

»Mladi za napredek Maribora 2021«

38. srečanje

**VPLIV KONCENTRACIJE BAKRA IN NJEGOVA GENOTOKSIČNOST NA
RASTLINE**

Raziskovalno področje: varstvo okolja

Raziskovalna naloga

PROSTOR ZA NALEPKO

Avtor: LIA ŽUNEC, ŽIVA ŽURGA
Mentor: ANITA MUSTAČ, TAMARA ŠIŠKO
Šola: II. GIMNAZIJA MARIBOR
Število točk: 156 / 170

Maribor, 2021

KAZALO VSEBINE

ZAHVALA	5
POVZETEK.....	6
1. UVOD.....	7
1.1. NAMEN IN CILJI RAZISKOVALNE NALOGE.....	8
1.2. HIPOTEZE:	8
2. TEORETIČNO OZADJE	9
2.1. TEŽKE KOVINE	9
2.1.1. TOKSIČNOST	9
2.1.2. VIRI TEŽKIH KOVIN.....	11
2.1.3. BAKER.....	12
2.1.4. VPLIV TEŽKIH KOVIN NA LJUDI	14
2.1.5. Uporaba bakra v kmetijstvu	15
2.2. VRSTE MOTENJ CELIČNEGA CIKLA (ANOMALIJE)	16
2.2.1 Piknoze	16
2.2.2 C-mitoza.....	16
2.2.3 Izgubljen kromosom	16
2.2.4 Anafazni most	17
2.2.5 Telofazni most	17
2.2.6 Semilunarna anafaza.....	18
2.2.7 Tripolarna anafaza	18
2.2.8 Kromosomski fragmenti	18
2.2.9 Mikronukleus.....	19
2.2. TESTNE RASTLINE	20
2.2.1. JAVANSKI MAH (<i>Vesicularia dubyana</i> sp.).....	20
2.2.2. ČEBULA	20
3. METODE IN MATERIALI	21
3.1 OPIS METOD	21
3.1.1 MITOTSKI INDEKS	21
3.1.2 ALLIUM TEST	21
3.1.3 SPEKTROFOTOMETRIJA	22
3.2 ALLIUM GENOTOKSIČNI TEST	24
3.2.1 Gojenje čebulic (<i>Allium cepa</i> L.) v raztopinah različnih koncentracij bakrovega sulfata pentahidrata ($\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$).....	24

3.2.2 Določanje mitoznega indeksa (MI) in ravni genotoksičnosti na čebulicah	25
3.3 DOLOČEVANJE Cu^{2+} IONOV V EKSTRAKTU JAVANSKEGA MAHA.....	28
4. REZULTATI.....	31
4.1 Allium test	31
a) Merjenje dolžine korenin holandskega rumenega čebulčka (<i>Allium cepa</i>) pri posamezni koncentraciji raztopine CuSO_4	31
b) Določanje mitotskega indeksa (MI) čebule (<i>Allium cepa</i>) v kontroli (navadna voda) in koncentracijah 0,002 g/L, 0,003 g/L, 0,004 g/L, 0,005 g/L in 0,006 g/L CuSO_4	32
4.2 DOLOČEVANJE Cu^{2+} IONOV V EKSTRAKTU JAVANSKEGA MAHA	38
a) Umeritvena krivulja.....	38
b) Absorbance okoliške vode in ekstrakta javanskega maha	39
5. RAZPRAVA.....	41
6. ZAKLJUČEK	46
7. DRUŽBENA ODGOVORNOST	48
8. VIRI	49
9. PRILOGE.....	53

KAZALO SLIK

Slika 1: Piknoze (Firbas, 2011)	16
Slika 2: C-mitoza (Firbas, 2011).....	16
Slika 3: Izgubljen kromosom (Firbas, 2011)	17
Slika 4: Anafazni most (Firbas, 2011).....	17
Slika 5: Telofazni most (Firbas, 2011)	17
Slika 6: Semilunarna anafaza (Firbas, 2011).....	18
Slika 7: Tripolarna anafaza (Firbas, 2011).....	18
Slika 8: Kromosomski fragmenti (Firbas, 2011)	19
Slika 9: Mikronukleus (Firbas, 2011)	19
Slika 10: Merjenje koreninskih vršičkov (lasten vir)	25
Slika 11: Javanski mah v določenih raztopinah $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ (lasten vir)	29

KAZALO TABEL

Tabela 1: Mejne koncentracije nevarnih snovi v tleh	10
Tabela 2: Povprečne dolžine korenin čebule (<i>Allium cepa</i> L.) v različnih koncentracijah CuSO ₄ v sedmih dneh in njihov prirastek.....	31
Tabela 3: Število prešteti celic v posamezni fazi delitve in mitotski indeks	32
Tabela 4:Število poškodb v fazah mitoze	34
Tabela 5: Kontrola (0,0 g/L) A: profaza, metafaza, anafaza, telofaza. B: profaza, metafaza, telofaza	34
Tabela 6: Koncentracija 0,002 g/L CuSO ₄ . A: profaza. B: izgubljen kromosom. C: 2 telofazi. D: kromosomski fragmenti.....	35
Tabela 7: Koncentracija 0,003 g/L CuSO ₄ . A: metafaza in anafaza. B: telofaza. C: C-mitoza. D: piknoze.....	35
Tabela 8: Koncentracija 0,004 g/L CuSO ₄ . A: telofaza s kromosomskimi fragmenti. B: anafazni most. C: telofazni most. D: piknoze.....	36
Tabela 9: Koncentracija 0,005 g/L CuSO ₄ . A: profaza. B: anafaza. C: tripolarna anafaza. D: kromosomski fragmenti.	36
Tabela 10: Koncentracija 0,006 g/L CuSO ₄ . A: telofaza. B: 2 anafazna mosta. C: anafazni most. D: telofazni most in izgubljeni kromosom. E: kromosomski fragmenti. F: tripolarna anafaza, C-mitoza in piknoze. G: C-mitoza. H: C-mitoza in kromosomski fragment	37
Tabela 11: Vrednosti absorbanca raztopin CuSO ₄ x 5H ₂ O	38
Tabela 12: Meritve absorbanca okoliške vode v kateri je bil potopljen javanski mah	39
Tabela 13: Meritve absorbanca ekstrakta javanski mah	40
Tabela 14: število anomalij pri koncentraciji 0,002 g/L CuSO ₄	53
Tabela 15: število anomalij pri koncentraciji 0,003 g/L CuSO ₄	53
Tabela 16: število anomalij pri koncentraciji 0,004 g/L CuSO ₄	54
Tabela 17: število anomalij pri koncentraciji 0,005 g/L CuSO ₄	54
Tabela 18: število anomalij pri koncentraciji 0,006 g/L CuSO ₄	55
Tabela 19: dolžina koreninskih izrastkov v 3. dnev.....	55
Tabela 20: dolžina koreninskih izrastkov v 5. dnev.....	56
Tabela 21: dolžina koreninskih izrastkov v 7. dnev.....	56
Tabela 22: povprečna dolžina koreninskih izrastkov v treh paralelah	57

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Prirastek korenin pri čebuli pri različnih koncentracijah CuSO ₄ v 7 dneh.....	32
Graf 2: Mitotski indeks <i>Allium</i> testa pri različnih koncentracijah raztopin CuSO ₄	33
Graf 3: Umeritvena krivulja.....	38

ZAHVALA

Radi bi se zahvalili mentoricama za vso pomoč pri opravljanju eksperimentalnega dela in omogočenega dostopa do laboratorijske opreme, za razlago in smernice pri interpretaciji in izdelavi raziskovalne naloge.

POVZETEK

Težke kovine so prisotne in nas ogrožajo s svojo prisotnostjo v vodi, tleh, škropivih, rastlinah in živalskem tkivu. Raziskave pravijo, da je povečana vsebnost težkih kovin; npr. bakra, ravno v vinogradniških tleh, vrtovih, gradbiščih in naših dvoriščih. Proučevali in raziskovali bomo vpliv različnih koncentracij bakra na rastline in njegovo potencialno genotoksičnost. V raziskovalni nalogi bomo uporabili različne kemijske metode merjenja vsebnosti akumulacije bakra v Javanskem mahu (*Vesicularia dubyana*). V biološkem delu bomo s pomočjo metode Allium test na koreninskih vršičkih čebule (*Allium cepa* L.) skušali ugotoviti genotoksičnost bakra na meristematska tkiva čebulic. Na podlagi dobljenih rezultatov bomo poskušali vzpostaviti korelacije med koncentracijami bakra in vplivom na deleče se celice ter dokazati potencialno negativen vpliv določenih kovin na človeka.

1. UVOD

Ljudje s svojimi posrednimi in neposrednimi posegi v okolje vnašajo snovi, ki onesnažujejo naravo. Onesnažujejo vodo, zrak in tla, kar negativno vpliva na rast in razvoj rastlin ter posledično tudi na zdravje človeka.

Onesnaževanje tal s kovinami sega daleč v zgodovino, v čas proizvodnje in obdelave rud. Je posledica tako naravnih kot antropogenih dejavnosti. Velik problem in grožnjo predstavljajo predvsem zaradi njihove nezmožnosti razgradnje, zaradi česar jih je potrebno odstraniti. V naravi se vsebnost kovin zmanjšuje s spiranjem skozi talni profil, erozijo tal in deflacijo, vendar jih večina kljub temu ostane vezanih na talne delce ali pa se vključujejo v kroženje snovi.

Težke kovine se nahajajo povsod, tako v urbanih kot v neurbanih tleh. Nekatere izmed teh, te so tako imenovane esencialne kovine, ki jih ljudje, živali in rastline potrebujejo za normalen razvoj in rast. Previsoka vsebnost teh kot tudi neesencialnih kovin, je za organizme toksična in škoduje zdravju, ovira presnovo, ter se kopiči v tkivih. Glavna pot težkih kovin v rastline je absorbcija skozi korenine, absorbcija in kopičenje teh v rastlinskih tkivih pa sta odvisni tudi od drugih dejavnikov, najbolj pa od biotopnosti toksičnih snovi (Breznik, 2015).

Nekatere kovine preko prehranjevalne verige, npr. preko zaužitih vrtnin in živali, ki so rastle ali se pasle na s kovinami onesnaženih tleh, pridejo v človeški organizem in zanj ter njegovo zdravje predstavljajo potencialno nevarnost. Takšne kovine so npr. Co, Cu, Cr, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, Se in Zn. Podrobno preučevanje vplivov CuSO_4 , kot kovine, ki je stalno prisotna v tleh na rast določenih rastlin je tako zanimivo zaradi vnašanja preko kmetijstva, pri katerem je baker ključni element številnih gnojil, baktericidov in fungicidov. Predstavlja del začaranega kroga obremenitve tal, okolja in posredne toksičnosti na posamezne trofične nivoje. Potencialna genotoksičnost CuSO_4 na rast meristemskih tkiv v koreninskih vršičkih in prirastek tovrstnih tkiv, kot tudi skupna količina akumulacije in vpliv na samo rast ob izpostavljenosti zelenih delov rastlin so lahko negativni znanitелji prekomerne obremenitve okolja kot tudi rdeči alarm za vsa živa bitja, ki v tem okolju živijo.

1.1. NAMEN IN CILJI RAZISKOVALNE NALOGE

Namen raziskovalne naloge je ugotoviti kako baker vpliva na rast in razvoj korenin pri holandski rumeni čebuli (*Allium cepa* sp.), ter ali genotoksično vpliva na deleče se celice v koreninskih vršičkih. Prav tako pa želimo ugotoviti, ali ima baker genotoksičen vpliv na javanski mah (*Vesicularia dubyana*) ter poiskati korelacije med morebitnimi negativnimi učinki bakra na obeh rastlinah.

1.2. HIPOTEZE:

1. Prirastek koreninic Hollandske rumene čebule (*Allium cepa* sp.) bo po sedmih dneh izpostavljenosti najvišji koncentraciji CuSO_4 najmanjši.
2. Mitotski indeks (MI) bo padal z večanjem koncentracije raztopine bakrovega sulfata, torej bo obratno sorazmeren. Najvišji bo pri kontroli (0,0 g/L) in najnižji pri najvišji koncentraciji 0,006 g/L.
3. Število kromosomskih anomalij, aberacij v posameznih fazah delitve se bo premo sorazmerno večalo z višanjem koncentracije raztopine bakrovega sulfata. Največ jih bo pri koncentraciji 0,006 g/L.
4. Največjo koncentracijo bakrovih ionov akumulirajo rastline, ki so izpostavljene višjim koncentracijam bakrovih spojin, kar se bo pokazalo pri vrednosti absorbance. Posledično bo koncentracija bakrovih ionov v okoliški vodi manjša.

2. TEORETIČNO OZADJE

2.1. TEŽKE KOVINE

Težke kovine, z drugim izrazom tudi sledeče kovine (ti. Trace metals) so elementi, ki jih najdemo tako v vodnem okolju kot v geoloških vzorcih, v precej nizkih koncentracijah. Zanje se uporablja tudi definicija elementov, ki imajo v primerjavi z vodo, relativno visoko gostoto, gostoto ki presega 5 g/cm^3 (Adriano, 1986). Mednje uvrščamo krom, kobalt, baker, železo, magnezij, cink in nikelj. Te delimo med esencialne in neesencialne težke kovine. Med biološko pomembne uvrščamo baker, nikelj, železo in cink. Železo, kor primer, tvori bistven del hemoglobina, ki je ključen za prenos kisika po krvi. Visoke koncentracije teh in tudi nebiološko bistvenih kovin povzročajo toksičnost.

2.1.1. TOKSIČNOST

Če so težke kovine prisotne nad mejnimi koncentracijami, postanejo strupene. Mejna koncentracija je odvisna od kovine, živalske vrste in okolja v katerem se nek organizem nahaja. Mejne koncentracije oz. vrednosti določa Uredba o mejnih, opozorilnih, in kritičnih emisijskih vrednosti nevarnih snovi v tleh.

Tabela 1: Mejne koncentracije nevarnih snovi v tleh

NEVARNA SNOV	MEJNA VREDNOST LETNEGA VNOSA kg/ha
Kadmij s svojimi spojinami	0.025
Baker s svojimi spojinami	3.000
Nikelj s svojimi spojinami	0,500
Svinec s svojimi spojinami	2,500
Cink s svojimi spojinami	10,00
Živo srebro s svojimi spojinami	0,025
Celotni krom	2,500
Šestvalentni krom	0,250

(Uradni list RS, 2005)

Težke kovine na živa bitja vplivajo s postopnim nalaganjem – bioakumulacijo. Bioakumulacija pomeni povečanje koncentracije kemikalije v biološkem organizmu skozi čas v primerjavi s koncentracijo kemikalije v okolju.

Koncentracije težkih kovin se višajo po prehranjevalni verigi navzgor – izpostavljenost se prične pri nižje razvitih organizmih in se postopoma nalaga v plenilske, višje razvite organizme, med katere uvrščamo tudi človeka. Visoke koncentracije teh kovin motijo presnovne procese na dva načina. (i) kovine se nabirajo in s tem ovirajo delovanje vitalnih organov in žlez, (ii) iz njih izpodrinejo vitalne prehranske minerale s prvotnega mesta in s tem ovirajo njihovo biološko funkcijo (Heavy metals, b.d).

Tako kot na živali in ljudi, višje koncentracije vplivajo tudi na rastline. Rastline ob previsoki izpostavljenosti težkim kovinam doživljajo t. i. oksidativni stres. Ta lahko povzroči celične poškodbe in motnje celične ionske homeostaze. Številne vrste so se na povečane koncentracije prilagodile z razvojem razstrupljevalnih mehanizmov, ki temeljijo predvsem na kelaciji.

Težke kovine lahko v človeško telo vstopijo s hrano, vodo, zrakom ali absorbcijo skozi kožo (v industriji, kmetijstvu, farmaciji, proizvodnji). Industrijska izpostavljenost velja za najbolj pogost način izpostavljenosti pri odraslih, pri otrocih pa zaužitje. Vstop težkih kovin pri rastlinah je nekoliko drugačen od tega pri človeku (Chaney in sod. 1984, Ewers in schlipkoeter 1984).

2.1.2. VIRI TEŽKIH KOVIN

Težke kovine so lahko posledica antropogenih in naravnih procesov. Med naravne vire težkih kovin štejemo naravne emisije težkih kovin, te pa vključujejo vulkanske izbruhe, pršila z morskno soljo, gozdne požare, biogene vire in delce tal, ki jih odnaša veter. Najdemo jih v obliki hidroksidov, oksidov, sulfidov, sulfatov, fosfatov in oraganskih spojin. Med antropogene procese pa najpogostejše sodijo industrija, kmetijstvo, odpadne vode rudarstvo. Eni izmed najpomembnejših antropogenih procesov, ki so vir onesnaževanja so avtomobilski izpuhi, insekticidi in izgorevanje fosilnih goriv (Masind, Muedi, 2018).

Prisotnost težkih kovin prinaša prej škodljive kot pa pozitivne vplive. Vplivajo na več področij okolja, kot so hidrosfera, litosfera, biosfera in ozračje.

Prisotnost nahajanja težkih kovin v tleh je posledica industrijskih dejavnosti (rudarjenje, taljenje rude), vnašanje gnojil, namakanje tal z odpadno vodo in nastanek tal na kamnini, bogati s kovino (Udovič in Leštan, 2008). Koncentracije kovin so prisotne v obliki ionov, ki so topni v talnih raztopinah in v obliki kationov, vezanih na različne organske snovi, karbonate, okside. Ob sprejemu ionov iz tal v rastlino vplivajo različni dejavniki, kot so temperatura, pH tal, mikroorganizmi v tleh, ontogenetski razvoj rastline (Kranjčič, 2008). Večina težkih kovin ni

mikrobno ali kemično degradirana, ker so nerazgradljive in kot posledica se njihove koncentracije čez leta le nabirajo.

V Sloveniji v splošnem tla niso zelo onesnažena s težkimi kovinami, razen v določenih izjemah. K zmanjšanju povišanih koncentracij težkih kovin pripomorejo spiranje in erozija tal ter sprejem v rastlinske dele (Romih, Graner, Lasnik, b.d.).

Tako kot tla, prihaja tudi do onesnaženja vode. Glavna vzroka za le-to sta industrializacija in urbanizacija. Težke kovine se odvajajo z odtokom iz industrij in urbanih območjih in se v obliki usedlin kopičijo na vodnih tleh. Za živali predstavljajo še večjo nevarnost, saj se kovine v vodi lažje transportirajo in so jim lažje dostopne. Vodni organizmi so tako kovinam bolj izpostavljeni, saj so z njimi ves čas v neposrednem stiku. Onesnaženost vode preko prehranjevalnih verig tako prizadene vse organizme. Ljudje kot primer organizmov, ki se hranijo na najvišji ravni, so bolj nagnjeni k večjim zdravstvenim težavam, saj se, kot že zgoraj navedeno, koncentracija težkih kovin v prehranjevalni verigi povečuje.

Tako kot vodo, industrializacija in urbanizacija, onesnažujeta tudi zrak, kar se v zadnjih letih pojavlja kot glavni okoljski problem po vsem svetu. Njegovo onesnaževanje so pospešili prah in delci, ki se sproščajo ob antropogenih procesih. Prav tako sproščajo v zrak prašne delce tudi različni naravni procesi. Ti prašni delci lahko povzročijo draženje kože, oči, okužbe dihal in bolezni srca ter ožilja, kar lahko vodi v prezgodnjo smrt (Briffa, Singara, Bludell, 2020).

2.1.3. BAKER

Baker je za živa bitja esencialnega pomena, saj ima pomembno vlogo pri encimskih reakcijah, pri rastlinah pa tudi ključno vlogo za tvorbo klorofila. Element v rastlini aktivira nekatere encime, ki sodelujejo v sintezi lignina, pomemben je tudi v pri procesu fotosinteze in pomaga pri presnovi ogljikovih hidratov ter beljakovin. Baker bodisi v pomankanju bodisi v presežku povzroči motnje v rasti in razvoju rastlin.

Pomankanje bakra se kaže v obliki simptomov ki se začnejo kot rahla kloroza celotnega lista ali med žilami lista. Na klorotičnih predelih se začnejo tvoriti majhne lise, zlasti na robovih. Z

napredovanjem simptomov se listi manjšajo, izgubljajo sijaj in lahko celo uvenijo (Kaiser, Rosen, 2018).

Presežek bakra zavira rast in moti pomembne celične procese kot so celično dihanje in fotosinteza. Rastline, gojene v prisotnosti visoke ravni Cu, običajno kažejo zmanjšane simptome biomase in klorotike. Prevelika koncentracija bakra omeji rast korenin tako, da sežge koreninske konice in s tem povzroči odvečno stransko rast korenin. Visoka vsebnost bakra tekmuje z vnosom železa in cinka, in kasneje to kaže simptome pomankanja železa in drugih mikrohranil. Če se toksičnost bakra ne popravi lahko sledi zmanjšano razvejanje rastlin in kasneje tudi upadanje (Yruela, 2005).

Dosedanje raziskave so pokazale, da ima presežek bakra znotraj rastline in na enoti celice precej škodljivih vplivov. Ugotovili so, da je v listih nižja vsebnost klorofila, pojavljajo se tudi spremembe v strukturi kloroplasta in sestavi tlakoidne membrane. Ob povečani ravni Cu, bi naj ta posegal v biosintezo fotosintetskih strojev, kateri spreminjajo tako pigmentno kot beljakovinsko sestavo fotosintetskih membran. Opažena je bila tudi peroksidacija (oksidativna razgradnja) lipidov in zmanjšanje vsebnosti le-teh. Procesi, ki jih povzročajo previsoke koncentracije bakra, posledično uničujejo kompleksno polipeptidno sestavo, ki razvija kisik ali pa interakcijo z ioni, ki so potrebni za normalno delovanje Mn, Cl, Ca, ind.

Kot že navedeno, da lahko previsoke koncentracije težkih kovin v rastlinah povzročijo oksidativni stres, enako velja tudi za baker. Ta povzroči spremembe v aktivnosti nekaterih komponent antioksidativnih poti. Antioksidativni odzivi so bili opaženi predvsem v listih ter koreninah. V raziskavah so ugotovili tudi, da je baker upočasnil hitrost fotoredukcije in da povečuje škodljive učinke svetlobe-ob daljši izpostavljenosti visoki intenzivnosti svetlobe se fotosintetska aktivnost zmanjša (Yruela, 2005).

Rastline absorbirajo element (esencialni in neesencialni) iz tal kot odziv na gradient koncentracije in selektivni prenos ionov ali pa z difuzijo. Stopnja absorpcije različnih elementov je odvisna od posameznih rastlinskih vrst. Pomembno vlogo pri sprejemanju kovinskih ionov ima rastlinski koren. Mehanizem se prične z absorpcijo kovinskih ionov v koreninskem tkivu, ioni naštetih kovin se na površini korenin ločijo od svojih kompleksnih oblik, kovine se kopičijo v korenem apoplastu (rastlinski sistem, ki ga gradijo celične stene

in medcelični prostori.) Adsorpcija kovin na površini korenine poteka v kationski obliki z negativno celično steno, zaradi prisotnosti glikoproteinov, celuloze in pektinov, kateri delujejo kot ionski izmenjevalci. Adsorpcija in premeščanje k. ionov se v tkivu floema in ksilema pojavljata kot simplastični in apoplastični transport. Slednji poteka skozi medcelične prostore z difuzijo kovinskih ionov v koreninski celici, skozi talno raztopino, simplastični transport pa skozi plazemsko membrano z različnimi nosilci ali transporterji (Arif, idr. 2018).

2.1.4. VPLIV TEŽKIH KOVIN NA LJUDI

V zemeljski skorji, rastlinah in v okolju na splošno se nahajajo različne težke kovine, ki lahko na ljudi vplivajo posredno ali pa neposredno. Za človeka esencialne težke kovine (Cu, Fe, Mn, Ni, Mg, Zn, Cr...) so lahko v večjih odmerkih izredno škodljive, medtem ko preostale težke kovine (kot so Hg, Pb, Ar, Ag) imajo velike negativne učinke že pri nizkih vrednostih, in povzročajo akutne in kronične toksičnosti (Forstnerič, 2018).

Omenjene kovine se v človeškem telesu transportirajo in porazdelijo v telesne celice in tkiva, vezane na beljakovine, nukleinske kisline pa uničujejo te makromolekule in motijo celične funkcije. Toksičnost težkih kovin lahko vpliva na delovanje osrednjega živca, kar lahko vodi v duševne motnje, vpliva na sestavine krvi in tako poškoduje jetra, pljuča, ledvice in preostale vitalne organe ter s tem spodbudi več bolezni. Dolgotrajno kopičenje prekomerne koncentracije kovin lahko upočasni delovanje in napredovanje fizičnih, mišičnih ter nevroloških degenerativnih procesov (parkinsonova, alzheimerjeva bolezen). Ponavljajoči se stiki s težkimi kovinami lahko povzročijo tudi poškodbe nukleinskih kislin, povzročijo mutacijo, posnemajo hormone in s tem motijo endokrini in reproduktivni sistem ter sčasoma povzročijo tudi raka.

Glavni mehanizem toksičnosti težkih kovin vključuje nastajanje prostih radikalov, ki povzročajo oksidativni stres, poškodbe bioloških molekul, kot so encimi, beljakovine, lipidi in nukleinske kisline, poškodbe DNA, ki je ključnega pomena za rakotvornost in nevrotoksičnost (Engwa, idr. 2019).

Briffa, Sinagra in Blundell (2020) so zapisali najpogostejše negativne vplive, bolezni na človeka, glede na prekomerno izpostavljenost določeni težki kovini.

Baker:

Prekomerna izpostavljenost bakru se najpogosteje pokaže kot kovinska mrzlica (podobni simptomi kot pri gripi, driska, bruhanje, omotica), gastroenteritis zaradi nekroze, bolezni jeter in ledvic, Wilsonovo bolezen (nabiranje bakra v organih, namesto da bi le-tega izločal žolč).

Glede na to, da težke kovine vstopajo v telo tako z vdihavanjem kot z zaužitjem s hrano, bi lahko to preprečili z odstranjevanjem težkih kovin iz okolja. Koncentracije kovin iz zraka bi zmanjšali z manj izpušnimi plini in manjšo onesnaženostjo industrije, težke kovine iz prsti v katerih uspevajo rastline, katere kasneje zaužije tudi človek, pa bi zmanjšali s fitoremediacijo. Slednje je način absorpcije težkih kovin iz tal, vode in sedimentov. To storimo tako, da posadimo rastlino, ki je hiperakumulator, ta ima koreninske sisteme, ki imajo selektiven prevzem, kjer se kovina prenaša in kopiči v organih, nato pa se rastlina v celoti razgradi in s tem odstrani težke kovine.

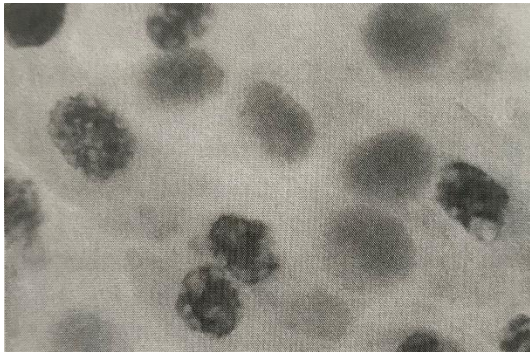
2.1.5. Uporaba bakra v kmetijstvu

Zaradi njegove široke uporabe v pesticidih in herbicidih se tla se z bakrom najpogosteje onesnažijo z gnojili, baktericidi in fungicidi uporabljenimi v kmetijstvu. Zaradi svojih protimikrobnih lastnosti se uporablja v kmetijstvu ter humani in veterinarski medicini. Za zaščito pridelkov se baker uporablja predvsem v ionski obliki v obliki formulacij na osnovi soli (bakrov sulfat ali bakrov hidroksid), ki ga spremljajo različni dodatki. Takšni izdelki se na splošno poškropijo po nadzemnih delih pridelka. Izdelki na osnovi bakra se uporabljajo za nadzor določenih glivičnih in bakterijskih bolezni pri kmetijskih pridelkih. Odobrena uporaba bakra vključuje predvsem glivice in bakterijske bolezni, ki prizadenejo trajnice, zelenjavne rastline, parfumske, aromatične in zdravilne rastline. Uporaba pesticidov na osnovi bakra je eden največjih virov onesnaževanja kmetijskih tal z bakrom, v nekaterih primerih lahko privede do velikega kopičenja bakra v zgornjih plasteh tal. V Evropi je uporaba bakrove mešanice Bordeaux za škropljenje grozdja povzročila znatno povečanje ravni bakra v vinogradniških tleh, z vrednostmi, ki dosežejo 200 ali celo 500 mg/kg prsti. Priznavanje negativnih vplivov bakra na okolje je povzročilo omejitve uporabe bakrovih pesticidov v kmetijstvu. Uporaba bakra za zaščito pridelkov je v Franciji in večini držav EU omejena z največ 6 kg/ha na leto. V nekaterih državah pa je ta delež nižji.

2.2. VRSTE MOTENJ CELIČNEGA CIKLA (ANOMALIJE)

2.2.1 Piknoze

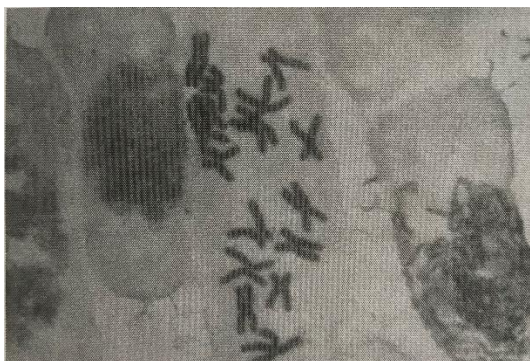
Nastanejo v začetku profaze. So skupki (klastri) nehomologno kondenziranega kromatina, ki se pojavijo na večih mestih jedra. (Firbas, 2011)



Slika 1: Piknoze (Firbas, 2011)

2.2.2 C-mitoza

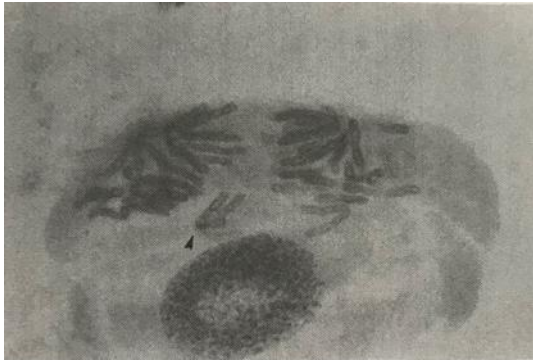
V metafazi prosto razporejeni kromosomi, ki so posledica poškodb celotnega delitvenega mitoznega aparata. Kromosomi so nepoškodovani, vendar to stanje v celici povzroča poškodba mitoznega aparata z nitmi delitvenega vretena, zato se mitoza zaustavi. Raziskave dokazujejo, da so povzročitelji zaustavljanja mitoze različni citostatiki kot je npr. kolhicin (Firbas, 2011).



Slika 2: C-mitoza (Firbas, 2011)

2.2.3 Izgubljen kromosom

Firbas (2011) navaja, da je izgubljen kromosom »prost kromosom v celici, med ali po koncu anafaze, ki ni vpet v delitveno vreteno.«



Slika 3: Izgubljen kromosom (Firbas, 2011)

2.2.4 Anafazni most

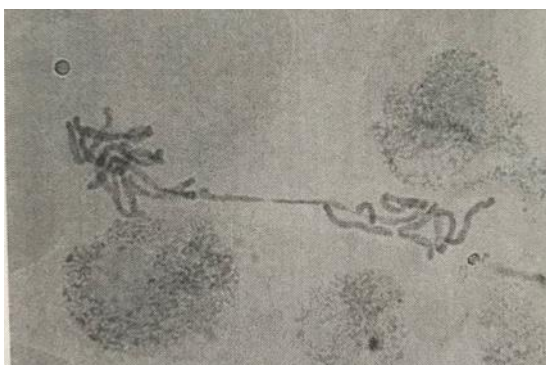
Nastane v anafazi, kromatinska nit ostane povezana z anafaznim kromatinom, ki je posledica nerazdvajanja kromatid kromosoma (Firbas, 2011).



Slika 4: Anafazni most (Firbas, 2011)

2.2.5 Telofazni most

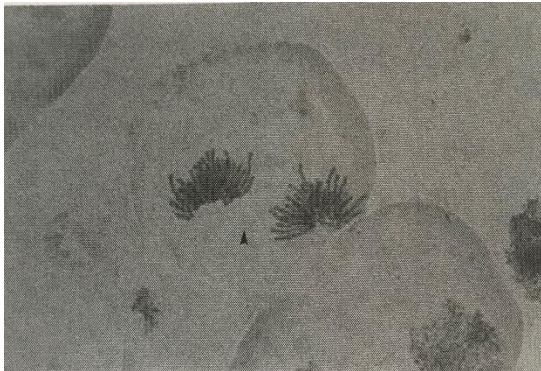
Nastane v telofazi, kot posledica nerazdvajanja kromatid kromosoma (Firbas, 2011).



Slika 5: Telofazni most (Firbas, 2011)

2.2.6 Semilunarna anafaza

Je poškodovana anafaza, pri kateri delitveno vreteno odstopa od normalnega položaja v celici. Kromosomi potujejo v eno smer. (Firbas, 2011)



Slika 6: Semilunarna anafaza (Firbas, 2011)

2.2.7 Tripolarna anafaza

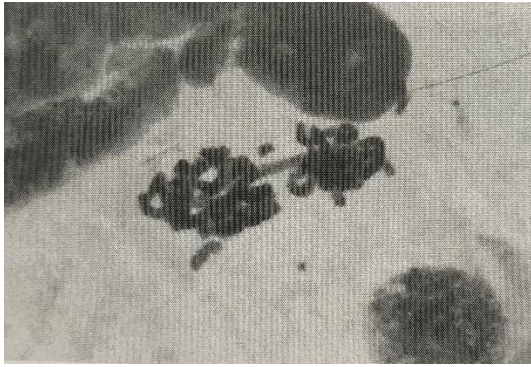
»V anafazi nastanejo trije celični poli, ki potegnejo kromatide v tri smeri.« (Firbas, 2011)



Slika 7: Tripolarna anafaza (Firbas, 2011)

2.2.8 Kromosomski fragmenti

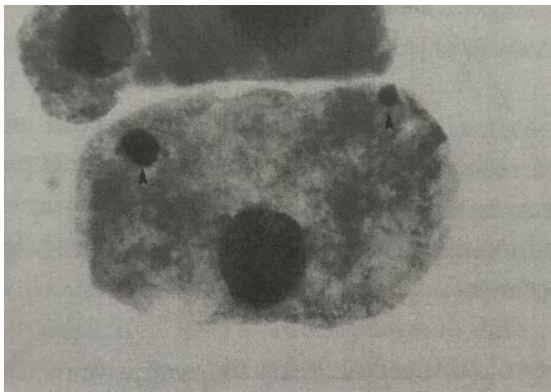
»Odlomljeni deli kromosomov, različnih velikosti« (Firbas, 2011)



Slika 8: Kromosomski fragmenti (Firbas, 2011)

2.2.9 Mikronukleus

So manjša sekundarna jedra, ki so v primerjavi z primarnim jedrom v razmerju velikosti od 1 : 5 do 1 : 20. Nastanejo iz dekoncentriranih kromosomskih fragmentov ali izgubljenih kromosomov, ki se niso vključili v interfazno jedro (Firbas, 2011).



Slika 9: Mikronukleus (Firbas, 2011)

2.2. TESTNE RASTLINE

2.2.1. JAVANSKI MAH (*Vesicularia dubyana* sp.)

Javanski mah, ki ima latinsko ime *Vesicularia dubyana* izvira iz družine *Hypnaceae* je razširjen v tropski Aziji, kjer se razrašča v vlažnih habitatih deževnega gozda in v vodi. Ima mehko steblo, dolgo do 17 cm, z gosto pokritimi majhnimi zelenimi listi in razvejanimi poganjki. Lističi so nazobčani in koničasti, starejši so temnejše barve. Razmnožuje se tako kot drugi mahovi z izmenjavo gametofitske in sporofitske generacije, vendar le občasno razvije kapsule s sporami. Na površino se pritruje z rizoidi. Za rast ne potrebuje zemlje, dobro uspeva na kamnih, lesu, plastičnih ceveh in tudi na akvarijskem filtru. Javanski mah je zelo ne zahtevna rastlina, raste tudi na slabše osvetljenih predelih, vendar najbolje uspeva v pogojih z vsaj srednjo osvetlitvijo, dobro oskrbo s CO₂ ter hranili. Optimalna temperatura vodnih okolij za rastlino je med 22 - 27 stopinj Celzija, pH vrednosti pa med 6 – 7,5. Uporablja se predvsem kot akvarijska rastlina. *Vesicularia dubyana* se je pogosto zamenjevala za vrsto *Taxiphyllum barbieri*, saj se je v akvarijih zanjo prav tako uporabljalo ime Javanski mah. V primerjavi z *Taxiphyllum barbieri* raste počasneje ter je bolj kompaktna. Danes je vrsta *Vesicularia dubyana* znana tudi pod imenom »mah iz Singapurja« (Mah javanski, b.d, *Vesicularia Dubyana*, b.d.).

2.2.2. ČEBULA

Mlada hollandska rumena čebula (*allium cepa* L.) je rumene barve, premera 14 do 18 mm in tehta od 2,5 do 3 g. Testne rastline mladih čebul je potrebno shranjevati v temnih prostorih, pri temperaturi od 12 do 14 stopinj Celzija ter zračni vlagi 50 %.

Čebula je kot testna rastlina primerna za raziskave zaradi hitre rasti, stalnega števila kromosomov, hitrega odziva na genotoksičnost snovi in majhnega števila spontanih kromosomskih poškodb. (Glasečnik, 2004)

3. METODE IN MATERIALI

V kemijskem empiričnem delu naloge bomo z metodo spektrofotometrije določali koncentracije bakra v javanskem mahu, v biološkem delu poskusa pa bomo uporabljali metodo Allium test na koreninskih vršičkih čebule (*Allium cepa* sp.).

3.1 OPIS METOD

3.1.1 MITOTSKI INDEKS

Mitotski indeks je metoda, ki jo uporabljamo za merjenje hitrosti razmnoževanja celične populacije. Je razmerje med številom celic v mitози in celotnim številom celic. Glede na število prešteti celic, ga lahko izrazimo v odstotkih (%). (Beals, Gross, Harrell, 1999)

$$\text{MITOTSKI INDEKS} = \frac{P+M+A+T}{N} \times 100;$$
 kjer so P – profaza, M – metafaza, A – anafaza, T – telofaza in N – število vseh celic

3.1.2 ALLIUM TEST

Biološki test Allium ali čebulni test zaznava prisotnost škodljivih snovi v koncentracijah, ki so nižje od mejnih sposobnosti analitskih metod. Kot testna rastlina se uporablja mlada holandska rumena čebula (*Allium cepa* L.), ki je zelo primerna zaradi stabilnega kariotipa in kromosomskega števila, hitre odzivnosti rasti korenin in hitrega odziva na genotoksične snovi. Z metodo ugotavljamo vpliv različnih kemikalij na celostno rast in razvoj meristemskih korenin celic testne rastline. Pogosto se uporablja za ugotavljanje kakovosti pitne vode, primeren je tudi za detekcijo radiološkega sevanja v okolju ipd., kjer ugotavljajo splošno toksičnost in dokazujejo potencialne genotoksične snovi. Metodo Allium lahko razdelimo na tri različne teste, ki se nadgrajujejo. Allium generalno toksični test prikazuje različno hitrost rasti in dolžine korenin pri mladi čebuli, ob izpostavitvi različnim kemikalijam, ki inhibirajo in zaustavljajo rast korenin. Glede na odzivnost testne rastline ugotavljamo splošno strupenost (toksičnost). Z Allium anafazno-telofaznim testom ugotavljamo raven genotoksičnosti kemikalij na podlagi poškodb in okvar v procesu mitoze (pojav anomalij), ki so najpogostejše

v anafazi in telofazi. Allium metafazni test pa dokazuje posledice genotoksikov na genski material, kar se pokaže v obliki kromosomskih in kromatidnih poškodb, ki se identificirajo v metafazi. Test je enostaven, zanesljiv in hitro izvedljiv, ter uporaben na širokem področju. (Fibras, 2011)

3.1.3 SPEKTROFOTOMETRIJA

Spektrofotometrija je metoda, ki jo uvrščamo med molekulsko absorpcijsko spektrometrijo. Svetloba je elektromagnetno valovanje, njene valove pa sestavljajo oscilirajoča električna in magnetna polja. Vzorec raztopine absorbira elektromagnetno valovanje iz izvora energije, kar predstavlja osnovo spektrometrične metode. Spektrofotometrija se uporablja za merjenje spektrov absorpcije svetlobe v raztopini. Opazujemo količino absorbirane svetlobe, ki povzroči spremembo elektronskih stanj v molekulah. Razlikujemo med UV, VIS in IR spektrofotometrijo, glede na vrste svetlobe. Valovno dolžino za naše meritve izbiramo na podlagi številnih faktorjev, to je npr. vsebnost posameznih funkcijskih skupin v raztopini, ki svetlobo absorbirajo ali v UV ali v IR spektru. Uporabili smo metodo UV-VIS spektrofotometrijo, ki je učinkovita metoda za kvantitativno analizo. V primerjavi z UV in vidno spektrometrijo, je IR spektrometrija bolj uporabna za kvalitativne meritve. Ultravijolična svetloba zajema območje valovnih dolžin 200-400 nm, vidna svetloba pa valovne dolžine 400-800 nm. Za merjenje takšnih valovnih dolžin svetlobe uporabljamo UV-VIS spektrofotometre. Vsi ti instrumenti imajo svetlobni vir (žarnico), monokromator, detektor, registrator in kiveto z vzorcem. UV-VIS spektrofotometrija je enostavno in široko uporabna, natančna, selektivna, občutljiva in hitro določljiva metoda.

Načelo absorpcijske spektrofotometrije je Beer-Lambertov zakon, ki pravi da je absorbanca raztopljene snovi neposredno sorazmerna z njeno koncentracijo v raztopini. To lahko napišemo z naslednjo enačbo:

$$A = -\log(I_0/I) = \epsilon C l$$

A - absorbanca

I_0 - začetna intenziteta svetlobe

I - končna intenziteta svetlobe

ϵ - molarni absorpcijski koeficient (L/cm mol)

C - koncentracija snovi v raztopini (mol/L)

l - dolžina poti svetlobe skozi raztopino (cm)

Pri določanju koncentracije neke snovi sta dolžina poti svetlobe skozi raztopino, ki v UV-VIS spektrometriji ponavadi meri 1 cm, in molarni absorpcijski koeficient konstantna. Ker je pri različnih valovnih dolžinah absorptivnost različna, velja Beer-Lambertov zakon le za monokromatsko (enobarvno) svetlobo. (Gorenjak, 2010) (Förster, 2004)

3.2 ALLIUM GENOTOKSIČNI TEST

3.2.1 Gojenje čebulic (*Allium cepa* L.) v raztopinah različnih koncentracij bakrovega sulfata pentahidrata ($\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$)

3.2.1.1 Material

Laboratorijska oprema:

- 18x epruvete
- stojalo za epruvete
- 5x čaša (1L)
- merilni valj
- laboratorijski pribor (pinceta, skalpel, škarje)
- milimetrski papir (ravnilo)
- tehtnica

Biološki material:

- testna rastlina – hollandski rumeni čebulček (*Allium cepa* L.)

Kemikalije:

- bakrov sulfat ($\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$)
- destilirana voda (H_2O)

3.2.1.2 Priprava testnih rastlin in različnih koncentracij $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$

V čašah smo pripravili različne koncentracije bakrovega sulfata pentahidrata, in sicer 0,002 g/L, 0,003 g/L, 0,004 g/L, 0,005 g/L in 0,006 g/L. Čaše z raztopinami smo pokrili ter jih shranili. Za testno rastlino smo uporabili hollandski rumeni čebulček vrste *Allium cepa* L., ki smo ga kupili v trgovini. Za vsak testiran vzorec in kontrolo smo uporabili 3 čebulice, torej skupno 18 čebulic. Izbirali smo večje in debelejše čebulice ter jih na strani koreninskega poganjka z nožem rahlo odrezali.

3.2.1.3 Priprava poskusa

Epruvete smo postavili na stojalo, jih označili ter po 3 epruvete do vrha napolnili s posamezno koncentracijo. Kontrolne epruvete smo napolnili z navadno vodo. Testne rastline - čebulice smo postavili na epruvete. Celotno stojalo za epruvete s čebulicami smo ovili v aluminijasto folijo ter tako zagotovili podobne pogoje kot pod zemljo. Testne rastline smo pustili rasti v različnih koncentracijah raztopin 7 dni. Tretji in peti dan smo epruvetam pri katerih čebulice niso bile več namočene dolili ustrezno koncentracijo raztopine.

3.2.1.4 Merjenje dolžine korenin

Korenine smo merili 3., 5. in 7. dan poskusa. Z milimetrskim papirjem smo izmerili dolžino 5 najdaljših korenin čebulic na vsaki epruveti pri posameznih koncentracijah ter podatke uredili v tabele. Pri posameznih koncentracijah smo izračunali povprečno vrednost (aritmetično sredino) dolžine korenin čebulic, tako da smo vsoto dolžine korenin delili z številom korenin.



Slika 10: Merjenje koreninskih vršičkov (lasten vir)

3.2.2 Določanje mitoznega indeksa (MI) in ravni genotoksičnosti na čebulicah

Ko smo opravili *Allium* generalni toksični test, smo z eksperimentalnim delom nadaljevali. Pod mikroskopom smo opazovali celice koreninskih vršičkov čebulic iz raztopin $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ in jim določili mitozni indeks ter raven genotoksičnosti.

3.2.2.1 Material

Laboratorijska oprema:

- Mikroskopska stekla
- Krovna mikroskopska stekla
- 2x erlenmajerica (75 ml)
- Čaše
- Epruvete
- Laboratorijski pribor (pinceta, skalpel, škarje)
- Gorilnik
- Filtrirni papir
- Mikroskop
- Fotoapar

Biološki material:

- Testna rastlina – mlada čebula (*Allium cepa* L.)

Kemikalije

- Ledocetna kislina
- Karmin
- etanol
- očetna kislina

3.2.2.2 Priprava Karmin očetnega barvila

Sedmi dan poskusa smo pripravili karmin očetno barvilo s katerim smo barvali koreninske vršičke. Na tehtnici smo stehali 1,5 g karmina ter ga v čaši premešali z 150 ml ledocetne kisline. Pripravili smo vodno kopel, ko je voda zavrela smo čašo s karmin očetnim barvilom postavili v lonec. Ko je barvilo zavrelo smo ga pustili vreti približno 20 min, medtem smo tekočino enakomerno mešali. Pazili smo, da voda v loncu ni premočno vrela, da ne bi prišla v čašo v katerem je bilo barvilo. Nato smo barvilo pustili hladiti 10 min ter ga kasneje prefiltrirali v dve 75 ml erlenmajerici.

3.2.2.3 Priprava mikroskopskih preparatov in mikroskopiranje

Tretji dan poskusa smo po meritvah korenin odrezali po 10 koreninskih vršičkov na eni čebuli iz vsake koncentracije vključno s kontrolo. Koreninske vršičke smo fiksirali s fiksativom raztopine etanola in 45% ledocetne kisline v razmerju 3:1, ki smo jo namešali. Vršičke

potopljene v fiksativ smo postavili v hladilnik. Sedmi dan smo koreninske vršičke obarvali v karmin barvilu. Vršičke smo vzeli iz fiksativa in jih s pinceto dali v epruvete, v katere smo nalili barvilo. Posamezno epruveto z barvilom in vršički smo nato z gorilnikom segrevali do prvega rahlega vretja ter tekočino prelili v petrijevke, kjer smo pustili vršičke stati 15 min, da so vpili barvilo.

Za vsako koncentracijo smo pripravili po 3 preparate. Preparat smo pripravili tako, da smo vzeli mikroskopsko steklo ter nanj s pinceto položili en koreninski vršiček. Majhen, bolj obarvan del vršička smo pustili na steklu, drugi del pa smo odrezali s skalpelom in odstranili. S kapalko smo dodali eno kapljico barvila iz petrijevke na mikroskopsko steklo in vršiček pokrili s krovnim steklom ter ga rahlo zmečkali. Preparat smo malo obrisali ob robovih. Tako končan mikroskopski preparat smo opazovali pod mikroskopom s 400x povečavo.

3.2.2.4 Izračun MI in opazovanje poškodb faz v mitozii (anomalij)

Na enem preparatu pri vsaki koncentraciji smo celice v vidnem polju prešteli, jim določili fazo mitotske delitve (interfaza, profaza, metafaza, anafaza, telofaza) ter izračunali njihovo vrednost v odstotkih. Za posamezen preparat smo določili tudi mitotski indeks po enačbi:

$$MI = 100\% \times \text{število delečih se celic} / \text{število vseh celic}$$

V celicah smo opazovali tudi poškodbe v fazah mitoze. Genotoksični vpliv delcev bakra smo ugotavljali z vrsto in pogostostjo kromosomskih aberacij, ki so se pojavile v celicah koreninskih vršičkov. Pri vsaki koncentraciji smo na 3 preparatih iskali anomalije, jim določili vrsto in prešteli njihovo število. Posamezne anomalije smo slikali z računalniškim programom LAS EZ. Podatke smo obdelali.

3.3 DOLOČEVANJE Cu^{2+} IONOV V EKSTRAKTU JAVANSKEGA MAHA

3.3.1 Material

Laboratorijska oprema:

- 5x bučka (100 ml)
- 5x čaša (1L)
- program Logger Pro (verzija)
- spektrofotometer SpektroVis UV/VIS
- analitska tehtnica
- lij
- filtrirni papir
- terilnica in pestilo
- peč za sušenje

Kemikalije:

- Bakrov sulfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$)
- etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$)

Biološki material:

- Testna rastlina: javanski mah (*Vesicularia dubyana*)

3.3.2 Priprava testne rastline

Testno rastlino smo vzeli iz šolskega akvarija. Po osužitvi, smo natehtali pet vzorcev rastlin z isto maso.

3.3.3 Priprava raztopin $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ s potopljenim javanskim mahom (*Vesicularia dubyana*)

Pripravili smo raztopine koncentracij: 0,002 g/L, 0,003 g/L, 0,004 g/L, 0,005 g/L in 0,006 g/L. Označene čaše smo napolnili z raztopino CuSO_4 določene koncentracije ter dodali točno določeno maso rastline.



Slika 11: Javanski mah v določenih raztopinah $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ (lasten vir)

3.3.4 Priprava umeritvene krivulje

Pripravili smo raztopine koncentracij 0,0002 g/ml, 0,0005 g/ml, 0,002 g/ml, 0,004 g/ml, 0,005 g/ml in 0,006 g/ml. Standardne raztopine smo pripravili v merilnih bučkah (100ml). Zatehtali smo 0,0002 g, 0,0005 g, 0,002 g, 0,004 g, 0,005 g in 0,006 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ ter bučke dopolnili do oznake.

Z UV-spektrofotometrom smo izmerili absorbance pri valovni dolžini 880 nm. Na podlagi dobljenih rezultatov smo naredili umeritveno krivuljo.

3.3.4 Ekstrakcija zelenih delov rastlin in določanje absorbance bakra v ekstraktu in okoliški vodi

Po sedmih dneh izpostavljenosti rastlin različnim koncentracijam $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$, smo vzorce rastlin sušili 8 h na 42°C in 8 h na 90°C.

Zatehtali smo 3g posušenega vzorca, homogenizirali in ekstrahirali z 80% raztopino etanola. Nastali temno zeleno ekstrakt smo prefiltrirali. Zaradi intenzivne barve smo morali narediti 10x razredčitev, da smo lahko izmerili absorbance.

Postopek smo ponovili za vseh pet vzorcev testnih rastlin.

S spektrofotometrom smo izmerili absorbance pri valovni dolžini 880 nm. Na podlagi izmerjenih rezultatov in s pomočjo umeritvene krivulje, smo izračunali koncentracijo bakra v razredčeni raztopini. Prav tako smo izmerili tudi absorbanco bakrovih ionov v okoliški vodi. Po devetih dneh izpostavljanja rastlin določeni koncentraciji, smo postopek ponovili.

4. REZULTATI

4.1 Allium test

a) Merjenje dolžine korenin holandskega rumenega čebulčka (*Allium cepa*) pri posamezni koncentraciji raztopine CuSO₄

Tabela 2: Povprečne dolžine korenin čebule (Allium cepa L.) v različnih koncentracijah CuSO₄ v sedmih dneh in njihov prirastek

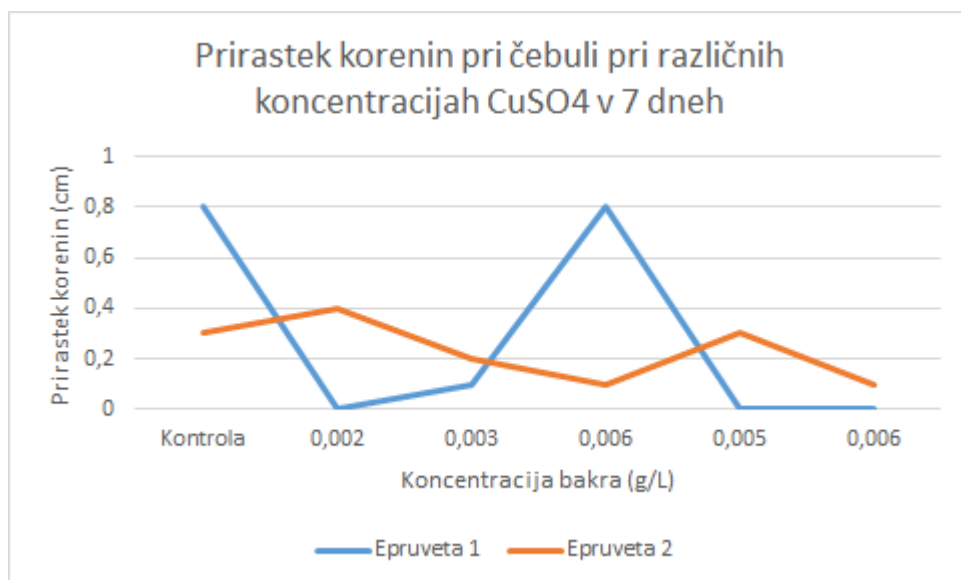
Epruveta	1				2			
	3. D	5. D	7. D	PK	3. D	5. D	7. D	PK
Kontrola	2,1	2,3	2,9	0,8	2,6	2,6	2,9	0,3
0,002	1	0,9	0,9	0,1	1	1,2	1,4	0,4
0,003	1,3	1,3	1,4	0,1	0,9	1,1	1,1	0,2
0,004	1,9	2	2,7	0,8	1	1	1,1	0,1
0,005	1,1	1,1	1,1	0	0,6	0,6	0,9	0,3
0,006	1,2	1,2	1,2	0	0,6	0,7	0,7	0,1

Legenda:

D – dan

PK - prirastek korenin

Graf 1: Prirastek korenin pri čebuli pri različnih koncentracijah CuSO₄ v 7 dneh

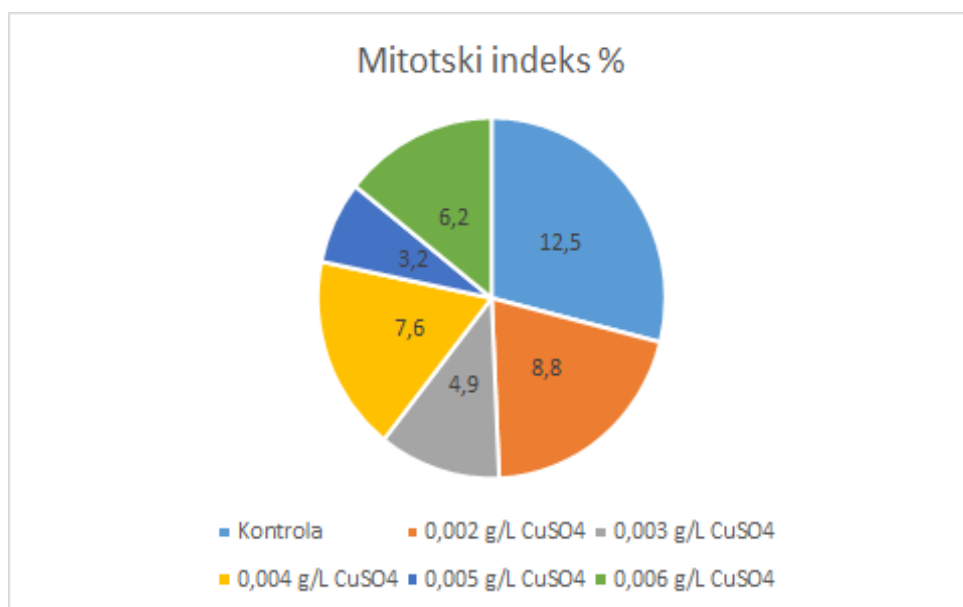


b) Določanje mitotskega indeksa (MI) čebule (*Allium cepa*) v kontroli (navadna voda) in koncentracijah 0,002 g/L, 0,003 g/L, 0,004 g/L, 0,005 g/L in 0,006 g/L CuSO₄

Tabela 3: Število prešteti celic v posamezni fazi delitve in mitotski indeks

Koncentracija bakra (g/L)	0,0	0,002	0,003	0,004	0,005	0,006
Interfaza	778	500	402	355	409	306
Profaza	50	30	17	21	10	6
Metafaza	25	7	1	4	0	1
Anafaza	21	3	2	1	1	5
Telofaza	14	4	0	1	2	7
Mitotski indeks (%)	12,5	8,80	4,90	7,60	3,20	6,20

Graf 2: Mitotski indeks *Allium* testa pri različnih koncentracijah raztopin CuSO_4



c) Vrste in število poškodb v mitotski delitvi pri posamezni koncentraciji

Tabela 4: Število poškodb v fazah mitoze

Vrsta poškodb v fazi mitoze	Število pri posamezni koncentraciji (g/L)					
	0	0,002	0,003	0,004	0,005	0,006
C-mitoza	0	0	1	1	2	2
kromosomski fragmenti	0	1	0	0	0	9
anafazni most	0	0	0	2	6	9
telofazni most	0	0	0	1	0	1
piknoza	0	0	11	26	30	45
anafaza s kromosomskimi fragmenti	0	0	0	0	0	2
telofaza s kromosomskimi fragmenti	0	0	0	0	1	1
tripolarna anafaza	0	0	0	0	1	2
izgubljen kromosom	0	1	0	0	0	0
SKUPAJ	0	2	12	28	41	71

Tabela 5: Kontrola (0,0 g/L) A: profaza, metafaza, anafaza, telofaza. B: profaza, metafaza, telofaza

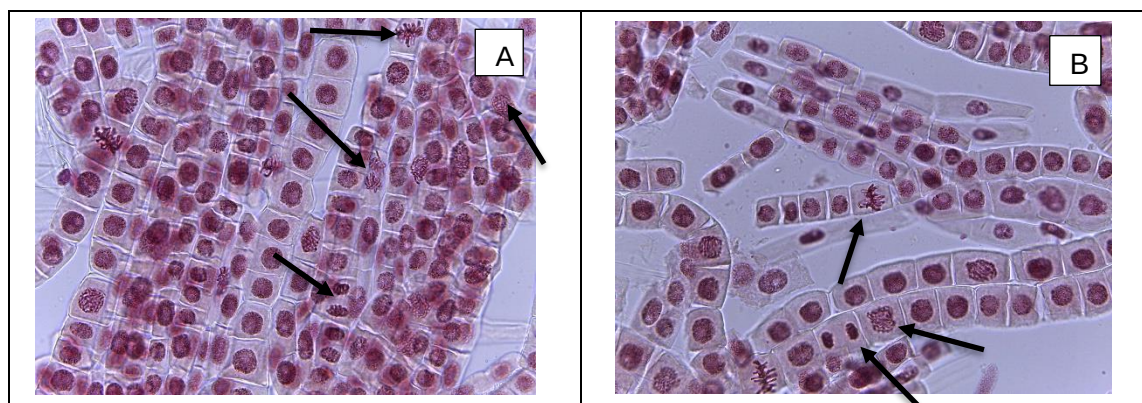


Tabela 6: Koncentracija 0,002 g/L CuSO₄. A: profaza. B: izgubljen kromosom. C: 2 telofazi. D: kromosomski fragmenti.

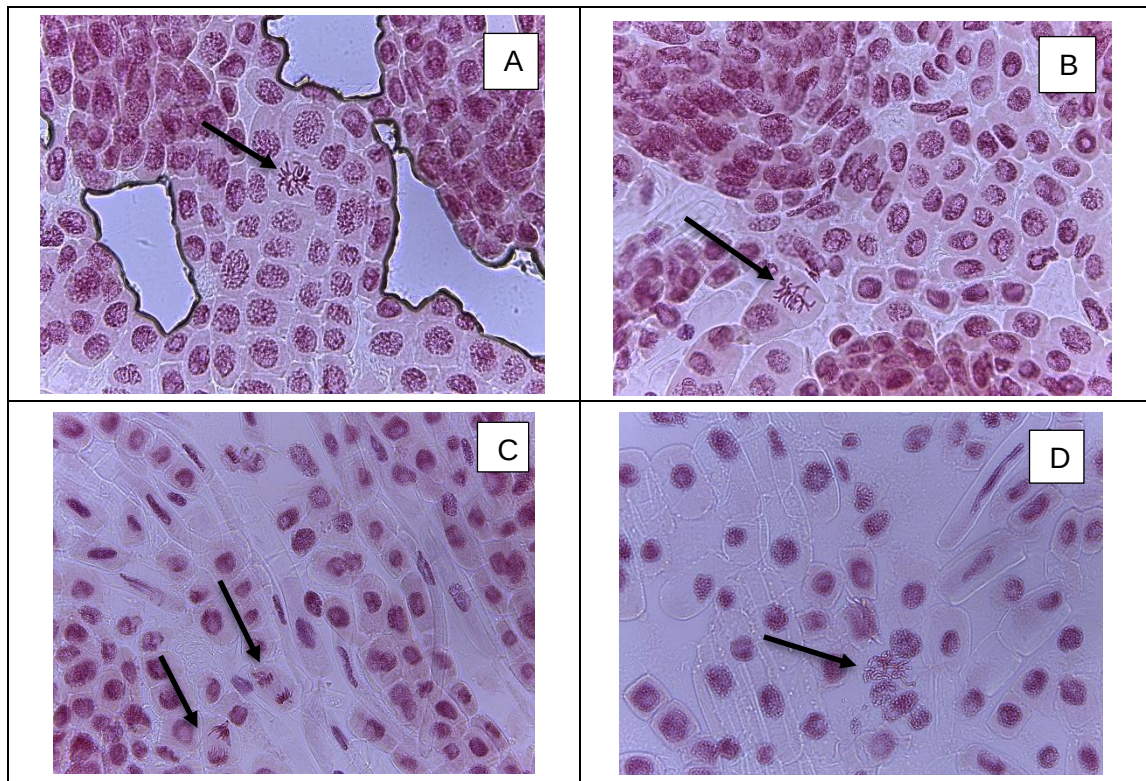


Tabela 7: Koncentracija 0,003 g/L CuSO₄. A: metafaza in anafaza. B: telofaza. C: C-mitoza. D: piknoze

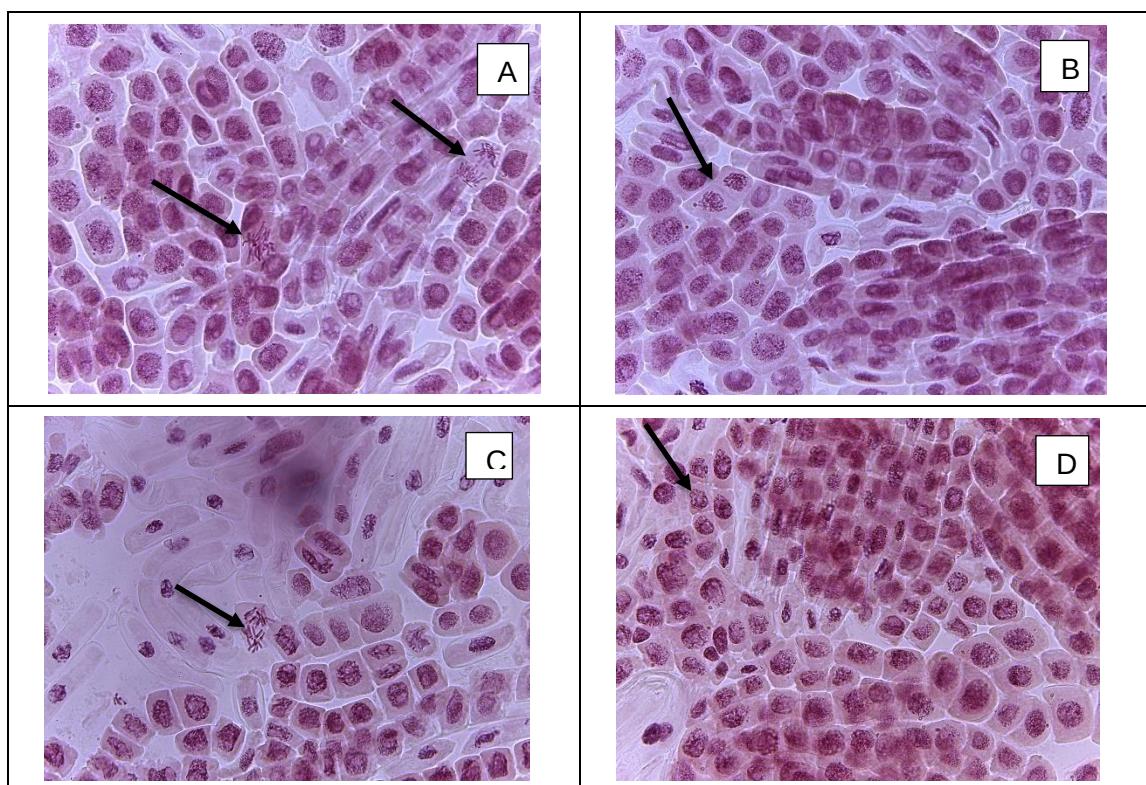


Tabela 8: Koncentracija 0,004 g/L CuSO₄. A: telofaza s kromosomskimi fragmenti. B: anafazni most. C: telofazni most. D: piknoze

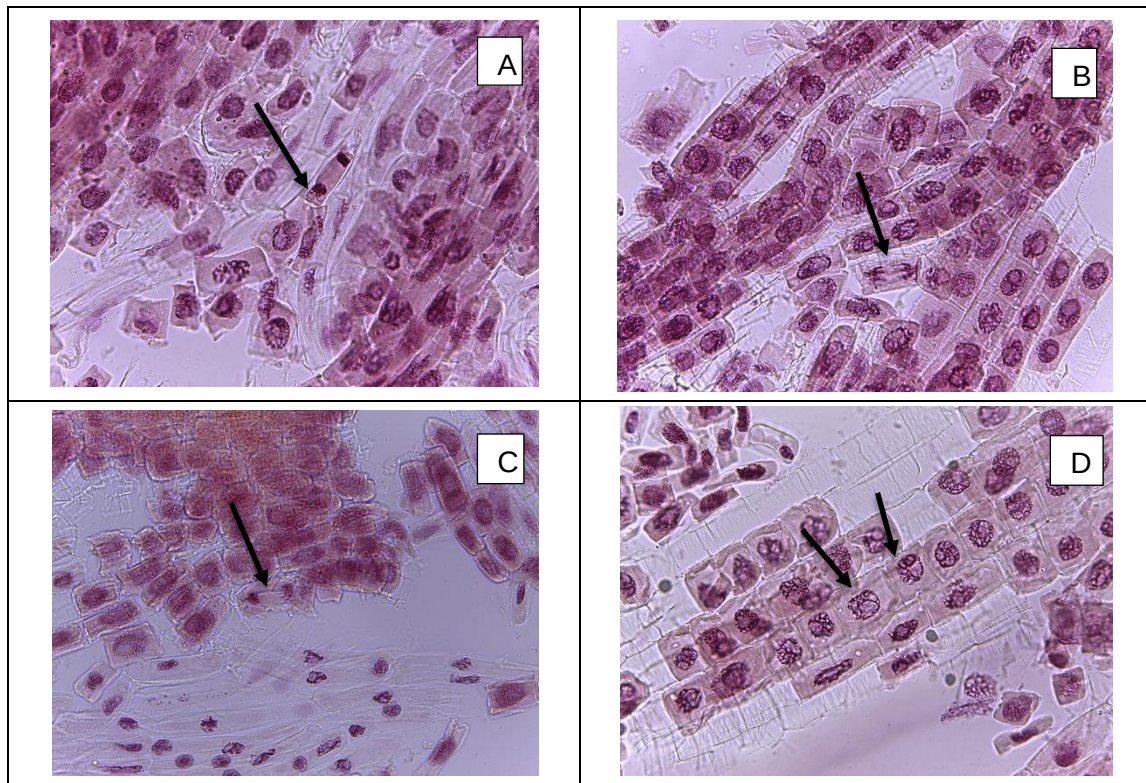


Tabela 9: Koncentracija 0,005 g/L CuSO₄. A: profaza. B: anafaza. C: tripolarna anafaza. D: kromosomski fragmenti.

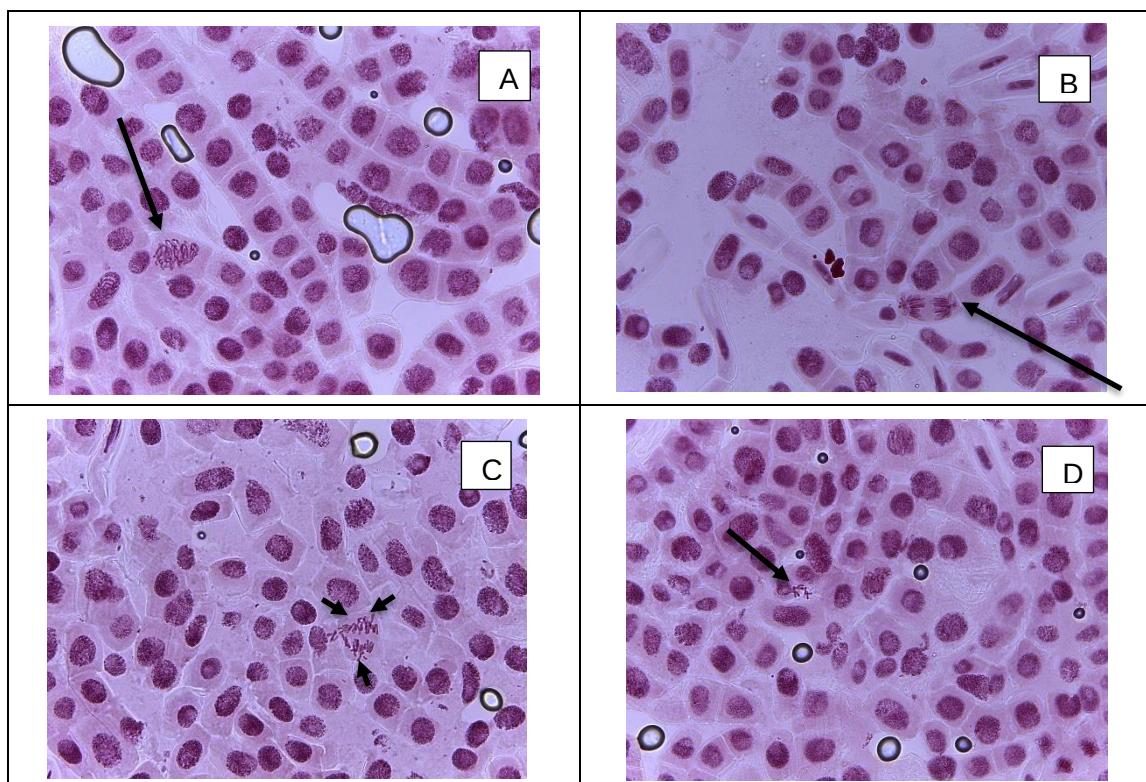
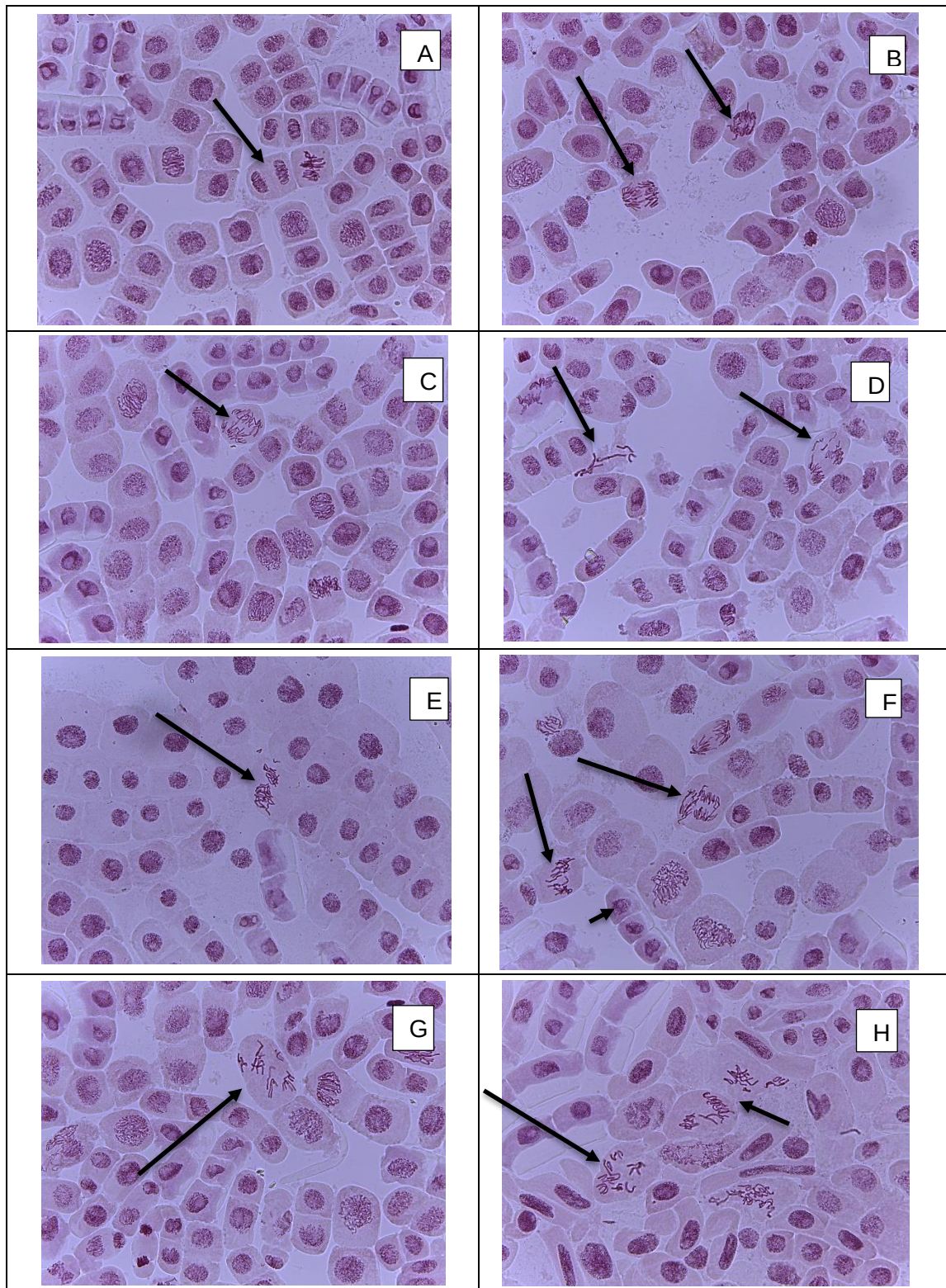


Tabela 10: Koncentracija 0,006 g/L CuSO₄. A: telofaza. B: 2 anafazna mosta. C: anafazni most. D: telofazni most in izgubljeni kromosom. E: kromosomski fragmenti. F: tripolarna anafaza, C-mitoza in piknoze. G: C-mitoza. H: C-mitoza in kromosomski fragment



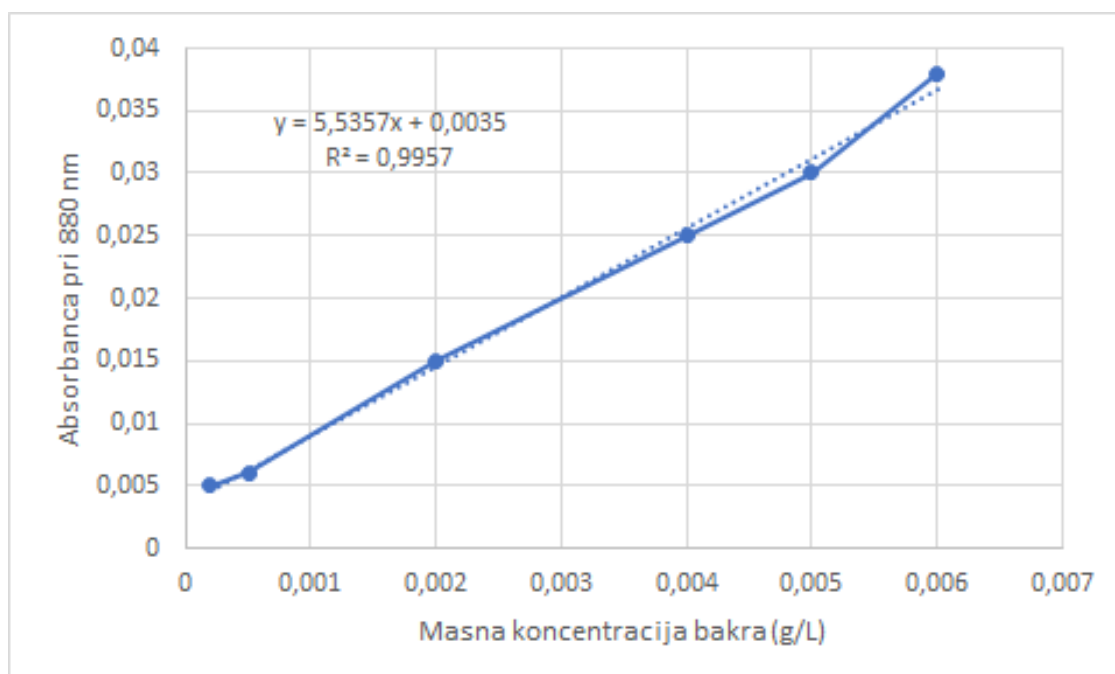
4.2 DOLOČEVANJE Cu^{2+} IONOV V EKSTRAKTU JAVANSKEGA MAHA

a) Umeritvena krivulja

Tabela 11: Vrednosti absorbanc raztopin $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$

Vzorec	Absorbanca (880 nm)
1	0,005
2	0,006
3	0,015
4	0,025
5	0,030
6	0,038

Graf 3: Umeritvena krivulja



Enačba premice je $y = 5,5357x + 0,0035$, kjer x predstavlja koncentracijo in y absorbanco.

$$\text{Koncentracija} = \frac{A + 0,0035}{5,5357} \times \text{razredčitveni faktor}$$

Koleracijski faktor R^2 je 0,9957.

b) Absorbance okoliške vode in ekstrakta javanskega maha

Tabela 12: Meritve absorbance okoliške vode v kateri je bil potopljen javanski mah

Vzorec	Absorbanca (880 nm)		
	1. MERITEV (1. dan)	2. MERITEV (7. dan)	3. MERITEV (9. dan)
1	0,027	0,011	0,014
2	0,028	0,026	0,032
3	0,036	0,028	0,022
4	0,033	0,032	0,032
5	0,036	0,037	0,037

Tabela 13: Meritve absorbance ekstrakta javanski mah

Vzorec	Absorbanca (880 nm)			
	1. MERITEV (7. dan)	Koncentracija bakra v razredčeni raztopini (g/L)	2. MERITEV (9. dan)	Koncentracija bakra v razredčeni raztopini (g/L)
1	0,04	0,0786	0,02	0,04245
2	0,044	0,0856	0,022	0,04605
3	0,036	0,0714	0,023	0,04787
4	0,04	0,0786	0,025	0,05148
5	0,038	0,075	0,023	0,04787

5. RAZPRAVA

HIPOTEZA 1

Bakrovi nanodelci aktivno vplivajo na delitev aktivno delujočih celic v koreninskem vršičku. Ugotovili smo, da nižje koncentracije bakra pospešujejo rast koreninskih meristemskih celic, saj je baker mikrohranilo in je esencialnega pomena. Baker je s svojo genotoksičnostjo vplival le pri večjih koncentracijah oz. odmerkih, to pa se je pokazalo kot mito-depresivni učinek bakrovih nanodelcev in posledično so bile korenine v omenjenih koncentracijah krajše (Nagaonkar, Shende, Rai, 2015). To hipotezo lahko le delno potrdimo. Meritve smo izvajali in opazovali v treh paralelah, od tega smo eno paralelo uporabili za rezanje koreninskih vršičkov. Iz tega razloga, te paralele nismo uporabili v računanju povprečne dolžine izrastkov, saj so bile korenine v petem dnevu posledično krajše kot korenine izmerjene v tretjem dnevu. Tako prirastek ne bi bil točen in bi precej zniževal skupno povprečje dolžine korenin preostalih dni. V tabeli 2 smo prikazali le povprečje prve in druge paralele. V skladu z našo delno potrjeno hipotezo so povprečne dolžine korenin z višanjem koncentracije CuSO_4 padale le v drugi paraleli. V najvišji koncentraciji (0,006) smo izmerili najkrajšo dolžino korenin in sicer 0,7 cm, medtem ko so v kontroli znašale povprečno dolžino 2,9 cm, v najnižji koncentraciji (0,002) pa 1,4 cm. V nasprotju s pričakovanji je bil prirastek v drugi paraleli najvišji pri koncentraciji 0,002 g/L, ki je znašal 0,4 cm, in ne v kontroli, kjer sva izračunali prirastek 0,3 cm. V prvi paraleli pa dolžine korenin niso enakomerno padale z višanjem koncentracije CuSO_4 . Tukaj so bile najkrajše korenine v koncentraciji 0,002 CuSO_4 g/L, te so v povprečju merile 0,9 cm, kar je 0,3 cm krajše kot dolžina koreninskih vršičkov pri koncentraciji 0,006 CuSO_4 g/L, kjer se je pričakovala najkrajša dolžina.

Tudi prirastek ni enakomerno padal. Pri kontroli in koncentraciji 0,004 g/L je bil prirastek najvišji ter znašal 0,8 cm. Pri najvišjih koncentracijah v prvi paraleli prirastka ni bilo, prav tako je bil zelo nizek v najvišji koncentraciji druge paralele. Kot že v zgoraj navedenem članku, navaja tudi Šiško (2019), ki je zapisala, da rastlina potrebuje le minimalno koncentracijo CuSO_4 , večje koncentracije pa so zanjo toksične in zavirajo rast rastline. Za vzrok neenakomernega padanja prirastka z večanjem koncentracije je navedla, možnost da je rastlina kompenzirala majhne koncentracije bakra, za katere je predvidevala, da jih je

vsebovala vodovodna voda. Pri našem poskusu bi lahko bil vzrok neenakomernega padanja tudi uporaba vodovodne vode. S tem lahko sklepamo, da je dolžina korenin pri nekaterih nižjih koncentracija precej visoka.

Deloma so na dolžino korenin vplivala naslednja dejstva in možne napake, in sicer lahko bi prišlo do merskih napak pri merjenju dolžine korenin, nekatere korenine so bile zvite in smo pri ravnanju le teh, za učinkovitejše merjenje, morali biti zelo previdni, da samega koreninskega vršička nismo zlomili. Prav tako merjenje z milimetrskim papirjem ne more biti popolnoma natančno in zanesljivo, zato smo si ob merjenju uporabili tudi ravnilo. Za natančnejše rezultate bi lahko, merjenje dolžin korenin večkrat ponovili. Kot možno napako lahko omenimo tudi ne natančno tehtanje CuSO_4 , zaradi zelo majhnih vrednosti in zaokroževanje pri povprečju dolžine koreninskih vršičkov.

HIPOTEZA 2

Številne raziskave so pokazale, da bo mitotski indeks z večanjem koncentracije bakrovega sulfata padal. To so potrdili tudi W. Jiang, D. Liu in X. Liu (2001), ki so zapisali: "Mitotski indeks odraža pogostost delitve celic in pomemben parameter pri določanju stopnje rasti korenin. Mitotski indeks se je postopoma zmanjšal s povečano koncentracijo Cu (z 10 na 102 M). Povežemo ga lahko s hitrostjo rasti, kar kaže na to, da je zaviranje rasti korenin posledica zaviranja celične delitve." Tudi Yildiz idr. (2009) navajajo, da se je celična delitev znatno zmanjšala z naraščanjem koncentracij bakrovega sulfata in kobaltovega klorida, v primerjavi s kontrolo. Visoke koncentracije teh kemikalij lahko povzročajo smrt celic na koreninskem vršičku, motijo normalen razvoj mitoze ter zavirajo vstop celicam v profazo, kar se je pokazalo kot upad mitotskega indeksa.

V našem primeru mitotski indeks ni bil najnižji pri najvišji vzeti koncentraciji (0,006 g/L). Najnižjo vrednost smo izračunali pri koncentraciji 0,005 g/L, ta je znašala 3,2 %. Druga najnižja izračunana vrednost je bila pri koncentraciji 0,003 g/L, in sicer 4,9 %, iz česar je razvidno, da z naraščanjem koncentracije mitotski indeks ni enakomerno padal. Najvišji je bil pri kontroli, kot je bilo pričakovano. Visok pa je bil tudi pri najnižji koncentraciji, saj je baker esencialna kovina, ki jo v nizkih koncentracijah rastline nujno potrebujejo za razvoj. S tem lahko našo hipotezo delno potrdimo. Vsekakor pa smo ob merjenju MI morali upoštevati in izločiti

morebitne vplive na merjenje. Pri pripravi preparatov smo bili pazljivi na možnost pojavljanja naslednjih napak. Vršičke smo morali porezati in jih fiksirati 3. dan rasti, in sicer zjutraj. Pozorni smo morali biti tudi na možne fiziološke vplive na mitozo, saj pri rastlinah mitotske delitve potekajo ritmično in se dnevno spreminjajo - ritem dan noč. Na delitev lahko vpliva tudi temperatura, zato smo pazili, da čebulice rastejo v njihovi optimalni temperaturi, prav tako vpliva tudi vlažnost in razpoložljiva hranila (Sinkovič, 2008). Preparate smo pripravili tako, da smo dobro zmečkali koreninski vršiček na mikroskopskem steklu, saj smo potrebovali samo en sloj celic za ogled pod mikroskopom. V nasprotnem primeru se sloji celic preveč prekrivajo in posamezne faze delitve ter možne anomalije niso dobro vidni. Pomembno je tudi, da zajamemo zadnji del koreninskega vršička, kjer je največ meristematskih celic.

HIPOTEZA 3

Truta idr. (2013) so navedli, da je njihova raziskava ob analizi biološkega materiala, izpostavljenega delovanju bakra, pokazala široko paleto motenj v anafazah in telofazah. Genotoksičnost te težke kovine je imela visoko vrednost. Prevladujejo kromosomski mostovi, ki jim sledijo izgubljeni kromosomi in kompleksne aberacije, ki pa so se večale z naraščanjem koncentracije. To hipotezo lahko v celoti potrdimo, največ anomalij smo našli v koncentraciji 0,006 g/L. Najbolj zastopane v tej so bile piknoze, katerih smo v vidnih poljih prešteli 45, nato so sledili kromosomski fragmenti (9), zasledili pa smo tudi nekaj anafaznih in telofaznih mostičkov, c-mitoz in tripolarnih anafaz. Kot pričakovano, se je število anomalij z nižanjem koncentracij enakomerno zniževalo. V koncentraciji 0,005 g/L, so bile prav tako najbolj zastopane piknoze, teh je bilo 30, bilo je še nekaj anafaznih mostičkov, c-mitoz, opazili pa smo tudi tripolarno anafazo ter telofazo s kromosomskimi fragmenti. Tudi v preostalih treh koncentracijah so prevladovale piknoze, v 0,004 g/L smo opazili še anafazna mostička, c-mitozo in telofazni mostiček. V drugih dveh manjših koncentracijah smo našli zanemarljivo malo kromosomskih anomalij. Peter Fibras (2011) navaja, da sta pogoj za kontrolo in pravilen potek mitoze normalen nastanek in položaj faz mitoze. V liniji 180 stopinj se praviloma formirata dva celična pola, variabilno odstopanje od le te pa povzroča motnje procesov v mitoz, ki pa naj v kontroli ne bi bili. V poškodovanih celicah se lahko pojavi potovanje kromatid kromosomov pri čemer nastanejo polarni poli v obliki semilunarne, tripolarne ali tudi transverzalne anafaze. Nastanejo tudi izgubljen kromosom, anafazno-telofazni most, mikronukleus in C-mitoza, kot posledica poškodbe celotnega mitoznega aparata. Na

mikroskopskih preparatih kontrole v vidnih poljih nismo opazili nobenih anomalij. Celice so bile v normalnih fazah celične delitve. V primerjavi kontrolnih preparatov s preparati različnih koncentracij CuSO_4 lahko sklepamo, da je bil baker ključni vzrok za povzročitev poškodb v različnih fazah mitoze. Truta idr. (2013) navajajo da je zmanjšanje mitotske aktivnosti lahko posledica motenj bakra in drugih težkih kovin v poteku običajne mitoze. Pojav mitotskih aberacij in mitodepresivnega učinka bi lahko razložili na podlagi vpliva težkih kovin na inhibicijo DNA-polimeraze, potrebno za sintezo predhodnikov DNA, kot tudi na spremembe v biosintezi nekaterih ključnih proteinov celičnega cikla, ki so neposredno vključeni v sestavljanje ali usmerjanje vretena. Možne napake se lahko pojavijo pri površnem štetju anomalij in pri prepoznavanju vrst le teh. V raziskovalni nalogi pa bi lahko merili še druge parametre kot je na primer aberacijski indeks.

HIPOTEZA 4

Hipotezo lahko delno potrdimo. Izmerjene absorbance v ekstraktu javanskega maha 7. dneva ne naraščajo z večanjem koncentracije CuSO_4 . Absorbance se gibljejo med vrednostmi 0,036 in 0,044. Najvišja absorbanca 0,044 in posledično največja izračunana koncentracija bakra v razredčeni raztopini je bila v koncentraciji 0,003 g/L CuSO_4 . Pri najvišji koncentraciji 0,006 g/L CuSO_4 , pa je absorbanca znašala 0,038, sklepamo, da je ta koncentracija za rastlino že toksična.

Deveti dan meritve absorbance, pa so bile njene vrednosti v vseh koncentracijah CuSO_4 približno za polovico manjše kot sedmi dan. Ob tem lahko sklepamo, da je rastlina začela propadati, pojavila se je narkoza, smrt in poškodba celic. Yruela (2005) navaja, da lahko baker pri visokih koncentracijah postane izredno strupen in povzroča simptome, kot so kloroza in nekroza, prav tako pa zaostajanje v rasti, razbarvanje listov in zaviranje rasti korenin. Toksičnost je na celični ravni lahko posledica vezave na sulfhidrilne skupine v beljakovinah, s čimer se zavira encimska aktivnost ali delovanje beljakovin, oksidativne poškodbe, indukcije pomanjkanja drugih bistvenih ionov in okvarjenih procesov celičnega transporta. Zato rastlina ni več mogla absorbirati večjih količin bakra, morda pa je bila bakru v vodi izpostavljena predolgo. Absorbance so v devetem dnevu večinoma naraščale premo sorazmerno z večanjem koncentracije CuSO_4 , z izjemo največjih dveh koncentracij. Najvišja absorbanca je bila v koncentraciji 0,005 g/L in je znašala 0,025. Koncentracije bakrovih ionov, se tako v

sedmem kot devetem dnevu niso preveč razlikovale, najvišja koncentracija pa je bila tam, kjer je bila najvišja absorbanca ekstrakta.

Absorbanca je bila v okoliški vodi sedmi dan meritve pri vseh koncentracijah razen pri koncentraciji 0,005 in 0,006 g/L manjša kot prvi dan meritve. Podobno se je zgodilo tudi iz 7. na 9. dan meritve, vendar sta bili deveti dan absorbanci pri 0,002 in 0,003 g/L večji kot sedmi dan, kar lahko razlagamo s tem da je rastlina začela propadati.

Številne raziskave se osredotočajo večinoma na raziskovanje koncentracij in vsebnosti bakra v tleh, saj največ bakra absorbirajo ravno korenine iz okoliške prsti. Zato bi bilo bolje eksperiment narediti s kopensko rastlino s koreninami v zemlji, ki bi jo izpostavljali različnim koncentracijam bakra.

6. ZAKLJUČEK

V prvem delu raziskovalne naloge smo dokazovali vpliv genotoksičnosti različnih koncentracij CuSO_4 na holandsko rumeno čebulo (*Allium cepa* L.), kar smo preverjali z dolžino pognanih korenin, mitotskim indeksom in številom in vrsto poškodb v celični delitvi. Dolžine korenin pod vplivom različnih koncentracij $\text{CuSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, smo predstavili v dveh paralelah. Le v drugi paraleli se je dolžina korenin manjšala z večanjem koncentracije, najkrajše so bile pri koncentraciji 0,006 g/L, zato smo lahko drugo hipotezo delno potrdili. V prvi paraleli pa je bila najkrajša povprečna dolžina korenin pri koncentraciji 0,002 g/L. Mitotski indeks ni povsem enakomerno padal z večanjem koncentracije, najnižji je bil pri koncentraciji 0,005 g/L in je znašal 3,2%, zato smo lahko to hipotezo le delno potrdili.

Tretjo hipotezo smo lahko potrdili, saj se je število aberacij v posameznih fazah delitve premo sorazmerno večalo z višanjem koncentracije raztopine bakrovega sulfata. Največ jih je bilo pri koncentraciji 0,006 g/L. Najbolj zastopane vrste poškodb v mitozu pri vseh koncentracijah so bile piknoze, našli pa smo tudi nekaj kromosomskih fragmentov, anafaznih in telofaznih mostičkov C-mitoz idr. Z drugim eksperimentom smo preverjali vpliv različnih koncentracij raztopin $\text{CuSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ na javanski mah (*Vesicularia dubyana*), tako da smo izmerili absorbance ekstrakta rastline in okoliške vode. Absorbance po sedmih dnevih niso enakomerno naraščale z večanjem koncentracije. Po devetih dnevih pa so bile vrednosti absorbanc dvakrat manjše, zato lahko sklepamo, da je rastlina propadla, pojavila se je nekroza. Absorbance 7. Dneva so bile manjše kot prvi dan, tudi absorbance devetega dneva so bile nekoliko manjše kot sedmi dan, z izjemami pri nekaterih koncentracijah. Četrto hipotezo smo prav tako delno potrdili.

S tem smo ugotovili da je imel CuSO_4 negativne, genotoksične vplive na obe rastlini, kar se je pokazalo predvsem z množičnim številom poškodb v fazah mitoze pri višjih koncentracijah, z nizkimi mitotskimi indeksi in propadanju in nezmožni absorbciji bakra v 9. dnevu pri javanskem mahu. Potrdili smo tudi, da je baker v majhnih koncentracijah za rastlino esencialen. Pri najnižji koncentraciji bakra se pri čebuli ni pojavilo skoraj nič aberacij, tudi mitotski indeks je bil visok v primerjavi z drugimi koncentracijami.

Vezava težkih kovin še vedno zastavlja neodgovorjena vprašanja, zato bi predlagali, da bi v prihodnje lahko preučevali vpliv genotoksičnosti več različnih težkih kovin na druge izbrane

rastline, ter tako primerjali njihov odziv na posamezne koncentracije. Urbanizacija je pospešen svetovni pojav, ki zahteva pravilno razumevanje med antropogenimi dejavnostmi in mestnim okoljem. Težke kovine so ena izmed obsežno raziskanih onesnaževal, ki so ves čas prisotne v urbanem okolju, se hitro kopičijo in dosegajo toksične ravni. Med okolju najbolj nevarne kovine vključujemo Cr, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb, Hg in As in prenos teh elementov v vodnih in kopenskih prehranjevalnih verigah ima pomembne posledice za živali in zdravje ljudi. Pomembno je spremljati koncentracije strupenih težkih kovin v različnih predelih okolja in javnost čimbolj poučiti o škodljivih učinkih toksičnosti ter o zmerni uporabi le teh.

7. DRUŽBENA ODGOVORNOST

Svet je na veliko načinov onesnažen s težkimi kovinami, predvsem zaradi onesnaževanja ljudi, z industrijskimi, kmetijskimi in drugimi dejavnostmi, kar slabo vpliva na zdravje ljudi in drugih živih bitij. Koncentracija bakra in drugih težkih kovin se v živih bitjih povečuje z premikanjem po prehranjevalni verigi, zato bi se morali zavedati njihovih škodljivih učinkov. Ker predstavljajo problem celotnemu ekosistemu, bi se morali ozaveščati o preprečevanju oz. zmanjšanju nadaljnjega onesnaževanja ter razmisliti kako bi z modernimi tehnologijami čim učinkoviteje zmanjšali njihov delež v okolju.

8. VIRI

Adriano D.C. (1986). Trace elements in the terrestrial environment. New York, Springer-Verlag: 532 str. Dostopno na:

https://www.enr.gov.nt.ca/sites/enr/files/trace_metals.pdf (4.1.2021)

Arif, N., Yadav, V., Singh, S., Singh, S., Ahmad, P., Mishra, R. K., Sharma, S., Tripathi, D. K., Dubey, N. K., Chauhan, D.K. (2016). Influence of High and Low Levels of Plant-Beneficial Heavy Metal Ions on Plant Growth and Development. *Frontiers in Environmental Science*, 4, 69. Dostopno na:

<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fenvs.2016.00069> (5.1.2021)

Beals, M., Gross, L., Harrell, S. (1999). Mitotic index and cell division. Dostopno na:

<http://www.tiem.utk.edu/~gross/bioed/webmodules/mitoticindex.htm> (26.3.2021)

Breznik, T. 2015. Onesnaženost sedimenta s težkimi kovinami v Zlatem rogu. Visoka šola za varstvo okolja, Velenje. Diplomsko delo. Medmrežje: http://www.vsvo.si/images/pdf/2015100831_Diplomsko_delo_Tia_Breznik.pdf (4.1.2021)

Briffa, J., Sinagra, E., Blundell, R. (2020). Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. *Heliyon*, Volume 6, Issue 9. Dostopno na:

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04691> (4.1.2021)

Chaney R.L., Sterrett S.B., Mielke H.W. (1984). The potential for heavy metal exposure from urban gardens and soils V: Heavy metals in urban gardens. Preer J.R. (ed.). Washington, University of the District of Columbia: 37-84. Dostopno na:

https://www.researchgate.net/publication/242693949_THE_POTENTIAL_FOR_HEAVY_MTA_L_EXPOSURE_FROM_URBAN_GARDENS_AND_SOILS (6.1.2021)

Engwa, G. A., Ferdinand, P. U., Nwalo, F. N., Unachukwu, M. N. (2019). Mechanism and Health Effects of Heavy Metal Toxicity in Humans. Dostopno na:

<https://www.intechopen.com/books/poisoninghttps://www.intechopen.com/books/poisoning-in-the-modern-world-new-tricks-for-an-old-dog-/mechanism-and-health-effects-of-heavy-metal-toxicity-in-humans-in-the-modern-world-new-tricks-for-an-old-dog-/mechanism-and-health-effects-of-heavy-metal-toxicity-in-humans> (5.1.2021)

Fibras, Peter (2011). Kemizacija okolja in citogenske poškodbe. Grosuplje : Esklirbis

Forstnerič, L. (2018). Težke kovine v okolju in njihov vpliv na zdravje ljudi. Dostopno na:

<https://liveforheartwarming.com/blog/tezke-kovine-v-okolju-in-njihov-vpliv-na-zdravje-ljudi/> (14.1.2021)

Förster H. (2004) UV/VIS Spectroscopy. In: Karge H.G., Weitkamp J. (eds) Characterization I. Molecular Sieves – Science and Technology, vol 4. Springer, Berlin, Heidelberg. Dostopno na:

<https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1007/b94239> (26.3.2021)

Glasenčnik E. 2004. Vpliv onesnaženega zraka na celične delitve v koreninskih vršičkih Salotke (*Allium cepa* L var. *ascalonicum*) na emisijsko ogroženih območjih Slovenije Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Oddelek za biologijo: 200 stran

Gorenjak, A. H. (2010). Živilska kemija z analizo živil in analiza živil. Ljubljana: Zavod IRC. Dostopno na:

[http://www.impletum.zavod-irc.si/docs/Skriti dokumenti/Zivilska kemija z analizo in Analiza zivil-Hmelak.pdf](http://www.impletum.zavod-irc.si/docs/Skriti_dokumenti/Zivilska_kemija_z_analizo_in_Analiza_zivil-Hmelak.pdf)

(26.3.2021)

Heavy metals. (brez datuma). Dostopno na:

<https://www.aquasabi.com/Vesicularia-dubyana-in-Vitro-XL> (4.1.2021)

Jiang, W., Liu, D. , Liu, X. (2001). Effects of Copper on Root Growth, Cell Division, and Nucleolus of Zea Mays. *Biologia Plantarum* 44, 105–109. Dostopno na:

<https://doi.org/10.1023/A:1017982607493> (25.3.2021)

Kaiser, D., Rosen, C. (2018). Copper for crop production. Dostopno na:

<https://extension.umn.edu/micro-and-secondary-macronutrients/copper-crop-production>

(11.1.2021)

Krajncič, P. (2008). Uporaba pretočne citometrije za določanje apoptoze pri disiminiranem plazmocitomu. (Diplomsko delo, Fakulteta za farmacijo). Dostopno na:

[http://www.ffa.uni-](http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/diplome/2008/Krajncic_Polona_dipl_nal_2008.pdf)

[lj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/diplome/2008/Krajncic Polona dipl nal 2008.pdf](http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/diplome/2008/Krajncic_Polona_dipl_nal_2008.pdf)

(6.1.2021)

Mah javanski. Dostopno na:

<https://slo.aquafans.ru/ribe/2175-mah-javanski.html> (16.2. 2021)

Masindi, V. , Muedi K. L. (2018). Environmental Contamination by Heavy Metals. Heavy Metals, Hosam El-Din M. Saleh and Refaat F. Aglan, IntechOpen. Dostopno na:

[https://www.intechopen.com/books/heavy-metals/environmental-contamination-by-](https://www.intechopen.com/books/heavy-metals/environmental-contamination-by-heavy-metals#B17)

[heavy-metals#B17](https://www.intechopen.com/books/heavy-metals/environmental-contamination-by-heavy-metals#B17) (7.1.2021)

Nagaonkar, D., Shende, S., Rai, M. (2015). *Biosynthesis of copper nanoparticles and its effect on actively dividing cells of mitosis in Allium cepa*. *Biotechnology Progress*, 31(2), 557–565.

Dostopno na:

<https://aiche.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/btpr.2040> (25.3.2021)

Romih, N., Graner, B., Lasnik, C. R. (brez datuma). Remediacija onesnaženih tal s težkimi kovinami. Dostopno na:

https://arhiv.kis.si/datoteke/File/kis/SLO/MEH/Biomasa/PRIROCNIK_IOP-1.pdf (10.1.2021)

Sinkovič, T. (2008). Mitoza in celični cikel pri višjih rastlinah. *Acta agriculturae Slovenica*, 91 - 2. str. 465 - 477. Dostopno na:

<http://aas.bf.uni-lj.si/september%202008/12sinkovic.pdf> (25.3.2021)

Šiško, T. (2019). Vpliv delcev CuSO_4 na rast korenin čebule (*Allium cepa*). Biotehniška fakulteta, Ljubljana.

Truta, E., Vochița, G., Zamfirache, M., Zenovia, O., Rosu, C. (2013). Copper-induced genotoxic effects in root meristems of *Triticum Aestivum* L. CV. Beti. *Carpathian journal of earth and environmental sciences*. 8. 83-92. Dostopno na:
https://www.researchgate.net/figure/Types-of-ana-telophase-chromosome-aberrations-a-multiple-bridges-25mM-copper-acetate_fig2_257571976 (25.3.2021)

Udovič, M., Leštan, D. (2008) Remediacija zemljine z območja stare cinkarne v Celju z metodo stabilizacije s cementom. *Acta agriculturae Slovenica*, 91 (1), 283-295 . Dostopno na:
<http://aas.bf.uni-lj.si/maj%202008/23udovic.pdf> (7.1.2021)

Uradni list RS. (2005). Uredba o mejnih vrednostih vnosa nevarnih snovi in gnojil v tla. št. 84, str. 8709. Dostopno na:
<https://www.uradni-list.si/glasilo-uradni-list-rs/vsebina/57871> (5.1.2021)

Vesicularia Dubyana. (brez datuma). Dostopno na:
<https://www.aquasabi.com/Vesicularia-dubyana-in-Vitro-XL> (16.2.2021)

Yıldız, M., Ciğerci, İ. H., Konuk, M., Fatih Fidan, A., Terzi, H. (2009). *Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in Allium cepa root cells by chromosome aberration and comet assays. Chemosphere, 75(7), 934–938. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.01.023.* Dostopno na:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653509000356?via%3Dihub> (25.3.2021)

Yruela, I. (2005). Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(1), 145-156. Dostopno na:
<https://doi.org/10.1590/S1677-04202005000100012> (4.1.2021)

9. PRILOGE

Tabela 14: število anomalij pri koncentraciji 0,002 g/L CuSO₄

število celic v posamezni fazi delitve					
število preparata	INTERFAZA	PROFAZA	METAFaza	ANAFaza	TELOFAZA
1	152	7	3	0	0
2	161	13	2	2	3
3	187	10	2	1	1
povprečna vrednost	166,6	10	2,6	1	1,3

Tabela 15: število anomalij pri koncentraciji 0,003 g/L CuSO₄

število celic v posamezni fazi delitve					
število preparata	INTERFAZA	PROFAZA	METAFaza	ANAFaza	TELOFAZA
1	143	5	0	0	0
2	137	8	1	1	0
3	122	4	0	1	0
povprečna vrednost	134	5,6	0,3	0,6	0

Tabela 16: število anomalij pri koncentraciji 0,004 g/L CuSO₄

število celic v posamezni fazi delitve					
številka preparata	INTERFAZA	PROFAZA	METAFAZA	ANAFAZA	TELOFAZA
1	144	4	4	0	0
2	115	8	0	0	1
3	96	9	0	1	0
povprečna vrednost	118,3	7	1,3	0,3	0,3

Tabela 17: število anomalij pri koncentraciji 0,005 g/L CuSO₄

število celic v posamezni fazi delitve					
številka preparata	INTERFAZA	PROFAZA	METAFAZA	ANAFAZA	TELOFAZA
1	112	2	0	1	0
2	143	2	0	0	2
3	154	6	0	0	0
povprečna vrednost	136	3,3	0	0,3	0,6

Tabela 18: število anomalij pri koncentraciji 0,006 g/L CuSO₄

število celic v posamezni fazi delitve					
številka preparata	INTERFAZA	PROFAZA	METAFaza	ANAFaza	TELOFAZA
1	94	1	0	2	4
2	84	2	0	2	1
3	128	3	1	1	2
povprečna vrednost	102	2	0,3	1,6	2,3

Tabela 19: dolžina koreninskih izrastkov v 3. dnevu

Koncentracija bakra (g/L)	Dolžina izrastkov 1. epruvete (cm)	Dolžina izrastkov 2. epruvete (cm)	Dolžina izrastkov 3. epruvete (cm)	Povprečje izrastkov vseh epruvet (cm)
0	2,1	2,6	1,84	2,18
0,002	1	1	0,72	0,91
0,003	1,26	0,9	1,6	1,25
0,004	1,92	0,96	1,13	1,34
0,005	1,22	0,64	0,92	0,93
0,006	1,16	0,58	1,08	0,94

Tabela 20: dolžina koreninskih izrastkov v 5. dnevu

Koncentracija bakra (g/L)	Dolžina izrastkov 1. epruvete (cm)	Dolžina izrastkov 2. epruvete (cm)	Dolžina izrastkov 3. epruvete (cm)	Povprečje izrastkov vseh epruvet (cm)
0	2,34	2,64	2,96	2,65
0,002	0,88	1,16	0,74	0,93
0,003	1,28	1,18	1,44	1,3
0,004	2,02	0,96	2,12	1,7
0,005	1,08	0,6	0,9	0,86
0,006	1,18	0,72	1,34	1,08

Tabela 21: dolžina koreninskih izrastkov v 7. dnevu

Koncentracija bakra (g/L)	Dolžina izrastkov 1. epruvete (cm)	Dolžina izrastkov 2. epruvete (cm)	Dolžina izrastkov 3. epruvete (cm)	Povprečje izrastkov vseh epruvet (cm)
0	2,92	2,92	4,32	3,39
0,002	0,9	1,4	0,72	1
0,003	1,38	1,08	1,86	1,44
0,004	2,74	1,08	2,54	2,12
0,005	1,14	0,94	0,88	0,99
0,006	1,24	0,7	1,62	1,19

Tabela 22: povprečna dolžina koreninskih izrastkov v treh paralelah

Epruveta	1				2				3			
(cm)	3. D	5. D	7. D	PK	3. D	5. D	7. D	PK	3. D	5. D	7. D	PK
Kontrola	2,1	2,3	2,9	0,8	2,6	2,6	2,9	0,3	1,8	2,9	4,3	2,5
0,002	1	0,9	0,9	0,1	1	1,2	1,4	0,4	0,7	0,7	0,7	0
0,003	1,3	1,3	1,4	0,1	0,9	1,1	1,1	0,2	1,6	1,4	1,9	0,3
0,004	1,9	2	2,7	0,8	1	1	1,1	0,1	1,1	2,1	2,5	1,4
0,005	1,1	1,1	1,1	0	0,6	0,6	0,9	0,3	0,9	0,9	0,9	0
0,006	1,2	1,2	1,2	0	0,6	0,7	0,7	0,1	1,1	1,3	1,6	0,5