

**UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA**

**Nada VERDEL**

**KEMIJSKO - FIZIKALNE LASTNOSTI EPITAKSIČNO VTISNJENIH  
STRUKTUR ENOSTAVNIH IN KOMPLEKSNIH KEMIJSKIH SPOJIN**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**PHYSICO - CHEMICAL PROPERTIES OF EPITAXIALLY IMPRINTED  
STRUCTURES OF SIMPLE AND COMPLEX CHEMICAL COMPOUNDS**

**DOCTORAL DISSERTATION**

**Ljubljana, 2014**

Doktorsko delo je zaključek podiplomskega študija bioloških in biotehniških znanosti Biotehniške Fakultete Univerze v Ljubljani. Poskusi so bili opravljeni na Katedri za anorgansko kemijo in Katedri za fizikalno kemijo Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani ter na Inštitutu Bion, Ljubljana.

Po sklepu komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani je bila tema disertacije sprejeta 11. februarja 2010. Senat Univerze v Ljubljani je za mentorja doktorskega dela imenoval prof. dr. Igorja Jermana in za somentorja prof. dr. Petra Bukovca.

Komisija za oceno doktorske disertacije:

prof. dr. Nina Gunde Cimerman (BF) – predsednica  
prof. dr. Igor Jerman (BION) – mentor in član  
prof. dr. Peter Bukovec (FKKT) – somentor in član  
prof. dr. Nataša Poklar Ulrich (BF) – članica  
prof. dr. Slavko Pečar (FFA) - član

Komisija za prvi zagovor doktorske disertacije (dne 16. 3. 2012, neuspešen zagovor)

prof. dr. Peter Maček (BF) – predsednik  
prof. dr. Peter Bukovec (FKKT) – somentor in član  
prof. dr. Slavko Pečar (FFA) – član  
prof. dr. David Stopar (BF) - član

Komisija za drugi zagovor doktorske disertacije (dne 24. 3. 2014)

prof. dr. Ivan Svetlik (rektor UL) – predsednik  
prof. dr. Igor Potočnik (dekan BF) – član  
prof. dr. Matjaž Krajnc (dekan FKKT) – član  
prof. dr. Peter Bukovec (FKKT) - član  
prof. dr. Alenka Gaberščik (BF) - članica

Doktorsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Nada Verdel

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

**ŠD** Dd  
**DK** 541.183:577.2(043.3)=163.6  
**KG** voda/zaznavanje kvorum/*Chromobacterium violaceum* CV026/električna prevodnost/UV-VIS spektroskopija  
**AV** mag. VERDEL, Nada, univ. dipl. inž. kem. inž.  
**SA** JERMAN Igor (mentor)/BUKOVEC, Peter (somentor)  
**KZ** SI-1111 Ljubljana, Večna pot 111  
**ZA** Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, znanstveno področje biologija  
**LI** 2014  
**IN** KEMIJSKO – FIZIKALNE LASTNOSTI EPITAKSIČNO VTISNJENIH STRUKTUR ENOSTAVNIH IN KOMPLEKSNIH KEMIJSKIH SPOJIN  
**TD** Doktorska disertacija  
**OP** XV, 131 str., 19 pregl., 56 sl., 7 pril., 248 vir.  
**IJ** sl  
**JJ** sl/en  
**AI** Voda ima mnogotere vloge v biokemijskih procesih. Naš glavni namen je bil ugotoviti, ali na strukturo vode vpliva predhodna mehanska (poimenovali smo jo mehanogena epitaksija) in električna obdelava (elektrogena epitaksija). Mehansko smo raztopine obdelali tako, da smo jih izmenično redčili 1 : 100 in dinamizirali z močnim tresenjem, dokler nismo pripravili ekstremno razredčene raztopine z enako kemijsko sestavo kot topilo. Električna obdelava pa je potekala tako, da smo raztopine izpostavili močnim električnim impulzom, predvidoma spremenjenim zaradi električnega polja donorne (izhodne) snovi. Na ta način smo predvidevali, da v sprejemno raztopino vtiskujemo »informacijo« o strukturi izhodne snovi. Ekstremno razredčena oziroma z elektrogeno epitaksijo (predvidoma) vtisnjena kalijev klorid in Milli-q vodo smo karakterizirali z merjenjem električne prevodnosti in UV-VIS spektroskopijo. Eksperimentalne rezultate smo primerjali z rezultati analognih neobdelanih kontrolnih raztopin. S feromonskimi testi pa smo preverili vpliv ekstremno razredčene oziroma z elektrogeno epitaksijo (predvidoma) vtisnjene »informacije« feromonov N-heksanoil-L-homoserin laktona in N-(3-okso-heksanoil)-L-homoserin laktona. Vendar z uporabljenimi metodami (feromonski test z indikatorskimi bakterijami *Chromobacterium violaceum* CV026, UV-VIS spektroskopija in merjenje prevodnosti) teh vplivov nismo dokazali. Pri tem pa smo na osnovi rezultatov merjenja prevodnosti prišli do povsem novih spoznanj. Pri staranju 370 dni v 2 mL so bile presežne prevodnosti 43 %, v 5 mL 36 % in v 10 mL 27 % izmerjene prevodnosti. Ugotovili smo, da imajo vse starane raztopine (obdelane in neobdelane) značilno večje prevodnosti od sveže pripravljenih, kemijsko analognih raztopin razen tistih, ki smo jih skladiščili zamrznjene. Pri tem so rezultati presenetljivo v skladu z opaženim fenomenom v tekoči vodi, ki nastane oziroma se razvije, ko vodo nekaj časa skladiščimo v zaprtih posodah. Ta fenomen so poimenovali *avtotiksotropija* vode zaradi spontanega nastanka tiksotropnih lastnosti vode; tiksotropija je lastnost nekaterih tekočin, ki so pri normalnih pogojih poltrdne in viskozne, medtem ko z mehansko obdelavo postanejo bolj tekoče in manj viskozne (npr. glina). Glede na rezultate predpostavljamo, da bi lahko bili odločilni faktorji vpliva na razvoj avtotiksotropnih lastnosti vode ionti in bližina hidrofilnih površin.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

**DN** Dd  
**DC** 541.183:577.2(043.3)=163.6  
**CX** water/quorum sensing/*Chromobacterium violaceum* CV026/electrical conductivity/UV-VIS spectroscopy  
**AU** VERDEL, Nada  
**AA** JERMAN Igor (supervisor)/BUKOVEC, Peter (co-supervisor)  
**PP** SI-1111 Ljubljana, Večna pot 111  
**PB** University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, postgraduate study of biological and biotechnical sciences, science area biology  
**PY** 2014  
**TI** PHYSICO - CHEMICAL PROPERTIES OF EPITAXIALLY IMPRINTED STRUCTURES OF SIMPLE AND COMPLEX CHEMICAL COMPOUNDS  
**DT** Doctoral dissertation  
**NO** XV, 131 p., 19 tab., 56 fig., 7 ann., 248 ref.  
**LA** sl  
**AL** sl/en  
**AB** Water plays a wide variety of roles in biochemical processes. Our main purpose was to determine how the structure of water is influenced by mechanical (we termed it mechanogenic epitaxy) or electrical treatment (electrogenic epitaxy). Solutions were treated mechanically by iteration of two processes: 1 : 100 dilution and dynamization by vigorous shaking. The two processes were repeated until extremely dilute solutions were obtained, where the chemical composition was identical to that of the solvent. Electrically, solutions were exposed to strong electrical impulses altered by the electrical field of the donor substance. This way the “information” of the donor substance was (supposedly) epitaxially imprinted into the acceptor solution. The electrical conductivity and UV-VIS spectroscopy measurements were applied to the physical characterization of ultrahigh dilutions or by electrical treatment “imprinted” potassium chloride and Milli-q water. The experimental results were compared to the ones of analogous untreated control solutes. Pheromone tests were applied for verifying the influence of mechanically or electrically (supposedly) imprinted “information” of pheromones N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone and N-hexanoyl-L-homoserine lactone. However, with the methods we used (pheromone test with indicator bacteria *Chromobacterium violaceum* CV026, UV-VIS spectroscopy and electrical conductivity measurements) these influences were not proven. However, on the basis of the electrical conductivity measurements interesting cognitions were found. After 370 days excess conductivity of 2, 5 and 10 mL solutions gave 43, 36 and 27 % of measured conductivity, respectively. We found significantly higher conductivity values than those of freshly prepared chemically analogous solutions in all aged solutions (treated and untreated) except for those stored frozen. The results surprisingly resemble a previously observed phenomenon in liquid water, which develops when water is stored in closed vessels for some time and where the presence of ions seems to play a significant role. This phenomenon was termed *autothixotropy* due to weak gel-like behaviour of water developing spontaneously over time. We suggest that salt ions and contact with hydrophilic glass surface are the determinative conditions for the occurrence of the phenomenon.

## KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija _____	III
Key words documentation _____	IV
Kazalo vsebine _____	V
Kazalo preglednic _____	VII
Kazalo slik _____	VIII
Okrajšave in simboli _____	XIV
Slovarček _____	XV
<b>1 UVOD _____</b>	<b>1</b>
1.1 DELOVNA HIPOTEZA _____	2
1.2 AVTOTIKSOTROPIJA VODE _____	3
<b>2 PREGLED OBJAV _____</b>	<b>5</b>
2.1 VLOGA VODE V ŽIVIH ORGANIZMIH _____	5
<b>2.1.1 Voda kot tekočina in topilo _____</b>	<b>7</b>
<b>2.1.2 Vodno okolje celice _____</b>	<b>24</b>
<b>3 MATERIAL IN METODE _____</b>	<b>29</b>
3.1 MATERIAL _____	29
<b>3.1.1 Čiščenje steklovine _____</b>	30
<b>3.1.2 Sterilizacija raztopin, gojišč in steklovine _____</b>	30
3.2 METODE _____	30
<b>3.2.1 Mehanogena epitaksija _____</b>	32
<b>3.2.2 Elektrogena epitaksija _____</b>	32
<b>3.2.3 Merjenje prevodnosti _____</b>	34
<b>3.2.4 UV-VIS spektroskopija _____</b>	46
<b>3.2.5 Feromonski test s CV026 _____</b>	47
<b>4 REZULTATI _____</b>	<b>53</b>
4.1 MERJENJE PREVODNOSTI _____	53
<b>4.1.1 Preliminarna merjenja prevodnosti s sistemom MBR _____</b>	53
<b>4.1.2 Sistem za merjenje prevodnosti BFK _____</b>	57
4.2 FEROMONSKI TEST S <i>Chromobacterium violaceum</i> CV026 _____	83
<b>4.2.1 Feromonski test z »informacijo« AHL _____</b>	83
<b>4.2.2 Preliminarni testi zaznavanja kvoruma z AHL in »informacijo« AHL _____</b>	84
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI _____</b>	<b>95</b>
5.1 RAZPRAVA _____	95
<b>5.1.1 Kemijsko-fizikalne lastnosti epitaksično vtisnjениh struktur _____</b>	95
<b>5.1.2 Časovno pogojene spremembe v vodi _____</b>	98
<b>5.1.3 Vzrok za presežne prevodnosti _____</b>	99
<b>5.1.4 Vpliv položaja staranja _____</b>	102
<b>5.1.5 Vpliv hidrofilnih površin _____</b>	103
<b>5.1.6 Vpliv temperature _____</b>	105
<b>5.1.7 Vpliv raztopljenega CO<sub>2</sub> _____</b>	105
<b>5.1.8 Ali so rezultati uporabni tudi v biologiji? _____</b>	106
<b>5.1.9 Nadaljnje raziskave avtotiksotropije vode _____</b>	109
5.2 SKLEPI _____	110
<b>6 POVZETEK (SUMMARY) _____</b>	<b>111</b>

6.1	<b>POVZETEK</b>	111
6.2	<b>SUMMARY</b>	114
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	117
7.1	<b>DRUGI VIRI</b>	131
	<b>ZAHVALA</b>	
	<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1:	Uporabljene kemikalije.	29
Pregl. 2:	Uporabljena voda.	29
Pregl. 3:	Strukture uporabljenih feromonov AHL.	29
Pregl. 4:	Postopki čiščenja steklovine.	30
Pregl. 5:	Obdelave, uporabljene pri merjenju prevodnosti in UV-VIS spektroskopiji.	34
Pregl. 6:	Konstante kapilarnih celic sistema za merjenje prevodnosti MBR.	36
Pregl. 7:	Načini staranja raztopin $\text{NaHCO}_3$ .	38
Pregl. 8:	Primer desetih meritev prevodnosti $104 \mu\text{mol/L}$ $\text{NaHCO}_3$ pri 100, 120, 1000, 10 000 in 100 000 Hz ter $5^\circ\text{C}$ z opisno statistiko - povprečja (AVG), standardne deviacije (SD), standardne napake (SE) in relativne standardne napake (RSE).	40
Pregl. 9:	Priprava raztopin za umeritveno krivuljo prevodnosti iz $0,05 \text{ mol/L}$ $\text{NaHCO}_3$ in $\text{Mq}$ .	41
Pregl. 10:	Ponovljivost staranja priprav PR1 in PR2 – opis obdelav KON, MV, MK, EV in EK s številom paralelk (N).	43
Pregl. 11:	Ponovljivost staranja – statistični podatki.	43
Pregl. 12:	Vpliv volumna staranja – statistični podatki.	44
Pregl. 13:	Vpliv položaja staranja, obdelave, frekvence in temperature na prevodnost – statistični podatki.	46
Pregl. 14:	Primer priprave obdelav za gojenje CV026 v tekočih gojiščih.	49
Pregl. 15:	Priprave $50 \mu\text{L}$ raztopine AHL za difuzijsko metodo v jamicah.	49
Pregl. 16:	Test zaznave »informacije« OHHL v CV026 z difuzijsko metodo v jamicah; MF in EF pripravljene z gojiščem LB oziroma $\text{dH}_2\text{O}$ .	83
Pregl. 17:	Ponovljivost priprave gojišča na ploščah $2r = 90 \text{ mm}$ in merjenja $A_{585}$ po 15 urah inkubacije KON pri $20^\circ\text{C}$ ; 4 h na $4^\circ\text{C}$ .	91
Pregl. 18:	Ponovljivost priprave gojišča na malih ploščah $2r = 35 \text{ mm}$ in merjenja $A_{585}$ ; KON 4 h na $4^\circ\text{C}$ .	93
Pregl. 19:	$A_{585}$ KON in MF2 oziroma EF1 – male plošče oziroma male epruvete; 4 h na $4^\circ\text{C}$ .	93

## KAZALO SLIK

Sl. 1:	Shema mioglobina (modra površina) s 1911 vodnimi molekulami. Okoli proteina je ~ 5 Å debel hidratacijski ovoj. Približno 200 vodnih molekul so ločili od ozadja z visoko resolucijsko kristalografijo z rentgenskimi žarki (Vir: Frauenfelder in sod. 2009).	5
Sl. 2:	Shema strukture molekule vode, ponazorjena s štirimi $sp^3$ -hibridiziranimi elektronskimi pari. Opomba: shema ne ponazarja dejanske podobe molekule vode, ki je bolj okrogla (Vir: Chaplin <a href="http://www.lsbu.ac.uk/water/">http://www.lsbu.ac.uk/water/</a> ).	7
Sl. 3:	(a) Geometrija tetraedrične koordinacije vodnih molekul in (b) defekti z razcepljenimi vodikovimi vezmi. Za (b) Sciortino in sodelavci (1991) domnevajo, da imajo ključno vlogo v molekulski mobilnosti vode v tekočem stanju (Vir: Ball 2008).	8
Sl. 4:	Topljenje kationov in anionov: (a) konvencionalni pogled in (b) orientacija vode, odkrita s sipanjem nevronskih žarkov Sopra in sodelavcev (1977) (Vir: Ball 2008).	11
Sl. 5:	Hidrofobni privlak po modelu Luma in sodelavcev (1999). Hidrofobne površine so obdane s tanko plastjo pare, pri neki kritični razdalji $D_c$ se voda v medprostoru kolektivno izsuši (Vir: Ball 2008).	14
Sl. 6:	Kloridni most <i>t</i> -butil alkohola v vodni raztopini z NaCl po Finneyu in Bowronu (2004) (Vir: Ball 2008).	16
Sl. 7:	Skrivnostni mehurčki na hidrofobni površini so teoretično premajhni, da bi lahko obstajali (velikost slike je $4 \mu\text{m}^2$ ) (Vir: Borkent in sod. 2007).	17
Sl. 8:	Značilne dimenzijske nanomehurčkov: $r = 50 \text{ nm} - 6 \mu\text{m}$ , $r_s = 25 - 1000 \text{ nm}$ , $h = 5 - 20 \text{ nm}$ in $\theta = 135^\circ - 175^\circ$ . Prevod angl. – slo.: <i>liquid</i> – tekoče, <i>gas</i> – plin, <i>solid</i> – trdno, <i>contact angle</i> – stični kot, <i>gas-liquid surface</i> – površina plin-tekočina, <i>gas-solid surface</i> – površina plin-trdno, <i>bubble volume</i> – volumen mehurčka (Vir: Chaplin <a href="http://www.lsbu.ac.uk/water/">http://www.lsbu.ac.uk/water/</a> ).	18
Sl. 9:	Orientacijsko urejanje vodnih molekul ob lipidnem dvosloju po Chengu in sodelavcih (2003) (Vir: Ball 2008).	19
Sl. 10:	Primeri izključitev topnjencev z različnih površin. (a) Izključitev topnjencev (EXCL) z bližine gela poliakrilatne kisline. Gel so položili na krovno stekelce in dolili suspenzijo 1-μm karboksiliranih mikrosfer ter opazovali z invertnim mikroskopom z 20x objektivom. Slikali so po 20 minutah. Mikrosfere (desni del slike) so podvržene aktivnemu termičnemu gibanju. (b) Izključitev mikrosfer z bližine bioloških tkiv. V osmih vzorcih, ki so jih pregledali pod podobnimi pogoji, so našli izključitvene cone velikosti $360 \pm 50 \mu\text{m}$ . (c) Optično vlakno FS-SC-7324, Thorlabs, Newton, NJ, (levo) z akrilatnim polimernim premazom,	22

potopljeno v suspenzijo mikrosfer. Mikrosfere so se pomaknile proti desni. 20x objektiv, 2- $\mu\text{m}$  karboksilirane mikrosfere. (d) Hidrofilni monosloj, ki vsebuje COOH skupine, z izključitveno cono. (e) Film Nafiona-117 suličaste oblike, debeline 170  $\mu\text{m}$ , vstavljen med dva krovna stekelca z večjo debelino od filma. Zunanji film Nafiona so prepojili s suspenzijo karboksiliranih mikrosfer s premerom 2- $\mu\text{m}$ . Temne cone so brez mikrosfer. Številke zgoraj desno pa kažejo čas po prepojivitvi s suspenzijo. Prikazano je le prvih nekaj minut. (f) Žica iz nerjavnega jekla brez hidrofilnih skupin na površini, vrinjena med dva krovna stekelca, izpostavljena suspenziji mikrosfer – izključitvena cona se ne pojavi. Prevod angl. – slo.: *microspheres* – mikrosfere, *muscle* – mišica, *optical fibre* – optično vlakno, *monolayer* – monosloj, *wire* – žica (Vir: Zheng in sod. 2006).

Sl. 11:	Shema eksperimenta merjenja električne napetosti vode (Vir: Ovchinnikova in Pollack 2009).	23
Sl. 12:	Gneča v citoplazmi. Zaradi večje nazornosti so manjše molekule narisane samo v zgornjem desnem kotu skice (Vir: Goodsell 1993).	25
Sl. 13:	(a) Prenos vodikovih ionov ( $\text{H}^+$ ) v vodi poteka po de Grotthusovem mehanizmu, pri katerem se vodikove (črtkane črte) in kovalentne vezi (nepretrgane črte) med vodnimi molekulami prekinjajo in ponovno vzpostavljajo. Mehanizem lahko vsebuje poljubno število molekul vode, Xantheas (2009) pa je sliko poenostavil s štirimi molekulami. (b-d) Zundelov kation je najmanjša struktturna enota, v kateri si proton delita dve vodni molekuli. Njegovi načini nihanja, ki so jih simulirali Vendrell in sodelavci (2009), so (b) valenčna nihanja O-H vezi, (c) upogibanje v ravni vezi vodnih molekul navznoter in (d) nihanja med vodnimi molekulami in protonom (Vir: Xantheas 2009).	26
Sl. 14:	Shema metod, ki smo jih uporabili za merjenje vpliva molekulske »informacije«.	31
Sl. 15:	Shema Elibratorja.	33
Sl. 16:	2,5- in 20-mL steklenički.	37
Sl. 17:	Sistemi z različnimi dielektričnimi konstantami termostatske kopeli: a) vodna kopel z $\epsilon \sim 80$ , b) oljna kopel z $\epsilon \sim 2,5$ in c) brez termostatske kopeli, steklenička obdana z zrakom z $\epsilon \sim 1$ .	41
Sl. 18:	Prevodnost KON, 0,05 mmol/L $\text{NaHCO}_3$ pri 25 °C, merjene v celicah s konstantami 53,9/cm (rdeča), 22,7/cm (modra) in 3,3/cm (zelena).	54
Sl. 19:	Prevodnost EV v odvisnosti od frekvence z intervali SE pri 25 (rdeča) in 5 °C (modra) v celicah s konstantami 22,7/cm ( $\Delta$ ) in 53,9/cm ( $\circ$ ); N[ $/$ ] 25 °C: 9, 5 °C: 5.	55
Sl. 20:	Prevodnost EK v odvisnosti od frekvence z intervali SE pri 25 (rdeča) in 5 °C (modra) v celicah s 33,2/cm ( $\Delta$ ) in 6,6/cm ( $\circ$ ); N[ $/$ ] 25 °C: 9, 5 °C: 5	56

5.	
Sl. 21:	Prevodnost KON v odvisnosti od frekvence z intervali SE pri 25 (rdeča) in 5 °C (modra) v celici s konstanto 3,3/cm; N [/] 25 °C: 9, 5 °C: 5. Začetek ordinate je pri 4 µS/cm. 57
Sl. 22:	Ponovljivost prevodnosti $\sigma$ pri staranju PR1 in PR2. $\sigma$ prvi (izhodiščna prevodnost) in 310. dan z intervali SE, merjena pri 25 °C in 1000 Hz, če združimo obdelave; N [/] PR1: 28, PR2: 27. 58
Sl. 23:	Ponovljivost prevodnosti 310 dni staranih KON (modra), MV (rdeča), MK (zelena), EV (svetlo modra) in EK (oranžna) priprav PR1 ter PR2 z intervali SE pri 25 °C in 1000 Hz; N [/] PR1: KON 5, MV 5, MK 7, EV 5, EK 7; PR2: KON 7, MV 5, MK 5, EV 5, EK 5. 59
Sl. 24:	Ponovljivost frekvenčnih učinkov priprav PR1 (modra) in PR2 (rdeča) prvi in 310. dan staranja z intervali SE, če združimo obdelave. $\sigma$ merjena pri 25 °C; N [/] PR1: 28, PR2: 27. 60
Sl. 25:	Ponovljivost frekvenčnih učinkov pri staranju z intervali SE obdelav KON (rdeča), MV (modra), MK (zelena), EV (svetlo modra), EK (oranžna) priprav PR1 in PR2 pri 25 °C. PR1 in PR2 starane 310 dni; N [/] PR1: KON 5, MV 5, MK 7, EV 5, EK 7, PR2: KON 7, MV 5, MK 5, EV 5, EK 5. 62
Sl. 26:	Vpliv volumna staranja na prevodnost 2 (modra), 5 (rdeča) in 10 mL (zelena) z intervali SE, če združimo obdelavi. $\sigma$ merjena prvi (izhodiščna prevodnost) in 370. dan pri 25 °C in 1000 Hz; N [/] 2 mL: 8, 5 mL: 10, 10 mL: 10. 63
Sl. 27:	Prevodnost svežih (UK) in v 2 (modra), 5 (rdeča) ter 10 mL (zelena) staranih raztopin NaHCO <sub>3</sub> v odvisnosti od koncentracije NaHCO <sub>3</sub> ; obdelavi EV in EK sta združeni. Prevodnost nad UK je presežna. 64
Sl. 28:	Vpliv volumna staranja EV in EK na koeficient izmerjene in teoretične prevodnosti, $\sigma/\sigma_{UK}$ , z intervali SE. $\sigma$ merjene pri 25 °C in 1000 Hz. EV in EK starani 370 dni v 2 (modra), 5 (rdeča) in 10 mL (zelena); N [/] EV: 2 mL (3), 5 mL (5), 10 mL (5); EK: 2 mL (5), 5 mL (5), 10 mL (5). 65
Sl. 29:	Vpliv razmerja S/V na presežek prevodnosti, $\sigma_p$ , z intervali SE, merjeno pri 25 °C in 1000 Hz; EV in EK so združeni. EV in EK starani 370 dni v 2 mL s 4,0/cm (modra), 5 mL z 2,6/cm (rdeča) in 10 mL z 2,1/cm (zelena); N [/] 4,0/cm: 8, 2,6/cm: 10, 2,1/cm: 10. Začetek abscise je pri 1,5/cm. 66
Sl. 30:	Vpliv volumna staranja EV (svetlo modro) in EK (oranžna) na frekvenčni učinek pri 1000 (polno), 10 000 (črtasto) in 100 000 Hz (pikčasto) z intervali SE. Prevodnosti $\sigma$ merjene pri 25 °C. Obdelavi starani 370 dni v 2, 5 in 10 mL; N [/] EV: 2 mL (3), 5 mL (5), 10 mL (5), EK: 2 mL (5), 5 mL (5), 10 mL (5). 67
Sl. 31:	Vpliv obdelav EV (svetlo modra) in EK (oranžna) na frekvenčne učinke 68

pri 1000, 10 000 in 100 000 Hz z intervali SE, če združimo volumne; N [/] EV: 13, EK: 15.		
Sl. 32:	Frekvenčni učinki pri 1000 (polno), 10 000 (črtkano) in 100 000 Hz (pikčasto) svežih in 370. dni v 2 mL (modra), 5 mL (rdeča) in 10 mL (zelena) staranih raztopin z enakimi koncentracijami NaHCO <sub>3</sub> z intervali SE, merjene pri 25 °C, če združimo obdelavi; N [/] 2 mL: 8, 5 mL: 10, 10 mL: 10.	69
Sl. 33:	Vpliv položaja staranja na prevodnost po 310. dneh PR (modra), ST (rdeča) in MD (zelena) z intervali SE, če združimo obdelave. $\sigma$ merjena prvi (izhodiščna prevodnost) in 310. dan staranja pri 25 °C in 1000 Hz; N [/] PR: 28, ST: 20, MD: 20.	70
Sl. 34:	Vpliv položaja staranja na prevodnost $\sigma$ po 310. dneh PR (modra), ST (rdeča) in MD (zelena) z intervali SE, če združimo obdelave. $\sigma$ merjena prvi (izhodiščna prevodnost) in 310. dan staranja pri 5 °C in 1000 Hz; N [/] PR: 28, ST: 20, MD: 20.	70
Sl. 35:	Prevodnost svežih (UK) in na položajih PR (modra), ST (rdeča) ter MD (zelena) staranih obdelav pri 25 °C in 1000 Hz v odvisnosti od $c_{\text{NaHCO}_3}$ . Obdelave so združene, prevodnost nad UK je presežna.	71
Sl. 36:	Prevodnost svežih (UK) in na položajih PR (modra), ST (rdeča) ter MD (zelena) staranih obdelav pri 5 °C in 1000 Hz v odvisnosti od $c_{\text{NaHCO}_3}$ . Obdelave so združene, prevodnost nad UK je presežna.	72
Sl. 37 a):	Vpliv položaja staranja PR (modra), ST (rdeča) in MD (zelena) na $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$ z intervali SE (združene obdelave, frekvence in temperaturi).	73
Sl. 37 b):	Vpliv položaja staranja PR, ST in MD na $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$ z intervali SE pri 1000 Hz 25 (rdeča) in 5 °C (modra); združene obdelave.	74
Sl. 38 a):	Vpliv frekvence na $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$ z intervali SE po oceni LMM (združeni položaji, obdelave in temperaturi).	75
Sl. 38 b):	Vpliv frekvence na $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$ položajev PR (modra), ST (rdeča) in MD (zelena) z intervali SE pri 25 °C (združene obdelave). Začetek ordinate je pri 60 %.	75
Sl. 38 c):	Vpliv frekvence na $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$ položajev PR (modra), ST (rdeča) in MD (zelena) z intervali SE pri 5 °C (združene obdelave). Začetek ordinate je pri 80 %.	76
Sl. 39:	Koeficienti $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$ pri 25 (rdeča) in 5 °C (modra) z intervali SE (združeni položaji, frekvence in obdelave). Začetek ordinate je pri 139 %.	77
Sl. 40:	Koeficienti $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$ pri 5 (modra) in 25 °C (rdeča) ter frekvencah 1000, 10 000 in 100 000 Hz z intervali SE (združeni položaji in obdelave). Začetek je ordinate pri 135 %.	78
Sl. 41:	Obdelave PRKON, PRMV, PRMK, PREV in PREK (levo), STKON, STMV, STMK, STEV ter STEK (sredina), MDKON, MDMV, MDMK, MDEV in MDEK (desno) pri 5 (modra) ter 25 °C (rdeča) ter 1000, 10	79

000 in 100 000 Hz. $\sigma/\sigma_{UK}$ z intervali SE.	
Sl. 42: Vpliv položaja staranja na frekvenčne učinke pri 1000 (polno), 10 000 (črtasto) in 100 000 Hz (pikčasto) pri 25°C z intervali SE. Obdelave KON (modra), MV (rdeča), MK (zelena), EV (svetlo modra) in EK (oranžna), starane na položajih PR, ST in MD 310 dni; N [/] KON: PR (5), ST (3), MD (3), MV: PR (7), ST (4), MD (3), MK: PR (7), ST (4), MD (5), EV: PR (5), ST (5), MD (4), EK: PR (5), ST (4), MD (5).	81
Sl. 43: Vpliv položaja staranja na frekvenčne učinke pri 1000 (polno), 10 000 (črtasto) in 100 000 Hz (pikčasto) pri 5°C z intervali SE. Obdelave KON (modra), MV (rdeča), MK (zelena), EV (svetlo modra) in EK (oranžna), starane na položajih PR, ST in MD 310 dni; N [/] KON: PR (5), ST (3), MD (3), MV: PR (7), ST (4), MD (3), MK: PR (7), ST (4), MD (5), EV: PR (5), ST (5), MD (4), EK: PR (5), ST (4), MD (5).	82
Sl. 44: Plošče obdelav KON (sredine plošč) in MF (12cH, 9dH, 12dH) ter EF (na robovih).	84
Sl. 45: Feromonski test brez temperaturnega stresa z ocenami obarvanja in intervali SE KON (modra), MF1 (rdeča), MF2 (zelena) ter MF3 (svetlo modra); z OHHL inkubacija pri 20 °C, N=3. Začetek abscise je pri 9 h.	85
Sl. 46: Feromonski test z ocenami obarvanja in intervali SE KON (modra), MF1 (rdeča), MF2 (zelena) ter MF3 (svetlo modra); prekonočna kultura 2 h pri 4 °C, z OHHL inkubacija pri 20 °C, N [/] KON (6), MF1 (3), MF2 (3), MF3 (6). Začetek abscise je pri 12 h.	86
Sl. 47: Čas prvega obarvanja plošč glede na trajanje temperaturnega stresa in temperaturo inkubacije; N=2.	87
Sl. 48 a): Feromonski test KON (modra) in MF2 (rdeča); prekonočna kultura 6 h pri 4 °C, z OHHL inkubacija pri 20 °C. Ocene obarvanja z intervali SE; N [/] KON (8), MF2 (8). Začetek abscise je pri 12 h.	88
Sl. 48 b): Feromonski test KON (modra) in MF2 (rdeča); prekonočna kultura 6 h pri 4 °C, z OHHL inkubacija pri 20 °C. $A_{585}$ z intervali razlik med dvema paralelkama; N=2.	89
Sl. 49 a): Feromonski test_2 KON (modra) in MF2 (rdeča); prekonočna kultura 6 h pri 4 °C, z OHHL inkubacija pri 20 °C. Ocene obarvanja z intervali SE; N [/] KON (5), MF2 (5). Začetek abscise je pri 12 h.	90
Sl. 49 b): Feromonski test_2 KON (modra) in MF2 (rdeča); prekonočna kultura 6 h pri 4 °C, z OHHL inkubacija pri 20 °C. $A_{585}$ 18 ur po inkubaciji; N=5. Začetek ordinate je pri 0,3.	90
Sl. 50: Feromonski testi v tekočih gojiščih. $A_{585}$ z intervali odstopanj od povprečja dveh paralelek KON in MF2.	92
Sl. 51: Feromonski testi na malih ploščah in v malih epruvetah. Razmerje med $A_{585}$ MF2 oziroma EF1 in $A_{585}$ KON z intervali SE; N=5-8.	94
Sl. 52: Prevodnost svežih (UK) in staranih raztopin v odvisnosti od $c_{NaHCO_3}$ – vsi	100

- rezultati pri 25 °C in 1000 Hz. Staranje 310 dni v 2 mL pri različnih položajih: PR, ST in MD (modro) ter 370 dni v različnih volumnih: 2 mL, 5 mL in 10 mL (rdeče). Prevodnost nad UK je presežna.
- Sl. 53: Vpliv položajev staranja na frekvenčne učinke pri 1000 (polno), 10 000 (črtasto) in 100 000 Hz (pikčasto) 25 °C z intervali SE pri združenih obdelavah. Prevodnost merjena prvi (izhodiščni  $H$ ) in 310. dan staranja PR, ST in MD; N [/] PR: 28, ST: 20, MD: 20. 103
- Sl. 54: Vpliv volumna staranja na frekvenčne učinke pri 1000 (polno), 10 000 (črtasto) in 100 000 Hz (pikčasto) 25 °C z intervali SE pri združenih obdelavah. Prevodnost merjena prvi (izhodiščna  $H$ ) in 370. dan v 2 mL, 5 mL in 10 mL; N [/] 2 mL: 8, 5 mL: 10, 10 mL: 10. 104
- Sl. 55: Koeficienti  $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$  v odvisnosti od razmerja med volumnom zraka in volumnom raztopine ( $V_{\text{ZRAK}}/V_{\text{RAZTOPINA}}$ ) med staranjem 310 oziroma 370 dni na položaju PR. Prevodnost merjena pri 25 °C in 1000 Hz z intervali SE; obdelave so združene. Začetek ordinate je pri 130 %. N [/]: 0,25 mL/mL: 28, 1 mL/mL: 10, 3 mL/mL: 10, 9 mL/mL: 8. 106
- Sl. 56: Levo: HyperChem simulacija vode v nanocevki s premerom 4,07 nm, ki kaže urejanje vode v nanocevki enakega premera kot na sliki TEM. Prevod angl. – slo.: *carbon* – ogljik, *oxygen* – kisik, *hydrogen* – vodik. Sredina: Prečni prerez kaže sloj vode s povečano gostoto na meji med vodo in steno nanocevke. Desno: TEM slika – po obdelavi v avtoklavu v nanocevki opazimo ujeto vodo, ki v 4-nm kanalu ne naredi meniskusa na meji s plinom (Vir: Naguib in sod. 2004). 107

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

$A_{585}$	absorbanca pri 585 nm [ / ]
AHL	acil homoserin lakton
dH <sub>2</sub> O	destilirana voda
EF	raztopina z »informacijo« feromona, obdelana z elektrogeno epitaksijo
$\epsilon$	dielektrična konstanta [ / ]
EK	raztopina z »informacijo« KCl, obdelana z elektrogeno epitaksijo
EV	raztopina z »informacijo« vode, obdelana z elektrogeno epitaksijo
$f$	frekvenca izmeničnega toka merilnika prevodnosti [Hz]
$\sigma$	izmerjena prevodnost [ $\mu\text{S}/\text{cm}$ ]
$\sigma_f$	prevodnost pri frekvenci $f$ ; $f = 100, 120, 1000, 10\,000$ in $100\,000$ Hz
$\sigma/\sigma_{\text{UK}}$	koeficient izmerjene in teoretične prevodnosti [%]
$\sigma/\sigma_{\text{UK}f}$	koeficient izmerjene in teoretične prevodnosti pri frekvenci $f$ [%]
$\sigma_{\text{UK}}$	teoretična prevodnost [ $\mu\text{S}/\text{cm}$ ]
$H$	frekvenčni učinki
HHL	N-heksanoil-L-homoserin lakton
KON	kontrola, neobdelana izhodiščna raztopina
LB	gojišče Luria-Bertani
LMM	linearni mešani model
MD	položaj staranja raztopin v zamrzovalniku pri $-20^\circ\text{C}$ (glej pregl. 7)
MF	raztopina z »informacijo« feromona, obdelana z mehanogeno epitaksijo
MK	raztopina z »informacijo« KCl, obdelana z mehanogeno epitaksijo
MPM	»Repeated measures« ANOVA, ANOVA s ponavljajočimi se meritvami
Mq	Milli-q voda
MV	raztopina z »informacijo« vode, obdelana z mehanogeno epitaksijo
N	število paralelk
OHHL	N-(3-okso-heksanoil)-L-homoserin lakton
$\sigma_p, \sigma_p/\sigma$	presežek prevodnosti, razmerje med presežno in izmerjeno prevodnostjo
PK	prekonočna kultura
PR	položaj staranja raztopin na prostem (glej pregl. 7)
RSE	relativna standardna napaka
s	zaporedna številka stekleničke z vzorcem
SD	standardna deviacija
SE	standardna napaka
ST	položaj staranja raztopin v stiroporu, ovitih z aluminijasto folijo (glej pregl. 7)
TNP S-W	test normalnosti porazdelitve Shapiro-Wilk
UA	univariantna analiza
UK	umeritvena krivulja
V	volumen
$\Delta$	razlika med paralelkama

## SLOVARČEK

**Dinamizacija** (glej mehanogena epitaksija).

**Elektrogena epitaksija** je oznaka, ki smo jo uporabili za metodo, ki so jo razvili na Inštitutu Bion, s katero strukturo donorne substance (izhodne snovi) prek električnih impulzov predvidoma prenesemo v sprejemno tekočino (Jerman in sod. 2005). Slednjo v nadaljevanju imenujemo obdelana z elektrogeno epitaksijo.

**Epitaksija** je metoda, pri kateri se kristalna snov nalaga oziroma raste na kristalnem substratu in ima enako orientacijo kot substrat. Sloj, ki zraste oziroma se naloži imenujemo epitaksični sloj. Epitaksijo uporablajo za izdelavo polprevodnikov in v nanotehnologiji. Beseda epitaksija izhaja iz grških korenin *epi*, kar pomeni »nad«, in *taxis*, ki pomeni »urejeno«. To lahko prevedemo tudi z urejati nad. V tem doktorskem delu izraz epitaksija uporabljam za predvideni prenos »informacije« o strukturi spojine iz ene snovi na drugo brez snovnega prenosa in kemijskih reakcij.

**Mehanogena epitaksija** je oznaka, ki smo jo uporabili za metodo, s katero z izmeničnim redčenjem in dinamizacijo (mehanski tresljaji, lahko tudi zvok in vrtljaji) predvidoma prenesemo strukturo donorne substance (izhodne snovi) v sprejemno tekočino. Slednjo v nadaljevanju imenujemo obdelana z mehanogeno epitaksijo.

**Raztopina, obdelana z epitaksijo**, je raztopina, ki je (vsaj domnevno) epitaksično preoblikovana.

**Sprejemna epruveta** je epruveta iz navadnega stekla z izhodiščno tekočino, ki je akceptor »informacije«, v katero epitaksično vtiskujemo strukturo donorja.

**Tiksotropija** je lastnost nekaterih gelov ali tekočin, ki so pri normalnih pogojih gosti in viskozni ter postanejo bolj tekoči, manj viskozni, ko jih mešamo ali gnetemo. Tiksotropne lastnosti imajo na primer nekatere vrste gline in medu.



## 1 UVOD

V zadnjih desetletjih postaja vse bolj jasno, da je komunikacija med bakterijami kompleksna in raznolika. Bakterije torej niso enocelični »osamelci«, temveč »socialne« kreature, ki se kompleksno odzivajo na dražljaje v okolini (Lyon 2008). Večina bakterij komunicira s sistemom za zaznavanje celične gostote oziroma kvoruma (Khmel in sod. 2008), ki so ga Nealson in sodelavci (1970) odkrili pri preučevanju bioluminiscence morske bakterije *Vibrio fischeri* (Hastings in Greenberg 1999).

Zaznavanje kvoruma bakterijam omogoča, da ob zanje ustrezrem času pričnejo izločati sekundarne metabolite, kot so virulenčni faktorji, toksini, eksopolisaharidi in antibiotiki (Von Bodman in sod. 2003), preidejo iz eksponencialne v stacionarno fazo rasti (Lazazzera 2000), pričnejo podvajati kromosome (Withers in Nordstrom 1998) in tvoriti biofilme oziroma bakterijske trate (Kjelleberg in Molin 2002). Z zaznavanjem kvoruma celice ali skupine celic uravnavajo fiziologijo in vplivajo na obnašanje drugih celic z aktivno ali pasivno prenesenimi avtoinducenti.

Do sedaj je odkritih že mnogo avtoinducentov (Dong in Zhang 2005), najbolj natančno raziskani pa so acil-homoserin laktoni (AHL) v gramnegativnih bakterijah. AHL se v različnih bakterijah pojavljajo z enako homoserin laktonsko enoto in različnimi stranskimi acilnimi skupinami (Fuqua in Greenberg 2002). *Chromobacterium violaceum*, gramnegativna bakterija, ki jo najdemo v prsti in vodnem okolju tropskih ter subtropskih predelov, kot odgovor na mejno koncentracijo avtoinducentov N-heksanoil-L-homoserin laktonov (HHL) sintetizira vijolični pigment violacein (Lichstein in van de Sand 1945). Pri sintezi HHL sodeluje encim sintaza CviI, ki spada v družino encimov LuxI. Ko HHL doseže mejno koncentracijo, difundira nazaj v bakterije, kjer se veže na transkripcijski regulator CviR, iz družine encimov LuxR, in sodeluje pri prepisovanju genov za sintezo violaceina. Violacein poznajo že od leta 1882 (Boisbaudran) kot vodi netopno vijolično barvilo mikrobiološkega izvora, ki ščiti bakterije pred UV sevanjem (Antonio in Creczynski-Pasa 2004). Poleg tega deluje tudi antibakterijsko (Duran in sod. 1983, Duran in Menck 2001, Lichstein in Van de Sand 1945) in antivirusno (Duran in Menck 2001, Andrigotti-Frohner in sod. 2003).

Nekatere rastline proizvajajo motilce bakterijske komunikacije, kot so na primer furanoni, flavonoli, flavanoni, dihidroflavonoli in drugi fenoli, ki bakterijam preprečujejo komunikacijo z zaznavanjem kvoruma. Zaradi tega postanejo manj patogene, ne tvorijo bakterijskih trat in ne izločujejo toksinov (Popova in sod. 2007, Aljadi in Yusuff 2003, Küçük in sod. 2007, Bauer in Robinson 2002, Adonizio in sod. 2006, Costerton in sod. 1995). Takšni motilci bakterijske komunikacije imajo veliko prednost pred antibiotiki v tem, da je razvoj odpornosti nanje težko verjeten (Otto 2004). Žal pa je večina do sedaj poznanih motilcev preveč toksičnih, da bi jih lahko uporabili v medicini, kmetijstvu ali

prehrambni industriji (Bosgelmez-Tinaz in sod. 2007, Truchado in sod. 2009). Ena izmed možnosti razvoja netoksičnih motilcev bakterijske komunikacije, ki smo jo preučevali v doktorski študiji, je s pomočjo epitaksije (glej Slovarček). V doktorskem delu besedo epitaksija uporabljamo za predvideni prenos »informacije« o strukturi snovi s površine ene snovi (izhodne) na drugo (sprejemno) brez snovnega prenosa in kemijskih reakcij. Pri mehanogeni epitaksiji prenos »informacije« predvidoma poteka z izmeničnim redčenjem in dinamiziranjem; pri dinamiziranju v raztopino vnesemo kinetično energijo z močnim mehanskim ali ročnim tresenjem. Pri elektrogeni epitaksiji pa se »informacija« o strukturi izhodne snovi predvidoma prenese v sprejemno raztopino preko pulznega električnega polja, spremenjenega zaradi električnega polja donorne (izhodne) snovi (Jerman in sod. 2005).

Elija in sodelavci raziskujejo fizikalno - kemijske lastnosti raztopin natrijevega hidrogen karbonata, obdelanih z mehanogeno epitaksijo. Objavili so več kot deset člankov na to temo (glej npr. Elia in Niccoli 1999, 2000 in 2004, Elia in sod. 2004, 2005, 2007, 2008, 2009 in 2010, Belon in sod. 2008, Cacace in sod. 2009). Raztopine so izmenično redčili 1 : 100 in dinamizirali (sunkovito tresli) vse dokler niso pripravili ekstremno razredčenih raztopin z enako kemijsko sestavo kot topilo. Merili so topoto mešanja in električno prevodnost ekstremno razredčenih raztopin ter rezultate primerjali z analognimi toplotami mešanja in električno prevodnostjo neobdelanega topila. Opazili so značilne eksotermne presežke toplote in višje električne prevodnosti kot v neobdelanem topilu. Rezultate so pripisali samoorganizaciji vode v molekulske aggregate zaradi vnosa kinetične energije med dinamiziranjem.

Za nas najbolj zanimiva metoda, ki jo uporablja Neapeljska raziskovalna skupina Vittoria Elije, je merjenje prevodnosti. Protonski hip-hop mehanizem po de Grotthusu iz leta 1806, ki je odločilen pri merjenju prevodnosti natrijevega hidrogen karbonata, je namreč pomemben proces v prostorsko omejenih (angl.: *constraint*) prostorih, kjer se voda ne more razporediti v 3-D strukture (kot na primer v celici) (Agmon 1995). Po tem mehanizmu prenos protonov in hidroksilnih anionov poteka tako, da protoni sami ne potujejo skozi medij, ampak nihajo okoli ravnovesne lege in se enkrat pojavijo na enem, nato pa na drugem mestu (Agmon 1995). To poteka tako, da se med sosednjimi molekulami vode prekinjajo in ponovno vzpostavljajo kovalentne in vodikove vezi. Bolj, kot so molekule vode urejene z vodikovimi vezmi, hitrejši je prenos (Han in sod. 2006).

## 1.1 DELOVNA HIPOTEZA

Delovna hipoteza je ugotovitev, ali lahko tako z mehanskimi vplivi kot tudi prek močnih električnih impulzov v vodne raztopine prenesemo molekulsko informacijo enostavnih in bolj kompleksnih kemijskih spojin. Kot vir molekulske informacije bomo uporabili KCl, vodo in feromon, ki je motilec bakterijske komunikacije. Predpostavljam, da bo z

elektrogeno in mehanogeno epitaksijo informirana raztopina imela spremenjene kemijsko-fizikalne lastnosti, drugačne od kontrolne neinformirane raztopine, in podobne biološke učinke kot izhodiščna snov (feromon).

Delovno hipotezo smo preverili na naslednje načine:

- Z mehanogeno in elektrogeno epitaksijo obdelane ter neobdelane raztopine smo pripravili v različnih topilih in primerjali njihove UV-VIS spektre.
- Pri poskusih z indikatorskimi bakterijami CV026 smo kvalitativno in / oziroma kvantitativno spremljali količino sintetiziranega violaceina v odvisnosti od obdelave raztopine avtoinducenta. Sev CV026 ima namreč okvarjen gen za sintezo avtoinducentov, acil homoserin laktonov (AHL), medtem ko kot odgovor na prisotnost AHL v gojišču sintetizira violacein (McClean in sod. 1997). Poskuse smo zasnovali tako, da smo v gojišče dodali dovolj AHL za sprožitev sistema za zaznavanje kvoruma v bakterijah. Pri tem smo raztopino AHL obdelali na tri načine, z mehanogeno in elektrogeno eptaksijo, ter brez obdelave.
- Merjenje prevodnosti (pri petih različnih frekvencah) svežih in staranih raztopin  $\text{NaHCO}_3$  pri 25 in 5 °C smo spremljali s kemijsko analizo z masnim spektrometrom z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-MS). Raztopine  $\text{NaHCO}_3$  smo obdelali na tri načine: z mehanogeno in elektrogeno epitaksijo ter brez obdelave. Raztopine smo hranili v treh različnih volumnih z različnimi stičnimi površinami s steklom. Da bi preverili, kako svetloba, tresenje in temperatura vplivata na presežek prevodnosti, smo raztopine starali izpostavljeni svetlobi in morebitnemu tresenju, zavarovane pred svetlobo in tresljaji ter pri -20 °C.

## 1.2 AVTOTIKSOTROPIJA VODE

Delovne hipoteze z nobeno izmed uporabljenih metod nismo uspeli potrditi. Pri meritvah prevodnosti pa smo opazili nenavadno lastnost vodnih raztopin, ki se izrazi, ko nekaj časa stojijo na miru. Odprla nam je povsem nova vprašanja.

Rezultati, ki smo jih dobili pri merjenju prevodnosti nakazujejo, da je bistveni faktor za presežne lastnosti, ki smo jih izmerili tako Elija in sodelavci (2008) kot mi, čas in ne obdelava z mehanogeno epitaksijo. Presežne lastnosti so namreč (tako kot mi) izmerili šele, ko so raztopine nekaj časa stale. To pa je presenetljivo v skladu z desetletnimi opazovanji Bohumila Vybirala, ki je opazil, da razredčene vodne raztopine soli, ki jih pustimo dlje časa stati, razvijejo *avtotiksotropne* lastnosti (Vybiral 2006, Vybiral in Voráček 2007).

Voda je nenavadna spojina. Kar dve tretjini našega planeta prekriva in uporabljamo jo v vseh vidikih življenja. Vsi se strinjajo, da je mreža vodikovih vezi, s katerimi se povezujejo molekule  $\text{H}_2\text{O}$ , odgovorna za njene nenavadne lastnosti (Fisenko in Malomuzh

2008). Če bi bile te vezi močnejše, bi bila voda podobna steklu. Če pa bi bile šibkejše, bi bila voda pri sobni temperaturi plin. Njene nenavadne lastnosti so po mnenju večine raziskovalcev razlog za vzpostavitev in vzdrževanje življenja (Chaplin 2006, Henry 2005, 2009). Ker je njena gostota najvišja pri 4 °C, ko je v tekočem stanju, in ne pri tališču, kot pri običajnih tekočinah, jezera in oceani ne zamrznejo do tal, kar je gotovo pripomoglo k vzpostavitvi kompleksnega življenja na Zemlji.

Kakšna pa je vloga vode v celicah, sestavnih delih živih organizmov? Po konvencionalnih vidikih je zgolj neproblematično, povsem navadno topilo življenjsko pomembnim biološkim molekulam, kot so proteini, DNA in RNA. Mnogo raziskovalcev še dandanes objavlja samostojne slike proteinov, na katerih je voda nakazana zgolj s temnim ozadjem (Gerstein in Levitt 1998). Vendar pa je prostorska orientacija in dinamično vedenje vode v hidratacijskem ovoju okoli proteinov po Bizzarri in Cannistraro (2002) tesno povezana z njihovim delovanjem. Torej bi morali oboje obravnavati skupaj kot zaključeno celoto.

Tako je mislil že Paracelsus, ki je v 16. stoletju zapisal, da voda pleše na melodijo bioloških molekul (Jacobi 1979). Po Lingu (1993) se voda ob površinah iztegnjenih proteinov polarizira v več slojih. Chaplin je 2004 Lingovi teoriji dodal spoznanja Pollackove raziskovalne skupine (Zheng in Pollack 2003), da lahko topljenci zaznajo hidrofilne površine tudi v oddaljenosti nekaj sto mikronov. Nastala je nova teorija, po kateri so proteini in celična voda tesno povezani ter soodvisni. Ključni proteini s svojo mobilnostjo spreminjajo gostoto in strukturiranje celične vode ob svojih površinah, ki za protiutež nanje vpliva z energijskim statusom in ionsko vsebnostjo celice (Chaplin 2004).

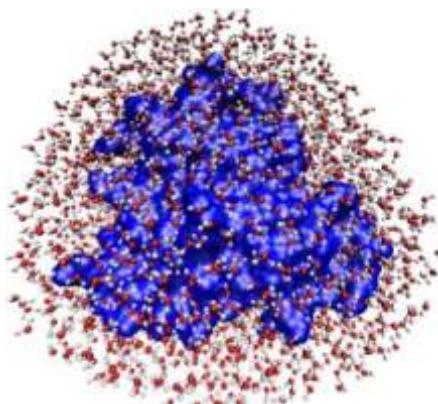
Tradicionalno gledano so površine že nekaj nano metrov stran nevidne za topljence (Israelachvili 1992). Zheng in Pollack (2003) pa sta opazila, da topljenci površine hidrofilnih gelov zaznajo tudi na večjih razdaljah. V vodnih raztopinah sta namreč našla cone, oddaljene kar nekaj sto mikronov od površin hidrofilnih gelov, ki so povsem brez topljencev. Te cone sta poimenovala izključitvene. Z NMR, slikanjem z infrardečo kamero, UV-VIS absorpcijskimi spektri, dvojno refrakcijo in merjenjem električnega potenciala ter viskoznosti je Pollackova raziskovalna skupina pokazala, da ima voda v teh conah bistveno drugačne lastnosti od siceršnje (večinske) vode. Je manj mobilna in bolj urejena (Zheng in sod. 2006, Pollack in sod. 2009, Pollack in Clegg 2008).

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 VLOGA VODE V ŽIVIH ORGANIZMIH

V zadnjih dveh desetletjih je postalo jasno, da voda ni zgolj topilo za biološko pomembne molekule, ampak aktivno sodeluje pri reakcijah, pomembnih za vzpostavitev in ohranjanje življenja. S svojimi nenavadnimi in edinstvenimi lastnostmi voda vpliva na spreminjanje konformacijskih stanj proteinov, oblikovanje dvoslojnih fosfolipidnih membran in povezovanje ter prepoznavanje delov DNA in RNA. že Paracelsus je v 16. stoletju zapisal, da je voda »matrica živega in mrtvega sveta« (Jacobi 1979). Žal premnogi biologi vodi sicer pripisujejo njene nenavadne lastnosti in jih vidijo kot pomembne za nastanek življenja, a vodo še vedno obravnavajo zgolj kot pasivno ozadje biološko pomembnejšim in dejavnim molekulam (Gerstein in Levitt 1998). Kakšna je torej vloga vode v biokemiskih procesih celice?

Voda nedvomno aktivno sodeluje z biološko pomembnimi molekulami. Aktiven volumen proteinov se zato razteza preko njihovih fizičnih meja in je odvisen od interakcije z bližnjo vodo oz. z lastnim hidratacijskim ovojem (Frauenfelder in sod. 2009); glej sl. 1. Struktura in dinamika hidratacijskih ovojev odloča o biološki funkciji proteinov. Ali drugače, hidratacijski ovoj in protein nista dve ločeni, ampak sta soodvisni enoti. Mnogo proteinov preko hidratacijske vode posredno reagira z drugimi proteini ali molekulami substrata (Johnson in sod. 2009).



**Slika 1:** Shema mioglobina (modra površina) s 1911 vodnimi molekulami. Okoli proteina je ~5 Å debel hidratacijski ovoj. Približno 200 vodnih molekul so ločili od ozadja z visoko resolucijsko kristalografijo z rentgenskimi žarki (Vir: Frauenfelder in sod. 2009).

**Figure 1:** Diagram of myoglobin (blue surface) with 1911 water molecules. The waters form a shell ~5 Å thick around the protein. Approximately 200 water molecules are distinguishable from background with high-resolution X-ray crystallography (Source: Frauenfelder et al. 2009).

Mnogi proteini se na DNA najprej vežejo nespecifično in nato linearno difundirajo vzdolž DNA vse dokler ne najdejo tarčnega mesta oziroma se brez izpolnjene naloge odcepijo. Difuzija vzdolž DNA je, merjena *in vitro*, 2000-krat počasnejša od difuzije prostih

proteinov v raztopini (Rau in Sidorova 2010). Vzrok za 40-50-krat nižjo stopnjo difuzije je najverjetneje rotacijsko trenje, ki nastane, ko protein sledi vijačnici DNA; protein sledi dvojni vijačnici in ima pri tem svoje »DNA vezavno mesto« stalno obrnjeno proti DNA molekuli (Blainey in sod. 2010). Preostali del zmanjšanja difuzije pa pripisujejo začasnim prekinittvam elektrostatičnih interakcij med proteinom in DNA ter sprememjanju strukture vode na mejni površini proteina in DNA (Rau in Sidorova 2010).

Rezultat interakcij med proteini in DNA je odvisen od medsebojnega vpliva dveh enakovrednih partnerjev. Obe makromolekuli imata svojo značilno tridimenzionalno strukturo, ki se mora prilagoditi drugi, da bi dosegla specifičnost. V mnogih interakcijah med proteini in DNA so ključne prav vodikove vezi, ki jih med njima posredujejo molekule vode (Rohs in sod. 2010). Tainer in Cunningham (1993) sta dokazala, da so mostovi vodnih molekul pomembni za delovanje encimov. Ključni so za tvorbo kompleksa med Trp represorjem in njegovim tarčnim zaporedjem v genomu (Otwinowski in sod. 1988), visoko urejene H<sub>2</sub>O pa posredujejo tudi pri specifičnem branju nukleotidnih baz kompleksa transkripcijskih faktorjev RXR-RAR (Rastinejad in sod. 2000).

Študije Fuxreiterja in sodelavcev (2005) z računalniško simulacijo Monte Carlo so potrdile, da ima voda posredniško vlogo pri interakciji makromolekul in lahko na več načinov pomaga pri prepoznavanju med proteini in ustreznimi deli DNA. Heksapeptid najprej prepozna hidratacijski sloj vode ob hidrofilni površini titanovega dioksida (rutila), šele nato se adsorbira na rutilovo površino (Skelton in sod. 2009). Molekule vode se namreč orientirajo v skladu z elektrostatičnimi interakcijami titana, kar privlači nasprotno nabite funkcionalne skupine na peptidu. Podobno vlogo prevodnika elektrostatičnih interakcij ima voda pri vezavi aminokislin na kremenčeve steklo (Notman in Walsh 2009) in na mejnih ploskvah proteinov (Samsonov in sod. 2008). S svojim posredovanjem voda proteinom zagotavlja mobilnost, ki bi bila ob njihovem neposrednem interagiranju s substrati bistveno okrnjena.

Vodne molekule, ki so prisotne na aktivnem mestu proteina, lahko po vezavi liganda svoje mesto ohranijo, ali pa jih ligand izpodrine v večinsko vodo. V obeh primerih je doprinos vodnih molekul ugoden, vendar pa povsem različen. V primerih, ko ostanejo ujete na aktivnih mestih, lahko s svojo mrežo vodikovih vezi stabilizirajo kompleks protein-ligand. V primerih, ko jih ligand izpodrine, pa se sistemu poveča entropija (De Beer in sod. 2010). Zato moramo pri sintetiziranju ligandov zdravilnih učinkovin natančno vedeti, kje na mejni površini med ligandom in proteinom se nahajajo molekule vode (Michel in sod. 2009).

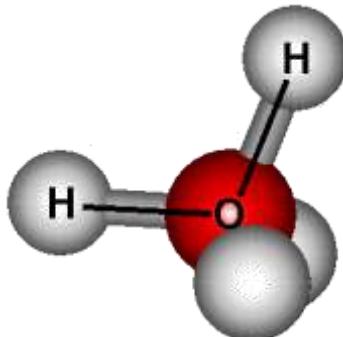
Ball (2008) vidi vodo kot raznoliko, prilagodljivo komponento celice, ki aktivno sodeluje pri biokemijskih reakcijah celice. Pri tem lastnosti vode loči na splošne in edinstvene. Njene splošne lastnosti lahko pripisemo vsem nizko molekularnim tekočinam in njeni sposobnosti, da tvori vodikove vezi, pri čemer te lastnosti niso nič drugačne od lastnosti

drugih s H-vezmi povezanih tekočin. Vendar ima voda tudi nekatere lastnosti, ki so edinstvene in so očitna anomalija glede na kemijsko sorodne tekočine.

### 2.1.1 Voda kot tekočina in topilo

#### 2.1.1.1 Struktura vode

Voda je sestavljena iz dveh atomov vodika in enega atoma kisika z molekulsko formulo  $\text{H}_2\text{O}$ . Molekula vode je relativno majhna, s polmerom 0,343 nm. Ker ima kisik višjo elektronegativnost kot vodik in ker je negativni pol molekule zamknjen stran od pozitivnega, ima molekula vode dipol in je polarna. Zaradi svoje obilne zastopanosti na Zemlji je brez dvoma najbolj pomembno polarno topilo (Marcus 1998). Voda ima eno najvišjih dielektričnih konstant (število nosilcev naboja na volumsko enoto,  $\epsilon$ , je pri 25 °C kar 79). To omogoča elektrolitom, da v njej popolnoma disociirajo. Splošno lahko napišemo, da je kot med H-O-H enak 104,5°, razdalja med kisikom in vodikom pa 0,97 Å. Kisikov atom v vodi je  $\text{sp}^3$ -hibridiziran.  $\text{H}_2\text{O}$  zato vsebuje štiri tetraedrično razporejene  $\text{sp}^3$ -hibridizirane elektronske pare, dva sta zasedena s kovalentnima vezema med vodikoma in kisikom, dva pa prosta, usmerjena v oglišča tetraedra (glej sl. 2; Chaplin spletna stran <http://www.lsbu.ac.uk/water/>).



**Slika 2:** Shema strukture molekule vode, ponazorjena s štirimi  $\text{sp}^3$ -hibridiziranimi elektronskimi pari.  
Opomba: shema ne ponazarja dejanske podobe molekule vode, ki je bolj okrogla (Vir: Chaplin spletna stran <http://www.lsbu.ac.uk/water/>).

**Figure 2:** Scheme of water molecule structure, illustrated with  $\text{sp}^3$ - hybridized electron pairs. Note: this cartoon of water does not represent its actual outline, which is more rotund (Source: Chaplin webpage <http://www.lsbu.ac.uk/water/>).

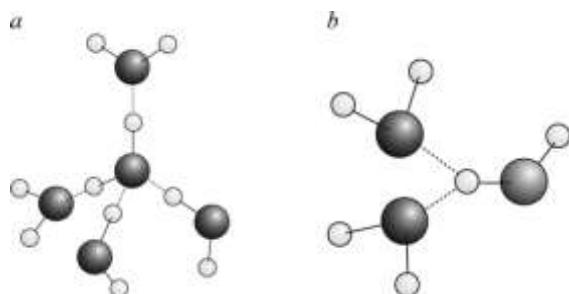
#### 2.1.1.2 Vodikove vezi

V vodi prevladujejo daljnosežne privlačne sile vodikovih vezi (Enderby in Neilson 1979), medtem ko v običajnih tekočinah prevladujejo kratkosežne odbojne sile in se daljnosežne privlačne sile zaradi termične agitacije – Brownovega gibanja – izgubijo. Molekule vode ravno zaradi vodikovih vezi niso tako gosto razporejene kot molekule enostavnih tekočin. Vodikove vezi so namreč linearne vzdolž osi med dvema kisikovima atomoma ( $\text{O}-\text{H}\cdots\text{O}$ ).

Če je os upognjena, se orbitali vodika in kisika slabše prekrivata in je zato vez šibkejša (Enderby in Neilson 1979).

Ena od pomembnejših lastnosti vodikovih vezi je, da so kooperativne (Podgornik 2009). Če se vzpostavi vez med dvema molekulama, se lažje vzpostavi še s tretjo molekuljo in tako dalje. Druga pomembna lastnost je, da so specifične in nastanejo samo med molekulami, ki imajo vodikove donorje in vodikove akceptorje, kot sta O ter N. Posamezna molekula vode se lahko na tri različne načine povezuje z drugimi molekulami: kot dvojni donor, ki odda oba svoja vodika, kot dvojni akceptor, ki sprejme vodika sosednjih molekul, ter kot donor in akceptor hkrati (Xantheas 2000).

Nastopanje iste molekule vode hkrati v donorski in akceptorski vlogi omogoča ustvarjanje mreže vodikovih vezi med molekulami vode. V tej mreži se lahko vodik poveže s kisikom samo na ustreznem mestu in pod ustreznim kotom. Iz tega razloga pravimo, da imajo vodikove vezi prostorsko naravo, v čemer se bistveno razlikujejo od ostalih sil med nevtralnimi molekulami, kot so van der Waalsove sile (Podgornik 2009). Tetraedrična koordinacijska geometrija vodikovih vezi omogoča, da se vsaka molekula  $H_2O$  lahko koordinira s štirimi drugimi molekulami. Ker pa so molekule v tekočini mobilne, ni nujno, da so zasedene vse štiri H-vezi. Z določanjem radialne porazdelitvene funkcije (rdf) s sisanjem nevtronov in računalniškimi simulacijami so ugotovili, da je povprečno število sosednjih H-vezi v vodi 3,5 (Enderby in Neilson 1979). Medtem ko so simulacije Sciortina in sodelavcev (1991) pokazale, da ima voda v tekočem stanju mnogo defektov v obliki razcepljenih vezi, kjer se vodikov atom ne koordinira samo z enim, ampak tudi z dvema kisikovima atomoma dveh različnih molekul vode. Takšne viličaste vezi pa so pomembne, saj povečajo difuzijo in s tem mobilnost vode v tekočem stanju (glej sl. 3).



**Slika 3:** (a) Geometrija tetraedrične koordinacije vodnih molekul in (b) defekti z razcepljenimi vodikovimi vezmi. Za (b) Sciortino in sodelavci (1991) domnevajo, da imajo ključno vlogo v molekulski mobilnosti vode v tekočem stanju (Vir: Ball 2008).

**Figure 3:** (a) Tetrahedral coordination geometry of water molecules and (b) defects involving bifurcated hydrogen bonds. The latter are posited by Sciortino et al. (1991) to play a key role in the molecular mobility in the liquid state (Source: Ball 2008).

Vodikova vez,  $X-H\cdots Y$ , ne obstaja samo med kisikom ene in vodikom druge molekule vode. X je lahko kisik, dušik in fluor, Y pa je lahko kisik, dušik, fluor in tudi klor. Energija

vodikove vezi znaša od 4 - 40 kJ / mol. Najdemo jo med tistimi molekulami, ki vsebujejo prave kombinacije O, N, F, Cl in H. Vodikove vezi, kot so O-H···O, O-H···N, N-H···N in N-H···O, so še posebej pomembne v DNA in proteinih. DNA je sestavljena iz zaporedja baznih parov, ki s pomočjo vodikovih vez tvorijo dvojno vijačnico. Če DNA segrejemo na 95 °C, se vodikove vezi začnejo cepiti in dvojna vijačnica se razvije v dve verigi (pravimo, da denaturira). Proteini pa so polipeptidi, katerih osnovni gradniki so aminokisline, ki imajo na enim koncu amino, na drugem pa karboksilno skupino. Vodikove vezi med peptidnimi vezmi in amino ter karboksilnimi skupinami zaradi svoje prostorske narave pomembno vplivajo na oblikovanje polipeptidov v  $\alpha$ -vijačnice in  $\beta$ -strukture (Podgornik 2009).

Vodikove vezi so v nekaterih primerih časovno neomejene, v drugih pa izredno kratkotrajne. Primer trajnejšega sodelovanja so medmolekulske vodikove vezi v cikličnih dimerih ocetne kisline in zgoraj omenjena struktura dvojne vijačnice DNA. Primer kratkotrajnih povezav z vodikovimi vezmi pa je mreža vodikovih vezi med molekulami vode v kapljevinskem stanju (Elsaesser 2009).

#### 2.1.1.3 Nenavadne lastnosti vode

Malo je molekul, ki so strukturno bolj enostavne, kot je voda, kljub temu pa je njen obnašanje zelo kompleksno. Z razumevanjem njenega nenavadnega obnašanja in dinamičnih lastnosti lahko napišemo, da se voda tudi nad temperaturo tališča obnaša kot gel z veliko strukturno raznovrstnostjo (Stanley in sod. 1999). S standardnimi teorijami tekočin njenih dinamičnih in termodinamičnih lastnosti, ki so drugačne od večine drugih tekočin, ne moremo razložiti.

Voda po svojih lastnostih izstopa v primerjavi s hidridi elementov, ki se v periodnem sistemu nahajajo v bližini kisika kot na primer NH<sub>3</sub>, HF in H<sub>2</sub>S. Pri sobni temperaturi bi morala biti plin in ne tekočina, saj bi morala imeti vrelišče pri -75 °C namesto pri 100 °C (Robinson in Stokes 2002: 2 str.). Poleg tega ima pri 25 °C nenavadno visoko specifično toploto,  $C_P = (\delta H/\delta T)_P = 4,1819 \text{ kJ kg}^{-1} \text{ K}^{-1}$  (101,325 kPa) (Wagner in sod. 2000) in površinsko napetost,  $\gamma = (dG / dA)_{TPn} = 71,98 \text{ mN m}^{-1}$  (Jenkins in Marcus 1995).

Voda je v kapljevinskem stanju pod temperaturo tališča podhlajena in metastabilna. Glede na povezanost s H-vezmi bi pričakovali, da je ne moremo kar tako podhladiti, saj bi prej predvideli trdno kristalno strukturo. Vendar jo zlahka podhladimo do -25 °C, malo težje do -38 °C in v manjših kapljicah do -41 °C (pri normalnem tlaku). Več vode je podhlajene pri večji hitrosti hlajenja in v manjših volumnih. Že manjša motnja iz okolice, kot je tresljaj ali dodatek nečistoče, pa povzroči, da preide v trdno agregatno stanje (Koop in sod. 2000, 2002).

Višji, kot je tlak, bolj se tališče in maksimalna gostota vode pomikajo k nižjim temperaturam, kar je obratno kot pri običajnih tekočinah. Stisljivost vode se z višanjem temperature znižuje in doseže minimum pri  $46,5^{\circ}\text{C}$ , medtem ko so običajne tekočine bolj stisljive pri višjih temperaturah. Pri dovolj visokem tlaku, ko se razcepi dovolj vodikovih vezi, pa nenavadno obnašanje vode izgine (Marcus 1998).

Električna prevodnost vode se povečuje s temperaturo do  $230^{\circ}\text{C}$  (pri visokih tlakih) predvsem zaradi povečane ionizacije, zaradi česar nastajajo večje koncentracije visoko mobilnih  $\text{H}^+$  in  $\text{OH}^-$ , ki dosežejo maksimum koncentracij pri  $249^{\circ}\text{C}$  (IAPWS 1990). Nad to temperaturo je gostota tekoče vode, ki je v ravnovesju s paro, zelo znižana in je pri  $300^{\circ}\text{C}$   $0,7 \text{ g/cm}^3$ , kar ji zmanjša sposobnost, da ionizira. Protomska mobilnost se zniža nad  $149^{\circ}\text{C}$  zaradi manjše koncentracije zundelovih kationov ( $\text{H}_5\text{O}_2^+$ ) (Han in sod. 2006).

Vodi se z nižanjem temperature poveča upornost oziroma zmanjša prevodnost (Light in sod. 2005). Zanimivo pa je, da se njena električna prevodnost z odstranitvijo inertnih plinov poveča (Pashley in sod. 2005). Skupaj te njene lastnosti po Chaplinu kažejo na obstoj ikozaedrskeh gruč molekul vode pri nižjih temperaturah in prisotnost nepolarnih plinov, ki onemogočijo neomejeno povezavo z vodikovimi vezmi in tako upočasnijo prenos protonov.

Tetraedrična geometrija vodikovih vezi je razlog za anomalijo maksimalne gostote vode. Led ima manjšo gostoto kot kapljevinska voda in plava na njeni gladini. V ledu (npr.  $\text{I}_h$ ) molekule tvorijo popolno tetraedrično mrežo, konfiguracijo »kot-led«, ki jih povezuje v šest-členske obroče z veliko vmesnega prostora in zato zasedejo večji volumen. Ko se led stali, se tri dimenzionalna mreža H-vezi razrahlja v konfiguracijo »kot-tekočina«, v kateri so molekule bližje skupaj. Z višanjem temperature od tališča do  $4^{\circ}\text{C}$  je vedno več vode v konfiguraciji »kot-tekočina«, ki pri  $4^{\circ}\text{C}$ , ko je voda najgostejša, prevlada. Pri temperaturah, višjih od  $4^{\circ}\text{C}$ , pa je termično obnašanje vode enako kot pri običajnih tekočinah, ki termično eksplandirajo (Mishima in Stanley 1998).

V čisti tekoči vodi je življenska doba vodikovih vezi 1 ps. Defekti, ki nastanejo s prekinitevijo vezi v mreži vodikovih vezi, so zelo kratkotrajni, 200 fs. Prekinjene H-vezi se namreč skoraj v trenutku ponovno vzpostavijo. Za vlogo vode kot topila v celicah je eno osnovnih vprašanj, kako na mrežno strukturo vodikovih vezi vpliva molekula topljenca ali bližina površine. V obeh primerih je odziv vode odvisen od tega, ali je topljenec oziroma površina hidrofilen ali hidrofoben.

#### 2.1.1.4 Nizko molekularni hidrofili

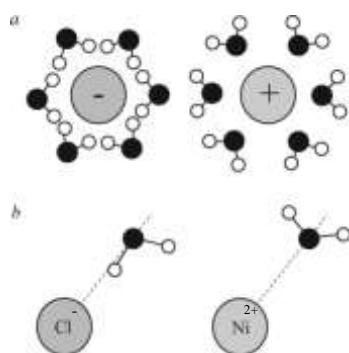
Voda je zaradi visoke dielektrične konstante izjemno dobro topilo za ione. S svojo polarnostjo zasenči Coulombov potencial ionskih parov z nasprotnim nabojem tako

učinkovito, da jim prepreči tvorbo medsebojnih vezi. Na enak način je voda odlično topilo tudi za polielektrolite, kot so DNA in proteini, saj zastre naboje bližnjih nasprotno ter enako nabitih ionskih skupin, ki tako med seboj ne morejo reagirati (Ball 2008).

Hidratacija ionov je dobro raziskana. Večinoma raziskovalci pišejo o tem, kakšno je hidratacijsko število. Žal podatki niso povsem jasni, saj pri raziskovanju uporabljajo različne metode, s katerimi lahko preučijo le delne vidike ionske hidratacije in ne dobijo celotne slike. Glavne metode, s katerimi raziskujejo, so IR (Bakker in sod. 2005), NMR (Mäemets in Koppel 1998), molekulska dinamika, merjenje kompresibilnosti (Bockris in Saluja 1972) ter sipanje nevtronskih in rentgenskih žarkov (Ansell in sod. 2006). Na vodne molekule najbolj vpliva neposredna bližina ionov, medtem ko je strukturiranje vode stran od ionov le malo spremenjeno. Ena redkih raziskav, ki trdi drugače, je Sedlákova (2006). Vodi je namreč okoli ionov našla tudi večje domene vodnih molekul s premerom okoli 100 nm.

Najbolj pomembne sile, ki v vodnih raztopinah delujejo na ione in polarne molekule (kot je DNA), so kratkosežne elektrostatične interakcije. Ione delimo glede na naboj na anione in katione. Pri obeh zvrsteh (anionih in kationih) poteka delni prenos naboja z iona na vodo. Interakcije anion-H-vez so entalpijsko močnejše kot interakcije kation-H-vez.

S sipanjem nevtronov so Soper in sodelavci (1977) ugotovili, da so anioni (npr. kloridni) koordinirani na vodne molekule tako, da je vez H-O...Cl skoraj linearna, medtem ko se molekule  $\text{H}_2\text{O}$  kationom približajo s kisikom (glej sl. 4). Študije Cappa in sodelavcev (2005 in 2006) z alkalijskimi solmi (npr.  $\text{Na}^+$ ) so pokazale, da enovalentni kationi skoraj ne vplivajo na daljnosežno strukturo vode in tudi dvovalentni spremenijo absorpcijske spektre rentgenskih žarkov tako, da je sprememba porazdelitve naboja vidna v prvem oziroma največ drugem hidratacijskem ovoju; pri čemer je prvi hidratacijski ovoj prvi sloj molekul vode ob ionu.



**Slika 4:** Topljenje kationov in anionov: (a) konvencionalni pogled in (b) orientacija vode, odkrita s sipanjem nevtronskih žarkov Sopra in sodelavcev (1977) (Vir: Ball 2008).

**Figure 4:** Solvation of cations and anions. (a) The conventional view. (b) Water orientations revealed by neutron scattering of Soper and coworkers (1977) (Source: Ball 2008).

Zgolj lokalni vpliv ionov so potrdili Krekeler in Delle Site (2007) s simulacijami molekulske dinamike, s katerimi so izračunali le manjšo stopnjo prednostne orientacije v prvem hidratacijskem ovoju eno- in dvovalentnih kationov. Omta in sodelavci (2003) so iz IR spektrov, posnetih s pomočjo femto sekundne črpalke, odčitali, da imajo ioni vpliv na rotacijsko dinamiko vode le v prvem hidratacijskem ovoju. Paesani in sodelavci (2010) pa so enake rezultate dobili s simulacijami molekulske dinamike, pri katerih so vključili jedrske kvantne vplive. S svojim delom so potrdili tudi dvojno naravo protonov v vodi – kot valovi in kot delci. Primer jedrskega kvantnega vpliva v vodi je na primer značilna delokalizacija protonov v podhlajeni vodi (Pietropaolo in sod. 2008), ki je hkrati tudi gonilo za njihovo visoko mobilnost (glej tudi 2.1.2.1).

Kakšen pa je mehanizem obrata vodikovih vezi v prisotnosti ionov? Rezultati multidimenzionalnih vibracijskih spektroskopskih raziskav vodnih raztopin  $\text{NaClO}_4$  so pokazali, da se vodna molekula zelo hitro odzove na prisotnost ionov. Premestitev vodikovih vezi iz sosednje vodne molekule ( $\text{O-H}_{\text{H}_2\text{O}}$ ) na kloratni anion ( $\text{O-HClO}_4^-$ ) poteče v piko sekundi ( $10^{-12}$  s). V manj kot 50 femtosekundah ( $10^{-15}$  s) pa povzroči kotno rotacijo H-vezi, skok za kar  $\sim 50^\circ$  (Ji in sod. 2010). Proste vodikove vezi so torej zgolj prehodne narave.  $\text{O-HClO}_4^-$  pa se po vzpostavitvi vezi počasneje orientirajo kot  $\text{O-H}_{\text{H}_2\text{O}}$  (Laage in Hynes 2006).

Hidratacija ionov je torej bolj lokalna kot globalna. V naslednjem poglavju pa bomo videli, da podoben princip delovanja drži tudi za manjše hidrofobne topljence v vodi.

### 2.1.1.5 Hidrofobne interakcije

Hidrofobne molekule so doble ime po grški besedi *hydropophobos* (prevod: voda - strah, strah pred vodo). To pomeni, da molekule vode raje sodelujejo druga z drugo kot s hidrofobnimi molekulami. Zato se hidrofobne molekule v vodi združujejo in s tem minimalizirajo kontaktno površino. Manjše molekule se do neke mere raztopijo, pri čemer se molekule vode organizirajo okoli njih, ne da bi spremenile mrežo vodikovih vezi. Z vodo se nato povezujejo z van der Waalsovimi silami induciranih električnih dipolov.

Pri raztpljanju se hidrofobnim molekulam poveča kemijski potencial, kar kaže na njihovo slabo topnost. Hidrofobne sile so močno odvisne od temperature – pri nizkih temperaturah je njihovo raztpljanje eksotermno, saj se lahko vklopijo v že obstoječo mrežo vodikovih vezi in pridobijo mnogo van der Waalsovih interakcij. Pri višjih temperaturah pa je raztpljanje endotermno, saj za ustvarjanje svojega prostora v mreži potrebujejo energijo. Pri mešanju z vodo se celotni volumen, ki je vsota parcialnih volumnov, zmanjša, saj se hidrofobi vključijo v mrežo vodikovih vezi med molekulami vode, pri čemer se celotnemu sistemu zniža entropija (Mikheev in sod. 2007).

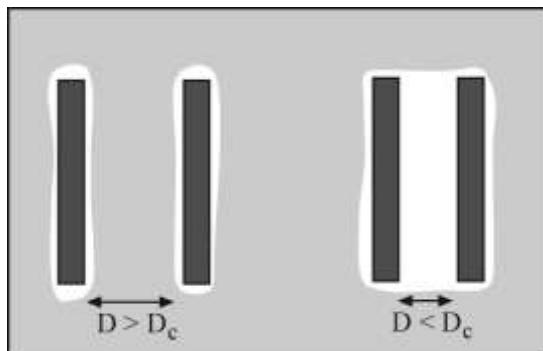
Hidrofobne interakcije so odgovorne za mnoge biološko pomembne procese: urejanje amfifilnih lipidov v dvoslojne membrane in zlaganje hidrofobnih alkilov v notranjosti polipeptidnih verig, kar proteinom omogoča, da se upogibajo, postanejo bolj kompaktni in se zlagajo v kvartarne strukture (Ball 2008).

Hidrofobne sile že precej časa ne razlagajo več s konvencionalno Kauzmannovo (1959) razlago, ki je sledila modelu ledenih gora Franka in Evansa iz leta 1945. Po tej razlagi se voda okoli hidrofobnih molekul uredi v obliki tekočih kristalov in se ji močno zniža entropija. Če je torej hidrofobnih molekul več, je entropijsko bolj ugodno, če so združene. Še vedno ne poznamo točne razlage, na osnovi eksperimentalnih rezultatov in simulacij molekulske dinamike Blokzijla in Engebertsa (1993) pa se predvideva, da voda manjše hidrofobne molekule kot npr. metan, vključi v svojo mrežo vodikovih vez; pri čemer nastane klatratna kletka, kjer niti prvi hidratacijski ovoj ni znatneje povezan z vodikovimi vezmi kot večinska voda. Poskusi z metanolom, ki je amfifilen, pa so pokazali, da imajo hidrofobne interakcije vendarle entropijski izvor, katerega prispevek pa ni tako velik kot trdi Kauzmann (Dixit in sod. 2002a). Molekule vode v drugem hidratacijskem ovoju metanola so v koncentrirani raztopini metanola (molsko razmerje metanol / voda = 7 : 3) namreč v mikroskopskem smislu rahlo zgoščene, bolj povezane in imajo nižjo entropijo od večinske vode. Prav to minimalno zmanjšanje prostosti molekul vode pa zaradi deplecijskega učinka spodbuja združevanje molekul metanola. Pri tem je treba poudariti, da se metanol v vseh razmerjih meša z vodo in tvori homogeno raztopino. Vendar je v molski mešanici vode in metanola 1 : 19 več kot 80 % metanolnih molekul združenih v skupine 3-8 (Dixit in sod. 2002b). Pri deplecijskem učinku dva vključka namreč manj porušita mrežo vodikovih vez, če se združita, kot če sta daleč narazen.

Majhni hidrofobni topljenci torej bistveno ne spremenijo mreže vodikovih vez molekul vode. Kaj pa voda stori z večimi hidrofobnimi topljenci? Hidrofobne topljence, ki so večji od 1 nm, mreža vodikovih vez ne more enostavno zaobjeti, saj so preveliki. Po eni razlagi voda z neposredne bližine hidrofobnih površin dobesedno izpari (Cheng in Rossky 1998). Tako naj bi nastala tanka plast pare, ki loči vodo od površine. Prostor, v katerem je para, ima predvidoma debelino enega do dveh slojev molekul vode. Zaradi razlike v agregatnem stanju naj bi nastala razlika v tlaku, ki hidrofobne površine med seboj privlači in poskrbi, da se združijo (Wallqvist in Berne 1995). Pri tem še vedno ni jasno, ali je izvor privlačnih interakcij med večimi hidrofobi enak silam, ki povzročajo združevanje manjših hidrofobnih molekul (Ball 2008). Simulacije molekulske dinamike raztopljanja trdnih krogel Rajamanija in sodelavcev (2005) kažejo na to, da je termodinamika hidratacije manjših entropijsko, večjih hidrofobov pa entalpijsko pogojena.

Mittal in Hummer sta leta 2008 s simulacijami molekulske dinamike ob hidrofobnih topljencih dejansko opazila manjše sprememjanje gostote, vendar brez jasno zaznavnih praznin v vodi. Pri tem pa je bil nakazan stik kapljevinske vode s paro. Ugotovila sta, da je

posledica spreminjačanj gostote nastanek lokalnih mokrih in suhih območij z upočasnjeno molekulsko dinamiko. Njuna odkritja so v skladu s predpostavko Stillingerja (1973) in teorijo Luma, Chandlerja in Weeksa (1999) ter Chandlerja (2005), da se okoli večjih topljencev hidrofobnega značaja nahaja tanek sloj pare. Meja med obnašanjem majhnih in velikih hidrofobnih topljencev je približno pri 1 nm, kar je velikostni razred premera  $\alpha$ -vijačnic (glej sl. 5).



**Slika 5:** Hidrofobni privlak po modelu Luma in sodelavcev (1999). Hidrofobne površine so obdane s tanko plastjo pare, pri neki kritični razdalji  $D_c$  se voda v medprostoru kolektivno izsuši (Vir: Ball 2008).

**Figure 5:** Hydrophobic attraction in the model of Lum and coworkers (1999). The hydrophobic surfaces are surrounded by a thin layer of vapor. At some critical separation  $D_c$  there is collective drying transition in the space between the surfaces (Source: Ball 2008).

Voda tako zelo ne mara hidrofobnih površin, da jo energijsko manj stane, če se pretvorí v drugo fazo, paro, kot pa če bi vztrajala v kapljevinском stanju. Če hidrofobne površine najprej združimo, nato pa vlečemo narazen, opazimo mehurčke pare. Temu pojavu pravimo kapilarna kondenzacija oz. kapilarno izparevanje. Maccarini in sodelavci (2007) pa so hidrofobnemu podoben solvofoben učinek opazili tudi pri nepolarnih topilih in hidrofilnih površinah. Hidrofobnega privlaka torej ne moremo pripisati edinstvenim lastnostim vode, ampak je na splošno značilen za raztapljanje solvofobnih topljencev. Kaj pa lahko napišemo o privlaku med ne-hidrofobnimi delci z enakim nabojem v vodi?

#### 2.1.1.6 Korelacijski privlak med enako nabitimi delci v vodi

Bo Jönsson z Univerze v Lundu na Švedskem je preučeval še eno vrsto nenavadnega privlaka v vodi, ki je precej podoben hidrofobnemu: korelacijski privlak. Pogojen je z visoko dielektrično konstanto vode in njen zmožnostjo, da razaplja polivalentne ione. Ugotovil je, da korelacijski privlak med enako nabitimi površinami nastane zato, ker se med površinami nahajajo delci z nasprotnim nabojem, s katerimi se privlači vsaka od teh površin posebej. Če so naboji med površinama dovolj veliki, polivalentni, je rezultat vseh interakcij korelacijski privlak (Karlström in sod. 1976, Penfold in sod. 1990, Ise 2007).

Biološki primer korelacijskega privlaka je DNA. Človeška DNA je dolga približno 90 cm in je ena od najbolj nabitih molekul v naravi. V celici je DNA močno strnjena, zavzema kar 10 000-krat manjši volumen kot v vodni raztopini. Pri tem ji pomagajo razni proteini, kot so pozitivno nabiti histoni, ki sestavljajo osnovni gradnik kromatina v jedru, nukleosom. DNA se navija okoli nukleosoma, nukleosomi se porazdelijo v vijačnico, ki se zavije v super vijačnico in tako dalje vse do končne oblike kromosoma. Takšno strnjevanje DNA pa lahko povzročimo tudi umetno v vodni raztopini tako, da ji dodamo sol, ki vsebuje polivalentne katione, kot so višje valentni poliamini ali trivalentni kobaltov heksammin. Njihova struktura ni pomembna, važno je le, da so polivalentni in kationi. Ko torej raztopini dodamo polivalentne ione, se DNA prične samoorganizirati in se zgosti v zvitek torusne oblike. Polivalentni kationi torej s korelacijskim privlakom inducirajo privlačne interakcije med različnimi segmenti DNA in če so privlaki dovolj veliki, DNA kondenzira sama vase (Podgornik 2009).

Poleg tega, da ioni pomagajo pri samo-zvijanju DNA, pa imajo različne vplive tudi na raztapljanje proteinov.

#### 2.1.1.7 Vpliv ionov na raztapljanje hidrofobnih molekul

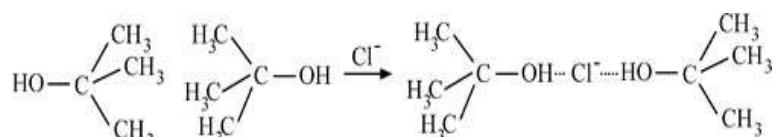
Ioni na različne načine vplivajo na raztapljanje hidrofobnih molekul v vodnih raztopinah. Hofmeister je leta 1888 opazil, da nekatere soli povzročijo, da se protein albumin iz vodnih raztopin obori, druge pa mu povečajo topnost (Kunz in sod. 2004). Glede na to, kateri ioni mu bolj zmanjšajo topnost, jih je razdelil na dve skupini:  $\text{H}_2\text{PO}_4^- > \text{SO}_4^{2-} > \text{F}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{J}^- > \text{ClO}_4^- > \text{SCN}^-$  in  $\text{Mg}^{2+} > \text{Li}^+ > \text{Na}^+ \sim \text{K}^+ > \text{NH}_4^+$ .

Hofmeistrovo vrsto so do pred nedavnim razlagali s sestavljanjem in podiranjem strukture vode ob raztapljanju različnih ionov (angl.: *structure-making in structure-breaking*). Po tem principu ioni globalno vplivajo na strukturo vode. Eni jo bolj uredijo, drugi pa poskrbijo, da je manj vodikovih vezi med molekulami. Tisti ioni, ki lahko bolj uredijo mrežo vodikovih vezi v vodi ( $\text{F}^-$  in  $\text{Mg}^{2+}$ ), s tem zaradi znižanja entropije zmanjšajo proteinsko hidratacijo. Hofmeister jih je zato razvrstil višje v vrsti.

Zaradi novejših spoznanj o raztapljanju manjših hidrofilov, o katerih smo pisali v točki 2.1.1.4, pa se z izgradnjo in podiranjem strukture vode ne moremo strinjati. Z eksperimenti in simulacijami molekulske dinamike so namreč pokazali, da imajo enostavni ioni dlje od prvega hidratacijskega ovoja zgolj minimalen vpliv, ali pa ga sploh nimajo. Namesto da bi Hofmeistrovo vrsto poskušali razumeti z globalnim vplivom ionov na strukturo vode je zato bolje gledati na vplive, ki jih imajo ti ioni na lokalno hidratacijo proteinov in drugih hidrofobnih molekul (Ball 2008).

Dejstvo je, da ioni v raztopini niso homogeno razpršeni v bližini površin, ampak so nekateri bližje hidrofilnim, drugi pa bližje hidrofobnim površinam. Zanimiv primer je hidronijev ion, ki se rad nahaja na meji z zrakom. To so potrdili z mnogimi metodami, od termodinamskih analiz (Pegram in Record 2006) in površinske spektroskopije (Tarbuck in sod. 2006) do izmenjave devterija na površini nanokristalov ledu (Buch in sod. 2007). Predvidevajo, da večja prisotnost hidronijevih ionov na meji z zrakom povzroči padec pH-ja na 4,8 ali celo manj. Nehomogeno razpršenost hidronijevih ionov v vodi bi lahko razložili z njihovo amfifilnostjo.  $\text{H}_3\text{O}^+$  bi namreč lahko bil podoben amfifilnim molekulam, saj lahko donira tri vodikove atome, medtem ko kisikov atom zaradi pozitivnega naboja ne more biti dober akceptor vodikovih vezi in bi lahko deloval hidrofobno (Iyengar in sod. 2005). Na stični površini z zrakom bi zato bili hidronijevi ioni orientirani s kisikovim atomom proti zraku. Kot smo že napisali, delujejo hidrofobne površine na vodo podobno kot stik z zrakom, zato Ball (2008) predpostavlja podobno obnašanje hidronijevih ionov tudi ob hidrofobnih površinah. Pri zvitju proteinov bi se tako protonirani deli verig polipeptidov pomikali v bližino hidrofobnih delov.

Raziskave Ninhama in sodelavcev (Salis in sod. 2007) so pokazale, da z dodatkom natrijevih ionov in različnih anionov k puferskim raztopinam encima lipaze sistematično spremenimo aktivnost tega encima na način, ki ga konvencionalno ne moremo razložiti. Da bi bolje razumeli vpliv vode na delovanje proteinov je pomembno, da poznamo specifične interakcije encimov z anionami. Eden bolj zanimivih primerov je interakcija med  $\text{NaCl}$  in *t*-butil alkoholom v vodi. S sipanjem nevronov so ugotovili, da kloridni anioni neposredno interagirajo z alkoholnimi hidroksilnimi skupinami, zaradi česar se popolnoma spremeni hidratacijsko okolje alkoholnih molekul (Finney in Bowron 2004). Pri odsotnosti soli v raztopinah z molskim razmerjem *t*-butil alkohol / voda = 1:50 se alkoholne molekule med seboj povezujejo na način glava proti glavi. Na ta način so metilne skupine skrite, hidroksilne pa izpostavljene vodi. Ko dodamo kloridne ione v molskem razmerju  $\text{NaCl}$  / voda je 1:100 (razmerje med alkoholom in  $\text{NaCl}$  je tako 2:1), približno polovica kloridnih ionov tvori mostove med hidroksilnima skupinama dveh molekul alkohola. Ostali kloridni ioni ostanejo popolnoma hidratirani enako kot natrijevi in ne vplivajo na raztopljanje alkohola. Torej se interakcije med alkoholnimi molekulami z dodatkom natrijevega klorida bistveno spremenijo iz nepolarno–nepolarno v polarno–polarno. Na ta način postane hidrofobni del molekule, *t*-butil, bolj izpostavljen vodnim molekulam (glej sl. 6).



**Slika 6:** Kloridni most *t*-butil alkohola v vodni raztopini z  $\text{NaCl}$  po Finneyu in Bowronu (2004) (Vir: Ball 2008).

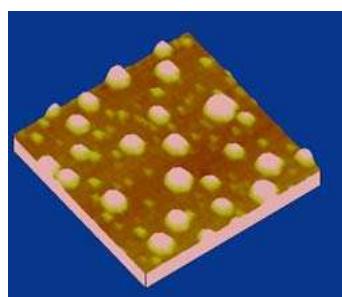
**Figure 6:** Chloride bridging of *t*-butyl alcohol in solution with  $\text{NaCl}$  after Finney and Bowron (2004)  
(Source: Ball 2008).

Mehanizem med ioni in površinami je torej subtilen in odvisen od neposredne interakcije med ioni in hidrofobnimi skupinami. V naslednji točki pa bomo pisali o še eni vrsti hidrofobnih interakcij, ki so zelo pomembne pri zvijanju proteinov v vodi.

#### 2.1.1.8 Daljnosežne hidrofobne interakcije in vloga mehurčkov

O obstoju daljnosežnih hidrofobnih interakcij diskutirajo že več kot 35 let (Blake in Kitchener 1972, Israelachvili in Pashley 1982, Christenson in Claesson 1988), saj njihov domet, od 1 – 100 nm, presega van der Waalove sile in jih ne morejo razložiti z restrukturiranjem vode. Na daljnosežne hidrofobne učinke sta leta 1972 prva postala pozorna Blake in Kitchener. Opazila sta namreč, da se je vodni film na hidrofobni površini, ko se ji je približeval zračni mehurček, »raztrgal«. Hidrofobne privlake s 300 nm razdalje sta z merjenjem površinskih sil deset let kasneje potrdila tudi Israelachvili in Pashley (1982). Christenson in Claesson pa v članku, objavljenem leta 1988 v reviji *Science*, opisujeta približevanje dveh hidrofobnih površin v vodi z razdalje 90 nm, med katerima pride do spontane kavitacije – nastanka parnih mehurčkov in mostičkov.

Obstaja več razlag za obstoj tega daljnosežnega privlaka, od večjega strukturiranja vode (Pashley in sod. 1985) do elektrostatičnih sil (Despa in Berry 2007). Zadnje čase pa prihaja vse bolj do veljave teorija, pri kateri med obema površinama nastane most iz mehurčkov različnih velikosti, podtlak pa obe površini povleče skupaj (Attard 1996); glej sl. 7.

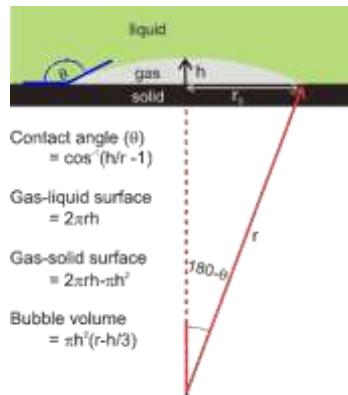


**Slika 7:** Skrivnostni mehurčki na hidrofobni površini so teoretično premajhni, da bi lahko obstajali (velikost slike je  $4 \mu\text{m}^2$ ) (Vir: Borkent in sod. 2007).

**Figure 7:** Mystery bubbles are theoretically too small to exist (image area is 4 square microns) (Source: Borkent et al. 2007).

Voda ob hidrofobnih površinah je, kot smo že napisali, manj gosta. Ima več prostih vodikovih vezi (približno eno četrino) podobno kot pri stiku z zrakom in raje interagira z večinsko vodo kot s hidrofobno površino (Du in sod. 1994). Njena tendenca, da čim bolj zmanjša stično površino s hidrofobno snovjo in poveča površino z zrakom povzroči, da tik ob površini ostajajo nanometrske praznine, ki jih radi zapolnjujejo plini (Mezger in sod. 2006). Opazovanja Carambasisa in sodelavcev (1998) pa so pokazala, da se v vodi v bližini hidrofobnih površin zadržujejo nanomehurčki, ki se med seboj samoorganizirajo in povezujejo v mreže. Njihove velikosti so različne in so bile dolgo časa jabolko spora.

Velikost nanomehurčkov je bila sporna zaradi Laplace-Youngove enačbe za izračun tlaka v makroskopskih mehurčkih. Po tej enačbi naj bi bil tlak zaradi malega polmera v nanomehurčkih tako visok, da bi se takoj razpočili. Vendar se je pokazalo, da to ni res, saj so lahko obstojni tudi več dni (Attard 2003).



**Slika 8:** Značilne dimenzije nanomehurčkov:  $r = 50 \text{ nm} - 6 \mu\text{m}$ ,  $r_s = 25 - 1000 \text{ nm}$ ,  $h = 5 - 20 \text{ nm}$  in  $\theta = 135^\circ - 175^\circ$ . Prevod angl. – slo.: *liquid* – tekoče, *gas* – plin, *solid* – trdno, *contact angle* – stični kot, *gas-liquid surface* – površina plin-tekočina, *gas-solid surface* – površina plin-trdno, *bubble volume* – volumen mehurčka (Vir: Chaplin <http://www.lsbu.ac.uk/water/>).

**Figure 8:** Nanobubbles typical dimensions:  $r = 50 \text{ nm} - 6 \mu\text{m}$ ,  $r_s = 25 - 1000 \text{ nm}$ ,  $h = 5 - 20 \text{ nm}$  and  $\theta = 135^\circ - 175^\circ$  (Source: Chaplin <http://www.lsbu.ac.uk/water/>).

Polmer nanomehurčkov je mnogo večji, kot so predvidevali, saj so bolj sploščenih oblik. Zato je njihov notranji tlak temu primerno nižji (glej sl. 8). Poleg tega pa so stabilizirani z negativno nabitimi delci na njihovi površini, npr. hidroksilnimi anioni (Zangi in Engberts 2005) in CO<sub>2</sub>. Da so dejansko nanomehurčki tisti, ki povzročijo daljnosežne hidrofobne interakcije, je dokaz, da odstranitev plinov iz vode ta privlak izniči, medtem ko kratkosežna ( $< 25 \text{ nm}$  in  $< 1 \text{ nm}$ ) hidrofobna privlaka ostaneta oziroma se celo ojačita (Pashley in sod. 1985).

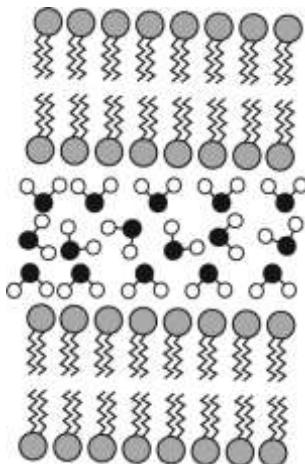
Voda raje tvori vodikove vezi z večinsko vodo kot s hidrofobno površino. Medtem ko se ob hidrofilnih površinah orientira glede na hidrofilne funkcionalne skupine površin in tvori manj vodikovih vezi z večinsko vodo (Lorenz in sod. 2009).

### 2.1.1.9 Hidrofilne površine

Meritve površinskih sil so pokazale, da pri majhni oddaljenosti med hidrofilnimi površinami vladajo odbojne sile (Rand in Parsegian 1989, Horn in sod. 1989, Israelachvili 1985). Ker pa so van der Waalsove sile med temi površinami privlačne, so se raziskovalci razdelili na dva pola. Marčelja in Radič (1976), Attard in Batchelor (1988) ter Kornyshev in Leikin (1989) predpostavljajo, da so za odboj krivi posebni strukturni učinki, edinstveni za vodo. Voda tik ob hidrofilni površini je namreč močno polarizirana zaradi električnega

polja, ki ga ustvarjajo nabiti delci na površini. Zato tik ob površini nastane hidratacijski ovoj, v katerem so molekule vode zelo urejene glede na površino. Debelina ovoja je odvisna od koncentracije ionov, lastnosti površine in edinstvenih strukturnih učinkov vode. Medtem ko Israelachvili in Wennerström (1996) zanikata vpliv posebnih strukturnih učinkov vode in za razlog odboja navajata zgolj specifične lastnosti hidrofilnih površin, kot so sterične ovire, neravne površine in druge površinske nepravilnosti.

V celici odboj hidrofilnih površin opazimo, ko se dve dvoslojni membrani močno približata. Na njuni medsebojni razdalji od 1 do 3 nm opazimo odbojno silo (Leikin in sod. 1993), ki je zelo pomemben dejavnik pri dinamiki membran. Simulacije molekulske dinamike Saiza in Kleina (2002) kažejo na to, da imajo molekule vode 1 nm stran od dvoslojnih membran povečan orientacijski red. To sliko so potrdili tudi z mikroskopiranjem s koherentnim anti-Stokes ramanskim sipanjem (Cheng in sod. 2003). Opazili so, da so molekule vode tik ob površini preferenčno orientirane tako, da so z dipoli usmerjene proti naboju lipidnih molekul v dvoslojnih membranah (glej sl. 9), zaradi česar so manj povezane s H-vezmi kot v večinski vodi.



**Slika 9:** Orientacijsko urejanje vodnih molekul ob hidrofilnem dvosloju po Chengu in sodelavcih (2003) (Vir: Ball 2008).

**Figure 9:** Orientational ordering of the water molecules between lipid bilayers by Cheng and coworkers (2003) (Source: Ball 2008).

Gurau in sodelavci (2003) so to sliko potrdili z opazovanjem razlik med vibracijskimi frekvenčnimi spektromi hidrofilnega karboksilatnega monosloja kalcijeve in cinkove soli eikozanojske kislino ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$ ). Pri tem  $\text{Ca}^{2+}$  ioni ne zmotijo hidratacijskega sloja, medtem ko ga bidentatni kelati s  $\text{Zn}^{2+}$  povsem spremenijo, kar opazimo na frekvenčnemu spektru vode. Z nelinearno lasersko spektroskopsko metodo (»*VIS-IR sum frequency generation spectroscopy*«) vode ob taljenem oziroma fuzijskem steklu sta Jena in Hore (2009) tej sliki pridodala, da večja, kot je ionska moč, bolj se molekule vode orientirajo v skladu s površinskimi hidrofilnimi funkcionalnimi skupinami in tanjši je

hidratacijski ovoj površine. Višje koordinirane so dlje stran od površine, medtem ko so tik ob površini nižje koordinirane molekule vode.

Simulacije vode, omejene v nano prostoru med dvema hidrofilnima površinama (v nadaljevanju nanovoda), so podobne razmeram v celici, saj so v celici zelo omejeni prostori in veliko makromolekul v celici je hidrofilnih. Pri nanovodi nastane konflikt med energetskim minimumom mreže vodikovih vezi (stopnjo koordiniranosti), interakcijami z relativno veliko površino nano prostora in prileganjem razpoložljivemu prostoru. Fizikalne lastnosti in stanje nanovode so odvisne od molekulskih lastnosti površine omejenega prostora in mer, kakor tudi od temperature in tlaka. Simulacije molekulske dinamike so pokazale, da ima voda v stiku z nanocevkami in v hidrofobnih kanalih bioloških membran dinamične in strukturne lastnosti tekočega stanja ali heksagonalnega ledu (Raghavender in sod. 2009). Zato lastnosti nanovode težko napovemo in so lahko zelo drugačne od večinske vode.

Raziskave dveh z nano prostorom omejenih hidrofilnih kremenčevih površin so pokazale, da so molekule vode sicer v kapljevinском stanju, vendar imajo povsem zamrznjeno strukturo (Hu in sod. 2009). Delujejo kot lepilo, saj je vsaka molekula z vsaj eno vodikovo vezjo povezana z vsaj eno hidrofilno funkcionalno skupino na obeh površinah, kar poleg tega bistveno poveča prenos toplove med površinama. Simulacije molekulske dinamike strukture vodnih verig v samoorganiziranih ciklopeptidih, ki imajo na svoji površini strukture, ki pripomorejo k njihovemu urejanju v nanocevke (Liu in sod. 2010) pa so pokazale, kako sterične ovire v nano prostoru vplivajo na mehanizem urejanja nanovode. V transmembranski ciklo peptidni nanocevki so molekule namesto v vrsti 1-1-1-1 oziroma  $H_2O-H_2O-H_2O-H_2O$  kot v drugih nanocevkah, urejene v obliki valov 1-2-1-2 oziroma  $H_2O-(H_2O)_2-H_2O-(H_2O)_2$ . Dolžina enega vala 1-2-1-2 pa je enaka razdalji med dvema obročema peptidov.

V urejanju vode ob hidrofilnih površinah Philip Ball (2008) vodi priznava edinstvene lastnosti. Ker pa se tudi običajne tekočine urejajo ob površinah (Rhykerd in sod. 1987), se moramo vprašati, ali so razlike med vodo ob površinah in večinsko vodo večje od tistih, ki jih pričakujemo od teorije enostavnih tekočin.

#### 2.1.1.9.1 Izključitvene cone vode ob hidrofilnih gelih

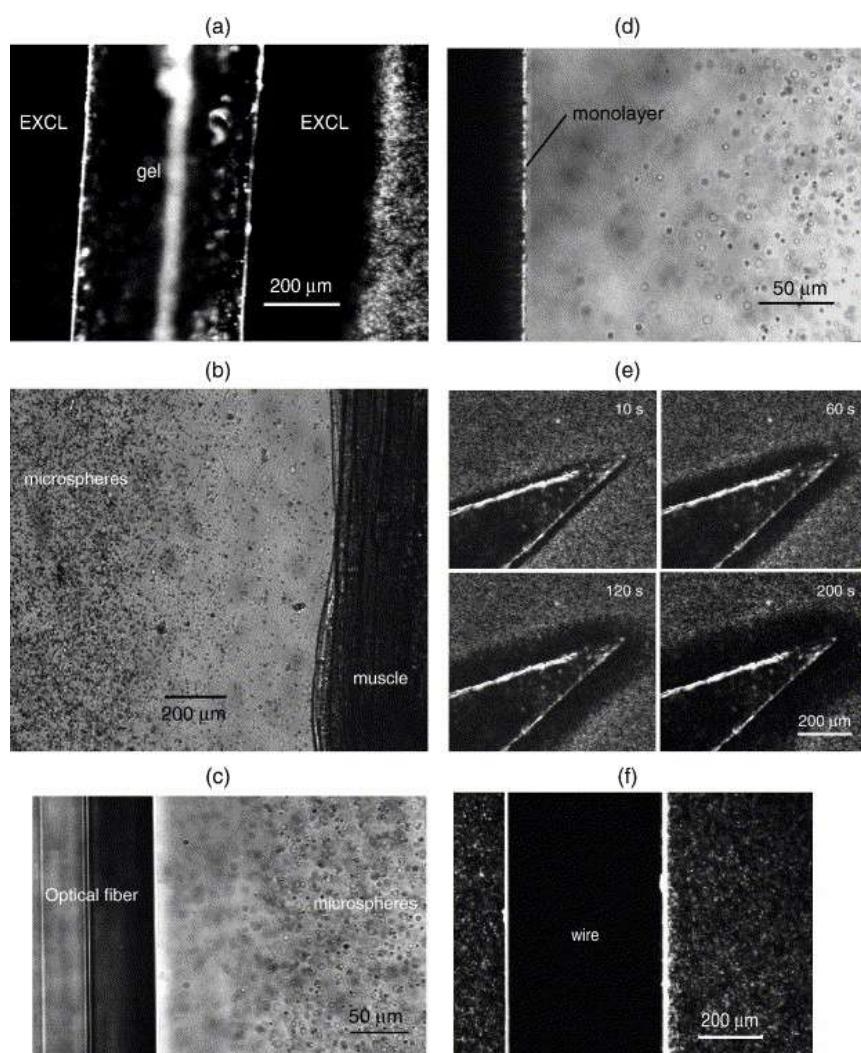
Voda je lahko v treh agregatnih stanjih – kot para, tekočina in led. Zadnja odkritja Geraldha H. Pollacka in sodelavcev pa vse bolj kažejo na obstoj še četrte, tekoče kristalinične faze ob hidrofilnih gelih. Raziskave Keplerja in Fradena (1994), Crockerja in Grierja (1996) ter Geraldha H. Pollacka (Zheng in Pollack 2003, Zheng in sod. 2006, Zhao in sod. 2008, Ovchinnikova in Pollack 2009, Pollack in sod. 2009, Nagornjak in sod. 2009, Chai in Pollack 2010, Klyuzhin in sod. 2010 idr.) so pokazale, da se voda ne ureja zgolj v enem ali

dveh slojih, temveč v par sto tisoč slojih stran od hidrofilnih gelov (gel je koloidna snov v poltrdem stanju, ki ima visoko afiniteto do vode).

Začetno odkritje, ki sta ga objavila Pollack in njegov kolega Zheng Jian-ming (2003) je bilo, da voda tvori masivne izključitvene cone poleg površin hidrofilnih gelov. Ko sta dodala dovolj velike topljence, sta pod mikroskopom opazila, da so te cone popolnoma izključile topljence. Poleg površine gela se je pojavila čista cona brez mikrosfer v debelini nekaj sto mikronov. Cona je ostala stabilna dneve in celo tedne.

Raziskovalci so odkritje sprejeli s skepso, saj sofisticirane tehnike, kot so NMR, rentgenski žarki in nevtronska difracija, niso našle več kot enega ali največ dva spremenjena sloja vode ob površinah glede na večinsko vodo (npr. Enderby in Neilson 1979). Pollack in njegova raziskovalna skupina so zato eno leto iskali vse možne napake in razširili svoje rezultate. Ugotovili so, da so izključitvene cone splošen fenomen vode, ki so ga opazili že več kot petdeset let nazaj. Henniker v preglednem članku iz leta 1949 z več kot sto viri navaja, da za mnoge tekočine vstevši vodo velja, da se cone poleg površin razlikujejo od večinskih con v fizikalnih lastnostih in se raztezajo nekaj sto mikronov stran od površin. Oparin (1965) v svoji knjigi o izvoru življenja večkrat navaja dela Bungenberga de Jong (1949), ki opisuje razširjeno strukturiranje vode okoli koloidnih delcev gumi arabike in želatine. Green in Otori (1970) pa sta prišla do podobnih ugotovitev pri raziskovanju tako imenovane nepomešane cone – regije s počasno difuzijo, ki obkroža mnogo bioloških tkiv (Barry in Diamond 1984). Naravna in umetna tkiva sta potopila v suspenzijo mikrosfer in cone v bližini površin so mikrosfere izključile. Nepomešane cone so bile velike nekaj sto mikrometrov in jih tudi z močnim mešanjem nista mogla odstraniti.

Pollackova skupina je nadaljevala z raziskavami in ugotovila, da širok spekter hidrofilnih gelov tvori izključitvene cone: polivinil alkoholni gel, poliakrilamidni gel, gel iz poliakrilne kisline in Nafiona (membrana, ki jo uporabljam kot protonski izmenjevalec v gorivnih celicah) ter biološka tkiva, kot sta sveženj zajčjih mišic ali kolagen; glej sl. 10 (a,b,e). Izključitvene cone so opazili tudi ob trdnih površinah, prekritih s slojem hidrofilnih skupin, in ob hidrofildem monosloju; glej sl. 10 (c,d). Medtem ko izključitve ob hidrofilnih površinah brez funkcionalnih skupin, kot je na primer žica iz nerjavnega jekla, ni; glej sl. 10 (f). Iz tega so sklepali, da izključitvene cone nastanejo ob površinah, ki vsebujejo funkcionalne skupine, ki z vodo tvorijo vodikove vezi. Izključeni topljenci niso samo mikrosfere, ampak tudi eritrociti, bakterije, koloidno zlato in molekule, kot je serum albumin, označena s fluorescenčnim barvilm, in fluorescenčno barvilo velikosti 200-300 Daltonov (Zheng in sod. 2006).

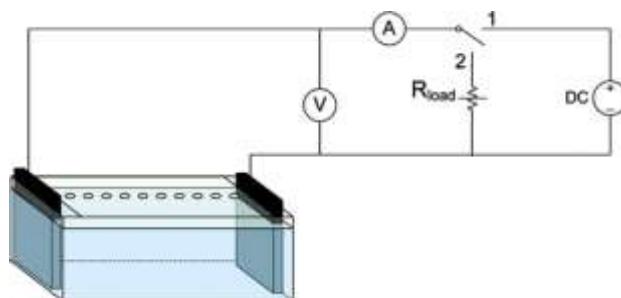


**Slika 10:** Primeri izključitve topljencev z različnih površin. (a) Izključitev topljencev (EXCL) z bližine gela poliakrilatne kisline. Gel so položili na krovno stekelce in dolili suspenzijo 1-μm karboksiliranih mikrosfer ter opazovali z invertnim mikroskopom z 20x objektivom. Slikali so po 20 minutah. Mikrosfere (desni del slike) so podvržene aktivnemu termičnemu gibanju. (b) Izključitev mikrosfer z bližine bioloških tkiv. V osmih vzorcih, ki so jih pregledali pod podobnimi pogoji, so našli izključitvene cone velikosti  $360 \pm 50 \mu\text{m}$ . (c) Optično vlakno FS-SC-7324, Thorlabs, Newton, NJ, (levo) z akrilatnim polimernim premazom, potopljeno v suspenzijo mikrosfer. Mikrosfere so se pomaknile proti desni. 20x objektiv, 2-μm karboksilirane mikrosfere. (d) Hidrofilni monosloj, ki vsebuje COOH skupine, z izključitveno cono. (e) Film Nafiona-117 suličaste oblike, debeline 170 μm, vstavljen med dva krovna stekelca z večjo debelino od filma. Zunanji film Nafiona so prepolili s suspenzijo karboksiliranih mikrosfer s premerom 2-μm. Temne cone so brez mikrosfer. Številke zgoraj desno pa kažejo čas po prepoljivosti s suspenzijo. Prikazano je le prvih nekaj minut. (f) Žica iz nerjavnega jekla brez hidrofilnih skupin na površini, vrinjena med dva krovna stekelca, izpostavljena suspenziji mikrosfer – izključitvena cona se ne pojavi. Prevod angl. – slo.: *microspheres* – mikrosfere, *muscle* – mišica, *optical fibre* – optično vlakno, *monolayer* – monosloj, *wire* – žica (Vir: Zheng in sod. 2006).

**Figure 10:** Examples of solute exclusion from various interfaces. (a) Solute exclusion (EXCL) in the vicinity of polyacrylic acid gel. The gel was placed on a coverslip, superfused with a suspension of 1-μm carboxylate-coated microspheres, and observed in an inverted microscope, equipped with a 20x objective. Image obtained 20 min. after superfusion. Microspheres (seen on right edge) undergo active thermal motion. (b) Microsphere exclusion in the vicinity of biological tissue. In eight specimens examined under similar conditions, the size of the exclusion zone, measured on video images, was found to be  $360 \pm 50 \mu\text{m}$ . (c) Optical fiber FS-SC-7324, Thorlabs, Newton, NJ (left), with an acrylate polymer coating, inserted into a microsphere suspension. Microspheres translate toward right; 20x objective, 2 μm carboxylate microspheres. (d) Hydrophilic monolayer, containing COOH groups, with exclusion zone. (e) Nafion-117 film, spear shaped, 170-μm thick, was sandwiched between two glass cover slips, much larger than the film. A carboxylated microsphere suspension 2-μm diameter was infiltrated around the sandwiched film. Dark zones are microsphere-free. Numbers in upper right indicate time after infiltration, in seconds. Only the first several minutes are shown. (f) Stainless steel wire, without hydrophilic groups at the surface, sandwiched between two glass slides and exposed to microsphere suspension – no exclusion zone occurred (Source: Zheng et al. 2006).

NMR slike so potrdile, da so izključitvene cone povezane z zmanjšano mobilnostjo glede na večinsko vodo. Meritve z visoko resolucijsko IR kamero so pokazale, da so izključitvene cone bolj urejene kot večinska voda, saj oddajajo manj svetlobe (Zheng in sod. 2006). pH občutljiva barvila pa so pokazala, da ima večinska voda, ki se nahaja poleg izključitvenih con neobičajno nizek pH. Nizek pH pomeni visoko koncentracijo protonov, kar nakazuje ločitev nabuja v vodi na  $H^+$  in  $OH^-$ . Kje pa so ostali negativni naboji? Z merjenjem električnega potenciala so ugotovili, da izključitvene cone z rastjo postajajo vse bolj negativno nabite. Tako ko so elektrodo postavili v izključitveno cono, je namreč potencial padel na -120 mV ali manj, odvisno od vrste gela (Zheng in sod. 2006).

V posodo s čisto vodo so Pollack in sodelavci (Ovchinnikova in Pollack 2009, Klimov in Pollack 2007) na skrajna konca vstavili elektrodi in ju izpostavili nizki napetosti (glej sl. 11). Še nekaj časa po izklopu električne napetosti je bila cona anionov in kationov določljiva oziroma vidna z indikatorjem. Po elektrolizi sta pri anodi, kjer je potekala oksidacija vode in so se kopičili protoni, zaznala bistveno nižji potencial kot pri katodi, kjer je potekala redukcija in so se kopičili hidroksilni anioni. Ta potencial je ostal zaznaven tudi po tem, ko sta tokokrog odprla in celo po tem, ko sta odstranila elektrodi.



**Slika 11:** Shema eksperimenta merjenja električne napetosti vode (Vir: Ovchinnikova in Pollack 2009).

**Figure 11:** Schematic model of experimental setup used for measuring the electrical potential of water  
(Source: Ovchinnikova and Pollack 2009).

Ta makroskopska ločitev nabuja je stabilna in nastane t. im. vodna baterija. Kaj pa jo hrani? Izkazalo se je, da so izključitvene cone občutljive na svetlobo. Če jih izpostavimo svetlobi, se odebelijo oz. povečajo. Učinkovit je celoten spekter sončne svetlobe, najbolj pa cel spekter vidne svetlobe in nevidna bližnja IR sevanja. Že deset minutna izpostavitev IR sevanju z valovno dolžino 3  $\mu m$ , ki povzroči dvig temperature vode samo za 1  $^{\circ}C$ , poveča velikost izključitvenih con za okoli štirikrat (Zhao in sod. 2008).

Pollackova odkritja so pomembna za razumevanje fizike, kemije in biologije. Prosti pozitivni naboji v večinski vodi namreč lahko izvršujejo različne naloge. Katere pa bi to lahko bile?

V vodi, kot smo že pisali v 2.1.1.6, vlada med enako nabitimi koloidnimi delci korelacijski privlak. Razlog za privlak pripisujejo nasprotno nabitim delcem, ki so porazdeljeni med

enako nabitimi. Ostaja pa nedoločeno, kako so lahko neenako nabititi delci na razpolago v ustreznih količinah. Po Nagornyaku in sodelavcih (2009) je količina protonov, ki izvirajo iz izključitvenih con dovolj, da zadostijo privlaku med negativno nabitimi delci; enako negativne skupine v izključitvenih conah zadostijo privlaku med pozitivno nabitimi delci. Neposreden test so izvedli s kroglicami ionskih izmenjevalcev. Opazili so, da se kroglice premera 0,5 mm, ko jih suspendirajo v vodi, med seboj privlačijo na razdaljah do 400 µm. Med pozitivno nabitimi kroglicami so s pH meritvami zaznali visok pH in z mikroelektrodami negativen potencial; med negativno nabitimi kroglicami so izmerili nizek pH in pozitiven potencial.

Poskusi s polprepustnimi membranami (Zhao in sod. 2009) so pokazali, da je razlika v potencialu tudi gonilo pri osmozi. Osmoza je proces, pri katerem skozi polprepustno membrano, kot so na primer dvoslojne lipidne membrane, topilo prehaja iz manj v bolj koncentrirano raztopino. Z dodatkom mikrosfer so namreč ob polprepustnih membranah opazili izključitvene cone, ki so bile na mestih, na katerih je voda prehajala skozi membrano, prekinjene.

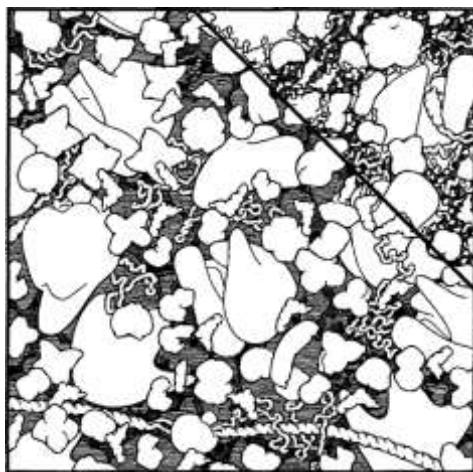
Mnogo pomembnih raziskovalcev je objavilo jasne dokaze, da se površinska voda razlikuje od večinske. Nobelov nagrajenec Albert Szent-Györgyi, oče moderne biokemije, je 1971 zapisal: »Življenje je voda, ki pleše po melodiji trdnih snovi.« Glibert Ling, ki je napisal pet pionirskeh knjig in mnogo drugih del, pa poudarja vlogo vode ob površinah pri vseh celičnih funkcijah (npr. Ling 1993, 2001, Ling in sod. 1993).

### **2.1.2 Vodno okolje celice**

Voda v kompleksni raztopini elektrolitov, neelektrolitov, koloidov in hidrogelov, ki se nahajajo v celici, ima znižano hidratacijsko število v primerjavi z večinsko vodo. Raziskovalci predvidevajo, da znaša okoli 2,2; podobno kot so ugotovili za vodo v omejenih prostorih. Viskoznost vode v vodni raztopini snovi v celici je mnogo večja ( $10^6$  do  $10^7$ -krat) od večinske vode (Kim in sod. 2003, Major in sod. 2006). Prav tako je počasnejša in se obnaša subdifuzivno – čas, ki ga potrebuje molekula, da prepotuje razdaljo  $l$  ni enak kot pri Brownovemu gibanju, ko je  $t \sim l^2$ , ampak je spremenjen za  $t \sim l^{2/\alpha}$ , kjer je  $\alpha = 0,74$  (Golding in Cox 2006). Subdifuzivno obnašanje vode in ionov v vodni raztopini snovi v celici pri vstopu v npr. hidratacijski ovoj popolnoma hidratirane molekule DNA ima  $\alpha \sim 0,81$ , če pa je DNA minimalno hidratirana, pa je  $\alpha \sim 0,66$  (Oleinikova in sod. 2008). To pomeni, da molekule potrebujejo dalj časa, da pridejo do cilja in se tam dlje časa zadržijo (Golding in Cox 2006).

Verkman (2002) je z analizo translacijske mobilnosti ugotovil, da je mobilnost fluorescenčne molekule v citoplazmi ca. štirikrat manjša kot v vodni raztopini. Citoplazma namreč tipično vsebuje 400 g/L makromolekul, ki zasedajo 5 – 40 % volumna celice. V

citoplazmi torej vlada velika gneča (Ellis in Minton 2003); glej sl. 12. V celici so zato entropijsko ugodnejši tisti procesi, ki zmanjšujejo prentranost, povečujejo hitrost zvijanja proteinov in optimizirajo proteinske funkcije v nagnetenem okolju (Minh in sod. 2006).



**Slika 12:** Gneča v citoplazmi. Zaradi večje nazornosti so manjše molekule narisane samo v zgornjem desnem kotu skice (Vir: Goodsell 1993).

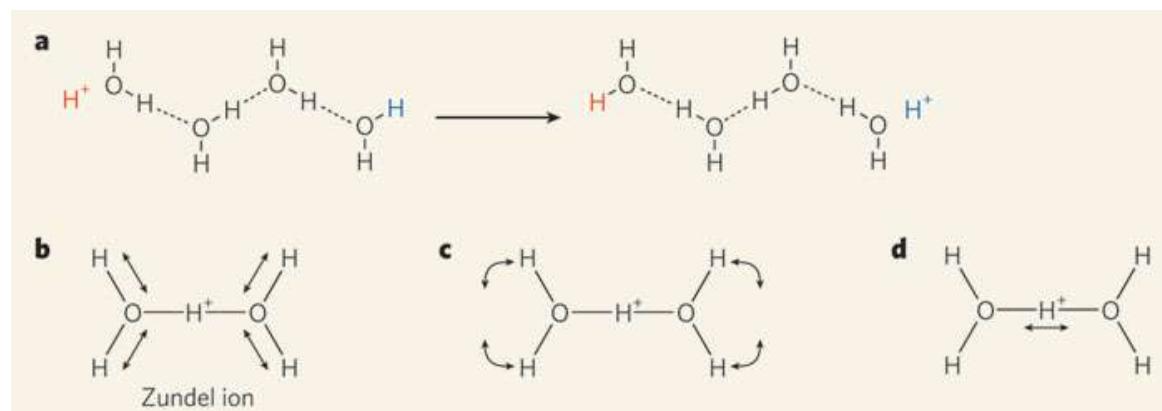
**Figure 12:** Cytoplasm is a crowded environment. For clarity, the small molecules are drawn only in the upper corner (Source: Goodsell 1993).

Pa so razlike med vodo v vodni raztopini snovi v celici in večinsko vodo dovolj velike, da so pomembne? Mnenja v literaturi so povsem različna. Eni vodo v vodnem okolju celice obravnavajo enako kot večinsko (Hill 1963, 1964). Na drugi strani pa je Pollack in njegovi podporniki, ki trdijo, da je citoplazma podobna gelu tudi brez makromolekulske mreže in svojo integriteto ohranja tudi takrat, ko večje dele celične membrane odstranimo (Pollack in Reitz 2001, Pollack 2001).

Voda v vodni raztopini snovi v celici ima dva načina delovanja. Po prvem se prosto giblje po celici, po drugem pa ostane ujeta v celičnih strukturah. Strukture mnogih membranskih proteinov kažejo na prisotnost ujetih molekul vode, ki delujejo kot prostetične skupine na način, ki ni podoben delovanju večinske vode (izraz prostetičen uporabljamo npr. za koencime, ki so kovalentno vezani na specifične encime in so z njimi v dolgotrajni povezavi.). Ujete molekule vode so urejene v strukture, ki so enako stabilne in pomembne kot stranske skupine proteinov. Radioliza v povezavi s struktурno masno spektroskopijo je pokazala, da voda sodeluje tudi pri transmembranskem signaliziranju (Orban in sod. 2010). Ena izmed možnosti sodelovanja vode pri signaliziranju pa je najverjetnejše s pomočjo protonskih mrež.

### 2.1.2.1 Protomska mreža

V vodi vodikovi kationi ( $H^+$ ) obstajajo v obliki kompleksov z vodnimi molekulami: kot hidronijevi ( $H_3O^+$ ), zundelovi ( $H_2O-H-H_2O^+$ ) in eigenovi ioni ( $H_9O_4^+$ ). Eden bolj pomembnih kompleksov je zundelov kation, v katerem si proton delita dve molekuli vode (Xantheas 2009). Zundelov kation poznajo že vrsto let iz IR spektrov, Vendrell in sodelavci pa so šele leta 2009 z izračuni IR spektrov zundelovih kationov, v katerih so enega ali več vodikovih atomov nadomestili z atomi devterija, opisali njihovo dinamično obnašanje (glej sl. 13).



**Slika 13:** (a) Prenos vodikovih ionov ( $H^+$ ) v vodi poteka po de Grotthusovem mehanizmu, pri katerem se vodikove (črtkane črte) in kovalentne vezi (nepretrgane črte) med vodnimi molekulami prekinjajo in ponovno vzpostavljajo. Mehanizem lahko vsebuje poljubno število molekul vode, Xantheas (2009) pa je sliko poenostavil s štirimi molekulami. (b-d) Zundelov kation je najmanjša strukturalna enota, v kateri si proton delita dve vodni molekuli. Njegovi načini nihanja, ki so jih simulirali Vendrell in sodelavci (2009), so (b) valenčna nihanja O-H vezi, (c) upogibanje v ravnihi vezi vodnih molekul navznoter in (d) nihanja med vodnimi molekulami in protonom (Vir: Xantheas 2009).

**Figure 13:** (a) The transport of hydrogen ions ( $H^+$ ) through water is accomplished by the Grotthuss mechanism, in which hydrogen bonds (dashed lines) and covalent bonds (solid lines) between water molecules are broken and re-formed. The mechanism can involve any number of water molecules, but only four are shown here for simplicity. (b-d) The Zundel cation is the smallest structural unit that enables the sharing of a hydrogen ion by two water molecules. Its modes of vibration, simulated by Vendrell et al. (2009) include (b) stretches of the outer oxygen–hydrogen bonds, (c) internal bending of the water molecules and (d) vibrations between the water molecules and the hydrogen ion (Source: Xantheas 2009).

Prenos vodikovih ionov skozi mrežo vodikovih vezi molekul vode poteka po de Grotthusovem hip-hop mehanizmu; glej sl. 13 (a). Pri  $25^\circ C$  poteka s hitrostjo  $361,9 \text{ nm} / \text{s}$ , kar je skoraj dvakrat hitreje od prenosa hidroksilnih anionov in sedemkrat hitreje od difuzije natrijevih kationov. Protoni sami skozi medij ne potujejo, ampak nihajo okoli ravnovesne lege in se enkrat pojavijo na enim, nato pa na drugem mestu (Agmon 1995). To poteka tako, da se med sosednjimi molekulami vode prekinjajo in ponovno vzpostavljajo kovalentne in vodikove vezi. Podoben hip-hop mehanizem so opazili tudi pri ionih  $\Gamma^-$  v tekočem jodu in  $Br^-$  ionih v tekočem bromidu, torej ga ne moremo pripisati edinstvenim lastnostim vode.

Prenos protonov skozi mrežo vodikovih vezi v vodi je dejansko počasnejši, kot bi predvidevali iz hip-hop mehanizma. Za nastanek hidronijevega iona ( $H_3O^+$ ), ki ima hidratacijsko število 3 in ne 4, kot ga ima nevtralna molekula  $H_2O$ , mora namreč mreža

vodikovih vezi spremeniti orientacijo. Ker se reorganizacija mreže opravi tik pred prihodom protona, je ta učinek Agmon (1995) poimenoval po Mojzesu; v mislih je imel razpolovitev Rdečega morja tik pred prihodom Mojzesa in Izraelcev. Molekulske simulacije (Day in sod. 2000) so Mojzesov učinek potrdile. Kornyshev in sodelavci (2003) pa so s primerjavo molekulske simulacije in eksperimentalnih podatkov ugotovili, da prenos protona z Mojzesovim učinkom poteka v obliki zundelovega kationa, kar zahteva sodelovanje in premestitev kar dveh ali treh protonov hkrati; glej sl. 13 (b-d).

Molekulske simulacije empiričnih valenčnih vezi (Lapid in sod. 2005) so pokazale, da je proces transporta protonov še bolj komplikiran. Eni protoni pri mehanizmu sodelujejo, medtem ko ga drugi ovirajo. V kristalni strukturi vode v trdnem stanju sta namreč dva orientacijska Bjerrumova defekta. L-defekt ( $\cdots\text{H}_2\text{O}\cdots\text{OH}_2\cdots$ ), ki izhaja iz nemške besede »*lehr*« oziroma prazen in označuje konfiguracije vodne molekule v ledu, kjer med sosednjima atomoma kisika ni protonov. D-defekt ( $\cdots\text{H-O-H}\cdots\text{H-O-H}\cdots$ ) pa se imenuje po nemški besedi »*doppelt*«, dvojen in označuje konfiguracije, kjer med sosednjima vodikoma ni kisika (Gosar 1980). Podobni defekti so torej prisotni tudi v protonskih mrežah in ovirajo difuzijo protonov.

Vendarle niso samo L in D-defekti tisti, ki vplivajo na transport protonov. Mezer in sodelavci (2005) so ugotovili, da protonski hip-hop mehanizem z zundelovimi kationi lahko premešča protone vzdolž površine proteinov skozi mrežo nepremičnih molekul hidratacijskega ovoja. Protone namreč zadržijo elektrostatične interakcije s Coulombovo kletko ( $\text{R}-\text{COO}^-\text{X}^+$ ) kislinskih ligandov na površini proteinov tako dolgo, dokler se ne vežejo na ustrezeno akceptorsko mesto. Podobno uravnavanje prenosa protonov s kislinskimi skupinami so pokazale tudi molekulske simulacije protonskega prenosa med dvema mestoma, oddaljenima za nekaj Å, na molekuli fluoresceina.

Encimska kataliza je mehanizem, pri katerem lahko nekateri proteini pospešijo kemijske reakcije za faktor  $10^{19}$  do  $10^{21}$  (Wolfenden in Snider 2001). Pri tem pa biokemijska in fizikalna osnova teh mehanizmov še vedno ni povsem poznana. Masgrau in sodelavci (2004) predvidevajo, da ima močan vpliv pri katalizi kvantno mehansko tuneliranje protonov. Proteinski substrat, ki neposredno sodeluje pri izgradnji hidratacijskega ovoja namreč ni toga matrica, ampak je spremenljiv (Wilson in sod. 1997, Daniel in sod. 1999) in močno povezan z dinamiko hidratacijske vode (Fenimore in sod. 2004). Z nevronskim sisanjem (Pagnotta in sod. 2009) so na površini hidratiranih proteinov potrdili, da so protoni pri sobni temperaturi delokalizirani in jih ne moremo povezati z nobeno od molekul vode ter z vsemi hkrati.

V vodi pa so poleg protonov delokalizirani tudi elektroni (Del Giudice in sod. 2009). Pod kritično temperaturo in nad kritično gostoto plinskih molekul vode namreč pride do faznega prehoda, pri katerem se pojavi koherentno stanje. Za koherentno stanje je značilen

skupni ritem nihanja vseh sestavnih delov znotraj območja, ki ga imenujemo »koherentna domena« (KD). Molekule vode v KD nihajo od osnovnega do vzbujenega stanja. V osnovnem stanju so elektroni močno vezani, v vzbujenem pa je energija molekul povečana na 12,06 elektronvoltov (eV). Ker je energija odcepitve elektrona oziroma ionizacije molekule vode 12,60 eV, potrebuje v vzbujenem stanju za sprostitev elektrona le malo energije, in sicer:  $12,60 - 12,06 = 0,54$  eV. Zato ima voda v koherentnem stanju veliko večjo tendenco, da sprošča elektrone kot v ne-koherentnem stanju. Medtem ko voda v ne-koherentnem stanju privlači elektrone in tvori  $\text{H}_2\text{O}^-$  ione, je energetska ovira, ki zadržuje elektrone znotraj KD tako majhna, da obstaja značilna verjetnost za kvantno tuneliranje. Prav to pa daje vodi posebne lastnosti glede na druga sorodna polarna topila z vodikovimi vezmi.

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 MATERIAL

Pri delu smo uporabili naslednje materiale (glej pregl. 1 do 3):

**Preglednica 1:** Uporabljene kemikalije.

**Table 1:** Used chemicals.

kemikalije	proizvajalec
natrijev hidrogen karbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) > 99,7 %	Sigma-Aldrich
kalijev klorid > 99,999 %	Merck
žveplova (VI) kislina ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )	Sigma-Aldrich
etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ), ≥ 99,0 %	Merck
vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), 30 %	Belinika
kalijev permanganat ( $\text{KMnO}_4$ ), > 99,8 %	Kemika
dimetilsulfoksid (DMSO), 99 %	Fluka
gojišče Luria-Bertani (LB)	Sigma-Aldrich
acetonitril	Aldrich
agar-agar	Biolife
N-(heksanoil)-L-homoserin lakton (HHL)	Sigma-Aldrich
N-(3-okso-heksanoil)-L-homoserin lakton (OHHL)	Sigma-Aldrich

**Preglednica 2:** Uporabljena voda.

**Table 2:** Used water.

voda	destiliranje	priprava
destilirana voda ( $\text{dH}_2\text{O}$ )	enkrat destilirana	Destilator DV8 Kambič Laboratorijska oprema.
Milli-q (Mq)	dvakrat destilirana in prefiltirana	Na Katedri za analizno kemijo FKKT Univerze v Ljubljani jo pridobivajo tako, da dvakrat destilirano vodo prefiltrirajo s polimernimi filtri Millipore brez uporabe žarkov.
trikrat destilirana voda ( $3x\text{-dH}_2\text{O}$ )	trikrat destilirana	Demineralizirano vodo destilirali v bidestilacijski napravi iz kvarčnega stekla (DESTAMAT Bil8E, Heraeus); produkt tretjič destilirali v zaprto posodo.

**Preglednica 3:** Strukture uporabljenih feromonov AHL.

**Table 3:** Structure of used pheromones AHL.

	kemijsko ime	kratica	topilo	<i>M</i>	$\rho$
				g/mol	mg/mL
$(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$	N-heksanoil-L-homoserin lakton	HHL	acetonitril	199,9	0,4
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COCH}_2$	N-(3-okso-heksanoil)-L-homoserin lakton	OHHL	$\text{dH}_2\text{O}$	213,2	1

Feromona smo hranili v zamrzovalniku Electrolux, model EU 6830 C pri -20 °C.

### 3.1.1 Čiščenje steklovine

**Preglednica 4:** Postopki čiščenja steklovine.

**Table 4:** Procedures of glass cleaning.

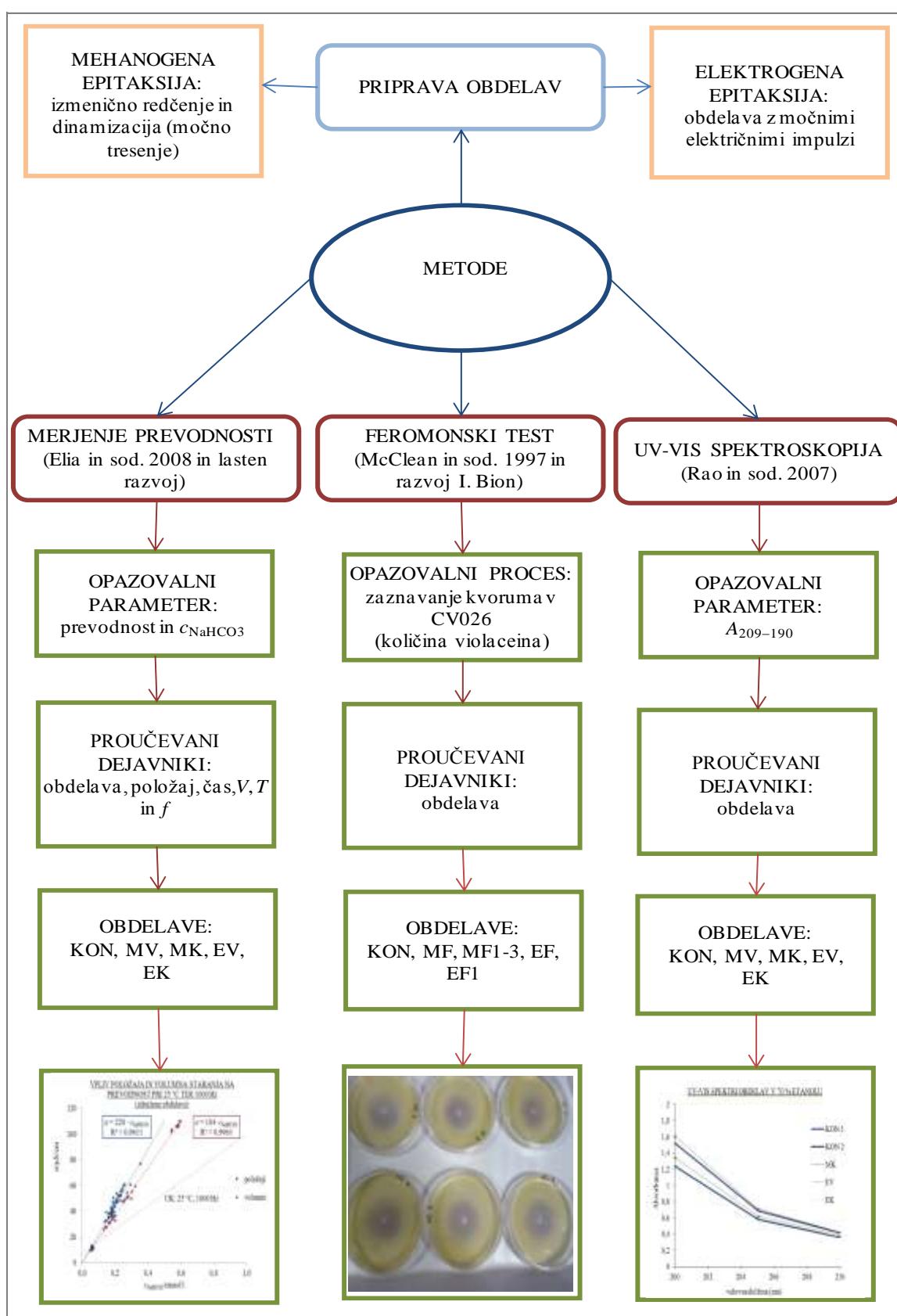
steklovina	postopek čiščenja
Laboratorijska steklovina pred prvo uporabo	Steklovino smo najprej dobro očistili z vodo iz pipe, nato notranje površine omočili z raztopino koncentrirane žveplove kisline ( $H_2SO_4$ ) in kalijevega permanganata ( $KMnO_4$ ) (ca. 0,5 g $KMnO_4$ v ca. 200 mL $H_2SO_4$ ) in počakali, da oksidira iz zelene v vijolično barvo. Po izlitju vsebine smo steklovino ponovno splagnili z vodo iz pipe, notranje površine omočili s 15 % $H_2O_2$ in počakali, da vsaj dve uri oksidira. Po ponovnem izlitju vsebine smo steklovino petkrat splagnili z $dH_2O$ in na koncu še trikrat z $Mq$ ozziroma 3x- $dH_2O$ ter pustili, da se posuši.
2- in 20-mL stekleničke za staranje	Uporabljali samo nove stekleničke, ki smo jih trikrat sprali z $dH_2O$ in dvakrat z $Mq$ ter sušili dve uri na 180 °C.
Steklovina, v kateri smo hranili epitaksično vtijsnjene »informacije«	Steklovino smo po spiranju za štiriindvajset ur namočili v 1 mol/L $H_2SO_4$ , ponovno sprali z vodo iz pipe, petkrat z $dH_2O$ in trikrat z $Mq$ ozziroma 3x- $dH_2O$ , nato pa dve uri sušili v sušilniku na 180 °C.
Steklovina (splošna uporaba za merjenje prevodnosti in UV-VIS spektroskopijo)	Steklovino smo petkrat sprali z $dH_2O$ in trikrat z $Mq$ ozziroma 3x- $dH_2O$ ter pustili, da se posuši.
steklovina (splošna uporaba za delo z bakterijami)	Steklovino smo petkrat sprali z $dH_2O$ ter pustili, da se posuši. Nato smo jo sterilizirali.

### 3.1.2 Sterilizacija raztopin, gojišč in steklovine

Gojišča in druge tekočine, ki smo jih uporabljali pri delu z bakterijami, smo sterilizirali v avtoklavu 3150 EL (Tuttnauer) 20 minut na 121 °C. Stekovino smo sterilizirali s suho toploto (2h, 180 °C) v sterilizatorju ST60 (Elektrotehnika LABO). Ves ostali material za gojenje bakterij pa smo predhodno sterilizirali 20 minut na 121 °C, nato pa 15 minut sušili. Delo z bakterijami smo opravili v mikrobiološki komori M 12 (Iskra PIO).

## 3.2 METODE

Metode, ki smo jih uporabili za merjenje vpliva molekulske »informacije«, so bile naslednje (glej sl. 14):



**Slika 14:** Shema metod, ki smo jih uporabili za merjenje vpliva molekulske »informacije«.

**Figure 14:** Scheme of methods used for measuring the influence of molecular »information«.

### 3.2.1 Mehanogena epitaksija

Obdelava raztopin z mehanogeno epitaksijo poteka s ponavljanjem dveh korakov – redčenja (stotinsko, »centesimalno«, ali desetinsko, »decimalno«) in dinamizacije. Proses dinamizacije poteka s sunkovitim ročnim oziroma mehanskim tresenjem raztopine. Raztopine smo dinamizirali s pomočjo 50 W in 0,2 A vibracijskega mešalnika Vibromix 10 (Tehtnica), ki smo ga za trideset sekund nastavili na maksimalno moč (3000 rpm, 50 Hz). Za centesimalno redčenje KCl je začetna točka 1 % masna raztopina KCl v 0,05 mM NaHCO<sub>3</sub>. Da pripravimo centesimalno redčenje KCl, 1 g KCl dodamo 99 g topila (izhodiščna raztopina) in dinamiziramo. Končna raztopina se imenuje KCl »1 centesimal hahnemannian« (Elia in sod. 2010) ali KCl 1cH. Da bi pripravili 2 centesimal hahnemanian (KCl 2cH), smo 1 g KCl 1cH dodali 99 g izhodiščne raztopine in dobljeno raztopino dinamizirali. Če pa želimo pripraviti KCl 10cH, moramo redčenje in dinamizacijo desetkrat ponoviti. Pri tem se koncentracija KCl ustavi pri minimalni vrednosti, ki je enaka koncentraciji KCl v izhodiščni raztopini. V primeru, ko redčimo organske snovi, ki običajno niso prisotne v vodi oziroma izhodiščni raztopini, pa je v 10cH koncentracija izvorne organske snovi (npr. feromona N-(3-okso-heksanoil)-L-homoserin laktona oziroma OHHL) razredčena za 10<sup>-20</sup>. Medtem ko je v KCl 10cH koncentracija izvorne snovi enaka kot v izhodiščni raztopini, je v OHHL 10cH prisotnih samo še približno 10<sup>3</sup> molekul.

Pri pripravi raztopin za merjenje prevodnosti smo kot izhodiščno raztopino uporabili 0,05 in 0,1 mmol/L NaHCO<sub>3</sub> zato, ker smo s tem preprečili večje napake zaradi raztopljanja CO<sub>2</sub> pri merjenju prevodnosti destilirane vode. Uporabili smo različno število redčenj in dve izvorni snovi. Zato smo te podatke navedli pri vsakem eksperimentu posebej. Po obdelavi smo raztopino natančno odmerili v vnaprej pripravljene stekleničke, jih izmerili prevodnost in / ali stekleničke pripravili na staranje.

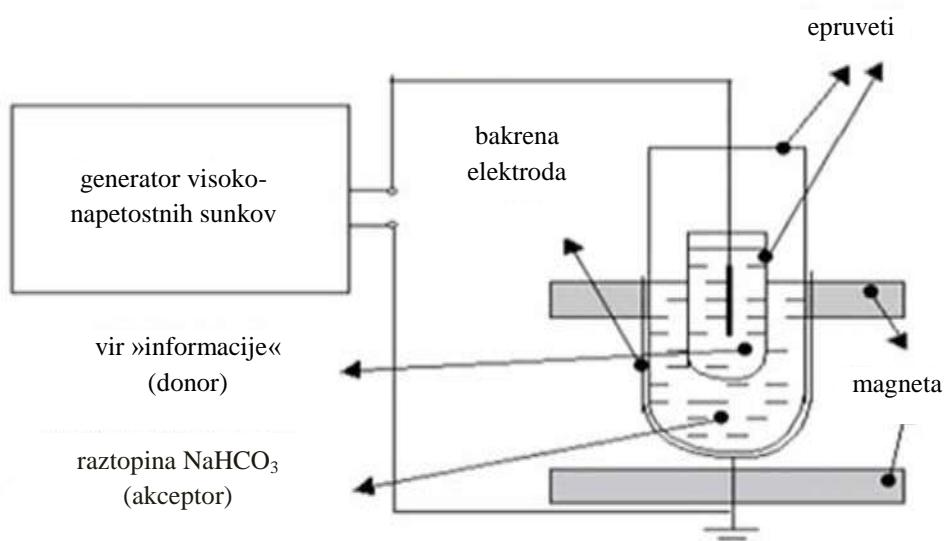
Ker se iz stekla, v katerem raztopine staramo, izločajo alkalijski oksidi, moramo poznati točno koncentracijo Na<sup>+</sup> v raztopinah. Natrijev oksid namreč reagira z vodo in ogljikovim dioksidom, ki se prav tako nahaja v raztopinah, v natrijev hidrogen karbonat po enačbi 1:



### 3.2.2 Elektrogena epitaksija

Metodo »informiranja« z elektrogeno epitaksijo so razvili na Inštitutu Bion in jo izvajamo s pomočjo naprave, imenovane Elibrator. S to napravo predvidevamo, da lahko katerokoli snov, ki je v tem primeru vir »informacije«, s pomočjo električne vtisnemo v raztopino, ki je prejemnik »informacije« (glej sl. 15).

Tokokrog Elibratorja smo imeli sestavljen na mizi in je bil vedno na istem mestu v isti sobi. Sklenjen tokokrog je povezovala osrednja komponenta, generator visoko napetostnih sunkov. Napetostni sunki so nastavljeni na 23.000 V s frekvenco 1,7 Hz. Generator ima priključek na 220 V omrežje in negativni ter pozitivni pol. Prvi pol generatorja je povezan z navadno bakreno žico, ki smo jo ozemljili. Drugi pol pa smo povezali s prirejeno bakreno elektrodo, ki ima na koncu 2 cm dolgo zlato žičko. Prirejena elektroda je oblikovana tako, da zlato žičko pomočimo v vsebino v 1,5-mL epruveti iz kremenčevega stekla (izhodna epruveta); vsebina pa je 1 mL raztopine vira »informacije« oziroma izhodne snovi. Nad in pod izhodno epruveto smo namestili dva stalna magneta s premerom 10 cm 400 mT, ki sta z ustvarjanjem nehomogenega magnetnega polja od 5 do 50 mT v izhodni epruveti predvidoma poskrbela za bolj učinkovito epitaksijo. Izhodna epruveta je bila vstavljena v sprejemno epruveto, v katero smo nalili ~ 70 mL izhodiščne raztopine, ki je »informacijo« predvidoma prejela. Epruveti smo nato vključili v tokokrog, s katerim smo predvidoma izpeljali elektrogeno epitaksijo. Pri tem smo pazili, da vsebini izhodne in sprejemne epruvete nista v nikakršnem fizičnem stiku, »povezani« sta zgolj in samo z močnim električnim poljem. Predvidevamo, da električno polje izhodne snovi spremeni električno polje, ki predvidoma vpliva na sprejemno raztopino tako, da se vanjo epitaksično vtrsnje »informacija« izhodne snovi.



**Slika 15:** Shema Elibratorja.  
**Figure 15:** Scheme of Elibrator.

Elektrogeno epitaksijo smo izvajali petindvajset minut, nato smo generator napetostnih sunkov ugasnili, sprejemno epruveto prekrili s para filmom in jo desetkrat ročno dinamizirali. V primeru, ko smo isto »informacijo« predvidoma epitaksično prenesli v več sprejemnih epruvet, smo vsebino vseh zlili v večjo bučko in jo dobro premešali. Z

elektrogeno epitaksijo predvidoma obdelano raztopino smo nato natančno odmerili v vnaprej pripravljene stekleničke.

Med pripravo raztopin, predvidoma obdelanih z elektrogeno epitaksijo, smo nosili zaščitne rokavice. Pred vsakokratnim »informiranjem« smo sobo, v kateri stoji elibrator, prezračili in očistili s petnajst minutnim epitaksičnim prenosom dH<sub>2</sub>O.

### 3.2.2.1 Priprava obdelav

Pri merjenju prevodnosti in UV-VIS spektroskopiji smo primerjali obdelave, navedene v preglednici 5. Kot izhodiščno raztopino smo pri merjenju prevodnosti uporabljali 0,05 oziroma 0,1 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>. Pri UV-VIS spektroskopiji pa smo uporabili še Mq, 95 % in 70 % etanol.

**Preglednica 5:** Obdelave, uporabljene pri merjenju prevodnosti in UV-VIS spektroskopiji.

**Table 5:** Treatments used for conductivity measurements and UV-VIS spectroscopy.

obdelava	donor »informacije«	kratica
brez obdelave - kontrola	/	KON
mehanogena epitaksija	voda	MV
	KCl	MK
elektrogena epitaksija	voda	EV
	KCl	EK

Pri feromonskem testu smo primerjali obdelave KON, MF in EG, navedene v preglednicah 14 in 15. Kot izhodni snovi oziroma donorja »informacije« smo uporabili feromona acil homoserin laktona, OHHL in HHL. Pri pripravi raztopin OHHL oziroma HHL, obdelanih z mehanogeno epitaksijo, smo kot izhodiščno raztopino, s katero smo redčili, uporabili sterilno gojišče LB z 20 g/L LB oziroma sterilno destilirano vodo. Kot osnovno raztopino pri elektrogeni epitaksiji pa smo uporabili destilirano vodo, ki smo ji po obdelavi dodali etanol. Tako pripravljeno 40 % raztopino etanola smo razredčili ena proti sto s sterilnim gojiščem LB oziroma dH<sub>2</sub>O ter dinamizirali. Tako smo dobili »informacijo« OHHL oziroma HHL (EF) v gojišču LB oziroma dH<sub>2</sub>O z 0,4 % etanola. 2 dH OHHL smo pripravili z dvakratnim redčenjem 1 : 10 izhodne raztopine OHHL in dvakratnim dinamiziranjem. OHHL 12cH pa smo pripravili z dvanajskratnim redčenjem 1 : 100 in dinamiziranjem ter vsebuje  $4,7 \cdot 10^{-15} \mu\text{mol/L}$  OHHL.

### 3.2.3 Merjenje prevodnosti

Elektrolitska prevodnost nam pove, kakšna je sposobnost raztopine, da prevaja električni tok. Pri natančnih meritvah je pomembno, da prevodnost merimo pri konstantni temperaturi, preprečimo polarizacijo na elektrodah in uporabljamo natančen električni aparat za merjenje prevodnosti. Tako zagotovimo, da na meritve pri konstantni temperaturi

vpliva le koncentracija, valenca in mobilnost ionov v raztopini, ki se nahaja med elektrodama. Večina vodnih raztopin ima pri 25 °C temperaturni koeficient prevodnosti 2 % / °C. Uporabo vode kot termostatske tekočine odsvetujejo zaradi neželenih kapacitivnih vplivov vzdolž celičnih sten. Jones in Josephs (1928) sta izračunala, da je razlika med upornostjo v z vodo in z oljem napolnjenim termostatom  $\pm 0,5\%$ . Napake na zapletene načine variirajo z geometrijo celice, prevodnostjo termostatske vode in upornostjo meritne celice. Večje so pri višjih frekvencah in pri večjih upornostih celice (oz. nižjih prevodnostih), kar kaže na to, da skozi celične stene in termostatsko vodo tečejo stranski električni tokovi. Napake se zmanjšajo, ko termostatski vodi povečamo prevodnost z dodatkom KCl (Robinson in Stokes 2002: 87-116 str.).

Pri merjenju prevodnosti merimo upornost med dvema elektrodama konstantnih oblik in velikosti. Upornost je odvisna od konstante celice ( $K$ ), od dimenzij ( $S$ ) in razdalj med elektrodama ( $d$ ),  $K = d / S [1/cm]$ . Zato je stalna praksa, da celico pred meritvami redno kalibriramo s pomočjo raztopine z znano specifično prevodnostjo. Polarizacijo na elektrodah preprečimo z uporabo izmeničnega toka in platiniziranjem elektrod, sistemom, ki ga je prvi preizkusil že Kohlrausch (1897). Kljub temu, da izmenični tok učinkovito prepreči elektrolizo, pa se zaradi kapacitativnih in induktivnih učinkov, ki se pri njem pojavijo, dodatno oteži izdelava naprave. Obliko in konstrukcijo visoko preciznih mostov izmenične napetosti, ki jih še danes uporabljam, so predvideli Grinnel Jones in sodelavci (na primer Jones in Bollinger 1929) ter Shedlovsky (1930). Baterijo enostavnega Wheatstonovega mostu so nadomestili s sinusoidnim izmeničnim potencialom iz oscilatorja, galvanometer pa z ustreznim detektorjem. Za preciznost meritev sta oscilator in detektor pomembni napravi, na meritve pa poleg teh pomembno vpliva tudi oblika celice. Objekt meritev mora biti zgolj idealna omska upornost raztopine med elektrodama. Če torej impedanca celice združuje samo to upornost, potem je enaka pri vseh frekvencah. V praksi pa to ni izvedljivo, saj več virov vpliva na celotno impedanco celice, ki se zato spreminja s frekvenco.

Nekaterim virom impedance se lahko izognemo s primerno obliko celice, drugim, ki so neločljivo povezani s procesi na elektrodah, pa se lahko delno izognemo s pravilno izbiro termostatske kopeli. Proses na elektrodah lahko zmanjšamo tudi s platiniziranjem elektrod (Kohlrausch 1897). Vendar pa moramo biti pazljivi pri delu z razredčenimi raztopinami, saj platina rada adsorbira topljence, zaradi česar prevodnost ni konstantna. Pri uporabi platiniziranih elektrod je priporočljivo, da prevodnost merimo pri več frekvencah in glede na to, kakšno frekvenčno odvisnost opazimo, ekstrapoliramo do neskončne frekvence (Robinson in Stokes 2002: 87-116 str.). Pri naših eksperimentih pa smo poskuse zasnovali tako, da smo med seboj primerjali prevodnosti pri 1000 Hz, podobno kot Elijeva raziskovalna skupina, in frekvenčne učinke pri 1000, 10 000 in 100 000 Hz ( $H_{1000}$ ,  $H_{10\,000}$ ,  $H_{100\,000}$ ). Frekvenčne učinke smo računali po podobni enačbi, kot sta jo za vodne raztopine

parafinskih soli uporabila Shirai in Tamamushi (1955), s tem da smo za osnovo primerjav nazornosti v prid izbrali frekvenco 120 Hz:

$$H_f = 100 (\sigma_f - \sigma_{120}) / \sigma_{120} \quad \dots(2)$$

Pri tem je  $\sigma_f$  prevodnost pri frekvenci  $f$  in  $\sigma_{120}$  prevodnost pri 120 Hz. Tako smo na primer frekvenčni učinek pri 1000 Hz računali po enačbi  $H_{1000} = 100 (\sigma_{1000} - \sigma_{120}) / \sigma_{120}$ .

Prevodnost raztopin smo merili s sistemom BFK (glej 3.3.2), pri nakupu katerega smo si pomagali s preliminarnimi eksperimenti na sistemu MBR (glej 3.3.1).

### 3.2.3.1 Komponente sistema za merjenje prevodnosti MBR

Komponente sistema Marije Bešter-Rogač (MBR), ki se nahaja na Katedri za fizikalno kemijo Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani, s katerim smo izvajali preliminarne eksperimente, so naslednje:

1. Natančni uporovni most (Leeds&Northrup), s katerim merimo upornost elektrolitskih raztopin pri frekvencah izmeničnega toka od 500 do 10 000 Hz, z natančnostjo 0,02 % pri 25 °C.
2. Hladna kopel Lauda WK1400 in natančni termostat Lauda UB40, ki omogočata meritve med 5 in 45 °C.
3. Temperaturo natančnega termostata nadzoruje natančni platinasti uporovni termometer Pt 100 (MPMI 1004/300 Merz), ki je zvezan na HP 3458A Multimeter in vsako temperaturo nastavi v roku 15 minut z natančnostjo 0,005 K. Kratko- in dolgoročna temperaturna nihanja so vsa pod 0,005 K (Bešter-Rogač in Habe 2006).
4. Set devetih kapilarnih celic za merjenje upornosti z naslednjimi konstantami:

**Preglednica 6:** Konstante kapilarnih celic sistema za merjenje prevodnosti MBR.

**Table 6:** Constants of capillary cells of the system for measuring conductivity MBR.

celica	konstanta (1/cm)
1. celica	22,706
2. celica	53,940
3. celica	33,194
4. celica	6,552
5. celica	3,2925
6. celica	72,726
7. celica	36,681
8. celica	83,748
9. celica	14,524

### 3.2.3.2 Komponente sistema za merjenje prevodnosti BFK

Komponente sistema za merjenje prevodnosti, ki je skupna investicija Inštituta Bion d.o.o. in Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani (BFK), pa so:

1. Merilec impedančne upornosti »Frequency passive components measuring instrument Stanford SR720 LCR Meter« s petimi frekvencami izmeničnega toka, 100, 120, 1000, 10 000 in 100 000 Hz, od Ronde&Schwartz.
2. Termostat VB13H, ki deluje v temperaturnem območju od 0 – 100 °C na  $\pm 0,1$  °C natančno, od Kambič Laboratorijska oprema.
3. Siva platinizirana dvopolna merilna celica Microsamples CDC749 za merjenje prevodnosti od 1 – 1000  $\mu\text{S}/\text{cm}$  od Radiometer Analytical s konstanto 1,66/cm.
4. Računalniški krmilni sistem, ki povezuje vse tri komponente, merilnik, merilno celico in termostat, z računalnikom, delo g. Dušana Habeta.
5. Pritrdilni sistem, ki omogoča konstantne pogoje pri vstavitevi merilne celice v 2,5- in 20-mL stekleničke.
6. 2,5-mL stekleničke iz prosojnega stekla dimenzijs 31 x 15 mm s pokrovčki iz umetnega materiala (neoLab) in 20-mL stekleničke (Wheaton); glej sl. 16.
7. Digitalni uporovni termometer, ki meri temperaturo na  $\pm 0,01$  °C natančno.



**Slika 16:** 2,5- in 20-mL steklenički.

**Figure 16:** 2,5- and 20-mL vials.

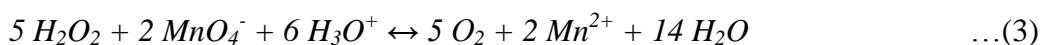
### 3.2.3.3 Kemijska analiza z ICP-MS

Koncentracijo natrija, kalija, magnezija, kalcija in srebra v staranih raztopinah natrijevega hidrogen karbonata smo določili z ICP-MS inštrumentom (Agilent 4500). ICP-MS je kratica za induktivno sklopljeno plazmo z masnim spektrometrom. Od dobljenih vrednosti smo odšteli povprečje slepih paralelk ( $M_q$ ,  $N = 6$ ). Umeritveno krivuljo smo določili z metodo standardnega dodatka ( $N = 10$ ). Mejo zaznave smo določili kot trikratno vrednost standardne deviacije slepih vzorcev ( $3s$ ,  $N = 6$ ) in je bila 0,001 mg/L za Mg ter 0,01 mg/L za Ca, Na in K.

### 3.2.3.4 Določitev vodikovega peroksida v staranih raztopinah

Koncentracijo  $\text{H}_2\text{O}_2$  v raztopinah, obdelanih z mehanogeno in elektrogeno epitaksijo, smo primerjali s koncentracijo v sveži  $M_q$ , ki nam je služila kot osnovno topilo pri pripravi raztopin. Postopek določitve je bil naslednji: Vsebino PR (v 2,5-mL stekleničkah) staranih

raztopin EV, EK in MV smo prelili v tri 50-mL merilne bučke (tri paralelke), jim dodali po 5 mL 1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in titrirali z 0,164 mmol/L standardno raztopino KMnO<sub>4</sub> do vijolične obarvanosti (glej enačbo 3).



Postopek smo ponovili s slepimi paralelkami (Mq, N = 3) ter izračunali povprečno porabo. Rezultate določitve smo podali v Prilogi B.

### 3.2.3.5 Potek dela

Najprej smo pripravili izhodiščno raztopino z določeno koncentracijo NaHCO<sub>3</sub> (0,05 mmol/L oziroma 0,1 mmol/L). Kot topilo smo uporabili Mq z manj kot 2 µS/cm. Vso laboratorijsko steklovino smo pred prvo uporabo očistili s H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Izhodiščno raztopino smo po pripravi razdelili na pet delov. Dva dela smo obdelali z mehanogeno, dva z elektrogeno epitaksijo, enega pa pustili neobdelanega (kontrola) in z njim ravnali enako kot z ostalimi. Nato smo raztopinam natančno odmerili po 2 mL v 2,5-mL oziroma po 2 mL, 5 mL in 10 mL v 20-mL stekleničke (glej sl. 16). Vsem petim obdelavam smo izmerili prevodnost in jih shranili na tri načine, PR, ST ter MD (glej pregl. 7). Raztopine so bile ves čas staranja tesno zaprte. Po določenem času smo raztopinam ponovno izmerili prevodnost. Ker stekleničke s časom izločajo nečistoče, smo sistematično analizirali vzorce z ICP-MS. Kemijsko analizo smo izvedli takoj po meritvah prevodnosti raztopin in pri tem zaradi majhnih volumnov staranja večinoma porabili vse vzorce. Nekaterim raztopinam smo določili vsebnost vodikovega peroksida (glej 3.3.4) in kalija, magnezija ter kalcija (glej pregl. B4).

**Preglednica 7:** Načini staranja raztopin NaHCO<sub>3</sub>.

**Table 7:** Types of ageing of NaHCO<sub>3</sub> solutions.

kratika	opis	vplivi
PR	prosto na polici v laboratoriju, nezaščiteno pred manjšimi tresljaji laboratorijskih aparatur	nihanja v temperaturi, svetloba, manjši tresljaji, rokovanje brez zaščitnih rokavic – po navodilih Elijeve raziskovalne skupine
ST	ovite v aluminijasto folijo in 2 mm plastično peno v škatli iz 8 cm stiropora v zaprti nepomični omari	manjša nihanja v temperaturi, zaščiteno pred svetlobo, brez tresljajev, rokovanje z zaščitnimi rokavicami
MD	ovite v aluminijasto folijo v zamrzovalniku pri -20 °C	zaščiteno pred svetlobo, rokovanje z zaščitnimi rokavicami

Potencialni dejavniki, ki bi lahko vplivali na meritev prevodnosti staranih raztopin in smo jih zaradi rezultatov analiz in izkušenj raziskovalne skupine Vittoria Elije (Elia in sod. 2008, 2010, Belon in sod. 2008) zanemarili, so bili:

1.  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$  in  $Ca^{2+}$ , ki se s časom glede na ICP-MS analize iz stekla izlužujejo v desetkrat manjših količinah kot  $Na^+$  (glej pregl. B4). Presežki prevodnosti so bili že pri samem upoštevanju natrijevih ionov v mnogih primerih negativni. ICP-MS analizo smo namreč zaradi destruktivnosti do vzorca izvedli šele po merjenju prevodnosti.
2.  $Ag^+$ , ki bi se lahko raztopljal iz žičke, ki smo jo uporabljali pri postopku elektrogene epitaksije, in je bil pod mejo detekcije ICP-MS analize.
3. Vodikov peroksid, ki po Voeikovu (2007) nastaja pri dinamizaciji in ga je bilo glede na titracijo s kalijevim permanganatom enako kot v topilu,  $Mq$  (glej pregl. B5).

Pri točki ena nismo navedli silicijevih ionov, ki se po novejših izkušnjah raziskovalne skupine Vittoria Elie (Elia in sod. 2008, 2010, Belon in sod. 2008) izlužujejo v tako minimalnih koncentracijah, stokrat manj kot  $Na^+$ , da jih lahko zanemarimo. Natrij se iz stekla izlužuje v obliki oksida,  $Na_2O$ , in s  $CO_2$  ter  $H_2O$  tvori  $NaHCO_3$ . Zato smo kemijski doprinos izmerjene prevodnosti ( $\sigma_{UK}$ ) izračunali s pomočjo umeritvenih krivulj z  $NaHCO_3$  pri 25 in 5 °C ter petih frekvencah merilnika BFK,  $\sigma_{UK} = k \cdot c_{NaHCO_3} + n$ .

Eksperimente smo razdelili na tri dele. Pri vseh smo prevodnost merili pri 25 °C, pri tretjem pa tudi pri 5 °C. V prvem delu smo primerjali ponovljivost staranja 2 mL raztopin. V drugem delu smo ugotavljali, kakšen je vpliv volumna staranja oziroma koeficiente stične površine z volumnom ( $S/V$ ) na prevodnost po staranju. V tretjem delu pa smo primerjali prevodnosti treh položajev staranja. Položaji staranja so se razlikovali po temperaturi, izpostavljenosti svetlobi in mehanskim vibracijam.

### 3.2.3.6 Preliminarna merjenja prevodnosti s sistemom MBR

Izhodiščno raztopino, 0,05 mmol/L  $NaHCO_3$ , smo obdelali z elektrogenu epitaksijo v EV in EK (glej pregl. 5). Kot topilo smo uporabili 3x-d $H_2O$ . Postopek elektrogene epitaksije smo izvajali dvajset minut. Kot izhodno snov (donor) za »informacijo« vode smo uporabili 3x-d $H_2O$ , za »informacijo« KCl pa nasičeno raztopino KCl. Raztopine smo po obdelavi shranili čez noč v 40-mL plastičnih epruvetah za centrifugiranje, zavitih v aluminijasto folijo in zaprtih v kartonski škatli. Najprej smo neobdelani izhodiščni raztopini (KON) izmerili prevodnost pri 25 °C z naslednjimi tremi kapilarnimi celicami: 22,7, 53,9 in 3,3/cm. Nato smo primerjali odvisnost prevodnosti od frekvence EV, EK in KON v merilnih celicah z različnimi konstantami pri 25 in 5 °C. EV smo merili v celicah z 22,7/cm in 53,9/cm, EK v 33,2/cm in 6,6/cm, KON pa v 3,3/cm.

### 3.2.3.7 Uvajanje sistema BFK

Meritve svežih in staranih vzorcev smo izvajali v 2,5-mL stekleničkah. Pri merjenju vpliva termostatske kopeli na prevodnost pri 10 000 in 100 000 Hz pa smo uporabili 20-mL stekleničke. Da bi zmanjšali zunanje vplive na prevodnost pri najvišjih dveh frekvencah

merilnika BFK, 10 000 in 100 000 Hz, smo dH<sub>2</sub>O v termostatu dodali NaCl ( $w_{\text{NaCl}} = 10\%$ ). Merilno celico smo pred meritvami redno kalibrirali. Ker smo opazili, da odčitek pri nekaterih meritvah zaradi uporabe platiniziranih elektrod in razredčenih raztopin ni bil konstanten, smo upoštevali povprečje desetih ponovitev meritev vzorca. Pri tem je morala biti RSE manjša od 1,6 % (glej primer v pregl. 8). Rezultate uvajanja sistema BFK smo podali v Prilogi B.

**Preglednica 8:** Primer desetih meritev prevodnosti 104 µmol/L NaHCO<sub>3</sub> pri 100, 120, 1000, 10 000 in 100 000 Hz ter 5 °C z opisno statistiko - povprečja (AVG), standardne deviacije (SD), standardne napake (SE) in relativne standardne napake (RSE).

**Table 8:** Example of ten conductivity measurements of 104 µmol/L NaHCO<sub>3</sub> at 100, 120, 1000, 10 000 and 100 000 Hz and 5 °C with descriptive statistics - averages (AVG), standard deviations (SD), standard errors (SE) and relative standard errors (RSE).

<i>f</i> (Hz)	100	120	1000	10 000	100 000
1. meritev $\sigma$ (µS/cm)	10,7	10,7	10,8	10,6	8,0
2. meritev $\sigma$ (µS/cm)	10,7	10,7	10,8	10,5	8,0
3. meritev $\sigma$ (µS/cm)	10,6	10,6	10,7	10,5	7,9
4. meritev $\sigma$ (µS/cm)	10,6	10,6	10,7	10,4	7,9
5. meritev $\sigma$ (µS/cm)	10,5	10,5	10,6	10,4	7,8
6. meritev $\sigma$ (µS/cm)	10,5	10,5	10,6	10,3	7,8
7. meritev $\sigma$ (µS/cm)	10,4	10,4	10,5	10,3	7,8
8. meritev $\sigma$ (µS/cm)	10,4	10,4	10,5	10,3	7,8
9. meritev $\sigma$ (µS/cm)	10,4	10,4	10,5	10,2	7,7
10. meritev $\sigma$ (µS/cm)	10,3	10,4	10,4	10,2	7,7
AVG (µS/cm)	10,5	10,5	10,6	10,4	7,8
SD (µS/cm)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
SE (µS/cm)	0,04	0,04	0,04	0,04	0,03
RSE (%)	0,41	0,37	0,41	0,41	0,42

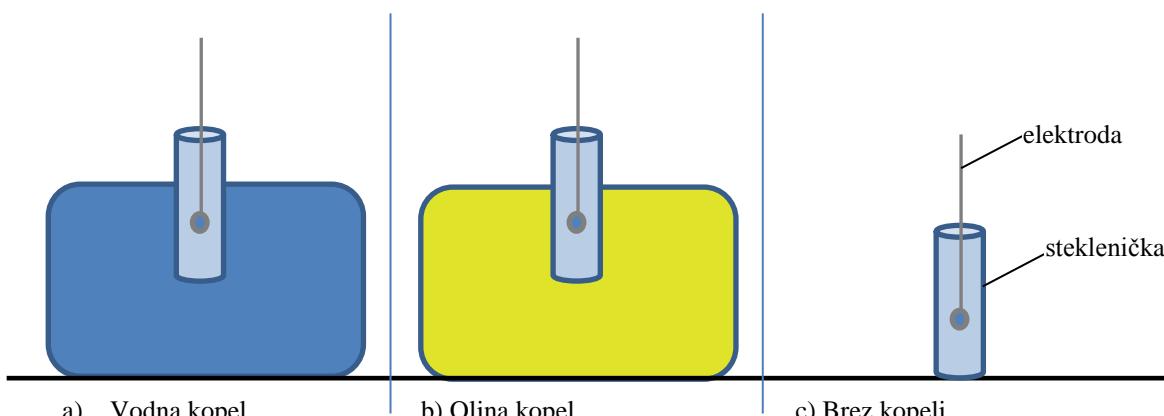
Pri meritvah brez termostatske kopeli smo za temperaturno korekcijo odstopanj od 25 °C uporabili temperaturni koeficient prevodnosti 2 % / °C. Pri tem smo meritve izvajali v klimatiziranem laboratoriju. Pred merjenjem prevodnosti vzorcev smo izmerili napako, ki nastane pri vsakokratnem vstavljanju merilne celice v stekleničke in pripravili umeritvene krivulje  $\sigma_{\text{UK}} = f(c_{\text{NaHCO}_3})$ . Če so se vzorci razlikovali v koncentraciji NaHCO<sub>3</sub>, smo za statistični izid upoštevali razmerja izmerjene s teoretično prevodnostjo v odstotkih ( $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$ ). Presežne prevodnosti,  $\sigma_p$ , so bili namreč v nekaterih primerih negativne. Iz  $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$  smo sklepali na presežke prevodnosti. Večji, kot so  $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$ , večji so presežki. Razmerje med izmerjeno in presežno prevodnostjo smo iz  $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$  izračunali na naslednji način:

$$\frac{\sigma}{\sigma_{\text{UK}}} = \sigma / (\sigma - \sigma_p) \quad \dots(4)$$

Če je na primer  $\sigma/\sigma_{\text{UK}} = 1,8 = \sigma / (\sigma - \sigma_p)$ , sledi, da je  $\sigma_p = 0,8 / 1,8 \sigma = 0,44 \sigma$ . To pomeni, da je 44 % izmerjene prevodnosti presežne.

Celico smo umerili s standardno raztopino 0,0002 M KCl, ki smo jo pripravili na naslednji način: KCl smo dve uri in pol sušili na 180 °C, nato čez noč ohladili v eksikatorju. 0,7545 g ohlajenega KCl smo raztopili v 1 litru Mq s specifično prevodnostjo pod 2  $\mu\text{S}/\text{cm}$  in razredčili 1 : 50. 0,0002 M KCl (N/5000) ima pri 20 °C prevodnost  $26,6 \pm 0,3 \mu\text{S}/\text{cm}$  (zapisnik ICUMSA 1966). Upoštevali smo meritev pri 1000 Hz. Napako, ki nastane pri vsakokratnem vstavljanju celice v stekleničke smo določili tako, da smo izmerili prevodnost desetih paralelk 0,5 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>. Vsako meritev smo ponovili desetkrat in pred vsakim merjenjem celico odstranili in ponovno vstavili v stekleničko. Izračunali smo SD, SE in RSE.

Da bi ugotovili, kakšen je vpliv termostatske kopeli na prevodnost pri višjih frekvencah, smo primerjali prevodnost pri 10 000 in 100 000 Hz treh sistemov, pri katerih se dielektrična konstanta snovi v neposrednem stiku z merilno stekleničko bistveno razlikuje. Kot termostatsko kopel smo pri prvem sistemu uporabili destilirano vodo z dielektrično konstanto  $\epsilon \sim 80$ , pri drugem jedilno olje z  $\epsilon \sim 2,5$  in pri tretjem zrak z  $\epsilon \sim 1$  (glej sl. 17). Frekvenčne učinke meritev prevodnosti smo primerjali s po tremi paralelkami 0,5 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, merjenimi v 20-mL stekleničkah.



**Slika 17:** Sistemi z različnimi dielektričnimi konstantami termostatske kopeli: a) vodna kopel z  $\epsilon \sim 80$ , b) oljna kopel z  $\epsilon \sim 2,5$  in c) brez termostatske kopeli z  $\epsilon \sim 1$ .

**Figure 17:** Systems with different dielectric constants of thermostat bath: a) water bath with  $\epsilon \sim 80$ , b) oil bath with  $\epsilon \sim 2,5$  and c) without thermostat bath with  $\epsilon \sim 1$ .

Umeritveno krivuljo prevodnosti raztopin NaHCO<sub>3</sub> smo pripravili v 2,5-mL stekleničkah z redčenjem 0,05 mol/L NaHCO<sub>3</sub> z Mq (glej pregl. 9).

**Preglednica 9:** Priprava raztopin za umeritveno krivuljo prevodnosti iz 0,05 mol/L NaHCO<sub>3</sub> in Mq.

**Table 9:** Preparation of solutions for conductivity calibration curve from 0,05 mol/L NaHCO<sub>3</sub> and Mq.

$V_{0,05 \text{ mol/L} \text{NaHCO}_3} (\text{mL})$	$V_{Mq} (\text{mL})$	$c_{\text{NaHCO}_3} (\text{mmol/L})$
0,48	19,52	1,2
0,40	19,60	1,0
0,32	19,68	0,8
0,24	19,76	0,6
0,20	19,80	0,5
0,16	19,84	0,4
0,12	19,88	0,3
0,08	19,92	0,2
0,04	19,90	0,1
0,02	19,98	0,05

Prevodnost pri 25 °C smo merili brez termostata (klimatiziran laboratorij), pri 5 °C pa v termostatski kopeli z 10 % aq. NaCl. Temperaturna nihanja pri merjenju brez termostata smo zaznali s termometrom za merjenje temperature zraka in vtičnim termometrom, ki smo ga vstavili v raztopino 2,5-mL stekleničke. Iz grafov odvisnosti prevodnosti od koncentracije NaHCO<sub>3</sub> smo dobili deset umeritvenih krivulj, pet pri 25 °C in 5 pri 5 °C.

### 3.2.3.8 Testiranje delovne hipoteze s sistemom BFK

Delovno hipotezo smo testirali v treh delih: ponovljivost staranja, vpliv volumna staranja in vpliv položaja staranja, obdelave, frekvence ter temperature. Upoštevali smo meritve pri štirih frekvencah merilnika: 120, 1000, 10 000 in 100 000 Hz, medtem ko smo meritve pri 100 Hz zanemarili, saj smo ugotovili, da se prevodnosti 68 raztopin tretjega dela eksperimentov (vpliv položaja staranja) pri 100 in 120 Hz med seboj ne razlikujejo ( $p = 1,000$ ). Vse prevodnosti smo merili v 2,5-mL stekleničkah. V prvem delu smo preverili, ali je prevodnost ob različnem času pripravljenih raztopin po enakem času staranja ponovljiva. Ponovljivost smo testirali s primerjavo prevodnosti pri 1000 Hz, ki je najbližje frekvenci merilnika, ki ga uporablja Elijeva raziskovalna skupina, in s primerjavo frekvenčnih učinkov pri 1000, 10 000 ter 100 000 Hz ( $H_{1000}$ ,  $H_{10\ 000}$  in  $H_{100\ 000}$ ). V drugem delu smo primerjali razmerja med izmerjeno in teoretično prevodnostjo ( $\sigma/\sigma_{UK}$ ) vzorcev, ki smo jih starali v različnih volumnih. Zanimala nas je primerjava  $\sigma/\sigma_{UK}$  pri 1000 Hz in primerjava frekvenčnih učinkov  $H_{1000}$ ,  $H_{10\ 000}$  ter  $H_{100\ 000}$ . Tretji del pa nam je povedal, kakšne so odvisnosti koeficientov  $\sigma/\sigma_{UK}$  od položaja staranja, obdelave (mehanogena oz. elektrogena), frekvence in temperature. Primerjali smo  $\sigma/\sigma_{UK}$  pri 120, 1000, 10 000 in 100 000 Hz ter 25 in 5 °C.

#### 1. Ponovljivost staranja

Ponovljivost staranih raztopin smo preverili z dvema ponovitvama priprave in staranja obdelav KON, MV, MK, EV ter EK (glej pregl. 10). Pripravi, ki smo ju poimenovali PR1 in PR2, smo starali v različnih časovnih intervalih po 310 dni. PR1 smo obdelali 20. 5. 2009 in ji izmerili prevodnost 1. 4. 2010. PR2 pa smo obdelali 2. 3. 2009 in ji izmerili

prevodnost 12. 1. 2010. Prevodnostim PR2 smo odšteli prevodnost sveže 0,05 mmol/L NaHCO<sub>3</sub> pri 25 °C, za kolikor je bila izhodiščna raztopina PR2 bolj koncentrirana kot PR1. Prevodnosti pri 1000 Hz smo primerjali z univariantno analizo (UA) in linearnim mešanim modelom (LMM). Frekvenčne učinke pri 1000, 10 000 in 100 000 Hz pa smo primerjali z LMM ter *Repeated measures ANOVA* (MPM); glej pregl. 11.

**Preglednica 10:** Ponovljivost staranja priprav PR1 in PR2 – opis obdelav KON, MV, MK, EV in EK s številom paralelk (N).

**Table 10:** Repeatability of ageing of preparations PR1 and PR2 – descriptions of treatments KON, MV, MK, EV and EK with numbers of parallels (N).

priprava	N (/)	obdelava
PR1	5	KON – neobdelana 0,05 mmol/L NaHCO <sub>3</sub>
	5	MV – 14cH, vir »informacije« Mq, dinamizacija z vibracijskim mešalnikom – enaka koncentracija Mq kot v izhodiščni raztopini
	7	MK – 14cH, vir »informacije« KCl (s), dinamizacija z vibracijskim mešalnikom – enaka koncentracija KCl kot v izhodiščni raztopini
	5	EV – vir »informacije« Mq, čas elektrogene epitaksije 25 minut – enaka koncentracija Mq kot v izhodiščni raztopini
	7	EK – vir »informacije« KCl (sat.), čas elektrogene epitaksije 25 minut – enaka koncentracija KCl kot v izhodiščni raztopini
PR2	7	KON – neobdelana 0,1 mmol/L NaHCO <sub>3</sub>
	5	MV – 12cH, vir »informacije« Mq, dinamizacija z vibracijskim mešalnikom – enaka koncentracija Mq kot v izhodiščni raztopini
	5	MK – 12cH, vir »informacije« KCl (s), dinamizacija z vibracijskim mešalnikom – enaka koncentracija KCl kot v izhodiščni raztopini
	5	EV – vir »informacije« Mq, čas elektrogene epitaksije 25 minut – enaka koncentracija Mq kot v izhodiščni raztopini
	5	EK – vir »informacije« KCl (sat.), čas elektrogene epitaksije 25 minut – enaka koncentracija KCl kot v izhodiščni raztopini

**Preglednica 11:** Ponovljivost staranja – statistični podatki.

**Table 11:** Repeatability of ageing – statistical data.

statistični dejavniki	prevodnost pri 1000 Hz	frekvenčni učinki
proučevani dejavniki	1. priprava (PR1, PR2) 2. obdelava (KON, MV, MK, EV, EK)	1. priprava (PR1, PR2) 2. obdelava (KON, MV, MK, EV, EK) 3. $f(1000, 10\ 000, 100\ 000\ Hz)$
interakcije med dejavniki	3. priprava*obdelava	4. priprava*obdelava 5. priprava*f 6. obdelava*f 7. priprava*obdelava*f
moteči dejavniki	različni začetni koncentraciji NaHCO <sub>3</sub> izhodiščnih raztopin	različni začetni koncentraciji NaHCO <sub>3</sub> izhodiščnih raztopin
poskusne enote	2,5-mL stekleničke z vzorcem	2,5-mL stekleničke z vzorcem
št. paralelk priprav	PR1 29, PR2 27	PR1 29, PR2 27

se nadaljuje

## nadaljevanje

**Preglednica 11:** Ponovljivost staranja – statistični podatki.

**Table 11:** Repeatability of ageing – statistical data.

izid poskusa	prevodnost $\sigma_{1000}$	$H$
porazdelitev	nenormalna	nenormalna
variance	homogene	homogene
potek statistične analize z UA	odvisna spremenljivka: $\sigma_{1000}$ , fiksni faktor: priprava, obdelava	/
potek statistične analize z LMM	subjekt: steklenička, odvisna spremenljivka: $\sigma_{1000}$ , faktor: priprava, obdelava; popolna faktorska analiza	subjekt: steklenička, ponavljajoča spremenljivka: $f$ , odvisna spremenljivka: $H$ , faktor: priprava, obdelava, $f$
potek statistične analize z MPM	/	<i>within-subject</i> spremenljivke: $H_{1000}, H_{10\,000}, H_{100\,000}$ , <i>between-subject</i> faktor: priprava, obdelava, model <i>full factorial</i>

## 2. Vpliv volumna staranja

Vpliv volumna staranja smo preverili s staranjem obdelav 370 dni na položaju PR v 10 mL, 5 mL in 2 mL volumnih v 20-mL stekleničkah. Izhodiščno raztopino, 0,05 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, smo obdelali z elektrogeno epitaksijo v EV in EK. Prevodnost smo merili pri 25 °C na zraku v 2,5-mL stekleničkah. Pred merjenjem smo vsebino iz 20-mL odpipetirali v čiste 2,5-mL stekleničke. Zaradi staranja v različnih volumnih, zaradi česar ni primerljivo izločanje natrijevih ionov iz stekla, smo med seboj primerjali koeficiente  $\sigma/\sigma_{UK}$ . Rezultate  $\sigma/\sigma_{UK}$  pri 1000 Hz smo statistično analizirali z UA, frekvenčne učinke  $H$  pri 1000, 10 000 in 100 000 Hz pa z LMM (glej pregl. 12) in z MPM. Statistična analiza z MPM (*within-subject* spremenljivke:  $H_{1000}, H_{10\,000}, H_{100\,000}$ , *between-subject* faktor: volumen, obdelava, frekvenca, *within-subject* faktor: frekvenca, model *full factorial*) zaradi nesferičnosti frekvenčnih učinkov nima enake statistične teže kot LMM.

**Preglednica 12:** Vpliv volumna staranja – statistični podatki.

**Table 12:** Influence of ageing volume – statistical data.

statistični dejavniki	UA	LMM
proučevani dejavniki	1. $V$ (2, 5, 10 mL) 2. obdelava (EV, EK)	1. $V$ (2, 5, 10 mL) 2. obdelava (EV, EK) 3. $f$ (1000, 10 000, 100 000 Hz)
interakcije med dejavniki	$V *obdelava$	1. $V *obdelava$ 2. $obdelava *f$ 3. $V *f$ 4. $V *obdelava *f$

se nadaljuje

## nadaljevanje

**Preglednica 12:** Vpliv volumna staranja – statistični podatki.

**Table 12:** Influence of ageing volume – statistical data.

moteči dejavniki	konzentracija $\text{NaHCO}_3$ odvisna od $V$ staranja prestavitev raztopin iz 20- v 2,5-mL stekleničke pred merjenjem prevodnosti	konzentracija $\text{NaHCO}_3$ odvisna od $V$ staranja prestavitev raztopin iz 20- v 2,5-mL stekleničke pred merjenjem prevodnosti
obdelave, št. paralelk	EV (2, 5, 10 mL), N [=] 13 (3, 5, 5) EK (2, 5, 10 mL), N [=] 15 (5, 5, 5)	EV (2, 5, 10 mL), N [=] 13 (3, 5, 5) EK (2, 5, 10 mL), N [=] 15 (5, 5, 5)
poskusne enote	28 stekleničk z vzorcem	28 stekleničk z vzorcem
izid poskusa	$\sigma/\sigma_{\text{UK}1000}$	$H$
porazdelitev rezultatov	normalna	nenormalna
variance	homogene	homogene
potek analize	odvisna spremenljivka: $\sigma/\sigma_{\text{UK}1000}$ , faktor: $V$ , obdelava	odvisna spremenljivka: $H$ <i>between-subject</i> faktor: $V$ , obdelava, $f$ <i>within-subject</i> spremenljivka: $f$ subjekt: steklenička <i>Repeated covariance Type</i> : nestrukturiran model <i>full factorial</i>

### 3. Vpliv položaja staranja, obdelave, frekvence in temperature

Vpliv položaja in obdelave na staranje smo preverili s staranjem petih obdelav, KON, MV, MK, EV in EK, na treh položajih, PR, ST in MD (glej pregl. 7). Izhodiščno raztopino, 0,05 mmol/L  $\text{NaHCO}_3$ , smo obdelali na enak način kot pripravo PR1 (glej pregl. 10). Obdelave in kontrolo smo razdelili v 2,5-mL stekleničke in jih starali na treh položajih. Obdelave so imele od tri do sedem paralelk pri vsakem izmed položajev staranja. Po 310 dnevih smo staranim raztopinam v istih stekleničkah, v katerih smo jih starali, izmerili prevodnost pri 25 °C na zraku in pri 5 °C v termostatski kopeli z 10 % NaCl (aq). Obdelave smo označevali s kraticami KON, MV, MK, EV in EK, ki smo jim v nekaterih primerih dodali kratice položajev. Tako smo kontrolo, starano PR, označili kot PRKON. Ker so frekvenčni učinki pri merjenju prevodnosti pri 10 000 in 100 000 Hz v termostatski kopeli spremenjeni zaradi kapacitivnih vplivov, smo celotno statistično analizo izvedli z  $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$ , pri katerih smo predpostavili, da smo z deljenjem moteče vplive izničili. Med seboj smo primerjali  $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$  pri 120, 1000, 10 000 in 100 000 Hz pri 25 in 5 °C (glej pregl. 13).

**Preglednica 13:** Vpliv položaja staranja, obdelave, frekvence in T – statistični podatki.

**Table 13:** Influence of ageing position, treatment, frequency and T – statistical data.

statistični dejavniki	LMM
proučevani dejavniki	1. položaj (PR, ST, MD), 2. obdelava (KON, MV, MK, EV, EK), 3. $T$ (25, 5 °C) 4. $f$ (120, 1000, 10 000, 100 000 Hz)
interakcije med dejavniki	1. položaj * obdelava 2. položaj * $f$ 3. obdelava * $f$ 4. položaj * obdelava * $f$ 5. položaj * $T$ 6. obdelava * $T$ 7. $f$ * $T$ 8. položaj * obdelava * $T$ 9. položaj * $f$ * $T$ 10. obdelava * $f$ * $T$ 11. položaj * obdelava * $f$ * $T$
moteči dejavniki	vpliv termostatske kopeli na prevodnost
obdelave, št. paralelk	PR (KON, MV, MK, EV, EK), N [/]=28 (5, 7, 7, 5, 5) ST (KON, MV, MK, EV, EK), N [/]=20 (3, 4, 4, 5, 4) MD (KON, MV, MK, EV, EK), N [/]=20 (3, 3, 5, 4, 5)
poskusne enote	68 stekleničk z 2 mL vzorca
izid poskusa	$\sigma/\sigma_{UK}$
porazdelitev	nenormalna
variance	nehomogene
LMM	odvisna spremenljivka: $\sigma/\sigma_{UK}$ , between-subject faktor: položaj, obdelava, $f$ , $T$ , within-subject spremenljivki: $f$ in $T$ , subjekt: steklenička, Repeated covariance Type: nestrukturiran, model full factorial

### 3.2.3.9 Uporabljeni statistični modeli

Statistično analizo smo izvedli s pomočjo programa SPSS 17.0. Kot statistično značilen rezultat smo upoštevali  $p < 0,05$ . Glede na porazdelitev rezultatov in naravo spremenljivk smo uporabili tri statistične analize: univariantno analizo (UA), pri kateri je pogoj, da so rezultati normalno porazdeljeni in imajo homogene variance, *Repeated measures ANOVA* (MPM), pri kateri morajo biti rezultati sferično porazdeljeni s homogenimi variancami, in linearni mešani model (LMM), ki nima omejitev. Pri vsakem eksperimentu smo navedli, katere teste smo uporabili, kako so rezultati porazdeljeni, število paralelk in kako smo jih analizirali.

### 3.2.4 UV-VIS spektroskopija

UV-VIS spektroskopijo uporabljamo za razpoznavanje delov molekul, ki jih imenujemo kromoforji in absorbirajo svetlobo iz UV-VIS dela elektromagnetevega spektra. Intenziteta

absorbirane svetlobe je definirana z Beer-Lambertovim zakonom,  $A = \log(I_0/I) = \varepsilon \cdot c \cdot d$ , kjer je  $A$  absorbanca,  $I_0$  intenziteta vpadnega žarka,  $I$  intenziteta žarka po prehodu skozi vzorec,  $\varepsilon$  molarna absorptivnost [ $\text{cm}^2/\text{mol}$ ],  $c$  koncentracija [ $\text{mol/L}$ ] in  $d$  dolžina potovanja žarka skozi vzorec [ $\text{cm}$ ]. Topilo bistveno vpliva na valovno dolžino ( $\lambda_{\max}$ ) in širino absorpcijskega maksimuma ter  $\varepsilon$ . Polarna hidroksilna topila (npr. etanol in voda), ki so prepredena s H-vezmi, imajo manj intenzivne in bolj razmazane trakove, ki so pomaknjeni k nižjim valovnim dolžinam, v primerjavi s trakovi v spektrih nepolarnih topil brez H-vezi. Kromofor v etanolu so nevezani elektroni na kisiku –OH skupine, ki absorbirajo svetlobo v območju od 240 do 205 nm, medtem ko ima voda  $\lambda_{\max}$  pri 190 nm (Milosavljević 1998, Cooper 1980).

Razlike med spektri raztopin, obdelanih z mehanogeno oziroma elektrogeno epitaksijo, in analognih neobdelanih raztopin smo opazovali s pomočjo UV-VIS spektrofotometra VARIAN, model Cary 50 z dvojnim žarkom, hitrostjo skeniranja 4800 nm/min in povprečnim časom skeniranja 0,0125 s. Pri meritvah smo uporabljali kvarčno kiveto širine 1 cm, v katero smo nalili minimalno 3 mL vzorca. Kot topilo smo uporabili Mq-vodo in etanol. Kot izhodni snovi pri epitaksiji pa KCl in Mq. Rezultate smo podali v Prilogi F.

### 3.2.5 Feromonski test s CV026

Zaznavanje celične gostote oziroma kvoruma temelji na interakciji signalne molekule (avtoinducenta) s transkripcijskim aktivatorskim proteinom, ki poveže sistem za izražanje genov z gostoto populacije. V gramnegativnih bakterijah so signalne molekule običajno N-acilhomoserin laktone, ki se med seboj razlikujejo v strukturi N-acilne verige (Fuqua in sod. 1996, Swift in sod. 1996, Fuqua in Greenberg 1998). Ta vrsta med-celičnega signaliziranja je posredovana z dvema družinama transkripcijskih regulatorjev, ki jih poznamo kot LuxI in LuxR. Homologi LuxI katalizirajo sintezo signalnih molekul, ki interagirajo z receptorskim proteinom LuxR. Ko se LuxR poveže s signalno molekuljo, aktivira oziroma zavre prepisovanje specifičnega tarčnega gena. Ker se signalne molekule nahajajo izven celic, interakcija signala z receptorjem celicam omogoča, da izražanje genov uravnava z gostoto populacije.

*Chromobacterium violaceum* je gramnegativna bakterija, ki proizvaja v vodi netopni vijolični pigment violacein. Če *C. violaceum* izpostavimo mini Tn5 transpozonski mutagenezi, dobimo bel mutant CV026, z dvema vključkom Tn5. Vključka transpozona se nahajata na mestu domnevnega represorja in na homologu LuxI (CviI) (Throup in sod. 1995). Zaradi tega ima CV026 okvarjeno proizvodnjo signalnih molekul, vendar pa kot odgovor na njihovo prisotnost v gojišču enako kot divji sev sintetizira pigment violacein. Zaznavanje kvoruma v CV026 sprožijo signalne molekule z dolžino N-acilne verige od C<sub>4</sub> do C<sub>8</sub>, z različnimi stopnjami občutljivosti (McClean in sod. 1997, Throup in sod. 1995).

Če CV026 gojimo na svetlem gojišču, kot je na primer gojišče Luria-Bertani (LB), zlahka kvalitativno ocenimo obarvanje bakterijske trate z violaceinom (McClean in sod. 1997, McLean in sod. 2004). S pomočjo ekstrakcije violaceina z organskimi topili in merjenjem absorpcije pri 585 nm pa lahko količino violaceina določimo tudi kvantitativno (Blosser in Gray 2000, Choo in sod. 2006).

Pri delu z bakterijami sem sodelovala z dr. Rokom Krašovcem in Lukom Janom.

### 3.2.5.1 Bakterijski sev

Kot indikatorski organizem smo uporabili bakterijski sev *C. violaceum* CV026, mini Tn5 mutant ATCC 31532, CviI: Tn5XylE, Km<sup>r</sup>, z okvarjeno sintezo molekul avtoinducentov - N-heksanoil-L-homoserin laktonov (Throup in sod. 1995). Dobili smo ga od American Type Culture Collection (Rockville, MD, ZDA). Sev smo preko noči namnožili v gojišču LB, nato pa trajne kulture pripravili na naslednji način: V mikrocentrifugirko smo k 700 µL z LB prečiščene prekonočne kulture CV026 dodali 150 µL 100 % glicerola in 150 µL svežega gojišča LB ter trajno kulturo shranili v globoko zamrzovalni omari pri -80 °C (New Brunswick Scientific, ZDA).

### 3.2.5.2 Gojenje CV026

Za gojenje bakterij smo indikatorske organizme CV026 gojili čez noč v Luria-Bertani (LB) gojišču (McClean in sod. 1997). Tekoče gojišče LB (Luria-Bertani) (20g/L) smo predhodno sterilizirali z avtoklavom Tuttnauer, model 3150 EL, 1,5 mL trajne kulture (-80 °C) smo odtalili in dvakrat prečistili v svežem gojišču LB z vmesnim centrifugiranjem (2 min na 6000 vrt./min) in odstranitvijo supernatanta. Nato smo 100 µL prečiščene trajne kulture vcepili v 9,9 mL sterilnega gojišča LB in inkubirali preko noči na inkubatorju stresalniku IS – 190 (Kambič) pri 30 °C ter 200 vrt./min 16 ur do optične gostote OD600 1,0 ali več. Po 16 urah smo prekonočno kulturo v nekaterih primerih izpostavili temperaturnemu stresu (od 0 do 48 ur pri 4 °C). Za inokulacijo gojišč smo uporabili suspenzijo bakterij, ki ustreza 10<sup>6</sup> bakterij/mL končne koncentracije. Pri delu smo uporabljali dva različna inkubatorja, Kambič IS – 190 in I-105 CK. Da bi se izognili napačnim zaključkom, ki bi bili posledica minimalnih razlik v rastnih pogojih, smo medseboj primerjali samo obravnavanja iz istega inkubatorja.

#### 1. Tekoča gojišča

Za pet 100-mL erlenmajeric smo predhodno sterilizirali 75 mL tekočega gojišča 2LB (40 g/L) in 75 mL dH<sub>2</sub>O. Pri tem smo MF in EF pripravili v sterilni dH<sub>2</sub>O. V primeru, ko smo kot izhodiščno raztopino za pripravo MF in EF uporabili sterilno gojišče LB, pa smo temu prilagodili razmerja med dodanimi sestavinami. V nekaterih primerih pa smo kot izhodiščno topilo uporabili gojišče LB. Pripravili smo pet erlenmajeric s 30 mL vsebine,

KON, MF2, EF1 in NK (glej pregl. 14). Vse obdelave razen NK so vsebovale 0,1  $\mu\text{mol/L}$  OHHL. Da bi dosegli čim boljšo preskrbo s kisikom, smo erlenmajerice stresali v inkubatorju stresalniku pri 25 °C in 150 vrt./min ter obarvanje z violaceinom spremljali tako, da smo jemali po 1 mL vsebine iz erlenmajeric vsako uro inkubacije in izmerili absorbanco pri 585 nm ( $A_{585}$ ). Kot standard pri merjenju absorbance smo uporabili mešanico 500  $\mu\text{l}$  dH<sub>2</sub>O in 500  $\mu\text{l}$  2LB. Čas od inkubacije do pričetka izločanja violaceina je bil približno 8 ur.

**Preglednica 14:** Primer priprave obdelav za gojenje CV026 v tekočih gojiščih.

**Table 14:** Example of treatments preparation for growing CV026 in liquid medium.

V	NK	KON	MF2	EF1
14,5 mL	2LB	2LB	2LB	2 LB
14,5 mL	dH <sub>2</sub> O	dH <sub>2</sub> O	MF v dH <sub>2</sub> O	EF v dH <sub>2</sub> O
650 $\mu\text{l}$	dH <sub>2</sub> O	OHHL	OHHL 2dH v dH <sub>2</sub> O	OHHL 2dH v dH <sub>2</sub> O
350 $\mu\text{l}$	PK	PK	PK	PK
N (/)	1	2	2	2
$c_{\text{OHHL}}$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	0	0,1	0,1	0,1
$c_{\text{LB}}$ (g/L)	20	20	20	20

## 2. Difuzijska metoda v jamicah z velikimi ploščami

Velike plošče (2r = 90 mm) za difuzijsko metodo v jamicah smo pripravili po postopku McCleana in sodelavcev (1997). Za 10 velikih plošč smo pripravili 100 mL trdnega agarja z 2 g LB in 1,5 g agarja ( $w_{\text{agar}} = 1,5\%$ ) ter 50 mL mehkega agarja z 1 g LB in 0,25 g agarja ( $w_{\text{agar}} = 0,5\%$ ). Tako pripravljena gojišča smo sterilizirali z avtoklavom. V sterilno ploščo smo razlili 10 mL trdnega agarja. Počakali smo približno pol ure, da se je agar strdil. Mehki agar (približno 45 °C) smo inokulirali s 50  $\mu\text{L}$  suspenzije bakterij / 5 mL gojišča, nato pa smo ga po 5 mL / ploščo razlili po že strjenem trdnem agarju. Ko se je ves agar strdil, smo v gojišče na plošči z obrnjenim pipetnim nastavkom (1 mL) izdolbli jamice s premerom približno 4 mm. V jamice smo odpipetirali po 50  $\mu\text{L}$  raztopine feromona OHHL oziroma HHL. Raztopine feromona so se razlikovale glede na koncentracijo in obdelavo z mehanogeno ter elektrogeno epitaksijo (glej pregl. 15). Pri tem se je končna koncentracija feromona, ko smo 50  $\mu\text{L}$  raztopine odpipetirali v jamice, razredčila s približno 15 mL gojišča LB na končno koncentracijo ~ 60 nmol/L. Plošče smo nato naključno razporedili po pladnjih, jih inkubirali na 30 °C ter opazovali obarvanje s pigmentom violaceinom (McLean in sod. 2004). Čas od inkubacije do pričetka izločanja violaceina je bil od 10 do 16 ur. Plošče smo slikali z digitalnim fotoaparatom Powershot G2 (Canon).

**Preglednica 15:** Priprave 50  $\mu\text{L}$  raztopine AHL za difuzijsko metodo v jamicah.

**Table 15:** Preparations of 50  $\mu\text{L}$  AHL solution for diffusion method in wells.

V	NK	KON	MF1	MF2	MF3	EF1
21 $\mu\text{L}$	LB	OHHL v LB	OHHL v LB	OHHL 2dH v LB	OHHL 2dH v LB	OHHL 2dH v LB

se nadaljuje

## nadaljevanje

**Preglednica 15:** Priprave 50 µL raztopine AHL za difuzijsko metodo v jamicah.

**Table 15:** Preparations of 50 µL AHL solution for diffusion method in wells.

14,5 µL	LB	2LB	2LB	2LB	2LB	2LB
14,5 µL	LB	dH <sub>2</sub> O	MF v dH <sub>2</sub> O	MF v dH <sub>2</sub> O	dH <sub>2</sub> O	EF v dH <sub>2</sub> O
<i>c</i> <sub>OHHL</sub> (µmol/L)	0	19	19	19	19	19
<i>c</i> <sub>LB</sub> (g/L)	20	20	20	20	20	20

### Legenda k preglednici 15:

MF = OHHL 12cH, v nekaterih primerih tudi OHHL 9dH in 12dH.

EF = z elektrogeno epitaksijo vtisnjena »informacija« OHHL oziroma HHL.

## 3. Male plošče

Da bi zmanjšali napako pri ekstrakciji, smo nekoliko prilagodili postopek McCleana in sodelavcev (1997) ter bakterije gojili na malih ploščah ( $2r = 35$  mm). Opustili smo kombinacijo trdnega in mehkega agarja. Pripravili smo 50 mL gojišča 2LB z agarjem ( $w_{agar} = 1,5\%$ ) ter 50 mL destilirane vode, ju sterilizirali z avtoklavom in počakali, da se ohladita na približno 45 °C. Nato smo po podobnem postopku kot za pripravo tekočih gojišč (glej pregl. 14) pripravili tri reagenčne stekleničke po 27 oziroma 30 mL, s tem da so na koncu vsebovale 0,75 % agarja in 20 g/L gojišča LB. Namesto OHHL smo uporabili feromon HHL s končno koncentracijo na ploščah 0,2 µmol/L. V posamezno sterilno plastično ploščo smo razlili 2 mL inokuliranega gojišča LB. Plošče smo nato naključno razporedili po pladnjih in jih inkubirali na 30 °C. Po inkubaciji smo opazovali proizvodnjo violaceina, ki se je kazala kot temno vijolično obarvanje bakterijske trate. Čas od inkubacije do pričetka izločanja violaceina je bil od 10 do 16 ur.

## 4. Male epruvete

Priprava v malih epruvetah ( $V = 10$  mL) je potekala podobno kot v malih ploščah, s tem da smo v posamezno epruveto odpipetirali 400 µL 0,75 % agarja z gojiščem LB in ustrezno količino bakterij ter feromona HHL. Kvantitativno določanje violaceina je potekalo na naslednji način: h gojiščem v malih epruvetah smo dolili 1 mL DMSO, 27 minut mešali z vibracijskim mešalnikom Vibromix 301 EVT (Tehnica) na maksimum, 10 minut centrifugirali pri 13 000 vrt./min in 100 µL čiste raztopine izmerili  $A_{585}$ .

### 3.2.5.3 Kvalitativno opazovanje obarvanosti bakterijske trate

Obarvanje z violaceinom smo ocenjevali kvalitativno po McLean in sodelavcih (2004) z ocenami od 1 - ni obarvanja, 2 – zelo šibko, 3 – šibko, 4 – srednje in 5 – močno. Pri tem so bile plošče označene tako, da ocenjevalec ves čas ocenjevanja ni vedel, katere obdelave ocenjuje (slepi test).

### 3.2.5.4 Kvantitativno določanje pigmenta violaceina

Gojišča na velikih ploščah smo izrezali s pomočjo ustja sterilne erlenmajerice ( $2r = 50$  mm) tako, da smo zajeli celotno obarvano bakterijsko trato, ki smo jo nato vstavili v 10 mL epruvete. Gojišča v malih ploščah pa smo v celoti vstavili v epruveto. Na razrezano gojišče v epruveti smo vlili 3 mL DMSO za velike, oziroma 2 mL za male plošče. Nato smo vsebino epruvete 30 sekund mešali s sterilno lopatico širine 5 mm, da bi dobili čim bolj homogeno suspenzijo. Tako dobljene suspenzije smo nato 15 minut mešali na velikem vibracijskem mešalniku Vibromix 301 EVT (Tehtnica) pri 750 vrt./min. Nato smo iz vsake epruvete v mikrocentrifugirke odpipetirali 750 mL suspenzije in 10 minut centrifugirali z univerzalno centrifugo Centric 150 (Tehtnica), nastavljeni na 13 000 vrt./min. Po končanem centrifugiranju smo odstranili supernatant, dodali 1000  $\mu$ L DMSO, premešali na malem vibracijskem mešalniku Vibromix 10 (Tehtnica), da se je vsebina enakomerno razporedila po mikrocentrifugirki in ponovno 10 minut centrifugirali. 100  $\mu$ L supernatanta smo prenesli v kiveto in izmerili absorbanco pri 585 nm, kot standard pa smo uporabili negativno kontrolo (NK), ki ni vsebovala violaceina (Blosser in Gray 2000, Choo in sod. 2006). Pri tem smo pazili, da je bil čas inkubacije pri vseh vzorcih enak, zato smo gojišča pred začetkom ekstrakcije postavili v hladilnik na 4 °C in tako ustavili proizvodnjo violaceina (Blosser in Gray 2000). Kvantitativno določanje violaceina v malih epruvetah smo opisali v tretji točki 3.5.2.2.

### 3.2.5.5 Testiranje delovne hipoteze

Z mehanogeno oziroma elektrogeno epitaksijo smo pripravili obdelave MF z 12cH, 12dH in 9dH, ki vsebujejo največ 1 nmol/L OHHL, kaj je manj od minimalne koncentracije feromona, 0,1  $\mu$ mol/L, ki jo bakterije še zaznajo (Ravn in sod. 2001), in EF, ki ne vsebuje izhodnega OHHL. Pripravili smo gojišča z difuzijsko metodo v jamicah. V vsako ploščo smo izdolbli dve jamici, na sredini je bila pozitivna kontrola (KON), ob robu pa ena izmed zgoraj navedenih obdelav. Prekonočno kulturo CV026 smo izpostavili štiriurnemu temperaturnemu stresu pri 4 °C. Izločanje violaceina smo spremljali kvalitativno po McLean in sodelavcih (2004).

Z mehanogeno oziroma elektrogeno epitaksijo smo pripravili obdelave MF1-3 in EF1, ki smo jim dodali enako koncentracijo feromona OHHL kot pozitivni kontroli (KON) s to razliko, da smo v obdelave vtisnili še »informacijo« feromona (glej pregl. 15). Pripravili smo gojišča z difuzijsko metodo v jamicah, v nekaterih primerih pa v tekočih gojiščih. Prekonočno kulturo CV026 smo izpostavili različnim časom temperaturnega stresa pri 4 °C. V enem primeru smo plošče zatesnili s parafilmom. Izločanje violaceina smo spremljali kvalitativno po McLean in sodelavcih (2004) ter kvantitativno z merjenjem  $A_{585}$ .

Ponovljivost priprave gojišča smo testirali tako, da smo z difuzijsko metodo v jamicah na velikih ploščah pripravili po 14 oziroma po 8 paralelk KON ter jim po 15 urah inkubacije pri 20 °C izmerili  $A_{585}$ . V malih ploščah pa smo petdesetkrat izmerili  $A_{585}$  6, 9 in 12 paralelkom KON.

Delovno hipotezo smo preverili še na malih ploščah in v malih epruvetah.

## 4 REZULTATI

### 4.1 MERJENJE PREVODNOSTI

Pred začetkom našega dela so Elija in sodelavci objavili zajetno bibliografijo, v kateri pišejo o presežnih prevodnostih raztopin, obdelanih z mehanogeno epitaksijo, glede na njihovo kemijsko sestavo; glej na primer Elia in sodelavci (2008). Presežke prevodnosti so pripisali vnosu kinetične energije pri dinamiziranju. Izmerili so jih, ko so raztopine nekaj časa stale. V člankih avtorji poročajo, da skupaj z raztopinami, obdelanimi z mehanogeno epitaksijo, neobdelanih raztopin niso starali. Zato nas je zanimalo, ali bomo tudi neobdelanim raztopinam in raztopinam, obdelanim z elektrogeno epitaksijo, izmerili presežno prevodnost.

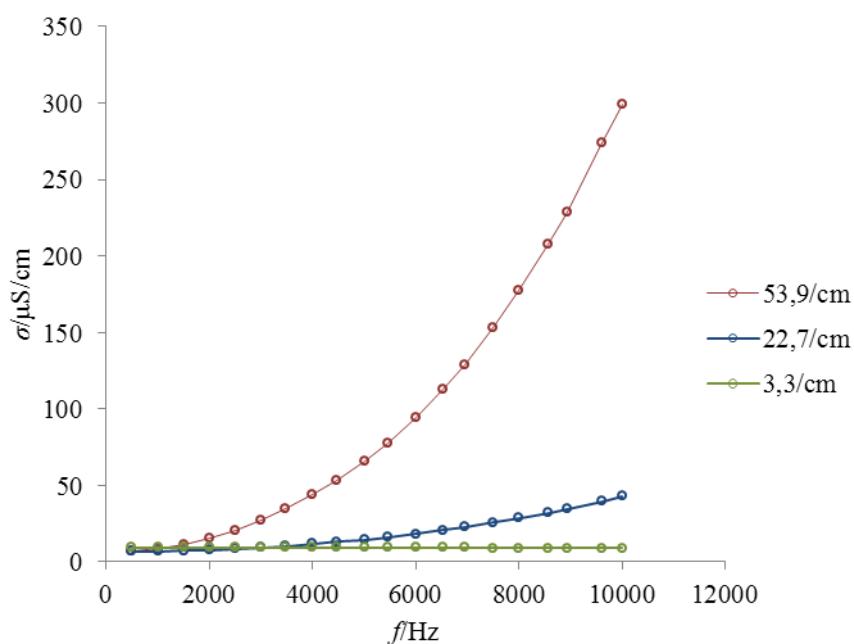
Najprej smo merili prevodnosti v odvisnosti od frekvence ter temperature z visoko natančnim sistemom za merjenje prevodnosti MBR. Na ta način smo ugotovili, na kaj moramo biti pozorni pri nakupu sistema za merjenje prevodnosti BFK, s pomočjo katerega smo testirali našo delovno hipotezo.

Rezultate smo razdelili na tri dele. V prvem delu smo ugotovili, kakšna je ponovljivost prevodnosti pri staranju in kakšen je vpliv obdelave na prevodnost, v drugem, kako vpliva volumen in v tretjem položaj staranja na presežke prevodnosti. Neobdelane rezultate in preglednice h grafikom smo podali v Prilogah A, C, D in E, v Prilogi B pa je celoten razvoj sistema BFK. Preglednice in slike v Prilogah smo označevali s črko Priloge in zaporedno številko. Prva preglednica v Prilogi A je preglednica A1 in prva preglednica v Prilogi B, preglednica B1.

#### 4.1.1 Preliminarna merjenja prevodnosti s sistemom MBR

Sistem za merjenje prevodnosti MBR vsebuje devet kapilarnih celic z različnimi konstantami (glej pregl. 6). Celice z višjimi konstantami so bolj primerne za koncentrirane raztopine, medtem ko so nižje konstante bolj natančne za merjenje prevodnosti razredčenih raztopin (Barthel in sod. 1979).

Preglednice z neobdelanimi rezultati in preglednice, ki spadajo k slikam te točke smo podali v Prilogi A. Da bi preverili vpliv geometrije celice na natančnost merjenja prevodnosti in odvisnost prevodnosti od frekvence, smo izmerili prevodnost neobdelane izhodiščne raztopine, 0,05 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, ki je služila za kontrolo (KON), v treh celicah z različnimi konstantami, 22,7, 53,9 in 3,3/cm (glej pregl. A1 in sl. 18).

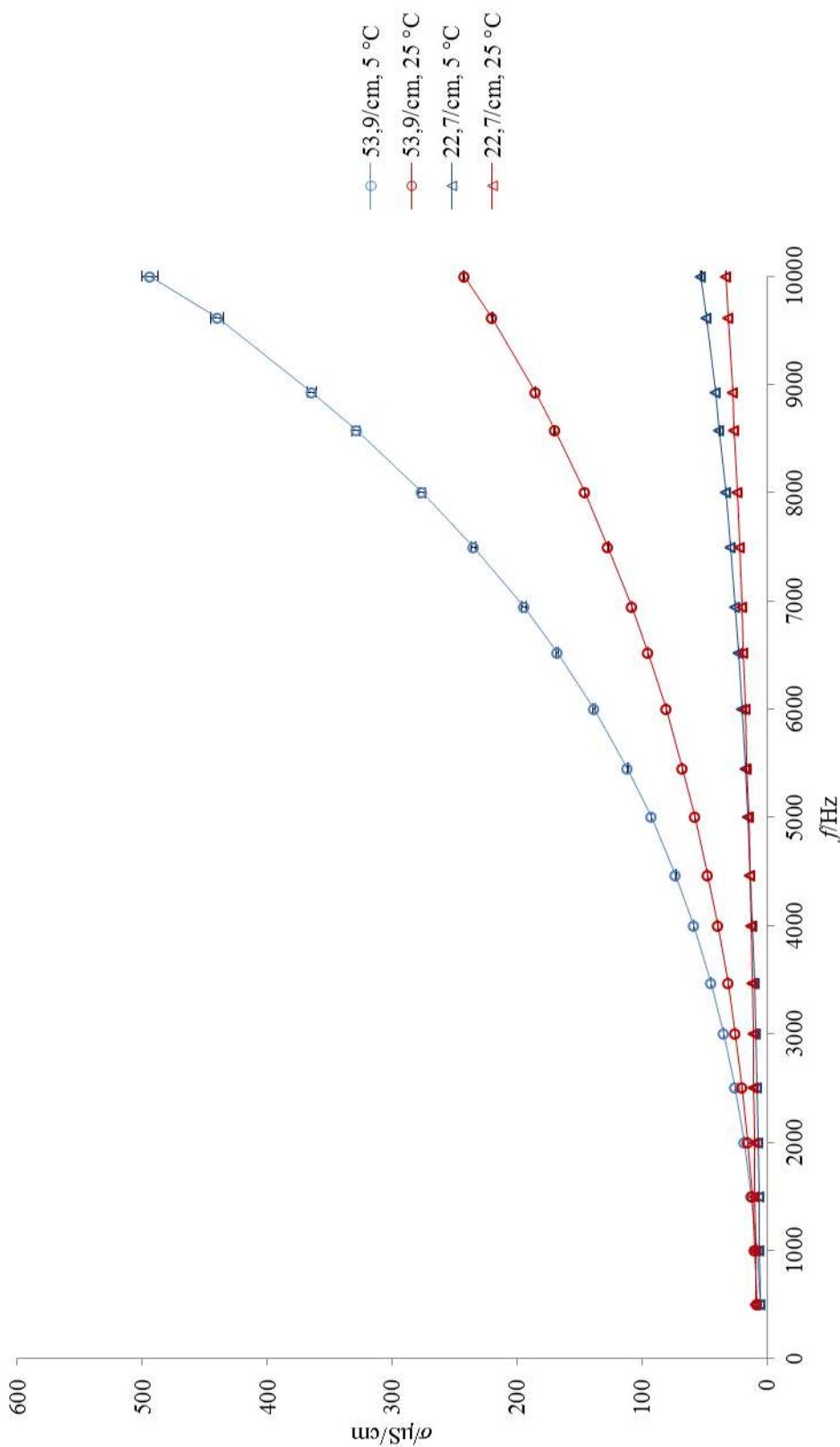


**Slika 18:** Prevodnost KON, 0,05 mmol/L NaHCO<sub>3</sub> pri 25 °C, merjene v celicah s konstantami 53,9/cm (rdeča), 22,7/cm (modra) in 3,3/cm (zelena).

**Figure 18:** Conductivity of KON, 0,05 mmol/L NaHCO<sub>3</sub> at 25 °C, measured in cells with constants 53,9/cm (red), 22,7/cm (blue) and 3,3/cm (green).

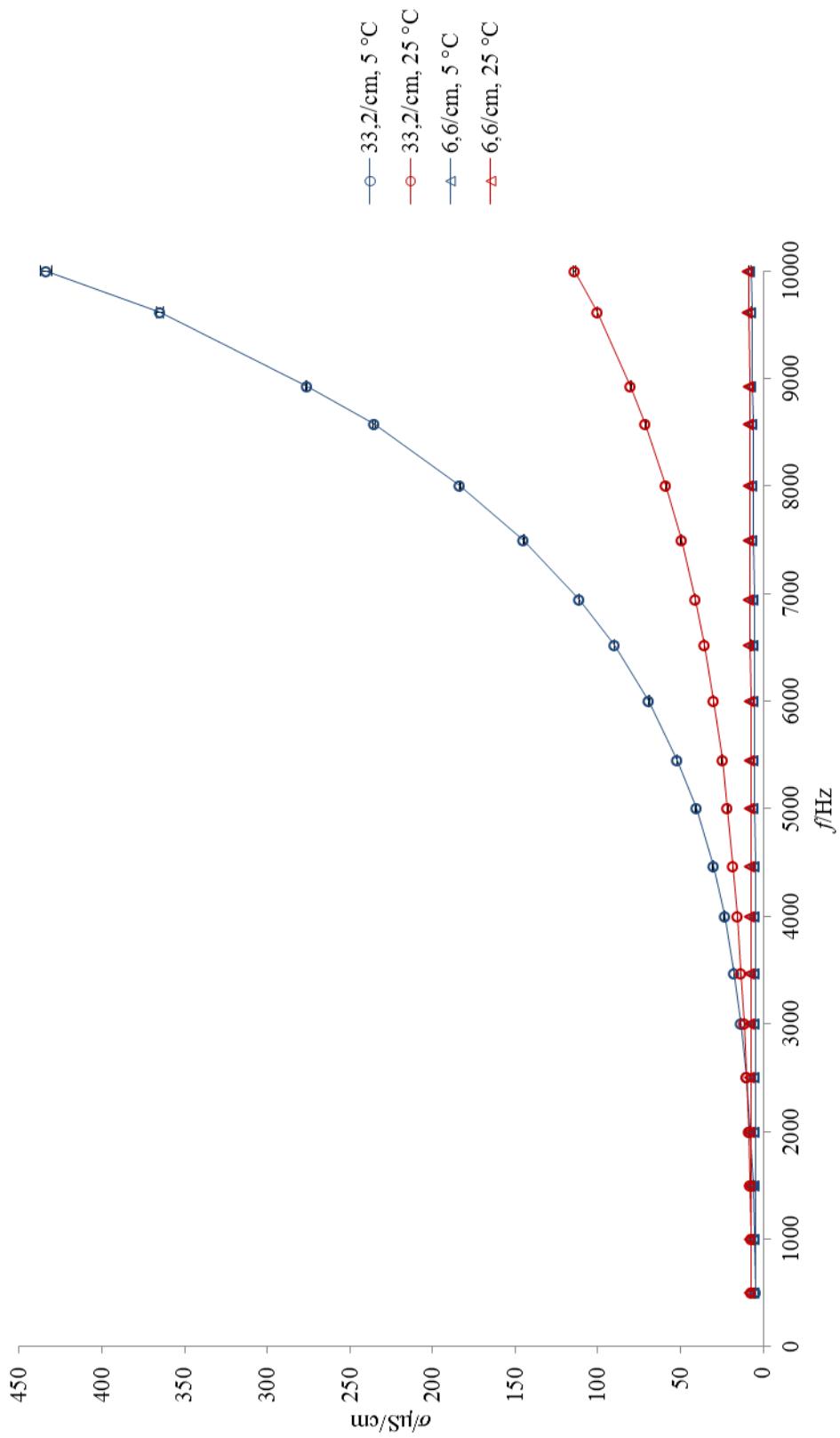
Pri 500 Hz je prevodnost KON v celici s 3,3/cm enaka 6,3, v celici z 22,7/cm je 6,6 in v celici s 53,9/cm je 6,8 μS/cm. Pri 500 Hz se prevodnost v celicah s 53,9/cm in 3,3/cm po enačbi  $x = 100 (\sigma_{53,9/\text{cm}} - \sigma_{3,3/\text{cm}}) / \sigma_{3,3/\text{cm}}$  razlikuje za 8 %. Medtem ko je prevodnost, merjena v celici s 3,3/cm skoraj povsem neovisna od frekvence, so razlike v celicah z višjima konstantama relativno velike. V celici s 3,3/cm je prevodnost pri 500 Hz 6,3 μS/cm in 10 000 Hz 6,5 μS/cm,  $x = 3,2\%$ . Medtem ko v celici z 22,7/cm prevodnost naraste s frekvenco za 5,5-krat, v celici s 53,9/cm pa za 43-krat.

Za nadaljnje meritve s sistemom MBR je bilo tako bistveno, da smo raztopine, ki smo jih žeeli primerjati, merili z isto kapilarno celico. Da bi zaznali morebitne razlike med EV, EK in KON, smo opazovali frekvenčne odvisnosti sveže pripravljenih raztopin pri dveh različnih temperaturah, 25 in 5 °C. Meritve pri 25 °C smo ponovili devetkrat, meritve pri 5 °C pa petkrat. Preglednice s povprečji devetih meritev pri 25 °C in petih meritev pri 5 °C, standardnimi napakami (SE) in relativnimi standardnimi napakami (RSE) smo predstavili v slikah 19 do 21 in preglednicah A2 do A6.



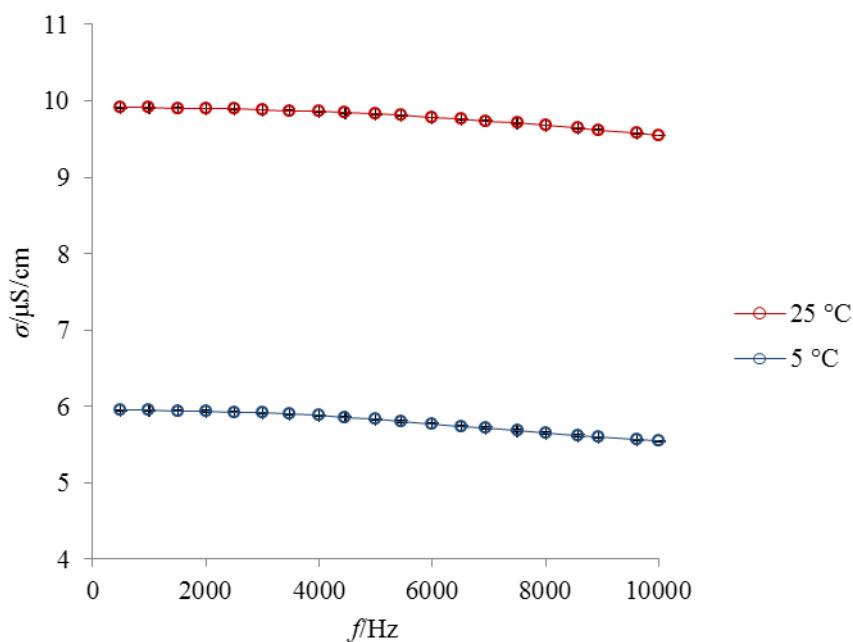
Slika 19: Prevodnost EV v odvisnosti od frekvence z intervali SE pri 25 (rdeča) in  $5^\circ\text{C}$  (modra) v celicah s konstantami  $22.7/\text{cm}$  in  $53.9/\text{cm}$  (○); Ni/[25 °C:  
9, 5 °C: 5].

**Figure 19:** Conductivity of EV in dependence of frequency with SE intervals at 25 (red) and  $5^\circ\text{C}$  (blue) in cells with  $22.7/\text{cm}$  and  $53.9/\text{cm}$  (○); Ni/[1 25 °C:  
9, 5 °C: 5].



**Slika 20:** Prevodnost EK v odvisnosti od frekvence z intervali SE pri 25 (rdeča) in 5 °C (modra) v celicah s 6,6/cm ( $\Delta$ ) in 33,2/cm ( $\circ$ ) in  $N[J] 25\text{ }^{\circ}\text{C}: 9, 5\text{ }^{\circ}\text{C}: 5, 9, 5\text{ }^{\circ}\text{C}: 5.$

**Figure 20:** Conductivity of EK in dependence of frequency with SE intervals at 25 (red) and 5 °C (blue) in cells with 6,6/cm ( $\Delta$ ) and 33,2/cm ( $\circ$ ) and  $N[J] 25\text{ }^{\circ}\text{C}: 9, 5\text{ }^{\circ}\text{C}: 5.$



**Slika 21:** Prevodnost KON v odvisnosti od frekvence z intervali SE pri 25 (rdeča) in 5 °C (modra) v celici s konstanto 3,3/cm; N[/] 25 °C: 9, 5 °C: 5. Začetek ordinate je pri 4  $\mu$ S/cm.

**Figure 21:** Conductivity of KON in dependence of frequency with SE intervals at 25 (red) and 5 °C (blue) in cell with constant 3,3/cm; N[/] 25 °C: 9, 5 °C: 5. Ordinate starts at 4  $\mu$ S/cm.

Iz krivulj v slikah 17 do 20 smo sklepali, da konstanta celice pomembno vpliva na merjenje prevodnosti razredčenih raztopin. Ne samo da vpliva na frekvenčno odvisnost prevodnosti, kot smo opazili pri merjenju prevodnosti kontrole (glej sl. 18) ampak tudi na relativne standardne napake. Največja RSE je v celici z najvišjo konstanto, 53,9/cm, in znaša pri devetih meritvah pri 25 °C 0,3 %, pri petih meritvah pri 5 °C pa 1,3 % (glej preg. A2 do A6). Kar pa je bistveno manj od razlik med prevodnostjo pri posameznih frekvencah pri 25 in 5 °C (glej sl. 19 do 21).

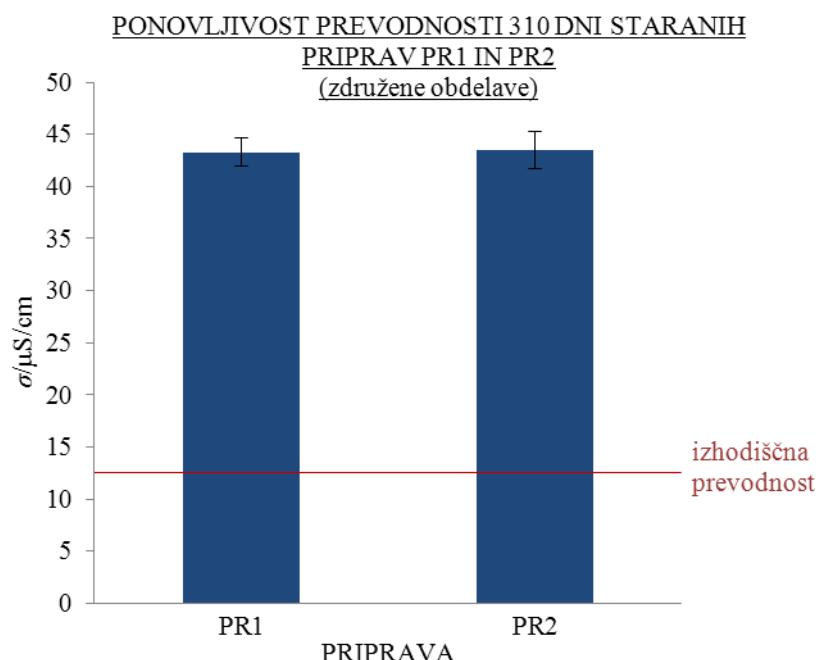
Iz preliminarnih meritev smo sklepali, kakšne morajo biti komponente sistema BFK, s katerim smo testirali delovno hipotezo.

#### 4.1.2 Sistem za merjenje prevodnosti BFK

Najprej smo sistemu BFK preverili natančnost, določili vpliv dielektrične konstante termostatske kopeli na merjenje prevodnosti pri 10 000 in 100 000 Hz, enačbe umeritvenih krivulj prevodnosti NaHCO<sub>3</sub> in frekvenčne učinke pri svežih raztopinah. Razvoj sistema BFK smo podali v Prilogi B. Ker se v nobenem primeru sveže pripravljene obdelave niso razlikovale od kontrol, smo upoštevali ugotovitve Elije in sodelavcev (2006, 2007) in obdelane raztopine starali. Delovno hipotezo doktorata smo testirali s pomočjo naslednjih treh eksperimentov: ponovljivost staranja, vpliv volumna staranja ter vpliv položaja staranja, obdelave, frekvence in temperature.

#### 4.1.2.1 Ponovljivost staranja

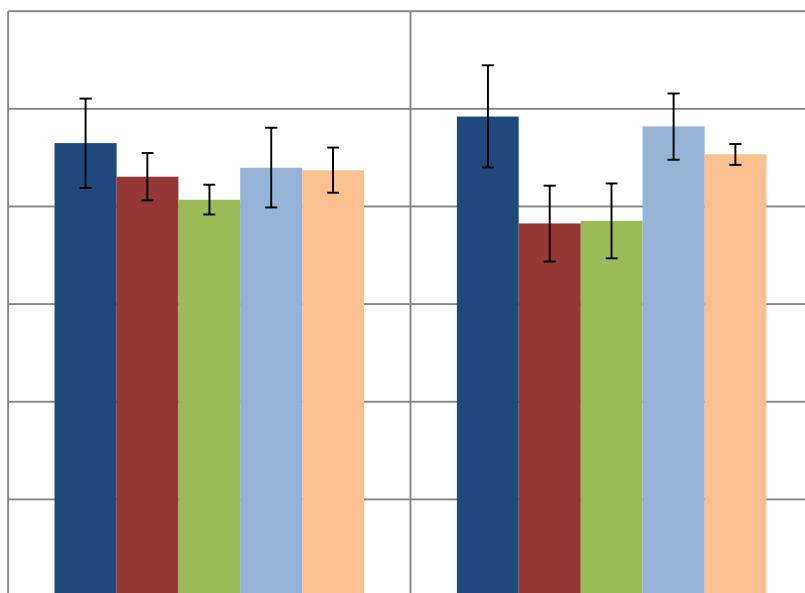
Primerjali smo izmerjeno prevodnost  $\sigma$  310 dni staranih obdelav KON, MV, MK, EV in EK priprav PR1 in PR2 (glej 3.3.9.1). Razmerje med stično površino s steklom in volumnom raztopin je bilo 3,9/cm. Prevodnosti smo merili v istih 2,5-mL stekleničkah, v katerih smo raztopine starali, pri 25 °C brez termostata v klimatiziranem laboratoriju. Temperaturo raztopin smo merili z vtičnim termometrom. Nihala je največ za ± 1 °C. Preglednice z rezultati smo podali v Prilogi C. V preglednicah C1 in C2 smo podali vse rezultate meritev prevodnosti. Raztopinam smo izmerili prevodnost takoj po pripravi in po 310 dneh (glej sl. 22 in pregl. C3). Na prevodnost obeh priprav pri 1000 Hz izmenično redčenje in mehansko tresenje ter močni električni impulzi nimajo bistvenega vpliva (glej sl. 23), zato smo pripravi prvi in 310. dan staranja predstavili z združenimi obdelavami.



**Slika 22:** Ponovljivost prevodnosti pri staranju PR1 in PR2.  $\sigma$  prvi (izhodiščna prevodnost) in 310. dan z intervali SE, merjena pri 25 °C in 1000 Hz, če združimo obdelave; N [/] PR1: 28, PR2: 27.

**Figure 22:** Repeatability of conductivity upon ageing of PR1 and PR2.  $\sigma$  the first (starting point conductivity) and 310<sup>th</sup> day with SE intervals, measured at 25 °C and 1000 Hz, if treatments are united; N [/] PR1: 28, PR2: 27.

$\sigma$  je po 310 dnevih staranja v PR1 in PR2 narasla za 3,5-krat (glej pregl. C3 in sl. 22). Stekleničke, v katerih smo starali pripravi PR1 in PR2 so iz stekla iste kakovosti in sestave. RSE koncentracij natrija po 310 dnevih staranja obeh priprav pa so 3 % (glej pregl. C4). Zato smo ponovljivost staranja PR1 in PR2 primerjali z izmerjenimi prevodnostmi  $\sigma$  (glej sl. 23 in pregl. C5).

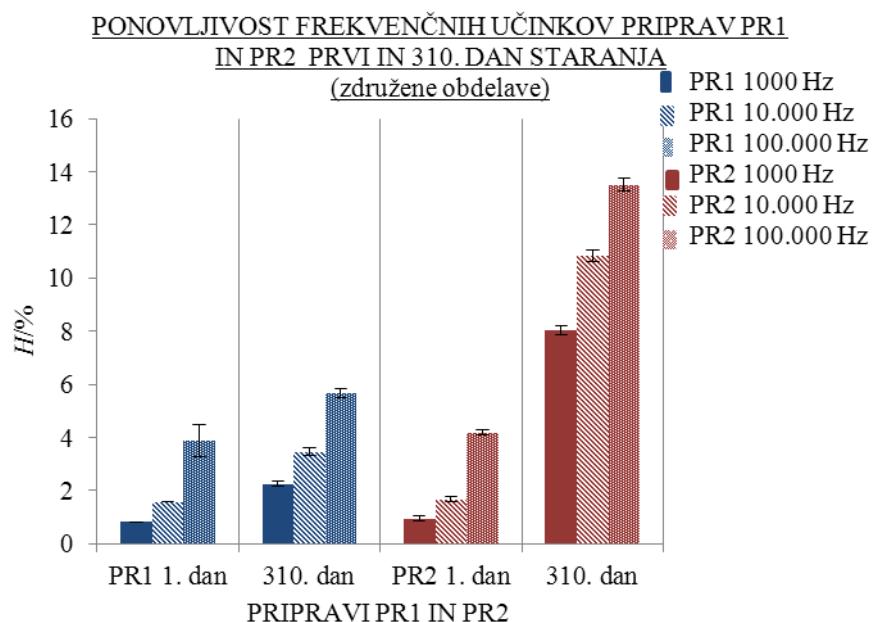


**Slika 23:** Ponovljivost prevodnosti 310 dni staranih KON (modra), MV (rdeča), MK (zelena), EV (svetlo modra) in EK (oranžna) priprav PR1 ter PR2 z intervali SE pri 25 °C in 1000 Hz; N [/] PR1: KON 5, MV 5, MK 7, EV 5, EK 7; PR2: KON 7, MV 5, MK 5, EV 5, EK 5.

**Figure 23:** Repeatability of conductivity after 310 days of ageing KON (blue), MV (red), MK (green), EV (light blue) and EK (orange) of preparations PR1 and PR2 with SE intervals at 25 °C and 1000 Hz; N [/] PR1: KON 5, MV 5, MK 7, EV 5, EK 7; PR2: KON 7, MV 5, MK 5, EV 5, EK 5.

Obdelava raztopin, če združimo obdelave obeh priprav, ne vpliva bistveno na izmerjene prevodnosti ( $\sigma$ ) pri 1000 Hz (glej sl. 23).  $\sigma$  pri 1000 Hz smo primerjali še s statistično analizo. Prevodnosti imajo glede na pripravo in glede na obdelavo homogene variance, nekatere obdelave pa so nenormalno porazdeljene (glej pregl. C5). Pripravi smo glede na  $\sigma$  obdelav primerjali z UA in LMM. Z obema analizama smo prišli do enakih rezultatov. Ker LMM ne pogojuje normalne porazdelitve, ima pri tem eksperimentu večjo statistično moč. Primerjava z LMM je pokazala, da so interakcije priprava\*obdelava neznačilne ( $p = 0,664$ ), prav tako neznačilno se razlikujeta pripravi ( $p = 0,887$ ) in obdelave ( $p = 0,078$ ); glej pregl. C6. Iz teh rezultatov lahko sklepamo, da so prevodnosti pri 1000 Hz ( $\sigma_{1000}$ ) staranih raztopin ponovljive.

Frekvenčne učinke prvi in 310. dan staranja priprave PR1 smo ponazorili v sliki 24 z združenimi obdelavami (glej pregl. C7). Frekvenčne učinke obdelav KON, MV, MK, EV in EK priprav PR1 in PR2 pa v sliki 25 (glej pregl. C8).



**Slika 24:** Ponovljivost frekvenčnih učinkov priprav PR1 (modra) in PR2 (rdeča) prvi in 310. dan staranja z intervali SE, če združimo obdelave.  $\sigma$  merjena pri 25 °C; N [/] PR1: 28, PR2: 27.

**Figure 24:** Repeatability of frequency effects of preparations PR1 (blue) and PR2 (red) the 1<sup>st</sup> and 310<sup>th</sup> day of ageing with SE intervals, if treatments are united.  $\sigma$  measured at 25 °C; N [/] PR1: 28, PR2: 27.

Frekvenčni učinki,  $H$ , so bistveno višji 310. dan staranja v primerjavi s prvim dnem. Frekvenčni učinki priprave PR2, če združimo obdelave, so pri vseh frekvencah bistveno višji kot pri PR1 (glej sl. 24 in pregl. C7). Frekvenčni učinki PR1 po 310 dneh staranja so pri 1000 Hz 2,2 %, 10 000 Hz 3,5 % in 100 000 Hz 5,7 %. Frekvenčni učinki PR2 pa pri 1000 Hz 8,0 %, pri 10 000 Hz 10,8 % in pri 100 000 Hz 13,5 %. Koncentracija NaHCO<sub>3</sub> po 310 dneh staranja obeh priprav je 0,2 mmol/L (glej pregl. C4). Medtem ko so frekvenčni učinki 310 dni starih PR1 enaki kot pri štirikrat bolj koncentrirani sveži raztopini NaHCO<sub>3</sub>, so frekvenčni učinki PR2 večji kot pri petkrat bolj koncentrirani sveži raztopini NaHCO<sub>3</sub>.

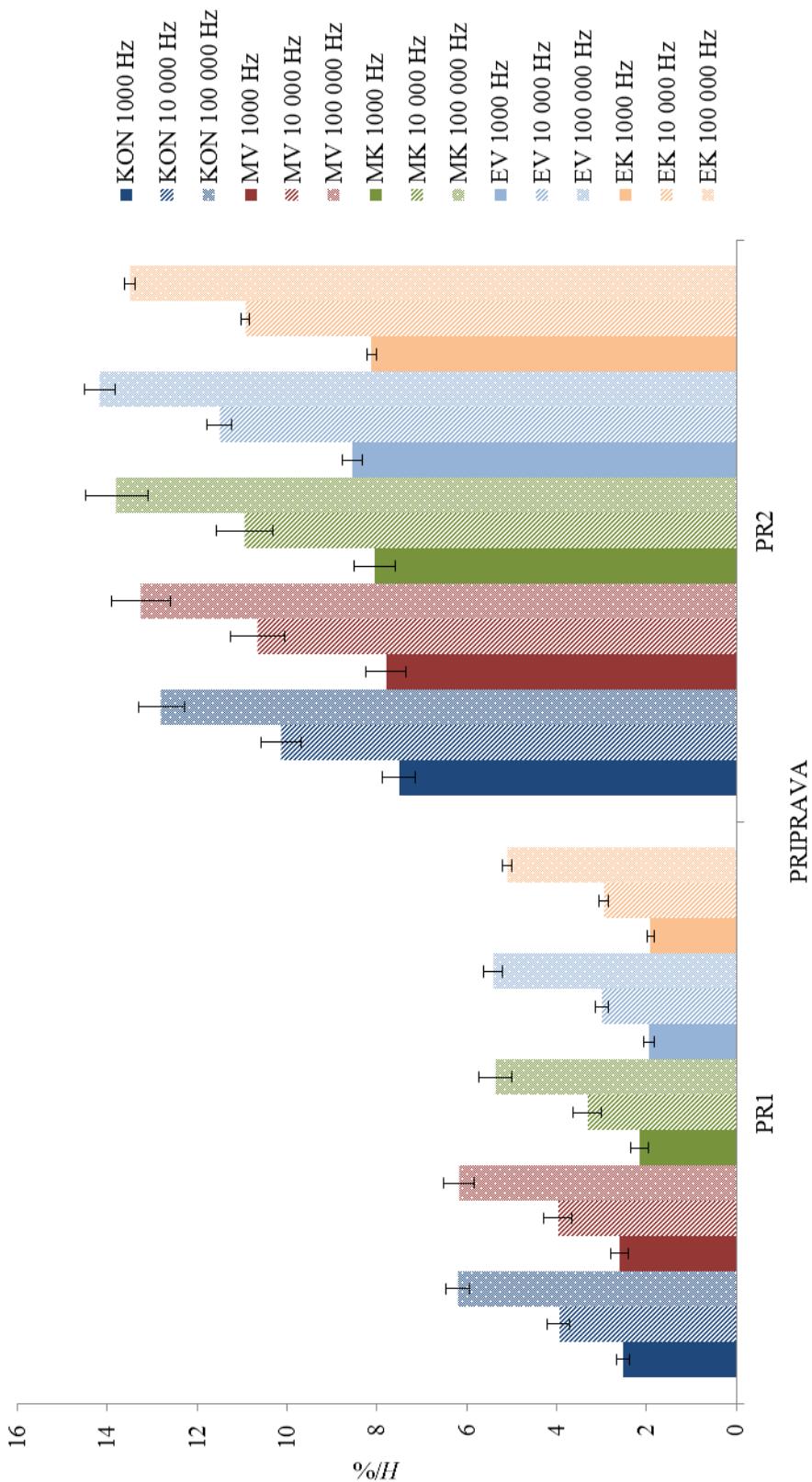
Frekvenčne učinke obdelav priprav PR1 in PR2 smo podali v sliki 25 in preglednici C8. Da bi ugotovili, ali se frekvenčni učinki obdelav priprav PR1 in PR2 med seboj razlikujejo, smo rezultate statistično analizirali z MPM in LMM (glej pregl. 11). Mauchlyjev test je pokazal, da frekvenčni učinki niso sferično porazdeljeni, zato smo pri analizi z MPM upoštevali Greenhouse-Geisserjev test, ki pa se je povsem skladal s testom, ko je predpostavljena sferičnost, Huynh-Feldt in Lower-bound testom ter z rezultati LMM. Rezultati statistične analize so naslednji:

1. Frekvenčni učinki priprave PR2 so značilno ( $p < 0,001$ ) višji od PR1.
2. Frekvenčni učinki obdelav so enaki ( $p = 0,897$ ).

3. Interakcija priprava\*obdelava ( $p = 0,057$ ) je neznačilna, kar pomeni, da so frekvenčni učinki vseh obdelav priprave PR1 značilno nižji kot frekvenčni učinki obdelav PR2.
4. Frekvenčni učinki značilno rastejo z večanjem frekvence ( $p < 0,001$ ).
5. Interakcija priprava\*frekvenca ( $p < 0,001$ ) je značilna, kar pomeni, da se frekvenčni učinki PR2 pri 10 000 in 100 000 Hz bolj strmo povečujejo glede na frekvenčne učinke pri 1000 Hz kot PR1 (glej sl. 24).
6. Interakcija obdelava\*frekvenca ( $p = 0,647$ ) je neznačilna, kar pomeni, da se  $H_{1000}$ ,  $H_{10\ 000}$  in  $H_{100\ 000}$  med obdelavami ne razlikujejo.

Na sliki 25 smo ponazorili frekvenčne učinke vseh obdelav pri 1000, 10 000 in 100 000 Hz.

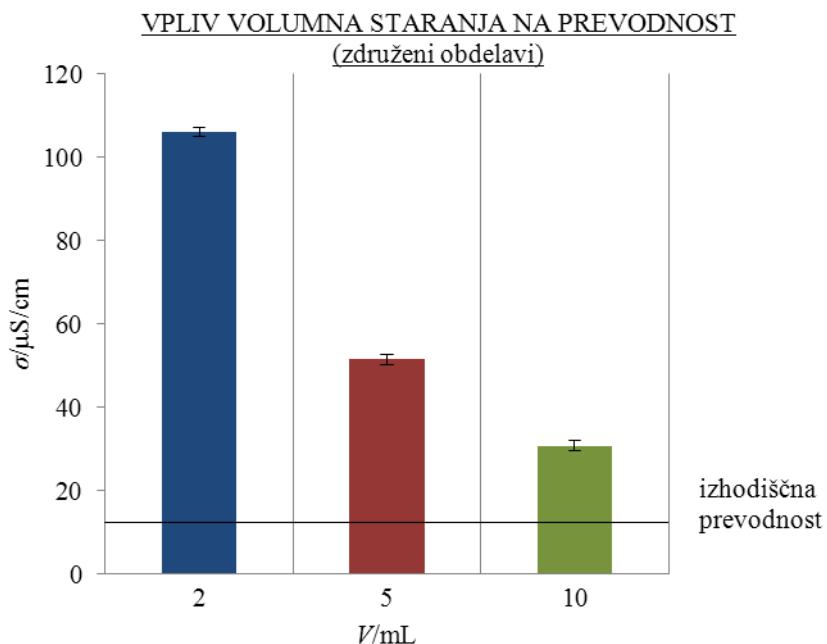
PONOVLJIVOST FREKVENČNIH UČINKOV OBDELAV PR1 IN PR2



**Slika 25:** Ponovljivost frekvenčnih učinkov pri staranju z intervali SE obdelav KON (rdeča), MV (modra), MK (zeleno), EV (svetlo modra), EK (oranžna) priprav PR1 in PR2 pri 25°C. PR1 in PR2 starane 310 dni; N [/] PR1: KON 5, MV 5, MK 7, EV 5, EK 7, PR2: KON 7, MV 5, MK 5, EV 5, EK 5.  
**Figure 25:** Repeatability of frequency effects upon ageing of treatments KON (red), MV (blue), MK (green), EV (light blue), EK (orange) of preparations PR1 and PR2 with SE intervals at 25°C. PR1 and PR2 aged for 310 days; N [/] PR1: KON 5, MV 5, MK 7, EV 5, EK 7, PR2: KON 7, MV 5, MK 5, EV 5, EK 5.

#### 4.1.2.2 Vpliv volumna staranja

Primerjali smo koeficiente izmerjene in teoretične prevodnosti,  $\sigma/\sigma_{UK}$ , pri 1000 Hz in frekvenčne učinke pri 1000, 10 000 in 100 000 Hz 370 dni na položaju PR staranih obdelav EV in EK v treh različnih volumnih 20-mL stekleničk (glej 3.3.9.2). Razmerje med stično površino s steklom in volumnom raztopin v 2 mL je bilo 4,0/cm, 5 mL 2,6/cm, 10 mL pa 2,1/cm. Prevodnosti smo merili v 2,5-mL stekleničkah pri 25 °C brez termostata v klimatiziranem laboratoriju, zato smo vsebine 20-mL stekleničk pred merjenjem prevodnosti odpipetirali v 2,5-mL stekleničke. Temperatura raztopin, ki smo jo merili z vtičnim termometrom, je nihala največ za ± 1 °C. Preglednice z rezultati smo podali v Prilogi D. V preglednici D1 smo zbrali vse rezultate  $\sigma/\sigma_{UK}$ ,  $c_{NaHCO_3}$  in frekvenčnih učinkov. Raztopinam smo izmerili prevodnost takoj po pripravi in po 370 dneh (glej sl. 26 in pregl. D2). Na prevodnost pri 1000 Hz bistveno vpliva predvsem volumen staranja, medtem ko se »informaciji« vode in KCl (EV in EK), preneseni z električnimi impulzi, med seboj ne razlikujeta. Iz tega razloga smo  $\sigma$  prvi in 370. dan staranja ponazorili z združenima obdelavama EV in EK.

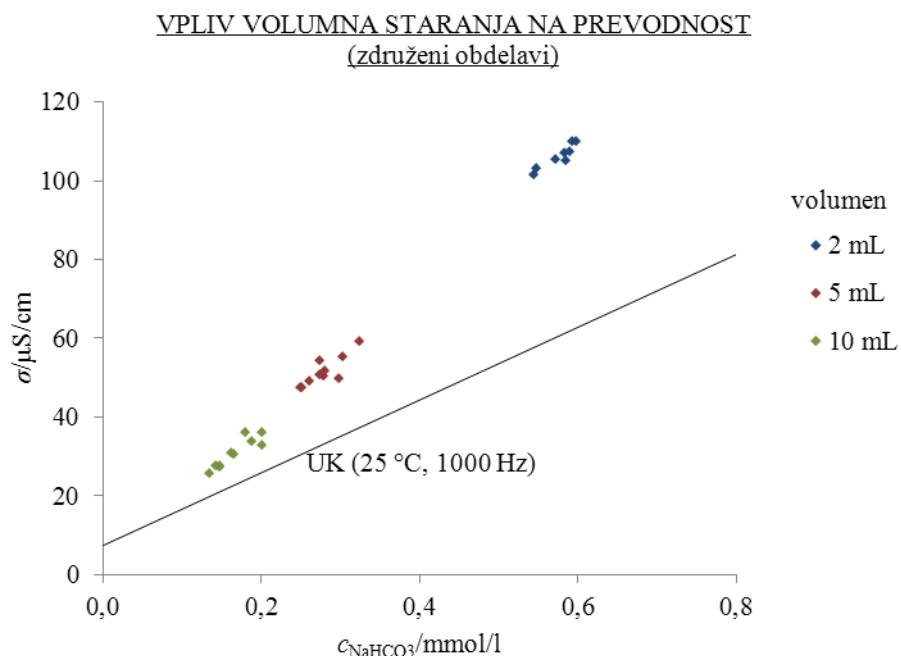


**Slika 26:** Vpliv volumna staranja na prevodnost 2 (modra), 5 (rdeča) in 10 mL (zelena) z intervali SE, če združimo obdelavi.  $\sigma$  merjena prvi (izhodiščna prevodnost) in 370. dan pri 25 °C in 1000 Hz; N [/] 2 mL: 8, 5 mL: 10, 10 mL: 10.

**Figure 26:** Influence of ageing volume on conductivity of 2 (blue), 5 (red) and 10 mL (green) with SE intervals, if treatments are united.  $\sigma$  measured the first (starting point conductivity) and 370<sup>th</sup> day at 25 °C and 1000 Hz; N [/] 2 mL: 8, 5 mL: 10, 10 mL: 10.

$\sigma$  je po 370 dnevih v 2 mL narasla za 8,5-krat, v 5 mL za 4,1-krat, v 10 mL pa za 2,5-krat (glej sl. 26 in pregl. D2). Vendar  $\sigma$  med volumni staranju ni smiselno primerjati zaradi

razlik v razmerju med stično površino s stekлом in volumnom,  $S/V$ . Večja, kot je  $S/V$ , večja je koncentracija natrija, ki se je s časom izlužil v raztopino. Naslednja slika je zato bolj nazorna, saj poleg  $\sigma$  upošteva tudi izmerjeno koncentracijo  $\text{NaHCO}_3$  (glej sl. 27).

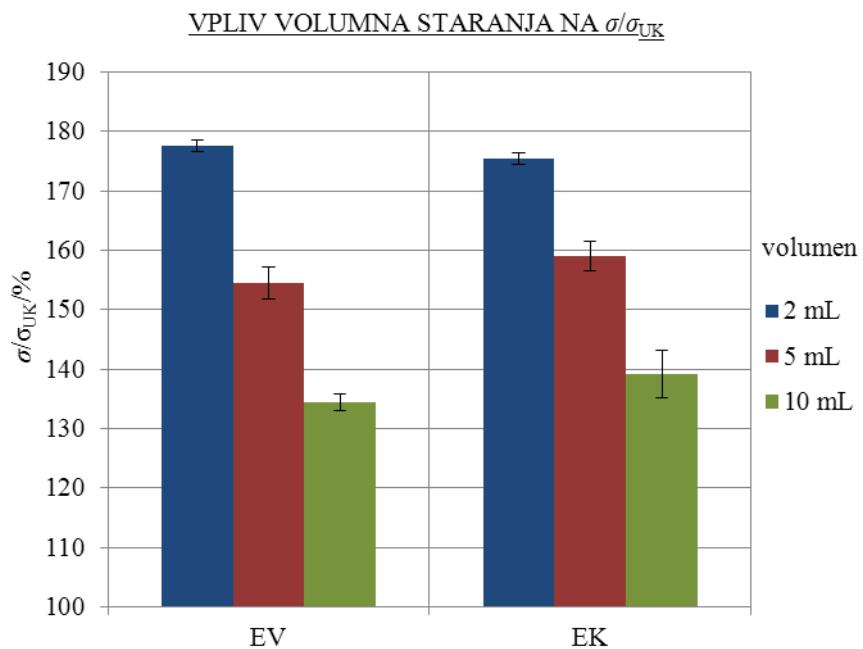


**Slika 27:** Prevodnost svežih (UK) in v 2 (modra), 5 (rdeča) ter 10 mL (zelena) staranih raztopin  $\text{NaHCO}_3$  v odvisnosti od koncentracije  $\text{NaHCO}_3$ ; obdelavi EV in EK sta združeni. Prevodnost nad UK je presežna.

**Figure 27:** Conductivity of fresh (UK) and in 2 (blue), 5 (red) and 10 mL (green) aged  $\text{NaHCO}_3$  solutions in dependence of  $\text{NaHCO}_3$  concentration; treatments EV and EK are united. Conductivity above CC is excess.

Slika 27 nam pove, kaj pomenijo  $\sigma$  staranih raztopin v odnosu do koncentracije natrija, ki smo jo določili z ICP-MS. Če narišemo vzporednico z absciso, ki teče od poljubne točke na grafu do UK, lahko odčitamo koncentracijo sveže raztopine, ki ima enako prevodnost. Tako imajo 2 mL raztopine po 370 dneh enako prevodnost kot sveže raztopine z več kot dvakrat višjo koncentracijo  $\text{NaHCO}_3$ , 5 mL 1,9-krat in 10 mL 1,5-krat. Razmerja med presežno in izmerjeno prevodnostjo,  $\sigma_p/\sigma$ , pri 2 mL so 43,3 %, 5 mL 36,1 % in 10 mL 26,8 %. To pomeni, da je v 2 mL  $45,9 \mu\text{S}/\text{cm}$ , 5 mL  $18,6 \mu\text{S}/\text{cm}$  in 10 mL  $8,3 \mu\text{S}/\text{cm}$  presežne prevodnosti.

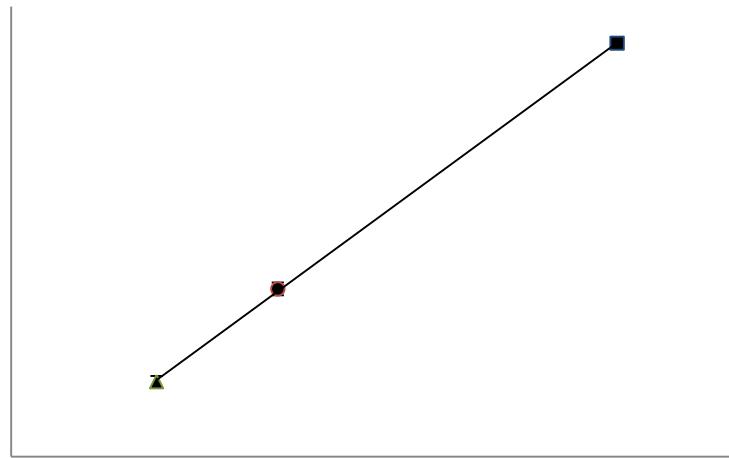
Nadalje smo vpliv volumna staranja primerjali s koeficienti  $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$ , pri katerih so upoštevane razlike v koncentraciji izluženega natrija (glej sl. 28).



**Slika 28:** Vpliv volumna staranja EV in EK na koeficient izmerjene in teoretične prevodnosti,  $\sigma/\sigma_{UK}$ , z intervali SE.  $\sigma$  merjene pri 25 °C in 1000 Hz. EV in EK starani 370 dni v 2 (modra), 5 (rdeča) in 10 mL (zeleno); N [/] EV: 2 mL (3), 5 mL (5), 10 mL (5); EK: 2 mL (5), 5 mL (5), 10 mL (5).

**Figure 28:** Influence of ageing volume of EV and EK on coefficient of measured and theoretical conductivity,  $\sigma/\sigma_{UK}$ , with SE intervals.  $\sigma$  measured at 25 °C and 1000 Hz. EV and EK aged for 370 days in 2 (blue), 5 (red) and 10 mL (green); N [/] EV: 2 mL (3), 5 mL (5), 10 mL (5); EK: 2 mL (5), 5 mL (5), 10 mL (5).

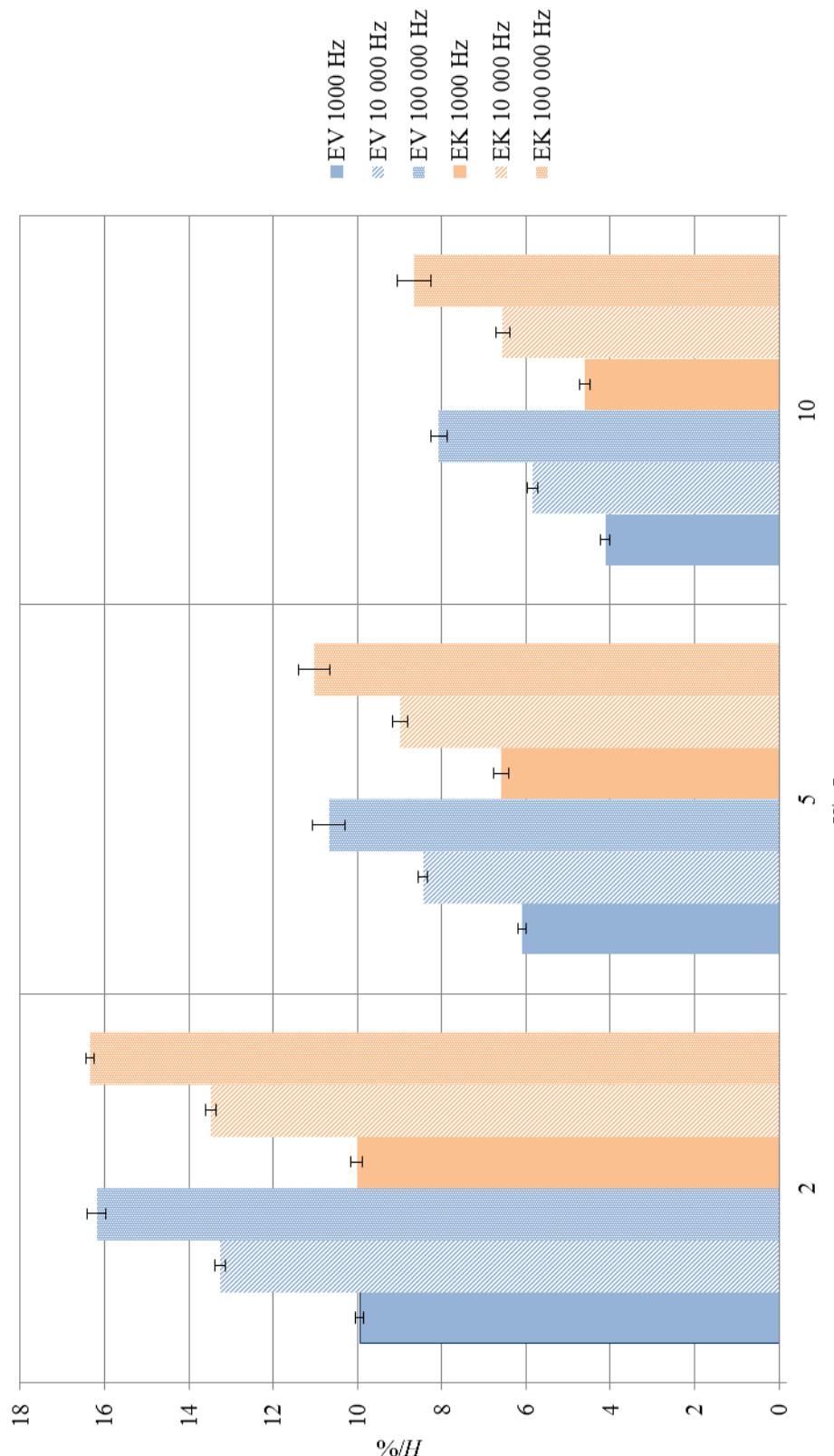
Razlika  $\sigma/\sigma_{UK}$  med posameznimi volumni staranja je očitna (glej sl. 28 in pregl. D3). Manjši, kot je volumen staranja, večji je  $\sigma/\sigma_{UK}$ .  $\sigma/\sigma_{UK}$  2 vs. 5 in 5 vs. 10 mL se v povprečju razlikujejo za 20 %,  $\sigma/\sigma_{UK}$  2 vs. 10 mL pa za 40 %. Manjši, kot je volumen staranja, večji so  $\sigma/\sigma_{UK}$ . Da bi preverili, če se  $\sigma/\sigma_{UK}$  volumnov EV in EK razlikujejo pri 1000 Hz (glede na obdelavo), smo rezultate, ki so normalno porazdeljeni in imajo homogene variance, statistično analizirali z UA (glej pregl. D3). UA je pokazala, da so interakcije volumna in obdelav ( $p = 0,370$ ) ter razlike med obdelavama ( $p = 0,279$ ) neznačilne. Iz tega razloga smo  $\sigma/\sigma_{UK}$  EV in EK v sliki 29 in preglednici D4 upoštevali kot paralelki.



**Slika 29:** Vpliv razmerja  $S/V$  na presežek prevodnosti,  $\sigma_p$ , z intervali SE, merjeno pri  $25\text{ }^\circ\text{C}$  in  $1000\text{ Hz}$ ; EV in EK so združeni. EV in EK starani 370 dni v  $2\text{ mL}$  s  $4,0/\text{cm}$  (modra),  $5\text{ mL}$  z  $2,6/\text{cm}$  (rdeča) in  $10\text{ mL}$  z  $2,1/\text{cm}$  (zelena); N [/]  $4,0/\text{cm}$ : 8,  $2,6/\text{cm}$ : 10,  $2,1/\text{cm}$ : 10. Začetek abscise je pri  $1,5/\text{cm}$ .

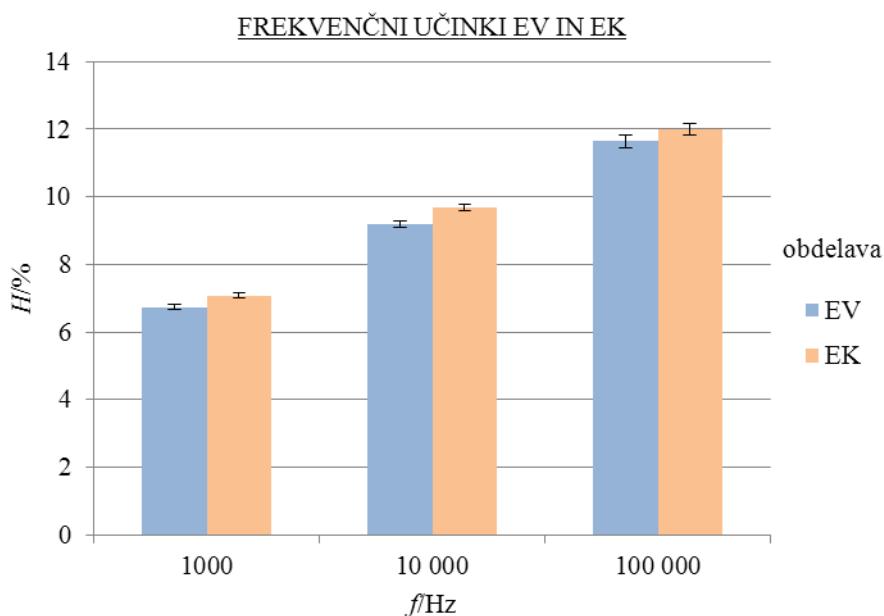
**Figure 29:** Influence of ratio  $S/V$  on excess conductivity,  $\sigma_p$ , with SE intervals, measured at  $25\text{ }^\circ\text{C}$  and  $1000\text{ Hz}$ ; EV and EK are united. EV and EK aged for 370 days in  $2\text{ mL}$  with  $4,0/\text{cm}$  (blue),  $5\text{ mL}$  with  $2,6/\text{cm}$  (red) and  $10\text{ mL}$  with  $2,1/\text{cm}$  (green); N [/]  $4,0/\text{cm}$ : 8,  $2,6/\text{cm}$ : 10,  $2,1/\text{cm}$ : 10. Abscissa starts at  $1,5/\text{cm}$ .

Vsi frekvenčni učinki so pri vseh frekvencah 370. dan staranja značilno višji kot prvi dan (glej pregl. D5). Frekvenčne učinke pri  $1000$ ,  $10\,000$  in  $100\,000\text{ Hz}$  EV ter EK, staranih v  $2\text{ mL}$ ,  $5\text{ mL}$  in  $10\text{ mL}$ , smo ponazorili v sliki 30 (glej pregl. D6).



**Slika 30:** Vpliv volumna staranja EV (svetlo modra) in EK (oranžna) na frekvenčni učinek pri 1000 (polno), 10 000 (črtasto) in 100 000 Hz (pikčasto) z intervali SE.  $\sigma$  merjene pri 25 °C. Obdelavi starani 370 dni v 2, 5 in 10 mL; N [l] EV: 2 mL (3), 5 mL (5), 10 mL (5), 15 mL (5), 20 mL (5), 25 mL (5). **Figure 30:** Influence of EV (light blue) and EK (orange) ageing volume on frequency effects at 1000 (filled), 10 000 (striped) and 100.00 Hz (dotted) with SE intervals;  $\sigma$  measured at 25 °C. Treatments aged for 370 days in 2, 5 and 10 ml; N [l] EV: 2 mL (3), 5 mL (5), 10 mL (3), 15 mL (5), 20 mL (5), 25 mL (5).

Frekvenčni učinki se bistveno razlikujejo glede na volumen staranja in frekvenco (glej sl. 30). Manjši, kot je volumen staranja, večji so frekvenčni učinki in večja, kot je frekvence, pri kateri računamo frekvenčni učinek, večji so frekvenčni učinki. Razlika med  $H_{1000}$  in  $H_{10\ 000}$  2 mL je 3,4 %, 5 mL 2,4 % in 10 mL 1,8 %. Razlika med  $H_{10\ 000}$  in  $H_{100\ 000}$  2 mL je 2,9 %, 5 mL 2,1 %, 10 mL pa 2,2 %. Frekvenčne učinke smo statistično analizirali z LMM in MPM. Ker so frekvenčni učinki nenormalno porazdeljeni, smo dali večjo statistično težo LMM. LMM je pokazal, da je interakcija volumen\*obdelava neznačilna ( $p = 0,516$ ) (glej pregl. D8). To pomeni, da se, če združimo frekvence, frekvenčni učinki obdelav EV in EK z volumnom spreminja na enak način. Na sliki 31 pa so podani frekvenčni učinki obeh obdelav pri treh različnih frekvencah in združenih volumnih (glej pregl. D7).

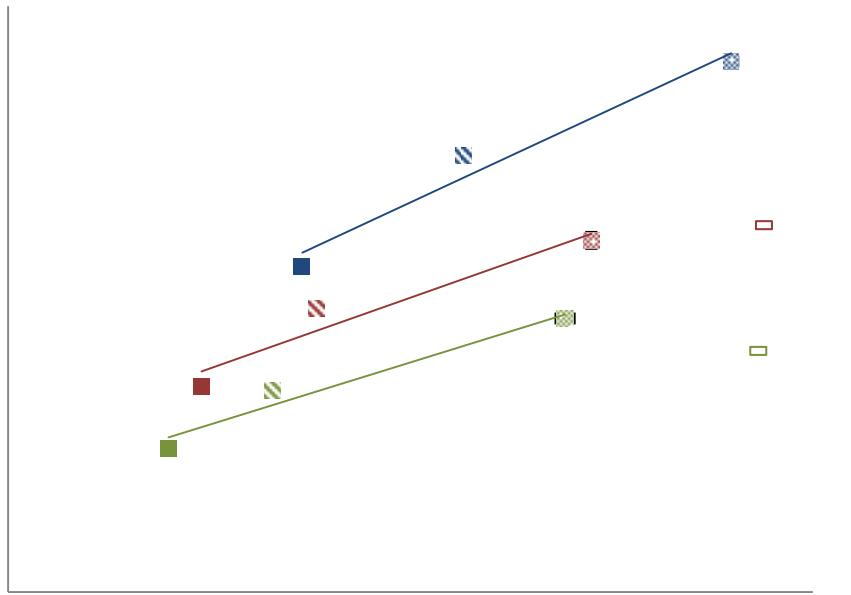


**Slika 31:** Vpliv obdelav EV (svetlo modra) in EK (oranžna) na frekvenčne učinke pri 1000, 10 000 in 100 000 Hz z intervali SE, če združimo volumne; N [/] EV: 13, EK: 15.

**Figure 31:** Influence of treatments EV (light blue) and EK (orange) on frequency effects at 1000, 10 000 and 100 000 Hz with SE intervals, if volumes are united; N [/] EV: 13, EK: 15.

Iz slike 30 vidimo, da so razlike med frekvenčnimi učinki EV in EK med frekvencami 1000 in 10 000 Hz pri 5 in 10 mL. Pri tem pa so te razlike glede na število paralel minimalne.  $H_{1000}$  5 mL EK je 6,6 s SE 0,1 in 5 mL EV 6,1 % s SE 0,2 %.  $H_{10\ 000}$  5 mL EK je 9,0 s SE 0,2 in 5 mL EV 8,4 % s SE 0,1 %.  $H_{1000}$  10 mL EK je 4,6 s SE 0,1, 10 mL EV 4,1 s SE 0,1 in  $H_{10\ 000}$  10 mL EK je 6,6 s SE 0,2, 10 mL EV pa 5,8 % s SE 0,1 %.

Frekvenčne učinke EV in EK smo združili v sliki 32 in preglednici D9.

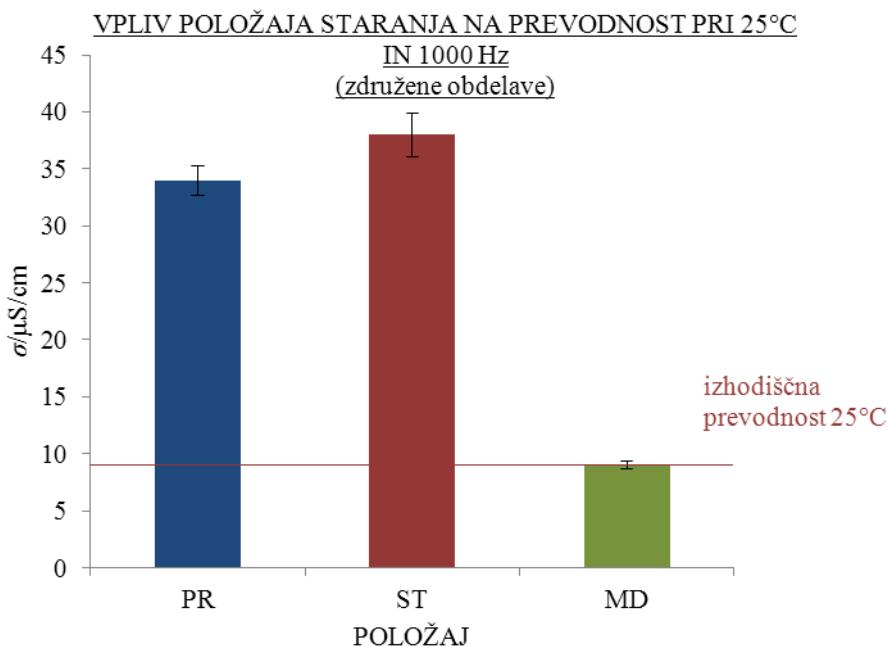


**Slika 32:** Frekvenčni učinki pri 1000 (polno), 10 000 (črtkano) in 100 000 Hz (pikčasto) svežih in 370. dni v 2 mL (modra), 5 mL (rdeča) in 10 mL (zelena) staranih raztopin z enakimi koncentracijami NaHCO<sub>3</sub> z intervali SE, merjene pri 25 °C, če združimo obdelavi; N [/] 2 mL: 8, 5 mL: 10, 10 mL: 10.

**Figure 32:** Frequency effects at 1000 (filled), 10 000 (striped) and 100 000 Hz (dotted) of fresh and 370 days in 2 mL (blue), 5 mL (red) and 10 mL (green) aged solutions of equal NaHCO<sub>3</sub> concentrations with SE intervals, measured at 25 °C, if treatments are united; N [/] 2 mL: 8, 5 mL: 10, 10 mL: 10.

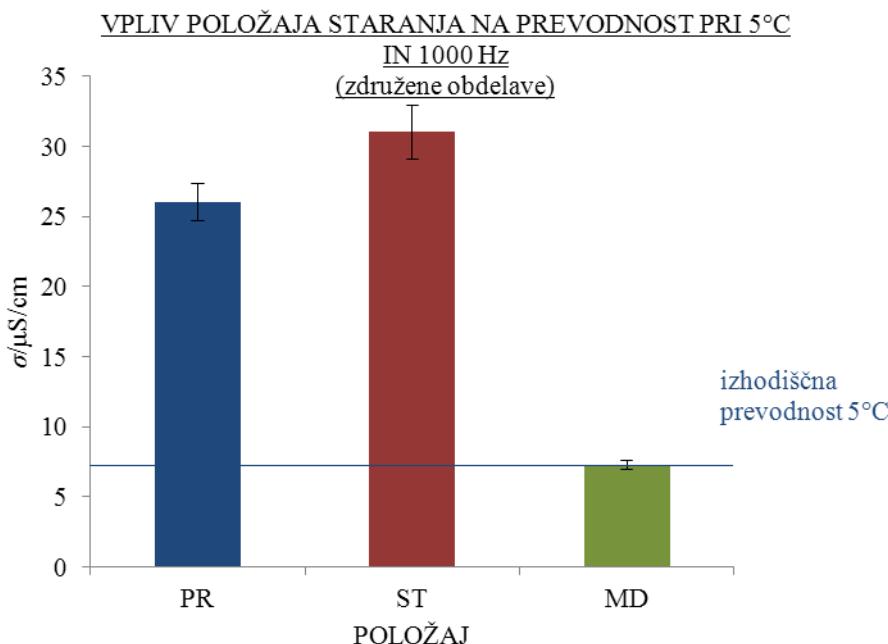
#### 4.1.2.3 Vpliv položaja staranja, obdelave, frekvence in temperature

Obdelave KON, MV, MK, EV in EK smo 310 dni starali na položajih PR, ST in MD v 2,5-mL stekleničkah (glej 3.3.9.3 in 3.3.6). Prevodnosti smo merili pri 25 °C brez termostata v klimatiziranem laboratoriju in pri 5 °C v termostatski kopeli z 10 % NaCl (aq.). Temperaturo raztopin, merjenih brez termostata, smo merili z vtičnim termometrom in je nihala največ za ± 1 °C. Razmerje med stično površino s stekлом in volumnom med staranjem je bilo 3,9/cm. Preglednice z rezultati in preglednice, ki spadajo k slikam te točke smo podali v Prilogi E. V preglednicah E1 in E2 smo zbrali vse rezultate  $\sigma/\sigma_{UK}$ ,  $\sigma_p/\sigma_{1000}$ ,  $c_{NaHCO_3}$  in  $H$ . Z LMM smo primerjali koeficiente  $\sigma/\sigma_{UK}$  pri 25 in 5 °C ter 120, 1000, 10 000 in 100 000 Hz. Prevodnost  $\sigma$  pri 25 in 5 °C položajev PR, ST in MD prvi ter 310. dan staranja smo z združenimi obdelavami pri 1000 Hz ponazorili v slikah 33 in 34 ter preglednici E3.



**Slika 33:** Vpliv položaja staranja na prevodnost po 310. dneh PR (modra), ST (rdeča) in MD (zelena) z intervali SE, če združimo obdelave.  $\sigma$  merjena prvi (izhodiščna prevodnost) in 310. dan staranja pri 25 °C in 1000 Hz; N [/] PR: 28, ST: 20, MD: 20.

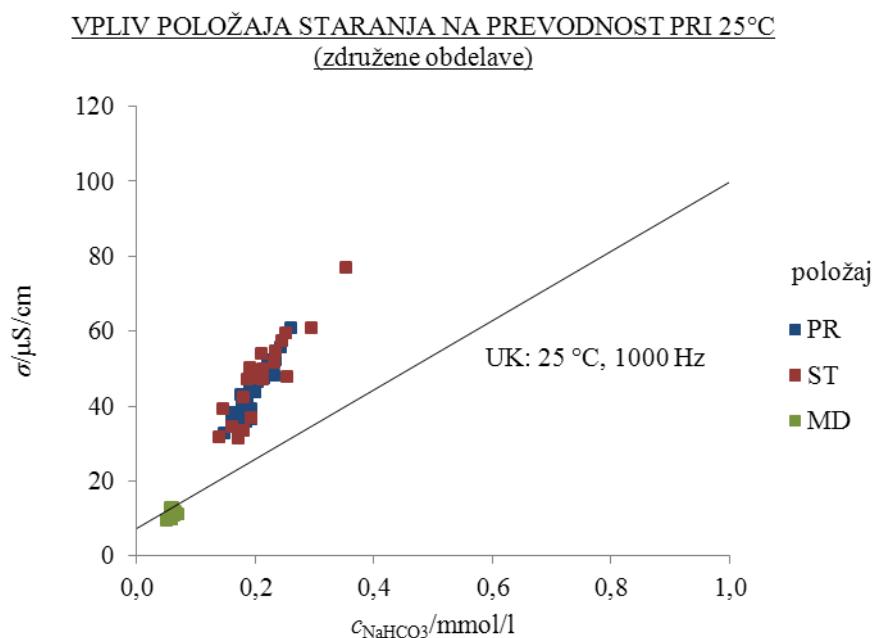
**Figure 33:** Influence of ageing position on conductivity after 310 days PR (blue), ST (red) and MD (green) with SE intervals, if treatments are united.  $\sigma$  measured the 1<sup>st</sup> (starting point conductivity) and 310<sup>th</sup> day of ageing at 25 °C and 1000 Hz; N [/] PR: 28, ST: 20, MD: 20.



**Slika 34:** Vpliv položaja staranja na prevodnost po 310. dneh PR (modra), ST (rdeča) in MD (zelena) z intervali SE, če združimo obdelave.  $\sigma$  merjena prvi (izhodiščna prevodnost) in 310. dan staranja pri 5 °C in 1000 Hz; N [/] PR: 28, ST: 20, MD: 20.

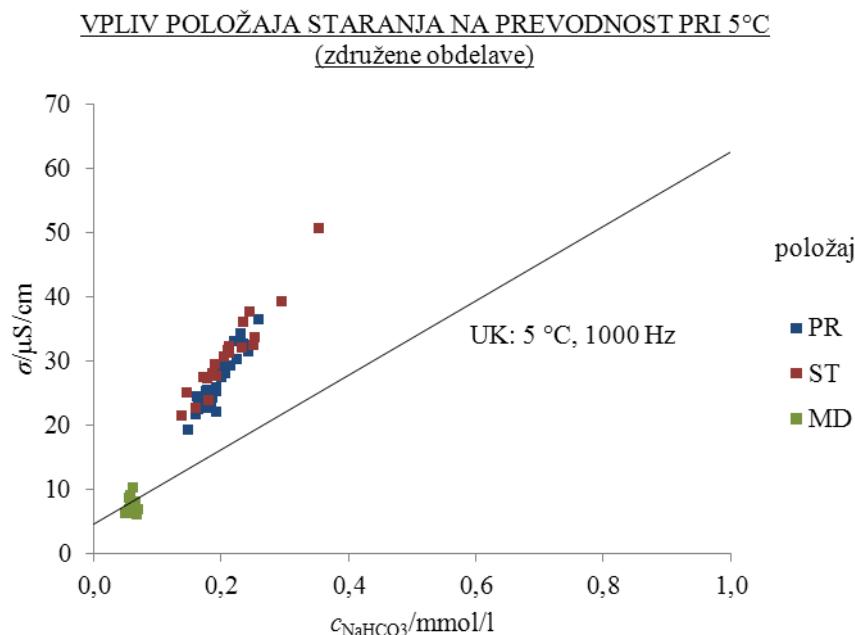
**Figure 34:** Influence of ageing position on conductivity after 310 days PR (blue), ST (red) and MD (green) with SE intervals, if treatments are united.  $\sigma$  measured the 1<sup>st</sup> (starting point conductivity) and 310<sup>th</sup> day of ageing at 5 °C and 1000 Hz; N [/] PR: 28, ST: 20, MD: 20.

Prevodnost pri 25 °C je po 310 dnevih na položaju PR narasla za 3,8-krat, ST za 4,3-krat, medtem ko na položaju MD skoraj ni rasti (glej sl. 33 in pregl. E3). Prevodnost pri 5 °C je po 310 dnevih na položaju PR narasla za 2,7-krat, ST za 3,3-krat, na položaju MD pa po 310 dnevih prav tako ni bistvenih razlik (glej sl. 34). Naslednji sliki ponazarjata  $\sigma$  v odvisnosti od koncentracije NaHCO<sub>3</sub> (glej sl. 35 in 36).



**Slika 35:** Prevodnost svežih (UK) in na položajih PR (modra), ST (rdeča) ter MD (zelena) staranih obdelav pri 25 °C in 1000 Hz v odvisnosti od  $c_{\text{NaHCO}_3}$ . Obdelave so združene, prevodnost nad UK je presežna.

**Figure 35:** Conductivity of fresh (UK) and on positions PR (blue), ST (red) and MD (green) aged treatments at 25 °C and 1000 Hz in dependence of  $c_{\text{NaHCO}_3}$ . Treatments are united, conductivity above CC is excess.



**Slika 36:** Prevodnost svežih (UK) in na položajih PR (modra), ST (rdeča) ter MD (zelena) staranih obdelav pri 5 °C in 1000 Hz v odvisnosti od  $c_{\text{NaHCO}_3}$ . Obdelave so združene, prevodnost nad UK je presežna.

**Figure 36:** Conductivity of fresh (UK) and on positions PR (blue), ST (red) and MD (green) aged treatments at 5 °C and 1000 Hz in dependence of  $c_{\text{NaHCO}_3}$ . Treatments are united, conductivity above CC is excess.

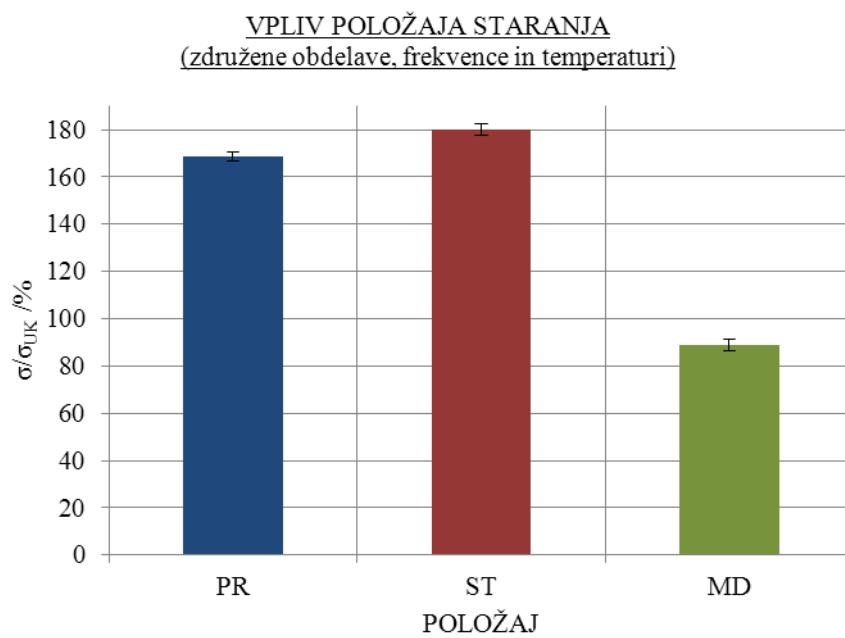
Položaja PR in ST imata pri 25 in 5 °C približno enake presežke prevodnosti, medtem ko položaj MD nima presežkov (glej sl. 35 in 36).

Rezultati merjenja prevodnosti in ICP-MS analize za natrij so v obliki koeficientov  $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$  v večini analiz nenormalno porazdeljeni in imajo nehomogene variance glede na položaj staranja, obdelavo, frekvenco in temperaturo (glej pregl. E4 do E7). Vpliv položaja staranja, obdelave, frekvence in temperature na presežek prevodnosti oziroma  $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$  smo zato statistično analizirali z LMM. Pri tem smo pazili, da je bilo število paralelk vzorcev, ki smo jih primerjali, večje od 7.

Pri statistični analizi z LMM smo frekvenco in temperaturo upoštevali kot ponavljajoči se (*within-subject*) spremenljivki in kot faktorja vpliva (*between-subject variable*) (Damijana Kastelec, osebna komunikacija). Osnovne rezultate analize z LMM smo podali v preglednici E8. Pri razlagi rezultatov statistične analize smo upoštevali pravilo, da najvišja značilna interakcija najbolj natančno prikaže vplive v sistemu (Field 2005). Pri računanju značilnosti faktorjev vpliva 2- in 3-interakcij statistični program ostalih spremenljivk ni upošteval kot faktorje, ampak jih je združil ter izračunal povprečje. Zato smo bistvene rezultate nižjih interakcij in nekaterih faktorjev vpliva ponazorili na dva načina. Najprej s povprečji, ki jih je izračunal LMM, nato pa s povprečji pri 1000 Hz 25 in 5 °C ločenih položajev ter po potrebi zaradi večje nazornosti še z združenimi obdelavami. Medtem ko se

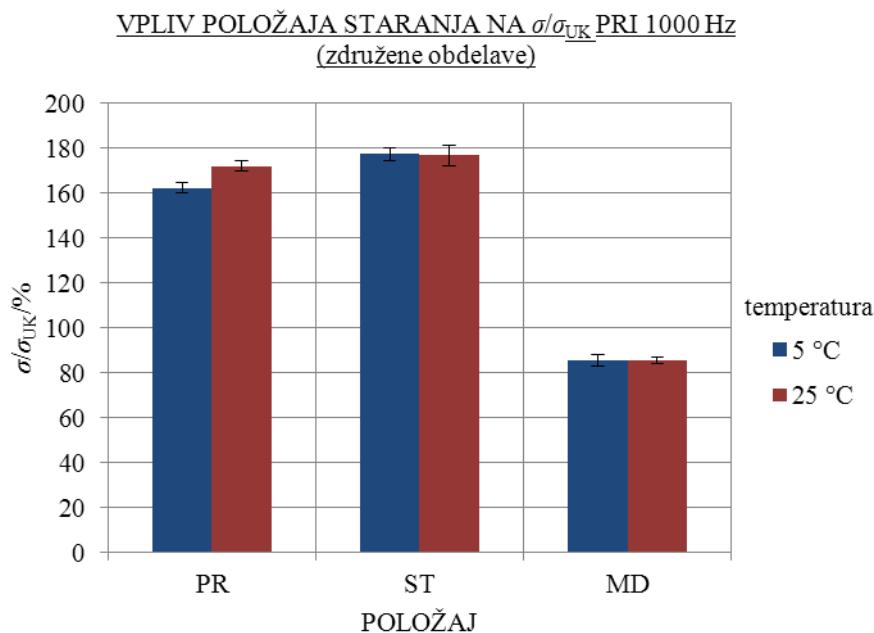
$\sigma/\sigma_{UK}$  položajev staranja znatno razlikujejo, so namreč razlike med obdelavami v sklopu nihanj  $\sigma/\sigma_{UK}$  posameznih položajev. Podajamo samo pomembne rezultate LMM analize.

1. Vpliv položajev staranja je značilen ( $p < 0,001$ ).



**Slika 37: a)** Vpliv položaja staranja PR (modra), ST (rdeča) in MD (zelena) na  $\sigma/\sigma_{UK}$  z intervali SE (združene obdelave, frekvence in temperaturi).

**Figure 37: a)** Influence of ageing positions PR (blue), ST (red) and MD (green) on  $\sigma/\sigma_{UK}$  with SE intervals (united treatments, frequencies and temperatures).



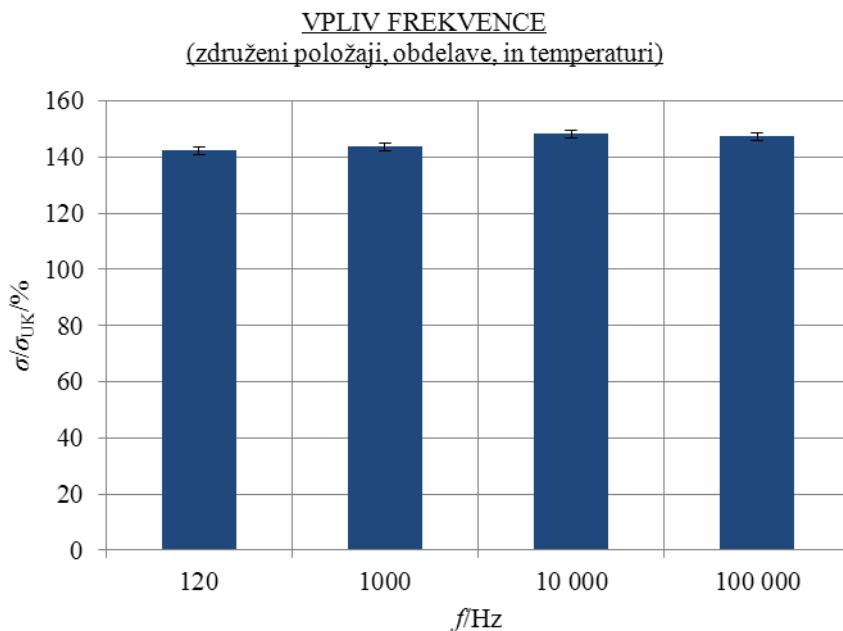
**Slika 37: b)** Vpliv položaja staranja PR, ST in MD na  $\sigma/\sigma_{UK}$  z intervali SE pri 1000 Hz 25 (rdeča) in 5 °C (modra); združene obdelave.

**Figure 37: b)** Influence of ageing positions PR, ST and MD on  $\sigma/\sigma_{UK}$  with SE intervals at 1000 Hz 25 (red) and 5 °C (blue); united treatments.

LMM (sl. 37 a): Kontrasti LMM so pokazali, da so  $\sigma/\sigma_{UK}$  ST značilno večji kot pri PR ( $p = 0,003$ ), hkrati pa so  $\sigma/\sigma_{UK}$  obeh položajev značilno višji ( $p < 0,001$ ) kot pri MD (glej pregл. E9).

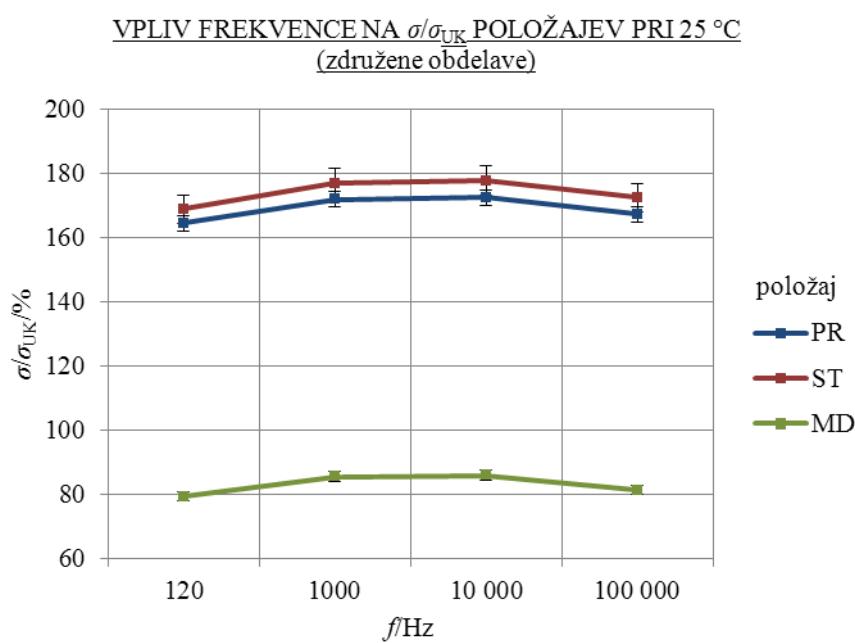
$\sigma/\sigma_{UK}$  položajev pri 1000 Hz 25 in 5 °C z združenimi obdelavami (sl. 37 b): Pri 5 °C so povprečja in RSE  $\sigma/\sigma_{UK}$  PR  $162,3 \% \pm 1,5 \%$ , ST  $177,2 \% \pm 1,5 \%$  in MD  $85,6 \% \pm 3,2 \%$ , pri 25 °C pa so pri PR  $171,9 \% \pm 1,4 \%$ , ST  $176,8 \% \pm 2,6 \%$  ter MD  $85,6 \% \pm 1,8 \%$ . Pri 5 °C so  $\sigma/\sigma_{UK}$  ST značilno višji kot PR, medtem ko se pri 25 °C  $\sigma/\sigma_{UK}$  PR in ST ne razlikujejo. Pri obeh temperaturah so  $\sigma/\sigma_{UK}$  MD znatno nižji kot PR in ST.  $\sigma/\sigma_{UK}$  položajev ST in MD se ne razlikujejo glede na temperaturo meritve, medtem ko so pri 25 °C  $\sigma/\sigma_{UK}$  PR značilno višji kot pri 5 °C.

2. Vpliv frekvence na  $\sigma/\sigma_{UK}$  je značilen ( $p < 0,001$ ).



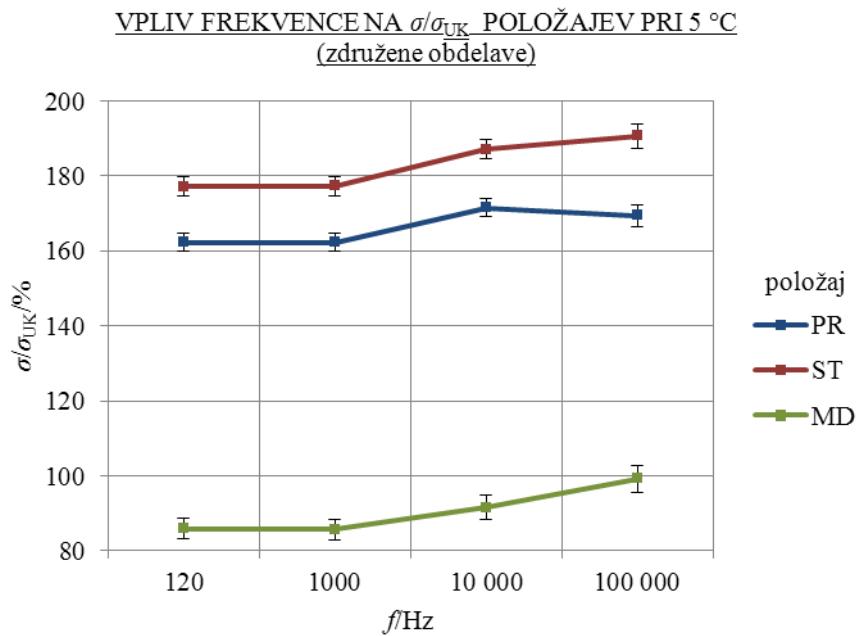
**Slika 38: a)** Vpliv frekvence na  $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$  z intervali SE po oceni LMM (združeni položaji, obdelave in temperaturi).

**Figure 38: a)** Influence of frequency on  $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$  with SE intervals from estimates of LMM (united positions, treatments and temperatures).



**Slika 38: b)** Vpliv frekvence na  $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$  položajev PR (modra), ST (rdeča) in MD (zelena) z intervali SE pri 25 °C (združene obdelave). Začetek ordinate je pri 60 %.

**Figure 38: b)** Influence of frequency on  $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$  of positions PR (blue), ST (red) and MD (green) with SE intervals at 25 °C (united treatments). Ordinate starts at 60 %.



**Slika 38: c)** Vpliv frekvence na  $\sigma/\sigma_{UK}$  položajev PR (modra), ST (rdeča) in MD (zelena) z intervali SE pri 5 °C (združene obdelave). Začetek ordinate je pri 80 %.

**Figure 38: c)** Influence of frequency on  $\sigma/\sigma_{UK}$  of positions PR (blue), ST (red) and MD (green) with SE intervals at 5 °C (united treatments). Ordinate starts at 80 %.

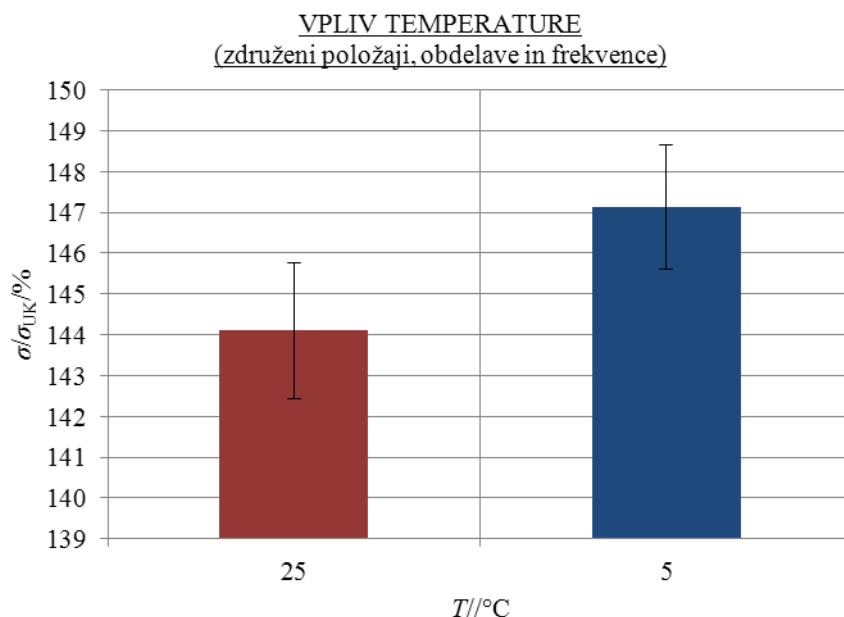
LMM (sl. 38 a): Kontrasti so pokazali, da se  $\sigma/\sigma_{UK}$  pri 120 in 1000 Hz ne razlikujejo ( $p = 0,284$ ), medtem ko se z nadaljnjjim večanjem frekvence, če združimo  $\sigma/\sigma_{UK}$  položajev in obdelav pri 25 in 5 °C, značilno povečujejo ( $p < 0,001$ ) (glej pregl. 10).

$\sigma/\sigma_{UK}$  položajev pri vseh frekvencah 25 in 5 °C z združenimi obdelavami (sl. 38 b in c): Pri 25 °C so povprečja in RSE  $\sigma/\sigma_{UK}$  položaja staranja PR pri 120 Hz 164,6 % ± 2,4 %, 1000 Hz 171,9 % ± 2,4 %, 10 000 Hz 172,6 % ± 2,4 % in 100 000 Hz 167,3 % ± 2,3 %. Povprečja in RSE  $\sigma/\sigma_{UK}$  položaja ST pri 120 Hz 168,9 % ± 4,4 %, 1000 Hz 176,8 % ± 4,6 %, 10 000 Hz 177,7 % ± 4,7 % in 100 000 Hz 172,5 % ± 4,6 %. Povprečja in RSE  $\sigma/\sigma_{UK}$  položaja MD pri 120 Hz 79,4 % ± 1,4 %, 1000 Hz 85,6 % ± 1,5 %, 10 000 Hz 86 % ± 1,5 % in 100 000 Hz 81,5 % ± 1,4 %; glej sl. 38 b). Pri 25 °C so krivulje  $\sigma/\sigma_{UK}$  položajev PR, ST in MD v odvisnosti od frekvence v obliki obrnjene kadi. Pri 120 in 100 000 Hz je spodnji del kadi, pri 1000 in 10 000 Hz pa zgornji del. Pri PR so značilne razlike med 120 vs. 1000 in 10 000 ter med 100 000 vs. 10 000 Hz. Pri ST ni značilnih razlik. Pri MD pa so značilne razlike med 120 in 100 000 Hz vs. 1000 in 10 000 Hz.

Pri 5 °C so povprečja in RSE  $\sigma/\sigma_{UK}$  položaja staranja PR pri 120 Hz 162,3 % ± 2,5 %, 1000 Hz 162,3 % ± 2,5 %, 10 000 Hz 171,6 % ± 2,5 % in 100 000 Hz 169,4 % ± 3,0 %. Povprečja in RSE položaja ST pri 120 Hz 177,2 % ± 2,6 %, 1000 Hz 177,2 % ± 2,6 %, 10 000 Hz 187,2 % ± 2,7 % in 100 000 Hz 190,6 % ± 3,3 %. Povprečja in RSE položaja MD pri 120 Hz 85,8 % ± 2,7 %, 1000 Hz 85,6 % ± 2,7 %, 10 000 Hz 91,5 % ± 3,2 % in 100 000 Hz 81,5 % ± 1,4 %.

000 Hz  $99,2\% \pm 3,6\%$ ; glej sl. 38 c). Pri PR in ST so  $\sigma/\sigma_{UK}$  pri 120 in 1000 Hz značilno nižji od 10 000 in 100 000 Hz, medtem ko so pri MD  $\sigma/\sigma_{UK}$  pri 120 in 1000 Hz značilno nižji od 100 000 Hz. Pri ST in MD je trend rasti  $\sigma/\sigma_{UK}$  v odvisnosti s frekvenco, medtem ko pri PR  $\sigma/\sigma_{UK}$  do 10 000 Hz raste, pri 100 000 Hz pa pade.

### 3. Vpliv temperature ni značilen.

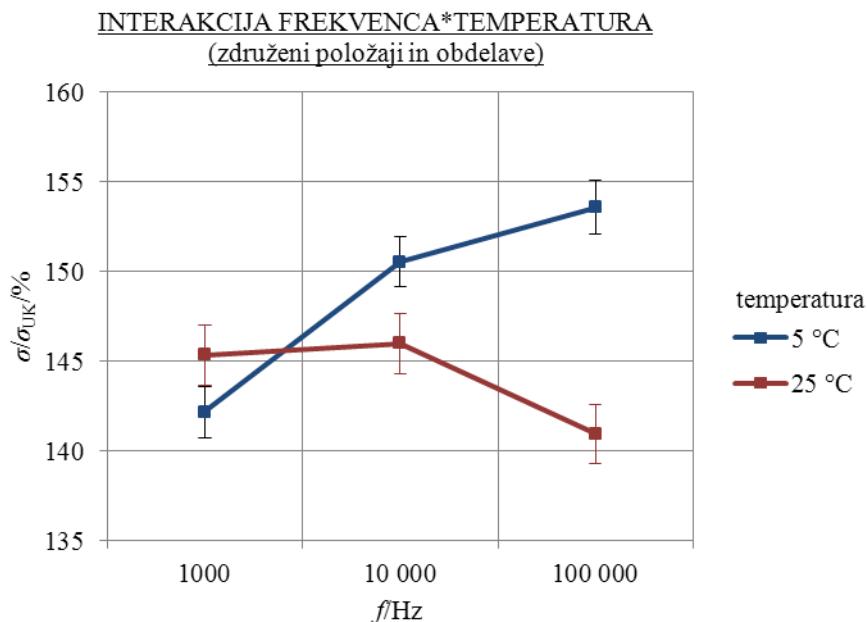


**Slika 39:** Koeficienti  $\sigma/\sigma_{UK}$  pri 25 (rdeča) in 5 °C (modra) z intervali SE (združeni položaji, frekvence in obdelave). Začetek ordinate je pri 139 %.

**Figure 39:** Coefficients  $\sigma/\sigma_{UK}$  at 25 (red) and 5 °C (blue) with SE intervals (united positions, treatments and frequencies). Ordinate starts at 139 %.

Ocena LMM (sl. 39):  $\sigma/\sigma_{UK}$  pri 5 °C so približno enaki kot pri 25 °C (glej pregл. E11). Iz tega lahko sklepamo, da so meritve brez termostata pri 25 °C zanesljive.

4. Interakcija frekvenca\*temperatura je značilna ( $p < 0,001$ ).

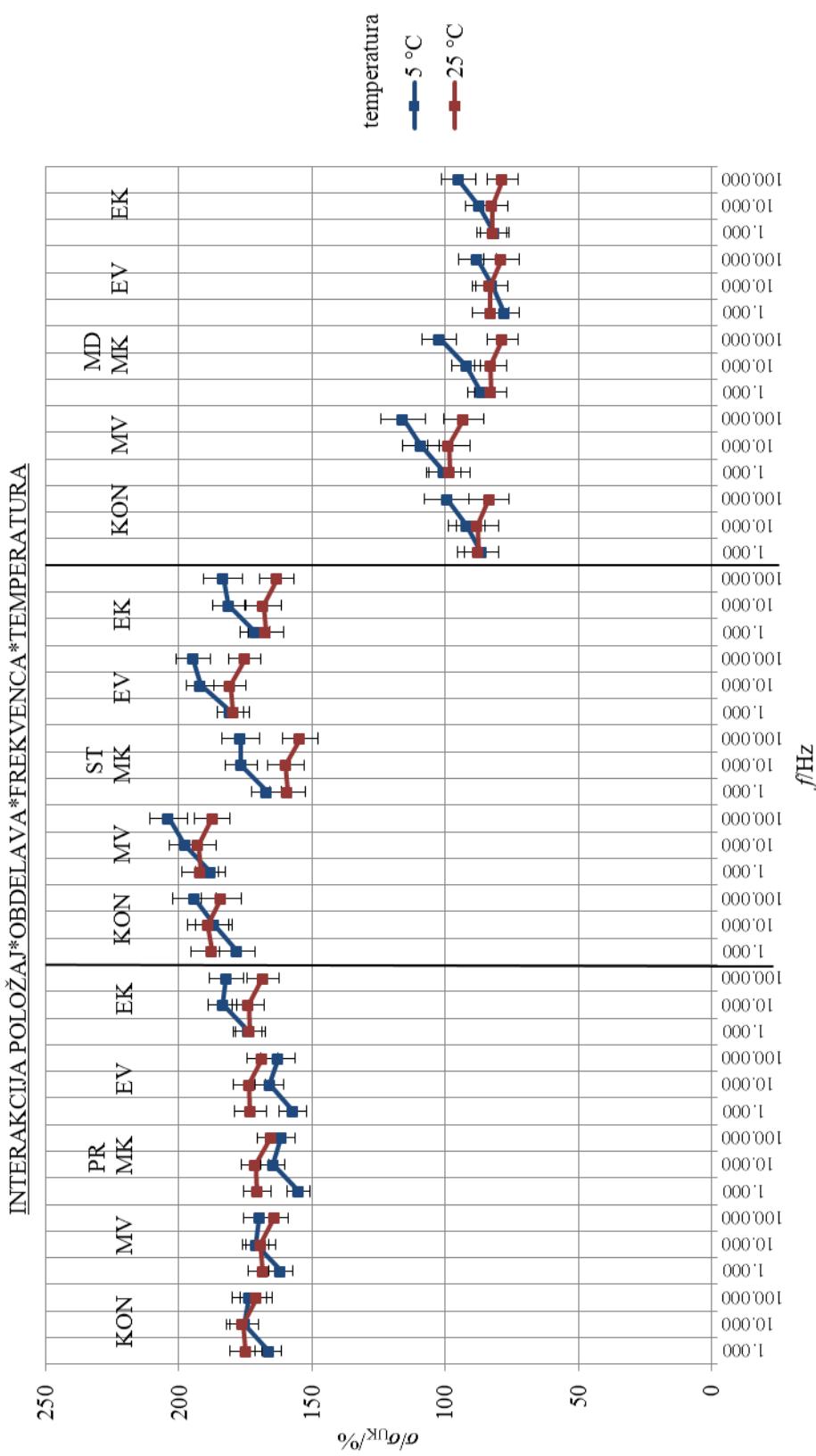


**Slika 40:** Koeficienti  $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$  pri 5 (modra) in 25 °C (rdeča) ter frekvencah 1000, 10 000 in 100 000 Hz z intervali SE (združeni položaji in obdelave). Začetek ordinate je pri 135 %.

**Figure 40:** Coefficients  $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$  at 5 (blue) and 25 °C (red) and frequencies 1000, 10 000 and 100 000 Hz with SE intervals (united positions and treatments). Ordinate starts at 135 %.

**LMM (sl. 40):**  $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$  pri 10 000 in 100 000 Hz so pri 5 °C značilno višji kot pri 25 °C (glej pregl. E12).

Na sliki 41 smo ponazorili  $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$  posameznih obdelav pri 1000, 10 000 in 100 000 Hz ter 25 in 5 °C.

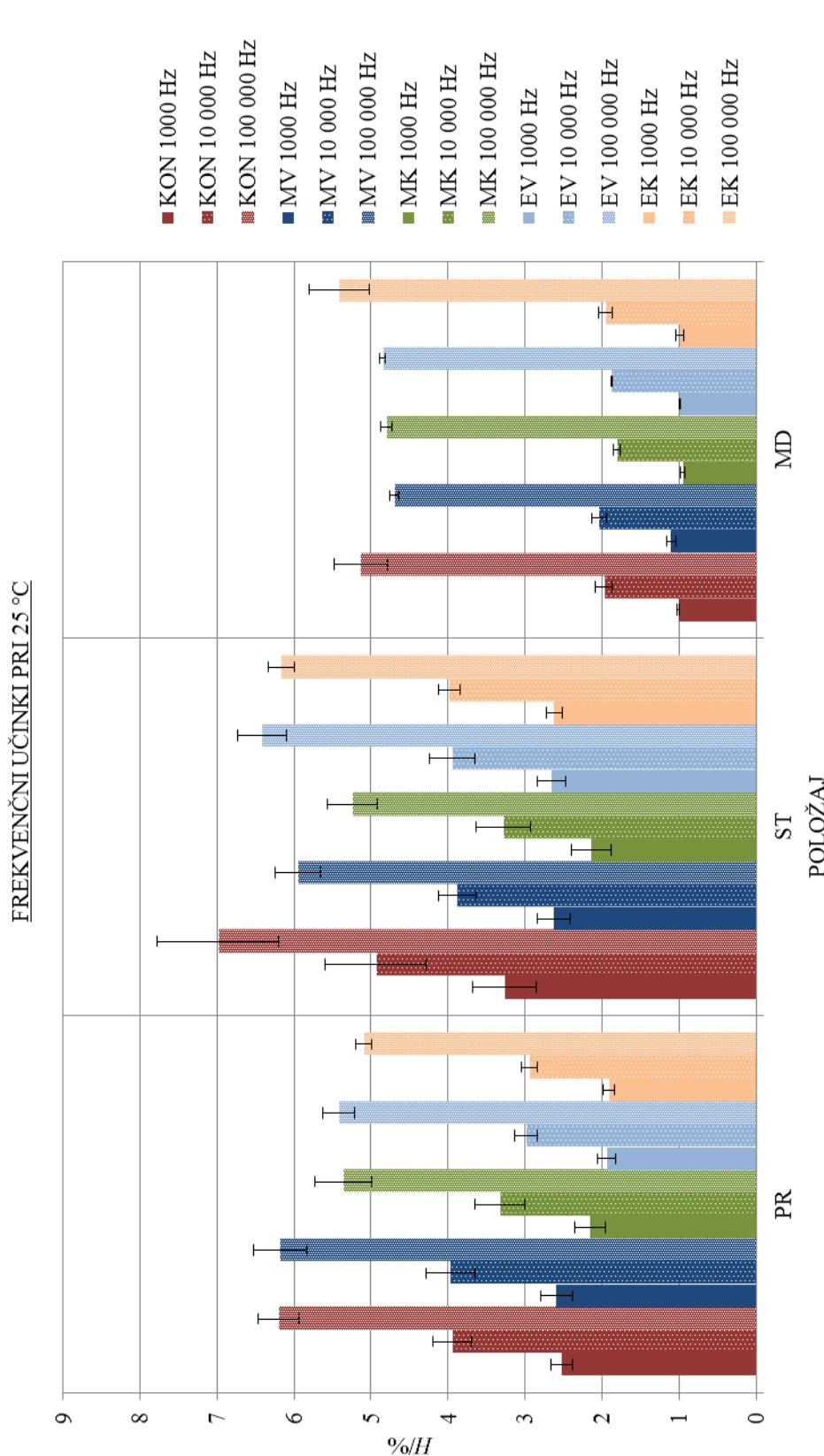


**Slika 41:** Obdelave PRKON, PRMV, PRMK, PREV in PREK (levo), STKON, STMV, STMK, STEV ter STEK (sredina), MDKON, MDMV, MDMK, MDEV in MDEK (desno) pri 5 °C (modra) ter 25 °C (rdeča) ter 1000, 10 000 in 100 000 Hz.  $\sigma/\sigma_{0K}$  z intervali SE.

**Figure 41:** Treatments PRKON, PRMV, PRMK, PREV and PREK (left), STKON, STMV, STMK, STEV and STEK (middle), MDKON, MDMV, MDMK, MDEV and MDEK (right) at 5 (blue) and 25 °C (red) and 1000, 10 000 and 100 000 Hz.  $\sigma/\sigma_{0K}$  with SE intervals.

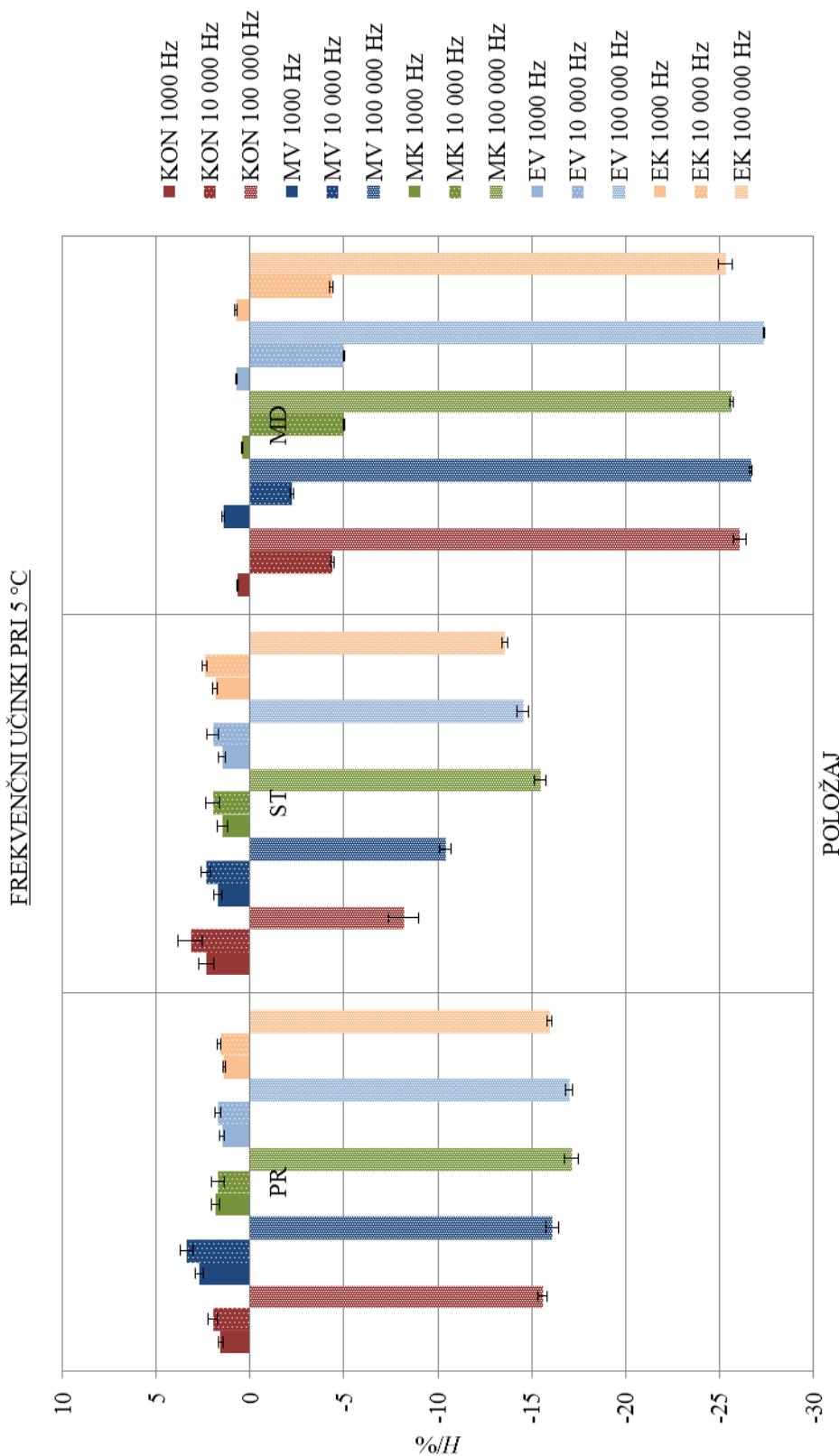
**LMM (sl. 41):**  $\sigma/\sigma_{UK}$  obdelav PRMK in PREV pri 1000 Hz so pri 25 °C značilno višje kot pri 5 °C, kar je obratni trend kot pri vseh ostalih obdelavah (glej pregl. E13).

Frekvenčni učinki vseh položajev staranja so večji kot prvi dan po obdelavi (glej pregl. E14). Frekvenčni učinki položaja ST pri 1000 Hz so za 230 %, 10 000 Hz za 150 % in 100 000 Hz za 60 % večji kot prvi dan po obdelavi, frekvenčni učinki položaja PR pri 1000 Hz za 175 %, 10 000 Hz 120 % in 100 000 Hz 50 % ter frekvenčni učinki položaja MD pri 1000 Hz 25 %, 10 000 Hz 20 % in 100 000 Hz 30 %. Frekvenčne učinke posameznih obdelav pri 25 in 5 °C smo kot dopolnilo k statistični analizi z LMM ponazorili v slikah 42 in 43 (glej pregl. E15 in E16).



**Slika 42:** Vpliv položaja staranja na frekvenčne učinke pri 1000 (polno), 10 000 (črtasto) in 100 000 Hz (pikčasto) pri 25°C z intervali SE. Obdelave KON (modra), MV (rdeča), MK (zelenja), EV (svetlo modra) in EK (oranžna), starane na položajih PR, ST in MD 310 dni; N [/] KON: PR (5), ST (3), MD (3), MV: PR (7), ST (4), MD (3), MK: PR (5), ST (5), MD (4), EV: PR (5), ST (4), MD (5).

**Figure 42:** Influence of ageing position on frequency effects at 1000 (filled), 10 000 (striped) and 100 000 Hz (dotted) at 25°C with SE intervals. Treatments KON (blue), MV (red), MK (green), EV (light blue) and EK (orange) aged on positions PR, ST and MD for 310 days; N [/] KON: PR (5), ST



**Slika 43:** Vpliv položaja staranja na frekvenčne učinke pri 1000 (polno), 10 000 (črtasto) in 100 000 Hz (pikčasto) pri 5°C z intervali SE. Obdelave KON (modra), MV (rdeča), MK (zelena), EV (svetlo modra) in EK (oranžna), starane na položajih PR, ST in MD 310 dni; N [1] KON: PR (5), ST (3), MD (3), MV: PR (7), ST (4), MD (3), MK: PR (7), ST (4), MD (4), EV: PR (5), ST (5), MD (4), EK: PR (5), ST (4), MD (5).

**Figure 43:** Influence of ageing position on frequency effects at 1000 (filled), 10 000 (striped) and 100 000 Hz (dotted) at 5°C with SE intervals. Treatments KON (blue), MV (red), MK (green), EV (light blue) and EK (orange) aged on positions PR, ST and MD for 310 days; N [1] KON: PR (5), ST

#### 4.2 FEROMONSKI TEST S *Chromobacterium violaceum* CV026

Zaznavanje kvoruma omogoča bakterijam iste vrste, v nekaterih primerih pa tudi drugih taksonov, da ob zadostni gostoti organizmov sprožijo vrsto sprememb v svojem metabolizmu. Pri tem bakterije sintetizirajo feromone, imenovane avtoinducenti, ki ob mejni koncentraciji (1 – 10 µg/mL) sprožijo spremembo genske ekspresije (Madigan 2000: 228 str., Khmel in sod. 2008).

Gramnegativne bakterije imajo LuxI / LuxR sistem za zaznavanje kvoruma s feromoni acil homoserin laktoni (AHL). Sinteza AHL je odvisna od LuxI – tipa AHL sintetaz. AHL prosto prehaja preko membrane v okolje in nazaj v celico, kjer se veže na LuxR – tip receptorjev v citoplazmi (Camilli in Bassler 2006). Receptor LuxR pa se aktivira šele, ko koncentracija AHL v okolju doseže mejno vrednost (Khmel in sod. 2008). Nekatere gramnegativne bakterije ne proizvajajo lastnih AHL, lahko se pa odzovejo na AHL v okolju (Khmel in sod. 2008, McClean in sod. 1997). Ena takšnih bakterij, ki smo jo uporabili pri eksperimentalnem delu, je mutant *Chromobacterium violaceum* CV026, ki se na prisotnost AHL v okolju odzove s sintezo violaceina (McClean in sod. 1997).

Rezultate feromonskih testov smo razdelili na dva dela. V prvem delu smo preverili, kakšen je odziv bakterij na z mehanogeno in elektrogeno epitaksijo vtisnjeno »informacijo« feromona AHL v gojišču. V drugem delu pa smo sintezo violaceina opazovali v gojiščih z enako koncentracijo izhodnega AHL z in brez dodane »informacije« AHL. Pri tem smo spremenjali pogoje gojenja CV026, izhodiščne raztopine pri pripravi »informacij« in čas izpostavljenosti prekonočne kulture temperaturnemu stresu pri 4 °C. Vendar so eksperimenti ostali pri preliminarnih testih. Neobdelane rezultate in preglednice h grafikonom smo podali v Prilogi G.

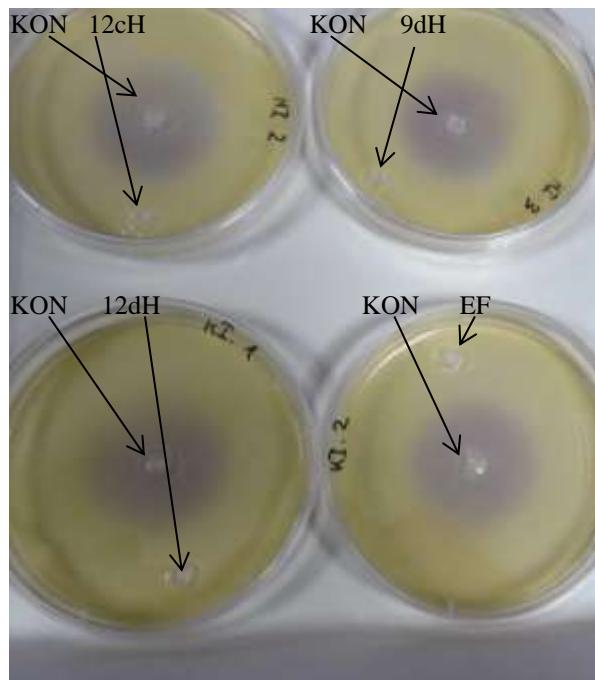
##### 4.2.1 Feromonski test z »informacijo« AHL

Predvidevali smo, da z mehanogeno in elektrogeno epitaksijo vtisnjena »informacija« feromona AHL (MF in EF) aktivira protein R ter s tem sintezo violaceina v CV026 na podoben način kot izhodna snov AHL (KON). Test zaznave »informacij« smo izvedli na velikih ploščah z difuzijsko metodo v jamicah. Pri tem smo kot donor »informacije« oziroma izhodno snov uporabili OHHL in HHL, kot izhodiščni snovi pri redčenju pa gojišče LB in dH<sub>2</sub>O. V preglednici 16 in sliki 44 smo podali rezultate feromonskih testov z »informacijo« OHHL, ki so enaki rezultatom z »informacijo« HHL.

**Preglednica 16:** Test zaznave »informacije« OHHL v CV026 z difuzijsko metodo v jamicah; MF in EF pripravljene z gojiščem LB oziroma dH<sub>2</sub>O.

**Table 16:** Test detection of OHHL “information” in CV026 with diffusion method in wells; MF and EF prepared with medium LB or dH<sub>2</sub>O.

opisna statistika	KON	MF v dH <sub>2</sub> O			EF v dH <sub>2</sub> O	MF v LB			EF v LB
		12cH	12dH	9dH		12cH	12dH	9dH	
$c_{AHL}$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	2	$10^{-24}$	$10^{-12}$	$10^{-9}$	0	$10^{-24}$	$10^{-12}$	$10^{-9}$	0
obarvanje	DA	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
N (%)	3	9	9	9	9	9	9	9	9



**Slika 44:** Plošče obdelav KON (sredine plošč) in MF (12cH, 9dH, 12dH) ter EF (na robovih).

**Figure 44:** Plates with treatments KON (in centers) and MF (12cH, 9dH, 12dH) and EF (on edges).

Bakterijska trata se v bližini obdelav MF (12cH, 12dH in 9dH) in EF, ki vsebujejo zgolj »informacijo« OHHL oziroma HHL, ni obarvala, medtem ko se je pozitivna kontrola, ki je vsebovala OHHL oziroma HHL nad mejno koncentracijo za kvorum (KON), obarvala temno vijolično (glej sl. 44 in pregl. 16).

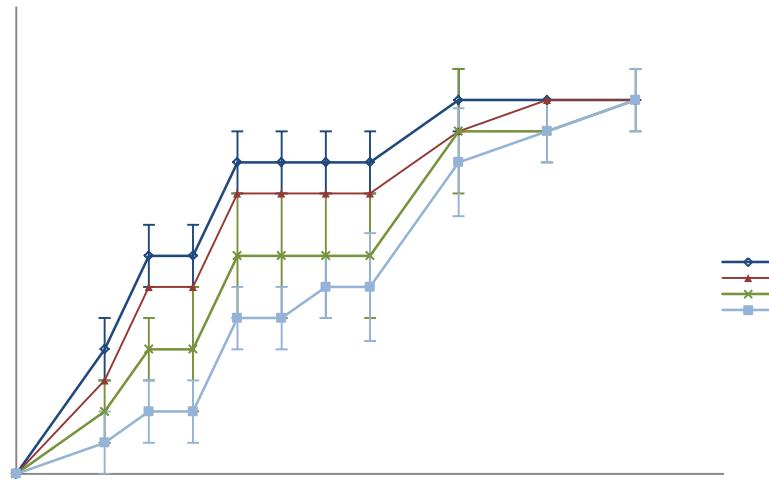
#### 4.2.2 Preliminarni testi zaznavanja kvoruma z AHL in »informacijo« AHL

Ugotovili smo, da samo »informacija« AHL ni dovolj za sprožitev sistema za zaznavanje kvoruma, zato smo eksperimente nadaljevali tako, da smo v vsa gojišča dodali enako količino feromona AHL z in brez »informacije« AHL.

##### 4.2.2.1 Difuzijska metoda v jamicah

Pri gojenju na velikih ploščah z difuzijsko metodo v jamicah smo večinoma dodali približno 60 nmol/L izhodnega OHHL. Najprej smo izvedli poskuse z difuzijsko metodo v

jamicah brez temperaturnega stresa, z obdelavami KON, MF1, MF2 in MF3 (glej pregl. 15 in sl. 45).

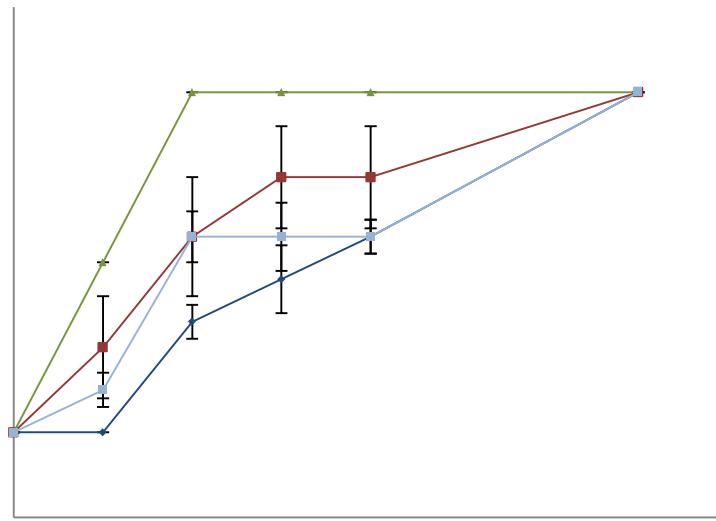


**Slika 45:** Feromonski test brez temperaturnega stresa z ocenami obarvanja in intervali SE KON (modra), MF1 (rdeča), MF2 (zelena) ter MF3 (svetlo modra); z OHHL inkubacija pri 20 °C, N=3. Začetek abscise je pri 9 h.

**Figure 45:** Pheromone test without temperature stress with staining scores of KON (blue), MF1 (red), MF2 (green) and MF3 (light blue); with OHHL incubation at 20 °C, N=3. The abscissa starts at 9 h.

Kolonije CV026 se niso odzvale na dodatek »informacije« OHHL, saj se ni nobena od z mehanogeno epitaksijo obdelanih raztopin feromona (MF1-3) prej obarvala kot pozitivna kontrola KON (glej sl. 45 in pregl. G1).

Predvidevali smo, da stres povzroči, da bakterije postanejo bolj občutljive za zaznavo »informacije« AHL. Prekonočno kulturo CV026 smo zato izpostavili dvem uram temperaturnega stresa pri 4 °C. Prvo obarvanje bakterijske trate z violaceinom smo opazili po 12 urah, po 15,5 urah pa razlik med obdelavami nismo več opazili (glej sl. 46 in pregl. G2).

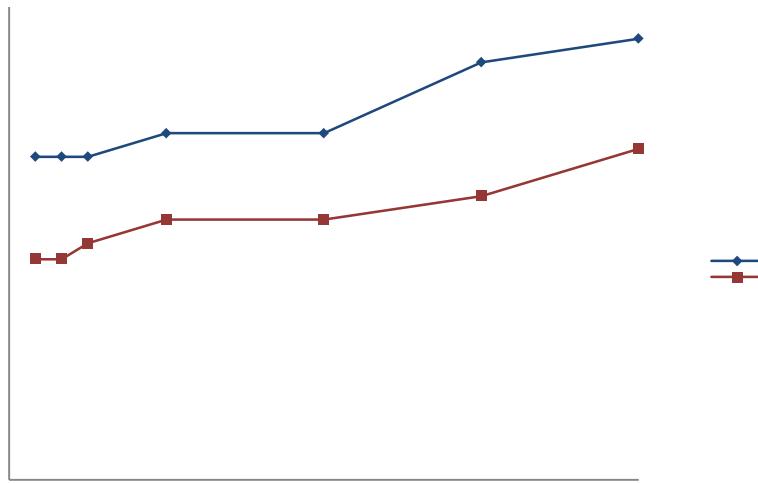


**Slika 46:** Feromonski test z ocenami obarvanja in intervali SE KON (modra), MF1 (rdeča), MF2 (zelena) ter MF3 (svetlo modra); prekonočna kultura 2 h pri 4 °C, z OHHL inkubacija pri 20 °C, N [/] KON (6), MF1 (3), MF2 (3), MF3 (6). Začetek abscise je pri 12 h.

**Figure 46:** Pheromone test with staining scores of KON (blue), MF1 (red), MF2 (green) and MF3 (light blue); overnight culture 2 h at 4 °C; with OHHL incubation at 20 °C, N [/] KON (6), MF1 (3), MF2 (3), MF3 (6). The abscissa starts at 12 h.

Kvalitativno ocenjevanje obarvanosti je pokazalo, da so eno uro po začetku obarvanja z violaceinom največje razlike med posameznimi obdelavami. MF2, ki vsebuje tako OHHL 12cH kot 2dH, je najhitreje obarvana, sledita ji MF1, ki vsebuje OHHL 12cH, in MF3, ki vsebuje OHHL 2dH. KON, ki ne vsebuje »informacije« OHHL, pa se je obarvala najpočasneje (glej sl. 46).

Da bi izpopolnili metodo dela z bakterijami, smo jih izpostavili različnim časom temperaturnega stresa pri 4 °C in jih inkubirali pri dveh različnih temperaturah, 20 in 25 °C, ter ocenili obarvanost kolonij (glej pregl. G3 in G4). Zaradi načrtovanja poteka nadaljnjega dela nas je zanimal predvsem čas prvega obarvanja plošč (glej sl. 47).

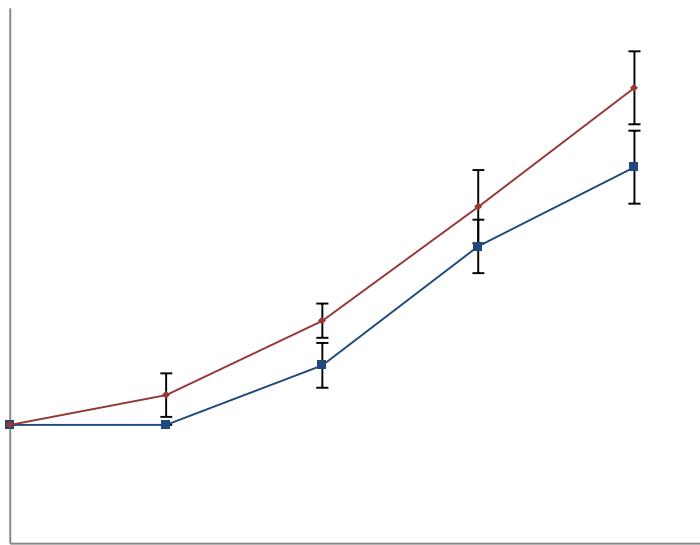


**Slika 47:** Čas prvega obarvanja plošč glede na trajanje temperaturnega stresa in temperaturo inkubacije; N=2.

**Figure 47:** Time of the first staining of the plates according to the duration of temperature stress and temperature of incubation; N=2.

Višja temperatura inkubacije pospeši izločanje violaceina (glej sl. 47).

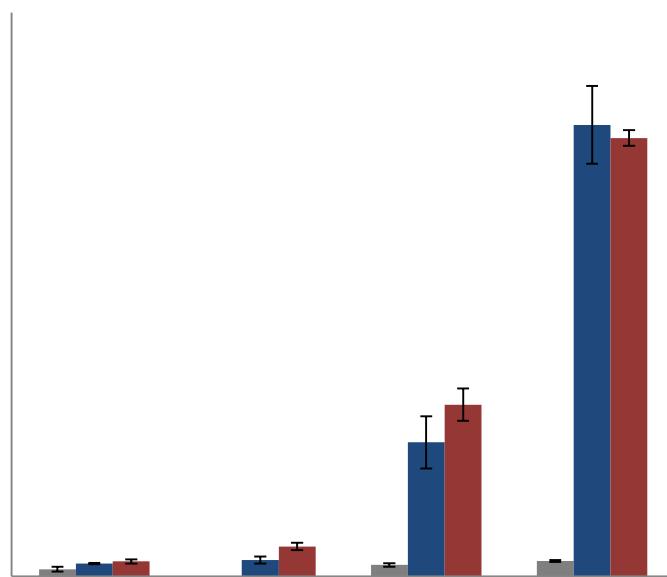
Predvidevali smo, da bo daljši temperaturni stres povečal razlike med obdelavami, zato smo prekonočno kulturo za šest ur izpostavili temperaturnemu stresu pri 4 °C. Obdelave na velikih ploščah smo najprej kvalitativno ocenili (glej sl. 48 in pregl. G5 a), nato pa violacein določili še kvantitativno z merjenjem  $A_{585}$ . Vsako uro po začetku obarvanja z violaceinom smo dvema paralelkama KON in MF2 ekstrahirali violacein ter izmerili  $A_{585}$  (glej sl. 49 in pregl. G5 b).



**Slika 48:** a) Feromonski test KON (modra) in MF2 (rdeča); prekonočna kultura 6 h pri 4 °C, z OHHL inkubacija pri 20 °C. Ocene obarvanja z intervali SE; N [/] KON (8), MF2 (8). Začetek abscise je pri 12 h.

**Figure 48:** a) Pheromone test of KON (blue) and MF2 (red); overnight culture 6 h at 4 °C; with OHHL incubation at 20 °C. Staining scores with SE intervals; N [/] KON (8), MF2 (8). The abscissa starts at 12 h.

Največje razlike med obdelavama KON in MF2 so po 16 urah inkubacije pri 20 °C. Obdelava MF2, ki vsebuje »informacijo« feromona, je značilno bolj obarvana kot obdelava KON, ki je brez »informacije« (glej sl. 48 a).

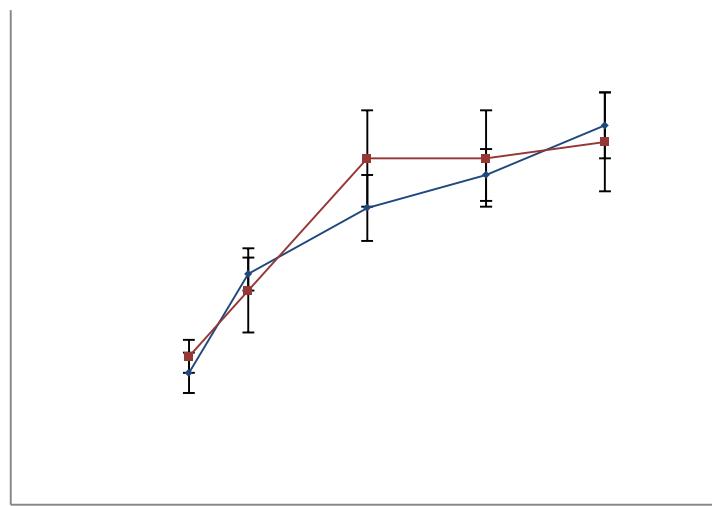


**Slika 48: b)** Feromonski test KON (modra) in MF2 (rdeča); prekonočna kultura 6 h pri 4 °C, z OHHL inkubacija pri 20 °C.  $A_{585}$  z intervali razlik med dvema paralelkama; N=2.

**Figure 48: b)** Pheromone test of KON (blue) and MF2 (red); overnight culture 6 h at 4 °C; with OHHL incubation at 20 °C.  $A_{585}$  with intervals of differences between two parallels; N=2.

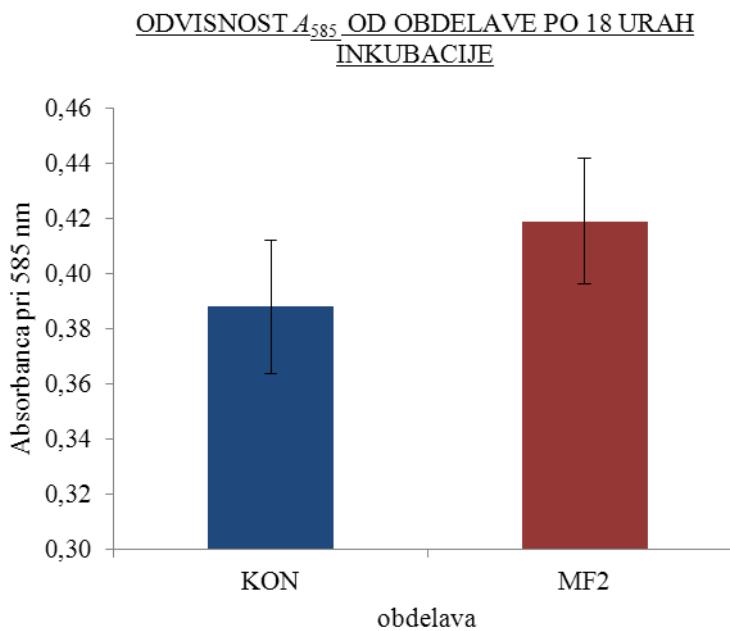
$A_{585}$  MF2 je značilno večja od KON po 16 urah inkubacije, po 22 urah je  $A_{585}$  MF2 še vedno rahlo in neznačilno večja od KON, medtem ko se po 36,5 urah vrstni red zamenja (glej sl. 48 b).

Predvidevali smo, da bo poskus pri enakih pogojih ponovljiv (glej sl. 49 in pregл. G6).



**Slika 49: a)** Feromonski test\_2 KON (modra) in MF2 (rdeča); prekonočna kultura 6 h pri 4 °C, z OHHL inkubacija pri 20 °C. Ocene obarvanja z intervali SE; N [/] KON (5), MF2 (5). Začetek abscise je pri 12 h.

**Figure 49: a)** Pheromone test\_2 of KON (blue) and MF2 (red); overnight culture 6 h at 4 °C; with OHHL incubation at 20 °C. Staining scores with SE intervals; N [/] KON (5), MF2 (5). The abscissa starts at 12 h.



**Slika 49: b)** Feromonski test\_2 KON (modra) in MF2 (rdeča); prekonočna kultura 6 h pri 4 °C, z OHHL inkubacija pri 20 °C.  $A_{585}$  18 ur po inkubaciji; N=5. Začetek ordinate je pri 0,3.

**Figure 49: b)** Pheromone test\_2 of KON (blue) and MF2 (red); overnight culture 6 h at 4 °C; with OHHL incubation at 20 °C.  $A_{585}$  18 h after incubation; N = 5. The ordinate starts at 0,3.

Feromonska testa s šestimi urami temperaturnega stresa in inkubacijo pri 20 °C nimata enakih rezultatov, saj je pri prvem testu več violaceina pri obdelavi MF2, medtem ko pri drugem testu med obdelavama ni značilnih razlik (glej sl. 48 do 49).

Predvidevali smo, da bo zatesnitev plošč s parafilmom povečala razlike med obdelavami. Vendar so rezultati pokazali, da zatesnitev plošč ni primerna, saj se je obarvanje z violaceinom pričelo šele po 20 urah, kar je pozneje kot pri drugih eksperimentih, poleg tega pa so bile paralelke precej neenakomerno obarvane (glej pregl. G7).

Pri difuzijski metodi v jamicah pri vsakokratnem pipetiranju mehkega in trdega agarja, suspenzije prekonočne kulture ter raztopine feromona lahko nastanejo naključne napake, ki vplivajo na ponovljivost in natančnost meritev (glej pregl. 17).

**Preglednica 17:** Ponovljivost priprave gojišča na ploščah  $2r = 90$  mm in merjenja  $A_{585}$  po 15 urah inkubacije KON pri 20 °C; 4 h na 4 °C.

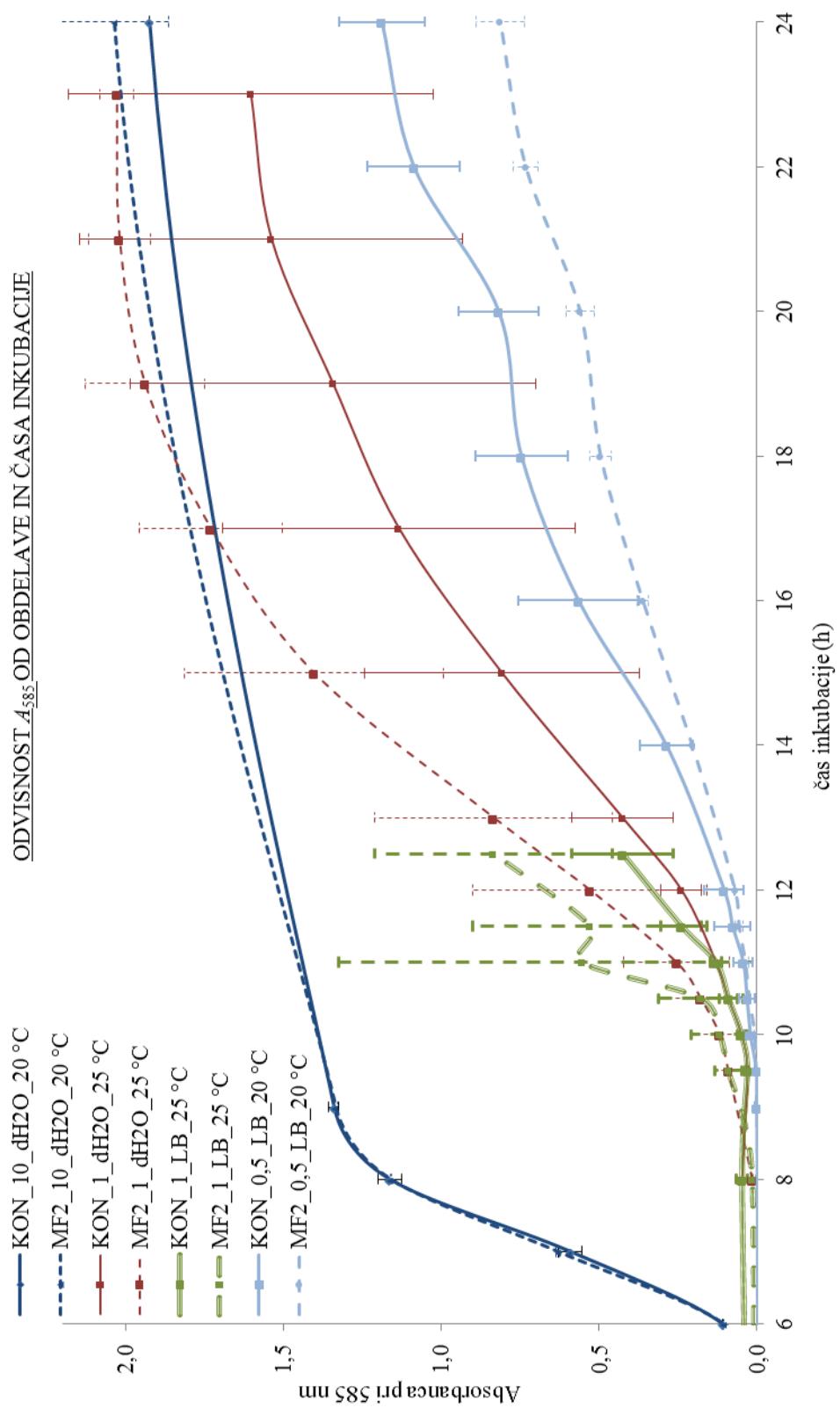
**Table 17:** Repeatability of medium preparation on plates  $2r = 90$  mm and  $A_{585}$  measurement 15 hours after incubation of KON at 20 °C; 4 h at 4 °C.

opisna statistika	N=14	N=8
AVG A (/)	0,272	0,267
SD (/)	0,043	0,048
SE (/)	0,012	0,017
RSE (%)	4,2	6,3

RSE meritev absorpcije 14 paralelk KON je  $\pm 4,2\%$ , 8 paralelk pa  $\pm 6,3\%$  (glej pregl. 17).

#### 4.2.2.2 Tekoča gojišča

Vzporedno z gojenjem na velikih ploščah z difuzijsko metodo v jamicah, smo feromonske teste izvajali tudi v tekočih gojiščih. Na sliki 50 so ponazorjene odvisnosti  $A_{585}$  od časa inkubacije dveh paralelk KON in MF2, gojenih v tekočem gojišču LB (glej pregl. G8). Dodali smo 10, 1 oziroma 0,5 µmol/L OHHL ter inkubirali pri 20 oziroma 25 °C. MF2 smo pripravljali v sterilni dH<sub>2</sub>O oziroma v sterilnem gojišču LB. Trije izmed poskusov sicer nakazujejo, da so MF2 hitreje in močneje obarvale kot KON, vendar so med paralelkami velike razlike (glej modre, rdeče in zelene črte na sliki 50). Medtem ko je pri poskusu z 0,5 µmol/L OHHL in inkubaciji pri 20 °C trend ravno nasproten (glej svetlo modre črte na sliki 50).



**Slika 50:** Feromonski testi v tekočih gojiščih.  $A_{585}$  z intervali odstopanj od povprečja dveh paralel KON in MF2.  
**Figure 50:** Pheromone tests in liquid media.  $A_{585}$  with intervals of deviations from average of two parallels of KON and MF2 in liquid medium.

#### 4.2.2.3 Male plošče in male epruvete

Zaradi relativno velikih razlik med paralelkami v tekočih gojiščih smo feromonske teste nadaljevali na trdnih gojiščih. Pri tem smo postopek priprave gojišč na velikih ploščah z difuzijsko metodo v jamicah poenostavili in izboljšali z uporabo malih plošč  $2r = 35$  mm (glej pregl. 18 in G9).

**Preglednica 18:** Ponovljivost priprave gojišča na malih ploščah  $2r = 35$  mm in merjenja  $A_{585}$ ; KON 4 h na 4 °C.

**Table 18:** Repeatability of medium preparation on mini plates  $2r = 35$  mm and  $A_{585}$  measurement: KON 4 h at 4 °C.

št. paralelk	6	9	12
RSE <sub>AVG</sub> (%)	1,85	1,51	1,37
RSE <sub>MIN</sub> (%)	0,59	0,72	0,71
RSE <sub>MAX</sub> (%)	3,01	2,50	1,75

Statistična obdelava petdesetkrat ponovljenega merjenja absorpcije šestih, devetih in dvanajstih paralelk KON kaže, da je povprečna slučajna napaka meritev in priprave šestih paralelk KON  $\pm 1,85$  %, devetih  $\pm 1,51$  % in dvanajstih  $\pm 1,37$  %. Pri tem so po enakem zaporedju navedene minimalne RSE 0,59 %, 0,72 % in 0,71 %, maksimalne RSE pa 3,01 %, 2,5 % ter 1,75 % (glej pregl. 18).

Test občutljivosti CV026 na »informacijo« HHL smo izvedli z devetimi eksperimenti, pri katerih smo primerjali intenziteto absorpcije obdelave z »informacijo« HHL (MF2 in EF1) ter kontrole KON po 18 do 22 urah inkubacije pri 30 °C na malih ploščah ozioroma v malih epruvetah (glej pregl. 19).

**Preglednica 19:**  $A_{585}$  KON in MF2 ozioroma EF1 – male plošče ozioroma male epruvete; 4 h na 4 °C.

**Table 19:**  $A_{585}$  KON and MF2 or EF1 – small plates or small tubes: 4 h at 4 °C.

pogoji poskusa	obdelava	AVG	SD	N	SE	RSE	$A_{MF2}/A_{KON}$	$A_{EF1}/A_{KON}$
		/	/	/	/	%	%	%
0,2 µmol/L HHL 6cH, inkubacija 20 h na 30 °C, male plošče	KON	1,31	0,02	6	0,01	0,6%	97,3	/
	MF2	1,27	0,03	6	0,01	1,0%		
0,2 µmol/L HHL 6cH, inkubacija 22 h na 30 °C, male plošče	KON	1,45	0,05	6	0,02	1,4%	99,5	/
	MF2	1,44	0,04	5	0,02	1,3%		
0,2 µmol/L HHL 6cH, inkubacija 18 h na 30 °C, male plošče	KON	1,10	0,02	6	0,01	0,6%	99,0	/
	MF2	1,09	0,02	6	0,01	0,6%		
0,2 µmol/L HHL, EF1, inkubacija 18 ur na 30 °C, male plošče	KON	0,53	0,02	6	0,01	1,4%	/	108,4
	EF1	0,57	0,02	6	0,01	1,6%		
0,2 µmol/L HHL, EF1, inkubacija 18 h na 30 °C, male plošče	KON	0,59	0,01	6	0,00	0,5%	/	99,0
	EF1	0,58	0,03	6	0,01	1,9%		
0,2 µmol/L HHL, EF1, inkubacija 18 ur na 30 °C, male epruvete	KON	0,46	0,02	5	0,01	2,0%	/	101,4
	EF1	0,47	0,03	5	0,02	3,3%		

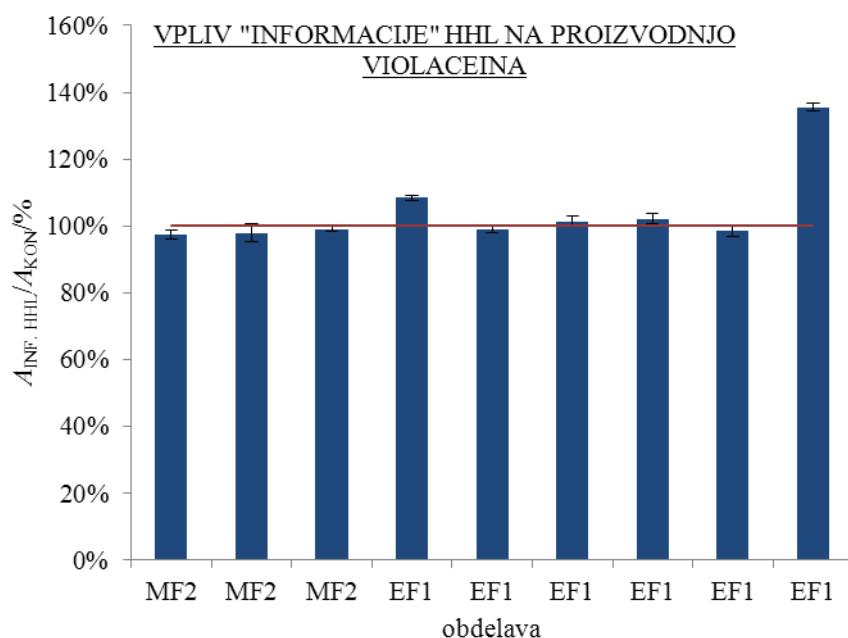
se nadaljuje

nadaljevanje

**Preglednica 19:**  $A_{585}$  KON in MF2 oziroma EF1 – male plošče oziroma male epruvete; 4 h na 4 °C.

**Table 19:**  $A_{585}$  KON and MF2 or EF1 – small plates or small tubes: 4 h at 4 °C.

0,2 µmol/L HHL, EF1, inkubacija 18 ur na 30 °C, male epruvete	KON	0,46	0,02	5	0,01	1,5%	/	102,0
	EF1	0,47	0,03	5	0,02	3,3%	/	
0,2 µmol/L HHL, EF1, inkubacija 18,5 ur na 30 °C, male epruvete	KON	0,55	0,04	8	0,01	2,6%	/	98,6
	EF1	0,55	0,03	8	0,01	1,6%	/	
0,2 µmol/L HHL, EF1, inkubacija 18,5 ur na 30 °C, male epruvete	KON	0,40	0,01	8	0,00	1,0%	/	135,6
	EF1	0,55	0,03	8	0,01	1,6%	/	



**Slika 51:** Feromonski testi na malih ploščah in v malih epruvetah. Razmerja med  $A_{585}$  MF2 oziroma  $A_{585}$  EF1 in KON z intervali SE; N=5-8.

**Figure 51:** Pheromone tests on small plates and in small tubes. Ratios between  $A_{585}$  MF2 or EF1 and  $A_{585}$  KON with SE intervals; N=5-8.

Razmerja med  $A_{585}$  MF2 oziroma EF1 in  $A_{585}$  KON po 18 do 22 urah inkubacije na sliki 51 so približno enaka 100 %. Rezultati kažejo, da so feromonski testi s feronom HHL po 18 urah inkubacije pri 30 °C relativno ponovljivi, pri tem pa bakterije »informacije« HHL večinoma niso zaznale, saj zaradi tega niso povečale proizvodnje violaceina.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

#### 5.1.1 Kemijsko-fizikalne lastnosti epitaksično vtisnjenih struktur

Predpostavili smo, da se kemijsko-fizikalne lastnosti vodnih raztopin po obdelavi z mehanogeno oziroma elektrogeno epitaksijo spremenijo in te spremembe lahko opazimo na UV-VIS spektrih, izločanju violaceina, ki ga sproži sistem za zaznavanje kvoruma pri indikatorskih bakterijah *Chromobacterium violaceum* CV026, ter z meritvami prevodnosti. Pri tem je mehanogena epitaksija metoda, s katero strukturo donorne substance (izhodne snovi) prek izmeničnega redčenja in mehanskih tresljajev predvidoma prenesemo v sprejemno tekočino. Pri elektrogeni epitaksiji pa prenos »informacije« v sprejemno tekočino predvidoma poteka prek električnih impulzov (Jerman in sod. 2005) (glej sl. 14).

Prva metoda, ki smo jo uporabili za preverjanje delovne hipoteze, je UV-VIS spektroskopija. Rao in sodelavci (2007) so namreč UV-VIS spektroskopijo uporabili kot orodje pri ugotavljanju razlik med z mehanogeno epitaksijo obdelanimi in neobdelanimi raztopinami. Objavili so UV-VIS spekture z mehanogeno epitaksijo obdelanih NaCl 6cH, 12cH in 30cH v 95 % etanolu ter spekter neobdelanega 95 % etanola. Spektri se v območju med 200 in 400 nm znatno razlikujejo tako med posameznimi redčenji kakor tudi glede na neobdelan 95 % etanol; pri tem NaCl 6cH pomeni, da so NaCl šestkrat izmenoma redčili ena proti sto in dinamizirali (močno tresenje). Ugotovili smo, da se spekter neobdelanega etanola, ki so ga objavili, ne ujema s podatki v literaturi (Silverstein in Bassler 1967).

Z mehanogeno in elektrogeno epitaksijo smo v 70 % etanolu pripravili po tri paralelke obdelav KON, MK, EV in EK ter posneli UV-VIS spekture (RSE desetih ponovitev snemanj spektrov je bila največ  $\pm 0,5\%$ ); pri tem je KON kratica za neobdelano kontrolo, MK kratica za KCl 12cH, EV in EK pa kratici za z elektrogeno epitaksijo vtisnjeni »informaciji« vode in KCl. Ugotovili smo, da med UV-VIS spektri obdelav v 70 % etanolu ni bistvenih razlik (glej sl. F5). Prepostavljamo, da bi raziskave lahko nadaljevali v vodnih raztopinah KMnO<sub>4</sub> ali K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. Absorpcijski spekter etanola se namreč delno nahaja v območju, ki ga z običajnim spektrofotometrom ne moremo posneti (Milosavljević 1998), medtem ko sta absorpcijska spektra obeh kalijevih soli v celoti v območju spektrofotometra, od 200 do 800 nm.

Naslednja metoda, s katero smo preverjali delovno hipotezo, je feromonski test s *Chromobacterium violaceum* CV026, pri katerem smo sodelovali dr. Rok Krašovec, Luka Jan in Nada Verdel. Indikatorske bakterije CV026 same ne zmorejo sintetizirati acil homoserin laktonov (AHL), so pa ohranile zmožnost, da kot odgovor na prisotne kratko verižne (C<sub>4</sub> do C<sub>8</sub>) AHL sintetizirajo violacein (McClean in sod. 1997). Zato smo jim v gojišče dodali »informacijo« kratko verižnih AHL in opazovali, ali se bodo kolonije obarvale z vijoličnim pigmentom violaceinom. Uporabili smo dva sintetična kratko verižna

AHL, N-(3-okso-heksanoil)-L-homoserin lakton (OHHL) in N-heksanoil-L-homoserin lakton (HHL). Ugotovili smo, da »informaciji« OHHL in HHL v bakterijah CV026 nista sprožili sistema za zaznavanje kvoruma (glej sl. 44 in pregl. 16 za OHHL). Bakterije ob dodatku »informacije« OHHL oziroma HHL v gojišču namreč niso pričele sintetizirati vijoličnega pigmenta violaceina.

Eksperimente s CV026 smo nadaljevali tako, da smo v vsa gojišča dodali enako koncentracijo OHHL oziroma HHL, nato pa primerjali obarvanje kolonij z in brez dodane »informacije« OHHL oziroma HHL. Spreminjali smo čas temperaturnega stresa, način gojenja bakterij, koncentracijo feromona in izhodiščno raztopino za pripravo obdelav z mehanogeno in elektrogeno epitaksijo. Prekonočno kulturo bakterij smo izpostavili temperaturnemu stresu pri  $4^{\circ}\text{C}$  od nič do 48 ur, ker smo predvidevali, da bo stres povečal njihovo občutljivost na zaznavo »informacije«. Bakterije so namreč prilagojene na višje temperature tropskih in subtropskih predelov (Lichstein in van de Sand 1945). Smrtnost bakterij po 12 urah temperaturnega stresa je bila približno 70 %.

Bakterije smo gojili tako v tekočih kot na trdnih gojiščih. Pri trdnih gojiščih smo najprej uporabili difuzijsko metodo v jamicah po McCleanu in sodelavcih (1997). Vendar smo ugotovili, da je napaka, ki nastane pri pripravi gojišč in merjenju količine violaceina z merjenjem absorpcije pri  $585\text{ nm} \pm 6,3\%$  (glej pregl. 17). Zato smo postopek nekoliko prilagodili in bakterije gojili na malih ploščah ( $2r = 35\text{ mm}$ ), kjer je bila napaka bistveno manjša,  $\pm 1,5\%$  (glej pregl. 18) ter v malih epruvetah (glej pregl. 19). Pri gojenju v tekočih gojiščih smo zaradi pomanjkanja prostora v inkubatorju lahko pripravili največ dve paralelki vsake izmed obdelav. Rezultati, ki smo jih dobili z gojenjem bakterij z difuzijsko metodo v jamicah (glej sl. 46, 48, 49) in v tekočih gojiščih (glej sl. 50) nakazujejo, da so bakterije dodano »informacijo« OHHL morebiti zaznale tako, da so pričele prej in močneje sintetizirati violacein. Vendar pa so intervali standardnih napak preveliki. Rezultati, ki smo jih dobili z gojenjem bakterij na malih ploščah in v malih epruvetah kažejo, da bakterije »informacije« HHL niso zaznale (glej sl. 51).

Tretja metoda, ki smo jo uporabili za preverjanje delovne hipoteze, pa je merjenje prevodnosti. Raziskovalna skupina pod vodstvom Vittoria Elije je v raztopinah, ki so jih pripravili z izmeničnim redčenjem izhodne spojine in mehanskim tresenjem, opazila zanimiv fenomen. Raztopine, ki so jih obdelali z mehanogeno epitaksijo in pustili nekaj časa stati, so imele v primerjavi s kemijsko gledano enakimi raztopinami presežne prevodnosti, presežne entalpije mešanja z NaOH, višje nevtralizacijske točke pri titraciji s HCl oziroma NaOH in spremenjene pH (glej npr. Elia in sod. 2008).

Za namene tega doktorskega dela smo s pomočjo rezultatov meritev na merilniku Marije Bešter-Rogač (MBR) sestavili svoj sistem za merjenje prevodnosti, namenjen razredčenim vodnim raztopinam. Sistem za merjenje prevodnosti MBR je bil uspešno uporabljen v

raziskavah vodnih (Tomšič in sod. 2002, Bešter-Rogač in sod. 2005, Rudan Tasič in sod. 2005, Apelblat in sod. 2006) in ne-vodnih elektrolitskih raztopin (Bešter-Rogač in sod. 2007). Ta sistem je pokazal zanimive rezultate v povezavi z velikostjo konstante celice in temperaturno ter frekvenčno odvisnostjo prevodnosti razredčenih raztopin natrijevega hidrogen karbonata (glej sl. 18 do 21). S temi rezultati smo si pomagali pri izbiri komponent za nakup novega sistema za merjenje prevodnosti.

Da bi preverili delovno hipotezo tega doktorata, smo sestavili ustrezni sistem za merjenje prevodnosti razredčenih vodnih raztopin. Poimenovali smo ga BFK, saj je bil skupna investicija Inštituta Bion in FKKT Univerze v Ljubljani. Pri meritvah prevodnosti s sistemom MBR smo opazili, da so frekvenčne in temperaturne odvisnosti prevodnosti v celicah z višjimi konstantami od  $22/\text{cm}$  bolj izrazite kot v celicah z nižjo konstanto, vendar smo zaradi manjših napak meritev za komponento sistema za merjenje prevodnosti BFK izbrali merilno celico s konstanto  $1,66/\text{cm}$ , ki je glede na podatke v literaturi (Barthel in sod. 1979) bolj primerna za merjenje prevodnosti razredčenih vodnih raztopin. Ker so se frekvenčne odvisnosti prevodnosti kazale kot zelo perspektivne, smo izbrali merilnik s frekvenčnim območjem do  $100\,000 \text{ Hz}$ . Da bi lahko opazovali temperaturne odvisnosti prevodnosti, pa smo sistemu dodali še termostat, ki nam je omogočil relativno natančne meritve pri  $25$  in  $5^\circ\text{C}$ .

Pred preverjanjem delovne hipoteze smo sistemu BFK določili natančnost in ugotovili, da je relativna standardna napaka desetih ponovitev meritev prevodnosti desetih paralelki enaka  $0,7\%$  (glej pregl. B1). S pomočjo umeritvenih krivulj (prevodnost = funkcija koncentracije  $\text{NaHCO}_3$ ) smo potrdili točnost meritev prevodnosti. Naklon umeritvene krivulje pri  $25^\circ\text{C}$  in  $10\,000 \text{ Hz}$  je namreč kljub temu, da smo prevodnost merili v majhnih,  $2,5\text{-mL}$  stekleničkah, primerljiv z objavljenimi podatki v literaturi (Elia in sod. 2007); glej enačbi B1 in B3 Priloge B. Ker se iz stekleničk, v katerih smo raztopine starali, s časom izloča predvsem natrijev oksid (glej pregl. B4 in B5 Priloge B), smo z ICP-MS točno določili koncentracijo natrija v staranih raztopinah. Iz enačb umeritvenih krivulj in ICP-MS analize za natrij smo nato izračunali teoretično prevodnost staranih raztopin,  $\sigma_{\text{UK}}$ . Izmerjene prevodnosti ( $\sigma$ ) smo delili s teoretičnimi v  $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$  in iz koeficientov sklepali, kakšni so presežki prevodnosti. Na ta način smo se izognili primerjavam z negativnimi vrednostmi, saj so v nekaterih primerih presežki manjši od nič. Poleg tega pa smo s tem izničili vpliv stranskih električnih tokov, ki so vplivali na meritve v kovinski termostatski kopeli pri  $5^\circ\text{C}$   $10\,000$  in  $100\,000 \text{ Hz}$ .

Pri merjenju prevodnosti v termostatski kopeli z vodo, ki ima visoko dielektrično konstanto, stranski električni tokovi bistveno znižajo rezultate meritev prevodnosti pri  $10\,000$  in  $100\,000 \text{ Hz}$  (glej sl. B1). Ker je voda na zraku zelo nestabilen sistem, smo destilirani vodi dodali  $10\%$   $\text{NaCl}$  in pazili, da je bila sestava termostatske kopeli pri meritvah prevodnosti svežih in staranih raztopin natrijevega hidrogen karbonata čim bolj

enaka. Frekvenčne učinke smo računali po enačbi 2:  $H_f = 100 \cdot (\sigma_f - \sigma_{120}) / \sigma_{120}$ . Tako smo prevodnost pri frekvencah 1000, 10 000 in 100 000 Hz primerjali z »referenčno« prevodnostjo pri 120 Hz. Pri 25 °C smo merili brez termostata, pri 5 °C pa s termostatsko kopeljo z 10 % NaCl. Frekvenčni učinki svežih raztopin natrijevega hidrogen karbonata so zato pri 25 in 5 °C primerljivi samo pri 1000 Hz, medtem ko so  $\sigma/\sigma_{UK}$  primerljivi pri vseh frekvencah. Bistvene faktorje vpliva na merjenje prevodnosti smo pri vseh eksperimentih primerjali pri 1000 Hz. Ker so koeficineti presežne in izmerjene prevodnosti pri 25 in 5 °C približno enaki, smo sklepali, da so meritve prevodnosti pri 25 °C zanesljive.

Delovno hipotezo doktorata smo najprej preverili z merjenjem prevodnosti svežih raztopin natrijevega hidrogen karbonata. Ugotovili smo, da se prevodnosti raztopin, obdelanih z izmeničnim redčenjem in mehanskim tresenjem ter z močnimi električnimi impulzi po Jermanu in sod. (2005), takoj po obdelavi ne razlikujejo od neobdelane kontrole pri nobeni od frekvenc 25 in 5 °C (glej sl. B6 in preg. B9). Zato smo sledili ugotovitvam Elije raziskovalne skupine in obdelane ter neobdelane raztopine natrijevega hidrogen karbonata starali. Enako kot pri UV-VIS spektroskopiji smo za molekulsko »informacijo« izbrali vodo in kalijev klorid. Raztopine smo hranili v treh različnih volumnih z različnimi stičnimi površinami s steklom glede na volumen. Da bi preverili, kako svetloba, tresenje in agregatno stanje vplivajo na presežek prevodnosti, pa smo raztopine starali na prostem, izpostavljene svetlobi in morebitnemu tresenju (položaj PR), v stiroporu, ovite s plastično termoizolacijsko peno, zakrite pred svetlobo ter zavarovane pred tresljaji (položaj ST), in pri -20 °C (položaj MD).

Iz analize rezultatov merjenja prevodnosti staranih raztopin ne moremo sklepati na bistvene vplive predhodne obdelave raztopin z mehanogeno (izmenično redčenje in mehansko tresenje) in elektrogeno epitaksijo (močni električni impulzi), glej sl. 23, kar je v nasprotju z interpretacijo Elije in sod. (2008). Glede na rezultate našega dela pa sklepamo, da so vzrok za presežne prevodnosti kompleksne lastnosti vode, ki se s časom ob prisotnosti ionov in izključitvenih con ob hidrofilnih površinah samoorganizira v večje strukture.

### **5.1.2 Časovno pogojene spremembe v vodi**

Z merjenjem prevodnosti in analizo z ICP-MS 310 in 370 dni staranih raztopin smo pokazali, da so njihove prevodnosti značilno presežne glede na kemijsko vsebino (glej sl. 27, 35, 36 in 52). Časovno pogojene spremembe v vodi so opazili tudi Lobyshev in sodelavci (1999), ki so ugotovili, da voda oddaja šibko luminiscenco v območju spektra bližnje ultravijolične in vidne svetlobe. Njen eksitacijski spekter je kompleksen in ima dva maksimuma, pri 260 ter 310 nm. Ustrezna emisijska spektra vsebujeta široka trakova pri 360 in 410 nm, ki sta odvisna od precej nenavadnih lastnosti vode. Intenziteta luminiscecence je namreč odvisna od časa skladisčenja vode v zaprtih posodah in od dodatka

sledov luminiscenčnih ter neluminiscenčnih snovi. Po enem tednu skladiščenja na temnem je intenziteta trakov v emisijskih spektrih narasla za 20 %, po dveh do štirih mesecih pa kar za 200 %. Nadaljnje skladiščenje vzorcev pa ni imelo dodatnih spektralnih učinkov. Bistveno povečanje koncentracije nečistoč med skladiščenjem so izključili, saj vzorcem električna prevodnost s časom ni rasla. Pri tem so uporabili destilirano vodo s  $3,6 \mu\text{S}/\text{cm}$ .

Da bi razjasnili morebitno vlogo raztopljenih plinov, so dlje časa skladiščene vzorce vode razplinili, vendar se spekter razplnjene vode ni razlikoval od kontrolnega vzorca. Da bi preverili, če je vzrok v spremenjenih lastnostih vode, so vodi dodali minimalno količino luminiscenčnih in neluminiscenčnih snovi. V razredčenih raztopinah mora biti intenziteta luminiscence linearno odvisna od koncentracije luminiscenčnih aditivov in neodvisna od časa ter dodatek neluminiscenčnih aditivov ne sme povečati luminiscence. V vodnih raztopinah z  $1 \mu\text{mol/L}$  neluminiscenčnega dipeptida pa so opazili dvakrat večjo intenziteto luminiscence v primerjavi s spektrom čiste vode, pri čemer se položaj maksimuma ni spremenil. Skladiščenje te raztopine pet dni na temnem je povečalo intenziteto za 140 %, pri čemer je intenziteta narasla bolj kot v spektru čiste vode, ki so jo skladiščili dva meseca. Zato so spremembe v intenziteti luminiscence razložili s strukturnim polimorfizmom vode oziroma njenom sposobnostjo samoorganizacije.

### 5.1.3 Vzrok za presežne prevodnosti

Rezultati so pokazali, da so prevodnosti v enaki meri presežne tako pri raztopinah, obdelanih z izmeničnim redčenjem in močnim mehanskim tresenjem, ter pri raztopinah, obdelanih z električnimi impulzi, kot pri neobdelanih kontrolah (glej sl. 23 in 41). Rezultati so podobni ugotovitvam Holandina in sodelavcev (2008), ki so primerjali časovno odvisnost električne prevodnosti destilirane vode, obdelane z izmeničnim redčenjem vinkristinskega sulfata in mehanskim tresenjem, z inertno, neobdelano destilirano vodo. Ugotovili so, da se električna prevodnost obej s časom enakomerno spreminja. Zaključili so, da fizikalno-kemijske lastnosti destilirane vode, predvidoma obdelane v »informacijo« vinkristinskega sulfata, lahko opišejo s kemijskimi in difuzivnimi mehanizmi, značilnimi za inertno, neobdelano destilirano vodo. Holysz in sodelavci (2007) pa so z meritvami električne prevodnosti in mase izhlapele vode ugotovili nasprotno, da magnetna polja značilno vplivajo na električno prevodnost elektrolitskih raztopin in količino izhlapele vode. Učinki so odvisni od narave ionov in so proporcionalni z debelino hidratacijskega ovoja ionov ter termodinamsko funkcijo hidratacije. Nižja, kot je entropija hidratacijskega ovoja iona, manjša je sprememba prevodnosti po izpostavitvi magnetnemu polju. Iz tega sklepajo, da magnetno polje uredi strukturo vode v hidratacijskem ovoju ionov. Učinki električnih in magnetnih polj bi torej lahko vplivali na električno prevodnost.

Ugotovili smo, da so prevodnosti pri  $1000 \text{ Hz}$  raztopin, ki jih obdelamo ob različnih časih in staramo enako dolgo (310 dni), ponovljive ( $p = 0,887$ ); glej sl. 22. Medtem ko se

frekvenčni učinki (H) bistveno razlikujejo ( $p < 0,001$ ); glej sl. 24. Zato frekvenčnih učinkov nismo združili v skupno sliko, primerjali pa smo jih po posameznih pripravah – raztopine z različnimi volumeni staranja posebej in raztopine z različnimi položaji staranja posebej. Relativne standardne napake frekvenčnih učinkov 28 meritev posamezne priprave namreč niso bile večje od 4,5 %.

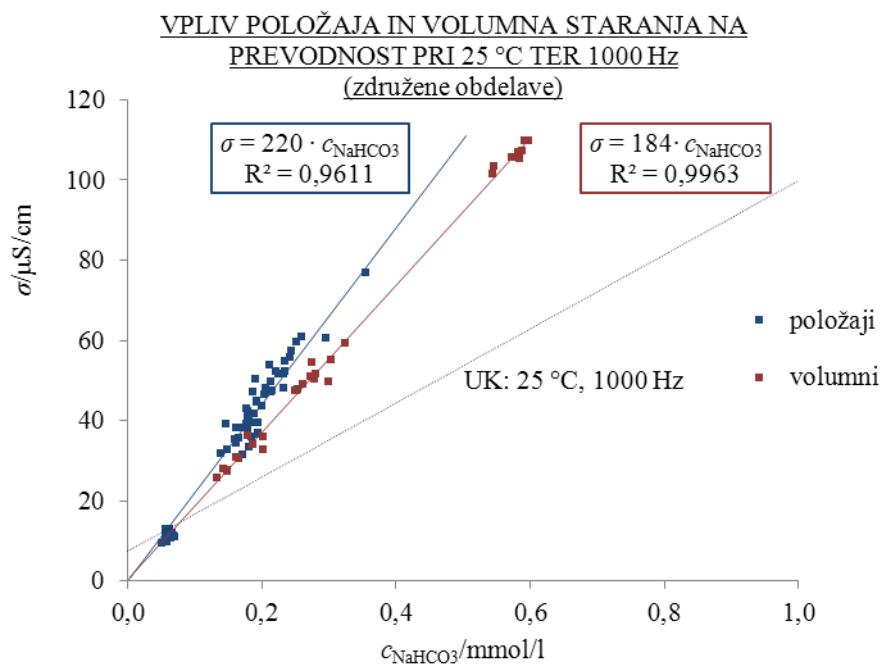
Izmerjene prevodnosti vseh priprav v odvisnosti od vsebnosti natrijevega hidrogen karbonata pri 25 °C in 1000 Hz smo primerjali v sliki 52. Prevodnosti točk na sliki 52, ki se nahajajo nad umeritveno krivuljo (UK), so presežne. Iz enačb trendnih črt, ki povezujejo točke različnih volumnov in položajev staranja lahko sklepamo, da so presežne prevodnosti premo sorazmerne s koncentracijo NaHCO<sub>3</sub>. Če združimo modre, rdeče in zelene točke različnih volumnov staranja na sliki 27 (v sliki 52 označene z rdečo) in skoznje narišemo premico skozi presečišče na sliki 52, dobimo naslednjo enačbo z  $R^2 = 0,9963$ :

$$\sigma = 184 \cdot c_{\text{NaHCO}_3} \quad \dots(5)$$

Če združimo modre, rdeče in zelene točke različnih položajev staranja na sliki 35 (na sliki 52 označene z modro), pa skoznje narišemo premico, ki teče skozi presečišče slike 52 in ima naslednjo enačbo z  $R^2 = 0,9611$ :

$$\sigma = 220 \cdot c_{\text{NaHCO}_3} \quad \dots(6)$$

Iz enačb 5 in 6 lahko sklepamo, da je izmerjena prevodnost premo sorazmerna koncentraciji NaHCO<sub>3</sub> v raztopinah. Večja, kot je koncentracija natrijevega hidrogen karbonata, večje so tako izmerjene kot presežne prevodnosti (glej sl. 52).



**Slika 52:** Prevodnost svežih (UK) in staranih raztopin v odvisnosti od  $c_{\text{NaHCO}_3}$  – vsi rezultati pri 25 °C in 1000 Hz. Staranje 310 dni v 2 mL pri različnih položajih: PR, ST in MD (modro) ter 370 dni v različnih volumnih: 2 mL, 5 mL in 10 mL (rdeče). Prevodnost nad UK je presežna.

**Figure 52:** Conductivity of fresh (UK) and aged solutions in dependence of  $c_{\text{NaHCO}_3}$  – all results at 25 °C and 1000 Hz. Ageing for 310 days in 2 mL at different positions: PR, ST and MD (blue) and ageing for 370 days in different volumes: 2, 5 and 10 mL (red). Conductivity above CC is excess.

Rezultati (glej sl. 52 in enačbi 5 ter 6) kažejo, da so izmerjene in presežne prevodnosti premosorazmerne s koncentracijo v vodi raztopljenih ionov. Kako pa ioni vplivajo na sposobnost samoorganizacije vode? Če vodi dodamo ione, se ji poveča viskoznost (Jenkins in Marcus 1995), kar so potrdili Mancinelli in sodelavci (2007) z nevronsko difrakcijo. Njihovi rezultati namigujejo na to, da ioni povečajo moč vodikovih vezi med molekulami vode. Meritve Omte in sodelavcev (2003) z ultra hitro IR črpalko s sondom pa kažejo nasprotno, da ioni nimajo nobenega vpliva na rotacijsko dinamiko molekul vode. Torej niti ne zmanjšajo moči mreže vodikovih vezi niti je ne povečajo. Turton in sodelavci (2008) so z merjenjem ultra hitrih optičnih Kerr učinkov in dielektrične relaksacijske spektroskopije pojasnili diametalno različne rezultate rotacijskega in translacijskega gibanja molekul vode. Rezultati so pokazali, da se elektrolitske raztopine obnašajo kot podhlajena tekočina, ki se z večanjem koncentracije ionov približuje steklastemu prehodu, v katerem so rotacijska in translacijska gibanja nepovezana. Medtem ko so rotacijska gibanja molekul neodvisna od koncentracije soli, so translacijska gibanja z večanjem koncentracije soli vse bolj nehomogena. Pri koncentraciji steklastega prehoda je gostota gruč tako velika, da se ustavijo in elektrolitsko raztopino spremenijo v steklo. Ioni torej povečajo moč vodikovih vezi med molekulami vode, pri čemer molekule še vedno prosto rotirajo.

Vybíral in Voráček (2007) sta s statično metodo torzije in z dvema dinamičnima metodama (metoda torzijske oscilacije in metoda malih žogic, ki padajo v vodo pod pogoji laminarnega toka) opazila, da voda, ki jo dlje časa pustimo stati, rahlo polimerizira, oziroma pridobi avtotiksotropne lastnosti. Tega fenomena v deionizirani vodi nista opazila, zato sta sklepala, da je bistvena prisotnost ionov. Predvidevata, da ioni na neki način povežejo molekule vode v gruče makroskopskih razsežnosti. Učinek se je namreč v nasprotju z Lobyshevimi opazovanji povečal v prevreti vodi, iz katere sta izčrpala pline, ki bi v nasprotnem primeru prekinjali mrežo vodikovih vezi. Električna prevodnost sveže vode je bila 5,6  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , po petih tednih pa ji je prevodnost pri 25 °C narasla na 30,5  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Odvisnost avtotiksotropnih lastnosti od prevodnosti nista zaznala.

Vpliv ionov na presežno prevodnost je v nasprotju z delovno hipotezo doktorata (predpostavili smo, da na presežno prevodnost vpliva obdelava z mehanogeno oziroma elektrogeno epitaksijo). Kako pa vplivajo različni položaji staranja?

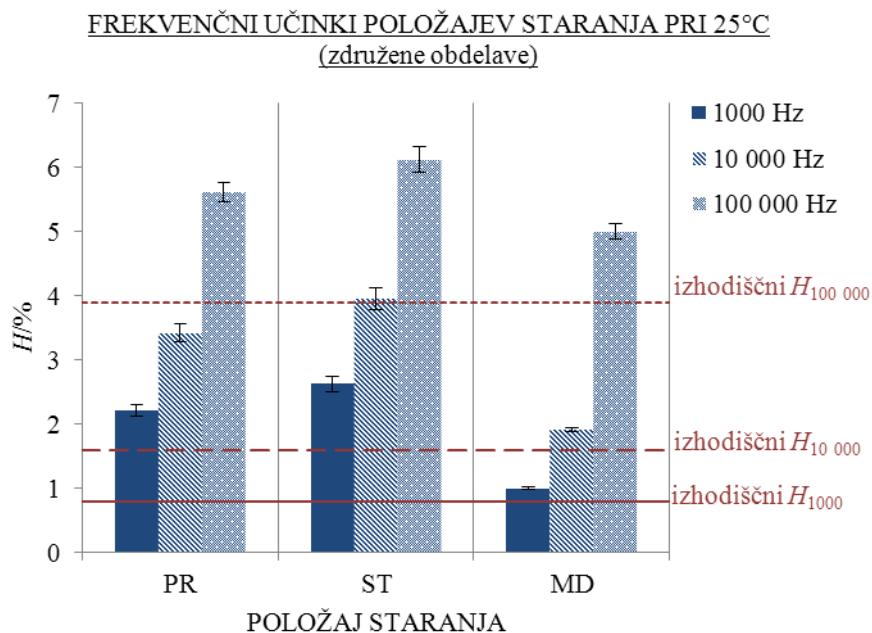
### 5.1.4 Vpliv položaja staranja

Pri 25 °C in 1000 Hz so presežki prevodnosti na položaju ST najvišji, znašajo kar 42,6 % izmerjene prevodnosti  $\sigma$ , na položaju PR 41,5 %  $\sigma$ , medtem ko na položaju MD ni presežkov, oziroma so negativni, -17,4 %  $\sigma$ . To pomeni, da je bilo na položaju ST presežnih 20,3  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , na PR 18,0  $\mu\text{S}/\text{cm}$  in na MD – 1,9  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (glej sl. 35 in 52).

Rezultati MD kažejo na to, da se avtotiksotropne lastnosti v zamrznjeni vodi ne morejo vzpostaviti zaradi premajhne mobilnosti molekul. Molekule vode so v trdnem stanju organizirane v rigidno strukturo, ki jim ne omogoča dinamičnosti. Poleg tega so nizke temperature staranja MD skoraj povsem preprečile izluževanje natrija iz stekla. Medtem ko se je iz stekleničk položaja MD po tristodesetih dneh izlužilo povprečno 0,01 mmol/L natrija  $\pm$  1,8 % (RSE), se je iz stekleničk položaja ST več kot desetkrat več, 0,16 mmol/L  $\pm$  5,5 %, in položaja PR 0,14 mmol/L  $\pm$  3,1 %. Ioni pa so bistveni faktorji pri nastanku avtotiksotropnih lastnosti vode (Vybíral in Voráček 2007).

Presežki oziroma  $\sigma$  zakritih stekleničk na položaju ST so po oceni linearnega mešanega modela ( $p < 0,05$ ) rahlo, vendar značilno višji kot presežki svetlobi izpostavljenih stekleničk na položaju PR; glej sl. 37. a). Pri tem je linearni mešani model upošteval povprečje vseh obdelav, frekvenc in obeh temperatur. Pri položaju staranja ST smo stekleničke zavili v termoizolacijsko peno in pokrili s stiroporom, pri PR pa smo jih postavili na polico v laboratoriju, kjer so bile izpostavljene svetlobi in občasnim tresljajem laboratorijskih naprav. Podoben trend kot  $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$  položajev staranja kažejo tudi njihovi frekvenčni učinki.

Frekvenčni učinki so na vseh položajih staranja po 310 dneh višji kot prvi dan po obdelavi (glej pregl. E24 in sl. 53). Spremembe so največje pri položaju ST, ki ima največje presežke prevodnosti, sledijo frekvenčni učinki položaja PR, ki ima druge najvišje presežke prevodnosti, minimalne spremembe pa so pri položaju MD, kjer presežkov prevodnosti nismo izmerili.



**Slika 53:** Vpliv položajev staranja na frekvenčne učinke pri 1000 (polno), 10 000 (črtasto) in 100 000 Hz (pikčasto) 25 °C z intervali SE pri združenih obdelavah. Prevodnost merjena prvi (izhodiščni  $H$ ) in 310. dan staranja PR, ST in MD; N [/] PR: 28, ST: 20, MD: 20.

**Figure 53:** Influence of ageing position on frequency effects  $H$  at 1000 (filled), 10 000 (striped) and 100 000 Hz (dotted) 25 °C with SE intervals when treatments are united. Conductivity measured the first (starting point  $H$ ) and 310<sup>th</sup> day on PR, ST and MD; N [/] PR: 28, ST: 20, MD: 20.

Drugi bistven faktor vpliva na  $\sigma/\sigma_{UK}$  pri 1000 Hz je volumen staranja (glej sl. 52).

### 5.1.5 Vpliv hidrofilnih površin

Presežki prevodnosti pri staranju 370 dni na prostem znašajo v 2 mL raztopinah 43,3 %  $\sigma$ , v 5 mL 36,2 %  $\sigma$  in v 10 mL 26,9 %  $\sigma$ . To pomeni, da smo v raztopinah, ki smo jih starali v 2 mL izmerili povprečno 46,0  $\mu\text{S}/\text{cm}$  presežne prevodnosti, v 5 mL 18,6  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , v 10 mL pa 8,3  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (glej sl. 27 in 52). Pri tem je bilo za izločanje ionov bistveno razmerje med stično hidrofilno površino s stekлом in volumnom staranja ( $S/V$ ), ki je največje v 2 mL raztopinah, 4,0/cm, v 5 mL je 2,6/cm, v 10 mL pa 2,1/cm. Iz linearnosti premice ( $R^2 = 0,999$ ) na sliki 29 lahko sklepamo, da večje, kot je razmerje  $S/V$ , večji so presežki prevodnosti:

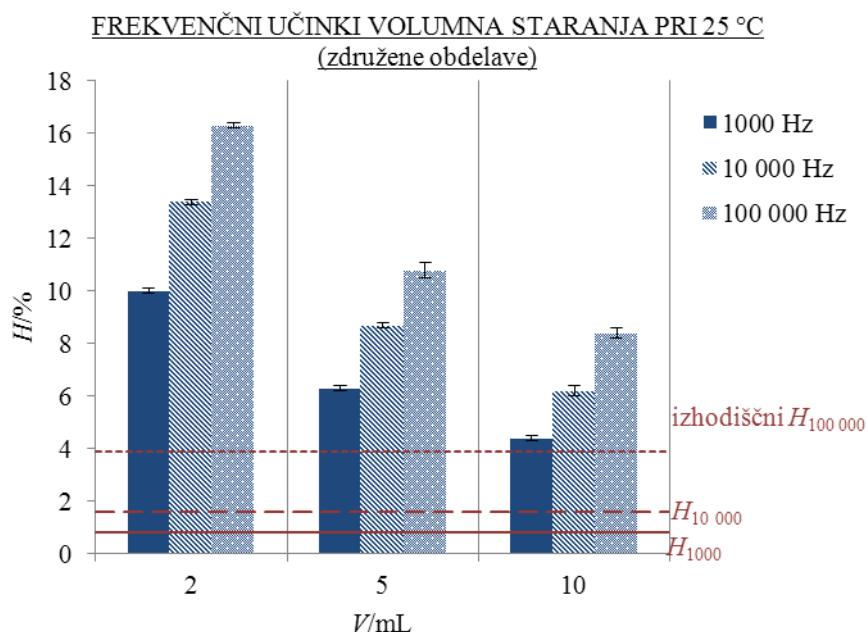
$$\sigma_p = 20 \cdot S/V - 33 \quad \dots(7)$$

Razmerje  $S/V$  nam pove, kolikšen del raztopine meji na hidrofilno površino stekla in se nahaja v »mejni« oziroma izključitveni coni (Zheng in Pollack 2003). Sklepamo, da hidrofilne površine zaradi urejanja vode vplivajo na povečanje prevodnosti. Guckenberger in sodelavci (1994) so namreč ugotovili, da ima tanka plast vode tik ob hidrofilnih

površinah nenavadno visoko prevodnost, kar za pet redov velikosti višjo od prevodnosti večinske vode. Vzrok za povečano prevodnost so pripisali protonskemu hip-hop mehanizmu vzdolž vodnih molekul, urejenih ob hidrofilnih površinah.

Protonski tok je pomemben tudi pri prevodnosti kolagena, ki predstavlja 70 % vezivnega tkiva in je najbolj razširjen protein v živalskem svetu. Fullerton in Amurao (2006) sta s pomočjo NMR ugotovila, da je voda v kolagenu strukturirana v verige vzdolž kolagenskih vlaken in se prilega zavojem trojne vijačnice. Strukturirana voda ob kolagenu pa podpira skokovito prevajanje protonov, kar je posredno z dielektričnimi meritvami potrdil Sasaki (1984). Sasaki je namreč ugotovil, da je prevodnost kolagena odvisna od količine hidratacijske vode. Pri tem se je kolagenu najbolj povečala prevodnost pri 310 K, kar je normalna temperatura našega telesa.

Enak trend kot pri presežnih prevodnostih opazimo tudi pri frekvenčnih učinkih (glej sl. 54 in pregл. D5 z združenimi obdelavami). Frekvenčni učinki pri staranju na prostem v 2 mL so namreč značilno večji kot v 5 mL in 10 mL.



**Slika 54:** Vpliv volumna staranja na frekvenčne učinke pri 1000 (polno), 10 000 (črtasto) in 100 000 Hz (pikčasto) 25 °C z intervali SE pri združenih obdelavah. Prevodnost merjena prvi (izhodiščna  $H$ ) in 370. dan v 2 mL, 5 mL in 10 mL; N [ / ] 2 mL: 8, 5 mL: 10, 10 mL: 10.

**Figure 54:** Influence of volume upon ageing on frequency effects at 1000 (filled), 10 000 (striped) and 100 000 Hz (dotted) 25 °C with SE intervals when treatments are united. Conductivity measured the first (starting point  $H$ ) and 370<sup>th</sup> day in 2, 5 and 10 mL; N [ / ] 2 mL: 8, 5 mL: 10, 10 mL: 10.

Razlike med frekvenčnimi učinki torej lahko pripisemo staranju v različnih volumnih in merjenju prevodnosti pri različnih frekvencah (1000, 10 000 in 100 000 Hz).

Primerjali smo tudi frekvenčne učinke svežih in staranih raztopin z enako koncentracijo  $\text{NaHCO}_3$  in ugotovili, da so vsi frekvenčni učinki staranih raztopin bistveno višji od svežih z enako koncentracijo  $\text{NaHCO}_3$ . Korelacije med frekvenčnimi učinki staranih in svežih raztopin z enako koncentracijo natrija opisujejo naslednje linearne enačbe premic v sliki 32 z odstopanjem od linearnosti  $R^2$ :

$$S/V = 4,0/\text{cm}: H_{\text{STARAN}} = 1,9 \cdot H_{\text{SVEŽ}} + 6,2; R^2 = 0,9652 \quad \dots(8)$$

$$S/V = 2,6/\text{cm}: H_{\text{STARAN}} = 1,5 \cdot H_{\text{SVEŽ}} + 4,7; R^2 = 0,9287 \quad \dots(9)$$

$$S/V = 2,1/\text{cm}: H_{\text{STARAN}} = 1,3 \cdot H_{\text{SVEŽ}} + 3,2; R^2 = 0,9563 \quad \dots(10)$$

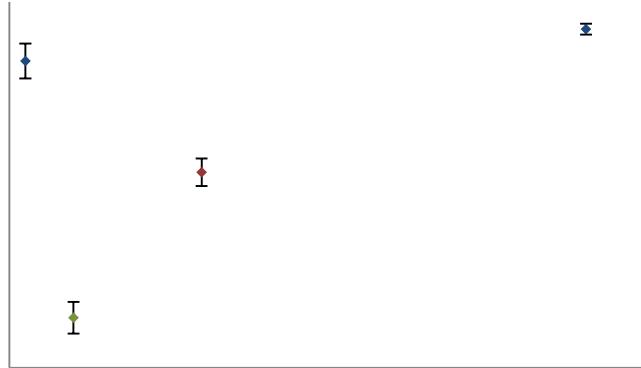
Kakšni pa so presežki prevodnosti glede na temperaturo merjenja prevodnosti?

### 5.1.6 Vpliv temperature

Koeficienti presežne in izmerjene prevodnosti,  $\sigma_p/\sigma_{1000}$ , staranih raztopin na položajih PR in ST imajo pri 1000 Hz podobne vrednosti pri 25 in 5 °C ( $p = 0,734$ ) (glej sl. 39 in pregl. E11). Glede na to lahko sklepamo, da so meritve prevodnosti pri 25 °C brez termostatske kopeli dovolj zanesljive.

### 5.1.7 Vpliv raztopljenega $\text{CO}_2$

Raztopine smo starali z razmerji med volumnom zraka nad raztopino in volumnom raztopine ( $V_{\text{ZRAK}}/V_{\text{RAZTOPINA}}$ ) od 0,25 do 9 (glej pregl. B10). Ugotovili smo, da koeficienti izmerjene in teoretične prevodnosti,  $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$ , pri 25 °C in 1000 Hz raztopin, staranih na položaju PR, niso odvisni od razmerja med volumnom zraka nad raztopino in volumnom raztopine (glej sl. 55). Iz tega sklepamo, da absorpcija  $\text{CO}_2$  ni bistveno vplivala na nastanek presežnih prevodnosti.



**Slika 55:** Koeficienti  $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$  v odvisnosti od razmerja med volumnom zraka in volumnom raztopine ( $V_{\text{ZRAK}}/V_{\text{RAZTOPINA}}$ ) med staranjem 310 oziroma 370 dni na položaju PR. Prevodnost merjena pri 25 °C in 1000 Hz z intervali SE; obdelave so združene. Začetek ordinate je pri 130 %. N [/]: 0,25 mL/mL: 28, 1 mL/mL: 10, 3 mL/mL: 10, 9 mL/mL: 8.

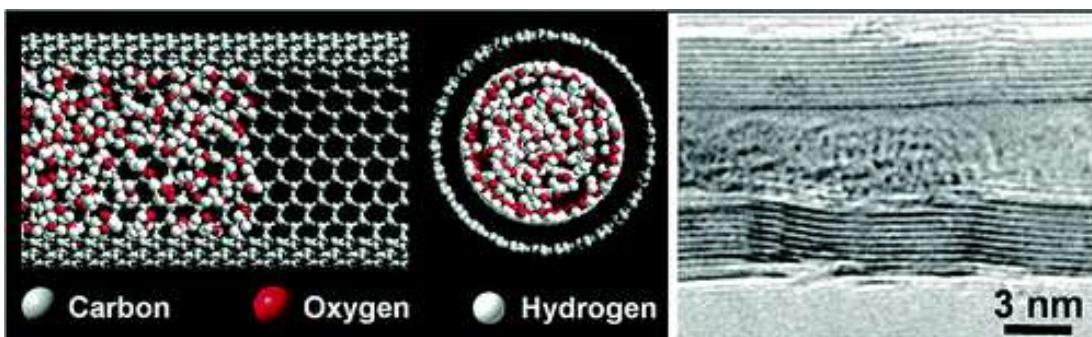
**Figure 55:** Coefficients  $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$  according to the ratio between volume of air and solution ( $V_{\text{AIR}}/V_{\text{SOLUTION}}$ ) during 310 or 370 days of ageing under the condition PR. Conductivity measured at 25 °C and 1000 Hz with SE intervals (treatments united). Ordinate starts at 130 %. N [/] 0,25 mL/mL: 28, 1 mL/mL: 10, 3 mL/mL: 10, 9 mL/mL: 8.

### 5.1.8 Ali so rezultati uporabni tudi v biologiji?

Predvidevamo, da je avtotiksotropija vode, ki jo nakazujejo presežne prevodnosti staranih vodnih raztopin, razlog za nastanek življenja. Po Pollacku in sodelavcih (2009) naj bi življenje namreč nastalo z združevanjem molekul oziroma koalescenco s pomočjo sončne energije. Avtotiksotropija vode bi lahko bila tudi razlog za obstoj organizmov, kot so na primer meduze, ki so sestavljene iz 10 % gradnikov in kar 90 % vode. Na ta način voda, ki se nahaja med gradniki, ne izteče iz meduze. Predvidevanja bi vsekakor morali potrditi z nadaljnji eksperimenti (glej 5.1.8), s katerimi bi preverili avtotiksotropijo vode in njen morebitno podobnost s pojavom izključitvenih con, ki jih je Pollackova raziskovalna skupina opazila v vodi ob hidrofilnih gelih (Zheng in sod. 2006). V nadaljevanju navajamo nekaj zanimivih odkritij, ki bi lahko nakazovali uporabnost urejene (avtotiksotropne) vode v biologiji in zaključimo z ekstrapolacijo naših rezultatov na razmerje med površino in volumnom v celici.

Leta 2004 se je zgodil preboj pri raziskovanju strukture vode, ko so Naguib in sodelavci vodo ujeli v karbonske nanocevke. Slike, posnete s TEM in molekulske simulacije kažejo, da ima voda v nanometrskih prostorčkih čudne lastnosti in povsem novo obnašanje. Medtem ko se voda v nanocevkah s premerom 100 nm obnaša kot v kapilarah, pa v

nanocevkah s premerom 2 do 5 nm ne naredi običajnega meniskusa na meji z zrakom. Molekule vode ne interagirajo s steno nanocevke, ampak samo med seboj, zato med tekočo vodo in steno ostane praznina (glej sl. 56). To odkritje je odprlo za našo raziskavo zanimivo vprašanje: kakšne so prevodnosti protonov v tako urejeni vodi? Pri tem moramo poudariti, da karbonske nanocevke simulirajo razmere v celici.



**Slika 56:** Levo: HyperChem simulacija vode v nanocevki s premerom 4,07 nm, ki kaže urejanje vode v nanocevki enakega premera kot na sliki TEM. Prevod angl. – slo.: *carbon* – ogljik, *oxygen* – kisik, *hydrogen* – vodik. Sredina: Prečni prerez kaže sloj vode s povečano gostoto na meji med vodo in steno nanocevke. Desno: TEM slika – po obdelavi v avtoklavu v nanocevki opazimo ujetno vodo, ki v 4-nm kanalu ne naredi meniskusa na meji s plinom (Vir: Naguib in sod. 2004).

**Figure 56:** Left: HyperChem simulation of water in a nanotube with a diameter of 4,07 nm, illustrating how water is arranged inside the nanotube of the same diameter as in TEM picture. Middle: Cross-sectional snapshot indicates a high-density layer near the wall but no interaction between water and the nanotube wall. Right: TEM picture - after autoclave treatment, water is observed in the nanotube channels, but it does not show a smooth water–gas interface in the 4-nm channel (Source: Naguib et al. 2004).

Že desetletja znanstveniki predvidevajo, da voda, vezana na površine proteinov in membran, prevaja električni naboj na poseben način. Pozitivna elektrika – pozitivni naboj v obliki protona - gre skozi verigo molekul, povezanih s H-vezmi, brez da bi se proton dejansko premaknil. Prosti proton se poveže s kisikom prve molekule  $H_2O$  v verigi, kar ustvari drugi prosti proton, ki zamenja soseda vse do zadnjega protona na koncu verige (Agmon 1995, Ho 2008: 256-258 str.). Hip hop mehanizem je hitrejši od elektrike v kovinski žici, v kateri se elektroni gibljejo in mnogo hitrejši od prevajanja ionov v vodi z difuzijo. Pri tem pa je seveda pogoj, da so molekule vode urejene. Membrane in površine proteinov pa po ugotovitvah Linga (2001) in Pollackove skupine (Zheng in sod. 2006) uredijo molekule vode v »mikroskopskih« oddaljenostih.

Vzdolž bioloških membran protone premikajo posebni membranski proteini, ki jih imenujemo protonske črpalki. Energijo za prehod protonov na višji energijski nivo protonske črpalke dobijo z oksidacijo hrane ali absorpcijo svetlobe. Pri vračanju v nižje energetsko stanje pa sproščeno energijo encim ATPaza porabi za sintezo ATP. Sintezo ATP torej vodi protonski gradient med dvema deloma protonske črpalke, ki sta ločena z membrano. Predvidevajo (npr. Saenger 1979, Suzuki in Sota 2005, Seibold in sod. 2005, Lee in Krauss 2004 idr.), da so bistveni deli protonskih črpalk strukturirane verige molekul

vode. Saenger (1979) je prvi opazil ciklične mreže s H-vezmi povezanih molekul vode. Nekaj piko sekund obstojne vodne molekule, ki se z vodikovimi vezmi povežejo v ciklične oblike, imajo povečan dipolni moment in delujejo kot protonski prevodni kanali. Suzuki in Sota (2005) sta z molekulskimi simulacijami dokazala obstoj cikličnih obročev molekul vode, povezanih z vodikovimi vezmi, med vodami hidratacijskega ovoja in hidroksilnimi skupinami na sladkorju  $\beta$ -ribofuranaza. Seibold in sodelavci (2005) pa so našli 23 Å dolgo vodno verigo v fotosintetskem centru *Rhodobacter sphaeroides*. Če so jo prekinili, so zmotili delovanje celotnega proteinskega kompleksa.

Podrobneje so preučili protonsko žico membranskega proteina bakteriorodopsina (bR). Kristalografske študije (Luecke in sod. 1999, Sass in sod. 2000) in simulacije molekulske dinamike (Baudry in sod. 2001, Grudinin in sod. 2005) so pokazale, da je v notranji votlini zunajcelične polovice bR več urejenih verig molekul vode. Proton se pomika od Schiffove baze, ki se nahaja v celici, do aspartatnega preostanka (Asp85), ki leži zunaj celice. Pred vezavo na Asp85 je proton vezan na neznano skupino, za katero Lee in Krauss (2004) v skladu z ugotovitvami Furutanija in sodelavcev (2005) potrjujeta, da je urejena veriga molekul vode. Rodopsin namreč deluje kot protonska črpalka le, če vsebuje strukturirano verigo molekul vode. Z dodatkom strukturiranih molekul k mutantu kloridne črpalke halorodopsina se njegova funkcija iz kloridne spremeni v protonsko črpalko.

Simulacija Hummerja in sodelavcev (2001) je pokazala, da se karbonska nanocevka, zgrajena iz ene stene z dolžino 1,34 nm in premerom 0,81 nm, v trenutku napolni z okoliško vodo. V njej je cel čas simulacije (66 ns) navzoča veriga petih molekul vode. To je presenetljivo, saj je karbon hidrofoben. Kaže, da so tako omejene vodne molekule v povprečju v nižjem energetskem stanju, kot bi bile v večjem prostoru. Zaradi tega je vodi energetsko bolj ugodno, da vstopi v nanocevko. Vodikove vezi med molekulami vode so v nanocevki zaščitene pred spremembami v okolju, zato so bolj stabilne. Le 0,02 % parov vodnih molekul v nanocevki, ki so v neposredni bližini (medsebojna razdalja 0,35 nm), je nevezanih, medtem ko je v večinski vodi ta odstotek znatno višji, 15 %. Vodikove vezi so v nanocevki močno orientirane; njihova povprečna življenska doba je 5,6 ps, v večinski vodi pa 1 ps. Hojeva (2008: 260 str.) meni, da so ti nanokanali, napolnjeni z vodo, dobri prevodniki protonov. Če je na eni strani presežek protonov, bo pozitivna elektrika stekla v manj kot ps, kar je 40-krat hitreje od prevajanja protonov v večinski vodi. Zato bi lahko veriga vodnih molekul v nanocevki simultano prevajala več protonov hkrati. Hojeva (2008: 260 str.) je prepričana, da takšni superprevodni protonski kabli obstajajo v živih organizmih.

Rezultati doktorske disertacije kažejo na to, da so presežki prevodnosti sorazmerni z razmerjem med stično hidrofilno površino in volumnom raztopine. Če bi dimenzije stekleničk (2 mL: 4,0/cm, 5 mL: 2,6/cm in 10 mL: 2,1/cm) ekstrapolirali na razmerja med

površino in volumnom v celici, bi lahko predvidoma sklepali, da so protoni v strukturirani vodi protonskih črpalk celice dejansko »super« prevodni.

### **5.1.9 Nadaljnje raziskave avtotiksotropije vode**

Pri nadalnjih raziskavah avtotiksotropije vode bi deionizirano vodo, nasičeno z ogljikovim dioksidom in kisikom ter vodo z različnimi koncentracijami ionov brez raztopljenih plinov starali v borosilikatnem steklu. Na ta način bi preverili, če so ioni in raztopljeni plini pomembni faktorji vpliva na časovno spreminjanje lastnosti vode. Raztopinam bi dodali mikrosfere in z metodami, ki jih je že uporabila Pollackova raziskovalna skupina (na primer NMR, IR in UV-VIS spektroskopija) opazovali morebitni nastanek izključitvenih con. Raztopinam bi merili prevodnost v večjem frekvenčnem in temperaturnem območju. Na ta način bi lahko zaobjeli lastnosti vode z več zornih kotov. Stranske električne tokove pri meritvah s termostatsko kopeljo bi zmanjšali z uporabo manj viskoznih termostatskih olj. Poleg tega pa bi spremajali razmerja med stično površino s stekлом in volumnom ter tako interpretirali razmere znotraj živih organizmov.

## 5.2 SKLEPI

Iz rezultatov doktorske disertacije povzemamo naslednje sklepe:

1. Sprememb kemijsko-fizikalnih lastnosti vodnih raztopin, ki (predvidoma) nastanejo zaradi obdelave z mehanogeno in elektrogeno epitaksijo, z meritvami prevodnosti, UV-VIS spektroskopijo in feromonskimi testi s *Chromobacterium violaceum* CV026 nismo uspeli potrditi. Predhodna obdelava z mehanogeno in elektrogeno epitaksijo ni imela bistvenega vpliva ne na UV-VIS spektre v 70 % etanolu ne na prevodnost svežih in staranih raztopin NaHCO<sub>3</sub>. Prav tako sama »informacija« feromona OHHL oziroma HHL indikatorskim bakterijam CV026 ni bila dovolj za sprožitev sistema za zaznavanje kvoruma. Medtem ko so razlike v izločanju violaceina med bakterijami, ki smo jim v gojišče dodali izhodni feromon z oziroma brez »informacije« feromona, nekonsistentne. Na velikih ploščah z difuzijsko metodo v jamicah in v tekočih gojiščih so bakterije dodatek »informacije« OHHL v gojišču v večini primerov zaznale tako, da so pričele prej in močnejše sintetizirati violacein. Medtem ko na malih ploščah dodane »informacije« HHL v večini poskusov niso zaznale. Za kakršnekoli sklepe bi morali optimizirati postopke pri delu z bakterijami.
2. Presežkov prevodnosti glede na kemijsko vsebnost v skladu z rezultati Elije in sodelavcev (2008) nismo izmerili takoj po obdelavi, temveč po tem, ko so raztopine nekaj časa stale. To razlagamo s tem, da je voda v tekočem stanju kompleksen dinamičen sistem, ki ima sposobnost samoorganizacije. S samoorganizacijo v večje gruče s časom pridobi avtotiksotropne lastnosti, pri čemer imajo bistveno vlogo ioni in bližina hidrofilnih površin. Večja, kot je bila koncentracija ionov in razmerje med hidrofilno površino ter volumnom, večji so bili presežki prevodnosti.
3. Največje presežke prevodnosti smo izmerili v 2 mL raztopinah, staranih 310 dni na položaju ST in 370 dni na položaju PR ter so znašali 43 % izmerjene prevodnosti. To pomeni, da smo v raztopinah, ki smo jih starali na položaju ST, od 47,6 µS/cm izmerili presežnih 20,3 µS/cm; po 370 dneh staranja na položaju PR v 2 mL pa od 106 µS/cm presežnih 46,0 µS/cm. Tako velikih presežkov prevodnosti ne moremo pojasniti z minimalno prisotnostjo drugih ionov, kot so kalij, magnezij in kalcij, saj so njihove koncentracije ca. desetkrat nižje od natrija, ki smo ga upoštevali pri izračunu teoretične prevodnosti.
4. Sklepamo, da absorpcija CO<sub>2</sub> ni bistveno vplivala na nastanek presežnih prevodnosti, saj so imele raztopine enakega volumna (2 mL) enaka razmerja med izmerjeno in teoretično prevodnostjo ne glede na to, da smo jih starali enkrat v 2,5-, drugič pa v 20-mL stekleničkah z 0,5 oziroma 18 mL zraka nad raztopinami.
5. Pri staranju v zamrzovalniku pri -20 °C raztopine po 310 dneh niso imele presežkov prevodnosti. Predvidevamo da zato, ker voda v trdnem stanju ni dinamičen sistem, saj so molekule premalo mobilne, da bi se lahko povezale v večjo in močnejšo mrežo vodikovih vezi.

## 6 POVZETEK (SUMMARY)

### 6.1 POVZETEK

Delovna hipoteza doktorata je bila naslednja: Kemijsko-fizikalne lastnosti vodnih raztopin se po obdelavi z mehanogeno oziroma elektrogeno epitaksijo spremenijo, kar lahko opazimo z UV-VIS spektroskopijo in meritvami prevodnosti. »Informacija« feromona acil homoserin laktona (AHL) deluje na indikatorske bakterije *Chromobacterium violaceum* CV026 enako kot izhodni feromon (donor »informacije«). Sev CV026 ima namreč okrnjen sistem za zaznavanje kvoruma v tem, da sam AHL ne sintetizira, vendar pa kot odgovor na eksogeno dodani AHL prične sintetizirati vijolični pigment violacein (McClean in sod. 1997). Pri mehanogeni epitaksiji z izmeničnim redčenjem in dinamizacijo (mehanski tresljaji, lahko tudi zvok in vrtljaji) predvidoma prenesemo strukturo izhodne snovi v sprejemno tekočino brez snovnega prenosa in kemijskih reakcij. Pri elektrogeni epitaksiji pa strukturo donorne substance (izhodne snovi) prek električnih impulzov predvidoma prenesemo v sprejemno tekočino (Jerman in sod. 2005).

Z nobeno izmed uporabljenih metod, ne z UV-VIS spektroskopijo in feromonskim testom s CV026 ne z merjenjem prevodnosti, pri pogojih, ki smo jih uporabili, delovne hipoteze nismo potrdili. UV-VIS spektri »informacij« KCl in Mq se ne razlikujejo bistveno od spektra neobdelanega topila, 70 % etanola. Pri feromonskih testih smo kot avtoinducenta uporabili N-heksanoil-L-homoserin lakton (HHL), ki je naravni avtoinducer *Chromobacterium violaceum* (McClean in sod. 1997), in N-(3-okso-heksanoil)-L-homoserin lakton (OHHL). Indikatorski sev *Chromobacterium violaceum* CV026 samo »informacije« OHHL oziroma HHL ni zaznal. Medtem ko so se pozitivne kontrole z dodanim izhodnim OHHL oziroma HHL obarvale vijolično. Delo smo nadaljevali s feromonskimi testi, pri katerih smo primerjali količino violaceina v gojiščih, v katera smo dodali enako koncentracijo izhodnega OHHL oziroma HHL z in brez dodane »informacije« OHHL oziroma HHL. Pri tem smo dobili nekonsistentne rezultate. Pri nekaterih eksperimentih so bakterije »informacijo« feromona »zaznale« in hitreje pričele sintetizirati violacein od kontrolnih kolonij. Medtem ko pri drugih eksperimentih tega nismo opazili. Tudi s spremjanjem pogojev, kot so različna obdobja temperaturnega stresa, različni načini gojenja, v tekočih gojiščih, na velikih ploščah ( $2r = 90$  mm) z difuzijsko metodo v jamicah, na malih ploščah ( $2r = 35$  mm) in v malih epruvetah, ter priprava »informacije« v različnih izhodiščnih raztopinah, nismo dobili jasnih rezultatov. Pri tem smo bakterije, ki so prilagojene na temperature tropskih in subtropskih krajev (Lichstein in Van de Sand 1945), izpostavili nizkim temperaturam zato, ker smo predpostavili, da bodo na ta način postale bolj občutljive za zaznavo »informacij«.

S tretjo metodo, merjenjem električne prevodnosti, smo vodne raztopine natrijevega hidrogen karbonata testirali v odvisnosti od časa, volumna in položaja staranja, predhodne obdelave z mehanogeno in elektrogeno epitaksijo ter frekvence in temperature merjenja

prevodnosti. Pri tem smo na enak način starali in izmerili prevodnost tudi neobdelanim kontrolam. Raztopine smo starali 310 dni v 2 mL in 370 dni v 2, 5 ter 10 mL. Pri tem smo jih 310 dni v 2 mL starali na treh različnih položajih. Na položaju PR smo stekleničke postavili na polico v laboratoriju, s čemer smo jih izpostavili svetlobi in nihanjem v temperaturi. Na položaju ST so bile ovite v termoizolacijsko peno in zaščitene pred svetobo z decimetrskim slojem stiropora ter večjim nihanjem temperature. Na položaju MD pa smo jih starali v zamrzovalniku pri -20 °C.

Pred merjenjem vzorcev smo sistemu za merjenje prevodnosti določili natančnost meritev, ki je bila  $\pm 0,7\%$ . Raztopinam smo izmerili prevodnost pri (100), 120, 1000, 10 000 in 100 000 Hz 25 ter 5 °C. Po končanem merjenju prevodnosti smo raztopinam analizirali vsebnost natrija, kalija, magnezija, srebra in kalcija z ICP-MS (induktivno sklopljeno plazmo z masnim spektrometrom) ter vodikovega peroksida s kemijsko reakcijo s kalijevim permanganatom. Potrdili smo ugotovitve Elije in sodelavcev (2008), da na prevodnost bistveno vplivajo samo natrijevi ioni, ki z vodi raztopljenim ogljikovim dioksidom reagirajo v natrijev hidrogen karbonat. S pomočjo vrednosti za natrij smo raztopinam izračunali teoretične prevodnosti iz enačb umeritvenih krivulj. Umeritvene krivulje smo pripravili s svežimi (največ 24 ur starimi) raztopinami natrijevega hidrogen karbonata pri vseh frekvencah merilnika prevodnosti 25 ter 5 °C.

Ugotovili smo, da se prevodnosti svežih raztopin ne razlikujejo glede na obdelavo z mehanogeno in elektrogeno epitaksijo. Medtem ko smo izmerili presežne prevodnosti glede na prevodnost kemijsko enakih kontrolnih raztopin v vseh staranih raztopinah razen tistih, ki smo jih starali pri -20 °C. Pri tem ni bila pomembna predhodna obdelava z mehanogeno in elektrogeno epitaksijo, kar je v nasprotju s trditvami Vittoria Elije in sodelavcev (2008). Presežki prevodnosti so se v skladu s trditvami Elije in sodelavcev (2008) bolj izrazili pri staranju v manjših volumnih z večjim deležem stične površine s stekлом glede na volumen. Pri staranju 370 dni PR v 2 mL je bilo razmerje med presežno in izmerjeno prevodnostjo 43 %, v 5 mL 36 % in v 10 mL 27 %. Pri tem je  $S/V$  v 2 mL 4,0/cm, v 5 mL 2,6/cm in v 10 mL 2,1/cm. Primerjava rezultatov staranja PR in ST je pokazala, da so presežki prevodnosti na položaju ST (43 % izmerjene prevodnosti  $\sigma$ ) rahlo, ampak značilno višji ( $p = 0,003$ ) kot na položaju PR (41 %  $\sigma$ ). Svetloba, kateri so bile izpostavljene stekleničke pri staranju PR, torej ni bila bistven faktor vpliva na presežno prevodnost.

Rezultati nakazujejo, da so bistven faktor za opažanje presežnih lastnosti, ioni, bližina hidrofilnih površin in čas. Presežne lastnosti smo namreč tako Elia in sodelavci kot mi izmerili šele, ko so raztopine nekaj časa stale. To pa je presenetljivo v skladu z desetletnimi opazovanji Bohumila Vybrála, ki je opazil, da razredčene vodne raztopine soli, ki jih pustimo dlje časa stati, razvijejo *avtotiksotropne* lastnosti (Vybrála 2006, Vybrála in Voráček 2007).

Voda, ki nekaj časa stoji, torej postane zaradi samoorganizacije molekul  $H_2O$  avtotiksotropna, kar pomeni, da se prične obnašati kot gel. Ioni so pri tem pomembni zato, ker povečajo moč vodikovih vezi v vodi (Turton in sod. 2008), hidrofilne površine pa zato, ker ima voda ob hidrofilnih površinah po Zhengu in Pollacku (2003) bolj urejeno strukturo v primerjavi z večinsko. Pri prevajanju natrijevega hidrogen karbonata v vodi imajo namreč bistveno vlogo protoni, ki se v vodi gibljejo v obliki zundelovih kationov po de Grotthusovem mehanizmu. Močnejše, kot so vodikove vezi med molekulami vode, hitreje poteka prenos protonov (Han in sod. 2006). Posledica tega pa je večja prevodnost.

Voda ima mnogotere vloge v biokemijskih procesih. Ohranja strukturo makromolekul, pomaga pri prepoznavanju molekul, aktivira in spreminja dinamiko proteinov ter sestavlja komunikacijske kanale skozi membrane, ki se lahko odpirajo in zapirajo (Ball 2008). Po Frauenfelderju in sodelavcih (2009) so gibanja zunanjih plasti proteinov tesno povezana s spremnjanjem lastnosti večinske vode in gibanja notranjih plasti s spremnjanjem lastnosti njihovih hidratacijskih ovojev. Mnogo lastnosti vode je edinstvenih, zdi pa se povsem verjetno, da bi nekatere funkcije vode v biologiji lahko prevzelo tudi katerokoli drugo polarno topilo, ki lahko tvori vodikove vezi (Ball 2008). Pa vendarle si zelo težko predstavljamo drugo molekulo, ki bi lahko »obula njene čevlje«.

## 6.2 SUMMARY

According to our working hypothesis physico-chemical properties of aqueous solutions change due to mechanical or electrical treatment, which can be shown with UV-VIS spectroscopy and measurements of conductivity and addition of mechanically or electrically imprinted “information” of pheromone to the growth media of indicator bacteria *Chromobacterium violaceum* CV026 triggers their quorum sensing system in the same way as does the addition of the original pheromone. Indicator bacteria CV026 is namely insufficient in synthesizing pheromones by themselves whereas they answer to their exogenous addition with synthesis of purple pigment violacein (McClean et al. 1997). With mechanical treatment, the transfer of “information” supposedly occurs via successive dilutions and dynamizations; during dynamization solutions are treated with vigorous mixing. For electrical treatment, the transfer of “information” occurs via electrical impulses (Jerman et al. 2005).

Under the conditions we used, none of the methods, neither UV-VIS spectroscopy and pheromone tests nor measurements of conductivity, confirmed our working hypothesis. With UV-VIS spectroscopy no differences between “information” of KCl and Mq and untreated analogous control, 70 % ethanol, were found. When “information” of pheromone, N-hexanoil-L-homoserine lactone (HHL), the natural autoinducer of *C. violaceum* (McClean et al. 1997), or N-(3-oxo-hexanoil)-L-homoserine lactone (OHHL), was added to the growth media of bacteria CV026, no staining of the bacterial lawn occurred. Whereas when to the growth media of CV026 original pheromone was added, OHHL or HHL, the typical purple coloring of bacterial lawn with violacein appeared. This means that the “information” of OHHL and HHL alone was not able to trigger the quorum sensing system in CV026. Therefore pheromone tests with equal concentration of OHHL (or HHL) with or without the “information” of OHHL (or HHL) in the growth media of CV026 were performed. Bacteria were grown in liquid media, on agar plates with diffusion method in wells, on small plates and in small tubes and pheromone “information” was prepared in different solutions. We assumed that “information” sensitivity in bacteria is increased by exposure to stress conditions. And for *C. violaceum*, accustomed to tropical and subtropical temperatures (Lichstein and van de Sand 1945), low temperatures are stressful. Therefore the duration of temperature stress at 4 °C was modified as well. In this, inconsistent results were found. Some experiments showed enhanced quorum sensing with increased synthesis of violacein when to the media with OHHL (or HHL) the “information” of OHHL (or HHL) was added, while in other experiments no differences appeared.

The third method we used for testing of our working hypothesis was measuring of the electrical conductivity. Electrical conductivity of aqueous solutions of sodium hydrogen carbonate was tested in dependence of time, volume, ageing position, mechanical and

electrical treatment and frequency and temperature of conductivity measurements. In the same way as the sample solutions, untreated solutions were aged and measured. Solutions of 2 mL were aged for 310 days and 2, 5 and 10 mL for 370 days. The solutions of 2 mL were aged for 310 days under three different conditions. Under condition “PR” vials were placed on a laboratory shelve, exposed to light and relatively large fluctuations of laboratory temperature. Under condition “ST” vials were wrapped into thermo-isolation foam and protected from light and larger temperature oscillations with ten centimeters of isolation material. Under condition “MD” the vials were frozen to  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Before the measurements of samples, the conductivity measurement system was proven to be  $\pm 0.7\%$  accurate. Solutions were measured at (100), 120, 1000, 10,000 and 100,000 Hz 25 and  $5^{\circ}\text{C}$ . After the conductivity measurements were completed, solutions were analyzed for sodium, potassium, magnesium, argentum and calcium with ICP-MS (inductively coupled plasma mass spectrometry) and hydrogen peroxide was determined via chemical reaction with potassium permanganate. The chemical impurity that mainly affects conductivity measurements proved to be  $\text{Na}_2\text{O}$  released by glass, which is in accordance with Elia’s findings (Elia et al. 2008). In contact with water it transforms into sodium hydroxide ( $\text{NaOH}$ ) and in presence of solvated carbon dioxide ( $\text{CO}_2$ ) sodium hydroxide turns into sodium hydrogen carbonate ( $\text{NaHCO}_3$ ). We therefore systematically determined the sodium concentration of the samples and divided the conductivity readings (measured conductivity -  $\sigma$ ) with the contribution of sodium hydrogen carbonate (theoretical conductivity -  $\sigma_{\text{UK}}$ ). Calibration curves for determining the theoretical conductivity were prepared from fresh solutions of sodium hydrogen carbonate at all above mentioned frequencies 25 and  $5^{\circ}\text{C}$ .

We found that on the first day after treatment the conductivity values of solutions subjected to mechanical or electrical treatment did not differ from the chemically analogous untreated solutions. Therefore we aged the treated as well as the untreated solutions and found no differences in conductivity values between aged mechanically (or electrically) treated solutions and aged untreated solutions, whereas all aged solutions had significantly higher conductivity values in comparison to the conductivity of chemically analogous freshly prepared solutions. However, no excess conductivity was found in frozen samples. Therefore we propose that insignificant mobility of water molecules in the solid state, at  $-20^{\circ}\text{C}$ , prevented water molecules from self-organizing. Whereas time-related changes occur in the structure of liquid water where ions and hydrophilic surfaces seem to play an important role.

In accordance to Elia’s statements (Elia et al. 2008) excess conductivities of aged solutions were more pronounced in smaller volumes with higher ratio between glass contact surface and solution volume,  $S/V$ . In 2 mL solutions aged for 370 days the ratios between excess and measured conductivities were 43 %, in 5 mL 36 % and in 10 mL 27 %. Excess

conductivities under condition ST (43 % of measured conductivity  $\sigma$ ) were slightly but significantly higher ( $p = 0,003$ ) than under condition PR (41 %  $\sigma$ ). Daylight, to which vials under condition PR were exposed, was less effective in raising conductivity in comparison to thermo isolation of the vials under condition ST.

Similarly to the measurements of Elia and coworkers, excess conductivities were measured only in solutions left to stand undisturbed for some time, which is surprisingly similar to the observations of Vybíral and Voráček (2007). They found that when water is left to stand undisturbed its properties change and become gel-like. They termed this property *autothixotropy* of water (weak gel-like behavior developing spontaneously over time) and attributed the phenomenon to the self-organization abilities of H<sub>2</sub>O molecules where ions seem to play an important part.

According to the results, we propose that time, ions and the presence of hydrophilic surfaces are important for the occurrence of the autothixotropic phenomenon. According to Turton and coworkers (2008), ions increase the strength of hydrogen bonds between water molecules and according to Zheng and Pollack (2003), next to hydrophilic surfaces water is ordered in much larger distances than previously proposed. The autothixotropic phenomenon plays a major role in proton conducting properties of aged water. Namely, in water the high mobility of protons (and OH<sup>-</sup> ions) under a gradient of electrical potential is explained by the Grotthuss mechanism. For this jumping mechanism, the structuring of water molecules implies faster proton conductivity (Han et al. 2006).

Water plays a wide variety of roles in biochemical processes. It maintains macromolecular structure, mediates molecular recognition, activates and modifies protein dynamics and provides a switchable communication channel across membranes (Ball 2008). Large-scale protein motions are “slaved” to the fluctuations in the bulk solvent whereas internal protein motions are “slaved” to the fluctuations of their hydration shells (Frauenfelder et al. 2009). Many of water properties do seem to depend on the “special” attributes of the H<sub>2</sub>O molecule. Although it seems entirely likely that some of water’s functions in biology are those of generic polar solvent rather than being unique to water itself, it is hard to imagine any other solvent that could fulfill all of its roles (Ball 2008).

## 7 VIRI

- Adonizio A. L., Downum K., Bennett B. C., Mathee K. 2006. Anti-quorum sensing activity of medicinal plants in southern Florida. *Journal of Ethnopharmacology*, 105: 427-435
- Agmon N. 1995. The Grotthuss Mechanism. *Chemical Physics Letters*, 244: 456-462
- Aljadi A. M. in Yusuff K. M. 2003. Isolation and identification of phenolic acids in Malaysian honey with antibacterial properties. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 33: 229-236
- Andrighetti-Frohner C. R., Antonio R. V., Creczynski-Pasa T. B., Barardi C. R., Simoes C. M. 2003. Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98: 843-848
- Ansell S., Barnes A.C., Mason P.E., Neilson G.W., Ramos S. 2006. X-ray and neutron scattering studies of the hydration structure of alkali ions in concentrated aqueous solutions. *Biophysical Chemistry*, 124: 171-179
- Antonio R. V. in Creczynski-Pasa T. B. 2004. Genetic analysis of violacein biosynthesis by *Chromobacterium violaceum*. *Genetics and Molecular Research*, 3: 85-91
- Apelblat A., Bešter-Rogač M., Barthel J. in Neueder R. 2006. An Analysis of Electrical Conductances of Aqueous Solutions of Polybasic Organic Acids. Benzenehexacarboxylic (Mellitic) Acid and Its Neutral and Acidic Salts. *Journal of Physical Chemistry B*, 110: 8893–8906
- Attard P. in Batchelor M. T. 1988. A mechanism for the hydration force demonstrated in a model system. *Chemical Physics Letters*, 149, 2: 206-211
- Attard P. 1996. Bridging Bubbles between Hydrophobic Surfaces. *Langmuir*, 12: 1693
- Attard P. 2003. Nanobubbles and the hydrophobic attraction. *Advances in Colloid and Interface Science*, 104: 75-91
- Ball P. 2008. Water as an Active Constituent in Cell Biology. *Chemical Reviews*, 108, 1: 74–108
- Bakker H. J., Kropman M. F., Omta A. W. 2005. Effect of ions on the structure and dynamics of liquid water. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 17: S3215-S3224
- Barry H. in Diamond J. M. 1984. Effects of unstirred layers on membrane phenomena. *Physiological Reviews*, 64: 763-872
- Barthel J., Wachter R., Gores H.-J. 1979. Temperature dependence of conductance of electrolytes in nonaqueous solutions. V: Modern aspects of electrochemistry No. 13. Conway B. E. in Bockris J. O'M. (ur.). New York in London, Plenum Press: 8 str.
- Baudry J., Tajkhorshid E., Molnar F., Philips J., Schulten K. 2001. Molecular dynamics study of bacteriorhodopsin and the purple membrane. *Journal of Physical Chemistry B*, 105: 905-918
- Bauer W. D. in Robinson J. B. 2002. Disruption of bacterial quorum sensing by other organisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 234-237

- De Beer S. B. A., Vermeulen N. P. E., Oostenbrink C. 2010. The Role of Water Molecules in Computational Drug Design. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 10: 55-66
- Belon P., Elia V., Elia L., Montanino M., Napoli E., Niccoli M. 2008. Conductometric and calorimetric studies of the serially diluted and agitated solutions. On the combined anomalous effect of time and volume parameters. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 93, 2: 459-469
- Bešter-Rogač M., Babič V., Perger T. M., Neueder R. in Barthel J. 2005. Conductometric study of ion association of divalent symmetric electrolytes: I. CoSO<sub>4</sub>, NiSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub> and ZnSO<sub>4</sub> in water. *Journal of Molecular Liquids*, 118: 111-118
- Bešter-Rogač M. in Habe D. 2006. Modern Advances in Electrical Conductivity Measurements of Solutions. *Acta Chimica Slovenica*, 53: 391-395
- Bešter-Rogač M., Hauptman N. in Barthel J. 2007. Conductometric study of ion association of divalent symmetric electrolytes: II. MgSO<sub>4</sub> in water+1,4-dioxane mixtures. *Journal of Molecular Liquids*, 131-132: 29-35
- Bizzarri A. R. in Cannistraro S. 2002. Molecular dynamics of water at the protein-solvent interface. *Journal of Physical Chemistry B*, 106, 26: 6617-6633
- Blainey P. C., Luo G., Kou S. C., Mangel W. F., Verdine G. L., Bagchi B., Xie X. S. 2010. Nonspecifically bound proteins spin while diffusing along DNA. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16, 12: 1224-1229
- Blake T. D. in Kitchener J. A. 1972. Stability of Aqueous Films on Hydrophobic Methylated Silica. *Journal of Chemical Society, Faraday Transactions I*, 68: 1435-1442
- Blosser R. S. in Gray K. M. 2000. Extraction of violacein from Chromobacterium violaceum provides a new quantitative bioassay for N-acyl homoserine lactone autoinducers. *Journal of Microbiological Methods*, 40: 47-55
- Boisbaudran L. D. 1882. Matière colorante se formant dans la colle de farine. *Comptes Rendus*, 94: 562-563
- Borkent B. M., Dammer S. M., Schonherr H., Vancso G. J., Lohse D. 2007. Superstability of Surface Nanobubbles. *Physical Review Letters*, 98: 204502-1-204502-4
- Bosgelmez-Tinaz G., Ulusoy S., Ugur A., Ceylon O. 2007. Inhibition of quorum sensing – regulated behaviors by *Scorzonera sandrasica*. *Current Microbiology*, 55: 114-118
- Blokzijl W. in Engberts J. B. F. N. 1993. Hydrophobic Effects. Opinions and Facts. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 32: 1545–1579
- Bockris J. O'M. in Saluja P. P. S. 1972. Ionic solvation numbers from compressibilities and ionic vibration potentials measurements. *Journal of Physical Chemistry*, 76, 15: 2140–2151
- Buch V., Milet A., Vacha R., Jungwirth P., Devlin J. P. 2007. Water surface is acidic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 104: 7342-7347
- Bungenberg de Jong J. 1949. Colloid Science. Kruyt H. (ur.). New York, Elsevier publishing co.: Vol. 2

- Cacace C. M., Elia L., Elia V., Napoli E., Niccoli M. 2009. Conductometric and pHmetric titrations of extremely diluted solutions using HCl solutions as titrant. A molecular model. *Journal of Molecular Liquids*, 146: 122-126
- Camilli A. in Bassler B. L. 2006. Bacterial Small-Molecule Signaling Pathways. *Science*, 311: 1113-1116
- Cappa C. D., Smith J. D., Wilson K. R., Messer B. M., Gilles M. K., Cohen R. C., Saykally R. J. 2005. Effects of alkali metal halide salts on the hydrogen bond network of liquid water. *Journal of Physical Chemistry B*, 109, 15: 7046-7052
- Cappa C. D., Smith J. D., Messer B. M., Cohen R.C., Saykally R.J. 2006. Effects of cations on the hydrogen bond network of liquid water: New results from X-ray absorption spectroscopy of liquid microjets. *Journal of Physical Chemistry B*, 110: 5301-5309
- Carambasis A., Jonker L. C., Attard P., Rutland M. W. 1998. Forces measured between hydrophobic surfaces due to a submicroscopic bridging bubble. *Physical Review Letters*, 80: 5357-5360
- Chai B. in Pollack G. H. 2010. Solute-free interfacial zones in polar liquids. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114, 16: 5371–5375
- Chandler D. 2005. Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly. *Nature*, 437: 640–647
- Chaplin M. F. 2004. The importance of cell water. *Science in Society*, 24: 42-45
- Chaplin M. F. 2006. Opinion: Do we underestimate the importance of water in cell biology? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7, 11: 861-866
- Cheng Y.-K. in Rossky P. J. 1998. Surface Topography Dependence of Biomolecular Hydrophobic Hydration. *Nature*, 392: 696–699
- Cheng J.-X., Pautot S., Weitz D. A., Xie X. S. 2003. Ordering of water molecules between phospholipid bilayers visualized by CARS microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 100: 9826-9830
- Choo J. H., Rukayadi Y., Hwang J.-K. 2006. Inhibition of bacterial quorum sensing by vanilla extract. *Letters in Applied Microbiology*, 42: 637-641
- Christenson H. K. in Claesson P. M. 1988. Cavitation and the Interaction between Macroscopic Hydrophobic Surfaces. *Science*, 239, 4838: 390-392
- Cooper J. W. 1980. Spectroscopic Techniques for Organic Chemists. New York, J. Wiley
- Costerton J. W., Lewandowski Z., Caldwell D. E., Korber D. R., Lappin-Scott H. M. 1995. Microbial biofilms. *The Annual Review of Microbiology*, 49: 711-745
- Crocker J. C. in Grier D. G. 1996. When like charges attract: The effects of geometrical confinement on long-range colloidal interactions. *Physical Review Letters*, 77: 1897-1900
- Daniel R. M., Finney J. L., Réat V., Dunn R., Ferrand M., Smith J. C. 1999. Enzyme dynamics and activity: timescale dependence of dynamical transitions in glutamate dehydrogenase solution. *Biophysical Journal*, 77: 2184–2190

- Daniels R., Vanderleyden J., Michiels J. 2004. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 28: 261-289
- Day T. J., Schmitt U. W., Voth G. A. 2000. The mechanism of hydrated proton transport in water. *Journal of the American Chemical Society*, 122, 48: 12027-12028
- Despa F. in Berry R. S. 2007. The Origin of Long-Range Attraction between Hydrophobes in Water. *Biophysical Journal*, 92: 373-378
- Dixit S., Crain J., Poon W. C. K., Finney J. L., Soper A. K. 2002a. Molecular segregation observed in a concentrated alcohol-water solution. *Nature*, 416: 829-832
- Dixit S., Soper A. K., Finney J. L., Crain J. 2002b. Water structure and solute association in dilute aqueous methanol. *Europhysics Letters*, 59, 3: 377-383
- Dong Y. H. in Zhang L. H. 2005. Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *Journal of Microbiology*, 43: 101-109
- Du Q., Freysz E., Shen Y. R. 1994. Surface vibrational spectroscopic studies of hydrogen bonding and hydrophobicity. *Science*, 264: 826-882
- Duran N., Erazo S., Campos V. 1983. Bacterial chemistry-II: antimicrobial photoproduct from pigment of *Chromobacterium violaceum*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 55: 231-234
- Duran N. in Menck C. F. 2001. *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmaceutical and industrial perspectives. *Critical Reviews in Microbiology*, 27: 201-222
- Elia V. in Niccoli M. 1999. Thermodynamics of extremely diluted aqueous solutions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 879: 241-248
- Elia V. in Niccoli M. 2000. New physico – chemical properties of water induced by mechanical treatments. A calorimetric study at 25 °C. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 61: 527-537
- Elia V. in Niccoli M. 2004. New physico – chemical properties of extremely diluted aqueous solutions. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 75: 815-836
- Elia V., Napoli E., Niccoli M., Nonatelli L., Ramaglia A., Ventimiglia E. 2004. New physico - chemical properties of extremely diluted aqueous solutions. A calorimetric and conductivity study at 25 °C. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 78: 331-342
- Elia V., Marchese M., Montanino M., Napoli E., Niccoli M., Nonatelli L., Ramaglia A. 2005. Hydrohysteretic phenomena of »extremely diluted solutions« induced by mechanical treatments. A calorimetric and conductometric study at 25 °C. *Journal of Solution Chemistry*, 34, 8: 947-960
- Elia V., Elia L., Montanino M., Napoli E., Niccoli M., Nonatelli. 2007. Conductometric studies of the serially diluted and agitated solutions on an anomalous effect that depends on the dilution process. *Journal of Molecular Liquids*, 135: 158-165
- Elia V., Napoli E., Niccoli M., Marchettini N., Tiezzi E. 2008. New Physico - Chemical Properties of Extremely Diluted Solutions. A Conductivity Study at 25 °C in Relation to Ageing. *Journal of Solution Chemistry*, 37, 1: 85-96

- Elia V., Napoli E., Niccoli M. 2009. A molecular model of interaction between extremely diluted solutions and NaOH solutions used as titrant. Conductometric and pHmetric titrations. *Journal of Molecular Liquids*, 148: 45-50
- Elia V., Napoli E., Niccoli M. 2010. Thermodynamic parameters for the binding process of the OH<sup>-</sup> ion with the dissipative structures. Calorimetric and conductometric titrations. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 102, 3: 1111-1118
- Ellis R. J. in Minton A. P. 2003. Join the crowd. *Nature*, 425: 27-28
- Elsaesser T. 2009. Two-Dimensional Infrared Spectroscopy of Intermolecular Hydrogen Bonds in the Condensed Phase. *Accounts of chemical research*, 42, 9: 1220-1228
- Enderby J. E. in Neilson G. W. 1979. X-ray and Neutron Scattering by Aqueous Solutions of Electrolytes. V: Water: A Comprehensive Treatise. Franks F. (ur.). Vol. 6: 1 str.
- Fenimore P. W., Frauenfelder H., McMahon B. H., Young R. D. 2004. Bulk-solvent and hydration-shell fluctuatin, similar to – and – fluctuations in glasses, control protein motions and functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101: 14408–14413
- Field A. 2005. Discovering Statistics Using SPSS. Wright D. B. (ur.). Druga izdaja, London, Thousand Oaks, New Delhi, SAGE Publications: 484-520 str.
- Finney J. L. in Bowron D. T. 2004. Anion bridges and salting out. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9: 59-63
- Fisenko A. I. in Malomuzh N. P. 2008. The role of the H-bond network in the creation of the life-giving properties of water. *Chemical Physics*, 345, 2-3: 164-172
- Frank H. S. in Evans M. W. 1945. Free volume and entropy in condensed systems. III. Entropy in binary liquid mixtures; partial molal entropy in dilute solutions; structure and thermodynamics in aqueous electrolytes. *Journal of Chemical Physics*, 13: 507
- Frauenfelder H., Chen G., Berendzen J., Fenimore P. W., Jansson H., McMahon B. H., Stroe I. R., Swenson J., Young R. D. 2009. A unified model of protein dynamics. *PNAS*, 106, 13: 5129-5134
- Fullerton G. D. in Amurao M. R. 2006. Evidence that Collagen and Tendon have Monolayer Water Coverage in the Native State. *Cell Biology International*, 30, 1: 56-65
- Fuqua W. C., Winans S. C., Greenberg E. P. 1996. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum sensing transcriptional regulators. *The Annual Review of Microbiology*, 50: 727-751
- Fuqua W. C. in Greenberg E. P. 1998. Cell-to-cell communication in Escherichia coli and Salmonella typhimurium: They may be talking, but who's listening? *PNAS*, 95: 6571-6572
- Fuqua W. C. in Greenberg E. P. 2002. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nature Reviews Molecular and Cellular Biology*, 3: 685-695
- Furutani Y., Shibata M., Kandori H. 2005. Strongly hydrogen-bonded water molecules in the Schiff base region of rhodopsins. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 4: 661-666

- Fuxreiter M., Mezel M., Simon I., Osman R. 2005. Interfacial Water as a “Hydration Fingerprint” in the Noncognate Complex of BamHI. *Biophysical Journal*, 89: 903-911
- Gerstein M. in Levitt M. 1998. Simulating water and the molecules of life. *Scientific American*, 279, 11: 101-105
- Del Giudice E., Elia V., Napoli E., Tedeschi A. 2009. The Role of Water in the living organisms. *Neural Network World*, 4: 355-360
- Golding I. in Cox E. C. 2006. Physical nature of bacterial cytoplasm. *Physical Review Letters*, 96: 098102-1-098102-4
- Goodsell D. S. 1993. *The Machinery of Life*. New York, Springer-Verlag: 57 str.
- Gosar P. 1980. *Fizika ledu*. OMF, 27: 2 str.
- Green K. in Otori T. 1970. Direct measurements of membrane unstirred layers. *Journal of Physiology*, 207: 93–102
- Grudinin S., Büldt G., Gordeliy V., Baumgaertner A. 2005. Water molecules and hydrogen-bonded networks in bacteriorhodopsin - molecular dynamics simulations on the ground state and M-intermediate. *Biophysical Journal*, 88, 5: 3252-3261
- Guckenberger R., Heim M., Cevc G., Knapp H. F., Wiegräbe W., Hillebrand A. 1994. Scanning Tunneling Microscopy of Insulators and Biological Specimens Based on Lateral Conductivity of Ultrathin Water Films. *Science*, 266: 1538–1540
- Gurau M. C., Kim G., Lim S.-M., Albertorio F., Fleisher H. C., Cremer P. S. 2003. Organization of Water Layers at Hydrophilic Interfaces. *Chemphyschem*, 4: 1231–1233
- Han J., Zhou X., Liu H. 2006. Ab initio simulation on the mechanism of proton transport in water. *Journal of Power Sources*, 161, 2: 1420-1427
- Hastings J. W. in Greenberg E. P. 1999. Quorum sensing: the explanation of a curious phenomenon reveals a common characteristic of bacteria. *Journal of Bacteriology*, 181: 2667-2668
- Henniker J. 1949. The depth of the surface zone of a liquid. *Reviews of Modern Physics*, 21: 322-341
- Henry M. 2005. The state of water in living systems: from the liquid to the jellyfish. *Cell and Molecular Biology*, 51: 677-702
- Henry M. 2009. Water: Facts without Myths. *Water*, 1: 3-4
- Hill T. L. *Thermodynamics of Small Systems*. 1963 in 1964. Benjamin V. A. (ur.). New York, Vol. 1 in 2: 210 str.
- Ho M.-W. 2008. *The Rainbow and the Worm. The Physics of Organisms*. 3. izd. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.: 256-260 str.
- Holandino C., Harduim R., Feo da Veiga V., Garcia S., Zacharias C. R. 2008 Modeling Physical-Chemical Properties of High Dilutions: an electrical conductivity study. *International Journal of High Dilution Research*, 7, 25: 165-173
- Holysz L., Szczes A., Chibowski E. 2007. Effects of a static magnetic field on water and electrolyte solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 316: 996-1002
- Horn R. G., Smith D. T., Haller W. 1989. Surface forces and viscosity of water measured between silica sheets. *Chemical Physics Letters*, 162, 4-5: 404–408

- Hu M., Goicochea J. V., Michel B., Poulikakos D. 2009. Water Nanoconfinement Induced Thermal Enhancement at Hydrophilic Quartz Interfaces. *Nanoletters*, 10: 279–285
- Hummer G., Rasaiah J. C., Noworyta J. P. 2001. Water conduction through the hydrophobic channel of a carbon nanotube. *Nature*, 414: 188-190
- IAPWS guideline statement. 1990. Electrolytic conductivity (specific conductance) of liquid and dense supercritical water from 0°C to 800°C and pressures up to 1000 MPa. The International Association for the Properties of Water and Steam. 1-7 str.
- Ise N. 2007. When, why and how does like-like-like? *Proceedings of the Japan Academy - Series B: Physical & Biological Sciences*, 83: 192–198
- Israelachvili J. N. in Pashley R. M. 1982. The hydrophobic interaction is long range, decaying exponentially with distance. *Nature*, 300: 341-342
- Israelachvili J. N. 1985. Measurements of hydration forces between macroscopic surfaces. *Chemica Scripta*, 25: 7-14
- Israelachvili J. 1992. *Intermolecular and Surface Forces*. 2. izd. San Diego: Acad. Press
- Israelachvili J. in Wennerström H. 1996. Role of hydration and water structure in biological and colloidal interactions. *Nature*, 379: 219-225
- Iyengar S. S., Day T. J. F., Voth G. A. 2005. On the amphiphilic behavior of the hydrated proton: an ab initio molecular dynamics study. *International Journal of Mass Spectrometry*, 241: 197-204
- Jacobi J. 1979. (ed.). *Paracelsus: Selected Writings*. Princeton University Press: 13 str.
- Jena K. C. in Hore D. K. 2009. Variation of Ionic Strength Reveals the Interfacial Water Structure at a Charged Mineral Surface. *Journal of Physical Chemistry C*, 113: 15364–15372
- Jenkins H. D. B. in Marcus Y. 1995. Viscosity B-coefficients of ions in solution. *Chemical Reviews*, 95: 2695–2724
- Jerman I., Ružič R., Krašovec R., Škarja M., Mogilnicki L. 2005. Electrical Transfer of Molecule Information into Water, Its Storage, and Bioeffects on Plants and Bacteria. *Electromagnetic Biology and Medicine*, 24: 341-353
- Ji M., Odelius M., Gaffney K. J. 2010. Large angular jump mechanism observed for hydrogen bond exchange in aqueous perchlorate solution. *Science*, 328: 1003–1005
- Johnson M. E., Malardie-Jugroot C., Murarka R. K., Head-Gordon T. 2009. Hydration Water Dynamics Near Biological Interfaces. *The Journal of Physical Chemistry*, 113: 4082–4092
- Jones G. in Josephs R. C. 1928. The measurement of the conductance of electrolytes. I. An experimental and theoretical study of principles of design of the Wheatstone bridge for use with alternating currents and an improved form of direct reading alternating current bridge. *Journal of American Chemical Society*, 50: 1049
- Jones G. in Bollinger G. M. 1929. The Measurement of the Conductance of Electrolytes. II. Improvements in the Oscillator and Detector. *Journal of American Chemical Society*, 51: 2407

- Karlström G., Jönsson B., Roos B., Wennerström H. 1976. Correlation effects on barriers to proton transfer in intramolecular hydrogen bonds. The enol tautomer of malondialdehyde studied by ab initio SCF-CI calculations. *Journal of American Chemical Society*, 98: 6851
- Kauzmann W. 1959. Some Factors in the Interpretation of Protein Denaturation. Original Research Article. *Advances in Protein Chemistry*, 14: 1–63
- Kepler G. M. in Fraden S. 1994. Attractive Potential between Confined Colloids at Low Ionic-Strength. *Physical Review Letters*, 73: 356-359
- Khmel I.A., Belik A.S., Zaitseva Y.V., Danilova N. N. 2008. Quorum Sensing and Communication in Bacteria. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*, 36, 1: 25-31
- Kim H. I., Kushmerick J. G., Houston J. E., Bunker B. C. 2003. Viscous "interphase" water adjacent to oligo(ethylene glycol)-terminated monolayers. *Langmuir*, 19, 22: 9271-9275
- Kjelleberg S. in Molin S. 2002. Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms? *Current Opinion in Microbiology*, 5: 254-258
- Klimov A. in Pollack G. H. 2007. Visualization of Charge-Carrier Propagation in Water. *Langmuir*, 25: 542-547
- Klyuzhin I. S., Ienna F., Roeder B., Wexler A., Pollack G. H. 2010. Persisting water droplets on water surfaces. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114, 44: 14020–14027
- Kohlrausch F. 1897. Ueber platinierte Electroden und Widerstandsbestimmung. *Wied. Ann. (Philosophical Transactions of the Royal Society of London)*, 60: 315-328
- Koop T., Luo B., Tsias A., Peter T. 2000. Water activity as the determinant for homogeneous ice nucleation in aqueous solution. *Nature*, 406: 611-614
- Koop T. 2002. The water activity of aqueous solutions in equilibrium with ice. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 75: 2587-2588
- Kornyshev A. A. in Leikin S. 1989. Fluctuation theory of hydration forces: The dramatic effects of inhomogeneous boundary conditions. *Physical Review A*, 40, 11: 6431-6437
- Kornyshev A. A., Kuznetsov A. M., Spohr E., Ulstrup J. 2003. Kinetics of proton transport in water. *Journal of Physical Chemistry B*, 107: 3351–3388
- Krekeler C. in Delle Site L. 2007. Solvation of positive ions in water: The dominant role of water-water interaction. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 19: 192101-192104
- Küçük M., Kolayli S., Karaoğlu S., Ulusoy E., Baltaci C., Candan F. 2007. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry*, 100: 526-534
- Kunz W., Henle J., Ninham B. W. 2004. Zur Lehre von der Wirkung der Sälze »(about the science of the effect of salts)«: Franz Hofmeister's historical papers. Review article. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9, 1-2: 19-37
- Laage D. in Hynes J. T. 2006. A Molecular Jump Mechanism of Water Reorientation. *Science*, 311, 5726: 832–835

- Lapid H., Agmon N., Peterson M. K., Voth G. A. 2005. A bond-order analysis of the mechanism for hydrated proton mobility in liquid water. *Journal of Chemical Physics*, 122: 014506
- Lazazzera B. A. 2000. Quorum sensing and starvation: Signals for entry into stationary phase. *Current Opinion in Microbiology*, 3: 177-182
- Lee Y.-S. in Krauss M. 2004. Dynamics of proton transfer in bacteriorhodopsin. *Journal of American Chemical Society*, 126: 2225
- Leikin S., Parsegian V. A., Rau D. C., Rand R. P. 1993. Hydration Forces. *Annual Reviews in Physical Chemistry*, 44: 369-395
- Lichstein H. C. in Van de Sand V. F. 1945. Violacein, an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. *Journal of Infectious Disease*, 76: 47-51
- Light T. S., Licht S., Bevilacqua A. C., Morash K. R. 2005. The fundamental conductivity and resistivity of water. *Electrochemical and Solid-State Letters*, 8: E16-E19
- Ling G. L. 2001. Life at the Cell and Below-Cell level: The Hidden History of a Fundamental Revolution in Biology. 1. izd. Pacific Press: New York, ZDA: 1–373
- Ling G. L. 1993. A Quantitative Theory of Solute Distribution in Cell Water According to Molecular Size. *Physiological Chemistry & Physics & Medical NMR*, 25: 154–175
- Ling G. L., Niu Z., Ochsenfeld M. 1993. Predictions of Polarised Multilayer Theory of Solute Distribution Confirmed from a Study of the Equilibrium Distribution in Frog Muscle of Twenty-one Nonelectrolytes Including Five Cryoprotectants. *Physiological Chemistry & Physics & Medical NMR*, 25: 177–208
- Liu J., Fan J., Tang M., Zhou W. 2010. Molecular Dynamics for the Structure of the Water Chain in a Transmembrane Peptide Nanotube. *Journal of Physical Chemistry A*, 114: 2376-2383
- Lobyshev V. I., Shikhinskaya R. E., Ryzhikov B. D. 1999. Experimental evidence for intrinsic luminescence of water. *Journal of Molecular Liquids*, 82: 73-81
- Lorenz C. D., Lane J. M. D., Chandross M., Stevens M. J., Grest G. S. 2009. Molecular dynamics simulations of water confined between matched pairs of hydrophobic and hydrophilic self-assembled monolayers. *Langmuir*, 25, 8: 4534–4542
- Luecke H., Schobert B., Richter H.-T., Cartailler J.-P., Lanyi J. K. 1999. Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 291: 899-911
- Lum K., Chandler C., Weeks J. D. 1999. Hydrophobicity at small and large length scales. *Journal of Physical Chemistry B*, 103, 22: 4570-4577
- Lyon P. 2008. From quorum to cooperation: Lessons from bacterial sociality. *Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Science* (posebna izdaja: *Philosophy of Microbiology*. O'Malley M in Dupré J. (ur.)): 1-30 str.
- Maccarini M., Steitz R., Himmelhaus M., Fick J., Tatur S., Wolff M., Grunze M., Janecek J., Netz R. R. 2007. Density depletion at solid-liquid interfaces: a neutron reflectivity study. *Langmuir*, 23, 2: 598-608
- Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. 2000. Regulation of gene expression. V: Brook's *Biology of Microorganisms*. 9. izd. Upper Saddle River, Prentice Hall: 212-235

- Mäemets V. in Koppel I. 1998. Effect of ions on the  $^{17}\text{O}$  and  $^1\text{H}$  NMR chemical shifts of water. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 94: 3261-3269
- Major R. C., Houston J. E., McGrath M. J., Siepman J. I., Zhu X. Y. 2006. Viscous water meniscus under nanoconfinement. *Physical Review Letters*, 96, 17: 177803
- Mancinelli R., Botti A., Bruni F., Ricci M. A., Soper A. K. 2007. Perturbation of water structure due to monovalent ions in solutions. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 9: 2959-2967
- Marcus Y. 1998. *The Properties of Solvents*. Wiley Series in Solution Chemistry, 4. izd. John Wiley & sons: 97 str.
- Marčelja S. in Radič N. 1976. Repulsion of interfaces due to boundary water. *Chemical Physics Letters*, 42, 1: 129-130
- Masgrau L., Basran J., Hothi P., Sutcliffe M. J., Scrutton N. S. 2004. Hydrogen tunneling in quinoproteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 428: 41–51
- McClean K. H., Winson M. K., Fish L., Taylor A., Chhabra S. R., Camara M., Daykin M., Lamb J. H., Swift S., Bycroft B. W., Stewart G. S. A. B., Williams P. 1997. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology*, 143: 3703-3711
- McLean R. J. C., Pierson III L. S., Fuqua C. 2004. A simple screening protocol for the identification of quorum signal antagonists. *Journal of Microbiological Methods*, 58: 351-360
- Mezer A., Friedman R., Noivirt O., Nachliel E., Gutman M. 2005. The mechanism of proton transfer between adjacent sites exposed to water. *Journal of Physical Chemistry B*, 109, 22: 11379-11388
- Mezger M., Reichert H., Schöder S., Okasinsk J., Schröder H., Dosch H., Palms D., Ralston J., Honkimäki V. 2006. High-resolution *in situ* x-ray study of the hydrophobic gap at the water-octadecyl trichlorosilane interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 103: 18401–18404
- Michel J., Tirado-Rives J., Jorgensen W. L. 2009. Energetics of Displacing Water Molecules from Protein Binding Sites: Consequences for Ligand Optimization. *Journal of American Chemical Society*, 131: 15403-15411
- Mikheev Y. A., Guseva L. N., Davydov E. Y., Ershov Y. A. 2007. The hydration of hydrophobic substances. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 81: 1897-1913
- Milosavljević S. M. 1998. Strukturne instrumentalne metode. Beograd, Hemski fakultet: 37 str.
- Minh D. D. L., Chang C.-E., Trylska J., Tozzini V., McCammon J. A. 2006. The Influence of Macromolecular Crowding on HIV-1 Protease Molecular Dynamics. *Journal of American Chemical Society*, 128: 6006-6007
- Mishima O. in Stanley H. E. 1998. The relationship between liquid, supercooled and glassy water. *Nature*, 396: 329–335
- Mittal J. in Hummer G. 2008. Static and dynamic correlations in water at hydrophobic interfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 51: 20130-20133

- Nagornjak K., Yoo H., Pollack G. H. 2009. Mechanism of attraction between like-charged particles in aqueous solution. *Soft Matter*, 5: 3850–3857
- Naguib N., Ye H., Gogotsi Y., Yazicioglu A. G., Megaridis C. M., Yoshimura M. 2004. Observation of Water Confined in Nanometer Channels of Closed Carbon Nanotubes. *Nano Letters*, 4: 2237-2243
- Nealson K. H., Platt T., Hastings J. W. 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *Journal of Bacteriology*, 104: 313-322
- Notman R. in Walsh T. R. 2009. Molecular Dynamics Studies of the Interactions of Water and Amino Acid Analogues with Quartz Surfaces. *Langmuir*, 25: 1638-1644
- Oleinikova A., Brovchenko I., Kruckau A., Mazur A. K. 2008. Anomalous diffusion of ions at the surface of hydrated DNA molecule. *A Letters Journal Exploring the Frontiers of Physics*, 82: 46002-1-46002-5
- Omta A. W., Kropman M. F., Woutersen S., Bakker H. J. 2003. Negligible effect of ions on the hydrogen-bond structure in liquid water. *Science*, 301: 347-349
- Oparin A. I. 1965. The Origin of Life. 2. izd., New York, Dover Publications, Inc.: 1-304 str.
- Orban T., Gupta S., Palczewski K., Chance M. R. 2010. Visualizing Water Molecules in Transmembrane Proteins Using Radiolytic Labeling Methods. *Biochemistry*, 49: 827-834
- Otwinowski Z., Schevitz R. W., Zhang R. G., Lawson C. L., Joachimiak A., Marmorstein R. Q., Luisi B. F., Sigler P. B. 1988. Crystal structure of trp repressor/operator complex at atomic resolution. *Nature*, 335: 321–329
- Ovchinnikova K. in Pollack G. H. 2009. Can Water store Charge? *Langmuir*, 2: 542–547
- Paesani F., Yoo S., Bakker H. J., Xantheas S. S. 2010. Nuclear Quantum Effects in the Reorientation of Water. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 1: 2316-2321
- Pagnotta S. E., Bruni F., Senesi R., Pietropaolo A. 2009. Quantum Behavior of Water Protons in Protein Hydration Shell. *Biophysical Journal*, 96: 1939-1943
- Pashley R. M., McGuigan P. M., Ninham B., Evans D. F. 1985. Attractive forces between uncharged hydrophobic surfaces-direct measurements in aqueous solution. *Science*, 229: 1088-1089
- Pashley R. M., Rzechorowicz M., Pashley L. R., Francis M. J. 2005. De-gassed water is a better cleaning agent. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109: 1231-1238
- Pegram L. M. in Record M. T. Jr. 2006. Partitioning of Atmospherically Relevant Ions Between Bulk Water and the Water/Vapor Interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 14278-14281
- Penfold R., Nordholm S., Jönsson B., Woodward C. 1990. A Simple Analysis of Ion-Ion Correlations in Polyelectrolyte Solutions. *Journal of Chemical Physics*, 92, 3: 1915
- Pietropaolo A., Senesi R., Andreani C., Botti A., Ricci M. A., Bruni F. 2008. Excess of Proton Mean Kinetic Energy in Super-cooled Water. *Physical Review Letters*, 100: 127802

- Podgornik R. 2009. H<sub>2</sub>O. Univerza v Ljubljani, Inštitut Jožef Stefan v Ljubljani: 1-314
- Pollack G. H. 2001. Cells, Gels and the Engines of Life. Seattle, WA, Ebner and Sons
- Pollack G. H. in Reitz F. B. 2001. Phase transition and molecular motion in the cell. *Cell and Molecular Biology*, 47: 885-900
- Pollack G. H. in Clegg J. 2008. Unsuspected Linkage between Unstirred Layers, Exclusion Zones and Water. V: Phase Transitions in Cell Biology. Pollack G. H. in Chin W. C. (ur.). New York, Springer: 183 str.
- Pollack G. H., Figueroa X., Zhao Q. 2009. Molecules, Water, and Radiant Energy: New Clues for the Origin of Life. *International Journal of Molecular Sciences*, 10: 1419–1429
- Popova M. P., Bankova V. S., Bogdanov S., Tsevetkova I., Naydenski C., Marcazzan G. L., Sabatini A.-G. 2007. Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin. *Apidologie*, 38: 306-311
- Raghavender U. S., Subrayashastry A., Narayanaswamy S., Kantharaju, Rai R., Balaram P. 2009. Characterization of Water Wires inside Hydrophobic Tubular Peptide Structures. *JACS Communications*, 131: 15130–15132
- Rajamani S., Truskett T. M., Garde S. 2005. Hydrophobic hydration from small to large lengthscales: understanding and manipulating the crossover. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 9475-9480
- Rand R. P. in Parsegian V. A. 1989. Hydration Forces Between Phospholipid Bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 988: 351-376
- Rao M. L., Roy R., Bell I. R., Hoover R. 2007. The defining role of structure (including epitaxy) in the plausibility of homeopathy. *Homeopathy*, 96: 175-182
- Rastinejad F., Wagner T., Zhao Q., Khorasanizadeh S. 2000. Structure of the RXR-RAR DNA-binding complex on the retinoic acid response element DR1. *The EMBO Journal*, 19: 1045–1054
- Rau D. C. in Sidorova N. Y. 2010. Diffusion of the Restriction Nuclease EcoRI along DNA. *Journal of Molecular Biology*, 395: 408-416
- Ravn L., Christensen A. B., Molin S., Giskov M., Gram L. 2001. Methods for detecting acylated homoserine lactones produced by Gram-negative bacteria and their application in studies of AHL-production kinetics. *Journal of Microbiological Methods*, 44: 239-251
- Rhykerd C. L. Jr., Schoen M., Diestler D. J., Cushman J. H. 1987. Classical Fluids in Micropores and Near Solid Surfaces. *Nature*, 330: 461-463
- Robinson R. A. in Stokes R. H. 2002. Electrolyte Solutions. 2. izd. Butterworths, London: 1-23, 87-116 str.
- Rohs R., Jin X., West S. M., Joshi R., Honig B., Mann R. S. 2010. Origins of Specificity in Protein-DNA Recognition. *Annual Review of Biochemistry*, 79: 233–269
- Rudan Tasić D., Župec T., Klofutar C., Bešter-Rogač M. 2005. A Conductometric Study of Aqueous Solutions of Some Cyclohexylsulfamates. *Journal of Solution Chemistry*, 34, 6: 631–644
- Saenger W. 1979. Circular hydrogen bonds. *Nature*, 279: 343-344

- Saiz L. in Klein M. L. 2002. Computer simulation studies of model biological membranes. *Accounts of Chemical Research*, 35: 482-489
- Salis A., Bilanicová D., Ninham B. W., Monduzzi M. 2007. Hofmeister effects in enzymatic activity: weak and strong electrolyte influences on the activity of *Candida rugosa* lipase. *Journal of Physical Chemistry B*, 111, 5: 1149–1156
- Samsonov S., Teyra J., Pisabarro M. T. 2008. A molecular dynamics approach to study the importance of solvent in protein interactions. *Proteins*, 73: 515-525
- Sasaki N. 1984. Dielectric properties of slightly hydrated collagen: Time–water content superposition analysis. *Biopolymers*, 23, 9: 1725–1734
- Sass H. J., Büldt G., Gessenich R., Hehn D., Neff D., Schlessinger R., Berendzen J., Ormos P. 2000. Structural alterations for proton translocation in the M state of wild-type bacteriorhodopsin. *Nature*, 406, 6796: 649–653
- Sciortino F., Geiger A., Stanley H. E. 1991. Effect of Defects on Molecular Mobility in Liquid Water. *Nature*, 354: 218–221
- Sedlák M. 2006. Large-scale supramolecular structure in solutions of low molar mass compounds and mixtures of liquids: I. Light scattering characterization. II. Kinetics of the formation and long-time stability. III. Correlation with molecular properties and interactions. *Journal of Physical Chemistry B*, 110: 4329–4345, 13976-13984
- Seibold S. A., Mills D. A., Ferguson – Miller S., Cukier R. I. 2005. Water chain formation and possible proton pumping routes in *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome c oxidase: a molecular dynamics comparison of the wild type and R481K mutant. *Biochemistry*, 44, 31: 10475–10485
- Shedlovsky T. 1930. A Screened Bridge for the Measurement of Electrolytic Conductance. *Journal of American Chemical Society*, 52: 1793
- Shirai M. in Tamamushi B. 1955. Dielectric Studies on Colloidal Solutions. I. High-frequency Conductivity of Aqueous Solutions of Paraffin-chain Salts. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 28, 8: 545-548
- Skelton A. A., Taining L., Walsh T. R. 2009. Interplay of Sequence, Conformation, and Binding at the Peptide – Titania Interface as Mediated by Water. *Applied Materials & Interfaces*, 1, 7: 1482-1491
- Soper A. K., Neilson G. W., Enderby J. E., Howe R. A. 1977. A neutron diffraction study of hydration effects in aqueous solutions. *Journal of Physics C: Solid State Physics*, 10: 1793-1801
- Stanley H. E., Buldyrev S. V., Canpolat M., Havlin S., Mishima O., Sadr-Lahijany M. R., Scala A., Starr F. W. 1999. The puzzle of liquid water: a very complex fluid. *Physica D: Nonlinear Phenomena*, 133, 1-4: 453–462
- Stillinger F. H. 1973. Structure in aqueous solutions of nonpolar solutes from the standpoint of scaled-particles theory. *Journal of Solution Chemistry*, 2: 141–158
- Suzuki T. in Sota T. 2005. Circular Hydrogen Bond Networks on the Surface of  $\beta$ -Ribofuranose in Aqueous Solution. *Journal of Physical Chemistry B*, 109: 12603-12611

- Swift S., Throup J. P., Salmond G. P. C., Williams P., Stewart G. S. A. B. 1996. Quorum sensing: a population-density component in the determination of bacterial phenotype. *Trends in Biochemical Sciences*, 21: 214-219
- Szent-Györgyi, A. 1971. Biology and pathology of water. *Perspectives in biology and medicine*, 12: 239
- Tainer J. A. in Cunningham R. P. 1993. Molecular recognition in DNA-binding proteins and enzymes. *Current Opinion in Biotechnology*, 4: 474–483
- Tarbuck T. L., Ota S. R., Richmond G. L. 2006. Spectroscopic Studies of Solvated Hydrogen and Hydroxide Ions at Aqueous Surfaces. *Journal of American Chemical Society*, 128: 14519-14527
- Throup J., Winson M. K., Bainton N. J., Bycroft B. W., Williams P., Stewart G. S. A. B. 1995. Signalling in bacteria beyond bioluminescence. V: *Bioluminescence and chemiluminescence: Fundamentals and Applied Aspects*. Campbell A., Kricka L., Stanley P. (ur.). Chichester, J. Wiley: 89-92 str.
- Tomšič M., Bešter-Rogač M., Jamnik A., Neueder R. in Barthel J. 2002. Conductivity of Magnesium Sulfate in Water from 5 to 35 °C and from Infinite Dilution to Saturation. *Journal of Solution Chemistry*, 31, 1: 19–31
- Truchado P., López-Gálvez F., Gil M. I., Tomás-Barberán F. A., Allende A. 2009. Quorum sensing inhibitory and antimicrobial activities of honeys and the relationship with individual phenolics. *Food Chemistry*, 115: 1337-1344
- Turton D.A., Hunger J., Hefter G., Buchner R., Wynne K. 2008. Glasslike behavior in aqueous electrolyte solutions. *The Journal of Chemical Physics*, 128: 161102-1-161102-4
- Vendrell O., Gatti F., Meyer H. – D. 2009. Strong Isotope Effects in the Infrared Spectrum of the Zundel Cation. *Angewandte Chemie International Edition*, 48: 352–355
- Verkman A. S. 2002. Solute and macromolecule diffusion in cellular aqueous compartments. *Trends in Biochemical Sciences*, 27: 27-33
- Voeikov V. L. 2007. The possible role of active oxygen in the memory of water. *Homeopathy: the Journal of the Faculty of Homeopathy*, 96, 3: 196-201
- Von Bodman S. B., Bauer W. D., Coplin D. L. 2003. Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 41: 455-482
- Vybíral B. 2006. The comprehensive experimental research on the autothixotropy of water. V: *Water and the Cell*. Pollack G. H., Cameron I., Wheatley D. (ur.). New York, Springer: 299–314 str.
- Vybíral B. in Voráček P. 2007. Long term structural effects in water: autothixotropy of water and its hysteresis. *Homeopathy*, 96: 183-188
- Wagner W., Cooper J. R., Dittmann A., Kijima J., Kretzschmar H.-J., Kruse A., Mareš R., Oguchi K., Sato H., Stöcker I., Šifner O., Takaishi Y., Tanishita I., Trübenbach J., Willkommen Th. 2000. The IAPWS industrial formulation 1997 for the thermodynamic properties of water and steam. *The Journal of Engineering for Gas Turbines and Power*, 122: 150–182

- Wallqvist A. in Berne B. J. 1995. Computer-simulation of hydrophobic hydration forces on stacked plates at short-range. *Journal of Physical Chemistry*, 99: 2893-2899
- Wilson G., Hecht L., Barron L. D. 1997. Evidence for a new cooperative transition in native lysozyme from temperature-dependent Raman optical activity. *Journal of Physical Chemistry B*, 101: 694–698
- Withers H. L. in Nordstrom K. 1998. Quorum-sensing acts at initiation of chromosomal replication in *Escherichia coli*. *PNAS*, 95: 15694-15699
- Wolfenden R. in Snider M. J. 2001. The depth of chemical time and the power of enzyme as catalysts. *Accounts of Chemical Research*, 34, 12: 938–945
- Xantheas S. S. 2000. Cooperativity and hydrogen bonding network in water clusters. *Chemical Physics*, 258: 225–231
- Xantheas S. S. 2009. Computational chemistry. Dances with hydrogen cations. *Nature*, 457: 673–674
- Zangi R. in Engberts J. B. F. N. 2005. Physisorption of hydroxide ions from aqueous solution to a hydrophobic surface, *Journal of American Chemical Society*, 127: 2272-2276
- Zhao Q., Zheng J. M., Chai B. H., Pollack G. H. 2008. Unexpected effect of light on colloidal crystal spacing. *Langmuir*, 24: 1750–1755
- Zhao Q., Ovchinnikova K, Chai B., Yoo H., Magula J, G. H. Pollack. 2009. Role of Proton Gradients in the Mechanism of Osmosis. *Journal of Physical Chemistry B*, 113: 10708–10714
- Zheng J. M. in Pollack G. H. 2003. Long range forces extending from polymer-gel surfaces. *Physical Reviews E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics*, 68: 031408-1-031408-7
- Zheng J.-M., Chin W.-C., Khijniak E., Khijniak Jr. E., Pollack G. H. 2006. Surfaces and interfacial water: Evidence that hydrophilic surfaces have long-range impact. *Advances in Colloid and Interface Science*, 127: 19–27

## 7.1 DRUGI VIRI

Chaplin M. F. 2012. Water Structure and Science.

<http://www.lsbu.ac.uk/water/> (3. januar 2012)

ICUMSA (Zapisnik). 1966.

<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31969R1265:SL:HTML>  
(3. januar 2012)

Silverstein R. M. in Bassler G. C. 1967. Spectrometric Identification of Organic Compounds. 2. izd. New York, J. Wiley

## ZAHVALA

Za vsestransko pomoč se zahvaljujem mentorju prof. dr. Igorju Jermanu. Predlagal, omogočil in vodil me je po zanimivem področju med kemijo, biologijo in kvantno fiziko.

Iskrena hvala raziskovalnemu mentorju dr. Roku Krašovcu za pronicljive nasvete, pozitivno kritično besedo, mnenja in veliko mero optimizma. Poleg tega se toplo zahvaljujem Luku Janu za veliko pomoč pri delu z bakterijami.

Iskrena hvala tudi somentorju prof. dr. Petru Bukovcu za pomoč pri izbiri metode, nasvete in nenehno pozitivno spodbudo.

Zahvaljujem se vsem bivšim sodelavcem in sodelavkam Inštituta Bion za pomoč in vesele urice!

Zahvaljujem se tudi sodelavcem s Katedre za anorgansko kemijo Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo za nasvete pri laboratorijskih zagatah in še kakšnih.

Najtopleje se zahvaljujem tistim, ki so mi najblžje, za veliko potrpežljivosti in podporo.

Izdelavo doktorske disertacije je delno financirala Evropska unija iz Evropskega socialnega sklada. Operacija se je izvajala v okviru Operativnega programa razvoja človeških virov za obdobje 2007 - 2013, razvojne prioritete: Spodbujanje podjetništva in prilagodljivosti; prednostne usmeritve: Strokovnjaki in raziskovalci za konkurenčnost podjetij, program »Mladi raziskovalci iz gospodarstva – generacija 2007«.

Hvala!

## PRILOGE

### PRILOGA A

#### PRELIMINARNA MERJENJA PREVODNOSTI S SISTEMOM MBR

**Preglednica A1:** Prevodnost kontrole od 500 do 10 000 Hz pri 25 °C, merjene v treh kapilarnih celicah s konstantami 3,3, 22,7 in 53,9/cm.

**Table A1:** Conductivity of control from 500 to 10 000 Hz at 25 °C, measured in three capillary cells with constants 3,3, 22,7 and 53,9/cm.

<i>f</i> (Hz)	prevodnost kontrole pri 25 °C ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )		
	K = 3,3/cm	K = 22,7/cm	K = 53,9/cm
500	6,3	6,6	6,8
1000	6,3	6,8	8,7
1500	6,3	7,2	11,5
2000	6,3	7,8	15,6
2500	6,3	8,5	20,8
3000	6,3	9,4	27,1
3472	6,3	10,3	34,3
4000	6,4	11,6	43,7
4464	6,4	12,9	53,3
5000	6,4	14,5	65,6
5455	6,4	16,1	77,7
6000	6,4	18,3	94,5
6522	6,4	20,5	112,8
6944	6,4	22,5	129,1
7500	6,4	25,5	153,0
8000	6,4	28,4	177,6
8571	6,5	32,0	207,9
8929	6,5	34,4	229,0
9615	6,5	39,6	273,9
10 000	6,5	42,9	299,0

**Preglednica A2:** Opisna statistika prevodnosti EV od 500 do 10 000 Hz pri 25 in 5 °C v celici s konstanto 22,7/cm – AVG, SD, SE, N in RSE.

**Table A2:** Descriptive statistics of EV conductivity from 500 to 10 000 Hz at 25 and 5 °C with cell constant 22,7/cm – AVG, SD, SE, N and RSE.

<i>f</i>	prevodnost EV pri 25 °C					prevodnost EV pri 5 °C				
	AVG	SD	SE	N	RSE	AVG	SD	SE	N	RSE
Hz	$\mu\text{S}/\text{cm}$	$\mu\text{S}/\text{cm}$	$\mu\text{S}/\text{cm}$	/	%	$\mu\text{S}/\text{cm}$	$\mu\text{S}/\text{cm}$	$\mu\text{S}/\text{cm}$	/	%
500	9,0	0,02	0,01	9	0,07	5,5	0,02	0,01	5	0,13
1000	9,2	0,02	0,01	9	0,06	5,8	0,02	0,01	5	0,15
1500	9,5	0,03	0,01	9	0,09	6,3	0,02	0,01	5	0,15
2000	9,9	0,02	0,01	9	0,08	7,0	0,02	0,01	5	0,12
2500	10,4	0,03	0,01	9	0,09	7,9	0,02	0,01	5	0,11
3000	11,0	0,03	0,01	9	0,08	8,9	0,03	0,01	5	0,13
3472	11,7	0,03	0,01	9	0,08	10,1	0,03	0,01	5	0,11

se nadaljuje

nadaljevanje

**Preglednica A2:** Opisna statistika prevodnosti EV od 500 do 10 000 Hz pri 25 in 5 °C v celici s konstanto 22,7/cm – AVG, SD, SE, N in RSE.

**Table A2:** Descriptive statistics of EV conductivity from 500 to 10 000 Hz at 25 and 5 °C with cell constant 22,7/cm – AVG, SD, SE, N and RSE.

4000	12,6	0,03	0,01	9	0,08	11,7	0,03	0,01	5	0,13
4464	13,5	0,03	0,01	9	0,09	13,2	0,04	0,02	5	0,14
5000	14,6	0,03	0,01	9	0,06	15,3	0,06	0,03	5	0,17
5455	15,7	0,03	0,01	9	0,06	17,3	0,08	0,03	5	0,20
6000	17,1	0,04	0,01	9	0,07	20,0	0,09	0,04	5	0,20
6522	18,6	0,04	0,01	9	0,08	22,8	0,10	0,05	5	0,20
6944	19,9	0,05	0,02	9	0,08	25,4	0,12	0,05	5	0,22
7500	21,8	0,05	0,02	9	0,08	29,2	0,16	0,07	5	0,24
8000	23,7	0,05	0,02	9	0,07	32,9	0,18	0,08	5	0,25
8571	26,0	0,11	0,04	9	0,14	37,7	0,21	0,10	5	0,25
8929	27,5	0,10	0,03	9	0,12	41,0	0,20	0,09	5	0,22
9615	30,7	0,08	0,03	9	0,09	47,9	0,26	0,11	5	0,24
10 000	32,7	0,08	0,03	9	0,08	52,5	0,38	0,17	5	0,32

**Preglednica A3:** Opisna statistika prevodnosti EV od 500 do 10 000 Hz pri 25 in 5 °C v celici s konstanto 53,9/cm – AVG, SD, SE, N in RSE.

**Table A3:** Descriptive statistics of EV conductivity from 500 to 10 000 Hz at 25 and 5 °C with cell constant 53,9/cm – AVG, SD, SE, N and RSE.

f Hz	prevodnost EV pri 25 °C					prevodnost EV pri 5 °C				
	AVG µS/cm	SD µS/cm	SE µS/cm	N	RSE %	AVG µS/cm	SD µS/cm	SE µS/cm	N	RSE %
500	7,8	0,03	0,01	9	0,13	5,4	0,03	0,02	5	0,29
1000	9,3	0,03	0,01	9	0,12	8,0	0,06	0,03	5	0,33
1500	11,8	0,04	0,01	9	0,12	12,2	0,08	0,04	5	0,31
2000	15,3	0,04	0,01	9	0,10	17,9	0,14	0,06	5	0,35
2500	19,7	0,08	0,03	9	0,13	25,2	0,16	0,07	5	0,28
3000	25,1	0,10	0,03	9	0,13	34,3	0,20	0,09	5	0,26
3472	31,2	0,12	0,04	9	0,13	44,7	0,24	0,11	5	0,24
4000	39,0	0,18	0,06	9	0,15	58,4	0,40	0,18	5	0,31
4464	47,0	0,17	0,06	9	0,12	72,8	0,68	0,30	5	0,42
5000	57,4	0,19	0,06	9	0,11	92,3	0,84	0,37	5	0,40
5455	67,4	0,14	0,05	9	0,07	111,5	1,11	0,50	5	0,45
6000	80,7	0,15	0,05	9	0,06	138,1	1,71	0,76	5	0,55
6522	95,1	0,17	0,06	9	0,06	167,7	2,39	1,07	5	0,64
6944	108,0	0,18	0,06	9	0,06	194,5	3,52	1,58	5	0,81
7500	126,8	0,18	0,06	9	0,05	234,6	4,34	1,94	5	0,83
8000	145,5	0,58	0,19	9	0,13	275,8	5,82	2,60	5	0,94
8571	169,6	1,62	0,54	9	0,32	328,6	7,24	3,24	5	0,99
8929	185,0	0,93	0,31	9	0,17	364,4	8,37	3,74	5	1,03
9615	219,8	1,42	0,47	9	0,21	440,0	12,09	5,41	5	1,23
10 000	242,2	1,40	0,47	9	0,19	493,7	14,19	6,35	5	1,29

**Preglednica A4:** Opisna statistika prevodnosti EK od 500 do 10 000 Hz pri 25 in 5 °C v celici s konstanto 33,2/cm – AVG, SD, SE, N in RSE.

**Table A4:** Descriptive statistics of EK conductivity from 500 to 10 000 Hz at 25 and 5 °C with cell constant 33,2/cm – AVG, SD, SE, N and RSE.

<b>f</b>	prevodnost EK pri 25 °C					prevodnost EK pri 5 °C				
	AVG	SD	SE	N	RSE	AVG	SD	SE	N	RSE
<b>Hz</b>	µS/cm	µS/cm	µS/cm	/	%	µS/cm	µS/cm	µS/cm	/	%
500	7,0	0,05	0,02	9	0,22	4,4	0,02	0,01	5	0,21
1000	7,4	0,03	0,01	9	0,11	5,1	0,02	0,01	5	0,13
1500	8,1	0,02	0,01	9	0,08	6,2	0,02	0,01	5	0,17
2000	8,9	0,02	0,01	9	0,06	7,8	0,03	0,02	5	0,20
2500	10,1	0,02	0,01	9	0,06	10,2	0,05	0,02	5	0,21
3000	11,5	0,03	0,01	9	0,07	13,4	0,07	0,03	5	0,25
3472	13,2	0,04	0,01	9	0,11	17,4	0,11	0,05	5	0,27
4000	15,5	0,07	0,02	9	0,14	23,4	0,14	0,06	5	0,26
4464	18,0	0,07	0,02	9	0,12	30,3	0,18	0,08	5	0,27
5000	21,4	0,10	0,03	9	0,15	40,6	0,26	0,12	5	0,29
5455	24,8	0,17	0,06	9	0,23	51,9	0,25	0,11	5	0,21
6000	29,9	0,14	0,05	9	0,15	69,0	0,28	0,13	5	0,18
6522	35,6	0,18	0,06	9	0,17	90,1	0,29	0,13	5	0,14
6944	41,1	0,26	0,09	9	0,21	111,2	0,21	0,10	5	0,09
7500	49,6	0,33	0,11	9	0,22	144,9	0,70	0,31	5	0,21
8000	58,7	0,44	0,15	9	0,25	183,3	0,86	0,38	5	0,21
8571	71,1	0,41	0,14	9	0,19	235,5	1,61	0,72	5	0,31
8929	80,0	0,63	0,21	9	0,26	276,2	0,63	0,28	5	0,10
9615	100,3	0,85	0,28	9	0,28	365,0	4,24	1,89	5	0,52
10 000	114,1	1,49	0,50	9	0,44	434,0	7,52	3,36	5	0,77

**Preglednica A5:** Opisna statistika prevodnosti EK od 500 do 10 000 Hz pri 25 in 5 °C v celici s konstanto 6,6/cm – AVG, SD, SE, N in RSE

**Table A5:** Descriptive statistics of EK conductivity from 500 to 10 000 Hz at 25 and 5 °C with cell constant 6,6/cm – AVG, SD, SE, N and RSE.

<b>f</b>	prevodnost EK pri 25 °C					prevodnost EK pri 5 °C				
	AVG	SD	SE	N	RSE	AVG	SD	SE	N	RSE
<b>Hz</b>	µS/cm	µS/cm	µS/cm	/	%	µS/cm	µS/cm	µS/cm	/	%
500	7,1	0,02	0,01	9	0,09	4,3	0,02	0,01	5	0,23
1000	7,1	0,02	0,01	9	0,09	4,3	0,02	0,01	5	0,24
1500	7,1	0,02	0,01	9	0,09	4,3	0,02	0,01	5	0,23
2000	7,2	0,02	0,01	9	0,10	4,4	0,02	0,01	5	0,21
2500	7,2	0,02	0,01	9	0,10	4,4	0,02	0,01	5	0,20
3000	7,2	0,02	0,01	9	0,09	4,5	0,02	0,01	5	0,23
3472	7,3	0,02	0,01	9	0,10	4,5	0,02	0,01	5	0,21
4000	7,3	0,02	0,01	9	0,09	4,6	0,02	0,01	5	0,21
4464	7,4	0,02	0,01	9	0,09	4,7	0,02	0,01	5	0,21
5000	7,4	0,02	0,01	9	0,09	4,9	0,02	0,01	5	0,23
5455	7,5	0,02	0,01	9	0,09	5,0	0,03	0,01	5	0,23
6000	7,5	0,02	0,01	9	0,08	5,1	0,03	0,01	5	0,23
6522	7,6	0,02	0,01	9	0,08	5,3	0,03	0,01	5	0,25

se nadaljuje

nadaljevanje

**Preglednica A5:** Opisna statistika prevodnosti EK od 500 do 10 000 Hz pri 25 in 5 °C v celici s konstanto 6,6/cm – AVG, SD, SE, N in RSE

**Table A5:** Descriptive statistics of EK conductivity from 500 to 10 000 Hz at 25 and 5 °C with cell constant 6,6/cm – AVG, SD, SE, N and RSE.

6944	7,7	0,02	0,01	9	0,08	5,5	0,03	0,01	5	0,22
7500	7,8	0,02	0,01	9	0,07	5,7	0,03	0,01	5	0,26
8000	7,9	0,02	0,01	9	0,07	5,9	0,04	0,02	5	0,27
8571	8,0	0,02	0,01	9	0,07	6,2	0,04	0,02	5	0,27
8929	8,1	0,02	0,01	9	0,07	6,4	0,04	0,02	5	0,27
9615	8,3	0,02	0,01	9	0,08	6,9	0,04	0,02	5	0,29
10 000	8,4	0,02	0,01	9	0,07	7,1	0,05	0,02	5	0,31

**Preglednica A6:** Opisna statistika prevodnosti KON od 500 do 10 000 Hz pri 25 in 5 °C v celici s konstanto 3,3/cm – AVG, SD, SE, N in RSE.

**Table A6:** Descriptive statistics of KON conductivity from 500 to 10 000 Hz at 25 and 5 °C with cell constant 3,3/cm – AVG, SD, SE, N and RSE.

f	prevodnost KON pri 25 °C					prevodnost KON pri 5 °C				
	AVG	SD	SE	N	RSE	AVG	SD	SE	N	RSE
Hz	µS/cm	µS/cm	µS/cm	/	%	µS/cm	µS/cm	µS/cm	/	%
500	9,9	0,01	0,004	9	0,04	5,95	0,03	0,01	5	0,20
1000	9,9	0,02	0,005	9	0,05	5,95	0,03	0,01	5	0,19
1500	9,9	0,02	0,005	9	0,05	5,94	0,03	0,01	5	0,20
2000	9,9	0,02	0,005	9	0,05	5,94	0,03	0,01	5	0,21
2500	9,9	0,02	0,005	9	0,05	5,93	0,03	0,01	5	0,21
3000	9,9	0,02	0,006	9	0,06	5,91	0,03	0,01	5	0,21
3472	9,9	0,02	0,005	9	0,05	5,90	0,03	0,01	5	0,21
4000	9,9	0,02	0,005	9	0,05	5,88	0,03	0,01	5	0,22
4464	9,8	0,02	0,005	9	0,05	5,86	0,03	0,01	5	0,21
5000	9,8	0,02	0,005	9	0,05	5,83	0,03	0,01	5	0,22
5455	9,8	0,01	0,005	9	0,05	5,80	0,03	0,01	5	0,22
6000	9,8	0,01	0,005	9	0,05	5,77	0,03	0,01	5	0,22
6522	9,8	0,01	0,005	9	0,05	5,74	0,03	0,01	5	0,23
6944	9,7	0,01	0,005	9	0,05	5,72	0,03	0,01	5	0,23
7500	9,7	0,02	0,005	9	0,05	5,68	0,03	0,01	5	0,22
8000	9,7	0,02	0,005	9	0,06	5,65	0,03	0,01	5	0,23
8571	9,6	0,01	0,004	9	0,05	5,61	0,03	0,01	5	0,21
8929	9,6	0,01	0,005	9	0,05	5,60	0,03	0,01	5	0,22
9615	9,6	0,02	0,005	9	0,05	5,56	0,03	0,01	5	0,21
10 000	9,5	0,01	0,005	9	0,05	5,54	0,03	0,01	5	0,25

## PRILOGA B

### RAZVOJ SISTEMA BFK

#### 1. Natančnost meritev prevodnosti

Ponovljivost meritev sistema BFK smo preverili z meritvami desetih paralelk 0,5 mmol/L NaHCO<sub>3</sub> z vsakokratnim vstavljanjem in odstranjevanjem merilne celice. Tako smo ugotovili, kakšno napako naredimo pri vstavljanju merilne celice v stekleničke. Upoštevali smo povprečje desetih meritev vsake paralelke (glej pregl. B1).

**Preglednica B1:** Ponovljivost prevodnosti 10 paralelk 0,5 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, merjene pri 25 °C in petih frekvencah v 20-mL stekleničkah z vsakokratno odstranitvijo in ponovno vstavljavo merilne celice v stekleničke. Opisna statistika prevodnosti z AVG, SD, SE, N in RSE.

**Table B1:** Repeatability of conductivity of 10 parallels 0,5 mmol/L NaHCO<sub>3</sub> measured at 25 °C and five frequencies in 20-mL vials. Before each measurement the cell was removed and inserted back into the vials.

Descriptive statistics of conductivity with AVG, SD, SE, N and RSE.

<b>f (Hz)</b>	<b>100</b>	<b>120</b>	<b>1000</b>	<b>10 000</b>	<b>100 000</b>
AVG σ (μS/cm)	50,2	50,5	50,6	51,2	51,9
SD (μS/cm)	0,79	0,97	0,97	1,03	1,20
N (/)	10	10	10	10	10
SE (μS/cm)	0,25	0,31	0,31	0,33	0,38
RSE (%)	0,5	0,6	0,6	0,6	0,7

Največja RSE meritev prevodnosti 0,5 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, merjene pri 25 °C in petih frekvencah na zraku, je pri vsakokratnem vstavljanju merilne celice, 0,7 %. Pri nadalnjem delu bomo upoštevali povprečja desetih meritev prevodnosti z dvakrat večjo RSE, 1,5 %.

#### 2. Vpliv ε termostatske kopeli na prevodnost pri 10 000 in 100 000 Hz

Opazili smo, da so prevodnosti pri 10 000 in 100 000 Hz odvisne od dielektrične konstante termostatske kopeli, v katero postavimo stekleničke. Zato smo 0,5 mmol/L NaHCO<sub>3</sub> v 20-mL stekleničkah izmerili v treh sistemih merjenja, ki so se med seboj razlikovali v dielektričnih konstantah termostatske kopeli (glej sl. 17). Za vsak sistem smo imeli tri paralelke (glej pregl. B2).

**Preglednica B2:** Prevodnosti treh paralelk 0,5 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, merjene pri 25 °C v vodni in oljni kopeli ter brez termostatske kopeli. Opisna statistika z AVG, SD, SE in RSE.

**Table B2:** Conductivities of three parallels of 0,5 mmol/L NaHCO<sub>3</sub> measured at 25 °C in water and oil bath and without thermostat bath. Descriptive statistics with AVG, SD, SE and RSE.

<b>sistem</b>	<b>f (Hz)</b>	<b>100</b>	<b>120</b>	<b>1000</b>	<b>10 000</b>	<b>100 000</b>
Vodna kopel	AVG σ (μS/cm)	68,6	68,9	70,7	71,0	62,6
	SD (μS/cm)	0,69	0,68	0,66	0,64	0,66
	SE (μS/cm)	0,40	0,39	0,38	0,37	0,38
	RSE (%)	0,6	0,6	0,5	0,5	0,6

se nadaljuje

nadaljevanje

**Preglednica B2:** Prevodnosti treh paralelk 0,5 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, merjene pri 25 °C v vodni in oljni kopeli ter brez termostatske kopeli. Opisna statistika z AVG, SD, SE in RSE.

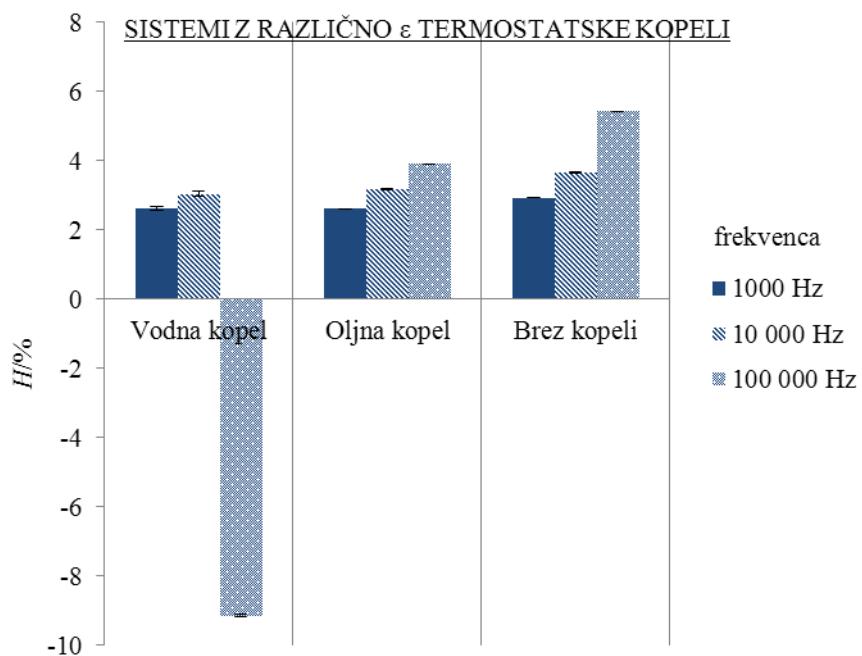
**Table B2:** Conductivities of three parallels of 0,5 mmol/L NaHCO<sub>3</sub> measured at 25 °C in water and oil bath and without thermostat bath. Descriptive statistics with AVG, SD, SE and RSE.

Oljna kopel	AVG $\sigma$ ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	68,8	69,1	70,9	71,3	71,8
	SD ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	0,21	0,21	0,22	0,23	0,23
	SE ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	0,12	0,12	0,13	0,13	0,13
	RSE (%)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
brez kopeli	AVG $\sigma$ ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	67,9	68,2	70,2	70,7	71,9
	SD ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	0,93	0,93	0,97	0,98	0,99
	SE ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	0,54	0,54	0,56	0,57	0,57
	RSE (%)	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8

**Preglednica B3:** Frekvenčni učinki pri 1000, 10 000 in 100 000 Hz treh paralelk 0,5 mmol/L NaHCO<sub>3</sub> v sistemih z različnimi dielektričnimi konstantami termostatske kopeli, vodna in oljna kopel ter brez termostatske kopeli, pri 25 °C.

**Table B3:** Frequency effects at 1000, 10 000 and 100 000 Hz of three parallels 0,5 mmol/L NaHCO<sub>3</sub> in systems with different dielectric constants, water and oil bath and without thermostat bath, at 25 °C.

sistem	$\varepsilon$ /	$H_{1000}$	$H_{10\ 000}$	$H_{100\ 000}$
		%	%	%
vodna kopel	80	2,6	3,0	-9,1
oljna kopel	2,5	2,6	3,2	3,9
brez kopeli	1	2,9	3,7	5,4



**Slika B1:** Frekvenčni učinki pri 1000 (polno), 10 000 (črtasto) in 100 000 Hz (pikčasto) 0,5 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, merjeni v sistemih z različnimi dielektričnimi konstantami termostatske kopeli: vodna ( $\varepsilon = 80$ ) in oljna kopel ( $\varepsilon = 2,5$ ) ter brez kopeli ( $\varepsilon = 1$ ), pri 25 °C.

**Figure B1:** Frequency effects at 1000 (filled), 10 000 (striped) and 100 000 Hz (dotted) of 0,5 mmol/L NaHCO<sub>3</sub> measured in systems with different dielectric constants, water ( $\epsilon = 80$ ) and oil bath ( $\epsilon = 2,5$ ) and without bath ( $\epsilon = 1$ ), at 25 °C.

Prevodnosti pri 100 000 Hz se med sistemi značilno razlikujejo (glej sl. B1). V sistemu brez termostatske kopeli, ko je steklenička v stiku z zrakom, prevodnost s frekvenco narašča. Pri 1000 Hz je frekvenčni učinek 2,9 %, pri 10 000 Hz 3,7 %, pri 100 000 Hz pa 5,4 % (glej pregl. B3). V sistemu z oljno kopeljo, ko je steklenička potopljena v časo z oljem z  $\epsilon \sim 2,5$ , je trend rasti prevodnosti s frekvenco manjši. Frekvenčni učinek pri 1000 Hz je 2,6 %, pri 10 000 Hz 3,2 %, pri 100 000 Hz pa 3,9 %. Medtem ko v sistemu z vodno kopeljo, ko je steklenička pomočena v dH<sub>2</sub>O termostatske kopeli z  $\epsilon = 80$ , prevodnost pri 1000 Hz raste za 2,6 %, pri 10 000 Hz za 3,0 %, pri 100 000 Hz pa pade za -9,1 %.

### 3. Vsebnost natrija, kalija, magnezija in kalcija po 310 dneh staranja

**Preglednica B4:** ICP-MS analiza natrija, kalija, kalcija in magnezija po 310 dneh na treh položajih staranja (PR, ST in MD) – opisna statistika z AVG, SD, N, SE in RSE.

**Table B4:** ICP-MS analysis of sodium, potassium, calcium and magnesium after 310 days on different ageing positions (PR, ST and MD) - descriptive statistics with AVG, SD, N, SE and RSE.

opisna statistika	PR	ST	MD
<b>AVG <math>c_{\text{Na}^+}</math> (mmol/L)</b>	<b>1,94E-01</b>	<b>2,14E-01</b>	<b>6,15E-02</b>
SD (mmol/L)	3,15E-02	5,23E-02	4,89E-03
N (/)	28	20	20
SE (mmol/L)	5,96E-03	1,17E-02	1,09E-03
RSE (%)	3,1	5,5	1,8
<b>AVG <math>c_{\text{K}^+}</math> (mmol/L)</b>	<b>3,13E-02</b>	<b>3,80E-02</b>	<b>7,89E-03</b>
SD (mmol/L)	2,23E-03	5,51E-03	9,05E-04
N (/)	29	21	21
SE (mmol/L)	3,53E-03	5,17E-03	6,25E-04
RSE (%)	11,32	13,66	7,74
<b>AVG <math>c_{\text{Ca}^{2+}}</math> (mmol/L)</b>	<b>2,51E-02</b>	<b>2,53E-02</b>	<b>1,36E-02</b>
SD (mmol/L)	2,74E-03	3,27E-03	3,34E-03
N (/)	29	21	21
SE (mmol/L)	3,37E-03	3,89E-03	1,67E-03
RSE (%)	13,58	15,34	14,42
<b>AVG <math>c_{\text{Mg}^{2+}}</math> (mmol/L)</b>	<b>8,70E-03</b>	<b>1,46E-02</b>	<b>2,60E-03</b>
SD (mmol/L)	1,09E-03	3,64E-03	6,47E-05
N (/)	29	21	21
SE (mmol/L)	1,14E-03	2,34E-03	1,83E-04
RSE (%)	13,08	15,96	7,08

Ugotovili smo, da imajo starani vzorci bistveno več natrija kot kalija, kalcija in magnezija, zato jih nismo upoštevali pri računanju teoretične prevodnosti (glej pregl. B4).

#### 4. Določitev vodikovega peroksida

**Preglednica B5:** Koncentracije vodikovega peroksida v 524 dni na prostem staranih obdelav MV, EV in EK ter v slepih paralelkah (Mq).

**Table B5:** Concentrations of hydrogen peroxide in 524 days PR aged treatments MV, EV and EK and in blind parallels (Mq).

opisna statistika	Mq	MV	EV	EK
AVG $c_{\text{H}_2\text{O}_2}$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	1,05	1,05	1,05	1,05
starost (d)	1	524	524	524
SD ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,01	0,00	0,00	0,00
N (/)	3	25	25	25

Ugotovili smo, da imajo starani vzorci, obdelani z elektrogeno in mehanogeno epitaksijo, enako koncentracijo vodikovega peroksida kot Mq (glej pregl. B5), zato ga nismo upoštevali pri računanju teoretične prevodnosti.

#### 5. Umeritvene krivulje prevodnosti $\text{NaHCO}_3$

Zvezo med koncentracijo in prevodnostjo določimo tako, da izmerimo prevodnost raztopin, katerih sestavo natančno poznamo ter iz rezultatov meritev in koncentracij izdelamo umeritveno krivuljo (UK). V preglednici B6 smo podali prevodnosti dveh paralel od 0 do 1 mmol/L  $\text{NaHCO}_3$  pri 25 °C in 5 °C. V preglednici B7 pa enačbe UK z odstopanjji od linearnosti ( $R^2$ ). Raztopine pri 25 °C smo merili brez, medtem ko smo raztopine pri 5 °C merili s termostatsko kopeljo. Odstopanja od 25 °C, merjena z vtičnim termometrom, so bila  $\pm 1$  °C.

**Preglednica B6: a)** Prevodnost svežih raztopin  $\text{NaHCO}_3$  pri 25 in 5 °C.

**Table B6: a)** Conductivities of fresh  $\text{NaHCO}_3$  solutions at 25 and 5 °C.

$c_{\text{NaHCO}_3}$	T	N	$\sigma_{100}$	$\sigma_{120}$	$\sigma_{1000}$	$\sigma_{10000}$	$\sigma_{100000}$
mmol/L	°C	/	$\mu\text{S/cm}$	$\mu\text{S/cm}$	$\mu\text{S/cm}$	$\mu\text{S/cm}$	$\mu\text{S/cm}$
0,00	25	2	6,6	6,6	6,6	6,7	7,1
0,05	25	2	12,4	12,4	12,5	12,6	12,9
0,10	25	2	16,6	16,6	16,8	16,9	17,3
0,20	25	2	25,4	25,4	25,7	25,9	26,5
0,30	25	2	34,1	34,1	34,6	34,9	35,6
0,40	25	2	43,6	43,7	44,4	44,9	45,8
0,50	25	2	52,7	52,9	53,9	54,6	55,6
0,60	25	2	62,2	62,3	63,7	64,4	65,7
0,80	25	2	81,0	81,3	83,1	84,0	85,7
1,00	25	2	95,4	95,7	98,0	98,9	101,0

se nadaljuje

nadaljevanje

**Preglednica B6: a)** Prevodnost svežih raztopin  $\text{NaHCO}_3$  pri 25 in 5 °C.

**Table B6: a)** Conductivities of fresh  $\text{NaHCO}_3$  solutions at 25 and 5 °C.

0,00	5	2	4,1	4,1	4,1	3,6	3,0
0,05	5	2	7,4	7,4	7,5	7,2	5,4
0,10	5	2	10,4	10,4	10,5	10,3	7,7
0,20	5	2	16,1	16,1	16,3	16,2	12,7
0,30	5	2	21,7	21,8	22,1	22,1	17,8
0,40	5	2	27,6	27,6	28,0	28,1	23,4
0,50	5	2	32,9	33,0	33,6	33,8	29,1
0,60	5	2	38,7	38,8	39,5	39,8	35,3
0,80	5	2	49,6	49,7	50,7	51,2	47,1

**Preglednica B6: b)** Razlike v prevodnosti med dvema paralelkama ( $\triangle$ ).

**Table B6: b)** Differences in conductivity between two parallels ( $\triangle$ ).

$c_{\text{NaHCO}_3}$	T	N	$\Delta_{100}$	$\Delta_{120}$	$\Delta_{1\ 000}$	$\Delta_{10\ 000}$	$\Delta_{100\ 000}$
mmol/L	°C	/	μS/cm	μS/cm	μS/cm	μS/cm	μS/cm
0,00	25	2	0,3	0,3	0,5	0,4	0,3
0,05	25	2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
0,10	25	2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2
0,20	25	2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
0,30	25	2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
0,40	25	2	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
0,50	25	2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
0,60	25	2	1,2	1,2	1,3	1,3	1,3
0,80	25	2	1,8	1,8	1,8	1,9	1,9
1,00	25	2	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1
0,00	5	2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
0,05	5	2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,10	5	2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
0,20	5	2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4
0,30	5	2	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
0,40	5	2	0,5	0,5	0,4	0,4	0,4
0,50	5	2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1
0,60	5	2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,80	5	2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2
1,00	5	1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

**Preglednica B7:** Enačbe UK prevodnosti svežih razt. NaHCO<sub>3</sub> pri 25 in 5 °C z odstopanji od linearnosti R<sup>2</sup>.

Prevodnosti σ<sub>UK</sub> v μS/cm, koncentracije c<sub>NaHCO<sub>3</sub></sub> v mmol/L.

**Table B7:** Equations of CC conductivity of fresh NaHCO<sub>3</sub> solutions at 25 and 5 °C with deviations from linearity R<sup>2</sup>. Conductivities σ<sub>UK</sub> in μS/cm, concentrations c<sub>NaHCO<sub>3</sub></sub> in mmol/L.

T (°C)	opis	100 Hz	120 Hz	1000 Hz	10 000 Hz	100 000 Hz
25	enačba	σ <sub>UK</sub> = 89,8 c <sub>NaHCO<sub>3</sub></sub> + 8	σ <sub>UK</sub> = 90,1 c <sub>NaHCO<sub>3</sub></sub> + 8	σ <sub>UK</sub> = 92,4 c <sub>NaHCO<sub>3</sub></sub> + 7	σ <sub>UK</sub> = 93,4 c <sub>NaHCO<sub>3</sub></sub> + 7	σ <sub>UK</sub> = 95,2 c <sub>NaHCO<sub>3</sub></sub> + 8
	R <sup>2</sup>	0,9983	0,9983	0,9983	0,9983	0,9983
5	enačba	σ <sub>UK</sub> = 56,6 c <sub>NaHCO<sub>3</sub></sub> + 5	σ <sub>UK</sub> = 56,7 c <sub>NaHCO<sub>3</sub></sub> + 5	σ <sub>UK</sub> = 58,1 c <sub>NaHCO<sub>3</sub></sub> + 5	σ <sub>UK</sub> = 59,0 c <sub>NaHCO<sub>3</sub></sub> + 4	σ <sub>UK</sub> = 56,0 c <sub>NaHCO<sub>3</sub></sub> + 2
	R <sup>2</sup>	0,9996	0,9996	0,9997	0,9996	0,9973

Mq voda je služila za topilo, zato smo jo uporabili za koncentracijo nič. Kljub temu, da je prevodnost Mq, merjena v 2,5-mL steklenički, približno dvakrat višja, kot če ji prevodnost izmerimo v 20-mL steklenički, smo jo upoštevali pri UK. Zaradi tega so bile izračunane presežne prevodnosti raztopin nižje za približno 5 μS/cm. Elia in sod. (2007) so namreč objavili enačbo UK NaHCO<sub>3</sub> pri 25 °C ter 2,5 kHz:

$$\sigma [\mu\text{S}/\text{cm}] = 93,7 \cdot c_{\text{NaHCO}_3} [\text{mmol}/\text{L}] + 2 \quad \dots(\text{B1})$$

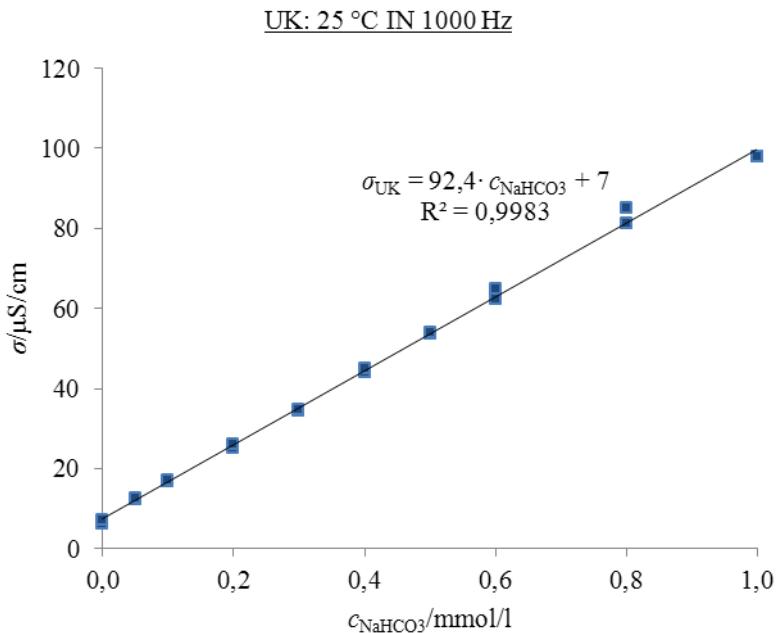
, ki je precej podobna tisti, ki jo dobimo s sistemom BFK in 2,5-mL stekleničkah pri 1 kHz in 25 °C:

$$\sigma [\mu\text{S}/\text{cm}] = 92,4 \cdot c_{\text{NaHCO}_3} [\text{mmol}/\text{L}] + 7 \quad \dots(\text{B2})$$

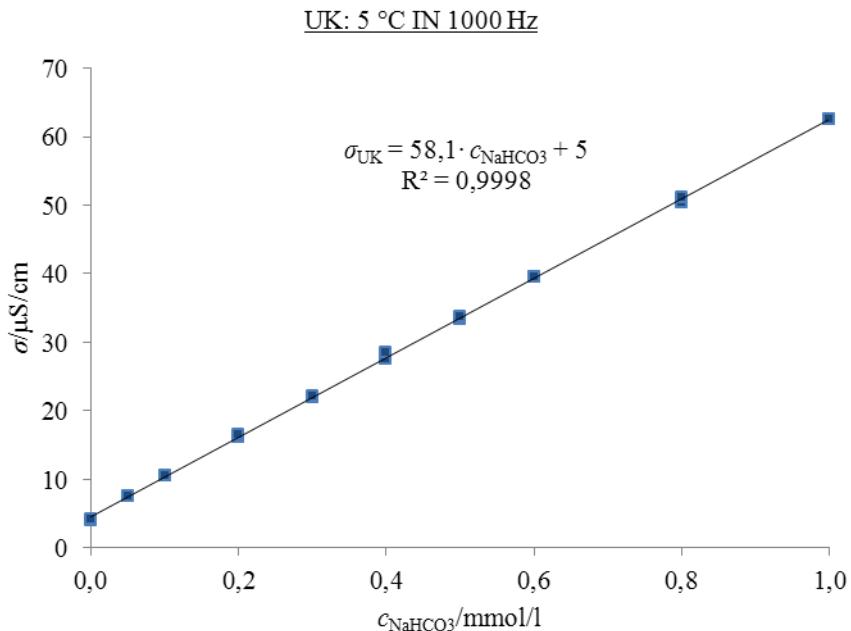
oziroma pri 10 kHz in 25 °C:

$$\sigma [\mu\text{S}/\text{cm}] = 93,4 \cdot c_{\text{NaHCO}_3} [\text{mmol}/\text{L}] + 7 \quad \dots(\text{B3})$$

Grafi z UK so si pri posameznih frekvencah in temperaturah podobni, zato smo izmed desetih ponazorili obe UK pri 1000 Hz (glej sl. B2 in B3).



**Slika B2:** UK dveh paralelk raztopin  $\text{NaHCO}_3$  pri  $25^\circ\text{C}$  in  $1000\text{ Hz}$ .  
**Figure B2:** CC of two parallels of  $\text{NaHCO}_3$  solutions at  $25^\circ\text{C}$  and  $1000\text{ Hz}$ .



**Slika B3:** UK dveh paralelk raztopin  $\text{NaHCO}_3$  pri  $5^\circ\text{C}$  in  $1000\text{ Hz}$ .  
**Figure B3:** CC of two parallels of  $\text{NaHCO}_3$  solutions at  $5^\circ\text{C}$  and  $1000\text{ Hz}$ .

Prevodnosti pri  $100\,000\text{ Hz}$ , merjene pri  $25^\circ\text{C}$  brez termostatske kopeli, rastejo z višanjem frekvence, medtem ko prevodnosti pri  $5^\circ\text{C}$ , merjene s termostatsko kopeljo, z višanjem frekvence rastejo do  $10\,000\text{ Hz}$ , nato pa pri  $100\,000\text{ Hz}$  zaradi neželenih stranskih električnih tokov vzdolž celičnih sten padejo pod vrednosti pri  $100\text{ Hz}$  (glej pregl. B4).

000 Hz prevodnosti pri 25 in 5 °C torej neposredno ne moremo primerjati. Ker pa smo pazili, da je bila sestava termostatske kopeli pri meritvah prevodnosti svežih in staranih raztopin  $\text{NaHCO}_3$  čim bolj enaka, smo s tem približno izničili vpliv okolice tako, da smo starane raztopine med seboj primerjali s koeficienti  $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$ . Ker so bile vrednosti koeficientov presežne in izmerjene prevodnosti staranih raztopin približno enake tako pri 5 kot pri 25 °C, smo predpostavili, da so meritve pri 25 °C kljub neuporabi termostata dovolj natančne.

## 6. Frekvenčni učinki

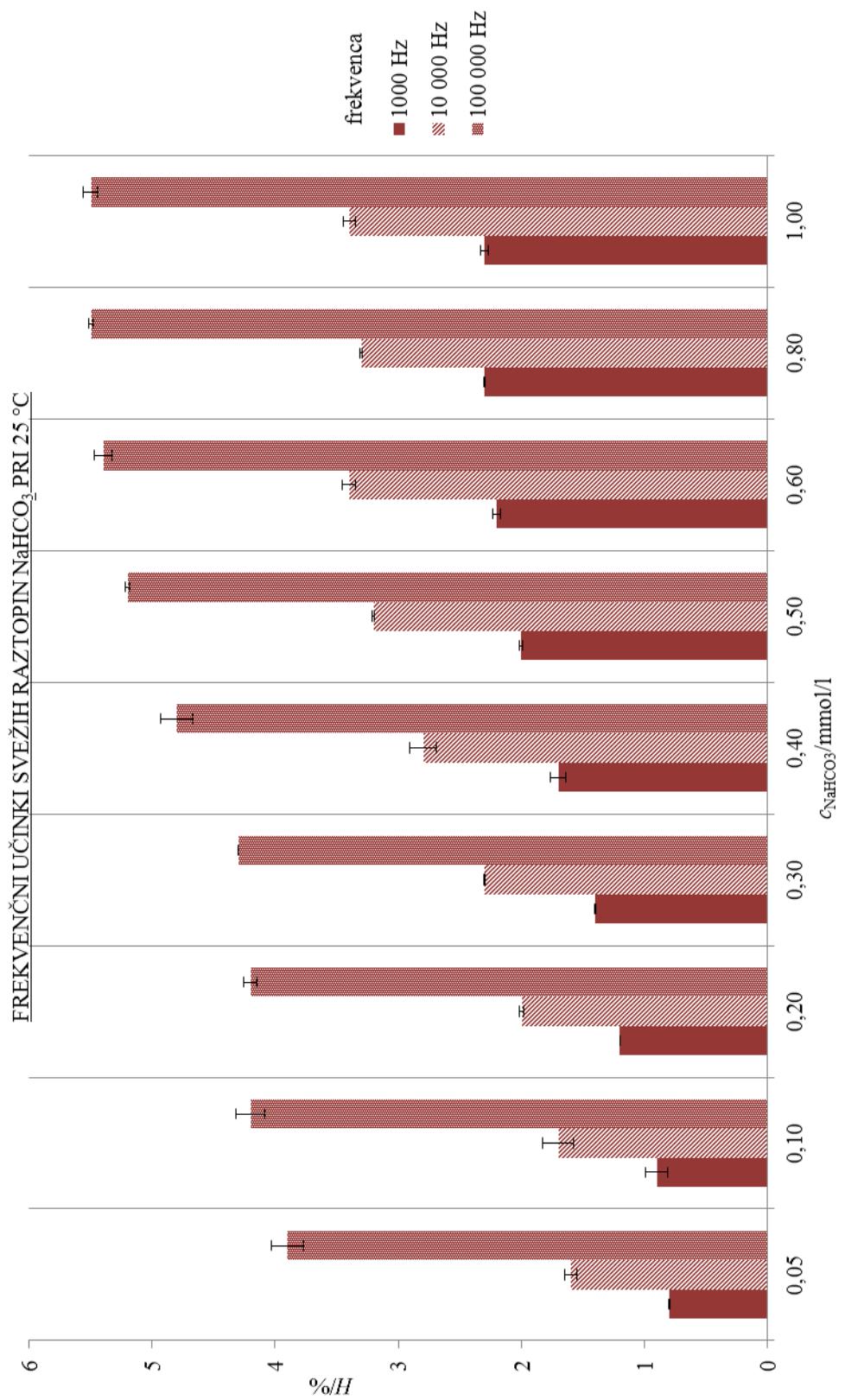
S pomočjo rezultatov prevodnosti raztopin, pripravljenih za UK, smo po enačbi 2 izračunali frekvenčne učinke pri različnih koncentracijah  $\text{NaHCO}_3$  (glej pregl. B8 ter sl. B4 in B5).

**Preglednica B8:** Frekvenčni učinki pri 1000, 10 000 in 100 000 Hz razt.  $\text{NaHCO}_3$  pri 25 in 5 °C.

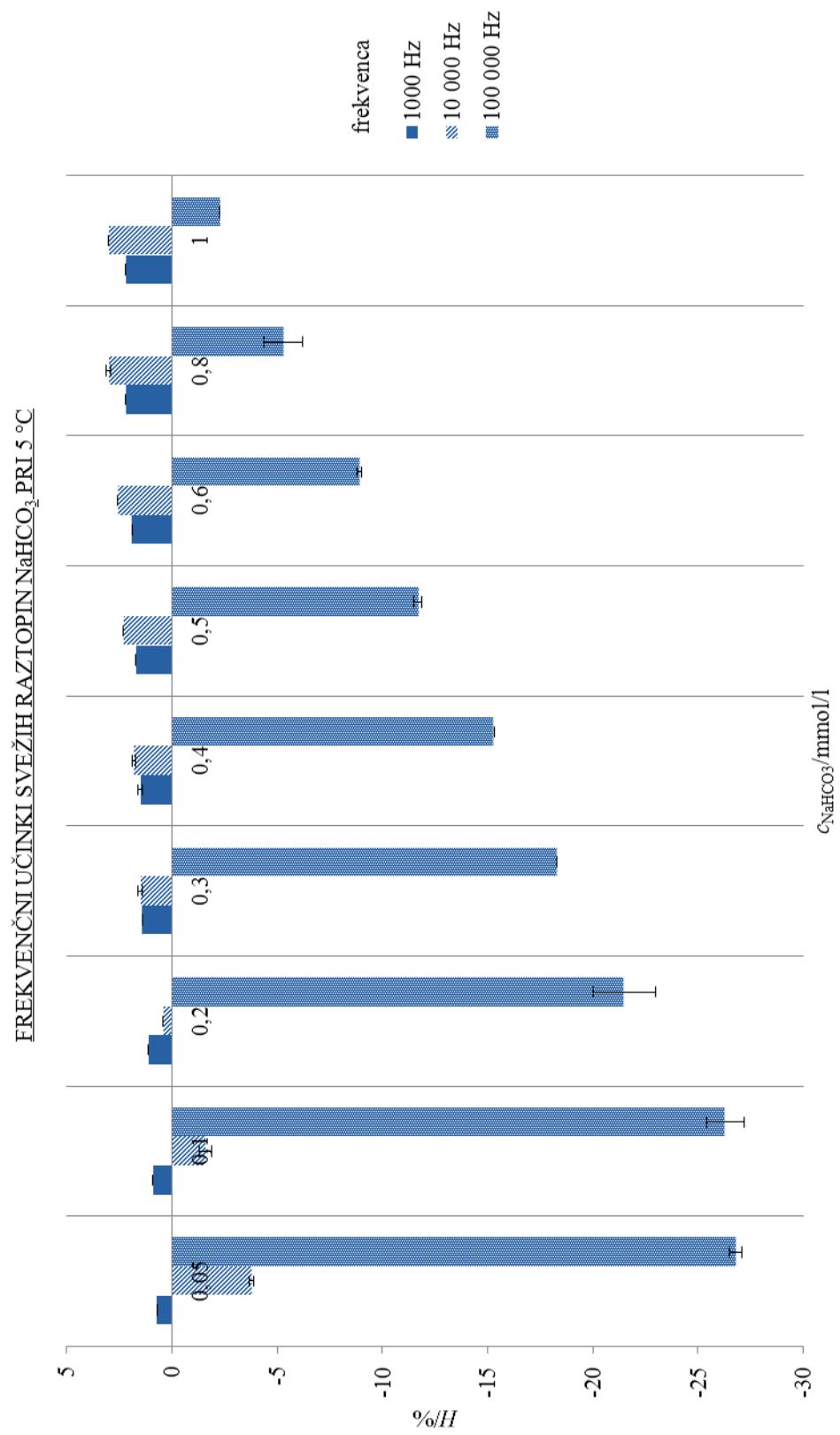
**Table B8:** Frequency effects at 1000, 10 000 and 100 000 Hz of  $\text{NaHCO}_3$  sol. at 25 in 5 °C.

$c_{\text{NaHCO}_3}$	$T = 25 \text{ } ^\circ\text{C}$			$T = 5 \text{ } ^\circ\text{C}$		
	$H_{1000} (\%)$	$H_{10\ 000} (\%)$	$H_{100\ 000} (\%)$	$H_{1000} (\%)$	$H_{10\ 000} (\%)$	$H_{100\ 000} (\%)$
0,00	0,2	1,3	7,3	0,1	-11,8	-26,2
0,05	0,8	1,6	3,9	0,7	-3,8	-26,8
0,10	0,9	1,7	4,2	0,9	-1,6	-26,3
0,20	1,2	2,0	4,2	1,1	0,4	-21,5
0,30	1,4	2,3	4,3	1,4	1,5	-18,3
0,40	1,7	2,8	4,8	1,5	1,8	-15,3
0,50	2	3,2	5,2	1,7	2,3	-11,7
0,60	2,2	3,4	5,4	1,9	2,6	-8,9
0,80	2,3	3,3	5,5	2,2	3,0	-5,3
1,00	2,3	3,4	5,5	2,2	3,0	-2,3

Pri 25 °C, ko smo prevodnosti merili brez termostatske kopeli, se vrednosti z višanjem frekvence zvišujejo, kar je v skladu z ugotovitvami Wachterja in Barthela (1979), medtem ko so pri 5 °C zaradi neželenih kapacitivnih vplivov termostatske kopeli prevodnosti raztopin od 0 do 0,1 mmol/L  $\text{NaHCO}_3$  pri 10 000 in 100 000 Hz nižje kot pri 100 in 120 Hz. Frekvenčni učinki pri 1000 Hz so pri obeh temperaturah podobni, zato smo jih med seboj primerjali pri staranih raztopinah. Pri 25 °C so 2,3 %, pri 5 °C pa 2,2 % (glej pregl. B8). Frekvenčni učinki pri 10 000 in 25 °C se višajo z večanjem koncentracije iz 1,3 na 3,4 %, pri 100 000 Hz pa iz 4,0 na 7,3 %. Pri 5 °C pa so frekvenčni učinki pri 10 000 Hz in koncentracijah od nič do 0,1 mmol/L ter frekvenčni učinki pri 100 000 Hz negativni. Frekvenčni učinki pri 10 000 Hz in koncentracijah  $\geq 0,1$  mmol/L pa so primerljivi z meritvami brez termostata pri 25 °C.



**Slika B4:** Frekvenčni učinki pri 1000 (polno), 10 000 (črtasto) in 100 000 Hz (pikčasto) svežih raztopin N<sub>A</sub>HCO<sub>3</sub> pri 25 °C.  
**Figure B4:** Frequency effects at 1000 (filled), 10 000 (dotted) and 100 000 Hz (dotted) of fresh N<sub>A</sub>HCO<sub>3</sub> sol. at 25 °C



**Slika B5:** Frekvenčni učinki pri 1000 (polno), 10 000 (črasto) in 100 000 Hz (pikčasto) svežih raztopin  $\text{NaHCO}_3$  pri  $5^\circ\text{C}$ , termostatska kopel z 10 %  $\text{NaCl}$  aq.  
**Figure B5:** Frequency effects at 1000 (filled), 10 000 (dotted) and 100 000 Hz (striped) of fresh  $\text{NaHCO}_3$  sol. at  $5^\circ\text{C}$ , thermostat bath with 10 %  $\text{NaCl}$  aq

## 7. Prevodnost sveže obdelanih raztopin

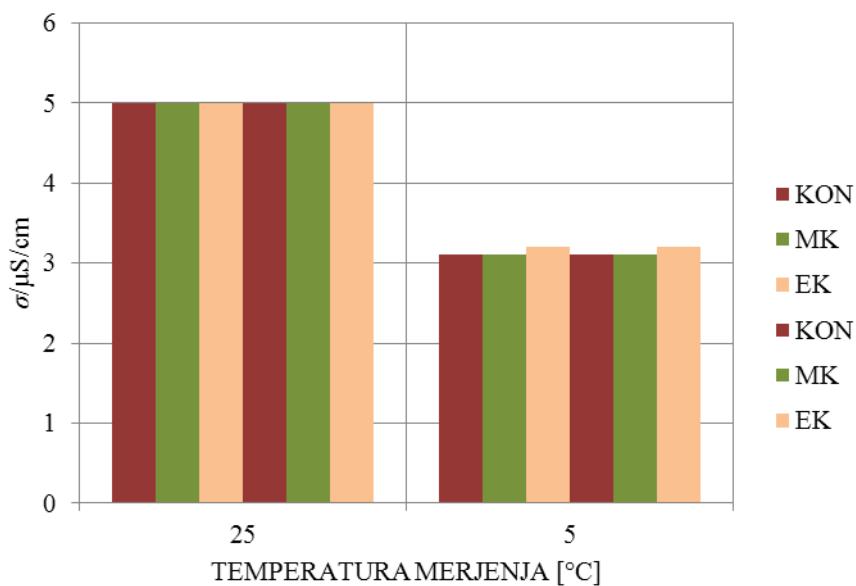
Izhodiščno raztopino smo obdelali z mehanogeno in elektrogeno epitaksijo ter izmerili prevodnost pri 25 °C brez termostatske kopeli in pri 5 °C v termostatski kopeli z 10 % NaCl aq. v 20-mL stekleničkah.

**Preglednica B9:** Prevodnosti obdelav KON, MK in EK en dan po obdelavi z mehanogeno oziroma elektrogeno epitaksijo pri 25 in 5 °C.

**Table B9:** Conductivities of KON, MK and EK one day after the treatment with mechanogenic or electrogenic epitaxy at 25 and 5 °C.

obdelava	T °C	$\sigma_{100}$ μS/cm	$\sigma_{120}$ μS/cm	$\sigma_{1000}$ μS/cm	$\sigma_{10\ 000}$ μS/cm	$\sigma_{100\ 000}$ μS/cm
KON	25	5,0	5,0	5,0	5,1	5,0
MK	25	5,0	5,0	5,0	5,0	5,1
EK	25	5,0	5,0	5,0	5,1	5,1
KON	5	3,1	3,1	3,1	2,3	2,0
MK	5	3,1	3,1	3,1	2,3	2,1
EK	5	3,2	3,2	3,2	2,4	2,2

### PREVODNOST KON, MK IN EK TAKOJ PO OBDELAVI



**Slika B6:** Prevodnost obdelav KON (rdeča), MK (zelena) in EK (oranžna) en dan po obdelavi z mehanogeno oziroma elektrogeno epitaksijo pri 1000 Hz, 25 in 5 °C.

**Figure B6:** Conductivity of treatments KON (red), MK (green) and EK (orange) one day after mehanogenic and electrogenic epitaxy at 1000 Hz, 25 and 5 °C.

Prevodnosti raztopin, obdelanih z mehanogeno in elektrogeno epitaksijo, se en dan po obdelavi ne razlikuje od kontrol ne pri 25 ne pri 5 °C (glej pregl. B9 in sl. B6). Zato smo sledili ugotovitvam Elijeve raziskovalne skupine in raztopine starali.

## 8. Vpliv raztopljenega CO<sub>2</sub>

Vpliv absorpcije CO<sub>2</sub> na prevodnost staranih raztopin smo preverili tako, da smo primerjali koeficiente izmerjene in teoretične prevodnosti pri raztopinah, staranih 310 oziroma 370 dni na položaju PR z različnimi razmerji med volumnom zraka in volumnom raztopine. Nad 2 mL raztopinah v 2,5-mL stekleničkah je 0,5 mL zraka, medtem ko je nad 2 mL raztopinah v 20-mL stekleničkah 18 mL zraka. Pri tem pa so koeficienti vseh staranih 2 mL raztopin približno enaki in znašajo okoli 174 % (glej pregl. B10). Poleg tega so  $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$  5 mL ( $V_{\text{ZRAK}}/V_{\text{RAZTOPINA}} = 3$ ) in 10 mL raztopin ( $V_{\text{ZRAK}}/V_{\text{RAZTOPINA}} = 1$ ) nižji od  $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$  2 mL raztopin z bistveno nižjim razmerjem med volumnom zraka in volumnom raztopine ( $V_{\text{ZRAK}}/V_{\text{RAZTOPINA}} = 0,25$ ). Iz tega predvidevamo, da absorpcija CO<sub>2</sub> ni bistveno vplivala na nastanek presežnih prevodnosti.

**Preglednica B10:** Vpliv raztopljenega CO<sub>2</sub> ( $V_{\text{ZRAK}}/V_{\text{RAZTOPINA}}$ ) na  $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$  staranih raztopin. Prevodnost merjena pri 25 °C in 1000 Hz, obdelave so združene.

**Table B10:** Influence of dissolved CO<sub>2</sub> ( $V_{\text{AIR}}/V_{\text{SOLUTION}}$ ) on  $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$  of aged solutions. Conductivity measured at 25 °C and 1000 Hz, treatments are united.

<b><math>V_{\text{STEKLENICK}}</math> mL</b>	<b><math>V_{\text{RAZTOPINA}}</math> mL</b>	<b><math>V_{\text{ZRAK}}</math> mL</b>	<b><math>V_{\text{ZRAK}}/V_{\text{RAZTOPINA}}</math></b> /	<b><math>S/V</math></b> <b>1/cm</b>	<b><math>\sigma/\sigma_{\text{UK}1000}</math></b>		
					<b>AVG (%)</b>	<b>SE (%)</b>	<b>N (/)</b>
2,5	2	0,5	0,25	3,9	171,9	2,4	28
20	2	18	9	4,0	176,3	0,8	8
20	5	15	3	2,6	156,7	1,9	10
20	10	10	1	2,1	136,8	2,2	10

## PRILOGA C

### PONOVLJVOST STARANJA

**Preglednica C1:** Ponovljivost staranja –  $\sigma$ ,  $H$  in  $c_{\text{NaHCO}_3}$  KON, MV, MK, EV in EK priprave PR1. PR1 starana 310 dni,  $\sigma$  merjena pri 25 °C.

**Table C1:** Repeatability of ageing –  $\sigma$ ,  $H$  and  $c_{\text{NaHCO}_3}$  of KON, MV, MK, EV and EK of preparation PR1. PR1 aged for 310 days,  $\sigma$  measured at 25 °C.

obd	N	s	$\sigma_{120}$	$\sigma_{1000}$	$\sigma_{10\ 000}$	$\sigma_{100\ 000}$	$c_{\text{NaHCO}_3}$	$H_{1000}$	$H_{10000}$	$H_{100\ 000}$
/	/	/	$\mu\text{S}/\text{cm}$	$\mu\text{S}/\text{cm}$	$\mu\text{S}/\text{cm}$	$\mu\text{S}/\text{cm}$	$\text{mmol/L}$	%	%	%
KON	5	1	35,3	36,4	37,0	37,9	0,19	3,0	4,8	7,2
		2	43,8	44,8	45,4	46,3	0,11	2,4	3,6	5,6
		3	37,2	38,0	38,5	39,5	0,17	2,1	3,4	6,2
		4	51,0	52,3	53,0	54,0	0,24	2,6	4,0	6,0
		5	59,3	60,9	61,7	62,9	0,26	2,6	4,0	6,0
MV	7	6	46,2	47,3	47,8	48,9	0,21	2,3	3,5	5,9
		7	46,3	47,3	47,8	48,8	0,22	2,2	3,3	5,5
		8	51,2	52,3	52,9	53,9	0,22	2,2	3,4	5,3
		9	34,7	35,4	35,8	36,5	0,17	1,9	3,0	5,2
		10	42,6	43,9	44,6	45,5	0,22	3,1	4,8	7,0
		11	38,1	39,3	40,0	40,8	0,19	3,2	4,9	7,2
		12	34,7	35,8	36,4	37,2	0,19	3,1	4,9	7,2
MK	7	13	38,3	39,4	40,0	40,9	0,19	2,9	4,5	6,8
		14	39,1	40,2	40,9	41,7	0,18	2,9	4,6	6,7
		15	40,9	41,7	42,1	42,9	0,19	1,9	2,9	4,9
		16	43,8	44,6	45,1	45,9	0,19	1,9	2,9	4,8
		17	42,0	42,8	43,2	44,0	0,18	1,9	2,9	4,8
		18	42,7	43,5	44,0	44,9	0,20	2,0	3,1	5,2
		19	32,1	32,5	32,8	33,5	0,15	1,5	2,4	4,4
EV	5	20	34,5	35,1	35,5	36,1	0,16	1,8	2,8	4,7
		21	54,5	55,7	56,4	57,7	0,24	2,3	3,5	6,0
		22	37,5	38,2	38,6	39,6	0,18	1,8	2,8	5,5
		23	38,5	39,2	39,6	40,7	0,18	1,7	2,7	5,6
		24	50,5	51,6	52,1	53,2	0,23	2,1	3,2	5,3
EK	5	25	46,9	47,9	48,4	49,3	0,21	2,1	3,2	5,1
		26	37,5	38,1	38,4	39,5	0,18	1,7	2,6	5,5
		27	37,5	38,1	38,6	39,3	0,16	1,8	2,9	5,0
		28	45,5	46,5	46,9	47,8	0,21	2,0	3,1	4,9
		29	47,0	48,0	48,4	49,4	0,23	2,0	2,9	4,9

**Legenda k preglednici C1:**

s... zaporedna številka stekleničke za LMM,  
obd... obdelava

**Preglednica C2:** Ponovljivost staranja –  $\sigma$ ,  $H$  in  $c_{\text{NaHCO}_3}$  KON, MV, MK, EV in EK priprave PR2. PR2 starana 310 dni,  $\sigma$  merjena pri 25 °C.

**Table C2:** Repeatability of ageing –  $\sigma$ ,  $H$  and  $c_{\text{NaHCO}_3}$  of KON, MV, MK, EV and EK of preparation PR2. PR2 aged for 310 days,  $\sigma$  measured at 25 °C.

obd.	N	s	$\sigma_{120}$	$\sigma_{1000}$	$\sigma_{10\ 000}$	$\sigma_{100\ 000}$	$c_{\text{NaHCO}_3}$	$H_{1000}$	$H_{10000}$	$H_{100\ 000}$
/	/	/	$\mu\text{S}/\text{cm}$	$\mu\text{S}/\text{cm}$	$\mu\text{S}/\text{cm}$	$\mu\text{S}/\text{cm}$	$\text{mmol/L}$	%	%	%
KON	5	30	50,2	55,5	57,1	58,4	0,24	8,5	11,4	13,8
		31	42,6	46,6	47,9	49,3	0,19	7,4	10,0	13,1
		32	27,9	30,3	31,2	31,7	0,18	6,3	8,6	10,7
		33	48,3	53,0	54,4	55,6	0,23	7,8	10,4	12,8
		34	55,7	60,7	62,5	63,9	0,25	7,6	10,3	12,8
MV	5	35	38,2	42,4	43,9	45,0	0,19	8,5	11,7	14,4
		36	37,5	41,5	42,9	43,8	0,18	8,3	11,3	13,7
		37	42,1	46,7	48,2	49,2	0,21	8,5	11,5	14,0
		38	22,1	24,1	24,8	25,2	0,14	6,1	8,4	10,6
		39	33,1	36,5	37,7	38,4	0,18	7,7	10,4	12,8
MK	7	40	42,4	47,4	49,1	50,4	0,21	9,3	12,5	15,4
		41	35,3	39,2	40,6	41,6	0,17	8,4	11,6	14,3
		42	38,7	43,0	44,5	45,4	0,19	8,6	11,7	14,2
		43	21,3	23,2	23,8	24,4	0,14	6,1	8,2	10,7
		44	23,3	25,5	26,3	26,8	0,14	6,5	8,9	11,2
		45	38,3	42,7	44,2	45,1	0,18	8,9	12,0	14,3
		46	43,7	48,5	50,1	51,7	0,19	8,7	11,7	15,0
EV	5	47	31,5	34,8	35,9	36,6	0,17	7,7	10,5	12,8
		48	45,3	50,2	51,9	53,2	0,25	8,7	11,8	14,6
		49	48,5	53,8	55,6	56,9	0,22	9,0	12,1	14,7
		50	45,7	50,6	52,3	53,5	0,20	8,7	11,8	14,3
		51	46,4	51,4	52,9	54,0	0,21	8,6	11,4	13,7
EK	5	52	37,8	41,6	42,9	43,8	0,19	7,8	10,7	12,9
		53	40,9	45,2	46,5	47,5	0,19	8,3	10,9	13,2
		54	42,1	46,5	48,0	49,0	0,20	8,3	11,1	13,6
		55	41,1	45,2	46,7	47,7	0,17	8,0	10,9	13,3
		56	43,5	48,0	49,5	50,6	0,20	8,3	11,2	13,6

**Legenda k preglednici C2:**

s... zaporedna številka stekleničke za LMM,

**Preglednica C3:** Ponovljivost prevodnosti pri staranju PR1 in PR2 pri 25 °C in 1000 Hz, če združimo obdelave. Opisna statistika  $\sigma$  PR1 in PR2 1. in 310. dan z AVG, N, SE in RSE.

**Table C3:** Repeatability of conductivity upon ageing of PR1 and PR2 at 25 °C and 1000 Hz, if treatments are united. Descriptive statistics of  $\sigma$  the 1<sup>st</sup> and 310<sup>th</sup> day with AVG, N, SE and RSE.

čas staranja (d)	opisna statistika	PR1	PR2
1	AVG $\sigma$ ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	12,5	
	N (/)	56	
	SE ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	0,19	
	RSE (%)	1,5	
310	AVG $\sigma$ ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	43,3	43,5
	N (/)	29	27
	SE ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	1,3	1,8
	RSE (%)	2,9	4,2

**Preglednica C4:** Ponovljivost  $c_{\text{NaHCO}_3}$  pri staranju – opisna statistika  $c_{\text{NaHCO}_3}$  310 dni staranih PR1 in PR2 z AVG, SD, SE in RSE.

**Table C4:** Repeatability of  $c_{\text{NaHCO}_3}$  upon ageing – descriptive statistics of  $c_{\text{NaHCO}_3}$  of 310 days aged PR1 and PR2 with AVG, SD, SE and RSE.

opisna statistika	PR1	PR2
AVG $c_{\text{NaHCO}_3}$ (mmol/L)	0,19	0,19
SD (mmol/L)	3,12E-02	2,94E-02
N (/)	29	27
SE (mmol/L)	5,79E-03	5,68E-02
RSE (%)	3,0	2,9

**Preglednica C5:** Ponovljivost  $\sigma$  staranih raztopin pri 1000 Hz. Opisna statistika  $\sigma$  obdelav PR1 in PR2 z AVG, SD, N, SE in RSE ter testi normalnosti porazdelitve Shapiro-Wilk (TNP S-W).

**Table C5:** Repeatability of  $\sigma$  upon ageing at 1000 Hz. Descriptive statistics of PR1 and PR2 treatments  $\sigma$  with AVG, SD, N, SE and RSE and tests of normality Shapiro-Wilk (TNP S-W).

obdelava	opisna statistika	PR1	PR2
KON	AVG $\sigma$ ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	46,5	49,2
	SD ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	10,2	11,7
	N (/)	5	5
	SE ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	4,58	5,24
	RSE (%)	9,8	10,6
	TNP S-W <sub>KON</sub> (Sig.)	0,604	
MV	AVG $\sigma$ ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	43,0	38,2
	SD ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	6,42	8,69
	N (/)	7	5
	SE ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	2,43	3,89
	RSE (%)	5,6	10,2
	TNP S-W <sub>MV</sub> (Sig.)	0,579	

se nadaljuje

nadaljevanje

**Preglednica C5:** Ponovljivost  $\sigma$  staranih raztopin pri 1000 Hz. Opisna statistika  $\sigma$  obdelav PR1 in PR2 z AVG, SD, N, SE in RSE ter testi normalnosti porazdelitve Shapiro-Wilk (TNP S-W).

**Table C5:** Repeatability of  $\sigma$  upon ageing at 1000 Hz. Descriptive statistics of PR1 and PR2 treatments  $\sigma$  with AVG, SD, N, SE and RSE and tests of normality Shapiro-Wilk (TNP S-W).

MK	AVG $\sigma$ ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	<b>40,7</b>	<b>48,5</b>
	SD ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	4,03	1,02
	N (/)	7	7
	SE ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	1,52	3,84
	RSE (%)	3,7	10,0
	TNP S-W <sub>MK</sub> (Sig.)	0,021	
EV	AVG $\sigma$ ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	<b>44,0</b>	<b>48,2</b>
	SD ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	9,11	7,62
	N (/)	5	5
	SE ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	4,07	3,41
	RSE (%)	9,3	7,1
	TNP S-W <sub>EV</sub> (Sig.)	0,042	
EK	AVG $\sigma$ ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	<b>43,7</b>	<b>45,3</b>
	SD ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	5,14	2,39
	N (/)	5	5
	SE ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	2,30	1,07
	RSE (%)	5,3	2,4
	TNP S-W <sub>EK</sub> (Sig.)	0,022	
statistični testi	TNP S-W glede na pripravi (Sig.)	0,239	0,125
	Levenov test glede na obdelave (Sig.)	0,052	
	Levenov test glede na pripravi (Sig.)	0,216	

**Preglednica C6:** Primerjava PR1 in PR2 po obdelavah z UA (odvisna spremenljivka:  $\sigma_{1000}$ , fiksni faktor: priprava, obdelava) in LMM (subjekt: steklenička, odvisna spremenljivka:  $\sigma_{1000}$ , faktor: priprava, obdelava; polna faktorska analiza).

**Table C6:** Comparison of PR1 and PR2 upon treatments with UA (dependent variable:  $\sigma_{1000}$ , fixed factor: preparation, treatment) in LMM (subject: vial, dependent variable:  $\sigma_{1000}$ , factor: preparation, treatment; full factorial analysis).

statistični faktorji	UA	LMM
interakcija priprava*obdelava (Sig.)	1,000	0,664
priprava (Sig.)	1,000	0,887
obdelava (Sig.)	0,078	0,078

**Preglednica C7:** Vpliv staranja na frekvenčne učinke (H) priprav PR1 in PR2, če združimo obdelave. Opisna statistika H 1. in 310. dan z AVG, N in SE.

**Table C7:** Influence of ageing on frequency effects (H) of preparations PR1 and PR2, if treatments are united. Descriptive statistics of H the 1<sup>st</sup> and 310<sup>th</sup> day with AVG, N and SE.

čas staranja (d)	opisna statistika	PR1			PR2		
		1000 Hz	10 000 Hz	100 000 Hz	1000 Hz	10 000 Hz	100 000 Hz
1	AVG H (%)	0,8	1,6	3,9	0,9	1,7	4,2
	N (/)	29	29	29	27	27	27
	SE (%)	0,0	0,0	0,6	0,1	0,1	0,1
310	AVG H (%)	2,2	3,5	5,7	8,0	10,8	13,5
	N (/)	29	29	29	27	27	27
	SE (%)	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2

**Preglednica C8:** Ponovljivost H staranih raztopin. Opisna statistika H 310 dni staranih obdelav PR1 in PR2 z AVG, SD, N, SE in RSE, TNP S-W, test homogenosti varianc (Levenov test), Mauchlyjev in Greenhouse-Geisserjev test.

**Table C8:** Repeatability of H upon ageing – descriptive statistics of H of 310 days aged PR1 and PR2 treatments with AVG, SD, N, SE and RSE, TNP S-W, Levene test of homogeneity of variances, Mauchly's and Greenhouse-Geisser test.

obdelava	opisna statistika	PR1			PR2		
		1000 Hz	10 000 Hz	100 000 Hz	1000 Hz	10 000 Hz	100 000 Hz
KON	AVG H (%)	2,5	3,9	6,2	7,5	10,1	12,8
	SD (%)	0,3	0,6	0,6	0,8	1,0	1,1
	N (/)	5	5	5	5	5	5
	SE (%)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,4	0,5
	RSE (%)	5,7	6,3	4,2	4,8	4,4	3,9
	TNP S-W (Sig.)	0,228			0,488		
MV	AVG H (%)	2,6	4,0	6,2	7,8	10,7	13,3
	SD (%)	0,5	0,8	0,9	1,0	1,3	1,5
	N (/)	7	7	7	5	5	5
	SE (%)	0,2	0,3	0,3	0,5	0,6	0,7
	RSE (%)	7,8	8,0	5,5	5,9	5,6	4,9
	TNP S-W (Sig.)	0,090			0,485		
MK	AVG H (%)	2,2	3,3	5,4	8,0	10,9	13,8
	SD (%)	0,5	0,9	1,0	1,2	1,7	1,8
	N (/)	7	7	7	7	7	7
	SE (%)	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7
	RSE (%)	9,5	9,7	6,9	5,8	5,8	5,0
	TNP S-W (Sig.)	0,060			0,252		

se nadaljuje

nadaljevanje

**Preglednica C8:** Ponovljivost  $H$  staranih raztopin. Opisna statistika  $H$  310 dni staranih obdelav PR1 in PR2 z AVG, SD, N, SE in RSE, TNP S-W, test homogenosti varianc (Levenov test), Mauchlyjev in Greenhouse-Geisserjev test.

**Table C8:** Repeatability of  $H$  upon ageing – descriptive statistics of  $H$  of 310 days aged PR1 and PR2 treatments with AVG, SD, N, SE and RSE, TNP S-W, Levene test of homogeneity of variances, Mauchly's and Greenhouse-Geisser test.

	AVG $H$ (%)	1,9	3,0	5,4	8,5	11,5	14,2
EV	SD (%)	0,3	0,3	0,5	0,5	0,6	0,8
	N (/)	5	5	5	5	5	5
	SE (%)	0,1	0,1	0,2	0,2	0,3	0,3
	RSE (%)	6,2	4,9	3,8	2,5	2,4	2,4
	TNP S-W (Sig.)	0,035			0,183		
	AVG $H$ (%)	1,9	2,9	5,1	8,1	10,9	13,5
EK	SD (%)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3
	N (/)	5	5	5	5	5	5
	SE (%)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
	RSE (%)	4,0	3,5	2,0	1,2	0,8	0,9
	TNP S-W (Sig.)	0,023			0,028		
	Levenov test (Sig.)	0,852			0,807		
statistični testi	Mauchly (Sig.)	0,006			< 0,001		
	Greenhouse-Geisser (Sig.)	0,735			0,628		

**Preglednica C9:** Podrobnosti analize ponovljivosti frekvenčnih učinkov z modelom MPM in LMM.

**Table C9:** Detailed analysis of repeatability of frequency effects with MPM and LMM.

proučevani dejavniki in interakcije	MPM <sup>a</sup> (Sig.)	LMM (Sig.)
interakcija priprava*obdelava*f	0,029	0,023
interakcija obdelava*f	0,660	0,647
interakcija priprava*f	< 0,001	< 0,001
interakcija priprava*obdelava	0,056	0,057
obdelava	0,881	0,879
priprava	< 0,001	< 0,001
f	< 0,001	< 0,001

**Legenda k preglednici C9:**

<sup>a</sup> ...Greenhouse-Geisserjev test

## PRILOGA D

### VPLIV VOLUMNA STARANJA

**Preglednica D1:** Vpliv V staranja na  $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$ ,  $\sigma_p/\sigma$  pri 1000 Hz,  $H$  in  $c_{\text{NaHCO}_3}$  obdelav EV ter EK. EV in EK 370 dni v 10, 5 in 2 mL 20-mL stekleničk,  $\sigma$  merjena pri 25 °C v 2,5-mL stekleničkah.

**Table D1:** Influence of ageing V on  $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$ ,  $\sigma_p/\sigma$  at 1000 Hz,  $H$  and  $c_{\text{NaHCO}_3}$  of treatments EV and EK. EV and EK 370 days in 10, 5 and 2 mL of 20-mL vials.  $\sigma$  measured at 25 °C in 2,5-mL vials.

s	N	obd.	V	$c_{\text{NaHCO}_3}$	$\sigma/\sigma_{\text{UK}120}$	$\sigma/\sigma_{\text{UK}1000}$	$\sigma/\sigma_{\text{UK}10\ 000}$	$\sigma/\sigma_{\text{UK}100\ 000}$	$\sigma_p/\sigma_{1000}$	$H_{1000}$	$H_{10\ 000}$	$H_{100\ 000}$
/	/	/	mL	mmol/L	%	%	%	%	%	%	%	%
1		EK	10	0,20	119,4	127,7	129,1	126,4	21,7	4,7	6,7	10,0
2				0,18	142,2	152,8	154,5	148,9	34,6	4,9	6,9	8,7
3	5			0,19	129,7	138,7	140,4	135,4	27,9	4,5	6,6	8,4
4				0,17	127,4	136,4	137,7	132,1	26,7	4,2	5,9	7,5
5				0,20	131,3	140,4	141,9	137,3	28,8	4,7	6,6	8,6
6				0,15	123,0	132,1	133,2	127,7	24,3	4,1	5,7	7,5
7				0,15	123,6	132,7	133,9	128,9	24,6	4,1	5,8	8,0
8	5			0,16	129,5	139,1	140,5	135,8	28,1	4,5	6,3	8,7
9				0,14	122,7	131,9	133,2	128,1	24,2	3,8	5,5	8,0
10				0,14	126,9	136,5	137,8	132,6	26,8	4,1	5,9	8,2
11		EK	5	0,28	145,6	156,5	158,9	154,6	36,1	6,3	8,8	10,7
12				0,28	142,8	153,1	155,2	151,0	34,7	6,1	8,4	10,3
13	5			0,33	148,7	160,2	162,6	159,0	37,6	7,0	9,6	11,7
14				0,30	145,8	157,2	159,0	156,5	36,4	6,9	9,1	12,1
15				0,28	155,7	167,7	170,1	164,5	40,4	6,6	9,0	10,2
16		EV	5	0,25	147,0	157,9	160,0	155,7	36,7	5,9	8,3	10,4
17				0,27	146,5	157,4	159,6	153,8	36,5	6,3	8,7	9,5
18	5			0,25	145,8	156,4	158,5	154,6	36,1	5,8	8,1	10,4
19				0,26	146,0	157,1	159,2	156,5	36,3	6,2	8,6	11,7
20				0,30	133,9	143,5	145,5	142,8	30,3	6,3	8,6	11,3
21		EK	2	0,59	160,2	174,6	178,9	177,4	42,7	9,6	13,4	16,2
22				0,60	161,2	176,6	180,4	179,0	43,4	10,3	13,7	16,5
23	5			0,58	160,4	175,7	179,4	177,9	43,1	10,2	13,6	16,4
24				0,59	162,4	178,0	181,8	180,4	43,8	10,3	13,7	16,6
25				0,59	157,9	172,4	175,9	174,8	42,0	9,8	13,1	16,1
26		EV	3	0,55	163,7	179,5	183,2	181,5	44,3	10,1	13,5	16,3
27	3			0,55	162,1	177,2	180,7	179,0	43,6	9,8	13,0	15,8
28				0,57	161,1	176,2	179,8	178,9	43,2	10,0	13,3	16,5

#### Legenda k preglednici D1:

s ... zaporedna številka stekleničke za LMM.

**Preglednica D2:** Vpliv V staranja na  $\sigma$  pri 25 °C in 1000 Hz, če združimo EV in EK. Opisna statistika prevodnosti  $\sigma$  2, 5 in 10 mL 1. in 370. dan z AVG, N, SE in RSE.

**Table D2:** Influence of V of ageing on conductivity  $\sigma$  at 25 °C and 1000 Hz, if EV and EK are united. Descriptive statistics of 2, 5 and 10 mL  $\sigma$  the 1<sup>st</sup> and 370<sup>th</sup> day with AVG, N, SE and RSE.

čas staranja (d)	opisna statistika	2 mL	5 mL	10 mL
1	AVG $\sigma$ ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	12,5		
	N (/)	28		
	SE ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	0,2		
	RSE (%)	1,5		
370	AVG $\sigma$ ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	106,0	51,5	30,8
	N (/)	8	10	10
	SE ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	1,0	1,2	1,2
	RSE (%)	1,0	2,3	3,9

**Preglednica D3:** Vpliv V na staranje pri 1000 Hz. Povprečja  $\sigma_p/\sigma$ , opisna statistika  $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$  2, 5 in 10 mL EV in EK z AVG, SD, N, SE in RSE ter statistična analiza s TNP S-W, Levenovim testom in primerjava EV ter EK po volumnih z UA (fiksni faktor: V, obdelava, odvisna spr.:  $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$ ) in t-testom.

**Table D3:** Influence of volume upon ageing at 1000 Hz. Average  $\sigma_p/\sigma$ , descriptive statistics  $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$  2, 5 and 10 mL EV and EK with AVG, SD, N, SE and RSE and statistical analysis with TNP S-E, Levene test and comparison of EV and EK upon volumes with UA (fixed factor: V, treatment, dependent variable:  $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$ ) and t-test.

obdelava	opisna statistika	2 mL	5 mL	10 mL
EV	AVG $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$ (%)	177,6	154,5	134,5
	SD (%)	1,7	6,1	3,2
	N (/)	3	5	5
	SE (%)	1,0	2,7	1,4
	RSE (%)	0,5	1,8	1,1
	AVG $\sigma_p/\sigma$ (%)	43,7	35,2	25,6
	TNP S-W (Sig.)	0,074		
EK	AVG $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$ (%)	175,5	159,0	139,2
	SD (%)	2,1	5,5	9,1
	N (/)	5	5	5
	SE (%)	0,9	2,5	4,0
	RSE (%)	0,5	1,6	2,9
	AVG $\sigma_p/\sigma$ (%)	43	37	27,9
	TNP S-W (Sig.)	0,219		
Levenov test (Sig.)		0,638		
t-test	obdelava (Sig.)	0,380		
UA	V*obdelava (Sig.)	0,370		
	obdelava (Sig.)	0,279		

**Preglednica D4:** Vpliv razmerja med stično površino s steklom in volumnom,  $S/V$ , na  $\sigma_p$  pri 1000 Hz, če združimo obdelavi..

**Table D4:** Influence of coefficient between glass contact surface and volume,  $S/V$ , on  $\sigma_p$  at 1000 Hz upon ageing, if treatments are united.

<b>S/V (1/cm)</b>	<b>4,0</b>	<b>2,6</b>	<b>2,1</b>
<b>V (mL)</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>10</b>
<b>AVG <math>\sigma_p</math> (<math>\mu</math>S/cm)</b>	45,9	18,6	8,3
<b>SD (<math>\mu</math>S/cm)</b>	1,4	2,2	2,0
<b>N (/)</b>	8	10	10
<b>SE (<math>\mu</math>S/cm)</b>	0,5	0,7	0,6
<b>RSE (%)</b>	1,1	3,8	7,5

**Preglednica D5:** Vpliv V staranja na frekvenčne učinke  $H$ , če združimo obdelavi EV in EK. Opisna statistika  $H$  2, 5 in 10 mL 1. in 370, dan z AVG, N in SE.

**Table D5:** Influence of  $V$  of ageing on frequency effects  $H$ , if treatments EV and EK are united. Descriptive statistics of 2, 5 and 10 mL  $H$  the 1<sup>st</sup> and 370<sup>th</sup> day with AVG, N and SE.

čas (d)	opisna statistika	2 mL			5 mL			10 mL		
		1000 Hz	10 000 Hz	100 kHz	1000 Hz	10 000 Hz	100 kHz	1000 Hz	10 000 Hz	100 kHz
1	AVG H (%)	0,8	1,6	3,9	0,8	1,6	3,9	0,8	1,6	3,9
	N (/)	8	8	8	10	10	10	10	10	10
	SE (%)	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,6
370	AVG H (%)	10,0	13,4	16,3	6,3	8,7	10,8	4,4	6,2	8,4
	N (/)	8	8	8	10	10	10	10	10	10
	SE (%)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1	0,2	0,2

**Preglednica D6:** Vpliv  $V$  staranja na frekvenčne učinke  $H$  pri 1000, 10 000 in 100 000 Hz. Opisna statistika  $H$  obdelav EV in EK 2, 5 in 10 mL z AVG, SD, N, SE in RSE ter TNP S-W.

**Table D6:** Influence of ageing  $V$  on frequency effects  $H$  at 1000, 10 000 and 100 000 Hz. Descriptive statistics of  $H$  2, 5 and 10 mL treatments EV and EK with AVG, SD, N, SE and RSE and TNP S-W.

**Preglednica D7:** Vpliv obdelav EV in EK na frekvenčne učinke pri 1000, 10 000 in 100 000 Hz, če združimo volumne. Opisna statistika  $H$  EV in EK z AVG, N in SE.

**Table D7:** Influence of treatments EV and EK on frequency effects at 1000, 10 000 and 100 000 Hz, if volumes are united. Descriptive statistics of EV and EK  $H$  with AVG, N and SE.

obdelava	opisna statistika	1000 Hz	10 000 Hz	100 000 Hz
EV	AVG $H$ (%)	6,7	9,2	11,6
	N (/)	13	13	13
	SE (%)	0,08	0,09	0,20
EK	AVG $H$ (%)	7,1	9,7	12,0
	N (/)	15	15	15
	SE (%)	0,07	0,08	0,18

**Preglednica D8:** Podrobnosti primerjave frekvenčnih učinkov EV in EK, staranih v 2, 5 in 10 mL, z MPM in LMM.

**Table D8:** Detailed comparison of EV and EK frequency effects upon ageing in 2, 5 and 10 mL with MPM and LMM.

proučevani dejavniki in interakcije	MPM (Sig.)	LMM (Sig.)
interakcija med $f$ , $V$ in obdelavo	0,919 <sup>a</sup>	0,678
interakcija med $f$ in obdelavo	0,047 <sup>b</sup>	0,041
interakcija med $f$ in $V$	< 0,001 <sup>a</sup>	< 0,001
interakcija med $V$ in obdelavo	0,516 <sup>a</sup>	0,516
obdelava	0,013 <sup>a</sup>	0,013
Mauchlyjev test sferičnosti	< 0,001	-
Greenhouse-Geisserjev test	0,543	-
Levenov test ( $F = 1000$ Hz)	0,349	-
Levenov test ( $F = 10 000$ Hz)	0,930	-
Levenov test ( $F = 100 000$ Hz)	0,139	-

**Legenda k preglednici D8:**

<sup>a</sup> ...Greenhouse-Geisserjev test, ker rezultati nesferični.

<sup>b</sup> ...multivariantni test MPM.

**Opomba k preglednici D8:** Frekvenčni učinki  $H$  EV in EK 10, 5 in 2 mL so nenormalno porazdeljeni. Pri primerjavi frekvenčnih učinkov smo zato uporabili MPM in LMM (glej 3.2.3.9).

**Preglednica D9:** Vpliv V staranja na frekvenčne učinke staranih in svežih raztopin z enakimi koncentracijami  $\text{NaHCO}_3$ , če združimo obdelavi EV in EK.

**Table D9:** Influence of ageing V on frequency effects of aged and fresh solutions with equal concentrations of  $\text{NaHCO}_3$ , if treatments are united.

<b>V</b>	sveže $H$ (%)			starane $H$ (%)		
	<b>mL</b>	1000 Hz	10 000 Hz	100 000 Hz	1000 Hz	10 000 Hz
10	1,2	2,0	4,2	4,4	6,2	8,4
5	1,4	2,3	4,3	6,3	8,7	10,8
2	2,2	3,4	5,4	10	13,4	16,3

## PRILOGA E

### VPLIV POLOŽAJA STARANJA, OBDELAVE, FREKVENCE IN TEMPERATURE

**Preglednica E1:** Vpliv položaja staranja in obdelave na  $\sigma/\sigma_{UK}$ ,  $\sigma_p/\sigma_{1000}$ ,  $H$  in  $c_{NaHCO_3}$ . Obdelave starane 310 dni na položajih PR, ST in MD.  $\sigma$  merjena pri 25 °C, 120, 1000, 10 000 in 100 000 Hz.

**Table E1:** Influence of ageing position and treatment on  $\sigma/\sigma_{UK}$ ,  $\sigma_p/\sigma_{1000}$ ,  $H$  and  $c_{NaHCO_3}$ . Treatments aged for 310 days under conditions PR, ST and MD.  $\sigma$  measured at 25 °C, 120, 1000, 10 000 and 100 000 Hz.

N	s	obd.	pol.	$c_{NaHCO_3}$	$\sigma/\sigma_{UK120}$	$\sigma/\sigma_{UK1000}$	$\sigma/\sigma_{UK10\ 000}$	$\sigma/\sigma_{UK100\ 000}$	$\sigma_p/\sigma_{1000}$	$H_{1000}$	$H_{10\ 000}$	$H_{100\ 000}$
/	/	/	/	mmol/L	%	%	%	%	%	%	%	%
1	5	KON		0,19	138,6	145,9	147,4	143,0	31,5	3,0	4,8	7,2
2				0,11	172,8	180,8	181,6	175,7	44,7	2,4	3,6	5,6
3				0,17	162,2	170,2	171,1	166,2	41,2	2,1	3,4	6,2
4				0,24	174,8	182,2	183,1	178,0	45,1	2,6	4,0	6,0
5				0,26	188,5	196,0	196,8	191,7	49,0	2,6	4,0	6,0
6	6	MV		0,21	173,2	180,8	181,5	176,4	44,7	2,3	3,5	5,9
7				0,22	168,4	175,3	175,8	170,8	43,0	2,2	3,3	5,5
8				0,22	183,1	190,5	191,1	185,4	47,5	2,2	3,4	5,3
9				0,17	151,7	158,9	159,5	153,9	37,1	1,9	3,0	5,2
11				0,19	149,3	157,5	158,9	154,1	36,5	3,2	4,9	7,2
12				0,19	140,1	147,9	149,3	144,6	32,4	3,1	4,9	7,2
13	7	PR		0,19	155,2	163,4	164,7	159,6	38,8	2,9	4,5	6,8
14				0,18	162,1	171,0	172,4	166,7	41,5	2,9	4,6	6,7
15				0,19	163,7	170,7	171,0	165,3	41,4	1,9	2,9	4,9
16				0,19	172,7	180,0	180,3	174,2	44,4	1,9	2,9	4,8
17				0,18	175,1	182,9	183,2	176,8	45,3	1,9	2,9	4,8
18				0,20	163,5	170,3	170,8	165,4	41,3	2,0	3,1	5,2
19				0,15	149,5	156,5	156,8	150,7	36,1	1,5	2,4	4,4
20	5	EV		0,16	153,1	160,2	160,6	154,7	37,6	1,8	2,8	4,7
21				0,24	181,9	188,9	189,5	185,1	47,1	2,3	3,5	6,0
22				0,18	157,4	164,3	164,7	160,0	39,1	1,8	2,8	5,5
23				0,18	160,1	167,0	167,4	163,0	40,1	1,7	2,7	5,6
24				0,23	178,3	185,3	185,7	180,4	46,0	2,1	3,2	5,3
25	5	EK		0,21	176,8	184,1	184,6	178,8	45,7	2,1	3,2	5,1
26				0,18	155,4	162,0	162,2	158,0	38,3	1,7	2,6	5,5
27				0,16	165,6	173,4	174,1	167,8	42,3	1,8	2,9	5,0
28				0,21	172,1	179,2	179,6	173,7	44,2	2,0	3,1	4,9
29				0,23	162,6	168,5	168,8	163,9	40,7	2,0	2,9	4,9

se nadaljuje

## nadaljevanje

**Preglednica E1:** Vpliv položaja staranja in obdelave na  $\sigma/\sigma_{UK}$ ,  $\sigma_p/\sigma_{1000}$ ,  $H$  in  $c_{NaHCO_3}$ . Obdelave starane 310 dni na položajih PR, ST in MD.  $\sigma$  merjena pri 25 °C, 120, 1000, 10 000 in 100 000 Hz.

**Table E1:** Influence of ageing position and treatment on  $\sigma/\sigma_{UK}$ ,  $\sigma_p/\sigma_{1000}$ ,  $H$  and  $c_{NaHCO_3}$ . Treatments aged for 310 days under conditions PR, ST and MD.  $\sigma$  measured at 25 °C, 120, 1000, 10 000 and 100 000 Hz.

30	3	KON	0,25	188,5	196,6	197,6	192,1	49,1	2,8	4,2	6,1
31			0,24	179,8	190,1	192,5	187,5	47,4	4,1	6,2	8,6
32			0,30	169,8	176,4	177,3	172,9	43,3	2,9	4,3	6,3
33	4	MV	0,36	186,2	192,9	193,6	190,0	48,2	3,1	4,4	6,7
34			0,21	194,5	202,9	203,6	197,5	50,7	2,3	3,5	5,6
35			0,18	171,2	179,3	180,1	173,8	44,2	2,3	3,4	5,4
36			0,25	185,0	193,0	193,9	188,5	48,2	2,8	4,1	6,1
37			0,18	134,2	139,7	140,0	135,2	28,4	1,7	2,6	4,6
38	4	MK	0,14	151,0	158,8	159,3	152,8	37,0	1,7	2,7	4,8
39			0,25	151,0	157,0	157,7	153,4	36,3	2,6	3,9	5,9
40			0,21	173,6	181,6	182,5	176,5	44,9	2,6	3,9	5,7
41			0,19	194,1	203,3	204,2	198,8	50,8	2,5	3,7	6,4
42	5	EV	0,17	129,3	136,4	136,4	133,3	26,7	2,8	3,6	6,9
43			0,15	179,8	189,3	190,1	182,7	47,2	2,0	3,2	5,2
44			0,19	184,0	194,0	195,6	189,2	48,5	3,0	4,7	6,8
45			0,21	167,6	175,9	177,3	172,1	43,1	3,0	4,7	6,8
46			0,19	140,4	147,5	148,5	144,0	32,2	2,8	4,3	6,6
47	4	EK	0,16	148,0	155,9	156,8	151,3	35,9	2,4	3,8	6,0
48			0,23	173,2	180,9	181,9	176,8	44,7	2,8	4,2	6,3
49			0,21	177,5	185,3	186,0	180,6	46,0	2,5	3,7	5,8
50			0,07	83,7	90,0	90,5	86,5	-11,1	1,0	2,2	5,8
51	3	KON	0,06	82,1	88,6	89,0	84,1	-12,9	1,0	1,9	4,8
52			0,06	77,7	83,8	84,1	79,6	-19,3	1,0	1,9	4,8
53			0,06	95,3	103,2	103,7	97,5	3,1	1,2	2,2	4,7
54	3	MV	0,06	84,1	90,9	91,2	86,2	-10,0	1,0	1,9	4,8
55			0,06	93,2	100,5	100,9	95,3	0,5	1,1	2,0	4,6
56			0,06	81,1	87,5	87,8	82,9	-14,3	0,8	1,6	4,6
57	5	MK	0,05	72,9	79,1	79,4	74,9	-26,4	0,9	1,8	5,0
58			0,06	77,2	83,5	83,8	79,3	-19,8	10,0	1,9	5,0
59			0,06	75,7	81,5	81,7	77,4	-22,7	1,0	1,8	4,7
60			0,06	76,2	82,2	82,5	78,0	-21,7	1,0	1,9	4,8

se nadaljuje

nadaljevanje

**Preglednica E1:** Vpliv položaja staranja in obdelave na  $\sigma/\sigma_{UK}$ ,  $\sigma_p/\sigma_{1000}$ ,  $H$  in  $c_{NaHCO_3}$ . Obdelave starane 310 dni na položajih PR, ST in MD.  $\sigma$  merjena pri 25 °C, 120, 1000, 10 000 in 100 000 Hz.

**Table E1:** Influence of ageing position and treatment on  $\sigma/\sigma_{UK}$ ,  $\sigma_p/\sigma_{1000}$ ,  $H$  and  $c_{NaHCO_3}$ . Treatments aged for 310 days under conditions PR, ST and MD.  $\sigma$  measured at 25 °C, 120, 1000, 10 000 and 100 000 Hz.

61	4	EV	0,07	78,5	84,4	84,7	80,4	-18,5	1,0	1,9	4,9	
62			0,07	79,6	85,7	86,0	81,5	-16,7	1,0	1,9	4,7	
63			0,06	71,4	77,0	77,4	73,2	-29,9	1,0	1,9	4,9	
64			0,06	78,4	84,5	84,8	80,4	-18,3	1,0	1,8	4,9	
65	5	EK	MD	0,06	71,0	76,8	77,2	73,2	-30,2	1,1	2,1	5,3
66				0,06	79,6	86,0	86,5	82,0	-16,3	1,0	2,2	5,3
67				0,06	75,9	82,0	82,3	77,8	-22,0	1,0	1,8	4,8
68				0,06	78,8	84,8	85,1	80,6	-17,9	1,0	1,9	4,8
69				0,07	75,4	80,7	81,0	78,6	-23,9	0,8	1,7	6,9

**Legenda k preglednici E1:**

s...zaporedna številka stekleničke za LMM.

**Preglednica E2:** Vpliv položaja staranja in obdelave na  $\sigma/\sigma_{UK}$ ,  $\sigma_p/\sigma_{1000}$ ,  $H$  in  $c_{NaHCO_3}$  Obdelave starane 310 dni PR, ST in MD, merjene pri 5 °C, 120, 1000, 10 000 in 100 000 Hz.

**Table E2:** Influence of ageing position on  $\sigma/\sigma_{UK}$ ,  $\sigma_p/\sigma_{1000}$ ,  $H$  and  $c_{NaHCO_3}$ . Treatments aged for 310 days PR, ST and MD, measured at 5 °C, 120, 1000, 10 000 and 100 000 Hz.

N	s	obd.	pol.	$c_{NaHCO_3}$	$\sigma/\sigma_{UK120}$	$\sigma/\sigma_{UK1000}$	$\sigma/\sigma_{UK10\ 000}$	$\sigma/\sigma_{UK100\ 000}$	$\sigma_p/\sigma_{1000}$	$H_{1000}$	$H_{10\ 000}$	$H_{100\ 000}$	
/	/	/	/	mmol/L	%	%	%	%	%	%	%	%	
1	5	KON	PR	0,19	135,2	135,4	143,2	135,0	26,1	1,8	2,2	-19,7	
2				0,11	179,8	179,1	189,4	189,9	44,2	1,3	1,7	-15,2	
3				0,17	162,1	161,7	172,0	168,6	38,2	1,4	1,5	-18,5	
4				0,24	174,8	174,6	183,2	182,5	42,7	1,7	2,2	-13,6	
5				0,26	181,3	181,1	189,3	192,5	44,8	1,7	2,3	-10,9	
6	6	MV		0,21	165,4	164,7	173,2	171,4	39,3	1,3	1,4	-15,9	
7				0,22	166,7	166,0	174,5	172,3	39,8	1,4	1,6	-15,5	
8				0,22	185,1	184,6	194,3	200,4	45,8	1,5	2,0	-11,2	
9				0,17	154,8	153,8	163,2	160,7	35,0	0,9	0,8	-18,7	
10				0,19	155,5	159,3	169,8	166,4	37,2	4,2	5,4	-13,9	
11				0,19	140,0	142,8	152,0	147,0	30,0	3,7	4,6	-16,1	

se nadaljuje

## nadaljevanje

**Preglednica E2:** Vpliv položaja staranja in obdelave na  $\sigma/\sigma_{UK}$ ,  $\sigma_p/\sigma_{1000}$ ,  $H$  in  $c_{NaHCO_3}$ . Obdelave starane 310 dni PR, ST in MD, merjene pri 5 °C, 120, 1000, 10 000 in 100 000 Hz.

**Table E2:** Influence of ageing position on  $\sigma/\sigma_{UK}$ ,  $\sigma_p/\sigma_{1000}$ ,  $H$  and  $c_{NaHCO_3}$ . Treatments aged for 310 days PR, ST and MD, measured at 5 °C, 120, 1000, 10 000 and 100 000 Hz.

12	7	MK	0,19	145,1	148,0	157,9	152,0	32,4	3,7	4,8	-16,4
13			0,18	157,7	160,7	171,7	167,9	37,8	3,6	4,6	-15,5
14			0,19	152,2	151,6	160,0	156,4	34,0	1,2	1,3	-17,8
15			0,19	156,1	155,4	163,9	161,5	35,6	1,3	1,4	-16,9
16			0,18	166,3	165,4	175,3	178,3	39,5	1,1	1,3	-15,0
17			0,20	166,0	164,9	173,7	170,9	39,4	1,1	1,2	-16,7
18			0,15	141,5	140,4	149,5	144,5	28,8	0,8	0,5	-21,4
19	5	EV	0,16	151,6	150,7	160,2	156,3	33,6	1,0	1,0	-19,6
20			0,24	163,9	163,7	171,5	174,0	38,9	1,7	2,2	-11,7
21			0,18	149,5	149,2	158,2	152,0	33,0	1,4	1,6	-19,6
22			0,18	156,0	155,8	165,2	160,5	35,8	1,5	1,8	-18,4
23			0,23	166,7	166,5	174,9	170,8	39,9	1,7	2,1	-15,7
24	5	EK	0,21	175,9	175,5	184,9	183,3	43,0	1,5	1,8	-15,4
25			0,18	166,0	165,2	174,8	170,7	39,5	1,2	1,2	-18,4
26			0,16	170,3	169,6	180,5	182,8	41,0	1,1	1,3	-16,2
27			0,21	174,5	174,1	183,5	180,0	42,6	1,5	1,8	-16,3
28			0,23	185,1	184,8	193,9	194,2	45,9	1,6	2,1	-13,3
29	3	KON	0,25	164,9	165,2	172,8	175,9	39,5	2,0	2,5	-10,9
30			0,24	190,6	192,9	203,8	210,8	48,2	3,0	4,3	-8,5
31			0,30	176,0	176,2	183,6	195,9	43,2	2,0	2,8	-5,1
32	4	MV	0,36	197,2	197,6	204,9	216,8	49,4	2,2	3,2	-4,3
33			0,21	183,7	183,4	193,3	195,4	45,5	1,6	2,1	-13,3
34			0,18	176,5	176,0	186,8	192,1	43,2	1,4	1,8	-13,5
35			0,25	196,3	196,2	205,7	211,4	49,0	1,7	2,4	-10,4
36	4	MK	0,18	153,2	153,1	162,4	158,9	34,7	1,6	2,0	-17,5
37			0,14	163,9	163,2	174,6	172,3	38,7	1,1	0,9	-20,1
38			0,25	171,1	170,8	178,6	179,3	41,5	1,6	2,2	-12,4
39			0,21	181,1	180,9	191,1	196,8	44,7	1,6	2,2	-11,8
40	5	EV	0,19	182,4	182,4	193,8	197,7	45,2	1,7	2,5	-13,0
41			0,17	182,5	182,0	193,7	197,8	45,1	1,4	1,8	-14,5
42			0,15	184,7	184,3	197,4	199,5	45,7	1,3	1,6	-17,1
43			0,19	176,4	176,1	186,7	188,8	43,2	1,5	2,0	-14,4
44			0,21	179,2	178,9	188,6	189,5	44,1	1,6	2,1	-13,6

se nadaljuje

nadaljevanje

**Preglednica E2:** Vpliv položaja staranja in obdelave na  $\sigma/\sigma_{UK}$ ,  $\sigma_p/\sigma_{1000}$ ,  $H$  in  $c_{NaHCO_3}$  Obdelave starane 310 dni PR, ST in MD, merjene pri 5 °C, 120, 1000, 10 000 in 100 000 Hz.

**Table E2:** Influence of ageing position on  $\sigma/\sigma_{UK}$ ,  $\sigma_p/\sigma_{1000}$ ,  $H$  and  $c_{NaHCO_3}$ . Treatments aged for 310 days PR, ST and MD, measured at 5 °C, 120, 1000, 10 000 and 100 000 Hz.

45	4	EK	ST	0,19	170,7	170,3	180,3	184,6	41,3	1,4	1,9	-13,0	
46				0,16	156,1	157,9	169,0	168,1	36,7	2,7	3,4	-16,0	
47				0,23	172,8	172,5	181,2	185,0	42,0	1,6	2,2	-11,5	
48				0,21	185,3	185,1	195,1	195,9	46,0	1,7	2,2	-13,7	
49	3	KON	MD	0,07	91,0	90,7	97,3	102,8	-10,3	0,7	-3,4	-26,2	
50				0,06	87,0	86,7	92,5	103,1	-15,3	0,6	-4,6	-24,5	
51				0,06	82,0	81,7	86,4	92,4	-22,4	0,7	-5,2	-27,6	
52				0,06	75,8	76,2	80,8	80,7	-31,2	1,6	-4,5	-32,6	
53				0,06	106,9	107,1	117,3	130,3	6,6	1,2	-1,7	-22,6	
54				0,06	117,2	117,8	129,5	136,6	15,1	1,5	-0,5	-24,8	
55	5	MK		0,06	105,8	105,0	113,6	126,2	4,8	0,2	-3,9	-24,6	
56				0,05	77,7	77,3	81,6	90,9	-29,4	0,4	-6,6	-27,9	
57				0,06	82,0	81,6	86,8	94,3	-22,5	0,5	-5,4	-27,5	
58				0,06	84,2	83,6	88,9	94,8	-19,6	0,4	-4,7	-26,9	
59				0,06	85,0	84,6	89,5	104,8	-18,2	0,4	-5,5	-21,3	
60	4	EV		0,07	67,5	67,7	70,5	74,5	-47,7	1,2	-5,5	-27,7	
61				0,07	86,9	86,4	92,4	96,7	-15,7	0,5	-4,1	-27,7	
62				0,06	73,9	73,7	78,2	81,2	-35,7	0,6	-5,1	-30,0	
63				0,06	84,0	83,6	88,5	99,1	-19,6	0,6	-5,2	-24,1	
64	5	EK		0,06	90,7	90,2	96,7	105,5	-10,9	0,4	-4,4	-25,9	
65				0,06	85,5	85,1	91,6	98,2	-17,5	0,5	-3,8	-26,6	
66				0,06	83,1	82,7	88,2	95,5	-20,9	0,5	-5,0	-27,4	
67				0,06	76,1	76,0	80,8	90,3	-31,6	1,0	-4,2	-23,0	
68				0,07	74,5	74,6	78,7	85,9	-34,0	1,2	-4,2	-23,7	

**Legenda k preglednici E2:**

s...zaporedna številka stekleničke za LMM.

**Preglednica E3:** Vpliv položaja staranja na prevodnost pri 1000 Hz, 25 in 5 °C, če združimo obdelave.

Opisna statistika PR, ST in MD 1. in 310. dan staranja z AVG, N, SE in RSE.

**Table E3:** Influence of ageing position on conductivity at 1000 Hz, 5 °C and 25 °C, if treatments are united. Descriptive statistics of positions PR, ST and MD the 1<sup>st</sup> and 310<sup>th</sup> day of ageing with AVG, N, SE and RSE.

čas staranja (d)	opisna statistika	T = 25 °C			T = 5 °C		
		PR	ST	MD	PR	ST	MD
1	AVG $\sigma$ ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	9,0			7,2		
	N (/)	68			68		
	SE ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	0,2			0,0		
	RSE (%)	1,5			0,5		
310	AVG $\sigma$ ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	43,3	47,6	10,8	26,7	31,0	7,3
	N (/)	28	20	20	28	20	20
	SE ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	1,3	2,6	0,2	0,8	1,5	0,2
	RSE (%)	3,0	5,4	1,9	3,1	4,8	3,1

**Preglednica E4:** Opisna statistika rezultatov  $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$  z vidika položajev staranja: testi normalnosti in test homogenosti varianc (združene obdelave, frekvence in temperaturi).

**Table E4:** Descriptive statistics of  $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$  results from ageing position point of view: normality tests and test of homogeneity of variances (treatments, frequencies and temperatures united).

opisna statistika	PR	ST	MD
TNP S-W (Sig.)	0,373	< 0,001	< 0,001
Levene test (Sig.)	< 0,001		

**Preglednica E5:** Opisna statistika rezultatov  $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$  z vidika obdelav: testi normalnosti in test homogenosti varianc (združeni položaji, frekvence in temperaturi).

**Table E5:** Descriptive statistics of results of  $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$  from treatment point of view: normality tests and test of homogeneity of variances (positions, frequencies and temperatures united).

opisna statistika	KON	MV	MK	EV	EK
TNP S-W (Sig.)	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Levene test (Sig.)	< 0,001				

**Preglednica E6:** Opisna statistika rezultatov  $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$  z vidika frekvenc: testi normalnosti in test homogenosti varianc (združeni položaji, obdelave in  $T$ ).

**Table E6:** Descriptive statistics of results of  $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$  from frequency point of view: normality tests and test of homogeneity of variances (positions, treatments and  $T$  united).

opisna statistika	120 Hz	1000 Hz	10 000 Hz	100 000 Hz
TNP S-W (Sig.)	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Levene test (Sig.)	0,955			

**Preglednica E7:** Opisna statistika rezultatov  $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$  z vidika temperature: testa normalnosti in test homogenosti varianc (združeni položaji, obdelave in frekvence).

**Table E7:** Descriptive statistics of results of  $\sigma/\sigma_{\text{UK}}$  from temperature point of view: normality tests and test of homogeneity of variances (positions, treatments and frequencies united).

opisna statistika	25 °C	5 °C
TNP S-W (Sig.)	< 0,001	< 0,001
Levene test (Sig.)	0,215	

**Preglednica E8:** Rezultati statistične analize vpliva položaja staranja, obdelave, frekvence in temperature na  $\sigma/\sigma_{UK}$  z LMM.

**Table E8:** Results of statistical analysis of influence of ageing position, treatment, frequency and temperature on  $\sigma/\sigma_{UK}$  with LMM.

proučevani dejavniki in interakcije	F	Sig.
položaj	401,067	< 0,001
obdelava	3,448	0,014
interakcija položaj*obdelava	1,985	0,066
$f$	842,507	< 0,001
interakcija položaj* $f$	37,183	< 0,001
interakcija obdelava* $f$	1,135	0,353
interakcija položaj*obdelava* $f$	1,935	0,023
$T$	8,573	0,005
interakcija položaj*T	5,739	0,006
interakcija obdelava*T	1,071	0,380
interakcija $f*T$	1065,258	< 0,001
interakcija položaj*obdelava*T	1,079	0,392
interakcija položaj*f*T	43,858	< 0,001
interakcija obdelava*f*T	1,739	0,111
interakcija položaj*obdelava*f*T	2,482	0,007

**Preglednica E9:** Vpliv položaja staranja na  $\sigma/\sigma_{UK}$ . AVG<sup>a</sup> izračunana z LMM.

**Table E9:** Influence of ageing condition on  $\sigma/\sigma_{UK}$ . AVG<sup>a</sup> calculated by LMM.

položaj	PR	ST	MD
AVG <sup>a</sup> $\sigma/\sigma_{UK}$ (%)	168,6	180,0	88,9
SE (%)	2,1	2,5	2,5

**Preglednica E10:** Vpliv frekvence na  $\sigma/\sigma_{UK}$ . AVG<sup>a</sup> izračunana z LMM.

**Table E10:** Influence of frequency on  $\sigma/\sigma_{UK}$ . AVG<sup>a</sup> calculated by LMM.

opisna statistika	120 Hz	1000 Hz	10 000 Hz	100 000 Hz
AVG <sup>a</sup> $\sigma/\sigma_{UK}$ (%)	142,2	143,8	148,3	147,3
SE (%)	1,4	1,4	1,4	1,5

**Preglednica E11:** Vpliv temperature na  $\sigma/\sigma_{UK}$ . AVG<sup>a</sup> izračunana z LMM.

**Table E11:** Influence of temperature on  $\sigma/\sigma_{UK}$ . AVG<sup>a</sup> calculated by LMM.

opisna statistika	25 °C	5 °C
AVG <sup>a</sup> $\sigma/\sigma_{UK}$ (%)	144,1	147,1
SE (%)	1,7	1,5

**Preglednica E12:** Interakcija frekvenca\*temperatura. AVG<sup>a</sup>  $\sigma/\sigma_{UK}$  izračunana z LMM.

**Table E12:** Interaction frequency\*temperature. AVG<sup>a</sup> of  $\sigma/\sigma_{UK}$  calculated by LMM.

<i>f</i> (Hz)	opisna statistika	25 °C	5 °C
1000	AVG <sup>a</sup> $\sigma/\sigma_{UK}$ (%)	<b>145,4</b>	<b>142,2</b>
	SE (%)	1,7	1,4
10 000	AVG <sup>a</sup> $\sigma/\sigma_{UK}$ (%)	<b>146,0</b>	<b>150,5</b>
	SE (%)	1,7	1,5
100 000	AVG <sup>a</sup> $\sigma/\sigma_{UK}$ (%)	<b>141,0</b>	<b>153,6</b>
	SE (%)	1,6	1,8

**Preglednica E13:** Interakcija položaj\*obdelava\*frekvenca\*temperatura. AVG<sup>a</sup>  $\sigma/\sigma_{UK}$  izračunana z LMM.  
**Table E13:** Interaction condition\*treatment\*frequency\*temperature. AVG<sup>a</sup> of  $\sigma/\sigma_{UK}$  calculated by LMM.

obdelava	<i>f</i> (Hz)	opisna statistika	PR		ST		MD	
			25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C
KON	1000	AVG <sup>a</sup> $\sigma/\sigma_{UK}$ (%)	<b>175,0</b>	<b>166,4</b>	<b>187,7</b>	<b>178,1</b>	<b>87,5</b>	<b>86,4</b>
		SE (%)	6,0	5,0	7,8	6,5	7,8	6,5
	10 000	AVG <sup>a</sup> $\sigma/\sigma_{UK}$ (%)	<b>176,0</b>	<b>175,4</b>	<b>189,1</b>	<b>186,7</b>	<b>87,9</b>	<b>92,1</b>
		SE (%)	6,0	5,3	7,8	6,9	7,8	6,9
	100 000	AVG <sup>a</sup> $\sigma/\sigma_{UK}$ (%)	<b>170,9</b>	<b>173,7</b>	<b>184,2</b>	<b>194,2</b>	<b>83,4</b>	<b>99,4</b>
		SE (%)	5,9	6,4	7,6	8,3	7,6	8,3
MV	1000	AVG <sup>a</sup> $\sigma/\sigma_{UK}$ (%)	<b>168,5</b>	<b>161,9</b>	<b>192,0</b>	<b>188,3</b>	<b>98,2</b>	<b>100,4</b>
		SE (%)	<b>5,5</b>	<b>4,6</b>	<b>6,7</b>	<b>5,6</b>	<b>7,8</b>	<b>6,5</b>
	10 000	AVG <sup>a</sup> $\sigma/\sigma_{UK}$ (%)	<b>169,3</b>	<b>171,2</b>	<b>192,8</b>	<b>197,7</b>	<b>98,6</b>	<b>109,2</b>
		SE (%)	<b>5,5</b>	<b>4,9</b>	<b>6,7</b>	<b>5,9</b>	<b>7,8</b>	<b>6,9</b>
	100 000	AVG <sup>a</sup> $\sigma/\sigma_{UK}$ (%)	<b>164,2</b>	<b>169,7</b>	<b>187,4</b>	<b>203,9</b>	<b>93,0</b>	<b>115,9</b>
		SE (%)	<b>5,4</b>	<b>5,9</b>	<b>6,6</b>	<b>7,2</b>	<b>7,6</b>	<b>8,3</b>
MK	1000	AVG <sup>a</sup> $\sigma/\sigma_{UK}$ (%)	<b>170,7</b>	<b>155,2</b>	<b>159,3</b>	<b>167,0</b>	<b>82,8</b>	<b>86,4</b>
		SE (%)	5,1	4,3	6,7	5,6	6,0	5,0
	10 000	AVG <sup>a</sup> $\sigma/\sigma_{UK}$ (%)	<b>171,3</b>	<b>164,6</b>	<b>159,9</b>	<b>176,7</b>	<b>83,0</b>	<b>92,1</b>
		SE (%)	5,1	4,5	6,7	5,9	6,0	5,3
	100 000	AVG <sup>a</sup> $\sigma/\sigma_{UK}$ (%)	<b>165,5</b>	<b>161,6</b>	<b>154,5</b>	<b>176,8</b>	<b>78,5</b>	<b>102,2</b>
		SE (%)	5,0	5,4	6,6	7,2	5,9	6,4
EV	1000	AVG <sup>a</sup> $\sigma/\sigma_{UK}$ (%)	<b>173,1</b>	<b>157,2</b>	<b>179,8</b>	<b>180,7</b>	<b>82,9</b>	<b>77,8</b>
		SE (%)	6,0	5,0	6,0	5,0	6,7	5,6
	10 000	AVG <sup>a</sup> $\sigma/\sigma_{UK}$ (%)	<b>173,6</b>	<b>166,0</b>	<b>180,7</b>	<b>192,0</b>	<b>83,2</b>	<b>82,4</b>
		SE (%)	6,0	5,3	6,0	5,3	6,7	5,9
	100 000	AVG <sup>a</sup> $\sigma/\sigma_{UK}$ (%)	<b>168,6</b>	<b>162,7</b>	<b>175,2</b>	<b>194,7</b>	<b>78,9</b>	<b>87,9</b>
		SE (%)	5,9	6,4	5,9	6,4	6,6	7,2
EK	1000	AVG <sup>a</sup> $\sigma/\sigma_{UK}$ (%)	<b>173,4</b>	<b>173,8</b>	<b>167,4</b>	<b>171,4</b>	<b>82,1</b>	<b>81,7</b>
		SE (%)	6,0	5,0	6,7	5,6	6,0	5,0
	10 000	AVG <sup>a</sup> $\sigma/\sigma_{UK}$ (%)	<b>173,9</b>	<b>183,5</b>	<b>168,3</b>	<b>181,4</b>	<b>82,4</b>	<b>87,2</b>
		SE (%)	6,0	5,3	6,7	5,9	6,0	5,3
	100 000	AVG <sup>a</sup> $\sigma/\sigma_{UK}$ (%)	<b>168,4</b>	<b>182,2</b>	<b>163,2</b>	<b>183,4</b>	<b>78,4</b>	<b>95,1</b>
		SE (%)	5,9	6,4	6,6	7,2	5,9	6,4

**Preglednica E14:** Vpliv položaja staranja na frekvenčne učinke, če združimo obdelave KON, MV, MK, EV in EK. Opisna statistika  $H$  PR, ST in MD 1. in 370. dan z AVG, N in SE pri 25 °C.

**Table E14:** Influence of position on frequency effects upon ageing, if treatments KON, MV, MK; EV and EK are united. Descriptive statistics of PR, ST and MD  $H$  the 1<sup>st</sup> and 370<sup>th</sup> day with AVG, N and SE at 25 °C.

opisna statistika	PR			ST			MD		
	1000	10 000	100 000	1000	10 000	100 000	1000	10 000	100 000
AVG $H_{1. \text{ dan}} (\%)$	0,8	1,6	3,9	0,8	1,6	3,9	0,8	1,6	3,9
N (/)	28	28	28	20	20	20	20	20	20
SE (%)	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,6
AVG $H_{310. \text{ dan}} (\%)$	2,2	3,5	5,7	2,6	4,0	6,1	1,0	1,9	5,0
N (/)	28	28	28	20	20	20	20	20	20
SE (%)	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,0	0,0	0,1

**Preglednica E15:** Vpliv položaja na  $H$  staranih KON, MV, MK, EV in EK.  $\sigma$  merjena pri 25 °C. Opisna statistika  $H$  PR, ST in MD z AVG, SD, N, SE in RSE.

**Table E15:** Influence of position on  $H$  upon ageing KON, MV, MK, EV and EK.  $\sigma$  measured at 25 °C. Descriptive statistics of PR, ST and MD  $H$  with AVG, SD, N, SE and RSE.

položaj 25 °C	PR			ST			MD		
$f$ (Hz)	1000	10 000	100 000	1000	10 000	100 000	1000	10 000	100 000
AVG $H_{\text{KON}} (\%)$	2,5	3,9	6,2	3,3	4,9	7,0	1,0	2,0	5,1
SD (%)	0,3	0,6	0,6	0,7	1,1	1,4	0,0	0,2	0,6
N (/)	5	5	5	3	3	3	3	3	3
SE (%)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,7	0,8	0,0	0,1	0,3
RSE (%)	5,7	6,3	4,2	12,5	13,3	11,3	1,7	5,6	6,8
AVG $H_{\text{MV}} (\%)$	2,6	4,0	6,2	2,6	3,9	5,9	1,1	2,0	4,7
SD (%)	0,5	0,8	0,9	0,4	0,5	0,6	0,1	0,2	0,1
N (/)	6	6	6	4	4	4	3	3	3
SE (%)	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,3	0,1	0,1	0,1
RSE (%)	7,8	8,0	5,5	7,9	6,2	5,0	5,0	4,6	1,1
AVG $H_{\text{MK}} (\%)$	2,2	3,3	5,4	2,1	3,3	5,2	0,9	1,8	4,8
SD (%)	0,5	0,9	1,0	0,5	0,7	0,7	0,1	0,1	0,2
N (/)	7	7	7	4	4	4	5	5	5
SE (%)	0,2	0,3	0,4	0,3	0,4	0,3	0,0	0,0	0,1
RSE (%)	9,5	9,7	6,9	12,0	10,7	6,2	3,1	2,7	1,6
AVG $H_{\text{EV}} (\%)$	1,9	3,0	5,4	2,7	3,9	6,4	1,0	1,9	4,8
SD (%)	0,3	0,3	0,5	0,4	0,7	0,7	0,0	0,0	0,1
N (/)	5	5	5	5	5	5	4	4	4
SE (%)	0,1	0,1	0,2	0,2	0,3	0,3	0,0	0,0	0,0
RSE (%)	6,2	4,9	3,8	7,0	7,6	4,9	1,4	0,7	0,8

se nadaljuje

nadaljevanje

**Preglednica E15:** Vpliv položaja na  $H$  staranih KON, MV, MK, EV in EK.  $\sigma$  merjena pri 25 °C. Opisna statistika  $H$  PR, ST in MD z AVG, SD, N, SE in RSE.

**Table E15:** Influence of position on  $H$  upon ageing KON, MV, MK, EV and EK.  $\sigma$  measured at 25 °C. Descriptive statistics of PR, ST and MD  $H$  with AVG, SD, N, SE and RSE.

<b>AVG <math>H_{EK}</math> (%)</b>	1,9	2,9	5,1	2,6	4,0	6,2	1,0	2,0	5,4
SD (%)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,1	0,2	0,9
N (/)	5	5	5	4	4	4	5	5	5
SE (%)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,4
RSE (%)	4,0	3,5	2,0	3,9	3,7	2,6	5,2	4,7	7,2

**Preglednica E16:** Vpliv položaja na  $H$  staranih KON, MV, MK, EV in EK. Prevodnost merjena pri 5 °C. Opisna statistika  $H$  PR, ST in MD z AVG, SD, N, SE in RSE.

**Table E16:** Influence of position on  $H$  upon ageing KON, MV, MK, EV and EK. Conductivity measured at 5 °C. Descriptive statistics of PR, ST and MD  $H$  with AVG, SD, N, SE and RSE.

<b>položaj 5 °C</b>	<b>PR</b>			<b>ST</b>			<b>MD</b>		
	<b>f (Hz)</b>	<b>1000</b>	<b>10 000</b>	<b>100 000</b>	<b>1000</b>	<b>10 000</b>	<b>100 000</b>	<b>1000</b>	<b>10 000</b>
<b>AVG <math>H_{KON}</math> (%)</b>	1,6	2,0	-15,6	2,3	3,2	-8,2	0,7	-4,4	-26,1
SD (%)	0,2	0,4	3,6	0,6	1,0	2,9	0,1	0,9	1,6
N (/)	5	5	5	3	3	3	3	3	3
SE (%)	0,1	0,2	1,6	0,3	0,5	1,7	0,0	0,5	0,9
RSE (%)	6,2	8,2	-10,3	14,3	17,3	-20,6	4,3	-12,2	-3,5
<b>AVG <math>H_{MV}</math> (%)</b>	2,7	3,4	-16,1	1,7	2,3	-10,4	1,4	-2,2	-26,7
SD (%)	2,0	2,6	3,2	0,4	0,6	4,3	0,2	2,0	5,2
N (/)	6	6	6	4	4	4	3	3	3
SE (%)	0,7	1,0	1,2	0,2	0,3	2,2	0,1	1,2	3,0
RSE (%)	27,4	29,1	-7,5	10,6	12,7	-20,8	7,1	-52,9	-11,3
<b>AVG <math>H_{MK}</math> (%)</b>	1,8	2,2	-17,1	1,5	1,8	-15,5	0,4	-5,2	-25,6
SD (%)	1,3	1,8	2,1	0,3	0,6	4,0	0,1	1,0	2,7
N (/)	7	7	7	4	4	4	5	5	5
SE (%)	0,5	0,7	0,8	0,1	0,3	2,0	0,0	0,5	1,2
RSE (%)	26,2	31,2	-4,7	9,4	17,3	-13,0	10,4	-8,6	-4,7
<b>AVG <math>H_{EV}</math> (%)</b>	1,5	1,7	-17,0	1,5	2,0	-14,5	0,7	-5,0	-27,4
SD (%)	0,3	0,5	3,3	0,1	0,3	1,5	0,3	0,6	2,4
N (/)	5	5	5	5	5	5	4	4	4
SE (%)	0,1	0,2	1,5	0,1	0,2	0,7	0,2	0,3	1,2
RSE (%)	8,7	12,6	-8,8	4,4	7,6	-4,8	23,8	-6,0	-4,4

se nadaljuje

nadaljevanje

**Preglednica E16:** Vpliv položaja na  $H$  staranih KON, MV, MK, EV in EK. Prevodnost merjena pri 5 °C.

Opisna statistika  $H$  PR, ST in MD z AVG, SD, N, SE in RSE.

**Table E16:** Influence of position on  $H$  upon ageing KON, MV, MK, EV and EK. Conductivity measured at 5 °C. Descriptive statistics of PR, ST and MD  $H$  with AVG, SD, N, SE and RSE.

<b>AVG <math>H_{EK}</math> (%)</b>	1,4	1,6	-15,9	1,9	2,4	-13,6	0,7	-4,3	-25,3
<b>SD (%)</b>	0,2	0,4	1,8	0,6	0,7	1,9	0,3	0,4	1,9
<b>N (/)</b>	5	5	5	4	4	4	5	5	5
<b>SE (%)</b>	0,1	0,2	0,8	0,3	0,3	0,9	0,1	0,2	0,8
<b>RSE (%)</b>	6,5	9,9	-5,1	15,5	13,6	-6,9	19,7	-4,6	-3,3

## PRILOGA F

### UV-VIS SPEKTROSKOPIJA

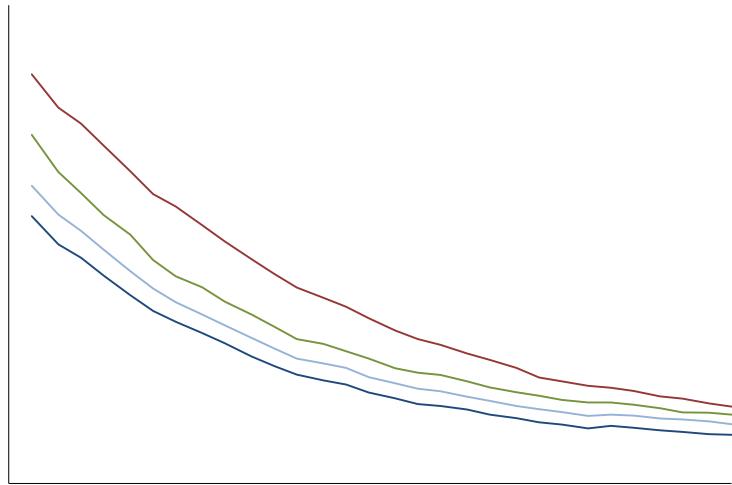
#### 1. Preliminarne meritve

Posneli smo UV-VIS spektre raztopin, obdelanih z mehanogeno in elektrogeno epitaksijo ter njihovih kontrol v 0,05 mmol/L NaHCO<sub>3</sub> (glej sl. F1 in pregl. F1), 0,1 mmol/L NaHCO<sub>3</sub> (glej sl. F2 in pregl. F2), Mq (glej sl. F3 in pregl. F3) in 95 % etanolu (glej sl. F4 in pregl. F4). Na ta način smo poiskali prizerno topilo, s katerim bi lahko najbolj nazorno prikazali morebitne razlike med spektri obdelav KON, MV, MK, EV in EK. Pri tem smo MV in MK razredčili do 12cH, MV5 in MK5 do 5cH, MV9 in MK9 pa do 9cH. V preglednice smo vstavili povprečja dveh snemanj UV-VIS spektrov, ki se med seboj razlikujejo največ za ± 0,5 %. Pri tem so intervali SE snemanja spektrov manjši od točk na spektrih.

**Preglednica F1:** Absorbance UV-VIS spektrov KON, MK, EV in EK v 0,05 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>.

**Table F1:** Absorbances of UV-VIS spectra KON, MK, EV and EK in 0,05 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>.

λ (nm)	Absorbanca (/)			
	KON	MK	EV	EK
209,1	0,127	0,156	0,139	0,133
208,0	0,131	0,161	0,143	0,136
207,0	0,134	0,166	0,147	0,139
205,9	0,137	0,171	0,151	0,143
205,0	0,140	0,175	0,155	0,147
204,0	0,145	0,181	0,163	0,152
202,9	0,151	0,189	0,169	0,158
202,0	0,156	0,195	0,175	0,164
201,1	0,160	0,200	0,181	0,169
200,0	0,168	0,210	0,192	0,177



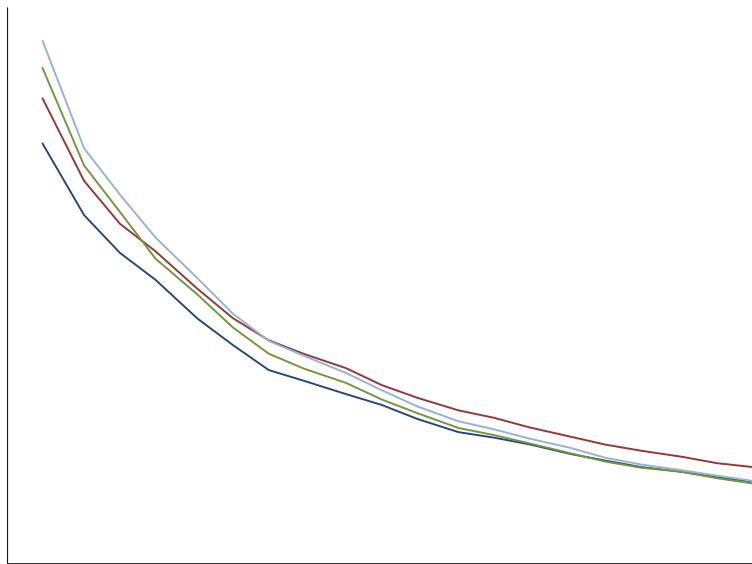
**Slika F1:** Preliminarni UV-VIS spektri KON (modra), MK (rdeča), EV (zelena) in EK (svetlo modra) z intervali SE snemanja v 0,05 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>.

**Figure F1:** Preliminary UV- VIS spectra of KON (blue), MK (red), EV (green) and EK (light blue) with SE intervals of in 0,05 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>.

**Preglednica F2:** UV-VIS spektri KON, MV, MK, EV in EK v 0,1 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>.

**Table F2:** UV-VIS spectra of KON, MV, MK, EV and EK in 0,1 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>.

$\lambda$ (nm)	Absorbanca (/)				
	KON	MV	MK	EV	EK
209,1	0,146	0,508	0,158	0,144	0,146
208,0	0,150	0,523	0,161	0,149	0,151
207,0	0,154	0,533	0,166	0,154	0,156
205,9	0,158	0,542	0,171	0,158	0,160
205,0	0,163	0,551	0,176	0,163	0,166
204,0	0,169	0,564	0,183	0,169	0,174
202,9	0,177	0,576	0,190	0,177	0,181
202,0	0,182	0,586	0,198	0,184	0,189
201,1	0,186	0,595	0,204	0,190	0,195
200,0	0,197	0,612	0,214	0,202	0,207
199,0	0,208	0,630	0,225	0,213	0,220
198,0	0,217	0,648	0,238	0,226	0,234
196,9	0,228	0,666	0,250	0,238	0,248
196,0	0,237	0,685	0,261	0,250	0,260
195,0	0,257	0,721	0,279	0,271	0,282
194,1	0,278	0,754	0,302	0,298	0,311
193,0	0,310	0,802	0,333	0,327	0,344
192,0	0,331	0,840	0,355	0,364	0,379
191,0	0,362	0,882	0,390	0,402	0,416
189,9	0,420	0,963	0,457	0,481	0,503



**Slika F2:** Preliminarni UV-VIS spektri KON (modra), MK (rdeča), EV(zelena) in EK (svetlo modra) z intervali SE v 0,1 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>.

**Figure F2:** Preliminary UV- VIS spectra of KON (blue), MK (red), EV (green) and EK (light blue) with SE intervals in 0,1 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>.

**Preglednica F3:** UV-VIS spektri KON, MK, EV in EK v Mq.

**Table F3:** UV-VIS spectra of KON, MK, EV and EK in Mq.

$\lambda$ (nm)	Absorbanca (/)			$\lambda$ (nm)	Absorbanca (/)
	KON	MK	EV		
209,1	0,153	0,152	0,144	209,1	0,127
208,0	0,158	0,157	0,149	208,0	0,131
207,0	0,163	0,161	0,152	207,0	0,134
205,9	0,167	0,165	0,157	205,9	0,136
205,0	0,173	0,171	0,161	205,0	0,140
204,0	0,179	0,177	0,167	204,0	0,145
202,9	0,188	0,184	0,173	202,9	0,149
202,0	0,195	0,190	0,179	202,0	0,154
201,1	0,201	0,196	0,184	201,1	0,158
200,0	0,212	0,206	0,191	200,0	0,165
199,0	0,225	0,216	0,201	/	/
198,0	0,237	0,228	0,208	/	/
196,9	0,251	0,238	0,218	/	/
196,0	0,267	0,250	0,224	/	/
195,0	0,291	0,270	0,238	/	/
194,1	0,326	0,292	0,255	/	/
193,0	0,374	0,332	0,279	/	/

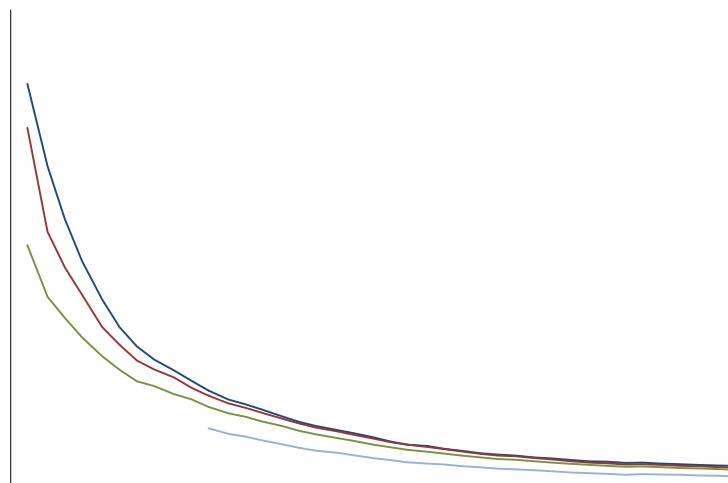
se nadaljuje

nadaljevanje

**Preglednica F3:** UV-VIS spektri KON, MK, EV in EK v Mq.

**Table F3:** UV-VIS spectra of KON, MK, EV and EK in Mq.

192,0	0,427	0,367	0,303	/	/
191,0	0,494	0,411	0,330	/	/
189,9	0,597	0,542	0,394	/	/



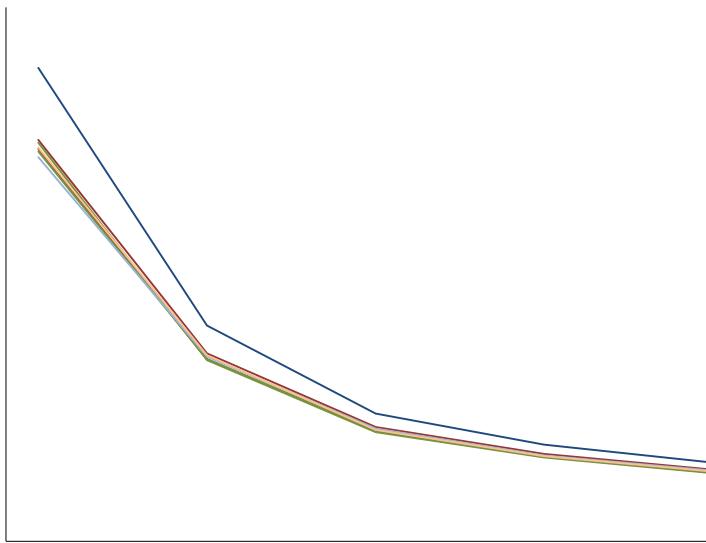
**Slika F3:** Preliminarni UV-VIS spektri KON (modra), MK (rdeča), EV(zelena) in EK (svetlo modra) z intervali SE v Mq.

**Figure F3:** Preliminary UV- VIS spectra of untreated KON (blue), MK (red), EV (green) and EK (light blue) with SE intervals in Mq.

**Preglednica F4:** UV-VIS spektri KON, MV5, MV9, MK5, MK9, EV in EK v 95 % etanolu.

**Table F4:** UV-VIS spectra of KON, MV5, MV9, MK5, MK9, EV and EK in 95 % ethanol.

$\lambda$ (nm)	Absorbanca (/)						
	KON	MV5	MV9	MK5	MK9	EV	EK
210,0	0,5979	0,5167	0,5358	0,5111	0,5190	0,5284	0,5219
205,0	1,0104	0,8531	0,8809	0,8485	0,8535	0,8648	0,8709
200,0	2,2162	1,8383	1,8791	1,8665	1,8251	1,7989	1,8445



**Slika F4:** Preliminarni UV-VIS spektri KON (modra) in MV5, MV9, MK5, MK9, EV ter EK z intervali SE v 95 % etanolu.

**Figure F4:** Preliminary UV- VIS spectra of KON (blue) and MV5, MV9, MK5, MK9, EV and EK with SE intervals in 95 % ethanol.

UV-VIS spektra neobdelanega 95 % etanola (KON na sliki F4) in Mq (KON na sliki F3) imata med 219 in 199 oziroma 219 in 189 nm višje absorbance od spektrov obdelav MV, MK, EV in EK. Medtem ko imata UV-VIS spektra neobdelane KON v 0,05 mmol/L NaHCO<sub>3</sub> (KON na sliki F1) in 0,1 mmol/L NaHCO<sub>3</sub> (KON na sliki F2) nižje absorbance od spektrov MV, MK, EV in EK. V Mq so večje razlike med obdelavami kot v 95 % etanolu. Ker pa so v literaturi (Rao in sod. 2007) že primerjali UV-VIS spektre obdelav z mehanogeno epitaksijo in njihovih kontrol v 95 % etanolu, smo se za nadaljnje snemanje spektrov odločili za kompromis in izbrali 70 % etanol.

## 2. Ponovljivost snemanja spektrov

Ponovljivost snemanja spektrov smo preverili s tridesetimi ponovitvami snemanja Mq in petdesetimi ponovitvami snemanja 70 % etanolu (glej pregl. F5 in F6).

**Preglednica F5:** Ponovljivost snemanja UV-VIS spektra KON v Mq; N=30.

**Table F5:** Repeatability of recording UV-VIS spectra of KON in Mq; N=30.

$\lambda$	Absorbanca			
	AVG	SD	SE	RSE
nm	/	/	/	%
209,9	0,152	0,001	2,61E-04	0,17
205,1	0,166	0,002	2,73E-04	0,17
200,0	0,189	0,002	2,70E-04	0,14

se nadaljuje

nadaljevanje

**Preglednica F5:** Ponovljivost snemanja UV-VIS spektra KON v Mq; N=30.

**Table F5:** Repeatability of recording UV-VIS spectra of KON in Mq; N=30.

194,9	0,236	0,001	2,35E-04	0,10
190,0	0,436	0,004	7,40E-04	0,17

Pri meritvah z Mq smo pazili, da so bile nastavitev spektrofotometra ves čas enake, saj so že najmanjše spremembe bistveno vplivale na rezultate. Ponovljivost snemanja UV-VIS spektrov Mq je enaka  $\pm 0,18\%$  (glej pregl. F5).

**Preglednica F6:** Ponovljivost snemanja UV-VIS spektra KON v 70 % etanolu; N=50.

**Table F6:** Repeatability of recording UV-VIS spectra of KON in 70 % ethanol; N=50.

$\lambda$	Absorbanca			
	AVG	SD	SE	RSE
nm	/	/	/	%
209,9	0,381	0,005	7,07E-04	0,17
205,1	0,601	0,006	8,75E-04	0,17
200,0	1,304	0,017	2,36E-03	0,14
194,9	2,748	0,027	3,80E-03	0,10
190,0	2,911	0,035	4,90E-03	0,17

Ponovljivost snemanja UV-VIS spektrov 70 % etanola je enaka  $\pm 0,17\%$  (glej pregl. F6).

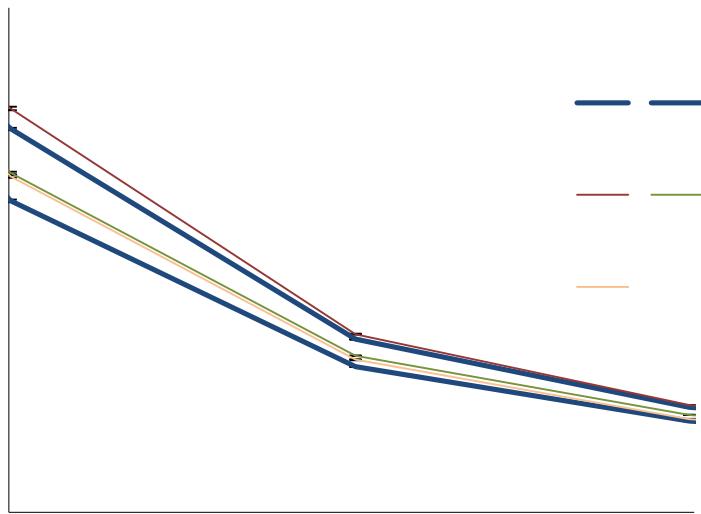
### 3. Preverjanje delovne hipoteze

Tri paralelke obdelav KON, MK, EV in EK smo pripravili v 70 % etanolu. Po pripravi smo raztopine za dva dni shranili na položaju PR. Vsak spekter smo posneli desetkrat in izračunali povprečje ter relativno standardno napako absorbanc (glej sl. F5 in pregl. F7). Pri tem smo vsako od obdelav pripravili trikrat.

**Preglednica F7:** Povprečja desetih meritev UV-VIS spektrov KON, MK, EV in EK v 70 % etanolu z RSE in SE; število paralelek: N=3.

**Table F7:** Average absorbances of UV-VIS spectra KON, MK, EV and EK in 70 % ethanol with RSE and SE; number of replicates: N=3.

$\lambda$	Absorbanca								
	KON		MK		EV		EK		
	AVG	RSE	AVG	RSE	AVG	RSE	AVG	RSE	
nm	/	%	/	%	/	%	/	%	
209,9	0,39	0,05	0,379	0,14	0,386	0,13	0,425	0,15	
205,1	0,63	0,11	0,620	0,32	0,621	0,21	0,706	0,25	
200,0	1,38	0,28	1,348	0,39	1,345	0,37	1,600	0,45	
194,9	2,75	0,10	2,767	0,54	2,758	0,31	2,839	0,48	
190,0	2,91	0,04	2,917	0,51	2,896	0,40	2,940	0,49	



**Slika F5:** UV-VIS spektri KON (modra), MK (rdeča), EV (zelena) in EK (oranžna) z intervali SE desetih meritev v 70 % etanolu; N=3.

**Figure F5:** UV-VIS absorption spectra of KON (blue), MK (red), EV (green) and EK (orange) with SE intervals of ten measurements in 70 % ethanol; N=3.

Na sliki F5 smo ponazorili UV-VIS spektre obdelav KON, MK, EV in EK v 70 % etanolu. Iz spektrov lahko sklepamo, da ni bistvenih razlik med obdelavami.

## PRILOGA G

### FEROMONSKI TEST S *Chromobacterium violaceum* CV026

**Preglednica G1:** Feromonski test brez temperaturnega stresa z ocenami obarvanja NK, KON in MF1-3; z OHHL inkubacija pri 20 °C, N=3.

**Table G1:** Pheromone test without temperature stress with staining scores of NK, KON and MF1-3; with OHHL incubation at 20 °C, N=3.

obdelava	opisna statistika	čas inkubacije (h)									
		9,0	9,5	9,8	10,0	10,3	10,5	10,8	11,0	11,5	12,0
<b>KON</b>	AVG (/)	<b>0,0</b>	<b>1,3</b>	<b>2,3</b>	<b>2,3</b>	<b>3,3</b>	<b>3,3</b>	<b>3,3</b>	<b>3,3</b>	<b>4,0</b>	<b>4,0</b>
	SE (/)	0,0	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,0	0,0
<b>MF1</b>	AVG (/)	<b>0,0</b>	<b>1,0</b>	<b>2,0</b>	<b>2,0</b>	<b>3,0</b>	<b>3,0</b>	<b>3,0</b>	<b>3,0</b>	<b>3,7</b>	<b>4,0</b>
	SE (/)	0,0	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,3	0,0
<b>MF2</b>	AVG (/)	<b>0,0</b>	<b>0,7</b>	<b>1,3</b>	<b>1,3</b>	<b>2,3</b>	<b>2,3</b>	<b>2,3</b>	<b>2,3</b>	<b>3,7</b>	<b>4,0</b>
	SE (/)	0,0	0,3	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,3	0,0
<b>MF3</b>	AVG (/)	<b>0,0</b>	<b>0,3</b>	<b>0,7</b>	<b>0,7</b>	<b>1,7</b>	<b>1,7</b>	<b>2,0</b>	<b>2,0</b>	<b>3,3</b>	<b>3,7</b>
	SE (/)	0,0	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,6	0,6	0,3	0,0
<b>NK</b>	AVG (/)	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>

**Preglednica G2:** Feromonski test z ocenami obarvanja NK, KON in MF1-3; prekonočna kultura 2 uri pri 4 °C, z OHHL inkubacija pri 20 °C.

**Table G2:** Pheromone test with staining scores of NK, KON and MF1-3; overnight culture 2 h at 4 °C; with OHHL incubation at 20 °C.

obdelava	opisna statistika	čas inkubacije (h)					
		12	12,5	13	13,5	14	15,5
<b>KON</b>	AVG (/)	<b>1,0</b>	<b>1,0</b>	<b>2,3</b>	<b>2,8</b>	<b>3,3</b>	<b>5,0</b>
	N (/)	6					
	SE (/)	0,0	0,0	0,2	0,4	0,2	0,0
<b>MF1</b>	AVG (/)	<b>1,0</b>	<b>2,0</b>	<b>3,3</b>	<b>4,0</b>	<b>4,0</b>	<b>5,0</b>
	N (/)	3					
	SE (/)	0,0	0,6	0,7	0,6	0,6	0,0
<b>MF2</b>	AVG (/)	<b>1,0</b>	<b>3,0</b>	<b>5,0</b>	<b>5,0</b>	<b>5,0</b>	<b>5,0</b>
	N (/)	3					
	SE (/)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>MF3</b>	AVG (/)	<b>1,0</b>	<b>1,5</b>	<b>3,3</b>	<b>3,3</b>	<b>3,3</b>	<b>5,0</b>
	N (/)	6					
	SE (/)	0,0	0,2	0,3	0,4	0,2	0,0
<b>NK</b>	AVG (/)	<b>1,0</b>	<b>1,0</b>	<b>1,0</b>	<b>1,0</b>	<b>1,0</b>	<b>1,0</b>
	N (/)	2					
	SE (/)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

**Preglednica G3:** Vpliv trajanja temperaturnega stresa na obarvanje KON; z OHHL inkubacija pri 20 °C.

**Table G3:** Influence of temperature stress duration on staining scores of KON; with OHHL incubation at 20 °C.

trajanje stresa (h)	čas inkubacije pri 20 °C (h)																	
	8	9	9,15	9,5	10,5	11,5	12,5	13,5	14,5	15,5	16,5	17,5	18,5	19,5	20,5	21,5	23	
2	1	1	1	1	1	1	1	2	3	3	4	4	4	5	5	5	5	
4	1	1	1	1	1	1	1	1,5	2,5	2,5	3,5	3,5	3,5	4,5	4,5	4,5	4,5	
6	1	1	1	1	1	1	1	2	2,5	2,5	3,5	4	4	4,5	4,5	4,5	4,5	
12	1	1	1	1	1	1	1	2	2,5	2,5	3,5	3,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	
24	1	1	1	1	1	1	1	1,5	2	2,5	3	3	3,5	4	4	4,5	4,5	
36	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2,5	2,5	3	3	3	3	3,5	
48	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,5	2,5	2,5	2,5	3,5	

**Preglednica G4:** Vpliv trajanja temperaturnega stresa na obarvanje KON; z OHHL inkubacija pri 25 °C.

**Table G4:** Influence of temp. stress duration on staining scores of KON; with OHHL incubation at 25°C.

trajanje stresa (h)	čas inkubacije pri 25 °C (h)											
	8	9	9,5	10	11	12	13	14	15	16	17	18
2	1,0	1,0	1,8	2,0	4,0	4,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
4	1,0	1,0	1,5	1,5	3,0	3,0	4,0	4,0	4,5	4,5	5,0	5,0
6	1,0	1,0	1,0	1,8	3,0	3,0	4,0	4,0	4,5	4,5	5,0	5,0
12	1,0	1,0	1,0	1,0	2,0	3,0	4,0	4,0	4,0	4,0	5,0	5,0
24	1,0	1,0	1,0	1,0	1,5	2,0	3,0	3,0	4,0	4,0	5,0	5,0
36	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,3	2,0	2,0	3,0	3,0	4,0	4,0
48	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	2,0	2,0	2,5	3,0

**Preglednica G5: a)** Feromonski test z NK, KON in MF2; prekonočna kultura 6 ur pri 4 °C, z OHHL inkubacija pri 20 °C. Ocene obarvanja; N [/] NK (3), KON (8), MF2 (8).

**Table G5: a)** Pheromone test of NK, KON and MF2; overnight culture 6 h at 4 °C; with OHHL incubation at 20 °C. Staining scores; N [/] NK (3), KON (8), MF2 (8).

obdelava	opisna statistika	čas inkubacije (h)				
		12,0	13,0	14,0	15,0	16,0
NK	AVG (/)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	SD (/)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	SE (/)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
KON	AVG (/)	1,0	1,0	1,5	2,5	3,2
	SD (/)	0,0	0,0	0,5	0,5	0,8
	SE (/)	0,0	0,0	0,2	0,2	0,3
MF2	AVG (/)	1,0	1,3	1,9	2,8	3,8
	SD (/)	0,0	0,5	0,4	0,8	0,8
	SE (/)	0,0	0,2	0,1	0,3	0,3

**Preglednica G5: b)** Feromonski test z NK, KON in MF2; prekonočna kultura 6 ur pri 4 °C, z OHHL inkubacija pri 20 °C.  $A_{585}$  KON, MF2 in NK z odstopanjem od povprečja dveh paralelk ( $\triangle$ AVG).

**Table G5: b)** Pheromone test of NK, KON and MF2; overnight culture 6 h at 4 °C; with OHHL incubation at 20 °C.  $A_{585}$  of KON, MF2 and NK with deviation from two parallels ( $\triangle$ AVG).

obdelava	opisna statistika	čas inkubacije pri 20 °C (h)			
		14	16	22	36,5
NK	AVG $A_{585}$ (/)	0,023		0,037	0,049
	N (/)	1			
	$\triangle$ AVG $A_{585}$ (/)	< 0,001		< 0,001	< 0,001

se nadaljuje

nadaljevanje

**Preglednica G5:** b) Feromonski test z NK, KON in MF2; prekonočna kultura 6 ur pri 4 °C, z OHHL inkubacija pri 20 °C.  $A_{585}$  KON, MF2 in NK z odstopanjem od povprečja dveh paralelk ( $\Delta$ AVG).

**Table G5:** b) Pheromone test of NK, KON and MF2; overnight culture 6 h at 4 °C; with OHHL incubation at 20 °C.  $A_{585}$  of KON, MF2 and NK with deviation from two parallels ( $\Delta$ AVG).

	AVG $A_{585}$ (/)	0,041	0,053	0,428	1,442
<b>KON</b>	N (/)	2			
	$\Delta$ AVG $A_{585}$ (/)	0,002	0,012	0,083	0,124
<b>MF2</b>	AVG $A_{585}$ (/)	0,048	0,096	0,549	1,400
	N (/)	2			
	$\Delta$ AVG $A_{585}$ (/)	0,006	0,012	0,052	0,025

**Preglednica G6:** a) Feromonski test\_2 z NK, KON in MF2; prekonočna kultura 6 ur pri 4 °C; z OHHL inkubacija pri 20 °C. Ocene obarvanja; N [/] NK (3), KON (5), MF2 (5).

**Table G6:** a) Pheromone test\_2 of NK, KON and MF2; overnight culture 6 h at 4 °C; with OHHL incubation at 20 °C. Staining scores; N [/] NK (3), KON (5), MF2 (5).

obdelava	opisna statistika	čas inkubacije pri 20 °C (h)				
		13,5	14	15	16	17
<b>KON</b>	AVG (/)	1,6	2,8	3,6	4,0	4,6
	SD (/)	0,5	0,4	0,9	0,7	0,9
	SE (/)	0,2	0,2	0,4	0,3	0,4
<b>MF2</b>	AVG (/)	1,8	2,6	4,2	4,2	4,4
	SD (/)	0,4	1,1	1,3	1,3	1,3
	SE (/)	0,2	0,5	0,6	0,6	0,6
<b>NK</b>	AVG (/)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	SD (/)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	SE (/)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

**Preglednica G6:** b) Feromonski test\_2 z NK, KON in MF2; prekonočna kultura 6 ur pri 4 °C; z OHHL inkubacija pri 20 °C.  $A_{585}$  KON in MF2 po 18 urah inkubacije; N=5.

**Table G6:** b) Pheromone test\_2 of NK, KON and MF2; overnight culture 6 h at 4 °C; with OHHL incubation at 20 °C.  $A_{585}$  of KON and MF2 after 18 hours of incubation; N=5.

opisna statistika	KON	MF2
AVG $A_{585}$ (/)	0,39	0,42
SD (/)	0,05	0,05
SE (/)	0,02	0,02
RSE (%)	5,2	4,8

**Preglednica G7:** Feromonski test z ocenami obarvanja KON, MF2 in MF3; prekonočna kultura 12 ur pri 4 °C, z OHHL inkubacija pri 20 °C; N=3; plošče zatesnjene s parafilmom.

**Table G7:** Pheromone test with staining scores of KON, MF2 and MF3; overnight culture 12 h at 4 °C; with OHHL incubation at 20 °C; N=3, plates sealed with parafilm.

obdelava	opisna statistika	čas inkubacije (h)			
		20,0	22,0	25,5	34,5
KON	AVG (/)	1,0	2,3	2,7	3,7
	SD (/)	1,0	1,5	1,5	1,5
	SE (/)	0,6	0,9	0,9	0,9
MF2	AVG (/)	1,0	1,0	1,7	3,7
	SD (/)	0,0	0,0	0,6	0,6
	SE (/)	0,0	0,0	0,3	0,3
MF3	AVG (/)	1,0	1,0	1,3	2,3
	SD (/)	0,0	0,0	0,6	0,6
	SE (/)	0,0	0,0	0,3	0,3

**Preglednica G8: a)** Feromonski test v tekočih gojiščih.  $A_{585}$  KON in MF2; z 10 µmol/L OHHL inkubacija pri 20 °C, prekonočna kultura 2,5 h na 2 °C, N=2.

**Table G8: a)** Pheromone test in liquid medium.  $A_{585}$  of KON and MF2; with 10 µmol/L OHHL incubation at 20 °C, overnight culture 2,5 h at 2 °C, N=2.

čas inkubacije (h)	$A_{585}$ (/)	
	KON	MF2
4	-0,033	-0,034
5	-0,029	-0,030
6	0,108	0,104
7	0,591	0,630
8	1,163	1,159
9	1,339	1,334
24	1,924	2,036
48	2,034	2,036

**Preglednica G8: b)** Feromonski test v tekočih gojiščih.  $A_{585}$  KON in MF2; z 1 µmol/L OHHL inkubacija pri 25 °C, MF2 pripravljena v dH<sub>2</sub>O, prekonočna kultura 12 h na 4 °C, N=2.

**Table G8: b)** Pheromone test in liquid medium.  $A_{585}$  of KON and MF2; with 1 µmol/L OHHL incubation at 25 °C, MF2 prepared in dH<sub>2</sub>O, overnight culture 12 h at 4 °C, N=2.

čas inkubacije (h)	$A_{585}$ (/)	
	KON	MF2
0	0,014	0,013
8	0,047	0,036
9,5	0,030	0,051
10	0,049	0,065
10,5	0,091	0,094
11	0,130	0,146
12	0,239	0,276
13	0,426	0,496
15	0,808	0,894
17	1,134	1,236
19	1,343	1,433
21	1,538	1,602
23	1,603	1,657

**Preglednica G8: c)** Feromonski test v tekočih gojiščih.  $A_{585}$  KON in MF2; z 0,5  $\mu\text{mol/L}$  OHHL inkubacija pri 20 °C, MF2 pripravljena v LB, prekonočna kultura 12 h na 4 °C, N=2.

**Table G8: c)** Pheromone test in liquid medium.  $A_{585}$  of KON and MF2; with 0,5  $\mu\text{mol/L}$  OHHL incubation at 20 °C, MF2 prepared in LB, overnight culture 12 h at 4 °C, N=2.

čas inkubacije (h)	$A_{585} (/)$	
	KON_3	MF2_3
0	-0,007	-0,005
8	-0,002	-0,003
9	0,001	-0,005
9,5	0,002	0,003
10	0,021	0,007
10,5	0,031	0,024
11	0,043	0,037
11,5	0,049	0,063
12	0,014	0,069
14	0,287	0,205
16	0,565	0,362
18	0,746	0,495
20	0,818	0,560
22	1,013	0,733
24	1,188	0,813

**Preglednica G8: d)** Feromonski test v tekočih gojiščih.  $A_{585}$  KON in MF2; z 1  $\mu\text{mol/L}$  OHHL inkubacija pri 25 °C, MF2 pripravljena v LB; prekonočna kultura 12 h na 4 °C, N=2.

**Table G8: d)** Pheromone test in liquid medium.  $A_{585}$  of KON and MF2; with 1  $\mu\text{mol/L}$  OHHL incubation at 25 °C, MF2 prepared in LB, overnight culture 12 h at 4 °C, N=2.

čas inkubacije (h)	$A_{585} (/)$	
	KON_5	MF2_5
8,1	0,047	0,015
9,5	0,030	0,091
10	0,049	0,118
10,5	0,091	0,178
11	0,130	0,555
12	0,239	0,555
13	0,426	0,834

**Preglednica G9: a)** Ponovljivost priprave gojišča v malih ploščah ( $2r = 35 \text{ mm}$ ) in merjenja  $A_{585}$ . N=6

**Table G9: a)** Repeatability of medium preparation in small plates  $2r = 35 \text{ mm}$  and  $A_{585}$  measurement. N=6.

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.	20.	21.	22.	23.	24.	25.	26.	27.	28.	29.	30.	31.	32.	33.	34.	35.	36.	37.	38.	39.	40.	41.	42.	43.	44.	45.	46.	47.	48.	49.	50.		
1,4	1,6	1,6	1,4	1,4	1,5	1,6	1,6	1,4	1,5	1,6	1,5	1,5	1,4	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,6	1,5	1,6	1,7	1,5	1,5	1,4	1,5	1,4	1,5	1,4	1,5	1,6	1,5	1,4	1,6	1,5	1,4	1,7				
1,4	1,5	1,6	1,5	1,6	1,6	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,6	1,4	1,6	1,5	1,6	1,5	1,4	1,6	1,5	1,6	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,6	1,5	1,7	1,6	1,5	1,7	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,4	1,5	1,6	1,4	1,5	1,5	1,6	1,4	1,5	1,4	1,5	1,5
1,4	1,4	1,5	1,6	1,6	1,4	1,5	1,5	1,5	1,5	1,6	1,6	1,4	1,5	1,5	1,4	1,5	1,5	1,5	1,6	1,4	1,6	1,6	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,4	1,5	1,5	1,6	1,6	1,6	1,4	1,5	1,5	1,6	1,4	1,5	1,4	1,7	1,6	1,4	1,5	1,6						
1,5	1,6	1,5	1,5	1,5	1,6	1,6	1,6	1,4	1,5	1,6	1,4	1,6	1,5	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,4	1,7	1,6	1,6	1,5	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,4	1,5	1,5	1,6	1,4	1,5	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,5								
1,6	1,5	1,6	1,5	1,5	1,4	1,6	1,4	1,6	1,5	1,5	1,5	1,6	1,6	1,4	1,5	1,5	1,6	1,4	1,5	1,5	1,5	1,5	1,4	1,5	1,5	1,6	1,7	1,5	1,6	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,5	1,5	1,5	1,6	1,5	1,5	1,5							
1,5	1,6	1,5	1,6	1,6	1,6	1,6	1,5	1,4	1,6	1,6	1,4	1,5	1,6	1,6	1,4	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5							

**Preglednica G9: b)** Ponovljivost priprave gojišča v malih ploščah ( $2r = 35$  mm) in merjenja  $A_{585}$ . N=9.

**Table G9: b)** Repeatability of medium preparation in small plates  $2r = 35$  mm and  $A_{585}$  measurement. N=9.

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.	20.	21.	22.	23.	24.	25.	26.	27.	28.	29.	30.	31.	32.	33.	34.	35.	36.	37.	38.	39.	40.	41.	42.	43.	44.	45.	46.	47.	48.	49.	50.
1,5	1,4	1,6	1,6	1,6	1,5	1,6	1,5	1,5	1,6	1,4	1,5	1,4	1,6	1,4	1,6	1,6	1,4	1,4	1,6	1,5	1,6	1,5	1,5	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,5	1,6	1,6	1,5	1,5	1,5	1,6	1,6	1,5	1,6	1,4	1,5	1,6	1,5	1,6	1,4					
1,6	1,6	1,6	1,5	1,5	1,5	1,7	1,6	1,5	1,6	1,6	1,6	1,4	1,5	1,6	1,6	1,4	1,5	1,4	1,4	1,5	1,5	1,4	1,4	1,5	1,5	1,4	1,6	1,6	1,4	1,4	1,6	1,4	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,5	1,4	1,5							
1,6	1,6	1,4	1,5	1,6	1,6	1,5	1,5	1,5	1,7	1,5	1,5	1,6	1,5	1,4	1,4	1,5	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,5	1,6	1,6	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5							
1,6	1,6	1,4	1,5	1,6	1,6	1,5	1,5	1,5	1,7	1,5	1,5	1,6	1,5	1,4	1,4	1,5	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,5	1,6	1,4	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5							
1,6	1,5	1,6	1,4	1,5	1,5	1,6	1,5	1,5	1,5	1,6	1,5	1,5	1,5	1,6	1,7	1,5	1,6	1,6	1,6	1,4	1,5	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,5	1,6	1,4	1,5	1,5	1,6	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5						
1,6	1,5	1,6	1,4	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,6	1,5	1,7	1,7	1,5	1,6	1,4	1,6	1,5	1,6	1,5	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,5	1,6	1,4	1,5	1,5	1,6	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5						
1,4	1,7	1,6	1,6	1,5	1,5	1,6	1,5	1,5	1,5	1,6	1,5	1,5	1,5	1,4	1,6	1,6	1,4	1,4	1,5	1,5	1,4	1,6	1,4	1,5	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,4	1,5	1,5	1,6	1,7	1,5	1,4	1,5	1,5	1,6	1,5	1,6	1,4	1,5	1,6				
1,5	1,4	1,4	1,7	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,6	1,5	1,7	1,7	1,5	1,6	1,4	1,6	1,5	1,6	1,5	1,5	1,6	1,4	1,5	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,4	1,5	1,5	1,6	1,7	1,6	1,4	1,5	1,6	1,5	1,6	1,4	1,5	1,6	1,4	1,5	1,6			
1,4	1,6	1,5	1,5	1,4	1,6	1,5	1,5	1,5	1,4	1,6	1,6	1,4	1,6	1,4	1,5	1,5	1,6	1,4	1,6	1,6	1,4	1,5	1,4	1,5	1,5	1,6	1,4	1,5	1,6	1,5	1,6	1,4	1,5	1,5	1,6	1,5	1,6	1,4	1,5	1,6	1,5	1,6	1,4	1,5	1,6				
1,5	1,6	1,6	1,7	1,5	1,6	1,5	1,5	1,5	1,5	1,6	1,5	1,7	1,5	1,6	1,4	1,6	1,5	1,6	1,5	1,5	1,6	1,4	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,4	1,5	1,5	1,6	1,5	1,6	1,4	1,5	1,6	1,5	1,6	1,4	1,5	1,6	1,5	1,6	1,4	1,5	1,6		
1,5	1,5	1,4	1,5	1,4	1,5	1,6	1,5	1,5	1,5	1,6	1,5	1,5	1,5	1,5	1,6	1,5	1,6	1,4	1,5	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,4	1,5	1,5	1,6	1,5	1,6	1,4	1,5	1,5	1,6	1,5	1,6	1,4	1,5	1,6	1,5	1,6	1,4	1,5	1,6		

**Preglednica G9: c)** Ponovljivost priprave gojišča v malih ploščah ( $2r = 35$  mm) in merjenja  $A_{585}$ . N=12.

**Table G9: c)** Repeatability of medium preparation in small plates  $2r = 35$  mm and  $A_{585}$  measurement. N=12.

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.	20.	21.	22.	23.	24.	25.	26.	27.	28.	29.	30.	31.	32.	33.	34.	35.	36.	37.	38.	39.	40.	41.	42.	43.	44.	45.	46.	47.	48.	49.	50.
1,6	1,5	1,6	1,6	1,4	1,6	1,6	1,6	1,5	1,4	1,5	1,5	1,5	1,5	1,4	1,5	1,6	1,4	1,4	1,5	1,5	1,6	1,7	1,4	1,5	1,5	1,5	1,6	1,5	1,5	1,5	1,4	1,5	1,4	1,5	1,5	1,4	1,6	1,4	1,5	1,6	1,4	1,6	1,4	1,5	1,6	1,5			
1,5	1,6	1,4	1,6	1,5	1,6	1,5	1,5	1,4	1,4	1,6	1,6	1,4	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,6	1,6	1,6	1,6	1,5	1,6	1,5	1,4	1,7	1,6	1,5	1,6	1,4	1,6	1,5	1,6	1,6	1,5	1,5	1,4	1,4	1,6	1,5	1,5	1,5					
1,5	1,6	1,4	1,6	1,6	1,4	1,5	1,6	1,5	1,5	1,5	1,7	1,5	1,5	1,5	1,5	1,4	1,6	1,5	1,6	1,7	1,6	1,5	1,5	1,4	1,5	1,5	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,6									
1,4	1,6	1,5	1,6	1,5	1,5	1,4	1,5	1,5	1,6	1,5	1,7	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,4	1,5	1,6	1,5	1,6	1,6	1,4	1,5	1,6	1,5	1,4	1,6	1,5	1,5	1,6	1,5	1,6	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,6										
1,6	1,6	1,6	1,7	1,5	1,4	1,4	1,5	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,5	1,6	1,5	1,4	1,5	1,4	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,6											
1,5	1,4	1,6	1,5	1,4	1,4	1,4	1,4	1,5	1,4	1,4	1,5	1,4	1,6	1,5	1,6	1,7	1,4	1,4	1,5	1,6	1,6	1,6	1,4	1,5	1,6	1,5	1,4	1,6	1,5	1,4	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5											
1,5	1,5	1,4	1,6	1,5	1,6	1,4	1,5	1,5	1,4	1,5	1,5	1,5	1,5	1,6	1,6	1,4	1,6	1,6	1,6	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,6												
1,6	1,6	1,4	1,6	1,5	1,5	1,4	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,4	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6											
1,5	1,5	1,5	1,4	1,5	1,6	1,4	1,5	1,5	1,4	1,5	1,5	1,5	1,5	1,6	1,6	1,4	1,6	1,6	1,6	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,4	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,4	1,5	1,6	1,5	1,6	1,6											
1,6	1,6	1,4	1,6	1,5	1,5	1,4	1,5	1,5	1,5	1,7	1,5	1,4	1,6	1,6	1,5	1,5	1,5	1,5	1,7	1,7	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,6	1,4	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,7	1,6	1,5	1,6	1,5											
1,5	1,5	1,5	1,5	1,4	1,5	1,5	1,6	1,4	1,4	1,5	1,5	1,5	1,4	1,5	1,6	1,6	1,4	1,7	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,4	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,6	1,5	1,6	1,5											
1,5	1,5	1,5	1,6	1,6	1,6	1,5	1,5	1,4	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,4	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5												
1,4	1,6	1,4	1,7	1,4	1,6	1,5	1,6	1,7	1,6	1,5	1,6	1,6	1,5	1,6	1,6	1,4	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,4	1,5	1,6	1,5	1,6	1,4	1,5	1,6	1,5	1,6	1,4	1,5											
1,6	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,7	1,6	1,5	1,4	1,6	1,5	1,6	1,7	1,6	1,4	1,5	1,4	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,4	1,5	1,5	1,6	1,5	1,6	1,4	1,5	1,5	1,6	1,4	1,5													