

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Marta FRLIC

**VPLIV NANODELCEV BAKROVEGA OKSIDA NA RAST IN
RAZVOJ SONČNICE (*Helianthus annuus*)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**EFFECTS OF COPPER OXIDE NANOPARTICLES ON GROWTH
AND DEVELOPMENT OF SUNFLOWER (*Helianthus annuus*)**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Katedri za botaniko in fiziologijo rastlin Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, kjer je bila izvedena večina poskusov. Meritve so bile opravljene tudi na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico diplomske naloge imenovala doc. dr. Katarino Vogel-Mikuš, za somentorico pa doc. dr. Jasno Dolenc Koce.

Predsednik: prof. dr. Damjana DROBNE
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Mentor: doc. dr. Katarina Vogel-Mikuš
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Somentor: doc. dr. Jasna Dolenc Koce
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Recenzent: prof. dr. Marjana Regvar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisana se strinjam z objavo svoje diplomske 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.

Marta Frlic

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	581.19:620.3(043.2)=163.6
KG	sončnica/bakrov oksid/nanodelci/fotosintezni pigmenti/elementna sestava/antioksidativni encimi
AV	FRLIC, Marta
SA	VOGEL-MIKUŠ Katarina (mentorica)/DOLENC KOCE Jasna (somentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2011
IN	VPLIV NANODELCEV BAKROVEGA OKSIDA NA RAST IN RAZVOJ SONČNICE (<i>Helianthus annuus</i>)
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 88 str., 16 pregl., 25 sl., 22 pril., 66 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Namen diplomske naloge je bil ugotoviti, kako nanodelci bakrovega oksida (CuO) vplivajo na rast in razvoj sončnice. Sončnice smo 4 tedne gojili na hidroponiki v hranilni raztopini, v katero smo dodali različne koncentracije (0, 10, 50, 100, 150 mg/l) CuO v standardni in nano obliki. Ob koncu poskusa smo opazovali morfološke in biokemijske spremembe, kot so suha biomasa poganjkov in korenin, vsebnost fotosinteznih pigmentov in aktivnost izbranih encimov oksidativnega stresa. Določili smo tudi stopnjo privzemja bakra ter makro (fosfor, žveplo, klor, kalij, kalcij) in mikroelementov (železo, cink). Po končanem tretiranju smo rastline liofilizirali in nato določili suho maso rastlinskih organov. Ugotovili smo, da je vpliv nanodelcev CuO na sončnice negativen. Korenine so postajale z višanjem koncentracije nano CuO vse krajše in temnejše, koreninski sistem je bil vedno slabše razvit, poganjki so zastajali v rasti, na listih pa so se začele pojavljati kloroze in kasneje nekroze. Tudi CuO v standardni kemijski obliki je negativno vplival na rast in razvoj korenin in poganjkov, vendar pa je bil njegov učinek manjši, kot pri nano oblikah. Rezultati meritve biomase so potrdili negativen vpliv tako nano kot standardne oblike CuO. Koncentracijo fotosinteznih pigmentov smo merili fotometrično. Ugotovili smo, da CuO tako v nano kot standardni kemijski oblikah vpliva tudi na vsebnost fotosinteznih pigmentov v listih. Z metodo rentgensko fluorescenčne spektrometrije smo opravili skupne analize elementov v koreninah in poganjkih. Določili smo tudi transportni indeks za baker. Koncentracija bakra se je tako v poganjkih kot v koreninah sončnic zviševala z višanjem koncentracije CuO v raztopini, ne glede na obliko CuO. Stopnja transporta iz korenin v poganjke je bila pri obeh oblikah CuO nizka. Nano oblika CuO je bila bolj mobilna. Nano CuO je negativno vplival na preskrbo poganjkov z žveplom, saj so koncentracije žvepla padale z višanjem koncentracije CuO v hranilni raztopini. V koreninah se je koncentracija žvepla povečevala s koncentracijo CuO v raztopini, kar je lahko posledica spremenjenega metabolizma ali pa tvorbe fitohelatinov. Povečane koncentracije Ca, Fe in Zn v koreninah so bile verjetno posledica prisotnosti nečistoč v CuO. Koncentracije so se bolj povečale pri tretiranju z nano CuO, ki je vseboval več železa in kalcija kot standardna oblika. Zn se v poganjke ni transportiral, medtem ko se je koncentracija železa v poganjkih nekoliko zmanjšala. Koncentracija Ca je v poganjkih rastlin tretiranih z nano CuO, s koncentracijo CuO upadala, kar je verjetno posledica izpodrivanja kalcija iz vezavnih mest v celični steni. Tudi koncentracija kalija je upadala v poganjkih rastlin, tretiranih z nano obliko. Tretiranje z obema oblikama CuO je vodilo v spremembe delovanja encimov, s tem pa sta bili moteni sinteza proteinov in fotosinteza, kar se je odražalo tudi na morfologiji rastlin. Fotometrično smo določili koncentracijo proteinov, ki je s povečevanjem koncentracije CuO v raztopini naraščala in aktivnosti antioksidativnih encimov guaiakol peroksidaze, askorbat peroksidaze in katalaze. Njihove aktivnosti so bile v poganjkih nižje kot v koreninah. Večje spremembe so bile opazne pri nano oblikah. V hranilnih raztopinah s primešanim CuO smo fotometrično določili koncentracijo bakrovih ionov. Ugotovili smo, da se iz nobene oblike CuO bakrovioni ne sproščajo v dovolj velikih koncentracijah, da bi lahko morfološke in biokemijske spremembe, ki so nastale ob tretiranju, pripisali strupenosti zaradi prisotnosti prostih bakrovih ionov v hranilni raztopini.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC 581.19:620.3(043.2)=163.6
CX sunflower/copper oxide/nanoparticles/photosynthetic pigments/elemental composition/antioxidative enzymes
AU FRLIC, Marta
AA VOGEL-MIKUŠ Katarina (supervisor)/DOLENC KOCE Jasna (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
PY 2011
TI EFFECTS OF COPPER OXIDE NANOPARTICLES ON GROWTH AND DEVELOPMENT OF SUNFLOWER (*Helianthus annuus*)
DT Graduation Thesis (University studies)
NO X, 88 p., 16 tab., 25 fig., 22 ann., 66 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The aim of the graduation thesis was to study the effects of copper oxide (CuO) nanoparticles on growth and development of sunflower. Plants were grown in hydroponic nutrient solution with added nano and standard chemical form CuO of 0, 10, 50, 100 and 150 mg/l for four weeks. At the end of experiment we observed morphological and biochemical changes as dry mass of shoots and roots, photosynthetic pigments content and activity of selected enzymes related to oxidative stress metabolism. Copper, macro (phosphorus, sulfur, chlorine, potassium, calcium) and microelements (iron, zinc) concentrations were also determined in plant tissues. Plants were dried, weighted and divided to roots and shoots. Generally sunflowers were negatively affected by the presence of CuO nanoparticles in nutrient solution. With increasing concentrations of nano CuO roots became shorter and darker, root and shoot growth reduced, leaves became chlorotic and later necrotic. Copper oxide in standard chemical form had also negative effects on growth and development of roots and shoots, but the effect was lower when compared to CuO nano form. Results of biomass measurements confirmed negative effect of nano and standard chemical form CuO. Concentrations of photosynthetic pigments were analysed photometrically. We find out that both, nano and standard chemical form, had influence on photosynthetic pigments content in leaves. The concentrations of elements found in roots and shoots were analysed by total reflection X-ray fluorescence. Copper concentrations in plant tissues increased with increasing CuO concentrations in nutrient solution. Transport of copper from roots to shoots was very low as determined by transfer factors, however in nano CuO treated plants the transfer factor was higher when compared to standard chemical CuO treated plants indicating higher mobility of CuO nanoparticles. Nano CuO had negative effect on shoot sulfur supply. Concentration of sulfur in shoots decreased with increased concentration of CuO in solution. The concentration of sulfur in roots increased with increasing concentration of CuO in solution, probably as a consequence of altered metabolism or phytochelatin synthesis. Increase of Ca, Fe and Zn concentration in roots could be the consequence of impurities found in CuO. The increase of concentration was bigger in nano CuO treatment, which contained slightly more Ca and Fe than standard chemical CuO. Zn did not transport effectively to the shoots, while concentrations of Fe in shoots became lower. Concentration of Ca in shoots decreased with increasing nano CuO concentration in solution. The reason could be displacement of Ca from binding points in cell wall. Concentration of K in shoots also decreased but only in plants treated with nano CuO. Treatment with both form of CuO changed enzymatic activity, which led to disturbance in protein synthesis and photosynthesis. The consequences were noticeable on morphology of treated plants. Proteins were determined photometrically method, and their concentrations increased with increasing concentration of CuO in solution. We have also analysed activity of antioxidative enzymes guaiacol and ascorbate peroxidase and catalase. Their activities were lower in shoots than in roots. Bigger differences were noticed in treatment with nano form. In nutrient solution with added CuO we determined concentration of copper ions by spectrophotometric method. We find out that CuO in both forms was not soluble and almost no free copper ions were detected in nutrient solution. Therefore we can conclude that free copper ions were not responsible for morphological and biochemical changes in treated plants.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACI.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	X
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 NANOTEHNOLOGIJA	3
2.1.1 Kaj je nanotehnologija	3
2.2 NANODELCI	4
2.2.1 Kaj so nanodelci in kako jih delimo	4
2.2.1.1 Nanodelci v naravi	5
2.2.1.2 Nenamensko proizvedeni nanodelci	7
2.2.1.3 Inženirski nanodelci	7
2.2.2 Lastnosti nanodelcev	8
2.2.2.1 Oblika nanodelcev	9
2.2.2.2 Kemijske in fizikalne lastnosti	9
2.3 UPORABA IN TVEGANJA NANOTEHNOLOGIJE	11
2.3.1 Nanotehnologija v hrani	11
2.3.2 Druge aplikacije nanotehnologije	12
2.3.3 Tveganja nanotehnologije	14
2.4 VPLIV NANODELCEV NA VIŠJE RASTLINE	15
2.4.1 Transport nanodelcov	15
2.4.2 Pozitivni vplivi nanodelcev na rastline	16
2.4.3 Negativne posledice nanodelcev na rastline	16
2.4.4 Oksidativni stres in antioksidanti	17
2.5 BAKROV OKSID V STANDARDNI IN NANO OBLIKI	19
2.5.1 Baker in bakrov oksid	19
2.5.2 Nanodelci bakrovega oksida	20
2.6 SONČNICA	22
3 MATERIAL IN METODE	24
3.1 PRIPRAVA POSKUSA	24
3.2 KARAKTERIZACIJA BAKROVEGA OKSIDA V NANO IN STANDARDNI KEMIJSKI OBLIKI	26
3.2.1 Dokazovanje bakrovega iona v raztopini CuO.....	26
3.2.2 Analiza bakrovega oksida z rentgensko fluorescenčno spektroskopijo	27
3.3 PRIPRAVA RASTLIN ZA MORFOLOŠKE MERITVE	27
3.4 PRIPRAVA VZORCEV ZA MERJENJE FOTOSINTEZNIH PIGMENTOV	27
3.5 DOLOČANJE KONCENTRACIJ ELEMENTOV V POGANKIH IN KORENINAH SONČNIC	28
3.5.1 Priprava vzorca	28
3.5.2 Rentgensko fluorescenčna spektrometrija s popolnim odbojem	29
3.5.2.1 Potek meritev	31
3.6 PRIPRAVA RASTLINSKEGA MATERIALA ZA MERJENJE KONCENTRACIJE PROTEINOV IN AKTIVNOSTI ANTIOKSIDATIVNIH ENCIMOV	31
3.6.1 Priprava 100 mM kalij-fosfatnega pufra	31
3.7 MERJENJE KONCENTRACIJE PROTEINOV V VZORCIH	32
3.8 MERJENJE AKTIVNOSTI ANTIOKSIDATIVNIH ENCIMOV	33
3.8.1 Merjenje encimske aktivnosti katalaze (CAT, EC 1.11.1.6)	33
3.8.2 Merjenje encimske aktivnosti askorbat peroksidaze (A-POD, EC 1.11.1.11)	34
3.8.3 Merjenje encimske aktivnosti guaiakol peroksidaze (G-POD, EC 1.11.1.7)	34
3.9 STATISTIČNA ANALIZA	35
4 REZULTATI	36
4.1 KARAKTERIZACIJA BAKROVEGA OKSIDA V NANO IN STANDARDNI KEMIJSKI OBLIKI	36

4.2	VSEBNOST BAKROVEGA IONA V RAZTOPINAH BAKROVEGA OKSIDA	38
4.3	MORFOLOŠKE SPREMEMBE	38
4.3.1	Biomasa rastlin	41
4.4	KONCENTRACIJA FOTOSINTEZNIH PIGMENTOV	43
4.5	KONCENTRACIJE ELEMENTOV V KORENINAH IN POGANJKIH SONČNICE	45
4.5.1	Baker.....	45
4.5.1.1	Koncentracija bakra	45
4.5.1.2	Vsebnost bakra	47
4.5.1.3	Transportni indeks za baker	49
4.5.2	Žveplo	51
4.5.3	Kalij	53
4.5.4	Kalcij.....	54
4.5.5	Železo	56
4.5.6	Cink.....	59
4.6	KONCENTRACIJA PROTEINOV.....	61
4.7	ENCIMSKA AKTIVNOST ANTIOKSIDATIVNIH ENCIMOV.....	62
4.7.1	Guaiakol peroksidaza	62
4.7.2	Askorbat peroksidaza.....	63
4.7.3	Katalaza.....	65
4.8	PREGLED STATISTIČNO ZNAČILNIH SPREMEMB V RASTLINAH, TRETIRANIH S STANDARDNO KEMIJSKO IN NANO OBLIKO CuO, V ODVISNOSTI OD KONCENTRACIJE CuO	67
5	RAZPRAVA.....	70
5.1	VSEBNOST BAKROVEGA IONA V RAZTOPINI BAKROVEGA OKSIDA (CuO)	70
5.2	KARAKTERIZACIJA BAKROVEGA OKSIDA V NANO IN STANDARDNI KEMIJSKI OBLIKI	70
5.3	VPLIV CuO NA RASTLINE	71
5.3.1	Vpliv CuO na morfologijo rastlin.....	71
5.3.2	Vpliv CuO na koncentracijo fotosinteznih pigmentov.....	72
5.3.3	Vpliv CuO na koncentracijo elementov v koreninah in poganjkih	73
5.3.3.1	Koncentracija bakra in transportni indeks	73
5.3.3.2	Koncentracija S, Fe, Zn, Ca in K.....	74
5.4	BIOKEMIJSKE SPREMEMBE	77
6	SKLEPI.....	79
7	POVZETEK.....	81
8	VIRI.....	84
ZAHVALA		
PRILOGE		

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Tabela 1: Koncentracije nečistoč v standardni kemijski obliki in nano obliki CuO.....	36
Tabela 2: Biomasa korenin (a.) in poganjkov (b.) (rezultati faktorske analize).....	42
Tabela 3: Klorofil a (a.), klorofil b (b.) in karotenoidi (c.) (rezultati faktorske analize)....	45
Tabela 4: Koncentracija Cu v koreninah (a.) in poganjkih (b.) (rezultati faktorske analize)	46
Tabela 5: Vsebnost Cu v koreninah (a.) in poganjkih (b.) (rezultati faktorske analize)	48
Tabela 6: Transportni indeks (rezultati faktorske analize)	50
Tabela 7: Koncentracija S v koreninah (a.) in poganjkih (b.) (rezultati faktorske analize)	52
Tabela 8: Koncentracija K v koreninah (rezultati faktorske analize).....	53
Tabela 9: Koncentracija Ca v koreninah (a.) in poganjkih (b.) (rezultati faktorske analize)	55
Tabela 10: Koncentracija Fe v koreninah (a.) in poganjkih (b.) (rezultati faktorske analize).....	57
Tabela 11: Koncentracija Zn v koreninah (rezultati faktorske analize)	59
Tabela 12: Koncentracija proteinov v koreninah (rezultati faktorske analize)	62
Tabela 13: Specifična encimska aktivnost G-POD v poganjkih (rezultati faktorske analize)	62
Tabela 14: Specifična encimska aktivnost A-POD v koreninah (a.) in poganjkih (b.) (rezultati faktorske analize)	64
Tabela 15: Aktivnost CAT v koreninah (a.) in poganjkih (b.) (rezultati faktorske analize)	65
Tabela 16: Spremembe na rastlinah, tretiranih s standardno kemijsko obliko in nano obliko CuO v primerjavi s kontrolo.....	67

KAZALO SLIK

str.

Slika 1: Sončnica (<i>Helianthus annuus</i>).....	22
Slika 2: A - Tri sončnice, vstavljeni v stiroporni plovec, ki je položen na čašo s hranilno raztopino in B-rastline v rastni komori.....	25
Slika 3: Shematski prikaz principa delovanja TXRF metode	30
Slika 4: Rentgensko fluorescenčni spekter posnet po vzbujanju vzorcev CuO v nano in standardni kemijski obliki z radioizotopskim izvorom Cd-109.....	37
Slika 5: Rentgensko fluorescenčni spekter posnet po vzbujanju vzorcev CuO v nano in standardni kemijski obliki z radioizotopskim izvorom Fe-55.	37
Slika 6: Vrednosti spektralnih prosojnosti v raztopinah bakrovega (II) sulfata, bakrovega oksida v nano in v standardni obliki	38
Slika 7: Primerjava kontrolne rastline z rastlino, ki je rasla v raztopini s koncentracijo 1 mg/l CuO v standardni in nano obliki.....	39
Slika 8: A - Primerjava kontrolne rastlin z rastlino, ki je rasla v raztopini s koncentracijo 10 mg/l CuO v standardni in nano obliki. B – Pojav kloroz na listih.	39
Slika 9: A - Primerjava kontrolne rastline z rastlino, ki je rasla v raztopini s koncentracijo 50 mg/l CuO v standardni in nano obliki. B – Pojav nekroz na listih	40
Slika 10: A - Primerjava kontrolne rastline z rastlino, ki je rasla v raztopini s koncentracijo 100 mg/l CuO v standardni in nano obliki. B – Deformacije listov	40
Slika 11: Primerjava kontrolne rastline z rastlino, ki je rasla v raztopini s koncentracijo 150 mg/l CuO v standardni in nano obliki.	41
Slika 12: Biomasa poganjkov in korenin sončnic pri različnih tretmajih	43
Slika 13: Koncentracija fotosinteznih pigmentov pri različnih tretmajih	44
Slika 14: Koncentracija Cu v koreninah (a.) in poganjkih (b.) pri različnih tretmajih.....	47
Slika 15: Vsebnost Cu v koreninah (a.) in poganjkih (b.) pri različnih tretmajih	49
Slika 16: Transportni indeksi pri različnih tretmajih	50
Slika 17: Koncentracija S v koreninah (a.) in poganjkih (b.) pri različnih tretmajih	52
Slika 18: Koncentracija K v koreninah (a.) in poganjkih (b.) pri različnih tretmajih.....	54
Slika 19: Koncentracija Ca v koreninah (a.) in poganjkih (b.) pri različnih tretmajih.....	56
Slika 20: Koncentracija Fe v koreninah (a.) in poganjkih (b.) pri različnih tretmajih	58
Slika 21: Koncentracija Zn v koreninah (a.) in poganjkih (b.) pri različnih tretmajih	60
Slika 22: Koncentracija proteinov pri različnih tretmajih v koreninah (a.) in poganjkih (b.)	61
Slika 23: Specifična encimska aktivnost G-POD pri različnih tretmajih v koreninah (a.) in poganjkih (b.).	63
Slika 24: Specifična encimska aktivnost A-POD pri različnih tretmajih v koreninah (levo) in poganjkih (desno)	64
Slika 25: Specifična encimska aktivnost CAT pri različnih tretmajih v koreninah (a.) in poganjkih (b.).....	66

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Vpliv oblike in koncentracije CuO na biomaso korenin tretiranih rastlin

PRILOGA B: Vpliv oblike CuO na biomaso poganjkov tretiranih rastlin

PRILOGA C: Vpliv oblike in koncentracije CuO na koncentracijo klorofila a pri tretiranih rastlinah

PRILOGA D: Vpliv oblike in koncentracije CuO na koncentracijo klorofila b pri tretiranih rastlinah

PRILOGA E: Vpliv koncentracije CuO na koncentracijo karotenoidov pri tretiranih rastlinah

PRILOGA F: Vpliv koncentracije CuO na koncentracijo bakra v koreninah tretiranih rastlin

PRILOGA G: Vpliv oblike in koncentracije CuO na koncentracijo bakra v poganjkih tretiranih rastlin

PRILOGA H: Vpliv oblike in koncentracije CuO na vsebnost bakra v koreninah tretiranih rastlin

PRILOGA I: Vpliv koncentracije CuO na vsebnost bakra v poganjkih tretiranih rastlin

PRILOGA J: Vpliv koncentracije CuO na vrednost transportnega indeksa tretiranih rastlin

PRILOGA K: Vpliv koncentracije CuO na koncentracijo žvepla v koreninah tretiranih rastlin

PRILOGA L: Vpliv oblike in koncentracije CuO na koncentracijo žvepla v poganjkih tretiranih rastlin

PRILOGA M: Vpliv koncentracije CuO na koncentracijo kalija v poganjkih tretiranih rastlin

PRILOGA N: Vpliv koncentracije CuO na koncentracijo kalcija v poganjkih in koreninah tretiranih rastlin

PRILOGA O: Vpliv oblike in koncentracije CuO na koncentracijo železa v koreninah tretiranih rastlin

PRILOGA P: Vpliv koncentracije CuO na koncentracijo železa v poganjkih tretiranih rastlin

PRILOGA R: Vpliv oblike in koncentracije CuO na koncentracijo cinka v koreninah tretiranih rastlin

PRILOGA S: Vpliv koncentracije CuO na koncentracijo proteinov v koreninah tretiranih rastlin

PRILOGA T: Vpliv oblike CuO na specifično encimsko aktivnost G-POD v poganjkih tretiranih rastlin

PRILOGA U : Vpliv oblike CuO na specifično encimsko aktivnost A-POD v koreninah in poganjkih tretiranih rastlin

PRILOGA V: Vpliv oblike in koncentracije CuO na specifično encimsko aktivnost CAT v koreninah tretiranih rastlin

PRILOGA Z: Vpliv koncentracije CuO na specifično encimsko aktivnost CAT v poganjkih tretiranih rastlin

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A-POD askorbat peroksidaza

Ca kalcij

CAT katalaza

Cu baker

CuO bakrov oksid

Fe železo

G-POD guaiakol peroksidaza

H₂O₂ vodikov peroksid

K kalij

ROS reaktivne kisikove spojine

S žveplo

SEA specifična encimska aktivnost

SM suha masa

TI transportni indeks

TXRF rentgensko fluorescenčna spektrometrija s popolnim odbojem

Zn cink

1 UVOD

Nanotehnologija je hitro razvijajoča se tehnologija, ki vpliva na ekonomijo, družbo in okolje (Lin in Xing, 2007). Glavni produkt nanotehnologije so nanodelci. Nanodelci so atomski ali molekulski agregati, ki vsaj v eni dimenziiji merijo manj kot 100 nm. Zanje je značilno, da se njihove fizikalno - kemijske in toksikološke lastnosti razlikujejo od lastnosti večjih delcev istega materiala (Lee s sod., 2009). V naravi obstajajo že od nastanka Zemlje (Monica in Cremonini, 2009).

Z razvojem nanotehnologije se povečuje tudi število industrijsko proizvedenih nanodelcev. Le vprašanje časa je, kdaj bodo ti delci našli pot v atmosfero, vodne in terestrične ekosisteme. Na trgu so inženirski nanodelci že močno razširjeni, a njihovi efekti še niso popolnoma znani. Za ocenjevanje tveganj, ki jih inženirski nanodelci prinašajo, je pomembno razumevanje njihove mobilnosti, reaktivnosti in ekotoksikologije (Nowack in Bucheli, 2007).

Med industrijsko proizvedene nanodelce spadajo tudi kovinski oksidi. Eden izmed njih je bakrov oksid (CuO), ki se v nano obliki uporablja kot katalizator in kot plinski senzor (Carnes in Klabunde, 2003; Dutta s sod., 2003). Na področju ekotoksikologije je raziskovanje osredotočeno na vodne organizme, zelo malo raziskav pa vključuje kopenske rastline (Stampoulis s sod., 2009). Ker je prav med kopenskimi rastlinami veliko predstavnikov, ki se uporabljajo v živilski, farmacevtski in kozmetični industriji, je vključevanje kopenskih rastlin v raziskovanje vpliva nanodelcev in njihove akumulacije v živih organizmih ključnega pomena.

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti, kako nanodelci bakrovega oksida vplivajo na rast in razvoj sončnice. Sončnico smo izbrali, ker je pomembna industrijska rastlina, dober modelni organizem, saj raste zelo hitro in ker jo je enostavno gojiti na hidroponskem sistemu. Rastline sončnice smo tako gojili 4 tedne v hranilni raztopini (Machils in Torrey, 1956) z dodanimi različnimi koncentracijami (0, 10, 50, 100, 150 mg l^{-1}) bakrovega oksida v nano in standardni kemijski obliki). Ob koncu poskusa smo opazovali morfološke in biokemijske spremembe, kot so suha masa poganjkov in korenin, vsebnost fotosinteznih

pigmentov in aktivnost izbranih encimov. Določili smo tudi stopnjo privzema bakra ter makro (fosfor, žveplo, klor, kalij, kalcij) in mikroelementov (železo, cink).

Naše hipoteze so bile:

- Nano bakrov oksid bo negativno vplival na rast in razvoj sončnic. Višja kot bo koncentracija, slabša bo rast rastlin.
- Pri rastlinah, tretiranih z nanodelci bakrovega oksida, bo rast poganjkov in korenin slabša kot pri tistih, ki bodo tretirane s standardno obliko bakrovega oksida, saj so nanodelci bolj reaktivni in manjši ter lahko prodrejo globlje v tkivo.
- Pri rastlinah tretiranih z nanodelci bakrovega oksida se bo vsebnost fotosinteznih pigmentov zmanjšala, ker bodo nanodelci bakrovega oksida povzročili oksidativni stres, poškodovali koreninski sistem ter s tem motili privzem esencialnih mineralnih hranil v rastline. Pri rastlinah, tretiranih z nanodelci bakrovega oksida, bo zaradi povečanega oksidativnega stresa spremenjena aktivnost encimov, ki sodelujejo pri odstranjevanju reaktivnih kisikovih spojin.
- Rastline, tretirane z nanodelci bakrovega oksida bodo zaradi večje mobilnosti nanodelcev v svojih tkivih vsebovale višje koncentracije bakra kot rastline z dodanim CuO v standardni obliki. Zaradi poškodb korenin ali kompeticije z ioni bakra bo motena preskrba z mineralnimi hranili.

2 PREGLED OBJAV

2.1 NANOTEHNOLOGIJA

2.1.1 Kaj je nanotehnologija

Beseda nano izhaja iz grške besede »nanos« in pomeni škrat. Pri nanotehnologiji gre za delo, ki poteka na objektih, ki merijo manj kot deset milijonink metra. Z njimi operiramo na nanometerski meritni lestvici (Remškar, 2009). Na tej ravni snovi izkazujejo različne in pogosto osupljive lastnosti (Schulenburg, 2006). Za lažjo predstavo nanometerske velikosti lahko kot dejstvo navedemo, da ima molekula DNA premer 2 nm, virusi približno 150 nm, rdeča krvnička 700 nm, človeški las 80 000 nm, bolha pa je v velikosti enega milimetra (tj. 1 000 000 nm) in jo že lahko vidimo s sprostim očesom. Produkti te tehnologije so zelo uporabni v realnem makroskopskem svetu (Remškar, 2009).

Prvi, ki je začel govoriti o konceptu nanoznanosti, je fizik Richard P. Feyman. Idejo je predstavil v svojem predavanju na letnjem srečanju Društva ameriških fizikov (American Physical Society) leta 1959 (Drobne, 2007).

Nanotehnologija je hitro razvijajoča se industrija, ki vpliva na ekonomijo, družbo in okolje. Mnenja medijev, znanstvenikov in vlad so zelo različna (Daohui in Baoshan, 2007). Z manjšimi, lažjimi, hitrejšimi in učinkovitejšimi materiali, komponentami in sistemi ponuja možne rešitve za številne trenutne probleme. Državam v razvoju daje nove možnosti za ustvarjanje bogastva in za zaposlovanje. Nanotehnologija naj bi prav tako znatno prispevala k reševanju globalnih in okoljskih izzivov in sicer z uresničevanjem procesov in ustvarjanjem izdelkov, bolj specifično določenih za uporabo. Z njenim pomočjo naj bi varčevali z viri in zmanjšali količino odpadkov ter emisij (Schulenburg, 2006).

Znanstvena odkritja in tehnološki obeti nanotehnologije so izjemni. Še posebej to velja za proizvodnjo materialov, nanoelektroniko, medicino, varovanje zdravja, biotehnologijo, informatiko in zagotavljanje varnosti. Jasno je, da bo imela nanotehnologija velik vpliv na ekonomijo in družbeno dogajanje 21. stoletja. Nekateri celo napovedujejo, da bo povzročila novo industrijsko revolucijo (Remškar, 2009). Podatki o trenutni uporabi in

sintezi nanodelcev so redki in zelo različni. Maynard (2006) navaja, da bo produkcija inženirskih nanomaterialov iz 2000 ton v letu 2004, narasla na 58 000 ton v letih od 2011-2020. Združene Države Amerike imajo na trgu trikrat več nanoproduktov kot vzhodna Azija in Evropa (EIAMIN, 2006).

Kljud veliko prednostim, ki jih nanotehnologija prinaša, pa se mnogi sprašujejo tudi, kakšne so negativne posledice izpostavljenosti nekaterim inženirskim nanodelcem. Pričakuje se, da se bo izpostavljenost nanomaterialom v prihodnjih letih dramatično povečala, zato je nujno potrebno pridobiti informacije o strupenosti in varni uporabi inženirskih nanodelcev (Kasemets s sod., 2009). Ta trenutek je tudi pomembno pridobiti čim več ustrezne znanja za oblikovanje regulativ na področju varne proizvodnje in uporabe nanodelcev (Drobne, 2007).

2.2 NANODELCI

2.2.1 Kaj so nanodelci in kako jih delimo

Nanodelci so atomski ali molekulski agregati, ki vsaj v eni dimenziji merijo od 1-100 nm. Zaradi majhnosti ter strukturnih in površinskih karakteristik so njihove fizikalno-kemijske lastnosti drugačne kot lastnosti večjih delcev enakega materiala (Stampoulis s sod., 2009). Nanodelce lahko industrijsko proizvedemo skoraj iz vsake kemikalije. Značilno je, da se suspendirani industrijski nanodelci v plinu ali tekočini združijo v večje skupke, agglomerate. Tvorba aglomeratov je odvisna od koncentracije in kemijskih značilnosti medija (Drobne, 2007).

Nanodelce lahko razdelimo na naravne in antropogene (Nowack in Bucheli, 2007). Naravne nanodelce lahko naprej razdelimo na nanodelce anorganskega in organskega izvora. Med organske nanodelce štejemo biomolekule ter rastlinske in živalske nanostrukturi. Nowack in Bucheli (2007) organske nanodelce razdelita še na na biogene, geogene, atmosferske in pirogene.

Koncentracija nanodelcev v ozračju se spreminja v odvisnosti od letnega časa, zračne vlage, vetra, temperature in bližine virov teh delcev (industrijski obrati, toplarne in druga kurišča, prometne poti) (Remškar, 2009). Nižje koncentracije nanodelcev se pojavijo v zimskem času kot posledica nižjih temperatur (Joeng s sod., 2005). Za delce, manjše od 10 μm , so določene mejne vrednosti $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Ocenjuje se, da je 90 odstotkov delcev v ozračju manjših od $2,5 \mu\text{m}$. Konec maja 2009 je bila sprejeta Direktiva Evropskega parlamenta in Sveta o kakovosti zunanjega zraka in čistejšem zraku za Evropo, ki določa mejno vednost $2,5\text{-}25 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Ta mora biti dosežena do leta 2015. Do leta 2020 pa mora biti dosežena mejna vrednost $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Remškar, 2009).

2.2.1.1 Nanodelci v naravi

V naravi nanodelci obstajajo že od nastanka Zemlje. Najdemo jih v puščavskem prahu, mineralnih kompozitih, nastajajo pri izbruhu vulkanov, gozdnih požarih in eroziji (Monica in Cremonini, 2009; Stampoulis s sod., 2009). Tudi fragmenti peloda in virusi spadajo med naravne nanodelce. Njihove velikosti so zelo različne (Navarro s sod., 2008).

Narava je mojster nanotehnologij. Živeči organizmi so se skozi evolucijo adaptirali na prisotnost naravnih nanodelcev v okolju (Blinova s sod., 2010). V štirih milijardah let je živi naravi s pomočjo nanotehnologije uspelo najti kar nekaj rešitev za težave, na katere je naletela. Življenje je snov strukturiralo do popolnosti, vse do atomov. Tega si želijo tudi nanotehnologi (Schulenburg, 2006). Nanožičke v naravi so DNA, pajčevina, svila in kite. Nanostrukture so tudi hemoglobin, fosfolipidne membrane, holesterol, kosti z nanokristali mineralov, mnogi geli, soli in miceliji. Seveda pa so možnosti žive narave omejene. Primer je omejitev delovanja pri visokih temperaturah. V nasprotju z naravo ima sodobna tehnika na razpolago zelo umetne pogoje (skrajna čistost, mraz, vakuum). Pod temi pogoji lahko snovi dosežejo presenetljive lastnosti (Navodnik, 2007).

Rastline so razvile mnogo nanostruktur, ki jim omogočajo oprijemanje, čiščenje... Lotosov cvet in kapucinka čistita svoje liste z lotosovim učinkom. S pomočjo vrstičnega elektronskega mikroskopa so znanstveniki videli, kako se vodne kapljice odmaknejo od lista (Schulenburg, 2006). Voda delca ne omoči, ampak ostane kot povsem okrogla kapljica na podlagi, prekriti z nanodelci. Če to podlago nagnemo, se bodo kapljice odkotalile (Remškar, 2009). Pri rastlinah pride do lotosovega efekta zaradi strukturirane površine lista v obliki nanostruktur, ki povzročijo odboj vode. Pri tem se odplakne tudi umazanja.

Rastline pa uporabljajo še več nanotehnologije. V listih so našli majhne gibajoče proteine forisome, ki v kapilarinem sistemu ksilema odpirajo ali pa zapirajo poti. Tudi fotosinteza, ki zbira energijo za življenje na Zemlji, je proces na nanometerski ravni, v katerem je pomemben vsak atom (Schulenburg, 2006).

Nanotehnologijo uporabljajo tudi živali. Gekoni, pajki, hrošči in muhe lahko s pomočjo nanotehnologije plezajo po stenah. To jim omogočajo tanke dlačice na nogah, ki so tako mehke, da se lahko večji površini približajo na razdaljo nekaj nanometrov. Takrat začne med atomi dlačic in podlage delovati šibka Van der Walsova sila. Čeprav je šibka, zaradi adhezijskih točk nosi težo. Vez se sprosti na podoben način, kot mi odlepimo lepilni trak. Težja kot je žival, nežnejše in številčnejše so dlačice (Schulenburg, 2006).

Užitna klapavica se na podlago pritrdi s pomočjo lepljivih kapljic. Lepljive kapljice se razlijejo in sprostijo močno podvodno lepilo, ki se razpeni v obliki majhne podvodne blazine. Ta deluje kot dušilnik vibracij. Na tej blazini je klapavica zasidrana z elastičnim bisusom (Schulenburg, 2006). Školjke uporabljajo nanotehnologijo tudi pri biomineralizaciji (Navodnik, 2007). Biserovina školjk sestoji iz apnenčastih kristalov v obliki aragonita. Ti kristali so sami po sebi zelo krhki, v školjki pa so povezani z visoko elastičnimi proteini, ki so podobni vijakom. Trije odstotki mase proteina so dovolj, da je lupina tisočkrat trdnejša od čistega apnenčastega kristala. Morski ježki na ta način krepijo bodice, da se lahko upirajo udarjanju valov. Glavna sestavina hišic diatomej je silicijev dioksid. Hišice so odporne na več korozivnih kislin in lugov. V njih je veliko por v nanomerilu (Schulenburg, 2006).

2.2.1.2 Nenamensko proizvedeni nanodelci

Poleg naravnih poznamo nenamensko proizvedene nanodelce, ki so stranski produkt pri industrijski proizvodnji (mletje, varjenje, brušenje, gradbeništvo, sprej tehnologije), izgorevanju biomase in fosilnih goriv, najdemo pa jih tudi v izpuhu motorjev z notranjim izgorevanjem, še posebej pri dizelskih motorjih. Pomemben je podatek, da je pri kajenju v vsakem kubičnem centimetru izdihanega zraka, pomešanega s tobačnim dimom, toliko nanodelcev, da presegajo številko sto milijonov (Remškar, 2009). Pri nenamensko proizvedenih nanodelcih gre predvsem za saje, organski in elementarni ogljik, heterogene delce, ki vsebujejo sulfid, sulfat, sledove kovin, nitrat in amonij (Navarro s sod. 2008, Sioutas s sod., 2005).

2.2.1.3 Inženirski nanodelci

Tretja skupina so inženirski nanodelci, ki jih delimo v štiri tipe:

- nanodelci na osnovi ogljika, med katerimi so najpogosteji fuleren, enostenske in večstenske nanocevke,
- nanodelci na osnovi kovin in kovinskih oksidov (nanozlato, nanocink, nanoaluminij, nanosrebro, titanov oksid, bakrov oksid,...),
- dendrimeri, ki so polimeri v nano velikosti s specifičnimi kemijskimi funkcijami,
- kompoziti, ki vključujejo kombinacije več nanodelcev, ali pa kombinacijo nanodelcev s standardno obliko materiala (Lin in Xing, 2007).

Velikosti inženirskih nanodelcev so bolj natančno definirane (Navarro s sod., 2008). Običajno so ti delci na površini kemijsko obdelani tako, da se ne morejo združevati v večje delce. Proizvajalci površino namensko oksidirajo ali pa nanjo nanesejo prevleko iz druge spojine in tako preprečijo združevanje nanodelcev. Prav zaradi te preprečene aglomeracije se industrijski nanodelci razlikujejo od nenamenskih (Remškar, 2009). Zaradi vse pogosteje uporabe inženirskih nanodelcev se pričakuje, da se bo njihova koncentracija v vodnem, terestričnem in atmosferskem okolju povečevala (Monica in Cremonini, 2009). Inženirski nanodelci lahko pridejo v okolje nenamerno preko atmosferskih izpustov, pri uporabi v kmetijstvu, z odpadnimi vodami, z nesrečami pri proizvodnji in transportu, ki

vodijo do izliva nanodelcev v okolje (Stampoulis s sod., 2009). Lahko pa pridejo v okolje tudi namerno z uporabo nanodelcev pri remediaciji (Zhang in Elliott, 2006). Posledice njihove prisotnosti in delovanja v okolju so še dokaj nepoznane (Monica in Cremonini, 2009).

2.2.2 Lastnosti nanodelcev

Lastnosti nanodelcev so drugačne kot lastnosti delcev večjih od 100 nanometrov. Z manjšanjem velikosti delca se povečuje njegova površina glede na volumen (Remškar, 2009). Večje kot je razmerje med površino in volumnom, bolj je delec reaktivен (Čebulj, 2007). Delec, ki ga zmanjšamo na velikost enega nanometra, ima kar 58 odstotkov vseh atomov na površini. Kemijska aktivnost tako postane zelo velika (Remškar, 2009). Če je atomov na površini več, se delci lahko hitreje in močneje vežejo (Čebulj, 2007). Zaradi motene koordinacije sosednjih atomov pride do sprememb v energijski strukturi elektronov, kar vodi v spremembo optičnih in električnih lastnosti (Remškar, 2009). Velikost delca pri nanodelcih bakrovega oksida vpliva tudi na viskozne lastnosti nanotekočine. Manjši kot so delci, večja je viskoznost (Chang s sod., 2005). Ogljikove cevke imajo trdnost 10-krat večjo od najboljših jekel. Nanosloji spremenijo barvo z debelino, tlakom, napetostjo, kemikalijami ali svetlobo. Proizvedemo lahko prozorne kovine. Delci postanejo 4,5-krat bolj magnetni, z magnetnim poljem se jim prevodnost 1000-krat poveča. Luminiscenca nanodelcev je 100-krat višja, vzpodbujajo pa jo temperatura, svetloba in napetost. Proizvedemo lahko supertekočine, ki tečejo po ceveh brez trenja (Navodnik, 2007).

Za razumevanje obnašanja nanodelcev v okolju je potrebno poznati njihovo velikost, obliko, kemijske značilnosti površine in jedra, sposobnost aglomeracije, redoks potencial, čistost, katalitično aktivnost, kristaliničnost, površinski naboj in poroznost (Powers s sod., 2006).

2.2.2.1 Oblika nanodelcev

Oblika nanodelcev je zelo pomembna informacija. Oblika natančno določa površino nanodelca, na tej površini pa so proste kemijske vezi ali električni naboj, ki vpliva na fizikalne in kemijske lastnosti delca (Remškar, 2009). Površinske lastnosti nanodelcev so eden najpomembnejših dejavnikov, ki določajo stabilnost nanodelcev, njihovo mobilnost v koloidnih raztopinah in njihovo agregacijo v večje delce (Navarro s sod., 2008). Površina ploščatega delca je večja kot površina sferičnega delca enake mase (Čebulj, 2007). Nanodelci so lahko v obliki vlaken in nitk. Za njih je značilno, da imajo dolžino, ki presega tri premere v prečni smeri. Primer nitkastih nanodelcev so ogljikove cevke (Remškar, 2009).

Oblika določa tudi aerodinamični premer delca, kar je pomembno pri razumevanju uhajanja nanodelcev v ozračje in potovanja delcev po zraku in tekočinah. Majhni in okrogli delci se v tekočini in plinu gibljejo zelo hitro. Lahko prehajajo skozi luknjice filtrov in trkajo med seboj ter z molekulami medija v katerem se nahajajo. Nitkasti delci so zaradi večje mase bolj podvrženi sedimentaciji. Lažje jih je prestreči s filtri. Pri trčenju se med seboj združujejo v snope, ki se lahko ponovno razpršijo ali pa v kroglaste skupke, iz katerih se težko ponovno osvobodijo. Na združevanje močno vplivata tudi kemijska sestava delcev in električna nabitost (Remškar, 2009).

Nanodelci, ki so tanjši od sto nanometrov in se gubajo ali zvijajo pod vplivom trkov okoliških molekul, imajo obliko tankih lističev. Razporeditev naboja na njihovi površini je neenakomerna, kar poveča sposobnost vezave tankih lističev na podlago, s katere jih je potem težko odstraniti (Remškar, 2009).

2.2.2.2 Kemijske in fizikalne lastnosti

Kemijska sestava nanodelcev je pomembna s stališča topnosti. Omočitveni kot in s tem stopnja hidrofilnosti sta močno odvisna od ukrivljenosti nanodelca in njegove velikosti. Nanodelci v vodi praviloma niso topni. Kovinski nanodelci so običajno topni in se počasi

raztapljajo v ione, kar lahko povzroči nezaželene kemijske reakcije v organizmu. Kovinski oksidi so stabilnejši, a tisti, ki vsebujejo prehodne elemente še vedno lahko povzročajo neželene kemijske reakcije zaradi večjega števila možnih oksidacijskih stanj kovinskega iona (Remškar, 2009). Nekaterim netopnim snovem se topnost lahko močno poveča, ko so delci manjši od 100 nm (Stampoulis s sod., 2009).

Nanodelci imajo večjo kemijsko aktivnost, kar prispeva k njihovemu združevanju v aglomerate. Da se lahko združijo, se morajo najprej srečati. V tekočinah in plinih so močno podvrženi Brownovemu gibanju (Remškar, 2009). Če se delca dovolj približata, se šibko sprimeta. Sčasoma se tvorijo večji aglomerati, ki imajo lahko popolnoma drugačne lastnosti kot posamezni delci. To je posledica spreminjanja razmerja med površino in volumnom, ter zapolnjevanja prostih vezi. Gre za popolnoma naraven in spontan proces (Čebulj, 2007). Hitrost delca določa njegova masa in pa temperatura medija v katerem se delec nahaja. V tekočinah hitrost določa tudi tok tekočine, vendar pa ta vpliva le na večje delce. Manjši kot so delci, večja je njihova termična energija, ki jih sili v gibanje in manj delci ubogajo tokovnice tekočine (Remškar, 2009). Za inženirske nanodelce je aglomeracija nezaželena, saj delci s tem izgubijo svojo funkcionalnost. Aglomeracijo je možno preprečiti na več načinov. Lahko se jih ovije z organskimi polimeri, nabije z dovolj velikim nabojem, se jih shrani v mediju, ki preprečuje aglomeracijo (Čebulj, 2007).

Nekateri nanodelci so zaradi posebnih lastnosti močni adsorbenti. Primer so saje, ki adsorbirajo organske zmesi (Nowack in Bucheli, 2007).

Sposobnost nanodelcev je tudi lebdenje v zraku, saj zaradi termične energije dosegajo hitrosti do več metrov na sekundo in trkajo z molekulami zraka (Remškar, 2009). V zraku lahko ostanejo veliko dlje kot večji delci (Čebulj, 2007).

2.3 UPORABA IN TVEGANJA NANOTEHNOLOGIJE

2.3.1 Nanotehnologija v hrani

Veliko snovi ki jih uporabljamo za hrano, vsebuje nanostrukture. Proteini, ki jih najdemo v naravni hrani, so nanodelci, saj gre za globularne delce v velikosti od 10 do 100 nm. Linearni polisaharadi so debeli manj kot 1 nm. Tudi škrob je sestavljen iz polisaharidov, povezanih v 3-D strukturo, ki je debela nekaj 10 nm (Chau s sod., 2007).

V prehrambeni industriji obeta nanotehnologija lažjo pridelavo bolj kvalitetne hrane. Pomembno je tudi zagotavljanje varne uporabe nanomaterialov v prehrambeni verigi. Hrano, ki je bila pridelana, predelana ali pakirana s pomočjo nanotehnologije, imenujemo nanohrana. Tako hrano že najdemo na prodajnih policah, ne da bi bilo to na izdelkih označeno. Točnega števila takih izdelkov ni mogoče ugotoviti (Remškar, 2009). Daniells (2007) ocenjuje, da je bilo leta 2007 na tržišču 150 do 600 vrst t.i. nanohrane in od 400 do 500 nanotehnoloških embalaž za živila. Nanosrebro se zaradi antibakterijskega učinka uporablja v embalaži za hrano, v hladilnikih, lončkih za otroško hrano in čaj, kuhinjski posodi itd. Nanodelci silicijevega dioksida so dodani polimernim kompozitom, da povečajo njihovo gostoto in preprečijo prepustnost plastike za kisik, ter tako podaljšajo obstojnost hrane. Nanokroglice škroba dodajajo lepilu za embalažo, saj za pripravo zahteva manj vode in krajši čas sušenja kot običajni škrob. Nanodelci železa so dodani visoko energijskim pijačam. Aluminijevi silikati se uporabljajo za preprečitev zlepljenja v procesu predelave hrane v prašni obliki. Nanoprevleke z debelino komaj 5 nm se nanašajo na meso, sire, sadje in zelenjavbo, da zmanjšajo vpliv ozračja in preprečijo izgubo vlage, dajejo živilom barvo, okus, vsebujejo antioksidante, encime, podaljšujejo življensko dobo. Titanov dioksid se zaradi antibakterijske učinkovitosti uporablja kot belilno sredstvo in kot podaljševalec obstojnosti hrane. Dodajajo ga v premaze bonbonov in moko, z njim loščijo sadje, nahaja se v fermentiranem mleku (Remškar, 2009).

Do vstopa nanodelcev v hrano lahko pride tudi med samo predelavo zaradi obrabe orodja in onesnaženosti okolja. Primeri so mletje, rezanje, uporaba posod, iz katerih se izločajo drobni delci materiala, sušenje v dimu (Remškar, 2009).

Kljud temu, da nanotehnologija ponuja mnogo novih možnosti za prehrambno industrijo, lahko vstop industrijskih nanodelcev v prehranjevalno verigo povzroči akumulacijo strupenih snovi, ki bi vplivale tudi na človekovo zdravje (Chau s sod., 2007). S poskusi na podganah so dokazali, da nanosrebro učinkuje na delovanje mitohondrijev in celovitost membrane. Zaznali so tudi močno povečano sproščanje reaktivnih oksidacijskih radikalov. Oksidativni stres je najverjetnejša razloga strupnosti živega srebra, poleg tega pa se srebrovi ioni tudi vežejo s funkcionalnimi -SH skupinami strukturnih proteinov in encimov ter jih tako poškodujejo. Podobno so zaznali tvorbo prostih radikalov tudi pri titanovem oksidu (Remškar, 2009). Da bi preprečili škodljive posledice uporabe nanotehnologije v hrani, je potrebno narediti še veliko raziskav.

2.3.2 Druge aplikacije nanotehnologije

Nanotehnologija se uporablja v različnih panogah. Ena izmed njih je avtomobilska industrija. Mogoče je izdelati premaze, ki varujejo vetrobransko steklo pred praskami. Ti premazi vsebujejo nanodelce, ki so popolnoma prozorni in svetlobe ne razpršijo. Avtolak bi lahko vseboval nanodelce in bi s pomočjo lotosovega efekta odstranjeval umazanijo z odtekanjem. Tudi svetleče diode, ki jih najdemo v zavornih lučeh, imajo prefinjene nanometerske plastne sisteme, ki elektriko spreminjajo v svetlobo (Schulenburg, 2006).

Nanodelci zlata so za razliko od standardnega zlata odličen katalizator. Taki katalizatorji se testirajo kot preprečevalci vonjav (Schulenburg, 2006). Tudi cink in cinkov oksid se uporablja kot katalizatorja, poleg tega pa ju najdemo še v pigmentih, sončnih kremah, kozmetiki in metalurgiji (Remškar, 2009). Nekatere dnevne kreme že vsebujejo nano kroglice iz cinkovega oksida za zaščito pred UV žarki. Kroglice so nevidne, ker so v nanometerskem merilu, zato je krema prozorna (Schulenburg, 2006).

V zobnih pastah se uporablja kroglice v nano velikosti iz apatita, ki z oben pomaga pri obnavljanju (Schulenburg, 2006).

Nanolističi imajo lastnost, da jih je, ko se enkrat prilepijo na podlago, iz nje zelo težko odstraniti. To lastnost so v preteklosti izkoriščali za pozlate, v zadnjem času pa pri novi generaciji maziv, kjer plasti volframovega ali molibdenovega diosulfida tvorijo na površini orodij ali gibljivih komponent tribofilm. Gre za luske omenjenih materialov, ki med procesom trenja pokrijejo površino in hkrati kovino zaščitijo pred korozijo. Sljuda in bizmut imata podoben učinek. Sljuda se uporablja kot dodatek zobnim pastam, bizmutove lističe pa najdemo v ličilih (Remškar, 2009).

Nanodelci silicijevega dioksida so dodatek v gumenih izdelkih, loščilih, papirnih izdelkih, zdravilih in kozmetiki.

Nanodelce najdemo tudi v tekstilni industriji. Najzanimivejše funkcije nanotehnologij v tekstuju so odpornost proti mečkanju, odstranjevanje neprijetnih vonjav, antimikrobnia in zaščitna funkcija. Oblačila se prilagajajo spremembam temperature, ventilirajo telo, zapirajo zrak glede na potenje, ciljno zadržujejo UV žarke (Navodnik, 2007).

Nanotehnologijo bi lahko uporabili tudi v kmetijstvu. Izdelali bi nanokapsule, ki bi bile oblikovane tako, da bi lažje prodrle skozi kutikulo ter počasi in kontrolirano oddajale aktivne sestavine v smeri tarče. Nanokapsulacija kemikalij bi omogočala tudi bolj varno rokovovanje z aktivnimi snovmi za kmetovalce (Nair s sod., 2010).

Nanodelci so izjemno uporabni v onkologiji, zlasti pri slikanju in diagnostiki, saj povečajo kontrast na slikah tumorjev, posnetih z jedrsko magnetno resonanco ali rentgenskim slikanjem. Veliko se obeta tudi od nanodelcev železovega oksida (Remškar, 2009). Gre za magnetne nanodelce, na površino katerih bi lahko selektivno vezali aktivne molekule kot npr. zdravilne učinkovine in antigene. Z uporabo zunanjega magnetnega polja bi lahko z aktivnimi molekulami na nanodelcih manipulirali in detektirali njihov položaj (Pisanic s sod., 2007).

Nanodelci zlata se selektivno vežejo na rakaste celice. Pod vplivom radiofrekvenčnega električnega polja se segregirajo in na ta način lahko uničijo tumorje, medtem ko okoliško tkivo ostane nepoškodovano (Remškar, 2009).

Primerov uporabe je še mnogo. Ker nanomateriali izboljujejo kvaliteto našega življenja se bo njihova uporaba na različnih področjih še močno povečala.

2.3.3 Tveganja nanotehnologije

Da lahko določimo tveganja za zdravje in okolje pri uporabi nanomaterialov, je potrebno najprej poznati fizikalne in kemijske lastnosti nanodelcev. Posledica velike raznovrstnosti in kompleksnosti nanomaterialov je težja kemijska identifikacija in karakterizacija v primerjavi z ostalimi kemikalijami. Lastnosti nanomaterialov, ki vplivajo na usodo okolja, še niso dobro poznane (Drobne, 2007).

Karakteristike nanodelcev v okolju so zelo dinamične. Transport skozi različne plasti zemlje je odvisen od velikosti delca. Raziskave so pokazale, da imajo delci, ki so manjši od 200 nm velik transportni potencial in lahko zelo hitro dosežejo podtalne ali površinske vode. Tudi naboj delca in matriksa, v katerem se delec nahaja, je pomemben. Od njega je namreč odvisno ali bo delec skozi matriks potoval ali se bo vezal nanj (Darlington s sod., 2008).

Problem predstavlja tudi težavna identifikacija nanodelcev v okolju. Obstaja kar nekaj metod za določanje števila, površine in masne koncentracije nanodelcev, vendar pa nobena od njih ni uporabna na terenu (Drobne, 2007). Razvoj detektorjev nanodelcev je trenutno velika razvojna in tržna priložnost (Remškar, 2009).

Za določitev tveganja ob izpostavljenosti človeka in okolja nanodelcem, je potrebno poznati tudi zakonitosti interakcij in sprejema nanodelcev. Zunanji mehanizmi naredijo nanodelce dostopne za absorpcijo ali kakršenkoli drugačen vstop v telo. Od kemijskih lastnosti in narave nanodelca pa je odvisno, kdaj in kateri tarčni organ bo dosegel. Od fizikalno kemijskih lastnosti je odvisna tudi ocena strupenosti nanodelcev (Drobne, 2007). Prenos sintetičnih nanodelcev po prehranjevalni verigi je v veliki meri odvisen od biologije in fiziologije tarčnega organizma (Blinova s sod., 2010).

2.4 VPLIV NANODELCEV NA VIŠJE RASTLINE

Ker se uporaba inženirskih nanodelcev povečuje, je pričakovati, da bodo njihove vplive občutili tudi organizmi. Med njimi so pomembne višje rastline, pri katerih je izmenjava snovi z atmosfero in terestričnim okoljem ključna za njihovo preživetje.

Nanodelci lahko močno vplivajo na biodiverziteto rastlin. Bolj občutljive rastline bodo začele propadati, saj nanodelci zavirajo njihovo rast, cvetenje in tvorbo plodov. Preživele bodo le bolj prilagojene rastline (Monica in Cremonini, 2009). Slednje bi lahko uporabili kot orodje za čiščenje tal, onesnaženih z nanodelci. Taki sta na primer vrsti lucerna (*Medicago sativa*) in rjava ogrščica (*Brassica juncea*), ki lahko akumulirata nanodelce srebra, pri tem pa ostanejo njuna tkiva nepoškodovana (Harris in Bali, 2008).

2.4.1 Transport nanodelcev

Da se nanodelci lahko transportirajo preko stebla v liste, morajo najprej prečiti celično steno in plazemsko membrano korenin, ter vstopiti v ksilem (Navarro s sod., 2008). Celična stena pri rastlinah preprečuje zunanjim delcem (vključno z nanodelci), da bi preprosto prehajali v notranjost celic (Nair, 2010). Delci lahko prehajajo skozi pore, ki so velike od 5 do 20 nm. Raziskovalci so najprej mislili, da lahko vstopijo le agregati nanodelcev, ki so manjši od por. Kasneje so ugotovili, da lahko med delitvijo celic nastanejo celične stene, ki so bolj prepustne za nanodelce, ali pa lahko nanodelci inducirajo nastanek večjih por za vstop večjih agregatov. Preko membrane lahko nanodelci vstopijo z endocitozo, lahko pa za vstop v celico uporabijo ionske kanalčke ali transportne proteine. Ko enkrat nanodelci pridejo v citoplazmo celice, se lahko transportirajo v različne organele kjer vplivajo na metabolne procese. Rezultat teh interakcij so reaktivne kisikove spojine, ki povzročajo oksidativni stres (Navarro s sod., 2008).

Da Silva je s sodelavci (2006) dokazal, da lahko nanodelci vstopijo direktno skozi listno povrhnjico. Vstopajo lahko preko listnih rež ali baze trihomov. V listni sredici nato

vplivajo na transpiracijo, regulacijo temperature, izmenjavo plinov in fotosintezo. Pri povoskanih in gladkih listih je prehod nanodelcev nekoliko manjši.

2.4.2 Pozitivni vplivi nanodelcev na rastline

Večina inženirskih nanodelcev ima antimikrobne lastnosti. Z njimi se lahko poveča odpornost rastline na stres (Navarro s sod., 2008). Po drugi strani pa bi lahko zaradi povečane odpornosti rastlin ogrozili obstoj prostoživečih bakterij, ki fiksirajo zračni dušik in rastlinskih simbiontov. Nanodelci z veliko površino lahko zadržujejo hranila, ki služijo rastlini kot zaloga. Prav tako se lahko nanodelci povežejo z drugimi onesnažili v okolju in jim tako onemogočijo vstop v rastlino (Navarro s sod., 2008).

2.4.3 Negativne posledice nanodelcev na rastline

Večina raziskav je pokazala, da nanodelci negativno vplivajo na rast in razvoj rastlin (Monica in Cremonini, 2009). Pogoste posledice izpostavljenosti rastlin nanodelcem so slabša rast, zmanjšanje biomase in deformacije koreninske čepice (Ma s sod., 2010). Lin in Xing (2007) sta ugotovila, da se inhibicija rasti korenin razlikuje glede na vrsto rastline in vrsto nanodelcev, ter je močno odvisna od njihove koncentracije. Večina nanodelcev mora biti prisotna v zelo velikih koncentracijah, da pridejo do izraza njihovi strupenostni učinki. Tudi privzem in transport nanodelcev po rastlini je odvisen od vrste rastline. Zhu s sod. (2008) so ugotovili, da navadna buča (*Cucurbita maxima*), ki raste v tekočem mediju z magnetnimi nanodelci magnetita (Fe_3O_4), te delce absorbira, jih premika in akumulira v različna tkiva, medtem ko limski fižol (*Phaseolus limensis*) ni sposoben absorpcije in premika magnetnih nanodelcev. Magnetni vpliv imajo na primer železovi nanodelci, ki vplivajo na encimske strukture, vključene v različne faze fotosinteze (Monica in Cremonini, 2009). Na fotosintezno aktivnost pa lahko nanodelci vplivajo tudi posredno. Z njihovo akumulacijo na površini lista rastlini otežijo lovljenje svetlobe. Tudi prehajanje esencialnih hranil je zmanjšano, če agregati nanodelcev zaprejo pore v celični steni (Navarro s sod., 2008).

2.4.4 Oksidativni stres in antioksidanti

Ob interakciji nanodelcev z organizmom ali pa z agensi, ki so prisotni v okolju (UV sevanje) se lahko tvorijo reaktivne kisikove spojine (ROS) (Navarro s sod., 2008). ROS so danes nujno potrebne za pravilno delovanje in preživetje tako eno kot mnogoceličarjev (Kopušar, 2009). V rastlinah nastajajo v kloroplastih med fotosintezo, v mitohondrijih med dihanjem, v mikrotelescih, npr. v peroksisomih med fotorespiracijo. Če so dobro nadzorovane, imajo zelo pomembne funkcije v celici. Nekateri so medcelične signalne molekule, imajo vlogo pri strukturi celične stene in vplivajo na senescenco. Kot signalne molekule lahko aktivirajo obrambne odzive na biotski in abiotiski stres. Pri napadu patogenov omejijo širitev okužbe z ojačanjem celičnih sten ali z neposrednim delovanjem na patogene organizme (Dat s sod., 2000).

Med najpomembnejše reaktivne kisikove spojine sodijo hidroksidni (OH^\cdot) in hidroperoksidni radikal (O_2H^\cdot), superoksidni anion ($\text{O}_2^\cdot-$), vodikov peroksid (H_2O_2), ozon (O_3),... Njihova značilnost je, da izredno hitro reagirajo z drugimi spojinami, in sicer tako, da poskušajo odvzeti elektron, ki ga potrebujejo za stabilnost. Ko določeni spojini, ki ni radikal, odvzamejo elektron, ta sama postane radikal. Sproži se verižna reakcija. Reagirajo lahko tudi s celičnimi komponentami, ki vsebujejo nenasičene maščobne kisline, beljakovine, nukleinske kisline in ogljikove hidrate. Zato te reakcije lahko vodijo do poškodb celice. Dramatično upade rast in produktivnost rastline. Če njihovega škodljivega vpliva rastlina ne zaustavi, sledi smrt (Hegedüs s sod., 2001).

Razlage za njihovo prisotnost v živih bitjih najdemo v evoluciji aerobnega življenja. Prilaganje organizmov na kisik se je začelo pred dvema milijardama let, ko je bilo v zraku prisotnih 10% kisika. To je bilo pogubno za anaerobne organizme. Preživelu so le bitja, ki so začela uporabljala kisik pri svojih normalnih presnovnih procesih. Razviti so morala tudi mehanizme, s katerimi so kompenzirala strupene učinke kisika (Kopušar, 2009). Temeljna zaščita celice je njena strukturalna in funkcionalna integriteta. Bolj specifična zaščita temelji na sposobnostih posameznih encimov, da odstranjujejo proste radikale in druge reaktivne kisikove zvrsti, in na delovanju antioksidantov, ki niso encimi, vendar

preprečujejo, zmanjšujejo in ustavljajo verižne oksidacije sprožene z reaktivnimi kisikovimi spojinami (Šuput in Kamarić, 1998).

Ena od negativnih posledic izpostavljenosti nanodelcem je neravnovesje med oksidanti in antioksidanti v celici, ki lahko vodi do poškodb (Remškar, 2009). Govorimo o oksidativnem stresu. Tega lahko povzroči tudi slabša antioksidativna obramba, ki jo povzroči predolga ali premočna izpostavljenost stresnim dejavnikom (Strlič, 2008).

Ločimo dve vrsti antioksidantov:

- neencimski antioksidanti: askorbat (vitamin C), reducirani glutation (GSH), α -tokoferol (vitamin E), karotenoidi, flavonoidi, ...
- encimski antioksidanti: superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT), peroksidaze (med njimi askorbat peroksidaza (A-POD) in guaiakol peroksidaza (GPOD)), glutation reduktaza (GR), ...

Molekularni kisik se najprej pretvori v superoksidni ion ($O_2^{\cdot-}$). Ker je ta radikal močno reaktiv, ga aerobni organizmi pretvorijo v manj reaktivno obliko, v superokside in H_2O_2 . To storijo s pomočjo encima superoksid dismutaza, ki je prisoten v citosolu, peroksisomih in plastidih (Hegedüs s sod., 2001). Pretvorbo prikazuje enačba 1.



H_2O_2 nato odstranijo katalaze in peroksidaze. Katalaze (CAT) prestrežejo večino H_2O_2 , ki nastane med respiracijo in fotorespiracijo, še preden difundira v druge dele celice in ga pretvorijo v vodo in molekularni kisik. Katalaze se nahajajo v peroksisomih, glioksisomih in mitohondriih (Hegedüs s sod., 2001). Pretvorbo prikazuje enačba 2.



Peroksidaze so encimi, ki so ključni za rast, razvoj in senescenco rastline. Vplivajo na sintezo etilena in lignina, razgradnjo avksina in sodelujejo pri odpornosti na patogene organizme ter celjenju ran. Peroksidaze tudi odstranjujejo H_2O_2 , vendar na bolj specifičnih

mestih kot katalaze, saj imajo zanj višjo afiniteto in lovijo manjše količine peroksida (Dat s sod., 2000). Za to reakcijo potrebujejo encimi različne substrate (donorje elektrona). Askorbat peroksidaza (A-POD) potrebuje kot substrat askorbat. Običajno se nahaja v kloroplastih in citosolu. Guaiakol peroksidaza (G-POD) pa je najpogosteje prisotna v celični steni in za svoje delovanje potrebuje substrat guaiakol (Hegedüs s sod., 2001).

2.5 BAKROV OKSID V STANDARDNI IN NANO OBLIKI

2.5.1 Baker in bakrov oksid

Kovinski ioni se že stoletja uporabljajo za razkuževanje. Grki so baker predpisovali proti pljučnim obolenjem in za čiščenje pitne vode. Kelti so izdelovali viski v bakrenih posodah in tako se izdeluje še danes. V 18. stoletju so baker uporabljali za zdravljenje duševnih in pljučnih bolezni. Prvi ameriški osvajalci so dajali srebrne in bakrene kovance v lesene sode z vodo, da bi s tem ohranjali vodo pitno do konca njihovega potovanja. Podobno so med drugo svetovno vojno japonski vojaki koščke bakra dajali v steklenice za pitno vodo za preprečevanje diareje. Danes se baker uporablja za čiščenje vode, kot algicid, fungicid, zatiralec nematodov in mehkužcev, kot antibakterijsko sredstvo (Gabbay s sod., 2005). Uporabo bakrovih soli kot biocida so v zadnjih letih nekoliko omejili zaradi povečanega onesnaževanja s težkimi kovinami (Aruoja s sod., 2009). Veliko bakra se uporablja v električni industriji. V prehrambeni industriji se uporablja kot prehranski dodatek (Adriano, 2001). Hostynék s sod. (2003) navaja, da je baker človeku dokaj nenevaren, medtem ko Uriu-Adams in Keen (2005) ugotavlja, da baker priomore k razvoju mnogih bolezenskih stanj, vključno z diabetesom in kardiovaskularnimi obolenji. Povečane količine bakra med nosečnostjo povzročajo imunološke in nevrološke abnormalnosti ploda. Kronična zastrupitev z bakrom povzroča bolezni jeter in živčnega sistema tudi pri odraslih.

Za rastline je baker esencialni mikroelement in je nujen za njihovo preživetje (Lee s sod., 2007). Rastline ga potrebujejo le v majhnih količinah (5-20 ppm za normalno rast). V večjih količinah je strupen (Adriano 2001, cit. po Jones 1972). Je sestavni del številnih encimov. Pomanjkanje bakra povzroča motnje v metabolizmu ogljikovih hidratov (fotosinteza, respiracija), metabolizmu dušika (fiksacija N₂, sinteza proteinov), sintezi

celične stene (predvsem sinteza lignina), vodnih razmerjih, tvorbi semen in odpornosti proti boleznim. Vpliva tudi na privzemanje ionov in diferenciacijo rastline v zgodnji razvojni fazи. V splošnem vpliva bolj na zaviranje reproduktivne (tvorba semen in plodov) kot pa vegetativne rasti. Baker v prevelikih količinah zavira rast in razvoj rastlin, povzroča razbarvanje korenin in kloroze na listih, ter zavira razvoj mladik (Adriano, 2001).

Bakrov oksid ima antibakterijski in antivirusni učinek, deluje kot fungicid in uničuje pršice, zato ga uporablajo v tekstilskih vlaknih. Ta vlakna koži ne škodujejo (Borkow in Gabbay, 2004). V uporabi so nogavice, ki vsebujejo 10% vlaken, impregniranih z bakrovim oksidom. Te nogavice so Gabbay in sodelavci (2004) testirali na osebah, ki trpijo za boleznijo tinea pedis (atletsko stopalo). Rezultati so pokazali, da je srbečica, ki spremlja to obolenje izginila po 1-3 dneh nošenja teh nogavic. Okužba je popolnoma izginila po 2-6 dneh nošenja. Z bakrovim oksidom impregnirana vlakna pa se uporablajo tudi v rjuhah. Zaznali so značilno nižjo kolonizacijo bakterij kot na navadnih rjuhah. Če bi v bolnišnicah uporabljali rjuhe, pižame, blazine in druge tekstilne materiale iz vlaken, impregniranih z bakrovim oksidom, bi s tem lahko preprečili širjenje mikroorganizmov (Gabbay s sod., 2005).

2.5.2 Nanodelci bakrovega oksida

Nanodelci bakrovega oksida sodijo med najpomembnejše inženirske nanodelce. Zaradi posebnih optičnih, električnih in katalitičnih lastnosti se intenzivno uporabljajo v elektroniki, keramiki, črnilih, tekstuру in mazivih (Lee s sod., 2007). Nanodelci bakrovega oksida v tekoči obliki imajo veliko toplotno prevodnost, zato so zelo učinkoviti kot tekočine za prenos toplote pri strojih (Chang s sod., 2005). Dutta s sod. (2003) so ugotovili, da so nanodelci bakrovega oksida v inertnem matriksu silicijevega dioksida občutljivi na dušikov dioksid in ogljikov monoksid. Torej jih lahko uporabljam tudi kot plinske senzorje. Nanokristali bakrovega oksida so zelo dobri katalizatorji in delujejo pri nižjih temperaturah kot ostali komercialno dostopni materiali (Carnes in Klabunde, 2003). Topnost nanodelcev bakrovega oksida je 40-krat večja kot topnost standardne oblike bakrovega oksida. Od tega je odvisna tudi strupenost (Blinova s sod., 2010).

Na primeru alge *Pseudokirchneriella subcapitata* je bilo ugotovljeno, da so nanodelci bakrovega oksida veliko bolj strupeni kot pa standardna oblika bakrovega oksida (Aruoja s sod., 2009). Tudi dostopnost bakra iz standardne oblike je bila veliko manjša, saj je bil baker iz nanodelcev bakrovega oksida je bil 141-krat bolj dostopen. Strupenostni učinki obeh oblik bakrovega oksida so v tem primeru posledica dostopnosti bakrovih ionov. Pri nano obliki je bilo po 72 urah dostopnih 25% bakrovih ionov, pri standardni pa le 0,18%. (Aruoja s sod., 2009). Margit Heinlaan je s sodelavci (2008) na primeru bakterije *Vibrio fischeri* dokazala, da za strupenostni učinek ni nujen vstop kovinskih oksidov v celico, ampak je dovolj, da povzročijo spremembe v mikrookolju blizu kontaktnega mesta med organizmom in delcem. Te spremembe lahko vplivajo na topnost kovin ali pa vodijo do nastanka prostih kisikovih radikalov, ki lahko poškodujejo celično membrano (Heinlaan s sod., 2008). Raziskave so bile narejene še na kvasovkah, kjer se je izkazalo, da bakrov oksid vpliva na njihovo rast in na mitetalkarju *Tetrahymena thermophila*. Tudi pri teh raziskavah so bili nanodelci bakrovega oksida bolj strupeni kot standardna oblika (Kasemets s sod., 2009; Mortimer s sod., 2010).

Lee je s sodelavci (2007) dokazal, da imajo nanodelci bakrovega oksida negativen učinek na dolžino semena fižola (*Phaseolus radiatus*) in pšenice (*Triticum aestivum*). Pri pšenici se je izkazalo, da ima nano bakrov oksid večji vpliv na rast korenin kot na rast poganjkov. Pri fižolu so se na izpostavljenih koreninah pojavile nekroze. Raziskovalci predvidevajo, da so poganjki manj poškodovani zaradi manjšega prenosa nanodelcev iz korenin v poganjke. Večja akumulacija bakrovih nanodelcev v koreninah pšenice je posledica večje površine korenin v primerjavi s fižolom, preko katere lahko nanodelci prehajajo. Iz nanodelcev se lahko sprosti bakrov ion. Ker se pri koncentraciji 1000 mg/l bakrovega oksida, ki so ga uporabili pri tej raziskavi, sprosti le 0,3 mg/l bakrovega iona, je to premalo, da bi bilo strupeno za rastline. Strupeni učinki se najverjetneje pojavijo zaradi samih nanodelcev. S transmisijsko elektronsko mikroskopijo so opazovali posamezne in agregirane nanodelce v citoplazmi in celični steni korenin. Vsebnost nanodelcev bakrovega oksida v rastlinah se je povečevala z višanjem koncentracije nanodelcev v rastnem mediju (Lee s sod., 2007).

2.6 SONČNICA

Podobno kot Lee s sodelavci (2008), smo tudi mi v raziskavi za diplomsko delo žeeli odkriti vpliv nanodelcev na rastlino. Za poskusno rastlino pa si nismo izbrali fižola ali pšenice, ampak sončnico.

Gre za enoletnico, ki sodi v družino nebinovk (*Asteraceae*). Latinsko ime za sončnico je *Helianthus annuus* L. Ime izhaja iz grških besed »helios«, kar pomeni sonce in »anthos«, kar pomeni cvetlica. Prihaja iz Severne Amerike, v Evropo pa so jo prinesli v 16. stoletju. Ima močno steblo in spiralno nameščene, široke, jajčaste, hrapave liste s tremi dobro vidnimi žilami. Cveti od julija do septembra (Bianchini in Pantano, 1979). Tisoč do dva tisoč posameznih cvetov je združenih v socvetje, imenovano košek. Gre za glavičasto socvetje, ki ga obdaja skupen ovojek iz številnih ovojkovih listov in predstavlja eno oprševalno enoto (Martinčič s sod., 2007). Barva cvetov je rumena, včasih tudi rdečkasta rumena (Bianchini in Pantano, 1979).



Slika 1: Sončnica (*Helianthus annuus*)

Iz semen pridelujejo sončnično olje, ki se uporablja pri kuhanju, izdelavi margarine in biodizla. Ostali deli rastline se uporabljajo za krmo. Ker stebla vsebujejo veliko vlaken, bi se lahko uporabljala v papirni industriji za pridelavo papirja. Sončnice so primerne tudi za bioremediacijo, saj v tkivih lahko kopičijo velike koncentracije kovin, ne da bi prišlo do poškodb fotosinteznega aparata (KrishnaRaj s sod., 2006). Po katastrofi v Černobilu so jih uporabili za odstranjevanje cezija-137 in stroncija-90 iz tal (Sunflower, 2011).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 PRIPRAVA POSKUSA

Sto semen sončnic smo posejali v substrat Agra-vermikulit (RHP). Semena smo pustili kaliti en teden, nato smo kalice prestavili na hidroponiko, kjer so rasle v hranilni raztopini z naslednjo sestavo (Machils in Torrey, 1956):

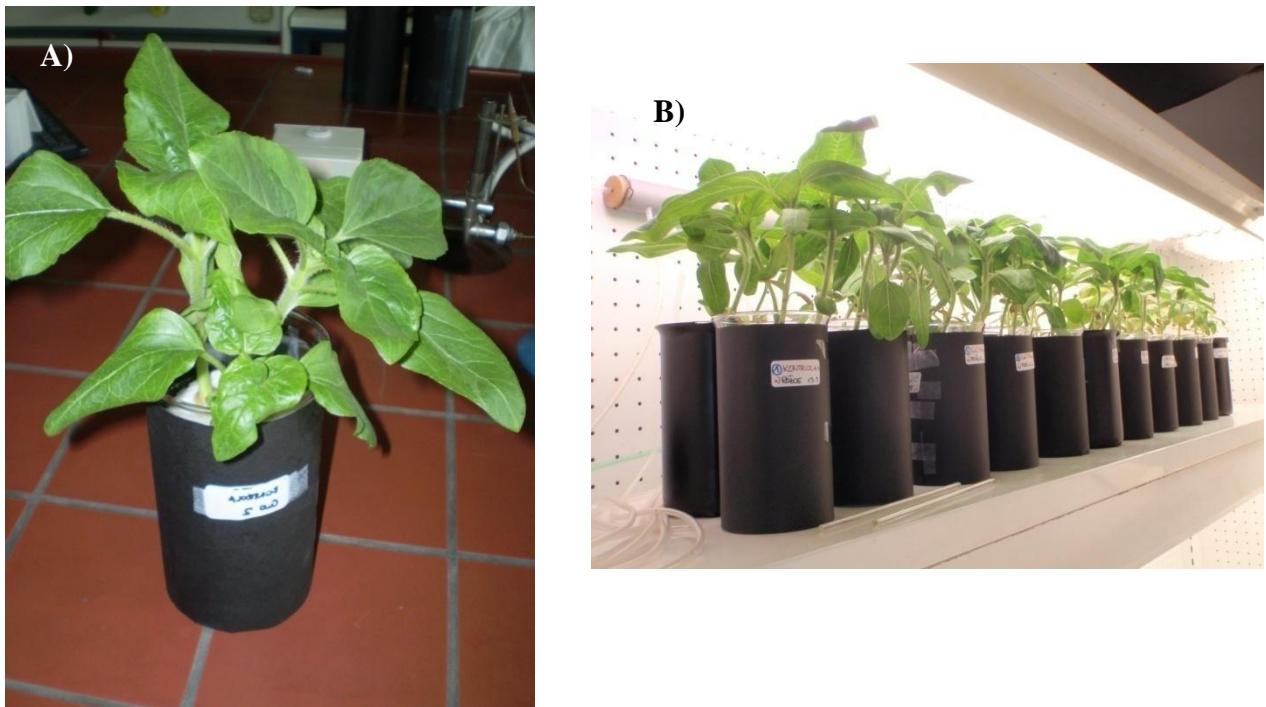
- 3,1 mM Ca(NO₃)₂,
- 3,1 mM KNO₃,
- 0,6 mM MgSO₄,
- 0,6 mM KH₂PO₄,
- 0,1 mM FeNaEDTA,
- 0,6 mM NaNO₃
- 0,3 mM MgCl₂
- 0,6 mM Na₂SO₄
- 0,6 mM NaH₂PO₄
- 0,6 mM CaCl₂
- 0,6 mM KCl
- 800 ml destilirane vode

Po tri sončnice smo vstavili v en stiroporni plovec in ga položili na čaše, ki so bile do 800 ml napolnjene s hranilno raztopino. Skupaj smo imeli 22 čaš (po dve časi na tretma). Rastline smo gojili v rastnih komorah pri temperaturi 26°C in 60% relativni zračni vlagi in sicer prvih 14 dni samo na hranilni raztopini. Raztopino smo vsak dan mešali in ji dodajali destilirano vodo, da je bila koncentracija hranil nespremenjena. Hranilno raztopino smo menjali 1x tedensko. Po 14 dneh smo pričeli s tretiranjem in sicer v 2 časi nismo dodali bakrovega oksida (kontrola). V ostale čaše smo dodali bakrov (II) oksid (CuO) v nano (Aldrich chemistry, USA) ali pa v standardni obliki (Sigma Aldrich, Germany). Koncentracije CuO v raztopinah so bile 1 mg/l, 10 mg/l, 50 mg/l, 100 mg/l in 150 mg/l. Vsako koncentracijo smo pripravili v dveh paralelkah (imeli smo po dve časi za vsak tertma). Čaše z rastlinami smo ponovno postavili v rastno komoro. Raztopine smo menjali tedensko. Po treh tednih smo s tretiranjem zaključili.

Bakrov (II) oksid v standardni obliki, ki smo ga pri poskusu uporabili, je imel na embalaži zabeležene naslednje nečistoče:

- Co in Mn ($\leq 0,001$)
- V HCl netopne snovi in totalni N ($\leq 0,02\%$)
- SO₄ ($\leq 0,03$)
- Cl, Cr, K, Ni in Zn ($\leq 0,05$)
- Cd in Mg ($\leq 0,01$)
- Na, Fe in Pb ($\leq 0,05$)

Na embalaži bakrovega (II) oksida v nano obliki nečistoč ni bilo zabeleženih.



Slika 2: A - Tri sončnice, vstavljeni v stiroporni plovec, ki je položen na časo s hranilno raztopino in
B - rastline v rastni komori.

3.2 KARAKTERIZACIJA BAKROVEGA OKSIDA V NANO IN STANDARDNI KEMIJSKI OBLIKI

3.2.1 Dokazovanje bakrovega iona v raztopini CuO

Koncentracije bakrovega (Cu^{2+}) iona v hranilni raztopini smo določili fotometrično. Umeritveno krivuljo smo pripravili tako, da smo 0,05 M bakrov (II) sulfat ($CuSO_4$) (založna raztopina) razredčili v testnih epruvetah z destilirano vodo tako, da smo dobili 7 različnih koncentracij (1, 5, 10, 50, 100, 150 in 500 mg/l). Iz vsake razredčine smo vzeli 5 ml vzorca in mu dodali 2 kapljice koncentriranega amonijaka. Na spektrofotometru 8452A (HP-Hewlett Packard) smo izmerili absorbcojo pri 600 nm in določili vsebnost $Cu(NH_3)_4^{2+}$ ionov v vsakem vzorcu po enačbi 3 (Brooks, 2011).

$$c(Cu(NH_3)_4^{2+}) = V(CuSO_4)/10 \text{ ml} \times c(CuSO_4) \quad \dots(3)$$

Za umeritev spektrofotometra smo uporabili destilirano vodo z dodanim amoniakom. Iz povprečnih vrednosti dobljenih absorpcij smo za vsak vzorec izračunali spektralno prepustnost po enačbi 4 (Transmittance, 2011).

Naše testne raztopine so vsebovale CuO v nano in standardni obliki. Koncentracije CuO v raztopinah so bile 1, 10, 50, 100 in 150 mg/l. Ko smo raztopine pripravili, smo jih prefiltrirali skozi filtrirni papir. Vzeli smo po 5 ml vzorca iz vsake raztopine. Vsakemu vzorcu smo dodali po dve kapljici koncentriranega amonijaka in izmerili absorbcojo pri 600 nm. Iz povprečnih vrednosti dobljenih absorpcij, smo izračunali spektralno prepustnost po enačbi 4, ki smo jo nato primerjali s spektralno prepustnostjo raztopin $CuSO_4$. Vsebnost Cu^{2+} iona, je bila enaka vsebnosti $Cu(NH_3)_4^{2+}$ v raztopini $CuSO_4$ z enako spektralno prepustnostjo.

$$T = 10^{-A_{600}} \quad \dots(4)$$

3.2.2 Analiza bakrovega oksida z rentgensko fluorescenčno spektroskopijo

Iz CuO v bakrovi in standardni kemijski obliki smo pripravili tabletke in jih pomerili z rentgensko fluorescenčno spektrometrijo, da bi preverili vsebnosti primesi elementov, ki bi lahko potencialno vplivali na mineralno sestavo testnih rastlin. Tabletke smo vzbujali z radioizotopoma Fe-55, da bi določili lahke elemente (Mg, Al, Si, P, S, Cl, K, Ca in Ti) ter z radioizotopom Cd-109, da bi določili težje elemente (Cr, Mn, Cu, Fe, Zn, Pb, Rb, Sr in Mo).

3.3 PRIPRAVA RASTLIN ZA MORFOLOŠKE MERITVE

Sončnice smo vzeli iz raztopine in si zapisali spremembe barve, oblike in dolžine, ki smo jih opazili na listih in koreninah. Ločili smo poganjke od korenin in jih stehtali. Nato smo korenine in poganjke sprali z navadno in kasneje še z destilirano vodo, jih zavili v aluminijasto folijo in zamrznili v tekočem dušiku. Tako pripravljenе rastline smo sušili v liofilizerju (Christ alpha 2-4). Ker kapljevina pri liofiliziranju prehaja neposredno iz trdnega v plinsko stanje so mehanske poškodbe sušenja (npr. tkiv) minimalne, hkrati pa so posušeni biološki preparati biokemijsko obstojni, kar omogoča nadaljnje kvantitativne biokemijske analize npr. fotosinteze pigmenta. Po končanem sušenju smo stehtali suho maso rastlinskih organov.

3.4 PRIPRAVA VZORCEV ZA MERJENJE FOTOSINTEZNIH PIGMENTOV

Posušene poganjke smo s pomočjo tekočega dušika uprašili v terilnici. V očiščene centrifugirke smo zatehtali po 30 mg poganjkov. V vsako centrifugirko z vzorcem smo dodali po 5 ml 80% acetona in vsebino premešali z vorteksiranjem. Centrifugirke smo nato pokrili z aluminijasto folijo in jih čez noč postavili v hladilnik. Naslednji dan smo vzorce ponovno premešali in jih 3 minute centrifugirali na 2500 obratih pri sobni temperaturi. Nato smo na spektrofotometru 8452A (HP-Hewlett Packard) izmerili absorpcijo pri valovnih dolžinah 470 nm, 647 nm in 664 nm. Za umeritev spektrofotometra smo uporabili aceton. Iz dobljenih absorpcij smo preračunali koncentracije pigmentov v $\mu\text{mol/l}$ po enačbi

5 za klorofil a, 6 za klorofil b in 7 za karotenoide. Pretvorbo v enote mg/g smo naredili po enačbi 8 (Graan in Ort, 1984).

$$chl_a (\mu\text{mol/l}) = 13,19 \times A_{664} - 2,57 \times A_{647} \quad \dots(5)$$

$$chl_b (\mu\text{mol/l}) = 22,10 \times A_{647} - 5,26 \times A_{664} \quad \dots(6)$$

$$\Sigma kar (\mu\text{mol/l}) = \frac{1000 \times A_{470} - 1,82 \times chl_a - 85,02 \times chl_b}{198} \quad \dots(7)$$

$$X = \frac{conc\ pigmenta \times V_{ekstrakta}}{m_{poganjkov} \times 1000} \quad \dots(8)$$

3.5 DOLOČANJE KONCENTRACIJ ELEMENTOV V POGANJKIH IN KORENINAH SONČNIC

Meritve koncentracij elementov v poganjkih in koreninah sončnic so bile opravljena na Institutu Jožef Stefan na Oddelku za fiziko nizkih in srednjih energij (F2) s pomočjo rentgensko fluorescenčne spektrometrije s popolnim odbojem (TXRF).

3.5.1 Priprava vzorca

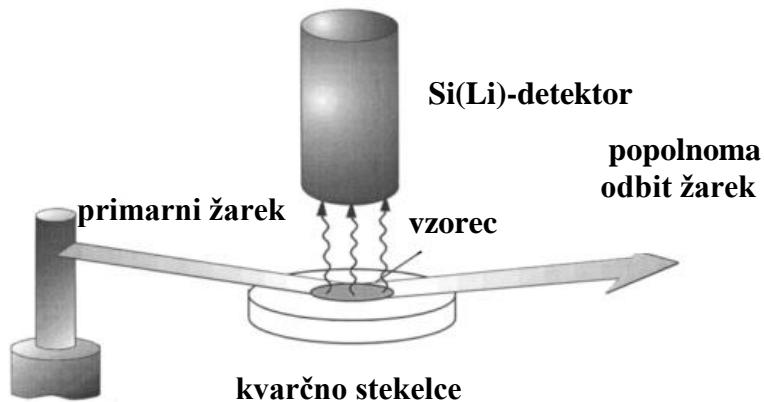
V epruvete smo zatehtali po 100 mg vzorca korenin in poganjkov, ki smo ga predhodno s pomočjo tekočega dušika uprašili v terilnici. V vsako epruveto z vzorcem smo odpipetirali po 5 ml kislinske mešanice za mineralizacijo, ki smo jo pripravili iz koncentrirane HNO_3 in HClO_4 (Merck) v razmerju 7:1. Vzorce smo čez noč pustili v digestoriju, da se je rastlinski material dobro prepolnil z mešanicami kislin. Naslednji dan smo pričeli z mineralizacijo, ki je potekala v digestoriju. Epruvete so bile nameščene v termoblok, ki smo ga postopno segrevali do 150 °C, dokler kislinska mešanica ni popolnoma izparela. Postopek je trajal približno en teden. Paziti smo morali, da kislina ne prekorači roba epruvete. Po končani mineralizaciji smo epruvete z vzorcem pokrili in jih hranili v hladilniku. Tik pred merjenjem smo vzorce z razklopljenim materialom raztopili v 5 ml

0,2% HNO₃ in jih zvorteksirali. Iz vsake epruvete smo odpipetirali po 1 ml vzorca in ga prenesli v novo epruveto. V novo epruveto z vzorcem smo dodali po 10 µl galija (interni standard) in zvorteksirali. Za natančno analizo je bilo zelo pomembno, da je bil interni standard enakomerno pomešan z vzorcem in da je bil vzorec homogen. Odpipetitarali smo 10 µl mešanice in jo nanesli na sredino kvarčnega stekelca. Stekelce smo nato prestavili v eksikator in počakali, da se vzorec na njem posuši.

Ker se posamezno kvarčno stekelce uporabi večkrat, smo ga morali pred nanosom svežega vzorca očistiti. Najprej smo stekelca sprali z detergentom (Kemex) pod tekočo vodo, nato pa še z 0,2% HNO₃. Sledilo je spiranje z destilirano vodo in acetonom. Preden smo nanje nanesli vzorce, smo jih obrisali do suhega.

3.5.2 Rentgensko fluorescenčna spektrometrija s popolnim odbojem

Rentgensko fluorescenčna spektrometrija s popolnim odbojem (TXRF) je izredno občutljiva tehnika za analizo elementov v sledeh v majhnih vzorcih, ki se nanesejo na gladko ravno podlago iz primerne snovi, imenovano reflektor. Rentgenski curek je močno fokusiran in pada na optično gladko podlago pod kotom v območju kritičnega kota za popolni odboj. Velikost kritičnega kota za popolni odboj je izredno majhna (manj kot 0,1°), kar pri večini snovi pomeni, da je vpadni rentgenski curek skoraj vzporeden s površino reflektorja. Če vpadni kot preseže kritičnega, pogoj totalnega odboja ni več izpolnjen. Reflektivnost naenkrat pade in rentgenski žarki začno prodirati v snov (Kump, 1994). Popolni odboj pomeni, da se žarek odbije z intenziteto skoraj 100%, za razliko od navadne rentgensko fluorescenčne spektrometrije (XRF), kjer je odboj manjši od 0,1% (Klockenkämper in Bohlem, 2001).



Slika 3: Shematski prikaz principa delovanja TXRF metode (Klockenkämper in Bohlem, 2001: 2006).

TXRF se uporablja za rutinsko analizo elementov v različnih vzorcih iz okolja. Pri tankoplastnih in večplastnih strukturah, ki so enakomerno nanešene na podlago, pride do interference med lomljenimi vhodnimi in odbitimi žarki na mejah zaporednih plasti in na reflektorju. Ta pojav omogoča selektivne meritve elementov, ki te plasti sestavljajo (Kump, 1994).

Eksperimentalni sistem na IJS je sestavljen iz rentgenske cevi (AEG, Nemčija) kot izvora rentgenskega sevanja, totalno-refleksijskega modula, ki omogoča pravilno oblikovanje žarkovne linije rentgenskih žarkov, in rentgenskega spektrometra s Si (Li) detektorjem (Princeton Gamma Tech Co, ZDA, FWHM). Za napajanje rentgenske cevi se uporablja generator Philips PW-1010/80 z močjo 1000 W, možnostjo nastavitev napetosti med 10 in 54 kV in toka 6-36 mA. Za vzbujanje vzorca uporabljajo Mo difrakcijsko rentgensko cev (Rich. Seifert & Co.) s finim fokusom $0,4 \times 8 \text{ mm}^2$, ki se napaja z napetostjo 40 kV (Nečemer, 1995). Visoko ločljivostni rentgenski spektrometer s polprevodniškim Si (Li) detektorjem sestavljajo še visokonapetostni izvir, ojačevalnik, analogno-digitalni pretvornik (ADC) in večkratni analizator. Vse enote so združene v integriranem signalnem procesorju M 1520 in MCA računalniški kartici S100 (Canberra, ZDA) (Kump, 1994; Pongrac, 2004).

3.5.2.1 Potek meritve

Curek rentgenskih žarkov smo usmerili na reflektor pod kotom, manjšim od kritičnega kota za totalni odboj, detektor pa približali reflektorju na manj kot 1 mm razdalje. Vzorcu smo že ob pripravi dodali znano količino (10 µl) internega standarda, ki je bil v našem primeru galij. Z uporabo ustrezne meritve smo izračunali koncentracije ostalih elementov glede na interni standard. Analizo spektrov smo izvedli s programom AXIL, kvantitativno analizo pa s programom QUAES (Pongrac, 2004).

3.6 PRIPRAVA RASTLINSKEGA MATERIALA ZA MERJENJE KONCENTRACIJE PROTEINOV IN AKTIVNOSTI ANTIOKSIDATIVNIH ENCIMOV

Za analizo koncentracije proteinov in aktivnosti encimov smo rastline na novo vzgojili. Postopek je bil enak kot pri prvem poskusu (glej poglavje 3.1), le da smo imeli poleg kontrole samo dve koncentraciji CuO v nano in standardni obliki in sicer 10 mg/l in 100 mg/l. Skupaj smo imeli 6 čaš in 18 rastlin.

Po končanem tretiranju smo polovico korenin in po tri liste vsake rastline zamrznili v tekočem dušiku in jih shranili na -80°C. Pred začetkom poskusa smo zatehtali po 100 mg zmrznenega vzorca in ga s pomočjo tekočega dušika uprašili v terilnici. Sledila je ekstrakcija v 2 ml kalij-fosfatnega pufra s pH 7,0. Ekstrahiran vzorec smo takoj prelili v epice in ga postavili na led. Po 15 minutnem centrifugiraju pri 4°C in 14 000 obratih, smo supernatant (proteinski ekstrakt) odpipetirali v nove primerno označene epice in ga uporabili za merjenje koncentracije proteinov in encimske aktivnosti.

3.6.1 Priprava 100 mM kalij–fosfatnega pufra

Iz predhodno pripravljenih 100 mM založnih raztopin K_2HPO_4 (raztopina A) in KH_2PO_4 (raztopina B) smo pripravili 100 mM kalij-fosfatni pufer za ekstrakcijo in meritve encimske aktivnosti. Pripravili smo ga tako, da smo zmešali 61,5 ml raztopine A in 38,5 ml raztopine B.

Raztopina A je bil 100 mM K₂HPO₄ (Acros organics). Pripravili smo jo tako, da smo 8,71 g soli raztopili v 500 ml destilirane vode.

Raztopina B je bil 100 mM KH₂PO₄ (Sigma Aldrich). Pripravili smo jo tako, da smo 6,805 g soli raztopili v 500 ml destilirane vode.

Pufer smo hranili v hladilniku pri temperaturi 4 °C.

3.7 MERJENJE KONCENTRACIJE PROTEINOV V VZORCIH

Koncentracijo proteinov v vzorcu smo določili fotometrično s kompletom BCA za določanje koncentracije proteinov (BCATM Protein AssayKit, Pierce, ZDA).

Najprej smo zmešali reagenta A in B v razmerju 1:50 V našem primeru smo vzeli 20 µl reagenta A in 400 µl reagenta B. Nato smo v 1,5 ml epice odpipetirali 50 µl proteinskega ekstrakta in 1 ml mešanice reagentov A in B. Epice z vzorci smo postavili v vodno kopel in jih 30 minut inkubirali pri 37 °C. Po koncu inkubacije smo s spektrofotometrom 8452A (HP-Hewlett Packard) izmerili absorbcojo raztopine pri valovni dolžini 562 nm. Vzorce smo morali pomeriti najkasneje 10 minut po inkubaciji.

S pomočjo predhodno narejene umeritvene krivulje, smo iz dobljene absorbcoje izračunali koncentracijo proteinov v vzorcu (programska oprema UV Probe version 2.32, Chimatzu corporation). Kot standard za umeritveno krivuljo smo uporabili goveji serumski albumin. Podatek o koncentraciji proteinov v vzorcu smo kasneje potrebovali za izračun specifične encimske aktivnosti (SEA) posameznega encima. Ta je definirana kot aktivnost encima (EA) glede na količino vseh proteinov v vzorcu. S pomočjo teh podatkov smo lahko med seboj primerjali aktivnosti različnih encimov.

3.8 MERJENJE AKTIVNOSTI ANTIOKSIDATIVNIH ENCIMOV

Za vsak encim smo opravili eno meritev posameznega vzorca. Med vsakim merjenjem smo merili tudi EA testne mešanice, ki ni vsebovala vzorca. S tem smo kontrolirali kvaliteto meritev. Namesto vzorca smo dali v testno mešanico toliko več pufra.

3.8.1 Merjenje encimske aktivnosti katalaze (CAT, EC 1.11.1.6)

EA katalaze smo določili fotometrično z merjenjem absorbkcije pri 240 nm. Uporabili smo kvarčne kivete, ki prepuščajo UV svetlobo.

Reagenčno raztopino smo pripravili tako, da smo zmešali 50 ml 50 mM kalij–fosfatnega pufra s pH 7 in 39 µl 30% H₂O₂ (Sigma Aldrich). Pred meritvami EA smo raztopino segreli na sobno temperaturo. Ker je H₂O₂ občutljiv na svetlobo smo stekleničko zavili v Al-folijo.

Testno raztopino smo pripravili v kivetih. Zamešali smo jo iz 900 µl reagenčne raztopine in 100 µl proteinskega ekstrakta (pripravili smo ga po postopku opisanem v poglavju 3.5). S pipeto smo testno raztopino temeljito premešali. Preden smo začeli z merjenjem absorbkcije smo vzorec v kiveti pustili stati pol minute.

Test je temeljil na upadu absorbkcije pri 240 nm. Upad je bil posledica katalazne aktivnosti. Katalaza je razgrajevala H₂O₂. Aktivnost smo merili pri 240 nm eno minuto z odčitkom na 5 sekund. Iz dobljenih absorbkcij smo izračunali encimsko aktivnost po enačbi 9 (Strlič, 2008).

$$\Delta c = \frac{\Delta A/min}{\epsilon \times l} \quad \dots(9)$$

ΔA = spremembra absorbkcije

l = debelina kivete = 1 cm

ϵ = ekstinkcijski koeficient H₂O₂ pri 240 nm = 0,04/µM x cm

3.8.2 Merjenje encimske aktivnosti askorbat peroksidaze (A-POD, EC 1.11.1.11)

EA A-POD smo določili fotometrično z merjenjem absorbkcije pri 290 nm. Uporabili smo kvarčne kivete, ki prepuščajo UV svetlobo.

Reagenčno raztopino smo pripravili tako, da smo zmešali 49,5 ml 50 mM kalij–fosfatnega pufra s pH 7, 39 µl 30% H₂O₂ in 0,5 ml 10 mM Na-askorbata (Acros organics). Pred meritvami EA smo mešanico segreli na sobno temperaturo. Ker je H₂O₂ občutljiv na svetlobo smo stekleničko zavili v Al-folio.

10 mM Na-askorbat smo pripravili tako, da smo 10 mg soli raztopili v 10 ml destilirane vode.

Testno raztopino smo pripravili v kiveti. Zamešali smo jo iz 800 µl reagenčne raztopine in 200 µl proteinskega ekstrakta (pripravili smo ga po postopku opisanem v poglavju 3.5). S pipeto smo testno raztopino temeljito premešali.

Test je temeljil na upadu absorbkcije pri 290 nm. Upad je bil posledica delovanja A-POD, ki je povzročilo oksidacijo askorbata. Aktivnost smo merili pri 290 nm eno minuto z odčitkom na 5 sekund. Iz dobljenih absorbkcij smo izračunali encimsko aktivnost po enačbi 9 (Strlič, 2008). Pri izračunu smo upoštevali, da je ekstinkcijski koeficient askorbata pri 290 nm 0,0028/µM x cm.

3.8.3 Merjenje encimske aktivnosti guaiakol peroksidaze (G-POD, EC 1.11.1.7)

EA G-POD smo določili fotometrično z merjenjem absorbkcije pri 470 nm. Uporabili smo polistirenske kivete za enkratno uporabo.

Reagenčno raztopino smo pripravili tako, da smo zmešali 49,5 mL 50 mM kalij–fosfatnega pufra s pH 7, 39 µl 30% H₂O₂ in 0,5 ml guaiakola (Sigma Aldrich). Pred meritvami EA

smo mešanico segreli na sobno temperaturo. Ker je H₂O₂ občutljiv na svetlobo smo stekleničko zavili v Al-folijo.

Testno raztopino smo pripravili v kiveti. Zamešali smo jo iz 900 µl reagenčne raztopine in 100 µl proteinskega ekstrakta (pripravili smo ga po postopku opisanem v poglavju 3.5). S pipeto smo testno raztopino temeljito premešali.

Test je temeljil na naraščanju absorbcijske pri 470 nm. Naraščanje je bilo posledica delovanja G-POD, ki je povzročilo polimerizacijo guaiakola v tetraguaiakol. Aktivnost smo merili pri 470 nm eno minuto z odčitkom na 5 sekund. Iz dobljenih absorbcijskih smo izračunali encimsko aktivnost po enačbi 9 (Strlič, 2008). Pri izračunu smo upoštevali, da je ekstinkcijski koeficient tetraguaiakola pri 470 nm 0,0266/µM x cm.

3.9 STATISTIČNA ANALIZA

Podatke smo analizirali s standardnimi statističnimi metodami. Pri tem smo uporabili MS Excel 2007 in programska kompleta Statistica (Statsoft 7.0.61.0 EN) ter GraphPad Prism. Za izračun statistično značilnih razlik smo uporabili program enosmerna ANOVA, Duncanov test, p<0,05. Faktorske analize variance smo izračunali s programom Faktorska ANOVA, p<0,05. Med posameznimi izmerjenimi parametri smo določali tudi koreacijske povezave, pri čemer smo uporabili Spearmanov koreacijski koeficient, p<0,05.

4 REZULTATI

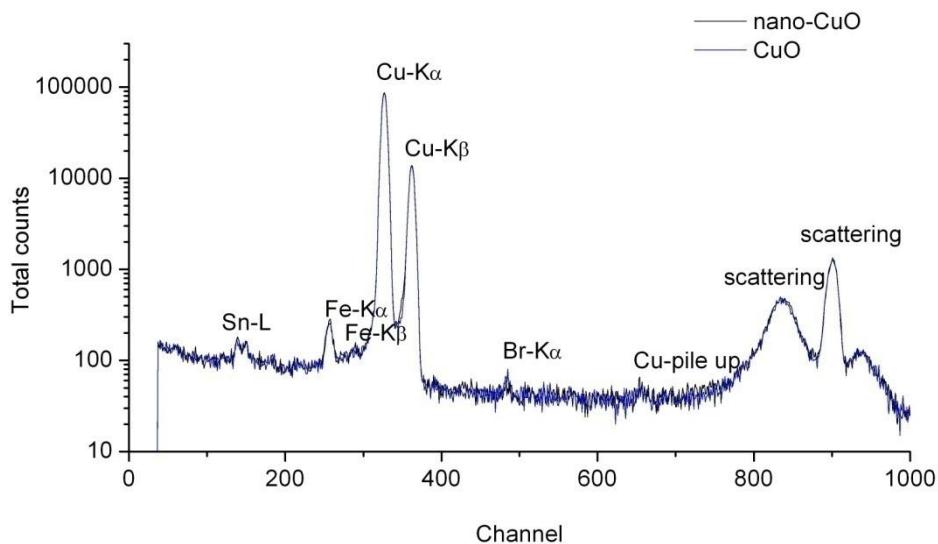
4.1 KARAKTERIZACIJA BAKROVEGA OKSIDA V NANO IN STANDARDNI KEMIJSKI OBLIKI

Tako v nano kot v standardni kemijski obliki CuO, so bile po vzbujanju vzorcev CuO z radioizotopskim izvorom Cd-109, poleg Cu, ki je glavna komponenta CuO, v obeh spojinah opazne sledi kositra, železa in bromma (slika 4).

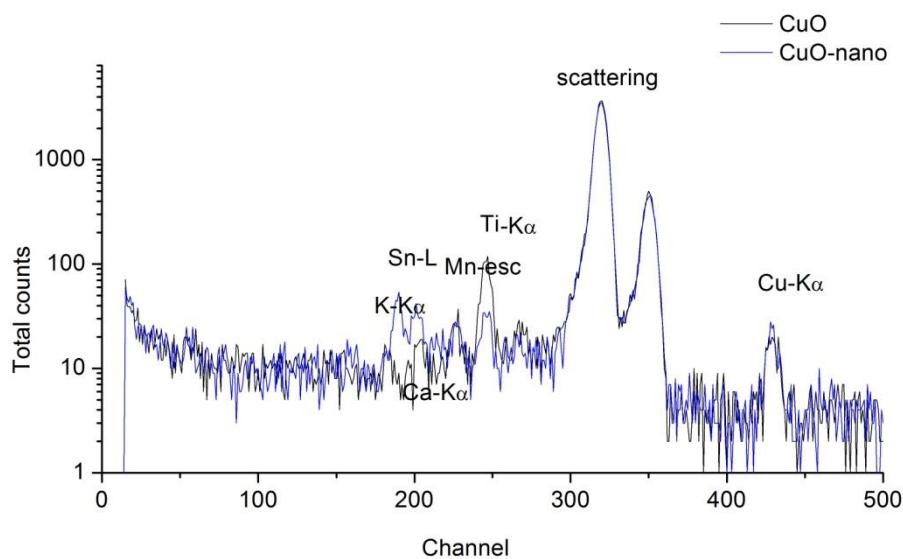
Ko smo vzorce CuO vzbujali z radioizotopskim izvorom Fe-55, smo opzili v standardni kemijski obliki CuO poleg železa in bromma, še titan, kalcij in kalij, v nano obliki CuO pa titan, kalcij in kositer (slika 5).

Tabela 1: Koncentracije nečistoč v standardni kemijski obliki in nano obliki CuO.

Nečistoče	Koncentracija (ppm) pri standardni kemijski obliki CuO	Koncentracija (ppm) pri nano obliki CuO
K	770	0
Ca	600	1700
Ti	3240	750
Fe	230	795
Br	230	1020
Sn	0	9230



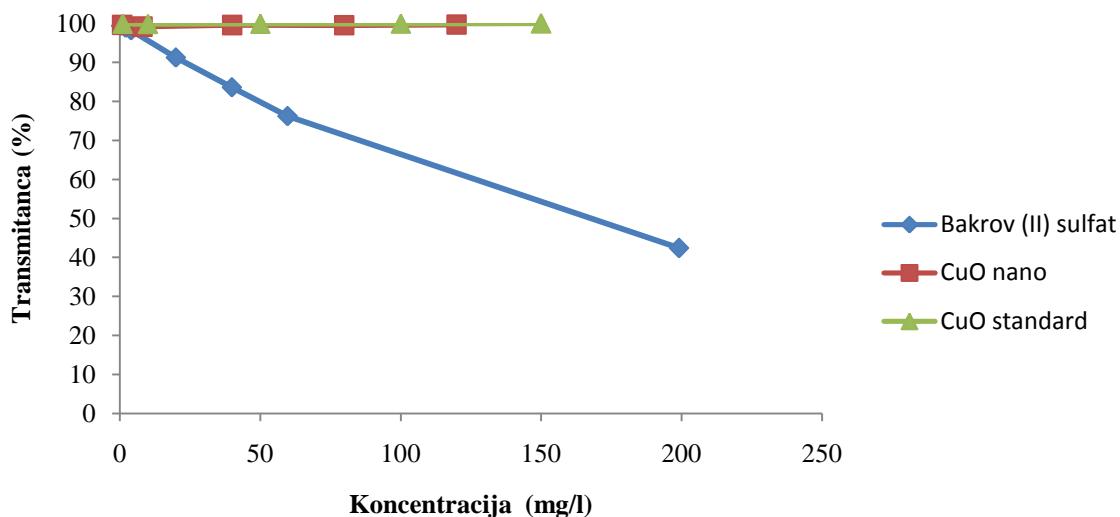
Slika 4: Rentgensko fluorescenčni spekter posnet po vzbujanju vzorcev CuO v nano in standardni kemijski obliki z radioizotopskim izvorom Cd-109.



Slika 5: Rentgensko fluorescenčni spekter posnet po vzbujanju vzorcev CuO v nano in standardni kemijski obliki z radioizotopskim izvorom Fe-55.

4.2 VSEBNOST BAKROVEGA IONA V RAZTOPINAH BAKROVEGA OKSIDA

Vrednosti transmitanc v vseh koncentracijah raztopin CuO, tako nano kot standardne oblike, so bile višje od 99%, medtem ko je vrednost transmitance pri bakrovem (II) sulfatu z zviševanjem koncentracije padala (slika 6).



Slika 6: Vrednosti transmitanc v raztopinah bakrovega (II) sulfata, bakrovega oksida v nano in v standardni obliki. Prikazane so povprečne vrednosti ($N = 7$).

4.3 MORFOLOŠKE SPREMEMBE

Spremembe na koreninah in poganjkih različno tretiranih rastlin so bile vidne že na prvi pogled. Pri kontrolnih rastlinah so bili poganjki nepoškodovani, korenine pa dolge in močno razvezjane. Rastline, ki so rasle v raztopini s koncentracijo 1 mg/l CuO v standardni in nano oblikih (slika 7) in 10 mg/l CuO v standardni oblikih (slika 8), so bile zelo podobne kontrolnim. Pri rastlinah, tretiranih z 10 mg/l nano CuO pa so bile korenine rahlo temno obarvane in manj razvezjane (slika 8). Pojavile so se tudi kloroze na spodnjih listih.



Slika 7: Primerjava kontrolne rastline z rastlino, ki je rasla v raztopini s koncentracijo 1 mg/l CuO v standardni in nano obliki.



Slika 8: A - Primerjava kontrolne rastline z rastlino, ki je rasla v raztopini s koncentracijo 10 mg/l CuO v standardni in nano obliki. B – Pojav kloroz na listih.

Pri rastlinah, tretiranih s 50 mg/l CuO v nano obliki, so bile korenine krajše, manj razvejane in močno temno obarvane. Tudi poganjki so bili krajiši. Na listih so se pojavile nekroze. Pri rastlinah, tretiranih s 50 mg/l CuO v standardni obliki, je prišlo do krajšanja in rahle temne obarvanosti korenin, na listih pa so se pojavile kloroze (slika 9).



Slika 9: A - Primerjava kontrolne rastline z rastlino, ki je rasla v raztopini s koncentracijo 50 mg/l CuO v standardni in nano obliki. B – Pojav nekroz na listih.

Rastline tretirane s 100 mg/l CuO v nano oblikah so imele popolnoma črne, tanke in skoraj nerazvejane korenine. Poganjki so bili veliko krajši od kontrole, na listih pa so bile prisotne nekroze. Pri rastlinah, tretiranih s 100 mg/l CuO v standardni oblikah so se korenine rahlo temno obarvale in bile v primerjavi s kontrolo krajše. Prišlo je do deformacije listov in pojava nekroz (slika 10).



Slika 10: A - Primerjava kontrolne rastline z rastlino, ki je rasla v raztopini s koncentracijo 100 mg/l CuO v standardni in nano oblikah. B – Deformacije listov.

Pri rastlinah, tretiranih s 150 mg/l CuO v nano obliki, so bile korenine črne in brez stranskih korenin, skoraj vsi listi so se posušili. Rastline so bile zelo majhne. Rastline, tretirane s 150 mg/l CuO v standardni obliki, so imele višino poganjkov podobno kot kontrolne rastline, korenine pa so bile krajše, rahlo črno obarvane in bolj zbitne (slika 11). Na listih so se pojavile kloroze.



Slika 11: Primerjava kontrolne rastline z rastlino, ki je rasla v raztopini s koncentracijo 150 mg/l CuO v standardni in nano oblik.

4.3.1 Biomasa rastlin

Faktorska analiza variance je pokazala, da je na suho biomaso korenin in poganjkov vplivala oblika CuO (tabela 2). Rastline, ki so rasle v raztopini z nano CuO, so imele nižjo biomaso, kot rastline, ki so rasle v raztopini s standardno obliko CuO (priloga A,B). Tudi pri koreninah je faktorska analiza pokazala negativen vpliv koncentracije in kombinacije koncentracije in oblike (tabela 2a, priloga A).

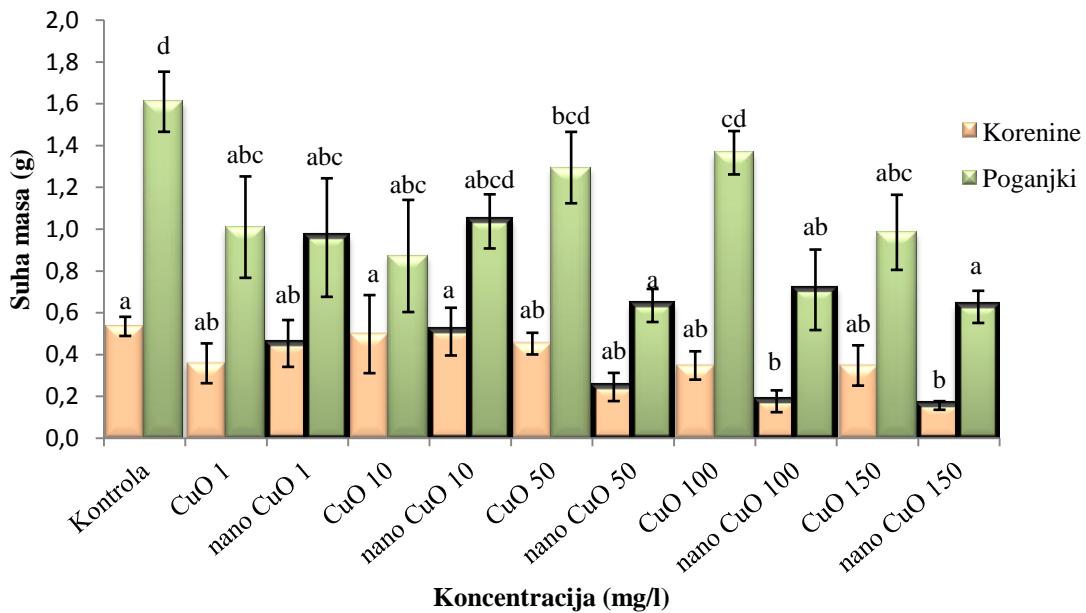
Tabela 2: Rezultati faktorske analize za biomaso korenin (a.) in poganjkov (b.), ki smo jo opravili s programom Faktorska ANOVA. Rdeča barva prikazuje statistično značilne vplive.

a.)	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Koncentracija (mg/l)	0,48	4	0,12	5,76	0,0013
Oblika CuO	0,11	1	0,11	5,41	0,0263
Koncentracija (mg/l)*Oblika CuO	0,23	4	0,06	2,76	0,0440
Napaka	0,69	33	0,02		

b.)	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Koncentracija (mg/l)	0,29	4	0,07	0,44	0,7769
Oblika CuO	1,11	1	1,11	6,68	0,0138
Koncentracija (mg/l)*Oblika CuO	1,22	4	0,31	1,85	0,1407
Napaka	6,15	37	0,17		

Biomasa poganjkov je bila večja od biomase korenin (slika 12). Biomasa poganjkov rastlin, tretiranih z 1, 10 in 150 mg/l CuO v standardni, ter 1, 50, 100 in 150 mg/l CuO v nano obliki je bila statistično značilno manjša od biomase kontrolnih rastlin (slika 12) . Pri koncentracijah 50 in 100 mg/l je bila biomasa poganjkov, tretiranih z nano obliko CuO, statistično značilno manjša od poganjkov, tretiranih s standardno obliko CuO (slika 12).

Pri koreninah se je biomasa statistično značilno zmanjšala v primerjavi s kontrolo le pri rastlinah, tretiranih s 100 in 150 mg/l CuO v nano oblikih. Oblika CuO ni statistično značilno vplivala na biomaso korenin, opazili pa smo trend večjega zmanjšanja biomase korenin pri rastlinah, tretiranih z nano obliko CuO (slika 12).



Slika 12: Biomasa poganjkov in korenin sončnic pri različnih tretmajih (povprečje ± SN, N = 6). Različne črke označujejo statistično značilno razliko med tretmaji (enosmerna ANOVA, Duncan's test, p<0,05). Statistična obdelava je bila narejena posebej za korenine in poganjke.

4.4 KONCENTRACIJA FOTOSINTEZNIH PIGMENTOV

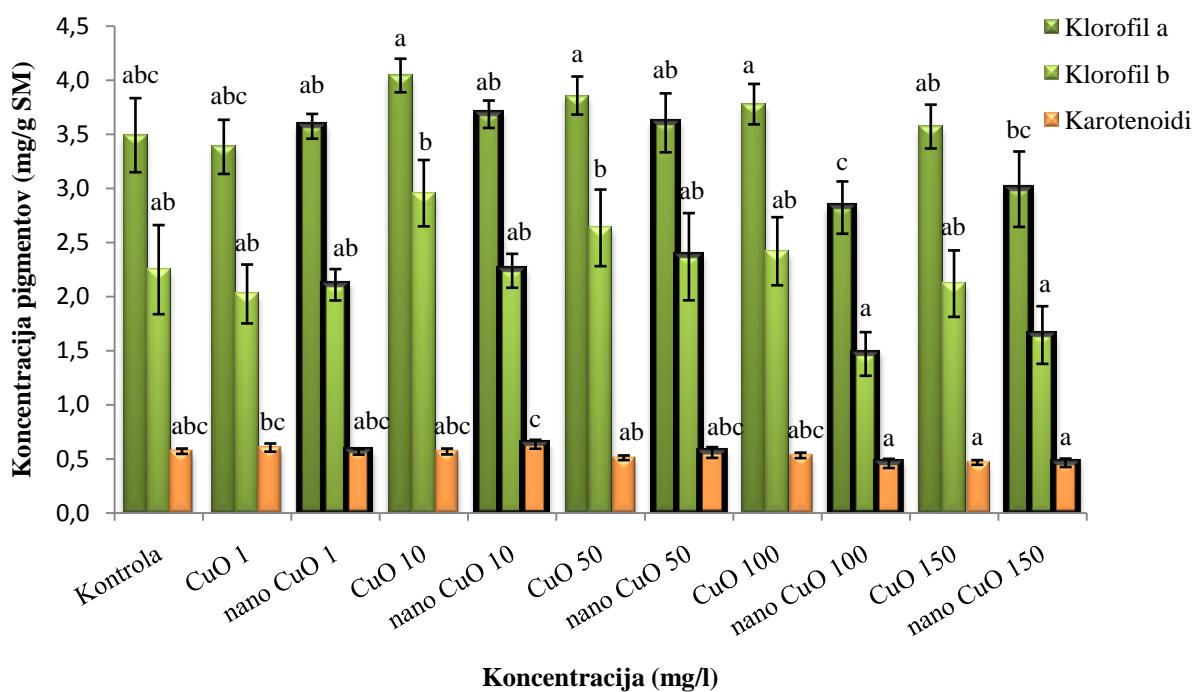
V poganjkih tretiranih rastlin je bila pri vseh rastlinah najvišja koncentracija klorofila a, sledil je klorofil b, najmanj pa je bilo karotenoidov (slika 13).

Faktorska analiza variance je pokazala, da je na koncentracijo klorofila a vplivala tako oblika CuO, kot tudi koncentracija (tabela 3a). CuO v nano oblikah in višjih koncentracijah je koncentracijo klorofila a bolj znižal kot CuO v standardni oblikah (priloga C). Opazili smo trend zniževanja koncentracije klorofila a pri višjih koncentracijah CuO (slika 13). Ko smo primerjali rastline, ki so rasle ob enaki koncentraciji CuO različnih oblik, smo pri koncentracijah nad 100 mg/l opazili statistično značilno zniževanje koncentracije klorofila a pri nano oblikah CuO (slika 13).

Faktorska analiza variance je pokazala, da tudi na koncentracijo klorofila b vplivata oblika in koncentracija CuO (tabela 3b). CuO v nano oblikah in višjih koncentracijah je imel na koncentracijo klorofila b bolj negativen vpliv kot CuO v standardni oblikah (priloga D).

Pri klorofilu b so se med tretmaji pokazali trendi zniževanja koncentracije klorofila b pri višjih koncentracijah CuO. Ko smo primerjali koncentracije klorofila b pri standardni in nano obliki CuO, smo opazili trend večjega zniževanja koncentracije klorofila b pri nano obliki (slika 13).

Pri karotenoidih se je pokazal trend upadanja koncentracije karotenoidov s povečanjem koncentracije CuO (slika 13). Faktorska analiza variance je pokazala, da je na koncentracijo karotenoidov vplivala koncentracija CuO, ne pa tudi oblika CuO (tabela 3c). Vpliv koncentracije CuO na koncentracijo karotenoidov je bil negativen (priloga E).



Slika 13: Koncentracija fotosinteznih pigmentov pri različnih tretmajih (povprečje ± SN, N = 6). Različne črke označujejo statistično značilno razliko med tretmaji (enosmerna ANOVA, Duncan's test, $p < 0,05$). Statistična obdelava je bila narejena za vsak pigment posebej.

Tabela 3: Rezultati faktorske analize za klorofil a (a.), klorofil b (b.) in karotenoide (c.), ki smo jo opravili s programom Faktorska ANOVA. Rdeča barva prikazuje statistično značilne vplive.

a.)	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Koncentracija (mg/l)	3,01	4	0,75	2,69	0,0424
Oblika CuO	2,17	1	2,17	7,75	0,0077
Koncentracija (mg/l)*Oblika CuO	1,97	4	0,49	1,77	0,1517
Napaka	13,13	47	0,28		

b.)	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Koncentracija (mg/l)	4,90	4	1,22	2,69	0,0425
Oblika CuO	3,06	1	3,06	6,71	0,0127
Koncentracija (mg/l)*Oblika CuO	1,78	4	0,45	0,98	0,4290
Napaka	21,40	47	0,46		

c.)	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Koncentracija (mg/l)	0,15	4	0,04	5,55	0,0010
Oblika CuO	0,00	1	0,00	0,00	0,9956
Koncentracija (mg/l)*Oblika CuO	0,04	4	0,01	1,37	0,2573
Napaka	0,32	47	0,01		

4.5 KONCENTRACIJE ELEMENTOV V KORENINAH IN POGANJKIH SONČNICE

V poganjkih in koreninah smo določili koncentracije bakra, žvepla, kalija, kalcija, žezeleza in cinka.

4.5.1 Baker

4.5.1.1 Koncentracija bakra

Koncentracija bakra je bila v poganjkih od 78-99% nižja v primerjavi s koreninami. Faktorska analiza variance je pokazala, da na koncentracijo bakra v koreninah vpliva koncentracija CuO v hrnilni raztopini in sicer pozitivno (tabela 4a, priloga F). Tudi kombinacija koncentracije in oblike CuO vpliva na koncentracijo bakra v koreninah (tabela 4a). Pri poganjkih poleg koncentracije CuO v hrnilni raztopini vpliva tudi oblika CuO, pri

čemer so imele rastline tretirane z nano CuO v poganjkih višje koncentracije Cu (tabela 4b, priloga G).

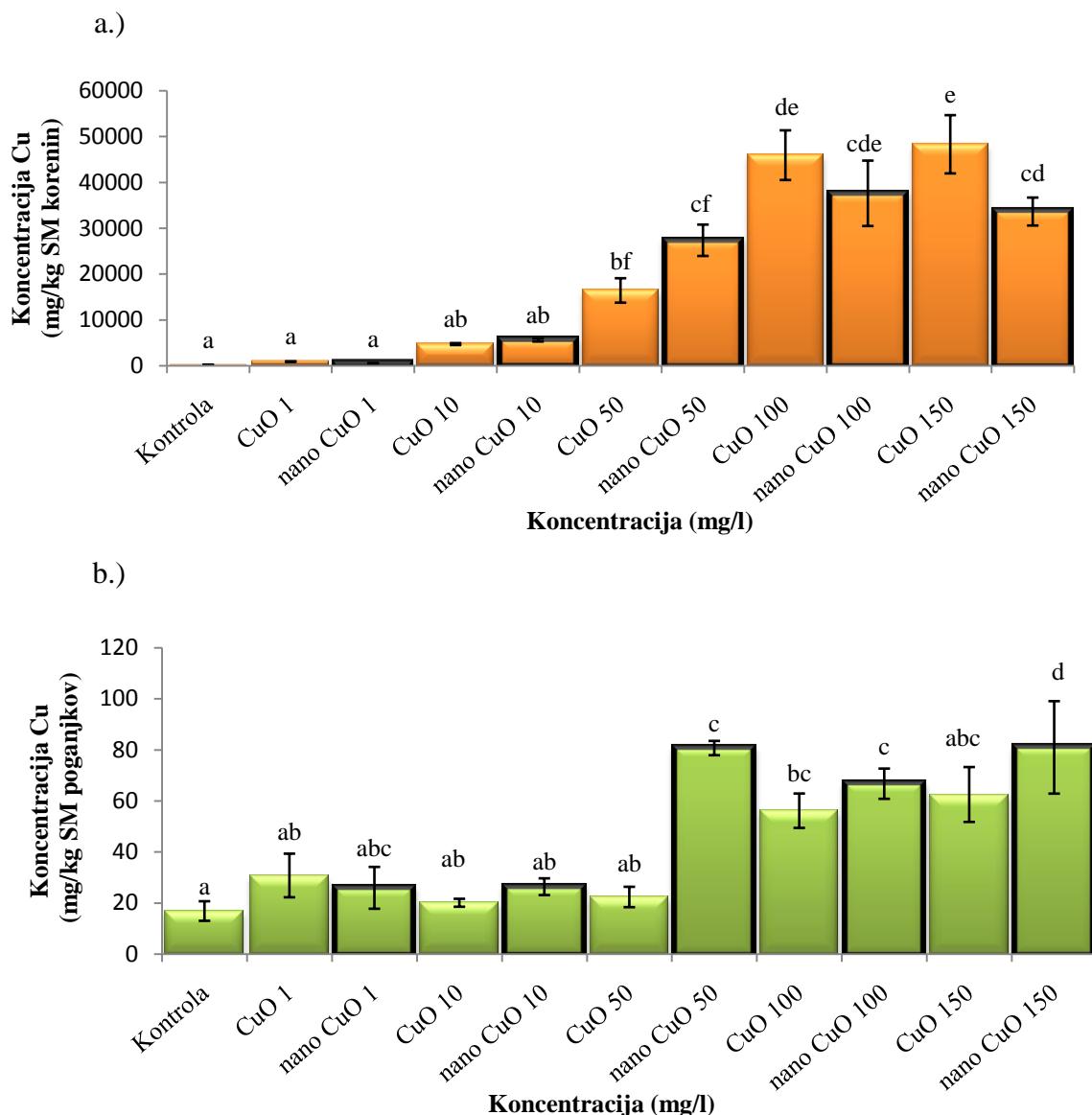
Tabela 4: Rezultati faktorske analize za koncentracijo Cu v koreninah (a.) in poganjkih (b.), ki smo jo opravili s programom Faktorska ANOVA. Rdeča barva prikazuje statistično značilne vplive.

a.)	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Koncentracija (mg/l)	1,64E+10	4	4,09E+09	39,75	0,0000
Oblika CuO	7,36E+07	1	7,36E+07	0,72	0,4021
Koncentracija (mg/l)*Oblika CuO	1,09E+09	4	2,73E+08	2,66	0,0445
Napaka	4,73E+09	46	1,028E+08		

b.)	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Koncentracija (mg/l)	36458,7	4	9114,7	7,60	0,0001
Oblika CuO	16398,1	1	16398,1	13,67	0,0005
Koncentracija (mg/l)*Oblika CuO	12033,7	4	3008,4	2,51	0,0536
Napaka	59992,5	50	1199,9		

V koreninah je s povečanjem koncentracije CuO v raztopini naraščala tudi koncentracija Cu v tkivih. Statistično značilne razlike v koncentraciji Cu med kontrolnimi in tretiranimi rastlinami so bile opazne le pri koncentracijah nad 50 mg/l hranilne raztopine. Pokazal se je trend, počasnejše rasti koncentracije Cu v rastlinah, tretiranih z nano obliko v primerjavi s standardno kemijsko obliko CuO. Razlike med nano in standardno obliko CuO so bile statistično značile pri koncentraciji 150 mg/l, kjer je bila koncentracija Cu v koreninah tretiranih s standardno obliko 18% večja kot v koreninah tretiranih z nano obliko CuO (slika 14a).

Tudi koncentracija bakra v poganjkih je s povečano koncentracijo CuO v raztopini naraščala. Podobno kot pri koreninah so bile tudi tu razlike statistično značilne pri koncentracijah višjih od 50 mg/ml CuO. Pri nižjih koncentracijah CuO v raztopini se je pokazal trend višje vsebnosti bakra v poganjkih rastlin, tretiranih z nano obliko CuO v primerjavi s poganjki rastlin, tretiranih s standardno obliko CuO. Pri koncentracijah 50 in 150 mg/l CuO je bila razlika statistično značilna ($p < 0,05$) (slika 14b).



Slika 14: Koncentracija Cu v koreninah (a.) in poganjkih (b.) pri različnih tretmajih (povprečje ± SN, N = 6). Različne črke označujejo statistično značilno razliko med tretmaji (enosmerna ANOVA, Duncan's test, p<0,05).

4.5.1.2 Vsebnost bakra

Vsebnost bakra v tkivih smo izračunali tako, da smo koncentracijo bakra pomnožili s suho maso tkiva. Faktorska analiza variance je pokazala, da na vsebnost bakra v koreninah vplivata koncentracija in oblika CuO v hranilni raztopini (tabela 5a). Koncentracija je imela pozitiven, nano oblika pa bolj negativen vpliv od standardne (priloga H). Tudi kombinacija koncentracije in oblike CuO vpliva na koncentracijo bakra v koreninah.

(tabela 5a). Pri poganjkih vpliva na vsebnost bakra le koncentracija CuO (tabela 5b). Njen vpliv je pozitiven (priloga I).

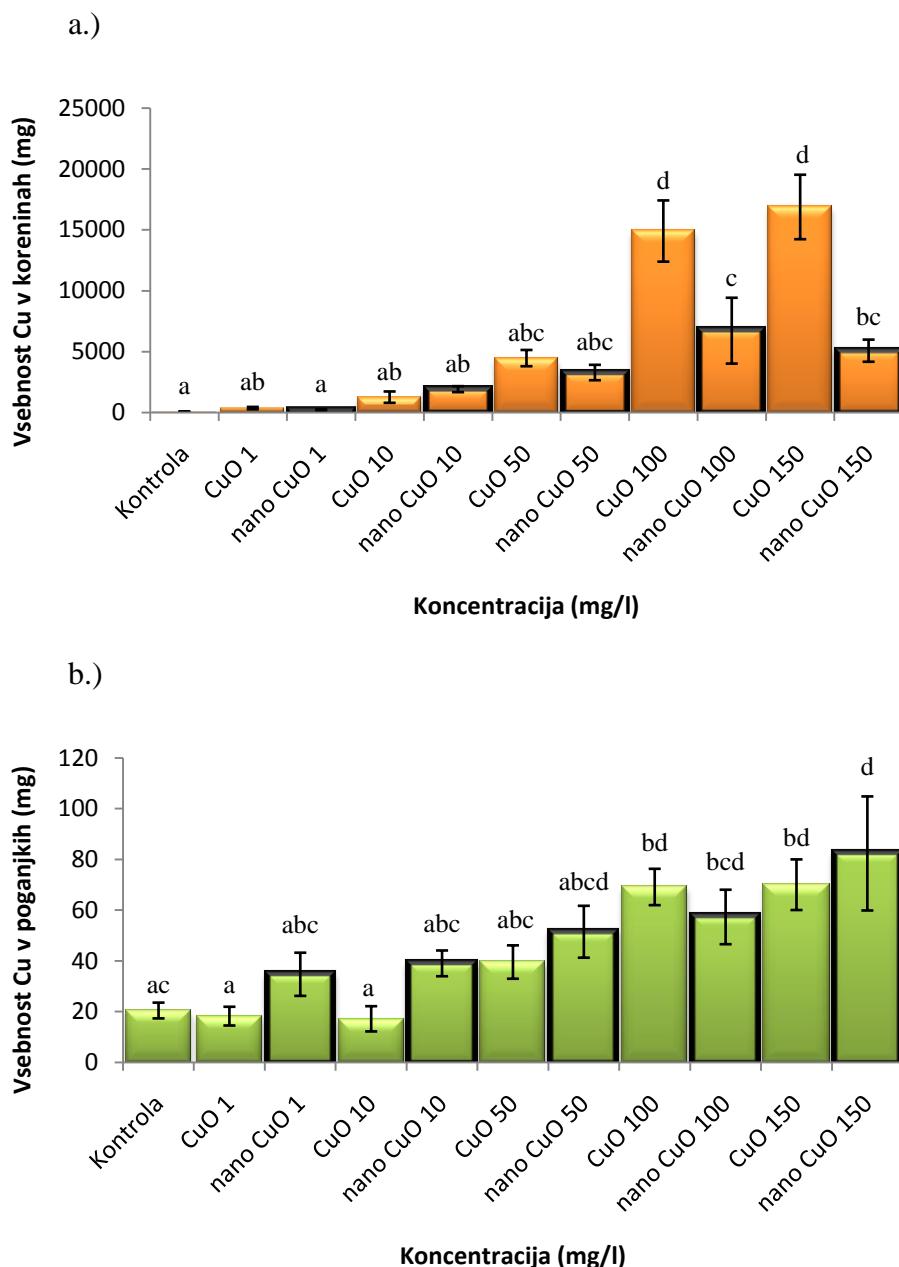
Tabela 5: Rezultati faktorske analize za vsebnost Cu v koreninah (a.) in poganjkih (b.), ki smo jo opravili s programom Faktorska ANOVA. Rdeča barva prikazuje statistično značilne vplive.

a.)	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Koncentracija (mg/l)	1,06E+09	4	2,65E+08	22,87	0,0000
Oblika CuO	2,08E+08	1	2,08E+08	18,01	0,0001
Koncentracija (mg/l)*Oblika CuO	2,98E+08	4	7,45E+07	6,44	0,0004
Napaka	4,63E+08	40	1,157731E+07		

b.)	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Koncentracija (mg/l)	18738,9	4	4684,7	6,97	0,0002
Oblika CuO	1358,2	1	1358,2	2,02	0,1631
Koncentracija (mg/l)*Oblika CuO	1654,2	4	413,6	0,62	0,6542
Napaka	26211,4	39	672,1		

Vsebnost bakra je bila v koreninah veliko večja kot v poganjkih. V koreninah je pri koncentracijah večjih od 50 mg/l CuO v raztopini, s povečano koncentracijo CuO v raztopini naraščala tudi vsebnost bakra. Vsebnost bakra je bila pri rastlinah tretiranih s standardno obliko CuO večja, kot pri rastlinah tretiranih z nano obliko. Pri koncentracijah 100 in 150 mg/l so bile razlike med tretiranimi rastlinami in kontrolo, ter med nano in standardno obliko bakra statistično značilne (slika 15a).

Tudi v poganjkih je bila vsebnost bakra višja pri višjih koncentracijah CuO v raztopini. Podobno kot pri koreninah so bile tudi tu opazne statistično značilne razlike med tretiranimi rastlinami in kontrolo pri koncentracijah višjih od 100 mg/ml. Pokazal se je trend višje vsebnosti bakra v poganjkih rastlin tretiranih z nano obliko CuO v primerjavi s poganjki rastlin tretiranih s standardno obliko CuO (slika 15b).



Slika 15: Vsebnost Cu v koreninah (a.) in poganjkih (b.) pri različnih tretmajih (povprečje ± SN, N = 6). Različne črke označujejo statistično značilno razliko med tretmaji (enosmerna ANOVA, Duncan's test, p<0,05).

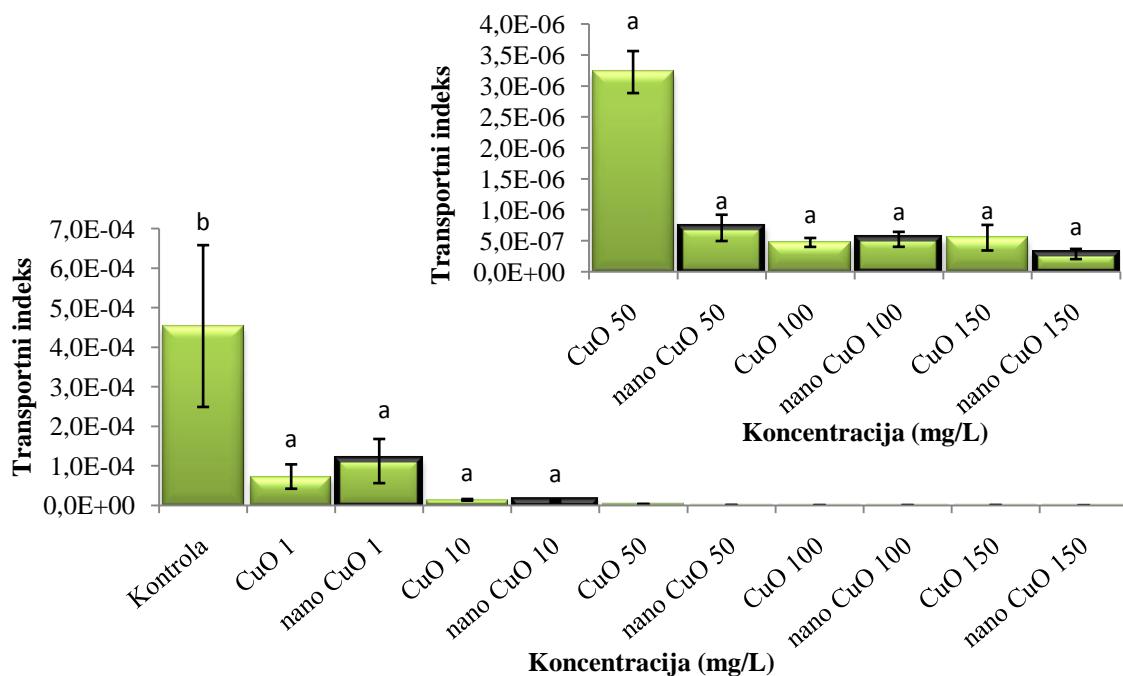
4.5.1.3 Transportni indeks za baker

Faktorske analize so pokazale, da je na vrednosti transportnega indeksa vplivala koncentracija CuO v raztopini (tabela 6). Vpliv je bil negativen (priloga J).

Tabela 6: Rezultati faktorske analize za prenosne faktorje, ki smo jo opravili s programom Faktorska ANOVA. Rdeča barva prikazuje statistično značilne vplive.

	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Koncentracija (mg/l)	6,01E-08	4	1,50E-08	12,78	4,99E-07
Oblika CuO	5,97E-10	1	5,97E-10	0,51	4,80E-01
Koncentracija (mg/l)*Oblika CuO	3,10E-09	4	7,74E-10	0,66	6,24E-01
Napaka	5,29E-08	45	1,18E-09		

Transportni indeksi smo izračunali kot razmerje koncentracij med poganjki in koreninami. Transportni indeks za baker je bil mnogo manjši od 1. Z višanjem koncentracije CuO so vrednosti transportnega indeksa statistično značilno padale glede na kontrolo. Ko smo primerjali rastline, ki so rasle ob enaki koncentraciji CuO različnih oblik smo opazili, da med transportnimi indeksi rastlin, tretiranih z nano in tistih s standardno obliko CuO, ni bilo statistično značilnih razlik (slika 16).



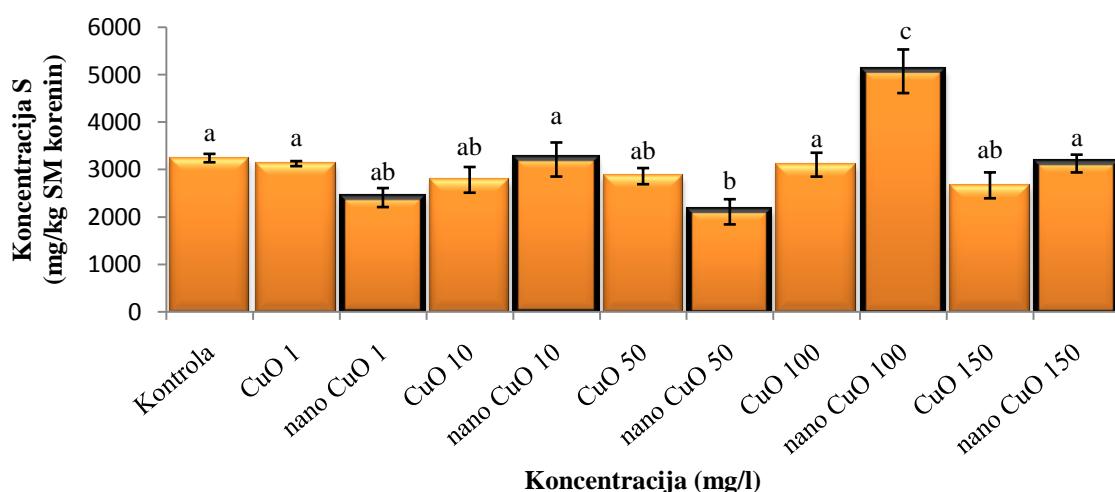
Slika 16: Transportni indeksi pri različnih tretmajih (povprečje ± SN, N = 6). Različne črke označujejo statistično značilno razliko med tretmajmi (enosmerna ANOVA, Duncan's test, p<0,05).

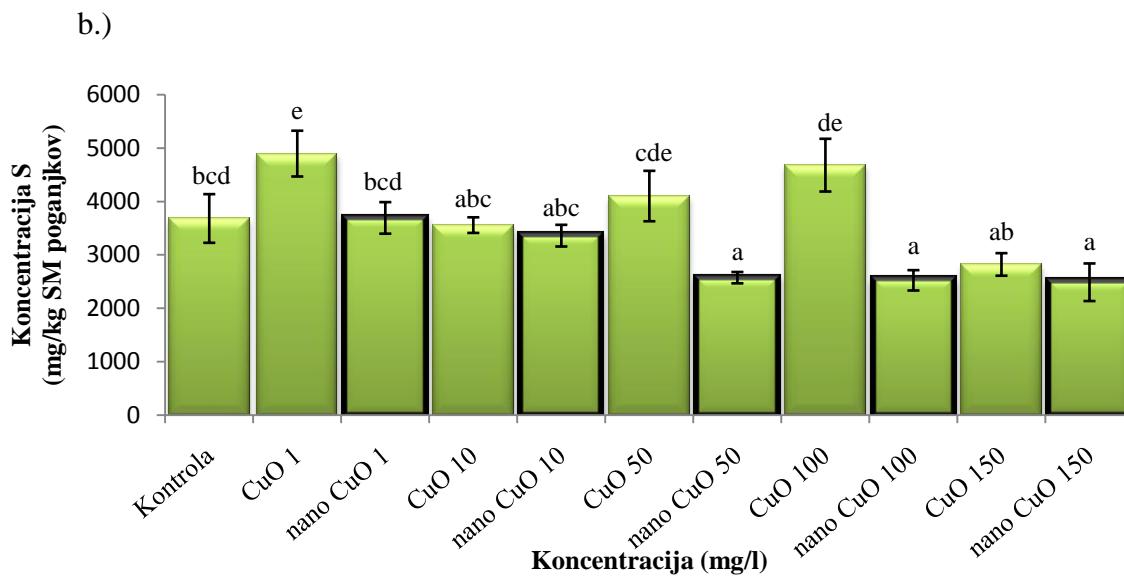
4.5.2 Žveplo

Koncentracija žvepla je bila v poganjkih in koreninah približno enaka. V koreninah so bile statistično značilne razlike v koncentraciji žvepla le pri nano obliki CuO pri koncentraciji 100 mg/l (slika 17a). Faktorska analiza variance je pokazala trend zviševanja koncentracije žvepla v tkivih korenin z zviševanjem koncentracijo CuO v raztopini (priloga K). Tudi kombinacija koncentracije in oblike Cu je vplivala na koncentracijo žvepla v koreninah (tabela 7a). Koncentracija CuO v raztopini je zvišala koncentracijo žvepla le pri nano obliku CuO (slika 17a).

V poganjkih smo opazili trend nižanja koncentracije žvepla v tkivih z višanjem koncentracije CuO v raztopini. Koncentracija žvepla se je do 30% bolj znižala v rastlinah, tretiranih z nano obliko CuO v primerjavi s standardno obliko (slika 17b), kar nam je pokazala tudi faktorska analiza variance (tabela 7b). Ta razlika je bila pri koncentracijah 1, 50 in 100 mg/l CuO statistično značilna (slika 17b). Tako zviševanje koncentracije CuO v raztopini, kot nano oblika CuO sta imeli negativen vpliv na koncentracijo žvepla v poganjkih (priloga L). Tudi kombinacija koncentracije in oblike Cu je vplivala na koncentracijo žvepla v poganjkih (tabela 7b). Med koncentracijo Cu in S v koreninah je bila pri nano obliku CuO opazna statistično značilna negativna korelacija (vrednost Spearmanovega korelacijskega koeficienta je $R = -0,50$; $p < 0,05$).

a.)





Slika 17: Koncentracija S v koreninah (a.) in poganjkih (b.) pri različnih tretmajih (povprečje ± SN, N = 6). Različne črke označujejo statistično značilno razliko med tretmajmi (enosmerna ANOVA, Duncan's test, p<0,05).

Tabela 7: Rezultati faktorske analize za koncentracijo S v koreninah (a.) in poganjkih (b.), ki smo jo opravili s programom Faktorska ANOVA. Rdeča barva prikazuje statistično značilne vplive.

a.)

	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Koncentracija (mg/l)	11814252	4	2953563	10,63	0,0000
Oblika CuO	845972	1	845972	3,04	0,0898
Koncentracija (mg/l)*Oblika CuO	10023851	4	2505963	9,02	0,0000
Napaka	9725742	35	277878		

b.)

	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Koncentracija (mg/l)	22265633	4	5566408	5,24	0,0013
Oblika CuO	17297085	1	17297085	16,30	0,0002
Koncentracija (mg/l)*Oblika CuO	12784267	4	3196067	3,01	0,0266
Napaka	53074441	50	1061489		

4.5.3 Kalij

Faktorska analiza variance je pokazala, da je imela koncentracija CuO negativen vpliv na koncentracijo kalija v koreninah (tabela 8, priloga M). Statistično značilnih razlik med vplivom nano in standardne oblike CuO v koreninah ni bilo. V poganjkih faktorska analiza ni pokazala vpliva različne oblike ali različnih koncentracij CuO.

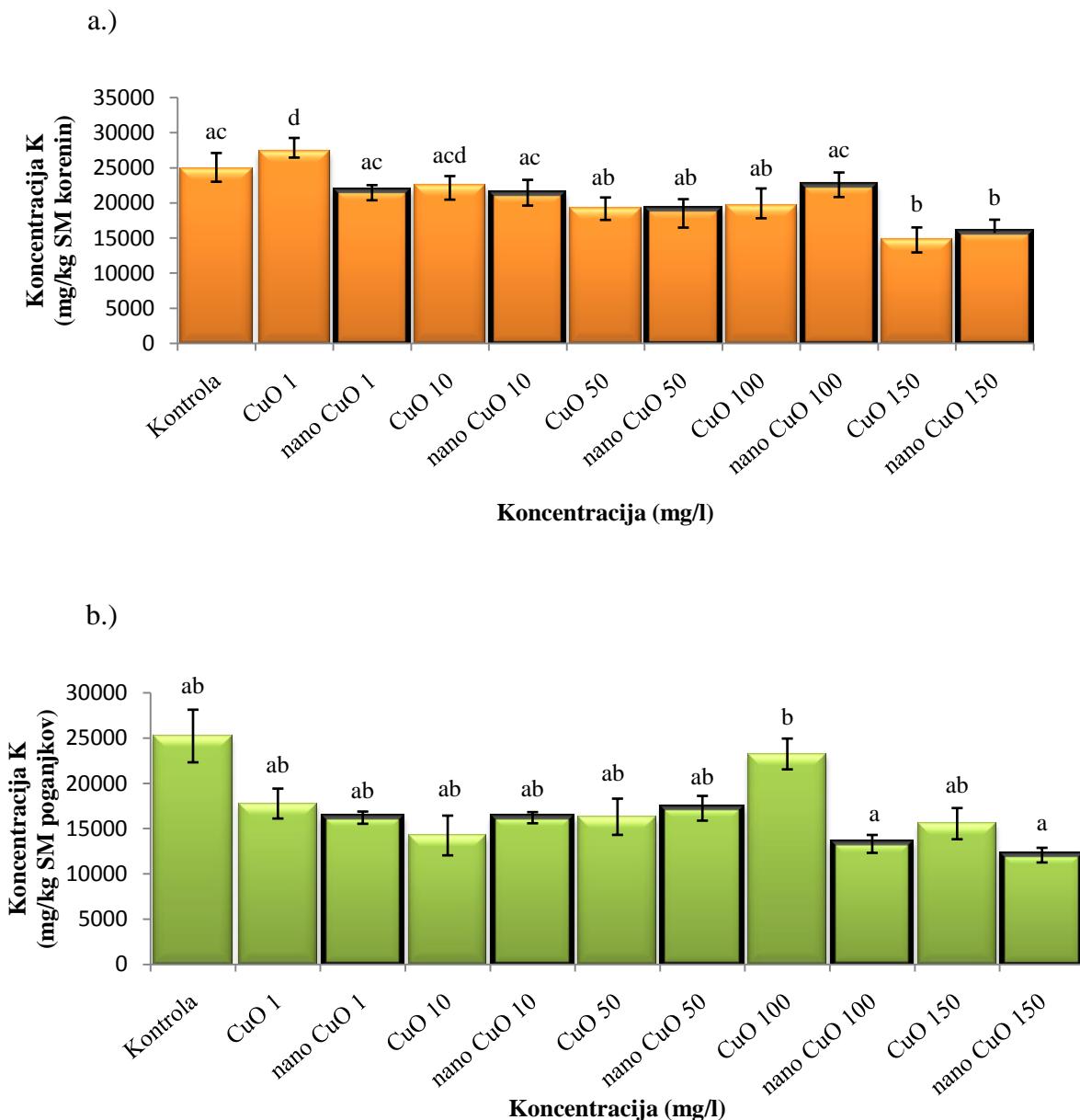
Tabela 8: Rezultati faktorske analize za koncentracijo K v koreninah, ki smo jo opravili s programom Faktorska ANOVA. Rdeča barva prikazuje statistično značilne vplive.

	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Koncentracija (mg/l)	4,15E+08	4,00E+00	1,04E+08	6,76E+00	3,6464E-04
Oblika CuO	6,28E+06	1,00E+00	6,28E+06	4,09E-01	5,2652E-01
Koncentracija (mg/l)*Oblika CuO	9,99E+07	4,00E+00	2,50E+07	1,63E+00	1,8865E-01
Napaka	5,52E+08	3,60E+01	1,53E+07		

Koncentracija kalija je bila v poganjkih nekoliko nižja kot v koreninah. V koreninah se je pokazal trend zniževanja koncentracije kalija z zviševanjem koncentracije CuO, tako pri nano kot standardni obliki CuO. Pri 150 mg/l CuO v nano in standardni obliki so bile razlike statistično značilne v primerjavi s kontrolo in nižjimi koncentracijami CuO (slika 18a).

V poganjkih smo zaznali trend zniževanja koncentracije kalija z naraščajočo koncentracijo CuO le pri nano obliki (slika 18b).

Med koncentracijo Cu in K v koreninah je bila pri standardni obliki CuO opazna statistično značina negativna korelacija (vrednost Spearmanovega korelacijskega koeficienta je $R = -0,55$; $p < 0,05$).



Slika 18: Koncentracija K v koreninah (a.) in poganjkih (b.) pri različnih tretmajih (povprečje ± SN, N = 6). Različne črke označujejo statistično značilno razliko med tretmajmi (enosmerna ANOVA, Duncan's test, p<0,05).

4.5.4 Kalcij

Faktorska analiza variance je pokazala, da je imela na koncentracijo Ca tako v koreninah kot v poganjkih vpliv koncentracija CuO v raztopini, ne pa tudi oblike CuO (tabela 9). Vpliv je bil v koreninah pozitiven, v poganjkih pa negativen (priloga N). Tudi kombinacija koncentracije in oblike Cu je vplivala na koncentracijo kalcija v poganjkih in koreninah (tabela 9).

Tabela 9: Rezultati faktorske analize za koncentracijo Ca v koreninah (a.) in poganjkih (b.), ki smo jo opravili s programom Faktorska ANOVA. Rdeča barva prikazuje statistično značilne vplive.

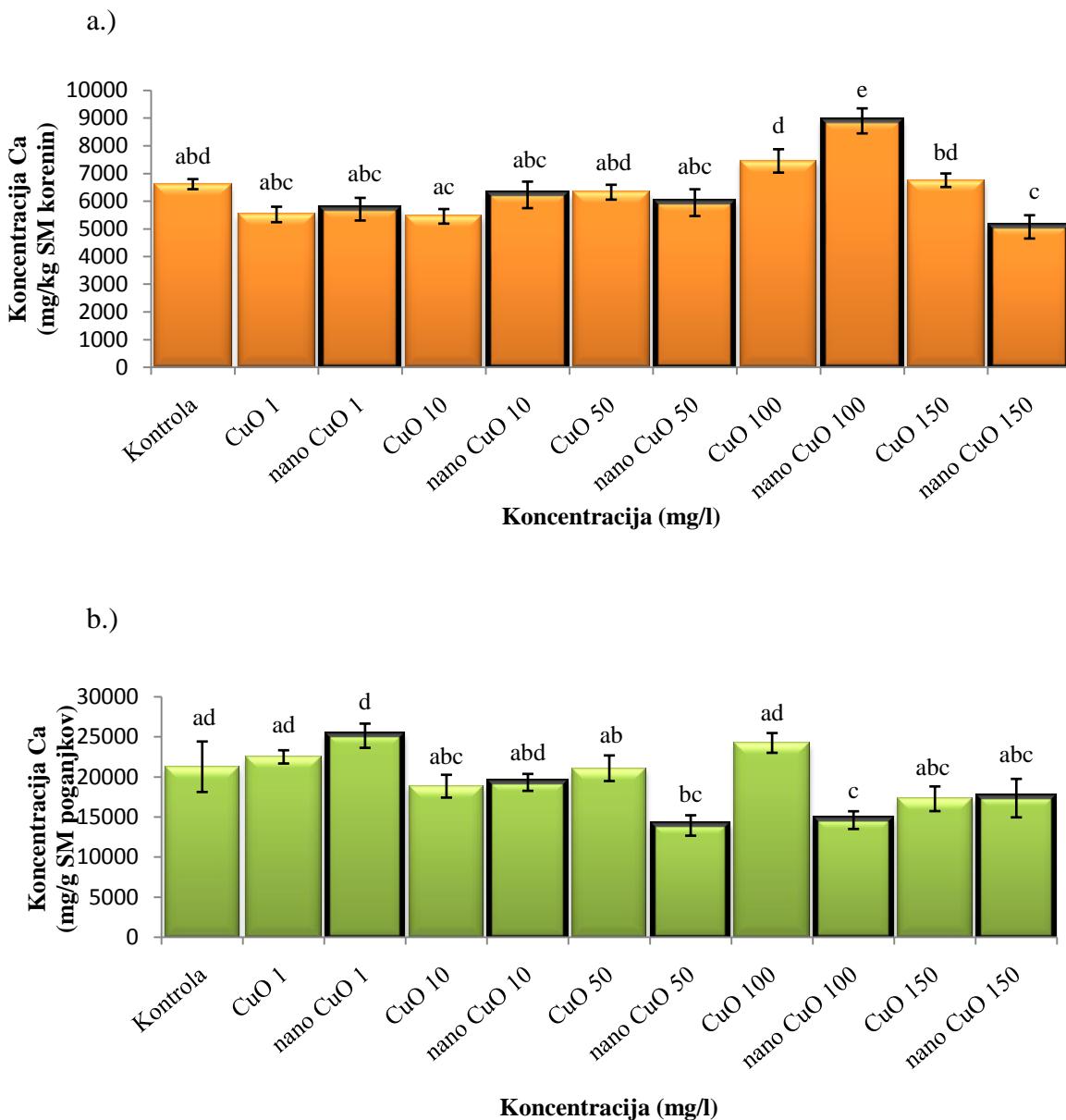
a.)	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Koncentracija (mg/l)	4,65E+07	4	1,16E+07	14,97	0,0000
Oblika CuO	6,37E+04	1	6,37E+04	0,08	0,7760
Koncentracija (mg/l)*Oblika CuO	1,51E+07	4	3,79E+06	4,88	0,0024
Napaka	3,42E+07	44	7,77E+05		

b.)	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Koncentracija (mg/l)	3,50E+08	4	8,74E+07	5,06	0,0017
Oblika CuO	6,85E+07	1	6,85E+07	3,96	0,0521
Koncentracija (mg/l)*Oblika CuO	2,89E+08	4	7,21E+07	4,17	0,0054
Napaka	8,64E+08	50	1,73E+07		

Koncentracija kalcija je bila v poganjkih večja kot v koreninah. V koreninah se je pokazal trend zviševanja koncentracije kalcija z zviševanjem koncentracije CuO v raztopini (slika 19a), kar je pokazala tudi faktorska analiza (priloga L). V primerjavi s kontrolo se je koncentracija kalcija statistično značilno zvišala le pri 100 mg/l nano CuO. Pri 150 mg/l nano CuO je prišlo do padca koncentracije kalcija (slika 19a).

V poganjkih smo pri nano obliki CuO opazili trend zniževanja koncentracije kalcija z zviševanjem koncentracije CuO v raztopini, medtem ko pri standardni obliki razlike niso bile očitne. Statistično značilna razlika med vplivom nano in standardne oblike CuO na koncentracijo kalcija v poganjkih se je pojavila le pri koncentraciji 100 mg/l CuO (slika 19b).

Med koncentracijo Cu in Ca v koreninah je bila pri standardni obliki CuO opazna statistično značilna pozitivna korelacija (vrednost Spearmanovega korelacijskega koeficiente je $R = 0,76$; $p < 0,05$).



Slika 19: Koncentracija Ca v koreninah (a.) in poganjkih (b.) pri različnih tretmajih (povprečje ± SN, N = 6). Različne črke označujejo statistično značilno razliko med tretmaji (enosmerna ANOVA, Duncan's test, p<0,05).

4.5.5 Železo

Faktorska analiza variance je pokazala, da je koncentracija CuO v raztopini vplivala na koncentracijo železa tako v koreninah kot v poganjkih (tabela 10). Vpliv je bil v koreninah pozitiven (priloga O), v poganjkih pa negativen (priloga P). V koreninah je poleg koncentracije CuO, na koncentracijo železa vplivala tudi oblika CuO in kombinacija

koncentracije in oblike CuO (tabela 10a). CuO v nano obliku je imel bolj pozitiven vpliv v primerjavi s standardno obliko (Priloga M).

Tabela 10: Rezultati faktorske analize za koncentracijo Fe v koreninah (a.) in poganjkih (b.), ki smo jo opravili s programom Faktorska ANOVA. Rdeča barva prikazuje statistično značilne vplive.

a.)	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Koncentracija (mg/l)	15855843	4	3963961	48,87	0,0000
Oblika CuO	3125787	1	3125787	38,54	0,0000
Koncentracija (mg/l)*Oblika CuO	4298600	4	1074650	13,25	0,0000
Napaka	3000968	37	81107		

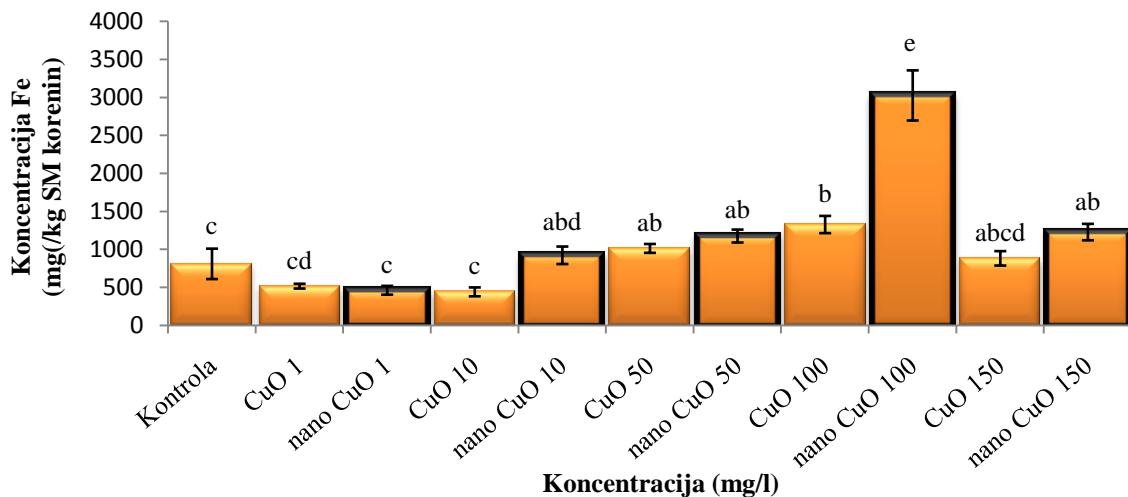
b.)	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Koncentracija (mg/l)	23981,8	4	5995,4	3,62	0,0114
Oblika CuO	188,7	1	188,7	0,11	0,7369
Koncentracija (mg/l)*Oblika CuO	2725,9	4	681,5	0,41	0,7992
Napaka	82702,9	50	1654,1		

Koncentracije železa so bile v koreninah veliko večje kot v poganjkih. Tako pri nano kot pri standardni obliki CuO smo v koreninah opazili trend višanja koncentracije železa z višanjem koncentracije CuO. Izjema je bila koncentracija 150 mg/l, kjer se je koncentracija železa znižala. Ugotovili smo, da je bila pri koncentracijah 50 in 100 mg/l CuO v standardni obliku ter 10, 50 in 100 mg/l CuO v nano obliku, statistično značilno povečana koncentracije železa v primerjavi s kontrolo (Duncan test, $p<0,05$). Opazen je bil tudi trend večjega naraščanja koncentracije železa v koreninah rastlin, tretiranih z nano CuO v primerjavi s standardno obliko (slika 20a).

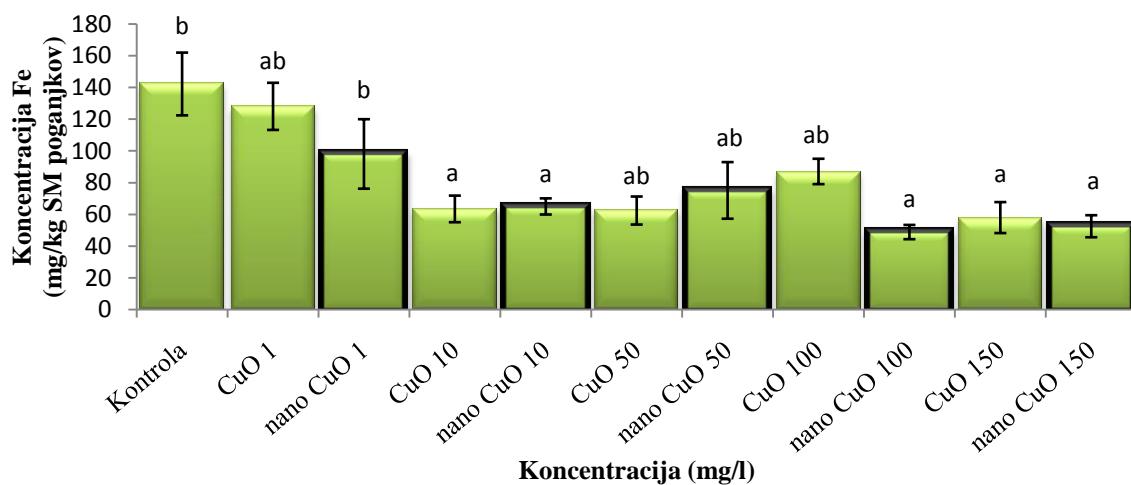
V poganjkih smo opazili trend nižanja koncentracije železa z višanjem koncentracije CuO v raztopini. Ugotovili smo, da je bila koncentracija železa statistično značilno manjša od kontrole pri 10 in 100 mg/l CuO v standardni obliku ter pri 10, 100 in 150 mg/l CuO v nano obliku (slika 20b).

Med koncentracijo Cu in Fe v koreninah je bila pri standardni in nano obliki CuO opazna statistično značilna pozitivna korelacija (vrednost Spearmanovega korelacijskega koeficienta za standardno obliko je $R = 0,71$, za nano pa $R = 0,90$; $p < 0,05$).

a.)



b.)



Slika 20: Koncentracija Fe v koreninah (a.) in poganjkih (b.) pri različnih tretmajih (povprečje \pm SN, $N = 6$). Različne črke označujejo statistično značilno razliko med tretmajami (enosmerna ANOVA, Duncan's test, $p < 0,05$).

4.5.6 Cink

Faktorska analiza variance je pokazala, da sta imeli v koreninah vpliv na koncentracijo cinka tako oblika kot koncentracija CuO v raztopini (tabela 11). Vpliv koncentracije je bil pozitiven (priloga R). CuO v nano oblikih je na koncentracijo cinka v koreninah vplival bolj pozitivno kot CuO v standardni oblikih (priloga R). Vpliv je imela tudi kombinacija koncentracije in oblike Cu (tabela 11). Pri poganjkih faktorska analiza ni pokazala vpliva različne oblike ali različnih koncentracij CuO.

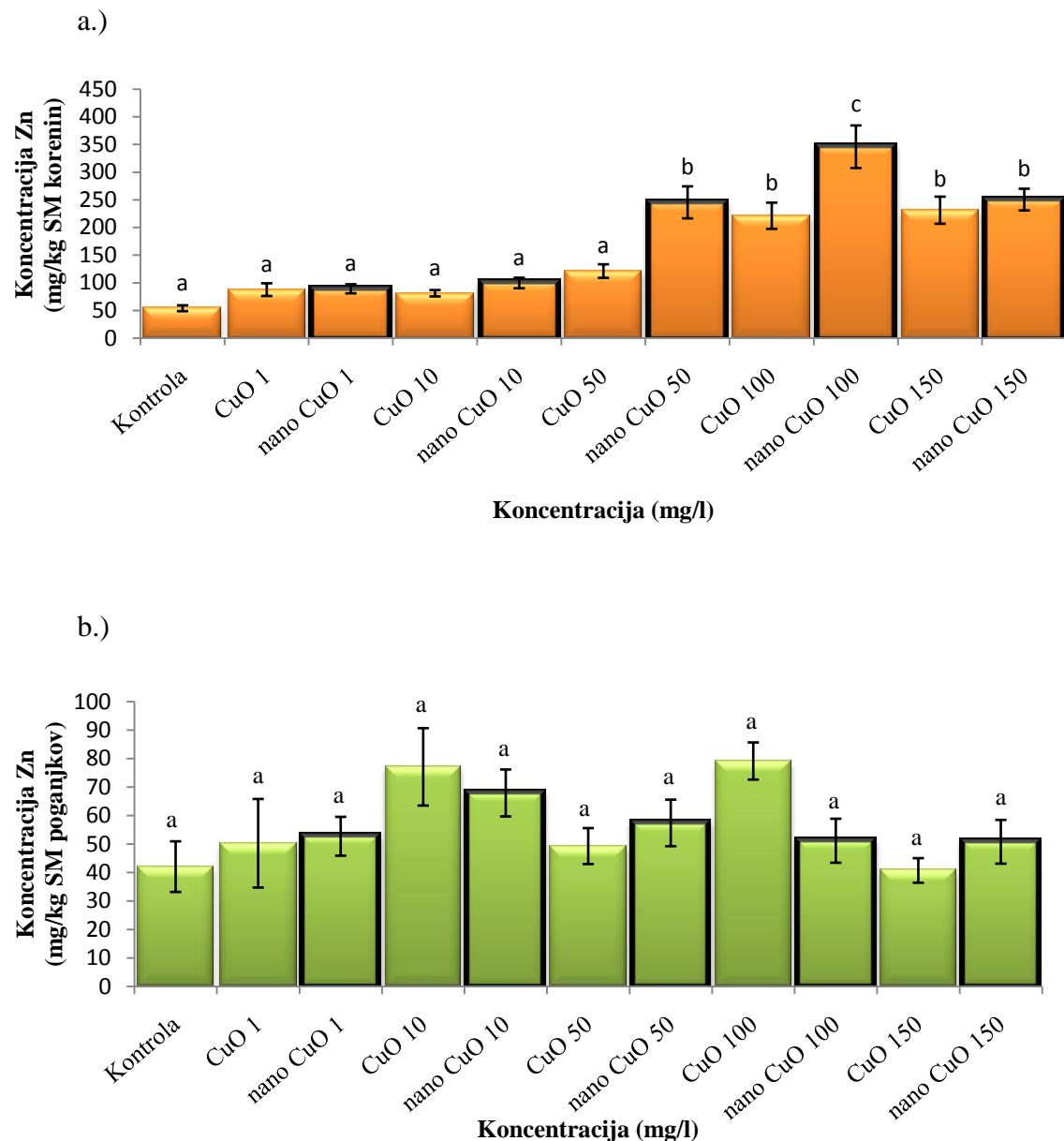
Tabela 11: Rezultati faktorske analize za koncentracijo Zn v koreninah, ki smo jo opravili s programom Faktorska ANOVA. Rdeča barva prikazuje statistično značilne vplive.

	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Koncentracija (mg/l)	326644	4	81661	34,84	0,0000
Oblika CuO	43581	1	43581	18,59	0,0001
Koncentracija (mg/l)*Oblika CuO	40522	4	10130	4,32	0,0050
Napaka	100796	43	2344		

Tudi koncentracije cinka so bile v koreninah večje. Tako pri nano kot pri standardni oblikih CuO smo v koreninah opazili trend višanja koncentracije cinka z višanjem koncentracije CuO. Izjema je bila koncentracija 150 mg/l CuO, kjer se je koncentracija cinka znižala, a je bila še vedno statistično značilno večja od kontrole. Pri koncentracijah 100 in 150 mg/l CuO v standardni oblikih ter 50, 100 in 150 mg/l CuO v nano oblikih, je bila koncentracije cinka v primerjavi s kontrolo statistično značilno povečana. Opazen je bil tudi trend večjega naraščanja koncentracije cinka v koreninah rastlin, tretiranih z nano CuO v primerjavi s standardno obliko. Večje naraščanje koncentracije cinka pri nano oblikih je bilo statistično značilno pri koncentracijah 50 in 100 mg/l CuO (slika 21a).

V poganjkih ni bilo statistično značilnih sprememb v koncentraciji cinka (slika 21b).

Med koncentracijo Cu in Zn v koreninah je bila pri standardni in nano oblikih CuO opazna statistično značilna pozitivna korelacija (vrednost Spearmanovega korelacijskega koeficiente za standardno obliko je $R = 0,91$, za nano pa $R = 0,95$; $p < 0,05$).

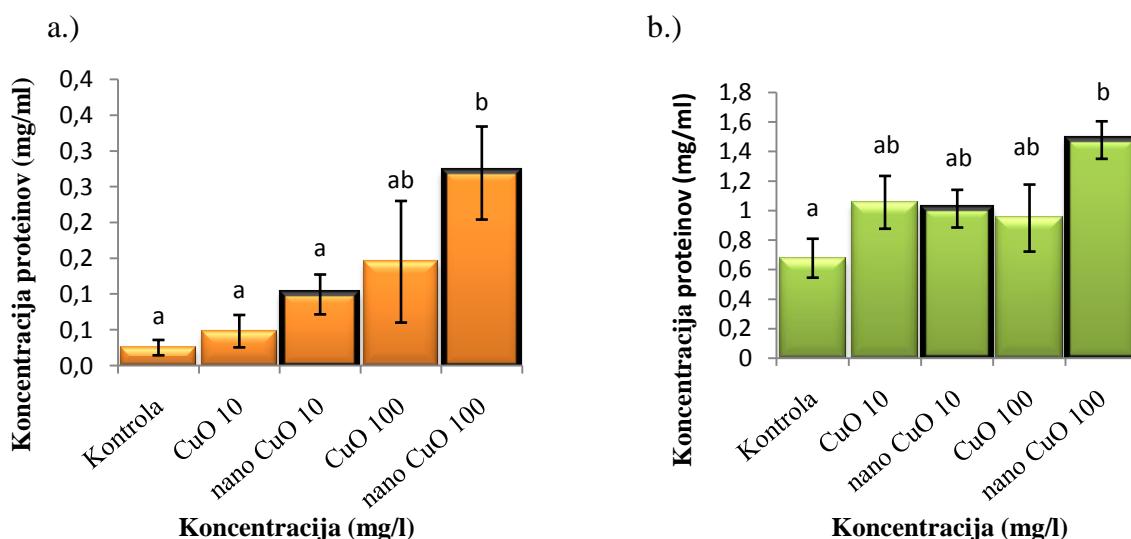


Slika 21: Koncentracija Zn v koreninah (a.) in poganjkih (b.) pri različnih tretmajih (povprečje \pm SN, N = 6). Različne črke označujejo statistično značilno razliko med tretmajmi (enosmerna ANOVA, Duncan's test, p<0,05).

4.6 KONCENTRACIJA PROTEINOV

Koncentracija proteinov je bila višja v poganjkih. V koreninah smo opazili trend naraščanja koncentracije proteinov z naraščanjem koncentracije CuO. Ugotovili smo, da se je statistično značilno od nižjih koncentracij razlikovala le koncentracija proteinov pri 100 mg/l nano CuO (Duncan test, $p<0,05$). Pri rastlinah, tretiranih z nano obliko CuO, je bila koncentracija proteinov višja v primerjavi s standardno obliko CuO, vendar razlike niso bile statistično značilne (slika 22a).

V poganjkih smo opazili trend naraščanja koncentracije proteinov pri nano obliki. Statistično značilno se je koncentracija proteinov v primerjavi s kontrolo povišala le pri 100 mg/l nano CuO (slika 22b). Faktorska analiza variance je pokazala, da je v koreninah na koncentracijo proteinov vplivala koncentracija CuO v raztopini, ne pa tudi oblika (tabela 12). Vpliv koncentracije je bil pozitiven (priloga S). V poganjkih faktorska analiza ni pokazala vpliva različne oblike ali različnih koncentracij CuO.



Slika 22: Koncentracija proteinov pri različnih tretmajih v koreninah (a.) in poganjkih (b.) (povprečje \pm SN, N = 3). Različne črke označujejo statistično značilno razliko med tretmaji (enosmerna ANOVA, Duncan's test, $p<0,05$).

Tabela 12: Rezultati faktorske analize za koncentracijo proteinov v koreninah, ki smo jo opravili s programom Factorska ANOVA. Rdeča barva prikazuje statistično značilne vplive.

	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Koncentracija (mg/l)	0,05	1	0,05	5,58	0,0458
Oblika CuO	0,02	1	0,02	2,41	0,1589
Koncentracija (mg/l)*Oblika CuO	0,00	1	0,00	0,41	0,5377
Napaka	0,08	8	0,01		

4.7 ENCIMSKA AKTIVNOST ANTIOKSIDATIVNIH ENCIMOV

Merili smo specifično encimsko aktivnost guaiakol peroksidaze, askorbat peroksidaze in katalaze.

4.7.1 Guaiakol peroksidaza

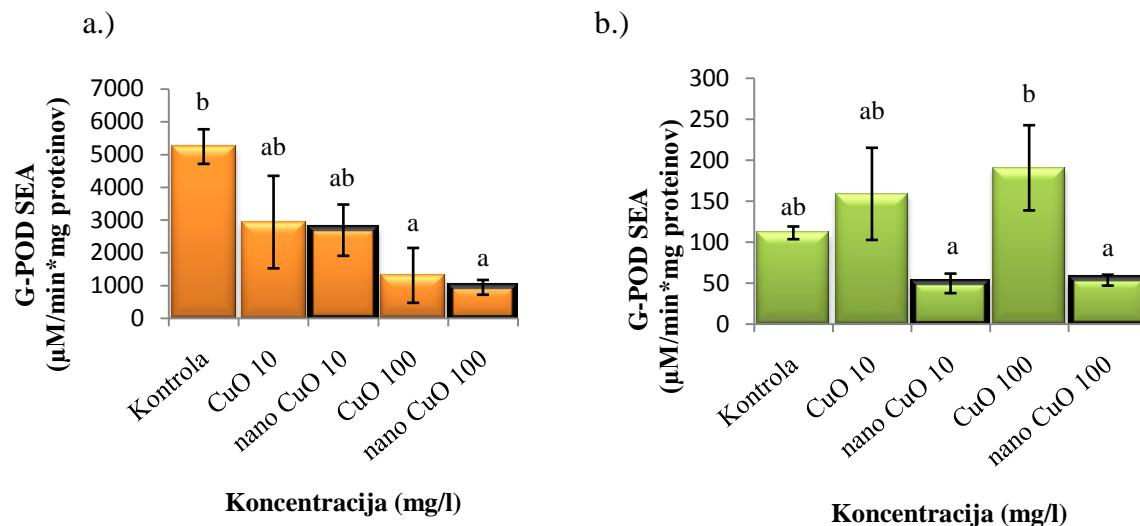
Faktorska analiza variance nam pokaže, da je bila specifična encimska aktivnost G-POD v poganjkih odvisna od oblike CuO (tabela 13). CuO v nano oblikih je na aktivnost vplival bolj negativno (priloga T). V koreninah faktorska analiza ni pokazala vpliva različne oblike ali različnih koncentracij CuO.

Tabela 13: Rezultati faktorske analize za specifično encimsko aktivnost G-POD v poganjkih, ki smo jo opravili s programom Factorska ANOVA. Rdeča barva prikazuje statistično značilne vplive.

	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Koncentracija (mg/l)	696,0	1	696,0	0,20	0,6756
Oblika CuO	33116,0	1	33116,0	9,38	0,0280
Koncentracija (mg/l)*Oblika CuO	423,5	1	423,5	0,13	0,7432
Napaka	17657,0	5	3531,4		

Aktivnost G-POD je bila v poganjkih bistveno nižja kot v koreninah. V koreninah smo opazili trend padanja aktivnosti G-POD. Padec aktivnosti je bil statistično značilen pri koncentraciji 100 mg/l CuO v primerjavi s kontrolo. Pokazali so se trendi večjega upada aktivnosti pri tretiranju z nano obliko CuO v primerjavi s standardno obliko (slika 23a).

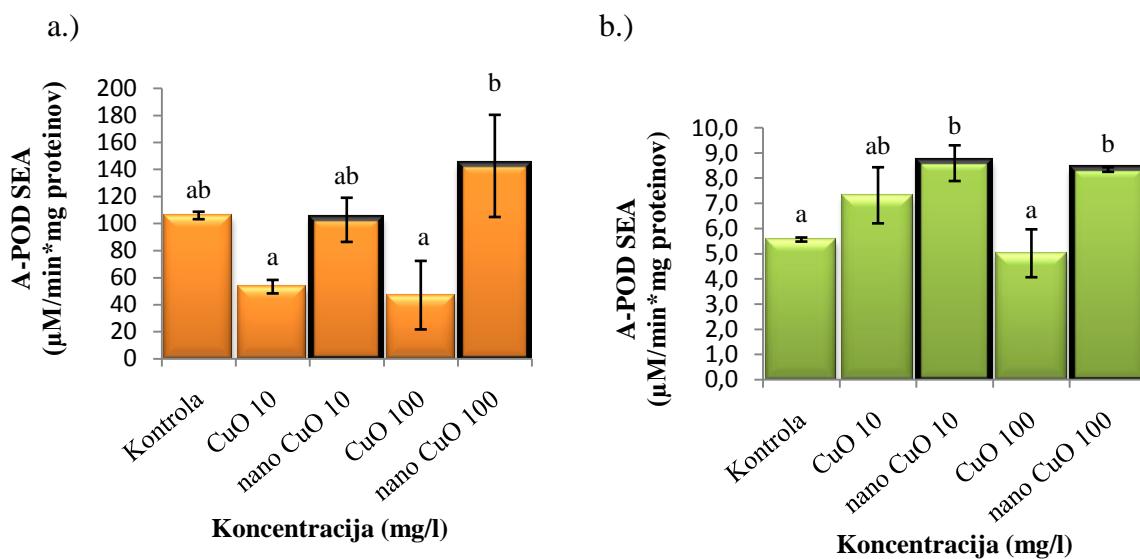
Pri poganjkih smo zaznali trend povišanja encimske aktivnosti pri standardni obliki CuO, medtem, ko je pri nano oblikih encimska aktivnost padla (slika 23b).



Slika 23: Specifična encimska aktivnost G-POD pri različnih tretmajih v koreninah (a.) in poganjkih (b.) (povprečje ± SN, N = 3). Različne črke označujejo statistično značilno razliko med tretmaji (enosmerna ANOVA, Duncan's test, p<0,05).

4.7.2 Askorbat peroksidaza

Tudi specifična encimska aktivnost A-POD je bila v poganjkih veliko nižja kot v koreninah. Tako v koreninah (slika 24a) kot v poganjkih (slika 24b) je bil opazen trend povečevanja aktivnosti A-POD pri nano CuO in zmanjševanja aktivnosti pri standardni obliki CuO. Ugotovili smo, da je bila aktivnost A-POD pri 100 mg/l CuO v poganjkih in koreninah statistično značilno večja pri nano oblikih CuO v primerjavi s standardno obliko. Tudi faktorske analize nam pokažejo, da je bila aktivnost A-POD v koreninah (tabela 14a) in v poganjkih (tabela 14b) odvisna od oblike CuO. V obeh primerih je nano oblika CuO vplivala na aktivnost bolj pozitivno kot standardna oblika (priloga U).



Slika 24: Specifična encimska aktivnost A-POD pri različnih tretmajih v koreninah (a.) in poganjkih (b.) (povprečje ± SN, N = 3). Različne črke označujejo statistično značilno razliko med tretmajmi (enosmerna ANOVA, Duncan's test, p<0,05).

Tabela 14: Rezultati faktorske analize za specifično encimsko aktivnost A-POD v koreninah (a.) in poganjkih (b.), ki smo jo opravili s programom Factorska ANOVA. Rdeča barva prikazuje statistično značilne vplive.

	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Koncentracija (mg/l)	564,96	1	564,96	0,48	0,5274
Oblika CuO	10525,06	1	10525,06	8,90	0,0406
Koncentracija (mg/l)*Oblika CuO	1065,53	1	1065,53	0,90	0,3961
Napaka	4728,65	4	1182,16		

	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Koncentracija (mg/l)	4,90	1,00	4,90	2,46	0,1554
Oblika CuO	15,88	1,00	15,88	7,97	0,0224
Koncentracija (mg/l)*Oblika CuO	3,15	1,00	3,15	1,58	0,2439
Napaka	15,94	8,00	1,99		

4.7.3 Katalaza

Faktorska analiza variance je pokazala, da sta v koreninah na specifično encimsko aktivnost CAT vplivali tako koncentracija kot oblika CuO. Tudi kombinacija oblike in koncentracije CuO je imela vpliv (tabela 15a). Nano oblika in višja koncentracija CuO sta imeli negativen vpliv (priloga V). V poganjkih je na aktivnost vplivala le koncentracija (tabela 15b) in sicer negativno (priloga Z).

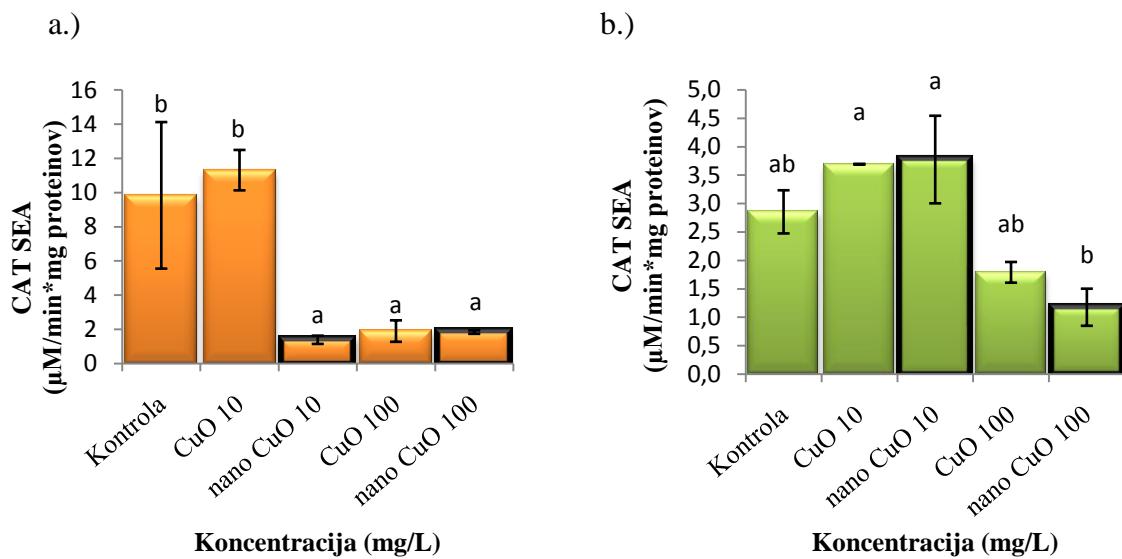
Tabela 15: Rezultati faktorske analize za aktivnost CAT v koreninah (a.) in poganjkih (b.) tretiranih rastlin, ki smo jo opravili s programom factorial ANOVA. Rdeča barva prikazuje statistično značilne vplive.

a.)	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Koncentracija (mg/l)	43,83	1	43,83	58,19	0,0006
Oblika CuO	54,40	1	54,40	72,21	0,0004
Koncentracija (mg/l)*Oblika CuO	53,08	1	53,08	70,47	0,0004
Error	3,77	5	0,75		

b.)	SS	Prostostne stopnje	MS	F	p
Koncentracija (mg/l)	11,03	1	11,03	14,38	0,0127
Oblika CuO	0,15	1	0,15	0,20	0,6726
Koncentracija (mg/l)*Oblika CuO	0,26	1	0,26	0,34	0,5826
Error	3,84	5	0,77		

Specifična encimska aktivnost CAT je bila v poganjkih nižja kot v koreninah. V primerjavi s kontrolo smo opazili v koreninah pri koncentracijah 10 in 100 mg/l CuO v nano obliki in 100 mg/l CuO v standardni obliki statistično značilen padec aktivnosti. Ugotovili smo, da se je statistično značilno zmanjšala aktivnost CAT v koreninah pri rastlinah, tretiranih z nano obliko CuO v primerjavi s standardno obliko (slika 25a).

V poganjkih je aktivnost katalaze najprej narasla, nato pa pri 100 mg/l CuO upadla (slika 25b).



Slika 25: Specifična encimska aktivnost CAT pri različnih tretmajih v koreninah (a.) in poganjkih (b.) (povprečje \pm SN, N = 3). Različne črke označujejo statistično značilno razliko med tretmaji (enosmerna ANOVA, Duncan's test, p<0,05).

4.8 PREGLED STATISTIČNO ZNAČILNIH SPREMEMB V RASTLINAH, TRETIRANIH S STANDARDNO KEMIJSKO IN NANO OBLIKO CuO, V ODVISNOSTI OD KONCENTRACIJE CuO

Tabela 16: Spremembe na rastlinah, tretiranih s standardno kemijsko obliko in nano obliko CuO v primerjavi s kontrolo.

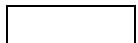
		Koncentracija (mg/l)					
	Oblika CuO	0	1	10	50	100	150
masa korenin	nano						
	standard						
masa poganjkov	nano						
	standard						
vsebnost klorofila a	nano						
	standard						
vsebnost klorofila b	nano						
	standard						
vsebnost karotenoidov	nano						
	standard						
koncentracija Cu v koreninah	nano						
	standard						
koncentracija Cu v poganjkih	nano						
	standard						
koncentracija S v koreninah	nano						
	standard						
koncentracija S v poganjkih	nano						
	standard						
koncentracija K v koreninah	nano						
	standard						
koncentracija K v poganjkih	nano						
	standard						
koncentracija Ca v koreninah	nano						
	standard						
koncentracija Ca v poganjkih	nano						
	standard						
koncentracija Fe v koreninah	nano						
	standard						
koncentracija Fe v poganjkih	nano						
	standard						
koncentracija Zn v koreninah	nano						
	standard						
koncentracija Zn v poganjkih	nano						
	standard						

Se nadaljuje

koncentracija proteinov v koreninah	nano		np		np		np
	standard		np		np		np
koncentracija proteinov v poganjkih	nano		np		np		np
	standard		np		np		np
SEA G-POD v koreninah	nano		np		np		np
	standard		np		np		np
SEA G-POD v poganjkih	nano		np		np		np
	standard		np		np		np
SEA A-POD v koreninah	nano		np		np		np
	standard		np		np		np
SEA A-POD v poganjkih	nano		np		np		np
	standard		np		np		np
SEA CAT v koreninah	nano		np		np		np
	standard		np		np		np
SEA CAT v poganjkih	nano		np		np		np
	standard		np		np		np

 višja v primerjavi z kontrolo

 nižja v primerjavi s kontrolo

 ni razlike v primerjavi s kontrolo

np ni podatka

Ugotovili smo, da ima nano oblika CuO pri koncentracijah, višjih od 100 mg/l, statistično značilno negativen vpliv na rast korenin, medtem ko za standardno kemijsko obliko tega ne moremo trditi. Na rast poganjkov obe obliki CuO delujeta negativno že pri nizkih koncentracijah (1 mg/l). Spremembe v koncentraciji fotosinteznih pigmentov v primerjavi s kontrolo niso bile statistično značilne. Opazili smo le trende. Koncentracija bakra v koreninah se je povišala pri koncentracijah CuO, višjih od 50 mg/l. V poganjkih smo opazili, da so bile pri nano obliku CuO koncentracije bakra višje že pri 50 mg/l, medtem ko pri standardni obliku šele pri 100 mg/l nano CuO. Spremembe v koncentraciji žvepla v koreninah smo opazili le pri nano obliku in sicer porast pri koncentraciji 50 in padec pri 100 mg/l. V poganjkih se je koncentracija žvepla povečala pri 10 mg/l standardne oblike CuO, medtem ko je pri nano CuO koncentracija žvepla padla in sicer, če je bilo v raztopini

več kot 50 mg/l nano CuO. Koncentracije kalija so se statistično značilno spremenile v primerjavi s kontrolo le v koreninah. Pri koncentraciji 150 mg/l CuO je koncentracija kalija padla pri obeh oblikah CuO. Koncentracije kalcija se v koreninah rastlin, tretiranih z standardno kemijsko obliko CuO, niso statistično značilno spremenile, medtem ko smo pri nano obliku opazili višjo koncentracijo kalcija v koreninah pri 100 mg/l in pa nižjo pri 150 mg/l nano CuO. V poganjkih smo opazili padec koncentracije kalcija pri tretiranju s 50 in 100 mg/l nano CuO. Koncentracije železa in cinka so bile v koreninah rastlin višje v primerjavi s kontrolo. Pri tretiranju z nano obliko CuO, se je koncentracija Fe statistično značilno povečala že pri 10 mg/l nano CuO, koncentracija Zn pa pri 50 mg/l nano CuO. Pri standardni obliku smo višje koncentracije Fe opazili pri 50 mg/l, Zn pa pri 100 mg/l CuO. V poganjkih sprememb v koncentraciji Zn ni bilo, medtem ko so bile koncentracije Fe nižje od kontrolnih. Pri obeh oblikah so se spremembe pokazale že pri koncentraciji 10 mg/l CuO. Koncentracije proteinov v koreninah in poganjkih so bile statistično značilno višje od kontrole le pri tretiranju s 100 mg/l nano CuO. V encimski aktivnosti G-POD ni bilo razlik med rastlinami, ki so rasle ob prisotnosti nano ali standardne oblike CuO. Encimska aktivnost v koreninah je v obeh primerih padla pri tretiranju s 100 mg/l CuO. Aktivnost A-POD se je povečala v poganjkih rastlin, tretiranih z 10 in 100 mg/l nano CuO. Aktivnost CAT je v koreninah tretiranih rastlin padla. Padec aktivnosti smo pri tretiranju z nano obliko CuO opazili že pri koncentraciji 10 mg/l, medtem ko so se spremembe pri standardni kemijski obliki CuO pokazale šele pri koncentraciji 100 mg/l.

5 RAZPRAVA

5.1 VSEBNOST BAKROVEGA IONA V RAZTOPINI BAKROVEGA OKSIDA (CuO)

Vrednosti spektralne prepustnosti se lahko gibljejo med 0 in 100%. 100% vrednost spektralne prepustnosti pomeni, da v raztopini ni bakrovega iona ali pa je ta prisoten v tako majhnih koncentracijah, da ga z uporabljeni metodo nismo zaznali. Če je vrednost 0% ima raztopina več bakrovega iona, kot ga z našo metodo lahko zaznamo. V takem primeru moramo raztopino bolj razredčiti ali pa uporabiti drugo metodo (Brooks, 2011). Spektralne prepustnosti v vseh naših raztopinah so bile višje od 99%, kar pomeni, da se iz CuO ni sproščalo veliko bakrovih ionov. Tudi po podatkih iz literature, je CuO v vodi praktično netopen (Copper (II) Oxide, 2011). Mortimer s sod. (2010) so ugotovili, da se iz CuO v nano oblikih po štirih urah sprostita le 2% bakrovih ionov, iz CuO v standardni kemijski oblikih pa le 0,12 %, kar je zelo malo v primerjavi s ZnO, kjer je topnost 80%. Torej je bila koncentracija prostih bakrovih ionov v hranilni raztopini tako majhna, da morfoloških in biokemijskih sprememb, ki so nastale ob tretiranju, ne moremo pripisati strupenosti zaradi prostih bakrovih ionov v hranilni raztopini.

5.2 KARAKTERIZACIJA BAKROVEGA OKSIDA V NANO IN STANDARDNI KEMIJSKI OBLIKI

Na embalaži bakrovega (II) oksida v nano oblikih ni bilo zabeleženih podatkov o prisotnosti nečistoč. Iz tega bi lahko sklepali, da je čistost CuO v nano oblikih 100%. Po vzbujanju vzorcev z radioizotopskima izvoroma Cd-109 in Fe-55 pa smo ugotovili, da tako nano kot standardna kemijska oblika CuO vsebuje poleg Cu, ki je glavna komponenta CuO, še sledi kositra, železa, bromma, titana in kalcija. CuO v standardni oblikih poleg omenjenih elementov vsebuje še sledove kalija. Koncentracije kalcija, železa, kositra in bromma so bile višje v nano kot v standardni kemijski oblikih, kar pomeni, da je bil odstotek čistosti v standardni kemijski oblikih CuO večji kot pri nano oblikih.

5.3 VPLIV CuO NA RASTLINE

5.3.1 Vpliv CuO na morfologijo rastlin

Številne raziskave so pokazale, da ima večina nanodelcev negativen vpliv na rast in razvoj rastlin (Monica in Cremonini, 2009; Ma s sod., 2010; Navarro s sod., 2008; Lee s sod., 2007). Tudi naša raziskava je potrdila, da je vpliv nanodelcev CuO na rastline, v našem primeru sončnice, negativen. Pri koncentracijah nad 50 mg/l je bil vpliv na rast opazen že na prvi pogled. Korenine so postajale z višanjem koncentracije CuO vse krajše, koreninski sistem je bil vedno slabše razvit, poganjki so zastajali v rasti, na listih pa so se začele pojavljati kloroze in nekroze. Kloroze in nekroze bi lahko bile rezultat vpliva visokih koncentracij bakra na lipidno peroksidacijo, katere posledica so poškodbe membran (Razinger s sod., 2008), vendar pa v našem primeru nismo imeli veliko prostih bakrovih ionov. Verjetno so kloroze in nekroze nastale zaradi poškodb korenin in s tem motene mineralne prehrane. Pojavila se je črna obarvanost korenin, ki je pri nekaterih rastlinah znak za strupenost bakra (Adriano, 2001). Obarvanost korenin se je lahko pojavila tudi zaradi adsorpcije CuO na njihovo površino, lahko pa je posledica proizvodnje sekundarnih metabolitov v koreninskih vršičkih (Ma s sod., 2010), ki pa jih nismo določali. Korenine so bile pri višjih koncentracijah (100 in 150 mg/l) po površini prekrite z mukozno snovjo. Podoben učinek sta opazila že Lin in Xing (2008) pri travi ljljki (*Lolium perenne*), ki sta jo tretirala z nanodelci ZnO. Predvidevala sta, da je bila sluz sestavljena iz pektina, ki je pomagal pri adsorpciji nanodelcev ZnO na površino korenin. Tudi CuO v standardni obliki je negativno vplival na rast in razvoj korenin in poganjkov, vendar pa je bil njegov učinek pri večjih koncentracijah CuO manjši, kot pri nano obliki.

Rezultati meritve biomase potrdijo naše ugotovitve o zmanjšani rasti korenin in poganjkov s povečevanjem koncentracije nano in standardne oblike CuO v raztopini. Bolj kot pri koreninah, kjer opazimo le trende, so spremembe opazne pri poganjkih. Pri višjih koncentracijah CuO je bila biomasa poganjkov rastlin tretiranih z nano obliko statistično značilno manjša od rastlin tretiranih s standardno obliko CuO (slika 12).

Razlog za razlike v učinkih nano in standardne oblike CuO je lahko ta, da se iz nano oblike CuO sprošča Cu^{2+} ion v večjih količinah kot iz standardne oblike in je zato bolj dostopen

(Aruoja s sod., 2009). Čeprav je baker esencialni element za rastline, je v velikih količinah strupen (Lee s sod., 2007). Vendar pa smo ugotovili, da se v našem primeru Cu^{2+} tako pri nano kot pri standardni obliki ni sproščal v tako velikih količinah, da bi imel strupen učinek na sončnice. Ovržemo lahko tudi hipotezo, da je bila preskrba z mineralnimi hranili motena zaradi kompeticije z bakrovim ionom. Razlog lahko iščemo v večji mobilnosti CuO v nano obliku v primerjavi s standardno obliko. Ker je nano oblika bolj mobilna (Navarro s sod., 2008), lahko dlje časa po mešanju ostane v raztopini in je zato dlje časa dostopna rastlinam. Drugi razlog večje strupenosti nano oblike CuO je ta, da je velikost nanodelcev v primerjavi s standardno obliko veliko manjša. Nanodelci se zato lažje vežejo na celulozne mikrofibre celične stene in motijo njeno integriteto, ki je zelo pomembna za pravilno rast korenin (Ma s sod., 2010), poleg tega pa zaradi svoje majhnosti lažje preidejo skozi membrano in vstopajo globlje v rastlinska tkiva (Lee s sod., 2008). Torej strupenost nanodelcev ni nujno posledica njihovih kemijskih lastnosti, ampak je lahko rezultat fizičnih interakcij med nanodelci in rastlinskimi transportnimi potmi, kar je ugotovil že Ma s sodelavci (2010).

5.3.2 Vpliv CuO na koncentracijo fotosinteznih pigmentov

V tilakoidnih membranah kloroplastov pri višjih rastlinah najdemo dve skupini fotosinteznih pigmentov. To so klorofili in karotenoidi. Glede na funkcijo pri fotosintezi in izrabi svetlobe, lahko pigmente razdelimo na glavni asimilacijski pigment v reakcijskem centru (klorofil a) in antenske asimilacijske pigmente (karotenoidi in ostali klorofili) (Likar s sod., 2008). V naši raziskavi so se pokazali trendi zniževanja koncentracije klorofila a in klorofila b v odvisnosti od zviševanja koncentracije CuO tako v nano kot v standardni obliki (slika 13). Razlog za zniževanje koncentracij klorofila je lahko motena preskrba rastline z magnezijem, kar pa nismo dokazovali, saj koncentracij Mg v tkivih nismo izmerili. Magnezij je namreč sestavni element klorofila (Marschner, 1995). Lahko pa je zaradi povečane koncentracije Cu v poganjkih pri višjih koncentracijah CuO v raztopini, prišlo do povečane tvorbe prostih kisikovih radikalov, ki so povzročili peroksidacijo membran (Razinger s sod., 2008). Pri višjih koncentracijah CuO so se pokazali trendi bolj negativnega vpliva CuO v nano obliku v primerjavi s standardno obliko. Iz dobljenih

rezultatov lahko zaključimo, da CuO v nano in standardni obliki vpliva tudi na fotosintezno aktivna tkiva.

Pri interpretaciji rezultatov moramo upoštevati, da je bil prenos Cu iz korenin v poganjke zelo majhen, zato bi za bolj zanesljive dokaze o vplivih CuO v nano obliku morali uporabiti kakšno drugo metodo. Lahko bi foliarno nanašali nanodelce Cu direktno na liste. Nekateri nanodelci namreč lahko vstopajo v notranjost lista preko trihomov in listnih rež ali pa kar preko kutikule in celic povrhnjice (Corredor s sod., 2010; da Silva s sod., 2006).

5.3.3 Vpliv CuO na koncentracijo elementov v koreninah in poganjkih

5.3.3.1 Koncentracija bakra in transportni indeks

Lee je s sodelavci (2008) na primeru fižola in pšenice, ki ju je gojil na agarju ugotovil, da se le majhen delež bakra transportira iz korenin v poganjke. Višja kot je bila koncentracija nanodelcev CuO v rastnem mediju, višji je bil transport iz korenin v poganjke. Naše raziskave z gojenjem sončnic na hidroponiki so potrdile, da se je koncentracija bakra tako v poganjkih kot v koreninah zviševala z višanjem koncentracije CuO v hranilni raztopini (slika 14). Vendar pa so bile koncentracije bakra v poganjkih veliko nižje kot v koreninah, kar kaže na majhno stopnjo transporta. Tudi nizke vrednosti transportnega indeksa (TI), ki predstavlja razmerje med koncentracijo bakra v poganjkih in koreninah, kažejo na majhno stopnjo transporta (slika 16). Podobno značilnost sta opazila že Lin in Xing (2008) na primeru nanodelcev ZnO in vplivov na ljljko. Ugotovila sta, da se večina nanodelcev ZnO agregira na površini korenin in le nekaj posameznih delcev je sposobno preiti v žilje in se transportirati v višje dele rastline. Z naraščajočo koncentracijo CuO v raztopini je vrednost TI padala. To pomeni, da se je z višanjem koncentracije CuO v raztopini, večji delež Cu zadržal v ali na koreninah.

Pri višjih koncentracijah CuO v raztopini je bila vsebnost bakra v poganjkih, ki so bili tretirani z nano obliko CuO, večja. Iz tega lahko sklepamo, da je nano oblika CuO bolj mobilna. Pričakovali smo, da bodo tudi vrednosti TI pri nano obliku CuO večje, kot pri standardni, saj so nanodelci manjši in lahko prehajajo v simplast, ter se po njem

transportirajo, medtem ko se večji delci CuO zadržijo v apoplastu. Rezultati te hipoteze niso potrdili, saj se je očitno večja količina CuO v nano obliki vezala na površino korenin oz. vstopala v koreninska tkiva. Pokazali so se le trendi višjih TI pri rastlinah, tretiranih z nano obliko CuO.

V koreninah smo opazili trende višje koncentracije Cu v rastlinah tretiranih z nano obliko le pri nižjih koncentracijah CuO v raztopini (do 50 mg/l). Pri višjih koncentracijah (100 in 150 mg/l), pa je vsebnost Cu večja pri rastlinah, tretiranih s standardno obliko. Razlog ja lahko ta, da višje vsebnosti CuO v nano obliku korenine že tako poškodujejo, da te postanejo nefunkcionalne. Posledično se zaradi manjšega privzema hranič zmanjša tudi biomasa rastlin. Ker so koncentracije Cu preračunane glede na maso rastlin, so vrednosti manjše tudi na račun manjše mase. Pri CuO v standardni obliko so korenine tudi pri višjih koncentracijah še vedno funkcionalne.

5.3.3.2 Koncentracija S, Fe, Zn, Ca in K

Žveplo je makronutrient, ki ga kopenske rastline v večini privzemajo iz zemlje preko koreninskega sistema v obliki SO_4^{2-} iona (Marschner, 1995). Sestavlja dve aminokislini cistein in metionin, zato močno vpliva na zgradbo in delovanje proteinov. Poleg proteinov, žveplo vsebujejo še koencim A, glutation, sulfolipidi, vitamina biotin in tiamin (Stefels, 2000). V naši raziskavi smo opazili trend povečevanja koncentracije žvepla v koreninah s povečevanjem koncentracije CuO. Razlike so bile zelo majhne (slika 17). Verjetno je bilo žveplo prisotno kot nečistoča v standardni in nano obliko CuO, ki smo ga dodali v hidroponsko raztopino. Pri standardni obliki CuO je bila prisotnost žvepla označena na embalaži, naše meritve z vzbujanjem vzorcev z radioizotopskima izvoroma Cd-109 in Fe-55 pa je niso dokazale. Možno je, da je žveplo v CuO prisotno v nižjih koncentracijah in so ga vrhovi drugih elementov prekrili, zato ga nismo opazili. V poganjkih je koncentracija žvepla upadla (slika 17). Posledice upada koncentracije bi lahko bile kloroze, ki smo jih opazili na listih, saj pomanjkanje žvepla povzroča motnje v sintezi proteinov (Marschner, 1995). Večje spremembe smo opazili pri poganjkih, ki so bili tretirani z nano CuO, tako, da lahko zaključimo, da nano CuO vpliva negativno na preskrbo poganjkov z žveplom.

Upad koncentracije žvepla v poganjkih in povečevanje njegove koncentracije v koreninah lahko razložimo tudi s tvorbo fitohelatinov. Fitohelatini spadajo med metalotionine in lahko tvorijo komplekse z dvovalentni ioni (Adriano, 2001). Njihova vloga v višjih rastlinah je odstranjevanje težkih kovin. Prekurzor fitohelatinov je glutation (Marschner, 1995). V našem poskusu se je morda s povečevanje koncentracije bakra v koreninah pospeševala sinteza fitohelatinov. Sestavni del fitohelatinov je tudi žveplo, ki se je verjetno iz poganjkov transportiralo v korenine, zato smo v koreninah opazili povečanje, v poganjkih pa zmanjšanje koncentracije žvepla.

Koncentracije železa in cinka v koreninah so naraščale s koncentracijo CuO v raztopini (slika 20 in 21). Ker so bile vrednosti Spearmanovega korelacijskega koeficiente zelo visoke, lahko variabilnosti v koncentraciji železa in cinka razložimo s spremembou koncentracije CuO. Rezultati vzbujanja vzorcev z radioizotopskima izvoroma Cd-109 in Fe-55 so pokazali, da je bilo železo prisotno kot nečistoča v obeh oblikah CuO, ki smo ga uporabili v poskusu, kar je bilo na embalaži standardne oblike zabeleženo, pri nano pa ne. Torej so povečane koncentracije železa v koreninah verjetno posledica prisotnosti železa kot nečistoče v CuO. Pri standardni obliki CuO je bila na embalaži označena tudi prisotnost Zn, naše meritve z vzbujanjem vzorcev z radioizotopskima izvoroma Cd-109 in Fe-55 pa je niso pokazale. Verjetno cinka nismo opazili zaradi prekritja z vrhovi drugih elementov. Ker sta bili koncentraciji železa in cinka v koreninah rastlin, tretiranih z nano CuO večji kot v koreninah, tretiranih s standardno obliko CuO, iz tega predvidevamo, da je imel nano CuO večji delež nečistoč železa in cinka kot standardna oblika. Rezultati potrjujejo naše predvidevanje le za železo. Koncentracija cinka v poganjkih se ni spremenjala, iz česar lahko zaključimo, da se cink ni transportiral iz korenin v poganjke. Koncentracija železa v poganjkih pa se je nekoliko zmanjšala, kar je verjetno posledica poškodbe kloroplastov, v katerih se nahaja okrog 80% vsega železa, kadar rastlina raste pod kontroliranimi pogoji (Marschner, 1995).

Kalcij je dvovalentni kation in ima struktурno vlogo v membranah in celični steni. Je tudi pomemben intracelularni sekundarni prenašalec v citosolu (Marschner, 1995). V koreninah tretiranih rastlin se je pokazal trend zviševanja koncentracije kalcija z zviševanjem koncentracije CuO v raztopini pri obeh oblikah, medtem ko je koncentracija kalcija v

poganjkih rastlin, tretiranih z nano obliko CuO upadla (slika 19). Zviševanje koncentracije Ca v koreninah je lahko posledica njegove prisotnosti kot nečistoča v CuO, kar je bilo na embalaži standardne oblike zabeleženo, naše meritve pa so pokazale, da je kalcij v še višji koncentraciji prisoten tudi v nano obliki CuO. V poganjkih, kjer so bile koncentracije kalcija višje kot v koreninah, pa je upad koncentracije kalcija v tretiranih rastlinah verjetno posledica izpodrivanja kalcija iz vezavnih mest v celični steni (Marschner, 1995). Da je bil učinek večji pri tretmajih z nano obliko CuO je pričakovano, saj je bila mobilnost delcev pri nano obliku večja kot pri standardni (slika 15).

Kalij je element, ki ga najdemo pretežno v citoplazmi celic in močno vpliva na njihov osmotski potencial. Veliko ga je tudi v kloroplastih. Tako v citosolu kot v kloroplastih uravnava pH med 7 in 8, kar je optimum za delovanje številnih encimov. Zmanjšanje njegove koncentracije v celicah vodi v spremembe delovanja številnih encimov (Marschner, 1995). V naši raziskavi smo ugotovili, da je podobno kot pri kalciju, tudi pri kaliju njegova koncentracija v poganjkih rastlin, tretiranih z nano obliko, upadla. Opazen je bil tudi upad kalija pri višjih koncentracijah CuO v koreninah (slika 18). Čeprav je bil kalij prisoten kot nečistoča v standardni obliki CuO, pa se njegove koncentracije v koreninah ne povečujejo. Iz tega lahko sklepamo, da CuO moti absorpcijo kalija preko korenin. To je lahko vodilo v spremembe delovanja encimov, s tem pa sta bili moteni sinteza proteinov in fotosinteza (Marschner, 1995), kar se je odražalo tudi na morfologiji rastlin.

5.4 BIOKEMIJSKE SPREMEMBE

Rezultati raziskav so pokazali, da so vsebnosti proteinov v poganjkih večje od vsebnosti v koreninah. Opazili smo trende, da se je količina proteinov, tako v koreninah kot v poganjkih, povečevala z naraščajočo koncentracijo CuO v raztopini (slika 22), kar je v nasprotju z našimi pričakovanji. Pričakovali smo, da bo koncentracija proteinov ostala enaka ali da se bo celo zmanjšala, saj prosti radikali, ki lahko nastajajo ob izpostavljenosti nanodelcem, proteine poškodujejo in jih naredijo nefunkcionalne, kar vodi v propad celičnih membran (Dat s sod., 2000). Poleg tega smo opazili, da CuO vpliva na vsebnost elementov, ki so ključni za pravilno delovanje encimov in s tem na proteinsko sintezo. Vendar pa moramo upoštevati, da je baker lahko vplival na sintezo celične stene. Koncentracija proteinov se je povečala, v bistvu pa se je lahko zmanjšal delež celuloze v celični steni, kar je vplivalo na začetno zatehto. Da bi lahko naredili bolj natančne zaključke, bi morali povečati število paralelk pri posameznem poskusu.

Specifične encimske aktivnosti antioksidativnih encimov G-POD, A-POD in CAT so bile v poganjkih nižje kot v koreninah, saj imajo korenine nekoliko drugačne mehanizme odstranjevanja kisikovih radikalov kot poganjki (Hegedüs s sod., 2001). Poleg tega so bile korenine v direktnem stiku s CuO in zato bolj izpostavljene oksidativnemu stresu kot poganjki. Specifična encimska ktivnost G-POD in CAT je v koreninah padala. V poganjkih smo zaznali padec G-POD le pri nano obliki, aktivnost CAT pa je padla pri večjih koncentracijah CuO (slika 23 in 25). Padec aktivnosti obeh encimov je najverjetneje posledica nastanka proteinskega kompleksa z bakrom, ki spremeni strukturno integriteto proteinov (Hou s sod, 2007). Ker je bila pri tretiranju z nano obliko CuO koncentracija bakra večja, je bil tudi vpliv na aktivnost obeh encimov večji. Pri aktivnosti A-POD smo opazili trende povečanja aktivnosti pri rastlinah tretiranih z nano obliko (slika 24). Lahko je prišlo do povečane aktivnosti A-POD zaradi pomanjkanja aktivnosti CAT in G-POD pri razgradnji H_2O_2 . Poleg tega pa se A-POD nahaja v citosolu in kloroplastih (Hegedüs s sod., 2001) in je bila zato manj izpostavljena direktnemu vplivu Cu kot G-POD, ki se nahaja v celični steni.

Nizka encimska aktivnost je lahko tudi posledica prevelikega stresa po izpostavitvi rastlin različnim oblikam in koncentracijam CuO.

Za bolj reprezentativne rezultate bi morali analize oksidantov in antioksidantov opraviti že po 24-ih urah. Povečana tvorba reaktivnih kisikovih spojin je namreč prvi odgovor rastline na biotski in abiotiski stres (Schützendübel in Polle 2002, cit. po Polle in Rennenberg, 1993). Posledično pa se poviša tudi aktivnost antioksidativnih encimov, ki sodelujejo pri njihovem odstranjevanju (Razinger s sod., 2007). ROS lahko vodijo do nespecifične oksidacije proteinov in membranskih lipidov. Povzročajo tudi poškodbe DNA (Schützendübel in Polle 2002). Po 14-ih dnevih bi bilo bolj smiselno meriti tvorbo sekundarnih metabolitov, ki predstavljajo pomembne molekule v biokemijski obrambi rastlin v stresnih rastnih razmerah (Bennett in Wallsgrave, 1994). Tako se na primer poveča tvorba lignina v celični steni, ki jo inducira H₂O₂ (Hegedüs s sod., 2001).

6 SKLEPI

- Vpliv nanodelcev bakrovega oksida na rast in razvoj sončnic je negativen.
- Korenine postajajo z višanjem koncentracije nano CuO vse krajše in temnejše, koreninski sistem je vedno slabše razvit, poganjki zastajajo v rasti, na listih se pojavljajo kloroze in nekroze.
- Biomasa poganjkov in korenin se s povečevanjem koncentracije nano CuO v raztopini zmanjšuje.
- Tudi CuO v standardni obliki negativno vpliva na rast in razvoj korenin in poganjkov, vendar pa je njegov učinek veliko manjši kot pri nano obliki.
- Ugotovili smo, da se iz raztopine CuO, ki smo jo uporabili v našem poskusu, bakrov ion ne sprošča v dovolj velikih koncentracijah, da bi lahko morfološke in biokemijske spremembe, ki so nastale ob tretiranju, pripisali strupenosti zaradi prostih bakrovih ionov v hranilni raztopini.
- CuO v nano in standardni obliki vpliva tudi na fotosintezno aktivna tkiva. Opazili smo trende zniževanja koncentracije klorofila a in klorofila b z zviševanjem koncentracije CuO neodvisno od njegove oblike. Koncentracija karotenoidov se ni bistveno spremenjala.
- Koncentracija bakra se tako v poganjkih kot v koreninah sončnic zvišuje z višanjem koncentracije CuO v raztopini. Opazili smo, da so koncentracije bakra večje v poganjkih tistih rastlin, ki so bile tretirane z nano obliko CuO.
- Stopnja transporta bakra po rastlini je majhna. Z višanjem koncentracije CuO v raztopini se večji delež CuO zadrži v ali na koreninah.
- Nano oblika CuO je bolj mobilna kot standardna oblika.
- S povečevanjem koncentracije CuO opazimo trend povečevanja koncentracije žvepla v koreninah. V poganjkih koncentracija žvepla upada. Večje spremembe se pojavijo pri poganjkih, ki so tretirani z nano CuO, tako da lahko zaključimo, da nano CuO vpliva negativno na preskrbo poganjkov z žveplom.
- Koncentraciji železa in cinka v koreninah naraščata s koncentracijo CuO v raztopini. Koncentraciji obeh elementov sta večji v koreninah tretiranih z nano CuO. Pri standardni obliki CuO se pojavijo višje koncentracije železa pri tretiranju

s 50 mg/l CuO, cinka pa pri 100 mg/l. Pri nano obliki CuO se koncentracija železa poveča že pri 10, cinka pa pri 50 mg/l. Cink se ne transportira iz korenin v poganjke. Koncentracija železa v poganjkih se s povečevanjem koncentracije CuO v raztopini nekoliko zmanjša.

- Koncentracije kalcija so višje v poganjkih kot v koreninah.
- Višja koncentracija CuO v raztopini vpliva na višjo koncentracijo kalcija v koreninah. V poganjkih rastlin tretiranih z nano obliko koncentracija kalcija upada.
- Koncentracija kalija v poganjkih rastlin, tretiranih z nano obliko, upada. V koreninah je upad kalija opazen pri višjih koncentracijah CuO.
- Vsebnosti proteinov je v poganjkih večja od vsebnosti v koreninah. Z naraščajočo koncentracijo CuO v raztopini, se količina proteinov, tako v koreninah kot v poganjkih, povečuje obratno sorazmerno z biomaso.
- Specifična encimska aktivnosti antioksidativnih encimov G-POD, A-POD in CAT so v poganjkih nižje kot v koreninah. Povečana koncentracija CuO v raztopini zmanjšuje aktivnost G-POD in CAT v koreninah. V poganjkih zaznamo padec G-POD le pri nano obliki, aktivnost CAT pa pada pri koncentracijah 10 mg/l nano CuO in 100 mg/l standardne kemijske oblike CuO. Pri aktivnosti A-POD so opazni trendi povečanja aktivnosti pri rastlinah, tretiranih z nano obliko.

7 POVZETEK

Nanotehnologija se zelo hitro razvija in bo imela velik vpliv na družbeno dogajanje 21. stoletja. Podatki o trenutni uporabi in produkciji nanodelcev, kot produktov nanotehnologije so zelo različni. Kljub veliko prednostim, ki jih nanotehnologija prinaša, pa se mnogi sprašujejo, kakšne so negativne posledice izpostavljenosti nekaterim inženirskim nanodelcem. Zaradi vse pogostejše uporabe inženirskih nanodelcev se pričakuje, da se bo njihova koncentracija v vodnem, terestričnem in atmosferskem okolju povečevala. Lastnosti nanodelcev se razlikujejo od lastnosti večjih delcev istega materiala, zato je poznavanje njihovih lastnosti ključno za razumevanje obnašanja nanodelcev v okolju. Med inženirske nanodelce spadajo tudi nanodelci bakrovega oksida.

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti, kako nanodelci bakrovega oksida vplivajo na rast in razvoj sončnice v primerjavi s standardno obliko CuO oz. negativno kontrolno skupino rastlin. Ob koncu 4 tedenskega poskusa smo opazovali morfološke in biokemijske spremembe, kot so suha biomasa poganjkov in korenin, vsebnost fotosinteznih pigmentov in aktivnost izbranih encimov. Določili smo tudi stopnjo privzema bakra ter makro (fosfor, žveplo, klor, kalij, kalcij) in mikroelementov (železo, cink).

Sončnice smo vzgajali na hidroponiki v hranilni raztopini, v katero smo dodali različne koncentracije CuO v standardni in nano obliki. Fotometrično smo določili koncentracijo bakrovega iona v raztopini. Ugotovili smo, da se iz raztopine CuO, ki smo jo uporabili v našem poskusu, bakrov ion ne sprošča v dovolj velikih koncentracijah, da bi lahko morfološke in biokemijske spremembe, ki so nastale ob tretiranju, pripisali strupenosti zaradi prostih bakrovih ionov v hranilni raztopini. Obe obliki CuO sta vsebovali tudi nečistoče in sicer kositer, železo, brom, titan in kalcij. CuO v standardni obliki je poleg omenjenih elementov vseboval še sledove kalija. Koncentracije kalcija, železa, kositrica in broma so bile višje v nano kot v standardni kemijski obliki, kar pomeni, da je bil odstotek čistosti v standardni kemijski obliki CuO večji kot pri nano oblikih.

Po končanem tretiranju smo rastline liofilizirali in določili suho maso rastlinskih organov. Že med tretiranjem smo opazovali morfološke spremembe, ki so bile vidne s prostim

očesom. Ugotovili smo, da je vpliv nanodelcev CuO na sončnice negativen. Korenine so postajale z višanjem koncentracije CuO vse krajše, koreninski sistem je bil vedno slabše razvit, poganjki so zastajali v rasti, na listih pa so se začele pojavljati kloroze in kasneje nekroze. Pojavila se je črna obarvanost korenin, ki je pri nekaterih rastlinah znak strupenosti bakra. Tudi CuO v standardni obliki je negativno vplival na rast in razvoj korenin in poganjkov, vendar pa je bil njegov učinek manjši, kot pri nano oblikami. Rezultati meritve biomase so potrdili naše ugotovitve o zmanjšani rasti korenin in poganjkov s povečevanjem koncentracije nano in standardne oblike CuO v raztopini.

Koncentracijo fotosinteznih pigmentov smo merili fotometrično. Opazili smo trende zniževanja koncentracije klorofila a in klorofila b z zviševanjem koncentracije CuO tako pri nano kot standardni oblikami, kar je lahko posledica motene preskrbe rastline z magnezijem ali pa povečane tvorbe prostih kisikovih radikalov. CuO v nano in standardni oblikami torej vpliva tudi na vsebnost najpomembnejših fotosinteznih pigmentov v listih.

Z metodo rentgensko fluorescenčne spektrometrije smo opravili skupne analize elementov v koreninah in poganjkih. Koncentracije elementov v poganjkih in koreninah smo določali po razklopu z mešanico HNO_3 in HClO_4 . Določili smo tudi transportni indeks za baker. Koncentracija bakra se je tako v poganjkih kot v koreninah sončnic zviševala z višanjem koncentracije CuO v raztopini. Vendar pa so bile koncentracije bakra v poganjkih veliko manjše, kar kaže na majhno stopnjo transporta iz korenin v poganjke. Z višanjem koncentracije CuO v raztopini, se je večji delež Cu zadržal v ali na površini korenin. Nano oblika CuO je bila bolj mobilna. Višje vsebnosti CuO v nano oblikami so korenine že tako poškodovale, da so te postale nefunkcionalne. Posledično se je zaradi manjšega privzema hrani zmanjšala tudi biomasa rastlin. Baker je negativno vplival na preskrbo poganjkov z žveplom, saj so bile koncentracije žvepla v njih majhne. V koreninah se je koncentracija žvepla povečevala s koncentracijo CuO v raztopini, kar je lahko posledica prisotnosti nečistoč v CuO ali pa tvorbe fitohelatinov. Tudi povečane koncentracije Ca, Fe in Zn v koreninah so bile verjetno posledica prisotnosti nečistoč. Zn se v poganjke ni transportiral, medtem ko se je koncentracija Fe v poganjkih nekoliko zmanjšala. Koncentracija Ca v poganjkih je upadala, kar je verjetno posledica izpodrivanja Ca iz vezavnih mest v celični steni. Koncentracija K je upadala v poganjkih rastlin, tretiranih z nano obliko CuO. To je

verjetno vodilo v spremembe delovanja encimov, s tem pa sta bili moteni sinteza proteinov in fotosinteza, kar se je odražalo tudi na morfologiji rastlin.

Fotometrično smo določili tudi koncentracijo proteinov, ki je s povečevanjem koncentracije CuO v raztopini naraščala in aktivnosti antioksidativnih encimov G-POD, A-POD in CAT. Njihove aktivnosti so bile v poganjkih nižje kot v koreninah. Padec aktivnosti G-POD in CAT v koreninah in poganjkih je najverjetneje posledica nastanka proteinskega kompleksa z bakrom, ki spremeni strukturno integriteto proteinov. Za A-POD smo opazili trende povečevanja aktivnosti pri tretiraju z nano obliko. Za bolj reprezentativne rezultate pa bi morali analize oksidantov in antioksidantov opraviti že po 24-ih urah. Tvorba presežka prostih kisikovih radikalov je namreč prvi odgovor rastline na biotski in abiotski stres.

8 VIRI

- Adriano C.D. 2001. Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability and risks of metals. 2nd edition. New York, Springer
- Aruoja V., Dubourguier H.C., Kasemets K., Kahru A. 2009. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. Science of the total environment, 407: 1461-1468
- Bennett R.N., Wallsgrove R.M. 1994. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. New Phytologist, 127: 617-633
- Bianchini F., Pantano A.C. 1979. Vse o cvetju: Vodnik za gojenje zelenja in cvetja. 3. ponatis. Ljubljana, Mladinska knjiga: 360 str.
- Blinova I., Ivask A., Heinlaan M., Mortimer M., Kahru A. 2010. Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water. Environmental Pollution, 158: 41-47
- Borkow G., Gabbay J. 2004. Putting copper into action: copper-impregnated products with potent biocidal activities. FASEB Journal, 18: 1728-1730
- Brooks D. W. 2011. Searching for the Copper Ion. Brooks D.W. (23.julij 2001)
<http://dwb4.unl.edu/Chemistry/LABS/LABS18c.htm> (3. avgust 2011)
- Carnes C.L., Klabunde K.J. 2003. The catalytic methanol synthesis over nanoparticle metal oxide catalysts. Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, 194: 227-236
- Chang H., Jwo C.S., Lo C.H., Tsung T.T., Kao M.J., Lin H.M. 2005. Rheology of CuO nanoparticle suspension prepared by asns. Rev. Adv. Mater. Sci., 10: 128-132
- Chau C.F., Wu S.H., Yen G.C. 2007. The development of regulation for food nanotechnology. Trends in Food Science & Technology, 18: 269-280
- Copper (II) oxide. 2011. Wikimedia Foundation, Inc. (20. avgust 2011).
[http://en.wikipedia.org/wiki/Copper\(II\)_oxide](http://en.wikipedia.org/wiki/Copper(II)_oxide) (13. avgust 2011)
- Corredor E., Testillano P.S., Coronado M.J., Gonzalez-Melendi P., Fernandez-Pacheco R., Marquina C., Ibarra M.R., de la Fuente J.M., Rubiales D., Perez-de-Luque A., Risueno M.C. 2009. Nanoparticle penetration and transport in living pumpkin plants: in situ subcellular identification. BMC Plant Biology, 9.
- Čebulj M. 2007. Posebne lastnosti nanodelcev. Seminarska naloga. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za matematiko in fiziko
- Daniels S., Think big, think nano.2007. William Reed Business Media SAS (2011)
<http://foodnavigator-usa.com/Science/Think-big-think-nano> (25. julij 2011)

Darlington T.K., Neigh A.M., Spencer M.T., Nguyen O.T., Oldenburg S.J. (2008) Nanoparticles characteristics affecting environmental fate and transport through soil. Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 28, No. 6: 1191-1199

Da Silva L.C., Oliva M.A., Azevedo A.A., De Araujo M.J. 2006. Response of restinga plant species to pollution from an iron pelletization factory. Water, Air and Soil Pollution, 157: 241-256

Dat J., Vandenabeele S., Vranová E., Van Montagu M., Inzé D., Van Breusegem F. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. CLMS Cellular and Molecular Life Sciences, 57: 779-795

Drobne D. 2007. Nanotoxicology for safe and sustainable nanotechnology. Arh Hig Rada Toksikol, 58: 471-478

Dutta A., Das D., Grilli M.L., Di Bartolomeo E., Traversa E., Chakravorty D. 2003. Preparation of sol-gel nano-composites containing copper oxide and their gas sensing properties. Journal of Sol-Gel Science and Technology, 26: 1085-1089

EIAmin A. 2006. Nanotech database compiles consumer items on the market. William Reed Business Media SAS (2011)

<http://www.foodproductiondaily.com/Supply-Chain/Nanotech-database-compiles-consumer-items-on-the-market> (25.julij 2011)

Gabbay J., Mishal J., Magen E., Zatcoff R., Shemer-Avni Y., Borkow G. 2005. Copper Oxide Impregnated Textiles with Potent Biocidal Activities. Journal of Industrial Textiles, Vol. 35, No. 4: 323-335

Hegedüs A., Erdei S., Horváth G. 2001. Comparative studies of H_2O_2 detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. Plant Science, 160: 1085-1093

Harris A.T., Bali R. 2008. On the formation and extent of uptake of silver nanoparticles by live plants. Journal of Nanoparticles Research, 10: 691-695

Heinlaan M., Ivask A., Blinova I., Dubourguier H.C., Kahru A. 2008. Toxicity of nanosized and bulk ZnO , CuO in TiO_2 to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. Chemosphere, 71: 1308-1316

Hou W., Chen X., Song G., Wang Q., Chang C.C. 2007. Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*). Plant Physiology and Biochemistry 45: 62-69

Hostyněk J.J., Maibach H.I. 2003. Copper hypersensitivity: dermatologic aspects—an overview. Rev. Environ. Health, 18: 153-183

Jeong C.H., Hopke P.K., Chalupa D., Utell M. 2004. Characteristics of Nucleation and Growth Events of Ultrafine Particles Measured in Rochester, NY. Environmental science and technology, Vol. 38, No.7

Kasemets K., Ivask A., Dubourguier H.C., Kahru A. 2009. Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO₂ to yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Toxicology in Vitro, 23: 1116-1122

Klockenkämper R., von Bohlen A. 2001. Total-reflection X-ray fluorescence moving towards nanoanalysis: a survey. Spectrochimica Acta Part B, 56: 2005-2018

Kopušar N. 2009. Spremljanje kazalnikov oksidativnega stresa pri rastlinah kot tretja raven ekološko informacijskega sistema onesnaženosti zraka. Doktorsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

KrishnaRaj S., Dan T.V., Saxena P.K. 2006. A Fragrant Solution to Soil Remediation. International Journal of Phytoremediation, Vol. 2: 117-132

Kump P. 1994. Rentgenska fluorescenčna spektroskopija s totalnim odbojem (XTRF). Vakuumist, 14,4

Lee W., An Y., Yoon H., Kweon H. 2008. Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants mung bean (*Phaseolus radiatus*) and wheat (*Triticum aestivum*): plant agar test for water-insoluble nanoparticles. Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 27, No. 9: 1915-1921

Likar M., Vogel-Mikuš K., Regvar M., 2008. Praktikum fiziologije rastlin. Ljubljana

Lin D., Xing B. 2007. Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. Environmental Pollution, 150: 243-250

Lin D., Xing B. 2008. Root Uptake and Phytotoxicity of ZnO Nanoparticles. Environmental Science & Technology, 42: 5580-5585

Ma X., Geiser-Lee J., Deng Y., Kolmakov A. 2010. Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation. Science of the Total Environment, 408: 0353-3061

Machils L., Torrey J.G. 1956. Plants in Action: A Laboratory Manual of Plants Physiology. W.H. Freeman and Company

Maynard A.D. 2006. Nanotechnology: A Research Strategy for Addressing Risk. Washington, Woodrow Wilson international center for scholars

Marschner H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. 2nd edition. San Diego, Academic press

Martinčič A., Wraber T., Jogan N., Podobnik A., Turk B., Vreš B. 2007. Mala flora Slovenije: Ključ za določanje praprotnic in semenk. 4. dopolnjena in spremenjena izdaja. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 633 str.

Monica R.C., Cremonini R. 2009. Nanoparticles and higher plants. Caryologia, Vol. 62, No. 2: 161-165

Mortimer M., Kasemets K., Kahru A. 2010. Toxicity of ZnO and CuO nanoparticles to ciliated protozoa *Tetrahymena thermophila*. Toxicology, 269: 182-189.

Nair R., Varghese S.H., Nair B.G., Maekawa T., Yoshida Y., Kumar D.S. 2010. Nanoparticulate material delivery to plants. Plant Science, 179: 154-163

Navarro E., Baun A., Behra R., Hartmann N.B., Filser J., Miao A.J., Quigg A., Santschi P.H., Sigg L. 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. Ecotoxicology, 17: 372-386

Navodnik J. 2007. Slovenija je ustvarjena za nanotehnologije: izdelki in tehnologije prihodnosti. Celje, NAVODNIK d.o.o

Nečemer M. 2005. Optimizacija rentgenske fluorescenčne spektrometrije s totalnim odbojem za analizo sledov elementov. Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Nowack B., Bucheli T.D. 2007. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. Environmental Pollution, 150: 5-22

Pisanic T.R., Blackwell J.D., Shubayev V.I., Fiñones R.R., Jin S. 2007. Nanotoxicity of iron oxide nanoparticles internalization in growing neurons. Biomaterials, 28: 2572-2581

Pongrac P. 2004. Privzem in lokalizacija Zn, Cd., in Pb pri ranem mošnjaku (*Thlaspi praecox* Wulf.). Diplomska naloga. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta.

Powers K.W., Brown S.C., Krishna V., Wasdo S.C., Moudgil B.M., Roberts S.M. 2005. Forum series: Research Strategies for Safety Evaluation of Nanomaterials. Part VI. Characterization of Nanoscale Particles for Toxicological Evaluation. Toxicological sciences, 90 (2): 296-303

Razinger J., Dermastia M., Drinovec L., Drobne D., Zrimec A., Dolenc Koce J. 2007. Antioxidative Responses of Duckweed (*Lemna minor* L.) to Short-Term Copper Exposure. Env. Sci. Pollut. Res., 14: 194-201

Razinger J., Dermastia M., Dolenc Koce J., Zrimec A. 2008. Oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.) caused by short-term cadmium exposure. Environmental pollution, 153: 687-694

Remškar M. 2009. Nanodelci in novavnost. Ljubljana, Ministrstvo za zdravje/Urad Republike Slovenije za kemikalije; izdano v okviru EU projekta "Prehodni vir - Kemikska varnost 3"

Schulenburg M. 2006. Nanotehnologija: inovacija za jutrijšnji svet. Luxembourg, Urad za uradne publikacije Evropskih skupnosti

Schützendübel A., Polle A. 2001. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 53, No. 372: 1351-1365

Sioutas C., Delfino R.J., Singh M. 2005. Exposure assessment for atmospheric ultrafine particles (UFPs) and implications in epidemiologic research. *Environmental Health Perspective*, 113: 947-955.

Stampoulis D., Sinha S. K., White J. C. 2009. Assay-Dependent Phytotoxicity of Nanoparticles to Plants. *Environmental Science & Technology*, Vol. 43, No. 24: 9473-9479

Stefels J. 2000. Biological aspects of production and conversion of DMSP in marine algae and higher plants. *Journal of Sea Research* 43: 183-197

Strlič T. 2008. Odziv male vodne leče (*Lemna minor* L.) na prisotnost kadmija. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

Sunflower. 2011. Wikimedia Foundation, Inc. (9. maj 2011).
<http://en.wikipedia.org/wiki/Sunflower> (11. maj 2011)

Šuput D., Kamarić L. 1998. Prosti radikali. V: Izbrana poglavja iz patološke fiziologije. Ribarič S. (ur.), Ljubljana: 23-43

Trnamittance. 2011. Wikimedia Foundation, Inc. (22. julij 2011)
<http://en.wikipedia.org/wiki/Transmittance> (6. avgust 2011)

Uriu-Adams J., Keen C.L. 2005. Copper, oxidative stress, and human health. *Molecular Aspects of Medicine*, Vol. 26: 268-298

Zhang W.X., Elliot D.W. 2006. Applications of Iron Nanoparticles for Groundwater Remediation. *Remediation*, 16: 7-21

Zhu H., Han J., Xiao J.Q., Jin J. 2008. Uptake, translocation and accumulation of manufactured iron oxide nanoparticles by pumpkin plants. *Journal of Environmental Monitoring*, 10: 713-717

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Katarini Vogel-Mikuš in somentorici doc. dr. Jasni Dolenc Koce za veliko pomoč, nasvete in razumevanje pri izdelavi diplomskega dela.

Hvala ker sta me vodili in mi pomagali na vsakem koraku.

Hvala tudi Špeli, Matevžu in Mileni, za vse nasvete in usmeritve.

Hvala Evi Kovačec za veliko pomoč pri izvedbi poskusov.

Iskrena hvala tudi dr. Petru Kumpu in dr. Marijanu Nečemru z Instituta "Jožef Stefan" za pomoč pri meritvah koncentracije elemntov z metodo TXRF.

Zahvaljujem se tudi recenzentki diplomskega dela, prof. dr. Marjani Regvar.

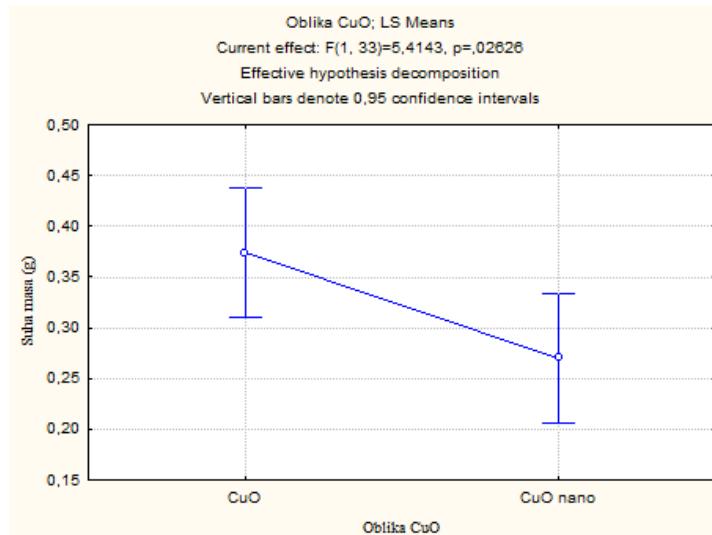
Posebna zahvala gre mojim domačim in prijateljem, ki so me spodbujali in podpirali pri tem študiju.

PRILOGE

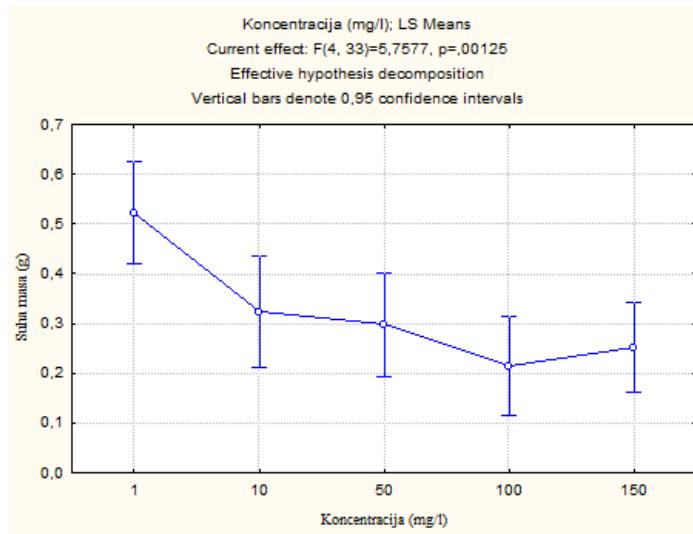
PRILOGA A

Vpliv oblike in koncentracije CuO na biomaso korenin tretiranih rastlin

a.)



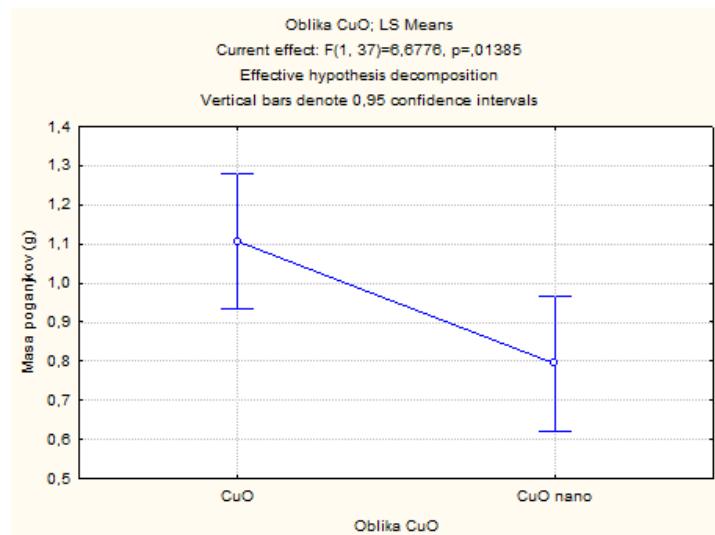
b.)



Slika: Vpliv oblike (a.) in koncentracije (b.) CuO na biomaso korenin ($N_{(CuO\ nano)}=22$, $N_{(CuO\ standard)}=21$, $p<0,05$).

PRILOGA B

Vpliv oblike CuO na biomaso poganjkov tretiranih rastlin

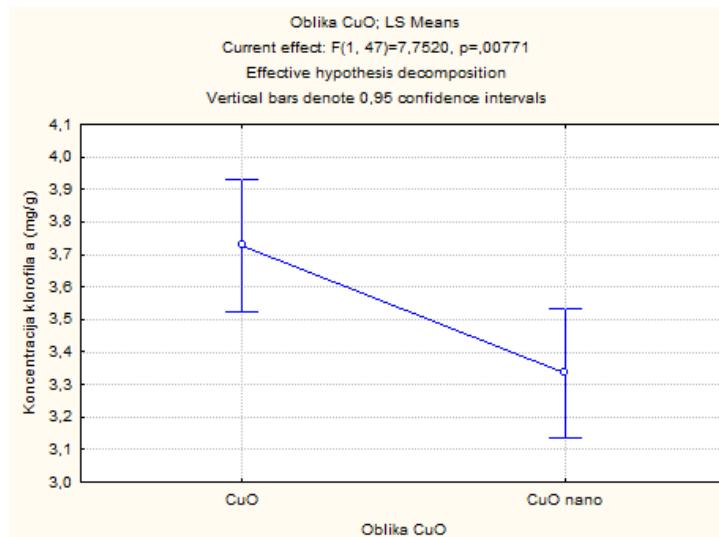


Slika: Vpliv oblike CuO na biomaso poganjkov ($N_{(CuO\ nano)} = 24$, $N_{(CuO\ standard)} = 23$, $p < 0,05$).

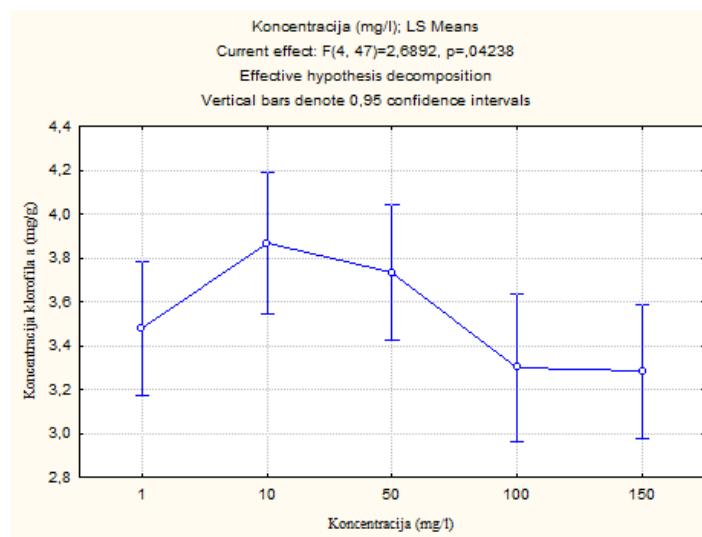
PRILOGA C

Vpliv oblike in koncentracije CuO na koncentracijo klorofila a pri tretiranih rastlinah

a.)



b.)

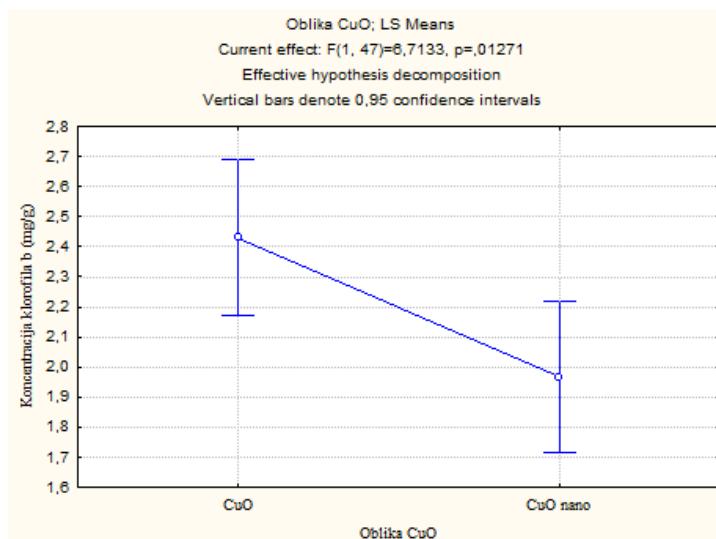


Slika: Vpliv oblike (a.) in koncentracije (b.) CuO na koncentracijo klorofila a pri tretiranih rastlinah ($N_{(CuO\ nano)}=29$, $N_{(CuO\ standard)}=28$, $p<0,05$).

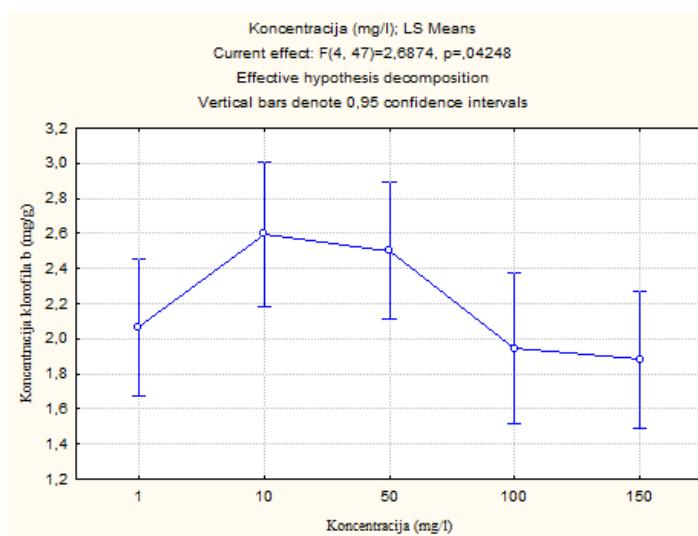
PRILOGA D

Vpliv oblike in koncentracije CuO na koncentracijo klorofila b pri tretiranih rastlinah

a.)



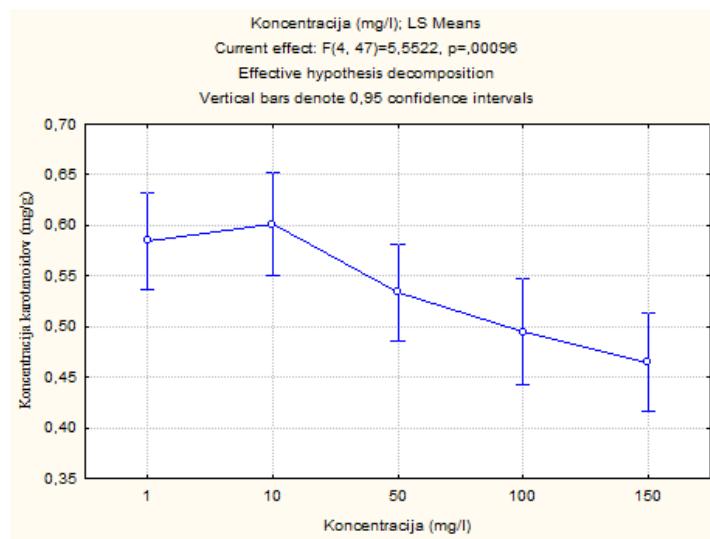
b.)



Slika: Vpliv oblike (a.) in koncentracije (b.) CuO na koncentracijo klorofila b pri tretiranih rastlinah ($N_{(CuO\ nano)}=29$, $N_{(CuO\ standard)}=28$, $p<0,05$).

PRILOGA E

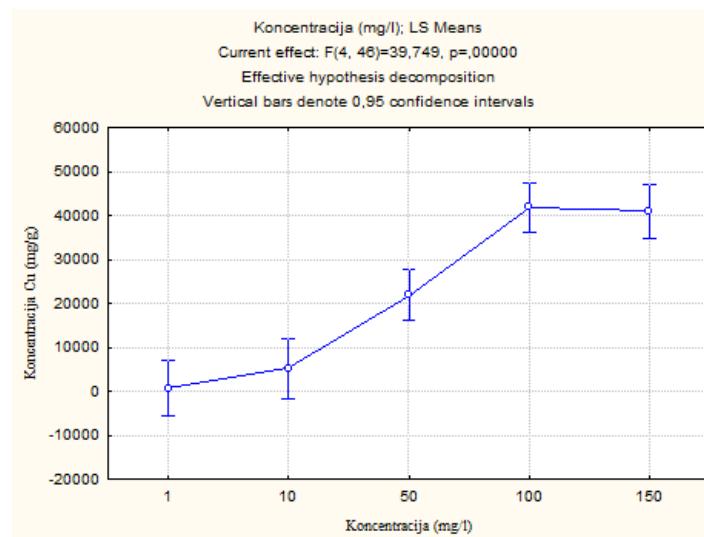
Vpliv koncentracije CuO na koncentracijo karotenoidov pri tretiranih rastlinah



Slika: Vpliv koncentracije CuO na koncentracijo karotenoidov pri tretiranih rastlinah
($N_{(CuO \text{ nano})} = 29$, $N_{(CuO \text{ standard})} = 28$, $p < 0,05$).

PRILOGA F

Vpliv koncentracije CuO na koncentracijo bakra v koreninah tretiranih rastlin

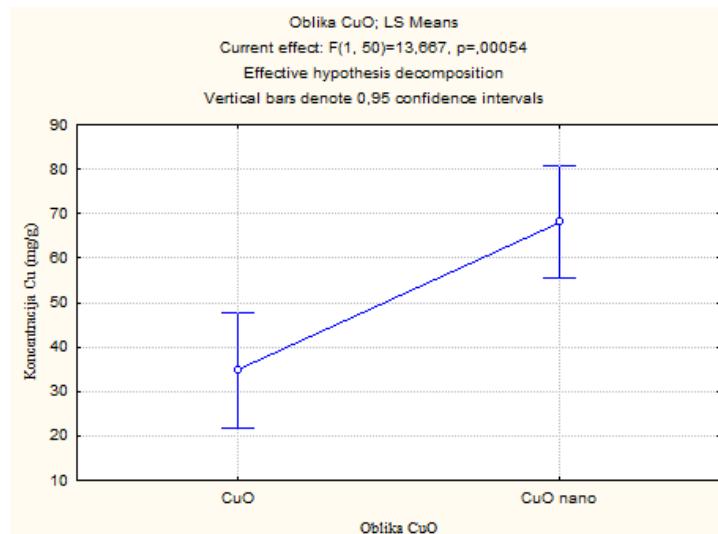


Slika: Vpliv koncentracije CuO na koncentracijo Cu v koreninah tretiranih rastlin
($N_{(CuO\ nano)} = 27$, $N_{(CuO\ standard)} = 29$, $p < 0,05$).

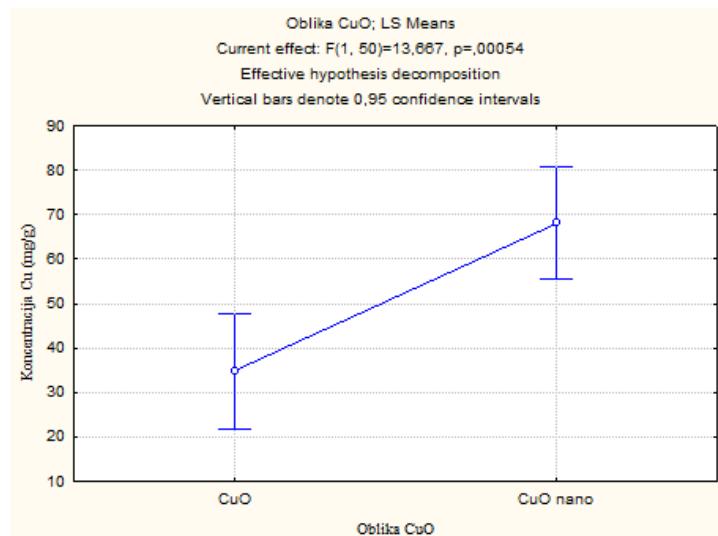
PRILOGA G

Vpliv oblike in koncentracije CuO na koncentracijo bakra v poganjkih tretiranih rastlin

a.)



b.)

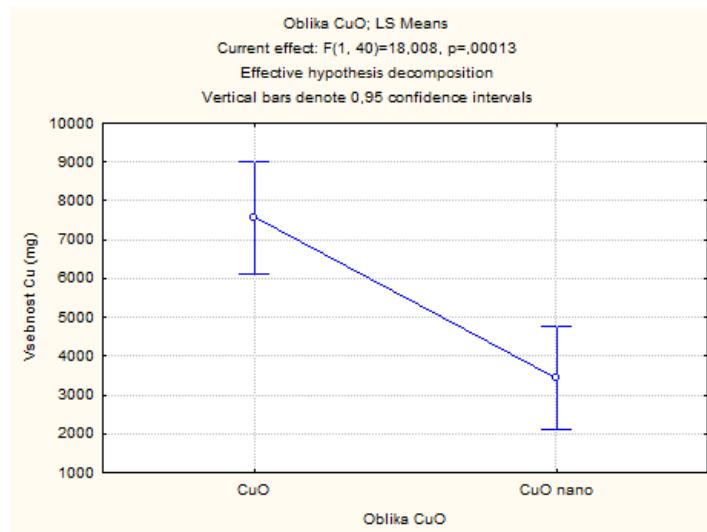


Slika: Vpliv oblike (a.) in koncentracije (b.) CuO na koncentracijo Cu v poganjkih tretiranih rastlin ($N_{(CuO\ nano)}=31$, $N_{(CuO\ standard)}=29$, $p<0,05$).

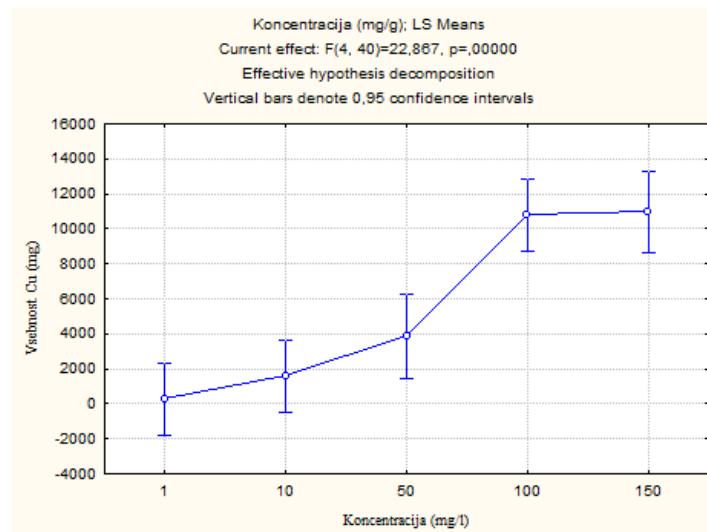
PRILOGA H

Vpliv oblike in koncentracije CuO na vsebnost bakra v koreninah tretiranih rastlin

a.)



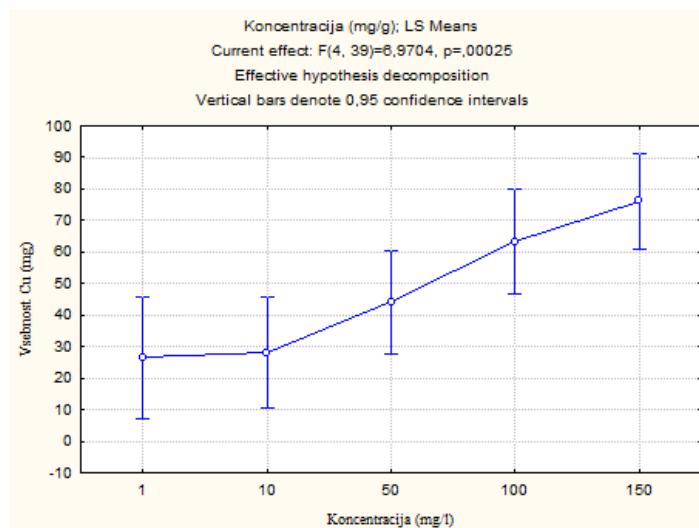
b.)



Slika: Vpliv oblike (a.) in koncentracije (b.) CuO na vsebnost Cu v koreninah tretiranih rastlin
($N_{(CuO\ nano)}=31$, $N_{(CuO\ standard)}=29$, $p<0,05$).

PRILOGA I

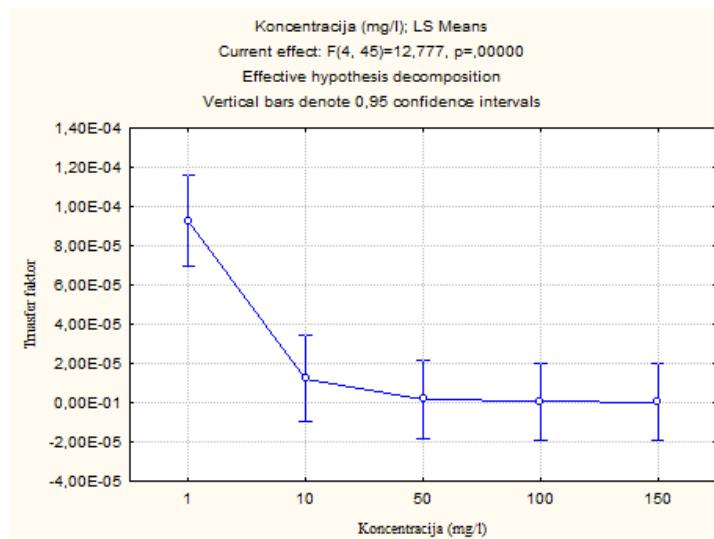
Vpliv koncentracije CuO na vsebnost bakra v poganjkih tretiranih rastlin



Slika: Vpliv koncentracije CuO na vsebnost Cu v poganjkih tretiranih rastlin
($N_{(CuO\ nano)} = 31$, $N_{(CuO\ standard)} = 29$, $p < 0,05$).

PRILOGA J

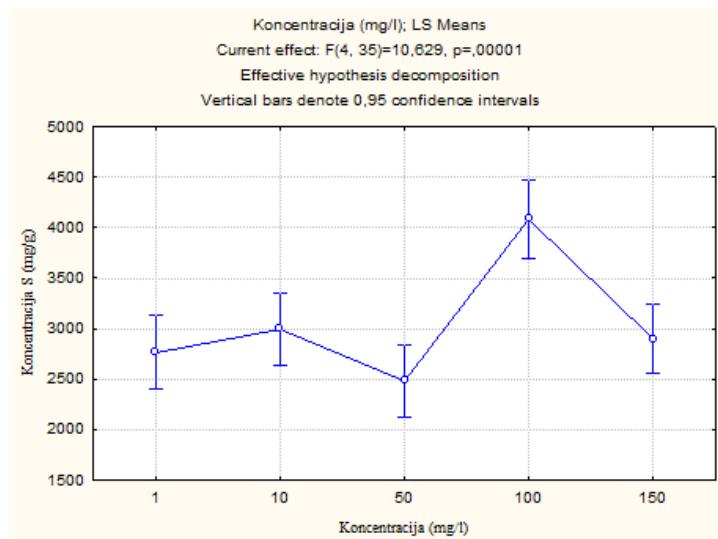
Vpliv koncentracije CuO na vrednosti transportnega indeksa tretiranih rastlin



Slika: Vpliv koncentracije CuO na vrednosti transportnega indeksa ($N_{(\text{CuO nano})} = 27$, $N_{(\text{CuO standard})} = 28$, $p < 0,05$).

PRILOGA K

Vpliv koncentracije CuO na koncentracijo žvepla v koreninah tretiranih rastlin

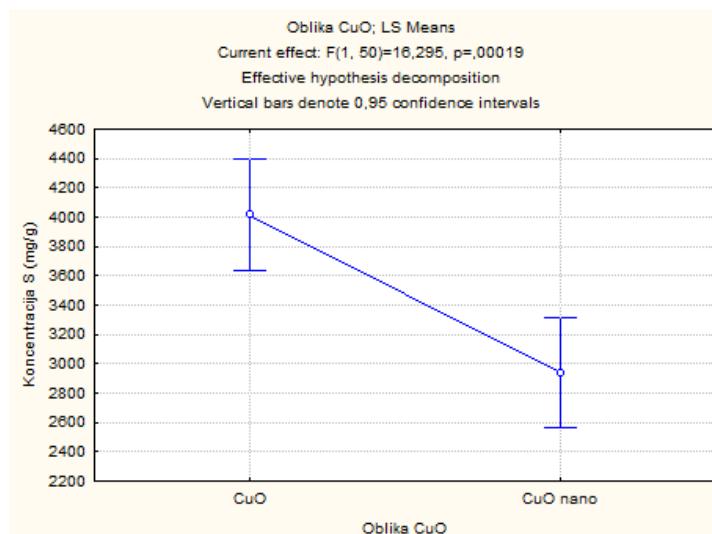


Slika: Vpliv koncentracije CuO na koncentracijo S v koreninah tretiranih rastlin
($N_{(CuO\ nano)}=20$, $N_{(CuO\ standard)}=25$, $p<0,05$).

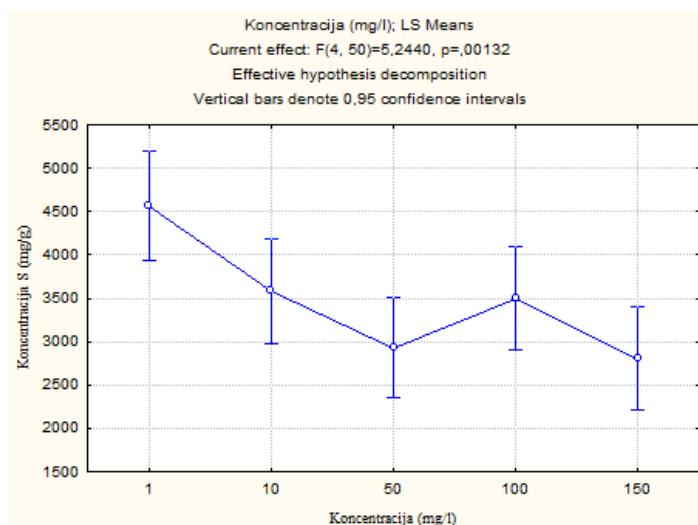
PRILOGA L

Vpliv oblike in koncentracije CuO na koncentracijo žvepla v poganjkih tretiranih rastlin

a.)



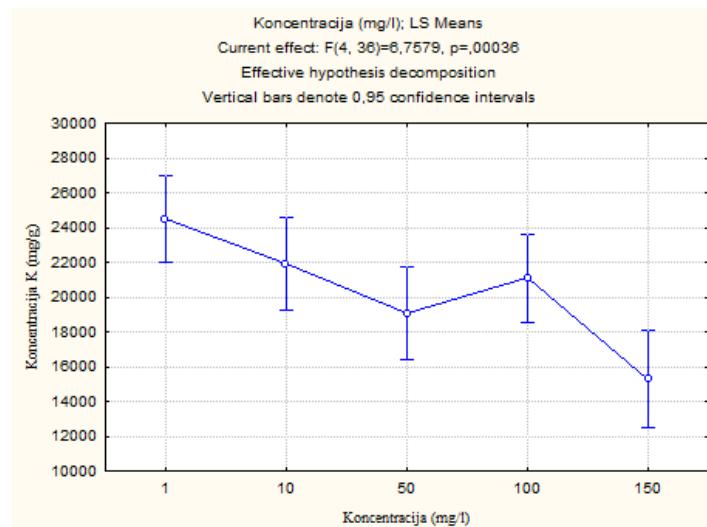
b.)



Slika: Vpliv oblike (a.) in koncentracije (b.) CuO na koncentracijo S v poganjkih tretiranih rastlin ($N_{(CuO \text{ nano})} = 31$, $N_{(CuO \text{ standard})} = 29$, $p < 0,05$).

PRILOGA M

Vpliv koncentracije CuO na koncentracijo kalija v poganjkih tretiranih rastlin

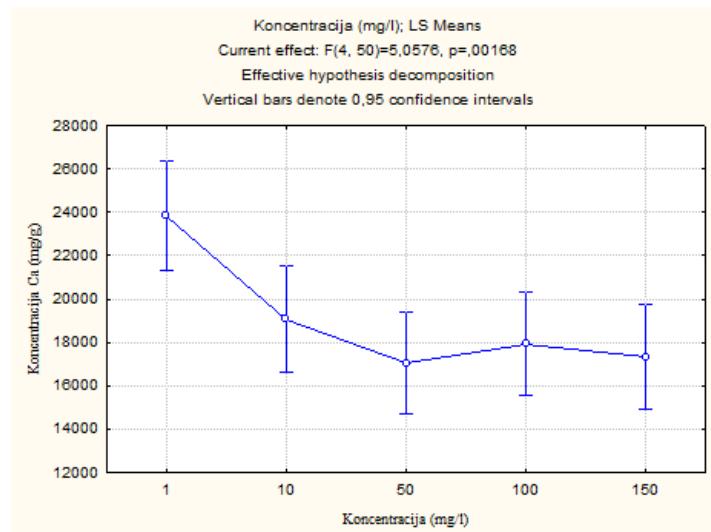


Slika: Vpliv koncentracije CuO na koncentracijo K v koreninah tretiranih rastlin
($N_{(\text{CuO nano})} = 22$, $N_{(\text{CuO standard})} = 24$, $p < 0,05$).

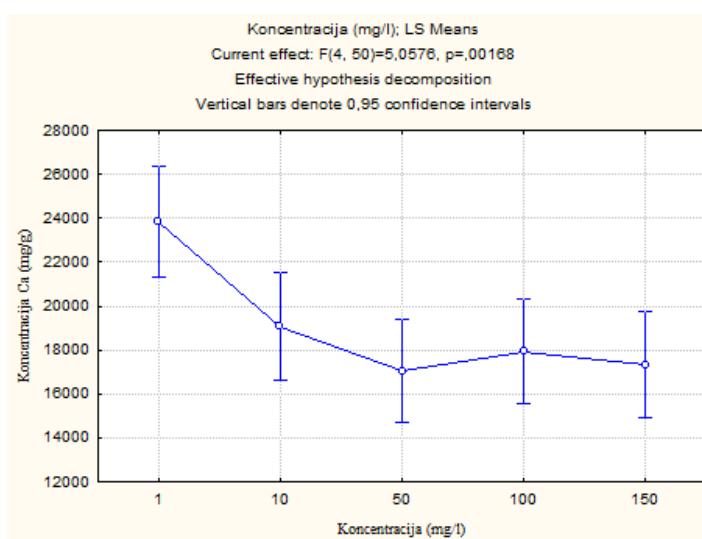
PRILOGA N

Vpliv koncentracije CuO na koncentracijo kalcija v poganjkih in koreninah tretiranih rastlin

a.)



b.)

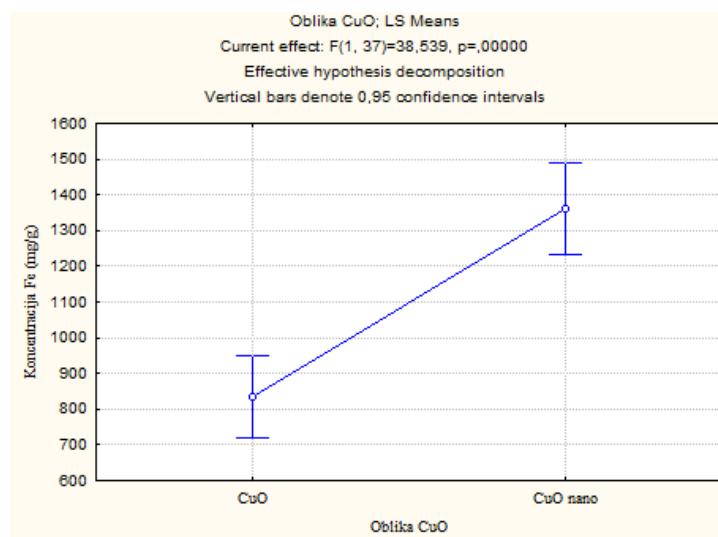


Slika: Vpliv koncentracije CuO na koncentracijo Ca v koreninah (a) in poganjkih (b.) tretiranih rastlin ($N_{(CuO \text{ nano-korenine})} = 23$, $N_{(CuO \text{ standard-korenine})} = 31$, $N_{(CuO \text{ nano-poganjki})} = 31$, $N_{(CuO \text{ standard-poganjki})} = 29$, $p < 0,05$).

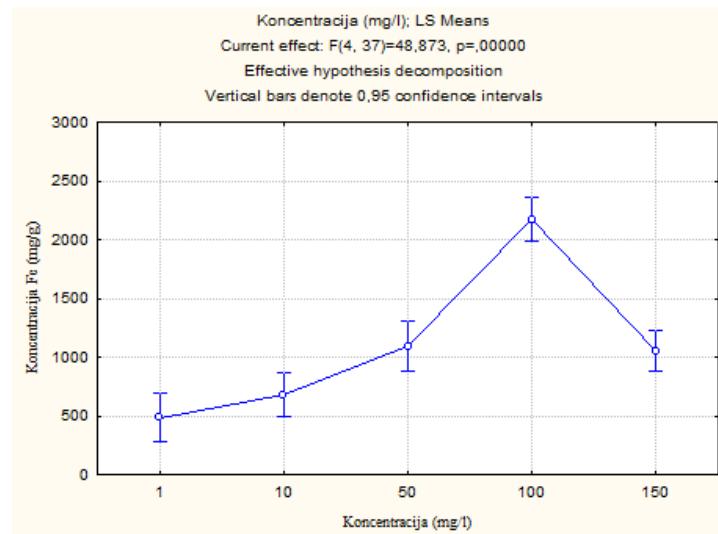
PRILOGA O

Vpliv oblike in koncentracije CuO na koncentracijo železa v koreninah tretiranih rastlin

a.)



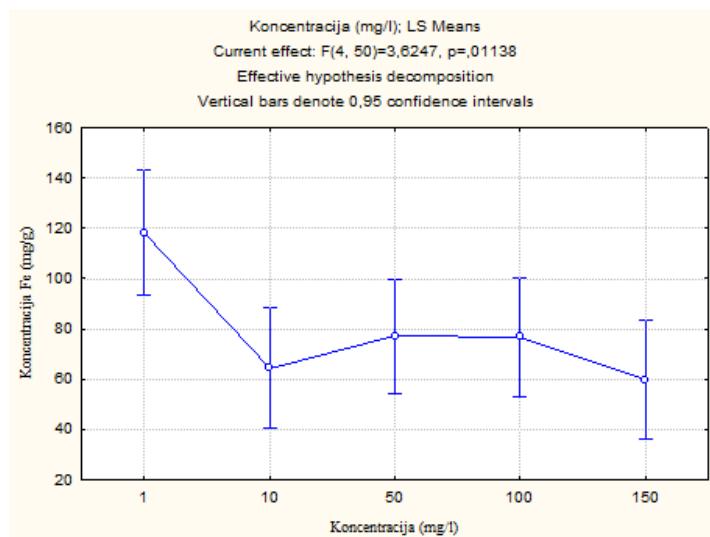
b.)



Slika: Vpliv oblike (a.) in koncentracije (b.) CuO, na koncentracijo Fe v koreninah tretiranih rastlin
(N_(CuO nano)= 21, N_(CuO standard)= 26, p<0,05).

PRILOGA P

Vpliv koncentracije CuO na koncentracijo železa v poganjkih tretiranih rastlin

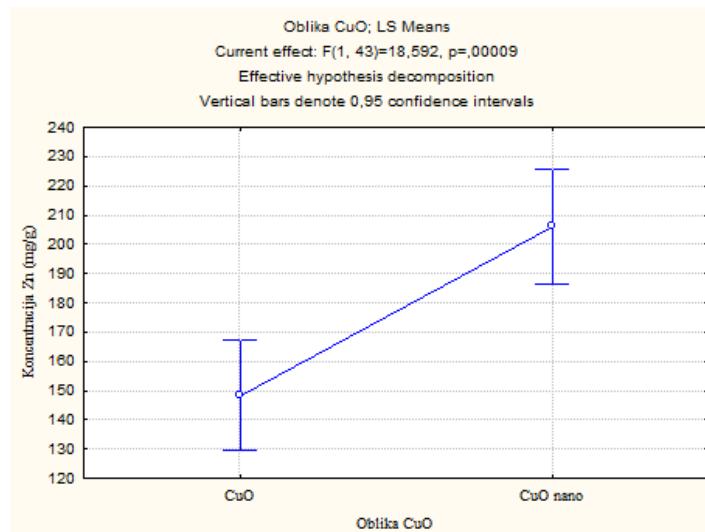


Slika: Vpliv koncentracije CuO na koncentracijo Fe v poganjkih tretiranih rastlin
($N_{(\text{CuO nano})} = 31$, $N_{(\text{CuO standard})} = 29$, $p < 0,05$).

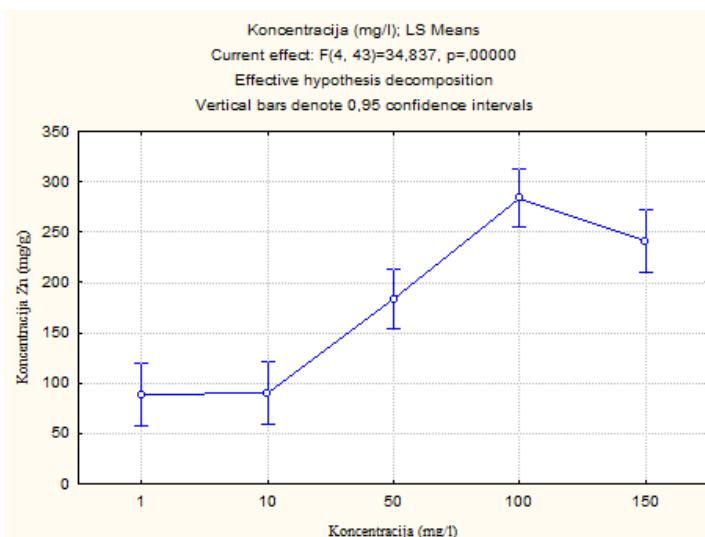
PRILOGA R

Vpliv oblike in koncentracije CuO na koncentracijo cinka v koreninah tretiranih rastlin

a.)



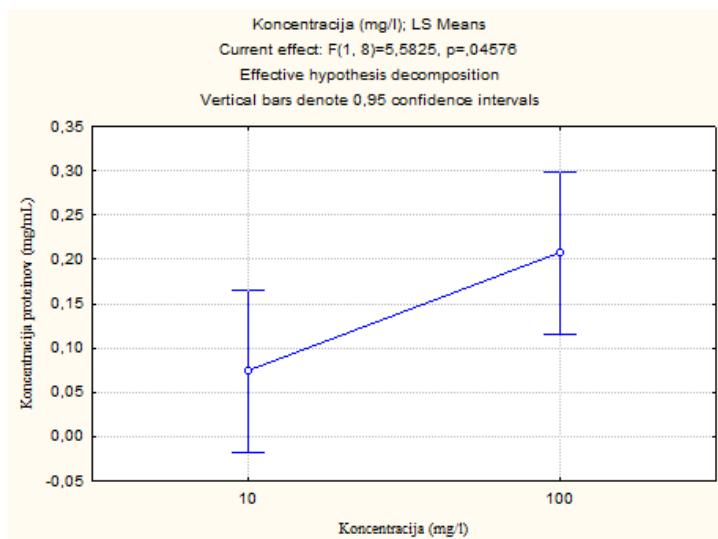
b.)



Slika: Vpliv oblike (a.) in koncentracije (b.) CuO na koncentracijo Zn v koreninah tretiranih rastlin
($N_{(CuO\ nano)}=25$, $N_{(CuO\ standard)}=28$, $p<0,05$).

PRILOGA S

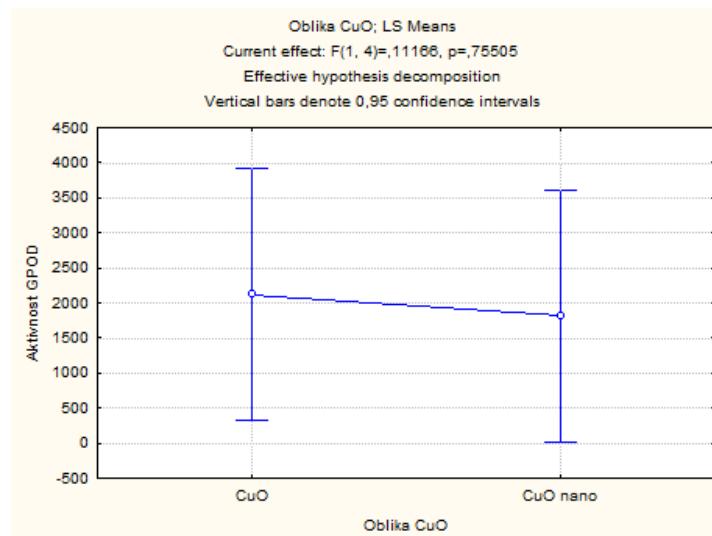
Vpliv koncentracije CuO na koncentracijo proteinov v koreninah tretiranih rastlin



Slika: Vpliv koncentracije CuO na koncentracijo proteinov v koreninah ($N_{(CuO \text{ nano})} = 6$, $N_{(CuO \text{ standard})} = 6$, $p < 0,05$).

PRILOGA T

Vpliv oblike CuO na specifično encimsko aktivnost G-POD v poganjkih tretiranih rastlin

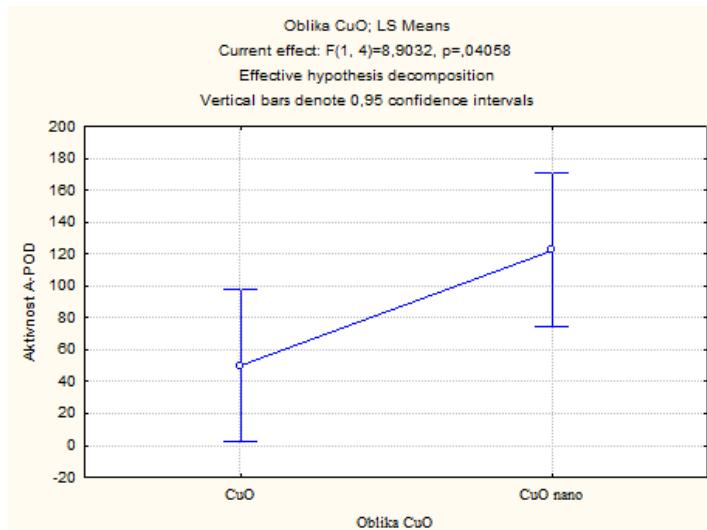


Slika: Vpliv oblike CuO na specifično encimsko aktivnost G-POD v poganjkih ($N_{(CuO\ nano)} = 4$, $N_{(CuO\ standard)} = 4$, $p < 0,05$).

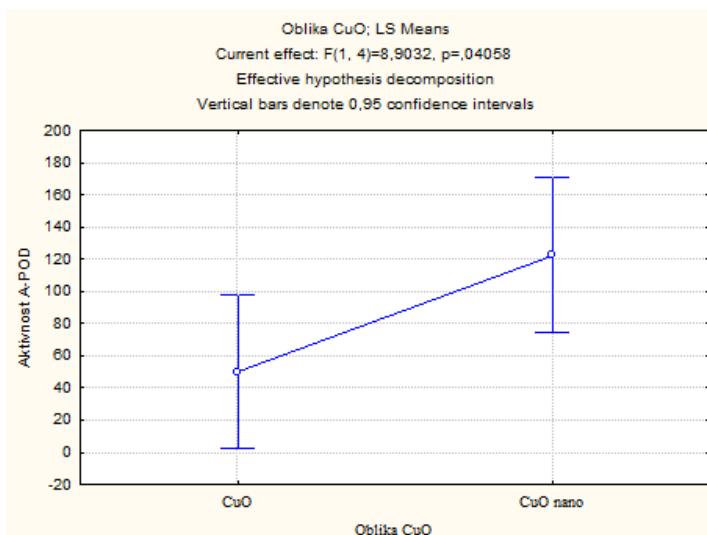
PRILOGA U

Vpliv oblike CuO na specifično encimsko aktivnost A-POD v koreninah in poganjkih tretiranih rastlin

a.)



b.)

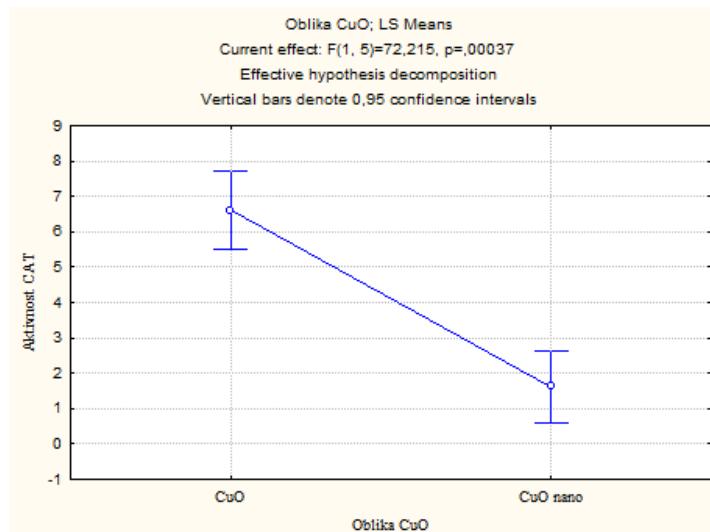


Slika 26: Vpliv oblike CuO na specifično encimsko aktivnost A-POD v koreninah (a.) in poganjkih (b.) tretiranih rastlin ($N_{(CuO\ nano-korenine)} = 4$, $N_{(CuO\ standard-korenine)} = 4$, $N_{(CuO\ nano-poganjki)} = 6$, $N_{(CuO\ standard-poganjki)} = 6$, $p < 0,05$).

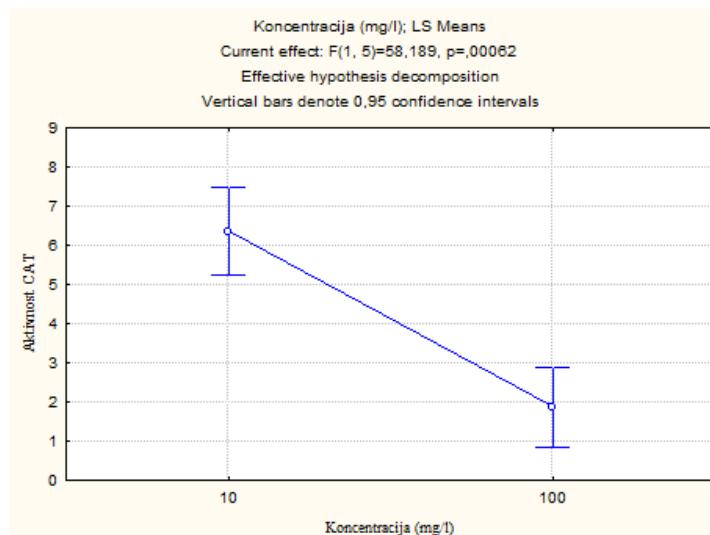
PRILOGA V

Vpliv oblike in koncentracije CuO na specifično encimsko aktivnost CAT v koreninah tretiranih rastlin

a.)



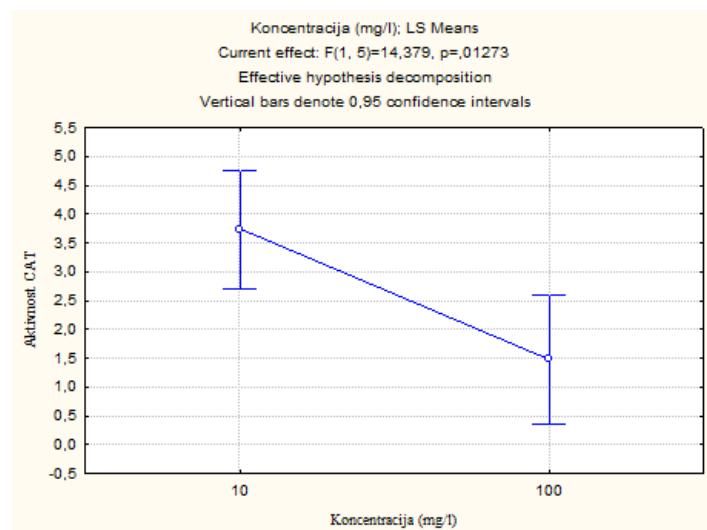
b.)



Slika: Vpliv oblike (a.) in koncentracije (b.) CuO na specifično encimsko aktivnost CAT v koreninah tretiranih rastlin ($N_{(CuO\ nano)} = 5$, $N_{(CuO\ standard)} = 4$, $p < 0,05$).

PRILOGA Z

Vpliv koncentracije CuO na specifično encimsko aktivnost CAT v poganjkih tretiranih rastlin



Slika: Vpliv koncentracije na specifično encimsko aktivnost CAT v poganjkih tretiranih rastlin ($N_{(\text{CuO nano})} = 5$, $N_{(\text{CuO standard})} = 4$, $p < 0,05$).

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Marta FRLIC

**VPLIV NANODELCEV BAKROVEGA OKSIDA NA RAST IN
RAZVOJ SONČNICE (*Helianthus annuus*)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011