

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Eva KOVAČEC

**LOKALIZACIJA BAKRA IN BIOKEMIJSKE SPREMEMBE V  
KORENINAH NAVADNE SONČNICE, IZPOSTAVLJENE  
SUSPENZIJI NANODELCEV BAKROVEGA OKSIDA**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**COPPER LOCALIZATION AND BIOCHEMICAL CHANGES IN  
SUNFLOWER ROOTS, EXPOSED TO SUSPENSION OF COPPER  
OXIDE NANOPARTICLES**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Katedri za botaniko in fiziologijo rastlin Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, kjer je bila izvedena večina poskusov. Meritve so bile opravljene tudi na Institutu Jožef Stefan, na Odseku za fizika nizkih in srednjih energij (F2) v Ljubljani, Kemijskem inštitutu v Laboratoriju za strukturo biomolekul (L14) v Ljubljani in na žarkovnih linijah TwinMic in SISSI na Sinhrotronu Elettra v Bazovici, Italija.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico diplomske naloge imenovala doc. dr. Katarino Vogel-Mikuš, za somentorja pa doc. dr. Jožeta Grdadolnika.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Jasna DOLENC KOCE  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Mentorica: doc. dr. Katarina VOGEL-MIKUŠ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Somentor: doc. dr. Jože GRDADOLNIK  
Kemijski inštitut, Laboratorij za strukturo biomolekul

Recenzentka: prof. dr. Marjana REGVAR  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 14. september 2012

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

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

Eva Kovačec

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn  
DK 58:582.998.16:577(043,2)=163,6  
KG sončnica/bakrov oksid/nanodelci/lokalizacija/elementna sestava/  
biokemijske spremembe  
AV KOVAČEC, Eva  
SA VOGEL-MIKUŠ Katarina (mentorica)/GRDADOLNIK Jože (somentor)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo  
LI 2012  
IN LOKALIZACIJA BAKRA IN BIOKEMIJSKE SPREMEMBE V KORENINAH  
NAVADNE SONČNICE, IZPOSTAVLJENE SUSPENZIJI NANODELCEV  
BAKROVEGA OKSIDA  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP XV, 129 str., 6 pregl., 61 sl., 13 pril., 97 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI V naši raziskavi so nas zanimale nekatere karakteristike in mobilnost bakrovega oksida (CuO) v nano in standardni kemijski obliki, njihov vpliv na privzem in lokalizacijo bakra ter drugih elementov ter biokemijske in morfološke spremembe v tkivih korenin sončnic izpostavljenim suspenziji nanodelcev CuO. Z merjenjem prevodnosti suspenzij CuO, koncentracije Cu in Cu<sup>2+</sup> iona smo ugotovili, da nanodelci nosijo naboj in se ne raztapljajo. Zato naše izsledke o strupenosti nanodelcev CuO pripisujemo fizikalnim lastnostim nanodelcev. S preučevanjem morfologije rastlin smo ugotovili, da nanodelci pospešujejo staranje rastlin. Največje morfološke spremembe so bile vidne na koreninah, saj so bile te v neposrednem stiku z nanodelci. Opazili smo predvsem deformacijo, spremenjeno strukturo žil ter nekroze tkiv. Dokazali smo, da so nanodelci CuO genotoksični, saj se je mitotski indeks pri tretmaju s 100 mg l<sup>-1</sup> nano CuO zmanjšal za 70 % v primerjavi s kontrolo. Posledica motenj v celičnih delitvah meristemske regije se odraža v slabši rasti korenin. S pomočjo mikro protonske emisije rentgenskih žarkov (mikro-PIXE, Mikroanalitski center, Institut Jožef Stefan), smo Cu pri koreninah nano tretmajev locirali v skorji korenin, ne pa tudi v prevodnem cilindru. To je dokaz, da so nanodelci sposobni prodirati v notranja koreninska tkiva in da Kasparijeva proga v endodermisu učinkovito preprečuje množičen vstop nanodelcev v žilo. Z metodo nizko energijske rentgensko fluorescenčne spektromikroskopije (LEXRF, sinhrotron Elettra, Trst) smo določili porazdelitev bakra na celičnem nivoju, kjer smo iz kolokalizacijskih map opazili, da Cu kolokalizira s kisikom, zato lahko sklepamo, da se baker v celicah skorje nahaja v obliki nanodelcev CuO. To pomeni, da so nanodelci CuO sposobni prečkati membrano in potovati po simplastu. Obenem smo z metodo mikro-PIXE dokazali, da je tretiranje rastlin s CuO oz. nano CuO vplivalo tudi na spremembo koncentracije in porazdelitve drugih elementov v koreninskih tkivih. Vzrok za spremenjene koncentracije in porazdelitve elementov so verjetno spremembe v sestavi celične stene in poškodbe plazmaleme, kar se odraža kot motnje v transportu ostalih ionov in snovi. Analizo biokemijskih sprememb smo s pomočjo infrardeče spektroskopije z uporabo Fourierjeve transformacije (FTIR) opravili na organskem (Kemijski inštitut, Ljubljana) in na tkivnem nivoju (sinhrotron Elettra, Trst). Klasterske analize infrardečih spektrov posameznih tkiv znotraj korenine so nam pokazale, da se pričakovane biokemijske spremembe dogajajo predvsem v zunanjih tkivih korenin (rizodermis, skorja, koreninska čepica, meristemska regija), medtem ko v notranjih tkivih (žila in endodermis) korenin ni prišlo do večjih sprememb. Iz tega lahko zaključimo, da so poškodbe koreninskih tkiv odvisne predvsem od prodornosti nanodelcev.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC 58:582.998.16:577(043,2)=163,6  
CX sunflower/copperoxide/nanoparticles/localization/  
elemental composition/biochemical changes  
AU KOVAČEC, Eva  
AA VOGEL-MIKUŠ Katarina (supervisor)/GRDADOLNIK Jože (co-supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology  
PY 2012  
TI COPPER LOCALIZATION AND BIOCHEMICAL CHANGES IN SUNFLOWER  
ROOTS, EXPOSED TO SUSPENSION OF COPPER OXIDE NANOPARTICLES  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO XV, 129 p., 6 tab., 61 fig., 13 ann., 97 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB The aim of graduation thesis was to determine some characteristics and mobility of copper (II) oxide (CuO) in nano and standard chemical form, their influence on uptake and localization of copper and other elements, as well as biochemical and morphological changes in root tissues of sunflower exposed to nanoparticles suspension. On the basis of the measurements of conductivity, concentration of copper and copper ions ( $\text{Cu}^{2+}$ ) in different CuO and nano CuO suspensions, we have concluded that CuO nanoparticles are charged and do not dissolve. Toxicity of nanoparticles may be therefore assigned to nanoparticles' physical characteristics. The observation of plant morphology showed that nanoparticles promote ageing of plants, especially in the roots which were in direct contact with nanoparticles suspension. We noticed deformation, changes in vein structure and necrosis of tissues. We proved that nanoparticles are genotoxic, since the mitotic index decreased for 70 % in roots treated by nanoparticles CuO  $100 \text{ mg l}^{-1}$ , comparing to the control. Using micro proton induced X-ray emission we have localized copper in risedermis of CuO treated roots, while in nano CuO treated roots Cu was also present in cortex but not in veins. CuO nanoparticles are apparently capable to migrate into internal root tissues, however Casparian strip serves as functional barrier that prevents massive entrance of nanoparticles in veins. In this research we have also localized copper and oxygen on cellular level using Low energy X-ray fluorescence (LEXRF, synchrotron Elettra, Trieste). The results showed a direct colocalization of Cu and O in cytosol, indicating that CuO nanoparticles can cross the membranes and enter root symplast. Using micro-PIXE elemental mapping we also showed that treating plants with CuO nanoparticles caused redistribution of other elements in root tissue, probably due to altered cell walls and plasma membranes. We examined biochemical changes using Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy on organic (National Institute of Chemistry, Ljubljana) and on tissue level (synchrotron Elettra, Trieste). The results of cluster analysis of IR spectra confirmed that expected biochemical changes occurred mainly in external root tissues (risedermis, cortex, rootcap and meristematic zone), directly exposed to nanoparticles, while in internal root tissue (vein and endodermis) bigger biochemical changes were not seen. The results indicate that biochemical changes in tissues correlate with ability of nanoparticles to penetrate into root tissues.

## KAZALO VSEBINE

|  | str.      |
|--|-----------|
| KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....   | III       |
| KEY WORDS DOCUMENTATION.....   | IV        |
| KAZALO VSEBINE.....  | V         |
| KAZALO PREGLEDNIC.....   | VIII      |
| KAZALO SLIK.....   | IX        |
| KAZALO PRILOG.....   | XIV       |
| OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....  | XV        |
| <br>   |           |
| <b>1 UVOD .....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>2 PREGLED OBJAV .....</b>   | <b>3</b>  |
| 2.1 NANOTEHNOLOGIJA .....  | 3         |
| 2.2 NANODELCI IN NJIHOVE LASTNOSTI .....   | 4         |
| <b>2.2.1 Lastnosti nanodelcev .....</b>  | <b>6</b>  |
| 2.3 UPORABA IN TVEGANJA NANOTEHNOLOGIJE .....  | 8         |
| 2.4 VPLIV NANODELCEV NA VIŠJE RASTLINE.....  | 10        |
| <b>2.4.1 Privzem in transport nanodelcev po rastlini .....</b>   | <b>10</b> |
| <b>2.4.2 Privzem nanodelcev na celični ravni.....</b>  | <b>12</b> |
| <b>2.4.3 Pozitivni vplivi nanodelcev na rastline .....</b>   | <b>13</b> |
| <b>2.4.4 Negativni vplivi nanodelcev na rastline .....</b>   | <b>14</b> |
| 2.5 BAKROV OKSID V STANDARDNI IN NANO OBLIKI .....   | 15        |
| <b>2.5.1 Baker in bakrov oksid .....</b>   | <b>15</b> |
| <b>2.5.2 Nanodelci bakrovega oksida .....</b>  | <b>16</b> |
| <b>3 MATERIAL IN METODE .....</b>  | <b>21</b> |
| 3.1 PRIPRAVA POSKUSA .....   | 21        |
| 3.2 KARAKTERIZACIJA BAKROVEGA OKSIDA V NANO IN STANDARDNI<br>KEMIJSKI OBLIKI.....  | 23        |
| <b>3.2.1 Dokazovanje bakrovega iona v raztopini CuO .....</b>  | <b>23</b> |
| <b>3.2.2 Merjenje prevodnosti suspenzij standardnega in nano CuO .....</b>   | <b>24</b> |
| <b>3.2.3 Določanje mineralne sestave vodnih raztopin različnih koncentracij<br/>standardnega in nano CuO z metodo rentgenske fluorescenčne<br/>spektrometrije s popolnim odbojem (TXRF).....</b> | <b>24</b> |
| 3.2.3.1 Rentgensko fluorescenčna spektrometrija s popolnim odbojem (TXRF)  | 25        |
| 3.2.3.2 Priprava vzorcev .....   | 26        |
| 3.2.3.3 Potek meritev .....  | 26        |
| 3.3 DOLOČANJE KONCENTRACIJ ELEMENTOV V POGANJKIH IN<br>KORENINAH SONČNIC (TXRF) (GLEJ POGLAVJE 3.2.3.).....  | 27        |

|              |   |           |
|--------------|---|-----------|
| <b>3.3.1</b> | <b>Priprava vzorca.....</b>   | <b>27</b> |
| 3.4          | MERJENJE LIPIDNE PEROKSIDACIJE.....   | 28        |
| <b>3.4.1</b> | <b>Priprava rastlinskega materiala in potek meritev .....</b>   | <b>28</b> |
| 3.4.1.1      | Priprava 5 % TCA .....  | 29        |
| 3.4.1.2      | Priprava 0,5 % TBA v 20 % TCA .....   | 29        |
| 3.5          | PRIPRAVA PREPARATOV ZA DOLOČANJE MITOTSKEGA INDEKSA.....  | 29        |
| <b>3.5.1</b> | <b>Priprava Schiffovega reagenta .....</b>  | <b>30</b> |
| 3.5.1.1      | Priprava SO <sub>2</sub> vode .....   | 31        |
| <b>3.5.2</b> | <b>Analiza mikroskopskih preparatov .....</b>   | <b>31</b> |
| 3.6          | PRIPRAVA RASTLINSKEGA MATERIALA ZA MERITVE MIKRO-PIXE TER<br>SINHROTRONSKE MERITVE NA ŽARKOVNIH LINIJAH TWIN-MIC IN<br>SISSI.....                             | 31        |
| 3.7          | LOKALIZACIJA ELEMENTOV V KORENINAH SONČNIC Z METODO<br>PROTONSKO INDUCIRANE EMISIJE RENTGENSKIH ŽARKOV ALI<br>MIKRO-PIXE (PROTON INDUCED X-RAY EMISSION)..... | 32        |
| <b>3.7.1</b> | <b>Opis metode mikro-PIXE .....</b>   | <b>32</b> |
| 3.7.1.1      | Priprava vzorca .....   | 34        |
| 3.7.1.2      | Potek meritev .....   | 35        |
| 3.7.1.3      | Obdelava podatkov .....   | 35        |
| 3.8          | SINHROTRON.....   | 36        |
| <b>3.8.1</b> | <b>Sinhrotron Elettra .....</b>   | <b>37</b> |
| <b>3.8.2</b> | <b>Žarkovna linija Twin-Mic (A twin soft X-ray transmission and emission<br/>spectromicroscope) .....</b>   | <b>40</b> |
| 3.9          | FTIR SPEKTROSKOPIJA .....   | 41        |
| <b>3.9.1</b> | <b>Postopek analize vzorca s FTIR .....</b>   | <b>42</b> |
| <b>3.9.2</b> | <b>Pomen FTIR za analizo bioloških vzorcev .....</b>  | <b>43</b> |
| <b>3.9.3</b> | <b>Priprava rastlinskega materiala za določanje biokemijske sestave sončnic s<br/>pomočjo FTIR spektroskopije .....</b>                                       | <b>44</b> |
| <b>3.9.4</b> | <b>Obdelava infrardečih spektrov.....</b>   | <b>45</b> |
| <b>3.9.5</b> | <b>SISSI žarkovna linija (Source for Imaging and Spectroscopic Studies in<br/>the Infrared) .....</b>   | <b>46</b> |
| 3.10         | STATISTIČNA ANALIZA .....   | 48        |
| <b>4</b>     | <b>REZULTATI.....</b>   | <b>49</b> |
| 4.1          | BAKROV OKSID V NANO IN STANDARDNI OBLIKI .....  | 49        |
| <b>4.1.1</b> | <b>Vsebnost bakrovega iona v raztopinah bakrovega oksida.....</b>   | <b>49</b> |
| <b>4.1.2</b> | <b>Prevodnost raztopin bakrovega oksida .....</b>   | <b>49</b> |
| <b>4.1.3</b> | <b>Koncentracija bakra v supernatantu suspenzij s CuO in nano CuO<br/>(TXRF).....</b>   | <b>50</b> |
| 4.2          | LOKALIZACIJA ELEMENTOV V KORENINAH SONČNICE.....  | 51        |
| <b>4.2.1</b> | <b>Porazdelitev elementov na tkivnem nivoju z mikro-PIXE .....</b>  | <b>51</b> |
| <b>4.2.2</b> | <b>Kolokalizacija elementov z bakrom .....</b>  | <b>56</b> |
| <b>4.2.3</b> | <b>Koncentracija elementov v tkivih.....</b>  | <b>61</b> |
| 4.2.3.1      | Baker (Cu) .....  | 61        |
| 4.2.3.2      | Cink (Zn) .....   | 63        |
| 4.2.3.3      | Železo (Fe).....  | 64        |

|              |  |            |
|--------------|--|------------|
| 4.2.3.4      | Kalcij (Ca) .....  | 64         |
| 4.2.3.5      | Kalij (K).....   | 64         |
| 4.2.3.6      | Fosfor (P).....  | 64         |
| 4.2.3.7      | Žveplo (S).....  | 65         |
| <b>4.2.4</b> | <b>Lokalizacija bakra in kisika ter njuna kolokalizacija na celičnem nivoju z metodo LEXRF .....</b>                                     | <b>65</b>  |
| 4.3          | DOLOČANJE KONCENTRACIJ BAKRA V KORENINAH IN POGANJKIH (TXRF) .....   | 67         |
| 4.4          | LIPIDNA PEROKSIDACIJA .....  | 69         |
| 4.5          | BIOKEMIJSKE SPREMEMBE.....   | 70         |
| <b>4.5.1</b> | <b>FTIR analize poganjkov, korenin in koreninskih vršičkov .....</b>   | <b>71</b>  |
| <b>4.5.2</b> | <b>Spektri biokemijske sestave vzorcev, posnetih z infrardečo svetlobo na tkivnem nivoju (žarkovna linija SISSI, Elettra, Trst).....</b> | <b>76</b>  |
| 4.6          | GENOTOKSIČNOST .....   | 89         |
| 4.7          | MORFOLOŠKE SPREMEMBE .....   | 90         |
| <b>4.7.1</b> | <b>Morfološke spremembe na nivoju organizma.....</b>   | <b>91</b>  |
| <b>4.7.2</b> | <b>Morfološke spremembe na tkivnem in celičnem nivoju.....</b>   | <b>91</b>  |
| 4.7.2.1      | Steblo.....  | 92         |
| 4.7.2.2      | List.....  | 92         |
| 4.7.2.3      | Koreninski vršiček.....  | 93         |
| 4.7.2.4      | Korenina .....   | 94         |
| <b>5</b>     | <b>RAZPRAVA.....</b>   | <b>96</b>  |
| 5.1          | PRISOTNOST BAKROVIH IONOV V SUSPENZIJI BAKROVEGA OKSIDA (CuO).....   | 96         |
| 5.2          | PREVODNOST SUSPENZIJ BAKROVEGA OKSIDA (CuO) .....  | 96         |
| 5.3          | KONCENTRACIJA BAKRA V SUPERNATANTU SUSPENZIJ S CuO IN NANO CuO (TXRF) .....  | 97         |
| 5.4          | PRIVZEM BAKRA V KORENINE IN POGANJKE (TXRF).....   | 98         |
| 5.5          | LOKALIZACIJA BAKRA IN OSTALIH ELEMENTOV .....  | 99         |
| <b>5.5.1</b> | <b>Razporejanje bakra na celičnem nivoju .....</b>   | <b>101</b> |
| <b>5.5.2</b> | <b>Učinki na prerazporejanje esencialnih elementov.....</b>  | <b>102</b> |
| 5.6          | LIPIDNA PEROKSIDACIJA .....  | 104        |
| 5.7          | BIOKEMIJSKE SPREMEMBE.....   | 105        |
| 5.8          | GENOTOKSIČNOST .....   | 111        |
| 5.9          | MORFOLOŠKE SPREMEMBE RASTLIN .....   | 112        |
| <b>6</b>     | <b>SKLEPI .....</b>  | <b>115</b> |
| <b>7</b>     | <b>POVZETEK.....</b>   | <b>118</b> |
| <b>8</b>     | <b>VIRI .....</b>  | <b>122</b> |

ZAHVALA

PRILOGE

## KAZALO PREGLEDNIC

|   |    |
|---|----|
| Pregl. 1: Nekateri tehnični podatki sinhrotrona Elettra. ....   | 39 |
| Pregl. 2: Vrednosti Pearsonovega korelacijskega koeficienta ( $R_r$ ), Mandersovega prekrivnega koeficienta ( $R$ ) in Kvocienta intenzitete korelacije (ICQ) za Ca, Fe, K, Mg, Na, P, S in Zn s Cu v vzdolžnem prerezu koreninskega vršička sončnic, tretiranih s CuO v standardni kemijski in nano obliki. .... | 57 |
| Pregl. 3: Vrednosti Pearsonovega korelacijskega koeficienta ( $R_r$ ), Mandersovega prekrivnega koeficienta ( $R$ ) in Kvocienta intenzitete korelacije (ICQ) za Ca, Fe, K, Mg, Na, P, S in Zn s Cu v prečnem prerezu zrelih korenin sončnic, tretiranih s CuO v standardni kemijski in nano obliki. ....         | 57 |
| Pregl. 4: Rezultati faktorske analize za koncentracijo Cu v koreninah (a) in poganjkih (b), ki smo jo opravili s programom Faktorska ANOVA. Statistično značilne vplive prikazujejo odebeljene črke. ....   | 67 |
| Pregl. 5: Rezultati faktorske analize za koncentracijo MDA lipida v koreninah sončnic, tretiranih a) 2 dni, b) 29dni. Analizo smo opravili s programom Statistica 7. Statistično značilne vplive prikazujejo odebeljene črke. Pri 29 dneh tretiranih rastinah nismo opazili statistično značilnega vpliva. ....   | 70 |
| Pregl. 6: Rezultati faktorske analize za mitotski indeks (%) v tretiranih koreninskih vršičkih sončnic. Analizo smo opravili s programom Statistica 7. Statistično značilne vplive prikazujejo odebeljene črke. ....  | 90 |



## KAZALO SLIK

|   |    |
|---|----|
| Sl. 1: Shematski prikaz različnih poti različnih nanodelcev v rastlini in mesto njihove akumulacije (Povzeto po: Rico in sod., 2011: 3486).....   | 11 |
| Sl. 2: Načini prehajanja nanodelcev v celico, s pasivno difuzijo, endocitozo s pomočjo receptorja ali klaritina oz. kaveol (Povzeto po: Singh in sod., 2009: 3900).....   | 12 |
| Sl. 3: Rastline v rastni komori. ....   | 22 |
| Sl. 4: Levo - 100 mg CuO v nano obliki, desno - 100 mg CuO v standardni kemijski obliki. ....   | 23 |
| Sl. 5: Shematski prikaz principa delovanja TXRF metode (vir: Klockenkämper in Bohlem, 2001: 2006).....  | 26 |
| Sl. 6: Shematski potek dogajanja pri meritvi mikro-PIXE.....  | 33 |
| Sl. 7: Aluminijska nosilca z mikrorezinami položenimi med dve foliji pioloforma za meritve mikro-PIXE. (a) prečni prerezi korenine tretmaja nano CuO 100 mg l <sup>-1</sup> , (b) vzdolžni prerezi koreninskega vršička kontrole. ....  | 34 |
| Sl. 8: Primer posameznih tkiv v programu ImageJ za: A) vzdolžni prerez koreninskega vršička (1-celotna površina rezine, 2-rizodermis, 3-skorja, 4-žila, 5-meristemska regija, 6-koreninska čepica) in B) prečni prerez zrele korenine (1-celotna površina rezine, 2-skorja, 3- rizodermis, 4-endodermis, 5-žila)..... | 36 |
| Sl. 9: Glavni deli sinhrotronskega pospeševalnika: elektronska puška (1), linearni pospeševalnik (2), predpospeševalnik (3), shranjevalni obroč (4), žarkovna linija (5), eksperimentalna postaja (6). ....   | 37 |
| Sl. 10: Sinhrotron Elettra, Trst (Italija) in žarkovne linije (vir: Elettra – Beamlines, 9.8.2012).....   | 38 |
| Sl. 11: Viri sinhrotronske svetlobe, od leve proti desni: dipolni magnet, wiggler, undulator. ....  | 39 |
| Sl. 12: Shematični prikaz TwinMic žarkovne linije z 1 m dolgim undulatorjem (UND), sferičnim zrcalom (SAM), ravnim monokromatorjem (PGM), toroidalnim zrcalom (TFM) in fresnelovo lečo (vir: Elettra - A twin..., 9.4.2012).....  | 40 |
| Sl. 13: Zgradba merilnega instrumenta za FTIR (vir: Introduction to ... , 2005: 6).....   | 42 |
| Sl. 14: Tipični infrardeči spekter ene same HeLa celice. Območje zajema podatkov obsega 20×20 μm <sup>2</sup> . Spekter je bil zabeležen z laboratorijskim infrardečim mikroskopom, čas zajema je trajal 30 sekund (vir: Dumas in sod., 2006: 41). ....   | 44 |
| Sl. 15: Shema infrardeče sinhrotronske žarkovne linije SISSI (vir: Elettra - Source ..., 9.4.2012).....   | 46 |
| Sl. 16: Fotografija mikrorezin vzdolžnega prereza koreninskega vršička tretmaja nano CuO 10 mg l <sup>-1</sup> (a) in prečnega prereza korenine tretmaja nano CuO 100 mg l <sup>-1</sup> (b) z označenimi točkami meritev za posamezna tkiva z žarkovne linije SISSI.....   | 47 |
| Sl. 17: Vrednosti transmitanc v raztopinah bakrovega (II) sulfata, bakrovega oksida v nano in v standardni obliki. Prikazane so povprečne vrednosti (N = 3).....  | 49 |
| Sl. 18: Vrednosti prevodnosti (μS/cm) v destilirani vodi in raztopinah bakrovega oksida v nano in v standardni obliki.....  | 50 |
| Sl. 19: Koncentracija Cu (mg l <sup>-1</sup> ) v raztopinah bakrovega oksida v standardni in nano obliki. ....  | 50 |
| Sl. 20: Mape porazdelitve elementov Cu, Zn, Fe in Ca v vzdolžnih prerezih koreninskih vršičkov sončnic, tretiranih z 10 in 100 mg l <sup>-1</sup> CuO v nano in standardni kemijski obliki. ....  | 52 |

|   |    |
|---|----|
| Sl. 21: Mape porazdelitve elementov Mg, K, P in S v vzdolžnih prerezih koreninskih vršičkov sončnic, tretiranih z 10 in 100 mg l <sup>-1</sup> CuO v nano in standardni kemijski obliki. ....   | 53 |
| Sl. 22: Mape porazdelitve elementov Cu, Zn, Fe in Ca v prečnih prerezih korenin sončnic, tretiranih z 10 in 100 mg l <sup>-1</sup> CuO v nano in standardni kemijski obliki. ....   | 54 |
| Sl. 23: Mape porazdelitve elementov Mg, K, P in S v prečnih prerezih korenin sončnic, tretiranih z 10 in 100 mg l <sup>-1</sup> CuO v nano in standardni kemijski obliki. ....  | 55 |
| Sl. 24: Kolokalizijske slike elementov v tkivih koreninskih vršičkov sončnic ( <i>H. annuus</i> ) pri kontroli in tretmajih 10 in 100 mg l <sup>-1</sup> CuO v standardni kemijski in nano obliki. Oranžna barva pomeni kolokalizacijo elementov na rdečem in zelenem kanalu, roza barva pa kolokalizacijo elementov na rdečem in modrem kanalu. ....   | 59 |
| Sl. 25: Kolokalizijske slike elementov v prečnih prerezih zrelih korenin sončnic ( <i>H. annuus</i> ) pri kontroli in tretmajih 10 in 100 mg l <sup>-1</sup> CuO v standardni in nano obliki. Oranžna barva pomeni kolokalizacijo elementov na rdečem in zelenem kanalu, roza barva pa kolokalizacijo elementov na rdečem in modrem kanalu. ....  | 60 |
| Sl. 26: Koncentracija Cu (μg g <sup>-1</sup> SM) s standardno napako na logaritemski skali v posameznih tkivih prečnega prereza zrele kontrolne korenine in korenin tretiranih z 10 in 100 mg l <sup>-1</sup> CuO v nano in standardni kemijski obliki. ....  | 62 |
| Sl. 27: Koncentracija Cu (μg g <sup>-1</sup> SM) s standardno napako na logaritemski skali v tkivih vzdolžnega prereza koreninskega vršička kontrolne korenine in korenin tretiranih z 10 in 100 mg l <sup>-1</sup> CuO v nano in standardni kemijski obliki. Pri tretmaju CuO 10 mg l <sup>-1</sup> manjkajo podatki s področja žile in meristemske regije, saj ju ni bilo možno določiti glede na vzdolžni prerez. .... | 63 |
| Sl. 28: Slike lokalizacije Cu in O, ter v tretjem stolpcu kolokalizacije Cu (rdeč) in O (moder) na celičnem nivoju v vzdolžnih prerezih koreninskih vršičkov sončnic ( <i>H. annuus</i> ), tretiranih z 10 in 100 mg l <sup>-1</sup> CuO v standardni in nano obliki (legenda oznak na mapah: R=rizodermis, S=skorja). ....   | 66 |
| Sl. 29: Koncentracija Cu v koreninah (a) in poganjkih (b) pri kontrolnih rastlinah in rastlinah tretiranih z 10 in 100 mg l <sup>-1</sup> CuO v nano in standardni kemijski obliki. (povprečje ± SN, N=4). Okrajšava kont=kontrola, CuO=standardna oblika CuO, nano=nano oblika CuO. Različne črke označujejo statistično značilno razliko med tretmaji (enosmerna ANOVA, Duncan's test, p<0,05). ....                    | 68 |
| Sl. 30: Koncentracije MDA lipida v koreninah sončnic ( <i>H. annuus</i> ), pri netretiranih (kontrola) ali tretiranih z 10 in 100 mg l <sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki na hidroponski raztopini. Prikazane so povprečne vrednosti (kontrola N=2, ostali tretmaji N=3). Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilno razliko med tretmaji (enosmerna ANOVA, LSD test, p<0,05). ....             | 69 |
| Sl. 31: Primerjava spektrov skorje prečnega prereza zrele korenine kontrole (zelena) in tretmaja nano CuO 100 mg l <sup>-1</sup> (oranžna), posnetih z infrardečo svetlobo na žarkovni liniji SSI (sinhrotron Elettra). ....  | 71 |
| Sl. 32: Klasterška analiza za FTIR spektre stisnjenih tabletk iz liofiliziranih in uprašenih korenin (a) in listov poganjkov (b) sončnic kontrole, tretmaja CuO standardne oblike 10 in 100 mg l <sup>-1</sup> ter tretmaja nano CuO 10 in 100 mg l <sup>-1</sup> . ....  | 72 |
| Sl. 33: Vrednosti absorbanca vrhov za lipide, proteine, DNA in ogljikove hidrate v koreninah sončnic ( <i>H. annuus</i> ), pri netretiranih (kontrola) ali tretiranih z 10 in 100 mg l <sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki na hidroponski raztopini. ....   | 73 |

- Sl. 34: Razmerja med absorbcami vrhov za lipidi/proteini (L/P), ogljikovi hidrati/proteini (OH/P), ogljikovi hidrati/lipidi (OH/L), DNA/proteini (DNA/P) v koreninah sončnic (*H. annuus*), pri netretiranih (kontrola) ali tretiranih z 10 in 100 mg I<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki na hidroponski raztopini..... 74
- Sl. 35: Vrednosti absorbc vrhov za lipide, proteine, DNA in ogljikove hidrate v koreninskih vršičkih sončnic (*H. annuus*), pri netretiranih (kontrola) ali tretiranih z 10 in 100 mg I<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki na hidroponski raztopini. .... 74
- Sl. 36: Razmerja med absorbcami vrhov za lipidi/proteini (L/P), ogljikovi hidrati/proteini (OH/P), ogljikovi hidrati/lipidi (OH/L), DNA/proteini (DNA/P) v koreninskih vršičkih sončnic (*H. annuus*), pri netretiranih (kontrola) ali tretiranih z 10 in 100 mg I<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki na hidroponski raztopini. .... 75
- Sl. 37: Vrednosti absorbc vrhov za lipide, proteine, DNA in ogljikove hidrate v listih poganjkov sončnic (*H. annuus*), pri netretiranih (kontrola) ali tretiranih z 10 in 100 mg I<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki na hidroponski raztopini..... 75
- Sl. 38: Klustersko drevo za IR spektre, posnete v rizodermisu prečnega prereza zrele korenine (a) in vzdolžnega prereza koreninskega vršička (b) sončnic kontrole, tretmaja CuO standardne kemijske oblike 10 in 100 mg I<sup>-1</sup> ter tretmaja nano CuO 10 in 100 mg I<sup>-1</sup> ..... 77
- Sl. 39: Klustersko drevo za IR spektre, posnete v skorji prečnega prereza zrele korenine (a) in vzdolžnega prereza koreninskega vršička (b) sončnic kontrole, tretmaja CuO standardne oblike 10 in 100 mg I<sup>-1</sup> ter tretmaja nano CuO 10 in 100 mg I<sup>-1</sup>. .... 77
- Sl. 40: Klustersko drevo za IR spektre, posnete v koreninskih čepicah vzdolžnega prereza koreninskega vršička sončnic kontrole, tretmaja CuO standardne oblike 10 in 100 mg I<sup>-1</sup> ter tretmaja nano CuO 10 in 100 mg I<sup>-1</sup>. .... 78
- Sl. 41: Vrednosti absorbc vrhov za lipide, proteine, DNA in ogljikove hidrate (OH) v žili zrelih korenin (a) in koreninskih vršičkov (b) sončnic (*H. annuus*), pri netretiranih (kontrola) ali tretiranih z 10 in 100 mg I<sup>-1</sup> CuO v standardni obliki in 100 mg I<sup>-1</sup> v nano obliki na hidroponski raztopini. Manjkajo nam podatki za spektre žile koreninskega vršička tretmaja nano CuO 100 mg I<sup>-1</sup>, saj smo jo na vzdolžnem prerezu zgrešili, tako da na rezini ni prisotnega tkiva žile. .... 79
- Sl. 42: Vrednosti absorbc vrhov za lipide, proteine, DNA in ogljikove hidrate (OH) v skorji zrelih korenin (a) in koreninskih vršičkov (b) sončnic (*H. annuus*), pri netretiranih (kontrola) ali tretiranih z 10 in 100 mg I<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki na hidroponski raztopini. .... 80
- Sl. 43: Vrednosti absorbc vrhov za lipide, proteine, DNA in ogljikove hidrate (OH) v rizodermisu zrelih korenin (a) in koreninskih vršičkov (b) sončnic (*H. annuus*), pri netretiranih (kontrola) ali tretiranih z 10 in 100 mg I<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki na hidroponski raztopini. .... 81
- Sl. 44: Vrednosti absorbc vrhov za lipide, proteine, DNA in ogljikove hidrate (OH) v endodermisu zrelih korenin sončnic (*H. annuus*), pri netretiranih (kontrola) ali tretiranih z 10 in 100 mg I<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki na hidroponski raztopini..... 82
- Sl. 45: Vrednosti absorbc vrhov za lipide, proteine, DNA in ogljikove hidrate (OH) v meristemski regiji koreninskih vršičkov sončnic (*H. annuus*), pri netretiranih (kontrola) ali tretiranih z 10 in 100 mg I<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki na hidroponski raztopini. .... 82

- Sl. 46: Vrednosti absorbcanc vrhov za lipide, proteine, DNA in ogljikove hidrate (OH) v notranjosti koreninskih čepic vršičkov sončnic (*H. annuus*), pri netretiranih (kontrola) ali tretiranih z 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki na hidroponski raztopini. .... 83
- Sl. 47: Vrednosti absorbcanc vrhov za lipide, proteine, DNA in ogljikove hidrate (OH) v povrhnjici koreninskih čepic vršičkov sončnic (*H. annuus*), pri netretiranih (kontrola) koreninah ali koreninah, tretiranih z 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki na hidroponski raztopini. .... 83
- Sl. 48: Razmerja med absorbcancami vrhov za lipidi/proteini (L/P), ogljikovi hidrati/proteini (OH/P), ogljikovi hidrati/lipidi (OH/L), DNA/proteini (DNA/P) v IR spektrih posnetih v žili zrelih korenin (a) in koreninskih vršičkov (b) sončnic (*H. annuus*), pri netretiranih (kontrola) ali tretiranih z 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki na hidroponski raztopini. Pri vzdolžnem prerezu koreninskega vršička nam manjkajo podatki za tretma nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup>. .... 84
- Sl. 49: Razmerja med absorbcancami vrhov za lipidi/proteini (L/P), ogljikovi hidrati/proteini (OH/P), ogljikovi hidrati/lipidi (OH/L), DNA/proteini (DNA/P) v IR spektrih posnetih v skorji zrelih korenin (a) in koreninskih vršičkov (b) sončnic (*H. annuus*), pri netretiranih (kontrola) ali tretiranih z 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki na hidroponski raztopini. .... 85
- Sl. 50: Razmerja med absorbcancami vrhov za lipidi/proteini (L/P), ogljikovi hidrati/proteini (OH/P), ogljikovi hidrati/lipidi (OH/L), DNA/proteini (DNA/P) v IR spektrih posnetih v rizodermisu zrelih korenin (a) in koreninskih vršičkov (b) sončnic (*H. annuus*), pri netretiranih (kontrola) ali tretiranih z 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki na hidroponski raztopini. .... 86
- Sl. 51: Razmerja med absorbcancami vrhov za lipidi/proteini (L/P), ogljikovi hidrati/proteini (OH/P), ogljikovi hidrati/lipidi (OH/L), DNA/proteini (DNA/P) v IR spektrih posnetih v endodermisu zrelih korenin sončnic (*H. annuus*), pri netretiranih (kontrola) ali tretiranih z 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki na hidroponski raztopini. .... 87
- Sl. 52: Razmerja med absorbcancami vrhov za lipidi/proteini (L/P), ogljikovi hidrati/proteini (OH/P), ogljikovi hidrati/lipidi (OH/L), DNA/proteini (DNA/P) v IR spektrih posnetih v meristemski regiji koreninskih vršičkov sončnic (*H. annuus*), pri netretiranih (kontrola) ali tretiranih z 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki na hidroponski raztopini. .... 87
- Sl. 53: Razmerja med absorbcancami vrhov za lipidi/proteini (L/P), ogljikovi hidrati/proteini (OH/P), ogljikovi hidrati/lipidi (OH/L), DNA/proteini (DNA/P) v IR spektrih posnetih v notranjosti čepic koreninskih vršičkov sončnic (*H. annuus*), pri netretiranih (kontrola) ali tretiranih z 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki na hidroponski raztopini. .... 88
- Sl. 54: Razmerja med absorbcancami vrhov za lipidi/proteini (L/P), ogljikovi hidrati/proteini (OH/P), ogljikovi hidrati/lipidi (OH/L), DNA/proteini (DNA/P) v IR spektrih posnetih v povrhnjici čepic koreninskih vršičkov sončnic (*H. annuus*), pri netretiranih (kontrola) ali tretiranih z 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki na hidroponski raztopini. .... 88
- Sl. 55: Faze mitoze v apikalnem meristemu koreninskega vršička navadne sončnice (*H. annuus*). .... 89

|  |    |
|--|----|
| Sl. 56: Vrednosti mitotskega indeksa v koreninskih vršičkih sončnice ( <i>H. annuus</i> ), pri netretiranih (kontrola) rastlinah in rastlinah, tretiranih z 10 in 100 mg l <sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki na hidroponski raztopini. Prikazane so povprečne vrednosti (kontrola N=4, ostali tretmaji N=5). Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilno razliko med tretmaji (enosmerna ANOVA, Duncan's test, p<0,05). .... | 90 |
| Sl. 57: Primerjava kontrolne rastline z rastlino, ki je rasla v raztopini s CuO v standardni in nano obliki s koncentracijo 10 mg l <sup>-1</sup> (a) in 100 mg l <sup>-1</sup> (b). ....  | 91 |
| Sl. 58: Primerjava prečnih rezin stebela tretiranih rastlin: a) žila pri kontrolnih rastlinah, b) žila po tretmaju 100 mg l <sup>-1</sup> standardni CuO, c) steblo pri tretmaju 10 mg l <sup>-1</sup> nano CuO, d) žila pri tretmaju 100 mg l <sup>-1</sup> nano CuO, e) žila pri tretmaju 100 mg l <sup>-1</sup> nano CuO in f) steblo pri tretmaju 100 mg l <sup>-1</sup> nano CuO. ....  | 92 |
| Sl. 59: Primerjava prečnih rezin listne ploskve med a) kontrolo in b) tretmajem 100 mg l <sup>-1</sup> nano CuO. ....  | 93 |
| Sl. 60: Primerjave vzdolžnih prerezov koreninskih vršičkov sončnic, tretiranih z 10 ali 100 mg l <sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki.....  | 94 |
| Sl. 61: Primerjave prečnih prerezov korenin sončnic, tretiranih z 10 ali 100 mg l <sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki.....   | 95 |

## KAZALO PRILOG

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

**PRILOGA B:** Vpliv oblike in koncentracije CuO na mitotski indeks v koreninskih vršičkih 2 dni tretiranih rastlin

**PRILOGA C:** Vpliv oblike CuO na koncentracijo lipida MDA v koreninah 2 dni tretiranih rastlin

**PRILOGA D:** Korelacija Zn, K, S, P, Fe, Mn, Mg in Ca s Cu v zrelih koreninah in koreninskih vršičkih tretiranih rastlin

**PRILOGA E:** Vpliv tretmaja na koncentracijo cinka v posameznih tkivih zrele korenine (a) in koreninskega vršička (b) tretiranih rastlin

**PRILOGA F:** Vpliv tretmaja na koncentracijo železa v posameznih tkivih zrele korenine (a) in koreninskega vršička (b) tretiranih rastlin

**PRILOGA G:** Vpliv tretmaja na koncentracijo kalcija v posameznih tkivih zrele korenine (a) in koreninskega vršička (b) tretiranih rastlin

**PRILOGA H:** Vpliv tretmaja na koncentracijo kalija v posameznih tkivih zrele korenine (a) in koreninskega vršička (b) tretiranih rastlin

**PRILOGA I:** Vpliv tretmaja na koncentracijo fosforja v posameznih tkivih zrele korenine (a) in koreninskega vršička (b) tretiranih rastlin

**PRILOGA J:** Vpliv tretmaja na koncentracijo žvepla v posameznih tkivih zrele korenine (a) in koreninskega vršička (b) tretiranih rastlin

**PRILOGA K:** Klusterska analiza podobnosti spektrov, posnetih v žili zrele korenine (a) in v koreninskem vršičku (b)

**PRILOGA L:** Klusterska analiza podobnosti spektrov, posnetih v meristemski regiji koreninskega vršička

**PRILOGA M:** Klusterska analiza podobnosti spektrov, posnetih v endodermisu v zreli korenini

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

|         |  |
|---------|--|
| Ca      | kalcij   |
| Cu      | baker  |
| CuO     | bakrov oksid   |
| Fe      | železo   |
| FTIR    | infrardeča spektroskopija z uporabo Fourierjeve transformacije |
| IJS     | Institut Jožef Stefan  |
| K       | kalij  |
| LEXRF   | nizko energijska rentgensko fluorescenčna spektromikroskopija  |
| MDA     | malondialdehid   |
| MI      | mitotski indeks  |
| Mg      | magnezij   |
| P       | fosfor   |
| PIXE    | protonsko inducirana emisija rentgenskih žarkov                |
| ROS     | reaktivne kisikove spojine                                     |
| S       | žveplo   |
| SISSI   | sinhrotronska žarkovna linija z uporabo infrardečega sevanja   |
| SM      | suha masa  |
| TBA     | tiobarbiturna kislina  |
| TCA     | trikloroacetna kislina   |
| TWINMIC | sinhrotronska žarkovna linija z uporabo rentgenskega sevanja   |
| TXRF    | rentgensko fluorescenčna spektrometrija s popolnim odbojem     |
| XRF     | standardna rentgenska fluorescenčna spektrometrija             |
| Zn      | cink   |

## 1 UVOD

Nanomateriali izboljšujejo kvaliteto našega življenja, zato njihova uporaba v zadnjih letih dramatično narašča. Kot posledica razmaha nanotehnologije v stik s proizvedenimi nanodelci prihaja vse več organizmov, zato bo v prihodnosti potrebno izboljšati znanje o lastnostih nanodelcev in mehanizmih njihovega delovanja, obenem pa postaviti regulative, ki se tičejo njihove uporabe oz. primerne odstranitve (Drobne, 2007).

V zadnjih letih so bili razviti različni testi strupenosti, pri katerih žive organizme izpostavimo različnim snovem in opazujemo njihov odziv. Rastlinski testi, ki so bili predlagani s strani USEPA (1996, cit. po Monica in Cremonini, 2009), vključujejo predvsem raziskave vpliva snovi na kaljivosti semen, rast korenin, spremembe biomase in opazovanje anatomsko-histoloških sprememb. S takimi testi lahko hitro pridemo do podatkov o celokupnem škodljivem vplivu snovi na organizem, obenem pa spoznamo tudi mehanizem strupenosti določene snovi.

Narejenih je bilo precej raziskav o strupenosti nanodelcev, saj zaradi svoje majhnosti in povečane površine ti delci pridobijo popolnoma nove lastnosti. Ugotavljajo, da nanodelci organizmu lahko škodujejo posredno preko indukcije oksidativnega stresa, v splošnem pa so mehanizmi strupenosti nanodelcev še dokaj nepoznani.

Primer snovi, ki jo poznamo tako v standardni kemijski obliki kot tudi v nano obliki, je bakrov oksid (CuO). Standardni CuO se uporablja kot katalizator, obenem pa ima antibakterijski in antiviralni učinek, deluje kot fungicid in uničuje pršice, zato se uporablja v tekstilni industriji (Borkow in Gabbay, 2004). Nanodelci bakrovega oksida se zaradi posebnih optičnih, električnih in katalitičnih lastnosti intenzivno uporabljajo v elektroniki, optičnoelektronskih napravah, mikroelektromehaničnih sistemih, plinskih senzorjih, sončnih celicah, predvsem v vlogi superkonduktorja in katalizatorja (El Trass in sod., 2012), obenem pa služijo kot antimikrobni preparati in znotrajmaternična kontracepcijska sredstva (Aruoja in sod., 2009).

Namen diplomske naloge je bil okarakterizirati nekatere lastnosti nanodelcev CuO, preučiti stopnjo privzema in razporejanja bakra in ostalih elementov ter preučiti biokemijske



spremembe v koreninskih tkivih sončnic, tretiranih z nano in standardno obliko CuO. Za poskusno rastlino smo izbrali sončnico (*Helianthus annuus*), saj v kratkem času proizvede veliko biomase in je nezahtevna za gojenje, poleg tega pa je tudi pomembna kulturna rastlina. Rastline smo gojili na hidroponiki štiri tedne, kjer smo hranilni raztopini dodajali različne koncentracije (0, 10, 100 mg l<sup>-1</sup>) nanodelcev in standardnega CuO. Ob koncu poskusa smo s pomočjo svetlobne mikroskopije opazovali morfološke spremembe korenin na tkivnem in celičnem nivoju ter opravili test genotoksičnosti z barvanjem jeder celic koreninskih vršičkov po Feulgnu. S pomočjo standardne infrardeče (IR) spektroskopije (Kemijski inštitut, Ljubljana) in IR spektromikroskopije (Sinohrotron Elettra, Trst) smo preučili spremembe v biokemijski sestavi (razmerja v količini proteinov, lipidov in ogljikovih hidratov) korenin tretiranih rastlin na organskem in tkivnem nivoju. Z metodo mikro-protonsko inducirane emisije rentgenskih žarkov (mikro-PIXE) (Institut Jožef Stefan, Ljubljana) in nizko energijske rentgensko fluorescenčne spektromikroskopije (LEXRF) (Sinohrotron Elettra, Trst) smo določili tudi porazdelitev bakra in ostalih elementov v koreninskih tkivih.

*Naše delovne hipoteze so bile:*

- Pri določanju karakteristik nanodelcev CuO se bodo rezultati meritev suspenzij nanodelcev CuO razlikovali od rezultatov suspenzij s CuO v standardni kemijski obliki.
- Rastline, tretirane z nanodelci CuO, bodo v svojih tkivih vsebovale višje koncentracije bakra v primerjavi z rastlinami, tretiranimi s CuO v standardni obliki, zaradi večje mobilnosti nanodelcev. Pričakujemo tudi različno razporeditev bakra v tkivih korenin.
- Pri porazdelitvenih mapah elementov na celičnem nivoju bomo pri koreninah, tretiranih z nanodelci CuO, opazili kolokalizacijo kiska in bakra v celici.
- Predvidevamo, da bodo nanodelci CuO vplivali na prerazporeditev drugih esencialnih elementov v korenini, prav tako tudi na njihovo koncentracijo.
- Tretiranje rastlin z nanodelci CuO bo vplivalo tudi na morfološke spremembe rastlin.
- Nanodelci bodo povečali stopnjo peroksidne oksidacije membran, tako v koreninah kot v poganjkih.
- Nanodelci bodo motili proces delitve celic in zmanjšali mitotski indeks v celicah meristema koreninskih vršičkov sončnic.
- Pri rastlinah, tretiranih z nanodelci CuO, bo biokemijska sestava tkiv drugačna, pri čemer pričakujemo manj ogljikovih hidratov zaradi motenj v procesu fotosinteze.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 NANOTEHNOLOGIJA

Beseda *nano* izhaja iz grške besede "*nannos*" in pomeni *skrat oz. pritlikav*. Nano uporabljamo tudi kot predpono, ki v matematičnem merilu označuje desetiško potenco  $10^{-9}$  ( $1\text{nm}=10^{-9}\text{ m}$ ).

Nanotehnologija pomeni manipulacijo, sintezo in kontrolo snovi, ki vsaj v eni dimenziji meri manj kot 100 nm. Nanodelcev s prostim očesom ne moremo videti. Z njimi operiramo na nanometerski merilni lestvici (Remškar, 2009). Na tej ravni snovi izkazujejo različne in pogosto osupljive lastnosti (Schulenburg, 2006).

Nanotehnologija je hitro razvijajoča se industrija, ki vpliva na ekonomijo, družbo, okolje in tam živeče organizme. Mnenja medijev, znanstvenikov in vlad so zelo različna (Daohui in Baoshan, 2007). Uporablja se v vseh panogah industrije, od kemijske, tekstilne, računalniške in informatike, transporta, energetike, avtomobilske, farmacevtske ... Največji pomen ima pri proizvodnji materialov in nanoelektroniki. Z manjšimi, lažjimi, hitrejšimi in učinkovitejšimi materiali, komponentami ter sistemi nanotehnologija ponuja možne rešitve za številne probleme moderne družbe, kot tudi za globalne in okoljske probleme. S pomočjo nanotehnologije naj bi varčevali z viri in zmanjšali količino odpadkov ter emisij (Schulenburg, 2006). Nekateri celo napovedujejo, da bo razvoj nanotehnologije povzročil novo industrijsko revolucijo (Remškar, 2009). Podatki o trenutni uporabi in sintezi nanomaterialov so redki in zelo različni. Maynard (2006) navaja, da bo produkcija inženirskih nanodelcev iz 2000 ton v letu 2004 narasla na 58.000 ton v letih od 2011 do 2020.

S povečano rabo nanodelcev v vsakdanjem življenju pa se bo povečala tudi njihova prisotnost v okolju in s tem vpliv na tam živeče organizme. Predvsem so problematični nenadzorovani izpusti nanodelcev, ki bi se nakopičili v užitnih delih rastlin, od tu pa bi se prenesli na ostale člene prehranjevalne verige. Najbolj zaskrbljujoči so genotoksični učinki nanodelcev, saj se poškodbe DNA lahko odražajo v prenosu abnormalnosti organizmov na

potomce in oslavljenju celotnega ekosistema (Singh in sod., 2009). Zato je smiselno in hkrati tudi nujno potrebno pridobiti čim več ustreznega znanja za oblikovanje predpisov na področju varne proizvodnje in uporabe nanodelcev (Drobne, 2007).

## 2.2 NANODELCI IN NJIHOVE LASTNOSTI

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

Glede na izvor jih delimo v dve skupini, in sicer na naravne nanodelce in antropogene oz. proizvedene nanodelce, ki pa se ločijo na nenamensko proizvedene in inženirske nanodelce.

K proizvedenim nanodelcem prištevamo tiste nanodelce, ki se jih poslužujemo v medicini, farmacevtski, kozmetični, avtomobilski industriji ... Inženirske nanodelce delimo v štiri tipe:

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

Velikosti inženirskih nanodelcev so natančno definirane (Navarro in sod., 2008). Proizvajalci površino namensko oksidirajo ali pa nanjo nanesejo prevleko iz druge spojine

in tako preprečijo združevanje nanodelcev. Prav zaradi te preprečene aglomeracije se industrijski nanodelci razlikujejo od nenamenskih (Remškar, 2009). Zaradi vse pogostejše uporabe inženirskih nanodelcev se pričakuje, da se bo njihova koncentracija v vodnem, kopenskem in atmosferskem okolju povečevala (Monica in Cremonini, 2009). Inženirski nanodelci lahko pridejo v okolje nenamerno preko atmosferskih izpustov, pri uporabi v kmetijstvu, z odpadnimi vodami, z nesrečami pri proizvodnji in transportu, ki vodijo do izpustov nanodelcev v okolje (Stampoulis in sod., 2009). Lahko pa pridejo v okolje tudi namerno z uporabo nanodelcev pri remediaciji in čiščenju onesnaženih voda (Zhang in Elliott, 2006). Kakorkoli, če nanodelci pridejo v vodo ali zrak, na koncu končajo v zemlji oz. v sedimentih. Posledice njihove prisotnosti in delovanja v okolju pa so še dokaj nepoznane in neraziskane (Monica in Cremonini, 2009).

K nenamensko proizvedenim nanodelcem prištevamo stranske produkte v industrijski proizvodnji (mletje, varjenje, brušenje) ali produkte pri izgorevanju biomase in fosilnih goriv. Najdemo jih v izpuhu motorjev z notranjim izgorevanjem in v izdihanem zraku kadilca, kjer je v vsakem kubičnem centimetru več kot 100 milijonov nanodelcev (Remškar, 2009).

V naravi nanodelci obstajajo že od nastanka Zemlje. Razdelimo jih lahko na nanodelce anorganskega in organskega izvora. Anorganske najdemo v puščavskem prahu, mineralnih kompozitih, nastajajo pri izbruhu vulkanov, gozdnih požarih in eroziji (Monica in Cremonini, 2009; Stampoulis in sod., 2009). Med organske nanodelce štejemo biomolekule ter rastlinske in živalske nanostrukture. Nanožičke v naravi so npr. DNA, pajčevina, svila in kite. Nanostrukture so npr. hemoglobin, fosfolipidne membrane, holesterol, soli in miceliji. Tudi fragmenti peloda in virusi spadajo med naravne nanodelce. Njihove velikosti so zelo različne (Navarro in sod., 2008).

Koncentracija nanodelcev v ozračju se spreminja v odvisnosti od letnega časa, zračne vlage, vetra, temperature in bližine virov teh delcev (Remškar, 2009). Za delce, manjše od 10  $\mu\text{m}$ , so določene mejne vrednosti 50  $\mu\text{g m}^{-3}$ . Ocenjuje se, da je 90 % delcev v ozračju manjših od 2,5  $\mu\text{m}$ . Konec maja 2009 je bila sprejeta Direktiva Evropskega parlamenta in

Sveta o kakovosti zunanjega zraka in čistejšem zraku za Evropo, ki določa mejno vednost 2,5-25  $\mu\text{g m}^{-3}$ . Ta mora biti dosežena do leta 2015. Do leta 2020 pa mora biti dosežena mejna vrednost 20  $\mu\text{g m}^{-3}$  (Remškar, 2009).

Rastline so razvile mnogo nanostruktur, ki jim omogočajo oprijemanje, čiščenje ... Lotos in še približno 200 drugih znanih vrst čisti svoje liste z lotosovim učinkom, do česar pride zaradi strukturirane površine lista v obliki nanostruktur, ki povzročijo odboj vode. Pri nagnjeni podlagi se kapljice vode zakotalijo, ob tem pa se odplakne tudi umazanija. V listih rastlin pa so našli majhne gibajoče proteine forisome, ki v kapilarnem sistemu ksilema odpirajo ali pa zapirajo poti (Schulenburg, 2006).

Tudi živali se poslužujejo prednosti nanotehnologije. Užitna klapavica se na podlago pritrdi s pomočjo bisusnih niti, obenem pa školjke uporabljajo nanotehnologijo tudi pri povečevanju trdnosti oz. biomineralizaciji svojih lupin. Gekoni, pajki, hrošči in muhe imajo na nogah tanke dlačice, ki jim omogočajo plezanje po stenah (Schulenburg, 2006).

### **2.2.1 Lastnosti nanodelcev**

Lastnosti nanodelcev so drugačne kot lastnosti delcev z isto kemično zgradbo, ki pa so večji od 100 nm. Z manjšanjem velikosti delca se povečuje razmerje med površino in prostornino, kar povečuje reaktivnost oz. kemijsko aktivnost delca (Remškar, 2009). Delec, ki ga zmanjšamo na velikost enega nanometra, ima kar 58 % vseh atomov na površini. Če je atomov na površini več, se delci lahko hitreje in močneje vežejo (Čebulj, 2007). Zaradi motene koordinacije sosednjih atomov pride do sprememb v energijski strukturi elektronov, kar vodi v spremembo optičnih in električnih lastnosti (Remškar, 2009). Poveča se tudi trdnost, razteznost, difuzija, katalitična aktivnost, luminiscenca, magnetnost ter težnja po združevanju nanodelcev (Singh in sod., 2009). Z manjšanjem velikosti nanodelcev narašča njihova viskoznost, kar je dokazal Chang in sod. (2011) na primeru nanodelcev CuO. Medtem pa po drugi strani z majhnostjo delcev pada tališče, termična prevodnost, gostota, sipanje svetlobe (Navodnik, 2007).

Nanodelci lahko v človeško telo vstopijo skozi kožo, prebavila in dihala. Velikost ima pomembno vlogo pri prehajanju delcev: 70 nm veliki delci lahko prodrejo v pljučne mešičke, 50 nm v celice, 30 nm pa celo v celično jedro (Schulenburg, 2006).

Površinske lastnosti nanodelcev, kot so proste kemijske vezi in naboj, so eden najpomembnejših dejavnikov, ki določajo stabilnost nanodelcev, njihovo mobilnost v koloidnih raztopinah in njihovo agregacijo v večje delce (Navarro in sod., 2008). Nanodelci so lahko ploščati, sferični, v obliki vlaken in nitk. Za slednje je značilno, da imajo dolžino, ki presega tri premere v prečni smeri. Lahko pa imajo nanodelci tudi obliko tankih lističev, kadar je razporeditev naboja na njihovi površini neenakomerna (Remškar, 2009). Oblika določa tudi aerodinamični premer delca, ki je pomemben pri potovanju nanodelcev po ozračju in tekočinah. Okrogli delci se zelo hitro gibljejo in zato pogosteje trkajo med seboj ali z molekulami medija z lahkoto prehajajo preko luknjic filtrov (Remškar, 2009).

Kemijska sestava nanodelcev vpliva na njihovo topnost. Nanodelci v vodi praviloma niso topni. Kovinski nanodelci so običajno topni in se počasi raztapljajo v ione. Kovinski oksidi so stabilnejši, a tisti, ki vsebujejo prehodne elemente, še vedno lahko povzročajo neželene kemijske reakcije zaradi večjega števila možnih oksidacijskih stanj kovinskega iona (Remškar, 2009).

Nanodelci imajo večjo kemijsko aktivnost, kar prispeva k njihovemu združevanju v aglomerate. Sčasoma se tvorijo vedno večji aglomerati, ki imajo lahko popolnoma drugačne lastnosti kot posamezni delci. To je posledica spreminjanja razmerja med površino in volumnom ter zapolnjevanja prostih vezi. Aglomeracija je odvisna od vrste in velikosti nanodelca, koncentracije, raztopine, temperature in pH (Navarro in sod., 2008). Za inženirske nanodelce je aglomeracija nezaželena, saj delci s tem izgubijo svojo funkcionalnost. Aglomeracijo lahko preprečimo z ovojem iz organskih polimerov, z velikim nabojem delcev, s shrambo v mediju, ki preprečuje aglomeracijo (Čebulj, 2007).

Nanodelci lahko v zraku ostanejo veliko dlje kot večji delci, dosegajo večje hitrosti, kar je posledica njihove termične energije (Čebulj, 2007; Remškar, 2009).

Optične lastnosti nanodelcev se spreminjajo glede na pogoje, v katerih se ti nahajajo. Značilna je menjava barve v odvisnosti od velikosti delcev, temperature in tlaka. Lahko pride tudi do pojava fluorescence (Navodnik, 2007).

Za razumevanje obnašanja nanodelcev v okolju je potrebno dobro karakterizirati njihove lastnosti: velikost, obliko, kemijske značilnosti površine in jedra, sposobnost aglomeracije, redoks potencial, čistost, katalitično aktivnost, kristaliničnost, površinski naboj in poroznost (Powers in sod., 2006). Te lastnosti določajo tudi genotoksičen potencial nanodelcev (Singh in sod., 2009).

### 2.3 UPORABA IN TVEGANJA NANOTEHNOLOGIJE

Nanodelci nas obdajajo vsepovsod. Danes se na tržišču pojavlja vse več izdelkov, polizdelkov oz. surovin, ki vsebujejo nanodelce, saj se nanotehnologija pojavlja v različnih panogah. Singh in sod. (2009) so ocenili, da je bilo leta 2007 na trgu že 800 produktov, ki vsebujejo nanomaterialne, katerih vrednost je bila 147 milijonov dolarjev. Predvideli so, da bo do leta 2015 vrednost teh izdelkov dosegla 3,1 trilijonov dolarjev.

Ena izmed panog je avtomobilska industrija. Mogoče je izdelati premaze, ki varujejo vetrobransko steklo pred praskami in so termoodbojni.

Nanotehnologija se pojavlja tudi v gradbeništvu, kjer se uporabljajo nano-samoočiščevalni fasadni premazi, možno je kupiti tudi samočistilno keramiko (Remškar, 2009).

Vedno pogosteje se nanotehnologije poslužuje tudi prehrabena industrija. Njeni produkti so t.i. nanohrana; ta označuje hrano, ki je bila bodisi pridelana, predelana ali pakirana s pomočjo nanotehnologije. Zelo pomembno je zagotavljanje varne uporabe nanomaterialov

v prehrabni verigi. Žal nanohrano že najdemo na prodajnih policah, ne da bi bilo to na izdelkih označeno. Točnega števila takih izdelkov ni mogoče ugotoviti (Remškar, 2009).

Nanodelci so izjemno uporabni tudi v medicini, govorimo o t.i. nanomedicini, ki pripomore k boljšemu diagnosticiranju, preprečevanju in zdravljenju bolezni (Singh in sod., 2009).

Tudi kozmetična industrija vedno pogosteje uporablja inženirske nanodelce v šminkah, sončnih kremah in kremah proti staranju (Singh in sod., 2009). V zobnih pastah se nahajajo nanodelci apatita, ki zapolnjujejo kanalčke v zobni sklenini in s tem zmanjšujejo občutljivost zob na temperaturne spremembe (Schulenburg, 2006).

Namensko proizvedeni nanodelci se uporabljajo tudi v tekstilni industriji, saj nudijo tekstilu odpornost proti mečkanju, odstranjevanje neprijetnih vonjav ter antimikrobno zaščito.

Nanotehnologija nam ponuja širok spekter uporabe na mnogih področjih. Istočasno se poraja problem, kako ustrezno poskrbeti za varovanje narave, okolja in zdravja.

Karakteristike nanodelcev v okolju so zelo dinamične. Transport skozi različne plasti zemlje je odvisen od velikosti delca. Raziskave so pokazale, da imajo delci, ki so manjši od 200 nm, velik transportni potencial in lahko zelo hitro dosežejo podtalne ali površinske vode. Tudi naboj delca in matriksa, v katerem se delec nahaja, je pomemben. Od njega je namreč odvisno, ali bo delec skozi matriks potoval ali se bo vezal nanj (Darlington in sod., 2008). Ko enkrat nanodelec vstopi v organizem, pa obstaja velika nevarnost prenosa po prehranjevalni verigi, ki pa je v veliki meri odvisen od biologije in fiziologije tarčnega organizma (Blinova in sod., 2010).

Problem predstavlja tudi težavna identifikacija nanodelcev v okolju. Obstaja kar nekaj metod za določanje števila, površine in masne koncentracije nanodelcev, vendar pa nobena



od njih ni uporabna na terenu (Drobne, 2007). Razvoj detektorjev nanodelcev je trenutno velika razvojna in tržna priložnost (Remškar, 2009).

## 2.4 VPLIV NANODELCEV NA VIŠJE RASTLINE

Pričakovati je, da bo glede na vedno pogostejšo uporabo nanotehnologije vedno več organizmov prišlo v stik z inženirskimi nanodelci. Pomembno vlogo pri preučevanju vpliva nanodelcev imajo rastline, saj si izmenjujejo snovi tako z atmosfero kot tudi s kopenskim okoljem.

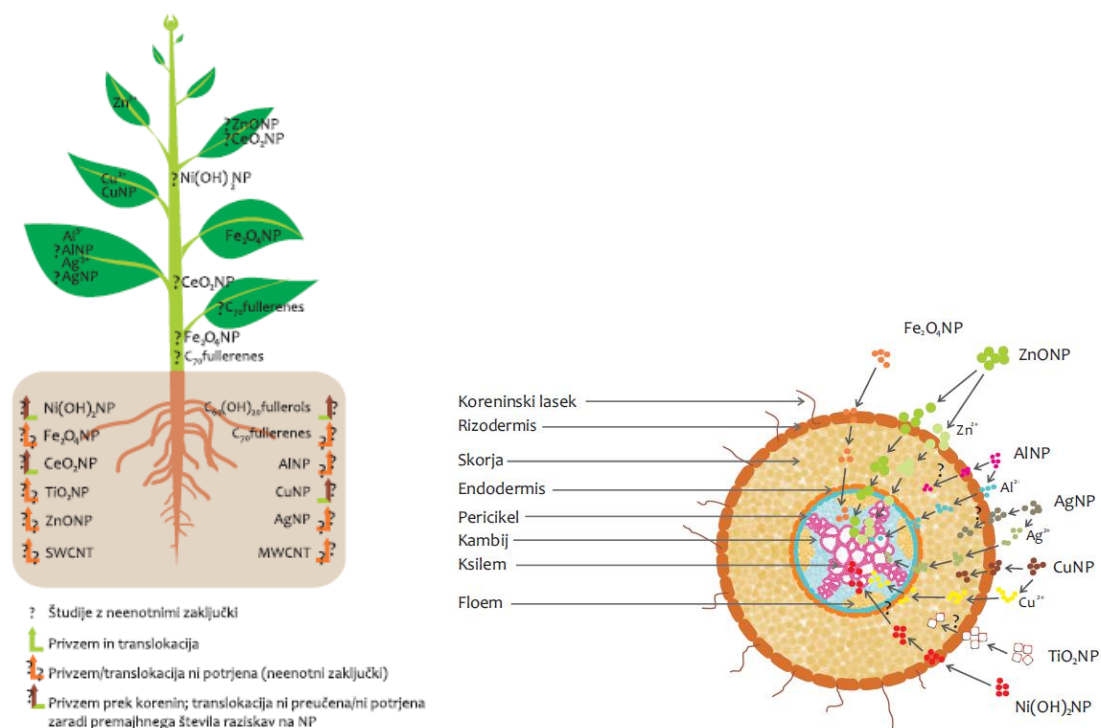
Nanodelci lahko močno vplivajo na biodiverzitetu rastlin, saj bodo občutljive vrste pričele izumirati, kajti nanodelci lahko zavirajo njihovo rast, cvetenje in tvorbo plodov. Preživele bodo le bolj prilagojene rastline (Monica in Cremonini, 2009). Slednje bi lahko uporabili kot poceni orodje za čiščenje tal. Take vrste poznamo že danes, in to so predstavniki rodu *Brassica*, *Medicago*, *Thlaspi* in vrste, kot so *Cucurbita maxima* in *Helianthus annuus* (Dokken, 2006; Monica in Cremonini, 2009).

Sončnico so uporabili za fitoremediacijo predvsem v močvirjih za odstranitev 2,4,6-trinitrotoluena (TNT), dinitrotoluena (DNT), nitrobenzena, nitrotoluena in hexahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina (RDX) iz površinskih odtekajočih voda in onesnaženja podtalnice. Sončnice so gojili na zemlji s poliaromatskimi hidrokarboni (PAHs) (Dokken, 2006). Po katastrofi v Černobilu so jih uporabili za odstranjevanje cezija-137 in stroncija-90 iz tal. V Ohio, kjer so bila tla onesnažena z uranom, so štiri tedne stare sončnice odstranile 95 % urana v 24 urah (Prasad, 2007).

### 2.4.1 Privzem in transport nanodelcev po rastlini

Nanodelci v rastline prehajajo preko koreninskega sistema ali preko listne površine. Privzem nanodelcev preko koreninskega sistema je odvisen predvsem od sestave, oblike in velikosti nanodelcev ter od rastlinske vrste (Ma in sod., 2010), medtem ko je sposobnost akumulacije odvisna predvsem od premera delcev (Battke in sod., 2008). Pri raziskavah nanodelcev Cu je bilo ugotovljeno, da se s povečevanjem koncentracije nanodelcev v

gojišču povečujeta tudi privzem in akumulacija le-teh v rastlinskih tkivih (Lee in sod., 2008). Pri ugotavljanju privzema nanodelcev ZnO pri ljujki (*Lolium perenne*) ni bilo zaznati transporta iz korenin v poganjke. Opazili pa so, da se nanodelci ZnO lepijo na površino korenin (Lin in Xing, 2008). Dokazali so, da imajo različne rastline različne odzive na enako vrsto nanodelcev. V primeru tretiranja rastlin z magnetnimi nanodelci so dokazali, da je navadna buča sposobna privzemati, translocirati in kopičiti nanodelce, medtem ko limski fižol ne privzema in ne transportira nanodelcev (Zhu in sod., 2008). Obenem nanodelci lahko delujejo kot prenosniki kemikalij in DNA v izolirane celice rastlin (protoplasti tobaka) in v liste koruze (Torney in sod., 2007).



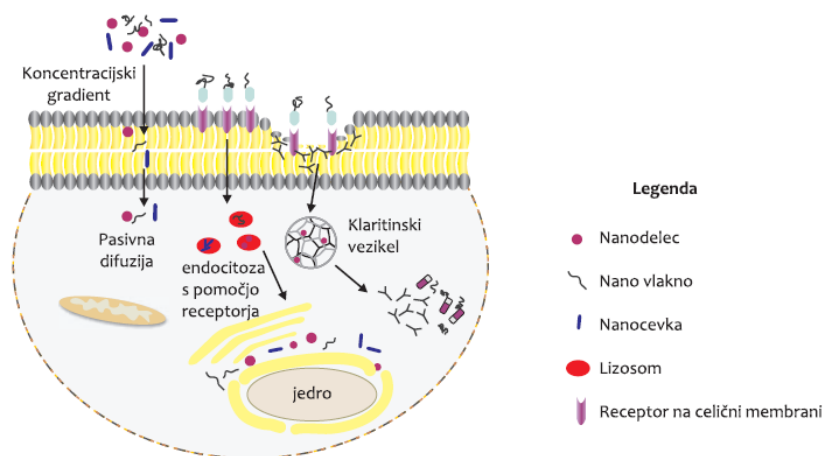
Slika 1: Shematski prikaz različnih poti različnih nanodelcev v rastlini in mesto njihove akumulacije (Povzeto po: Rico in sod., 2011: 3486).

Za vstop preko koreninskega sistema, morajo nanodelci najprej preiti celično steno, nato pa še celično membrano celic povrhnjice korenin. Od tam se nato transportirajo po celicah koreninskega korteksa in vstopajo v prevodna tkiva, kjer se po ksilemu nemoteno prenesejo v preostale dele rastline (Navarro in sod., 2008). Novejše raziskave so pokazale, da so se nanodelci fulerenov sposobni prenesti na drugo generacijo riža, saj se akumulirajo v zrnju (Lin in sod., 2009; cit. po Cifuentes in sod., 2010).

## 2.4.2 Privzem nanodelcev na celični ravni

Celična stena deluje kot prva prepreka, ki večjim delcem iz okolja preprečuje vstop do celice. Primarna celična stena je nekakšen gost preplet celuloznih fibril, drugih polisaharidov in beljakovin. Gostota zamreženosti in debelina celične stene določata prepustnost celične stene za delce. Prvi način vstopa posameznih nanodelcev je pasivno preko celične stene do celične membrane. Obstaja tudi možnost, da se celična stena ob prisotnosti nanodelcev na določenih mestih zrahlja, s tem pa je tudi večjim delcem omogočen stik s celično membrano, pri čemer lahko pride do poškodb celične membrane in nanodelci lahko direktno vstopijo v lumen celice. Novonastala celična stena po celični delitvi je lahko bolj prepustna za nanodelce, kar poveča vpliv nanodelcev na celice med celično delitvijo (Navarro in sod., 2008). Obenem pa se lahko nanodelci prenašajo na hčerinske celice, ko pridejo v stik z dednim materialom tekom mitoze (Singh in sod., 2009).

Ko delci uspešno prečkajo celično steno, sledi naslednja prepreka, ki je celična membrana. Način prehoda le-te je s pomočjo endocitoze, ko se membrana uviha in se delci, obdani z membrano, vpotegnejo v notranjost celice. Lahko pa za vstop v notranjost celice uporabijo transportne proteine oz. ionske kanalčke (Slika 2). Med celicami pa lahko prehajajo preko plazmodezem (Lin in Xing, 2008).



Slika 2: Načini prehajanja nanodelcev v celico, s pasivno difuzijo, endocitozo s pomočjo receptorja ali klaritina oz. kaveol (Povzeto po: Singh in sod., 2009: 3900).

Pri raziskavi Gonzales-Melendi in sod. (2008) se je pri tretiranju buče z magnetnimi nanodelci, prevlečenimi z ogljikom, izkazalo, da so nanodelci prisotni povsod, tako v celicah kot tudi med celičnimi prostori. Tudi Xin in Ling (2008) sta posamezne nanodelce ZnO v ljučki opazila tako v apoplastu kot tudi v simplastu koreninskega endodermisa in centralnega stržena.

V celici nanodelci motijo normalno delovanje celičnih organelov, kar se nato odraža kot motnje v presnovi celice in tvorbi reaktivnih kisikovih oblik (ROS), ki povzročajo oksidativni stres (Navarro in sod., 2008). ROS so visoko reaktivne molekule, ki lahko motijo homeostazo zaradi povezovanja s celičnimi makromolekulami, kot so DNA, proteini in lipidi. Prosti kisikovi radikali so definirani kot primarni in sekundarni. Primarni (superoksid,  $O_2^-$ ) lahko nastanejo v metabolnih procesih ali preko aktivacije kisika in reagirajo z drugimi molekulami, kot so redoks aktivne prehodne kovine ali encimi, pri čemer tvorijo sekundarne ROS, ti pa so primarni mediatorji za poškodbe DNA. Če so nanodelci dovolj majhni, lahko poškodujejo DNA z direktnim vstopom v jedro. Če pa se nanodelci kopičijo v celici in nimajo direktnega dostopa do DNA, se to lahko zgodi v času mitoze, ko se jedrna membrana razgradi.

Prav tako imajo prehodni kovinski ioni, ki se sprostijo iz kovinskih nanodelcev, sposobnost spreminjanja kisikovih metabolnih produktov, kot so vodikov peroksid in superoksidni anion, v hidroksilne radikale, ki nato lahko poškodujejo DNA (Oberdörster in sod., 2007).

### **2.4.3 Pozitivni vplivi nanodelcev na rastline**

Raziskave so le redko pokazale pozitiven vpliv nanodelcev na rastline. Večina inženirskih nanodelcev ima antimikrobne lastnosti. Z njimi se lahko poveča odpornost rastline na stres (Navarro in sod., 2008). Po drugi strani pa bi lahko zaradi povečane odpornosti rastlin ogrozili obstoj prostoživečih bakterij, ki fiksirajo zračni dušik, in rastlinskih simbiontov. Nanodelci z veliko površino lahko zadržujejo hranila, ki služijo rastlini kot zaloga. Prav tako se lahko nanodelci povežejo z drugimi onesnažili v okolju in jim tako onemogočijo vstop v rastlino (Navarro in sod., 2008). Lu in sod. (2002, cit. po Lin in Xing, 2007) so

ugotovili, da mešanica nano SiO<sub>2</sub> in nano TiO<sub>2</sub> delcev povečuje aktivnost nitrat reduktaze pri soji, poveča absorpcijo vode in plodnost, stimulira sistem antioksidantov in na splošno ugodno vpliva na rast in kalitev. Zheng in sod. (2005) so dokazali pozitiven vpliv nanodelcev TiO<sub>2</sub> v določeni koncentraciji na fotosintezo in dušični metabolizem ter rast in kalitev pri špinači. Tudi Hong in sod. (2005) so potrdili pozitiven učinek TiO<sub>2</sub> nanodelcev na fotokemične reakcije v kloroplastih, saj naj bi povečevali Hillovo reakcijo in neciklično fotofosforilacijo. Prav tako so Gao in sod. (2006) na špinači dokazali povečano aktivnost Rubisco encima pod vplivom nanodelcev TiO<sub>2</sub>. Dve leti kasneje so Xuming in sod. (2008) pokazali, da je to posledica povečane sinteze mRNA za veliko in malo podenoto Rubisca.

#### **2.4.4 Negativni vplivi nanodelcev na rastline**

Večina raziskav je pokazala, da nanodelci negativno vplivajo na rast in razvoj rastlin (Monica in Cremonini, 2009). Pogoste posledice izpostavljenosti rastlin nanodelcem so slabša rast, zmanjšanje biomase, zavrt razvoj koreninskega sistema in deformacije koreninske čepice (Ma in sod., 2010). Lin in Xing (2007) sta ugotovila, da se inhibicija rasti korenin razlikuje glede na vrsto rastline in vrsto nanodelcev ter je močno odvisna od njihove koncentracije. Večina nanodelcev mora biti prisotna v zelo velikih koncentracijah, da pridejo do izraza njihovi strupenostni učinki. Zaključila sta, da se inhibicija kalitve semena in rasti korenice ne pojavi v času, ko je seme namočeno, temveč v inkubacijski dobi po tretiranju. Leto kasneje sta Lin in Xing (2008) dokazala, da nanodelci ZnO močno zmanjšajo biomaso ljuke, skrajšajo koreninsko čepico in povzročijo propad ali pa visoko stopnjo vakuolarizacije rizodermalnih in kortikalnih koreninskih celic.

Lee in sod. (2008) so pri preučevanju vplivov Cu nanodelcev na fižol in pšenico zaznali inhibirano rast obeh rastlin. Dolžina kalic je negativno korelirala z naraščajočo koncentracijo nanodelcev v mediju. S transmisijsko elektronsko mikroskopijo so opazovali posamezne in agregirane nanodelce v citoplazmi in celični steni korenin.

Nanodelci  $\text{TiO}_2$  v koncentraciji  $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$  zmanjšujejo mitotski indeks v meristemskih celicah čebule (Klančnik in sod., 2011). Prav tako so dokazali Kumari in sod. (2009), da srebrovi nanodelci motijo proces delitve celic pri čebuli.

Asli in Neuman (2009) sta pokazala, da v kalčkih koruze  $\text{TiO}_2$  nanodelci zapolnjujejo prostor med celuloznimi mikrofibrilami v celični steni in imajo negativne posledice na rast listov, transpiracijo in vodni vlek korenin.

Nanodelci  $\text{TiO}_2$  pogosto poškodujejo DNA (Reeves in sod., 2008, Karlsson in sod., 2009, Falck in sod., 2009, Di Virgilio in sod., 2010, cit. po Klančnik in sod., 2011), povzročajo genotoksične odzive, kot so fragmentacije kromosomov, pretrganje DNA verige, točkaste mutacije, krčenje DNA preko oksidacije in alteracije v genski ekspresiji (Singh in sod., 2009).

## 2.5 BAKROV OKSID V STANDARDNI IN NANO OBLIKI

### 2.5.1 Baker in bakrov oksid

Baker se že stoletja uporablja za razkuževanje tekočin in človeškega tkiva. Uporabljali so ga Grki, Kelti, prvi ameriški osvajalci, japonski vojaki za različne namene: preprečevanje diareje, zdravljenje pljučnih in duševnih obolenj, čiščenje pitne vode ... Danes se baker uporablja za čiščenje vode, kot algicid, fungicid, zatiralec nematodov in mehkužcev, kot antibakterijsko sredstvo (Gabbay in sod., 2005). Najpogosteje se baker uporablja v električni industriji, saj je odličen prevodnik električnega toka. V prehrabeni industriji se uporablja kot prehranski dodatek (Adriano, 2001).

Za vse organizme je baker esencialni mikroelement in je nujen za njihovo preživetje (Lee in sod., 2008). Rastline ga potrebujejo le v majhnih količinah (5-20 ppm za normalno rast). V večjih količinah je strupen (Adriano, 2001). Je sestavni del številnih encimov, večinoma tistih, ki sodelujejo v elektronski verigi, in tistih, ki sodelujejo pri katalizi redoks reakcij (Hou in sod., 2007). Pomanjkanje bakra povzroča motnje v metabolizmu ogljikovodikov (fotosinteza, respiracija), metabolizmu dušika (fiksacija  $\text{N}_2$ , sinteza proteinov), sintezi

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

Bakrov oksid ima antibakterijski in antiviralni učinek, deluje kot fungicid in uničuje pršice, zato ga uporabljajo v tekstilni industriji. Uporablja se kot katalizator zaradi njegove visoke aktivnosti in selektivnosti v redukcijskih in oksidativnih reakcijah. Uvrščajo ga med p-polprevodnike (Izaki in sod., 2011). Lahko bi bil alternativa drugim kovinskim katalizatorjem, kot so platina, paladij in rodij, ki sodelujejo pri redukcijah  $\text{NO}_x$  v avtomobilskih izpušnih sistemih. Bakrov oksid se uporablja za sintezo metanola iz CO in  $\text{H}_2$  in v vodno plinski zamenjalni reakciji ( $\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2$ ) (Pike in sod., 2006).

## 2.5.2 Nanodelci bakrovega oksida

Nanodelci bakrovega oksida se zaradi posebnih optičnih, električnih in katalitičnih lastnosti intenzivno uporabljajo v elektroniki, optičnoelektronskih napravah, mikroelektromehaničnih sistemih, elektrokemičnih celicah, plinskih senzorjih, sončnih celicah, predvsem v vlogi superkonduktorja in katalizatorja (El Trass in sod., 2012). Nanodelci bakrovega oksida v etilen glikolu imajo veliko toplotno prevodnost, zato so zelo učinkoviti kot tekočine za prevajanje toplote v strojih (Chang in sod., 2011). Uporabljajo se tudi kot antimikrobni preparati in znotrajmaternična kontracepcijska sredstva (Aruoja in sod., 2009). Dutta in sod. (2003) so ugotovili, da so nanodelci CuO v inertnem matriksu silicijevega dioksida občutljivi na dušikov dioksid in ogljikov monoksid. Torej jih lahko uporabljamo tudi kot plinske senzorje. Nanokristali bakrovega oksida so zelo dobri katalizatorji in delujejo pri nižjih temperaturah kot ostali komercialno dostopni materiali (Carnes in Klabunde, 2003). CuO nanodelci, ki so jih proizvedli z elektrokemično sintezo, so baktericidni tako za Gram pozitivne bakterije kot tudi Gram negativne bakterije, ki povzročajo bolezni, ki se prenašajo po vodi, kot npr. *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *staphylococcus aureus* in *Bacillus subtilis* (Pandey in sod., 2012). Take delce bi lahko

uporabljali za prečiščevanje vode, v barvah in premazih za površine, ki se jih pogosto dotikamo v bolnišnicah.

Nanodelce CuO lahko pripravimo na različne načine: sonokemično, hidro- ali alko-termalno, z raztapljanjem, mikrovalovnim obsevanjem in mehničnem trenjem v trdnem stanju (Kida in sod., 2007). Metode proizvodnje potekajo v laboratoriju in so energetsko ter časovno potratne, predvsem pa drage (Chang in sod., 2011).

Nanodelci CuO so pomembni v ekotoksikoloških raziskavah, saj so zelo strupeni za organizme, kljub njihovi nizki topnosti. Usoda nanodelcev in njihova ekotoksičnost je odvisna od velikosti in razporeditve delcev, stopnje organiziranosti, naboja in topnosti. Narejenih je bilo mnogo raziskav o mehanizmih toksičnosti nanodelcev CuO na različnih organizmih. Največja dilema je, ali je vzrok njihove toksičnosti sproščanje  $\text{Cu}^{2+}$  iona ali pa lastnosti, povezane z majhnostjo delcev.

CuO nanodelci so pri podganah povzročili hepatotoksičnost in nefrotoksičnost (Lei in sod., 2008), čeprav ni znano, ali je bila to morda posledica oksidativnega stresa v tkivih jeter in ledvic. Raziskavo strupenosti nanodelcev CuO so izvedli Gunawan in sod. (2011) in prišli do sklepa, da je vzrok toksičnosti za bakterijo *E. coli* nastanek bakrovo-proteinskega kompleksa, ki je posledica luženja  $\text{Cu}^{2+}$  iona ob prisotnosti aminokislin. Bakrov kompleks je v celicah povzročil večkratno povečanje koncentracije reaktivnih kisikovih oblik, kar je negativno vplivalo na rast bakterij. Nastali bakrovi-proteinski kompleksi so se po citotoksičnosti razlikovali od bakrovih kompleksov, ki so nastali iz enako topnih bakrovih soli. Na povečanje njegove strupenosti je vplival pH, ki je povzročil povečano topnost Cu soli in sproščanje  $\text{Cu}^{2+}$  ionov, medtem ko pH ni vplival na stopnjo strupenosti kompleksa pri CuO nanodelcih. Ker se luženje  $\text{Cu}^{2+}$  ionov ni pojavilo pri standardni obliki CuO, tudi ni bilo znakov strupenosti. Zato pripisujejo strupenost nano CuO prav nanometerski velikosti delcev in posledično spremenjenim fizikalnim lastnostim.

Fahmy in Cormier (2009) sta dokazala, da koncentracijsko odvisno CuO nanodelci povečujejo oksidativni stres in znižujejo viabilnost epitelnih celic dihalnega sistema,



medtem ko  $\text{SiO}_2$  in  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  nanodelci niso bili strupeni. Ena razlaga je, da nanodelci  $\text{CuO}$  najučinkoviteje prehajajo skozi membrane celic. Ti efekti niso bili posledica  $\text{Cu}^{2+}$  ionov, kar so dokazali s pomočjo Cu-helatorjev (desferoksamin in D-penicilamin), ki niso omilili toksičnih efektov nanodelcev  $\text{CuO}$  v celici. Izkazalo se je, da nanodelci sami povzročajo oksidativni stres zaradi svojega redoks potenciala. To je pokazalo, da ima na odziv bioloških celic največji vpliv ravno kemijska zgradba in verjetno reduktivna kapaciteta teh delcev. Prehodne kovine, kot sta  $\text{Cu}$  in  $\text{Fe}$ , lahko pripomorejo k nastanku znotrajceličnih ROS preko Fentonove reakcije. Superoksidni anion teoretično lahko reducira  $\text{Fe}^{3+}$  in  $\text{Cu}^{2+}$ , ki kasneje reagirata s  $\text{H}_2\text{O}_2$ , katerih produkt so prosti hidroksilni radikali (Stohs in Bagchi, 1995, cit. po Fahmy in Cormier, 2009). Obstaja možnost, da zaradi same površine nanodelcev  $\text{CuO}$  v celici nastaja ROS, kot npr.  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Dokazali so, da so nanodelci  $\text{CuO}$  v vodnem gojišču s pomočjo  $\text{O}_2$  in svetlobe sposobni tvoriti  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Bandara in sod., 2005, cit. po Fahmy in Cormier, 2009).  $\text{CuO}$  nanodelci lahko oksidirajo membranske proteine. Ugotovili so, da nanodelci  $\text{CuO}$  vplivajo tudi na antioksidativne encime, ki preprečujejo oksidativni stres v celici z nevtralizacijo učinkov prostih radikalov. Ni bilo zaznanih sprememb v aktivnosti superoksid dizmutaze, medtem ko so za 25 % zavrli katalazo, za 29 % zavrli delovanje glutation reduktaze in povečali aktivnost glutation peroksidaze na 150 % v primerjavi s kontrolo.

Nanodelci  $\text{CuO}$  naj bi bili v velikosti od 10 do 100 nm, v raziskavi Buffet in sod. (2011) pa so dokazali, da so v resnici veliki od 40 do 500 nm in da v morski vodi tvorijo agregate velikosti 1000 nm. Naj bi pa bil vzrok toksičnosti ravno luženje na ione in lastnosti tega iona. Prisotnost organizmov lahko vpliva na topnost delcev in njihovo ekotoksičnost.

Topnost nanodelcev  $\text{CuO}$  je odvisna od pH in prisotnosti drugih ionov. Topni  $\text{Cu}$  in nanodelce  $\text{CuO}$  so dodajali vodni leči, *Landoltia Punctata*. Rast je bila za 50 % zmanjšana pri  $0,6 \text{ mg l}^{-1}$  topnega bakra in pri  $1 \text{ mg l}^{-1}$  nanodelcev  $\text{CuO}$ , ki so v raztopino sprostiti le  $0,16 \text{ mg l}^{-1}$  topnega  $\text{Cu}$ . Opazili so zmanjšano sintezo klorofila pri rastlinah, ki so bile tretirane z  $1 \text{ mg l}^{-1}$  nanodelcev  $\text{CuO}$ , medtem ko ni bilo opaziti razlik pri rastlinah, tretiranih z  $0,2 \text{ mg l}^{-1}$  topnega  $\text{Cu}$ . Prisotnost  $\text{Cu}$  v listih, tretiranih z enako koncentracijo nanodelcev, je bila 4-krat večja (Shi in sod., 2011).

V literaturi navajajo, da so CuO nanodelci preveliki, da bi vstopili v celico. Alga *Chara corallina* izloči iz celičnega lumna delce, večje od 9 nm (Proseus in Boyes, 2005), medtem ko korenine koruze preprečujejo vstop kovinskim nanodelcem, večjim od 6,6 nm (Asli in Neuman, 2009).

Razliko v strupenosti kovinskih oksidov v standardni in nano obliki je preučil Karlsson in sod. (2009). Nanodelci CuO povzročijo celično smrt, poškodujejo mitohondrije in poškodujejo DNA na epitelnih celicah človeškega dihalnega sistema. Raziskava je pokazala, da so nanodelci CuO veliko bolj strupeni od CuO v standardni obliki, mehanizem njihove toksičnosti pa naj bi bili poškodbe mitohondrijev in DNA ter povečevanje koncentracije ROS v celici. Vzroka strupenosti niso pripisali luženju Cu<sup>2+</sup> ionov, ampak samim fizikalnim lastnostim nanodelcev (Karlsson in sod., 2008).

Na rast bakterij standardni CuO nima vpliva, tako ne v organski kot anorganski prsti, ter ne vpliva na pH raztopin. Ugotovili so tudi, da je najbolj strupen CuSO<sub>4</sub>, saj z SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ioni zakisli prst, sledi mu nano CuO, najmanj strupen pa je standardni CuO (Rousk in sod., 2012).

Na primeru mikroalge (*Pseudokirchneriella subcapitata*) je bilo ugotovljeno, da so nanodelci CuO veliko bolj strupeni kot pa standardna oblika CuO (Aruoja in sod., 2009). Tudi dostopnost Cu iz standardne oblike je bila veliko manjša, saj je bil Cu iz nanodelcev CuO 141-krat bolj dostopen. Strupenostni efekti obeh oblik CuO so v tem primeru posledica dostopnosti bakrovih ionov (Aruoja in sod., 2009).

Blinova in sod. (2010) trdijo, da je topnost nanodelcev CuO 40-krat večja kot topnost standardne oblike CuO, saj se iz nano oblike CuO odluži približno 12 % Cu, od standardne oblike CuO pa 0,3 % Cu. Od tega je odvisna tudi strupenost. Shi in sod. (2011) pa navajajo, da nanodelci CuO sprostijo 14-krat več Cu kot standardna oblika CuO. V dveh dneh se sprostijo 80 % topnega Cu iz nanodelcev CuO. Topnost je pH odvisna. Prisotnost hranilne raztopine tudi povečuje topljenje Cu<sup>2+</sup>. V polovično redčeni Hoglandovi raztopini 10 mg l<sup>-1</sup> nano CuO sprostijo 6,4 mg l<sup>-1</sup> topnega Cu pri pH 3,2 mg l<sup>-1</sup>, pri pH 7 pa le 1,1 mg

$\text{l}^{-1}$ . V navadni vodi se iz  $10 \text{ mg l}^{-1}$  nanodelcev CuO sprosti  $3,6$  in  $0,7 \text{ mg l}^{-1}$  Cu pri pH 3,2 in 7. Rezultati raziskave so pokazali, da CuO nanodelci zavirajo rast vodne leče, presenetljivo 3- do 4-krat bolj kot topni Cu, ki bi ga pričakovali glede na raziskave, koliko se ga sprosti (Shi in sod., 2011).

Na primeru bakterije *Vibrio fischeri* so dokazali, da za strupenostni efekt ni nujen vstop kovinskih oksidov v celico, ampak je dovolj, da povzročijo spremembe v mikrookolju blizu kontaktnega mesta med organizmom in delcem. Te spremembe lahko vplivajo na topnost kovin ali pa vodijo do nastanka prostih kisikovih radikalov, ki lahko poškodujejo celično membrano (Heinlaan in sod., 2008). Raziskave so bile narejene še na kvasovkah, kjer se je izkazalo, da CuO vpliva na njihovo rast, in na migetalkarju *Tetrahymena thermophila*. Tudi pri teh raziskavah so bili nanodelci CuO bolj strupeni kot standardna oblika (Kasemets in sod., 2009; Mortimer in sod., 2010).

Najnovejšo raziskavo na nanodelcih CuO so naredili Dimpka in sod. (2012) in prišli do ugotovitve, da nanodelci CuO očitno poslabšajo rast korenin ter poganjka, ki je pri standardni obliki CuO manj opazna. V rastlinah, tretiranih z nanodelci, so opazili povečano lipidno peroksidacijo in oksidacijo glutationa, višjo peroksidazno in katalitično aktivnost v koreninah ter zmanjšano koncentracijo klorofila v poganjkih. To so dokazi, da je vzrok strupenosti nanodelcev na rastline produkcija kisikovih reaktivnih spojin v celici. Problem je kopičenje Cu in Zn v telesu rastline, saj se tako nanodelci vključujejo v prehranjevalno verigo. Tudi Wang in sod. (2012) trdijo, da se je dolžina in površina korenine, tretirane z nanodelci CuO, zmanjšala v primerjavi s koreninami kontrole, tretiranimi s standardno obliko CuO in  $\text{Cu}^{2+}$  ionom. Dokazali so, da se CuO nanodelci po ksilemu prenašajo iz korenin v poganjke. Hipotezo, da se prenašajo v obliki  $\text{Cu}^{2+}$  ionov, so ovrgli, saj so v tkivih listov koruze s transmisijskim elektronskim mikroskopom identificirali nanodelce CuO. Obenem pa so ugotovili, da se nanodelci CuO lahko transportirajo iz poganjkov v korenine koruze, saj so opazili črne agregate na koreninah, ki niso bile direktno izpostavljene nanodelcem CuO. Predvideli so, da se nanodelci povežejo z ogljikovimi hidrati v času shranjevanja fotosintatov.

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 PRIPRAVA POSKUSA

Za testno rastlino smo izbrali sončnico (*Helianthus annuus L.*), saj hitro raste na hidroponiki in proizvede veliko biomase, zaradi česar se uporablja za fitoremediacijo. Gre za enoletnico iz družine nebinovk (*Asteraceae*). Ima močno steblo in spiralno nameščene široke, jajčaste, hrapave liste s tremi dobro vidnimi žilami. Od 1000 do 2000 posameznih cvetov je združenih v socvetje, imenovano košek, ki je običajno rumene barve. Iz semen pridelujejo sončnično olje, ki se uporablja pri kuhanju, izdelavi margarine in biodizla. Ostali deli rastline se uporabljajo za krmo. Ker stebela vsebujejo veliko vlaken, bi se lahko uporabljala v papirni industriji za pridelavo papirja. Sončnice so primerne tudi za bioremediacijo, saj lahko v tkivih kopičijo velike koncentracije kovin, ne da bi prišlo do poškodb fotosinteznega aparata (KrishnaRaj in sod., 2006). Sončnice so gojili v Ohio, Novi Mehiki in Kolumbiji za preučevanje privzema, selektivnosti in translokacije težkih kovin Cd, Ni in Cr (Turgut in sod., 2005).

Sončnico so uporabili tudi Jiang in sod. (2000) v svojem poskusu, kjer so preučevali vpliv  $\text{Cu}^{2+}$  na rast korenin, celično delitev in celično jedro. Ugotovili so, da sončnica kopiči visoke koncentracije Cu, saj je imela rastlina, izpostavljena raztopini z  $10^{-3}$  M Cu, 25-krat več Cu kot kontrola.

Sto semen sončnic smo posejali v substrat Agra-vermikulit (RHP). Po enem tednu rasti smo kalice prestavili na hidroponiko, kjer so rasle v hranilni raztopini z naslednjo sestavo (Machils in Torrey, 1956):

- 3,1 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,
- 0,6 mM  $\text{MgSO}_4$ ,
- 0,1 mM FeNaEDTA,
- 0,3 mM  $\text{MgCl}_2$ ,
- 0,6 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,
- 0,6 mM KCl,
- 3,1 mM  $\text{KNO}_3$ ,
- 0,6 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,
- 0,6 mM  $\text{NaNO}_3$ ,
- 0,6 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,
- 0,6 mM  $\text{CaCl}_2$ ,
- 800 ml destilirane vode.

V vsako čašo, ki je bila napolnjena z 800 ml hranilne raztopine, smo položili stiroporni plovec s tremi enako velikimi kalicami. Rastline smo gojili v rastnih komorah pri temperaturi 23 °C, 40 % relativni zračni vlagi in pod neonsko svetlobo s 16-urnim svetlobnim ciklom ter vsako čašo preprihovali z zrakom po cevki, ki je bila povezana z zračno črpalko. Raztopino smo vsak dan mešali, vodo, ki je izhlapela, pa smo nadomeščali z destilirano vodo, da bi preprečili koncentriranje hranilnih snovi v raztopini. Hranilno raztopino smo menjali 1-krat tedensko. Skupaj smo imeli 22 čaš. Prvih 7 dni so rastline rastle samo na hranilni raztopini, nato pa smo pričeli s tretiranjem, in sicer v dve čaši nismo dodali bakrovega oksida (kontrola). V ostale čaše smo dodali bakrov (II) oksid (CuO) v nano (Aldrich chemistry, ZDA) ali pa v standardni kemijski obliki (Sigma Aldrich, Nemčija). Koncentracije CuO v raztopinah so bile 1 mg l<sup>-1</sup>, 10 mg l<sup>-1</sup>, 50 mg l<sup>-1</sup>, 100 mg l<sup>-1</sup> in 150 mg l<sup>-1</sup>. Vsako koncentracijo smo pripravili v dveh paralelkah (imeli smo po dve čaši za vsak tretma). Po štirih tednih smo s tretiranjem zaključili, z izjemo določanja mitotskega indeksa in lipidne peroksidacije, ko smo meritve izvedli že po dveh dnevih tretiranja.



Slika 3: Rastline v rastni komori.

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

- Co in Mn ( $\leq 0,001$ ),
- V HCl netopne snovi in totalni N ( $\leq 0,02$  %),
- SO<sub>4</sub> ( $\leq 0,03$ ),
- Cl, Cr, K, Ni in Zn ( $\leq 0,05$ ),

- Cd in Mg ( $\leq 0,01$ ),
- Na, Fe in Pb ( $\leq 0,05$ ).

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



Slika 4: Levo - 100 mg CuO v nano obliki, desno - 100 mg CuO v standardni kemijski obliki.

## 3.2 KARAKTERIZACIJA BAKROVEGA OKSIDA V NANO IN STANDARDNI KEMIJSKI OBLIKI

### 3.2.1 Dokazovanje bakrovega iona v raztopini CuO

Koncentracije bakrovega ( $\text{Cu}^{2+}$ ) iona v hranilni raztopini smo določili fotometrično. Umeritveno krivuljo smo pripravili tako, da smo 0,05 M bakrov (II) sulfat ( $\text{CuSO}_4$ ) redčili v testnih epruveh z destilirano vodo tako, da smo dobili 7 različnih koncentracij (1, 5, 10, 50, 100, 150 in  $500 \text{ mg l}^{-1}$ ). Iz vsake epruvete smo nato vzeli po 5 ml vzorca in dodali po dve kapljici koncentriranega amonijaka ( $\text{NH}_3$ ). Na spektrofotometru 8452A (HP-Hewlett Packard) smo izmerili absorpcijo pri 600 nm in določili vsebnost  $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{2+}$  ionov v vsakem vzorcu po enačbi 1 (Prenesti, 2002).

$$c(\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{2+}) = V(\text{CuSO}_4)/10 \text{ ml} \times c(\text{CuSO}_4) \quad \dots (1)$$

c = koncentracija,

V = volumen.

Za umeritev spektrofotometra smo uporabili destilirano vodo z dodanim amonijakom. Iz povprečnih vrednosti dobljenih absorpcij smo za vsak vzorec izračunali spektralno prepustnost ali transmitanco (T) po enačbi 2.

$$T = 10^{-A_{600}} \quad \dots (2)$$

Naše testne suspenzije so vsebovale CuO v nano in standardni velikosti. Koncentracije CuO so bile 1, 10, 50, 100 in 150 mg l<sup>-1</sup>. Ko smo suspenzije pripravili, smo jih prefiltrirali skozi filtrirni papir (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Nemčija) z velikostjo por 0,45 µm. Vzeli smo po 5 ml vzorca iz vsake suspenzije. Vsakemu vzorcu smo dodali po dve kapljici koncentriranega amonijaka in izmerili absorpcijo pri 600 nm. Iz povprečnih vrednosti dobljenih absorpcij smo izračunali spektralno prepustnost po enačbi 2, ki smo jo nato primerjali s spektralno prepustnostjo raztopin CuSO<sub>4</sub>. Vsebnost Cu<sup>2+</sup> iona, je bila enaka vsebnosti Cu(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub><sup>2+</sup> v raztopini CuSO<sub>4</sub> z enako spektralno prepustnostjo.

### **3.2.2 Merjenje prevodnosti suspenzij standardnega in nano CuO**

V bidestilirano vodo smo zamešali dve osnovni suspenziji, prvo s 150 mg l<sup>-1</sup> standardnega CuO in drugo s 150 mg l<sup>-1</sup> nano CuO, ter za kontrolo vzeli samo bidestilirano vodo. Suspenzijam smo umerili pH na 4,5, nato pa mešali z magnetnim mešalom 545 MMH (Tehtnica, Slovenija) na 50 °C štiri ure. Obe osnovni suspenziji (standardni in nano CuO) smo redčili na 5 koncentracij (1, 10, 50, 100, 150 mg l<sup>-1</sup>) volumna 10 ml in jih centrifugirali 1 uro na 20.000 obratov/minuto v centrifugi 3K30 (Sigma, Nemčija). Supernatant smo odpipetirali v epruveto in izmerili prevodnost pri temperaturi 22 °C s konduktometrom Seven Multi (Mettler Toledo).

### **3.2.3 Določanje mineralne sestave vodnih raztopin različnih koncentracij standardnega in nano CuO z metodo rentgenske fluorescenčne spektrometrije s popolnim odbojem (TXRF)**

Meritve koncentracij elementov v različnih koncentracijskih raztopinah standardnega in nano CuO so bile opravljene na Institutu Jožef Stefan, na Odseku za fiziko nizkih in

srednjih energij (F2) s pomočjo rentgensko fluorescenčne spektrometrije s popolnim odbojem (TXRF).

### 3.2.3.1 Rentgensko fluorescenčna spektrometrija s popolnim odbojem (TXRF)

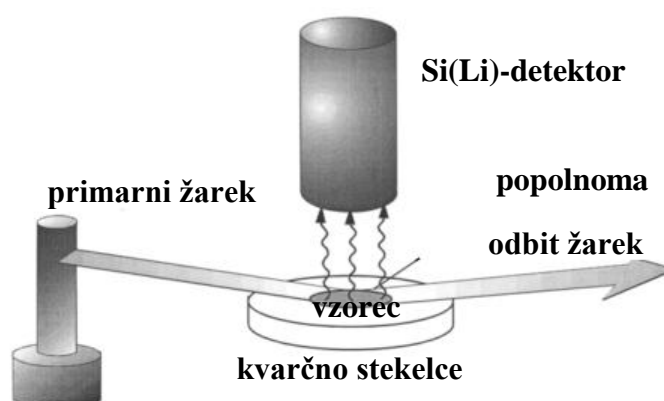
Rentgensko fluorescenčna spektrometrija s popolnim odbojem (TXRF) je izredno občutljiva multielementarna tehnika za analizo elementov v sledih v majhnih vzorcih (nekaj  $\mu\text{g}$ ), ki se nanesejo na gladko ravno podlago iz primerne snovi (običajno iz kremena oz. silicija), imenovano reflektor. Močno fokusiran rentgenski curek pada na optično gladko podlago pod kotom, ki je manjši od kritičnega kota za popolni odboj ( $\alpha \leq 1,8$  mrad oz.  $\alpha < 0,1^\circ$ ). To pri večini snovi pomeni, da je vpadni rentgenski curek skoraj vzporeden s površino reflektorja (Slika 5, vir: Klockenkämper in Bohlem, 2001: 2006). Če vpadni kot preseže kritičnega, pogoj popolnega odboja ni več izpolnjen. Reflektivnost naenkrat pade in rentgenski žarki začno prodirati v snov (Kump, 1994). Popolni odboj pomeni, da se žarek odbije z intenziteto skoraj 100 %, za razliko od navadne rentgensko fluorescenčne spektrometrije (XRF), kjer je odboj manjši od 0,1 % (Klockenkämper in Bohlem, 2001), zato se v rentgenskem spektru močno zmanjša ozadje zaradi sipanja na podlagi in je občutljivost tehnike precej boljša kot pri standardni rentgenski fluorescenci.

Osnova metode je enaka kot pri standardni rentgenski fluorescenčni spektroskopiji. Temelji na vzbujanju atomov oz. ionizaciji le-teh v K in L lupini s pomočjo rentgenske svetlobe ter nadaljnji relaksaciji vzbujenega oz. ionizirajočega atoma. Pri tem prihaja do fotoefekta oz. do interakcije med fotonom in vezanim elektronom v atomu, presežek energije se izseva kot karakteristični foton, ki služi za določanje tako kvalitativne kot tudi kvantitativne sestave vzorcev.

Eksperimentalni sistem na IJS je sestavljen iz rentgenske cevi z Mo-anodo (AEG, Nemčija) kot izvora rentgenskega sevanja, totalno-refleksijskega modula, ki omogoča pravilno oblikovanje in fokusiranje žarkovne linije rentgenskih žarkov, in visoko ločljivostnega rentgenskega spektrometra s Si-(Li) detektorjem (Princeton Gamma Tech Co, ZDA, FWHM). Za napajanje rentgenske cevi se uporablja generator Philips PW-



1010/80 z močjo 1000 W, z možnostjo nastavitve napetosti med 10 in 54 kV in toka med 6 in 36 mA. Za vzbujanje vzorca uporabljajo Mo difrakcijsko rentgensko cev (Rich. Seifert & Co.) s finim fokusom  $0,4 \times 8 \text{ mm}^2$ , ki se napaja z napetostjo 40 kV (Nečemer, 1995). Visokoločljivostni rentgenski spektrometer s polprevodniškim Si-(Li) detektorjem sestavljajo še visokonapetostni izvor, ojačevalnik, analogno-digitalni pretvornik (ADC) in večkratni analizator. Vse enote so združene v integriranem signalnem procesorju M 1520 in MCA računalniški kartici S100 (Canberra, ZDA) (Kump, 1994; Pongrac, 2004).



Slika 5: Shematski prikaz principa delovanja TXRF metode (vir: Klockenkämper in Bohlem, 2001: 2006).

### 3.2.3.2 Priprava vzorcev

Vzeli smo supernatant iz opisanega postopka v poglavju 1.2.2. Dva ml supernatanta smo sklopili z 20  $\mu\text{l}$  galijevega standarda in 10  $\mu\text{l}$  raztopine nanесли na sredino čistega TXRF reflektorja iz kvarčnega stekla. Ko se je kapljica posušila, smo na isto mesto ponovno kanili 10  $\mu\text{l}$  raztopine, silicijeva stekelca dali v eksikator in počakali, da so se posušila.

### 3.2.3.3 Potek meritev

Curek rentgenskih žarkov smo usmerili na reflektor z vzorcem pod kotom, manjšim od kritičnega kota za totalni odboj, detektor smo približali reflektorju na manj kot 1 mm razdalje. V vzorec smo že ob pripravi dodali znano količino internega standarda, ki je bil v našem primeru galij. Z uporabo ustreznega računalniškega programa smo nato izračunali

koncentracije ostalih elementov glede na interni standard. Dobljene spektre smo analizirali s programom AXIL, kvantitativno analizo spektrov pa smo naredili s programom QAES (Pongrac, 2004).

### 3.3 DOLOČANJE KONCENTRACIJ ELEMENTOV V POGANJKIH IN KORENINAH SONČNIC (TXRF) (GLEJ POGlavJE 3.2.3.)

Meritve koncentracij elementov v poganjkih in koreninah sončnic so bile opravljene na Institutu Jožef Stefan, na Odseku za fiziko nizkih in srednjih energij (F2), z uporabo rentgenske fluorescenčne spektrometrije s popolnim odbojem (TXRF).

#### 3.3.1 Priprava vzorca

Liofilizirane vzorce korenin in poganjkov smo s tekočim dušikom v terilnici uprašili in v epruvete zatehtali po 100 mg vzorca korenin in poganjkov. V vsako epruveto z vzorcem smo odpipetirali po 5 ml kislinske mešanice za mineralizacijo, ki smo jo pripravili iz koncentrirane  $\text{HNO}_3$  in  $\text{HClO}_4$  (Merck) v razmerju 7:1. Vzorce smo čez noč pustili v digestoriju, da se je rastlinski material dobro prepojil z mešanico kislin. Naslednji dan smo pričeli z mineralizacijo, ki je potekala v digestoriju. Epruvete so bile nameščene v termoblok, ki smo ga postopno segrevali do  $150\text{ }^\circ\text{C}$ , dokler kislinska mešanica ni popolnoma izparela. Postopek je trajal približno teden dni. Paziti smo morali, da kislina ne prekorači roba epruvete. Po končani mineralizaciji smo epruvete z vzorcem pokrili in jih hranili v hladilniku. Tik pred merjenjem smo vzorce z razklopljenim materialom raztopili v 5 ml 0,2 %  $\text{HNO}_3$  in jih premešali na vorteksu EV-100 (Tehtnica, Slovenija). Iz vsake epruvete smo odpipetirali po 1 ml vzorca in ga prenesli v novo epruveto. V novo epruveto z vzorcem smo dodali po 10  $\mu\text{l}$  galija (interni standard) in zvorteksirali. Za natančno analizo je bilo zelo pomembno, da je bil interni standard enakomerno pomešan z vzorcem, tako da je bil vzorec homogen. Odpipetirali smo 10  $\mu\text{l}$  mešanice in jo nanegli na sredino kvarčnega stekelca. Ko se je kapljica posušila, smo na isto mesto ponovno nanegli 10  $\mu\text{l}$  mešanice. Stekelce smo nato prestavili v eksikator in počakali, da se je vzorec na njem posušil.

Ker se posamezno kvarčno stekelce uporabi večkrat, smo ga pred nanosom svežega vzorca očistili. Najprej smo stekelca sprali z detergentom (Kemex) pod tekočo vodo, nato pa še z 0,2 %  $\text{HNO}_3$ . Sledilo je spiranje z destilirano vodo in acetonom. Preden smo nanje nanegli vzorce, smo jih obrisali do suhega.

### 3.4 MERJENJE LIPIDNE PEROKSIDACIJE

Količino lipida MDA (malondialdehid), ki je merilo za lipidno peroksidacijo, smo v vzorcu določili spektrofotometrično po metodi TBA, ki temelji na kislinski razgradnji lipidnih hidroperoksidov v MDA. Ta reagira s tiobarbiturno kislino (TBA), da nastane rdeč produkt, kateremu izmerimo absorbanco pri valovnih dolžinah 532 nm in 600 nm (Ortega – Villasante in sod., 2005).

#### 3.4.1 Priprava rastlinskega materiala in potek meritev

Za analizo lipidne peroksidacije smo rastline ponovno vzgojili po postopku, opisanem v poglavju 1.2.1, le da smo imeli le 5 tretmajev – poleg kontrole še CuO v standardni in nano obliki v koncentracijah  $10 \text{ mg l}^{-1}$  in  $100 \text{ mg l}^{-1}$ . Skupaj smo imeli deset čaš, za vsak tretma po dve, saj smo meritve lipidne oksidacije izvedli dvakrat, pri dveh dneh tretiranih rastlinah in pri štirih tednih tretiranih rastlinah. Rastline smo ločili na korenine in poganjke. Nadaljnji postopek je prirejen po protokolu Heath in Packer (1968). Svež rastlinski material smo strli s tekočim dušikom, v označene epice zatehtali po 100 mg zmrznjenega vzorca in jih shranili na  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ . Vzorcem smo nato dodali 2 ml 5 % trikloroocetne kisline ter jih zvorteksirali. Nato smo vzorce centrifugirali 10 minut pri  $12000 \text{ g}$  in  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  v centrifugi 3K30 (Sigma, Nemčija). Iz vsake epice smo odpipetirali dvakrat po 0,9 ml supernatanta v novo 2 ml epico. Vsaki smo dodali 0,9 ml raztopine 0,5 % TBA 20 % trikloroocetni kislini (TCA). Pokrovčke epic smo preluknjali in jih inkubirali 30 minut v vodni kopeli na  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ . Po končani inkubaciji smo epice prenesli na led in jih centrifugirali 1 minuto na  $12000 \text{ g}$  pri  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Takoj smo s spektrofotometrom 8452A (HP-Hewlett Packard) ter računalniškim programom UV Probe 2.32 (Chimatzu corporation) izmerili absorbanco pri valovnih dolžinah 532 nm in 600 nm. Uporabili smo PS kivete (Brand, Nemčija) za enkratno uporabo in jih po meritvi zavrgli. Za umeritev

spektrofotometra smo vzeli 0,9 ml 5 % TCA z 0,9 ml 0,5 % TBA v 20 % TCA. S pomočjo predhodno narejene umeritvene krivulje, smo iz dobljene razlike absorpcij (enačba 3) izračunali koncentracijo lipida MDA. Da smo dobili koncentracijo MDA lipida v vzorcu, smo morali preračunati dobljen rezultat na svežo maso vzorca (enačba 4).

$$(A(532\text{ nm}) - A(600\text{ nm}))/155 \cdot 1000 \quad \dots (3)$$

A=absorbanca

$$\text{Koncentracija MDA (nM)/0,1 g} \quad \dots (4)$$

#### 3.4.1.1 Priprava 5 % TCA

Zatehtali smo 10 g trikloroacetne kisline (TCA) -  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  (Merck, Nemčija) ter dolili destilirano vodo do 200 ml. Čašo z raztopino smo hranili na ledu.

#### 3.4.1.2 Priprava 0,5 % TBA v 20 % TCA

V 150 ml destilirane vode smo raztopili 30 g TCA (Merck, Nemčija) in tako dobili 20 % TCA. Raztopini smo dodali 0,75 g tiobarbiturne kisline (TBA) -  $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$  (Fluka, Nemčija), ki smo jo raztopili s pomočjo magnetnega mešala. Tako smo dobili raztopino 0,5 % TBA v 20 % TCA, ki smo jo hranili na ledu.

### 3.5 PRIPRAVA PREPARATOV ZA DOLOČANJE MITOTSKEGA INDEKSA

Mitotski indeks smo določili pri 5 tretmajih: kontroli, standardni  $\text{CuO}$   $10\text{ mg l}^{-1}$ , standardni  $\text{CuO}$   $100\text{ mg l}^{-1}$ , nano  $\text{CuO}$   $10\text{ mg l}^{-1}$  ter nano  $\text{CuO}$   $100\text{ mg l}^{-1}$ . Rastline so bile tretirane samo dva dni. 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). Pri vsakem tretmaju smo odrezali korenine in jih sprali z destilirano vodo ter osušili s papirnato brisačko. Ločili smo 1 cm dolge odrezke, saj smo potrebovali le

koreninske vršičke. Odrezke smo dali v označene steklene petrijevke s 5M klorovodikovo kislino (HCl) sobne temperature in jih pustili 30 minut, da je potekla hidroliza. S pipeto smo odstranili HCl, odrezke popivnali z brisačko in jih dali v ledeno mrzlo destilirano vodo, da smo ustavili hidrolizo. Po 5 minutah smo vodo odpipetirali in dodali Schiffov reagent, ki se veže na DNA. Ko so se odrezki obarvali vijolično, približno po 40 minutah, smo odpipetirali reagent in ga dali v odlagalnik za strupene odpadke. Sledilo je razbarvanje reagenta, ki ni vezan, s SO<sub>2</sub> vodo za 10 minut. Vzorce smo zopet sprali z destilirano vodo sobne temperature. Za največ 10 minut smo dodali 45 % očetno kislino, ki zmešča korenine. Odrezali smo vršiček z meristemom, ki je temneje obarvan (1-3 mm), in pripravili mečkani preparat tako, da smo vršiček položili na objektno steklo, nanj kanili kapljico 45 % očetne kisline in ga pokrili s krovnim steklom. Nato smo s preparirno iglo mečkali preparat od sredine navzven v vseh smereh. Na koncu smo preparat prekrili s filter papirjem in pritisnili s palcem tako, da smo osušili višek očetne kisline. Da bi bil preparat trajen, smo stekelca dali na suhi led (CO<sub>2</sub> v trdnem stanju) za 4 minute, da je tkivo primrznilo na objektno steklo in z britvico odstranili krovno steklo. Preparate smo nato 3 minute dehidrirali v 96 % etanolu. Čez noč smo jih v temi sušili v digestoriju, naslednji dan pa smo na preparate kanili kapljico sredstva DPX (Fisons, VB) in pokrili s krovnimi stekli. Pred pregledovanjem preparatov so se le-ti sušili dva do tri dni v temi pri sobni temperaturi.

### **3.5.1 Priprava Schiffovega reagenta**

4 g pararosanilnega klorida (Sigma, ZDA) smo raztopili v 300 ml vrele destilirane vode, premešali in pustili, da se ohladi na 50 °C. Raztopino smo nato vakuumsko prefiltrirali preko dveh filtrov s steklenimi vlakni (GF/C Whatman, ZDA), dodali 120 ml 1M HCl in 12 g kalijevega metabisulfit (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) (Merck, Nemčija). Raztopino smo pustili stati čez noč v temi pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo dodali 4 g aktivnega oglja za razbarvanje (Sigma, ZDA) in pomešali. Raztopino smo nato vakuumsko prefiltrirali preko filtra iz steklenih vlaken v suho steklenico. Pripravljen reagent smo shranili v temi na 4 °C v hladilniku. Tako shranjen reagent je uporaben tri do štiri mesece.

### 3.5.1.1 Priprava SO<sub>2</sub> vode

SO<sub>2</sub> vodo vedno pripravimo svežo. Za pripravo 0,5 l SO<sub>2</sub> vode smo zmešali 495 ml destilirane vode in 5 ml 5 M HCl ter dodali 2,5 g K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (Merck, Nemčija).

### 3.5.2 Analiza mikroskopskih preparatov

Preparate smo opazovali s svetlobnim mikroskopom Axioskop 2 MOT (Carl Zeiss) pri 400- in 1000-kratni povečavi. Na tretma smo pregledali 5 preparatov ter na vsakem vsaj 1000 jeder. Šteli in zapisovali smo si število interfaznih jeder ter mitotskih jeder, pri katerih smo si zabeležili še fazo mitoze. Iz dobljenih podatkov smo izračunali delež delečih se celic – mitotski indeks (MI) po enačbi 5.

$$MI (\%) = (n * 100) / N \quad \dots (5)$$

MI (%) = mitotski indeks izražen v odstotkih,

N = število delečih se celic, ki smo ga izračunali kot vsoto vseh celic v mitozi,

n = število vseh pregledanih jeder v koreninskem vršičku.

## 3.6 PRIPRAVA RASTLINSKEGA MATERIALA ZA MERITVE MIKRO-PIXE TER SINHROTRONSKE MERITVE NA ŽARKOVNIH LINIJAH TWIN-MIC IN SISSI

Po štirih tednih tretiranja smo korenine sprali z destilirano vodo ter rastlinam odrezali koščke korenin in koreninske vršičke. Zavili smo jih v aluminijasto folijo in zamrznili v termobloku, najprej v tekočem propanu s temperaturo tališča -187,7 °C, ter jih po 1 minuti prestavili v tekoči dušik s temperaturo tališča -196 °C. Po nekaj minutah smo jih prestavili v rotacijski mikrokriotom CM 3050 (Leica, Nemčija), kjer je bila temperatura komore -32 °C. Na bloke smo nanegli zamrzovalni vklopni medij Jung tissue freezing medium (Leica, Nemčija) ter hitro, preden se je medij strdil, nanj postavili pravilno orientiran vzorec. Pri stebli in korenini smo želeli dobiti prečni prerez, pri koreninskem vršičku pa vzdolžen prerez preko meristema. Nato smo blok z vzorcem čvrsto z vijakom vstavili v vpenjalo. Z novim, nepoškodovanim jeklenim nožem (Leica, Nemčija) smo z rezalno roko serijsko

rezali zamrzovalni medij, dokler nismo prišli do vzorca, ki se giblje vertikalno vzdolž noža kriotoma in se pomika naprej za nastavljeno debelino po vsakem odrezu. Debelino reza smo nastavili na 20-25  $\mu\text{m}$  za meritve na žarkovni liniji Twin-Mic in SISSI ter na 30  $\mu\text{m}$  za vzdolžni prerez korenine vršička in 60  $\mu\text{m}$  za prečni prerez korenine za meritve z mikro-PIXE. Pod lupo MZ6 (Leica, Nemčija) smo pregledali nastalo rezino in samo cele ter nepoškodovane rezine previdno prenesli s fino zakrivljeno pinceto v ohlajene, označene kovinske lončke ter jih pokrili s kovinskim pokrovčkom. Ko smo z rezanjem zaključili, smo komplet lončkov prenesli v jekleno posodo, dolili tekoči dušik in posodo čim hitreje prenesli v liofilizer. Po dveh dneh so bili vzorci popolnoma suhi. Rezine smo previdno preložili v steklene petrijevke, jih pokrili z objektnimi stekli in tako preprečili zvijanje rezin ter jih shranili v eksikator. Za meritve smo vsakič pregledali vse rezine pod lupo MZ8 (Leica, Nemčija) in izbrali najlepše rezine, ki smo jih nato prestavili v plastične petrijevke, pokrili z objektnimi stekli ter zapakirali v stiroporasto škatlo s silika gelom, tako da so bile nepremične. Pred meritvijo smo nato rezine namestili na ustrezne nosilce, kot je opisano v nadaljevanju.

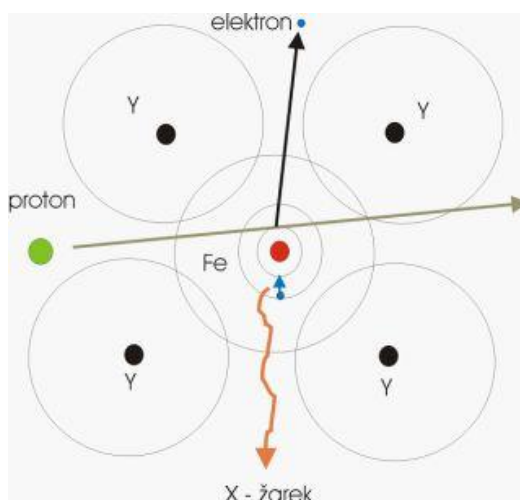
### 3.7 LOKALIZACIJA ELEMENTOV V KORENINAH SONČNIC Z METODO PROTONSKO INDUCIRANE EMISIJE RENTGENSKIH ŽARKOV ALI MIKRO-PIXE (PROTON INDUCED X-RAY EMISSION)

Porazdelitev elementov v koreninah sončnice smo najprej določili z metodo mikro-PIXE na ionskem pospeševalniku »Tandentron« v Mikroanalitskem centru Odseka za fiziko nizkih in srednjih energij (F2) Instituta Jožef Stefan. Meritve mikro-PIXE smo izvedli na merilni postaji z ionskim mikrožarkom.

#### 3.7.1 Opis metode mikro-PIXE

Ionski mikrožarek je naprava, s katero je mogoče meriti elementne porazdelitve v snoveh z lateralno ločljivostjo enega mikrometra. Zaradi posebnih lastnosti je protonski žarek zelo koristno orodje pri karakterizaciji mikroskopskih struktur v snovi. Z ionskim mikrožarkom običajno merimo elementne mape s tehniko Protonsko vzbujenih rentgenskih žarkov (PIXE). Metoda je nedestruktivna in natančna, saj omogoča vzporedno detekcijo skoraj

vseh elementov periodnega sistema (težjih od natrija). Je dokaj hitra in občutljiva, saj določa vsebnosti nekaterih elementov tudi takrat, ko nastopajo koncentracije pod  $10^{-6}$  delcev (ppm). Prav zaradi teh lastnosti je metoda uporabna v okoljskih raziskavah, analizah materialov, arheometriji, medicini, biologiji, geologiji. Za analizo elementov v bioloških tkivih je zelo pomembna priprava vzorcev, saj med pripravo ne sme priti do prerazporejanja elementov. Najprimernejša je kriofiksacija hidriranih (liofiliziranih) vzorcev, brez uporabe kemičnih fiksativov in kriosubstituentov, saj le-ti vplivajo na porazdeljevanje določenih elementov, pa tudi na končne izmerjene koncentracije, saj med postopkom fiksacije lahko prihaja do spiranja elementov (Vogel-Mikuš in sod. 2009).



Slika 6: Shematski potek dogajanja pri meritvi mikro-PIXE.

(vir: Microanalytical centre – MIC, Environment, 3.4.2012)

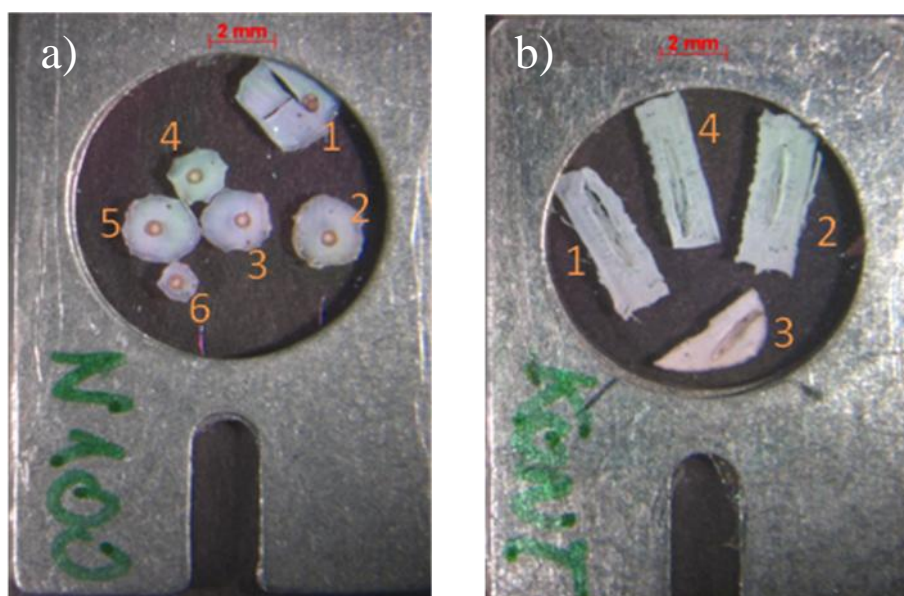
Tudi metoda mikro-PIXE temelji na principu rentgenske fluorescence, le da tu atome vzbujamo s protoni preko elektromagnetne ali coloumske interakcije, kjer pospešeni protoni izbijejo elektrone iz notranjih lupin atoma (Small, 1993, Maenhaut in Malmqvist, 1993, cit. po Vogel-Mikuš, 2006). Ko je atom vzbujen, je nestabilen in z viškom energije, ker mu na eni lupini manjka elektron. Vrzel v elektronski lupini se nato lahko zapolni z elektronom iz manj vezanega stanja v procesu relaksacije. Razlika v energiji pri prehodu elektrona med stanjema se lahko izseva kot foton rentgenske svetlobe (Slika 6). Ker ima vsak element različne vezavne energije za posamezna stanja elektronov v lupinah (K, L, M), se pri procesu rentgenske fluorescence izsevajo za vsak element karakteristični



rentgenski žarki, na podlagi katerih ločimo posamezne elemente med seboj. Za analizo elementov v vzorcu je potrebno meriti spekter fluorescenčne rentgenske svetlobe, ki smo jo vzbudili v vzorcu. Za ta namen uporabljamo rentgenske spektrometre, ki merijo energijo in število rentgenskih žarkov, torej energijsko porazdelitev fluorescenčne rentgenske svetlobe. Osnovni del rentgenskega spektrometra je detektor, za katerega je važno, da loči po energiji karakteristične rentgenske žarke sosednjih elementov v periodnem sistemu.

### 3.7.1.1 Priprava vzorca

Pri mikro-PIXE smo uporabili prečne prereze korenin debeline 60  $\mu\text{m}$  ter vzdolžne prereze koreninskih vršičkov debeline 30  $\mu\text{m}$ . Posamezne rezine smo namestili na aluminijaste nosilce med dva tanka sloja pioloformske folije (Vogel-Mikuš in sod., 2009). Z vijakom in matico smo nosilca dobro stisnili skupaj in po robu zalepili z mešanico lepil Araldite resin in Araldite hardener (Rapid, Anglija) ter čez noč sušili v eksikatorju. Pripravljene vzorce smo slikali pod lupo Stemi SV11 (Carl Zeiss) in mikroskopom Axioskop 2 MOT.



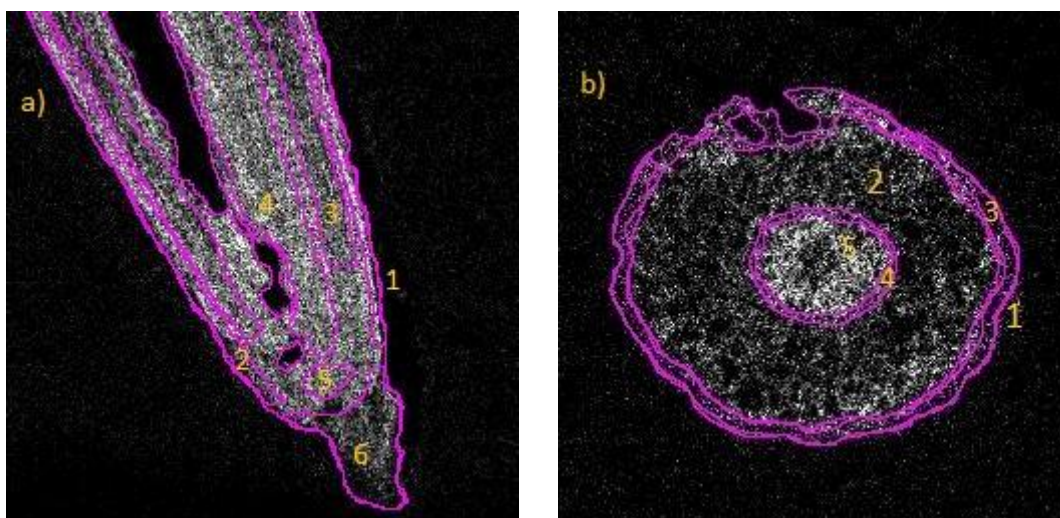
Slika 7: Aluminijasta nosilca z mikrorezinami položenimi med dve foliji pioloforma za meritve mikro-PIXE. (a) prečni prerezi korenine tretmaja nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup>, (b) vzdolžni prerezi koreninskega vršička kontrole.

### 3.7.1.2 Potek meritev

Pri metodi mikro-PIXE rastrsko pregledujemo izbrano polje vzorca. Pri energiji protonov 2 MeV je največja pregledna površina  $2,5 \times 2,5 \text{ mm}^2$ , pri energiji 3 MeV pa  $2 \times 2 \text{ mm}^2$ . Pri meritvah smo uporabili ionski tok 400 pA. Nosilec vzorcev (Slika 7) smo pritrdili na napetostni vakuumski goniometer v merilni vakuumski celici. Za meritev enega vzorca smo porabili povprečno dve uri žarkovnega časa. Posneti spektri so se nato analizirali z GEOPIXE II računalniškem programu in s simultano uporabo STIM (Scanning transmission ion microscopy), ki omogoča kvalitativne in kvantitativne analize porazdelitve elementnih map (Maxwell in sod., 1989, 1995, Campbell in sod., 2000, cit. po Vogel-Mikuš, 2006).

### 3.7.1.3 Obdelava podatkov

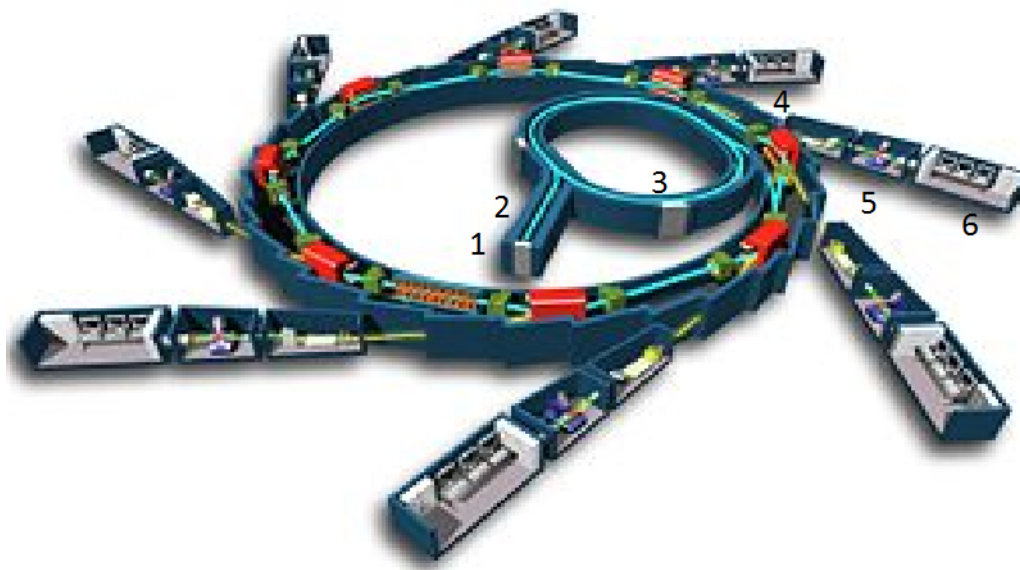
Za vsak tretma, tako za prečni kot vzdolžni prerez, smo posneli mape elementov: Mg, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu in Zn. Rezultate smo dobili kot Excelove .csv dokumente in kot .png slike. Večino analiz smo naredili v računalniškem programu BioPhotonics ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). S pomočjo ROI Manager smo označili področja posameznih tkiv, za rizodermis smo se orientirali predvsem po mapi Fe in Ca, za žilo po K, za koreninsko čepico po S, ter si vedno pomagali s slikami morfoloških struktur rezin, ki smo jih posneli z metodo STIM (Scanning transmission ion microscopy), in s svetlobnim mikroskopom. Nato smo iz posameznih obkroženih regij (tkiv) izračunali koncentracije posameznega elementa. Tudi Pearsonov korelacijski koeficient ( $R_r$ ), Mandersov prekrivni koeficient ( $R$ ) in korelacijski kvocient intenzitet (ICQ) smo izračunali s pomočjo programa ImageJ, le da smo slike spremenili v 8-bitne in uporabili metodo, imenovano Korelacijska analiza intenzitet (Intensity Correlation Analysis). Za kolokalizacijske mape elementov smo .csv dokumente z matriko pretvorili v stolpec (.edf) in s programom PyMca (<http://pymca.sourceforge.net/>), oz. podprogramom "Mca to Edf converter", dokumente pretvorili v .edf dokumente. Nato smo s podprogramom "RGB Correlator" odprli vse .edf dokumente ene rezine (za posamezni element). Kolokalizacijske mape smo naredili tako, da smo za vsako želeno porazdelitveno mapo izbrali po en kanal (rdeč, zelen ali moder), po potrebi prilagodili intenziteto barve in sliko shranilo kot .png dokument.



Slika 8: Primer posameznih tkiv v programu ImageJ za: A) vzdolžni prerez koreninskega vršička (1-celotna površina rezine, 2-rizodermis, 3-skorja, 4-žila, 5-meristemska regija, 6-koreninska čepica) in B) prečni prerez zrele korenine (1-celotna površina rezine, 2-skorja, 3- rizodermis, 4-endodermis, 5-žila).

### 3.8 SINHROTRON

Če imamo na razpolago dovolj energije, lahko delce pospešimo do hitrosti, ki so blizu svetlobni hitrosti. Najenostavneje je pospeševati nabite delce, in sicer elektrone. Gibanje in nihanje elektronov tako povzroča elektromagnetno valovanje z različnimi valovnimi dolžinami. Napravam, s pomočjo katerih pospešujemo nabite delce (npr. elektrone) do visokih hitrosti s pomočjo usklajenih električnih in magnetnih polj v vakuumu, imenujemo pospeševalniki. Delimo jih na nizkonapetostne in visokonapetostne ter linearne in krožne pospeševalnike. Prednost krožnih pospeševalnikov je, da zavzamejo manjše območje kot linearni. Delci se gibljejo v krogu, dokler ne dosežejo zadostne energije. Najbolj znana krožna pospeševalnika sta ciklotron in sinhrotron. Ciklotroni so manjši krožni pospeševalniki reda velikosti do nekaj metrov, medtem ko imajo sinhrotroni premer okrog 100 metrov. V sinhrotronu krožijo delci v vakuumski cevi po obodu. Sinhrotronska svetloba nastaja pri zavijanju elektronov v magnetnem polju, ko elektroni izgubljeno energijo v obliki fotonov izsevajo v okolico. Sinhrotronski pospeševalnik je sestavljen iz elektronske puške, linearne pospeševalnika, predpospeševalnika, shranjevalnega obroča, žarkovnih linij in eksperimentalnih postaj (Slika 9).

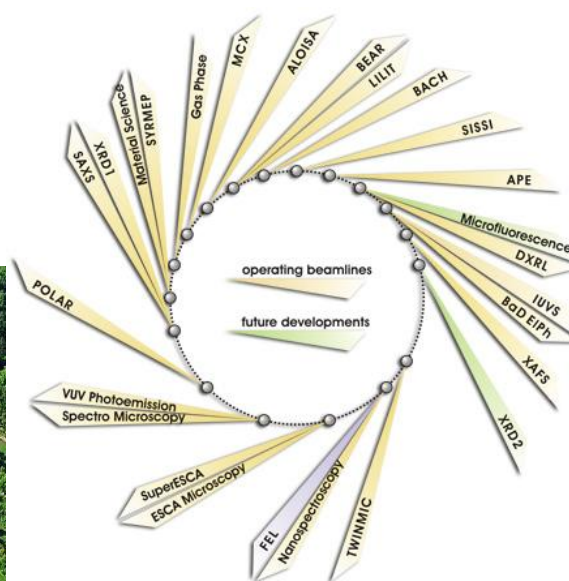
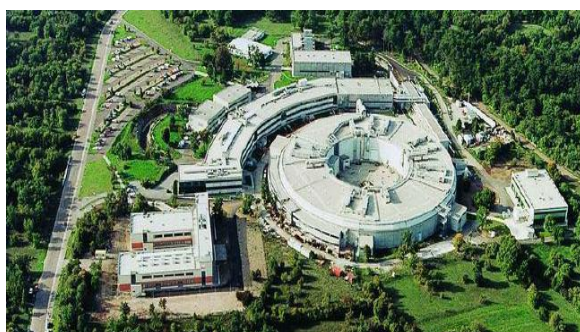


Slika 9: Glavni deli sinhrotronskega pospeševalnika: elektronska puška (1), linearni pospeševalnik (2), predpospeševalnik (3), shranjevalni obroč (4), žarkovna linija (5), eksperimentalna postaja (6).

V osnovi so bili sinhrotroni namenjeni preučevanju elementarnih delcev, ko pa so leta 1947 v ZDA odkrili sinhrotronsko svetlobo, katere spekter je zvezen in se svetloba razteza vse od infrardeče prek vidne in ultravijolične do rentgenske svetlobe, je pomen sinhrotrona dobil nove razsežnosti. Zaradi te lastnosti je sinhrotronska svetloba uporabna v nanotehnologiji, za proučevanje virusov, pri razvoju zdravil, za medicinsko diagnostiko, pri proučevanju lastnosti živil, za ugotavljanje posledic globalnega segrevanja, za razvoj novih energetskih virov, pri razvoju novih materialov, za določanje starosti arheoloških izkopnin. Snop sinhrotronske svetlobe je zelo ozek, širokega spektra in izjemno velike intenzitete (Pajor, 2005).

### 3.8.1 Sinhrotron Elettra

Sinhrotron Elettra (Slika 10) se nahaja v Bazovici tik ob državni meji med Italijo in Slovenijo na italijanski strani. Ob svojem zagonu leta 1993 je ta sinhrotron veljal za enega najsvetlejših izvorov sinhrotronske svetlobe, danes ga letno uporablja več kot 1000 uporabnikov s področja biologije, kemije, medicine, fizike materialov in površin.



Slika 10: Sinhrotron Elettra, Trst (Italija) in žarkovne linije (vir: Elettra – Beamlines, 9.8.2012).

Shranjevalni obroč Elettre je mnogokotnik, ki ima 12-sledno simetrično strukturo. Elektronski žarek z energijo 2 GeV in tokom 400 mA ima nezvezno časovno strukturo, sestavljeno iz ozkih paketov periode 2 ns. Za odklanjanje elektronskega žarka poskrbijo odklonski magneti. Sestavljeni so iz dipolnih magnetov, ki odklonijo elektronski žarek za  $15^\circ$ , za regulacijo in fokusacijo žarka poskrbijo najprej kvadropolni, nato pa še heksopolni magneti. Med zaporednimi odklonskimi magneti so ravni odseki, kjer je prostor za vgradnjo undulatorjev ali wigglerjev, ki služijo za doseganje velike intenzitete na ozkem spektru svetlobe (Slika 11). Shranjevalni obroč je namenjen le vzdrževanju takih elektronov s konstantno energijo. Elektrone je treba najprej pospešiti na energije med 1,0 do 1,5 GeV. Za ta namen uporabljajo linearni pospeševalnik. Transportni sistem pripelje žarek do shranjevalnega obroča, kjer se nato vbrizga v shranjevalni obroč. Ponavadi se elektronski žarek vbrizgava enkrat dnevno, pri čemer vbrizg traja nekaj 10 min, lahko pa žarek vbrizgavajo po malem vsakih nekaj minut ("top up mode"). Štirje radiofrekvenčni resonatorji (500 MHz) vzdolž obroča pospešijo elektrone na 2,0 GeV, nato pa vzdržujejo žarek pri tej energiji, saj zaradi sinhrotronskega sevanja izgublja energijo, in sicer izgubi en elektron 256 keV/obhod. Cev je iz 2 mm debele nerjavne jeklene pločevine s presekom  $85 \text{ mm}^2$ . V obroču je ultra visoki vakuum  $p = 10^{-10}$ - $10^{-12}$  mbar, kar zagotavlja majhno

sipanje žarka elektronov na preostalih atomih. Za vakuum skrbijo ionsko geterske črpalke in črpalke z neevaporacijskimi getri. Več tehničnih podatkov si lahko ogledate v Tabeli 1. Sinhrotronsko svetlobo s pomočjo žarkovne linije vodimo do eksperimentalnih postaj, kjer uporabniki izvajajo poizkuse. Žarkovna linija vsebuje veliko naprav, ki se uporabljajo za usmerjanje in fokusiranje žarkov. Zaradi visoke zahtevane natančnosti so te naprave zgrajene iz motorjev in senzorjev, katerih resolucije se gibljejo v mikrometerskem in nanometerskem področju. Danes ima sinhrotron Elettra 23 žarkovnih linij, v bližnji prihodnosti pa načrtujejo še izgradnjo dveh novih (Slika 10).

Preglednica 1: Nekateri tehnični podatki sinhrotrona Elettra.

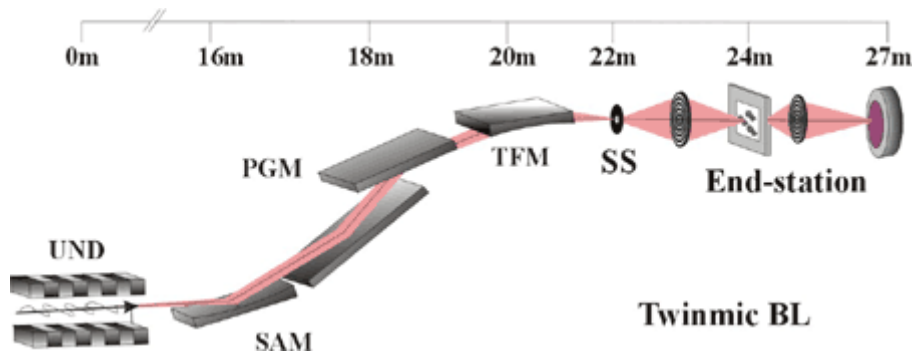
|  |                     |
|--|---------------------|
| Polmer shranjevalnega obroča                 | 41,2 m              |
| Obseg shranjevalnega obroča                  | 259,2 m             |
| Energija žarka v obroču                      | 0,7–2,0 GeV         |
| Tok v obroču pri energiji 2 GeV              | 400 mA              |
| Razpolovni čas žarka pri 250 mA              | 26 ur               |
| Frekvenca obhoda                             | 1,157 MHz           |
| Število krožečih paketov                     | Od 1 do 432         |
| Časovni presledek med paketi                 | 864 do 2 ns         |
| Izgube energije žarka na obhod               | 255,7 keV           |
| Izgube energije žarka na obhod z undulatorji | 290,2 keV           |
| Število uklonskih magnetov                   | 12                  |
| Magnetno polje v odklonskih magnetih         | 1,2 T               |
| Dolžina ravnih odsekov za undulatorje        | 6 m; 4,8 m uporabna |
| Število ravnih odsekov za undulatorje        | 11                  |
| Magnetno polje v undulatorjih                | 0,44–0,56 T         |
| Magnetno polje v wigglerju                   | 1.5 T               |



Slika 11: Viri sinhrotronske svetlobe, od leve proti desni: dipolni magnet, wiggler, undulator.

### 3.8.2 Žarkovna linija Twin-Mic (A twin soft X-ray transmission and emission spectromicroscope)

Ena izmed žarkovnih linij na sinhrotronu Elettra je TWIN-MIC (BL1.1L), ki omogoča raziskave heterogenih vzorcev s pomočjo rentgenske spektromikroskopije. Omogoča mikrokarakterizacijo tako trdnih in tekočih kot plinastih snovi. Rentgenski mikroskop na sinhrotronsko svetlobo je prvi instrument, ki združuje presevni način mikroskopije in fluorescenčno spektromikroskopijo v eni napravi. V primerjavi s svetlobno, pa tudi elektronsko mikroskopijo, tu krajša valovna dolžina vzbujevalne rentgenske svetlobe omogoča večjo optično ločljivost (pod 1  $\mu\text{m}$  do nekaj 10 nm) in prodornost, tako da za opazovanje podrobne strukture vzorcev, le-teh ni potrebno rezati na ultratanke rezine kot pri npr. presewni elektronski mikroskopiji.



Slika 12: Shematični prikaz TwinMic žarkovne linije z 1 m dolgim undulatorjem (UND), sferičnim zrcalom (SAM), ravnim monokromatorjem (PGM), toroidalnim zrcalom (TFM) in fresnelovo lečo (vir: Elettra - A twin..., 9.4.2012).

Vir rentgenske svetlobe je U5.6 undulator z dolžino 1 m. Optika mikroskopa je sestavljena iz treh enot, in sicer visokoločljivostnega monokromatorja tipa SX-400, ki deluje v energijskem območju od 400-2200 eV, toroidnega fokusnega zrcala in Fresnelove leče, s katero lahko fokusiramo žarek v pego s premerom od 1,2  $\mu\text{m}$  do 20 nm. Za zajemanje signala v transmisiji se uporablja CCD kamera (Andor Ixona), za zajemanje rentgensko fluorescenčnega signala pa 8 SD (silicon drift) detektorjev (Slika 12). TwinMic mikroskop je opremljen z Labview programsko opremo na treh računalnikih, ki je bila razvita s pomočjo Instituta Jožef Stefan. Meritve se lahko opravljajo v zraku, pogojeni plinski

atmosferi ali vakuumu. Presevni, pa tudi rentgenski fluorescenčni način mikroskopiranja je omejen na vzorec, ki ni debelejši od nekaj 10  $\mu\text{m}$  in večji od 5x5 mm (Elettra - A twin ..., 9.4.2012).

Na žarkovni liniji smo dobili odobren merilni čas od 24. do 28.10.2011 (v okviru projekta 20110043, "Localization of elements, structural and functional organic compounds, and speciation of Cu in sunflower roots treated with CuO nanoparticles"), kjer sta s pomočjo operatorjev meritve opravljala doc. dr. Katarina Vogel-Mikuš in znanstvenik z Instituta Jožef Stefan, dr. Peter Kump. Mapiranje vzorcev je potekalo v vakuumu pri energiji 1,425 keV z žarkom premera 1,2  $\mu\text{m}$ . Dobljeni podatki so bili analizirani s programom PyMCA.

### 3.9 FTIR SPEKTROSKOPIJA

Infrardeča spektroskopija z uporabo Fourierjeve transformacije (FTIR) je ena najpogosteje uporabljenih metod infrardeče spektroskopije. Pri tej metodi vzorec presvetlimo z infrardečo svetlobo, pri čemer se nekaj svetlobe absorbira v vzorcu, ostala pa preide skozi (preseva). Frekvenčno odvisnost absorpcije tvori infrardeči spekter. Ta predstavlja molekularni prstni odtis vzorca z absorpcijskimi vrhovi, ki ustrezajo določenim vrstam nihanj atomov v molekuli. Vsaka molekula ima edinstven infrardeči spekter, zato je infrardeča spektroskopija idealna metoda za pozitivno identifikacijo (kvalitativno analizo) neznanih snovi. Ker je velikost vrhov v spektru neposredno odvisna od količine snovi, je z modernimi, računalniško podprtimi algoritmi infrardeča spektroskopija tudi zelo dobro orodje za kvantitativno analizo komponent v zmesih (Introduction to ... , 2005). Infrardeči spekter pa ni odvisen samo od vrste atomov in kemijskih vezi, ampak tudi od njihove medsebojne orientacije. To vrsto frekvenčne odvisnosti uporabimo pri strukturnih študijah molekul in molekularskih agregatov.

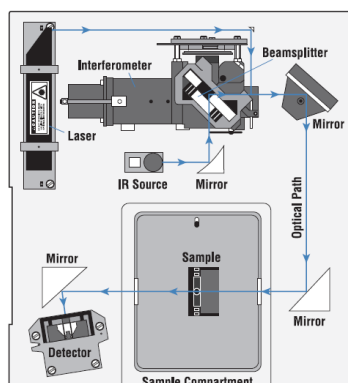
FTIR običajno ne zahteva posebnih postopkov za pripravo vzorca, zato dodatne kemikalije večinoma niso potrebne. Tudi sama metoda je nedestruktivna, saj ne poškoduje bioloških vzorcev (Introduction to ... , 2005).



Optika, ki se uporablja v modernih FTIR spektrometrih, je kompaktna in robustna (Fourier ..., 2008). Gibljivo ogledalo v interferometru je namreč edini premikajoči se del instrumenta, zato je možnost mehanske okvare zelo majhna (Introduction to ... , 2005).

### 3.9.1 Postopek analize vzorca s FTIR

Sevajoče keramično telo oddaja infrardečo svetlobo. Žarek te svetlobe potuje skozi aperturo, ki uravnava količino energije, ki doseže vzorec (in posledično detektor). Žarek vstopa v interferometer, kjer nastane »spektralno kodiranje« - dobimo interferogram (Slika 13). Skozi interferometer prehaja tudi laserski žarek. Njegova vloga je kalibracija valovne dolžine infrardeče svetlobe, nadzor položaja ogledala in sprožanje zajemanja podatkov v spektrometru. Žarek nato doseže detektor, kjer poteče zajemanje signala (interferograma). Računalnik digitalizira izmerjeni interferogram in izvede Fourierjevo transformacijo, s čimer izračuna infrardeči spekter (Introduction to ... , 2005).



Slika 13: Zgradba merilnega instrumenta za FTIR (vir: Introduction to ... , 2005: 6).

Ker se absorpcijska intenziteta izraža na relativni skali, je potrebno izmeriti tudi spekter ozadja. Običajno to pomeni meritev brez vzorca. Spekter ozadja nato primerjamo s spektrom vzorca, pri čemer izračunamo »delež prepustnosti«. Rezultat tega postopka je spekter, iz katerega je odstranjen vpliv instrumenta, torej vse spektralne lastnosti, ki izvirajo zgolj iz vzorca. Ena sama meritev ozadja zadošča za mnogo meritev vzorca, če snemamo vzorce pri konstantni temperaturi in vlažnosti.

### 3.9.2 Pomen FTIR za analizo bioloških vzorcev

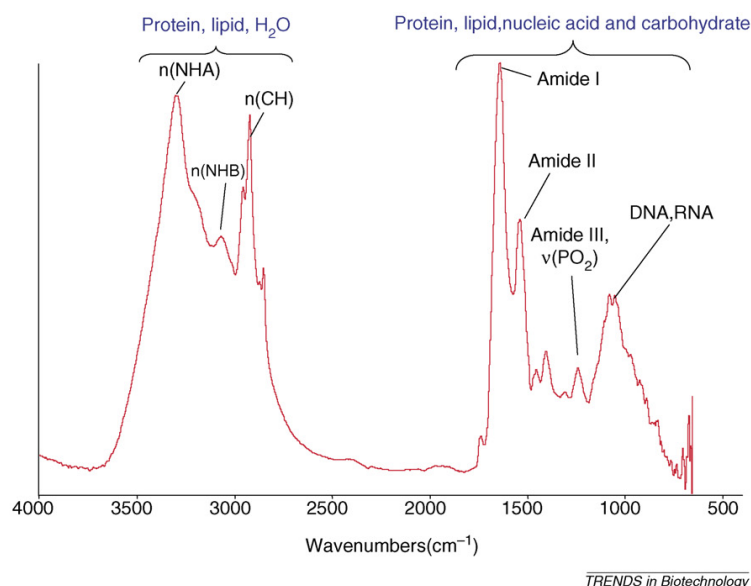
Infrardeča spektroskopija predstavlja del »biofotonike«: raziskovalnega področja, ki združuje biologijo z optiko in zajema številne tehnike, ki izkoriščajo svetlobo (oziroma katerokoli energijo fotonov) za potrebe znanosti o življenju. Vibracijska spektroskopija lahko zazna biokemijske spremembe v tkivih in nudi višji nivo molekularne informacije; žal je prostorska ločljivost omejena s šibkostjo laboratorijskega vira (na velikostni skali več deset  $\mu\text{m}^2$ ), pri sinhrotronskem viru svetlobe pa teoretično dosežemo ločljivost 5-7  $\mu\text{m}^2$ . Sklapanje konvencionalnih FTIR spektrometrov z mikroskopom je ustvarilo potencial za preučevanje tkiv na celičnem nivoju in vodi k zajemanju slike (imaging) z infrardečo svetlobo, kjer sta združeni biokemijska in prostorska informacija (Dumas in sod., 2006).

Vibracijska gibanja posameznih kemijskih vezi vseh molekul ležijo v rangu valovnih dolžin med 2,5 in 25  $\mu\text{m}$ . Tradicionalno se je uveljavila drugačna merilna skala – recipročni centimetri:  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) =  $1/\lambda$  ( $\text{cm}$ ) (npr. 2,5  $\mu\text{m}$ =4000  $\text{cm}^{-1}$ ; 25  $\mu\text{m}$ =400  $\text{cm}^{-1}$ ). To je absorpcijsko območje skoraj vseh intramolekularnih nihanj biomolekul in je bogato z informacijami o njihovi strukturi in konformaciji. V vibracijskih spektrih se različna razmerja in/ali konformacije biomolekul odražajo v razlikah njihovih absorpcijskih vrhov (npr. v obliki krivulje, frekvenčnem zamiku in/ali spremembi intenzitete) in nakazujejo spremembe na celičnem ali tkivnem nivoju (Dumas in sod., 2006). FTIR vrhovi so relativno ozki in jih je v mnogih primerih mogoče povezati z vibracijo določene kemijske vezi (ali posamezne funkcionalne skupine) v molekuli (Movasaghi in sod., 2008).

Infrardeči spektri bioloških vzorcev sestojijo iz mešanice proteinov, nukleinskih kislin, lipidov in ogljikovih hidratov, njihova kompleksnost pa se odraža na spektru, ki ga generirajo (Slika 14). Kljub kompleksni biokemijski sestavi takšnega biološkega vzorca ima njegov infrardeči spekter nekaj prepoznavnih značilnosti (Dumas in sod., 2006):

- amidno I območje pri  $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$ , ki izvira pretežno iz  $\nu(\text{C}=\text{O})$  vzdolžnih valenčnih (ang. *stretching*) nihanj v amidnih vezeh proteina;
- amidno II območje blizu  $1550 \text{ cm}^{-1}$ , ki je kombinacija  $\delta(\text{N}-\text{H})$  prečnega (ang. *bending*) in  $\nu(\text{C}-\text{N})$  vzdolžnega valenčnega nihanja amidnih vezi;

- $\nu(\text{C}=\text{O})$  valenčno nihanje lipidov pri  $\sim 1740 \text{ cm}^{-1}$ ;
- amidno III območje, ki je sestavljeno predvsem iz N-H prečnega nihanja, C=O ravninskega prečnega nihanja, C-C in C-N vzdolžnega valenčnega nihanja ter CH prečnega nihanja v proteinu;
- antisimetrično  $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$  vzdolžnega valenčnega nihanja fosfatnih skupin v nukleinskih kislinah in fosfolipidih ( $1240 \text{ cm}^{-1}$  -  $1225 \text{ cm}^{-1}$ );
- simetrično  $\nu(\text{PO}_2^-)$  vzdolžnega valenčnega nihanja fosfatnih skupin v nukleinskih kislinah in fosfolipidih ( $\sim 1080 \text{ cm}^{-1}$ ).



Slika 14: Tipični infrardeči spekter ene same HeLa celice. Območje zajema podatkov obsega  $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ . Spekter je bil zabeležen z laboratorijskim infrardečim mikroskopom, čas zajema je trajal 30 sekund (vir: Dumas in sod., 2006: 41).

### 3.9.3 Priprava rastlinskega materiala za določanje biokemijske sestave sončnic s pomočjo FTIR spektroskopije

Meritve biokemijske sestave poganjkov in korenin sončnic so bile opravljene na Kemijskem inštitutu v Laboratoriju za strukturo biomolekul (L14) z uporabo vibracijskih spektrometrov.

Za meritve biokemijske sestave rastlin smo poskus zastavili le v koncentracijah 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> nano in standardnega CuO ter kontrolo. Po štirih tednih tretiranja smo sončnice ločili na liste in korenine, ki smo jih sprali z destilirano vodo, jih zavili v aluminijasto folijo in zamrznili v tekočem dušiku. Tako pripravljene rastline smo sušili v liofilizerju (Christ alpha 2-4) tri dni. Posušen rastlinski material smo s pomočjo tekočega dušika uprašili v terilnici ter prah shranili v zaprtih plastičnih posodicah.

Rastlinski material so nato pod vodstvom doc. dr. Jožeta Grdadolnika na Kemijskem inštitutu pomerili s FT-IR spektrometrom Perkin Elmer System 2000. Snemali smo v tehniki oslABLJENE REFLEKSije (angl. attenuated total reflection, ATR), kjer infrardeči spektri niso odvisni od debeline vzorca.

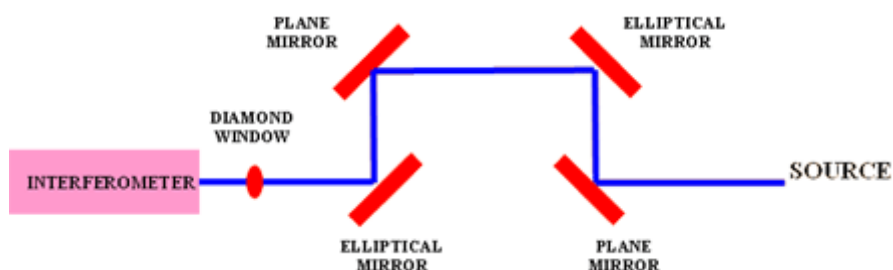
#### **3.9.4 Obdelava infrardečih spektrov**

Spektre smo nato obdelovali s pomočjo računalniškega programa OPUS 6.5 (Bruker Optik GmbH 1997–2007). Najprej smo naredili klustersko analizo spektrov, kjer smo izbrali območje od 4000 do 750 cm<sup>-1</sup>. Program nam je nato izrisal klustersko drevo podobnosti spektrov. Vsem spektrom smo odvedli vodo ter odrezali šum v območju od 600 do 750 cm<sup>-1</sup>. S spektrom smo odčitavali višino oz. intenziteto več vrhov karakterističnih trakov, a smo se za prikaz rezultatov odločili le za štiri, in sicer - en za lipide, en za proteine, en za ogljikove hidrate in en vrh za DNA. Da bi bilo odčitavanje čim bolj pravilno, smo določili enotno bazno linijo med 1777 cm<sup>-1</sup> in 765 cm<sup>-1</sup>, ki je veljala za vse spektre in vse vrhove z izjemo lipidov. Pri tem smo uporabili metodo K integriranja za lipide, in metodo L integriranja za ostale trakove. Za lipide smo določili meje trakov med 3020 in 2650 cm<sup>-1</sup>, saj je to območje značilno za  $\nu(\text{C-H})$  asimetrično in simetrično valenčno nihanje, ki pripada -CH<sub>2</sub> skupini v lipidih in -CH<sub>3</sub> skupini v lipidih (Wei in sod., 2009). Za proteine smo odčitavali vrh med 1715 in 1570 cm<sup>-1</sup>, saj je to območje amida I, ki izvira pretežno iz  $\nu(\text{C=O})$  valenčnih nihanj v amidnih vezeh proteina (Dumas in sod., 2006); za DNA območje med 1307 in 1184 cm<sup>-1</sup>, ki predstavlja antisimetrično  $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$  valenčno nihanje fosfatnih skupin v nukleinskih kislinah in fosfolipidih (Dumas in sod., 2006); za ogljikove hidrate pa območje med 1190 in 983 cm<sup>-1</sup>, saj so tu valenčna (ang. stretching) nihanja  $\nu(\text{C-}$

O-C) vezi ogljikovih hidratov (Wei in sod., 2009). Iz višine vrhov posameznih trakov smo nato izračunali razmerja med lipidi/proteini, ogljikovimi hidrati/proteini, lipidi/ogljikovimi hidrati in proteini/DNA.

### 3.9.5 SISSI žarkovna linija (Source for Imaging and Spectroscopic Studies in the Infrared)

Ena izmed žarkovnih linij na sinhrotronu Elettra je SISSI (BL9.1), ki deluje na področju infrardeče in vidne svetlobe za uporabo v spektroskopiji, mikrospektroskopiji in zajemu slike. Področja uporabe SISSI žarkovne linije so znanost o površinah in materialih, biokemija, mikroanalize, geologija, celična biologija, biomedicinska diagnostika, zvijanje proteinov, kemijska kinetika, nanotoksikologija in druge. Sevanje se zbira z odklonskega magneta 9.1 pod kotom 70 mrad (H) in 25 mrad (V), ki združi oba kota in omogoči konstantno sevanje. Komplet elipsoidnih in ravnih zrcal v vakumskih komorah usmerja svetlobo do merilnega instrumenta (Slika 15), ki sestoji iz Michelsonovega interferometra (Bruker Vertex-70 z detektorjem HgCdTe/DTGS) in konfokalnega infrardečega mikroskopa (Bruker Hyperion 3000 z detektorjem HgCdTe/FPA (64x64)).

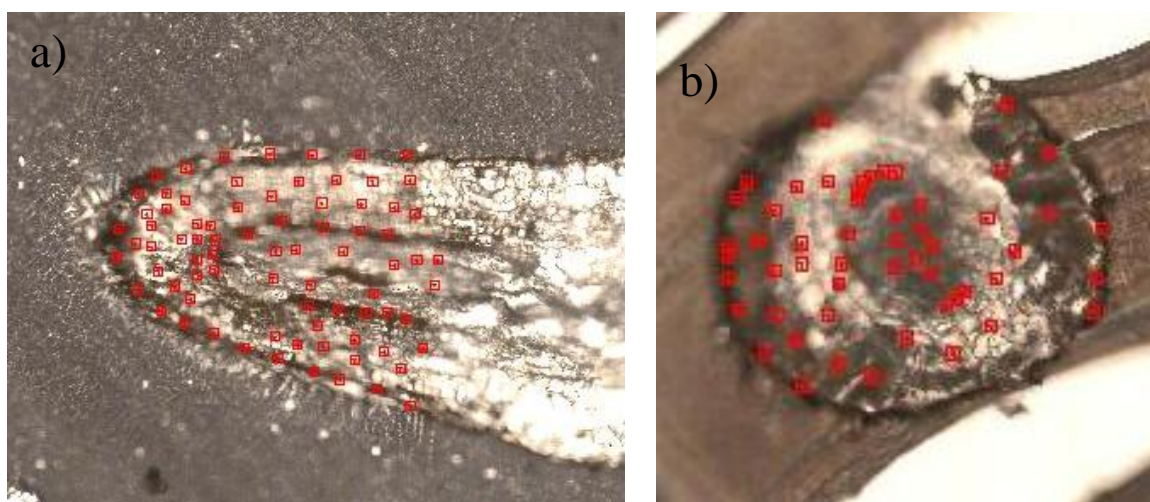


Slika 15: Shema infrardeče sinhrotronske žarkovne linije SISSI (vir: Elettra - Source ..., 9.4.2012).

Interferometer je opremljen za zaznavanje in analiziranje sevalnega spektra širine od  $5 \text{ cm}^{-1}$  do  $50000 \text{ cm}^{-1}$ . Hitro skeniranje in sposobnost postopnega skeniranja omogočajo časovno zaznavanje v razponu od nanosekunde do milisekunde ter prostorsko ločljivost mikrometerskega ranga. Žarkovna linija je opremljena tudi z motoriziranim dvodimenzionalnim mapirnim postopkom, ki omogoča meritve v presewni in reflektivni

geometriji, poleg tega pa imajo tudi lastni globarni vir žarka. Svetlost sinhrotronskega sevanja omogoča srednje IR spektre od valovne dolžine  $6000\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu=1,6\text{ }\mu\text{m}$ ) do  $800\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu=12\text{ }\mu\text{m}$ ) objekta velikosti  $4\times 4\text{ }\mu\text{m}$  (Elettra - Source ..., 9.4.2012).

Na žarkovni liniji smo dobili odobren merilni čas od 17. do 21.10.2011 (v okviru projekta 20110045, "Localization of elements, structural and functional organic compounds, and speciation of Cu in sunflower roots treated with CuO nanoparticles"), kjer sta s pomočjo operatorjev meritve opravljala doc. dr. Katarina Vogel-Mikuš in fizik z Instituta Jožef Stefan dr. Peter Kump. V času meritev smo uporabljali globarni vir žarka merilne postaje SISSI z aperturo  $20\text{ }\mu\text{m}$ , saj je bil sinhrotronski v okvari.



Slika 16: Fotografija mikrorezin vzdolžnega prereza koreninskega vršiška tretmaja nano CuO  $10\text{ mg l}^{-1}$  (a) in prečnega prereza korenine tretmaja nano CuO  $100\text{ mg l}^{-1}$  (b) z označenimi točkami meritev za posamezna tkiva z žarkovne linije SISSI.

Merili smo spektre posameznih točk (od 5 do 20) znotraj istega tkiva (Slika 16). Pri vršičkih smo določili meristemsko regijo, koreninsko čepico, notranjost koreninske čepice, rizodermis, skorjo in žilo. Pri prečnih rezinah korenine pa smo identificirali rizodermis, skorjo, endoderm in žilo. Pomerili smo spekter zamrzovalnega medija, ki smo ga uporabljali za vkapljanje vzorcev, saj smo predvidevali, da se bo v določenih točkah

nahajal tudi v spektrih rizodermisa, koreninske čepice in skorje, saj ob morebitnih poškodbah rizodermisa lahko pronica v zunanja tkiva korenine. Poleg tega je apertura kvadratne oblike in lahko ob snemanju spektrov v zunanjih tkivih, nehote zajamemo tudi okoliški zamrzovalni medij. Spektre teh tkiv smo podrobno pregledali in po potrebi s programsko opremo OPUS odšteli spekter zamrzovalnega medija. Spektre enakega tkiva in enakega tretmaja smo povprečili, da smo dobili le en spekter za eno tkivo pri enem tretmaju. Izračunali smo standardno deviacijo povprečevanja, odvedli vodo ter odrezali šum od 600 do 750  $\text{cm}^{-1}$ . Spektre smo nato obdelali po opisanem postopku v poglavju 3.9.4.

### 3.10 STATISTIČNA ANALIZA

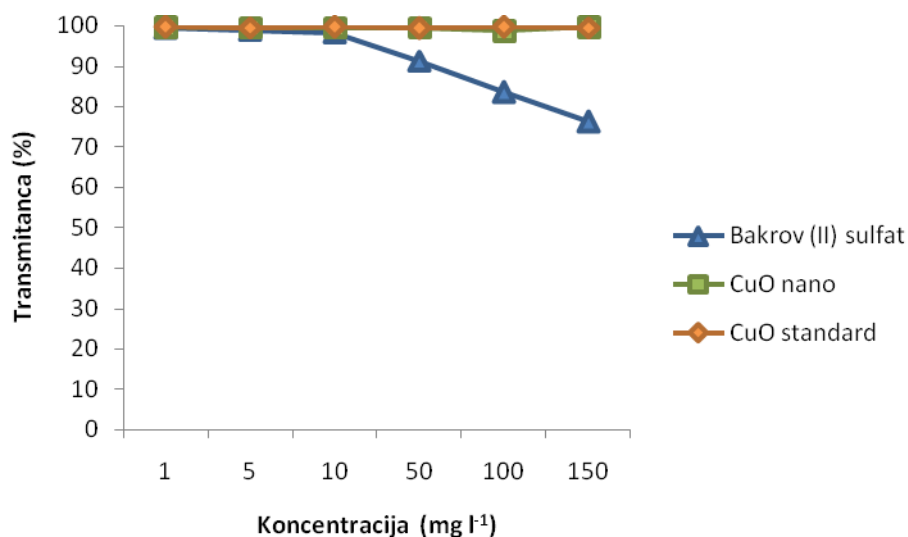
Podatke smo analizirali s standardnimi statističnimi metodami. Pri tem smo uporabili MS Excel 2010 z nadgradnjo ANOVA in programski komplet Statistica (Statsoft 7.0.61.0 EN). Za izračun statistično značilnih razlik smo uporabili enosmerno in dvosmerno ANOVA in Duncanov test,  $p < 0,05$ . Faktorske analize variance smo izračunali s programom Faktorska ANOVA,  $p < 0,05$ . Med posameznimi izmerjenimi parametri smo določali tudi korelacijske povezave, pri čemer smo uporabili Spearmanov korelacijski koeficient,  $p < 0,05$ .

## 4 REZULTATI

### 4.1 BAKROV OKSID V NANO IN STANDARDNI OBLIKI

#### 4.1.1 Vsebnost bakrovega iona v raztopinah bakrovega oksida

Vrednosti transmitanc v vseh koncentracijah raztopin CuO, tako nano kot standardne oblike, so bile višje od 99 %, medtem ko je vrednost transmitance pri bakrovem (II) sulfatu z zviševanjem koncentracije padala (Slika 17).

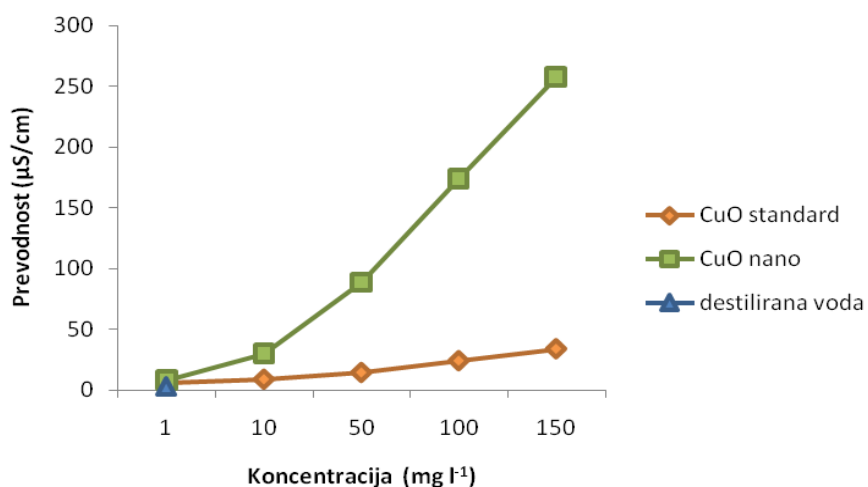


Slika 17: Vrednosti transmitanc v raztopinah bakrovega (II) sulfata, bakrovega oksida v nano in v standardni obliki. Prikazane so povprečne vrednosti (N = 3).

#### 4.1.2 Prevodnost raztopin bakrovega oksida

Vrednosti izmerjene prevodnosti so se z večanjem koncentracije poviševale tako pri nano kot pri standardni obliki CuO, le da so bile vrednosti pri nano obliki višje (Slika 18). Suspenzijam smo izmerili tudi pH, katerih vrednosti so bile med 6,1 in 6,5.

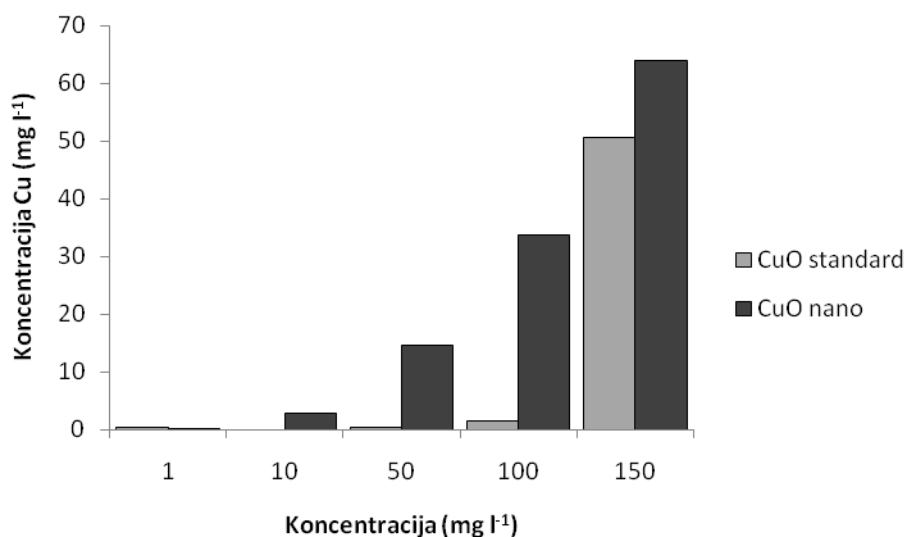




Slika 18: Vrednosti prevodnosti ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) v destilirani vodi in raztopinah bakrovega oksida v nano in v standardni obliki.

#### 4.1.3 Koncentracija bakra v supernatantu suspenzij s CuO in nano CuO (TXRF)

Pri obeh oblikah bakrovega oksida se je koncentracija bakra v supernatantu zviševala z naraščajočo koncentracijo CuO. Vsebnosti bakra so bile pri nano obliki višje, vendar z omenjeno metodo ne moremo ločiti Cu ionov od CuO (Slika 19).



Slika 19: Koncentracija Cu ( $\text{mg l}^{-1}$ ) v raztopinah bakrovega oksida v standardni in nano obliki.

## 4.2 LOKALIZACIJA ELEMENTOV V KORENINAH SONČNICE

Rezultate lokalizacije elementov smo pridobili z dvema metodama, in sicer z mikro-PIXE, s katero smo pridobili porazdelitvene mape elementov (Mg, S, P, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn) za celotno področje rezine korenine oz. koreninskega vršička, ter metodo nizko energijske rentgensko fluorescenčne spektromikroskopije (low energy X-ray fluorescence, LEXRF), s pomočjo katere smo lokalizirali baker in kisik na celičnem nivoju.

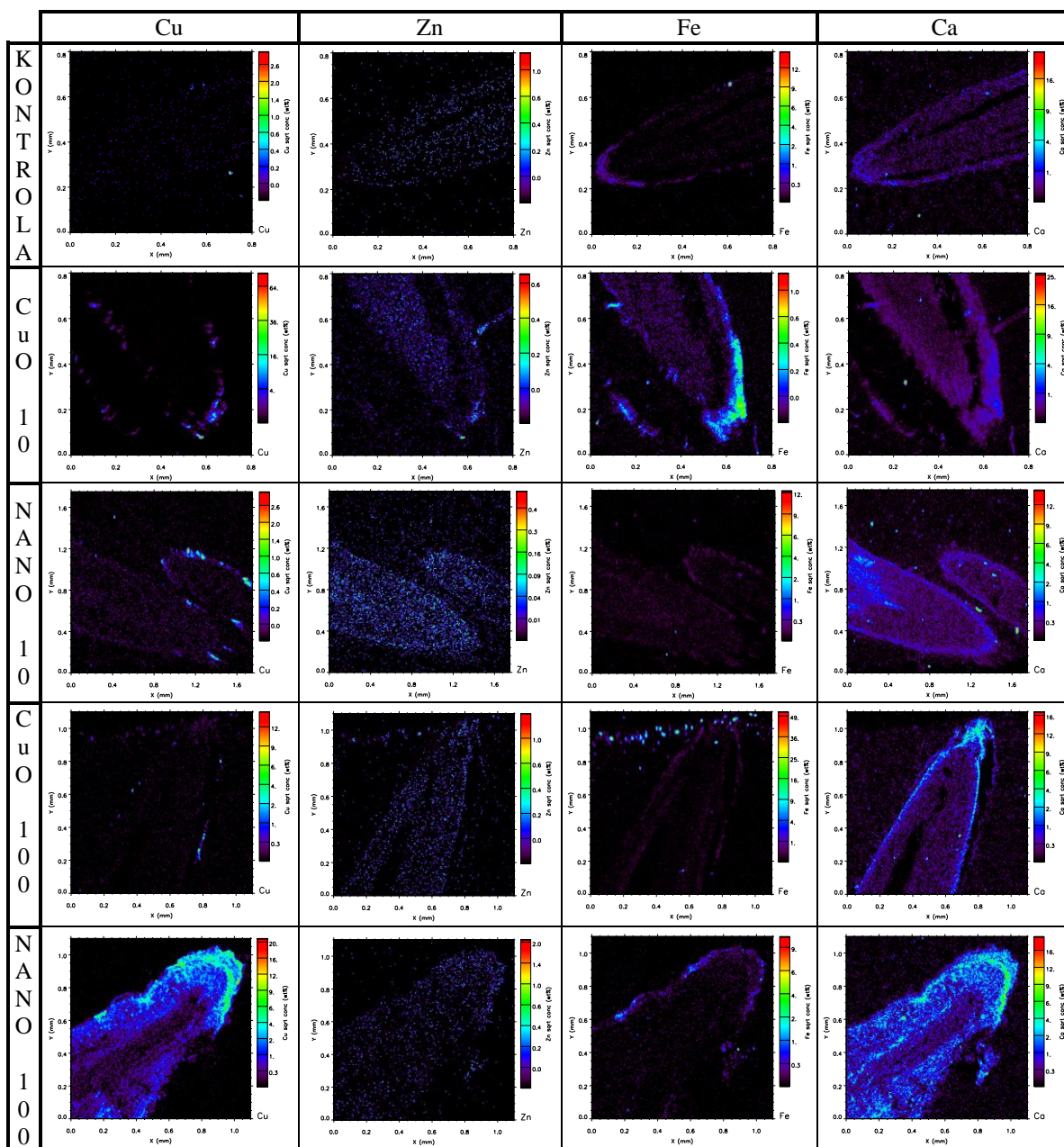
### 4.2.1 Porazdelitev elementov na tkivnem nivoju z mikro-PIXE

Na vzdolžnem prerezu koreninskega vršička sončnice lahko vidimo tkiva rizodermisa, skorje in žile, ki si sledijo od zunanosti korenine proti notranosti, ter tkiva koreninske čepice in meristemske regije (Slika 60). Pri tretmaju s standardno obliko CuO v koncentraciji  $10 \text{ mg l}^{-1}$  nimamo popolnega vzdolžnega prereza, zato nam manjkata tkivi žile in meristemske regije.

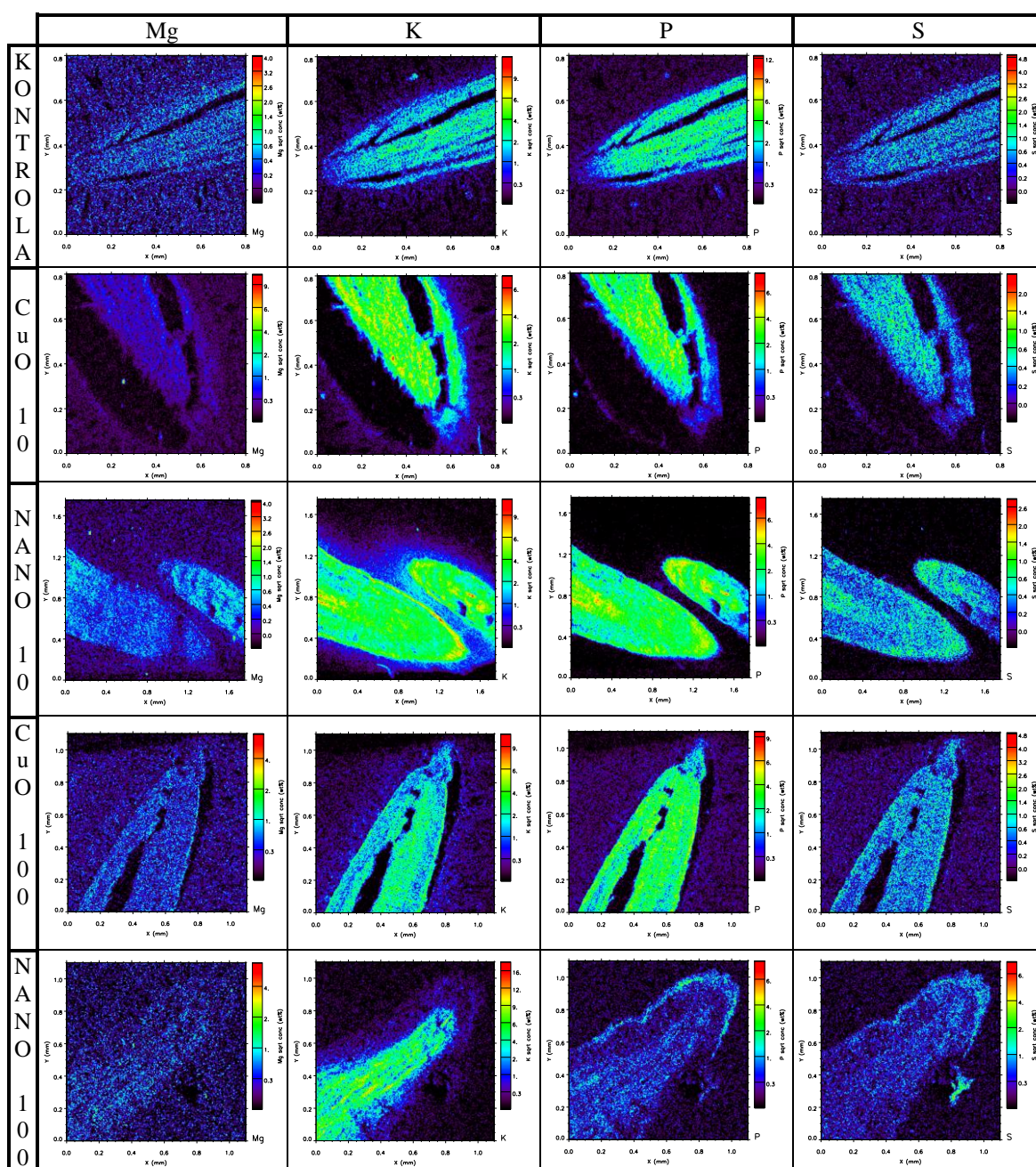
Baker je bil v kontrolnih koreninah razporejen homogeno v zelo majhnih koncentracijah po celotnem vršičku, medtem ko je bil pri obeh tretmajih CuO v standardni obliki Cu skoncentriran na rizodermisu, kjer se je pojavljal v skupkih. Pri tretmajih s CuO v nano obliki zasledimo Cu v rizodermisu ter skorji, vse do žile. Pri Zn bistvenih razlik v razporeditvi elementa med tretmaji ni bilo. Za Fe smo opazili, da se nahaja predvsem v rizodermisu in koreninski čepici v višji koncentraciji ter v skorji in žili v nižjih koncentracijah, medtem ko smo Ca zasledili v celotnem koreninskem vršičku, manj v žili in več v koreninski čepici (Slika 20).

Magnezij smo našli v vseh tkivih koreninskega vršička pri vseh tretmajih. Za K velja, da ga je več v žili in rizodermisu ter manj v skorji, pri tretmaju z nano CuO  $100 \text{ mg l}^{-1}$  pa se v glavnem nahaja le v žili. Žveplo je pri kontroli precej homogeno razporejen, podobno je tudi pri tretmajih s standardno obliko CuO, medtem ko se pri tretmajih z nano obliko CuO S v višjih koncentracijah nahaja v koreninski čepici in žili. Za P veljajo podobne

ugotovitve, le da se pri tretmaju standardni CuO nahaja tudi v žili v povečani koncentraciji (Slika 21).

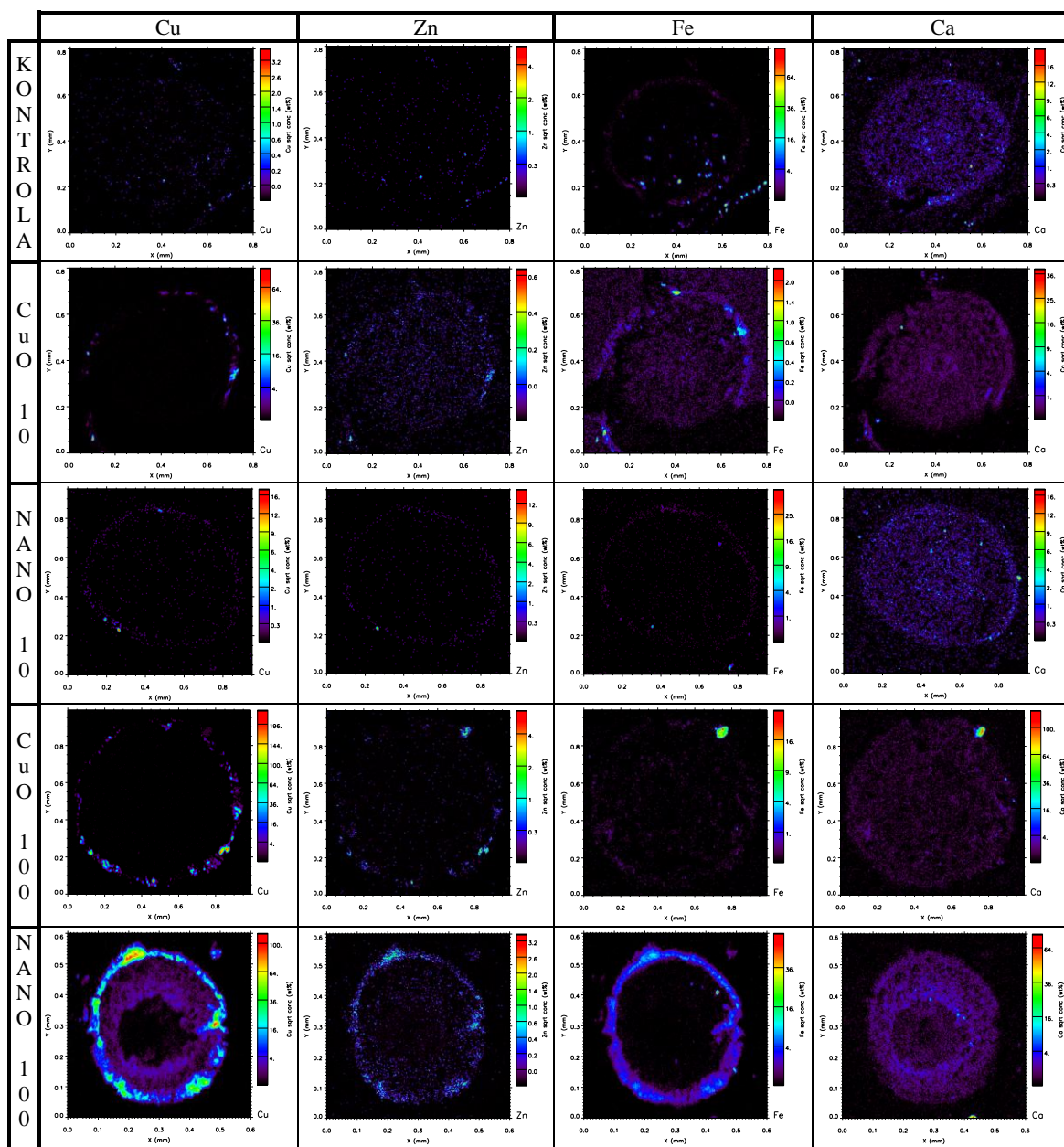


Slika 20: Mape porazdelitve elementov Cu, Zn, Fe in Ca v vzdolžnih prerezih koreninskih vršičkov sončnic, tretiranih z 10 in 100  $\text{mg l}^{-1}$  CuO v nano in standardni kemijski obliki.



Slika 21: Mape porazdelitve elementov Mg, K, P in S v vzdolžnih prerezih koreninskih vršičkov sončnic, tretiranih z 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni kemijski obliki.

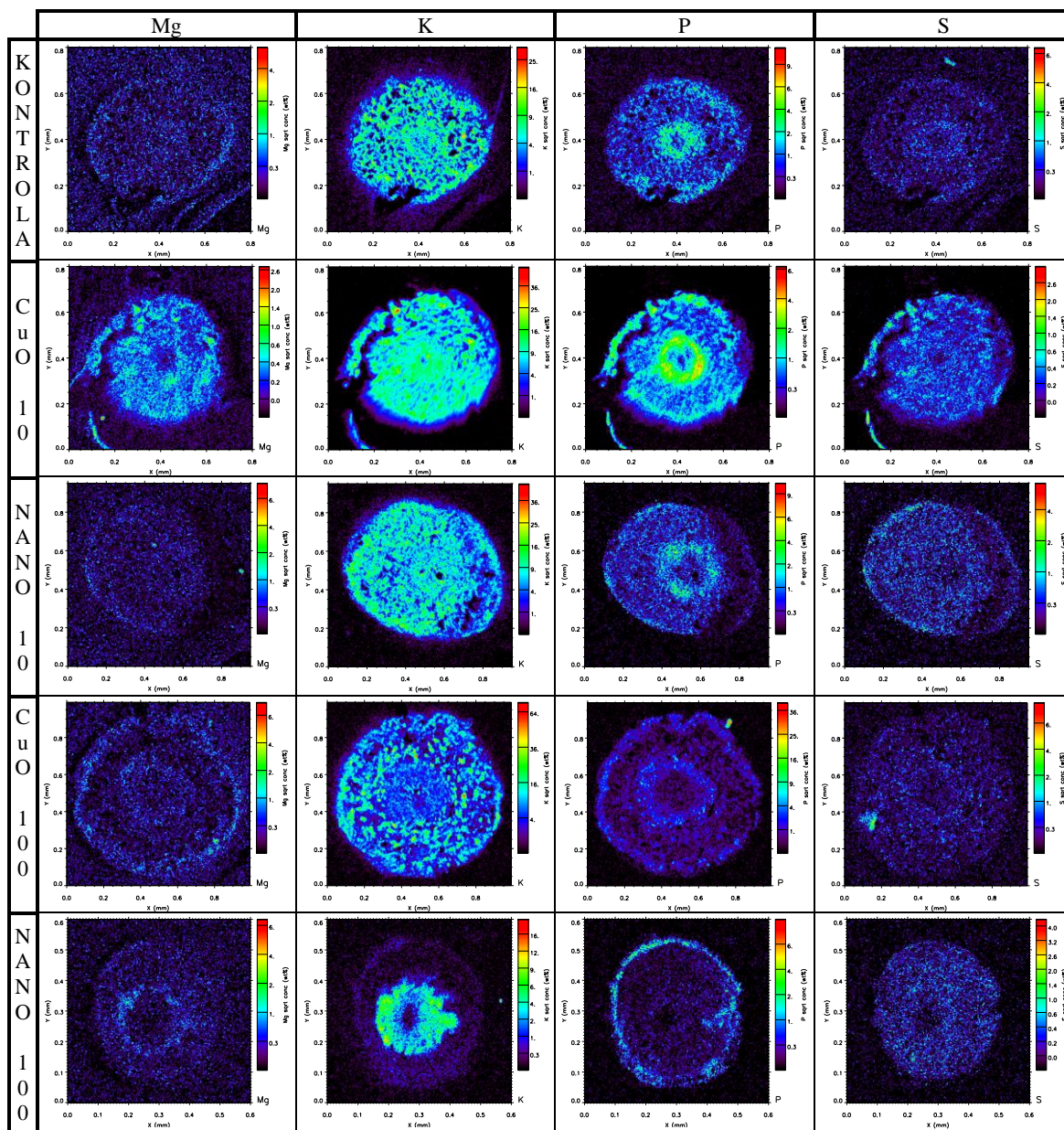
Pri prečnih prerezih zrele korenine sončnice lahko vidimo tkiva rizodermisa, skorje, endodermisa in žile, ki si sledijo od zunanosti korenine proti notranosti in so koncentrične oblike (Slika 61).



Slika 22: Mape porazdelitve elementov Cu, Zn, Fe in Ca v prečnih prerezih korenin sončnic, tretiranih z 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni kemijski obliki.

Za baker velja enako kot pri vzdolžnih prerezih koreninskih vršičkov, pri kontroli je komaj zaznaven in precej enakomerno razporejen, pri tretmajih standardnega CuO se nahaja le na in v rizodermisu v večjih skupkih, pri tretmajih z nano CuO pa se jasno vidi, da je Cu prodrl v globlja tkiva, v skorjo in se v endodermisu ustavil. Tako Fe kot Zn pri kontroli

skoraj ni bilo, pri drugih tretmajh pa se nahajata predvsem v zunanem tkivu, rizodermisu. Kalcij smo našli v vseh tkivih, razen pri nano tretmajh, kjer se je zaustavil v skorji oz. endodermisu in ga v žili ni bilo toliko kot v drugih tkivih (Slika 22).



Slika 23: Mape porazdelitve elementov Mg, K, P in S v prečnih prezihih korenin sončnic, tretiranih z 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni kemijski obliki.

Za Mg smo opazili, da se pri tretiranih rastlinah ne nahaja v žili, medtem ko pri kontrolnih rastlinah se. Kalij nam najlepše prikaže strukturno zgradbo prereza korenine. Pri kontroli in tretmajih z  $10 \text{ mg l}^{-1}$  CuO je bil K enakomerno razporejen v simplastu celotne korenine, pri tretmaju z nano CuO  $100 \text{ mg l}^{-1}$  pa se nakopiči v žili in endodermisu. Fosfor najdemo v najvišjih koncentracijah v žili, endodermisu in rizodermisu pri vseh tretmajih z izjemo tretmaja nano CuO  $100 \text{ mg l}^{-1}$ , pri katerem ga najdemo v rizodermisu, žili in v manjših koncentracijah v endodermisu. Žveplo je v koreninskih tkivih večinoma enakomerno porazdeljen, le da se pri kontroli v višjih koncentracijah nahaja v žili, medtem ko so pri ostalih tretmajih koncentracije S v žili nižje kot v okoliških tkivih (Slika 23).

#### 4.2.2 Kolokalizacija elementov z bakrom

Kolokalizacijske analize smo naredili s programom ImageJ, ki izračuna kolokalizacijske faktorje na porazdelitvenih mapah različnih elementov. Kolokalizacijo najlažje definiramo s Pearsonovim korelacijskim koeficientom ( $R_r$ ), saj le-ta izključuje točke z ničelno koncentracijo obeh elementov. Vrednosti koeficienta se raztezajo od -1 do 1, kjer 1 predstavlja popolno korelacijo, -1 popolno izključevanje, 0 pa pomeni naključno razporeditev. Določili smo tudi Mandersov prekrivni koeficient ( $R$ ), katerega vrednosti se gibljejo med 1 in 0. Vrednosti blizu 1 pomenijo visoko kolokalizacijo, vrednosti blizu 0 pa nizko. Določili smo tudi Kvocient intenzitete korelacije (ICQ), ki se razteza od -0,5 do +0,5. Naključno ujemanje porazdelitve elementov je okrog 0, negativna vrednost predstavlja ločeno razporejanje, medtem ko pozitivne vrednosti predstavljajo odvisno razporeditev elementov.

Preučili smo kolokalizacijo Ca, Fe, K, Mg, Na, P, S in Zn s Cu. Pri kontrolnih koreninah imajo vsi elementi, z izjemo negativne kolokalizacije z Zn, naključno kolokalizacijo s Cu, saj je le-tega zelo malo in so vrednosti Pearsonovega korelacijskega koeficienta okoli 0. V koreninskih vršičkih tretmaja standardnega CuO  $10 \text{ mg l}^{-1}$  so vsi elementi v naključni kolokalizaciji s Cu, z izjemo pozitivne kolokalizacije s Fe, Zn in Na. Pri vršičkih tretmaja  $100 \text{ mg l}^{-1}$  standardnega CuO so vsi elementi, z izjemo negativne kolokalizacije z Zn, v naključni kolokalizaciji s Cu. Za koreninske vršičke tretmaja nano CuO  $10 \text{ mg l}^{-1}$  smo

ugotovili, da je kolokalizacija Cu in Zn, P in S negativna, vsi ostali elementi pa so v naključni kolokalizaciji s Cu. V koreninskih vršičkih tretmaja nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup> ima Cu negativno kolokalizacijo s K, Mg in Na, pozitivno kolokalizacijo pa s Ca in Fe (Preglednica 2).

Preglednica 2: Vrednosti Pearsonovega korelacijskega koeficienta (Rr), Mandersovega prekrivnega koeficienta (R) in Kvocienta intenzitete korelacije (ICQ) za Ca, Fe, K, Mg, Na, P, S in Zn s Cu v vzdolžnem prerezu koreninskega vršička sončnic, tretiranih s CuO v standardni kemijski in nano obliki.

| el. | KONTROLA |       |        | CuO 10 mg l <sup>-1</sup> |       |       | Nano CuO 10 mg l <sup>-1</sup> |       |       | CuO 100 mg l <sup>-1</sup> |       |        | Nano CuO 100 mg l <sup>-1</sup> |       |       |
|-----|----------|-------|--------|---------------------------|-------|-------|--------------------------------|-------|-------|----------------------------|-------|--------|---------------------------------|-------|-------|
|     | Rr       | R     | ICQ    | Rr                        | R     | ICQ   | Rr                             | R     | ICQ   | Rr                         | R     | ICQ    | Rr                              | R     | ICQ   |
| Ca  | -0,125   | 0,049 | 0,057  | 0,045                     | 0,107 | 0,171 | -0,055                         | 0,105 | 0,16  | -0,057                     | 0,075 | 0,22   | 0,329                           | 0,598 | 0,195 |
| Fe  | -0,123   | 0,031 | 0,266  | 0,182                     | 0,246 | 0,246 | -0,056                         | 0,062 | 0,326 | 0,053                      | 0,113 | 0,405  | 0,177                           | 0,324 | 0,173 |
| K   | -0,009   | 0,071 | 0,111  | -0,047                    | 0,036 | 0,074 | 0,033                          | 0,182 | 0,042 | -0,036                     | 0,064 | 0,138  | -0,251                          | 0,187 | 0,021 |
| Mg  | -0,015   | 0,061 | 0,054  | -0,041                    | 0,041 | 0,161 | -0,03                          | 0,144 | 0,111 | -0,054                     | 0,052 | 0,048  | -0,179                          | 0,226 | 0,046 |
| Na  | -0,085   | 0,043 | -0,056 | 0,164                     | 0,173 | 0,102 | -0,011                         | 0,145 | 0,091 | -0,079                     | 0,062 | -0,034 | -0,122                          | 0,283 | 0,053 |
| P   | 0,006    | 0,067 | 0,154  | -0,085                    | 0,017 | 0,078 | -0,134                         | 0,14  | 0,024 | -0,033                     | 0,055 | 0,119  | 0,091                           | 0,412 | 0,139 |
| S   | -0,007   | 0,061 | 0,124  | -0,057                    | 0,038 | 0,128 | -0,135                         | 0,118 | 0,095 | -0,026                     | 0,063 | 0,132  | 0,11                            | 0,422 | 0,143 |
| Zn  | -0,448   | 0,034 | -0,082 | 0,119                     | 0,247 | 0,1   | -0,293                         | 0,08  | 0,132 | -0,161                     | 0,061 | 0,184  | 0,03                            | 0,187 | 0,14  |

Preglednica 3: Vrednosti Pearsonovega korelacijskega koeficienta (Rr), Mandersovega prekrivnega koeficienta (R) in Kvocienta intenzitete korelacije (ICQ) za Ca, Fe, K, Mg, Na, P, S in Zn s Cu v prečnem prerezu zrelih korenin sončnic, tretiranih s CuO v standardni kemijski in nano obliki.

| el. | KONTROLA |       |        | CuO 10 mg l <sup>-1</sup> |       |       | Nano CuO 10 mg l <sup>-1</sup> |       |       | CuO 100 mg l <sup>-1</sup> |       |       | Nano CuO 100 mg l <sup>-1</sup> |       |       |
|-----|----------|-------|--------|---------------------------|-------|-------|--------------------------------|-------|-------|----------------------------|-------|-------|---------------------------------|-------|-------|
|     | Rr       | R     | ICQ    | Rr                        | R     | ICQ   | Rr                             | R     | ICQ   | Rr                         | R     | ICQ   | Rr                              | R     | ICQ   |
| Ca  | -0,121   | 0,055 | 0,055  | -0,005                    | 0,052 | 0,135 | -0,116                         | 0,035 | 0,077 | -0,035                     | 0,023 | 0,234 | -0,052                          | 0,147 | 0,144 |
| Fe  | 0,211    | 0,285 | 0,312  | 0,073                     | 0,123 | 0,302 | -0,073                         | 0,047 | 0,325 | -0,058                     | 0,024 | 0,355 | 0,668                           | 0,74  | 0,392 |
| K   | -0,021   | 0,068 | 0,108  | -0,051                    | 0,033 | 0,006 | -0,026                         | 0,055 | 0,064 | -0,025                     | 0,059 | 0,118 | -0,164                          | 0,067 | 0,157 |
| Mg  | -0,095   | 0,043 | 0,019  | -0,063                    | 0,014 | 0,11  | -0,087                         | 0,028 | 0,06  | -0,07                      | 0,056 | 0,061 | -0,125                          | 0,11  | 0,158 |
| Na  | -0,112   | 0,053 | -0,064 | 0,037                     | 0,076 | 0,144 | -0,108                         | 0,042 | 0,002 | 0,531                      | 0,455 | 0,219 | 0,206                           | 0,393 | 0,268 |
| P   | -0,053   | 0,053 | 0,142  | -0,077                    | 0,008 | 0,106 | -0,081                         | 0,026 | 0,102 | -0,072                     | 0,033 | 0,148 | 0,256                           | 0,404 | 0,265 |
| S   | -0,079   | 0,052 | 0,073  | -0,066                    | 0,02  | 0,116 | -0,077                         | 0,031 | 0,089 | -0,098                     | 0,027 | 0,098 | -0,128                          | 0,099 | 0,162 |
| Zn  | -0,194   | 0,189 | 0,053  | 0,206                     | 0,287 | 0,163 | 0,48                           | 0,583 | 0,058 | 0,389                      | 0,466 | 0,309 | 0,396                           | 0,462 | 0,301 |

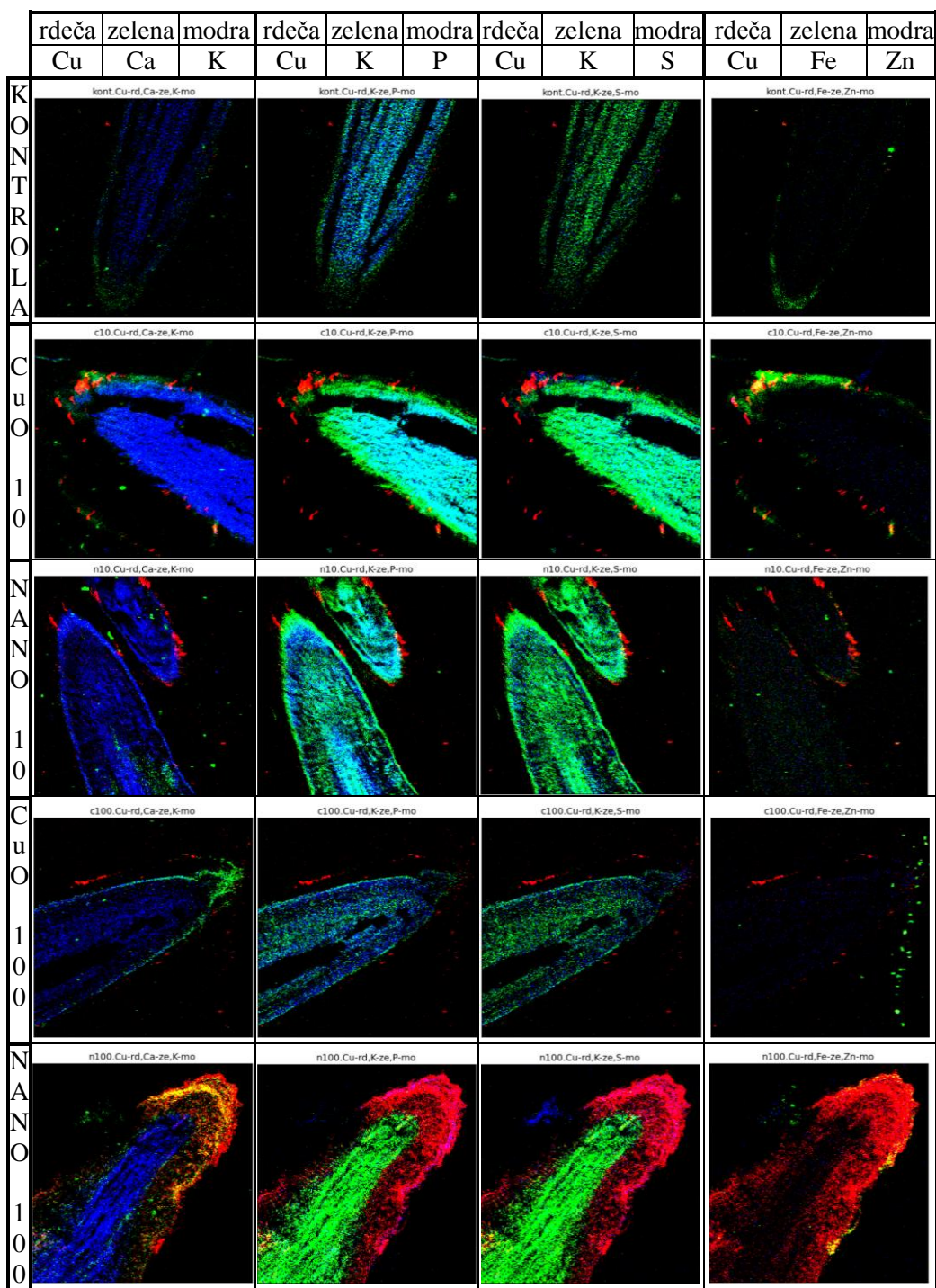


V prečnem prerezu zrele korenine ima pri kontrolni korenini Cu pozitivno kolokalizacijo s Fe in negativno kolokalizacijo z Zn. Ostali elementi so naključno porazdeljeni. Pri tretmaju  $10 \text{ mg l}^{-1}$  standardnega CuO ima Cu v zreli korenini pozitivno kolokalizacijo z Zn, pri tretmaju s standardnim CuO  $100 \text{ mg l}^{-1}$  z Na in Zn, ostali elementi so v naključni kolokalizaciji. Za prečni prerez zrele korenine tretmaja nano CuO  $10 \text{ mg l}^{-1}$  velja, da je Cu v pozitivni kolokalizaciji le z Zn, pri tretmaju nano CuO  $100 \text{ mg l}^{-1}$  pa s Fe, Na, P in Zn, ostali elementi pa so naključno porazdeljeni glede na lokalizacijske mape Cu (Preglednica 3).

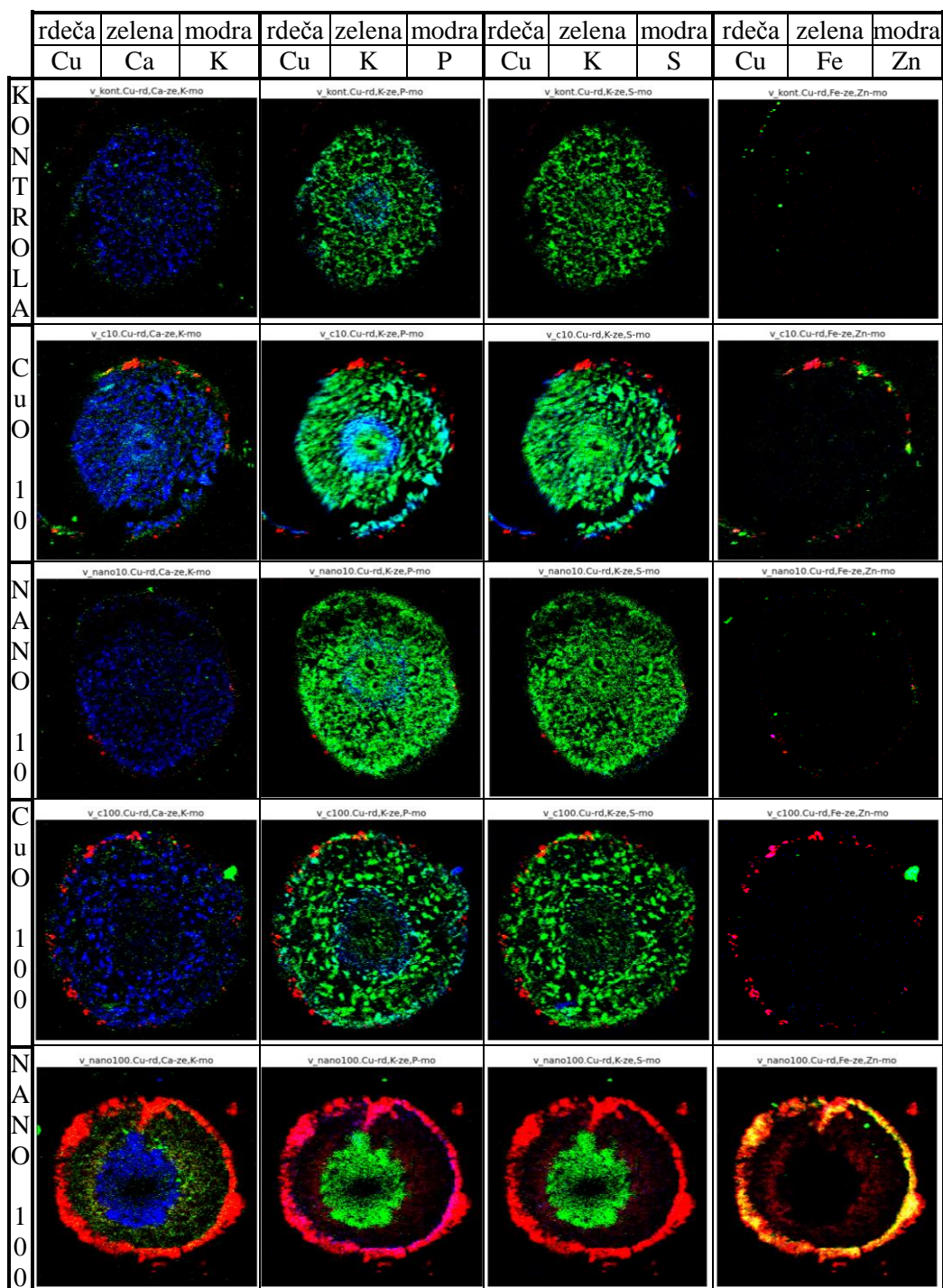
Korelacijo različnih elementov s Cu smo preučili tudi s programom Statistica 7, ki nam je izračunal Pearsonov korelacijski faktor (Priloga D).

Kolokalizacijske slike elementov smo naredili z računalniškim programom PyMca. Vsakemu elementu smo določili en RGB kanal, Cu je bil vedno rdeč, Ca, K (v 2. in 3. kombinaciji elementov) in Fe zeleni, K (v 1. kombinaciji elementov), P, S in Zn pa modri (Slika 24, Slika 25). Kolokalizacija Cu z elementom zelene barve nam da rumeno oz. oranžno barvo, kolokalizacija Cu z elementom modre barve pa nam da rožnato barvo. Opazovali smo kolokalizacijo Cu s Ca, K, P, S, Fe in Zn.

Najprej smo naredili kolokalizacijske mape na vzdolžnih prerezih koreninskih vršičkov različnih tretmajev (Slika 24). Pri prvi kombinaciji smo opazili, da Cu kolokalizira s Ca v rizodermisu, le pri nano CuO  $100 \text{ mg l}^{-1}$  se Cu nahaja tudi v skorji, kjer kolokalizira s Ca. Za kombinacijo Cu s K in P, smo opazili, da P in K kolokalizirata v žili z izjemo tretmaja nano CuO  $100 \text{ mg l}^{-1}$ , kjer P kolokalizira v rizodermisu s Cu in ga v žili ni. Za kombinacijo elementov Cu s K in S velja enako, le da S kolokalizira s Cu poleg rizodermisa pri vseh tretmajih, tudi v skorji pri tretmaju nano CuO  $100 \text{ mg l}^{-1}$ . Za četrto kombinacijo elementov velja, da se v vseh tretmajih, z izjemo nano CuO  $100 \text{ mg l}^{-1}$ , Cu nahaja na rizodermisu v skupkih, kjer kolokalizira s Fe, Zn pa se nahaja bolj v notranjih tkivih, razen pri tretmaju standardni CuO  $100 \text{ mg l}^{-1}$ , kjer je Zn v nenaravni ravnini poleg koreninskega vršička. Za nano CuO  $100 \text{ mg l}^{-1}$  velja, da se Zn nahaja po celotnem vršičku, Cu in Fe pa kolokalizirata v rizodermisu in koreninski čepici.



Slika 24: Kolokalizacijske slike elementov v tkivih koreninskih vršičkov sončnic (*H. annuus*) pri kontroli in tretmajih 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v standardni kemijski in nano obliki. Oranžna barva pomeni kolokalizacijo elementov na rdečem in zelenem kanalu, roza barva pa kolokalizacijo elementov na rdečem in modrem kanalu.



Slika 25: Kolokalizijske slike elementov v prečnih prerezih zrelih korenin sončnic (*H. annuus*) pri kontroli in tretmajih 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v standardni in nano obliki. Oranžna barva pomeni kolokalizacijo elementov na rdečem in zelenem kanalu, roza barva pa kolokalizacijo elementov na rdečem in modrem kanalu.

Pri kolokalizacijskih mapah prečnih prerezov zrelih korenin različnih tretmajev (Slika 25), smo opazili, da pri kontroli Cu ne moremo lokalizirati, pri tretmajih standardni CuO 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> in tretmaju nano CuO 10 mg l<sup>-1</sup> se nahaja v skupkih na in v rizodermisu, pri tretmaju nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup> pa se Cu pojavlja v rizodermisu in v skorji, z višjo koncentracijo proti endodermisu. Ca pri tretmajih s standardnim CuO kolokalizira s Cu v rizodermisu, pri tretmaju nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup> pa tudi v skorji. Cu s K kolokalizira minimalno le pri tretmaju nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup> v zunanjem delu skorje. Za P velja, da kolokalizira s Cu le pri tretmaju nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup>, in sicer le v rizodermisu in zunanjem delu skorje. Pri kolokalizaciji Cu s Fe in Zn smo ugotovili, da se vsi trije elementi nahajajo pretežno v rizodermisu, kjer se v skupkih Cu pojavlja tudi Zn, pri tretmaju nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup> pa je v rizodermisu veliko Fe, ki kolokalizira s Cu.

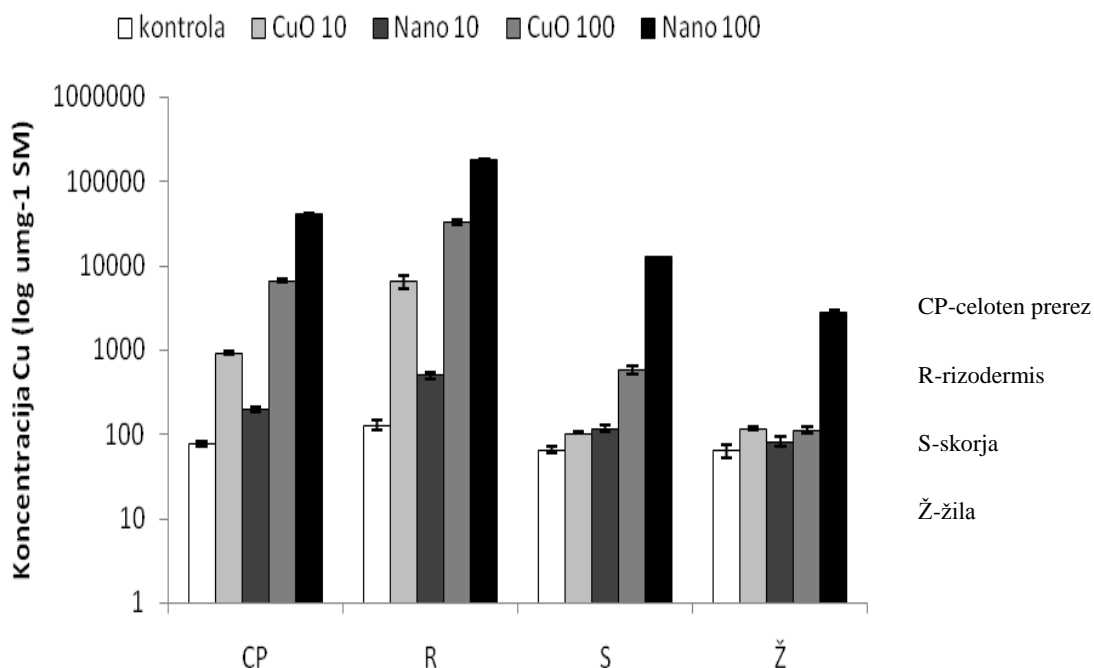
### 4.2.3 Koncentracija elementov v tkivih

Koncentracije elementov po tkivih smo izračunali na podlagi kvantitativnih mikro-PIXE porazdelitvenih map elementov, kjer smo na porazdelitveni mapi vsake rezine s programom MacBiophotonics ImageJ obkročili regije posameznih tkiv, značilne za posamezna tkiva, in izračunali koncentracije elementov v posameznem tkivu.

#### 4.2.3.1 Baker (Cu)

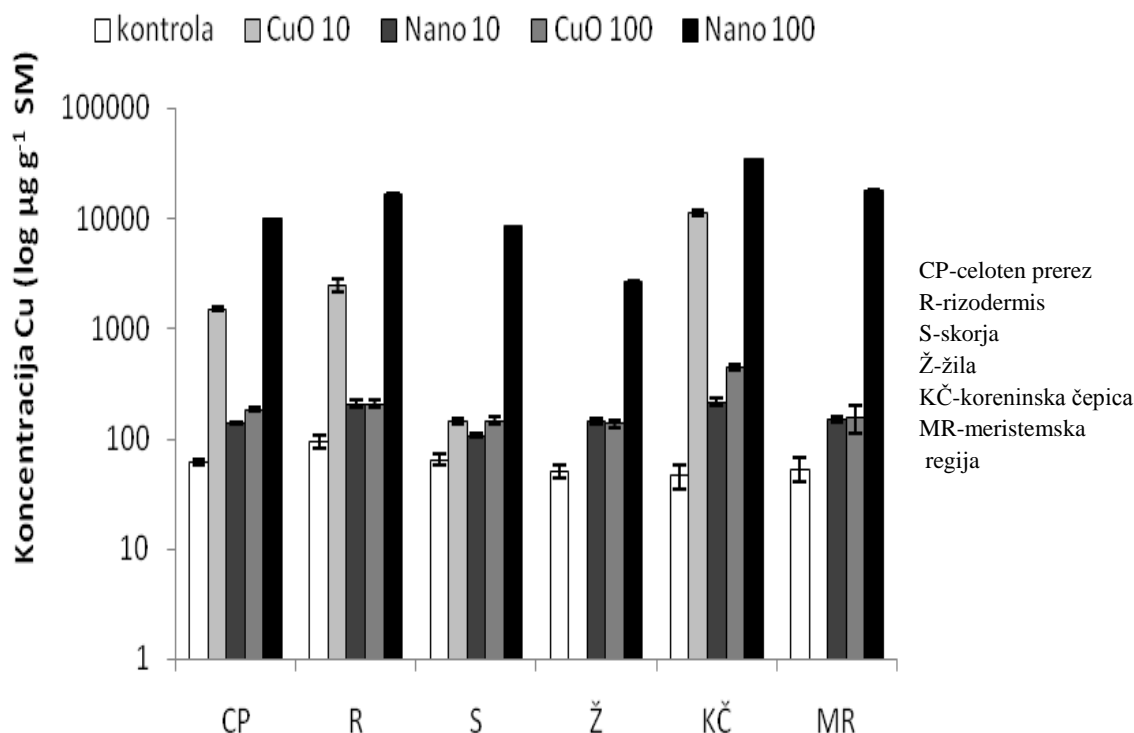
Koncentracija bakra je v vseh tkivih, tako na prečnem (Slika 26) kot vzdolžnem (Slika 27) prerezu najvišja pri tretmaju z nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup>. Pri zreli korenini mu sledi tretma standardnega CuO 100 mg l<sup>-1</sup>, pri koreninskem vršičku pa tretma standardnega CuO 10 mg l<sup>-1</sup>. Pri kontroli so povsod najnižje koncentracije Cu. Koncentracija Cu je pri kontroli v vseh tkivih stalna in se ne spreminja. V prečnem prerezu se največ Cu nahaja v rizodermisu (Slika 26). Največ Cu v rizodermisu je v korenini tretmaja nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup>, sledi mu korenina tretmaja CuO 100 mg l<sup>-1</sup>, nato CuO 10 mg l<sup>-1</sup>, najmanj od tretiranih rastlin pa ima korenina nano CuO 10 mg l<sup>-1</sup>. Drugo tkivo z največ Cu je skorja, kjer ima največ Cu nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup>, sledijo mu CuO 100 mg l<sup>-1</sup>, nano CuO 10 mg l<sup>-1</sup>, najmanj od tretiranih pa ima CuO 10 mg l<sup>-1</sup>. V žilo zrele korenine je največ Cu prišlo pri tretiranju z

nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup>, vsi ostali tretmaji pa so si pri koncentraciji zelo podobni in imajo nižjo koncentracijo Cu v primerjavi z najskrajnejšim tretmajem.



Slika 26: Koncentracija Cu ( $\mu\text{g g}^{-1}$  SM) s standardno napako na logaritemski skali v posameznih tkivih prečnega prereza zrele kontrolne korenine in korenin tretiranih z 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni kemijski obliki.

V posameznih tkivih koreninskega vršička kontrole so koncentracije Cu stalne in najnižje v primerjavi z drugimi tretmaji (Slika 27). Največ Cu se nahaja v koreninski čepici vršička tretmaja nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup>, po koncentraciji najbližje mu je koreninska čepica tretmaja CuO 10 mg l<sup>-1</sup>, sledita mu tretmaja CuO 100 mg l<sup>-1</sup> in nano CuO 10 mg l<sup>-1</sup>. Rezultati so podobni v rizodermisu. V skorji ima najvišjo koncentracijo Cu vršiček tretmaja nano CuO mg l<sup>-1</sup>, medtem ko so koncentracije Cu v skorji pri drugih tretmajih okoli 100-krat nižje in med seboj primerljive. Za žilo in meristemsko regijo podatka za tretma CuO 10 mg l<sup>-1</sup> nimamo, a trend ostaja enak: največ Cu je v vršičkih tretiranih z nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup>, 10- do 100-krat nižje pa so koncentracije Cu v vršičkih tretmaja CuO 100 mg l<sup>-1</sup> in nano CuO mg l<sup>-1</sup>.



Slika 27: Koncentracija Cu ( $\mu\text{g g}^{-1}$  SM) s standardno napako na logaritemski skali v tkivih vzdolžnega prereza koreninskega vršička kontrolne korenine in korenin tretiranih z 10 in 100  $\text{mg l}^{-1}$  CuO v nano in standardni kemijski obliki. Pri tretmaju CuO 10  $\text{mg l}^{-1}$  manjkajo podatki s področja žile in meristemske regije, saj ju ni bilo možno določiti glede na vzdolžni prerez.

#### 4.2.3.2 Cink (Zn)

Koncentracije Zn so na prečnem prerezu zrele korenine najnižje pri kontroli, najvišje pa pri tretmaju nano CuO 100  $\text{mg l}^{-1}$ . Koncentracije Zn v tkivih so med tretmajema nano CuO 10  $\text{mg l}^{-1}$  in standardni CuO 100  $\text{mg l}^{-1}$  primerljive. V koreninskem vršičku se koncentracija Zn v koreninski čepici in meristemi regiji najvišje pri tretmaju nano CuO 100  $\text{mg l}^{-1}$ , najnižje pa pri kontroli. V žili koncentracija Zn pada z naraščajočo koncentracijo CuO (Priloga E).

#### 4.2.3.3 Železo (Fe)

Na prečnem prerezu ima najvišjo koncentracijo Fe v celotnem prerezu, rizodermisu in skorji tretma nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup>, medtem ko ima v žili največ Fe kontrola. Oba tretmaja s koncentracijo 10 mg l<sup>-1</sup> CuO sta primerljiva, tretma s 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v standardni obliki pa ima od njiju več Fe v rizodermisu in gledano celokupno. Pri vršičku ni splošnega trenda, v celotnem prerezu, skorji, žili in koreninski čepici ima največ Fe vršiček standardnega CuO 100 mg l<sup>-1</sup>, v rizodermisu vršiček iz hranilne raztopine s 100 mg l<sup>-1</sup> nano CuO, v meristemski regiji pa vršiček nano 10 mg l<sup>-1</sup> (Priloga F).

#### 4.2.3.4 Kalcij (Ca)

V zreli korenini velja trend, da ima tretma CuO 10 mg l<sup>-1</sup> manj Ca kot kontrola. Kontrolni sledijo tretmaji z nano 10 mg l<sup>-1</sup>, standardni CuO 100 mg l<sup>-1</sup> po naraščajoči koncentraciji. Najvišje koncentracije v vseh tkivih ima tretma nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup>. Prav tako ima najvišje koncentracije v vršičku v vseh tkivih tretma nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup> (Priloga G).

#### 4.2.3.5 Kalij (K)

Koncentracija K se z 10 mg l<sup>-1</sup> CuO zvišuje v vseh tkivih z izjemo rizodermisa. Najnižje koncentracije K, nižje od kontrole, ima v vseh tkivih rastlina najskrajnejšega tretmaja, nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup>. V vršičku se v rizodermisu, skorji, koreninski čepici in meristemski regiji koncentracija K s skrajnostjo tretmaja znižuje, z izjemo žile, kjer se pokaže obratni trend in se tu koncentracija K v tretmajih z nano CuO povečuje (Priloga H).

#### 4.2.3.6 Fosfor (P)

Za rizodermis v zreli korenini smo opazili, da imata tretmaja s koncentracijo 10 mg l<sup>-1</sup> CuO obeh oblik nižjo koncentracijo P kot kontrola, višjo pa imata tretmaja s 100 mg l<sup>-1</sup> CuO obeh oblik. V skorji ima največ P kontrola, koncentracija P pada do tretmaja nano CuO

100 mg l<sup>-1</sup>, ki ga ima najmanj. Isti trend se pokaže v žili ter v skorji vršička. V vršičku se koncentracija P v primerjavi s kontrolo pri tretmaju nano 100 mg l<sup>-1</sup> zelo zniža (Priloga I).

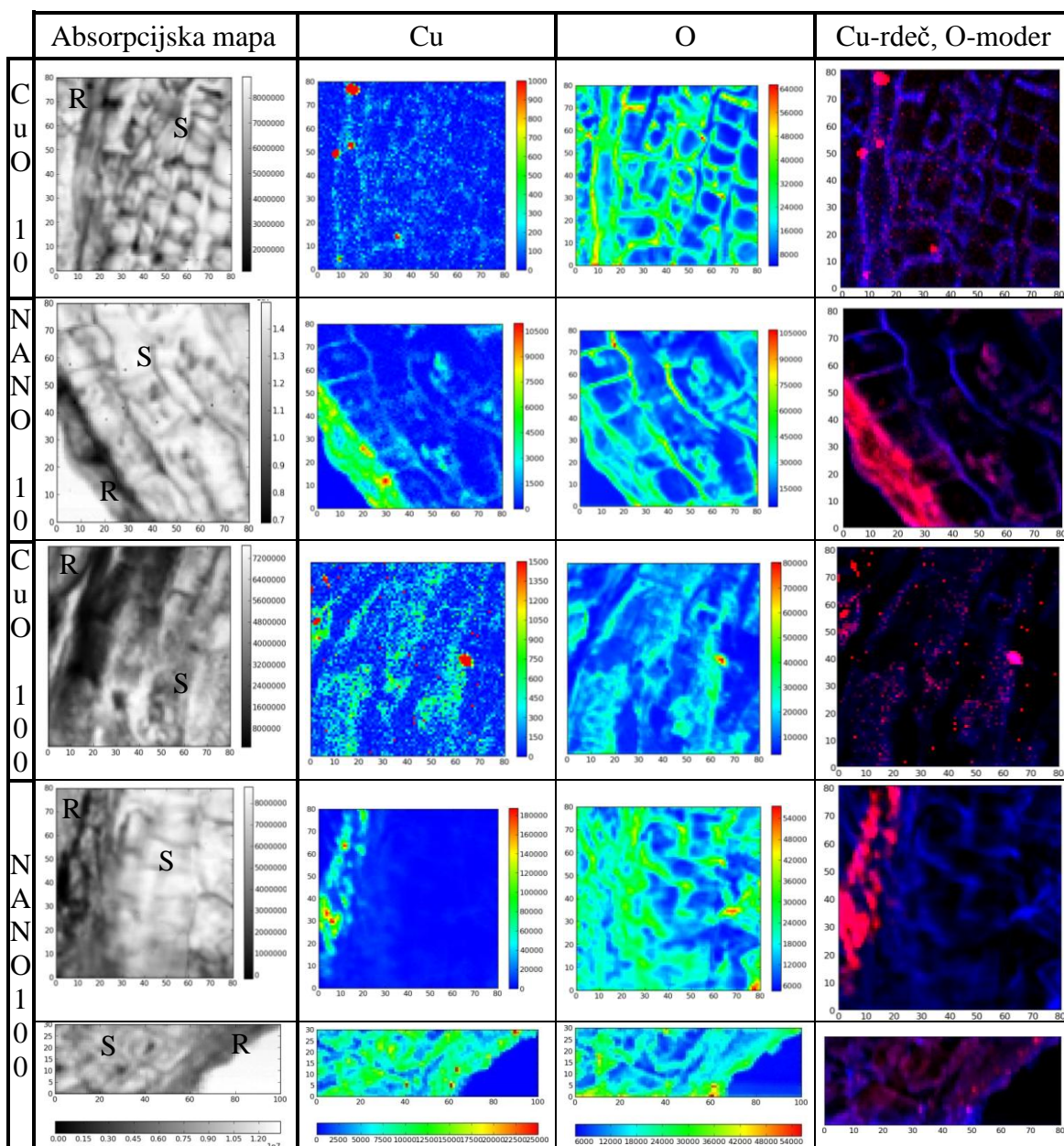
#### 4.2.3.7 Žveplo (S)

Na prečnem prerezu zrele korenine smo žveplo locirali v največji koncentraciji v žili le pri kontroli (Priloga J), pri tretmaju nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup> se je koncentracija S v vseh tkivih znižala, z izjemo koreninske čepice. Žveplo se koncentrira v endodermisu, v koreninskem vršičku nahaja se tudi v žili, pri tretmaju z nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup> pa tudi v rizodermisu (Slika 21, Slika 23).

#### **4.2.4 Lokalizacija bakra in kisika ter njuna kolokalizacija na celičnem nivoju z metodo LEXRF**

Porazdelitvene mape nam pokažejo, da se pri koreninah, tretiranih s standardnim kemijskim CuO, Cu nahaja v skupkih, saj na mapi opazimo posamezne točke oz. manjša območja z visoko koncentracijo Cu. Pri koreninah, tretiranih z nanodelci CuO, opazimo, da je Cu bolj homogeno razporejen, a so večje koncentracije na zunanji strani celičnih sten rizodermisa (Slika 28). Kisik se pri vseh koreninah nahaja tako v simplastu kot v apoplastu, kisikova mapa pa dobro sovпада z absorpcijsko mapo, ki nam prikazuje strukturo mikronske rezine. Ko združimo kisikovo in bakrovo porazdelitveno mapo, je očitno, da pri koreninah tretmajev z nanodelci CuO elementa kolokalizirata, kar nam nakazuje, da nanodelci CuO ostanejo v tej obliki. Vidni so tudi v notranjosti celic (Slika 28).





Slika 28: Slike lokalizacije Cu in O, ter v tretjem stolpcu kolokalizacije Cu (rdeč) in O (moder) na celičnem nivoju v vzdolžnih prerezi koreninskih vršičkov sončnic (*H. annuus*), tretiranih z 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v standardni in nano obliki (legenda oznak na mapah: R=rizodermis, S=skorja).

### 4.3 DOLOČANJE KONCENTRACIJ BAKRA V KORENINAH IN POGANJKIH (TXRF)

Koncentracija bakra je bila v poganjkih od 64-99,8 % nižja v primerjavi s koreninami. Faktorska analiza variance je pokazala, da na koncentracijo bakra v koreninah vpliva koncentracija CuO v hranilni raztopini in sicer pozitivno (Preglednica 4.a, Priloga A). Pri poganjkih faktorska analiza variance ni pokazala ne statističnega vpliva koncentracije bakrovega oksida ne oblike delca, kot tudi ne njune interakcije (Preglednica 4.b).

Preglednica 4: Rezultati faktorске analize za koncentracijo Cu v koreninah (a) in poganjkih (b), tretiranih s CuO v standardni kemijski in nano obliki, ki smo jo opravili s programom Faktorska ANOVA. Statistično značilne vplive prikazujejo odebeljene črke.

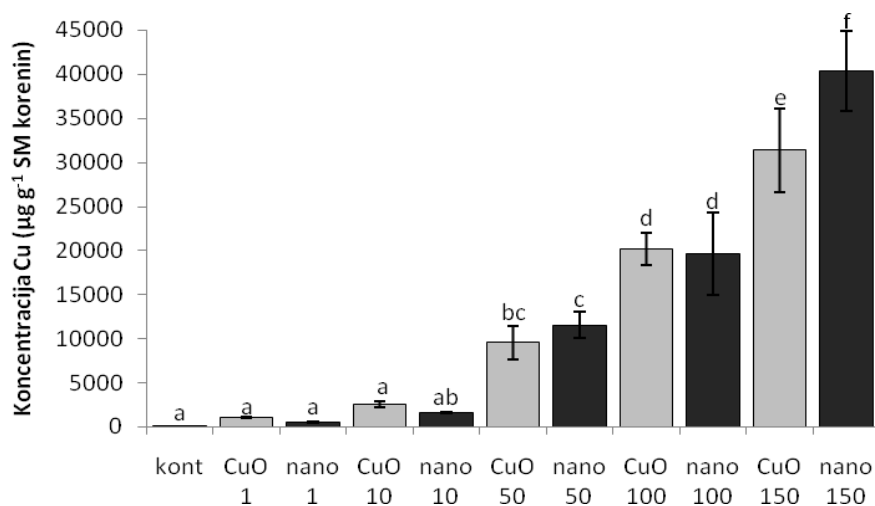
| a)   | SS                  | Prostostne stopnje | MS                  | F              | p               |
|--|---------------------|--------------------|---------------------|----------------|-----------------|
| <b>Koncentracija (mg l<sup>-1</sup>)</b>       | <b>1,009978E+10</b> | <b>4</b>           | <b>2,524946E+09</b> | <b>57,1608</b> | <b>0,000000</b> |
| Oblika CuO                                     | 4,790590E+07        | 1                  | 4,790590E+07        | 1,0845         | 0,302699        |
| Koncentracija (mg l <sup>-1</sup> )*Oblika CuO | 2,089085E+08        | 4                  | 5,222712E+07        | 1,1823         | 0,329970        |
| Napaka   | 2,208635E+09        | 50                 | 4,417269E+07        |                |                 |

| b)   | SS       | Prostostne stopnje | MS     | F        | p        |
|--|----------|--------------------|--------|----------|----------|
| Koncentracija (mg l <sup>-1</sup> )            | 1050021  | 4                  | 262505 | 0,943243 | 0,447385 |
| Oblika CuO                                     | 715615   | 1                  | 715615 | 2,571374 | 0,115513 |
| Koncentracija (mg l <sup>-1</sup> )*Oblika CuO | 1420427  | 4                  | 355107 | 1,275983 | 0,292832 |
| Napaka   | 13080127 | 47                 | 278301 |          |          |

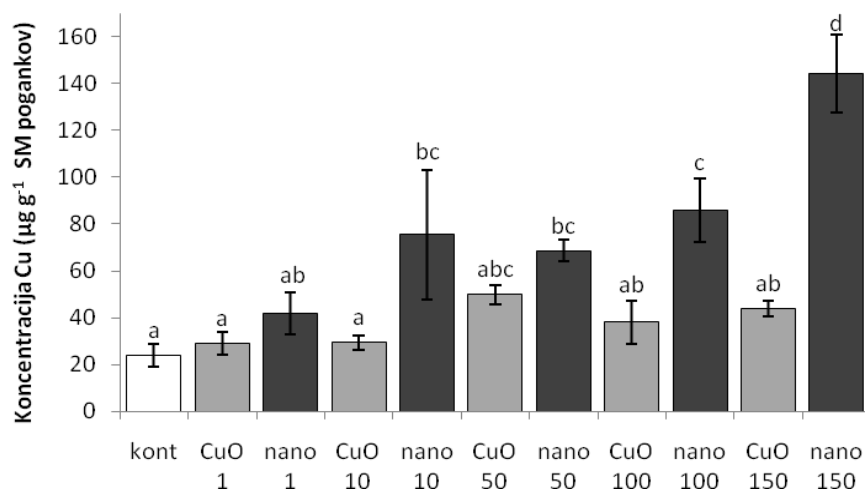
V koreninah je s povečanjem koncentracije CuO v raztopini naraščala tudi koncentracija Cu v tkivih. Statistično značilne razlike v koncentraciji Cu med kontrolnimi in tretiranimi rastlinami so bile opazne le pri koncentracijah nad 50 mg l<sup>-1</sup> hranilne raztopine. Razlike med nano in standardno obliko CuO so bile statistično značilne pri koncentraciji 150 mg l<sup>-1</sup>, kjer je bila koncentracija Cu v koreninah, tretiranih z nano obliko, 38 % večja kot v koreninah, tretiranih s standardno obliko CuO (Slika 29.a).

Tudi koncentracija Cu v pogankjih je s povečano koncentracijo CuO v raztopini naraščala. Statistično značilne razlike so bile le pri nano obliki CuO pri koncentracijah, višjih od 1 mg l<sup>-1</sup> CuO. Pri koncentracijah 100 in 150 mg l<sup>-1</sup> CuO pri obeh oblikah je bila razlika statistično značilna (p<0,05) (Slika 29.b).

a)



b)



Slika 29: Koncentracija Cu v koreninah (a) in pogankjih (b) pri kontrolnih rastlinah in rastlinah tretiranih z 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni kemijski obliki. (povprečje ± SN, N=4). Okrajšava kont=kontrola, CuO=standardna oblika CuO, nano=nano oblika CuO. Različne črke označujejo statistično značilno razliko med tretmaji (enosmerna ANOVA, Duncan's test, p<0,05).

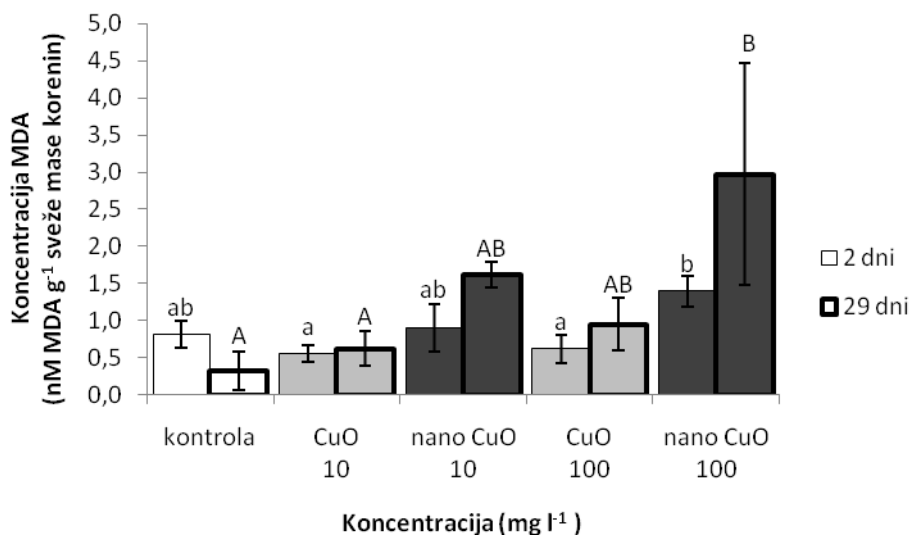
#### 4.4 LIPIDNA PEROKSIDACIJA

Koncentracija MDA lipida je v koreninah tretiranih rastlin naraščala s povečujočo koncentracijo CuO v hranilni raztopini (Slika 30). Koncentracija MDA lipida je bila višja pri tretmaji z nano obliko CuO v primerjavi s tretmaji s standardno obliko CuO.

Z izjemo kontrole so bile koncentracije MDA lipida pri rastlinah, starih 29 dni, višje kot pri dva dni starih rastlinah (Slika 30).

Statistično značilne razlike so bile opazne tako pri dva kot pri 29 dni starih rastlinah le pri tretmaju nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup> (p<0,05) (Preglednica 5, Priloga C).

V poganjkih med tretmaji nismo zaznali statistično značilnih razlik v koncentraciji MDA lipida. Povprečna koncentracija MDA lipida je bila v poganjkih po dveh dneh tretiranja 1,19 nM MDA g<sup>-1</sup> sveže mase (SN± 0,29). Po 29 dneh pa je povprečna koncentracija MDA lipida v poganjkih narasla na 2,51 nM MDA g<sup>-1</sup> sveže mase (SD± 1,25), še vedno pa ni bilo opaziti statističnih razlik med tretmaji, ker je bila variabilnost podatkov precejšnja.



Slika 30: Koncentracije MDA lipida v koreninah sončnic (*H. annuus*), pri netretiranih (kontrola) ali tretiranih z 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki na hidroponski raztopini. Prikazane so povprečne vrednosti (kontrola N=2, ostali tretmaji N=3). Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilno razliko med tretmaji (enosmerna ANOVA, LSD test, p<0,05).

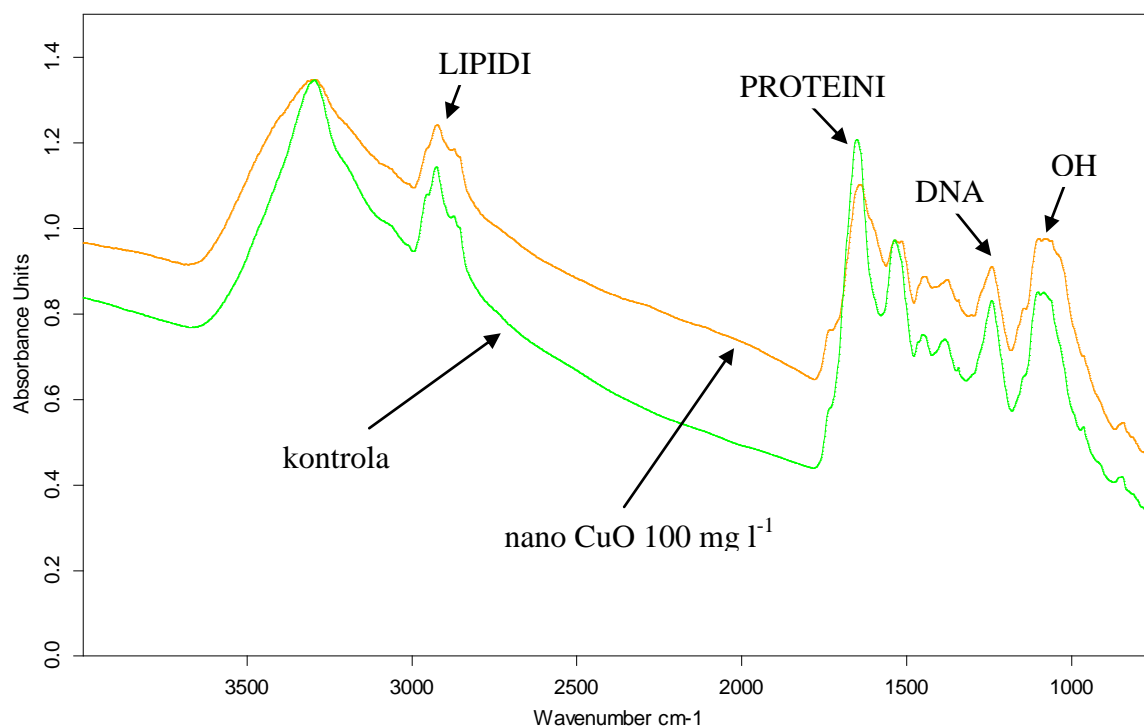
Preglednica 5: Rezultati faktorjske analize za koncentracijo MDA lipida v koreninah sončnic, tretiranih 2 dni (a) in 29 dni (b) s CuO v standardni kemijski in nano obliki. Analizo smo opravili s programom Statistica 7. Statistično značilne vplive prikazujejo odebeljene črke. Pri 29 dneh tretiranih rastlinah nismo opazili statistično značilnega vpliva.

| a)   | SS              | Prostostne stopnje | MS              | F             | p               |
|--|-----------------|--------------------|-----------------|---------------|-----------------|
| <b>Oblika CuO</b>                              | <b>0,937912</b> | <b>1</b>           | <b>0,937912</b> | <b>6,4381</b> | <b>0,034855</b> |
| Koncentracija (mg l <sup>-1</sup> )            | 0,234478        | 1                  | 0,234478        | 1,60952       | 0,240227        |
| Oblika CuO*Koncentracija (mg l <sup>-1</sup> ) | 0,138744        | 1                  | 0,138744        | 0,95238       | 0,357697        |
| Napaka   | 1,165453        | 8                  | 0,145682        |               |                 |

| b)   | SS       | Prostostne stopnje | MS      | F       | p        |
|--|----------|--------------------|---------|---------|----------|
| Oblika CuO                                     | 6,79847  | 1                  | 6,79847 | 3,72978 | 0,089546 |
| Koncentracija (mg l <sup>-1</sup> )            | 2,11030  | 1                  | 2,11030 | 1,15775 | 0,313307 |
| Oblika CuO*Koncentracija (mg l <sup>-1</sup> ) | 0,79917  | 1                  | 0,79917 | 0,43844 | 0,526487 |
| Napaka   | 14,58203 | 8                  | 1,82275 |         |          |

#### 4.5 BIOKEMIJSKE SPREMEMBE

Biokemijske spremembe smo skušali določiti z dvema metodama. Najprej s FTIR spektroskopijo, kjer smo z infrardečo svetlobo posneli spektre posušenega zmletega materiala celotnih korenin, koreninskih vršičkov in listov s poganjkov. Nato pa smo na sinhrotronski žarkovni liniji SISSI, Elettra, Trst, posneli infrardeče spektre posameznih tkiv na mikronskih rezinah korenin in koreninskih vršičkov. Razlike med spektroma, posnetima na koreninah kontrole in koreninah, tretiranih s 100 mg l<sup>-1</sup> nano CuO, so opazne že na prvi pogled (Slika 31).



Slika 31: Primerjava spektrov skorje prečnega prereza zrele korenine kontrole (zelena) in tretmaja nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup> (oranžna), posnetih z infrardečo svetlobo na žarkovni liniji SISSI (sinhrotron Elettra).

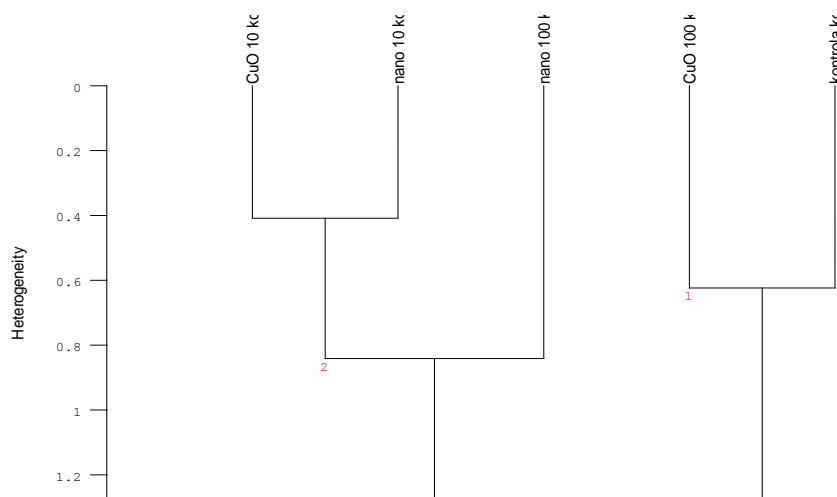
#### 4.5.1 FTIR analize poganjkov, korenin in koreninskih vršičkov

Posnete spektre vzorcev smo obdelali s pomočjo računalniškega programa OPUS 6.5 (Bruker Optik GmbH 1997-2007). Vsem spektrom smo odvedli vodo, jih normalizirali ter odrezali šum od 600 do 750 cm<sup>-1</sup>. Za vsako skupino vzorca (korenine, koreninski vršički, listi s poganjki) smo izvedli klustersko analizo podobnosti in s spektrov odčitali višino 4 vrhov - en za lipide (med 3020 in 2650 cm<sup>-1</sup>), en za proteine (med 1715 in 1570 cm<sup>-1</sup>), en za ogljikove hidrate (1190 in 983 cm<sup>-1</sup>) in en vrh za DNA (1307 in 1184 cm<sup>-1</sup>). Iz višine vrhov izbranih trakov smo izračunali razmerja med lipidi/proteini, ogljikovimi hidrati/proteini, lipidi/ogljikovimi hidrati in proteini/DNA (glej Poglavlje 3.9.4).

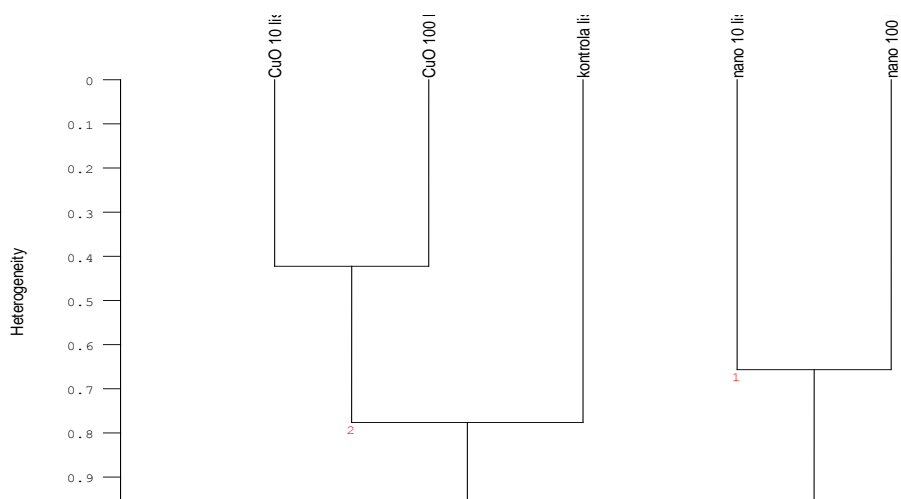
Z uporabo klusterske analize podobnosti spektrov korenin smo ugotovili, da sta si med seboj najbolj podobna spektra tretmajev z 10 mg l<sup>-1</sup> CuO v obeh oblikah, podobna pa sta si tudi tretmaja kontrole in standardnega CuO 100 mg l<sup>-1</sup>. Spektre korenin tretmaja nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup> pa po obliki močno odstopa od drugih (Slika 32.a).

Za liste velja, da sta si med seboj najbolj podobna spektra listov z rastlin, tretiranih s standardnim CuO, njima podobna je kontrola, tretmaja z nano obliko CuO pa se od ostalih ločita (Slika 32.b).

a)



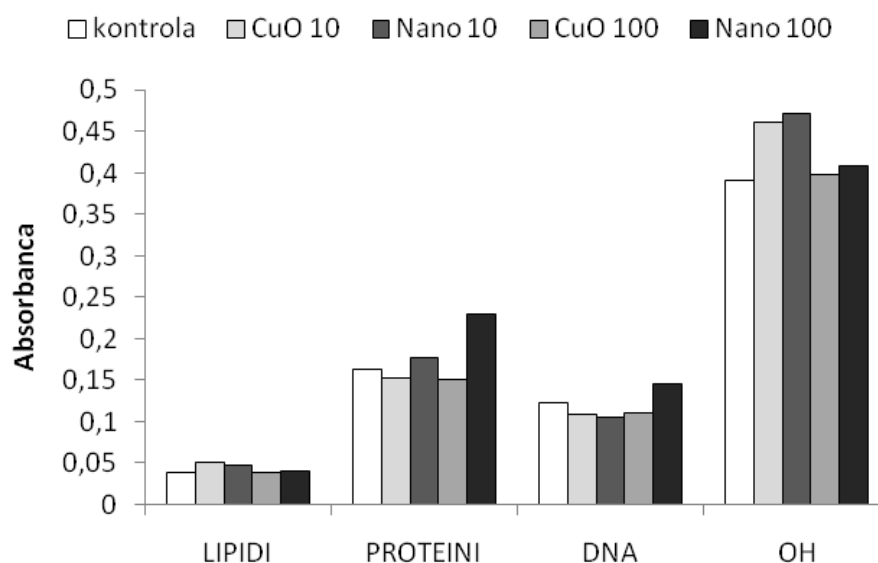
b)



Slika 32: Klusterska analiza za FTIR spektre stisnjenih tabletk iz liofiliziranih in uprašenih korenin (a) in listov poganjkov (b) sončnic kontrole, tretmaja CuO standardne oblike 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> ter tretmaja nano CuO 10 in 100 mg l<sup>-1</sup>.

Meritev spektra je bila opravljena na enem homogenem kompozitnem vzorcu, zato statistična analiza ni mogoča, opazili pa smo določene trende. Pri analizi spektrov korenin

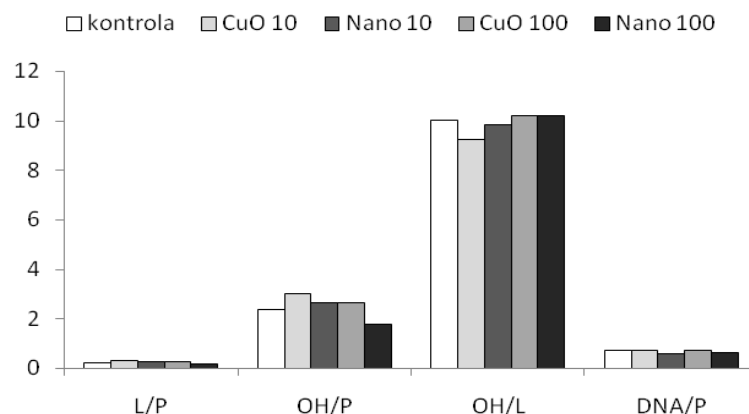
smo opazili, da se količina lipidov med tretmaji ne spreminja bistveno (Slika 33). Pri tretmajih z nanodelci CuO se poveča količina proteinov, medtem ko je pri tretmajih s standardno kemijsko obliko CuO količina proteinov primerljiva s kontrolo. Količina DNA se rahlo poveča le pri tretmaju nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup>. Ogljikovi hidrati se povečajo pri obeh tretmajih s koncentracijo 10 mg l<sup>-1</sup>, pri tretmajih s koncentracijo 100 mg l<sup>-1</sup>, pa se le-ti povečajo minimalno.



Slika 33: Vrednosti absorbanc vrhov za lipide, proteine, DNA in ogljikove hidrate v koreninah sončnic (*H. annuus*), pri netretiranih (kontrola) ali tretiranih z 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki na hidroponski raztopini.

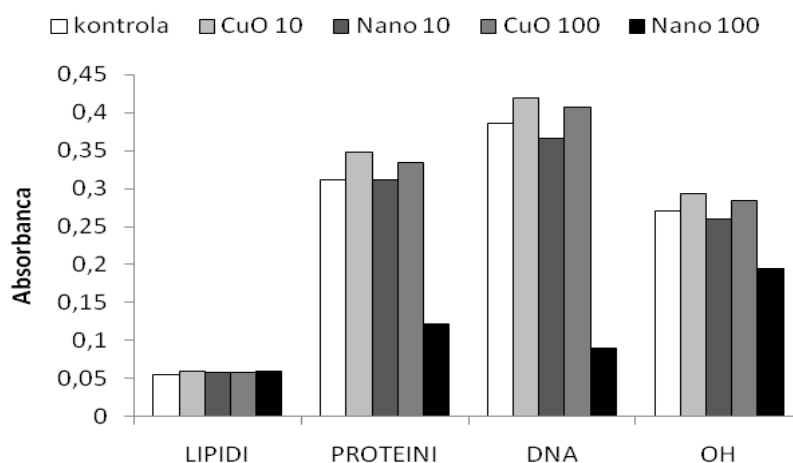
Razmerja med absorbancami vrhov za lipide (L), proteine (P), DNA in ogljikove hidrate (OH) nam podajo bolj primerljiv rezultat. Razmerje med OH/P se pri vseh tretmajih poveča (Slika 34), z izjemo korenin tretmaja nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup>, na račun povečane količine proteinov. Razmerje med OH/L se pri tretmajih s koncentracijo 10 mg l<sup>-1</sup> CuO zmanjša, medtem ko se pri tretmajih s koncentracijo 100 mg l<sup>-1</sup> CuO rahlo poveča.





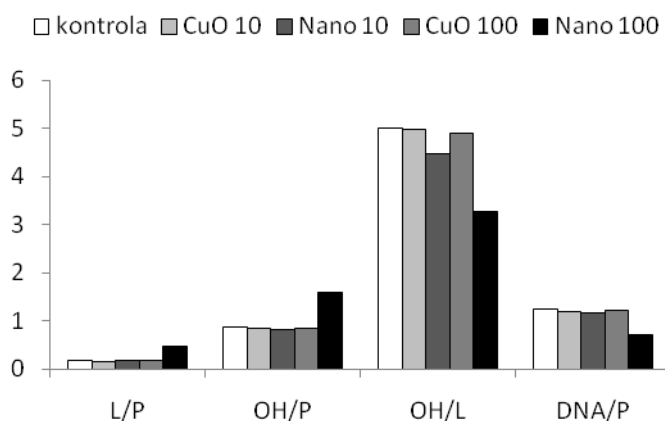
Slika 34: Razmerja med absorbanca vrhov za lipidi/proteini (L/P), ogljikovi hidrati/proteini (OH/P), ogljikovi hidrati/lipidi (OH/L), DNA/proteini (DNA/P) v koreninah sončnic (*H. annuus*), pri netretiranih (kontrola) ali tretiranih z 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki na hidroponski raztopini.

Količina lipidov v koreninskih vršičkih se pri vseh tretmajih enako minimalno poveča glede na kontrolo (Slika 35). Koreninski vršički tretmaja CuO 10 mg l<sup>-1</sup> imajo podobne vrednosti kot kontrola za proteine, DNA in ogljikove hidrate. Za koreninske vršičke tretmajev nano CuO 10 mg l<sup>-1</sup> in standardni CuO 100 mg l<sup>-1</sup> velja, da se količine proteinov, DNA in ogljikovih hidratov rahlo povečajo. Pri vršičkih tretmaja nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup> opazimo opazno zmanjšanje tako proteinov kot DNA in ogljikovih hidratov.

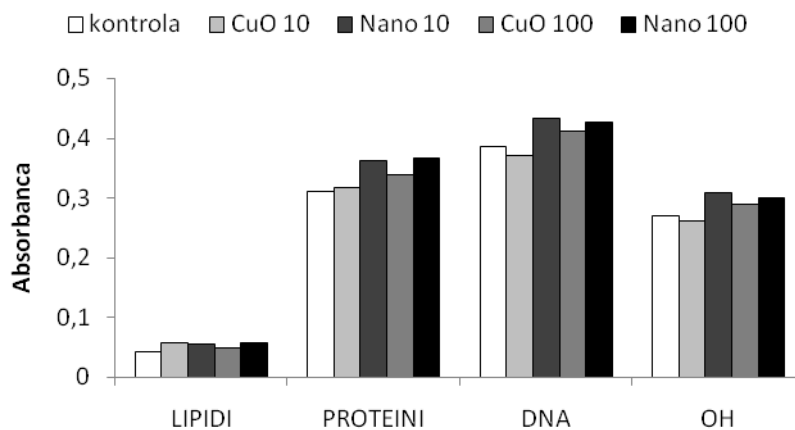


Slika 35: Vrednosti absorbanca vrhov za lipide, proteine, DNA in ogljikove hidrate v koreninskih vršičkih sončnic (*H. annuus*), pri netretiranih (kontrola) ali tretiranih z 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki na hidroponski raztopini.

Med koreninskimi vršički različnih tretmajev ostajajo razmerja nespremenjena (Slika 36), z izjemo koreninskih vršičkov najskrajnejšega tretmaja nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup>, kjer se razmerji L/P in OH/P zvišata na račun manjše količine proteinov, medtem ko se razmerji OH/L in DNA/P znižata na račun zmanjšanja količine DNA in OH.



Slika 36: Razmerja med absorbcami vrhov za lipidi/proteini (L/P), ogljikovi hidrati/proteini (OH/P), ogljikovi hidrati/lipidi (OH/L), DNA/proteini (DNA/P) v koreninskih vršičkih sončnic (*H. annuus*), pri netretiranih (kontrola) ali tretiranih z 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki na hidroponski raztopini.



Slika 37: Vrednosti absorbc vrhov za lipide, proteine, DNA in ogljikove hidrate v listih poganjkov sončnic (*H. annuus*), pri netretiranih (kontrola) ali tretiranih z 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki na hidroponski raztopini.

Z analizo spektrov listov sončnic smo opazili, da se noben tretma opazno ne razlikuje od kontrole, minimalno povečane vrednosti absorbanca imajo vrhovi spektrov listov tretmajev z nano obliko CuO (Slika 37).

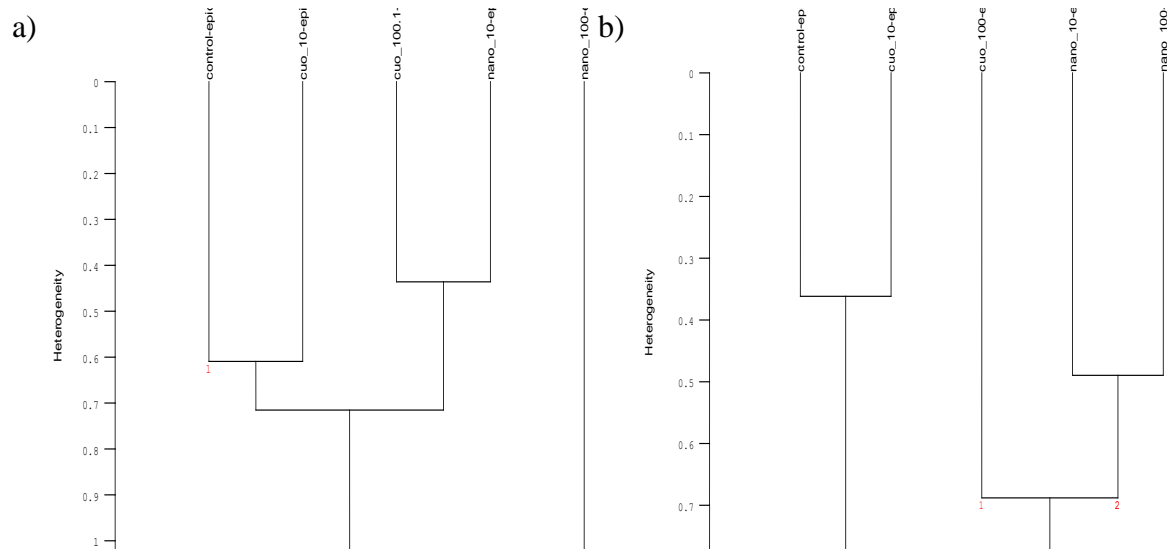
#### **4.5.2 Spektri biokemijske sestave vzorcev, posnetih z infrardečo svetlobo na tkivnem nivoju (žarkovna linija SISSI, Elettra, Trst)**

Merili smo spektre posameznih točk (od 5 do 20) znotraj istega tkiva. Pri vršičkih smo določili meristemsko regijo, povrhnjico koreninske čepice, notranjost koreninske čepice, rizodermis, skorjo in žilo. Pri prečnih rezinah korenine smo identificirali rizodermis, skorjo, endoderm in žilo. Spektre, posnete v rizodermisu, koreninski čepici in skorji, smo podrobno pregledali in po potrebi odšteli spekter zamrzovalnega medija. Spektre enakega tkiva in enakega tretmaja smo povprečili, da smo dobili le 1 spekter za 1 tkivo pri 1 tretmaju. Izračunali smo standardno deviacijo povprečevanja, vsem spektrom odvedli vodo, jih normalizirali ter odrezali šum od 600 do 750  $\text{cm}^{-1}$ . Spektrom posameznih tkiv smo določili podobnost s klustersko analizo in s spektrom odčitani višino 4 vrhov - en za lipide (med 3020 in 2650  $\text{cm}^{-1}$ ), en za proteine (med 1715 in 1570  $\text{cm}^{-1}$ ), en za ogljikove hidrate (1190 in 983  $\text{cm}^{-1}$ ) in en vrh za DNA (1307 in 1184  $\text{cm}^{-1}$ ). Iz višine vrhov smo izračunali razmerja med lipidi/proteini, ogljikovimi hidrati/proteini, lipidi/ogljikovimi hidrati in proteini/DNA (glej Poglavlje 3.9.4.).

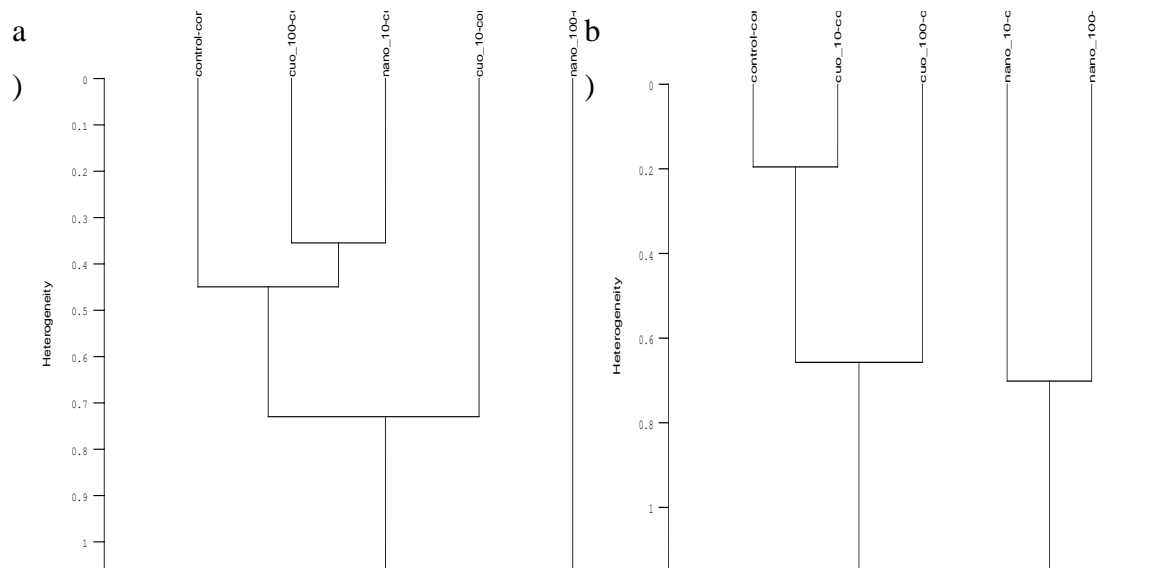
Klusterske analize infrardečih spektrov posameznih tkiv znotraj korenine so nam pokazale, da se pričakovane biokemijske spremembe dogajajo predvsem v zunanjih tkivih korenin (rizodermis, skorja, koreninska čepica, meristemsska regija), medtem ko v notranjih tkivih (žila, meristemsska regija in endodermis) korenin ni prišlo do očitnih sprememb (Priloga K, L, M).

Med FTIR spektromi, posnetimi v rizodermisu zrelih korenin in koreninskega vršička (Slika 38), najbolj izstopa izmed vseh tretmajev spekter, posnet v rizodermisu korenin, tretiranih z nano CuO 100  $\text{mg l}^{-1}$ , saj je tudi najskrajnejši tretma in najmanj podoben spektru, posnetem v rizodermisu kontrolnih korenin. Spektrom, posnetem v rizodermisu kontrolnih

korenin, je najbolj podoben spekter, posnet v rizodermisu korenin, tretiranih s  $\text{CuO}$   $10 \text{ mg l}^{-1}$ .



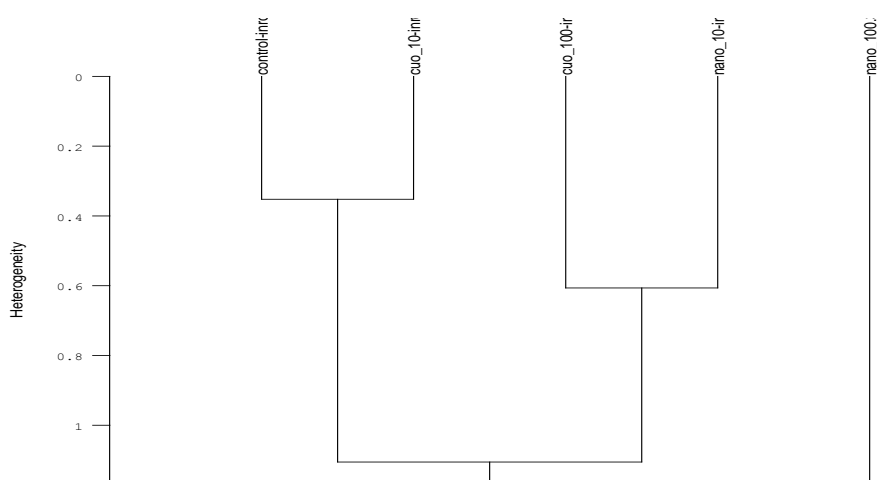
Slika 38: Klustersko drevo za IR spektre, posnete v rizodermisu prečnega prereza zrele korenine (a) in vzdolžnega prereza koreninskega vršička (b) sončnic kontrole, tretmaja  $\text{CuO}$  standardne kemijske oblike 10 in  $100 \text{ mg l}^{-1}$  ter tretmaja nano  $\text{CuO}$  10 in  $100 \text{ mg l}^{-1}$ .



Slika 39: Klustersko drevo za IR spektre, posnete v skorji prečnega prereza zrele korenine (a) in vzdolžnega prereza koreninskega vršička (b) sončnic kontrole, tretmaja  $\text{CuO}$  standardne oblike 10 in  $100 \text{ mg l}^{-1}$  ter tretmaja nano  $\text{CuO}$  10 in  $100 \text{ mg l}^{-1}$ .

Klustersko drevo spektrov, posnetih v skorji, nam prikaže zelo podobne rezultate (Slika 39). Spekter, posnet v koreninski skorji tako zrele korenine kot koreninskega vršička najskrajnejšega tretmaja nano CuO mg l<sup>-1</sup>, se najbolj razlikuje od kontrole.

V vzdolžnem prerezu koreninskega vršička pa se poleg spektrov, posnetih v skorji in v rizodermisu, enake spremembe opazijo pri spektrih, posnetih v koreninski čepici (Slika 40). Spektrom kontrole so najbolj podobni spektri, posneti v koreninski čepici tretmaja CuO 10 mg l<sup>-1</sup>, najmanj pa spektri, posneti v koreninski čepici tretmaja nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup>.

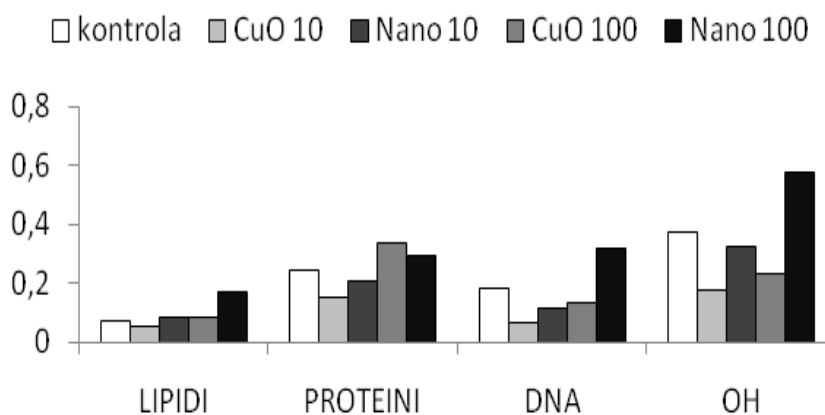


Slika 40: Klustersko drevo za IR spektre, posnete v koreninskih čepicah vzdolžnega prereza koreninskega vršička sončnic kontrole, tretmaja CuO standardne oblike 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> ter tretmaja nano CuO 10 in 100 mg l<sup>-1</sup>.

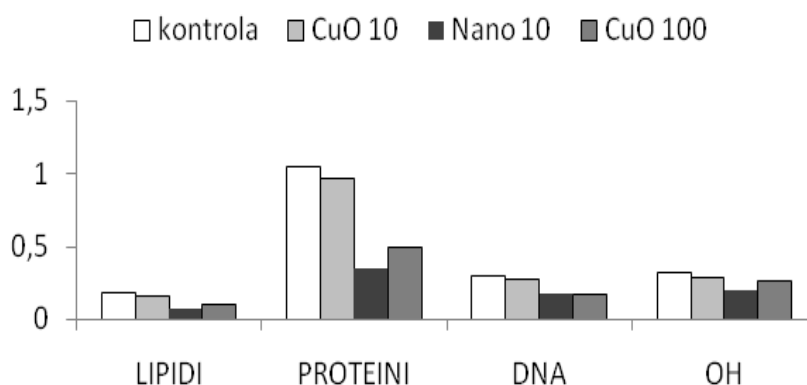
Spektrom posameznih tkiv, tako v zrelih koreninah kot v koreninskih vršičkih, smo odčitali količino lipidov, proteinov, DNA in ogljikovih hidratov za vse tretmaje.

V žili smo pričakovali nespremenjeno biokemijsko sestavo. V zreli korenini se je najbolj povečala količina OH pri tretmaju nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup> (Slika 41). Podatka za žilo koreninskega vršička tretmaja nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup> nimamo, saj smo žilo na vzdolžnem prerezu zgrešili. Se je pa močno zmanjšala količina proteinov, tako da imajo vsi tretmaji manj proteinov v primerjavi s kontrolo. Prav tako se je rahlo zmanjšala količina lipidov, DNA in OH v žili koreninskih vršičkov ostalih tretmajev.

a)



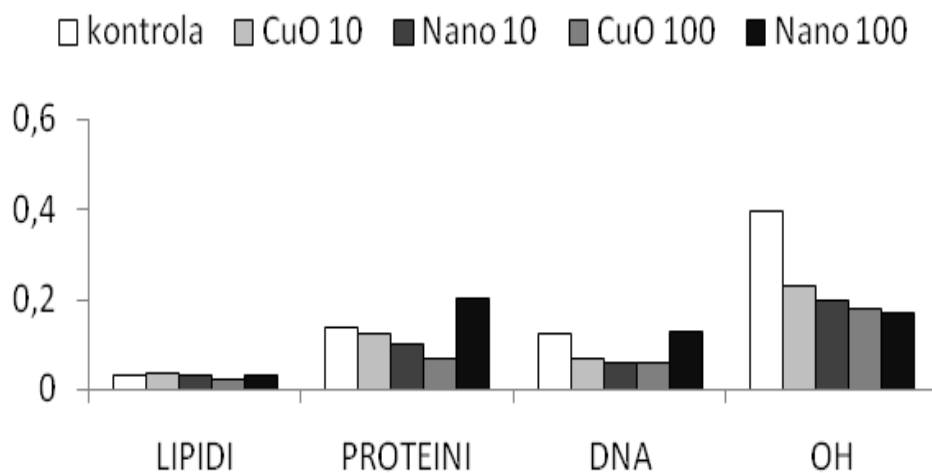
b)



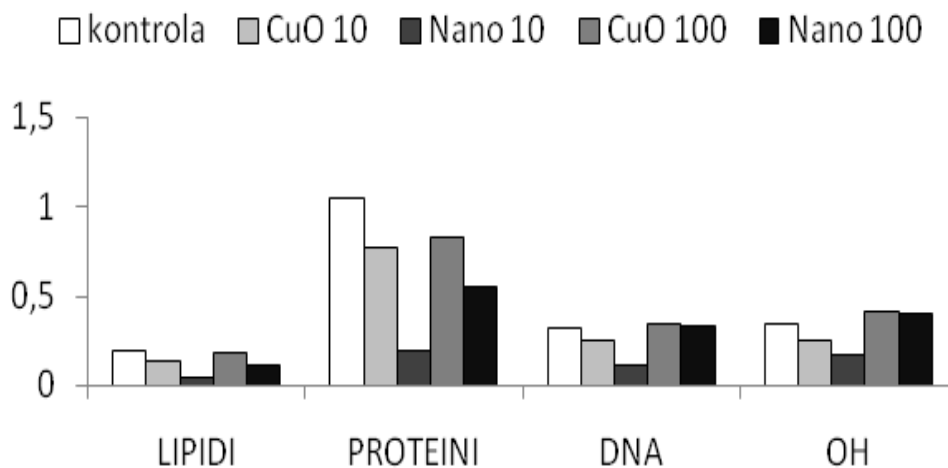
Slika 41: Vrednosti absorbanc vrhov za lipide, proteine, DNA in ogljikove hidrate (OH) v žili zrelih korenin (a) in koreninskih vršičkov (b) sončnic (*H. annuus*), pri netretiranih (kontrola) ali tretiranih z 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v standardni obliki in 100 mg l<sup>-1</sup> v nano obliki na hidroponski raztopini. Manjkajo nam podatki za spektre žile koreninskega vršička tretmaja nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup>, saj smo jo na vzdolžnem prerezu zgrešili, tako da na rezini ni prisotnega tkiva žile.

V skorji zrele korenine (Slika 42.a) so se količine vseh biomolekul zmanjševale z višanjem koncentracije dodanega CuO, z izjemo količine proteinov in DNA, ki je pri tretmaju nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup> višja od kontrolne. Podobno velja za skorjo koreninskih vršičkov (Slika 42.b), z izjemo tretmaja nano CuO 10 mg l<sup>-1</sup>, kjer so količine vseh biomolekul najnižje.

a)



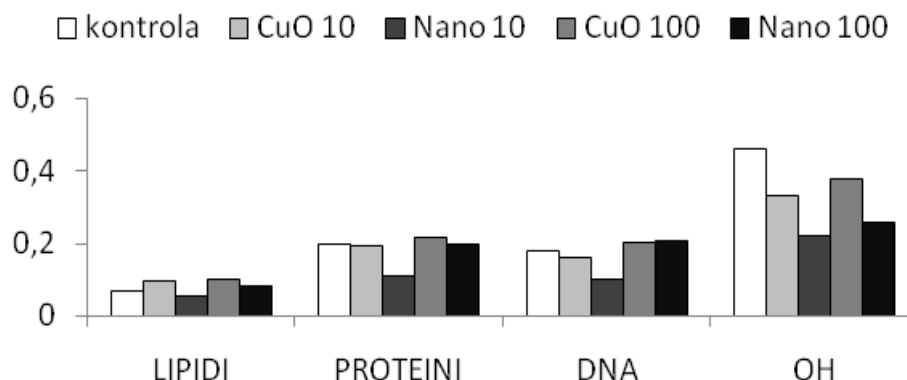
b)



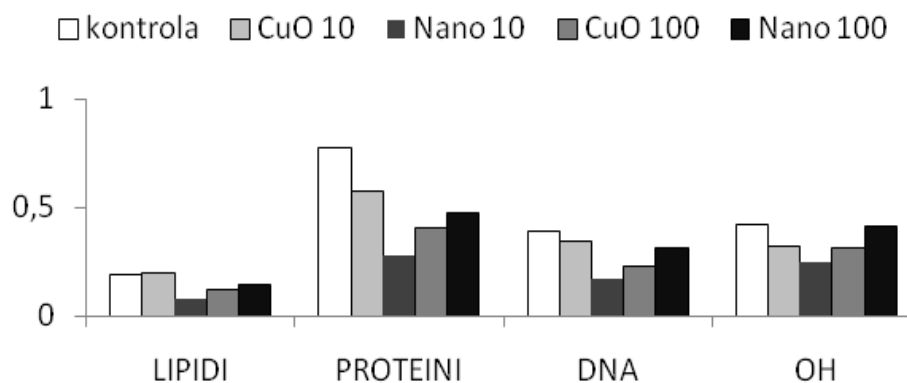
Slika 42: Vrednosti absorbanc vrhov za lipide, proteine, DNA in ogljikove hidrate (OH) v skorji zrelih korenin (a) in koreninskih vršičkov (b) sončnic (*H. annuus*), pri netretiranih (kontrola) ali tretiranih z 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki na hidroponski raztopini.

V rizodermisu zrele korenine se količine biomolekul med različnimi tretmaji bistveno ne spreminjajo, z izjemo izstopajočega tretmaja nano CuO 10 mg l<sup>-1</sup>, ki ima povsod najnižje vrednosti (Slika 43.a). Enako velja za rizodermis koreninskih vršičkov (Slika 43.b).

a)



b)

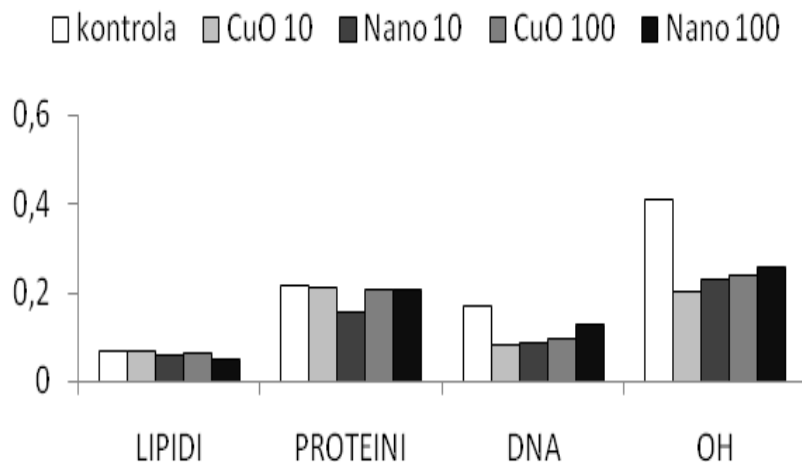


Slika 43: Vrednosti absorbanc vrhov za lipide, proteine, DNA in ogljikove hidrate (OH) v rizodermisu zrelih korenin (a) in koreninskih vršičkov (b) sončnic (*H. annuus*), pri netretiranih (kontrola) ali tretiranih z 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki na hidroponski raztopini.

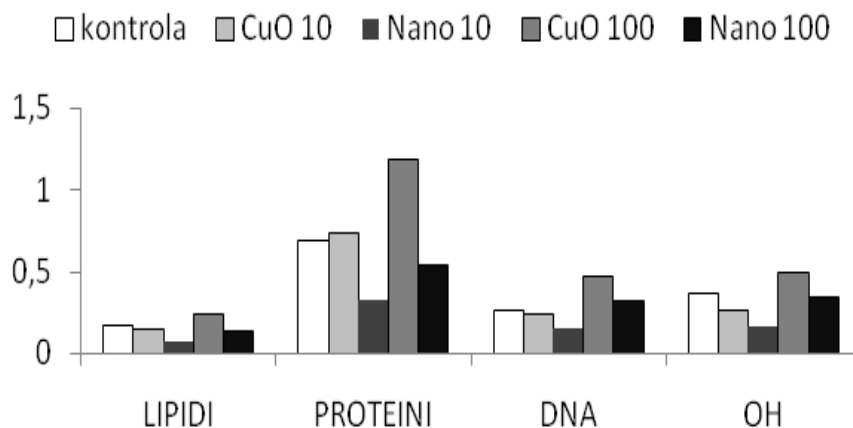
Tudi v endodermisu zrelih korenin nismo zaznali bistvenih sprememb v količini posameznih biomolekul med tretmaji (Slika 44). Kontrolna rastlina ima največ DNA in OH.

V meristemski regiji koreninskih vršičkov velja enak trend kot pri rizodermisu, da ima koreninski vršiček tretmaja nano CuO 10 mg l<sup>-1</sup> najnižje vrednosti vseh biomolekul (Slika 45). Najvišje vrednosti tu ima koreninski vršiček tretmaja CuO 100 mg l<sup>-1</sup>.



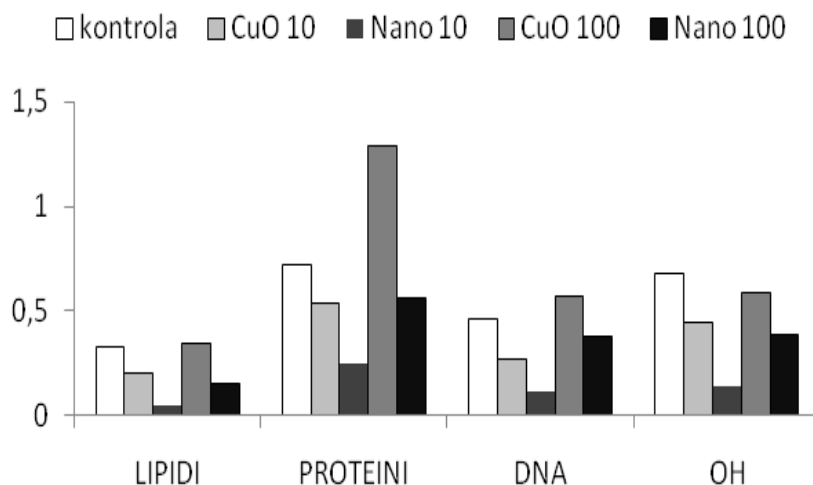


Slika 44: Vrednosti absorbanc vrhov za lipide, proteine, DNA in ogljikove hidrate (OH) v endodermisu zrelih korenin sončnic (*H. annuus*), pri netretiranih (kontrola) ali tretiranih z 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki na hidroponski raztopini.



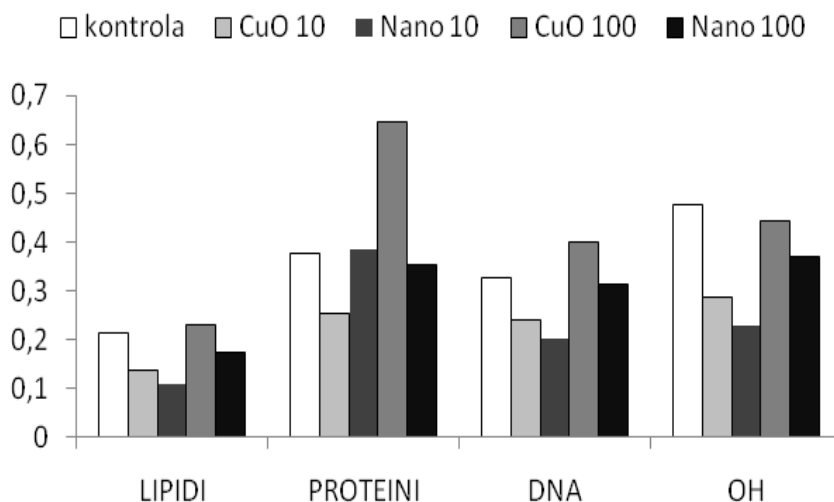
Slika 45: Vrednosti absorbanc vrhov za lipide, proteine, DNA in ogljikove hidrate (OH) v meristemski regiji koreninskih vršičkov sončnic (*H. annuus*), pri netretiranih (kontrola) ali tretiranih z 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki na hidroponski raztopini.

V notranjosti koreninske čepice vršička korenine izstopa večja količina proteinov tretmaja CuO 100 mg l<sup>-1</sup>. Spet se pojavijo najnižje koncentracije vseh biomolekul pri tretmaju nano CuO 10 mg l<sup>-1</sup>. Prav tako ima tretma CuO 10 mg l<sup>-1</sup> nižje vrednosti od kontrole (Slika 46).



Slika 46: Vrednosti absorbanč vrhov za lipide, proteine, DNA in ogljikove hidrate (OH) v notranjosti koreninskih čepic vršičkov sončnic (*H. annuus*), pri netretiranih (kontrola) ali tretiranih z 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki na hidroponski raztopini.

Biokemijska sestava zunanosti koreninske čepice je primerljiva z notranjostjo (Slika 47). Najnižje vrednosti ima tretma nano CuO 10 mg l<sup>-1</sup>, prav tako nižje vrednosti od kontrole ima tretma standardnega CuO 10 mg l<sup>-1</sup>.

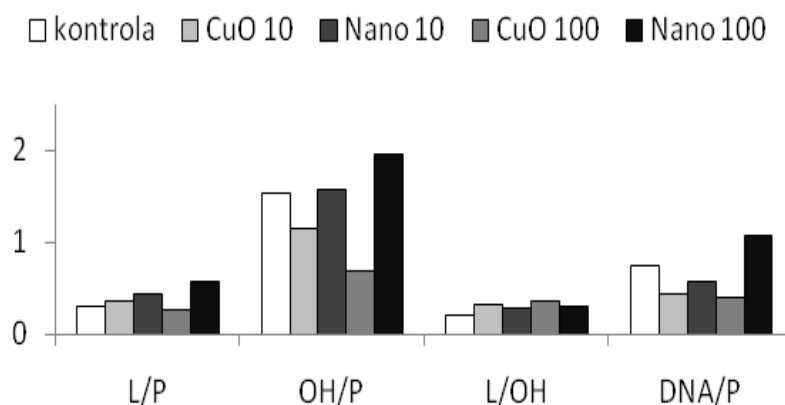


Slika 47: Vrednosti absorbanč vrhov za lipide, proteine, DNA in ogljikove hidrate (OH) v povrhnjici koreninskih čepic vršičkov sončnic (*H. annuus*), pri netretiranih (kontrola) koreninah ali koreninah, tretiranih z 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki na hidroponski raztopini.

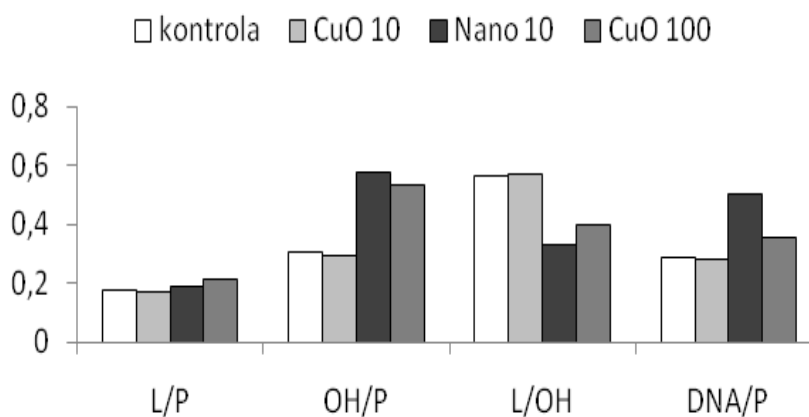
Preučili smo razmerja med absorbančami vrhov spektrov posameznih tkiv za lipide, proteine, DNA in ogljikove hidrate. Med seboj smo primerjali enako tkivo zrele korenine in koreninskega vršička.

V žili koreninskega vršička nam manjkajo podatki za vršiček tretmaja nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup>, saj smo pri rezanju zgrešili žilo (Slika 48). V zreli korenini je razmerje med OH/P višje, kar pomeni večjo količino OH. Najmanj se spreminja razmerje L/P, a tudi sicer v žili nismo pričakovali bistvenih sprememb v biokemijski sestavi.

a)



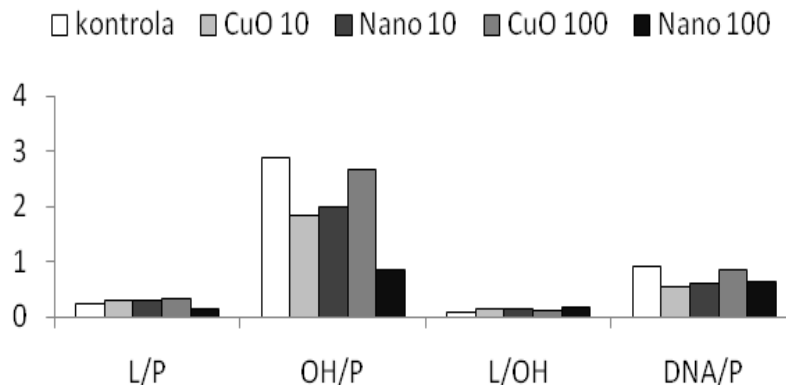
b)



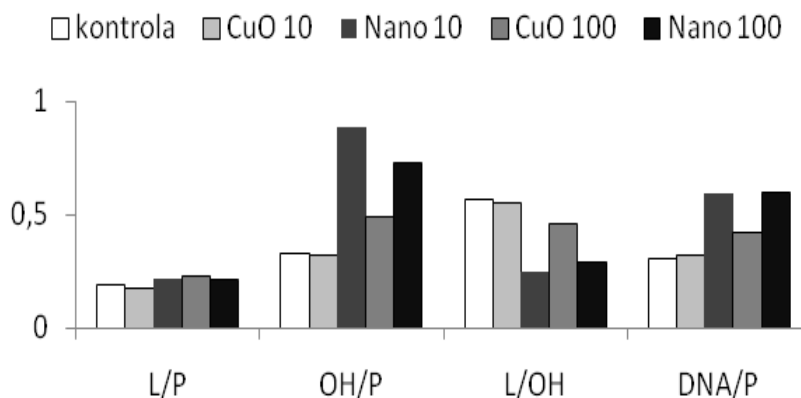
Slika 48: Razmerja med absorbančami vrhov za lipidi/proteini (L/P), ogljikovi hidrati/proteini (OH/P), ogljikovi hidrati/lipidi (OH/L), DNA/proteini (DNA/P) v IR spektrih posnetih v žili zrelih korenin (a) in koreninskih vršičkov (b) sončnic (*H. annuus*), pri netretiranih (kontrola) ali tretiranih z 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki na hidroponski raztopini. Pri vzdolžnem prerezu koreninskega vršička nam manjkajo podatki za tretma nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup>.

Razmerja med biomolekulami v skorji so večja pri zreli korenini (Slika 49).

a)



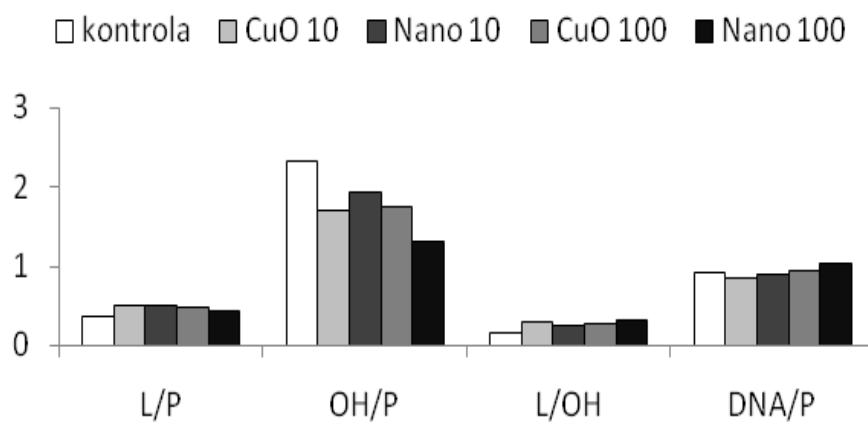
b)



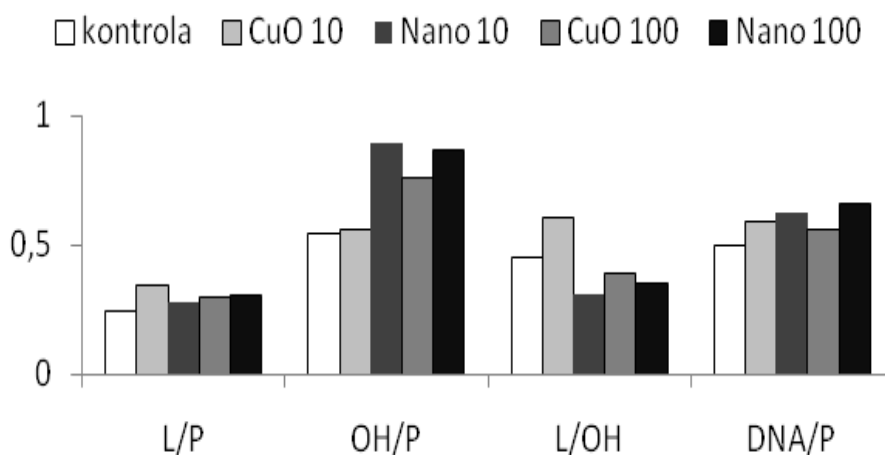
Slika 49: Razmerja med absorbancami vrhov za lipidi/proteini (L/P), ogljikovi hidrati/proteini (OH/P), ogljikovi hidrati/lipidi (OH/L), DNA/proteini (DNA/P) v IR spektrih posnetih v skorji zrelih korenin (a) in koreninskih vršičkov (b) sončnic (*H. annuus*), pri netretiranih (kontrola) ali tretiranih z 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki na hidroponski raztopini.

Prav tako so večje spremembe v razmerjih med biomolekulami v rizodermisu pri zreli korenini (Slika 50). V rizodermisu zrele korenine se s skrajnostjo tretmaja razmerje med OH/P znižuje na račun zniževanja OH, medtem ko se v koreninskem vršičku razmerje OH/P povečuje na račun zniževanja proteinov.

a)



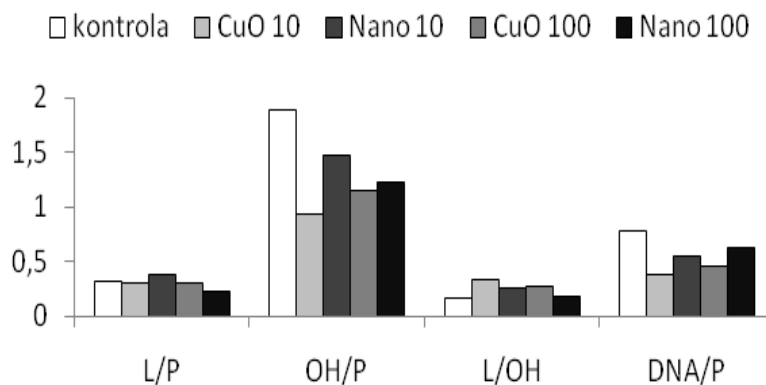
b)



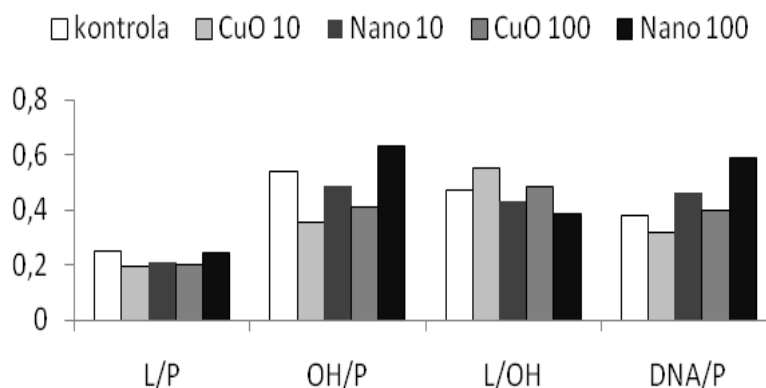
Slika 50: Razmerja med absorbancami vrhov za lipidi/proteini (L/P), ogljikovi hidrati/proteini (OH/P), ogljikovi hidrati/lipidi (OH/L), DNA/proteini (DNA/P) v IR spektrih posnetih v rizodermisu zrelih korenin (a) in koreninskih vršičkov (b) sončnic (*H. annuus*), pri netretiranih (kontrola) ali tretiranih z 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki na hidroponski raztopini.

V endodermisu zrelih korenin ni prišlo do bistvenih sprememb, kot velja za ostala tkiva zrele korenine, se pa tudi tu s skrajnostjo tretmaja razmerje OH/P znižuje (Slika 51).

Za meristemsko regijo koreninskega vršička velja, da se razmerji OH/P in DNA/P s skrajnostjo tretmaja povečujeta (Slika 52).

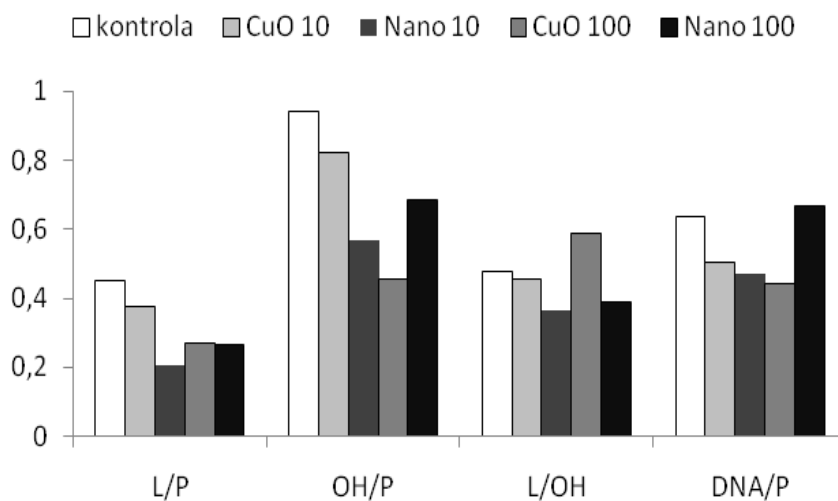


Slika 51: Razmerja med absorbančami vrhov za lipidi/proteini (L/P), ogljikovi hidrati/proteini (OH/P), ogljikovi hidrati/lipidi (OH/L), DNA/proteini (DNA/P) v IR spektrih posnetih v endodermisu zrelih korenin sončnic (*H. annuus*), pri netretiranih (kontrola) ali tretiranih z 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki na hidroponski raztopini.

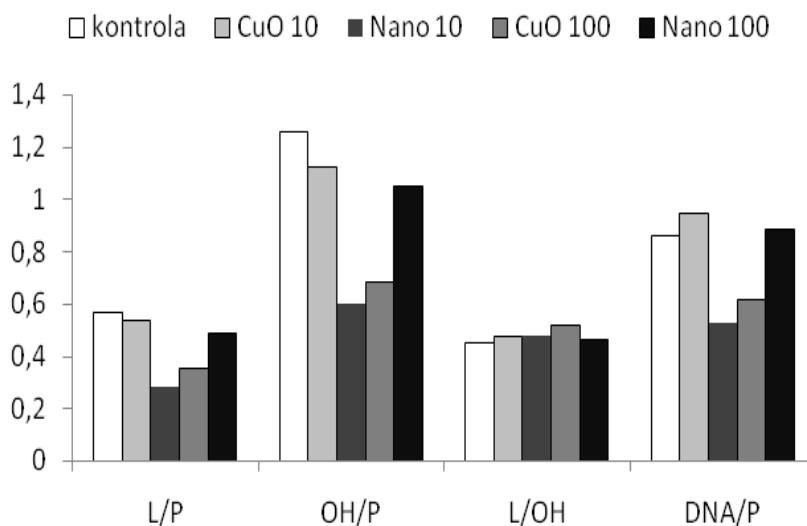


Slika 52: Razmerja med absorbančami vrhov za lipidi/proteini (L/P), ogljikovi hidrati/proteini (OH/P), ogljikovi hidrati/lipidi (OH/L), DNA/proteini (DNA/P) v IR spektrih posnetih v meristemski regiji koreninskih vršičkov sončnic (*H. annuus*), pri netretiranih (kontrola) ali tretiranih z 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki na hidroponski raztopini.

Za notranjost (Slika 53) in povrhnjico (Slika 54) koreninske čepice vršička korenine velja, da se razmerja s skrajnostjo tretmaja znižujejo, z izjemo višjega razmerja OH/P in DNA/P pri tretmaju nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup> in višjega razmerja L/OH pri tretmaju CuO 100 mg l<sup>-1</sup>.



Slika 53: Razmerja med absorbcami vrhov za lipidi/proteini (L/P), ogljikovi hidrati/proteini (OH/P), ogljikovi hidrati/lipidi (OH/L), DNA/proteini (DNA/P) v IR spektrih posnetih v notranjosti čepic koreninskih vršičkov sončnic (*H. annuus*), pri netretiranih (kontrola) ali tretiranih z 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki na hidroponski raztopini.

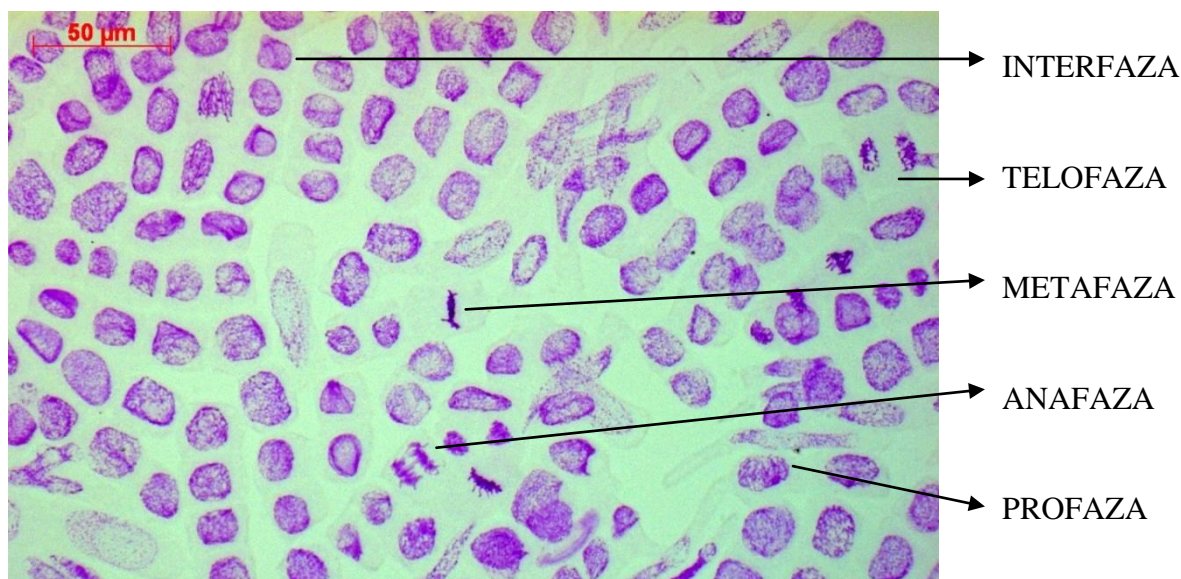


Slika 54: Razmerja med absorbcami vrhov za lipidi/proteini (L/P), ogljikovi hidrati/proteini (OH/P), ogljikovi hidrati/lipidi (OH/L), DNA/proteini (DNA/P) v IR spektrih posnetih v povrhnjici čepic koreninskih vršičkov sončnic (*H. annuus*), pri netretiranih (kontrola) ali tretiranih z 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki na hidroponski raztopini.

#### 4.6 GENOTOKSIČNOST

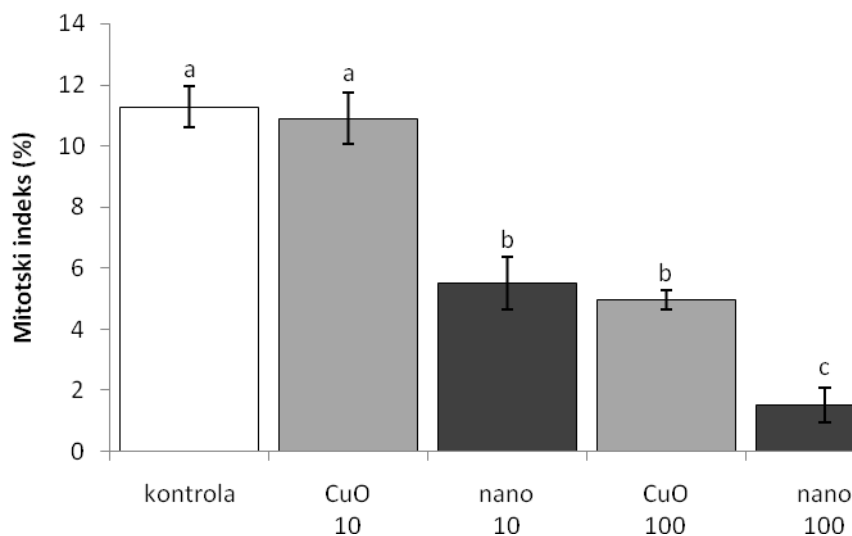
Obarvana jedra meristemskih celic koreninskega vršička smo poslikali z mikroskopom in določili faze delitve celic (Slika 55). Mitotski indeks je bil največji pri kontroli, vendar se je z naraščajočo koncentracijo CuO zmanjševal (Slika 56). Najmanjši vpliv je imel tretma standardnega CuO v koncentraciji  $10 \text{ mg l}^{-1}$ . Vrednosti mitotskega indeksa pri nano obliki CuO so nižje kot pri enaki koncentraciji standardnega CuO. Pri koncentraciji  $10 \text{ mg l}^{-1}$  se je mitotski indeks zmanjšal za 50 %, pri koncentraciji  $100 \text{ mg l}^{-1}$  pa za 70 %. Značilne so statistične razlike ( $p < 0,05$ ) med oblikama CuO pri obeh koncentracijah.

Faktorska analiza variance je pokazala, da na mitotski indeks v apikalnem meristemu koreninskega vršička vplivata tako oblika CuO kot njegova koncentracija v hranilni raztopini (Preglednica 6), medtem ko njuna interakcija ni imela statistično značilnega vpliva (Priloga B).



Slika 55: Faze mitoze v apikalnem meristemu koreninskega vršička navadne sončnice (*H. annuus*).





Slika 56: Vrednosti mitotskega indeksa v koreninskih vršičkih sončnice (*H. annuus*), pri netretiranih (kontrola) rastlinah in rastlinah, tretiranih z 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki na hidroponski raztopini. Prikazane so povprečne vrednosti (kontrola N=4, ostali tretmaji N=5). Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilno razliko med tretmaji (enosmerna ANOVA, Duncan's test, p<0,05).

Preglednica 6: Rezultati faktorjske analize za mitotski indeks (%) v tretiranih koreninskih vršičkih sončnic. Analizo smo opravili s programom Statistica 7. Statistično značilne vplive prikazujejo odebeljene črke.

|  | SS              | Prostostne stopnje | MS              | F              | p               |
|--|-----------------|--------------------|-----------------|----------------|-----------------|
| <b>Oblika CuO</b>                              | <b>97,1928</b>  | <b>1</b>           | <b>97,1928</b>  | <b>41,9382</b> | <b>0,000008</b> |
| <b>Koncentracija (mg l<sup>-1</sup>)</b>       | <b>123,1096</b> | <b>1</b>           | <b>123,1096</b> | <b>53,1212</b> | <b>0,000002</b> |
| Oblika CuO*Koncentracija (mg l <sup>-1</sup> ) | 4,75            | 1                  | 4,75            | 2,0496         | 0,171491        |
| Napaka   | 37,0804         | 16                 | 2,3175          |                |                 |

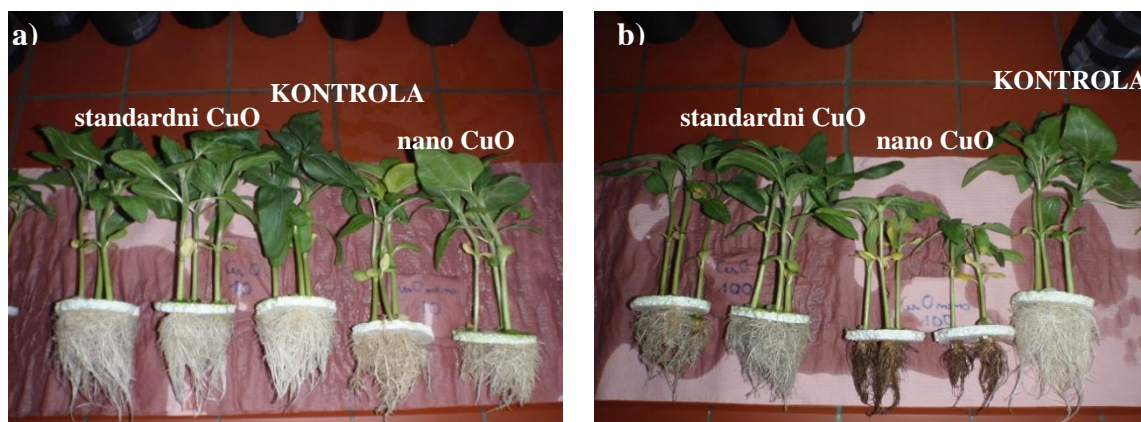
#### 4.7 MORFOLOŠKE SPREMEMBE

Kot posledica biokemijskih sprememb in sprememb v razporeditvi elementov v tretiranih rastlinah se strupenostni učinki tretiranja s CuO pokažejo tudi na morfologiji rastlin. Največje spremembe so bile pri sončnicah, tretiranih z nanodelci CuO. Pri koncentraciji 10 mg l<sup>-1</sup> spremembe niso tako velike, iz česar sklepamo, da rastlina, izpostavljena tej

koncentraciji nanodelcev CuO, lahko raste normalno, medtem ko so pri koncentraciji 100 mg l<sup>-1</sup> poškodbe prevelike in rastlina ne more zaključiti svojega ravnega cikla.

#### 4.7.1 Morfološke spremembe na nivoju organizma

Spremembe na koreninah in poganjkih različno tretiranih rastlin so bile vidne že na prvi pogled. Pri kontrolnih rastlinah so bili poganjki nepoškodovani, korenine pa bele, dolge in močno razvejane. Izrazitih sprememb pri koncentraciji 10 mg l<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki ni bilo opaziti. Korenine so bile rahlo temno obarvane in manj razvejane, na spodnjih listih so se pojavile kloroze (Slika 57.a). Rastline, ki so rasle v raztopini s koncentracijo 100 mg l<sup>-1</sup> nano CuO, so imele popolnoma črne, tanke in skoraj nerazvejane korenine. Poganjki so bili veliko krajši kot pri kontroli, prišlo je do deformacije listov in pojava nekroz. Pri rastlinah, tretiranih s 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v standardni obliki, so se korenine rahlo temno obarvale in so bile v primerjavi s kontrolo krajše (Slika 57.b), kot je bilo opazno že pri predhodnih poskusih (Frlic, 2011).

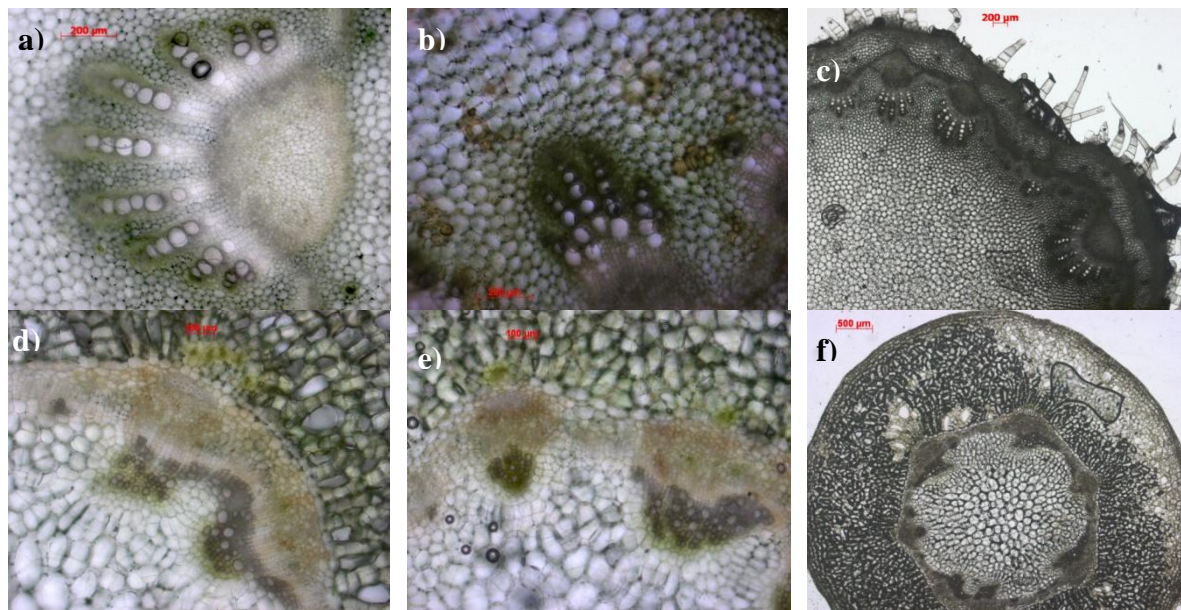


Slika 57: Primerjava kontrolne rastline z rastlino, ki je rasla v raztopini s CuO v standardni in nano obliki s koncentracijo 10 mg l<sup>-1</sup> (a) in 100 mg l<sup>-1</sup> (b).

#### 4.7.2 Morfološke spremembe na tkivnem in celičnem nivoju

Spremembe med tretiranimi rastlinami so bile opazne tudi na tkivnem nivoju, predvsem na koreninskem sistemu, ter manj izrazite na poganjkih.

#### 4.7.2.1 Steblo

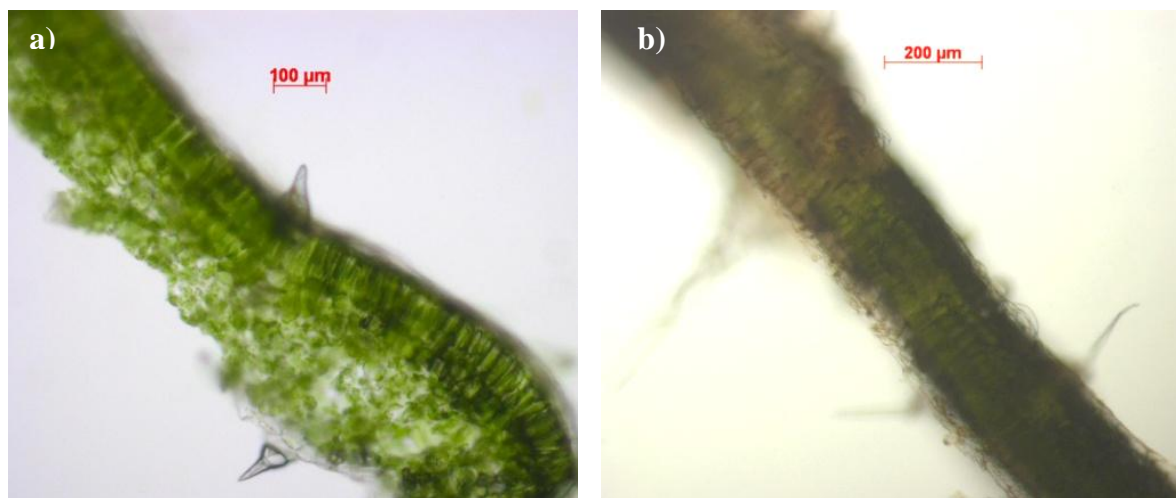


Slika 58: Primerjava prečnih rezin stebela tretiranih rastlin: a) žila pri kontrolnih rastlinah, b) žila po tretmaju 100 mg l<sup>-1</sup> standardni CuO, c) steblo pri tretmaju 10 mg l<sup>-1</sup> nano CuO, d) žila pri tretmaju 100 mg l<sup>-1</sup> nano CuO, e) žila pri tretmaju 100 mg l<sup>-1</sup> nano CuO in f) steblo pri tretmaju 100 mg l<sup>-1</sup> nano CuO.

Steblo je bilo v primerjavi z drugimi tretmaji (Slika 58.a, b) dokončno razvito le pri sončnici tretmaja 100 mg l<sup>-1</sup> nano CuO in je imelo karakteristike odraslega stebela (Slika 58.c, d, e, f). Steblo ni bilo poraščeno s trihomi, bilo je močno lignificirano, tanjše in z debelejšo skorjo kot pri enako starih rastlinah drugih tretmajev. Same žile so bile manjše in so izgubile obliko prstastih žil, ki so sicer značilne za mlado steblo.

#### 4.7.2.2 List

Prečni prerezi listov se med tretmaji niso bistveno spreminjali. Največje razlike v primerjavi s kontrolnim (Slika 59.a) je imel list tretmaja 100 mg l<sup>-1</sup> nano CuO, kjer je bila listna sredica bolj kompaktna in enotna (Slika 59.b). Ni bilo videti jasne meje med stebričastim in gobastim tkivom, saj je bilo slednje slabše razvito.



Slika 59: Primerjava prečnih rezin listne ploskve med a) kontrolo in b) tretmajem  $100 \text{ mg l}^{-1}$  nano CuO.

#### 4.7.2.3 Koreninski vršiček

V vzdolžnem prerezu koreninskega vršička med tretmaji ni bilo bistvenih razlik, z izjemo koreninskih vršičkov rastlin, ki so rasle v suspenziji nanodelcev CuO v koncentraciji  $100 \text{ mg l}^{-1}$  (Slika 60). Koreninske čepice so propadle, prav tako je bil poškodovan koreninski apikalni meristem. Zaradi tega se blizu konice korenine začnejo tvoriti zasnove stranskih korenin. Na splošno so koreninski vršički pri tem tretmaju deformirani, pojavljajo pa se tudi nekroze zasnov stranskih korenin znotraj korenine.



Se nadaljuje

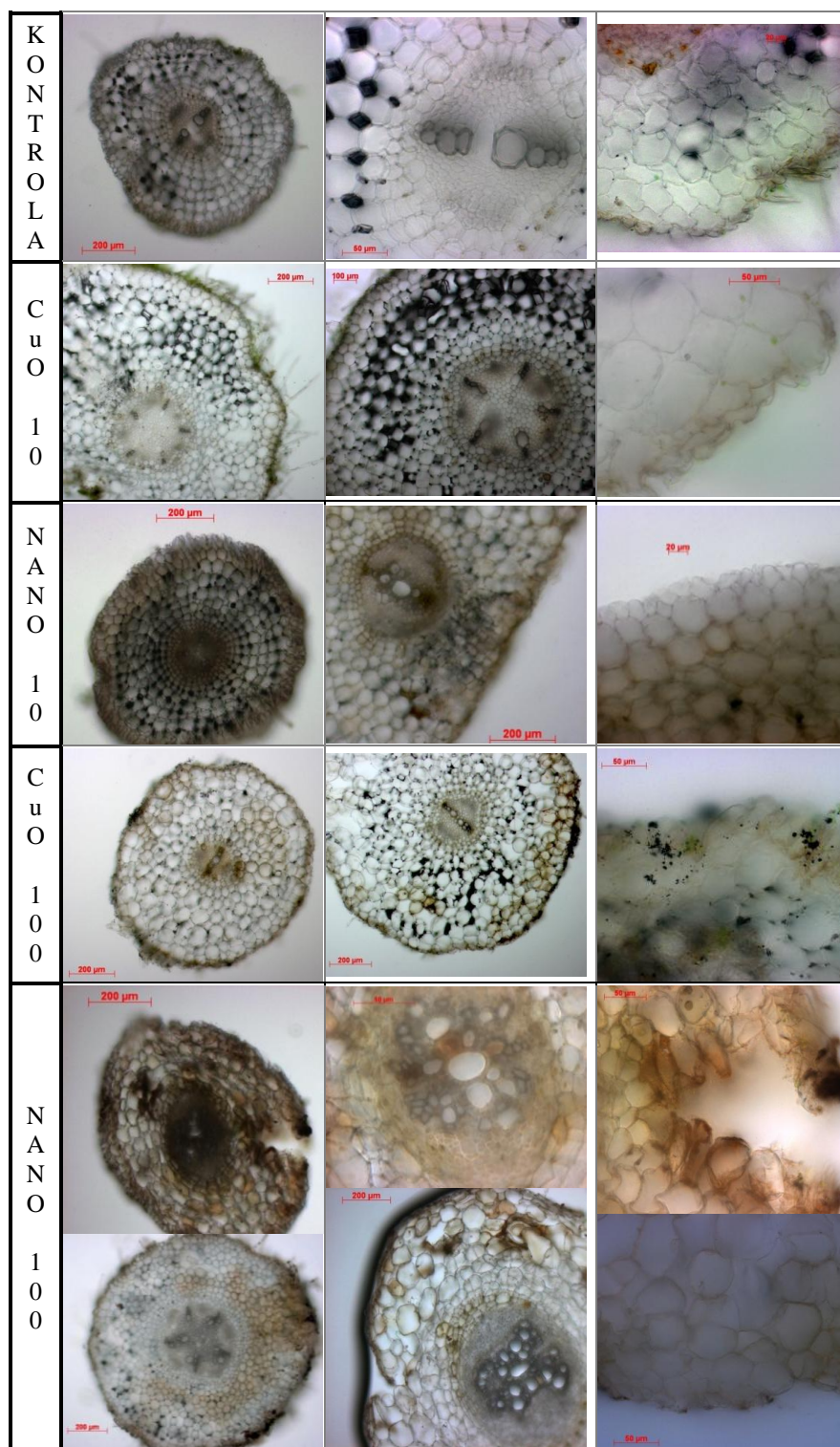
### Nadaljevanje Slike 60.



Slika 60: Primerjave vzdolžnih prerezov koreninskih vršičkov sončnic, tretiranih z 10 ali 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki.

#### 4.7.2.4 Korenina

Poskusne rastline so bile vzgojene na hidroponiki, zato so se v koreninah vseh tretmajev pojavili večji intracelularni prostori, ki omogočajo lažje prehajanje plinov in s tem preskrbo potopljenih tkiv s kisikom. Pri tretmaju 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v standardni obliki so bili na rizodermisu dobro vidni skupki CuO, ki je v tej obliki v vodnem mediju netopen, vendar se delci lepijo na celično povrhnjico (Slika 61, 3. vrstica). Tako pri nano CuO 10 mg l<sup>-1</sup> kot tudi pri 100 mg l<sup>-1</sup> se je pojavila deformacija žil, nemalokrat se je porušila značilna 2- ali 5-žarkasta struktura žile (Slika 61, 5. vrstica). Pri koncentraciji nano 100 mg l<sup>-1</sup> so traheje dobro formirane, z močno celično steno, obenem pa so parenhimske celice ponekod obarvane rjavo, kar nakazuje na propadanje koreninskega tkiva. Rizodermis je poškodovan in ponekod manjka.



Slika 61: Primerjave prečnih prerezov korenin sončnic, tretiranih z 10 ali 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki

## 5 RAZPRAVA

### 5.1 PRISOTNOST BAKROVIH IONOV V SUSPENZIJI BAKROVEGA OKSIDA (CuO)

Prisotnost bakrovih ionov v suspenzijah nano CuO in CuO v standardni kemijski obliki smo preverjali s testom, kjer se ob prisotnosti amonijaka z bakrovimi ioni tvori modro obarvan kompleks ( $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{2+}$ ). Prišli smo do enakih zaključkov kot Frlic (2011), saj se nobena od pripravljenih suspenzij ni obarvala modro. Prav tako so bile spektralne prepustnosti v vseh naših raztopinah višje od 99 %, kar pomeni, da se iz CuO ni sproščalo veliko bakrovih ionov (Slika 17). Tudi po podatkih iz literature je CuO v vodi praktično netopen (Copper (II) Oxide, 2011).

Gunawan in sod. (2011) so v svoji raziskavi dokazali, da se iz bakrovih soli sproščajo  $\text{Cu}^{2+}$  ioni, ki tvorijo bakrovo-proteinski kompleks, ki zavira rast bakterij, medtem ko se luženje  $\text{Cu}^{2+}$  ionov ni pojavilo pri standardni obliki CuO in ni bilo znakov strupenosti, tako da pripisujejo strupenostne efekte nanodelcev CuO njegovim fizikalnim lastnostim. Mortimer in sod. (2010) so ugotovili, da se iz CuO v nano obliki po štirih urah sprostita le 2 % bakrovih ionov, iz CuO v standardni kemijski obliki pa le 0,12 %, kar je zelo malo v primerjavi s ZnO, kjer je topnost 80 %. S pomočjo Cu-helatorjev (desferoksamin in D-penicilamin) sta Fahmy in Cormier (2009) dokazala, da strupenostni efekti niso posledica  $\text{Cu}^{2+}$  ionov, saj helatorji niso omilili strupenostnih učinkov nanodelcev CuO.

Zaključili smo, da je bila koncentracija  $\text{Cu}^{2+}$  ionov v hranilni raztopini tako majhna, da morfoloških in biokemijskih sprememb, ki so nastale ob tretiranju, ne moremo pripisati strupenosti zaradi prostih  $\text{Cu}^{2+}$  ionov v hranilni raztopini, ampak fizikalnim lastnostim nanodelcev.

### 5.2 PREVODNOST SUSPENZIJ BAKROVEGA OKSIDA (CuO)

V suspenzijah nanodelcev CuO in CuO v standardni kemijski obliki smo izmerili prevodnost. Vrednosti izmerjene prevodnosti so se z večanjem koncentracije poviševale tako pri nano kot standardni obliki CuO, le da so bile vrednosti pri nanodelcih višje (Slika

18). Buffet in sod. (2011) so izmerili zeta potencial topnemu Cu ( $\text{Cu}^{2+}$ ), ki ima visoko pozitiven naboj (26,3 mV), kar prispeva k stabilnosti raztopine, medtem ko imajo nanodelci CuO rahlo negativen naboj (8,69 in 7,72 mV), kar je vzrok za nestabilnost raztopine. Naboj delca je pomemben, saj ta vpliva na razporejanje delcev in ločevanje ionov in biomolekul, kar posledično vpliva na interakcijo med celico in delcem. Obenem so Zhuang in sod. (2009, cit. po Tso in sod., 2010) ugotovili, da lahko kationi ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) v vodi nevtralizirajo negativni naboj površine nanodelcev. El Trass in sod. (2012) so dokazali, da je naboj nanodelcev CuO odvisen od pH. Z višanjem pH se negativnost nanodelcev povečuje, med pH 4,5 in 12 imajo negativen naboj; pH naših hranilnih raztopin se je gibal med 6.1 in 6.5, kar pomeni, da so imeli nanodelci CuO verjetno negativen naboj, vendar tega nismo neposredno dokazali.

Lahko sklepamo, da se nanodelci CuO zaradi svoje majhnosti obnašajo kot metaioni, ki nosijo naboj, in je zaradi tega prevodnost suspenzij nanodelcev CuO višja kot prevodnost suspenzij CuO v standardni obliki.

### 5.3 KONCENTRACIJA BAKRA V SUPERNATANTU SUSPENZIJ S CuO IN NANO CuO (TXRF)

Pri nano obliki bakrovega oksida se je koncentracija bakra v supernatantu zviševala z naraščajočo koncentracijo nanodelcev CuO (Slika 19), vendar pri analizi metodi TXRF analiziramo skupno količino Cu in tako ne moremo ločiti Cu ionov od CuO. Metodo bi lahko izboljšali s sonifikacijo suspenzij, daljšim centrifugiranjem ali uporabo filtrov z nanometrsko velikostjo por, da bi lahko z zagotovostjo trdili, da baker v supernatantu je oz. ni v ionski obliki. Znano je, da nanodelci pri višjih koncentracijah agregirajo v večje skupke in v vodi tvorijo agregate velikosti od 200 do 17000 nm. Agregacija je posledica privlaka med posameznimi nanodelci. Hkrati pa se posamezni nanodelci lahko hitreje gibajo v raztopini, kar je posledica Brownovega gibanja delcev v vodi, za katere velja, da imajo manjši delci višji difuzijski koeficient (Tso in sod., 2010).



#### 5.4 PRIVZEM BAKRA V KORENINE IN POGANJKE (TXRF)

Povprečna koncentracija Cu v rastlini je  $10 \mu\text{g g}^{-1}$  suhe mase (Baker in Senef, 1995, cit. po Yruela, 2005), pri našem poskusu pa so imele vse rastline z izjemo kontrole precej višje koncentracije Cu v tkivih.

V koreninah je s povečanjem koncentracije CuO v raztopini naraščala tudi koncentracija Cu v tkivih. Razlike med nano in standardno obliko CuO so bile statistično značilne pri koncentraciji  $150 \text{ mg l}^{-1}$ , kjer je bila koncentracija Cu v koreninah, tretiranih z nano obliko, za 38 % večja kot v koreninah, tretiranih s standardno obliko CuO (Slika 27a). Koncentracije Cu v poganjkih so bile za 64-99,8 % nižje kot v koreninah, a se je tudi tu pokazal trend zviševanja koncentracije Cu s povečano koncentracijo CuO v hranilni raztopini (Slika 27b). Trendi so bili enaki kot pri Frlic (2011).

Lin in Xing (2008) sta ugotovila, da se je pri ljulkah, tretiranih s koncentracijami, višjimi od  $100 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^+$  in nanodelcev ZnO pokazal trend zniževanja koncentracije Zn v koreninah pri ionski obliki Zn ter trend zviševanja koncentracije Zn v koreninah s povečevanjem koncentracije nanodelcev ZnO v hranilni raztopini. Tudi Lee in sod. (2008) so dokazali linearno odvisnost med koncentracijo nanodelcev Cu v ravnem gojišču in koncentracijo Cu v fižolu in pšenici.

Kot je ugotovila Frlic (2011), je prenosni indeks za Cu iz korenin v poganjke veliko manjši od 1 za vse tretmaje CuO, a vseeno višji pri tretmajih za nano obliko CuO. Enako so ugotovili Lin in Xing (2008) na primeru nanodelcev ZnO in dokazali, da je prenosni indeks za Zn manjši od 0,02. Sklepali so, da je to posledica agregiranja nanodelcev ZnO na zunanji površini korenin, saj le redki posamezni delci vstopijo v notranjost koreninskega stržena in so se sposobni transportirati v poganjek.

Na primeru drugih dvokaličnic so dokazali, da je endodermis odločilna prepreka za vstop Pb v prevajalne elemente (Lyubenova in sod., 2012). Enako velja tudi za komplekse kovin s sintetičnimi helati, ki navadno potujejo do osrednjega koreninskega cilindra po apoplastu, zato so predvideli, da v prevodne elemente korenin vstopajo le na področju koreninske

čepice, kjer endodermis še ni dokončno razvit (Nowack in Bucheli., 2007). V raziskavi razporeditve Cu v koreninah *Brassica carinata*, tretiranih s  $\text{CuSO}_4$  in CuEDDS so ugotovili, da se Cu v prvem primeru nahaja pretežno v žili, saj  $\text{Cu}^{2+}$  močno poškoduje membrane in tako pasivno vstopa v prevodna tkiva, medtem ko se v drugem primeru Cu nahaja pretežno v notranjih celicah skorje in v endodermisu, kjer se ustavi (Cestone in sod., 2012). Da lahko prehaja v prevodna tkiva, se mora CuEDDS kompleks predhodno razgraditi. Zato sklepamo, da v prevodna tkiva vstopajo nanodelci, ki so uspeli iz apoplasta preiti v simplast, saj se koncentracija Cu v žilah korenin povečuje s koncentracijo dodanega CuO. V najnovejši raziskavi so Wang in sod. (2012) dokazali, da se CuO nanodelci po ksilemu prenašajo iz korenin v poganjke. Hipotezo, da se prenašajo v obliki  $\text{Cu}^{2+}$  ionov, so ovrgli, saj so v tkivih listov koruze s TEM identificirali nanodelce CuO. Obenem pa so ugotovili, da se nanodelci CuO lahko transportirajo iz poganjkov v korenine koruze, saj so opazili črne agregate na koreninah, ki niso bile direktno izpostavljene nanodelcem CuO. Ti rezultati nakazujejo na veliko kompleksnost transporta nanodelcev pri rastlinah, katerega mehanizmi zaenkrat še niso poznani.

## 5.5 LOKALIZACIJA BAKRA IN OSTALIH ELEMENTOV

Lokalizacijo elementov smo v koreninah na tkivnem nivoju določali s pomočjo mikro protonske emisije rentgenskih žarkov (mikro-PIXE). Tudi pri lokalizaciji smo potrdili opažen trend TXRF meritev, in sicer odvisnost koncentracije bakra v koreninskih tkivih sončnic od koncentracije in oblike CuO. V kontrolnih koreninah je bil Cu razporejen homogeno v zelo majhnih koncentracijah v vseh koreninskih tkivih (Slika 20, Slika 22). Pri obeh tretmajih s standardno obliko CuO se je Cu, tako v koreninskem vršičku kot v zreli korenini, nahajal na in v rizodermisu, kar pomeni, da CuO v tej obliki ne prehaja v notranja tkiva korenin (Slika 20, Slika 22). Pri obeh tretmajih z nano obliko CuO smo višje koncentracije Cu locirali v rizodermisu, koreninski čepici, meristemski regiji in skorji, kjer se je prodiranje v endodermisu zaustavilo in so koncentracije v žili precej nižje (Slika 26, Slika 27). Podobno se tudi nanodelci Ag v koreninah navadnega repnjakovca (*Arabidopsis thaliana*) pretežno nahajajo na površini koreninske čepice in v notranjosti koreninske čepice, v osrednji cilinder pa prehajajo le v manjših količinah (Ma in sod., 2010).

To je dokaz, da so nanodelci sposobni prodirati v notranja koreninska tkiva in da Kasparijeva proga v endodermisu učinkovito preprečuje množičen vstop nanodelcev v žilo. Obenem smo tudi dokazali, da CuO v standardni kemijski obliki v manjši meri prehaja v žilo.

Z metodo mikro-PIXE smo v tkivih poleg drugih elementov (P, S, K, Ca, Mn, Fe, Zn) uspeli določiti porazdelitev skupnega bakra, ne pa tudi bakrovih vezavnih oblik, tako da lahko le sklepamo, da porazdelitev Cu v koreninah, tretiranih s CuO oz. nano CuO, dejansko odraža porazdelitev CuO ob predpostavki, da se CuO ne raztaplja. Za dokazovanje vezavnih oblik CuO v koreninah bi morali uporabiti drugo metodo, npr. mikro-XANES (Arčon, 2006), s katero bi lahko natančno določili vezavne oblike Cu v tkivih.

Možne interakcije nanodelcev z rastlinskimi koreninami so lepljenje na zunanjo površino korenin, vgrajevanje v celično steno ali pa privzem v celico. Nanodelci lahko difundirajo v medcelične prostore v apoplastu in se tam vgradijo v celično membrano. Rastlinske celice imajo zaradi karboksilnih in hidroksilnih skupin polisaharidov v celični steni negativni naboj na površini, kar jim omogoča prenos negativno nabitih nanodelcev v apoplast. Kasparijeva proga v endodermu predstavlja prepreko za apoplastni prenos nanodelcev v žilo, tako da je možni prenos v žilo le po simplastu. Ta prepreka pa ni popolna, saj nanodelci lahko vstopijo v ksilem preko lukenj in poškodovanih celic, ne da bi jim bilo treba prečkati celično membrano. Ugotovili so, da je ta proces prevladujoč v prenosu kovinskih helatorjev (npr. EDTA) do žile in kasneje poganjka (Nowack in sod., 2006, Tandy in sod., 2006, cit. po Nair in sod., 2010). Na podlagi tega znanja o fiziologiji korenine so znanstveniki postavili hipotezo, da nanodelci z negativnim nabojem lahko vstopijo v apoplast skorje in tudi v žilo, pri tem pa jim ni treba vstopiti v posamezne celice (Nowack in Bucheli, 2007; cit. po Nair, 2010).

### 5.5.1 Razporejanje bakra na celičnem nivoju

Z metodo LEXRF smo določili porazdelitev Cu na celičnem nivoju, kjer smo opazili, da se ta koncentrira na zunanji strani celičnih sten rizodermisa. Pri tretiranju z nanodelci CuO pa smo Cu lokalizirali tudi v simplastu skorje (Slika 28). Omenjena metoda nam omogoča tudi lokalizacijo kisika. Iz kolokalizacijskih map je razvidno, da Cu kolokalizira s kisikom, zato lahko sklepamo, da se baker v celicah skorje nahaja v obliki nanodelcev CuO. To pomeni, da so nanodelci CuO sposobni prečkati membrano.

Mnogi raziskovalci so že dokazali, da nanodelci prehajajo v notranjost celic in tam tudi ostanejo v obliki nanodelca. Wang in sod. (2012) so opazili nanodelce CuO tako v celičnih stenah rizodermalnih celic kot tudi v medceličnih prostorih in v notranjosti celic skorje, celo v jedru. Ker so našli nanodelce v medceličnih prostorih, predvidevajo, da potujejo preko rizodermisa in skorje po apoplastni poti. Ker so v celici opazili endosom, so predvidevali, da je način vstopa nanodelca CuO v celico s pomočjo endocitoze, kar so nakazali že v predhodni študiji na algah. Pri raziskavi Gonzales-Melendi in sod. (2008) se je pri tretiranju buče z magnetnimi nanodelci, prevlečenimi z ogljikom, izkazalo, da so nanodelci prisotni povsod, tako v celicah kot tudi v medceličnih prostorih. S pomočjo TEM so opazili prisotnost črnih pik v endodermisu korenin, tretiranih z ZnO. Bile so v apoplastu, citoplazmi in celo v jedru celice. Velikosti črnih pik ( $19 \pm 6$  nm) so bile enake kot velikosti posameznih nanodelcev ZnO. Zaključili so, da nanodelci ZnO lahko preidejo v endodermis in prevodna tkiva korenine ljuke (Lin in Xing, 2008). Tako individualne kot tudi agregirane nanodelce Cu so opazili v citoplazmi in celični steni koreninskih celic fižola. Skupke so opazili v vakuolah, večji so bili pri višjih koncentracijah tretiranja (Lee in sod., 2008). Rico in sod. (2011) so v svojem pregledu objav povzeli, da imamo jasne zaključke o privzemu in prenosu nanodelcev po rastlini le o fullerenu, Ni(OH)<sub>2</sub> in Cu nanodelcih. Veliko je znanega o privzemu nanocevk, a te so hidrofobne, zato je njihov privzem drugačen od ostalih nabitih nanodelcev.

### 5.5.2 Učinki na prerazporejanje esencialnih elementov

Tretiranje rastlin s CuO oz. nano CuO je vplivalo tudi na spremembo porazdelitve drugih elementov v koreninskih tkivih. Železa in cinka pri kontroli skoraj ni bilo (Slika 20, Slika 22). Oba elementa se pri tretiranih rastlinah s CuO nahajata predvsem v rizodermisu in koreninski čepici, najvišje koncentracije pa so v koreninah, tretiranih z nanodelci CuO (Priloga E, Priloga F). Rezultati analize Pearsonovega korelacijskega koeficienta nam pokažejo pozitivno kolokalizacijo cinka in železa z bakrom (Preglednica 3, Priloga D). Povečane koncentracije tako železa kot cinka v koreninskih tkivih so verjetno posledica deleža nečistoč v obeh kemikalijah, tako v standardnem CuO kot nano CuO. Frlic (2011) je ugotovila, da se cink ni prenašal iz korenin v poganjke.

Kalcij smo lokalizirali v celotnem koreninskem vršičku (Slika 21), manj v žili in več v koreninski čepici; zanimivo pri tretmaju nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup> je, da se je kalcij koncentriral v skorji in endodermisu, v vseh tkivih pa je bil prisoten v višjih koncentracijah kot pri kontroli (Slika 23, Priloga G). Trend poviševanja kalcija v rastlini z naraščajočo koncentracijo CuO se je pokazal tudi v predhodni raziskavi (Frlic, 2011). Zviševanje koncentracije kalcija v koreninah je lahko posledica njegove prisotnosti kot nečistoče v CuO, kar je bilo na embalaži standardne oblike zabeleženo, meritve pa so pokazale, da je kalcij v še višji koncentraciji prisoten tudi v nano obliki CuO.

Za kalij smo ugotovili, da se pri vseh tretmajih nahaja v vseh koreninskih tkivih, medtem ko se pri tretmaju nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup> v višjih koncentracijah nahaja le v žili (Slika 21, Slika 23), v povprečju pa so koncentracije kalija ekstremno nizke (Priloga H). Kalij je element, ki ga najdemo pretežno v citoplazmi celic in močno vpliva na njihov osmotski potencial, obenem pa uravnava pH med 7 in 8, kar je optimum za delovanje številnih encimov. Zmanjšanje njegove koncentracije v celicah vodi v spremembe delovanja številnih encimov (Marschner, 1995). Wang in sod. (2012) so potrdili, da nanodelci CuO s svojim vplivom na integriteto celične membrane motijo prepuščanje K<sup>+</sup>. Tudi Frlic (2011) je dokazala upadanje koncentracije kalija tako v koreninah kot v poganjkih pri tretmajih z nanodelci CuO, medtem ko standardni CuO ni vplival na spremembo koncentracijo kalija v poganjkih. Iz tega lahko sklepamo, da nanodelci CuO motijo absorpcijo kalija preko

korenin. To je lahko vodilo v spremembe delovanja encimov, s tem pa sta bili moteni sinteza proteinov in fotosinteza (Marschner, 1995), kar se je odražalo tudi na morfologiji rastlin.

Na prečnem prerezu zrele korenine smo žveplo locirali v največji koncentraciji v žili le pri kontroli (Priloga J), pri tretmaju nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup> se je koncentracija S v vseh tkivih znižala, z izjemo koreninske čepice. Žveplo se koncentrira v endodermisu, v koreninskem vršičku pa se nahaja tudi v žili, pri tretmaju z nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup> pa tudi v rizodermisu (Slika 21, Slika 23). To lahko potrjuje hipotezo, da se nanodelci CuO v rastlini bioakumulirajo v obliki CuO in Cu(I)-žveplovih kompleksov (Dimpka in sod., 2012; Wang in sod., 2012).

Fosfor se v kontrolnih koreninskih vršičkih razporeja precej enakomerno, pri ostalih tretmajih pa se koncentrira v žili, koreninski čepici in rizodermisu. Fosfor v zreli korenini najdemo v najvišjih koncentracijah v žili, endodermisu in rizodermisu pri vseh tretmajih z izjemo tretmaja nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup>, kjer je skoncentriran v rizodermisu in se ne kopiči v žili (Slika 21, Slika 23). V koreninskem vršičku se koncentracija fosforja v primerjavi s kontrolo pri tretmaju nano 100 mg l<sup>-1</sup> v žili in skorji zelo zniža (Priloga I), kar kaže na motnje v privzemu P.

Problem pri interpretiranju rezultatov je bilo pomanjkanje ponovitev meritev, saj smo za vsak tretma imeli izmerjeno le po eno porazdelitveno mapo prečnega in vzdolžnega prereza. Tudi označevanje tkiv je bilo zelo subjektivno, kljub temu, da smo si za določanje tkiva pomagali s slikami, ki smo jih posneli s svetlobnim mikroskopom in STIM (scanning ion transmission microscopy). Problematična je bila tudi priprava vzorcev, saj so rezine zelo občutljive in jih lahko hitro kontaminiramo, kot je vidno na primeru mape Zn koreninskega vršička, kjer je element prisoten le v eni liniji (Slika 22).

Vzrokov za spremenjeno porazdelitev elementov je veliko. Zaradi spremenjene celične stene in poškodovane membrane je lahko motena regulacija transporta ostalih ionov in snovi (Pal in sod., 2007; cit. po Navarro in sod., 2008; Lin in Xing, 2008). Večje število

hidroksilnih in karboksilnih skupin na mestu poškodb, nastalih zaradi tretiranja s Pb, prerazporejajo Ca iz epidermalnih celic v kortikalne, akumulirajo P in S ione ter druge komponente v regiji poškodb, kar povečuje možnost vezave ostalih eno- in dvo-valentnih kationov (Lyubenova in sod., 2012). V raziskavi Cifuentes in sod. (2010) so ugotovili, da različne rastline različno hitro privzemajo nanodelce in jih različno porazdeljujejo po tkivu. Hitrejši privzem imata žito in grah, medtem ko imata paradižnik in sončnica počasnejšega. Obenem so ugotovili, da ima sončnica manjšo sposobnost prestavljanja nanodelcev radialno izven prevajalnih tkiv.

Torej se nanodelci pojavljajo in potujejo tako po simplastu kot tudi apoplastu. Mehanizem prehoda nanodelcev še ni natančno poznan, verjetno pa nanodelci fizično poškodujejo celično steno in membrano. Včasih se nanodelci agregirajo in lahko blokirajo ionske kanale, obenem pa lahko povečajo luknje v celični steni z interakcijo s proteini in polisaharidi v celični steni, kar se kaže v njihovem uspešnem prenosu v rastlino.

Naši rezultati kažejo, da se kompleksnosti vplivov nanodelcev na rastline, njene organe in rastlinske celice ne da razložiti s fizikalno kemijskimi opisi nanodelcev in rastline. Stampolius in sod. (2009) so ugotovili, da za preučevanje vplivov nanodelcev ne zadoščajo standardne fitotoksiološke raziskave, kot so kaljivost in dolžina korenin. Za natančnejše preučevanje vplivov se moramo poslužiti metod lokalizacije elementov na celičnem in subceličnem nivoju (Regvar in sod., 2011), pa tudi določanja kemijskih oblik elementov, iz katerih so nanodelci sestavljeni.

## 5.6 LIPIDNA PEROKSIDACIJA

Lipidna peroksidacija je radikalska poškodba biološke membrane, ki vodi do porušenja membranske strukture in njene funkcije. Definirana je kot porušenje ravnotežja med prooksidativnimi in antioksidativnimi procesi v celici (Niki in sod., 2005).

Malondialdehid (MDA) je spojina, ki nastane pri neencimski lipidni peroksidaciji nenasičenih maščobnih kislin in je merilo za lipidno peroksidacijo. MDA reagira in vivo in

in vitro s prostimi aminoskupinami proteinov, fosfolipidov ali nukleinskih kislin (Chancerelly in sod., 1998).

Koncentracija MDA lipida je v koreninah tretiranih rastlin naraščala s povečujočo koncentracijo CuO v hranilni raztopini (Slika 30). Koncentracija MDA lipida je bila višja pri tretmajih z nano obliko CuO v primerjavi s tretmaji s standardno obliko CuO. Z izjemo kontrole, kjer se je koncentracija MDA lipida po 29 dneh zmanjšala za 60 %, so bile koncentracije MDA lipida pri tretiranih rastlinah, starih 29 dni, od 11 do 112 % višje kot pri 2 dni starih. Iz tega sklepamo, da sama rast rastlin na hidroponiki za rastline ni stresna. Rezultati količine MDA lipida so tudi v poganjkih od 35 do 148 % višje po 29 dneh tretiranja s CuO oz. nano CuO. To nakazuje, da tudi v poganjkih prihaja do poškodbe membran, a bi za statistično ovrednotenje potrebovali večje število ponovitev. Mnogi raziskovalci so dokazali, da je mehanizem strupenosti nanodelcev med drugim tudi povečana lipidna peroksidacija. Dimpka in sod. (2012) ter Wang in sod. (2012) so ugotovili, da nanodelci CuO po vstopu v celico povzročijo nastanek ROS in lipidno peroksidacijo. Kumari in sod. (2011) so dokazali, da nanodelci ZnO povečujejo lipidno peroksidacijo v koreninah česna, prav tako nanodelci TiO<sub>2</sub> povečujejo lipidno peroksidacijo v čebuli (Gosh in sod., 2010, cit. po Rico in sod., 2011).

## 5.7 BIOKEMIJSKE SPREMEMBE

Analizo biokemijskih sprememb smo opravili s pomočjo infrardeče spektroskopije z uporabo Fourierjeve transformacije (FTIR). Ta zaznava vibracijska gibanja posameznih kemijskih vezi vseh molekul, ki ležijo v rang valovnih dolžin med 4000 in 400 cm<sup>-1</sup>. V vibracijskih spektrih se različna razmerja in/ali konformacije biomolekul odražajo v rahlih razlikah njihovih absorpcijskih vrhov in nakazujejo spremembe na celičnem ali tkivnem nivoju (Dumas in sod., 2006). FTIR vrhovi so relativno ozki in jih je v mnogih primerih mogoče povezati z vibracijo določene kemijske vezi (ali posamezne funkcionalne skupine) v molekuli (Movasaghi in sod., 2008). Meritve biokemijske sestave homogenih vzorcev poganjkov in korenin tretiranih sončnic so bile opravljene na Kemijskem inštitutu (Ljubljana) v Laboratoriju za strukturo biomolekul (L14) z uporabo vibracijskih



spektrometrov, medtem ko smo tkivne spremembe preučili na sinhrotronu Elettra (Trst), na žarkovni liniji SISSI (BL9.1), ki deluje na področju infrardeče in vidne svetlobe za uporabo v spektroskopiji.

Auffan in sod. (2009) so predpostavili tri mehanizme strupenosti kovinskih nanodelcev. Prvi so spremembe redoks stanja površine, ki lahko oksidirajo proteine, tvorijo reaktivne kisikove zvrsti (ROS) in inducirajo oksidativni stres. Ob predpostavki, da se  $\text{Cu}^{2+}$  ioni odtapljajo s površine nanodelcev  $\text{CuO}$ , bi bakrov redoks cikel med  $\text{Cu}^{2+}$  in  $\text{Cu}^+$  lahko kataliziral produkcijo zelo strupenih hidroksilnih radikalov, ki poškodujejo DNA, lipide, proteine in ostale biomolekule. Strupenost na celični ravni bi lahko pripisali vezanju  $\text{Cu}$  na sulfhidrilne skupine na proteinih in s tem inhibiciji encimatske aktivnosti oz. funkcionalnosti proteinov, pomanjkanju ostalih esencialnih ionov zaradi motenih procesov celičnega transporta ter najpomembneje oksidativnim poškodbam (Yruela, 2005).

Zaradi kompleksnosti bioloških tkiv so FTIR spektri, posneti v rastlinskih vzorcih, zelo kompleksni, njihova interpretacija pa je precej težavna, saj nemalokrat prihaja do prekrivanja trakov, ki so značilni za posamezne skupine molekul. Analize spektrov smo se lotili tako, da smo najprej naredili klustersko analizo podobnosti spektrov, kjer smo primerjali celotne spektre (od  $650\text{ cm}^{-1}$  do  $4000\text{ cm}^{-1}$ ). V drugi fazi smo potem analizirali in primerjali višine izbranih trakov v FTIR spektru. Običajno je najbolj optimalna metoda izbor normalizacijskega faktorja oz. referenčnega traku, ki se med posameznimi vzorci ne spreminja. Tudi mi smo poskusili z izborom referenčnega traku, vendar smo ugotovili, da v rastlinskih vzorcih noben trak ni primeren kot interni standard, saj so se med tretmaji vsi spreminjali. Zato smo se odločili za predstavitev rezultatov v obliki razmerij med trakovi, ki so značilni za posamezne biomolekule, saj se razmerja med trakovi ohranjajo ne glede na višino trakov, kar pa omogoča primerjavo med posameznimi vzorci oz. tretmaji. Za definiranje količine posameznih biomolekul smo izbrali karakterističen trak za vsako izmed njih (Slika 31). Verjetno bi bilo natančneje, če bi za vsako skupino biomolekul preučili več trakov. Med tretmaji smo med seboj primerjali spremembe v intenziteti oz. absorbanci trakov. Odločili smo se za metodo integracije oz. odčitavanje višine traku,

čepprav je pogosteje uporabljena metoda odčitavanje ploščine. Da bi bilo odčitavanje primerljivo, smo vsem spektrom določili enotno bazno linijo.

Pri analizi zunanjih tkiv korenin (rizodermis, koreninska čepica) smo naleteli na problem, da so se v spektru pojavljali trakovi, značilni za zamrzovalni medij (Jung tissue tek). V zamrzovalni medij smo namreč pred hitrim zmrzovanjem vklopili vzorce. Medij namreč poveča hitrost zamrzovanja vzorcev in hkrati nudi potrebno oporo, da vzorce lahko s pomočjo kriomikrotoma narežemo na tanke rezine. Spektre, ki so vsebovali trakove zamrzovalnega medija smo analizirali tako, da smo trakove, značilne za medij, odšteli. Predhodno smo namreč pomerili in okarakterizirali spektre čistega zamrzovalnega medija.

Problem pri analizi FTIR spektrov je predstavljala tudi neenakomerna debelina rezine in gostota vzorca, saj je pri kontrolnih rastlinah v tkivu več vode in se po dehidraciji vzorca gostota zniža. Da bi bili rezultati čim bolj zanesljivi, smo pri meritvah na tkivnem nivoju izvedli veliko število ponovitev za vsako tkivo, medtem ko imamo pri meritvah FTIR spektrov na organskem nivoju (celotnih korenin, koreninskih vršičkov in poganjkov) le po eno ponovitev, ki smo jo izmerili na kompozitnem vzorcu, ki je bil sestavljen iz organov treh rastlin istega tretmaja. Ker smo opazili propadanje in gnitje koreninskega tkiva, smo pričakovali manj lipidov in proteinov v koreninah, tretiranih z nano obliko CuO. Obenem je bila v tretiranih koreninah povečana lipidna peroksidacija, tako da smo domnevali, da se bo spremenila koncentracija lipidov, le da se bo to kazalo lokalno v določenih koreninskih tkivih. Pri lipidni peroksidaciji se pojavi vrh pri  $2935\text{ cm}^{-1}$ , ki predstavlja vzdolžno valenčno nihanje  $\text{-OCH}^2\text{-}$  funkcionalne skupine peroksidov in hidroperoksidov (Wei in sod., 2009).

Z uporabo klusterske analize podobnosti spektrov korenin smo ugotovili, da sta si med seboj najbolj podobna spektra tretmajev z  $10\text{ mg l}^{-1}\text{ CuO}$  v obeh oblikah, medtem ko spekter korenin tretmaja nano CuO  $100\text{ mg l}^{-1}$  po obliki močno odstopa od drugih (Slika 31.a). Za spektre listov velja, da sta si med seboj najbolj podobna spektra listov tretmajev z nano obliko CuO (Slika 32.b).

Pri tretmajih z nanodelci CuO se v koreninah poveča količina proteinov, medtem ko je pri tretmajih s standardno kemijsko obliko CuO količina proteinov primerljiva s kontrolo (Slika 33). Že Frlic (2011) je dokazala, da se je količina proteinov tako v koreninah kot v poganjkih povečevala z naraščajočo koncentracijo CuO v raztopini. Verjetno je pri rastlinah, tretiranih z nanodelci CuO, prihajalo do motenj sinteze ogljikovih hidratov, kar je vplivalo na relativno večji delež proteinov v vzorcu. Količina DNA se je povečala le pri tretmaju z nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup>, in sicer za 19 %. Ogljikovi hidrati se povečajo glede na kontrolo pri obeh tretmajih s koncentracijo 10 mg l<sup>-1</sup>, pri tretmajih s koncentracijo 100 mg l<sup>-1</sup> pa so le-ti primerljivi s kontrolo. Pri spektrih koreninskih vršičkov tretmaja nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup> opazimo precejšnje zmanjšanje tako proteinov kot DNA in ogljikovih hidratov, kar je verjetno posledica gnitja in popolnega propada tkiva (Slika 34). Pri analizi biokemijske sestave spektrov listov sončnic nismo opazili bistvenih razlik med tretmaji, verjetno zato, ker so korenine v neposrednem stiku s CuO in je vpliv nanodelcev na tkivo večji (Slika 35).

Klusterske analize infrardečih spektrov posameznih tkiv znotraj korenine so nam pokazale, da se pričakovane biokemijske spremembe dogajajo predvsem v zunanjih tkivih korenin (rizodermis, skorja, koreninska čepica, meristemska regija), medtem ko v notranjih tkivih (žila, meristemska regija in endodermis) korenin ni prišlo do očitnih sprememb. Zanimivo je, da so spektri, posneti v skorji in rizodermisu v koreninskih vršičkih obeh tretmajev z nanodelci CuO, podobni, saj jih na podlagi klusterske analize lahko uvrstimo v isto skupino (Slika 38, Slika 39). To si lahko razlagamo s tem, da se tkivo v koreninskem vršičku enako odziva na obliko CuO ne glede na koncentracijo, medtem ko ima zrela korenina že očitne poškodbe in veliko večjo biokemijsko raznolikost pri večjih koncentracijah nanodelcev. Verjetno je vzrok v tem, da tkivo koreninskega vršička še ni lignificirano.

Najočitnejše spremembe se kažejo na tkivih rizodermisa in koreninske čepice, saj sta to tkivi, ki sta v neposrednem stiku z nanodelci CuO (Slika 43, Slika 46). Tkiva v notranjosti korenine niso v neposrednem stiku z nanodelci CuO v hranilni raztopini, zato so tudi spremembe v tkivih v notranjosti korenine vedno manj prisotne. Iz tega lahko zaključimo,

da so poškodbe notranjih tkiv, kot so koreninska skorja, endodermis in osrednji cilinder, odvisne predvsem od prodornosti nanodelcev.

Nemalokrat se je pokazalo, da so spremembe pri tretmaju nano CuO 10 mg l<sup>-1</sup> večje kot pri nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup> (vidno pri rizodermisu, skorji, koreninski čepici in meristemski regiji). Verjetno je to posledica izbora koreninskih vršičkov za pripravo mikrorezin, saj so bili pri tretmaju nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup> koreninski vršički gnili, tako da smo morali vzeti novo nastale koreninske vršičke, ki so bili tretiranju izpostavljeni manj časa. Strupenost višje koncentracije je dobro vidna na nivoju celotnega organizma. Zanimivo je, da so v koreninskih vršičkih vrednosti absorbanca posameznih trakov precej višje v primerjavi s tistimi v zrelih koreninah enakih tkiv.

Za preučevanje proteinov smo vzeli vrh amida I in prišli do zaključka, da se tretiranje z nanodelci CuO najočitneje kaže v uničenju vrha amida I, in sicer so najočitnejše spremembe vidne v vseh tkivih koreninskih vršičkov, kar je v nasprotju z rezultati analize na organskem nivoju. S tkivnimi analizami zrele korenine smo ugotovili, da se v žili in skorji koncentracija proteinov povečuje, v rizodermisu in endodermisu pa je primerljiva s kontrolo. To razlaga rezultate analize na organskem nivoju, saj ta predstavlja povprečne vrednosti količine biomolekul v posameznih organih in s tem zabriše spremembe na tkivnem nivoju. Ker je v zreli korenini največji delež skorje, ta prispeva k povečevanju koncentracije proteinov v celokupnem vzorcu korenine.

Ena izmed teorij je, da nanodelci motijo sintezo proteinov. Nanodelci se v celici obdajo s proteinskim plaščem ali pa se vežejo na proteine. Na primeru arginina in aspartamske kisline so dokazali, da se negativno nabiti nanodelci CuO vežejo na aminokislino s pozitivnim nabojem. Vzrok je v elektrostatskem odboju med negativno površino nanodelcev in negativno karboksilno skupino na aminokislini (arginin). Z višanjem koncentracije nanodelcev CuO se povečuje število interakcij s pozitivno nabitimi aminokislinami (El Trass in sod., 2012). Celice z nanodelci CuO so imele več HSP proteinov, ki sodelujejo pri zvijanju proteinov, kar nakazuje na večji okoljski stres in večjo potrebo po njih, kar pomeni, da je bilo v celici povečano število odvitih proteinov

(Connolly, 2010). Wie in sod. (2009) so z uporabo FTIR spektroskopije dokazali, da se sinteza proteinov po tretiranju listov detelje s Cd 1 uro ustavi. Po 24 urah pa se je vrednost proteinov vrnila na raven kontrole.

Količina ogljikovih hidratov se niža, kar je posledica motnje sinteze ogljikovih hidratov, verjetno zaradi nalaganja in vgradnje nanodelcev CuO na in v celično steno. Ker so Wang in sod. (2012) ugotovili, da se nanodelci CuO lahko po floemu prenašajo iz poganjkov v korenine, so predvideli, da se nanodelci povežejo z ogljikovimi hidrati v času shranjevanja fotosintatov. Dokazali so, da se del CuO nanodelcev v rastlini reducira v Cu<sub>2</sub>O in Cu<sub>2</sub>S. Redukcije Cu (II) v Cu (I) bi bili sposobni encimi, kot so reduktaze in ferodoksini fotosintetskega sistema. Drugi dokaz je prisotnost reduciranih sladkorjev, kot sta glukoza in fruktoza. To podpirajo z raziskavami Beattie in Haverkamp (2011, cit. po Wang in sod., 2012), ki sta opisala redukcijo Ag<sup>+</sup> in Au<sup>3+</sup> v Ag<sup>0</sup> in Au<sup>0</sup> s sladkorji v *Brassica juncea*. Za detelje, tretirane s Cd, so za ogljikove hidrate ugotovili, da se je pri vseh dvignila višina traku (1199 cm<sup>-1</sup>, 1155 cm<sup>-1</sup>, 1106 cm<sup>-1</sup> in 1037 cm<sup>-1</sup>), a celokupna površina vrhov se je zmanjšala. Zaključili so, da je motena sinteza ogljikovih hidratov in so se pojavile strukturne spremembe ogljikovih hidratov (Wei in sod., 2009).

Prav tako se pri tretmajih z nanodelci CuO zmanjšuje količina lipidov. To smo predvideli, saj smo že predhodno dokazali pojav razpada oz. peroksidacije membran. Wei in sod. (2009) so dokazali tudi višjo prisotnost peroksidov in hidroperoksidov, ki so biološki pokazatelji lipidne peroksidacije.

Bistvenih vplivov tretiranja rastlin s CuO na biokemijske spremembe DNA nismo zaznali, čeprav nam mitotski indeks pokaže, da je prišlo do sprememb v funkcionalnosti DNA. Količina DNA se je v meristemski regiji koreninskega vršička, kjer poteka delitev celic, zmanjšala pri tretmajih s koncentracijo 10 mg l<sup>-1</sup> pri standardnem CuO na 90 %, pri nano CuO pa na 57 %, medtem ko se povečala pri koncentracijah 100 mg l<sup>-1</sup> pri standardnem CuO na 180 %, pri nanodelcih CuO pa na 122 % (Slika 45). Opazili smo, da je imelo najbolj negativen vpliv na količino DNA tretiranje sončnic z 10 mg l<sup>-1</sup> nano CuO. Kot smo ugotovili že prej, pri tej koncentraciji nanodelcev ne nastajajo večji aglomerati in tako

lahko več delcev preide v notranjost rastline, kar povzroči večjo lokalno škodo. Poškodbe DNA so lahko fizične, lahko pride do mutacij ali vezave delca na DNA oz. na beljakovine, ki sodelujejo pri popravljanju nastalih poškodb DNA. Poškodbe DNA se odražajo kot nepravilen ali zavrt proces celične delitve oz. motnje normalnega delovanja celice. Vzrok temu so nepravilnosti v prepisu ali pa popolna inhibicija sinteze različnih nujno potrebnih biomolekul, kot so npr. proteini (encimi), hormoni, ogljikovi hidrati, lipidi, RNA ...

Najočitnejši učinki nanodelcev CuO so se kazali v zmanjševanju količine proteinov, ogljikovih hidratov in lipidov. Pri preučevanju Cd stresa na *Padina tetrastromatica* so ugotovili, da se je zmanjšala količina proteinov in ogljikovih hidratov (D'Souza in sod., 2008).

## 5.8 GENOTOKSIČNOST

Genotoksičnost smo opazovali z meritvami mitotskega indeksa. Mitotski indeks je bil največji pri kontrolnih rastlinah in se je zmanjševal z naraščanjem koncentracije CuO v hranilni raztopini. Vrednosti mitotskega indeksa pri nano obliki CuO so bile statistično značilno nižje kot pri enaki koncentraciji standardnega CuO (Slika 56). Pri koncentraciji 10 mg l<sup>-1</sup> se je mitotski indeks zmanjšal za 50 %, pri koncentraciji 100 mg l<sup>-1</sup> pa za 70 %. Faktorska analiza variance je pokazala, da na mitotski indeks vplivata tako oblika CuO kot njegova koncentracija v hranilni raztopini. Posledica motnje v celičnih delitvah meristemske regije koreninskega vršička se verjetno odraža v slabši rasti korenin.

V raziskavi Karlsson in sod. (2009) so s primerjavo različnih nanodelcev ugotovili, da so najbolj citotoksični in zmožni poškodovati DNA ravno nanodelci CuO. V poskusu vpliva nanodelcev ZnO na česen se je mitotski indeks zmanjševal v odvisnosti od koncentracije in časa (Shaymurat in sod., 2012; Kumari in sod., 2011). Verjetno je eden izmed mehanizmov genotoksičnosti nanodelcev povečana količina ROS v celici, saj ti poškodujejo DNA in gene za kontrolo celičnega cikla (Connolly, 2010). Najnovejše raziskave na nanodelcih CuO (Atha in sod., 2012) so, da se oksidativno spremenjene komponente kopičijo v celicah, kar vodi do mutagenih lezij DNA, ki so vzrok zavrte rasti rastline.

## 5.9 MORFOLOŠKE SPREMEMBE RASTLIN

Kot posledica biokemijskih sprememb in sprememb v razporeditvi elementov v tretiranih rastlinah se strupenostni učinki tretiranja s CuO pokažejo tudi na morfologiji rastlin. Največje spremembe so bile pri sončnicah, tretiranih z nanodelci CuO. Pri koncentraciji 10 mg l<sup>-1</sup> spremembe niso tako velike, iz česar sklepamo, da rastlina, izpostavljena tej koncentraciji nanodelcev CuO, lahko raste normalno, medtem ko so pri koncentraciji 100 mg l<sup>-1</sup> poškodbe prevelike in rastlina ne more zaključiti svojega ravnega cikla.

Z naraščanjem koncentracije CuO v standardni in nano obliki so se začele pojavljati kloroze, nekroze in deformacije listov, medtem ko je koreninski sistem postajal vedno bolj nerazvejan, temneje obarvan, korenine pa so bile vse tanjše (Slika 57). Rastline so imele manjšo biomaso (Frlic, 2011). Vsi pojavi so bili močnejše izraženi pri rastlinah, tretiranih z nano obliko CuO.

Morfologija lista je bila spremenjena pri tretmaju 100 mg l<sup>-1</sup> nano CuO, kjer je bila listna sredica bolj kompaktna in enotna, gobasto tkivo pa je bilo slabše razvito (Slika 59). Leta 2009 sta Asli in Neumann dokazala, da nanodelci TiO<sub>2</sub> zapolnjujejo prostore med celuloznimi mikrofibrilami v celični steni celic lista kalčka koruze, kar se je odražalo v inhibiciji rasti lista, slabši transpiraciji in slabši koreninski hidravlični prevodnosti. Akumulacija nanodelcev na fotosintetskih površinah ovira prehajanje plinov preko listnih rež, kar vpliva predvsem na proces fotosinteze, obenem pa povzroči segrevanje listov, kar lahko vpliva na fiziologijo rastline (Da Silva, 2006).

Kontrolne rastline so po 4 tednih rasti na hidroponski raztopini kazale značilnosti juvenilnega stebela sončnice. To so poraščenost s trihomi, manjše število celic ksilema, ki so večje in se v obliki prstastih izrastkov iztezajo proti notranjosti stebela. Sončnice, tretirane s 100 mg l<sup>-1</sup> nano CuO, pa so bile po morfoloških karakteristikah dokončno razvite. Steblo je bilo močno lignificirano, tanjše in z debelejšo skorjo kot pri enako starih rastlinah drugih tretmajev (Slika 58). Same žile so bile manjše in so izgubile obliko prstastih žil mladega stebela, kar kaže na to, da je tretiranje z nano CuO pospešilo staranje

rastlin. Iz navedenega lahko zaključimo, da nanodelci CuO pomembno spremenijo razvojne stopnje rastlin.

Na vzdolžnem prerezu koreninskega vršička lahko vidimo tkiva rizodermisa, skorje in žile ter na konici koreninsko čepico s cono meristema (Slika 60). Med različnimi tretmaji ni bilo bistvenih sprememb, z izjemo koreninskih vršičkov tretmaja nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup>. Koreninske čepice so propadle, prav tako je bil poškodovan koreninski apikalni meristem. Zaradi tega so se blizu konice korenine začele tvoriti zasnove stranskih korenin. Na splošno so koreninski vršičku pri tem tretmaju deformirani, pojavljajo pa se tudi nekroze zasnov stranskih korenin znotraj korenine.

Prečni prerez zrele korenine v absorpcijski coni nam pokaže tkiva rizodermisa, skorje, endodermisa in prevajalnih elementov (Slika 61). Za rastline, vzgojene na hidroponiki, je značilen pojav večjih intracelularnih prostorov v koreninskem tkivu, ki omogočajo lažje difundiranje plinov. Pri tretmaju 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v standardni obliki so bili na rizodermisu dobro vidni skupki CuO, ki je v tej obliki v vodnem mediju netopen in se lepi na zunanjo celično steno rizodermisa. Tako pri nano CuO 10 mg l<sup>-1</sup> kot tudi pri 100 mg l<sup>-1</sup> se je pojavila deformacija žil, nemalokrat se je porušila značilna 2- ali 5-žarkasta struktura žile. Pri koncentraciji nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup> so traheje dobro formirane, z močno celično steno, obenem pa so celice skorje ponekod deformirane in obarvane rjavo, kar nakazuje na propadanje koreninskega tkiva. Rizodermis je poškodovan in ponekod manjka, kar je verjetno posledica lastnosti nanodelcev, da mehansko poškodujejo rizodermis in tako lahko prehajajo v notranja tkiva korenine.

Wang in sod. (2012) so ugotovili, da so bile korenine koruze bolj občutljive na tretiranje z nanodelci CuO kot na standardni CuO ali Cu<sup>2+</sup> ione, kar ni presenetljivo, saj so bile korenine v neposrednem stiku z nanodelci. Dolžina in površina korenine se je zmanjšala v primerjavi s koreninami kontrole, tretiranimi s standardno obliko CuO in Cu<sup>2+</sup> ionom. Tudi celulozne mikrofibrile v parenhimatskih celicah so bile aksialno oz. osno razporejene. Te morfološke spremembe so odgovor na abiotski stres, kjer verjetno sodelujejo hormoni.



Tudi razpad mikrotubulskega omrežja je verjetno vzrok za drugačno rast celic in nabreklosti glavne korenine.

Pri korenini ljulke, tretirane s  $1000 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^+$  in nanodelcev ZnO so bili koreninski vršički skrčeni, rizodermalne celice in celice koreninske čepice pretrgane, celice skorje so bile visoko vakuolizirane in propadle, stržen žilnih elementov pa je bil ožji. Predvideli so, da nanodelci ZnO povečajo prepustnost celične membrane tako, da ustvarijo luknje v membrani in preidejo v notranjost celice. Nato se s pomočjo plazmodezem transportirajo med sosednjimi celicami, saj so to kanali, ki omogočajo transport snovi in komunikacijo med celicami, s premerom 40 nm (Lin in Xing, 2008). Tudi Pal in sod., (2007, cit. po Navarro in sod., 2008) sta dokazala, da nanodelci Ag lahko povzročijo spremembe celične membrane, povečajo njeno poroznost in pri bakterijah onemogočajo regulacijo transporta snovi v celico.

Učinki nanodelcev CuO se kažejo torej tudi v morfoloških spremembah koreninskega sistema. Glede na podatke iz literature negativne učinke nanodelcev CuO na rast in razvoj korenin lahko pripisujemo temu, da se nanodelci "ujamejo" med celulozne mikrofibrile, kar se odraža v neobičajnem nalaganju celuloznih mikrofibril in polisaharidnega matriksa ter s tem onemogočeni elongaciji celične stene. Obenem pa mehansko poškodujejo celične membrane in preidejo v notranja tkiva.

## 6 SKLEPI

- Ugotovili smo, da se iz suspenzij CuO v standardni in nano obliki, ki smo jo uporabili pri našem poskusu, bakrovi ioni ne sproščajo v dovolj velikih koncentracijah, da bi lahko morfološke in biokemijske spremembe, ki so nastale ob tretiranju, pripisali strupenosti zaradi prostih bakrovih ionov v hranilni raztopini.
- Prevodnost suspenzij z nanodelci CuO je višja kot prevodnost suspenzij s CuO v standardni kemijski obliki, iz česar sklepamo, da imajo nanodelci CuO naboj.
- Koncentracija bakra se je tako v poganjkih kot v koreninah sončnic zviševala z višanjem koncentracije CuO v raztopini. Opazili smo, da so koncentracije bakra večje v poganjkih tistih rastlin, ki so bile tretirane z nano obliko CuO, kar pomeni, da so se nanodelci zmožni transportirati po ksilemu v poganjke, in da je nano oblika CuO v rastlinskih tkivih bolj mobilna kot standardna oblika.
- S povečevanjem koncentracije CuO opazimo trend povečevanja bakra v vseh koreninskih tkivih, največ v rizodermisu in koreninski čepici. Koncentracije so višje pri tretmajih z nanodelci CuO.
- Pri tretmajih s standardnim CuO vidimo, da se je baker nahajal le na in v rizodermisu, medtem ko je bil pri tretmajih z nanodelci CuO prisoten tudi v koreninski skorji, kar kaže na to, da so nanodelci CuO zmožni prodreti globlje v rastlinska tkiva od CuO v standardni kemijski obliki.
- Baker kolokalizira s železom in cinkom, saj sta prisotna kot nečistoči v sami kemikaliji CuO v nano in v standardni obliki.
- Na celičnem nivoju smo opazili, da se pri rastlinah, tretiranih s CuO, baker koncentrira predvsem na rizodermisu korenin, pri rastlinah, tretiranih z nano CuO, pa smo Cu opazili tudi v celicah, kjer je bil kolokaliziran s kisikom, kar kaže na prisotnost nanodelcev CuO v simplastu koreninske skorje.
- Tretiranje s CuO in nano CuO je vplivalo tudi na prerazporeditev ostalih elementov v tkivih, predvsem kalija, ki se pri nano CuO 100 mg l<sup>-1</sup> nahaja le v žili. Za fosfor in žveplo velja, da se skoncentrirata v rizodermisu in žili v koreninskem vršičku,

medtem ko ju v žili zrele korenine ni. Kalcij se v zreli korenini nakopiči v skorji in endodermisu.

- Tretiranje sončnic z nanodelci CuO je povzročilo spremembe v koncentraciji nekaterih elementov v določenih koreninskih tkivih. Povišala se je koncentracija kalcija v vseh tkivih, koncentracije kalija so se ekstremno znižale v vseh tkivih, koncentracije fosforja in žvepla so se znižale, z izjemo koreninske čepice, kjer se je koncentracija žvepla povečala.
- Lipidna peroksidacija membran se je v koreninah povečevala z naraščajočo koncentracijo nanodelcev CuO.
- Analize biokemijske sestave posameznih tkiv korenin, ki smo jih opravili z infrardečo spektroskopijo z uporabo Fourierjeve transformacije (FTIR), so nam pokazale, da nanodelci CuO znižujejo količino proteinov, ogljikovih hidratov in lipidov v koreninskih tkivih sončnic.
- Nanodelci CuO motijo sintezo proteinov, obenem pa se lahko zaradi svojega naboja vežejo na aminokislino.
- Nanodelci CuO povzročajo motnje sinteze ogljikovih hidratov, verjetno zaradi nalaganja in vgradnje nanodelcev CuO na in v celično steno, obenem pa verjetno tudi spremenijo strukturo ogljikovih hidratov.
- Nanodelci CuO bistveno ne vplivajo na količino DNA, a motijo njeno funkcionalnost, kar smo dokazali z določanjem mitotskega indeksa. Ta se je zmanjševal z naraščajočo koncentracijo CuO. Nižje vrednosti mitotskega indeksa so bile opazne pri nano obliki CuO, kar pomeni, da so nanodelci CuO genotoksični in motijo proces celične delitve.
- Najočitnejše biokemijske spremembe se pojavljajo v zunanjih tkivih korenin, v rizodermisu, skorji in koreninski čepici, kjer so tkiva v neposrednem stiku z nanodelci.
- V zreli korenini so veliko opaznejše spremembe biokemijske sestave tkiva pri višji koncentraciji nanodelcev, medtem ko imajo tkiva koreninskih vršičkov večje spremembe opazne že pri nižji koncentraciji nanodelcev. Verjetno nanodelci v višji koncentraciji tvorijo aglomerate in lokalno manj poškodujejo tkivo. Posledica poškodb zrele korenine pri višji koncentraciji nanodelcev je koreninsko gnitje.

- Ob tretiranju z naraščajočimi koncentracijami nano CuO so bile na rastlinah opazne morfološke spremembe, kot je npr. slabše razvit in deformiran koreninski sistem. V koreninah je prišlo do porušjenja simetričnosti žile, manjkala je koreninska čepica in v eksodermisu so bile prisotne nekroze, kar kaže na to, da nanodelci CuO mehansko poškodujejo rizodermis korenin. Poganki so zastajali v rasti, se hitreje starali in so bili bolj lignificirani, na listih so se pojavljale kloroze in nekroze, tkivo mezofila lista pa je bilo kompaktnejše s slabše razvitim gobastim tkivom.

## 7 POVZETEK

Namen diplomske naloge je bil določiti nekatere lastnosti nanodelcev CuO in ugotoviti, kako nanodelci CuO vplivajo na morfologijo, lokalizacijo elementov in biokemijsko sestavo korenin sončnice (*Helianthus annuus*).

Sončnice smo gojili na hidroponiki v hranilni raztopini, v katero smo dodali različne koncentracije CuO v standardni in nano obliki (0, 10, 100 mg l<sup>-1</sup>). S pomočjo fotometričnega testa za bakrov ion in merjenja prevodnosti suspenzij CuO in nano CuO smo ugotovili, da se bakrov ion s CuO ne odtaplja v dovolj veliki koncentraciji, da bi spremembe na rastlinah lahko pripisali strupenosti bakrovih ionov v hranilni raztopini, ugotovili pa smo tudi, da so nanodelci CuO nosilci naboja.

Lokalizacijo elementov smo v koreninah na tkivnem nivoju določali s pomočjo mikro protonske emisije rentgenskih žarkov (mikro-PIXE, Mikroanalitski center, Institut Jožef Stefan). V kontrolnih koreninah je bil baker razporejen homogeno v vseh koreninskih tkivih, pri tretmajih s standardno obliko CuO se je baker nahajal na in v rizodermisu, pri tretmaju z nano obliko CuO pa smo višje koncentracije bakra locirali v rizodermisu, koreninski čepici in skorji, kjer se je prodiranje v endodermisu zaustavilo in so koncentracije v žili nižje. To je dokaz, da so nanodelci sposobni prodirati v notranja koreninska tkiva in da Kasparijeva proga v endodermisu učinkovito preprečuje množičen vstop nanodelcev v žilo. Z metodo nizko energijske rentgensko fluorescenčne spektromikroskopije (LEXRF, sinhrotron Elettra, Trst) smo določili porazdelitev bakra na celičnem nivoju, kjer smo opazili, da se ta koncentrira na zunanji strani celičnih sten rizodermisa. Pri tretiranju z nanodelci CuO pa smo Cu lokalizirali tudi v simplastu skorje. Iz kolokalizacijskih map je razvidno, da Cu kolokalizira s kisikom, zato lahko sklepamo, da se baker v celicah skorje nahaja v obliki nanodelcev CuO. To pomeni, da so nanodelci CuO sposobni prečkati membrano in da potujejo po simplastu in apoplastu.

Tretiranje rastlin s CuO oz. nano CuO je vplivalo tudi na spremembo koncentracije in porazdelitve drugih elementov v koreninskih tkivih. Železo in cink se pri tretiranih

rastlinah s CuO nahajata predvsem v rizodermisu in koreninski čepici. Rezultati analize Pearsonovega korelacijskega koeficienta nam pokažejo pozitivno kolokalizacijo cinka in železa z bakrom. Povečane koncentracije obeh elementov so verjetno posledica prisotnosti nečistoč v obeh kemikalijah CuO. Enako velja za kalcij, ki smo ga tudi zasledili v višjih koncentracijah v koreninah nano tretmajev. Koncentracije kalija so se močno znižale, iz česar sklepamo, da nanodelci CuO motijo absorpcijo kalija preko korenin. Koncentracije fosforja in žvepla se v primerjavi s kontrolo znižajo. Vzrok za spremenjene koncentracije in porazdelitve elementov je spremenjena celična stena in poškodovane membrane in s tem motena regulacija transporta ostalih ionov in snovi.

Koncentracija MDA lipida, ki je pokazatelj lipidne peroksidacije, je v koreninah tretiranih rastlin naraščala s povečujočo koncentracijo CuO, vrednosti koncentracije so bile višje pri tretmajih z nano obliko CuO v primerjavi s tretmaji s standardno obliko CuO.

Analizo biokemijskih sprememb smo s pomočjo infrardeče spektroskopije z uporabo Fourierjeve transformacije (FTIR) opravili na organskem nivoju (Kemijski inštitut, Ljubljana) in na tkivnem nivoju (sinhrotron Elettra, Trst). S klustersko analizo smo ugotavljali podobnost med posnetimi FTIR spektri od  $650\text{ cm}^{-1}$  do  $4000\text{ cm}^{-1}$ , kjer se v koreninah samostojno pogrupira (tvori podskupino???) spekter tretmaja nano CuO  $100\text{ mg l}^{-1}$ . Na organskem nivoju se v tretiranih koreninah z nanodelci CuO  $100\text{ mg l}^{-1}$  poveča količina proteinov. Pri spektrih koreninskih vršičkov tretmaja nano CuO  $100\text{ mg l}^{-1}$  opazimo precejšnje zmanjšanje tako proteinov in DNA kot ogljikovih hidratov, kar je verjetno posledica gnitja in popolnega propada tkiva. Pri analizi biokemijske sestave spektrov listov sončnic nismo opazili bistvenih razlik med tretmaji, verjetno zato, ker so korenine v neposrednem stiku s CuO in je vpliv nanodelcev na tkivo večji.

Klusterske analize infrardečih spektrov posameznih tkiv znotraj korenine so nam pokazale, da se pričakovane biokemijske spremembe dogajajo predvsem v zunanjih tkivih korenin (rizodermis, skorja, koreninska čepica, meristemska regija), medtem ko v notranjih tkivih (žila, meristemska regija in endodermis) korenin ni prišlo do velikih sprememb. Iz tega

lahko zaključimo, da so poškodbe notranjih tkiv, kot so koreninska skorja, endodermis in osrednji cilinder, odvisne predvsem od prodornosti nanodelcev.

Najočitnejši efekti nanodelcev CuO so se kazali v zmanjševanju količine proteinov, ogljikovih hidratov in lipidov.

Za preučevanje proteinov smo vzeli vrh amida I in prišli do zaključka, da se tretiranje z nanodelci CuO najočitneje kaže v uničenju vrha amida I, in sicer so najočitnejše spremembe vidne v vseh tkivih koreninskih vršičkov. S tkivnimi analizami zrele korenine smo ugotovili, da se v žili in skorji koncentracija proteinov povečuje, v rizodermisu in endodermisu pa je primerljiva s kontrolo. To razlaga rezultate analize na organskem nivoju, saj ta predstavlja povprečne vrednosti količine biomolekul v posameznih organih in s tem zabriše spremembe na tkivnem nivoju. Ker je v zreli korenini največji delež skorje, ta prispeva k povečevanju koncentracije proteinov v celokupnem vzorcu korenine.

Količina ogljikovih hidratov se s tretiranjem z nanodelci CuO niža v vseh koreninskih tkivih, kar je posledica motnje sinteze ogljikovih hidratov, verjetno zaradi nalaganja in vgradnje nanodelcev CuO na in v celično steno.

Prav tako se pri tretmajih z nanodelci CuO zmanjšuje količina lipidov. To smo predvideli, saj smo že predhodno dokazali pojav razpada oz. peroksidacije lipidnih membran.

Bistvenih vplivov tretiranja rastlin s CuO na biokemijske spremembe DNA nismo zaznali. Opazili smo, da je imelo najbolj negativen vpliv na količino DNA tretiranje sončnic z 10 mg l<sup>-1</sup> nano CuO, kjer se je količina DNA zmanjšala za 43 % v primerjavi s kontrolo.

Preučili smo tudi genotoksičnost CuO in ugotovili, da se je mitotski indeks zniževal z naraščajočo koncentracijo CuO v suspenziji, vrednosti so bile statistično značilno nižje pri nano obliki CuO. Pri koncentraciji 10 mg l<sup>-1</sup> nano CuO se je mitotski indeks zmanjšal za 50 %, pri koncentraciji 100 mg l<sup>-1</sup> nano CuO pa za 70 % v primerjavi s kontrolo. Posledica motenj v celičnih delitvah meristemske regije se odraža v slabši rasti korenin.

Z naraščanjem koncentracije CuO v standardni in nano obliki so se začele na listih pojavljati kloroze, nekroze in deformacije, medtem ko je koreninski sistem postajal vedno manj razvejan, temneje obarvan, korenine pa so bile vse tanjše. Vsi pojavi so bili močnejše izraženi pri rastlinah, tretiranih z nano obliko CuO. Kontrolne rastline so po 4 tednih rasti na hidroponiki kazale značilnosti juvenilnih rastlin, medtem ko so imele rastline, tretirane z nano CuO, značilnosti zrelih rastlin, tako da lahko zaključimo, da tretiranje z nanodelci CuO pospešuje staranje rastlin. Celice koreninske skorje rastlin, tretiranih z nano CuO, so bile ponekod deformirane in obarvane rjavo, kar nakazuje na propadanje koreninskega tkiva. Rizodermis je bil poškodovan in je ponekod manjkal. Koreninske čepice so propadle, prav tako je bil poškodovan koreninski apikalni meristem. Zaradi tega so se blizu konice korenine začele tvoriti zasnove stranskih korenin. Na splošno so bili koreninski vršički deformirani, pojavljale pa so se tudi nekroze zasnove stranskih korenin znotraj korenine. Negativne učinke nanodelcev CuO na rast in razvoj korenin lahko pripisujemo temu, da se nanodelci "ujamejo" med celulozne mikrofibrile, kar se odraža v neobičajnem nalaganju celuloznih mikro fibril ter s tem onemogočeni elongaciji celične stene. Obenem mehansko poškodujejo celične membrane in tako lahko preidejo v notranja tkiva.



## 8 VIRI

- Adriano C.D. 2001. Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability and risks of metals. 2nd edition. New York, Springer: 879 str.
- Arčon I. XANES Teorija. 2006. XAS. (30. maj 2006).  
<http://www.ung.si/~arcon/xas-si/XANES/teorija.html> (4. sep. 2012)
- Aruoja V., Dubourguier H.C., Kasemets K., Kahru A. 2009. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO<sub>2</sub> to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. Science of the total environment, 407, 4: 1461-1468
- 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 Environment, 32: 577-584
- Atha D.H., Wang H., Petersen E.J., Cleveland D., Holbrook R.D., Jaruga P., Dizdaroglu M., Xing B., Nelson B.C. 2012. Copper oxide nanoparticles mediated DNA damage in terrestrial plant models. Environmental Science&Technology, 46, 3:1819-1827
- Battke F., Leopold K., Maier M., Schidhalter U., Schuster M., 2008. Palladium exposure of barley uptake and effects. Plant biology, 10: 272-276
- Blinova I., Ivask A., Heinlaan M., Mortimer M., Kahru A. 2010. Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water. Environmental Pollution, 158: 41-47
- Borkow G., Gabbay J. 2004. Putting copper into action: copper-impregnated products with potent biocidal activities. FASEB Journal, 18: 1728-1730
- Buffet P.E., Tankoua O.F., Pan J.F., Berhanu D., Herrenknecht C., Poirier L., Amiard-Triquet C., Amiard J.C., Bérard J.B., Risso C., Guibbolini M., Roméo M., Reip P., Valsami-Jones E., Mouneyrac C. 2011. Behavioural and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles. Chemosphere, 84: 166-174
- Cestone B., Vogel-Mikuš K., Quartacci M. F., Rascio N., Pongrac P., Pelicon P., Vavpetič P., Grlj N., Jeromel L., Kump P., Nečemer M., Regvar M., Navari-Izzo F. 2012. Use of micro-PIXE to determine spatial distributions of copper in *Brassica carinata* plants exposed to CuSO<sub>4</sub> or CuEDDS. The Science of the total environment, 427-428: 339-346
- Chancerelly Y., Mathieu J., Kergonou F.J. 1998. Antibodies against malondialdehyde – modified proteins. Free radical and antioxidant protocols. Methods in molecular biology, 108:111-118
- Chang M. H., Liu H. S., Tai C. Y. 2011. Preparation of copper oxide nanoparticles and its application in nanofluid. Powder Technology, 207: 378-386

- Cifuentes Z., Custardoy L., de la Fuente J. M., Marquina C., Ibarra M. R., Rubiales D., Pérez-de-Luque. 2010. Absorption and translocation to the aerial part of magnetic carbon-coated nanoparticles through the root of different crop plants. *Journal of Nanobiotechnology*, 8, 1: 26
- Connolly S. 2010. Cytotoxicity of Copper oxide Nanoparticles and Associated Ions on Human Epithelial Lung Cells (A549). National Nanotechnology Infrastructure Network Research Experience Undergraduates Program, 2010 Research Accomplishments: 6-7
- Copper (II) oxide. 2011. Wikimedia Foundation, Inc. (28. jul. 2012).  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Copper\(II\)\\_oxide](http://en.wikipedia.org/wiki/Copper(II)_oxide) (13. avg. 2012)
- Da Silva L.C., Oliva M.A., Azevedo A.A., De Araujo M.J. 2006. Response of restinga plant species to pollution from an iron pelletization factory. *Water, Air and Soil Pollution*, 157: 241-256
- Daohui L., Baoshan X. 2007. Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution*, 150, 2: 243-250
- Darlington T.K., Neigh A.M., Spencer M.T., Nguyen O.T., Oldenburg S.J. 2008. Nanoparticles characteristics affecting environmental fate and transport through soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28, 6: 1191-1199
- Drobne D. 2007. Nanotoxicology for safe and sustainable nanotechnology. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 58: 471-478
- Dimpka C.O., McLean J.E., Latta D.E., Manangón E., Britt D.W., Johnson W.P., Boyanov M.I., Anderson A.J. 2012. CuO and ZnO nanoparticles: phytotoxicity, metal speciation, and induction of oxidative stress in sand-grown wheat. *Journal of Nanoparticle Research*, 14, 9: 1-15
- Dokken K. M. 2006. Infrared microspectroscopy of plants: use of synchrotron radiation infrared microspectroscopy to study plant root anatomy and to monitor the fate of organic contaminants in those roots. Doctor's dissertation. Kansas State University, Graduate Biochemistry Group
- Dolenc Koče J. 2001. Ugotavljanje variabilnosti količine jederne DNA pri standardnih rastlinskih vrstah in morskih kritosemenkah s slikovno citometrijo. Doktorska disertacija. Ljubljana. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 26-27
- D'Souza L., Devi P., Shridhar D.M.P., Naik C. G. 2008. Use of Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy to study Cadmium-Induced Changes in *Padina tetrastromatica* (Hauck). *Analytical Chemistry Insights*, 3: 135-143

Dumas P., Sockalingum G.D., Sulé-Suso, J. 2006. Adding synchrotron radiation to infrared microscopy: what's new in biomedical applications? *Trends in Biotechnology*, 25, 40–44

Elettra - Source for Imaging and Spectroscopic Studies in the Infrared (SISSI).

(11. jan 2012)

<http://www.elettra.trieste.it/elettra-beamlines/sissi.html> (9. apr. 2012)

Elettra – Beamlines. (1. avg. 2012)

<http://www.elettra.trieste.it/lightsources/elettra/beamlines.html> (9. avg. 2012)

Elettra - A twin soft X-ray transmission and emission spectromicroscope (TWINMIC).

(13. feb. 2012)

<http://www.elettra.trieste.it/elettra-beamlines/twinmic.html> (9. apr. 2012)

El-Trass A., El-Shamy H., El-Mehasseb I., El-Kemary M. 2012. CuO nanoparticles: Synthesis, characterization, optical properties and interaction with amino acids. *Applied Surface Science*, 258: 2997 - 3001

Fahmy B., Cormier S. A. 2009. Copper oxide nanoparticles induce oxidative stress and cytotoxicity in airway epithelial cells. *Toxicology In Vitro*, 23, 7: 1365-1371

Fourier Transform Infrared Spectroscopy (2008). Bruker Optics Inc., Billerica, Massachusetts, ZDA.

[http://www.brukeroptics.com/fileadmin/be\\_user/News\\_Events/Webinar\\_061609/What\\_is\\_FTIR\\_Spectroscopy\\_Flyer\\_EN.pdf](http://www.brukeroptics.com/fileadmin/be_user/News_Events/Webinar_061609/What_is_FTIR_Spectroscopy_Flyer_EN.pdf)

Frlic M. 2011. Vpliv nanodelcev bakrovega oksida na rast in razvoj sončnice (*Helianthus annuus*). Diplomski naloga. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

Gabbay J., Mishal J., Magen E., Zatcoff R., Shemer-Avni Y., Borkow G. 2005. Copper Oxide Impregnated Textiles with Potent Biocidal Activities. *Journal of Industrial Textiles*, 35, 4: 323-335

Gao F., Hong F., Liu C., Zheng L., Su M., Wu X., Yang F., Wu C., Yang P., 2006. Mechanism of nano-anatase TiO<sub>2</sub> on promoting photosynthetic carbon reaction of spinach. *Biological Trace Element Research*, 111: 239-253

Gonzales-Melendi P., Fernandez-Pacheco R., Coronado M. J., Corredor E., Testillano P.S., Risueno M.C., Marquina C., Ibarra M. R., Rubiales D., and Perez-de-Luque A. 2008. Nanoparticles as smart treatment-delivery systems in plants: assessment of different techniques of microscopy for their visualization in plant tissues. *Annals of Botany*, 101: 187-195

Gunawan C., Teoh W.Y., Marquis C.P., Amal R. 2011. Cytotoxic origin of copper(II) oxide nanoparticles: comparative studies with micron-sized particles, leachate, and metal salts. *ACS Nano*, 5: 7214-7225

- Heath R. L. and Packer L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125: 189-198
- Hong F., Zhou J., Liu C., Yang F., Wu C., Zheng L., Yang P. 2005. Effects of Nano-TiO<sub>2</sub> on photochemical reaction of chloroplasts of spinach. *Biological Trace Element Research*, 105: 269-279
- Hou W., Chen X., Song G., Wang Q., Chang C. C. 2007. Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*). *Plant Physiology and Biochemistry*, 45: 62-69
- Introduction to Fourier Transform Infrared Spectroscopy (2005). Thermo Electron Corporation, Madison, Wisconsin, ZDA.  
[http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Various/File\\_52263.pdf](http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Various/File_52263.pdf)
- Izaki M., Nagai M., Maeda K., Fariza Binti M., Motomura K., Sasano J., Shinagawa T., Watase S. 2011. Electrodeposition of 1.4-eV-Bandgap p-Copper (II) Oxide Film With Excellent Photoactivity. *Journal of the Electrochemical Society*, Vol. 158: 578-584
- Jiang W., Liu D., Li H. 2000. Effects of Cu<sup>2+</sup> on root growth, cell division, and nucleolus of *Helianthus annuus* L. *Science Total Environment*, 256: 59-65
- Karlsson H. L., Cronholm P., Gustafsson J., Möller L. 2008. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chemical Research in Toxicology*, 21, 9: 1726-1732
- Karlsson H.L., Gustafsson J., Cronholm P., Möller L. 2009. Size-dependent toxicity of metal oxide particles--a comparison between nano- and micrometer size. *Toxicology Letters*, 188: 112-118
- Kida T., Oka T., Nagano M., Ishiwata Y., Zheng X. G. 2007. Synthesis and Application of Stable Copper Oxide Nanoparticle Suspensions for Nanoparticulate Film Fabrication. *American Ceramic Society*, 90, 1: 107-110
- Klančnik K., Drobne D., Valant J., Dolenc Koce J. 2011. Use of a modified *Allium* test with nanoTiO<sub>2</sub>. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, 1:85-92
- Klockenkämper R., von Bohlen A. 2001. Total-reflection X-ray fluorescence moving towards nanoanalysis: a survey. *Spectrochimica Acta Part B*, 56: 2005-2018
- KrishnaRaj S., Dan T.V., Saxena P.K. 2006. A Fragrant Solution to Soil Remediation. *International Journal of Phytoremediation*, 2: 117-132

- Kumari M., Mukherjee A., Chandrasekaran N. 2009. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Science of Total Environment*, 407, 19: 5843-5246
- Kumari M., Khan S. S., Pakrashi S., Mukherjee A., Chandrasekaran N. 2011. Cytogenetic and genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on root cells of *Allium cepa*. *Journal of hazardous materials*, 190, 1-3: 613-621
- Kump P. 1994. Rentgenska fluorescenčna spektroskopija s totalnim odbojem (TXRF). *Vakuumist*, 14, 4: 15-19
- Lee W., An Y., Yoon H., Kweon H. 2008. Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants mung bean (*Phaseolus radiatus*) and wheat (*Triticum aestivum*): plant agar test for water-insoluble nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27, 9: 1915-1921
- Lei R., Wu C., Yang B., Ma H., Shi C., Wang Q., Yuan Y., Liao M. 2008. Integrated metabolomic analysis of the nano-sized copper particle-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats: a rapid in vivo screening method for nanotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 232: 292-301
- Lin D., Xing B. 2007. Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution*, 150: 243-250
- Lin D., Xing B. 2008. Root Uptake and Phytotoxicity of ZnO Nanoparticles. *Environmental Science & Technology*, 42: 5580-5585
- Lyubenova L., Pongrac P., Vogel-Mikuš K., Kukec Mezek G., Vavpetič P., Grlj N., Kump P., Nečemer M., Regvar M., Pelicon P., Schröder P. 2012. Localization and quantification of Pb and nutrients in *Typha latifolia* by micro-PIXE. *Metallomics*, 4: 333-341
- Ma X., Geiser-Lee J., Deng Y., Kolmakov A. 2010. Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation. *Science of the Total Environment*, 408: 3053-3061
- Machils L., Torrey J.G. 1956. *Plants in Action: A Laboratory Manual of Plants Physiology*. W.H. Freeman and Company: 282 str.
- Marschner H. 1995. *Mineral nutrition of higher plants*. 2nd edition. San Diego, Academic press: 889 str.
- Maynard A.D. 2006. *Nanotechnology: A Research Strategy for Addressing Risk*. Washington, Woodrow Wilson international center for scholars: 45 str.

- Microanalytical centre – MIC, Environment (13. feb. 2009).  
[http://www.rcp.ijs.si/mic/our\\_work/applications/environment/environment.php](http://www.rcp.ijs.si/mic/our_work/applications/environment/environment.php) (3.apr. 2012)
- Monica R.C., Cremonini R. 2009. Nanoparticles and higher plants. *Caryologia*, 62, 2: 161-165
- Mortimer M., Kasemets K., Kahru A. 2010. Toxicity of ZnO and CuO nanoparticles to ciliated protozoa *Tetrahymena thermophila*. *Toxicology*, 269: 138-189
- Movasaghi Z., Rehman S., ur Rehman, I. 2008. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 43: 134–179
- Nair R., Varghese S.H., Nair B.G., Maekawa T., Yoshida Y., Kumar D.S. 2010. Nanoparticulate material delivery to plants. *Plant Science*, 179: 154-163
- Navarro E., Baun A., Behra R., Hartmann N.B., Filser J., Miao A.J., Quigg A., Santschi P.H., Sigg L. 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology*, 17: 372-386
- Navodnik J. 2007. Slovenija je ustvarjena za nanotehnologije: izdelki in tehnologije prihodnosti. Celje, NAVODNIK d.o.o
- Nečemer M. 2005. Optimizacija rentgenske fluorescenčne spektrometrije s totalnim odbojem za analizo sledov elementov. Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo
- Niki E., Yoshida Y., Satio Y., Noguchi N. 2005. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects (review). *Biochemical and biophysical research communications*, 338: 668-676
- Nowack B., Bucheli T.D. 2007. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution*, 150: 5-22
- Oberdörster G., Stone V., Donaldson K. 2007. Toxicology of nanoparticles: A historical perspective. *Nanotoxicology*, 1, 1: 2-25
- Ortega-Villasante C., Rellán-Álvarez R., Delc Campo F.F., Carpena-Ruiz R.O., Hernández R.E. 2005. Cellular damage induced by cadmium and mercury in *Medicago sativa*. *Journal of Experimental Botany*, 56, 418: 2239-2251
- Pajor G. 2005. Krmiljenje vakuumskega sistema predpospeševalnika avstralskega sinhrotrona. Diplomsko naloga. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za matematiko in fiziko

- Pandey P., Merwyn S., Agarwal G.S., Tripathi B.K. in Pant S.C. 2012. Electrochemical synthesis of multi-armed CuO nanoparticles and their remarkable bactericidal potential against waterborne bacteria. *Journal Nanoparticle Research*, 14, 1: 709
- Pike J., Chan S.W., Zhang F., Wang X., Hanson J. 2006. Formation of stable Cu<sub>2</sub>O from reduction of CuO nanoparticles. *Applied Catalysis A*, 303: 273–277
- Pongrac P. 2004. Privzem in lokalizacija Zn, Cd., in Pb pri ranem možnjaku (*Thlaspi praecox* Wulf.). Diplomsko naloga. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta
- Prasad, M.N.V. 2007. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) - A potential crop for environmental industry. *Helia*, 46: 167-174
- Prenci E., Daniele P. G., Toso S. 2002. Visible spectrophotometric determination of metal ions: the influence of structure on molar absorptivity value of copper(II) complexes in aqueous solution. *Analytica Chimica Acta*, 459: 323-336
- Remškar M. 2009. Nanodelci in nanovarnost. Ljubljana, Ministrstvo za zdravje/Urad Republike Slovenije za kemikalije; izdano v okviru EU projekta "Prehodni vir - Kemijska varnost 3"
- Regvar M., Eichert D., Kaulich B., Gianoncelli A., Pongrac P., Vogel-Mikuš K., Kreft I. 2011. New insights into globoids of protein storage vacuoles in wheat aleurone using synchrotron soft X-ray microscopy. *Journal of Experimental Botany*, 62, 11: 3929-3939
- Rico M.C., Majumdar S., Duarte-Gardea M., Peralta-Videa J.R., Gardea-Torresdey J.L. 2011. Interaction of Nanoparticles with Edible Plants and Their Possible Implications in the Food Chain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 8: 3485-3498
- Rousk J., Ackermann K., Curling S.F., Jones D.L. 2012. Comparative Toxicity of Nanoparticulate CuO and ZnO to Soil Bacterial Communities. *Plos One*, 7, 3: 1-8
- Shaymurat T., Gu J., Xu C., Yang Z., Zhao Q., Liu Y. 2012. Phytotoxic and genotoxic effects of ZnO nanoparticles on garlic (*Allium sativum* L.): a morphological study. *Nanotoxicology*, 6, 3: 241-248
- Shi J., Abid A.D., Kennedy I.M., Hristova K.R., Silk W.K. 2011. To duckweeds (*Landoltia punctata*), nanoparticulate copper oxide is more inhibitory than the soluble copper in the bulk solution. *Environmental Pollution*, 159: 1277-1282
- 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*, 30: 3891-3914
- Stampoulis D., Sinha S. K., White J. C. 2009. Assay-Dependent Phytotoxicity of Nanoparticles to Plants. *Environmental Science and Technology*, 43, 24: 9473-9479

- Torney F., Trewyn B.G., Lin Y., Wang K. 2007. Mesoporous silica nanoparticles deliver DNA and chemicals into plants. *Nature Nanotechnology*, 2: 295-300
- Tso C.P., Zhung C.M., Shih Y.H., Tseng Y.M., Wu S.C., Doong R.A. 2010. Stability of metal oxide nanoparticles in aqueous solutions. *Water Science and Technology*, 61, 1: 127-133
- Turgut C., Pepe M.K., Cutright T.J. 2005. The effect of EDTA on *Helianthus annuus* uptake, selectivity, and translocation of heavy metals when grown in Ohio, New Mexico and Colombia soils. *Chemosphere*, 58: 1087-1095
- Vogel-Mikuš K. 2006. Privzem Zn, Cd in Pb ter arbuskularna mikoriza pri ranem mošnjaku *Thlaspi praecox* Wulfen (Brassicaceae). Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta
- Vogel Mikuš K., Pongarc P., Pelicon P., Vavpetič P., Povh B., Bothe H., Regvar M. 2009. Micro-PIXE analysis for localization and quantification of elements in roots of mycorrhizal metal-tolerant plants. *Soil Biology*, 18: 227-242
- Xuming W., Fengqing G., Linglan M., Jie L., Sitao Y., Ping Y., Fashui H., 2008. Effects of nano-anatase on Ribulose-1, 5-Bisphosphate carboxylase/oxygenase mRNA expression in Spinach. *Biological Trace Element Research*, 126: 280-289
- Wang Z., Xie X., Zhao J., Liu X., Feng W., White J.C., Xing B. 2012. Xylem- and Phloem-Based Transport of CuO Nanoparticles in Maize (*Zea mays* L.). *Environmental Science Technology*, 46, 8: 4434-4441
- Wei Z.L., Dong L., Tian Z.H. 2009. Fourier transform infrared spectrometry study on early stage of cadmium stress in clover leaves. *Pakistan Journal of Botany*. 41, 4: 1743-1750
- Yruela I. Copper in plants (2005). *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17, 145-159
- Zhang W.X., Elliot D.W. 2006. Applications of Iron Nanoparticles for Groundwater Remediation. *Remediation*, 16: 7-21
- Zheng L., Hong F., Lu S., Liu C. 2005. Effects of nano-TiO<sub>2</sub> on strength of naturally aged seeds and growth of spinach. *Biological Trace Element Research*. 104: 83 - 91
- Zhu H., Han J., Xiao J. Q., Jin Y. 2008. Uptake, translocation and accumulation of manufactured iron oxide nanoparticles by pumpkin plants. *Journal of Environmental Monitoring*, 10: 713-717



## ZAHVALA

Največja zahvala gre mojim staršem za ljubezen, vso podporo in odprt pogled na svet, sestri Žani pa za vse zapiske, skupno učenje in nasvete.

Zahvaljujem se doc. dr. Katarini Vogel-Mikuš za ideje, pomoč in predstavitev sinhrotrona ter somentorju doc. dr. Jožetu Grdadolnik za pomoč pri obdelavi spektrov.

Zahvaljujem se prof. dr. Marjani Regvar za pomoč pri izboljševanju diplomske naloge.

Hvala tudi doc. dr. Jasni Dolenc Koce za vse koristne nasvete in vzpodbude.

Zahvaljujem se tudi članom Katedre za botaniko in fiziologijo rastlin – posebno Mileni, pa tudi Pauli, Matevžu in Špeli za odgovore na vsa moja vprašanja.

Hvala znanstvenikom z Instituta Jožef Stefan, dr. Petru Kump, dr. Marjanu Nečemer, dr. Primožu Pelicon za meritve in rezultate.

Hvala Katji za lektoriranje, vso spodbudo tekom študija in potrpežljivo prijateljstvo.

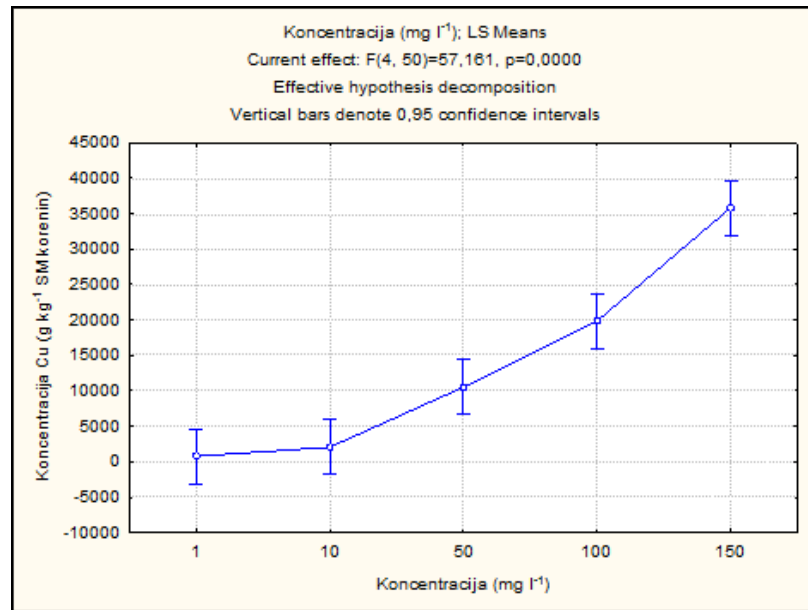
Hvala Tinkari za pomoč pri slikovnem gradivu in prijetno skupno delo.

Hvala tudi vsem mojim prijateljem, ki so mi prisluhnili v slabih dneh in mi z dobro voljo dajali energijo za spopade z vsemi izzivi.

## PRILOGE

### PRILOGA A

Vpliv koncentracije CuO na koncentracijo bakra v koreninah tretiranih rastlin

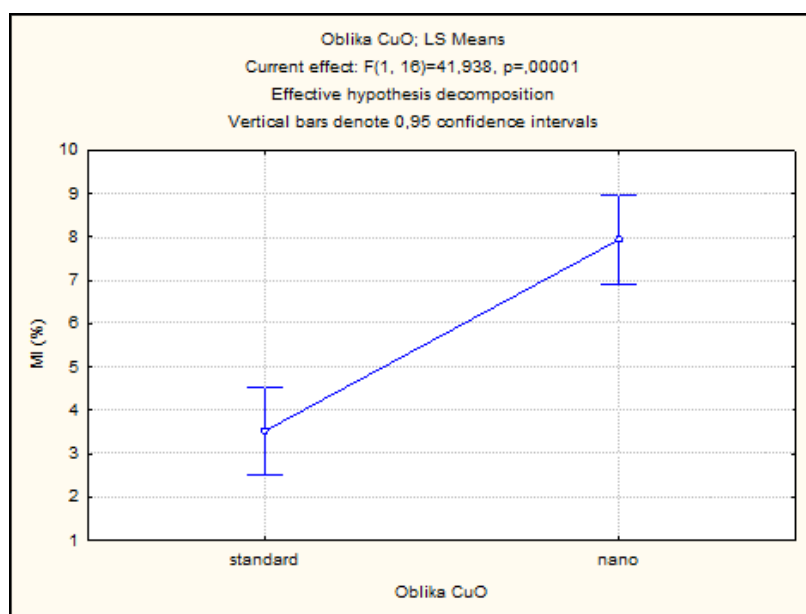


Slika: Vpliv koncentracije CuO na koncentracijo Cu v koreninah rastlin tretiranih z nano in standardno obliko CuO ( $N_{\text{CuO nano}} = 30$ ,  $N_{\text{CuO standard}} = 30$ ,  $p < 0,05$ ).

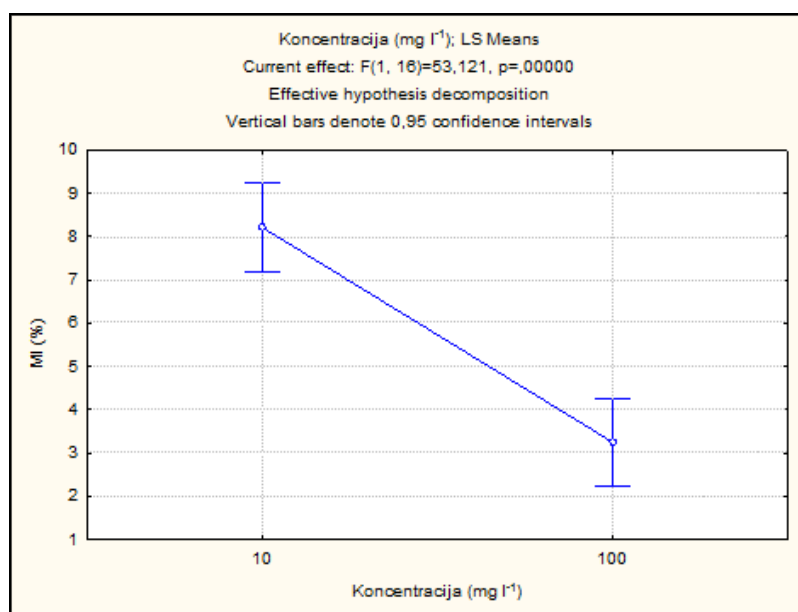
## PRILOGA B

Vpliv oblike in koncentracije CuO na mitotski indeks v koreninskih vršičkih 2 dni tretiranih rastlin

a)



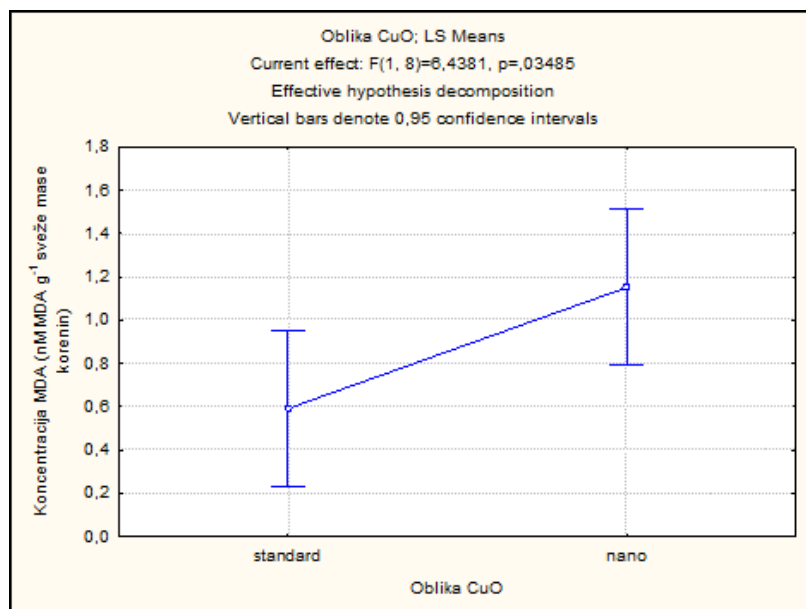
b)



Slika: Vpliv oblike (a) in koncentracije (b) CuO na mitotski indeks (MI (%)) v koreninskih vršičkih 2 dni tretiranih rastlin z nano in standardno obliko CuO ( $N_{\text{CuO nano}} = 8, N_{\text{CuO standard}} = 8, p < 0,05$ ).

## PRILOGA C

Vpliv oblike CuO na koncentracijo lipida MDA v koreninah 2 dni tretiranih rastlin



Slika: Vpliv oblike CuO na koncentracijo MDA lipida (nM MDA g<sup>-1</sup> sveže mase) v koreninah 2 dni tretiranih rastlin z nano in standardno obliko CuO ( $N_{\text{CuO nano}} = 6$ ,  $N_{\text{CuO standard}} = 6$ ,  $p < 0,05$ ).

## PRILOGA D

Korelacija Zn, K, S, P, Fe, Mn, Mg in Ca s Cu v zrelih koreninah in koreninskih vršičkih  
tretiranih rastlin

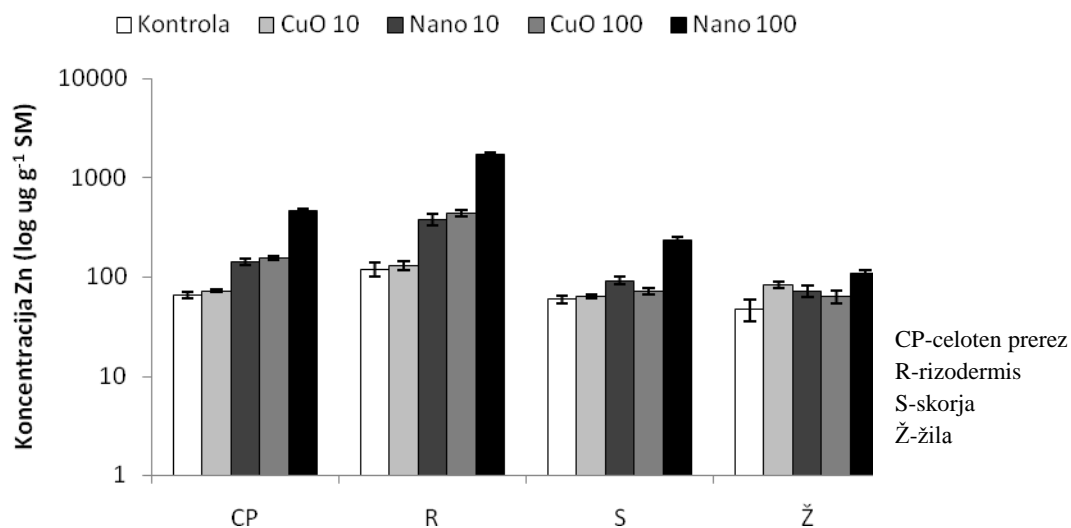
Preglednica: Korelacijski koeficienti in statistična verjetnost za korelacijo elementov Zn, K, S, P, Fe, Mn, Mg, Ca s Cu za kontrolo, tretmaje z 10 mg l<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki ter 100 mg l<sup>-1</sup> CuO v nano in standardni obliki. Odebeljene številke prikazujejo statistično značilne razlike (p<0,05).

|    |                                   | TRETMA                           |                                  |                                 |                                  |                                 |                                 |                                  |                                  |                                 |             |
|----|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|-------------|
|    |                                   | Prečni prerez                    |                                  |                                 |                                  |                                 | Vršički                         |                                  |                                  |                                 |             |
|    |                                   | Kontrola                         | CuO<br>10                        | Nano<br>10                      | CuO<br>100                       | Nano 100                        | Kontrola                        | CuO<br>10                        | Nano<br>10                       | CuO<br>100                      | Nano<br>100 |
| Zn | <b>0,9919</b><br><b>p=0,008</b>   | <b>0,9545</b><br><b>p=0,046</b>  | <b>0,9988</b><br><b>p=0,001</b>  | <b>0,999</b><br><b>p=0,001</b>  | <b>0,9998</b><br><b>p=0,000</b>  | -0,1864<br>p=0,724              | 0,5285<br>p=0,281               | 0,7428<br>p=0,091                | <b>0,9011</b><br><b>p=0,014</b>  | <b>0,9535</b><br><b>p=0,003</b> |             |
| K  | <b>-0,09735</b><br><b>p=0,027</b> | <b>0,9854</b><br><b>p=0,015</b>  | <b>-0,9858</b><br><b>p=0,014</b> | 0,3876<br>p=0,612               | -0,5311<br>p=0,469               | -0,1605<br>p=0,761              | -0,0851<br>p=0,873              | 0,8089<br>p=0,051                | -0,7457<br>p=0,089               | -0,6963<br>p=0,124              |             |
| S  | -0,2614<br>p=0,508                | <b>-0,9907</b><br><b>p=0,009</b> | -0,9399<br>p=0,060               | -0,9093<br>p=0,910              | <b>-0,9968</b><br><b>p=0,003</b> | -0,2923<br>p=0,574              | -0,0377<br>p=0,943              | 0,3215<br>p=0,534                | -0,5236<br>p=0,286               | <b>0,8677</b><br><b>p=0,025</b> |             |
| Fe | 0,1067<br>p=0,893                 | <b>0,9949</b><br><b>p=0,005</b>  | <b>0,9896</b><br><b>p=0,010</b>  | <b>0,9870</b><br><b>p=0,013</b> | <b>1,000</b><br><b>p=0,000</b>   | 0,0996<br>p=0,851               | <b>0,9224</b><br><b>p=0,009</b> | -0,1649<br>p=0,755               | <b>0,9889</b><br><b>p=0,000</b>  | 0,5106<br>p=0,301               |             |
| P  | -0,4918<br>p=0,508                | -0,7034<br>p=0,297               | -0,8158<br>p=0,184               | 0,4245<br>p=0,576               | <b>0,9995</b><br><b>p=0,001</b>  | -0,3035<br>p=0,559              | -0,2236<br>p=0,670              | -0,1033<br>p=0,846               | <b>-0,9114</b><br><b>p=0,011</b> | 0,6346<br>p=0,176               |             |
| Mn | -0,5880<br>p=0,412                | -0,4028<br>p=0,597               | 0,9299<br>p=0,070                | <b>0,9685</b><br><b>p=0,032</b> | <b>0,9950</b><br><b>p=0,005</b>  | <b>0,8638</b><br><b>p=0,027</b> | 0,4595<br>p=0,359               | <b>0,8981</b><br><b>p=0,015</b>  | <b>0,9969</b><br><b>p=0,000</b>  | 0,5254<br>p=0,284               |             |
| Ca | 0,3360<br>p=0,664                 | -0,2848<br>p=0,716               | 0,6278<br>p=0,372                | 0,9267<br>p=0,073               | -0,1681<br>p=0,832               | -0,0687<br>p=0,897              | <b>0,8333</b><br><b>p=0,039</b> | 0,2871<br>p=0,581                | <b>0,9323</b><br><b>p=0,007</b>  | <b>0,9276</b><br><b>p=0,008</b> |             |
| Mg | 0,8747<br>p=0,125                 | -0,9258<br>p=0,074               | -0,9389<br>p=0,061               | 0,9491<br>p=0,051               | -0,6953<br>p=0,305               | -0,3078<br>p=0,553              | 0,1285<br>p=0,808               | <b>-0,9397</b><br><b>p=0,005</b> | -0,6873<br>p=0,131               | -0,6628<br>p=0,151              |             |

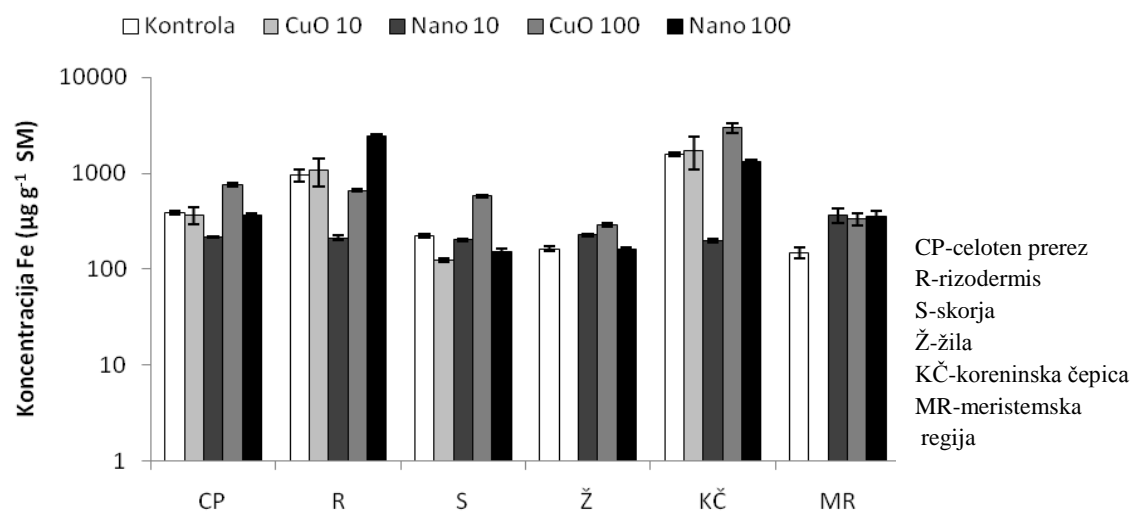
## PRILOGA E

Vpliv tretmaja na koncentracijo cinka v posameznih tkivih zrele korenine (a) in koreninskega vršička (b) tretiranih rastlin

a)



b)

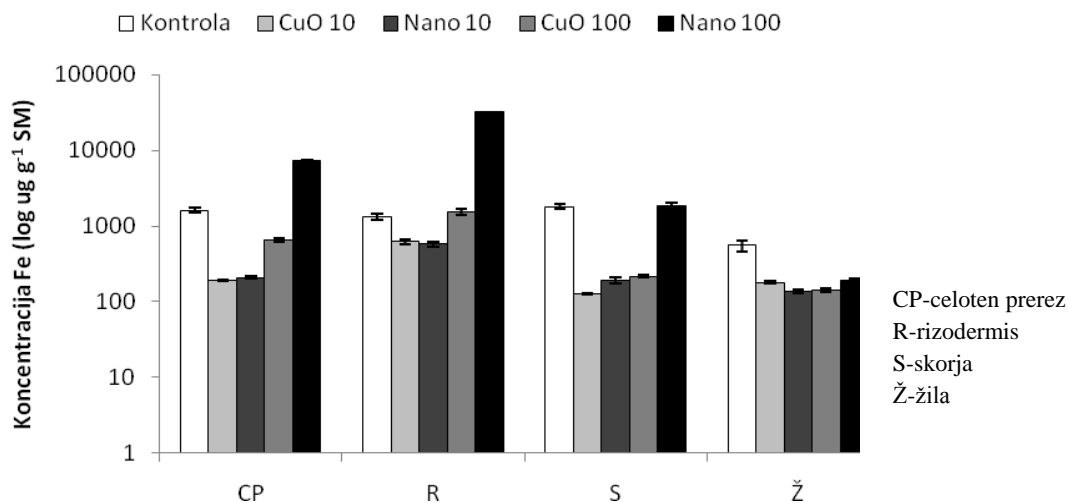


Slika: Koncentracija Zn ( $\mu\text{g g}^{-1} \text{ SM}$ ) na logaritemski skali s standardno napako v tkivih prečnega prereza zrele korenine (a) in vzdolžnega prereza koreninskega vršička (b) rastlin tretiranih z nano in standardno obliko CuO.

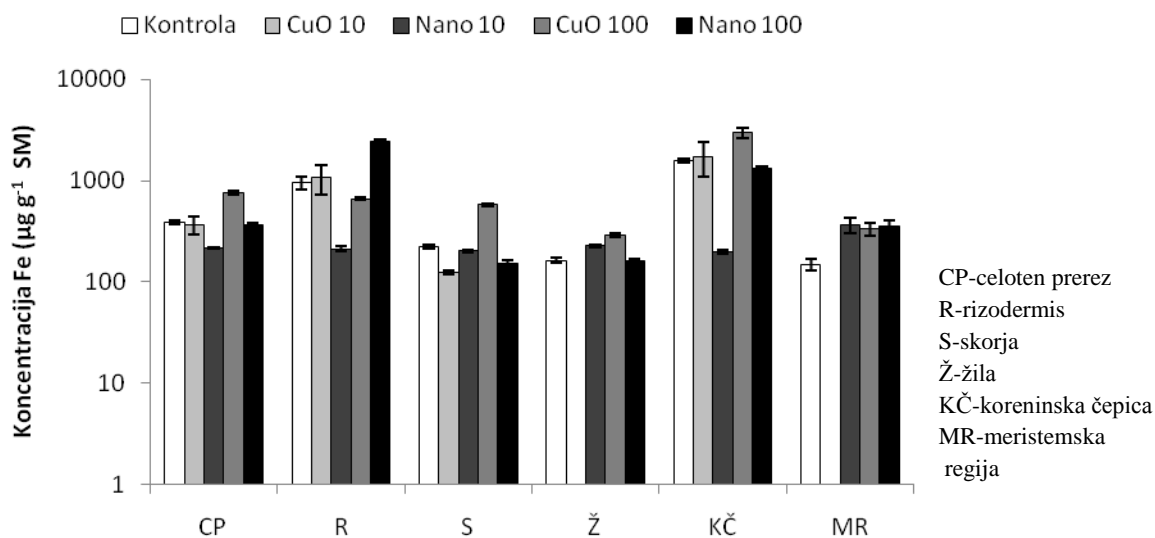
## PRILOGA F

Vpliv tretmaja na koncentracijo železa v posameznih tkivih zrele korenine (a) in koreninskega vršička (b) tretiranih rastlin

a)



b)

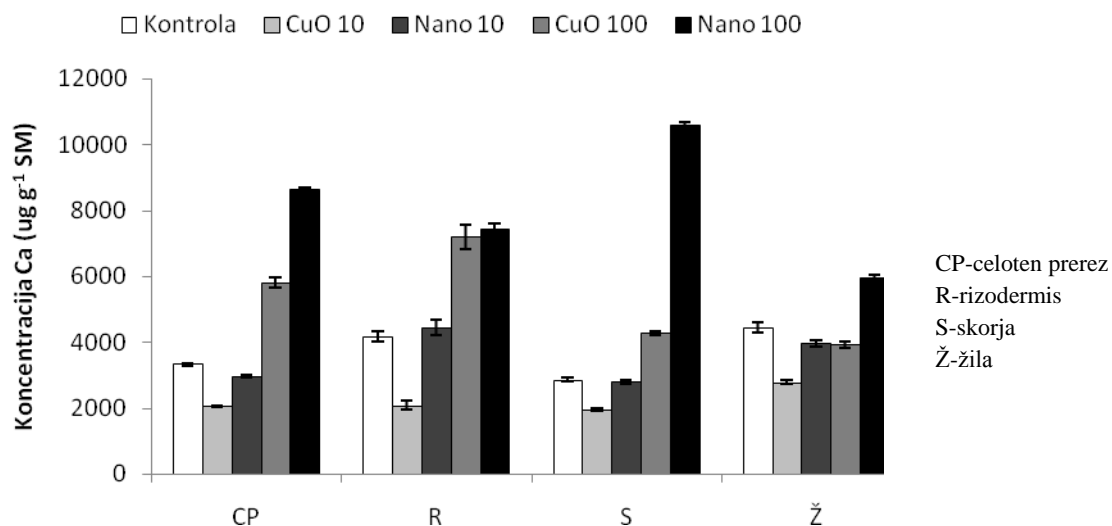


Slika: Koncentracija Fe ( $\mu\text{g g}^{-1}$  SM) na logaritemski skali s standardno napako v tkivih prečnega prereza zrele korenine (a) in vzdolžnega prereza koreninskega vršička (b) rastlin tretiranih z nano in standardno obliko CuO.

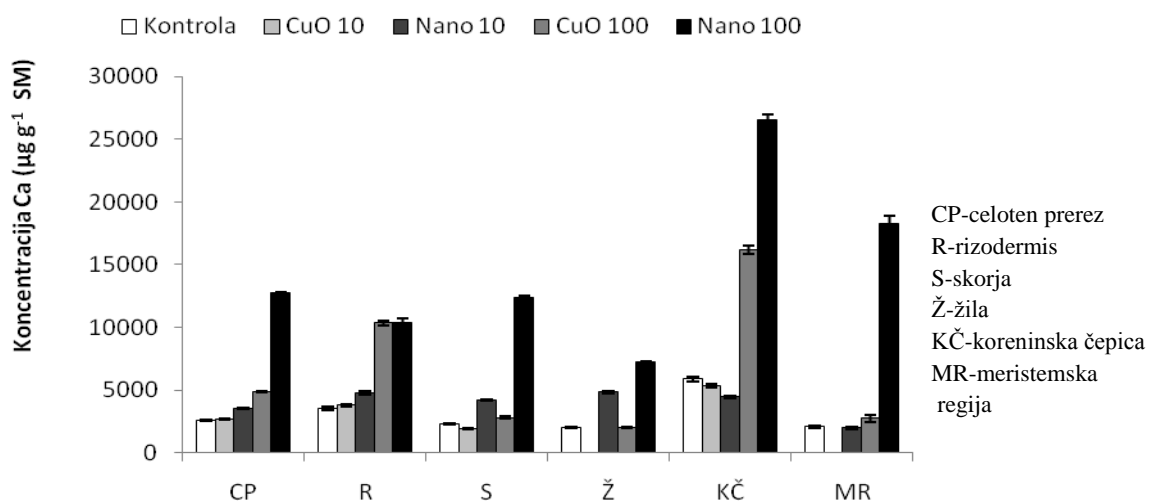
## PRILOGA G

Vpliv tretmaja na koncentracijo kalcija v posameznih tkivih zrele korenine (a) in koreninskega vršička (b) tretiranih rastlin

a)



b)



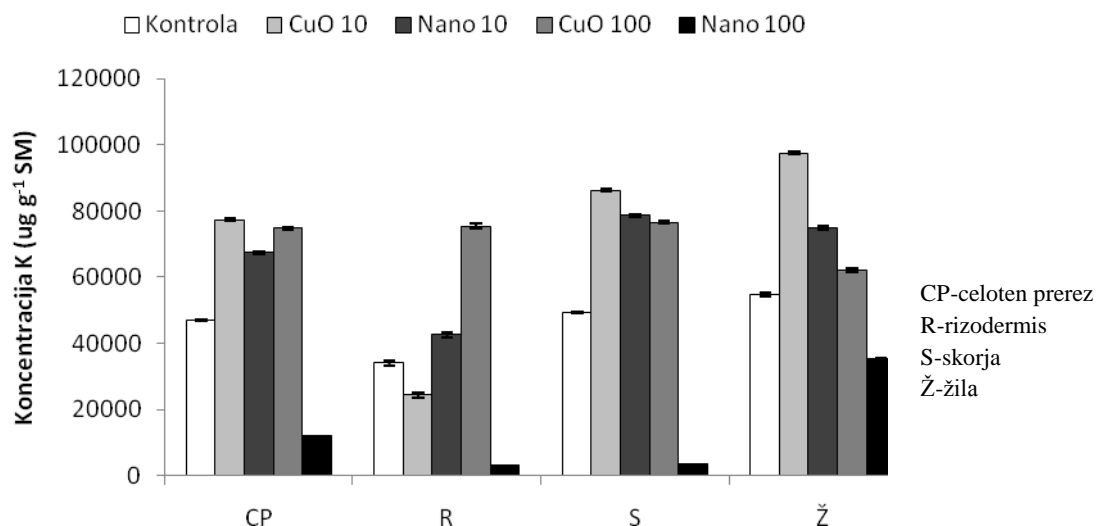
Slika: Koncentracija Ca ( $\mu\text{g g}^{-1}$  SM) s standardno napako v tkivih prečnega prereza zrele korenine (a) in vzdolžnega prereza koreninskega vršička (b) rastlin tretiranih z nano in standardno obliko CuO.



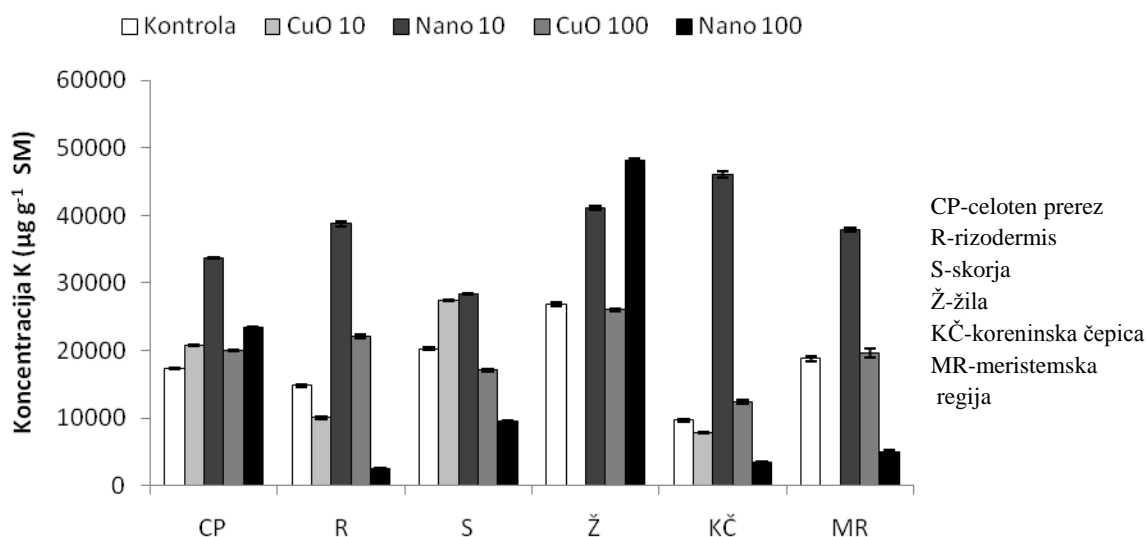
## PRILOGA H

Vpliv tretmaja na koncentracijo kalija v posameznih tkivih zrele korenine (a) in koreninskega vršička (b) tretiranih rastlin

a)



b)

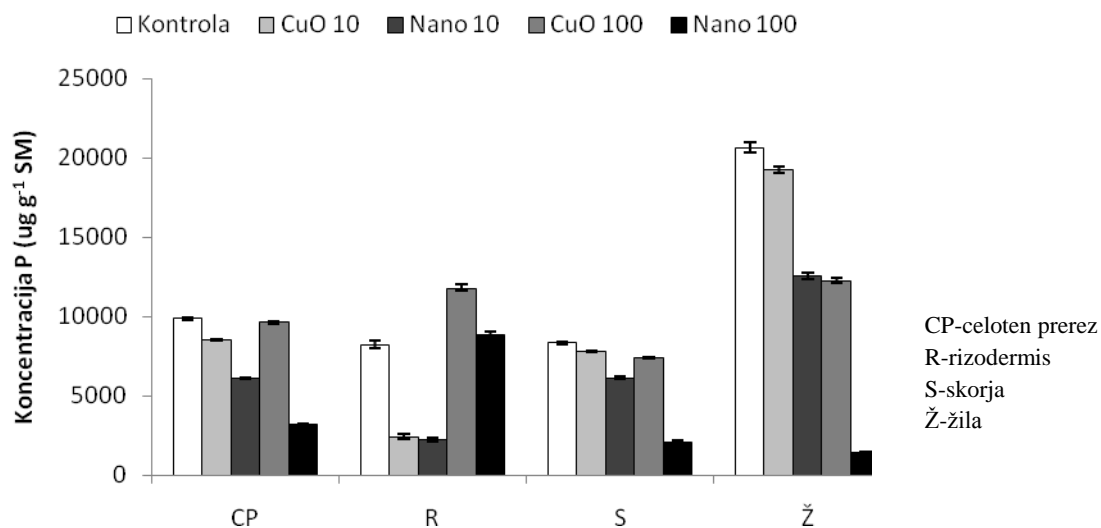


Slika: Koncentracija K ( $\mu\text{g g}^{-1}$  SM) s standardno napako v tkivih prečnega prereza zrele korenine (a) in vzdolžnega prereza koreninskega vršička (b) rastlin tretiranih z nano in standardno obliko CuO.

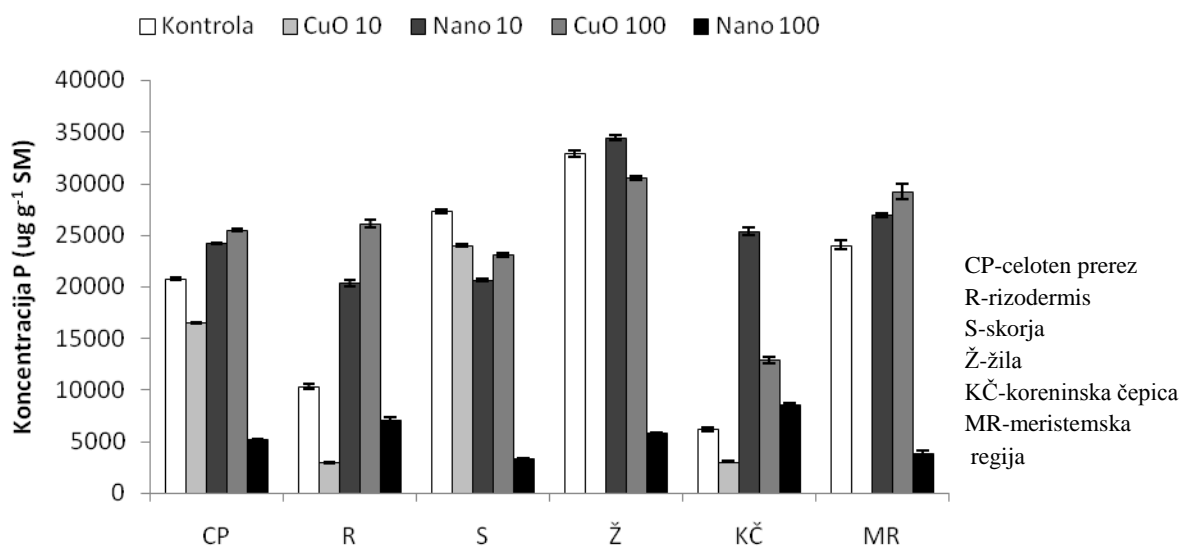
## PRILOGA I

Vpliv tretmaja na koncentracijo fosforja v posameznih tkivih zrele korenine (a) in koreninskega vršička (b) tretiranih rastlin

a)



b)

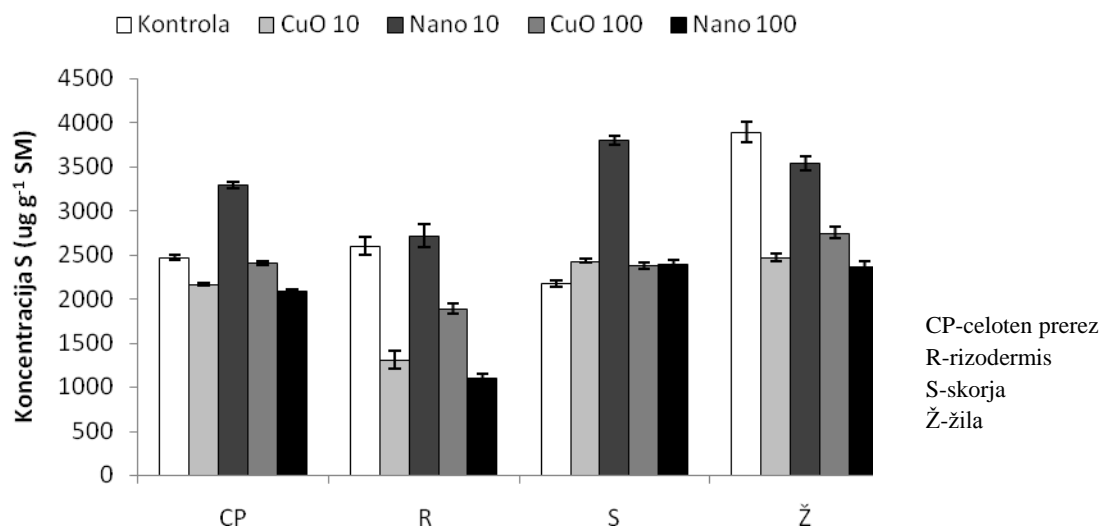


Slika: Koncentracija P ( $\mu\text{g g}^{-1}$  SM) s standardno napako v tkivih prečnega prereza zrele korenine (a) in vzdolžnega prereza koreninskega vršička (b) rastlin tretiranih z nano in standardno obliko CuO.

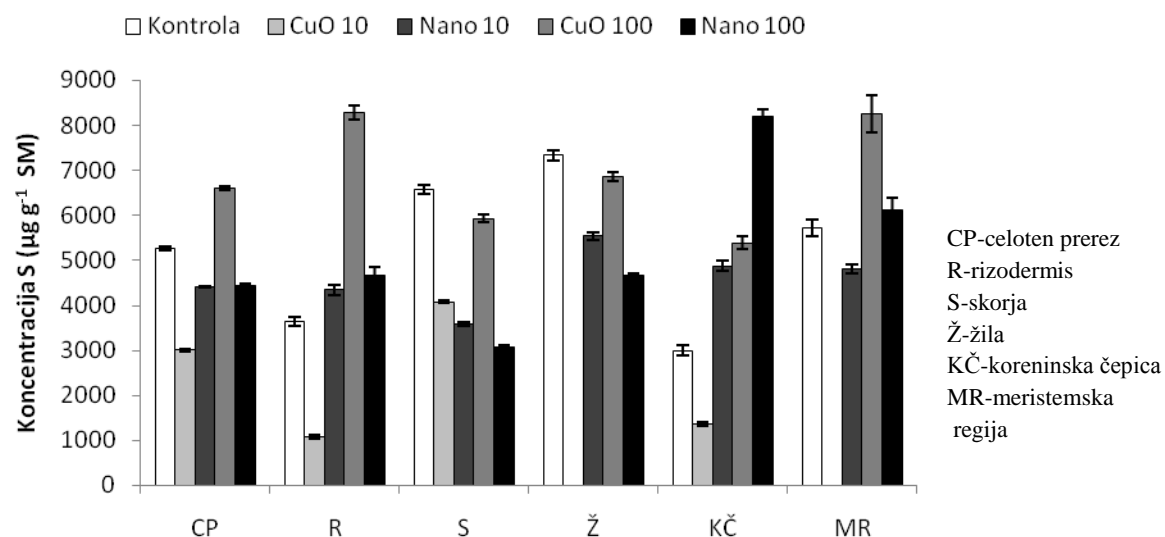
## PRILOGA J

Vpliv tretmaja na koncentracijo žvepla v posameznih tkivih zrele korenine (a) in koreninskega vršička (b) tretiranih rastlin

a)



b)

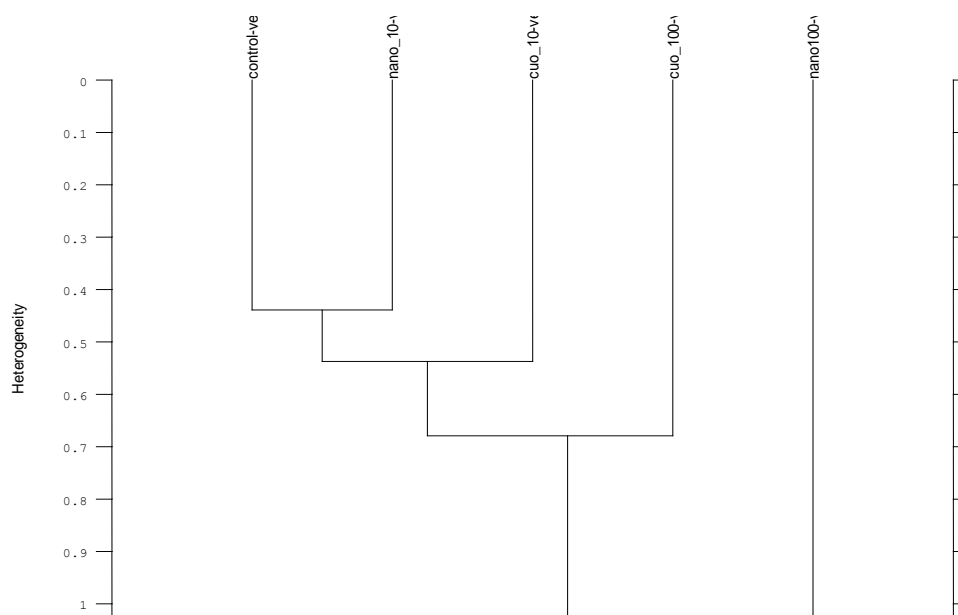


Slika: Koncentracija S ( $\mu\text{g g}^{-1}$  SM) s standardno napako v tkivih prečnega prereza zrele korenine (a) in vzdolžnega prereza koreninskega vršička (b) rastlin tretiranih z nano in standardno obliko CuO.

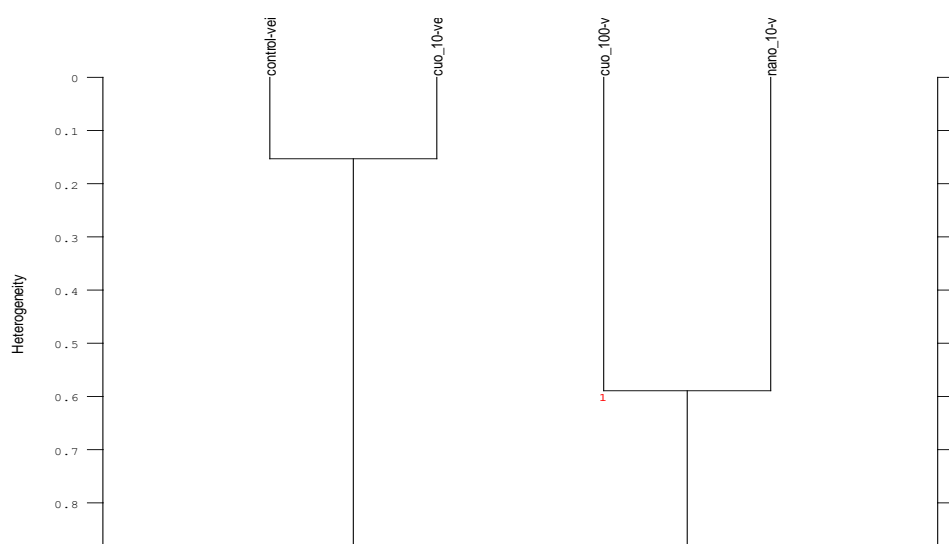
## PRILOGA K

Klasterška analiza podobnosti spektrov, posnetih v žili zrele korenine (a) in v koreninskem vršičku (b)

a)



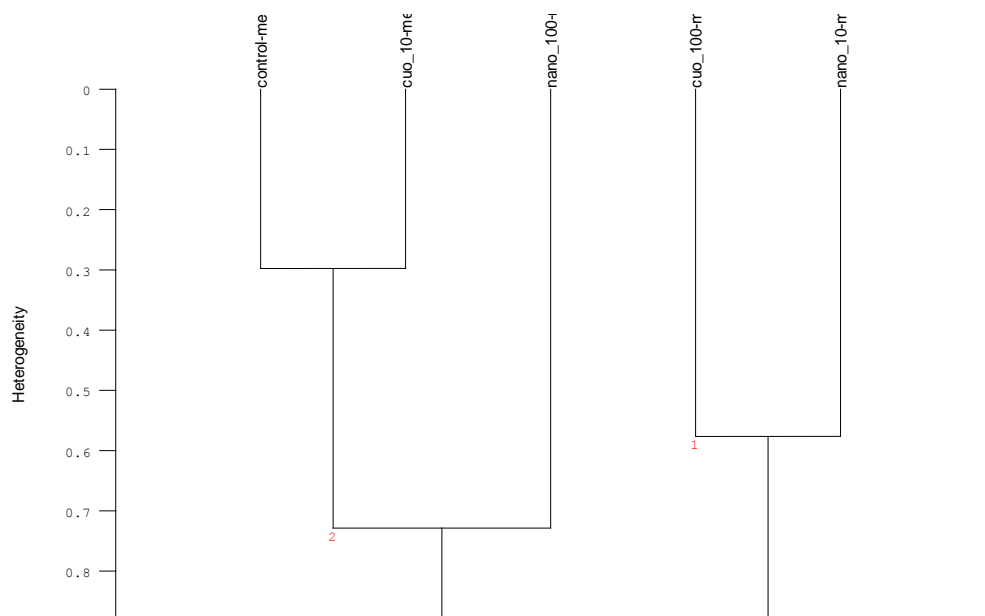
b)



Slika: Klasterško drevo za IR spektre posnete v žili zrele korenine (a) in koreninskem vršičku (b) sončnic kontrole, tretmaja CuO standardne oblike 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> ter tretmaja nano CuO 10 in 100 mg l<sup>-1</sup>.

## PRILOGA L

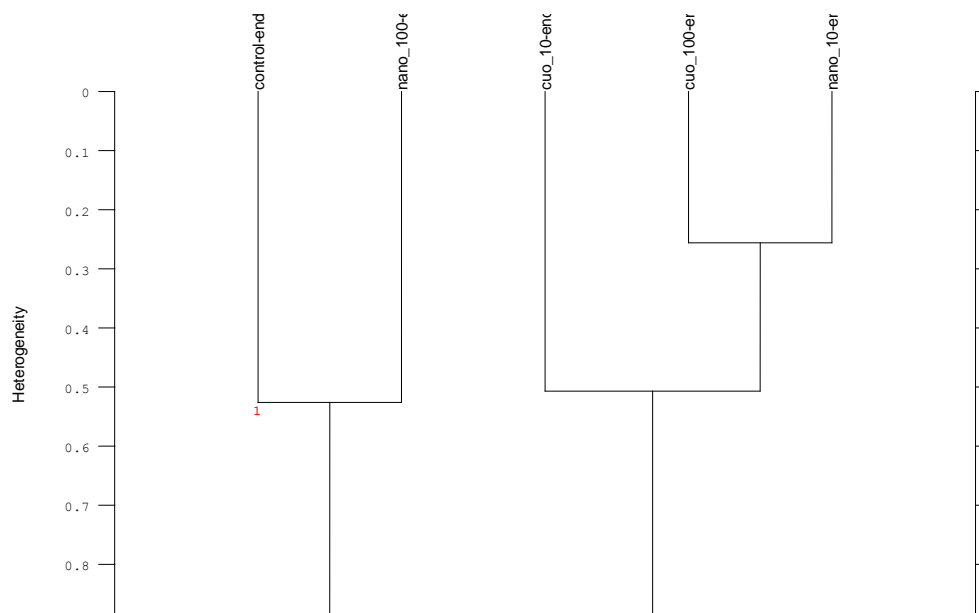
Klusterska analiza podobnosti spektrov, posnetih v meristemski regiji koreninskega vršička



Slika: Klustersko drevo za IR spektre posnete v meristemski regiji koreninskega vršička sončnic kontrole, tretmaja CuO standardne oblike 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> ter tretmaja nano CuO 10 in 100 mg l<sup>-1</sup>.

## PRILOGA M

Klusterska analiza podobnosti spektrov, posnetih v endodermisu v zreli korenini



Slika: Klustersko drevo za IR spektre posnete v endodermisu zrele korenine sončnice kontrole, tretmaja CuO standardne oblike 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> ter tretmaja nano CuO 10 in 100 mg l<sup>-1</sup>.

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Eva KOVAČEC

**LOKALIZACIJA BAKRA IN BIOKEMIJSKE  
SPREMEMBE V KORENINAH NAVADNE SONČNICE,  
IZPOSTAVLJENE SUSPENZIJI NANODELCEV  
BAKROVEGA OKSIDA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012