili 5 epruвет, ki smo jih do vrha napolnili s preskusnimi raztopinami. Tretirane čebulice smo nato ločeno položili na vrh epruвет, izberemo čebulice take velikosti, da so se lepo usedle na vrat epruвет, da je bilo izhlapevanje tekočin čim manjše. Vse skupaj smo pustili 24 ur in s kapalko dodali količino porabljene raztopine ali v primeru kontrole - vode. Postopek smo ponovili po nadaljnjih 24 h. Po treh dnevih smo čebulice odstranili iz epruвет in jim z milimetrskim ravnilom izmerili dolžine desetih najdaljših koreninic (Arambašič in ostali, 1994).



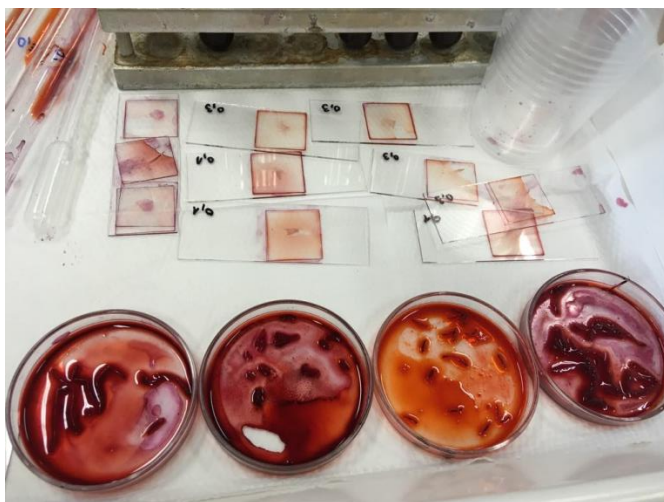
Slika 12: Nastavitev čebulic (lastni vir)



Slika 13: Čebulice v epruveh (lastni vir)

Po izmerjenih dolžinah najdaljših korenin vsake od 5 čebulic pri 7 različnih koncentracijah in kontroli, smo te korenine pomočili v fiksativ, sestavljen iz 96 % etanola ter 99,8 % led očetne kisline v razmerju 3:1. Po enem dnevu smo jih odstranili iz fiksativa ter koreninske vršičke obarvali, tako da smo jih položili v epruvete in dodali barvilo kisli orcein. Epruvete smo z leseno prijemalko držali nad prenosnim gorilnikom in počakali, da kisli orcein dvakrat zavre. Tako obarvane koreninske vršičke smo posamično prenesli na objektna stekla, nanje kanili kapljico kislega orceina ter preko položili krovno steklo. S pomočjo topega konca svinčnika smo koreninske vršičke nežno zmečkali ter vsak preparate za vsako koncentracijo preučili pod mikroskopom.

Pod mikroskopom smo poiskali meristemsko regijo koreninskih vršičkov in določili fazo celičnega cikla od 100 do 200 skupaj ležečim celicam vsakega preparata. Nato smo izračunali mitotski indeks.



Slika 14: Priprava mikroskopskih preparatov (lastni vir)

3.2.3 METODA S SPEKTROSKOPIJO

3.2.3.1 Material

- Terilnica in pestilo,
- etanol (96 %, Sigma Aldrich),
- centrifuga (LC - 321; Tehnica Železniki),
- centrifugirke (15 mL),
- avtomatske pipete s pripadajočimi nastavki LLG Micropipette (100 do 1000 μ l),
- spektrofotometer: Vernier SpectroVis Plus Spectrophotometer,
- kivete (makro, Ratiolab),
- računalnik s programom (LoggerPro),
- analitska tehnica (Kern, z natančnostjo 0,01 g).



Slika 15: Javanski vodni mah (lastni vir)

3.2.3.2 Potek dela

Najprej smo tri akvarije (12 L) napolnili z javanskim mahom ter dolili vodo. V prvi akvarij, ki je predstavljal kontrolo, nismo dodali cinkovega piritiona, v drugega smo dodali koncentracijo 6 μ l/L cinkovega piritiona, v tretji akvarij pa koncentracijo 1,2 μ l/L. Vse akvarije smo pustili stati en mesec. Akvarije smo opremili z napravami za filtriranje. Po enem mesecu smo rastline vzeli iz akvarija in s pomočjo metode s spektroskopijo izračunali vrednost posameznih fotosintetskih pigmentov (klorofila a, klorofila b in karotenoidov).

Pigmente iz rastline smo pridobili tako, da smo 0,5 g rastlinskega materiala homogenizirali v sterilnici skupaj s 10 mL etanola, ohlajenega na 4 C. Pridobljeno zmes smo dali v centrifugirke (15 mL) in jo centrifugirali 15 minut pri 10 000 rpm (obratih). Po končanem centrifugiranju smo odpipetirali 0,5 mL supernatanta in mu dodali 4,5 mL ohlajenega etanola. S spektrofotometrom smo izmerili absorbanco pri 470 nm, 649 nm in 664 nm.

Količino klorofila a, klorofila b in karotenoidov smo izračunali po naslednji formuli (metoda povzeta po Lichtenthaler in Buschmann, 2001):

$$\text{Ch-a} = 13,36 \times A_{664} - 5,19 \times A_{649}$$

$$\text{Ch-b} = 27,43 \times A_{649} - 8,12 \times A_{664}$$

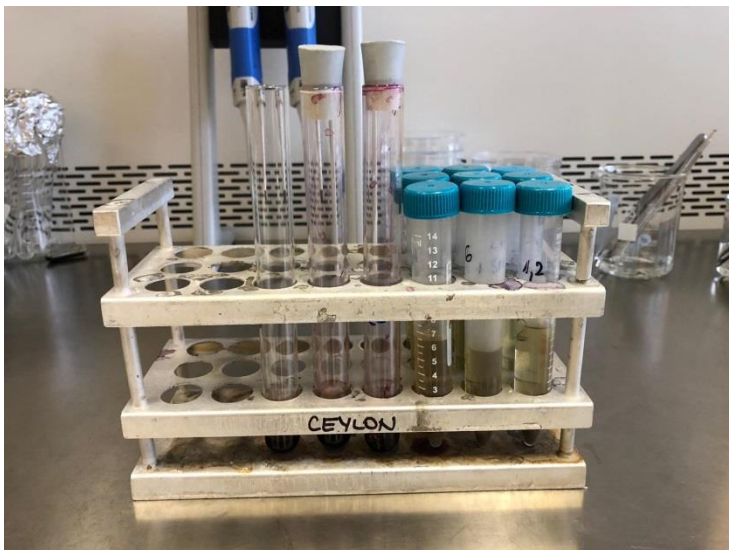
$$\text{Cx+c} = (1000 \times A_{470} - 2,13 \times \text{Ch-a} - 97,63 \times \text{Ch-b}) \div 209$$

A = absorbanca

Ch-a = klorofil a

Ch-b = klorofil b

Cx+c = karotenoidi

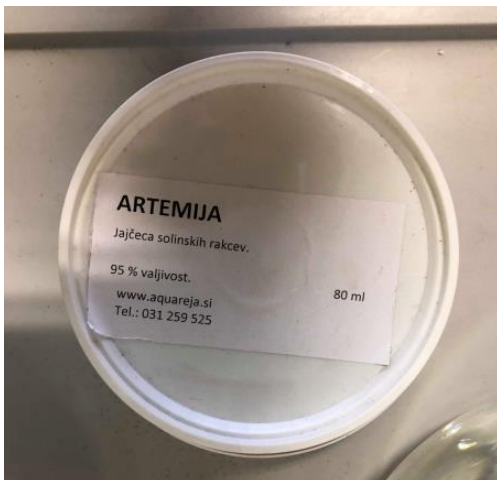


Slika 16: Centrifugirke (lastni vir)

3.2.4 ARTEMIA TEST

3.2.4.1 Material

- Stereomikroskop (Leica 2000),
- dve stekleni posodi (2,8 L),
- kuhinjska sol,
- plastične žličke,
- jajčeca solinskih rakcev (*Artemia salina*),
- dve cevki za zračenje brez razpršilnega kamenčka,
- kapalka,
- petrijevke,
- steklene palčke za mešanje.



Slika 17: Jajčeca solinskih rakcev (lastni vir)

3.2.4.2 Potek dela

Uporabili smo dve prozorni steklenici (2,8 L) in ju do vrha napolnili z vodo. Preračunali smo količini soli in jajčec solinskih rakcev, ki ju je bilo potrebno vmešati v vodo, glede na naš volumen (metoda povzeta po <http://www.aquareja.si/izdelek/47/artemija>). V vsako steklenico (2,8 L) smo dali 4,6 plastičnih žličk soli in dodali 5,7 plastičnih žličk jajčec solinskih rakcev. Dodali smo zračenje brez razpršilnega kamenčka, cevko pa namestili do dna steklenice. Po 24 urah so se rakci (navpliji) izvalili. S kapalko smo prenesli v vsako petrijevko po 10 navplijev in dodali različne koncentracije cinkovega piritona. Koncentracije smo naredili v 1 L čašah, napolnjenih z vodo in naredili 2 $\mu\text{l/L}$, 4 $\mu\text{l/L}$, 6 $\mu\text{l/L}$, 50 $\mu\text{l/L}$ in 150 $\mu\text{l/L}$. V vsako čašo pa

smo dodali tudi 1,7 plastične žličke kuhinjske soli (NaCl). Kontrolo je predstavljala 1 L čaša, napolnjena z vodo, v katero smo dodali samo 1,7 žlice soli. Za vsako koncentracijo in kontrolo smo pripravili tri petrijevke. S pomočjo stereomikroskopa smo prešteli število preživelih rakcev po 1 h, po 2 h in po 24 h. Ličinke so veljale za mrtve, če v nekaj sekundah opazovanja niso pokazale nobenega notranjega ali zunanjšega gibanja. Nato smo iz dobljenih rezultatov razbrali LC50.



Slika 18: Jajčeca solinskih rakcev pred valjenjem (lastni vir)



Slika 19: Ličinke solinskih rakcev po valjenju (lastni vir)



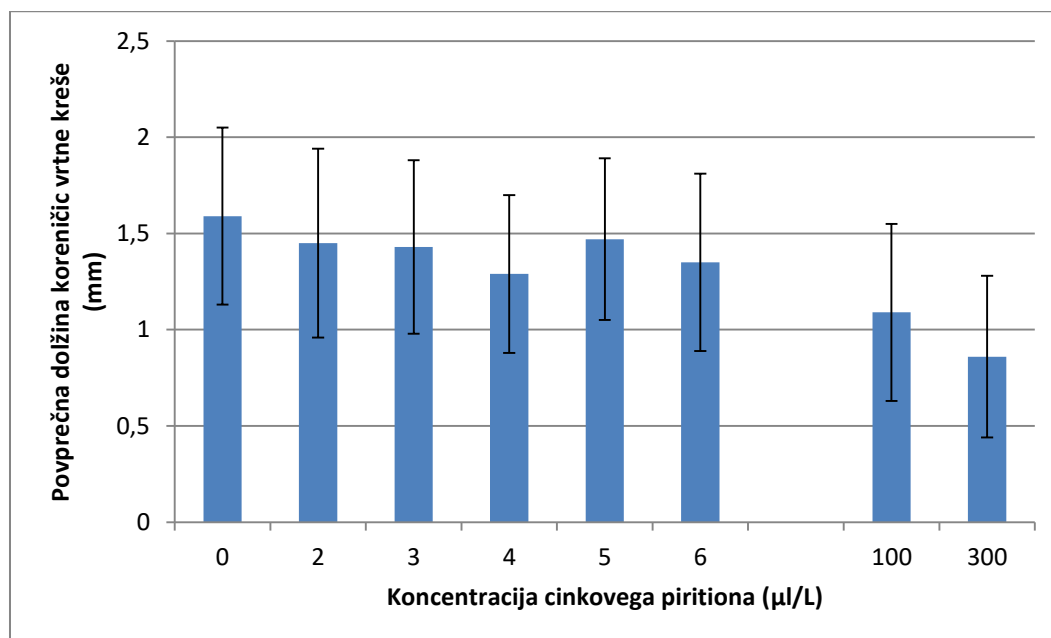
Slika 20: Opazovanje ličink pod stereomikroskopom (lastni vir)

4 REZULTATI

4.1 *Lepidium* test

Tabela 1: Povprečna vrednost dolžine korenčic (mm) vrtno kreše (*Lepidium sativum*) in % kalitve pri različnih koncentracijah ($\mu\text{l/L}$) cinkovega piritiona.

Koncentracija cinkovega piritiona ($\mu\text{l/L}$)	Povprečna vrednost dolžine korenčic (mm)	% kalitve
0	1,59	100
2	1,45	100
3	1,43	100
4	1,29	100
5	1,47	100
6	1,35	100
100	1,09	100
300	0,86	100



Graf 1: Povprečna vrednost dolžine korenčic (mm) vrtno kreše (*Lepidium sativum*) pri različnih koncentracijah ($\mu\text{l/L}$) cinkovega piritiona.

Koreninice kalčkov vrtno kreše so pri koncentracijah 4 $\mu\text{l/L}$, 100 $\mu\text{l/L}$ in 300 $\mu\text{l/L}$ krajše kot pri kontroli ($p < 0,05$).

4.2 Allium test

4.2.1 Merjenje dolžine koreninic

Tabela 2: Povprečna vrednost dolžine koreninic (mm) čebule (*Allium cepa* L.) pri različnih koncentracijah ($\mu\text{l/L}$) cinkovega piritiona.

Koncentracija cinkovega piritiona ($\mu\text{l/L}$)	Povprečna vrednost dolžine koreninic (mm)
0	27,3
2	11,0
3	15,1
4	15,4
5	17,0
6	18,6
100	4,9
300	5,9



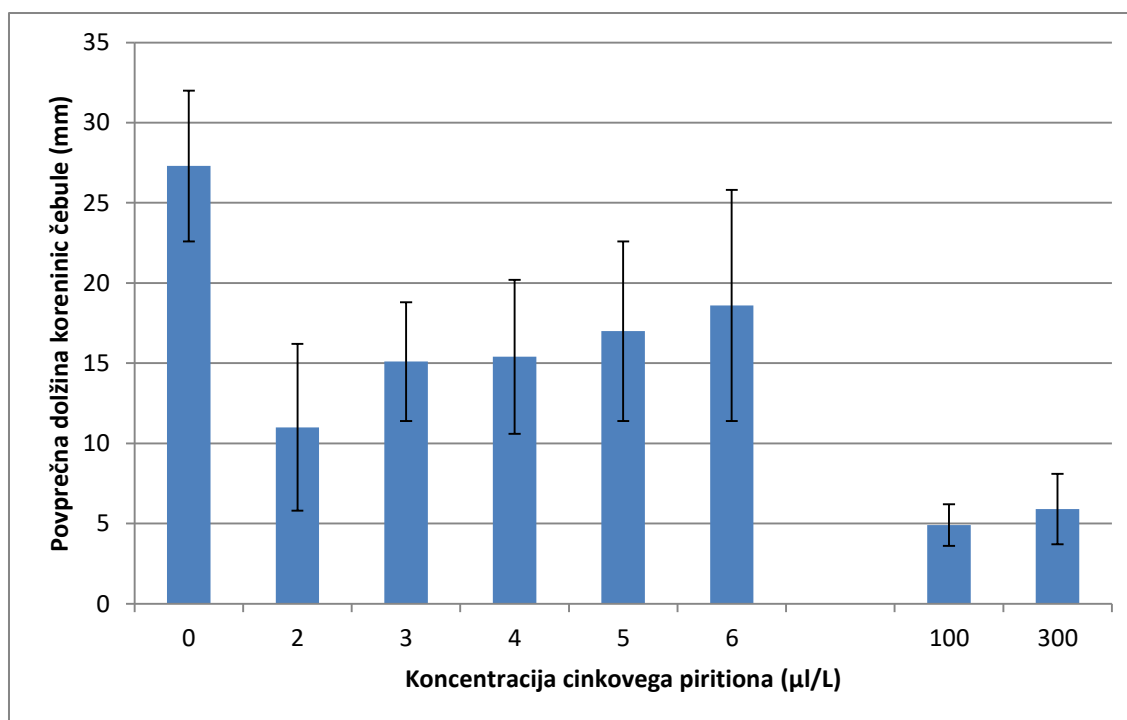
Slika 21: Čebule po Allium testu pri vodi (lastni vir)



Slika 22: Čebule po Allium testu pri koncentraciji 100 $\mu\text{l/L}$ (lastni vir)



Slika 23: Čebule po Allium testu pri koncentraciji 300 $\mu\text{l/L}$ (lastni vir)



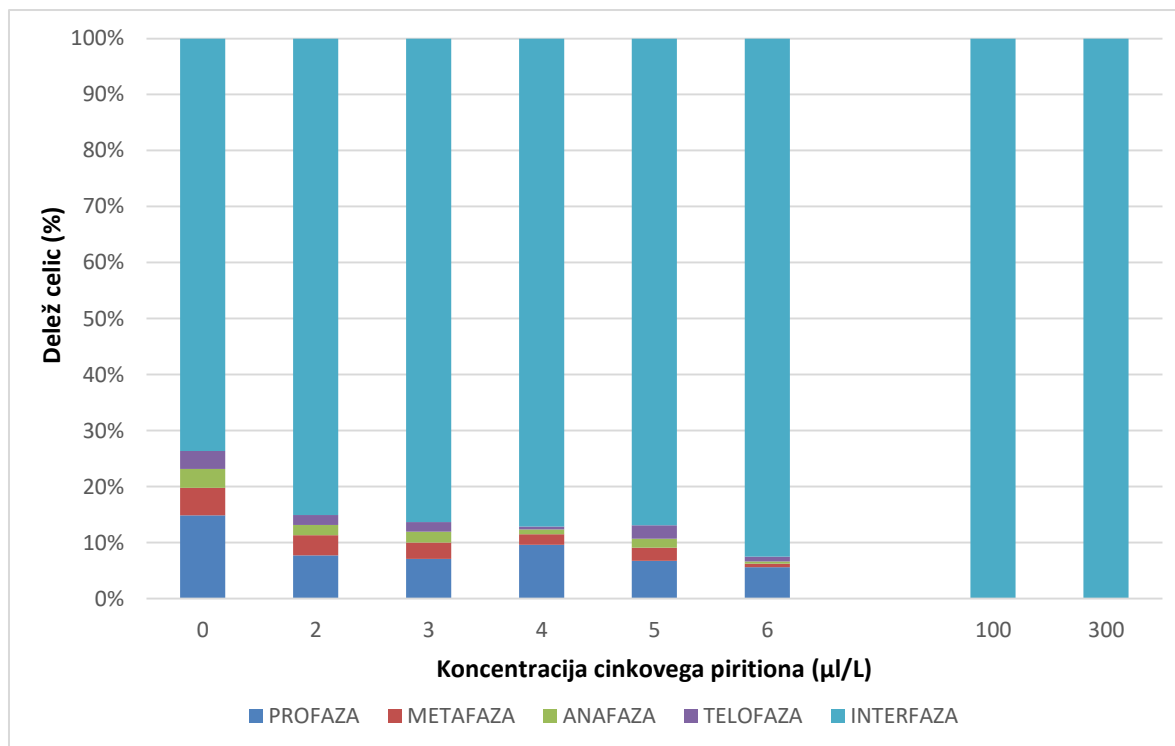
Graf 2: Povprečna vrednost dolžine koreninic (mm) čebule (*Allium cepa L.*) pri različnih koncentracijah (µl/L) cinkovega piritiona.

Dolžine koreninic čebule so bile v prisotnosti cinkovega piritiona krajše kot pri kontroli ($p < 0,05$), višje koncentracije cinkovega piritiona (100 in 300 µl/L) so delovale na rast bolj zaviralno kot nižje ($p < 0,05$).

4.2.2 Mitotski indeks

Tabela 3: Delež (%) celic koreninskega vršička čebule (*Allium cepa L.*) v posamezni fazi mitoze pri različnih koncentracijah (µl/L) cinkovega piritiona.

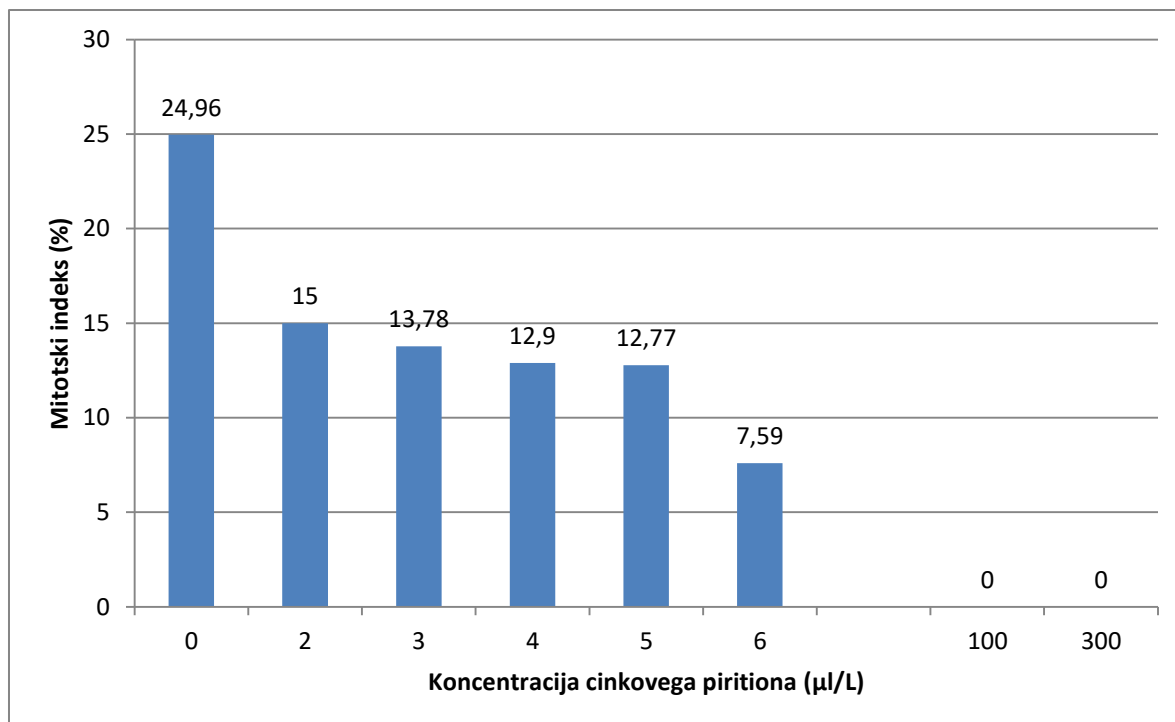
		Koncentracija cinkovega piritiona (µl/L)							
		0	2	3	4	5	6	100	300
Faza mitoze	Profaza	14,88	7,73	7,09	9,59	6,76	5,58	0	0
	Metafaza	4,88	3,61	2,93	1,92	2,39	0,64	0	0
	Anafaza	3,41	1,80	1,96	0,82	1,59	0,43	0	0
	Telofaza	3,17	1,80	1,71	0,55	2,39	0,86	0	0
	Interfaza	73,66	85,05	86,31	87,12	87,28	92,49	100	100



Graf 3: Delež celic (%) koreninskega vršička čebule (*Allium cepa L.*) v posamezni fazi mitoze pri različnih koncentracijah (µl/L) cinkovega piritiona.

Tabela 4: Mitotski indeks (%) delečih se celic koreninskega vršička čebule (*Allium cepa L.*) pri različnih koncentracija (µl/L) cinkovega piritiona.

Koncentracija cinkovega piritiona (µl/L)	Mitotski indeks (%)
0	24,96
2	15,00
3	13,78
4	12,90
5	12,77
6	7,59
100	0
300	0

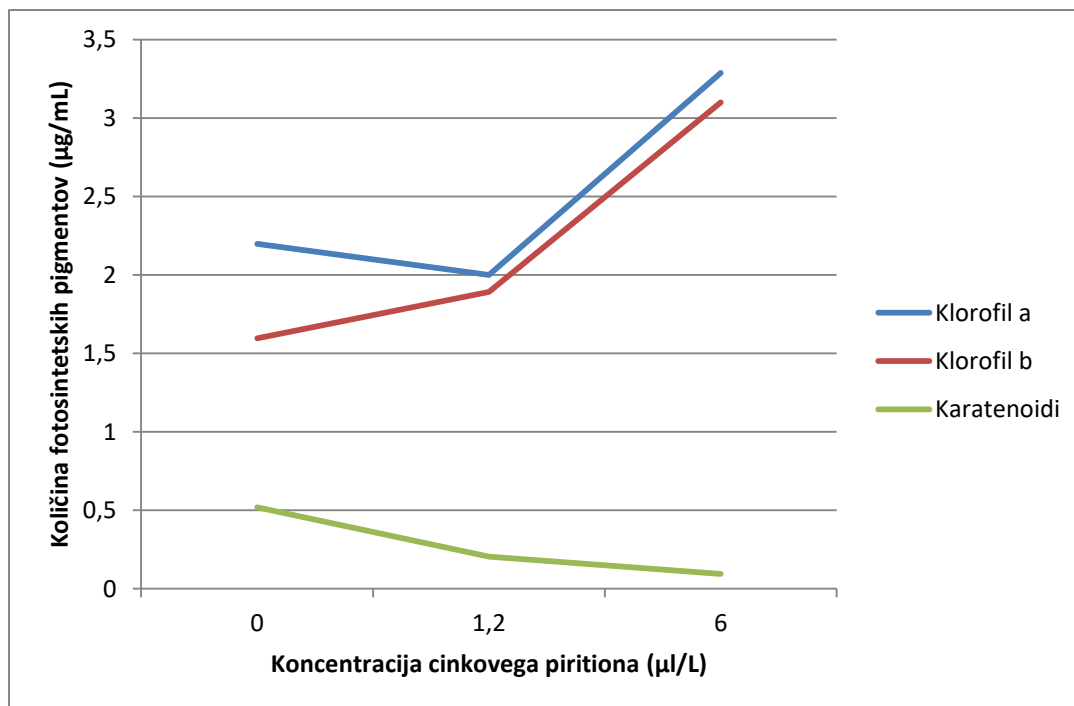


Graf 4: Mitotski indeks (%) delečih se celic koreninskega vršička čebule (*Allium cepa L.*) pri različnih koncentracijah (µl/L) cinkovega piritiona.

4.3 Metoda s spektroskopijo

Tabela 5: Povprečna vrednost količine fotosintetskih pigmentov (µg/mL) pri različnih koncentracijah (µl/L) cinkovega piritiona.

Fotosintetski pigment	Koncentracija cinkovega piritiona (µl/L)		
	0	1,2	6
Klorofil a	2,20	2,00	3,29
Klorofil b	1,60	1,90	3,10
Karotenoidi	0,52	0,20	0,10



Graf 5: Povprečna vrednost količine fotosintetskih pigmentov (µg/mL) pri različnih koncentracijah (µl/L) cinkovega piritiona.

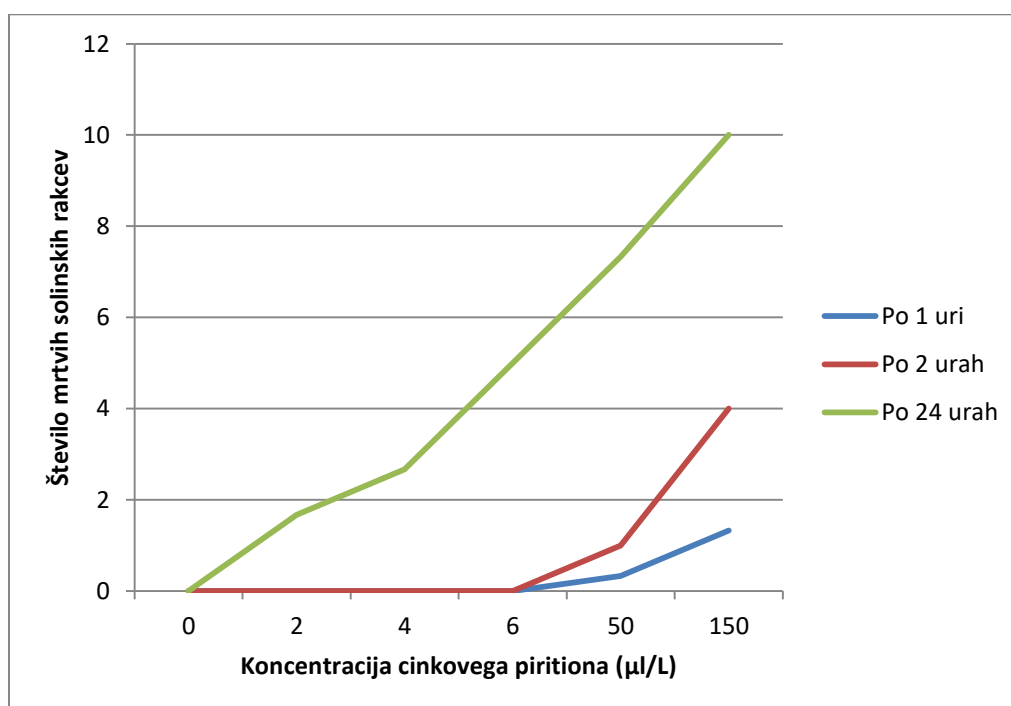
4.4 Artemia test

Tabela 6: Povprečna vrednost števila poginulih solinskih rakcev (*Artemia salina*) od skupno 10 v eni petrijevki pri različnih koncentracijah (µl/L) cinkovega piritiona v različnem časovnem obdobju.

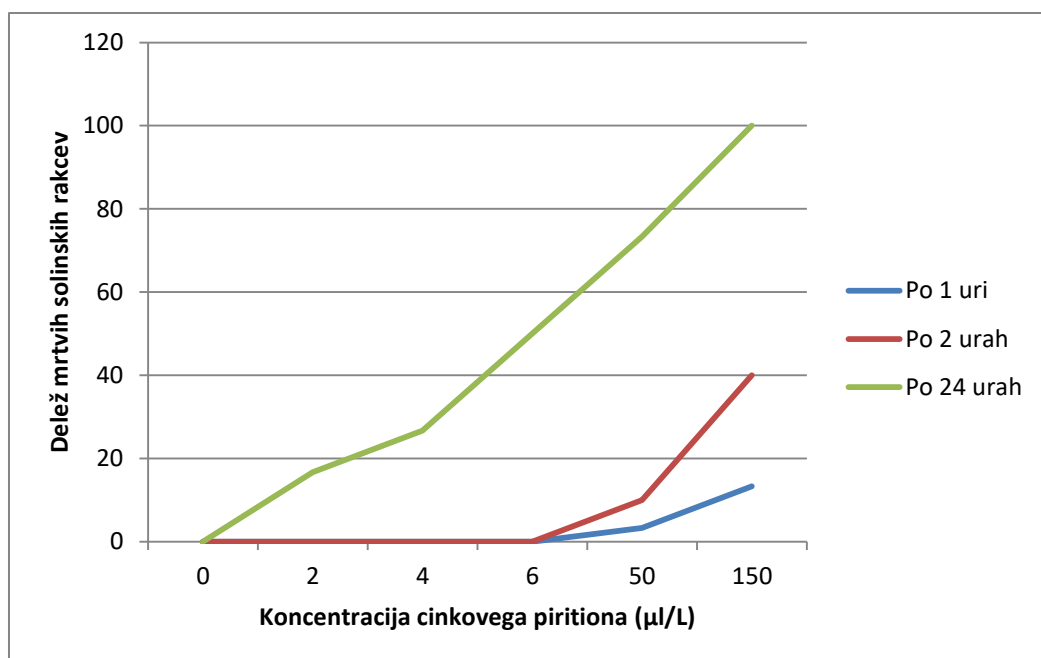
		Koncentracija cinkovega piritiona (µl/L)					
		0	2	4	6	50	150
Časovno obdobje	Po 1 uri	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33	1,33
	Po 2 urah	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	4,00
	Po 24 urah	0,00	1,67	2,67	5,00	7,33	10,00

Tabela 7: Povprečna vrednost deleža (%) poginulih solinskih rakcev (*Artemia salina*) od skupno 10 v eni petrijevki pri različnih koncentracijah ($\mu\text{L/L}$) cinkovega piritiona v različnem časovnem obdobju.

		Koncentracija cinkovega piritiona ($\mu\text{L/L}$)					
		0	2	4	6	50	150
Časovno obdobje	Po 1 uri	0,0	0,0	0,0	0,0	3,3	13,3
	Po 2 urah	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0	40,0
	Po 24 urah	0,0	16,7	26,7	50,0	73,3	100,0



Graf 6: Povprečna vrednost števila poginulih solinskih rakcev (*Artemia salina*) od skupno 10 v eni petrijevki pri različnih koncentracijah ($\mu\text{L/L}$) cinkovega piritiona v različnem časovnem obdobju.



Graf 7: Povprečna vrednost deleža (%) poginulih solinskih rakcev (*Artemia salina*) od skupno 10 v eni petrijevki pri različnih koncentracijah (µl/L) cinkovega piritiona v različnem časovnem obdobju.

LC50 po 24 urah za cinkov piritiona (48 % suspenzija) znaša 6 µl/L.

5 RAZPRAVA

Hipotezo 1 moramo ovreči, saj je bila kalitev vrtno kreše 100%, vsa semena pri vseh koncentracijah cinkovega piritona so namreč vzkalila (tabela 1). Cinkov piriton v našem primeru torej ni zaviral celotne kalitve, ampak je vplival zaviralno le na dolžino korenčic, oziroma povzročil počasnejšo rast le teh. Najverjetneje smo uporabili prenizke koncentracije cinkovega piritona, da bi zavrli začetek kalitve.

Hipotezo 2 lahko potrdimo, saj je viden trend zmanjševanja dolžine korenčic kalčkov semen vrtno kreše vrste *Lepidium sativum* z večanjem koncentracije cinkovega piritona (graf 1). Odstopa le dolžina korenčic pri koncentraciji 5 $\mu\text{l/L}$ in 6 $\mu\text{l/L}$. Dolžine korenčic pri 100 in 300 $\mu\text{l/L}$ so pomembno krajše kot pri kontroli in korenčice pri ostalih uporabljenih koncentracijah ($p < 0,5$). Kot izhodišče za ta toksikološki test nam je služila strokovna raziskava Arambašiča in ostalih (1994), ki je pokazala padajoči trend dolžine korenčic vrtno kreše ob povečanju koncentracije ZnSO_4 . Tudi Moukrad in sodelavci (2014) so ugotovili, da ima ZnO zaviralni učinek na rast semen.

Pri večjih koncentracijah cinkovega piritona so dolžine korenčic semen vrtno kreše vrste *Lepidium sativum* krajše, saj se inhibitorna aktivnost kemikalije zaradi večje količine cinka povečuje (Moukrad in ostali, 2014). Cinkov piriton je torej inhibiral rast korenčic, saj je prišlo do razlike med povprečno dolžino korenčic pri kontroli (H_2O) in različnih koncentracijah cinkovega piritona (graf 1 in tabela 1).

Rezultati potrjujejo hipotezo 3 (graf 2), saj je cinkov piriton imel zaviralni vpliv na rast koreninskega vršička čebule vrste *Allium cepa* L., ki so bile v njegovi prisotnosti pomembno krajše kot pri kontroli ($p < 0,5$). Največji učinek cinkovega piritona je bil opazen šele pri večjih koncentracijah (100 $\mu\text{l/L}$ in 300 $\mu\text{l/L}$), kjer so bile koreninice najkrajše (5,9 mm).

S tem smo dokazali splošni toksični učinek cinkovega piritona na celice koreninskega vršička čebule vrste *Allium cepa* L., kar se sklada tudi z rezultati raziskave Arambašiča in ostalih (1994), v kateri so namesto cinkovega piritona uporabili ZnSO_4 . Zaviralni vpliv cinka na rast korenin čebule sta v svoji raziskavi dokazala tudi Lin in Xing (2007).

Hipotezo 4 lahko potrdimo, saj so rezultati genotoksičnega testa pokazali, da se je mitotski indeks zniževal z večanjem koncentracij cinkovega piritona. Delež delečih se celic oziroma celic v mitozu je bil večji pri kontroli (24,96 %) kot pri različnih koncentracijah cinkovega piritona. Pri najnižji koncentraciji cinkovega piritona (2 $\mu\text{l/L}$) je mitotski indeks znašal 15

%, medtem ko je pri obeh največjih koncentracijah cinkovega piritiona (100 $\mu\text{l/L}$ in 300 $\mu\text{l/L}$) znašal 0 %, to pomeni, da se celice sploh niso več delile. Cinkov piriton naj bi povzročal primarno škodo na DNA v meristemskih celicah koreninic (Demir s sodelavci, 2014) in tako nobena celica ni vstopila v fazo delitve. S tem smo tudi na mikroskopskem nivoju potrdili, da je cinkov piriton zaviral rast koreninic čebule vrste *Allium cepa* L., kar smo zaradi podatkov ugotovljenih v strokovnem članku Tsoneva in Lidona (2012) tudi pričakovali.

Hipotezo 5 moramo ovreči, saj v javanskem mahu ni prišlo do zmanjšanja količine klorofila a in klorofila b (tabela 5). Vrednost klorofila a in b se je v prisotnosti cinkovega piritona celo povečala. Drugačen trend je bil opazen pri vrednostih karotenoidov, kjer se je z večanjem koncentracije cinkovega piritona njihova koncentracija zmanjševala.

Predvidevali smo, da bo cinkov piriton zaviral fotosintezo, kot sta zapisala Bertrand in Poirier (2005), vendar očitno ni učinkoval na zmanjšanje vrednosti klorofila v rastlini. Očitno je cinkov piriton zaviral kakšen drug dejavnik v procesu fotosinteze. Rastline v našem poskusu so se morda ravno zaradi omejene fotosinteze odzvale s povečanim proizvodnjem klorofila a in b.

Hipotezo 6 lahko v celoti potrdimo, saj je pri večjih koncentracijah cinkovega piritona število preživelih solinskih rakcev vrste *Artemia salina* res manjše. Rezultati so prav tako pokazali, da dlje kot so bili rakci izpostavljeni preskusni raztopini, manj jih je preživel. Montanher in Pizzolatti (2002) ter Carballo s sodelavci (2002) so v raziskavah ugotovili, da ima cinkov piriton toksičen učinek na vodne organizme in da že pri majhnih koncentracijah (0,0078 mg/L) povzroča smrtnost. Pri svojih eksperimentih so uporabljali čisto kemikalijo, medtem ko smo mi uporabljali 48 % suspenzijo cinkovega piritona. Iz teh razlogov smo močno povečali koncentracije cinkovega piritona, a kljub temu nismo naredili dovolj visoke koncentracije, da bi dosegli LC50 po eni uri. Iz tabele 7 in grafa 7 je razviden LC50 po 24 urah, ki znaša 6 $\mu\text{l/L}$. V raziskavi Koutsaftisa in Aoyame (2007), o vplivu cinkovega piritona na solinske rakce, je bila določena 24 urna LC50 za cinkov piriton v mejah med 2.45 do 3.88 mg/L. To smo vzeli za naše izhodišče, nato pa smo s pomočjo gostote izračunali masno koncentracijo naše suspenzije, ki je znašala 855 mg/mL. S pomočjo tega podatka smo lahko izračunali LC50 za našo suspenzijo (48 %), ki je znašal 5,13 mg/mL, kar je nekoliko višje kot je bilo ugotovljeno v strokovnem članku. Do razlik med vrednostmi LC50 drugih raziskovalcev in med našo vrednostjo je verjetno prišlo zaradi razpada cinkovega piritona ob pripravi raztopin in testnih petrijevk z rakci na svetlobi. Naša dejanska koncentracija cinkovega piritona je bila

zato morda nekoliko nižja in s tem primerljiva z vrednostmi iz literature. Vidimo pa tudi, da večja kot je bila koncentracija cinkovega piritiona večja je bila povprečna vrednost števila in deleža (%) poginulih solinskih rakcev po 1 uri, 2 urah in po 24 urah. Najbolj je to očitno prav pri največji koncentraciji (150 $\mu\text{l/L}$), kjer je po 1 uri poginilo 13,3 %, po 2 urah 40 % in po 24 urah 100 % solinskih rakcev.

Pri kontroli (H_2O) so preživele vse ličinke, zato lahko z gotovostjo trdimo, da se smrtnost, ugotovljena v biološkem testu, lahko pripiše različnim koncentracijam cinkovega piritiona in ne stradanju; v vsakem primeru lahko navpliji preživijo do 48 ur brez hrane, ker se še vedno hranijo iz jajčne vrečke (Carballo in ostali, 2002).

Rezultati naših poskusov kažejo na toksični učinek cinkovega piritiona na vse uporabljene rastlinske in živalske vrste in ga lahko zaradi tega opredelimo kot potencialno grožnjo za okolje, v katerega se z uporabo sprošča. V poskusih so bile uporabljene koncentracije sicer večje kot je dejansko stanje v vodnih ekosistemih. Okolju v prid govori tudi dejstvo, da cinkov piriton na svetlobi hitro razpada, tako da je njegova nevarnost največja v slabo osvetljenih področjih, kjer pretok vode ni velik, na primer pristaniščih.

6 MOŽNI VIRI NAPAK IN IZBOLJŠAVE METOD

Kevin V. Thomas in ostali (2001 in 2009) so v svojih raziskavah ugotovili, da cinkov piriton na svetlobi razpada, zato smo petrijevke s semeni vrtno kreše in navpliji solinskih rakcev postavili v temni prostor (omaro), epruvete s čebulicami pa zavili v alu-folijo. Pri izvedbi poskusa z javanskim mahom smo uporabili svetilko z dnevno svetlobo brez UV dela spektra. V času priprave samih raztopin in njihovega nanašanja, je bila kemikalija izpostavljena svetlobi in možno je, da je prišlo do razpada in s tem nižanja koncentracije uporabljenih raztopin. Ker je bil eksperiment izveden v šolskih prostorih, nismo mogli vzdrževati konstantne optimalne temperature prostora, saj je ponoči temperatura padla zaradi izklopa kurjave.

Do večjih napak bi lahko prišlo tudi pri pripravi raztopin. Ker je vodna suspenzija cinkovega piritiona zelo gosta in viskozna, uporabljene količine pa zelo majhne, se je kljub uporabi avtomatskih pipet pojavil problem natančnega odmerjanja, kar se je najbolj odrazilo pri nizkih koncentracijah. Problem bi lahko rešili z uporabo čiste kemikalije ali pa pripravo večjih

količin raztopin ustreznih koncentracij, saj tako ne bi bilo potrebe po odmerjanju zelo majhnih količin.

Pri določanju mitotskega indeksa je najverjetneje prišlo do napak pri štetju celic, saj je le to odvisno od vsakega posameznika in njegovega subjektivnega prepoznavanja različnih faz celic med samo delitvijo. Prav tako je takšno opazovanje in štetje kar naporno in pri premajhni zbranosti hitro kakšno celico preštejemo dvakrat ali pa jo morda pozabimo prišteti. Kar bi pri poskusu lahko izboljšali je zagotovo štetje celic. Uporabili bi lahko šablono, ki bi vidno polje razdelila na manjše dele (na primer četrtine), kar bi olajšalo samo štetje in pripomoglo k bolj natančnim rezultatom. Poskus bi lahko ponovili z nekoliko višjimi koncentracijami (med 8 in 20 $\mu\text{L/L}$), da bi dokazali nadaljnje padanje vrednosti mitotskega indeksa.

Ker pri metodi s spektroskopijo nismo dobili pričakovanih rezultatov glede količine klorofila a in b, menimo, da je cinkov pirition očitno zaviral kakšen drug dejavnik v procesu fotosinteze, zato bi bilo koristno, da bi merili tudi hitrost fotosinteze.

Ker so solinski rakci zelo majhni in gibljivi, je pri testu z njimi možno, da smo pod stereomikroskopom napačno prešteli njihovo število, kar je vplivalo na kasnejše rezultate. Prav tako je lahko prišlo do napak že v začetnem mešanju raztopin različnih koncentracij, kajti če raztopino nisva dovolj dobro zmešali, se je lahko cinkov pirition usedel na dno in tako volumen, ki sva ga odmerili za v petrijevko, ni bil dovolj koncentriran ter ni imel dovolj velikega vpliva na solinske rakce. Poskus bi veljalo ponoviti z več različnimi in višjimi koncentracijami, da bi bilo mogoče določiti tudi vrednosti LC50 po eni uri.

7 ZAKLJUČEK

Cilj raziskovalne naloge je bilo raziskati možne negativne učinke cinkovega piritiona, ki z vsakodnevno uporabo predstavlja nevarnost okolju in organizmom v njem. Osredotočili smo se predvsem na preučevanje splošne toksičnosti in genotoksičnosti, ter njegovega vpliva na vrednost fotosintetskih pigmentov v rastlinah. Prav tako pa nas je zanimal vpliv cinkovega piritiona na preživetje vodnih organizmov, pri čemer smo spremljali preživetje solinskih rakcev, ki so bili izpostavljeni različnim koncentracijam te kemikalije v različnem časovnem obdobju. Negativni učinki so nas zanimali predvsem zato, ker je to kemikalija, ki se je ljudje poslužujemo skorajda vsak dan, s tem ko si peremo lase, saj je le ta prisotna v različnih šamponih proti prhljaju in se tako znajde v odpadnih vodah in vodnem ekosistemu ter lahko vpliva na netarčne organizme. Cinkov piriton se nahaja tudi v premazih proti obraščanju vodnih plovil in se tako sprošča v morje. Ob prodaji teh izdelkov se poudarjajo le pozitivni učinki cinkovega piritiona, negativni učinki pa pogosto ostajajo v ozadju, oziroma ljudje z njimi sploh niso seznanjeni.

Naše izhodišče so bili številni strokovni članki in raziskave, ki so že opozarjali na toksičnost cinkovega piritona oziroma ostalih pripravkov na osnovi cinka, kot je $ZnSO_4$. Z *Lepidium* testom smo dobili podobne rezultate, kot jih navajajo raziskave, saj je dolžina korenčic semen vrtno kreše (*Lepidium sativum*) v prisotnosti cinkovega piritona značilno krajša ($p < 0,05$). S tem smo dokazali, da je cinkov piriton inhibiral rast korenčic semen vrtno kreše (*Lepidium sativum*).

Toksičnost cinkovega piritona smo raziskovali tudi s pomočjo *Allium* testa, kjer so se pojavile pomembne razlike med dolžino korenin pri kontroli z vodo in pri ostalih epruvetah, ki so vsebovale različne koncentracije cinkovega piritona ($p < 0,05$). Trenda krajšanja korenin z višanjem koncentracije cinkovega piritona nismo ugotovili, najverjetneje zaradi napak pri pripravi raztopin, kjer je bilo zaradi izjemno goste suspenzije težko pripraviti niz zelo podobnih nizkih koncentracij.

V skladu z našimi pričakovanji so bili rezultati genotoksičnega testa, ki so pokazali, da se je mitotski indeks (%) s povečanjem koncentracije cinkovega piritona zmanjševal, s čimer se je zmanjševalo tudi število delečih se celic oziroma celic v fazah mitoze. Pri visokih koncentracijah (100 $\mu\text{l/L}$ in 300 $\mu\text{l/L}$) ni niti ena izmed celic vstopila v fazo delitve, kar

pomeni, da se je rast popolnoma zaustavila. S tem smo tudi na mikroskopskem nivoju potrdili, da je cinkov piriton zaviral rast koreninic čebule (*Allium cepa* L.), kar smo zaradi podatkov, ugotovljenih v strokovnem članku Tsoneva in Lidona (2012), tudi pričakovali.

Rezultati metode s spektroskopijo so nas presenetili, saj smo zaradi Bertrandovega in Poirierjevega (2005) strokovnega članka pričakovali, da bodo pri večjih koncentracijah cinkovega piritona nastale manjše količine klorofila kot pri kontroli (H₂O), kar pa se ni zgodilo. Vrednost klorofila a je pri vodi znašala 2,20 µg/mL, pri največji koncentraciji (6 µl/L) cinkovega piritona pa je, v nasprotju s pričakovanji, ta vrednost močno narastla in znašala kar 3,29 µg/mL. Podobno se je zgodilo tudi pri klorofilu b, kjer je razlika med količino nastalega klorofila b pri vodi in pri največji koncentraciji (6 µl/L) znašala kar 1,50 µg/mL. Pričakovane rezultate smo dobili le pri vrednostih karotenoidov. Bolj kot smo povečali koncentracijo cinkovega piritona, manjša je bila njihova vrednost. Pri vodi je ta vrednost znašala 0,52 µg/mL, pri največji koncentraciji (6 µl/L) pa le 0,10 µg/mL. Ob teh rezultatih ne moremo trditi, da cinkov piriton zavira fotosintezo z zmanjšanjem količine fotosintetskih pigmentov. Cinkov piriton verjetno zavira fotosintezo na drugačen način, javanski vodni mah pa se je morda ravno zaradi zmanjšane fotosinteze odzval s povečanim proizvodnjem klorofila a in b.

Z večanjem koncentracij cinkovega piritona, se je število preživelih solinskih rakcev (*Artemia salina*) občutno manjšalo. Torej večja kot je koncentracija cinkovega piritona, večja je povprečna vrednost števila in deleža (%) poginulih solinskih rakcev po 1 uri, 2 urah in po 24 urah. Rezultati prav tako kažejo, da je tudi čas izpostavljenosti rakcev preskusni raztopini močno vplival na njihovo preživetje. Zaradi nedostopnosti čiste kemikalije in uporabe 48 % suspenzije cinkovega piritona, sva močno povečali koncentracije in pri koncentraciji 6 µl/L po 24 urah dobili LC50, medtem ko so pri največji koncentraciji (150 µl/L) poginili prav vsi solinski rakci. Ob vsem tem pa lahko potrdiva tudi, da je na smrtnost vplival res cinkov piriton, saj so pri kontroli (H₂O) preživele vse ličinke. Tako sva dokazali močno toksičen učinek cinkovega piritona, ki povzroča smrtnost vodnih organizmov.

V raziskovalni nalogi smo se seznanili z nekaterimi negativnimi učinki cinkovega piritona na rastlinske in živalske vrste ter prišli do pomembnih podatkov, ki kažejo na toksični učinek cinkovega piritona. Zaradi tega ta kemikalija predstavlja potencialno grožnjo za okolje in organizme v njem.

8 DRUŽBENA ODGOVORNOST

Tema naše raziskovalne naloge in pridobljeni rezultati kažejo na osnovna načela družbene odgovornosti, saj se je pomembno zavedati številnih stranskih učinkov kozmetičnih izdelkov, pesticidov in zdravil, ki vsebujejo škodljive kemikalije. Želeli smo prispevati k že znanim raziskavam, ob tem pa smo ugotovili, da se v veliki meri poudarjajo samo koristne lastnosti cinkovega piritona, medtem ko se o njegovi škodljivi strani zelo malo govori. Videli smo veliko oglasov o učinkovitosti te kemikalije in izjav ljudi, ki so se rešili prhljaja. Naš cilj je zato bil zagotoviti ljudem čim več podatkov in rezultatov o tej drugi strani cinkovega piritona, ki v javnosti ni tako splošno znana.

Z raziskavo pa smo želeli razširiti znanje o cinkovem piritonu ter tako omogočiti ljudem zavestno izbiro ali bodo izdelke z vsebovano kemikalijo uporabili ali ne in s tem vplivali na svoje zdravje, okolje in organizme v njem.

9 VIRI IN LITERATURA

- ARAMBAŠIĆ, M., BJELIĆ, S. and SUBAKOV, G. (1994). 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. Yugoslavia.
- Arch Chemicals, Inc. (2003). ZINC OMADINE® FPS AQ. DISP. IND. BACTERICIDE & FUNGICIDE. 501 Merritt 7 PO Box 5204 Norwalk, CT 06856-5204
- Aquashop. Solinski rakci. (Pridobljeno iz: http://www.aquashop.si/Product-Kordon-solinski-rakci-113g_8702.aspx?gid=294)
- Banister, K. (1985). Encyclopedia of Aquatic Life. New York: Facts on File, Inc.. (Pridobljeno iz: http://animaldiversity.org/accounts/Artemia_salina/)
- Bertrand, M. and Poirier, I. (2005). Photosynthetic organisms and excess of metals. France.
- Carballo, J., Hernandez-Inda, Z., Perez, P. (2002). A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. Madrid, Spain.
- Dalecki, A. and Wolschendorf, F. (2017). Microbiology of Metal Ions. (Pridobljeno iz: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/zinc-pyrithione>)
- Demir, E. (2014). Genotoxic effects of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles on root meristem cells of *Allium cepa* by comet assay. Department of Biology, Faculty of Sciences, Akdeniz University, Antalya, Turkey
- DrugBank. (2010). Pyrithione zinc. (Pridobljeno iz: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB06815>)
- Evenari, M. (1949). Research Gate. (Pridobljeno iz Germination Inhibitors: https://www.researchgate.net/publication/225341113_Germination_Inhibitors)
- Firbas, P. (2004). Kako zdrava je voda : priročnik za biološki monitoring vode, Ljubljana: ARA Založba
- Firbas, P. (2010). Kemizacija okolja in citogenetske poškodbe, Ekslibris: 2010
- Fiskesjö, G. (1985). The *Allium* test as a standard in environmental monitoring, vol. 102, p. 99-112 25. Gattlen.

- Gill, J. (1982). A study of germination inhibition in fruits. *Journal of Biological Education*....
- Goldschmidt, E. (1976). Endogenous Growth Substances of Citrus Tissues. *Hortscience*.
- Hooper, M. (2009). SOIL TOXICITY AND BIOASSESSMENT TEST METHODS FOR ECOLOGICAL RISK ASSESSMENT. Lubbock, Texas.
- Klančnik, K. (2009). UČINKI NANODELCEV TITANOVEGA DIOKSIDA NA KORENINE NAVADNE ČEBULE (*Allium cepa* L.). Ljubljana.
- Klein, K. and Palefsky, I. (2007). Shampoo Formulation. (Pridobljeno iz: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/zinc-pyrithione>)
- Koutsaftis A, Aoyama I. (2007). Toxicity of four antifouling biocides and their mixtures on the brine shrimp *Artemia salina*. *Sci Total Environ*. 2007 Nov 15;387(1-3):166-74. Epub 2007 Sep 4.
- Kukovec, V. Javanski vodni mah. (Pridobljeno iz: <http://www.akvazin.si/?kat=0302&ID=339>)
- Levan, A. (1938). The effect of colchicine on root mitoses in ALLIUM, *Hereditas*, vol. 24, p. 471-486
- Lichtenthaler, H. K. and Buschmann, C. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. Karlsruhe, Germany.
- Lin, D. and Xing, B. Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth.
- Ljubljana, S. Semenarna ljubljana. (Pridobljeno iz Solatnice - vrtna kreša: <http://www.semenarna.si/solatnice/category/vrtna-kresa>)
- Morton, J. F. (1987). *Fruits of Warm Climates*. Winterville, N.C. : Creative Resource Systems, Inc.
- MONTANHER, A., PIZZOLATTI, M. (2002). An Application of the Brine Shrimp Bioassay for General Screening of Brazilian Medicinal Plants. Brazil.
- Moukrad, N. in ostali. (2014). Phytotoxic activity of the zinc oxyde nanoparticles synthesized from different precursors on germination and radicle growth of seeds *lepidium sativum*. *International Journal of Scientific and Research Publications*, Volume 4, Issue 12, December 2014 1 ISSN 2250-3153

- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=3005837, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3005837> (accessed Feb. 9, 2018).
- PETERSEN, D., DAHLLOF, I. and NIELSEN, L. P. (2003). Effects of zinc pyriithione and copper pyriithione on microbial community function and structure in sediments. Denmark.
- Rajabi, S. in ostali. (2015). Artemia salina as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. (Pridobljeno iz: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4344789/>)
- Rank, J. (2003). The metod of ALLIUM anaphase-telophase chromosome aberation assay, Ekologija, vol. 1, p. 38-42
- Roland, G. (1979). *Gewürze und Krauter von A - Z" (V svetu začimb in dišav)*. Založba Mladinska knjiga in HP Droga Portorož, Ljubljana.
- Sanchez-Bayo, F. in Goka, K. (2006). Ecological effects of the insecticide imidacloprid and a pollutant from antidandruff shampoo in experimental rice fields. Japan: Onogawa.
- Sanchez-Bayo, F. in Goka, K. (2006). Influence of light in acute toxicity bioassays of imidacloprid and zinc pyriithione to zooplankton crustaceans. Japan: Onogawa.
- Sanchez-Bayo, F. in Goka, K. (2005). Unexpected effects of zinc pyriithione and imidacloprid on Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*). Japan: Onogawa.
- Stušek, P., Škornik, S., & Vodnik, D. (2011). *Zgradba in delovanje organizmov*. Ljubljana: DZS.
- Thomas, K. V., McHugh, M. and Waldock M. (2001). Antifouling paint booster biocides in UK coastal waters: inputs, occurrence and environmental fate. *The Science of the Total Environment* 293 (2002) 117–127
- Thomas, K.V. and Brooks, S. (2009). The environmental fate and effects of antifouling paint biocides. Norwegian Institute for Water Research (NIVA), Gausatadalle´en 21, 0349 Oslo, Norway.
- Tsonev, T. and Cebola Lidon, J. F. (2012). Zinc in plants - An overview. Bolgaria and Portugal.
- Upadhyay, R., Sharma, Y. K. and Srivastava, S. (2017). Effects of Zinc Stress on Growth, Photosynthetic Pigments, Antioxidative Enzymes and Protein Content of Black Gram. Department of Botany, University of Lucknow, Lucknow-226007, India.

- Zvezdanović, J. in Marković, D. (2009). Copper, Iron, and Zinc Interactions with Chlorophyll in Extracts of Photosynthetic Pigments Studied by VIS Spectroscopy*. University of Niš, Faculty of Technology, 16000 Leskovac, Serbia

10 PRILOGE

10.1 *Lepidium* test

Tabela 8: Dolžina koreninic (mm) vrtne kreše (*Lepidium sativum*) in njihovo povprečje (mm) pri različnih koncentracijah ($\mu\text{l/L}$) cinkovega piritiona.

Koncentracija cinkovega piritiona ($\mu\text{l/L}$)	Dolžina korenječic (mm)										Povprečna dolžina korenječic (mm)
0	1,9	1,6	2,4	2,5	1,1	1,3	1,3	1,7	1,6	1,5	1,59
0	1,0	1,1	2,0	1,5	1,3	2,0	1,4	1,1	2,4	1,1	
2	1,8	1,6	2,5	1,0	2,0	1,5	1,5	1,0	1,7	0,3	1,45
2	1,9	1,3	1,5	1,4	1,2	2,0	1,5	1,7	0,3	1,2	
3	1,5	1,8	1,4	2,1	1,2	1,3	1,4	1,1	1,4	0,8	1,43
3	1,1	1,1	2,0	1,4	1,1	2,0	1,6	1,1	1,6	1,5	
4	1,5	1,1	1,4	1,6	1,2	1,6	1,5	1,5	1,6	0,9	1,29
4	1,4	1,2	1,3	1,1	0,9	1,3	1,1	1,0	1,2	1,3	
5	1,6	1,5	1,6	2,0	1,5	1,0	1,5	1,6	1,1	0,6	1,47
5	2,5	1,5	1,6	0,7	2,0	1,1	2,0	1,5	1,1	1,3	
6	1,0	2,4	1,3	1,6	1,3	1,1	1,1	0,9	1,2	1,2	1,35
6	1,2	1,1	1,5	1,5	1,1	0,8	0,9	1,9	2,4	1,5	
100	2,1	1,7	0,8	1,2	1,0	1,1	0,9	1,1	0,7	0,4	1,09
100	1,4	1,8	1,0	0,7	1,7	1,1	1,2	0,9	0,6	0,3	
300	1,0	1,5	0,6	1,8	1,1	0,5	0,5	0,6	0,6	0,7	0,86
300	1,0	1,1	0,7	0,6	0,8	0,7	0,4	1,0	1,1	0,8	

10.2 Allium test

Tabela 9: Dolžina petih najdaljših korenčic (mm) čebulic in njihovih povprečij pri različnih koncentracijah cinkovega piritiona ($\mu\text{l/L}$).

Koncentracija cinkovega piritiona ($\mu\text{l/L}$)	Petrijevka	Dolžina korenin (mm)					Povprečna dolžina korenčic (mm)
0	1.	32	34	25	27	22	28
	2.	28	36	41	32	27	32.8
	3.	26	29	28	26	25	26.8
	4.	24	24	26	26	25	25
	5.	29	23	23	27	18	24
2	1.	19	16	13	12	12	14.4
	2.	4	4	9	6	12	7
	3.	20	16	16	15	15	16.4
	4.	6	8	9	9	9	8.2
	5.	18	17	4	3	4	9.2
3	1.	15	15	17	14	12	14.6
	2.	14	18	19	19	21	22.8
	3.	18	15	15	13	10	14.2
	4.	9	9	7	8	18	10.2
	5.	16	15	14	13	10	13.6
4	1.	25	25	20	20	19	21.8
	2.	16	20	18	21	19	18.8
	3.	17	12	8	10	10	11.4
	4.	8	10	12	12	12	10.8
	5.	15	15	14	14	12	14
5	1.	21	22	23	20	20	21.2
	2.	11	12	12	13	15	12.6
	3.	26	25	27	26	24	25.6
	4.	14	14	14	16	13	14.2
	5.	15	10	10	11	11	11.4

6	1.	20	22	20	20	21	20.6
	2.	16	15	13	13	13	14
	3.	28	29	27	30	27	28.2
	4.	25	22	23	22	21	22.6
	5.	10	7	6	9	7	7.8
100	1.	6	6	7	7	7	6.6
	2.	6	6	6	5	4	5.4
	3.	3	4	5	5	6	4.6
	4.	5	5	4	4	3	4.2
	5.	3	3	4	4	4	3.6
300	1.	7	6	6	7	5	6.2
	2.	2	3	3	4	4	3.2
	3.	11	11	9	9	7	9.4
	4.	4	4	5	5	6	4.8
	5.	7	7	6	5	4	5.8

Tabela 10: Povprečna vrednost vseh dolžin koreninic (mm) pri posamezni koncentraciji cinkovega piritiona ($\mu\text{l/L}$).

Koncentracija cinkovega piritiona ($\mu\text{l/L}$)	Povprečna vrednost vseh dolžin koreninic (mm)
0	27,3
2	11
4	15,1
5	17
6	18,6
100	4,9
300	5,9

10.2.1 Mitotski indeks

Tabela 11: Število celic in delež celic koreninskega vršička čebule (*Allium cepa L.*) v posamezni fazi mitoze pri različnih koncentracijah ($\mu\text{l/L}$) cinkovega piritiona.

Koncentracija cinkovega piritiona ($\mu\text{l/L}$)	Faza delitve	Petrijevka			Skupno število celic v vseh treh petrijevkah	Delež celic (%) v vseh treh petrijevkah
		1.	2.	3.		
0	Profaza	14	36	11	61	14,88
	Metafaza	4	11	5	20	4,88
	Anafaza	3	7	4	14	3,41
	Telofaza	3	7	3	13	3,17
	Interfaza	89	116	97	302	73,66
	Skupaj	113	177	120	410	100,00
2	Profaza	7	12	11	30	7,73
	Metafaza	3	6	5	14	3,61
	Anafaza	1	3	3	7	1,80
	Telofaza	2	3	2	7	1,80
	Interfaza	119	113	98	330	85,05
	Skupaj	132	137	119	388	100,00
3	Profaza	10	8	11	29	7,09
	Metafaza	3	4	5	12	2,93
	Anafaza	2	2	4	8	1,96
	Telofaza	2	3	2	7	1,71
	Interfaza	121	125	107	353	86,31
	Skupaj	138	142	129	409	100,00
4	Profaza	9	14	12	35	9,59
	Metafaza	1	5	1	7	1,92
	Anafaza	0	3	0	3	0,82
	Telofaza	0	2	0	2	0,55
	Interfaza	106	96	116	318	87,12
	Skupaj	116	120	129	365	100,00
	Profaza	11	14	9	34	6,76

5	Metafaza	4	2	6	12	2,39
	Anafaza	2	2	4	8	1,59
	Telofaza	5	2	3	12	2,39
	Interfaza	146	131	162	439	87,28
	Skupaj	168	151	184	503	100,00
6	Profaza	9	6	11	26	5,58
	Metafaza	1	1	1	3	0,64
	Anafaza	1	1	0	2	0,43
	Telofaza	2	1	1	4	0,86
	Interfaza	124	133	174	431	92,49
	Skupaj	137	142	187	466	100,00
100	Profaza	0	0	0	0	0
	Metafaza	0	0	0	0	0
	Anafaza	0	0	0	0	0
	Telofaza	0	0	0	0	0
	Interfaza	172	184	156	512	100
	Skupaj	172	184	156	512	100
300	Profaza	0	0	0	0	0
	Metafaza	0	0	0	0	0
	Anafaza	0	0	0	0	0
	Telofaza	0	0	0	0	0
	Interfaza	162	153	146	461	100
	Skupaj	162	153	146	461	100

Tabela 12: Mitotski indeks (%) delečih se celic koreninskega vršička čebule (*Allium cepa* L.) pri različnih koncentracija ($\mu\text{l/L}$) cinkovega piritiona.

Koncentracija cinkovega piritiona ($\mu\text{l/L}$)	Petrijevka			SKUPAJ
	1.	2.	3.	
0	21,24	34,46	19,17	24,96
2	9,85	17,52	17,65	15,00
3	12,32	11,97	17,05	13,78
4	8,62	20,00	10,08	12,90
5	13,10	13,25	11,96	12,77
6	9,50	6,34	6,95	7,59
100	0	0	0	0
300	0	0	0	0

10.3 Metoda s spektroskopijo

Tabela 13: Vrednosti absorbance pri različnih valovnih dolžinah za različne koncentracije ($\mu\text{l/L}$) cinkovega piritiona.

Koncentracija cinkovega piritiona ($\mu\text{l/L}$)	Petrijevka	Valovna dolžina (nm)		
		470,6	649,5	664,4
0	1.	0,266	0,122	0,209
	2.	0,240	0,098	0,173
	3.	0,300	0,138	0,238
1,2	1.	0,298	0,158	0,245
	2.	0,208	0,120	0,187
	3.	0,189	0,106	0,166
6	1.	0,303	0,205	0,325
	2.	0,380	0,223	0,352
	3.	0,304	0,202	0,306

Tabela 14: Količina fotosintetskih pigmentov ($\mu\text{g/mL}$) pri različnih koncentracijah cinkovega piritiona ($\mu\text{l/L}$).

		Koncentracija cinkovega piritiona ($\mu\text{l/L}$)		
Fotosintetski pigment	Petrijevka	0	1,2	6
Klorofil a	1.	2,15906	2,45318	3,27805
	2.	1,80266	1,87552	3,54535
	3.	2,62954	1,66762	3,03978
Klorofil b	1.	1,64938	2,34454	2,98415
	2.	1,28338	1,77316	3,25865
	3.	1,85278	1,55966	3,05614
Karotenoidi	1.	0,48025	0,30563	0,02237
	2.	0,53045	0,14781	0,25984
	3.	0,54312	0,15875	0,00405

Tabela 15: Povprečna vrednost količine fotosintetskih pigmentov ($\mu\text{g/mL}$) pri različnih koncentracijah cinkovega piritiona ($\mu\text{l/L}$).

		Koncentracija cinkovega piritiona ($\mu\text{l/L}$)		
Fotosintetski pigment		0	1,2	6
Klorofil a		2,19709	1,99877	3,28773
Klorofil b		1,59518	1,89245	3,09965
Karotenoidi		0,51794	0,20406	0,09542

10.4 Artemia test

Tabela 16: Število poginulih solinskih rakcev (*Artemia salina*) od skupno 10 v eni petrijevki pri različnih koncentracijah ($\mu\text{l/L}$) cinkovega piritiona v različnem časovnem obdobju.

Koncentracija cinkovega piritiona ($\mu\text{l/L}$)	Petrijevka	Časovno obdobje		
		Po 1 uri	Po 2 urah	Po 24 urah
0	1.	0	0	0
	2.	0	0	0
	3.	0	0	0
2	1.	0	0	2
	2.	0	0	1
	3.	0	0	2
4	1.	0	0	3
	2.	0	0	3
	3.	0	0	2
6	1.	0	0	4
	2.	0	0	5
	3.	0	0	6
50	1.	0	2	8
	2.	1	1	7
	3.	0	0	7
150	1.	1	5	10
	2.	2	4	10
	3.	1	3	10

Tabela 17: Povprečna vrednost števila poginulih solinskih rakcev (*Artemia salina*) od skupno 10 v eni petrijevki pri različnih koncentracijah ($\mu\text{l/L}$) cinkovega piritiona v različnem časovnem obdobju.

Koncentracija cinkovega piritiona ($\mu\text{l/L}$)	Časovno obdobje		
	Po 1 uri	Po 2 urah	Po 24 urah
0	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,00	1,67
4	0,00	0,00	2,67
6	0,00	0,00	5,00
50	0,33	1,00	7,33
150	1,33	4,00	10,00

Tabela 18: Povprečna vrednost deleža (%) poginulih solinskih rakcev (*Artemia salina*) od skupno 10 v eni petrijevki pri različnih koncentracijah ($\mu\text{l/L}$) cinkovega piritiona v različnem časovnem obdobju.

Koncentracija cinkovega piritiona ($\mu\text{l/L}$)	Časovno obdobje		
	Po 1 uri	Po 2 urah	Po 24 urah
0	0,0	0,0	0,0
2	0,0	0,0	16,7
4	0,0	0,0	26,7
6	0,0	0,0	50,0
50	3,3	10,0	73,3
150	13,3	40,0	100,0