

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Katja KLANČNIK

**UČINKI NANODELCEV TITANOVEGA DIOKSIDA
NA KORENINE NAVADNE ČEBULE (*Allium cepa* L.)**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Katja KLANČNIK

**UČINKI NANODELCEV TITANOVEGA DIOKSIDA NA KORENINE
NAVADNE ČEBULE (*Allium cepa* L.)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE EFFECTS OF NANOPARTICLES OF TITANIUM DIOXIDE ON
THE ROOTS OF ONION (*Allium cepa* L.)**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

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.

Komisija za študijske zadeve Oddelka za biologijo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Damjano Drobne in za somentorico doc. dr. Jasno Dolenc Koce.

Komisija za oceno in zagovor:

- Predsednica: prof. dr. Marjana REGVAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Članica: prof. dr. Damjana DROBNE
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Članica: doc. dr. Jasna DOLENC KOCE
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Članica: prof. dr. Marina DERMASTIA
Nacionalni inštitut za biologijo

Datum zagovora: 30. september 2009

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

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

Katja Klančnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK 581.1:635.25:546.3(043.2)=163.6
- KG nanodelci / titanov dioksid / čebulni test (test *Allium*) / strupenost / UV- A sevanje / mitotski indeks / kromosomske aberacije / mikrojedra
- AV KLANČNIK, Katja
- SA DROBNE, Damjana (mentorica) / DOLENC KOCE, Jasna (somentorica)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2009
- IN UČINKI NANODELCEV TITANOVEGA DIOKSIDA NA KORENINE ČEBULE (*Allium cepa* L.)
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP IX, 62 str., 6 pregl., 21 sl., 50 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Raziskali smo vpliv nanodelcev titanovega dioksida (TiO_2) na korenine čebule (*Allium cepa* L.). Ugotavljali smo strupeno delovanje nanodelcev na koreninski meristem v odsotnosti in prisotnosti UV-A sevanja. Za vrednotenje vplivov nanodelcev smo uporabili standardno metodo čebulni test (test *Allium*), kjer smo čebule izpostavili nanodelcem v koncentracijah od 0,1 do 1000 $\mu\text{g/ml}$ TiO_2 . Odzive rastlin smo spremljali na makroskopskem in mikroskopskem nivoju. Z meritvami dolžine korenin in njihovo številčnostjo smo ugotavljali vpliv nanodelcev na rast in razvoj koreninskega sistema čebule po 72-urni izpostavitvi rastlin. Prisotnost nanodelcev v testnih raztopinah ni zavirala rasti in razvoja korenin čebule. Za opazovanje mikroskopskih parametrov smo po 24-urni in 72-urni izpostavitvi korenine fiksirali in pobarvali s Feulgenovo reakcijo. Na mikroskopskih preparatih smo določili mitotski indeks, deleže faz mitoze ter frekvenco pojavljanja kromosomskih aberacij in mikrojedr. Tako smo dobili podatke o vplivih testiranih nanodelcev na aktivnost koreninskega meristema čebule in ovrednotili njihovo genotoksično delovanje. Ugotovili smo, da nanodelci TiO_2 v izbranih testnih koncentracijah niso imeli večjega vpliva na mitotski indeks, deleži faz mitoze so ohranjali razmerje, primerljivo z negativno kontrolo. Prav tako nismo opazili statistično značilno povečanega pojavljanja kromosomskih aberacij in mikrojedr v koreninskih vršičkih, ki so rasli v raztopinah z dodanimi nanodelci. Strupeni učinki nanodelcev TiO_2 v izbranih koncentracijah niso bili potrjeni ne glede na koncentracijo nanodelcev, čas izpostavitve in prisotnost oz. odsotnost UV-A sevanja.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC 581.1:635.25:546.3(043.2)=163.6
- CX nanoparticles / titanium dioxide / onion test (test *Allium*) / toxicity / UV-A radiation / mitotic index / chromosomal aberrations / micronuclei
- AU KLANČNIK, Katja
- AA DROBNE, Damjana (supervisor) / DOLENC KOCE, Jasna (co-supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
- PY 2009
- TI THE EFFECTS OF NANOPARTICLES OF TITANIUM DIOXIDE ON THE ROOTS OF ONION (*Allium cepa* L.)
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO IX, 62 p., 6 tab., 21 fig., 50 ref.
- LA sl
- AL sl/en
-
- AB We investigated the effects of nanoparticles of titanium dioxide (TiO₂) on the roots of onion (*Allium cepa* L.). We were trying to determine the toxic effects of nanoparticles on the root meristem in combination with UV-A radiation. To evaluate the effects of nanoparticles we used a standard biotest, *Allium* test, where we exposed the plants to nanoparticles at concentrations from 0.1 to 1000 µg /ml TiO₂. We observed the responses of plants on the macroscopic and microscopic level. By measuring the length and abundance of roots we determined the impact of nanoparticles on the growth and development of onion roots after 72-hour exposure. The presence of nanoparticles in the test solutions did not inhibit the root growth and development. Observations of microscopic parameters were made after 24-hour and 72-hour exposure to nanoparticles. The roots were fixed and stained with Feulgen reaction. On each slide we determined the mitotic index, the share of mitotic phases, the frequency of occurrence of chromosome aberrations and micronuclei. Through these procedures we acquired information on the effects of nanoparticles on the activity of the tested root meristem of onion and evaluated their genotoxic activity. TiO₂ nanoparticles in selected test concentrations had no significant effect on the mitotic index, nor on the share of mitotic phases regardless of the time of exposure and presence or absence of UV-A radiation. In most cases the difference in chromosomal aberrations and micronuclei frequency between the tested nano-TiO₂ and the negative control was not significantly different as well.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacij	SKA INFORMACIJA	III
key words documentation		IV
KAZALO VSEBINE		V
KAZALO PREGLEDNIC		VII
KAZALO SLIK		VIII
OKRAJŠAVE		IX
1 UVOD		1
2 PREGLED OBJAV		2
2.1 NANODELCI		2
2.1.1 Nanodelci titanovega dioksida (nano-TiO ₂)		3
2.1.2 Indukcija poškodb celic		4
2.1.2.1 Prehajanje delcev v celice		4
2.1.2.2 Fotokatalitičnost TiO ₂ in oksidativni stres		5
2.1.3 Citotoksičnost in genotoksičnost TiO ₂		6
2.1.3.1 Živalske celice		6
2.1.3.2 Rastline		8
2.2 RASTLINSKI BIOTESTI		9
2.2.1 Čebulni test		10
2.2.1.1 Kromosomske aberacije		11
2.2.1.1 Mikrojedra.....		11
2.2.1.2 Moteni procesi celične delitve		12
2.3 NAMEN DELA IN HIPOTEZE		13
3 MATERIALI IN METODE		14
3.1 RASTLINSKI MATERIAL.....		14
3.2 REAGENTI.....		14
3.3 OPIS POSTOPKOV		15
3.3.1 Vzgoja in priprava korenin		15
3.3.2 Priprava raztopin z nanodelci TiO ₂		15
3.3.3 Izpostavitve testnim raztopinam		16
3.3.4 Izpostavitve testnim raztopinam v kombinaciji z UV-A sevanjem		17
3.3.5 Fiksacija korenin		19
3.3.6 Priprava mikroskopskih preparatov		19
3.3.6.1 Priprava Schiffovega reagenta		20
3.3.6.2 Priprava SO ₂ -vode		20
3.3.7 Analiza mikroskopskih preparatov		21
3.3.6 Statistična analiza.....		23
4 REZULTATI		24
4.1 MAKROSKOPSKA OPAZOVANJA		24
4.1.1 72-urna izpostavitve obsevanim in neobsevanim raztopinam		24
4.1.1.1 Povprečno število korenin.....		24
4.1.1.2 Povprečna dolžina korenin.....		25
4.1.1.3 Dolžina koreninskega sistema.....		26
4.2 MIKROSKOPSKA OPAZOVANJA.....		27

4.2.1 Mitotski indeks (MI)	27
4.2.1.1 72-urna izpostavitev testnim raztopinam	27
4.2.1.2 24-urna izpostavitev testnim raztopinam	31
4.2.2 Deleži posameznih faz mitoze	35
4.2.2.1 72-urna izpostavitev testnim raztopinam	35
4.2.2.2 24-urna izpostavitev testnim raztopinam	38
4.2.3 Genotoksičnost.....	40
4.2.3.1 72-urna izpostavitev testnim raztopinam	40
4.2.3.1 24-urna izpostavitev testnim raztopinam	42
5 RAZPRAVA	45
5.1 MAKROSKOPSKA OPAZOVANJA	45
5.2 MIKROSKOPSKA OPAZOVANJA.....	47
5.2.1 Mitotski indeks.....	47
5.2.1.1 72-urna izpostavitev testnim raztopinam	47
5.2.1.1 24-urna izpostavitev testnim raztopinam	48
5.2.2 Deleži faz mitoze	50
5.2.3 Genotoksičnost.....	51
5.2.3.1 72-urna izpostavitev testnim raztopinam	51
5.2.3.2 24-urna izpostavitev testnim raztopinam	52
5.3 SKLEPI	54
6 POVZETEK	56
7 LITERATURA	58

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Vpliv sevanja UV-A na mitotski indeks po 72-urni izpostavitvi.....	31
Preglednica 2: Vpliv sevanja UV-A na mitotski indeks po 24-urni izpostavitvi.....	35
Preglednica 3: Kromosomske aberacije in mikrojedra v celicah koreninskih vršičkov po 72-urni izpostavitvi testnim raztopinam.....	41
Preglednica 4: Kromosomske aberacije in mikrojedra v celicah koreninskih vršičkov po 24-urni izpostavitvi testnim raztopinam.....	41
Preglednica 5: Statistična analiza pojavljanja kromosomskih aberacij in mikrojedr pri 72-urni izpostavitvi	42
Preglednica 6: Statistična analiza pojavljanja kromosomskih aberacij in mikrojedr v koreninskih vršičkih po 24-urni izpostavitvi.	43

KAZALO SLIK

Slika 1: Prisotnost nanodelcev v različnih potrošniških izdelkih.	3
Slika 2: Prisotnost nanodelcev v različnih potrošniških izdelkih. Podrobnejši pregled kategorije.....	3
Slika 3: Načini prehajanja nanodelcev skozi celično membrano.....	5
Slika 4: Izpostavitve rastlin testnim tekočinam.	17
Slika 5: Poskus z obsevanjem testnih raztopin z UV-A svetlobo.....	18
Slika 6: Pobarvan koreninski vršiček čebule.	20
Slika 7: Faze mitoze v koreninskem vršičku čebule.....	22
Slika 8: Število korenin po 72-urni izpostavitvi testnim raztopinam.	25
Slika 9: Dolžina korenin po 72-urni izpostavitvi testnim raztopinam.	26
Slika 10: Dolžina koreninskega sistema po 72-urni izpostavitvi testnim raztopinam.....	27
Slika 11: Mitotski indeks v regiji F0 po 72-urni izpostavitvi neobsevanim testnim raztopinam.....	29
Slika 12: Mitotski indeks v regiji F1 po 72-urni izpostavitvi neobsevanim testnim raztopinam.....	29
Slika 13: Mitotski indeks v regiji F0 po 72-urni izpostavitvi obsevanim testnim raztopinam.	30
Slika 14: Mitotski indeks v regiji F1 po 72-urni izpostavitvi obsevanim testnim raztopinam.	30
Slika 15: Mitotski indeks v regiji F0 po 24-urni izpostavitvi neobsevanim testnim raztopinam.....	32
Slika 16: Mitotski indeks v regiji F1 po 24-urni izpostavitvi neobsevanim testnim raztopinam.....	32
Slika 17: Mitotski indeks v regiji F0 po 24-urni izpostavitvi obsevanim testnim raztopinam.	33
Slika 18: Mitotski indeks v regiji F1 po 24-urni izpostavitvi obsevanim testnim raztopinam.	34
Slika 19: Delež posamezne faze mitoze po 72-urni izpostavitvi nanodelcem TiO ₂	37
Slika 20: Delež faz mitoze po 24-urni izpostavitvi.....	39
Slika 21: Kromosomske aberacije in mikrojedro.....	44

OKRAJŠAVE

DNA	deoksiribonukleinska kislina
EAA	Farmerjev fiksativ
EMS	etilmetanosulfonat
HCl	klorovodikova kislina
konc.	koncentracija
MI	mitotski indeks
ROS	reaktivne kisikove spojine
SiO ₂	silicijev dioksid
SN	standardna napaka
UV	ultravijolična svetloba
TiO ₂	titanov dioksid
Zn	cink
ZnO	cinkov oksid

1 UVOD

Nanotehnologija je v svetu hitro razvijajoča se industrija, ki ima v zadnjem času velik vpliv na ekonomijo, družbo in okolje (Lin in Xing, 2007). Delci, manjši od 100 nm, se vse pogosteje uporabljajo v komercialne namene, saj s svojo majhnostjo dobijo nove fizikalno-kemijske lastnosti. Te pa lahko vplivajo tudi na povečano biološko dostopnost in reaktivnost nanodelcev ter imajo neugoden vpliv na organizme in okolje (Kahru in sod., 2008). Prav ta spoznanja so v zadnjih letih pritegnila veliko pozornosti v raziskave vpliva različnih nanodelcev na organizme. Kljub temu so informacije še vedno pomanjkljive in se ne pojavljajo vzporedno s porastom razvoja nanotehnologije. Omejene informacije, ki se pojavljajo, kažejo, da so lahko nanodelci citotoksični, povzročajo oksidativni stres in/alivnetja. Vse to pa vzbuja dvom in negotovost o varnosti proizvodnje in uporabe nanomaterialov. S hitrim razvojem nanotehnologije je bistvenega pomena poznavanje in razumevanje vplivov nanodelcev, da lahko zmanjšamo potencialna tveganja povezana z njihovo uporabo. Ne samo za zaščito zdravja ljudi, ampak tudi v izogib škodi, ki jo lahko nanotehnologija povzroči v daljšem časovnem obdobju (Singh in sod., 2009).

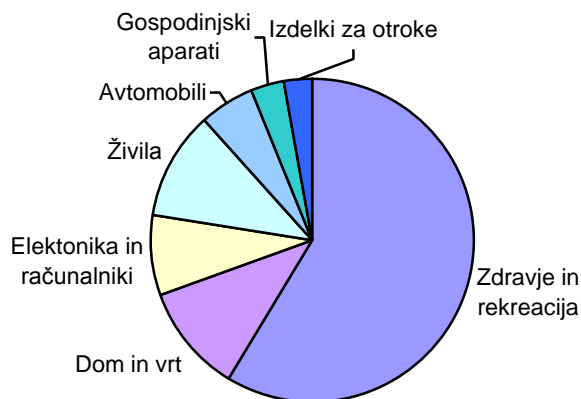
2 PREGLED OBJAV

2.1 NANODELCI

Nanodelci v širšem smislu niso novost ampak imajo tako dolgo zgodovino kot Zemlja sama. V naravi najdemo nanodelce npr. kot koloide humusa, glin in fine delce izpustov v ozračju, katerih vir so lahko vulkanski izbruhi ali gozdni požari (Navarro in sod., 2008). Naravni nanodelci lahko nastanejo z različnimi vremenskimi vplivi, z mikrobno aktivnostjo ali z nastankom jeder v super-nasičenih raztopinah (Wigginton in sod., 2007, cit. po Kahru in sod., 2008).

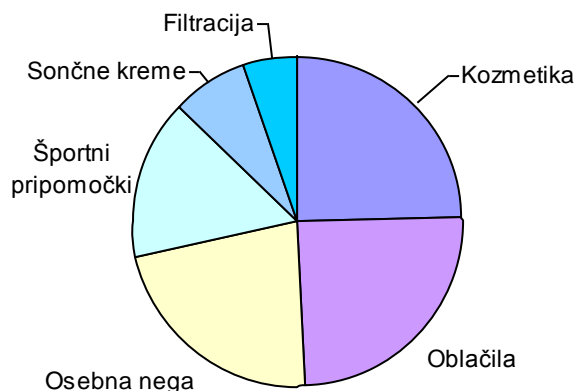
Z besedo nanodelci danes označujemo tudi različne industrijsko proizvedene delce, manjše od 100 nm. Lahko jih najdemo v najrazličnejših oblikah, kot so palčke, cevke, vlakna, kroglice ali v bolj dovršenih strukturah (Imasaka in sod., 2006; Warner in sod. 2008, cit. po Singh in sod., 2009). Nanodelci so lahko neorganski, npr. kovinski oksidi in kovinske soli ali pa organske kemikalije in polimeri. Vsem pa je skupno, da so majhni delci, ki se po fizikalno-kemičnih lastnostih močno razlikujejo od večjih delcev iste snovi (Nel in sod., 2006, cit po. Singh in sod., 2009). Na nanometrskem nivoju se lastnosti snovi bistveno spremenijo, predvsem zaradi povečane specifične površine in reaktivnosti, kar lahko vodi do povečane biološke dostopnosti in strupenosti (Kahru in sod., 2008).

Tehnološki nanodelci se uporabljajo na najrazličnejših področjih; npr. v letalski in vesoljski industriji, nano-elektroniki, medicini, živilski industriji in okoljski remediaciji. Trenutne ocene kažejo, da že več kot 800 potrošniških izdelkov vsebuje nanodelce, ki smo jim organizmi vsakodnevno izpostavljeni. S sedanjim hitrim razvojem nanotehnologije domnevajo, da bomo nanodelcem izpostavljeni v vedno večji meri. Zato je nujno, da z različnimi študijami raziščemo varnost uporabe nanodelcev in njihovo morebitno toksičnost, da bomo lahko v prihodnje ustrezno usmerjali razvoj nanotehnologije (Singh in sod., 2009).



Slika 1: Prisotnost nanodelcev v različnih potrošniških izdelkih.

Povzeto po Singh in sod. (2009).



Slika 2: Prisotnost nanodelcev v različnih potrošniških izdelkih. Podrobnejši pregled kategorije " Zdravje in rekreacija "

Povzeto po Singh in sod. (2009).

2.1.1 Nanodelci titanovega dioksida (nano-TiO₂)

Po podatkih The Nanotechnology Consumer products Inventory so najpogosteje uporabljeni nanodelci ogljika, sledi uporaba srebrovih in kremenovih nanodelcev, nanodelci TiO₂ pa so na 4. mestu po uporabi. Uporabljajo se v farmacevtski in kozmetični industriji, pri proizvodnji živil, barv, oblačil in športne opreme (Singh in sod., 2009). Pogosto se dodajajo kot belo barvilo v tablete, kapsule, sončne kreme, zobne paste, skuto, sire,

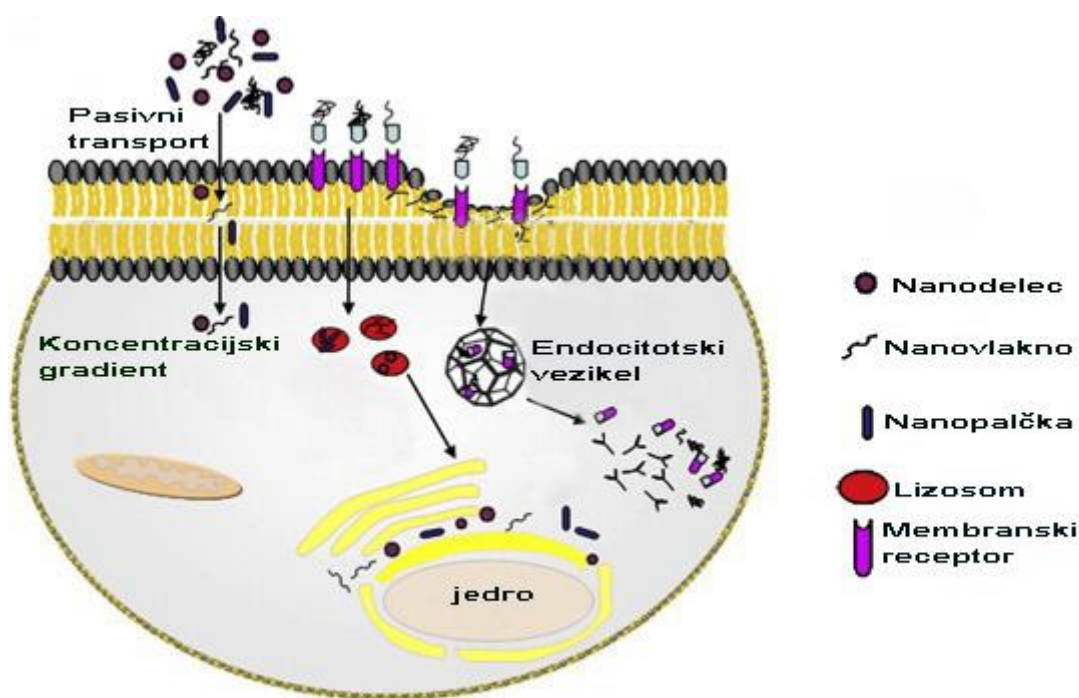
namaze, različne omake, žvečilne gumije, sladkarije in bele barve (Orgon.si, 2006). Zaradi njegovih fotokatalitičnih lastnosti se nano-TiO₂ uporablja tudi v samočistilnih premazih in kot razkužilo. Vključen je v okoljsko remediacijo in v procese čiščenja odpadnih voda (Cho in sod., 2004). TiO₂ so med drugim tudi uporabili v fotodinamični terapiji zdravljenja rakastih celic človeškega debelega črevesa (Zhang in sod., 2004, cit po Singh in sod., 2009). Glede na širok spekter uporabe nano-TiO₂ lahko tudi v prihodnje pričakujemo, da bomo ljudje in okolje vse bolj izpostavljeni tovrstnim nanodelcem (Sigh in sod., 2009).

2.1.2 Indukcija poškodb celic

2.1.2.1 Prehajanje delcev v celice

Rastlinske celice imajo stene, ki so slabo prepustne in dovoljujejo prost prehod le manjšim molekulam, med tem ko omejujejo prehod večjim molekulam. Premer por v celični steni meri od 5 do 20 nm (Navarro in sod., 2008). Tako lahko pasivno prehajajo preko stene samo delci, ki so manjši od premera največjih por. Se pa prepustnost celične stene lahko spremeni med celično delitvijo. Novo nastala celična stena je lahko bolj prepustna za nanodelce (Wessels, 1993; cit po Navarro in sod., 2008). Posledično je lahko neposreden vpliv nanodelcev na celice večji med celično delitvijo. Lin in Xing (2008) navajata, da lahko nanodelci ZnO naredijo tudi luknje v celični steni in tako povečajo njeno prepustnost. Ko delci pridejo skozi steno, naletijo na naslednjo biološko bariero - celično membrano. Potencialne vstopne poti nanodelcev skozi lipidni dvosloj je razložil Moore (2006). Delci lahko skozi membrano prehajajo s procesom endocitoze. Membrana se uviha, delci se obdajo z membrano in vpotegnejo v notranjost celice. Vstop v celico pa je mogoč tudi preko proteinskih prenašalcev ali preko ionskih kanalčkov (slika 3). Ko je delec v celici se lahko poveže z različnimi organeli in vpliva na metabolne procese, npr. v kopičenje reaktivnih kisikovih spojin - ROS v celici (Navarro in sod., 2008). Nato pa lahko prehajajo tudi med celicami preko plazmodezem (Lin in Xing, 2008). Če so delci dovolj majhni lahko prehajajo tudi v jedro ali z difuzijo preko jedrnih por ali se vključijo vanj med celično delitvijo in se potem pojavljajo tudi v hčerinskih celicah. Kadar se nanodelci pojavijo v jedru, je omogočena neposredna povezava med njimi in molekulo DNA ali s proteini, ki so povezani z DNA, kar vodi do poškodb dednega materiala. V raziskavah so namreč dokazali, da lahko nanodelci silicija in TiO₂ vstopijo v jedro, kjer povzročijo agregacijo proteinov, kar lahko prepreči nadaljne celične delitve (Gaiser in sod., 2005; Liu

in sod., 2007, cit. po Singh in sod. 2009). Lin in Xing (2008) sta v svoji raziskavi z nanodelci Zn in ZnO pri ljujki (*Lolium perenne*) ugotovila prisotnost nanodelcev v celicah. Pojavljanje delcev ZnO je bilo omejeno zgolj na korenine. Višje v rastlini se za razliko od Zn delcev, niso pojavljali. Večina delcev ZnO je namreč ostala na površini korenin. V podobni raziskavi 30-nanometrski delci TiO₂, niso prehajali v celice koruze, ampak so se nabirali na celični steni in mašili pore (Asli in Neumann, 2009).



Slika 3: Načini prehajanja nanodelcev skozi celično membrano.

Povzeto po Singh in sod. (2009).

2.1.2.2 Fotokatalitičnost TiO₂ in oksidativni stres

Številne raziskave potrjujejo fotokatalitične lastnosti TiO₂. Absorpcija svetlobe je prvi korak v fotokatalitičnih reakcijah. Ko TiO₂ absorbira svetlobo valovne dolžine manjše od 380 nm, pride do vzbujanja elektronov. Svetloba valovne dolžine 365 nm (UV-A) je najbolj primerna za fotoaktivacijo TiO₂. Ker je naravni vir UV-A sevanja v notranjih prostorih šibek in variabilen, se pri študijah fotokatalitičnosti navadno uporabi umetni vir UV-A svetlobe (Pelton in sod., 2006). Sicer pa so avtorji različnih študij uporabljali različne valovne dolžine UV sevanja za fotoaktivacijo nanodelcev TiO₂.

Pri fotoaktivaciji ima pomembno vlogo prisotnost vodnih molekul. V mnogih primerih foto-aktiviran TiO_2 najprej reagira z vodo. Nato nadaljne reakcije vodijo do nastanka reaktivnih kisikovih spojin (ROS) npr. hidroksidnih (OH^\cdot) in hidroperoksidnih radikalov (O_2H^\cdot), superoksidnih anionov ($\text{O}_2^{\cdot-}$) in vodikovega peroksida (H_2O_2) (Pelton in sod., 2006). Da TiO_2 povzroča nastanek ROS, so v večih raziskavah tudi dokazali (Gurr in sod., 2005; Kang in sod., 2008, cit. po Singh in sod., 2009; Park in sod., 2008,). Park in sod. (2008) so v svojih poskusih ugotovili, da je razporeditev nanodelcev TiO_2 v perinuklearnem delu povezana z nastajanjem ROS v isti regiji.

Porast koncentracije ROS in upad antioksidantov v celici povzroči porušenje ravnotežja med njimi. Poruši se celična homeostaza in nastopi oksidativni stres. Za ROS je značilna visoka reaktivnost, zato lahko reagirajo s celičnimi sestavinami, kot so DNA, proteini in lipidi. Te reakcije vodijo v zmanjšano produktivnost in poškodbe celic, kar se lahko odraža kot vnetje tkiva (Sigh in sod., 2009). Lipidna peroksidacija npr. povzroča spremembe celičnih membran, kar lahko vodi v celično smrt (Rikans in sod., 1997). ROS v reakcijah z DNA povzročijo enoverižne- ali dvoverižne-zlome DNA in spremembe baz. Poškodbe DNA izzovejo različne procese v celici, npr. prenehanje delitev, apoptozo in najpomembneje aktivacijo popravljalnih mehanizmov (Singh in sod., 2009). Poškodbe DNA v celici, nastalih zaradi genotoksičnega delovanja snovi, lahko zaznamo tudi posredno. Prisotnosti nanodelcev TiO_2 namreč aktivira supresorski gen *p53*, ki izzove popravljalne mehanizme v človeških limfocitih iz česar so sklepali, da so nanodelci TiO_2 genotoksični (Kang in sod., 2008, cit. po Singh in sod., 2009).

Da pa nanodelci povzročijo oksidativni stres, ni nujno da v celico vstopijo. Na dogajanje v celici lahko vplivajo tudi preko interakcij s celično površino ali s sproščanjem prostih kovinskih ionov (Singh in sod., 2009).

2.1.3 Citotoksičnost in genotoksičnost TiO_2

2.1.3.1 Živalske celice

Citotoksičnost nanodelcev TiO_2 na živalskih celicah so ob prisotnosti UV sevanja dokazali v večih raziskavah (Cai in sod., 1992; Wang in sod., 2007). Wang in sod. (2007) so zaznali povečano pojavljanje mikro jeder kot posledico nastanka točkastih mutacij in zlomov verig DNA ob prisotnosti nanodelcev TiO_2 . Povečanje frekvence pojavljanja mikro jeder so potrdili tudi Rahman in sod. (2002), ti so celice izpostavili nanodelcem TiO_2 za 12 do 72

ur. Pri 12- in 24-urni izpostavitvi so odkrili tudi koncentracijsko-odvisen odgovor, med tem ko pri daljših izpostavitvah tega niso zaznali. Koncentracijsko povečanje indukcije poškodb DNA pri človeških celicah so s kometnim testom ugotovili tudi Gopalan in sod., 2009. Vendar so fotogenotoksičen odgovor zaznali le pri limfocitih, pri spermijih celicah pa ne. Gurr in sod. (2005) so v svojih raziskavah tudi potrdili, da nano-TiO₂ (10 in 20 nm) povzroča nastanek mikrojedr. Z meritvami lipidne peroksidacije in ROS so potrdili nastanek H₂O₂ in NO. Večji 200 nm veliki delci, niso povzročali nastanka oksidativnega stresa. Torej se zdi, da manjši kot je delec, lažje povzroča oksidativne poškodbe. Fotogenotoksičnost nanodelcev TiO₂ so dokazali v *in vitro* študijah z ribjimi celicami (Reeves in sod., 2008). Celice so izpostavili delcem v koncentracijah 1, 10 in 100 µg/ml. V primeru, ko so bile celice obsevane še z UV-A sevanjem, so potrdili večje število poškodb DNA. Dunford in sod. (1997) so v svoji raziskavi ugotovili, da TiO₂, izoliran iz krem za sončenje pri obsevanju s sončno svetlobo pospeši nastajanje poškodb DNA tako v *in vitro* kot tudi v *in vivo* poskusih. Ob tem se pojavlja vprašanje, ali je uporaba krem za zaščito pred soncem res varna.

Vsem tem raziskavam je skupno, da je do genotoksičnosti prišlo posredno zaradi oksidativnega stresa, ki je nastal ob prisotnosti nanodelcev TiO₂. Genotoksičnosti nanodelcev TiO₂ pa v svoji raziskavi na ovarijskih celicah hrčka niso potrdili Theogaraj in sod. (2007). Spremljali so frekvence kromosomskih aberacij ob prisotnosti UV sevanja in brez njega ter v nobenem primeru niso potrdili negativnega vpliva testnih nanodelcev.

Splošno toksičnost nanodelcev so raziskovali pri različnih testnih organizmih, kot so *E. coli*, *Bacillus subtilis* (Adams in sod., 2006), vodnih bolhah (*Daphnia magna*) in šarenkah (*Oncorhynchus mykiss*) (Federici in sod. 2007). Vendar so bile potrebne izredno visoke koncentracije TiO₂, da je prišlo do toksičnega učinka na izbrane testne organizme, pri kratkotrajni izpostavitvi nanodelcem TiO₂. Pri dolgotrajnejši izpostavitvi (npr. 14 dni), so bile nevarne že bistveno nižje koncentracije izbranih nanodelcev (Federici in sod. 2007). Obsevanost nanodelcev TiO₂ z UV sevanjem je njihovo toksičnost še povečala (Hund-Rinke in sod., 2006, cit po. Kahru in sod., 2008).

Pri vrednotenju toksičnosti in genotoksičnosti TiO₂ imajo poleg izbire testnega organizma in časa izpostavitve, velik pomen tudi abiotični parametri (velikost delcev/agregacija in obsevanje). V poročilih številnih raziskav je opazno pomanjkanje informacij o uporabljenih materialih, kar otežuje primerjavo rezultatov med različnimi raziskavami in dokončno razumevanje vplivov nanodelcev ter pogojev, v katerih delujejo toksično (Singh in sod., 2009).

Raziskovalci še vedno ne razumejo specifičnih mehanizmov nanotoksičnosti, domnevajo pa da je močno odvisna od kemične sestave, strukture, velikosti in površine nanodelcev (Berger, 2007). Najverjetneje pride do interakcij med nanodelci in celično membrano (Valant in sod. 2009). Te interakcije lahko nato sprožijo v celici niz dogodkov. Predvidevajo, da je učinek nanodelcev na biološke sisteme zelo kompleksen in odvisen od mnogih parametrov.

2.1.3.2 Rastline

V primerjavi z živalskimi celicami je bilo na rastlinskih celicah do danes narejenih dosti manj raziskav o toksičnosti nanodelcev. Omejene fitotoksične študije poročajo o pozitivnih in o negativnih vplivih različnih nanodelcev (Lin in Xing, 2007; Yang in Watts, 2005).

Kar nekaj raziskav o vplivih nanodelcev je bilo narejenih na cianobakterijah, ki imajo nekatere značilnosti rastlinskih celic. Kim in sod. (2005) so potrdili foto-toksičnost TiO_2 na cianobakterije, ki so jih obsevali z UV-A sevanjem ob dodatku nano- TiO_2 , zaradi česar se je zmanjšala fotosintezna aktivnost organizmov. Inhibitoren vpliv je bil najmanjši pri predstavnikih rodu *Melosira.*, ti imajo razvito frustulo, ki deloma ščiti pred škodljivimi vplivi. Večjo škodljivost nano- TiO_2 zaradi UV sevanja so dokazali pri vrsti *Chroococcus sp.*, kjer je prišlo do poškodbe membran in posledično do izgube snovi iz celic (Hong in sod., 2005).

Redke raziskave vpliva nano- TiO_2 na višje rastline, dajejo podatke tako o njihovih pozitivnih kot negativnih vplivih. Mešanica nano- SiO_2 in nano- TiO_2 delcev lahko poveča aktivnost nitrat reduktaze pri soji (*Glycine max*), poveča absorpcijo vode, plodnost, stimulira sistem antioksidantov in na splošno ugodno vpliva na kalitev in rast (Lu in sod., 2002, cit. po Lin in Xing, 2007). Rutil nanodelci TiO_2 naj bi v nekaterih koncentracijah pospešili fotosintezo in dušični metabolizem ter izboljšali kalitev in rast špinače. ROS naj bi bili pri kalitvi starih semen celo koristni, saj naj bi izboljšali prediranje semenske ovojnice, privzemanje vode in metabolizem semen. Hitrejša rast špinače naj bi bila posledica boljšega privzemanja hranil in povečani intenzivnosti fotosinteze. Poleg naštetega pa lahko imajo nanodelci TiO_2 tudi antimikrobno delovanje. Foto-sterilizacija pod vplivom TiO_2 bi lahko bila glavni razlog za povečano odpornost rastlin na stres in posledično hitrejšo rast in razvoj (Lei in sod., 2005). V novejših raziskavah pa so Lei in sod. (2007) potrdili pozitiven učinek TiO_2 . Ugotovili so, da so bile poškodbe kloroplastov zaradi UV-B sevanja manjše, če so dodali nano- TiO_2 . Nanodelci so absorbirali UV-B

sevanje in zmanjšali njegov negativen vpliv na kloroplaste. Poleg tega so nanodelci TiO₂ aktivirali antioksidante, ki preprečujejo kopičenje ROS in pripomorejo k ohranjanju homeostaze.

Seeger in Braun (2008) nista ugotovila ne pozitivnih ne negativnih vplivov nanodelcev TiO₂ (25 nm, 100 nm) na vrbo. Rast, transpiracija in izraba vode se zaradi izpostavljenosti TiO₂ niso spremenile. Asli in Neuman (2009) sta v nedavni raziskavi ugotovila, da nanodelci TiO₂ lahko delujejo negativno na rast koruze. Vendar ne gre za neposreden toksičen vpliv delcev, temveč fizikalen vpliv. Rast poganjkov in transpiracija sta se zmanjšala zaradi mašenja por v celičnih stenah. 30 nm veliki delci so bili preveliki, da bi prehajali skozi stene in so se nabirali na stenah. Transport vode skozi steno se je zmanjšal, zato so se na rastlinah pojavili znaki vodnega stresa.

Iz dosedanjih objav raziskav o vplivih nanodelcev TiO₂, je razvidno, da so raziskave narejene na rastlinskem materialu mnogo redkejše v primerjavi z raziskavami na živalskih celicah. Problem redkih fitotoksičnih raziskav nanodelcev TiO₂ je, da se omejijo na splošno toksičnost, ki pa lahko zahteva izpostavitvev organizmov zelo visokim koncentracijam nanodelcev. Pomankljivost teh raziskav je, da prezrejo komaj opazne celične spremembe, na primer na nivoju genoma, do katerih pa lahko pride tudi pri nižjih koncentracijah nanodelcev. Te sicer lahko ne povzročajo celične smrti, pa vendar predstavljajo tveganje za organizem. Zato je pomembno da se v ocenah toksičnosti nanodelcev vključi tudi genotoksične teste za ovrednotenje mutagenega potenciala novih snovi.

2.2 RASTLINSKI BIOTESTI

Zaradi vse večjega onesnaževanja okolja z različnimi snovmi, se je pojavila potreba po hitrih in natančnih metodah za zaznavo in oceno vplivov različnih snovi na organizme. Zato so bili razviti t. i. biološki testi (biotesti), pri katerih žive organizme izpostavimo določenim dejavnikom in opazujemo njihov odziv (Maluszynska in Juchimiuk, 2005). Danes poznamo paleto bioloških testov, s katerimi lahko ugotavljamo toksičnost in genotoksičnost različnih snovi na organizme. Imajo pa rastlinski biotesti nekatere prednosti pred drugimi testnimi sistemi, predvsem zaradi reproduktivnih sposobnosti rastlin, netežavne gojitve in skladiščenja ter nizkih stroškov. S temi testi lahko hitro pridemo do podatkov o celokupnem škodljivem vplivu snovi v okolju na rastline, na nivoju organizma, organov in celic. Postopki testiranja so ponovljivi in primerljivi (Smaka-Kincl, 1993).

2.2.1 Čebulni test

Čebulni test (test *Allium*) je uvedel Levan leta 1938, ko je raziskoval vpliv kolhicina na rastlinskih celicah. Danes je čebulni test eden od rastlinskih testov, ki se najpogosteje uporablja v okoljskem monitoringu, pri preučevanju kakovosti voda (Fiskesjö, 1985). Med drugim so čebulni test uporabili tudi za ocenjevanje onesnaženosti ozračja, za preučevanje toksičnega učinka saj, toksičnosti herbicidov in pesticidov, za ugotavljanje mutageneih učinkov zdravil,... (Saradjen, 1993).

S čebulnim testom se lahko sočasno ugotavlja splošna toksičnost in genotoksičnost. Pogostost poškodb DNA se ugotavlja v celicah rastnih vršičkov korenin čebule, kjer dokazujemo delovanje potencialne genotoksične snovi. Test upošteva celostne vplive ter medsebojno delovanje med genotoksiki in dednim materialom (Fiskesjö, 1985). Navadna čebula (*Allium cepa* L.) ima 16 relativno velikih kromosomov, ki omogočajo enostavno detekcijo kromosomskih napak in določanje genotoksičnih potencialov snovi (Fras in Maluszynska, 2003).

Toksične vplive testnih snovi lahko ugotavljamo na celični ravni tudi z merjenjem frekvence delečih se celic. Splošno toksičnost snovi pa lahko opazujemo s pomočjo različnih parametrov. Fiskesjö (1985) kot najpomembnejši parameter navaja dolžino korenin, predlaga pa še opazovanje naslednjih parametrov: nabreklost korenin, sprememba barve, cepitev korenin in dolžino listov. Vendar pa nekateri avtorji navajajo, da je zadnji kriterij lahko preveč variabilen in tako manj zanesljiv. Poleg tega so korenine tisti del rastline, ki je v neposrednem stiku s testno snovjo in simptomi toksičnosti snovi se prej pokažejo na koreninah kot na poganjkih (Sresty in Rao, 1999, cit po. Lin in Xing, 2007). Za čebulni test velja, da pokaže odlično sorazmerje s podobnimi testi, kjer potekajo raziskave na ribah in sesalcih *in vivo*, rezultati pa se z visoko zanesljivostjo lahko prenašajo na človeka (Fiskesjö, 1985). Pozitivni rezultati, ki jih dobimo s čebulnim testom, so lahko pokazatelj, da predstavlja določena testna snov direktno ali indirektno biološko tveganje za druge rastline, živali ali pa tudi za človeka.

Mednarodni program rastlinskih bioloških testov (International Program in Plant Bioassays) je čebulni test sprejel za biomonitoring in testiranje okoljskih onesnažil. V okviru teh programov je test tudi standardiziran in validiran (Fiskesjö, 1985).

2.2.1.1 Kromosomske aberacije

Molekula DNA je primarna tarča različnih mutagenih snovi, ki povzročajo kromosomske poškodbe. DNA ima tudi popravljalne mehanizme, vendar so v splošnem kromosomske poškodbe trajne. Celica v takih primerih ne preživi, če pa že, so procesi v njej moteni, kar pa je odvisno od stopnje poškodb kromosomov. S preiskavami kromosomov tako dobimo pomembne informacije o mutagenih učinkih preiskovane snovi na celico. Sistemsko lahko poškodbe kromosomov razdelimo v dve skupini, in sicer na kromosomske in kromatidne. Kadar nek genotoksik deluje v celičnem ciklu med fazo G1, nastanejo kromosomske okvare, delovanje genotoksika v fazah S in G2 pa izove kromatidne okvare. Vendar genotoksiki večinoma vplivajo v več fazah celičnega cikla, tako da obstajajo prehodi in kombinacije med kromosomskimi in kromatidnimi poškodbami, zato je njihovo prepoznavanje težavno.

Kromosomske okvare vključujejo celoten kromosom. Enojni zlomi kromosoma nastanejo v predelu centromera (primarna zožitev kromosoma) in kromosom razpade na dva dela. Dvojni zlom vključuje dva zloma v istem predelu obeh kromatid. Med okvarami kromosomov lahko prepoznamo še krožne kromosome, kjer se dva poškodovana kromosoma, ki imata zlomljene terminalne dele, združita. Prisotni pa so tudi fragmenti, odlomljeni deli kromosomov. Lahko pa nastanejo tudi kromatidne okvare npr. zlom kromatide, ki se vidi kot špranja, lahko pa se nastali fragment premakne iz osi kromatide (Glasečnik, 2003).

Pri testu kromosomskih aberacij pregledamo pobarvane kromosome v celicah koreninskih vršičkov v regijah F0 in F1 ter spremljamo prisotnost morebitnih kromosomskih napak. Beležimo različne tipe napak in njihovo številčnost. Večja kot je frekvenca kromosomskih napak, večja je mutagenost testne snovi.

2.2.1.1 Mikrojedra

Mikrojedra nastanejo kot posledica kromosomskih in kromatidnih napak. Nastanejo namreč z dekondezencijjo odlomljenih kromosomskih ali kromatidnih fragmentov, lahko tudi celih kromosomov, ki se niso vključili v preostali kromatin. Za določitev ali je nastalo mikrojedro posledica klastogenega (fragmentacija kromosomov) ali aneugenega (izguba celotnega kromosoma, moteno delovanje delitvenega vretena) načina delovanja snovi, pa je potrebno vključiti še barvanje kinetohorjev. V primeru, da se v mikrojedru vidi kinetohor, lahko sklepamo, da je nastalo z dekondezencijjo celotnega kromosoma (Singh in sod.,

2009). Kromosomski in kromatidni fragmenti tako sestavljajo sekundarna jedra, ki so manjša od primarnega jedra. Mikrojedra so vidna v interfazi celičnega cikla. Celice, ki vsebujejo mikrojedra, se običajno ne delijo več in večinoma v generaciji F1 propadejo (Ma in sod., 1994).

Test mikrojedr je hitra in občutljiva metoda za kvantifikacijo kromosomskih poškodb. Pobarvana jedra pregledujemo v regiji F1, saj je v tej regiji štetje mikrojedr bolj učinkovito (Ma in sod., 1994). Mikrojedra sicer nastanejo kot posledica kromosomskih aberacij, ki so nastale v regiji F0, vendar je za formacijo mikrojedr potrebna naslednja celična delitev. Pri pregledovanju celic (jeder) beležimo število mikrojedr, ki jih prepoznavamo po ustreznih kriterijih. Večja frekvenca mikrojedr kaže na povečano število kromosomskih napak v regiji F0 in večjo genotoksičnost preučevanega dejavnika. Več avtorjev navaja, da bi test mikrojedr lahko povsem nadomestil test kromosomskih aberacij, saj je bolj učinkovit. Poleg tega pa so mikrojedra pokazatelj kromosomskih poškodb, ki jih lažje prepoznamo kot same aberacije (Ma in sod., 1994; Majer in sod., 2003).

2.2.1.2 Moteni procesi celične delitve

Genotoksične snovi lahko povzročajo najrazličnejše motnje pri procesu celične delitve. Nekatere testne snovi celo povzročijo zastoj mitoze, kar se lahko kaže kot porast števila mitotskih celic v regijah F0 in F1 (Ma in sod., 1994). V tem primeru lahko tudi dobimo višjo frekvenco pojavljanja anafaznih mostičkov, ki nastanejo kot posledica neločevanja kromatid kromosoma (Majer in sod., 2003). Genotoksiki lahko povzročajo nastanek kromatinskih skupkov, kar onemogoči kondenzacijo kromatina v profazi celične delitve. Motnje v nastanku ali delovanju delitvenega vretena pa vodijo v pojavljanje c-mitoz (El-Ghamery in sod., 2003). Prisotnost c-mitoz kaže na subletalno delovanje snovi, kar pomeni, da tretiranje povzroči začasno prenehanje nekaterih življenjskih procesov, ne pa tudi bazičnih procesov, kar omogoči tkivu, da se povrne v prvotni položaj, ko vplivi prenehajo (Fiskesjö, 1985). Različne motnje, ki nastajajo v procesu celične delitve, se lahko posledično odražajo tudi na drugih ravneh, npr. upočasnjena ali zavrnata rast rastlinskih organov.

2.3 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Namen dela je bil ugotoviti strupenost nanodelcev TiO₂ na rastlinske celice v odsotnosti in prisotnosti UV-A sevanja. S spremljanjem inhibicije rasti korenin smo ugotavljali vpliv nanodelcev na rast in razvoj koreninskega sistema. Aktivnost koreninskega meristema smo ocenili z mitotskim indeksom, s testoma kromosomskih aberacij in mikro jeder pa smo ovrednotili genotoksično delovanje testiranih nanodelcev.

Na podlagi predhodnih objav smo postavili naslednje hipoteze:

- (1) Prisotnost nanodelcev TiO₂ zmanjša rast in razvoj koreninskega sistema čebule.
- (2) Prisotnost nanodelcev TiO₂ zmanjša mitotski indeks v celicah apikalnega meristema korenin čebule.
- (3) Nanodelci TiO₂ povečajo frekvenco pojavljanja kromosomskih napak in mikro jeder.
- (4) Negativni učinki nanodelcev TiO₂ so koncentracijsko-odvisni.
- (5) Prisotnost UV-A sevanja poveča strupen učinek nanodelcev.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 RASTLINSKI MATERIAL

Za poskuse smo uporabili rastlinsko vrsto navadna čebula (*Allium cepa* L.), kultivarja 'Stuttgarter riesen' (dobavitelj Delta Green BV, Zierikzee, Nizozemska) in 'Holandska rumena' (dobavitelj Kesselaar BV, Gravenpolder, Nizozemska).

Čebule smo pred uporabo shranjevali v hladilniku pri 4 °C. S tem smo simulirali zimski počitek in tako vplivali na boljšo kalivost čebulčkov ob uporabi.

Za poskuse smo izbirali 3 do 5 gramske čebule v dobrem stanju. Izločili smo posušene, plesnive ali poškodovane rastline.

3.2 REAGENTI

V vsaki seriji poskusov smo nastavili rast čebule v različno koncentrirane raztopine TiO₂, destilirano vodo in 1 mM etilmetansulfonat (EMS, C₃H₈O₃S).

Testna snov so bili nanodelci TiO₂. Uporabili smo nesonicirane, 15 nm velike delce TiO₂ (nanopowder, čistost 99,7%, anataza; Aldrich, VB). Nanodelce smo vmešali v destilirano vodo in pripravili 5 raztopin različnih koncentracij (0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml in 1000 µg/ml TiO₂) v katere smo nastavili rast čebule. Pri vseh poskusih smo za negativno kontrolo uporabili čebule, rastoče tekom celotnega poskusa v destilirani vodi. Kot pozitivno kontrolo pa smo uporabili čebule, rastoče v 1 mM raztopini EMS (Sigma), ki je snov z znanim genotoksičnim učinkom. Pri vseh poskusih smo za pozitivno kontrolo uporabili 1mM etilmetanosulfonat (EMS). Gre za mutageno in kancerogeno organsko snov s kemijsko formulo C₃H₈O₃S. V bioloških sistemih EMS tvori alkilacijske produkte, zlasti v reakcijah s proteini in nukleinskimi kislinami. EMS pogosto uporabljajo v različnih raziskavah kot modelni mutagen (Pfister T. in Eichinger - Chapelon A., 2009), ki v reakcijah z nukleinskimi kislinami povzroča naključne mutacije v genomu s spreminjanjem nukleotidov, npr. alkilacija gvanina. To pogosto vodi v nastanek točkastih mutacij in zlomov verig DNA (Yesilda, 2000), ki se izrazijo kot kromosomske aberacije tudi pri navadni čebuli (Rank in Nielsen, 1997). Alkilacija proteinov pa potencialno lahko vpliva na fiziološke funkcije specifičnih proteinov, kar posledično vodi v poškodbe tkiv in organsko toksičnost (Pfister T. in Eichinger - Chapelon A., 2009).

Vse uporabljene raztopine so bile temperirane na sobno temperaturo. Rezultate testnih raztopin nanodelcev smo primerjali z rezultati kontrole. Za fiksacijo korenin smo uporabljali Farmerjev fiksativ (EAA), mešanico 3:1 (v/v) 96 % etanol : led očetna kislina.

3.3 OPIS POSTOPKOV

3.3.1 Vzgoja in priprava korenin

Za vsak poskus smo izbrali po 42 približno enako velikih čebul. Izbirali smo čebule, ki so se lepo usedle na vrat centrifugirk, da je bilo izhlapevanje tekočin čim manjše. Čebulam smo odstranili suhe luskoliste in na spodnji strani s skalpelom postrgali rjavo plast s posušenimi koreninami. Pri tem smo pazili, da je čebulni krožec ostal nepoškodovan. Tako pripravljene čebule smo nastavili rast za 24 ur v 15 mililitrske centrifugirke do roba napolnjene z destilirano vodo, temperirano na sobno temperaturo. Centrifugirke smo zložili na stojala, jih ovili v alu folijo in postavili na svetlo mesto brez neposredne sončne svetlobe. Po 24 urah so čebulam zrasle približno 1 cm dolge korenine.

Čebule smo nato porazdelili v ustrezno število testnih skupin. Natančno število skupin je navedeno pri vsakem posameznem poskusu. Čebule smo v skupine razporejali tako da je bilo razmerje med rastlinami z boljše in slabše zraslimi koreninami v vseh skupinah enako.

3.3.2 Priprava raztopin z nanodelci TiO_2

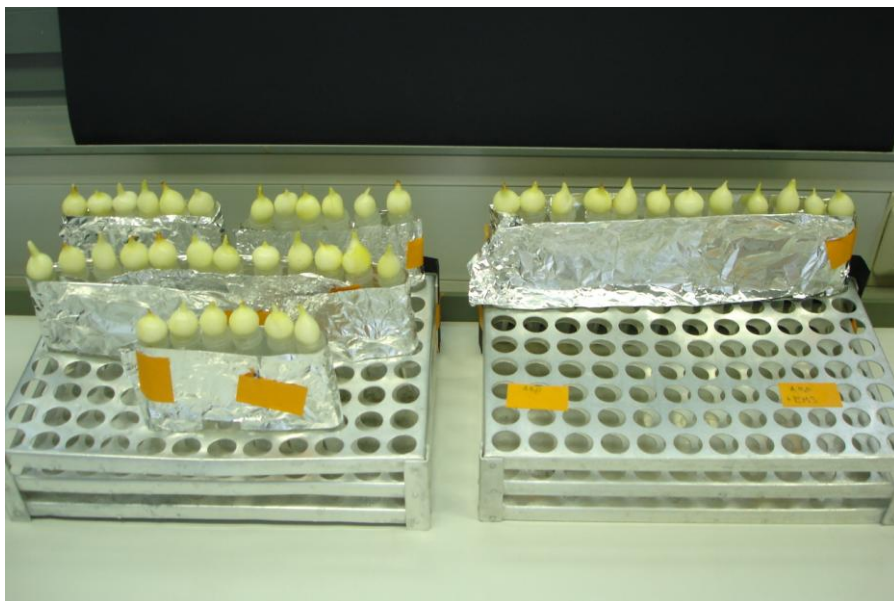
Raztopine nanodelcev smo pripravili tik pred nastavitvijo poskusov, da so bile sveže in je bila agregacija delcev čim manjša. Zatehtali smo 0,12 g nanodelcev TiO_2 , jim dolili 120 ml destilirane vode in dobro premešali. Dobili smo izhodiščno raztopino s koncentracijo 1000 $\mu\text{g/ml}$ TiO_2 , ki smo jo štirikrat zapored desetkratno redčili: preden so se delci začeli posedati, smo odpipetirali po 12 ml raztopine v naslednjo posodico, kamor smo dolili še po 108 ml destilirane vode in dobro premešali. Tako smo dobili koncentracijsko vrsto nanodelcev od 0,1 do 1000 $\mu\text{g/ml}$ TiO_2 .

3.3.3 Izpostavitev testnim raztopinam

Čebule z zraslimi koreninami smo porazdelili v sedem skupin s po šestimi čebulami. Prvo skupino čebul smo nastavili rasti v destilirano vodo, drugo skupino čebul v 1mM raztopino EMS. Nato smo po šest čebul nastavili rasti v različno koncentrirane raztopine z nanodelci TiO₂ (0,1, 1, 10, 100, 1000 µg/ml). Vsako raztopino z ustrežno koncentracijo smo nalili v označene centrifugirke. Centrifugirke smo zložili na stojala in ovili v alu folijo. Stojala smo postavili na svetlo mesto brez neposredne sončne svetlobe.

Tekom 72-urnega poskusa smo skušali zagotavljati enake koncentracije raztopin, zato smo po 24 urah zamenjali testne raztopine v centrifugirkah. Stare raztopine smo previdno odlili, da ne bi poškodovali korenin in s pipeto napolnili centrifugirke s svežimi raztopinami. Raztopine z nanodelci so bile vsak dan sveže pripravljene pred polnjenjem centrifugirk. Pazili smo, da smo iz centrifugirk z nanodelci čim bolj sprali stare raztopine, pred dolivanjem novih. Postopek smo v 24-urnem intervalu dvakrat zapored ponovili. Tretji dan smo izmed šestih čebulic izločili najslabše rastočo in jo zavrgli. Preostalih 5 čebul smo pobrali iz raztopin in jim porezali vse zrasle korenine. Porezane korenine smo prešteli in izmerili dolžino. S seštevkom dolžine vseh korenin posamezne čebule smo dobili dolžino celotnega koreninskega sistema posamezne rastline. Sledila je fiksacija korenin (glej poglavje 3.3.5). Kasneje smo vzeli po 10 vzorčnih korenin vsakega tretmaja in pripravili mikroskopske preparate za analizo mitotskega indeksa (MI) in genotoksičnosti.

Na enak način smo izvedli 24-urni poskus genotoksičnosti, le da smo korenine fiksirali že po 24 urah. V tem primeru korenin nismo šteli in merili. Odrezali smo po 10 vzorčnih korenin vsake rastline in jih ločeno spravili v označene mikrocentrifugirke ter prilili fiksativ. Kasneje smo za izdelavo mikroskopskih preparatov vzeli po 3 korenine vsake čebule in naredili analizo mitotskega indeksa in genotoksičnosti.



Slika 4: Izpostavitev rastlin testnim tekočinam.

3.3.4 Izpostavitev testnim raztopinam v kombinaciji z UV-A sevanjem

Čebule z zraslimi koreninami smo razvrstili v osem skupin s po petimi čebulami, dve najslabše rastoči smo zavrgli. Testne raztopine smo nalili v po 5 označenih epruvet. Uporabili smo 16 mililiterske plastične epruvete, ki prepuščajo UV sevanje. V 5 epruvet smo nalili 1mM raztopino EMS (Sigma) in v 5 epruvet destilirano vodo. Čebule smo postavili rast na epruvete napolnjene z raztopinami in jih zložili v stojala. Stojala smo postavili v digestorij, tako da so bile vse epruvete s čebulami v vodoravni vrsti neposredno pred virom UV-A sevanja. Za vir UV-A sevanja smo uporabili žarnico Sylvania (blacklight-blue F30W/BLB-T8). Digestorij smo zatemnili, da je bila izguba UV-A sevanja iz digestorija čim manjša. Epruvete s čebulami smo obsevali 8 ur (prvo tretjino celičnega cikla), nato smo žarnico po osmih urah ugasnili, odstranili črni papir z vrat digestorija in nadaljnih 16 ur pustili rastline rasti pri naravni svetlobi.

Pri 72-urnem poskusu smo po 24 urah rastlinam zamenjali raztopine v epruvetah in jih ponovno obsevali 8 ur z UV-A sevanjem, nato so rastline ponovno rasle 16 ur pri naravni svetlobi. Postopek smo ponovili 2-krat zapored, nato smo čebule pobrali iz epruvet in jim porezali vse zrasle korenine. Prešteli smo število vseh zraslih korenin pri vsaki čebuli in izmerili dolžine korenin. S seštevkom dolžin vseh korenin smo izračunali dolžino celotnega koreninskega sistema posamezne rastline. Porezane korenine smo nato fiksirali. Po nekajdnevni fiksaciji smo izbrali po 3 korenine vsake rastline in pripravili mikroskopske preparate za analizo mitotskega indeksa in genotoksičnosti.

Vzporedno z rastjo in obsevanjem raztopin in čebul v digestoriju, smo nastavili rast še 5 čebul v destilirano vodo in jih izpostavili podobnim pogojem kot pri poskusu brez UV-A obsevanja. Čebulice, rastoče izven digestorija, so nam služile kot kontrola morebitnega negativnega vpliva samega UV-A sevanja na čebule.

Na enak način smo izvedli 24-urni poskus z obsevanimi raztopinami in čebulami, le da smo korenine fiksirali že po 24 urah. Korenin nismo šteli in merili. Fiksirali smo po 10 vzorčnih korenin vsake čebule in jih ločeno spravili v označene mikrocentrifugirke. Za izdelavo mikroskopskih preparatov smo po nekajdnevni fiksaciji vzeli 3 korenine vsake rastline ter naredili analizo mitotskega indeksa in genotoksičnosti.



Slika 5: Poskus z obsevanjem testnih raztopin z UV-A svetlobo.

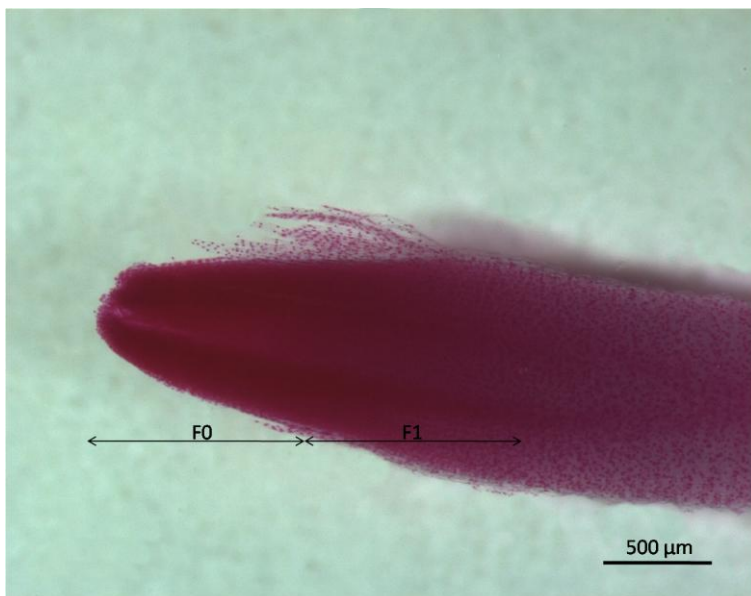
3.3.5 Fiksacija korenin

Porezane korenine smo ločeno shranili v označene mikrocentrifugirke in jim dolili Farmerjev fiksativ (EAA), sestavljen iz 96 % etanola in led očetne kisline v razmerju 3:1 (v/v). Vedno smo pripravljali svež fiksativ tik pred uporabo. Fiksirane koreninice smo pustili vsaj 24 ur v hladilniku pri 4 °C. Nato smo fiksativ EAA odpipetirali in v mikrocentrifugirke nalili 96 % etanol. Tako fiksirane koreninice so primerne za dolgotrajnejše shranjevanje v zmrzovalniku pri -20 °C.

3.3.6 Priprava mikroskopskih preparatov

Za opazovanje citoloških parametrov smo pripravili trajne mikroskopske preparate. Vzorčne korenine smo pobarvali po Feulgenju in Rossenbeck (1924), po postopku prirejenem po Greilhuberju in Ebertovi (1994), ki je objavljen v Dolenc Koce (2001). Korenine smo vzeli iz fiksativa in jih 5 minut spirali v destilirani vodi, temperirani na sobno temperaturo. Potem smo koreninice popivnali s papirnato brisačo in jih prestavili v označene stekleničke v katerih smo imeli pripravljeno 5 M HCl za hidrolizo. Hidroliza je potekala v termostabilni vodni kopeli ($20,0 \pm 0,1$ °C). Po 60 minutah smo hidrolizo ustavili z ledeno mrzlo destilirano vodo, v katero smo prestavili korenine za 5 minut. Vzorce smo nato barvali s Schiffovim reagentom 120 minut pri 20 °C v termostatirani vodni kopeli. Nato je sledilo odstranjevanje odvečnega barvila. Vzorce smo spirali v SO₂-vodi, trikrat zapored po 2 minuti, dvakrat po 10 minut in enkrat po 20 minut. Do priprave mečkanih preparatov (mečkancev) smo hranili koreninice v destilirani vodi v hladilniku. Pripravo mečkancev smo začeli s prenosom korenin v 45 % očetno kislino za približno 10 minut. Z očetno kislino smo tudi očistili predmetna stekelca in nanje prenesli posamezno korenino. Koreninam smo odrezali vršiček z meristemom, ki je bil temneje obarvan. Preostali del korenine smo zavrgli. Vršiček smo nato prečno prerezali na dva približno 1 mm velika koščka (regiji F0 in F1 koreninskega vršička) (slika 6). Na koščka smo kanili kapljico očetne kisline in vsakega posebej prekrili s krovnim stekelcem. Tkivo smo zmečkali s topo iglo in z močnim pritiskom. Nato smo preparate dali na suhi led (CO₂ v trdnem stanju), da je tkivo primrznilo na predmetno stekelce in z britvico odstranili krovno stekelce. Sledila je dehidracija preparatov, najprej 2 minuti v 96 % etanolu in nato še 2 minuti v 100 % etanolu. Preparate smo nato sušili približno 1 uro v digestoriju. Sledilo je prekrivanje

preparatov s krovnim sredstvom DPX (Fisons, VB) in krovnimi stekelci. Pred pregledovanjem preparatov so se le-ti sušili 2 do 3 dni na sobni temperaturi in v temi.



Slika 6: Pobarvan koreninski vršiček čebule.

3.3.6.1 Priprava Schiffovega reagenta

V 800 ml vrele destilirane vode raztopimo 4 g pararosanilin klorida (Sigma, ZDA), premešamo in počakamo, da se ohladi na 50 °C. Raztopino nato vakuumsko prefiltriramo preko filtra iz steklenih vlaken (GF/C; Whatman, ZDA) in ji dodamo 120 ml 1M HCl ter 12 g $K_2S_2O_5$ (Merck, Nemčija). Raztopino pustimo stati čez noč pri sobni temperaturi. Naslednji dan dodamo raztopini 4 g aktivnega oglja za razbarvanje (Sigma, ZDA) in premešamo. Sledi vakuumsko prefiltriranje raztopine preko filtra iz steklenih vlaken v suho steklenico (barvilo mora biti prozorno). Pripravljen Schiffov reagent hranimo v hladilniku na 4 °C.

3.3.6.2 Priprava SO_2 -vode

Za pripravo 100 ml SO_2 -vode, dodamo v 99 ml destilirane vode 1 ml 5 M HCl, zatehtamo še 0,5 g $K_2S_2O_5$ (Merck, Nemčija) in v digestoriju stresemo v raztopino. Dobro premešamo in hranimo v zaprti steklenici v hladilniku.

3.3.7 Analiza mikroskopskih preparatov

Kodirane preparate smo opazovali s svetlobnim mikroskopom (Motic BA210) pri 40- in 100-kratni povečavi objektiv. Pri večji povečavi smo uporabljali imerzno olje. Na posameznem vzorcu smo v vsaki regiji (F0 in F1) pregledali najmanj 1000 jeder. Beležili smo si število interfaznih in mitoznih jeder, pri katerih smo si zabeležili še fazo mitoze. Ob pregledovanju smo spremljali še prisotnost mikro jeder in kromosomskih aberacij. Iz dobljenih podatkov smo izračunali delež deležih se celic - mitotski indeks (MI), delež celic v posameznih fazah mitoze (slika 7), frekvence mikro jeder in različnih tipov kromosomskih aberacij (slika 21).

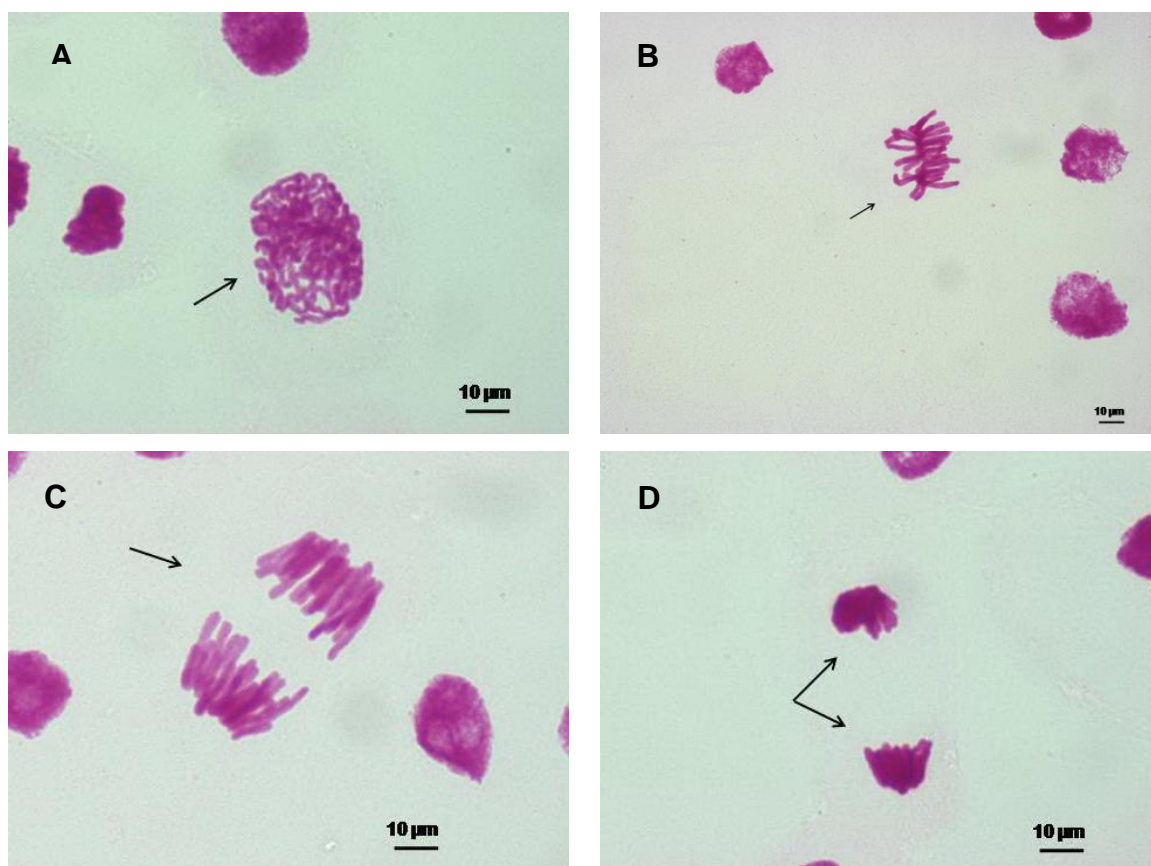
Mitotski indeks smo izračunali po naslednji formuli:

$$MI (\%) = (n \times 100) / N, \text{ pri čemer je} \quad \dots(1)$$

MI (%) = mitotski indeks izražen v odstotkih

n = število deležih se celic, ki smo ga izračunali kot vsoto vseh celic v mitozni

N = število vseh pregledanih jeder v posamezni regiji koreninskega vršička



Slika 7: Faze mitoze v koreninskem vršičku čebule.

Mitozna jedra so označena s puščicami.

A: Profaza;

B: Metafaza;

C: Anafaza;

D: Telofaza.

Kriteriji za določanje mikrojedr pri rastlinskih biotestih niso posebej definirani, zato so pri raziskavah mikrojedr v rastlinskih celicah povzeti kriteriji za mikrojedra pridobljeni pri raziskavah sesalčnih celic.

Pri določanju mikrojedr smo uporabili naslednje kriterije povzete po Majer in sod. (2003):

- (1) intenziteta in vzorec obarvanja kromatina sta v mikrojedru podobna kot pri glavnem jedru,
- (2) meje mikrojedra so razločno prepoznavne, kar nakazuje prisotnost jederne membrane,
- (3) mikrojedra so okrogla in ločena od glavnega jedra,
- (4) nahajajo se v isti optični ravnini kot glavno jedro,
- (5) in so obdana z isto citoplazmo kot glavno jedro.

Običajno se tvorita 1 do 2 mikrojedri, redkeje več, odvisno od stopnje poškodovanosti kromosomov (Ma in sod., 1994).

Merila za prepoznavanje kromosomskih aberacij smo oblikovali na podlagi obstoječega slikovnega gradiva (El-Ghamery in sod., 2003; Fiskesjö, 1985; Fras in Maluszynska, 2003). Opazili smo prisotnost naslednjih kromosomskih aberacij: kromosomski fragmenti, anafazni mostički in c-mitoze.

3.3.6 Statistična analiza

Za vsak opazovan parameter smo izračunali povprečno vrednost vseh rastlin, ki so rasle v določeni raztopini, in standardne napake (SN). Pri obdelavi rezultatov smo uporabljali standardne statistične metode (ANOVA, Studentov t-test, Bonferronijev test), ki so navedene na ustreznih mestih v poglavju Rezultati. Za statistično analizo smo uporabili računalniška programa Microsoft Excel in GraphPad Prism ver. 4.02.

4 REZULTATI

4.1 MAKROSKOPSKA OPAZOVANJA

4.1.1 72-urna izpostavitve obsevanim in neobsevanim raztopinam

Pri 72-urni (tj. 3-dnevni) izpostavitvi rastlin smo opazovali morebitno akutno toksičnost testiranih koncentracij nanodelcev na čebulo. Spremljali smo število korenin, njihovo povprečno dolžino in skupno dolžino celotnega koreninskega sistema. Rezultati vseh opazovanih makroskopskih parametrov so izraženi kot povprečne vrednosti petih čebul, ki so bile testirane za vsako testno koncentracijo v poskusih brez obsevanja in poskusih, ki so vključevali tudi obsevanje z UV-A sevanjem.

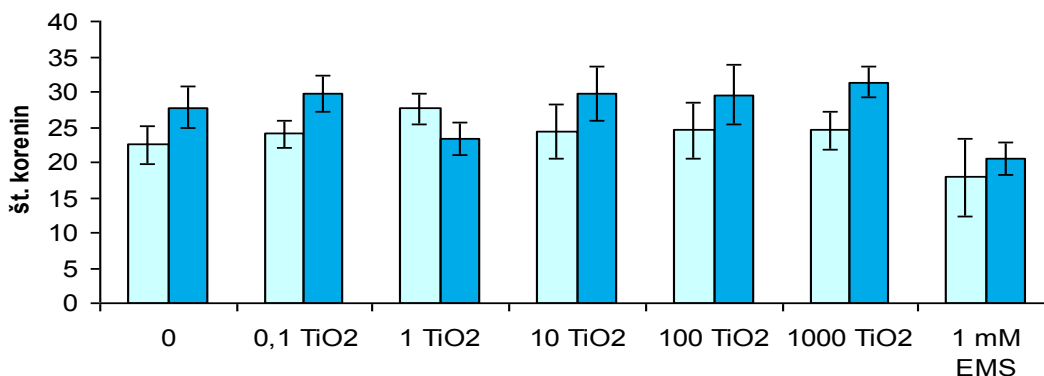
4.1.1.1 Povprečno število korenin

Rezultati povprečnega števila korenin v obeh poskusih so prikazani na sliki 8. Pri neobsevanih rastlinah, ki so rasle v različnih koncentracijah nanodelcev, je bilo povprečno število korenin statistično neznačilno večje kot pri rastlinah rastočih v destilirani vodi (23 korenin). Čebulam, ki so bile izpostavljene raztopinam z nanodelci je v povprečju zraslo 24 korenin. Med njimi pa je izstopala koncentracija $1\mu\text{g/ml TiO}_2$, kjer je čebulam v povprečju zraslo 28 korenin. Pri pozitivni kontroli (EMS) je bilo povprečno število zraslih korenin po pričakovanjih najmanjše (18 korenin). Pri statistični analizi rezultatov se med različnimi testnimi raztopinami niso pokazale statistično značilne razlike v povprečnem številu korenin ($p = 0,895$). Torej testne raztopine nanodelcev niso vplivale na povprečno število zraslih korenin.

Tudi pri obsevanih rastlinah, ki so rasle ob dodatku nanodelcev TiO_2 , smo zaznali statistično neznačilno povečano število korenin glede na negativno kontrolo. Ponovno pa je med njimi sicer statistično neznačilno izstopala koncentracija $1\mu\text{g/ml TiO}_2$, vendar tokrat z zmanjšanjem števila korenin glede na ostale koncentracije nanodelcev (23 korenin). Število zraslih korenin ob dodatku drugih koncentracij nanodelcev je bilo od 30 do 31. Pri negativni kontroli pa je rastlinam v povprečju zraslo 28 korenin. Primerjava števila korenin čebul tretiranih z raztopinami nanodelcev in negativno kontrolo tudi v tem primeru ni pokazala statistično značilnih razlik med njimi. Torej tudi obsevanje raztopin nanodelcev in čebul z UV-A sevanjem ni vplivalo na število zraslih korenin pri čebulah.

Primerjava obeh poskusov z različnimi statističnimi testi (ANOVA, t-test in Bonferronijev post-test) med poskusoma z in brez UV-A sevanja ni pokazala statistično značilnih razlik v številu korenin.

Torej različno koncentrirane raztopine nanodelcev niso imele vpliva na število zraslih korenin. Prav tako nismo potrdili, da bi na število zraslih korenin vplivali nanodelci v prisotnosti UV-A sevanja.



Slika 8: Število korenin po 72-urni izpostavitvi testnim raztopinam.

Svetlejši stolpci označujejo poskus brez UV-A obsevanja, temnejši stolpci pa poskus z obsevanjem raztopin in rastlin z UV-A sevanjem. V stolpcih so prikazane povprečne vrednosti \pm SN. Koncentracije nanodelcev TiO₂ so podane v $\mu\text{g/ml}$.

4.1.1.2 Povprečna dolžina korenin

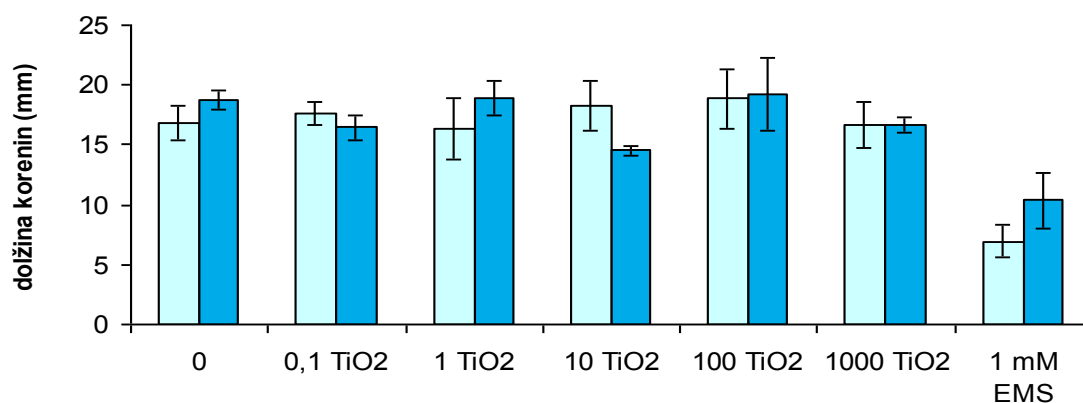
Dolžine korenin smo izračunali tako, da smo pri vsaki čebuli prešteli vse zrasle korenine in jim izmerili dolžine. Nato smo seštevek dolžin vseh korenin delili z njihovim številom.

Povprečne vrednosti dolžine korenin v poskusu z UV-A obsevanjem in brez njega so grafično prikazane na sliki 9. Iz grafičnega prikaza je razvidno, da je bila povprečna dolžina neobsevanih korenin med različnimi koncentracijami nanodelcev bolj enotna v primerjavi z obsevanimi koreninami z UV-A sevanjem. Vrednosti so se gibale med 16 mm in 19 mm. Rahlo povečanje dolžine korenin je bilo zaznati pri srednjih koncentracijah nanodelcev (10 in 100 $\mu\text{g/ml}$ TiO₂), vendar razlike niso bile statistično značilne. Prav tako ni bilo statistično značilnih razlik, če smo primerjali raztopine nanodelcev z negativno kontrolo, kjer so bile korenine v povprečju dolge 17 mm.

Pri poskusu z obsevanjem z UV-A sevanjem je bila dolžina korenin manj enotna. Pri rastlinah rastočih v raztopinah nanodelcev TiO₂ so korenine v povprečju zrasle od 14 mm

do 19 mm. Najkrajše korenine so zrasle pri koncentraciji 10 $\mu\text{g/ml}$, pri koncentraciji 100 $\mu\text{g/ml}$ pa najdaljše. Vendar je bilo povečanje povprečne dolžine pri konc. 100 $\mu\text{g/ml}$ predvsem na račun ene rastline, ki je imela zelo dolge korenine. V destilirani vodi so korenine dosegle povprečno dolžino 19 mm. Vendar statistična analiza (test ANOVA) ni pokazala razlik med testnimi raztopinami nanodelcev in negativno kontrolo. S testom ANOVA tudi nismo dokazali statistično značilnih razlik v povprečnem številu korenin med poskusoma brez in z UV-A obsevanjem.

Torej tudi na povprečno dolžino korenin nanodelci v izbranih koncentracijah niso imeli vpliva. Prav tako nismo zaznali vpliva testiranih nanodelcev v prisotnosti UV-A sevanja.



Slika 9: Dolžina korenin po 72-urni izpostavitvi testnim raztopinam.

Svetlejši stolpci prikazujejo rezultate poskusa brez obsevanja z UV-A sevanjem, temnejši stolpci pa prikazujejo rezultate poskusa z obsevanjem raztopin in čebul z UV-A sevanjem. Stolpci prikazujejo povprečne vrednosti \pm SN. Koncentracije nanodelcev so podane v $\mu\text{g/ml}$.

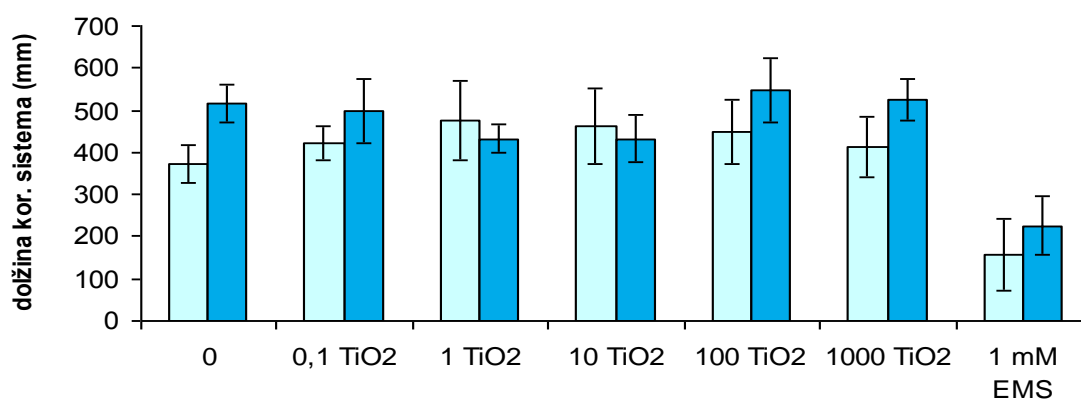
4.1.1.3 Dolžina koreninskega sistema

Dolžine koreninskega sistema smo izračunali, tako da smo sešteli izmerjene dolžine vseh zraslih korenin pri posamezni čebuli.

Rezultati meritev dolžine koreninskega sistema v poskusu brez obsevanja z UV-A sevanjem in poskusu z obsevanjem z UV-A sevanjem so prikazani na sliki 10. Pri poskusu brez obsevanja je bila pri vseh rastlinah tretiranih z nanodelci dolžina koreninskega sistema statistično neznačilno večja v primerjavi z negativno kontrolo. Zaznali smo od 10 do 27 % povečanje dolžine koreninskega sistema. Odstotek povečanja je bil večji pri koncentracijah 1 in 10 $\mu\text{g/ml}$, vendar so kljub temu bile razlike majhne in statistično neznačilne.

Pri drugem poskusu (obsevanje z UV-A sevanjem), pa se je pri nižjih koncentracijah nanodelcev dolžina koreninskega sistema zmanjšala v primerjavi z negativno kontrolo. Pri višjih koncentracijah nanodelcev pa se je dolžina koreninskega sistema povečala glede na negativno kontrolo. Zmanjšanje pri nižjih koncentracijah nanodelcev je bilo do 17 %, povečanje pri višjih koncentracijah pa je bilo do 6 %. Šlo je za majhne razlike, ki niso bile statistično značilne. Prav tako ni bilo statistično značilnih razlik med poskusom brez obsevanja in poskusom z obsevanimi raztopinami in rastlinami.

Nanodelci TiO_2 v izbranih koncentracijah niso vplivali na rast in razvoj koreninskega sistema. Prav tako nismo opazili, da bi testirane koncentracije nanodelcev imele kakeršenkoli vpliv na dolžino koreninskega sistema v prisotnosti UV-A sevanja.



Slika 10: Dolžina koreninskega sistema po 72-urni izpostavitvi testnim raztopinam

Svetlejši stolpci prikazujejo rezultate poskusa brez UV-A obsevanja, temnejši stolpci pa rezultate poskusa z obsevanjem raztopin in čebul z UV-A sevanjem. Stolpci prikazujejo povprečne vrednosti \pm SN. Koncentracije nanodelcev so podane v $\mu\text{g}/\text{ml}$.

4.2 MIKROSKOPSKA OPAZOVANJA

4.2.1 Mitotski indeks (MI)

4.2.1.1 72-urna izpostavitve testnim raztopinam

V meristemskih celicah koreninskih vršičkov, ki so rasli 72 ur v različnih testnih raztopinah, smo ugotavljali delež delečih se celic. Vrednosti mitotskih indeksov v koreninah, ki so rasle v različno koncentriranih raztopinah nanodelcev smo primerjali z rezultati negativne kontrole. Tako smo ugotavljali morebiten vpliv testiranih nanodelcev na

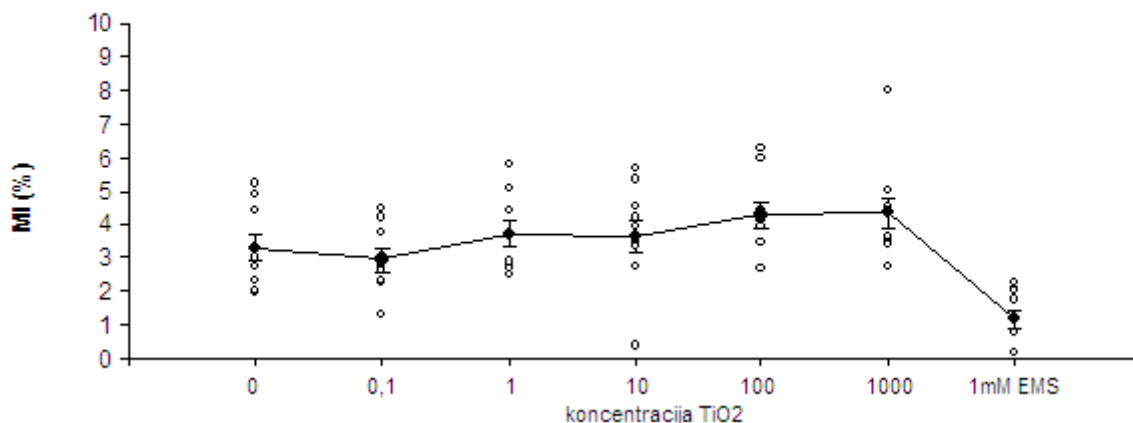
aktivnost koreninskega meristema čebule. Z rezultati negativne kontrole smo primerjali tudi mitotske indekse iz korenin, ki so bile izpostavljene nanodelcem v kombinaciji z UV-A sevanjem. Tako smo preverjali ali UV-A sevanje poveča kvarni učinek testiranih nanodelcev.

Slika 11 prikazuje vrednosti MI v regiji F0 (slika 6), ki smo jih izračunali po pregledu meristemskih celic koreninskih vršičkov, ki jih nismo obsevali z UV-A sevanjem. V tem poskusu brez obsevanja je MI znašal v regiji F0 pri negativni kontroli v povprečju $3,29 \pm 0,41$ %. V meristemih korenin, ki so rasle v različnih koncentracijah nanodelcev, pa je s povečevanjem koncentracije le-teh bilo opaziti rahlo sorazmerno povečevanje MI. Pri konc. $0,1 \mu\text{g/ml}$ je sicer povprečna vrednost MI v primerjavi z negativno kontrolo rahlo upadla ($2,94 \pm 0,33$ %). Pri konc. $1 \mu\text{g/ml TiO}_2$ pa je že bilo zaznati rahlo povečanje MI v povprečju na $3,72 \pm 0,38$ %, pri $10 \mu\text{g/ml TiO}_2$ pa v povprečju na $3,64 \pm 0,48$ %. Nato sta se pri konc. 100 in $1000 \mu\text{g/ml TiO}_2$ povprečni vrednosti MI še povečali na $4,29 \pm 0,39$ % in $4,34 \pm 0,46$ %. Kljub vsemu so bile razlike v vrednostih MI majhne in statistično neznačilne. Torej izbrane koncentracije nanodelcev niso vplivale na MI v koreninskih vršičkih čebule.

V drugem poskusu, kjer smo obsevali raztopine z UV-A sevanjem (slika 13), je MI v regiji F0 pri negativni kontroli dosegel povprečje pri $5,56 \% \pm 0,7$. V meristemih korenin, ki so rasle v različnih koncentracijah nanodelcev TiO_2 , pa smo s povečevanjem koncentracije nanodelcev zaznali rahlo upadanje vrednosti MI. Pri najmanjši konc. $0,1 \mu\text{g/ml TiO}_2$ je bila povprečna vrednost MI $5,09 \% \pm 0,47$, pri največji konc. $1000 \mu\text{g/ml TiO}_2$ pa je povprečna vrednost MI znašala $3,84 \% \pm 0,43$. Če smo primerjali vrednosti MI negativne kontrole in različnih koncentracij nanodelcev, med njimi ni bilo opaznih statistično značilnih razlik v regiji F0 ($p = 0,62$). Torej izbrane koncentracije nanodelcev TiO_2 tudi v prisotnosti UV-A sevanja niso imele vpliva na MI v regiji F0 koreninskih vršičkov.

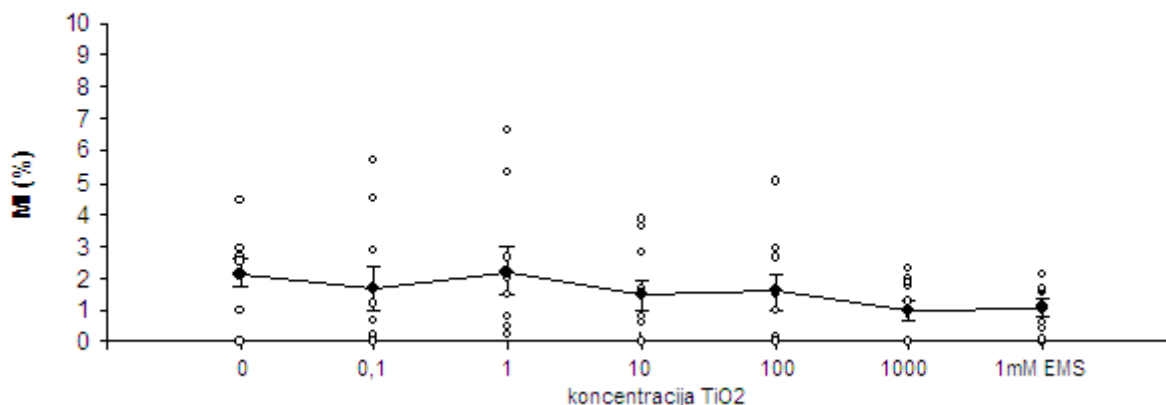
V regiji F1 vršičkov, ki so rasli v neobsevanih raztopinah, so se pri vseh tretmajih vrednosti MI zmanjšale glede na regijo F0 (sliki 11 in 12). Pri negativni kontroli je bila vrednost MI v povprečju $2,13 \pm 0,44$ %. Pri konc. $0,1 \mu\text{g/ml TiO}_2$ se je znižala na $1,68 \pm 0,71$ %, medtem ko se je pri konc. $1 \mu\text{g/ml TiO}_2$ povišala na $2,21 \pm 0,76$ %. Pri višjih konc. nanodelcev (10 , 100 in $1000 \mu\text{g/ml TiO}_2$) pa je MI, obratno kot v regiji F0, dosegel najnižje vrednosti ($1,43 \pm 0,47$ %, $1,57 \pm 0,56$ % in $0,99 \pm 0,3$ %). Tako so se pri konc. $10 \mu\text{g/ml}$ in $100 \mu\text{g/ml TiO}_2$ vrednost MI glede na regijo F0 zmanjšale za več kot 60 %, pri koncentraciji $1000 \mu\text{g/ml}$ pa za več kot 70 %. Smo pa v regiji F1 opazili rahlo zmanjševanje vrednosti MI s povečevanjem koncentracije nanodelcev. Vendar razlike niso

bile statistično značilne znotraj regije F1. Če smo primerjali rezultate MI obeh regij med seboj (F0 in F1) pa se je izkazalo, da so pri konc. 10, 100 in 1000 $\mu\text{g/ml}$ TiO_2 vrednosti $p \leq 0,05$, torej so opazne statistično značilne razlike med regijama.



Slika 11: Mitotski indeks v regiji F0 po 72-urni izpostavitvi neobsevanim testnim raztopinam.

Črta prikazuje povprečne vrednosti mitotskega indeksa. Koncentracije nanodelcev TiO_2 so podane v $\mu\text{g/ml}$.

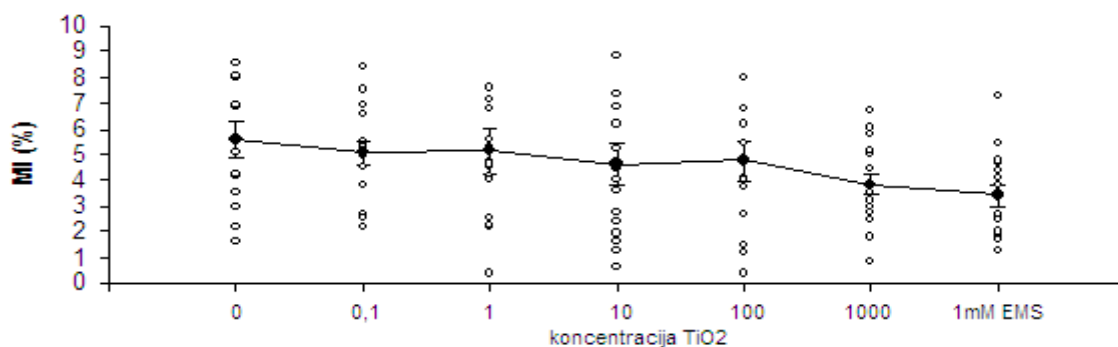


Slika 12: Mitotski indeks v regiji F1 po 72-urni izpostavitvi neobsevanim testnim raztopinam.

Črta prikazuje povprečne vrednosti mitotskega indeksa. Koncentracije nanodelcev so podane v $\mu\text{g/ml}$.

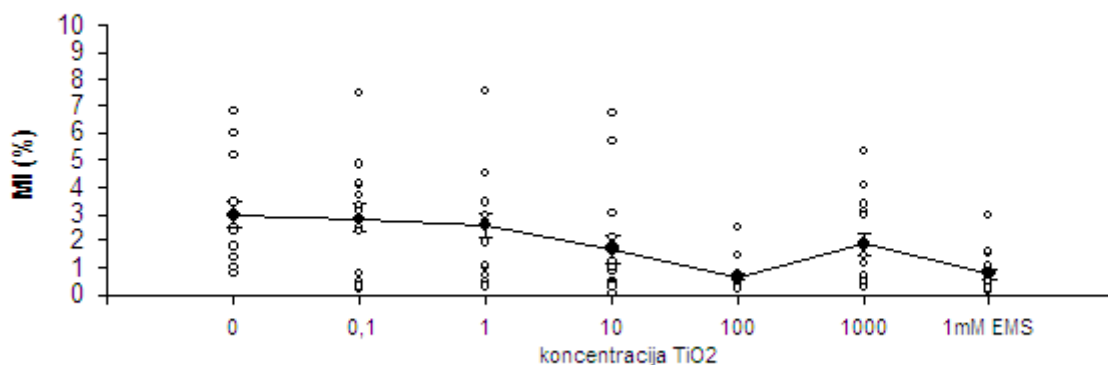
Tudi pri poskusu z UV-A obsevanjem raztopin in čebul so se vrednosti MI v regiji F1 zmanjšale glede na regijo F0 (sliki 13 in 14). Pri negativni kontroli je bila vrednost MI v regiji F1 v povprečju $2,97 \% \pm 0,49$. Pri koncentracijah 0,1 in 1 $\mu\text{g/ml}$ TiO_2 so se vrednosti MI še rahlo zmanjšale ($2,82 \% \pm 0,51$ in $2,6 \% \pm 0,47$). Pri konc. 10 $\mu\text{g/ml}$ pa je že bilo bolj občutno zmanjšanje povprečne vrednosti MI, ki je znašal $1,7 \% \pm 0,51$, pri koncentraciji 100 $\mu\text{g/ml}$ TiO_2 pa je dosegel minimum pri vrednosti $0,66 \% \pm 0,15$. Nato se

je pri najvišji koncentraciji nanodelcev povprečna vrednost MI zvišala na $1,87\% \pm 0,4$. Če smo primerjali povprečne vrednosti MI v regiji F1 med negativno kontrolo in različnimi koncentracijami nanodelcev, se je med njimi pokazala statistično značilna razlika ($p = 0,04$). Vendar je bila ta razlika samo na račun velikega zmanjšanja MI v regiji F1 pri koncentraciji $100 \mu\text{g/ml TiO}_2$.



Slika 13: Mitotski indeks v regiji F0 po 72-urni izpostavitvi obsevanim testnim raztopinam.

Črta prikazuje povprečne vrednosti mitotskega indeksa. Koncentracije nanodelcev so podane v $\mu\text{g/ml}$.



Slika 14: Mitotski indeks v regiji F1 po 72-urni izpostavitvi obsevanim testnim raztopinam.

Črta prikazuje povprečne vrednosti mitotskega indeksa. Koncentracije nanodelcev so podane v $\mu\text{g/ml}$.

Če smo statistično primerjali rezultate MI iz regiji F0 in F1 obsevanih vršičkov med seboj, sta si bili regiji statistično značilno različni ($p < 0,0001$). Mitotski indeks je bil statistično značilno manjši pri koncentracijah 10, 100 in $1000 \mu\text{g/ml TiO}_2$.

Na koncu smo primerjali poskusa brez in z UV-A obsevanjem med seboj. Primerjali smo tudi mitotske indekse regije F0 in regije F1 v poskusih brez obsevanja in z obsevanjem.

Izkazalo se je, da se regiji F0 med seboj nista statistično značilno razlikovali ($p = 0,16$). Regiji F1 pa sta se razlikovali, saj je bila vrednost $p = 0,0135$.

Vzporedno z nastavitvijo poskusa, ki je vključeval tudi obsevanje raztopin in čebul z UV-A sevanjem, smo postavili serijo čebul rast k oknu. Čebule so rasle v destilirani vodi in v podobnih pogojih kot pri poskusih brez obsevanja. Te čebule so nam služile kot kontrola, da smo lahko preverili vpliv samega UV-A sevanja na rastline. Če primerjamo MI koreninskih vršičkov čebul, ki so rasle v digestoriju z rezultati MI rastlin, ki so rasle pri oknu, ni opaznih statistično značilnih razlik med njimi (preglednica 1).

Preglednica 1: Vpliv sevanja UV-A na mitotski indeks po 72-urni izpostavitvi.

Prikazane so povprečne vrednosti mitotskega indeksa ($v\%$) \pm SN petih čebul. Čebule v digestoriju so bile obsevane z UV-A sevanjem, čebule pri oknu pa so rasle pri naravni svetlobi.

	MI - regija F0	MI – regija F1
čebule v digestoriju	5,56 \pm 0,7	2,97 \pm 0,49
čebule pri oknu	6,66 \pm 0,63	2,35 \pm 0,57
P (t-test)	0,26	0,42

4.2.1.2 24-urna izpostavitve testnim raztopinam

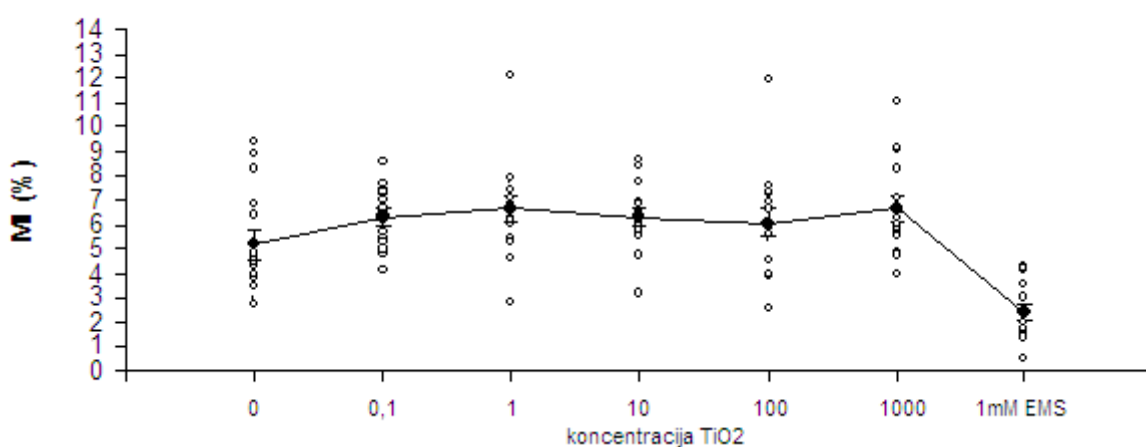
Tudi v meristemskih celicah koreninskih vršičkov, ki so rasli 24 ur v različnih testnih raztopinah, smo določali mitotski indeks. Primerjali smo mitotski indeks v koreninskih vršičkih negativne kontrole z MI koreninskih vršičkov, ki so rasli v različno koncentriranih raztopinah nanodelcev TiO₂. Prav tako smo z rezultati negativne kontrole primerjali MI koreninskih vršičkov, ki so bili izpostavljeni nanodelcem in hkrati obsevani z UV-A sevanjem. Tako smo ugotavljali morebitne vplive nanodelcev na aktivnost koreninskih vršičkov v odsotnosti UV-A sevanja in v prisotnosti UV-A sevanja.

Rezultati MI regije F0 koreninskih vršičkov po 24-urni izpostavitvi brez obsevanja so prikazani na sliki 15. Opazno je bilo rahlo povečevanje povprečnih vrednosti MI s povečevanjem koncentracije dodanih nanodelcev. Povprečna vrednost MI je bila pri negativni kontroli 5,19 % \pm 0,58. Pri raztopinah z nanodelci so se povprečne vrednosti MI gibale od 6,08 % do 6,66 %. Najvišja vrednost MI je bila pri konc. 1000 $\mu\text{g/ml}$ TiO₂,

najnižja pa pri konc. 100 $\mu\text{g/ml}$ TiO_2 . Ko smo primerjali MI koreninskih vršičkov, ki so rasli v raztopinah z nanodelci z MI koreninskih vršičkov negativne kontrole (destilirana voda) med njimi ni bilo statistično značilnih razlik ($p = 0,29$).

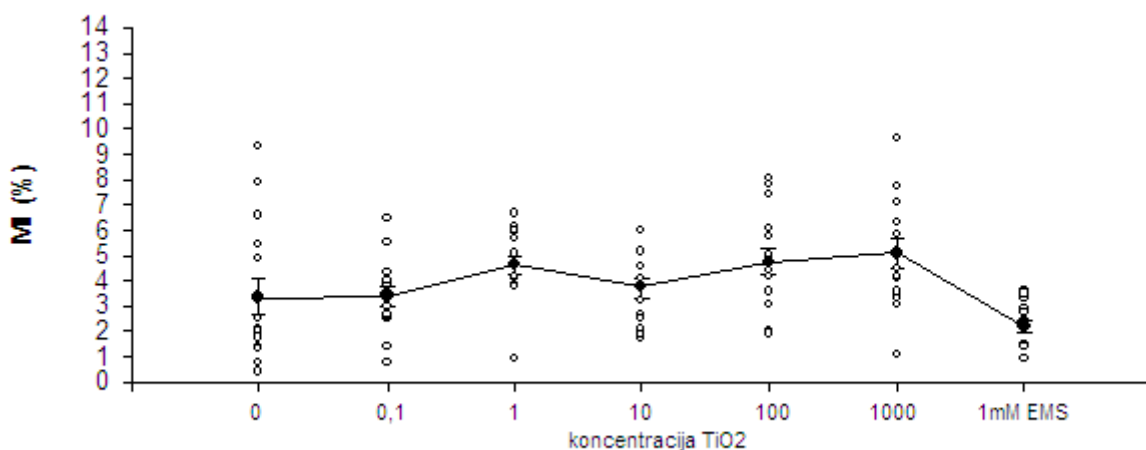
V drugi seriji poskusov, kjer smo raztopine in čebule obsevali z UV-A sevanjem (slika 17), je bila povprečna vrednost MI v F0 regiji pri negativni kontroli $6,20\% \pm 0,77$. Pri konc. 0,1 $\mu\text{g/ml}$ TiO_2 nato MI doseže med vsemi tretmaji najnižjo vrednost ($5,55\% \pm 0,61$). Najvišjo vrednost pa doseže pri konc. 100 $\mu\text{g/ml}$ TiO_2 in sicer je MI tukaj znašal $7,55\% \pm 0,94$.

Pri primerjavi MI v regiji F0 negativne kontrole z MI raztopin z dodanimi nanodelci ni bilo statistično značilnih razlik ($p = 0,27$).



Slika 15: Mitotski indeks v regiji F0 po 24-urni izpostavitvi neobsevanim testnim raztopinam.

Črta prikazuje povprečne vrednosti mitotskega indeksa. Koncentracije nanodelcev so podane v $\mu\text{g/ml}$.

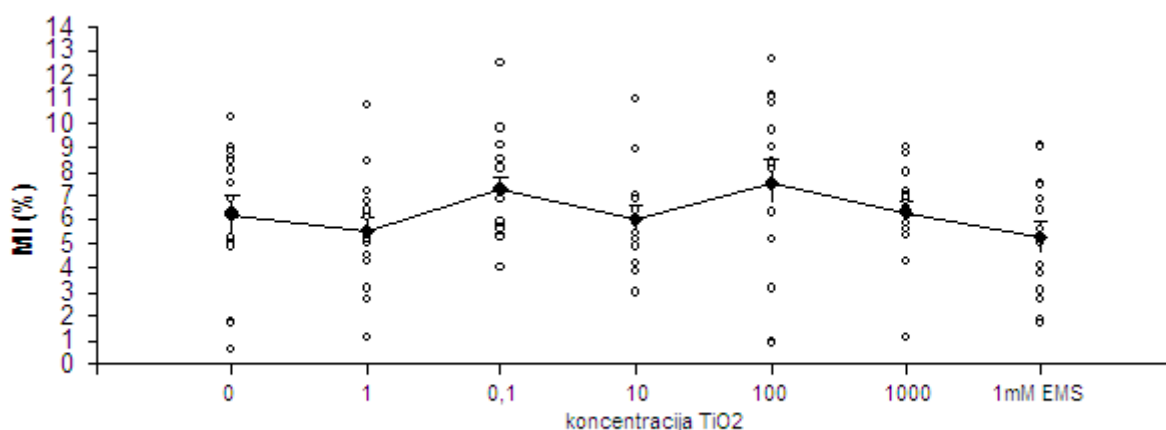


Slika 16: Mitotski indeks v regiji F1 po 24-urni izpostavitvi neobsevanim testnim raztopinam.

Črta prikazuje povprečne vrednosti mitotskega indeksa. Koncentracije nanodelcev so podane v $\mu\text{g/ml}$.

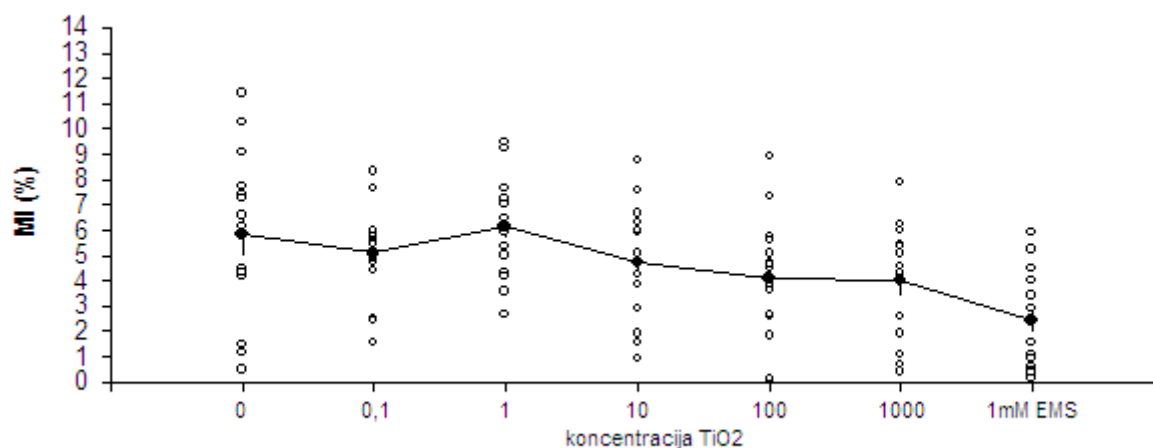
V regiji F1 koreninskih vršičkov rastočih v neobsevanih raztopinah (sliki 15 in 16) je bilo tako kot v regiji F0 opazno rahlo povečevanje povprečnih vrednosti MI s povečevanjem koncentracije nanodelcev. Vendar je bilo v tem delu vršička manj deležih se celic, zato so bile vrednosti MI nižje kot v regiji F0. Pri negativni kontroli je povprečna vrednost MI znašala $3,35 \% \pm 0,72$. Pri raztopinah z nanodelci pa so se vrednosti MI gibale med 3,38 % in 5,08 %. Najvišja vrednost MI je bila enako kot v regiji F0 pri konc. 1000 $\mu\text{g/ml}$, najnižja pa pri konc. 0,1 $\mu\text{g/ml}$ TiO_2 . Pri primerjavi rezultatov tretmajev z nanodelci z rezultati negativne kontrole (test ANOVA), smo dokazali statistično značilne razlike ($p = 0,048$) vrednosti MI v regiji F1 koreninskih vršičkov. Torej je prisotnost nanodelcev v raztopinah nekoliko vplivala na MI v regiji F1. Najbolj se je vrednosti MI povečala pri koncentraciji 1000 $\mu\text{g/ml}$ TiO_2 v primerjavi z negativno kontrolo.

Rezultati MI pri poskusu, kjer smo raztopine in čebule tudi obsevali z UV-A sevanjem, so prikazani na slikah 17 in 18. V regiji F1 koreninskih vršičkov, ki so rasli v obsevanih raztopinah je bila vrednost MI pri negativni kontroli $5,87 \% \pm 0,83$. Pri tretmajih z nanodelci so se vrednosti MI zmanjševale sorazmerno s povečevanjem koncentracije nanodelcev TiO_2 . Vrednosti MI so padale od 5,55 % do 3,99 %. Torej je bil opazen trend zmanjševanja povprečnih vrednosti MI, z izjemo konc. 1 $\mu\text{g/ml}$ TiO_2 , kjer se je MI povečal na $6,14 \% \pm 0,51$. Ko smo primerjali vrednosti MI med negativno kontrolo in različnimi koncentracijami nanodelcev med njimi ni bilo statistično značilnih razlik ($p = 0,07$). Torej nanodelci v raztopinah v prisotnosti UV-A sevanja niso imeli vpliva na MI v regiji F1 koreninskih vršičkov.



Slika 17: Mitotski indeks v regiji F0 po 24-urni izpostavitvi obsevanim testnim raztopinam.

Črta prikazuje povprečne vrednosti mitotskega indeksa. Koncentracije nanodelcev so podane v $\mu\text{g/ml}$.



Slika 18: Mitotski indeks v regiji F1 po 24-urni izpostavitvi obsevanim testnim raztopinam.

Črta prikazuje povprečne vrednosti mitotskega indeksa. Koncentracije nanodelcev so podane v µg/ml.

Primerjava regij F0 in F1 vršičkov je pokazala statistično značilne razlike med regijama ($p < 0,0001$). Z Bonferronijevim post testom smo ugotovili, da so se razlike pojavile pri koncentracijah do 100 µg/ml TiO₂, v primeru neobsevanih nanodelcev in pri koncentraciji 100 µg/ml TiO₂ pri obsevanih raztopinah z nano-TiO₂.

S testom ANOVA smo določili vpliv UV-A sevanja na posamezno regijo. Regije F0 vršičkov se med seboj niso statistično značilno razlikovale ($p = 0,26$), ne glede na to ali so bile čebule izpostavljene testnim raztopinam v prisotnosti UV-A sevanja ali brez sevanja. Medtem ko je v regiji F1 prišlo do razlik v vrednostih MI v poskusu brez UV-A obsevanja in z obsevanjem ($p = 0,0041$). S post testom smo ugotovili, da sta se med seboj najbolj razlikovali negativni kontroli iz obeh poskusov.

Na enak način kot smo pri 72-urnem testu preverjali vpliv samega UV-A sevanja na čebule, smo tudi pri 24-urnem poskusu serijo čebul postavili rasti k oknu. V obeh primerih je bil MI manjši v regiji F1 (preglednica 2). MI regije F0 se ni bistveno razlikoval med čebulami v digestoriju (čebule obsevane z UV-A sevanjem) in čebulami pri oknu (neobsevane čebule). Do statistično značilnih razlik med enimi in drugimi čebulami je prišlo v regiji F1. V čebulah, ki so rasle pri oknu, se je delež delečih celic v regiji F1 zmanjšal za 56 %. Pri čebulah, ki so rasle v digestoriju, pa se je povprečna vrednost MI v F1 regiji zmanjšala za samo 5 % glede na regijo F0.

Preglednica 2: Vpliv sevanja UV-A na mitotski indeks po 24-urni izpostavitvi.

Prikazane so povprečne vrednosti mitotskega indeksa (v %) \pm SN petih čebul. Čebule v digestoriju so bile obsevane z UV-A sevanjem, čebule pri oknu pa so rasle pri naravni svetlobi.

	MI - regija F0	MI - regija F1
čebule v digestoriju	6,20 \pm 0,77	5,87 \pm 0,83
čebule pri oknu	6,63 \pm 0,37	2,90 \pm 0,45
P (t-test)	0,62	0,004

4.2.2 Deleži posameznih faz mitoze

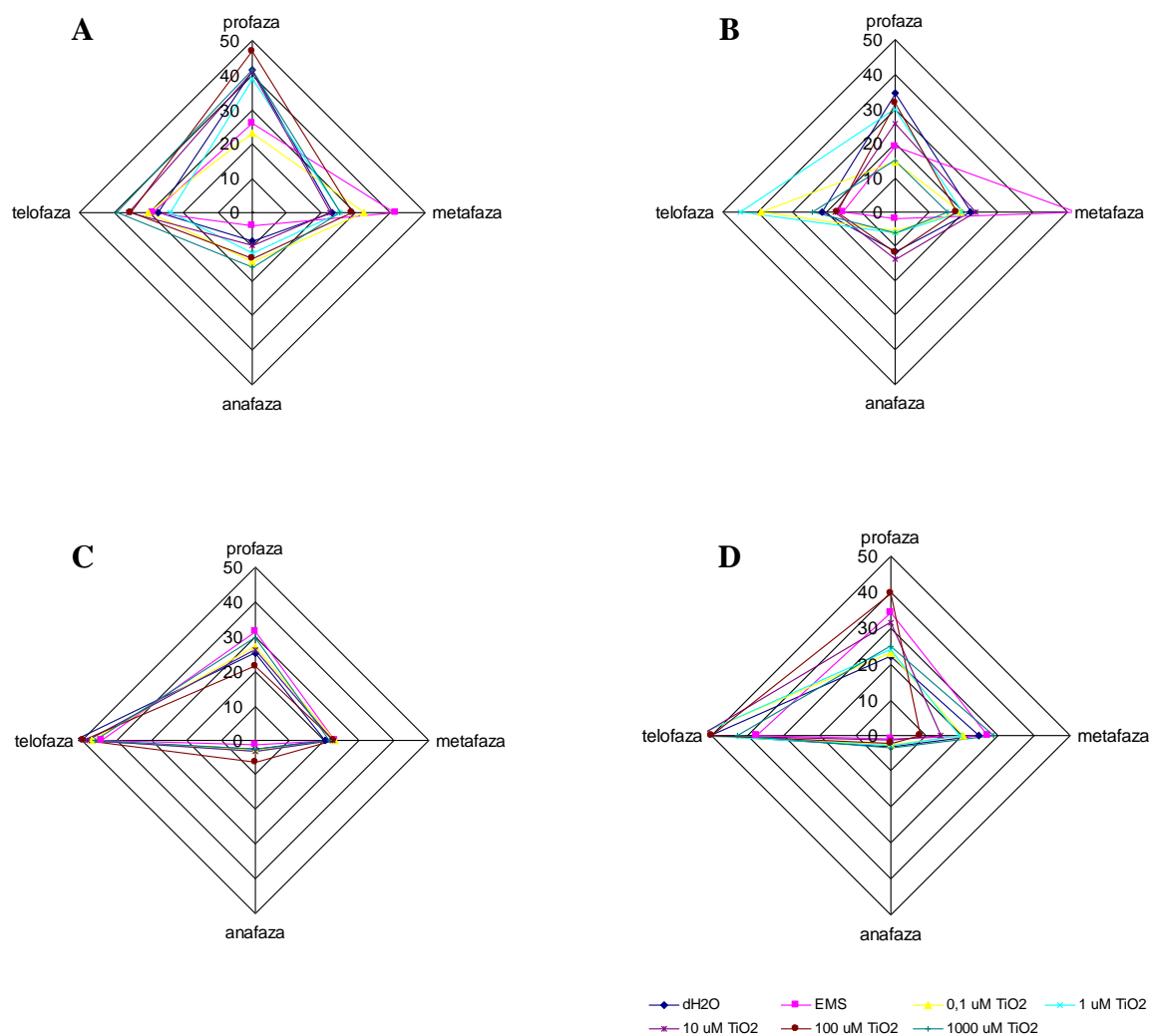
Iz podatkov, ki smo jih dobili pri pregledovanju mikroskopskih preparatov smo poleg mitotskega indeksa izračunali tudi deleže posameznih faz mitoze v celicah koreninskih vršičkov. Pri pregledovanju preparatov smo pri celicah v mitozni beležili še v kateri fazi mitoze so bile. Nato smo rezultate testnih raztopin nanodelcev primerjali z rezultati negativne kontrole v določeni regiji (slika 6) vršičkov. Iz teh podatkov smo dobili informacije o morebitnih vplivih različnih koncentracij nanodelcev na potek mitoze (podaljševanje celičnega cikla, zaustavitev mitoze,...). Dobljene rezultate poskusov (1. poskus brez obsevanja raztopin in čebul, 2. poskus z obsevanjem raztopin in čebul z UV-A sevanjem) smo tudi primerjali med seboj.

4.2.2.1 72-urna izpostavitvev testnim raztopinam

Pri obeh 72-urnih poskusih smo s testom ANOVA primerjali deleže faz mitoze znotraj določene regije koreninskih vršičkov. Primerjali smo dobljene rezultate pri raztopinah nanodelcev z rezultati negativne kontrole in ugotavljali morebiten vpliv nanodelcev TiO₂ na deleže faz mitoze. Pri prvem poskusu, brez UV-A obsevanja, v nobeni regiji (F0 in F1) koreninskih vršičkov nismo ugotovili statistično značilnih razlik v deležih faz mitoze pri primerjavi tretmajev nanodelcev in negativne kontrole (slika 19A in 19B). Delež faz mitoze pri testnih raztopinah nanodelcev se je v povprečju ohranjal v podobnem razmerju kot pri negativni kontroli (destilirana voda). Pri tej je bilo razmerje med profazo, metafazo, anafazo in telofazo v regiji F0; 42 : 23 : 8 : 27. V regiji F1 pa je bilo razmerje med deleži faz mitoze pri negativni kontroli 34 : 22 : 11 : 21. Torej nanodelci TiO₂ v izbranih koncentracijah niso vplivali na deleže faz mitoze.

Ko smo obsevali raztopine in čebulčke z UV-A sevanjem smo pri statistični primerjavi rezultatov med raztopinami nanodelcev in negativno kontrolo ugotovili med njimi razlike. V F0 regiji (slika 19C) je prišlo do razlik v deležu anafaz, vendar so te bile komaj statistično značilne ($p = 0,041$). V F1 regiji (slika 19D) pa so se med raztopinami nanodelcev in negativno kontrolo pojavile razlike v deležu profaz ($p = 0,015$) in deležu metafaz ($p = 0,007$). Delež profaz se je v koreninah tretiranih z nanodelci povečal v primerjavi z negativno kontrolo, delež metafaz pa se je zmanjšal. Torej so nanodelci TiO_2 v prisotnosti UV-A sevanja plivali na deleže faz mitoze.

Po končanih obeh poskusih smo primerjali rezultate poskusa z obsevanimi raztopinami in čebulami z rezultati poskusa brez obsevanja. Ugotovili smo, da se rezultati regij F0 razlikujejo pri vseh fazah, razen delež metafaz ostaja nespremenjen tudi v prisotnosti UV-A sevanja (slika 19A in 19C). Med obsevanjem se zmanjša delež profaz in anafaz, delež telofaz pa se poveča. Prav tako so se pojavile razlike med poskusoma pri primerjavi deležev faz mitoze v regiji F1 (19B in 19 D). Ponovno se poskusa brez in z UV-A obsevanjem nista razlikovala samo v deležu metafaz. Med obsevanjem se je povečal delež profaz in telofaz ter zmanjšal delež anafaz.



Slika 19: Delež posamezne faze mitoze po 72-urni izpostavitvi nanodelcem TiO₂.

A: V regiji F0, brez obsevanja z UV-A sevanjem;

B: V regiji F1, brez obsevanja z UV-A sevanjem;

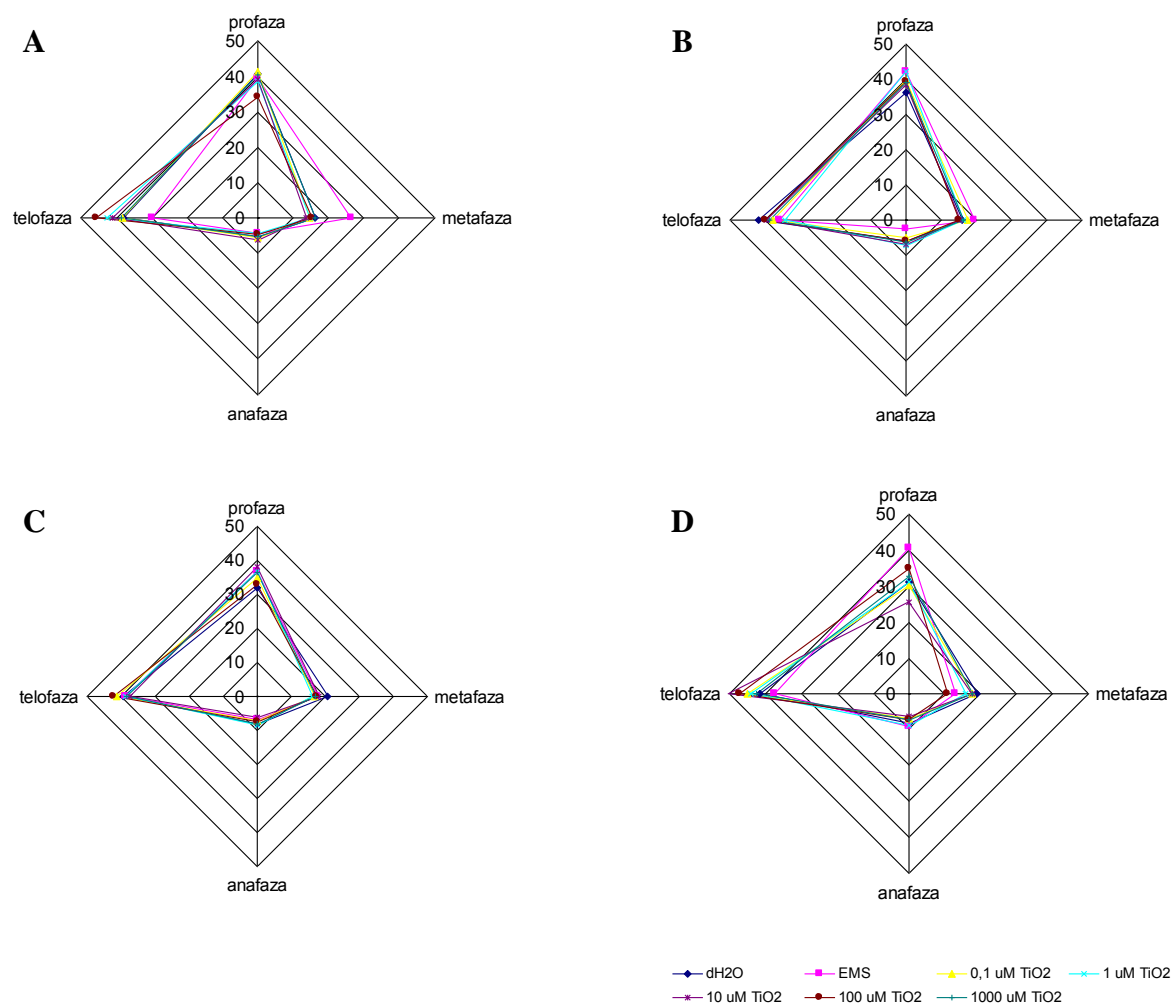
C: V regiji F0, z obsevanjem raztopin z UV-A sevanjem;

D: V regiji F1, z obsevanjem raztopin z UV-A sevanjem.

4.2.2.2 24-urna izpostavitve testnim raztopinam

Tudi pri 24-urnih poskusih, smo spremljali deleže faz mitoze v regijah F0 in F1 koreninskih vršičkov (slika 20). Primerjava deležev faz mitoze med tretmaji nanodelcev in negativno kontrolo znotraj določene regije koreninskih vršičkov ni pokazala razlik med njimi, niti v primeru neobsevanih niti obsevanih raztopin nano-TiO₂ in čebul. Nanodelci v različno koncentriranih raztopinah niso vplivali na spremembe deležev faz mitoze v regiji F0 in F1, saj so bili rezultati primerljivi z negativno kontrolo. Pri tej je bilo razmerje med deleži faz v poskusu brez UV-A obsevanja, v regiji F0 41 : 16 : 5 : 38 (slika 20A). V regiji F1 pa 36 : 16 : 6 : 42 (slika 20B). V drugem poskusu, ki je vključeval tudi obsevanje raztopin in čebul z UV-A sevanjem, so bili deleži faz pri negativni kontroli sledeči: v regiji F0 32 : 21 : 8 : 39 (slika 20C), v regiji F1 pa 31 : 19 : 8 : 42 (slika 20D). Torej pri 24-urni izpostavitvi nanodelci TiO₂ v izbranih koncentracijah niso vplivali na deleže faz mitoze v primerjavi z negativno kontrolo. Njihovega vpliva nismo zaznali niti v regiji F0, niti v regiji F1 koreninskih vršičkov čebule.

Primerjali smo poskus brez obsevanja in poskus z obsevanjem z UV-A sevanjem. Za statistično analizo smo uporabili test ANOVA z mejo zaupanja pri $p = 0,05$. Ugotovili smo, da se pojavijo razlike med poskusoma brez obsevanja in z obsevanjem z UV-A sevanjem. V regiji F0 se pojavijo razlike v deležu profaz ($p = 0,02$), delež teh se v poskusu z obsevanjem delcev in čebul zmanjša v primerjavi s poskusom brez obsevanja. Prav tako smo opazili razlike med poskusoma v deležu anafaz, ki sicer niso bile zelo očitne ($p = 0,042$). Delež anafaz se je v drugem poskusu (obsevanje z UV-A sevanjem) v primerjavi s prvim (brez UV-A sevanja) rahlo povečal. V regiji F1 so bile razlike med poskusoma samo v deležu profaz ($p = 0,01$). V drugem poskusu se v primerjavi s prvim delež profaz zmanjša.



Slika 20: Delež faz mitoze po 24-urni izpostavitvi.

A: V regiji F0, brez obsevanja z UV-A sevanjem;

B: V regiji F1, brez obsevanja z UV-A sevanjem;

C: V regiji F0, z obsevanjem raztopin z UV-A sevanjem;

D: V regiji F1; z obsevanjem raztopin z UV-A sevanjem.

4.2.3 Genotoksičnost

Morebitni genotoksični vpliv testiranih nanodelcev smo analizirali z vrsto in pogostostjo kromosomskih aberacij in mikrojedr v meristemskih celicah koreninskih vršičkov. Spremembe na nivoju genoma smo beležili vzporedno med pregledovanjem celičnih delitev. V koreninskih vršičkih so se pojavljale naslednje kromosomske aberacije: anafazni mostički, c-mitoze in različni fragmenti (slika 21). Aberacije smo beležili pri pregledovanju regij F0 in F1 (slika 6). Mikrojedra nastanejo kot posledica kromosomskih fragmentov in se izrazijo šele v naslednji generaciji celic, zato smo njihovo frekvenco beležili pri pregledovanju regije F1. V tej regiji je štetje mikrojedr bolj učinkovito (Ma in sod., 1994).

4.2.3.1 72-urna izpostavitve testnim raztopinam

V preglednici 3 so prikazani deleži posameznih kromosomskih aberacij in mikrojedr, ki so se pojavljali v koreninskih vršičkih po 72-urni izpostavitvi neobsevanim (brez UV-A) in obsevanim (z UV-A) testnim raztopinam. Med aberacijami so se najpogosteje pojavljali fragmenti. Pri neobsevanih rastlinah, kjer so se pojavljali fragmenti, je bila njihova frekvenca v od 0,005 % do 0,01 % pregledanih celicah določenega tretmaja. V obsevanih rastlinah pa so se pojavljali fragmenti v od 0,003 % do 0,01 % pregledanih celicah določenega tretmaja. Nekoliko višjo frekvenco pojavljanja fragmetov smo zaznali po pričakovanjih pri pozitivni kontroli (EMS). Skladno s pojavljanjem fragmetov so se pojavljala tudi mikrojedra. Njihova frekvenca pojavljanja v neobsevanih rastlinah je bila od 0,01 % do 0,05 % pregledanih celicah določenega tretmaja in v obsevanih raslinah od 0,03 % do 0,07 % pregledanih celicah določenega tretmaja. Anafazni mostički so se pojavljali redkeje, zasledili smo jih pri pregledovanju vršičkov, ki so rasli v koncentraciji 0,1 $\mu\text{g/ml}$ TiO_2 in v poskusu brez obsevanja pri koncentraciji 100 $\mu\text{g/ml}$ TiO_2 . V skladu s pričakovanji so se pojavljali tudi v vršičkih, tretiranih z EMS. Prisotnost c-mitoz smo ugotovili pri redkih rastlinah, vendar je bilo njihovo število takrat relativno visoko.

Preglednica 3: Kromosomske aberacije in mikrojedra v celicah koreninskih vršičkov po 72-urni izpostavitvi testnim raztopinam.

Prikazane so povprečne vrednosti pojavljanja aberacij in mikrojedra (v %) v primeru neobsevanih (brez UV) in obsevanih raztopin (z UV).

	0	0 µg/ml TiO ₂		0.1 µg/ml TiO ₂		1 µg/ml TiO ₂		10 µg/ml TiO ₂		100 µg/ml TiO ₂		1000 µg/ml TiO ₂		1mM EMS	
		okno	brez UV	z UV	brez UV	z UV	brez UV	z UV	brez UV	z UV	brez UV	z UV	brez UV	z UV	brez UV
mikrojedra	0,0129	0,0212	0,0321	0,0532	0,0447	0,0325	0,0515	0,0193	0,0260	0,0323	0,0263	0,0291	0,0712	0,1080	0,1506
fragmenti	0,0000	0,0105	0,0031	0,0051	0,0032	0,0053	0,0126	0,0000	0,0064	0,0106	0,0000	0,0143	0,0064	0,0537	0,0194
a. mostički	0,0000	0,0000	0,0000	0,0051	0,0032	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0106	0,0000	0,0000	0,0000	0,0322	0,0129
c-mitoze	0,0000	0,0000	0,0094	0,0103	0,0000	0,0000	0,0126	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0096	0,0268	0,0000

Preglednica 4: Kromosomske aberacije in mikrojedra v celicah koreninskih vršičkov po 24-urni izpostavitvi testnim raztopinam

Prikazane so povprečne vrednosti pojavljanja aberacij in mikrojedra (v %) v primeru neobsevanih (brez UV) in obsevanih raztopin (z UV).

	0	0 µg/ml TiO ₂		0.1 µg/ml TiO ₂		1 µg/ml TiO ₂		10 µg/ml TiO ₂		100 µg/ml TiO ₂		1000 µg/ml TiO ₂		1mM EMS	
		okno	brez UV	z UV	brez UV	z UV	brez UV	z UV	brez UV	z UV	brez UV	z UV	brez UV	z UV	brez UV
mikrojedra	0,0064	0,0190	0,0309	0,0191	0,0436	0,0000	0,0122	0,0253	0,0564	0,0126	0,0755	0,0250	0,0632	0,1226	0,1581
fragmenti	0,0031	0,0063	0,0093	0,0094	0,0093	0,0062	0,0000	0,0032	0,0062	0,0094	0,0062	0,0062	0,0062	0,0225	0,0202
a. mostički	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0032	0,0000	0,0000	0,0031	0,0031	0,0031	0,0096	0,0067
c-mitoze	0,0093	0,0000	0,0154	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0062	0,0187	0,0093	0,0000	0,0193	0,0344

Dobljene podatke smo nato tudi statistično analizirali (preglednica 5). S testom ANOVA smo primerjali rezultate iz različno koncentriranih raztopin TiO₂ z rezultati negativne kontrole. To primerjavo smo naredili za prvi poskus brez UV-A obsevanja in drugi poskus, kjer smo raztopine in čebule tudi obsevali. Iz podatkov v preglednici 5 je razvidno, da v nobenem poskusu ni bilo statistično značilnih razlik med negativno kontrolo in različnimi raztopinami nanodelcev (ANOVA₁). Primerjali smo tudi rezultate tretmajev iz prvega poskusa (brez UV-A) z rezultati tretmajev iz drugega poskusa (obsevanje z UV-A). Do statistično značilnih razlik med poskusoma je prišlo pri deležu pojavljanja anafaznih mostičkov (ANOVA₂). S Studentovim t-testom smo naredili še primerjavo pojavljanja aberacij in mikrojedr med negativno (destilirana voda) in pozitivno kontrolo (EMS) za vsak poskus. Statistično značilne razlike se v obeh poskusih pojavijo pri deležu mikrojedr.

Preglednica 5: Statistična analiza pojavljanja kromosomskih aberacij in mikrojedr pri 72-urni izpostavitvi

ANOVA₁: testiranje vpliva nanodelcev TiO₂;

ANOVA₂: testiranje vpliva UV-A sevanja

	ANOVA ₁		ANOVA ₂	t-test	
	brez UV	z UV		brez UV	z UV
mikrojedra	0,8875	0,1646	0,4978	0,0297*	0,0038*
fragmenti	0,679	0,2869	0,5444	0,0786	0,0681
a. mostički	0,0906	0,4229	0,0052*	-	-
c-mitoze	0,3996	0,6903	0,8308	-	-

* označuje statistično značilno razliko pri meji zaupanja pri $p < 0,05$.

4.2.3.1 24-urna izpostavitve testnim raztopinam

Deleži kromosomskih aberacij in mikrojedr v koreninskih celicah po 24-urni izpostavitvi različnim testnim raztopinam v poskusu brez UV-A obsevanja in z UV-A obsevanjem so prikazani v preglednici 4. Tudi pri krajši izpostavitvi čebul so bili med aberacijami najpogostejši fragmenti in pri vseh tretmajih so se ponovno pojavila mikrojedra. Anafazni mostički so pri nižjih koncentracijah nanodelcev niso pojavljali, so se pa pojavljali pri višjih koncentracijah, vendar so bili deleži pojavljanja relativno majhni (kjer so se pojavili, so bili prisotni v povprečno 0,003 % celic določenega tretmaja). Z večjo frekvenco so se aberacije in mikrojedra pojavljali pri pozitivni kontroli (EMS).

Rezultate deleža posameznih kromosomskih aberacij in mikrojedr po 24-urni izpostavitvi smo statistično analizirali (preglednica 6). S testom ANOVA smo tudi v tem primeru primerjali rezultate prvega (brez UV-A obsevanja) in drugega (z UV-A obsevanjem) poskusa med testnimi raztopinami nanodelcev in negativno kontrolo. Med njimi ni bilo statistično značilnih razlik (ANOVA₁). Testirali smo tudi rezultate posameznega tretmaja iz prvega in drugega poskusa in prav tako ni bilo statistično značilnih razlik (ANOVA₂). S Studentovim t-testom smo primerjali deleže aberacij in mikrojedr med negativno kontrolo (destilirana voda) in pozitivno kontrolo (EMS). Statistično značilne razlike med kontrolama so se v obeh poskusih ponovno pokazale v deležu mikrojedr.

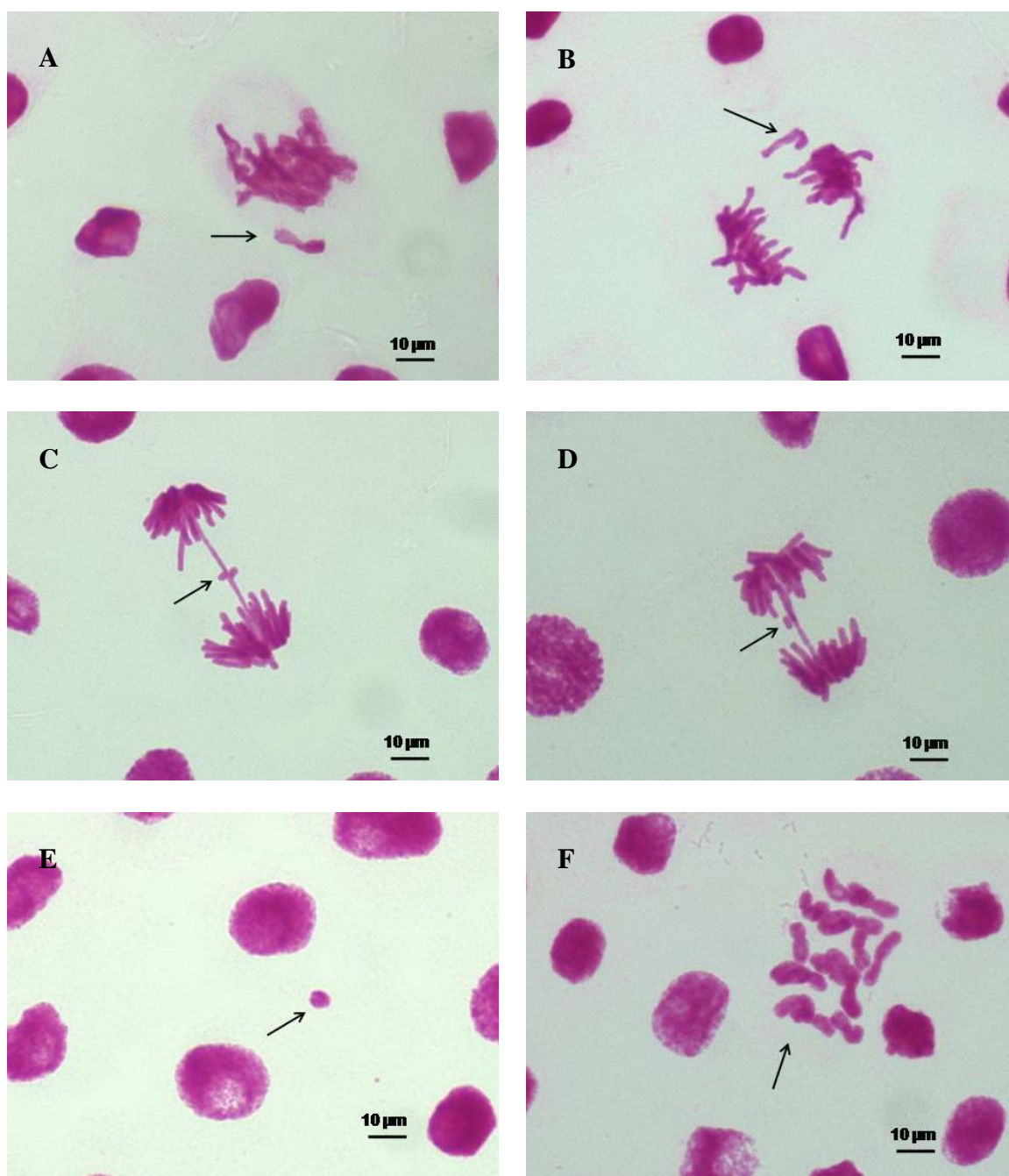
Preglednica 6: Statistična analiza pojavljanja kromosomskih aberacij in mikrojedr v koreninskih vršičkih po 24-urni izpostavitvi.

ANOVA₁: testiranje vpliva nanodelcev TiO₂;

ANOVA₂: testiranje vpliva UV-A sevanja.

	ANOVA ₁		ANOVA ₂	t-test	
	brez UV	z UV		brez UV	z UV
mikrojedra	0,8183	0,4047	0,1106	0,0171*	0,0026*
fragmenti	0,9563	0,6367	0,9668	0,2033	0,3271
a. mostički	0,5528	0,5528	0,7113	-	-
c-mitoze	0,182	0,4008	0,3929	-	0,3795

* označuje statistično značilno razliko pri meji zaupanja pri $p < 0,05$.



Slika 21: Kromosomske aberacije in mikrojedro.

Kromosomske aberacije in mikrojedro so značeni s puščicami.

A: Nastali fragment v metafazi pri pozitivni kontroli po 72-urni izpostavitvi;

B: Fragment v anafazi pri pozitivni kontroli po 72-urni izpostavitvi z obsevanjem raztopin in rastlin z UV-A sevanjem;

C: Primer anafaznega mostička nastalega pri negativni kontroli po 24-urni izpostavitvi brez obsevanja;

D: Anafazni mostiček s fragmentom pri koncentraciji 0,1 µg/ml TiO₂ po 72-urni izpostavitvi z obsevanjem raztopin in rastlin;

E: Mikrojedro nastalo pri negativni kontroli po 24-urni izpostavitvi brez obsevanja raztopin;

F: C- mitoza nastala pri pozitivni kontroli po 24-urni izpostavitvi z obsevanjem raztopin in rastlin z UV-A sevanjem.

5 RAZPRAVA

Podatki iz literature kažejo različne odzive organizmov na nano-TiO₂. Večina raziskav o vplivih nanodelcev se osredotoča predvsem na njihov vpliv na človekovo zdravje. To je verjetno tudi poglavitni razlog, za prevlado informacij o vplivih različnih nanodelcev na živalske celice, o vplivih na ostale organizme pa obstaja dosti manj podatkov. Z raziskavami vplivov nanodelcev na druge organizme lahko dobimo pomembne informacije o njihovi varnosti. In ne nazadnje predstavljajo rastline pomembno komponento v ekosistemih in nanodelci lahko z vplivi nanje posredno vplivajo tudi na ljudi.

5.1 MAKROSKOPSKA OPAZOVANJA

Splošne toksične vplive snovi se pri čebulnem testu lahko spremlja z opazovanjem rasti in razvoja korenin. Korenine so tisti del rastline, ki je v neposrednem stiku s testno snovjo, zato se lahko njen vpliv tukaj najprej izrazi (Sresty in Rao, 1999). Zavrta rast in razvoj korenin je lahko odraz seštevka različnih škodljivih vplivov. Celokupno lahko odraža posledice citotoksičnega in genotoksičnega delovanja snovi, saj gre za korelacijo med makroskopskimi in mikroskopskimi parametri (Fiskesjo, 1985; Saradjen, 1993; Paradiž, 1996; El-Ghamery in sod., 2003).

S spremljanjem rasti in razvoja korenin so že dokazali toksičnost nekaterih nanodelcev za rastline (Lin in Xing, 2007; Yang in Watts, 2005; Lee in sod., 2008). Lin in Xing (2007) sta med drugim ugotovila, da zmanjšana rast korenin ni odvisna samo od vrste nanodelcev, ampak tudi od izbire testnih rastlin. Izbrani nanodelci TiO₂ v naših poskusih niso zavirali rast in razvoj korenin čebule. V poskusih brez obsevanja z UV-A sevanjem smo zaznali celo trend rahlega povečevanja povprečnega števila korenin, povprečne dolžine korenin in dolžine koreninskega sistema. Povečevanje vseh treh opazovanih makroskopskih parametrov je bilo sorazmerno s povečevanjem koncentracij dodanih nanodelcev. Vendar pa so bile razlike med testnimi raztopinami in negativno kontrolo vseeno premajhne, da bi bile statistično značilne. Lei in sod. (2004) so ugotovili nekatere pozitivne vplive nanodelcev TiO₂, ki so v ustreznih koncentracijah izboljšali kalivost starih špinačnih semen in rast poganjkov. Prav tako lahko nanodelci TiO₂ zaščitijo kloroplaste pred poškodbami, povzročeni s prekomernim UV-B sevanjem. Seeger in sod. (2008) pa so nanodelcem TiO₂ izpostavili vrbe in niso ugotovili nobenih vplivov na njihove korenine. Tudi mi lahko

zaključimo, da nanodelci TiO₂ v izbranih koncentracijah v poskusu brez obsevanja z UV-A svetlobo niso imeli vpliva na izbrane makroskopske parametre.

V drugem poskusu, kjer smo raztopine nanodelcev obsevali z UV-A sevanjem, smo prav tako zaznali sicer statistično neznačilen trend povečevanja števila korenin sorazmerno s povečevanjem koncentracije nanodelcev TiO₂ (slika 8). Pri meritvah povprečne dolžine korenin so bili rezultati bolj variabilni. Med tretmaji nismo zaznali trenda zmanjševanja oz. povečevanja dolžin korenin, rezultati so bili primerljivi z dolžino korenin pri negativni kontroli (slika 9). Dolžina celotnega koreninskega sistema se je pri nižjih koncentracijah nanodelcev, glede na negativno kontrolo zmanjšala za do 17 %, pri višjih koncentracijah nanodelcev pa se je povečala za do 6 % (slika 10). Vendar tudi v tem poskusu, kjer smo raztopine in čebule obsevali, so bile opažene razlike med tretmaji nanodelcev in negativno kontrolo majhne in niso bile statistično značilne. Opazili smo tudi, da so bile izmerjene vrednosti makroskopskih parametrov v tem poskusu z obsevanjem z UV-A sevanjem večje, kot pri poskusu brez obsevanja. Ta pojav bi lahko razložili z višjo sobno temperaturo in nekoliko daljšo fotoperiodo tekom drugega poskusa, kar bi lahko vplivalo na hitrejši metabolizem čebulic in hitrejšo rast korenin. Statistična analiza podatkov obeh poskusov pa med njima vseeno ni pokazala statistično značilnih razlik. Torej UV-A obsevanje raztopin in čebul ni bistveno vplivalo na rezultate drugega poskusa in ni povečalo strupenega učinka testiranih nanodelcev. Nanodelci TiO₂ v koncentracijah od 0,1 do 1000 µg/ml niso imeli zaviralnega učinka na rast in razvoj korenin čebule.

Pri rezanju zraslih korenin smo bili pozorni tudi na njihove druge morfološke značilnosti. Opazovali smo njihovo obarvanost, debelino, čvrstost itd., če bi tako morda opazili kakšne razlike med tretmaji. Po pričakovanjih so med vsemi koreninami izstopale tretirane z EMS. Te korenine so bile rahlo rjavo obarvane, tanjše, bolj prosojnega videza in mehkejše. Pri koreninah, ki so rasle v ostalih testnih raztopinah, podobnih znakov nismo opazili. Smo pa pri 72-urnih poskusih pri višjih koncentracijah nanodelcev (100 in 1000 µg/ml TiO₂) opazili, da so korenine na videz bolj čvrste in debele. Na površini korenin so nanodelci naredili nekakšno oblogo. Omenimo naj, da sta Asli in Neumann (2009) pri poskusih z enakimi nanodelci tudi opazila nabiranje delcev na površini korenin koruze. Posledično je prišlo do mašenja por in zmanjševanja transporta skozi celične stene. Rastline so kazale znake stresa zaradi pomanjkanja vode. Mi takšnega vpliva na čebulah nismo opazili, bi se pa morda lahko izrazil, če bi podaljšali trajanje poskusa. Asli in Neumann sta sicer

zaključila, da nano-TiO₂ lahko povzroča stres pri koruzi, vendar ne zaradi njegove toksičnosti, temveč fizične vezave na korenine in celične stene.

5.2 MIKROSKOPSKA OPAZOVANJA

5.2.1 Mitotski indeks

5.2.1.1 72-urna izpostavitve testnim raztopinam

Pri pregledu jeder v regijah F0 koreninskih vršičkov, tako v poskusu z neobsevanimi, kot v poskusu z obsevanjem raztopin in čebulčkov nismo ugotovili statistično značilnih razlik mitotskih indeksov med negativno kontrolo in tretmaji z nanodelci. Nanodelci TiO₂ niso vplivali na MI v regiji F0 koreninskih vršičkov čebule, tako v prisotnosti UV-A sevanja kot odsotnosti UV-A sevanja. Pri primerjavi vrednosti mitotskega indeksa v regiji F0 med neobsevanimi in obsevanimi raztopinami (sliki 11 in 13) smo ugotovili, da so bili v drugem poskusu z obsevanimi raztopinami mitotski indeksi statistično neznačilno višji. Izjemoma se je mitotski indeks znižal pri koncentraciji izjemo 1000 µg/ml TiO₂). Kar bi sicer lahko kazalo na morebiten vpliv obsevanih nanodelcev pri višjih koncentracijah, vendar ko smo primerjali rezultate z rezultati poskusa brez UV-A obsevanja, se ti med sabo niso statistično razlikovali. Opazanja zvišanja mitotskega indeksa v poskusu z obsevanimi raztopinami sovпада z rezultati makroskopskega vrednotenja korenin, ki so bile v drugem poskusu daljše (slika 9). Razlog za te sicer statistično neznačilne razlike bi lahko bili nekoliko boljši abiotski pogoji tekom drugega poskusa (npr. višja sobna temperatura in daljša fotoperioda). Po navedbah virov je mitotski indeks močno odvisen od temperature (Wierzbicka, 1999).

Pri pregledu regije F1 koreninskih vršičkov čebule smo v poskusu z UV-A obsevanimi raztopinami in čebulčki, ugotovili statistično značilne razlike med negativno kontrolo in raztopinami z dodanimi nanodelci. Z Bonferronijevim post testom smo ugotovili, da je do statistično značilnih razlik prišlo samo na račun večjega zmanjšanja mitotskega indeksa pri koncentraciji 100 µg/ml TiO₂. Torej kljub vsemu nanodelci v splošnem tudi v regiji F1 v prisotnosti UV-A sevanja niso imeli vplivov na vrednosti mitotskega indeksa.

Znotraj obeh poskusov smo naredili primerjavo med regijama F0 in F1. Ugotovili smo, da je v poskusu z neobsevanimi raztopinami in v poskusu z obsevanimi raztopinami, prišlo do statistično značilnega zmanjšanja mitotskega indeksa v regiji F1. Takšni rezultati so pri

normalnem poteku celičnega cikla pričakovani. Celice se v regiji F1 začnejo diferencirati in število delitev se zmanjšuje. V splošnem je bil mitotski indeks v F0 višji kot v F1, kar je v skladu z zgoraj omenjenim dejstvom. Do tega vzorca je prišlo tako v obsevanih kot neobsevanih koreninah, zato je sklepamo, da UV-A sevanje ni povečalo strupenosti nanodelcev. To delno potrjuje tudi primerjava poskusov z neobsevanimi in obsevanimi raztopinami in čebulami. Med poskusoma nismo opazili statistično značilnih razlik v regiji F0, primerjava regij F1 pa je med poskusoma pokazala statistično značilne razlike.

Prisotnost nanodelcev v raztopinah torej v večini primerov ni bistveno vplivala na aktivnost koreninskega meristema pri čebulah. So se pa pri nekaterih koncentracijah pojavila nekoliko večja odstopanja mitotskega indeksa, vendar dobljenih rezultatov ne moremo neposredno pripisati vplivom nanodelcev. O nedvomnem vplivu nanodelcev TiO₂ na zmanjšanje rasti in delitev celic, pa poročajo iz raziskav pri različnih bakterijah (Adams in sod., 2006; Kim in sod., 2005; Wahrheit in sod. 2007).

5.2.1.1 24-urna izpostavitve testnim raztopinam

Mitotski indeks je bil, podobno kot pri 72-urni izpostavljenosti, tudi pri 24-urni izpostavitvi višji v poskusu z obsevanimi raztopinami. Vendar tokrat ne pri vseh koncentracijah. Višje vrednosti so tudi tukaj lahko pojav hitrejšega metabolizma zaradi višje sobne temperature in daljše fotoperiode. Ker mitotski indeks ni bil povišan pri vseh koncentracijah, predvidevamo, da se pri krajši izpostavitvi vpliv abiotskih dejavnikov še ne izrazi v tolikšni meri kot pri daljši izpostavitvi. Pri poskusu z UV-A obsevanjem smo v F0 regiji opazili nekoliko večja nihanja mitotskega indeksa, vendar razlike niso bile statistično značilne. Teh nismo ugotovili tudi pri primerjavi tretmajev v poskusu brez obsevanja raztopin in čebul. Prav tako primerjava rezultatov po pregledu regij F0, med poskusoma z obsevanjem in brez obsevanja ni pokazala statistično značilnih razlik med njima. Torej UV-A obsevani nanodelci po 24 urah niso bistveno vplivali na mitotski indeks v koreninskih vršičkih čebul, ki so rasle v raztopinah nanodelcev TiO₂, ne v regiji F0 niti v regiji F1.

Tudi pri 24-urni izpostavitvi rastlin smo po pregledu regij F1 ugotovili, da se vrednosti znižajo v primerjavi z regijo F0. Sklepali, smo da celični cikel normalno poteka. Veliko povečanje deleža delečih se celic, lahko kaže na zastoj celičnih delitev (Ma in sod., 1994). V drugem poskusu z UV-A obsevanjem, je bil mitotski indeks v regiji F1 višji kot v

poskusu brez obsevanja. Samo pri koncentraciji 1000 $\mu\text{g/ml}$ TiO_2 , je v drugem poskusu MI v F1 regiji nižji v primerjavi z prvim poskusom. V poskusu brez UV-A obsevanja smo zaznali rahel trend povečevanja MI skladno s povečevanjem konc. TiO_2 , pri poskusu z UV-A obsevanjem, pa smo opazili rahlo upadanje vrednosti MI z naraščajočo koncentracijo nanodelcev. Statistična analiza dobljenih podatkov je pokazala, da so pri prvem poskusu tretmaji nanodelcev in negativne kontrole med seboj komaj statistično različni ($p = 0,048$), v drugem poskusu pa niso bili statistično različni. S primerjavo rezultatov regij F1, smo ugotovili, da se rezultati poskusov z obsevanjem raztopin in čebulčkov in brez obsevanja med seboj statistično značilno razlikujejo.

Pri ugotavljanju aktivnosti celic koreninskega vršička torej nismo opazili večjih sprememb med tretmaji in med poskusi. Poskusa brez obsevanja z UV-A in z obsevanjem z UV-A se med seboj statistično značilno razlikujeta pri rezultatih dobljenih v regijah F1 koreninskih vršičkov. Drugače pa nanodelci TiO_2 v testnih koncentracijah niso bistveno vplivali na spremembe mitotskega indeksa v primerjavi z negativnima kontrolama obeh poskusov. Tudi po obsevanju nanodelcev z UV-A sevanjem, ti niso vplivali na spremembe mitotskega indeksa. Glede na to sklepamo, da nanodelci TiO_2 nimajo strupenega učinka na korenine čebule.

V poskusih z obsevanjem raztopin z UV-A sevanjem smo nastavili dodatno serijo kontrolnih čebul rast k oknu. V 72-urnem poskusu med kontrolnimi čebulami v digestoriju, ki so bile tudi obsevane in neobsevanimi kontrolnimi čebulami pri oknu ni bilo statistično značilnih razlik (preglednica 1). Torej samo UV-A sevanje ni vplivalo na koreninske vršičke čebule. V 24-urnem poskusu pa so bile opažene razlike med kontrolnimi čebulami v digestoriju in pri oknu. Pri primerjavi regiji F1 se je čebulam pri oknu delež celic v mitozu močno zmanjšal v regiji F1 (preglednica 2), česar pri obsevanih kontrolnih čebulah nismo zaznali. Zato bi lahko bile krive morebitne metodološke napake pri izdelavi mikroskopskih preparatov.

5.2.2 Deleži faz mitoze

Vzporedno z ugotavljanjem mitotskega indeksa smo v koreninskih vršičkih, določali tudi pogostost posameznih faz mitoze. Izhajali smo iz že znanih predpostavk, da tretiranje z nekaterimi snovmi vpliva na tvorbo in delovanje delitvenega vretena ter tako poruši normalno razmerje med posameznimi fazami delitve. Takšen učinek so med drugim ugotovili pri tretiranjih korenin s kolhicinom, različnimi herbicidi (Smaka-Kincl, 1993; Saradjen, 1993) in kovinami (El-Ghamery in sod., 2003). V naših poskusih z izbranimi testnimi raztopinami nanodelcev TiO_2 takšnega učinka nismo ugotovili. Ne glede na trajanje izpostavitve in na regijo koreninskega vršička.

Pri 72-urni izpostavitvi brez obsevanja nismo ugotovili razlik med tretmaji z nanodelci in negativno kontrolo (slika 19A in 19B). Pri 72-urnem poskusu z UV-A obsevanjem, pa smo zaznali razlike v regiji F0 med raztopinami nanodelcev in negativno kontrolo v deležu anafaz (slika 19C). Pri koncentraciji $100 \mu\text{g/ml}$ TiO_2 se je delež anafaz povečal na 6 %, pri ostalih testnih raztopinah pa so se deleži teh gibali med 2 in 3 %. V regiji F1 smo zaznali razlike v deležu profaz in metafaz (slika 19D). Ko smo med seboj primerjali 72-urna poskusa brez in z obsevanjem raztopin, smo ugotovili, da se rezultati v posamezni regiji vršičkov razlikujejo v deležih vseh faz, samo v metafazi ne. V deležu metafaz bi pričakovali razlike, če bi obsevani nanodelci vplivali na formacijo in delovanje delitvenega vretena. Pričakovano bi bil večji delež metafaz, saj bi se zaradi motenj v tvorbi delitvenega vretena ta faza podaljšala (El-Ghamery in sod., 2003). V primeru, da delitveno vreteno ne bi nastalo, bi se mitoza v tej fazi ustavila in posledično bi opazili močno povečan delež začetnih faz mitoze.

Pri 24-urni izpostavitvi z ali brez UV-A obsevanja pri primerjavi rezultatov raztopin nanodelcev in negativne kontrole v nobenem poskusu nismo zaznali statistično značilnih razlik med njimi. Pri primerjavi obeh 24-urnih izpostavitvev med seboj, pa smo zaznali v regiji F0 razlike v deležu profaz in anafaz (slika 20A in 20C). V poskusu z obsevanimi raztopinami se je delež profaz zmanjšal, delež anafaz pa rahlo povečal (slika 20C). V regiji F1 pa se je delež profaz tudi nekoliko zmanjšal pri vršičkih rastočih v obsevanih raztopinah (slika 20D). Pri upočasnitvi mitoze bi pričakovali povečan delež celic v profazi, oz. v zgodnejših fazah mitoze, delež kasnejših faz pa bi se zmanjšal. Takšno porušenje razmerij faz je na primer ugotovila Saradjen (1993) pri tretiranju čebulic z odpadnimi vodami. Lahko

pa zunanji dejavniki vplivajo tudi na hitrejši potek mitoze, ki tudi poruši razmerje med fazami mitoze (Okamoto in Tatara, 1995). Takšnih vplivov v naših poskusih, tako z obsevanjem nanodelcev kot brez obsevanja, nismo zaznali. V splošnem se je ohranjalo nekakšno normalno razmerje med fazami mitoze, ki smo jih pričakovali na podlagi podatkov o trajanju posameznih faz mitoze pri čebuli. Pri čebuli traja profaza od 2-3 ure, metafaza 30 minut, anafaza 20 minut in telofaza 1 uro (Šircelj, 2004). Pri izbranih testnih raztopinah nanodelcev TiO₂ nismo opazili, da bi ti povzročali večje spremembe deležev faz mitoze. Prav tako takšnega vpliva nismo zaznali, ko smo raztopine nanodelcev in rastline obsevali z UV-A sevanjem.

5.2.3 Genotoksičnost

5.2.3.1 72-urna izpostavitve testnim raztopinam

Pri poskusih z daljšo izpostavitvijo čebul testnim raztopinam smo zasledili različne kromosomske aberacije in mikrojedra (slika 21). Med aberacijami so bili najpogosteje prisotni fragmenti (preglednica 3), iz katerih se v naslednji generaciji celic oblikujejo mikrojedra. Mikrojedra so se pojavljala pri vseh čebulah, ne glede na to v katerih raztopinah so rasle. Tudi pri negativni kontroli je prihajalo do spontanij mutacij. Frekvenca pojavljanja mikrojedra pri negativni kontroli je bila primerljiva z nekaterimi že obstoječimi podatki (Smaka-Kincl, 1993; Paradiž J., 1996). Frekvenca pojavljanja mikrojedra se ni statistično povečala pri čebulah, ki so bile izpostavljene nanodelcem TiO₂, do tega ni prišlo niti v primeru obsevanja delcev. Wang in sod. (2007) so v poskusih s človeškimi celicami, ki so jih izpostavili nanodelcem v koncentraciji 130 µg/ml TiO₂, ugotovili 2,5-kratno povečanje frekvence pojavljanja mikrojedra glede na negativno kontrolo. O povečanem pojavljanju mikrojedra pod vplivom nanodelcev TiO₂ pa poročajo tudi druge raziskave o učinkih omenjenih nanodelcev pri živalskih celicah (Gurr in sod., 2005; Rahman in sod., 2002). Anafazne mostičke, ki nastanejo kot posledica neločevanja kromatid in se pogosteje pojavljajo pri upočasnitvi mitoze, smo našli v manj preparatih kjer so bili prisotni je bilo njihovo povprečje pojavljanja v 0,1 % celic. Frekvenca pojavljanja anafaznih mostičkov je bila v vseh trtmajih zelo nizka v primerjavi s podatki nekaterih drugih raziskav, kjer so potrdili genotoksičnost zunanjih dejavnikov (Glasenčnik, 2004). Pri proučevanju vplivov nanodelcev Zn na rastlinah, so v tretiranih koreninah bile frekvence pojavljanja aberacij mnogo višje v primerjavi s negativno kontrolo (El-Ghamery in sod., 2003). C-mitose so se

pojavnale neznačilno pri negativni in pozitivni kontroli ter pri raztopinah z nanodelci TiO₂. Prav tako smo opazili, da se so pojavljale v redkih preparatih, kjer pa so bile prisotne je bila navadno njihova številčnost večja od drugih aberacij. Druge aberacije so bile večinoma opažene posamič na določen preparat, c-mitoze pa so se pojavljale ponavadi v večjem številu. Z obzirom na te ugotovitve, ne moremo izključiti možnosti, da so opažene c-mitoze nastale zaradi metodološke napake. Pri prevelikem pritisku na preparat, bi lahko 'raztresli' že nastale kromosome po celici, kar daje podoben videz kot pri c-mitozah. Pri teh so kromosomi 'raztreseni' v celici, zaradi motenj v delovanju delitvenega vretena.

Statistična analiza rezultatov 72-urnih izpostavitvev je pokazala, da med raztopinami nanodelcev in negativno kontrolo ni razlik v frekvenci pojavljanja aberacij in mikrojedrer (preglednica 5). Tudi pri primerjavi poskusov, brez obsevanja in z obsevanjem raztopin z UV-A sevanjem, se poskusa med sabo nista razlikovala. Torej nanodelci TiO₂ pri 72-urni izpostavitvi niso imeli genotoksičnega vpliva na koreninski meristem čebule. Genotoksičnega vpliva nanodelcev nismo potrdili niti v prisotnosti UV-A sevanja.

5.2.3.2 24-urna izpostavitvev testnim raztopinam

Tudi pri 24-urni izpostavitvi čebul so se najpogosteje med aberacijami pojavljali fragmenti. Poleg njih smo pri vseh testnih raztopinah opazili mikrojedra. Anafazne mostičke so zasledili posamič in redkeje kot fragmente. Pri primerjavi 24-urnih poskusov z neobsevanimi in obsevanimi raztopinami nanodelcev, se je pokazala manjša razlika pri pojavljanju anafaznih mostičkov, ki so bili pogostejši v poskusu brez obsevanja (preglednica 4). Do ta razlike je prišlo samo pri koncentraciji 100 µg/ml TiO₂.

Prisotnost nanodelcev drugače v rastnem mediju ni imela genotoksičnega učinka na koreninske vršičke čebule. Prav tako se genotoksičnost nanodelcev TiO₂ ni povečala, če so ti bili obsevani z UV-A sevanjem. O povečanem genotoksičnem vplivu nanodelcev TiO₂ ob prisotnosti UV sevanja poročajo številne študije na živalskih celicah (Cai in sod., 1992; Dunford in sod., 1997; Rahman in sod., 2002). Povečanje poškodb DNA pri ribjih celicah, ki so bile tretirane z nanodelci TiO₂ in obsevane z UV-A svetlobo so dokazali Reeves in sod. (2007). Foto-genotoksičnost nanodelcev TiO₂ so na živalskih celicah potrdili tudi Nakagawa in sod. (1997). To so potrdili s povečanim številom aberacij, ki so se pojavljale v celicah po obsevanju nanodelcev. Vendar kot že rečeno, mi povečanja števila kromosomskih aberacij in mikrojedrer ob prisotnosti nanodelcev TiO₂ nismo opazili po 24-

urni in 72-urni izpostavitvi. Torej v naših pogojih testirani nanodelci niso imeli genotoksičnega vpliva na celice koreninskih vršičkov čebule.

Pri koreninah, ki so rasle v raztopini EMS, smo opazili, da jedra pogosto niso bila ovalnih oblik, ampak so bila nepravilno oblikovana. O teh opažanjih poroča tudi Babič (2008) pri tretiranju korenin čebule z EMS. Pri tretiranju korenin z nanodelci, podobnih nepravilnosti nismo opazili.

Ker na rezultate raziskav učinka nanodelcev lahko vpliva tudi sama izbira testnih organizmov, se predlaga uporaba serije testov, ki bi združevala več biotestov. Tudi rastline je treba vključiti v sisteme vrednotenja, da se razvije izčrpen pregled toksičnosti nanodelcev. Rezultati enega samega testnega sistema namreč niso dovolj, za celotno oceno tveganja, ki bi ga lahko predstavljala uporaba določenih nanodelcev.

V naših poskusih je bila izpostavljenost čebul nanodelcem TiO_2 relativno kratka (24-ur in 72-ur). V nadaljnjih poskusih bi bilo smiselno podaljšati čas izpostavitve organizmov. V raziskavah pri šarenkah, so Federici in sod. (2007) ugotovili, da so pri kratkotrajni izpostavitvi bile potrebne relativno visoke koncentracije za povzročanje negativnih vplivov nanodelcev TiO_2 . Pri dolgotrajnejši izpostavitvi, pa so se škodljivi vplivi nanodelcev izrazili že pri dosti nižjih koncentracijah. Tudi iz naših rezultatov je razvidno, da se pri nekaterih parametrih (npr. deleži faz mitoze) pokažejo večje razlike med tretmaji po 72-urni izpostavitvi, kot po 24-urni. Torej bi bilo morda smiselno v bodoče podaljšati čas izpostavitve rastlin nanodelcem. Kajti tudi v naravi so organizmi navadno izpostavljeni določenemu zunanemu dejavniku dlje časa.

V naših poskusih smo testnim raztopinam izpostavili po 5 čebul. V bodoče bi bilo smiselno povečati število testnih rastlin.

Poleg tega bi morda lahko v nadaljnjih poskusih z rastlinami uporabili tudi druge valovne dolžine UV svetlobe za fotoaktivacijo nanodelcev TiO_2 . Sicer naj bi po podatkih Pelton in sod. (2006) UV-A (365 nm) sevanje najbolje fotoaktiviralo nanodelce TiO_2 . Poleg tega pa prav UV-A sevanje predstavlja 99 % vsega UV sevanja, ki doseže zemeljsko površje. Vendar so avtorji različnih raziskav, ki poročajo o foto-(geno)toksičnosti nanodelcev TiO_2 uporabljali različne valovne dolžine UV sevanja za njihovo fotoaktivacijo. Poleg tega bi lahko v nadaljnjih poskusih z nanodelci TiO_2 , podaljšali čas njihovega obsevanja. Fotokatalitični nanodelci se po prenehanju obsevanja z UV sevanjem vrnejo v prvotno stanje (Pelton in sod., 2006).

Vse to tudi nakazuje, da bi bilo smiselno v bodoče tudi še razširiti nabor merjenih parametrov (biomarkerjev) tako, da bi zaznali morebitne spremembe, kot posledice bio-nanointerakcij že pri nizkih koncentracijah. Iz tega bi lahko bolje sklepali na biološko aktivnost oz. inertnost nanodelcev. Le s pomočjo tega znanja bomo lahko proizvajali biološko povsem varne oz. inertne nanodelce.

5.3 SKLEPI

Nanodelci TiO_2 v izbranih testnih koncentracijah od 0,1 do 1000 $\mu\text{g/ml}$ niso zavirali rasti in razvoja koreninskega sistema čebule (*Allium cepa* L.). To potrjujejo rezultati različnih meritev makroskopskih parametrov in morfoloških opazovanj. Rezultati meritev parametrov na nivoju korenin, ki so rasle 72 ur v prisotnosti nanodelcev TiO_2 , se niso statistično razlikovali od negativne kontrole. Pri čebulah tretiranih z različnimi testnimi raztopinami nismo opazili statistično značilnih razlik v številu zraslih korenin, dolžini korenin in dolžini celotnega koreninskega sistema. Torej prisotnost nanodelcev ni vplivala na opazovane makroskopske parametre, prav tako nismo potrdili negativnega vpliva nanodelcev TiO_2 v prisotnosti UV-A sevanja.

Negativnih vplivov testiranih nanodelcev tudi nismo potrdili pri raziskavah na celičnem nivoju. Vrednosti mitotskega indeksa koreninskih vršičkov, ki so rasli v raztopinah z dodanimi nanodelci, so bile primerljive z vrednostmi pri negativni kontroli. Vrednosti mitotskega indeksa se v vršičkih, izpostavljenih nanodelcem niso zmanjšale. Prisotnost nanodelcev TiO_2 torej ni vplivala na aktivnost koreninskega meristema. Nanodelci tudi niso vplivali na potek celičnega cikla, saj se je razmerje med posameznimi fazami mitoze bolj ali manj ohranjalo.

Z ugotavljanjem različnih tipov kromosomskih aberacij in njihovo pogostostjo ter prisotnosti mikrojedder, nismo potrdili genotoksičnega vpliva testiranih nanodelcev TiO_2 . Kromosomske aberacije in mikrojedra se v koreninskih vršičkih, ki so bili izpostavljeni nanodelcem za 24 ali 72 ur, niso pojavljali (statistično značilno) pogosteje kot pri negativni kontroli. Prav tako nismo opazili, da bi genotoksičen vpliv nanodelcev bil odvisen od koncentracije nanodelcev TiO_2 .

Povečanega strupenega vpliva testiranih nanodelcev nismo potrdili niti ob prisotnosti UV-A sevanja. Pri primerjavi rezultatov poskusov brez obsevanja in rezultatov poskusov, kjer smo raztopine nanodelcev obsevali, nismo opazili bistvenih razlik med njimi.

6 POVZETEK

Proizvodnja različnih nanodelcev hitro narašča, vendar so njeni vplivi na organizme in okolje v veliki meri še nepoznani. Po zadnjih raziskavah se različni nanodelci pojavljajo v več kot 800 potrošniških izdelkih, ki so v vsakodnevni uporabi, številka pa se iz dneva v dan veča. Hiter razvoj in naraščajoča proizvodnja, vplivata na vedno večjo izpostavljenost organizmov in okolja različnim nanodelcem. Zato je potrebno raziskati vplive njihove uporabe in morebitna tveganja, ki jih lahko predstavlja nanotehnologija.

Iz dosedanjih informacij je razvidno, da je večina raziskav usmerjena v odkrivanje vplivov nanodelcev na ljudi. O vplivih na ostale organizme pa je malo informacij. Pri celostni oceni vpliva nanodelcev na organizme in okolje, je potrebo vključiti čim večje število različnih testov, s katerimi lahko raziščemo morebitno škodljivost nanodelcev na različnih ravneh.

Cilj naše raziskave je bil ugotoviti vpliv nanodelcev TiO_2 na korenine čebule (*Allium cepa* L.). Uporabili smo splošno uporabljen čebulni test (test *Allium*). Gre za rastlinski biotest s katerim lahko ugotavljamo celokupne vplive določenega dejavnika. Vplive nanodelcev TiO_2 smo spremljali z makroskopskimi in mikroskopskimi parametri. Opazovali smo rast in razvoj koreninskega sistema čebule pri različnih koncentracijah nanodelcev. Pri raziskavah na celičnem nivoju smo z mitotskim indeksom spremljali aktivnost celic apikalnega koreninskega meristema čebule. S spremljanjem pojavljanja kromosomskih aberacij in mikrojedrer pa smo ugotavljali genotoksičen potencial testiranih nanodelcev. Genotoksične analize so pomembne pri ugotavljanju majhnih vplivov nanodelcev pri nizkih koncentracijah, ki jih pri spremljanju makroskopskih parametrov lahko pogosto spregledamo.

Vse opazovane parametre smo spremljali pri poskusih brez UV-A obsevanja in v poskusih, kjer smo testne raztopine in čebule obsevali z UV-A sevanjem. Na ta način smo vrednotili foto(geno)toksičen potencial nanodelcev TiO_2 , saj imajo znane fotokatalitične lastnosti.

Rezultati naših poskusov niso pokazali negativnega vpliva testiranih nanodelcev TiO_2 na rast in razvoj korenin po 72-urni izpostavitvi. V poskusih brez obsevanja raztopin z UV-A svetlobo smo opazili celo rahlo povečevanje povprečnega števila korenin, povprečne dolžine korenin in dolžine koreninskega sistema v primerjavi z negativno kontrolo. Vendar

razlike niso bile statistično značilne. UV-A obsevanje raztopin tudi ni bistveno vplivalo na makroskopske parametre in ni povečalo toksičnega učinka testiranih nanodelcev.

Prav tako testirane koncentracije nanodelcev TiO₂ niso imele večjega vpliva na opazovane mikroskopske parametre po 24-urni in 72-urni izpostavitvi. Rezultati mitotskega indeksa so pokazali, da prisotnost nanodelcev v rastni raztopini ne vpliva bistveno na aktivnost celic apikalnega koreninskega meristema čebule.

Deleži faz mitoze v tretiranih koreninah so bili primerljivi z rezultati negativne kontrole. Ohranjali so se v skladu s pričakovanji, glede na podatke o trajanju posamezne faze mitoze pri čebuli.

V poskusih tudi nismo zaznali genotoksičnega delovanja izbranih nanodelcev. Tipi in frekvenca kromosomskih aberacij ter frekvenca mikrojedr, ki so se pojavljali v koreninah tretiranih z nanodelci, niso bili statistično značilno različni v primerjavi z negativno kontrolo.

Nanodelci TiO₂ v izbranih koncentracijah torej niso imeli negativnega vpliva na korenine navadne čebule. To smo potrdili z opazovanjem makroskopskih in mikroskopskih parametrov. V naši raziskavi tudi nismo potrdili foto(geno)toksičnosti izbranih koncentracij nanodelcev TiO₂ v prisotnosti UV-A sevanja.

7 LITERATURA

- Adams L. K., Lyon D. Y., Alvarez P. J. J. 2006. Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂ and ZnO water suspensions. *Water Research*, 40: 3527-3532
- Asli S., Neumann P. M., 2009. Colloidal suspensions of clay or titanium dioxide nanoparticles can inhibit leaf growth and transpiration via physical effects on root water transport. *Plant, Cell and Environment*, 32: 577-584
- Babič V. 2008. Uporaba testa mikrojedr pri proučevanju vpliva kovin na rastline. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Berger M. 2007. Nanoparticles could have a negative effect on plant growth. *Nanowerk Spotlight*
<http://www.nanowerk.com/spotlight/spotid=1677.php>
- Cai R., Kubota Y., Shuin T., Sakai H., Hashimoto K., Fujishima A. 1992. Induction of cytotoxicity by photoexcited TiO₂ particles. *Cancer Research*, 52: 2346-2348
- Cho M., Chung H., Choi W., Yoon J. 2004. Linear correlation between inactivation of *E. coli* and OH radical concentration in TiO₂ photocatalytic disinfection. *Water Research*, 38: 1069-1077
- Dolenc Koce J. 2001. Ugotavljanje variabilnosti količine jedrne DNA pri standardnih rastlinskih vrstah in morskih kritosemenkah s slikovno citometrijo. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 26-27
- Dunford R., Salinaro A., Cai L., Serpone N., Horikoshi S., Hidaka H. 1997. Chemical oxidation and DNA damage catalysed by inorganic sunscreen ingredients. *FEBS Letters*, 418, 1-2: 87-90
- El-Ghamery A. A., El-Kholy M. A., Abou El-Yousser M. A. 2003. Evaluation of cytological effects of Zn²⁺ in relation to germination and root growth of *Nigella sativa* L. and *Triticum aestivum* L. *Mutation Research*, 537: 29-41
- Federici G., Shaw B. J., Handy R. D. 2007. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology*, 84, 4: 415-430

- Fiskesjö G. 1985. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, 102: 99-112
- Fras A., Maluszynska J. 2003. Chromosome aberrations and micronuclei assay in *Allium cepa* and *Vicia faba*. V: Bioassays in plant cells for improvement of ecosystem and human health, Katowice 2003. Maluszynska J. in Plewa M. (ur.). Wydawnictwo Uniwersytetu Slaskiego: 77–81
- Glasečnik E. 2004. Vpliv onesnaženega zraka na celične delitve v koreninskih vršičkih šalotke (*Allium cepa* L. var *ascalonicum*) na emisijsko ogroženih območjih Slovenije. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Gurr J. R., Wang A. S., Chen C. H., Jan K. Y. 2005. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology*, 213: 66-73
- Hong J., Ma H., Otaki M. 2005. Controlling algal growth in photo-dependent decolorant sludge by photocatalysis. *Journal of bioscience and bioengineering*, 99: 592-597
- Imasaka K., Kanatake Y., Ohshiro Y., Suehiro J., Harashima H. 2006. Production of carbon nanotubes and nanotubes using an intermittent discharge in water. *Thin Solid Films*: 250-254, 506-507
- Kahru A., Dubourguier H.-C., Blinova I., Ivask A., Kasementes K. 2008. Biotests and Biosensors for Ecotoxicology of Metal Oxide Nanoparticles: A Minireview. *Sensors*, 8: 5153-5170
- Kim S. C., Lee D. K. 2005. Preparation of TiO₂-coated hollow glass beads and their application to the control of algal growth in eutrophic water. *Microchemical Journal*, 80, 2: 227-232
- Lee W. M., An Y. J., Yoon H., Kweon H. S. 2008. Toxicity and Bioavailability of Copper Nanoparticles to Terrestrial Plants *Phaseolus radiatus* (Mung Bean) and *Triticum aestivum* (Wheat); Plant Agar Test for Water-Insoluble Nanoparticles. *Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC)*
- Lei Z., Fashui H., Shipeng L., Chao L. 2004. Effect of Nano-TiO₂ on Strength of Naturally Aged Seeds and Growth of Spinach. *Biological Trace Element Research*, 104: 83-91

- Lei Z., Mingyu S., Xiao W., Chao L., Chunxiang Q. 2007. Antioxidant Stress is Promoted by Nano-anatase in Spinach Chloroplasts Under UV-B Radiation. *Biol. Trace. Elem. Research*, 121: 69-79
- Lin D., Xing B. 2007. Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution*: 1-8
- Ma T. H., Xu Z., Xu C., McCornell H., Rabago E. V., Arreola G. A., Zhang H. 1994. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutation Research*, 334, 2: 185-195
- Majer B. J., Gottmann E., Knasmüller S. 2003. The micronucleus test with *Vicia faba* and *Allium cepa*. V: Bioassays in plant cells for improvement of ecosystem and human health, Katowice 2003. Maluszynska J. in Plewa M. (ur.). Wydawnictwo Uniwersytetu Slaskiego: 83–93
- Maluszynska J., Juchimiuk J. 2005. Plant genotoxicity: A molecular cytogenetic approach in plant bioassays. Department of Plant Anatomy and Cytology, University of Silesia, Katowice, Poland. *Arh Hig. Rada. Toksikol.*, 56: 177–184
- Moore M. N. 2006. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environment International*, 32, 8: 967-976
- Nakagawa Y., Wakuri S., Sakamoto K., Tanaka N. 1997. The photogenotoxicity of titanium dioxide particles. *Mutation Research*, 394: 125-132
- 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
- Okamoto H., Tatara A. 1995. Effects of low-dose γ -irradiation on the cell cycle of barley roots. *Environmental and Experimental Botany*, 35, 3: 379-388
- Orgon.si - Titanov dioksid (E171). December 2006.
<http://www.orgon.si/skodljive-snovi/barvila/titanov-dioksid-titanium-diokside-e171.html>
(avgust 2009)
- Paradiž J. 1996. Učinki ionizirajočega sevanja na celice meristema čebule (*Allium cepa* L.). Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

- Park E. J., Yi J., Chung K. H., Ryu D. Y., Choi J., Park K. 2008. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology Letters*, 180, 3: 222-229
- Pelton R., Geng X., Brook M. 2006. Photocatalytic paper from colloidal TiO₂ – fact or fantasy. *Advances in Colloid and Interface science*, 127: 43-53
- Pfister T., Eichinger – Chapelon A. 2009. General 4-week toxicity study with EMS in the rat. *Toxicology letters*
- Rahman O., Lohani M., Dopp E., Pemsel H., Jonas L., Weiss D. G., Schiffman D. 2002. Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in Syrian Hamster embryo fibroblasts. *Environmental Health Perspectives*, 110: 797-800
- Rank J., Nielsen M. H. 1997. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. *Mutation Research*, 390: 121-7
- Reeves J. F., Davies S. J., Dodd N. J., Jha A. N. 2008. Hydroxyl radicals (·OH) are associated with titanium dioxide (TiO₂) nanoparticle – induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. *Mutation Research*, 640, 1-2: 113-122
- Rikans L. E., Hornbrook K. R. 1997. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Molecular Basis of Disease*, 1362, 2-3: 116-127
- Saradjen J. 1993. Uporabnost *Allium testa* pri ocenjevanju kakovosti voda. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 6-10
- Seeger E. M., Baun A., Kastner M., Trapp S. 2008. Insignificant acute toxicity of TiO₂ nanoparticles to willow trees. *Journal Soils Sediments*, 9: 46-53
- Singh N., Manshian B., Jenkins G. J. S., Griffiths M. S., Williams M. P., Maffei T. G. G., Wright H. S., Doak S. H. 2009. NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*: 1-24
- Smaka-Kincl V. 1993. Ocenitev kvalitete odpadnih, površinskih in podtalnih voda z *Allium testom*. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: str. 8

- Stresty T. V. S., Rao K. V. M., 1999. Ultrastructural alterations in response to zinc and nickel stress in the root cells of pigeonpea. *Environmental and Experimental Botany*, 41, 1: 3-13S
- Šircelj H. 2004. Gradivo za vaje iz botanike za študente univerzitetnega študija agronomije. Ljubljana. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo [http:// web.bf.uni-lj.si/ag/botanika/gradiva/Citologija.pdf](http://web.bf.uni-lj.si/ag/botanika/gradiva/Citologija.pdf) (avgust 2009)
- Theogaraj E., Riley S., Hughes L., Maier M., Kirkland D. 2007. An investigation of the photo-clastogenic potential of ultrafine titanium dioxide particles. *Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 634, 1-2: 205-219
- Valant J., Drobne D., Sepčič K., Jemec A., Kogej K., Kostanjšek R. 2009. Hazardous potential of manufactured nanoparticles identified by *in vivo* assay. *Journal of Hazardous Materials*
- Warheit D. B., Hoke R. A., Finlay C., Donner E. M., Reed K. L., Sayes C. M. 2007. Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO₂ particles as a component of nanoparticle risk management. *Toxicology Letters*, 171: 99-110
- Wang J. J., Sanderson B. J., Wang H. 2007. Cyto- and genotoxicity of ultrafine TiO₂ particles in cultured human lymphoblastoid cells. *Mutation research*, 628: 99-106
- Wierzbicka M. 1999. Comparison of lead tolerance in *Allium cepa* with other plant species. *Environmental Pollution*, 104: 41-52
- Yesilda E. 2000. The effect of kinetin, gibberellic acid and indole acetic acid on EMS induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. *Turkish Journal of Biology*, 24: 279-284

ZAHVALA

Najprej se zahvaljujem mojima mentoricama, prof. dr. Damjani Drobne in doc. dr. Jasni Dolenc Koce, za vse nasvete in pomoč pri izdelavi diplomske naloge.

Jasna, hvala za vso pozitivno energijo, s katero ste tudi bolj napore dni naredila lažje. Predvsem pa hvala za prijeten občutek, da se lahko vedno obrnem po pomoč...in ni je bilo malo!

Prof. dr. Damjani Drobne se posebej zahvaljujem za vzpodbudo k razmišljanju, da je diploma konec ene poti in hkrati začetek novih. Hvala, tudi zaradi vaših besed je bila odločitev mnogo lažja.

Zahvaljujem se tudi vsem iz Katedre za botaniko in fiziologijo rastlin, ki so mi kadarkoli priskočili na pomoč pri praktičnem delu.

Hvala Janezu Valantu, da je med svojimi izopodnimi rakci našel čas tudi za moje čebule.

Še posebej hvala staršem za vso podporo in razumevanje. Hvala, ker mi vedno stojita ob strani.

Hvala tebi Rok...preprosto za vse.

Hvala tudi Rokovi družini zato, da sem se med njimi vedno počutila dobrodošlo in za prijeten občutek domačnosti, ki bi ga drugače v Ljubljani pogrešala.

Pa da ne pozabim na Moniko, Katjo, Živo in cimre...hvala tudi vam, z vami je bila pot do sem lažja in predvsem bolj zabavna! ;)

In še hvala vsem tistim, ki jih nisem posebej omenila, pa so kakorkoli prispevali k temu, da sem lahko napisala še to zadnjo stran.