

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Mateja PERVANJE

**ODZIV MALE VODNE LEČE (*Lemna minor*) NA
DELCE TiO_2 IN CuO**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Mateja PERVANJE

ODZIV MALE VODNE LEČE (*Lemna minor*) NA DELCE TiO₂ IN CuO

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

RESPONSE OF DUCKWEED (*Lemna minor*) ON PARTICLES TiO₂ AND CuO

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 so bili izvedeni vsi poskusi.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico diplomske naloge imenovala doc. dr. Jasno Dolenc Koce.

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

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

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

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

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

Mateja Pervanje

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 582.521.43:620.3(043.2)=163.6
- KG mala vodna leča/titanov dioksid/bakrov oksid/nanodelci/standardni sedemdnevni test inhibicije rasti/potencialna fotokemična učinkovitost/antioksidativni encimi
- AV PERVANJE, Mateja
- SA DOLENC KOCE Jasna (mentorica)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2012
- IN ODZIV MALE VODNE LEČE (*Lemna minor*) NA DELCE TiO₂ IN CuO
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP X, 62 str., 9 pregl., 13 sl., 21 pril., 56 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Namen diplomske naloge je bil ugotoviti, kako nanodelci titanovega dioksida (TiO₂) in bakrovega oksida (CuO) vplivajo na morfološko in fiziološko stanje leče. Rastlino smo gojili v mediju z različno koncentracijo nanodelcev in makrodelcev TiO₂ in CuO (0, 0,1, 1, 10, 100 in 1000 mg/l). Med sedemdnevnim testom smo opazovali različne parametre, kot so število členkov, število kolonij, število členkov na kolonijo, barvo členkov, dolžino najdaljše korenine v koloniji, delež kloroz in nekroz. Ocenjevali smo tudi prisotnost alg v gojišču. Poskus smo ponovili dvakrat, v treh paralelkah. Ob koncu poskusa smo izmerili potencialno fotokemično učinkovitost inaktivnost encimov CAT, A-POD, G-POD in GR. Ugotovili smo, da so imeli nanodelci in makrodelci posamezne snovi podoben učinek na lečo, učinek delcev CuO pa je bil bolj negativen od delcev TiO₂. Ugotovili smo, da so imele leče, ki so uspevale v prisotnosti delcev TiO₂, po koncu poskusa primerljivo število členkov, kolonij, barvo, dolžino korenine kot tiste, ki so uspevale brez TiO₂. Leča, ki je uspevala v gojišču z dodanimi nano- in makrodelci CuO, je imela že pri koncentraciji 1 µM vidne poškodbe. Rast je bila ustavljena, členki so že drugi dan opazno rumeneli, koreninice so odpadle. V gojiščih z dodanimi delci CuO alg ni bilo. Tudi merjenje potencialne fotokemične učinkovitosti je pokazalo, da ima bakrov oksid večji negativni učinek na lečo kot titanov dioksid. Razlika je bila tudi med velikostjo bakrovih delcev. Leča, ki je uspevala v gojišču z dodanimi nanodelci CuO, je imela nižje vrednosti fotokemične učinkovitosti kot tista, ki je uspevala v prisotnosti makrodelcev CuO. Razlike v encimski dinamiki v odvisnosti od vrste delcev smo odkrili pri encimih A-POD in G-POD. Pri leči, ki je bila tretirana z delci TiO₂, je specifična encimska aktivnost (SEA) A-POD z naraščajočo koncentracijo delcev padala. V poskusu, kjer smo lečo izpostavili delcem CuO, so vrednosti SEA A-POD naraščale. Delci TiO₂ na encim G-POD niso vplivali, saj so vrednosti SEA nespecifično nihale, medtem ko so pri leči, tretirani z delci CuO, naraščale. SEA encimov CAT in GR sta padala tako pri leči, izpostavljeni TiO₂ kot CuO. Iz naših rezultatov tako lahko zaključimo, da so imeli nano in makrodelci CuO večji negativen vpliv na *L. Minor* kot delci TiO₂.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 582.521.43:620.3(043.2)=163.6
CX duckweed/titanium dioxide/copper oxide/nanoparticles/standard seven day ISO test/
potential photochemical efficiency/antioxidative enzymes
AU PERVANJE, Mateja
AA DOLENC KOCE Jasna (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
PY 2012
TI RESPONSE OF DUCKWEED (*Lemna minor*) ON PARTICLES TiO₂ AND CuO
DT Graduation Thesis (University studies)
NO X, 62 p., 9 tab., 13 fig., 21 ann., 56 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The aim of this thesis was to ascertain how nanoparticles of the titanium dioxide (TiO₂) and copper oxide (CuO) influence the morphological and physiological condition of common duckweed (*Lemna minor*) plants. First we cultivated the plant in medium with different concentrations of nanoparticles and ultrafine particles TiO₂ and CuO (0, 0,1, 1, 10, 100 and 1000 mg/l). During the seven day test we were monitoring different parameters such as number of fronds, number of colonies, number of fronds per colony, the color of fronds, the length of the longest root in the colony, the proportion of chlorosis and necrosis. We also evaluated the presence of algae in the growth medium. We repeated the experiment twice, in three parallels. At the end of the experiment we measured the potential photochemical efficiency and the activity of CAT, A-POD, G-POD and GR enzymes. We established that the nanoparticles and ultrafine particles in the individual substance, affected the duckweed in a similar way, but the CuO effect was more negative than the effect of TiO₂ particles. We also found out that the duckweed growing in the presence of TiO₂ particles had at the end of the experiment a comparable number of fronds, colonies, the color and the root length, as those which grew without TiO₂. The duckweed which grew in the medium with added nano- and ultrafine particles CuO had visual lesions already at 1 μM concentration. The growth was stopped, the fronds visibly yellowed by the second day and the roots fell off. There were no algae in the growth medium with added CuO nanoparticles. The measurement of potential photochemical efficiency also showed, that copper oxide has more pronounced negative effect on the duckweed than titanium dioxide. There was also the difference between copper particles. The duckweed growing in the medium with added nanoparticles CuO had lower value of photochemical efficiency from the one growing in the presence of bigger CuO ultrafine particles. The differences in the enzyme dynamics were dependent on the sort of particles in case of A-POD and G-POD. In the duckweed which was treated with TiO₂ particles, the SEA of the enzyme A-POD decreased with the increasing particle concentration, while in the experiment in which duckweed was exposed to CuO particles, the values of SEA A-POD were increasing. The TiO₂ particles didn't affect the G-POD enzyme since the SEA values fluctuated unspecifically, while in the duckweed treated with the CuO particles they increased. The SEA of the CAT and GR decreased in duckweed, exposed to TiO₂ as well as to CuO particles. From our results, we can conclude that nano and macro particles CuO had more toxic impact on *L. minor* than TiO₂ particles.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Kazalo prilog	IX
Okrajšave in simboli	XI
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 NANODELCI.....	3
2.1.1 Nanodelci TiO₂	5
2.1.2 Nanodelci CuO	6
2.2 OKSIDATIVNI STRES.....	8
2.2.1 Reaktivne kisikove spojine (ROS)	8
2.2.2 Oksidativni stres kot pokazatelj škodljivih vplivov abiotskih dejavnikov	10
2.3 LIPIDNA PEROKSIDACIJA.....	10
2.4 ANTIOKSIDANTI.....	11
2.4.1 Superoksidna dismutaza (SOD)	12
2.4.2 Katalaza (CAT)	12
2.4.3 Peroksidaza (POD)	12
2.4.4 Glutation	13
2.4.5 Askorbat	13
2.4.5.1 Askorbat – Glutationski cikel.....	13
2.5 MALA VODNA LEČA (<i>LEMNA MINOR</i> L.).....	14
3 MATERIALI IN METODE	16
3.1 RASTLINSKI MATERIAL IN RASTNE RAZMERE.....	16
3.2 STANDARDNI TEST INHIBICIJE RASTI ISO/CD 20079 (2001).....	17
3.2.1 Priprava raztopin z delci titanovega dioksida in bakrovega oksida	17
3.2.2 Štetje in opazovanje členkov	18
3.3 MERJENJE POTENCIALNE FOTOKEMIČNE UČINKOVITOSTI.....	19
3.4 MERJENJE ENCIMSKE AKTIVNOSTI.....	19
3.4.1 Priprava založnih raztopin	20
3.4.2 Vsebnost proteinov v vzorcih	20
3.4.3 Encimska aktivnost antioksidativnih encimov	21

3.4.3.1	Merjenje encimske aktivnosti katalaze (CAT, EC 1.11.1.6).....	21
3.4.3.2	Merjenje encimske aktivnosti askorbat peroksidaze (A-POD, EC 1.11.1.11)	22
3.4.3.3	Merjenje encimske aktivnosti guaiakol peroksidaze (G-POD, EC 1.11.1.7).....	23
3.4.3.4	Merjenje encimske aktivnosti glutacion reduktaze (GR, EC 1.6.4.2).....	23
4	REZULTATI	25
4.1	TEST INHIBICIJE RASTI (ISO/CD 20079)	25
4.1.1	Vpliv nanodelcev TiO₂ na rast male vodne leče	25
4.1.2	Vpliv makrodelcev TiO₂ na rast male vodne leče	28
4.1.3	Vpliv nanodelcev CuO na rast male vodne leče	31
4.1.4	Vpliv makrodelcev CuO na rast male vodne leče	34
4.1.5	Primerjave izbranih parametrov standardnega testa inhibicije rasti (ISO/CD 20079)	37
4.1.5.1	Število členkov.....	37
4.1.5.2	Število kolonij.....	39
4.1.5.3	Dolžina najdaljše korenine.....	40
4.1.5.4	Barva členkov	41
4.1.5.5	Prisotnost alg v gojišču	43
4.2	POTENCIALNA FOTOKEMIČNA UČINKOVITOST.....	44
4.3	ANTIOKSIDATIVNI ENCIMI.....	45
4.3.1	Katalaza	45
4.3.2	Askorbat peroksidaza	46
4.3.3	Guaiakol peroksidaza	47
4.3.4	Glutacion reduktaza	48
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	49
5.1	RAZPRAVA	49
5.1.1	Vpliv delcev TiO₂ in CuO na morfologijo in rast male vodne leče	50
5.1.2	Vpliv delcev TiO₂ in CuO na encimsko aktivnost	52
5.1.3	Vpliv delcev TiO₂ in CuO na fotokemično učinkovitost <i>L. minor</i>- merjenje Fv/Fm	54
5.1.4	Povzetek primerjave vpliva nanodelcev TiO₂ in CuO	54
5.2	SKLEPI	55
6	POVZETEK	56
7	VIRI	57

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sestava Steinbergovega gojišča (ISO/CD 20079)	16
Preglednica 2: Rast male vodne leče (<i>L. minor</i>) med sedemdnevni standardnim testom inhibicije rasti pri različnih koncentracijah nanodelcev TiO ₂	26
Preglednica 3: Stanje členkov male vodne leče (<i>L. minor</i>) in prisotnost alg med sedemdnevni standardnim testom inhibicije rasti pri različnih koncentracijah nanodelcev TiO ₂	27
Preglednica 4: Rast male vodne leče (<i>L. minor</i>) med sedemdnevni standardnim testom inhibicije rasti pri različnih koncentracijah makrodelcev TiO ₂	29
Preglednica 5: Stanje členkov male vodne leče (<i>L. minor</i>) in prisotnost alg med sedemdnevni standardnim testom inhibicije rasti pri različnih koncentracijah makrodelcev TiO ₂	30
Preglednica 6: Rast male vodne leče (<i>L. minor</i>) med sedemdnevni standardnim testom inhibicije rasti pri različnih koncentracijah nanodelcev CuO	32
Preglednica 7: Stanje členkov male vodne leče (<i>L. minor</i>) in prisotnost alg med sedemdnevni standardnim testom inhibicije rasti pri različnih koncentracijah nanodelcev CuO	33
Preglednica 8: Rast male vodne leče (<i>L. minor</i>) med sedemdnevni standardnim testom inhibicije rasti pri različnih koncentracijah makrodelcev CuO	35
Preglednica 9: Stanje členkov male vodne leče (<i>L. minor</i>) in prisotnost alg med sedemdnevni standardnim testom inhibicije rasti pri različnih koncentracijah makrodelcev CuO	36

KAZALO SLIK

Slika 1: Mala vodna leča (<i>Lemna minor</i>)	14
Slika 2: Primer členkov z nekrozami.....	18
Slika 3: Modulacijski fluorometer PAM 2100	19
Slika 4: Število členkov male vodne leče (<i>L. minor</i>) po izpostavitvi TiO ₂ in CuO v nano in makro obliki med sedemdnevni testom rasti.	38
Slika 5: Število kolonij male vodne leče (<i>L. minor</i>) po izpostavitvi TiO ₂ in CuO v nano in makro obliki med sedemdnevni testom rasti.	39
Slika 6: Dolžina korenine male vodne leče (<i>L. minor</i>) po izpostavitvi TiO ₂ in CuO v nano in makro obliki med sedemdnevni testom rasti.	40
Slika 7: Barva členkov male vodne leče (<i>L. minor</i>) po izpostavitvi TiO ₂ in CuO v nano in makro obliki med sedemdnevni testom rasti.	42
Slika 8: Prisotnost alg v gojišču po izpostavitvi TiO ₂ in CuO v nano in makro obliki med sedemdnevni testom rasti.....	43
Slika 9: Potencialna fotokemična učinkovitost pri mali vodni leči (<i>L. minor</i>) po sedemdnevni standardnem testu inhibicije rasti pri različnih koncentracijah delcev TiO ₂ in CuO.....	44
Slika 10: Specifična encimska aktivnost (SEA) katalaze v odvisnosti od koncentracije delcev TiO ₂ in CuO v gojišču	45
Slika 11: Specifična encimska aktivnost (SEA) askorbat peroksidaze v odvisnosti od koncentracije delcev TiO ₂ in CuO v gojišču.....	46
Slika 12: Specifična encimska aktivnost (SEA) guaiakol peroksidaze v odvisnosti od koncentracije delcev TiO ₂ in CuO v gojišču.....	47
Slika 13: Specifična encimska aktivnost (SEA) glutation reduktaze v odvisnosti od koncentracije delcev TiO ₂ in CuO v gojišču.....	48

KAZALO PRILOG

PRILOGA A 1: Stanje male vodne leče (*L. minor*) med sedemdnevni standardni testom inhibicije rasti pri različnih koncentracijah nanodelcev TiO₂(prva ponovitev poskusa).

PRILOGA A 2: Stanje male vodne leče (*L. minor*) med sedemdnevni standardni testom inhibicije rasti pri različnih koncentracijah nanodelcev TiO₂(druga ponovitev poskusa).

PRILOGA A 3: Stanje male vodne leče (*L. minor*) med sedemdnevni standardni testom inhibicije rasti pri različnih koncentracijah makrodelcev TiO₂(prva ponovitev poskusa).

PRILOGA A 4: Stanje male vodne leče (*L. minor*) med sedemdnevni standardni testom inhibicije rasti pri različnih koncentracijah makrodelcev TiO₂(druga ponovitev poskusa).

PRILOGA A 5: Stanje male vodne leče (*L. minor*) med sedemdnevni standardni testom inhibicije rasti pri različnih koncentracijah nanodelcev CuO (prva ponovitev poskusa).

PRILOGA A 6: Stanje male vodne leče (*L. minor*) med sedemdnevni standardni testom inhibicije rasti pri različnih koncentracijah nanodelcev CuO (druga ponovitev poskusa).

PRILOGA A 7: Rast male vodne leče (*L. minor*) med sedemdnevni standardni testom inhibicije rasti pri različnih koncentracijah makrodelcev CuO (prva ponovitev poskusa).

PRILOGA A 8: Rast male vodne leče (*L. minor*) med sedemdnevni standardni testom inhibicije rasti pri različnih koncentracijah makrodelcev CuO (druga ponovitev poskusa)

PRILOGA A 9: Stanje male vodne leče (*L. minor*) na koncu sedemdnevnega standardnega testa inhibicije rasti pri različnih koncentracijah nanodelcev TiO₂ s standardnimi napakami

PRILOGA A 10: Stanje male vodne leče (*L. minor*) na koncu sedemdnevnega standardnega testa inhibicije rasti pri različnih koncentracijah makrodelcev TiO₂ s standardnimi napakami

PRILOGA A 11: Stanje male vodne leče (*L. minor*) na koncu sedemdnevnega standardnega testa inhibicije rasti pri različnih koncentracijah nanodelcev CuO s standardnimi napakami

PRILOGA A 12: Stanje male vodne leče (*L. minor*) na koncu sedemdnevnega standardnega testa inhibicije rasti pri različnih koncentracijah makrodelcev CuO s standardnimi napakami

PRILOGA B 1: Potencialna fotokemična učinkovitost pri mali vodni leči (*L. minor*) po sedemdnevni standardni testu inhibicije rasti pri različnih koncentracijah nanodelcev TiO₂ s standardnimi napakami

PRILOGA B 2: Potencialna fotokemična učinkovitost pri mali vodni leči (*L. minor*) po sedemdnevni standardni testu inhibicije rasti pri različnih koncentracijah makrodelcev TiO₂ s standardnimi napakami

PRILOGA B 3: Potencialna fotokemična učinkovitost pri mali vodni leči (*L. minor*) po sedemdnevni standardni testu inhibicije rasti pri različnih koncentracijah nanodelcev CuO s standardnimi napakami

PRILOGA B 4: Potencialna fotokemična učinkovitost pri mali vodni leči (*L. minor*) po sedemdnevem standardnem testu inhibicije rasti pri različnih koncentracijah makrodelcev CuO s standardnimi napakami

PRILOGA C 1: Specifična encimska aktivnost (SEA) encimov G-POD, GR, A-POD in CAT ob različnih koncentracijah nanodelcev TiO₂ v gojišču

PRILOGA C 2: Specifična encimska aktivnost (SEA) encimov G-POD, GR, A-POD in CAT ob različnih koncentracijah makrodelcev TiO₂ v gojišču

PRILOGA C 3: Specifična encimska aktivnost (SEA) encimov G-POD, GR, A-POD in CAT ob različnih koncentracijah nanodelcev CuO v gojišču

PRILOGA C 4: Specifična encimska aktivnost (SEA) encimov G-POD, GR, A-POD in CAT ob različnih koncentracijah makrodelcev CuO v gojišču.

PRILOGA D: Rezultati enosmernega testa ANOVA za vse opazovane parametre, razen barve členkov

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ROS	reaktivne kisikove spojine
CAT	katalaza
A-POD	askorbat peroksidaza
G-POD	guaiakol peroksidaza
GR	glutation reduktaza
Cu	baker
CuO	bakrov oksid
CuSO ₄	bakrov sulfat
TiO ₂	titanov dioksid
CdCl ₂	kadmijev diklorid
ZnCl ₂	cinkov diklorid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
SOD	superoksid dismutaza
OH [•]	hidroksidni ion
O ₂ H [•]	hidroperoksidni radikal
O ₂ ^{•-}	superoksidni anion
H ₂ O ₂	vodikov peroksid
MAPK	mitogen-aktivirane proteinske kinaze
Fe ³⁺ O ₂	perferilni radikal
MDA	malondialdehid
TBK	tiobarbiturna kislina
SA	salicilna kislina
GSH	glutation
GSSH	glutation disulfid
GS	glutation sintetaza
MDHA	monodehidroaskorbat
DHA	dehidroaskorbat
EDTA	etilen-diamin-tetraocetna kislina
KP pufer	kalij fosfatni pufer
KH ₂ PO ₄	kalijev dihidrogen fosfat
K ₂ HPO ₄	dikalijev hidrogen fosfat
γ-ECS	γ-glutamilcistein sintetaza
γ-EC	γ-glutamilcistein
dH ₂ O	destilirana voda
DTNB	5,5-dithio-bis (2- nitrobenzojska kislina)
TNB	2-nitro-5-thiobenzojska kislina
SEA	specifična encimska aktivnost

1 UVOD

Od stalne naseljenosti prebivalstva človek onesnažuje okolje. Ko so predniki še živeli v sožitju z naravo, je bilo onesnaževanja manj. S pojavom industrijske revolucije v 18. stoletju pa je to postajal vedno večji problem. Sčasoma so se ljudje bolj zavedali, kakšne posledice ima lahko nepremišljeno onesnaževanje. Razvili so čistilne naprave, uvedli recikliranje, ločevanje odpadkov ipd.

Okoljske motnje človekovega ali naravnega izvora lahko pomenijo za organizem stres. V stresnih razmerah se celični metabolizem spremeni, med drugim nastanejo reaktivne kisikove spojine (ROS), ki poškodujejo DNA, beljakovine in lipide. Zato jih celice poskušajo odpraviti s pomočjo antioksidativnih encimov ali drugih antioksidativnih snovi, saj lahko v najslabšem primeru rastlina celo propade.

Stres se n arastlini lahko pokaže tudi na drugih nivojih, na primer morfološke in fiziološke spremembe, kot so zmanjšana fotokemična učinkovitost, poškodbe koreninskega sistema, motnje pri privzemu vode in mineralov, ovenelost listov, pojav kloroz in nekroz. Vpliv stresorjev v okolju raziskujemo in vrednotimo z bioindikatorji.

Z razvojem nanotehnologije se delci, manjši od 100 nm, vse pogosteje uporabljajo tudi v komercialne namene. Pojavili so se dvomi o varnosti nanodelcev, saj naj bi bili citotoksični, povzročali naj bi vnetja, oksidativni stres. Zaradi hitre širitve uporabe in razvoja nanodelcev, je razumevanje njihovih učinkov na okolje in posamezna živa bitja zelo pomembno. Le tako bomo lahko varno razvijali in uporabljali nanotehnologijo.

Zato smo v našem delu želeli ugotoviti, kako delci dveh različnih kovinskih oksidov v nano in makro obliki, in sicer titanov dioksid in bakrov oksid, vplivajo na morfološko in fiziološko stanje testnih rastlin, kar smo ugotavljali s spremembami tako na encimski, fotokemični in morfološki ravni, rasti in delovanja izpostavljenih rastlin. V naših poskusih smo kot testno rastlino uporabili malo vodno lečo (*Lemna minor*), ki je zaradi svoje enostavne zgradbe odličen pokazatelj okoljskih razmer. Zanimalo nas je tudi, če oblika delcev vpliva na odgovor rastlin. Večje delce smo poimenovali makrodelci, manjše pa nanodelci. Nanodelci so veliki v premeru do 100 nm, makrodelci pa so večji od njih in zaradi tega imajo predpono makro-.

Naše hipoteze so bile:

- Nanodelci bakrovega oksida bodo bolj škodljivi za malo vodno lečo kot nanodelci titanovega dioksida. Višja kot bo koncentracija bakrovega oksida v gojišču, slabša bo rast leče. Z višanjem koncentracije titanovega dioksida v gojišču se rast leče ne bo zmanjšala. To predpostavljamo zaradi že narejenih raziskav, ki so pokazale, da so bakrove spojine bolj škodljive kot titanove.
- Pri rastlinah, tretiranih z nanodelci bakrovega oksida, bo rumenenje členkov večje kot pri rastlinah, ki bodo uspevale v prisotnosti nanodelcev titanovega dioksida. Predpostavljamo, da bo z večanjem koncentracije nanodelcev rumenenje v obeh primerih večje.
- Leča, ki bo uspevala v prisotnosti nanodelcev titanovega dioksida, bo imela nižji delež nekroz kot rastline, ki bodo rastle v prisotnosti nanodelcev bakrovega oksida.
- Specifična encimska aktivnost antioksidativnih encimov CAT, A-POD, G-POD se bo z večanjem koncentracije delcev v mediju višala. Aktivnost bo višja v leči, ki bo izpostavljena nanodelcem bakrovega oksida kot titanovega dioksida.
- Potencialna fotokemična učinkovitost leče, ki bo uspevala v prisotnosti nanodelcev bakrovega oksida, se bo nižala z njihovo naraščajočo koncentracijo v gojišču. Prav tako bo potencialna fotokemična učinkovitost nižja kot v rastlinah, ki bodo rasle v prisotnosti nanodelcev titanovega dioksida.
- Nanodelci titanovega dioksida in bakrovega oksida bodo v primerjavi z makrodelci bolj zavirali rast, rumenenje členkov leče bo hitrejše, večja bo aktivnost antioksidativnih encimov. Tudi fotokemična učinkovitost leče bo manjša v prisotnosti nanodelcev v primerjavi z makrodelci spojine.

2 PREGLED OBJAV

2.1 NANODELCI

Nanodelci niso nekaj novega; obstajajo vse od nastanka Zemlje. Nastajajo pri vulkanskih izbruhih (iz aerosolov), gozdnih požarih. Lahko nastanejo pod vplivom nekaterih vremenskih pojavov, z mikrobno aktivnostjo, z nastankom jeder v super-nasičenih raztopinah (Navarro in sod., 2008) ali kot stranski produkt preperevanja mineralov (Kahru in sod., 2008). Nanodelci naravnega izvora so polidisperzni; vsebujejo sulfide, sulfate, amonijak, organski in elementarni ogljik, tudi sledove kovin. So nepravilnih oblik, med temko so nanodelci umetnega izvora bolj homogene sestave in pravilnih oblik. Umetno izdelane nanodelce Lin in Xing (2007) razdelita v štiri skupine: (1) material na osnovi ogljika; fulereni, enostenske nano cevke, (2) materiali na osnovi kovin; nano zlato, nano aluminij, nano titanov dioksid,... (3) dandrimere; razvejani nano polimeri, katerih oblika se razlikuje glede na njihovo kemično funkcijo, (4) kombinacije nanodelcev, združevanje v večje molekule. Od teh sta prvi dve obliki najbolj pogosti in najbolj preučevani.

Po definiciji, ki jo navajajo Koehler in sod. (2010), so nanodelci lahko v dveh oblikah. Fini delci so v velikostnem razredu okoli 200 nm, ultra fini pa so manjši, in sicer od 20 nm do 100 nm. Lahko se pojavljajo v več oblikah, kot so cevke, vlakna in prah.

Vedno več je investicij v nanotehnologijo. Po Rocu (2005) naj bi bila ta tehnologija do leta 2015 vredna že milijardo dolarjev. Njihova uporaba je splošna: lahko jih najdemo v kremah za sončenje, detergentih, barvah, tiskarskem črnilu, plastičnih filtrih, izolaciji hiš, kozmetiki, tekstilu, zobnih kremah. Uporabljajo se tudi v farmaciji (Navarro in sod., 2008, Koehler in sod., 2010). Glede na to, da je to hitro razvijajoča se tehnologija, katere produkte najdemo v različnih panogah, je potrebno predvideti, da bodo nanodelci zašli tudi v okolje. Nanodelci, ki zaidejo v okolje, se kopičijo predvsem v sladkih in slanih vodnih sistemih, pa tudi v prsti (Kahru in sod., 2008).

Navarro s sodelavci (2008) navaja tri področja raziskav, na katere moramo biti pozorni: (1) viri, transformacije in usoda nanodelcev v okolju, (2) biotransformacija nanodelcev v stiku z okoljem in njihov prenos v rastline, alge in glive, (3) posledice za rastline in za okolje po prenosu nanodelcev v rastline.

Površinske lastnosti nanodelcev so pomembne pri povečevanju njihove stabilnosti in mobilnosti po vodnem sistemu. To jim omogoča vezavo in posledično prehod v alge, kjer lahko povzročijo negativne učinke. Nanodelci lahko vstopajo tudi v kopenske rastline in glive. Tudi v prsti je za njih ključnega pomena voda, preko katere preidejo v organizem. Vodno okolje je za kovinske nanodelce glavni razlog za njihovo škodljivost, saj se sprostijo kovinski ioni (Kahru in sod., 2008). Da so strupeni tudi kovinski ioni, dokazuje

študija Heinlaan-a in sodelavcev (2008). Ugotovili so, da sta ZnO in CuO kljub nizki topnosti v vodi negativno vplivala na bakterije vrste *Vibrio fischeri* in raka vrste *Thamnocephalus platyurus*.

Prvo pregrado na poti v rastline predstavlja celična stena. To je polprepustna struktura. Njene pore med celuloznimi fibrilami so velike od 5 do 20 nm. To pomeni, da lahko skozi njih prehajajo delci manjših velikosti. Interakcija nanodelcev s celico lahko povzroči nastanek novih por v celični steni ali pa se pore povečajo in stena postane bolj prepustna. Nanodelci po prečkanju prve ovire dosežejo plazemsko membrano. Skoznjjo preidejo s pomočjo endocitoze, kanalov ali transmembranskih proteinov. Ko so enkrat v celici, se nanodelci lahko vežejo na različne celične organele. Metabolizem celice je tako oviran, pojavijo se lahko tudi ROS (Navarro in sod., 2008). Sadiq s sodelavci (2011) ugotavlja, da je negativen učinek nano delcev TiO₂ na zeleni algi *Scenedesmus* sp. in *Chlorella* sp. povezan z velikostjo delcev. Manjši delci so bolj negativno vplivali na alge kot večji. Rast je bila v prisotnosti manjša, tudi vsebnost klorofila je upadla pri nižji koncentraciji nanodelcev v gojišču.

Nanodelci ne ovirajo le celičnega metabolizma, ampak poškodujejo tudi DNA, do katere pridejo na več načinov. Z difuzijo preidejo jedrno ovojnico ali prehajajo skozi kompleks jedrnih por. Do DNA pa lahko neposredno dostopajo v času mitoze, ko se jedrna ovojnica razgradi. Primera kovinskih nanodelcev, ki do DNA prispeta skozi pore, sta TiO₂ in SiO₂. V notranjosti jedra tvorita agregate proteinov, ki zavirajo podvojevanje, prepisovanje in delitev celice. Posredno pa nanodelci poškodujejo dedni material celice tako, da se vežejo na proteine, ki sodelujejo pri delitvi celice in s proženjem oksidativnega stresa. Znano je, da se med oksidativnim stresom poveča produkcija reaktivnih kisikovih spojin, ki lahko zlomijo DNA, povzročijo prekrivanje baznih parov ter druge poškodbe DNA. Posledica teh sprememb je lahko nekontrolirana delitev celice, ki vodi v nastanek maligne tvorbe (Singh in sod., 2009).

Dietz in Herth (2011) opisujeta štiri učinke, ki jih nanodelci povzročijo v celici: kemičnega, mehanskega, katalitičnega in površinskega.

- Pri kemičnem poudarjata vezavo nanodelcev na proteine in s tem spremembo funkcionalnosti. Tako oviranje celičnih procesov vodi v porušitev redoks ravnotežja in oksidativni stres.
- Mehanski učinek je odvisen od velikosti delcev, ki zapolnijo pore v celični steni, kar pomeni moten ali onemogočen transport snovi. Asli in Neumann (2009) navajata, da pride do zaviranja transporta vode pri višjih koncentracijah nanodelcev v prsti.
- Kovine (Ag, Pt, Pd, Au, Fe, Co) katalizirajo redoks reakcije.
- Pri površinskih učinkih nanodelcev na celico poudarjata oblikovanje OH- skupin na površini, kar privablja pozitivno nabite stranske skupine proteinov.

Kljub vsem opisanim negativnim učinkom nanodelcev na rastline pa Navarro in sod. (2008) navajajo tudi nekatere pozitivne. Ogljikovi fulereni lahko delujejo kot antioksidanti proti lipidni peroksidaciji. Njihovo delovanje sprožijo superoksidni in hidroksi radikali (Wang in sod., 2003, cit. po Navarro in sod., 2008).

2.1.1 Nanodelci TiO₂

Med vsemi nanodelci, so delci TiO₂ najbolj vsestransko uporabni zaradi svoje protimikrobne aktivnosti in fotokatalitične sposobnosti za zaščito pred UV-sevanjem. So dodatek hrani, ker podaljšujejo obstojnost hrane, npr. v fermentiranem mleku, v premazih za bombone, z njimi loščijo sadje. Uporabljajo jih tudi kot belilno sredstvo, v sončnih celicah in za čiščenje vode (Fabian in sod., 2008).

Nabitost delcev je odvisna od vrednosti pH. Če je ta nižji od 6, so delci pozitivno nabiti, če je pH višji od 7, pa negativno (Navarro in sod., 2008). Delci so sferične oblike, manjši lahko zavzamejo tudi heksagonalno obliko. Na mikroalge vrste *Scenedesmus* sp. in *Chlorella* sp. so imeli manjši delci TiO₂ manjši vpliv kot večji delci. Nano oblika je dosegla 50 % izumrtje populacije v gojišču pri nižji koncentraciji kot mikro oblika. Zaradi prisotnosti delcev je upadla koncentracija klorofila in zmanjšala sta se rast in preživetje alg (Sadiq in sod., 2011).

Veliko pozitivnih učinkov nanodelcev so različni avtorji opisali pri špinači (*Spinacia oleracea*) (Navarro in sod., 2008, Zheng in sod., 2005, Nair in sod., 2010, Lei in sod., 2008). Nanodelci TiO₂ so pospešili kalitev semena. Rastlini so omogočili lažji prevzem nitratov, lažjo pretvorbo anorganskega dušika v organskega. Posledično se suha in sveža masa rastline povečujeta, prav tako sinteza klorofila. Nanodelci TiO₂ so imeli pozitiven vpliv tudi na fotosintezo, saj se poveča kompleks LHC II. Pod vplivom sevanja UV-B nanodelci TiO₂ zmanjšujejo kopičenje ROS.

Prav tako so o pozitivnih učinkih poročali pri vrbi (*Salix* sp.) in bobu (*Vicia faba*). Pri vrbah so opazovali transpiracijo, rast (povečevanje mase) in sposobnost črpanja vode (Seeger in sod., 2009). Pri bobu pa so opravili test mikrojed, s katerim se ugotavlja, ali prihaja do sprememb DNA. Poleg tega so izmerili fotokemično učinkovitost po izpostavitvi nanodelcem TiO₂, stehali so korenine, izmerili lipidno peroksidacijo in aktivnost antioksidativnih encimov SOD, CAT, GR, G-POD, A-POD. Tako lipidna peroksidacija kot aktivnost encimov sta bili po končanem poskusu pri rastlinah, ki so uspevale v različnih koncentracijah nano TiO₂, nespremenjena (Foltête in sod., 2011).

Negativne učinke so nanodelci TiO₂ imeli na koruzo (*Zea mays*) in enocelične alge, vrste *Chlamydomonas reinhardtii*. Asli in Neumann (2009) sta ugotavljala, ali nanodelci TiO₂ v okoljskem mediju ovirajo črpanje vode skozi korenine koruze. Ugotovila sta, da so opazni

zaviralni učinki na hidrodinamiko korenin. Predpostavljala sta, da se nanodelci lahko vežejo na celično steno in s tem ovirajo sprejem vode. Pojavili so se še drugi negativni učinki, povezani z zmanjšano hidrodinamiko korenin, in sicer povečana tenzija ksilema, inhibicija rasti listov, manjša transpiracija. Ti učinki so bili kratkotrajni, saj so se po šestih tednih zmanjšali.

Na alga *Chlamydomonas reinhardtii* so imele negativne učinke šele višje koncentracije nanodelcev TiO₂ v gojišču. Lipidna peroksidacija in aktivnost encima SOD sta bili povečani pri algah, ki so bile izpostavljene koncentraciji 10 mg/L nano TiO₂. Rast alg je bila pri tej koncentraciji do drugega dne zavrta, a je število celic po petih dneh trajanja poskusa doseglo podobno vrednost kot v kontroli (Wang in sod., 2008). Iz tega lahko sklepamo, da so bile višje koncentracije nanodelcev TiO₂ v gojišču za alge strupeni.

Ker se nanodelci TiO₂ uporabljajo tudi v kozmetični in farmacevtski industriji, so potencialno škodljivi za ljudi. Kopičijo se lahko ob vdihavanju in prizadenejo pljuča, po oralnem zaužitju pa lahko preidejo tudi v ledvice, jetra ali vranico (Park in sod., 2008). Raziskave, v katerih so izpostavili miši (*Mus musculus*) nanodelcem TiO₂ v prahu, so pokazale, da so se po vdihu 0,1 mg nanodelcev TiO₂ pojavile morfološke in histološke spremembe v pljučih (porušene alveolarne septe, povečane alveole, akumulacija makrofagov) (Cheng in sod., 2006, cit. po Park in sod., 2008). O negativnem vplivu nanodelcev TiO₂ so poročali tudi v primeru vodne bolhe (*Daphnia magna*), kjer so povzročili povišanje aktivnosti antioksidativnih encimov CAT, GPX, GST. Aktivnost SOD se ni spreminjala. Pri koncentracijah nanodelcev TiO₂ med 5 in 10 mg/L v gojišču so opazili povečano umrljivost, medtem ko na reprodukcijo vodnih bolho niso vplivali (Kim in sod., 2010).

2.1.2 Nanodelci CuO

Baker je življenjsko pomemben mikronutrient, potreben za normalno rast in razvoj rastlin. Normalna koncentracija Cu v tkivu je 10 µg g⁻¹ suhe mase rastline. Je kofaktor številnim encimom v karbohidratnem in nitrogenem metabolizmu, najdemo ga tudi v celični steni. Pomemben je pri produkciji semen ter za uravnavanje vodnih razmer v rastlinah (Razinger in sod., 2007).

Baker je v naravi prisoten v dveh oksidacijskih stanjih: Cu⁺¹ in Cu⁺² (drugačen zapis, ki se pojavlja v kemijskih formulah je Cu(I) in Cu(II)). Obe obliki lahko pospešita tvorbo hidroksilnega radikala in reakcije fentonskega tipa, ki vodijo v uničenje nenasičenih maščobnih kislin. Študije fluorescence in fotooksidacije citokroma f/c v poškodovanih celicah kažejo, da Cu blokira fotosintezni elektronski transport v obeh smereh - tako v oksidirajočem kot v reducirajočem sistemu fotosinteze. Blokada fotosinteznega sistema preprečuje boljši prenos elektronov na kisik in poznejšo tvorbo O₂⁻. Cu v večjih

koncentracijah tekmuje s katalazo za razgradnjo peroksida, kar vodi v nastanek hidroksilnega radikala. Ta začne verižno reakcijo lipidne peroksidacije (Sandmann in Böger, 1980).

Nanodelci CuO se uporabljajo v barvnih premazih za čolne, iz katerih se lahko sproščajo v vodo v dveh oblikah: Cu⁺ ali nano CuO. Obe obliki sta škodljivi za okolje (Perreault in sod., 2010).

Nair in sod. (2010) v članku navajajo raziskavo Lee-ja (s sod., 2008), kjer so preučevali vpliv nanodelcev CuO na zlati fižol (*Phaseolus radiatus*) in navadno pšenico (*Triticum aestivum*). Ugotovili so, da je fižol na nanodelce CuO bolj občutljiv. S TEM-mikroskopijo so ugotovili, da so nanodelci vstopili v celico skozi celično membrano, njihova akumulacija pa je naraščala s povečevanjem koncentracije nanodelcev CuO v gojišču. Nair se s sodelavci sklicuje še na raziskavo Stampoliusa in sodelavcev (2009), ki so ugotovili, da so nanodelci CuO zavirali rast korenin pri bučah (*Cucurbita pepo*).

Veliko raziskav je bilo narejenih z bakrovim sulfatom (CuSO₄), iz katerega se sproščajo bakrovi ioni v okolico in s tem negativno vpliva na žive organizme. Glavni testni organizmi tovrstnih ekotoksikoloških raziskav so bili vodne leče (*Lemna minor*, *Lemna gibba*), trave (*Holcus lanatus*) in vrsta slive (*Prunus cerasifera*). Na splošno so bile ugotovitve precej podobne. Pri *L. minor* in travi se je aktivnost antioksidativnih encimov (SOD, CAT, A-POD) povečala, prav tako tudi lipidna peroksidacija, opazili so zmanjšano fluorescence (Hou in sod., 2007, Razinger in sod., 2007, Teisseire in Guy, 2000, Hartley-Whitaker in sod., 2001). Vrsta *Prunus cerasifera* je bila na sulfat bolj odporna, saj je do poškodb starejših listov prihajalo pri koncentracijah, višjih od 100 μM CuSO₄ v gojišču (Lombardi in Sebastiani, 2005).

Z absorpcijsko spektroskopijo so ugotovili, da tudi nanodelci CuO izločajo bakrove ione. Znano je, da ioni blokirajo fotosintetske procese pri *L. minor*. Perreault je s sodelavci (2010) dokazal, da imajo nanodelci CuO negativne učinke tudi na vrsto *L. gibba*. Indikator vsebnosti klorofila je pokazal, da prisotnost nanodelcev CuO zmanjša rast rastlin, prav tako pa je bil po 48 urah po izpostavitvi poškodovan fotosintezni aparat, kar so ugotovili z merjenjem fotokemične učinkovitosti.

V Sloveniji velja Uredba o mejnih, opozorilnih in kritičnih imisijskih vrednostih nevarnih snovi v tleh, v kateri je kot nevarna snov naveden tudi baker in njegove spojine (Uradni list RS (št. 68/1996)).

- Mejna imisijska vrednost je gostota posamezne nevarne snovi v tleh, ki pomeni takšno obremenitev tal, da zagotavlja življenjske razmere za rastline in živali, in pri kateri se ne poslabšuje kakovost podtalnice in rodovitnost tal. Pri tej vrednosti so

učinki ali vplivi na zdravje človeka ali okolje še sprejemljivi. Za Cu je ta vrednost 60 mg/kg suhih tal.

- Opozorilna imisijska vrednost je gostota posamezne nevarne snovi v tleh, ki pomeni pri določenih vrstah rabe tal verjetnost škodljivih učinkov ali vplivov na zdravje človeka ali okolje. Za Cu je ta vrednost 100 mg/kg suhih tal.
- Kritična imisijska vrednost je gostota posamezne nevarne snovi v tleh, pri kateri zaradi škodljivih učinkov ali vplivov na človeka in okolje onesnažena tla niso primerna za pridelavo rastlin, namenjeni prehrani ljudi ali živali ter za zadrževanje ali filtriranje vode. Za Cu je ta vrednost 300 mg/kg suhih tal.

2.2 OKSIDATIVNI STRES

Stres je zunanji dejavnik, ki ima na rastlino negativne vplive. Najpogosteje se ga meri v odvisnosti od preživetja rastline, uspešnosti svetlobne žetve, akumulaciji biomase (rasti) ali pa po privzemu CO₂ in mineralov. V okolju najdemo številne dejavnike, ki lahko postanejo stresni, če jim je rastlina predolgo časa izpostavljena. Visoka temperatura zraka postane stresna že po nekaj minutah, medtem ko stres zaradi pomanjkanja ali presežka mineralov nastopi po nekaj mesecih izpostavljenosti (Taiz in Zeiger, 2006).

Življenje na Zemlji se je bistveno spremenilo od razvoja fotosinteze. Zaradi fotosinteze se je v okolju povišala koncentracija kisika in organizmom se je ponudila možnost izkoriščanja kisika. Ker pri aerobni presnovi prihaja do nastanka prostih radikalov, ki so v velikih količinah strupeni, je za celice pomembno, da ohranjajo oksidante in antioksidante v ravnovesju. Ob neravnovesju, ki nastane zaradi izbruha oksidantov, nastopi oksidativni stres (Scandalios, 2002).

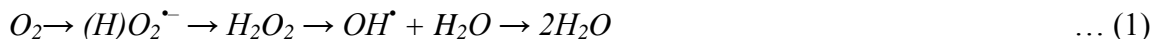
Oksidanti pa ne nastajajo le med običajno presnovo, njihova produkcija je povečana v stresnih razmerah. Te so lahko posledica redukcije prehodnih kovin, interakcij med nanodelci in sestavinami celice, izpraznitve glutationskega bazena in drugih procesov (Sies, 1997, Razinger in sod., 2008, Karlsson in sod., 2009).

Obramba pred poškodbami zaradi oksidativnega stresa se izvaja na več nivojih, kot so preprečitev nastanka oksidantov, prestrezanje že nastalih oksidantov in popravljanje nastale škode. Antioksidanti so lahko encimski ali neencimski (Sies, 1997).

2.2.1 Reaktivne kisikove spojine (ROS)

Ob redukciji O₂ v H₂O se sprošča energija, ki omogoča kompleksnost višjih organizmov. Vendar pa ob nepopolni redukciji nastanejo izjemno reaktivne ROS, ki lahko reagirajo z

DNA, proteini in lipidi (Dat in sod., 2002). Reakcija poteka v štirih fazah, kjer nastane več ROS:



Med ROS sodijo hidroksidni ion (OH[•]), hidroperoksidni radikal (O₂H[•]), superoksidni anion (O₂^{•-}), vodikov peroksid (H₂O₂) in druge (1). Njihova značilnost je, da hitro reagirajo z drugimi spojinami in jim hočejo odvzeti elektron, ki ga potrebujejo za svojo stabilnost. Spojina, ki ji je bil odvzet elektron, sama postane visoko reaktivna in verižna reakcija je sprožena. Tako ROS nastajajo z redukcijo molekularnega kisika v rastlinah. Na ta način postanejo spojine visoko reaktivne ali pa potencialni signalizatorji v celici. Zaradi njihove dvojne vloge jih nadzorujejo antioksidanti (Scandalios, 2002, Dat in sod., 2002).

Pri odzivu rastline na biotski ali abiotski stres igrajo pomembno vlogo antioksidanti in reaktivne kisikove spojine (ROS). ROS igrajo pomembno vlogo tako pri hipersenzitivnem odzivu rastline na patogene organizme, kot pri procesu, ki vodi v prilagoditev na stresne dejavnike (Dat in sod., 2000).

Začetki raziskav ROS segajo v leto 1930, ko je Michaelis predpostavil, da pri vseh bioloških oksidacijskih procesih nastajajo proste radikalne spojine, Haber in Weiss (1934) pa sta poročala o kovinsko kataliziranih peroksidnih dekompozicijskih reakcijah.

Danes več avtorjev (Mittler in sod., 2011, Scandalios, 2002, Dat in sod., 2000) poudarja pomen ROS kot signalnih molekul, pomembna je tudi njihova lokalizacija v celici. Omenjene molekule so povezane s celičnimi redoks mrežami preko tioredoksinov, peroksiredoksinov, glutaredoksinov ter NADPH. Sporočanje preko ROS je pomemben proces, ki se pojavlja znotraj celice med organeli, lahko pa je tudi na višji ravni, med posameznima celicama. Prav tako postaja več znanega o vključevanju genov v signalizacijo z ROS. Signalna pot ROS se lahko vključi ob aktivaciji mitogen-aktiviranih proteinskih kinaz (MAPK) kot tudi z NADPH oksidaznim kompleksom. Povod za prvega je prisotnost H₂O₂, za drugega pa je potrebna kalcijeva signalizacija in fosforilacija proteinov. Pomembno je kopičenje ROS signalov v primarnem celičnem metabolizmu bodisi v mitohondrijih bodisi v kloroplastih (Mittler in sod., 2011).

Po Singhu (in sod., 2009) ločimo primarne in sekundarne ROS. Primarni se tvorijo med metabolnimi procesi ali med aktivacijo kisika. Nastane superoksidni anion. Ta ne reagira neposredno z molekulo DNA, temveč z drugimi molekulami, kot so prehodne kovine. Tako pride do nastanka sekundarnih molekul ROS; primer je hiperoksidni radikal. Ta pa lahko neposredno poškoduje DNA.

2.2.2 Oksidativni stres kot pokazatelj škodljivih vplivov abiotičnih dejavnikov

Številni avtorji so s pomočjo oksidativnega stresa dokazali negativen vpliv abiotičnih delavnikov na rastline. Oksidativen stres so povzročile težke kovine, kot so svinec, živo srebro, arsenat in kadmij. Poleg teh so negativen učinek na rastline s pomočjo oksidativnega stresa dokazali tudi za druge abiotične dejavnike.

Na rži (*Oryza sativa*) so Verma in sod. (2003) ob povišanih koncentracijah Pb(NO₃)₂ v prsti opazili upad teže, rasti, izmerili so povečano lipidno peroksidacijo, aktivnost antioksidativnih encimov. Sadike paradižnika (*Lycopersicon esculentum*) so se z oksidativnim stresom odzvale na prisotnost živega srebra v prsti (Cho in Park, 2000). Po mesecu dni izpostavljenosti so imele sadike povišano lipidno peroksidacijo tako v koreninah kot v listih. Tudi prisotnost kadmija v gojišču je povečala lipidno peroksidacijo in antioksidativno encimsko aktivnost v različnih rastlinah (Balen in sod., 2011, Hegedüs in sod., 2001, Smeets in sod., 2005, Razinger in sod., 2008). S pomočjo oksidativnega stresa so prav tako dokazali negativen vpliv arsenata na črno deteljo (*Trifolium pratense*) (Maschner in sod., 2002). Po več tednih gojenja detelje pri koncentraciji 50 mg/L v prsti so poleg povečane aktivnosti antioksidativnih encimov v rastlini opazili še nekroze, v koreninah pa so izmerili povečane koncentracije poliamidov kot obrambne snovi.

Da pa ne povzročajo oksidativnega stresa le težke kovine, poročajo Panda, Upadhyay (2003) in Saqrane sod.(2007). Panda in Upadhyay pišeta o negativnem vplivu pri večjih vsebnosti soli v prsti (NaCl). Povečana lipidna peroksidacija in porast encimskega delovanja SOD, GR in upad delovanja CAT kažejo na oksidativen stres pri povišani slanosti. Saqrane (in sod., 2007) v članku objavi negativni vpliv mikrocistinov na vodno lečo (*Lemna minor*). Iz vodnega telesa, kjer so zaznali povečano rast cianobakterij, so izolirali mikrocistein. Po dvanajstih dneh izpostavitve so pri nižjih koncentracijah strupenih snovi zaznali povečano lipidno peroksidacijo kot pri višjih. Tam so bile povišane fenolne komponente, kar nakazuje na možnost izboljšave antioksidativne obrambe pri rastlinah.

2.3 LIPIDNA PEROKSIDACIJA

Lipidna peroksidacija je občutljiv pokazatelj poškodb zaradi oksidativnega stresa, ki sproži razgradnjo membranskih lipidov (Razinger in sod., 2008, Sevanian in Ursini, 2000). Nenasičene maščobne kisline so tarča ROS, saj imajo dvojno vez in tako je več možnosti, da jim ROS odvzame elektron (Razinger in sod., 2008). Tako sta stopnja oksidacije in dolžina peroksidacijske verige neposredno povezani s številom dvojnih vezi v lipidnih molekulah in v obratnem sorazmerju z deležem holesterola v lipidnem matriksu. Holesterol

uveljavlja antioksidativno funkcijo z zaviranjem širjenja oksidacije (Sevanian in Ursini, 2000).

Spojina, ki začne lipidno peroksidacijo, se tvori iz O₂^{•-}, H₂O₂ in prehodne kovine v reduciranem stanju. Kovinski kompleks je vpleten v razpad peroksida, kar vodi v nastanek prostih radikalov, ki lahko začnejo lipidno peroksidacijo. Kovinski kompleksi so pomembni tudi za nadaljevanje reakcije. Lipidna peroksidacija lahko poteče zaradi neposredne produkcije ROS, sprožijo jo lahko tudi sekundarni procesi, ki vključujejo encimsko aktivacijo (Sevanian in Ursini, 2000).

Hitra oksidacija fosfolipidov v umetnih membranah iz lipoproteinov je bila opisana s pomočjo hemina, ki služi kot model hemoglobina. Ta vsebuje železo, ki se najpogosteje nahaja v stanju Fe³⁺, ko pa je oksidiran, se pomakne na višje valentno stanje (Fe⁴⁺). Tak hemin lahko začne reakcije lipidne peroksidacije. Ključni element je katalitična sposobnost peroksida. Peroksid nastane zaradi citokroma P-450. Ernster (1963, cit. po Sevanian in Ursini, 2000) domneva, da je citokrom P-450 prvi donor elektrona. S tem reducira železov kompleks; s poznejšim dodatkom kisika se tvori perferilni radikal (Fe³⁺O₂). Ta reagira z nenasičenimi lipidi, rezultati reakcije pa so lipidni radikali. Kasnejše reakcije s kisikom dajo lipidne peroksilne radikale, ki predstavljajo uvodne korake v lipidno peroksidacijo.

Najbolj točna metoda za merjenje lipidne peroksidacije je neposredno štetje primarnih hidroperoksidnih produktov. Ker pa so ti zelo nestabilni, je bolj uspešen način merjenja lipidne peroksidacije, določanje malondialdehida (MDA) kot sekundarnega produkta razpada lipidov. MDA se tvori med avtooksidacijo in encimsko razgradnjo nenasičenih maščobnih kislin v celici (Hodges in sod., 1999). Ena izmed uveljavljenih metod merjenja MDA je test TBK. Analiza temelji na nastanku obarvanega kompleksa MDA-TBK₂ med eno molekulo MDA in dvema molekulama tiobarbiturine kisline (TBK). Absorbanca se izmeri pri valovni dolžini 532 nm (Esterbauer, 1996).

2.4 ANTIOKSIDANTI

Številni avtorji (Scandalios, 2002, Razinger in sod., 2007, Dat in sod., 2002) navajajo, da je glavna naloga antioksidantov, da pretvorijo škodljive oksidne radikale v neškodljive oblike. Tako poznamo dve vrsti antioksidantov:

- a) neencimski antioksidanti: vitamin C (askorbatna kislina), vitamin E (α -tokoferol), provitamin A (β -karoten), majhni neencimski antioksidanti
- b) encimski antioksidanti: superoksidna dismutaza, katalaza, peroksidaza, glutation reduktaza, NADPH⁺ redukcijski encimi

2.4.1 Superoksidna dismutaza (SOD)

V celici rastlin najdemo tri izo-encime SOD. To so Mn SOD, Cu-Zn SOD in Fe SOD. Mn SOD najdemo v mitohondrijih, Cu-Zn SOD v citosolu in kloroplastih, Fe SOD pa le v stromi kloroplastov (Babu in sod., 2003). Vsi skupaj s peroksidazami predstavljajo prvo linijo obrambe proti ROS: O₂^{•-} pretvorijo v vodikov peroksid, ki se kopiči v celici, dokler ga ne odstranijo katalaze in peroksidaze (Scandalios, 2002).

2.4.2 Katalaza (CAT)

Encimi katalaze so prisotni v peroksisomih, glikosomih, in v organelih, kjer so prisotni encimi za razgradnjo H₂O₂. V svoji zgradbi vsebujejo hem in so prisotni v treh oblikah (CAT1, CAT2, CAT3). Skupina CAT1 se nahaja v listih, je odvisna od svetlobe in odstranjuje H₂O₂ med fotorespiracijo. Skupina CAT2 se nahaja v žilnih tkivih, CAT3 pa odstranjuje H₂O₂ iz glioksisomov in je prisotna v semenih in mladih poganjkih. Njihova glavna naloga je pretvoriti H₂O₂ v O₂ in H₂O, neposredno ali posredno preko substrata (metanol, etanol, formaldehid, format, nitrit, idr.). Katalaze ne zahtevajo reducirajoče moči in imajo visoko stopnjo reaktivnosti. Ker imajo nizko stopnjo afinitete do H₂O₂, lahko odstranjujejo le presežke peroksida. Za aktivacijo encima sta namreč potrebni dve molekuli H₂O₂. Geni za katalazo se lahko izrazijo ne le razvojno, ampak tudi zaradi različnih okoljskih signalov (svetloba, ekstremne temperature). Poleg tega pa igrajo ti encimi tudi pomembno vlogo pri obrambi pred patogeni. Primer je tobak, pri katerem CAT inhibirajo salicilno kislino (SA), ki sproži obrambni odziv (Dat in sod., 2002).

2.4.3 Peroksidaza (POD)

Alternativna pot uničenja H₂O₂ poteka preko peroksidaz, ki se nahajajo po celi celici. Imajo večjo afiniteto do H₂O₂ kot katalaze, po reduciranju peroksida pa potrebujejo reducenta (Noctor in Foyer, 1998). To sta lahko askorbat ali glutation. Encim glutation peroksidaza je vpleten v biosintezo lignina in etilena. Lignifikacija celične stene omejuje raztezanje celice, kar je pomemben mehanizem pri prilagoditvi celice na stres.

Indukcija peroksidazne zmogljivosti je bila večkrat dokumentirana (Smeets in sod., 2005). Povzročili so jo UV-radiacija, povečanje koncentracije ozona, težke kovine, senescenca in vodni stres. Dokazano je, da pri peroksidaciji niso poškodovani samo lipidi, ampak sta motena tudi njihova sinteza in transport (Smeets in sod., 2005).

2.4.4 Glutation

Glutation je neencimski antioksidantin skupaj z askorbatom ena izmed najpomembnejših sestavin v boju proti oksidativnemu stresu. V rastlini ima glutacion dve vlogi: metabolizem žvepla in obramba. Glutation zmanjša ROS neposredno ali v povezavi z α -tokoferolom, ki je pogost radikalski odstranjevalec v tilakoidnih membranah kloroplasta (Razinger in sod., 2008).

Reducirana oblika glutaciona (GSH) je tripeptid (γ -glu-cys-gly). Je predstopnja tiola in regulira privzem žvepla v koreninah. Lahko neposredno ali pa s pomočjo α -tokoferola pogasi ROS. Vključen je tudi v redoks cikel askorbata, v katerem oksidira v glutacion disulfid (GSSG). Redukcijo iz GSSG v GSH katalizira glutacion reduktaza (GR), ki je prisotna predvsem v kloroplastu, lahko pa tudi v citosolu in mitohondrijih (Noctor in Foyer, 1998).

Razvojna pot glutaciona naj bi bila skupna vsem organizmom, ki vsebujejo GSH. Dva koraka sta katalizirana s pomočjo encimov γ -glutamylcistein sintetaza (γ -ECS) in glutacion sintetaza (GS). Za oba je potrebna energija ATP. Po fosforilaciji nastane γ -EC in GSH. Reakcije sinteze se lahko dogajajo v citosolu in kloroplastih. Pod določenimi stresnimi pogoji oksidacija GSH spremlja razpad glutationske mreže. Druge študije kažejo, da se glutacion kopiči kot odgovor na povečano produkcijo ROS ali pa je njegova koncentracija povišana v rastlinah, prilagojenih na stresne pogoje (Noctor in Foyer, 1998).

2.4.5 Askorbat

Askorbinsko kislino oz. askorbat lahko sintetizirajo vse rastline in živali, z izjemo morskih prašičkov in ljudi. V rastlini se askorbat kopiči tako v fotosinteznih kot tudi v nefotosinteznih tkivih. Pomemben je pri rasti rastline, večanju celic in pri uravnavanju celičnega cikla. Kot primarni antioksidant neposredno reagira z ROS, kot sekundarni pa reducira oksidirano obliko α -tokoferola (Noctor in Foyer, 1998).

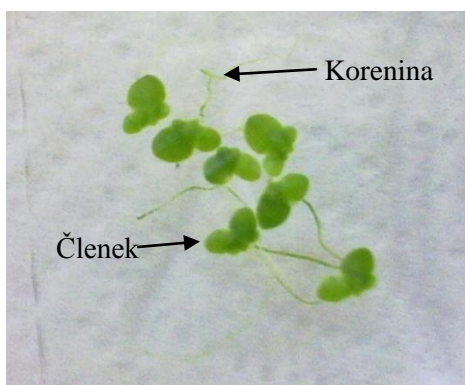
2.4.5.1 Askorbat – Glutationski cikel

V askorbat – glutationskem ciklu se preko več faz odstrani H₂O₂. Askorbat in glutacion neposredno nista vpletena v to pot, vendar sta prisotna pri cikličnem prenosu reducirajočih molekul, ki reducirajo H₂O₂ v H₂O. Uporabljata elektrone, ki jih posreduje NAD(P)H. Askorbat peroksidaza uporabi dve molekuli askorbata za redukcijo H₂O₂ v H₂O. Poleg H₂O₂ sta potrebni tudi dve molekuli monodehidroaskorbata (MDHA). MDHA je radikal z izjemno kratko življenjsko dobo. Če ni dovolj hitro reduciran, razpade na askorbat in

dehidroaskorbat (DHA). Tako se znotraj celice MDHA neposredno reducira do askorbata. Donor elektrona za redukcijo je lahko citokrom b, reducirani feredoksin ali pa NAD(P)H. Zadnje reakcije katalizirajo MDHA reduktaze, ki so v različnih celičnih komponentah. Zaradi hitrega razpada MDHA bo tako ob oksidaciji askorbata vedno nastalo nekaj DHA. Ta se reducira do askorbata s pomočjo DHA- reduktaze, ki uporablja reducirani glutation (GSH) kot reducirajoči substrat. To reakcijo generira glutation disulfid (GSSG), ki uporabi NADPH za ponovno redukcijo. Slednjo reakcijo katalizira GR (Noctor in Foyer, 1998).

2.5 MALA VODNA LEČA (*Lemna minor* L.)

Mala vodna leča sodi v družino vodolečevk (*Lemnaceae*). So nežne, prosto plavajoče ali potopljene zeli, niso zakoreninjene. Steblo je preobraženo v sploščene stebelne člene, ki spominjajo na liste, ti pa so popolnoma zakrneli. Posamezni stebelni člen ima eno ali več enostavnih kratkih korenin. Cvetov v naših podnebnih razmerah ne razvije. Cvetovi so enodomni, brez cvetnega odevala, po trije skupaj, v vdolbinici na stebelnem členku. Imajo en prašnik in eno plodnico. V družini so trije rodovi: vodna lečica (*Wolffia*), žabja leča (*Spirodela*), in vodna leča (*Lemna*). Za slednjo so značilni široko eliptični členki, ki so na spodnji strani zelene barve. Rastev vodnih jarkih, ribnikih in mlakah. Prisotna je tudi med rastlinjem na bregovih tekočih voda. Razširjena je v nižinah in redka v montanskem pasu (Jogan, N., 2007).



Slika 1: Mala vodna leča (*Lemna minor*)

Vodne rastline so pomemben producent kisika, pomemben člen v kroženju nutrientov, stabilizirajo sediment, akumulirajo težke kovine iz vode ter zagotavljajo pomemben prostor mnogim živalim. V preteklosti so ljudje verjeli, da so vodne rastline manj občutljive na spremembe v okolju, a pokazalo se je nasprotno. Alge veljajo za bolj občutljive kot makrofite in živali. Med makrofite sodi tudi *L. minor* (Lewis, 1995), ki se pogosto uporablja v ekotoksikoloških in ekoloških raziskavah (Balen in sod., 2011, Razinger in sod., 2007 in 2008, Hou in sod., 2007, Panda in Upadhyay, 2003). K njeni

pogosti uporabi v raziskovalne namene pripomorejo njene lastnosti. Je majhna, preprosta za gojenje v laboratorijskih pogojih, njena reprodukcija je hitra, sposobna je akumulacije težkih kovin (Lewis, 1995).

Med drugim se vodno lečo uporablja za sedemdnevni test inhibicije rasti (Moser in Pattard, 2009, Lewis, 1995), ki temelji na vplivu onesnaževalcev na rast in razvoj leče. Je standardiziran biološki test (biotest ISO/CD 20079), s katerim hitro in natančno zaznavamo vplive različnih snovi na žive organizme. Rastline male vodne leče izpostavimo določenim dejavnikom in merimo različne parametre rasti, kot so: število členkov na določenem območju, suha ali sveža masa, sestavi fotosinteznih barvil, fluorescenca klorofila a. Rastline pred začetkom testa uspevajo v enotnih pogojih, ob začetku poskusa pa izberemo zdrave, zelene rastline. Poskus traja sedem dni in se smatra za veljavnega, če je stopnja rasti v kontroli 0,275/dan (ISO, 2001, Moser in Pattard, 2009).

Poleg standardiziranega sedemdnevnega testa poznamo še druge teste, s katerimi ugotavljamo neoporečnost vode. Različne teste so razvili, saj je neoporečna voda za ljudi bistvenega pomena. Ni dovolj, da so ravni spojin anorganskega in organskega izvora v omejenih koncentracijah, pomembno je tudi, da na živa bitja ne učinkujejo negativno. Tega brez strupenostnih testov ne bi mogli vedeti. Biotesti so pri preiskavi kakovosti voda cenejši kot fizikalno – kemijske analize, pomemben parameter pri prikazu kakovosti vode je biološki učinek (Marinšek Logar in sod., 2006).

Marinšek Logar in sodelavci (2006) so preizkusili več toksikoloških in genotoksikoloških metod. Metode, ki so jih uporabili, so sledeče:

- Test strupenosti z zelenimi algami *Scenedesmus subspicatus*. Spremljali so rast alg in zakasnjeno luminiscenco po 72 urnem testu.
- Test strupenosti z vodno lečo *Lemna minor*. Po 48 urah so izmerili zakasnjeno luminiscenco in jo primerjali z začetno vrednostjo, po sedmih dneh pa so prešteli zelene členke in število primerjali s kontrolo.
- Test strupenosti z vodnimi bolhami *Daphnia magna*. V 21 dneh opazovanja so ugotavljali preživetje odraslih samic ter njihovo razmnoževanje.
- Testiranje citotoksičnosti s celicami Hep G2 in *Tetrahymena thermophila*.
- Testiranje genotoksičnega potenciala s tremi testi za genotoksičnost:
 - o Ames test z bakterijo *Salmonella typhimurium* (ugotavljanje obsežnosti pojava mutacij v bakterijah, ki jih izpostavimo mutageni snovi),
 - o Zimmermanov test s kvasovko *Saccharomyces cerevisiae*,
 - o Kometni test s praživaljo *Tetrahymena thermophila* ter s celično kulturo človeških jetrnih in črevesnih epitelnih celic.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 RASTLINSKI MATERIAL IN RASTNE RAZMERE

Eksperimentalni del diplomske naloge je bil izveden v laboratorijih Katedre za botaniko in fiziologijo rastlin Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete UL. Rastline male vodne leče (*Lemna minor*) smo nabrali v Botaničnem vrtu Univerze v Ljubljani in za nadaljnje gojenje izbrali take z zdravimi zelenimi členki, brez nekroz. Rastline smo najprej sterilizirali z namakanjem v 0,01 M NaOCl za 30 sekund in jih dobro sprali z destilirano vodo. Sterilizirane rastline smo prenesli v modificirano Steinbergovo hranilno gojišče z naslednjo sestavo makro in mikroelementov:

Preglednica 1: Sestava Steinbergovega gojišča (ISO/CD 20079)

Založna raztopina	Makroelementi	mg/l
1	KNO ₃	350,00
3	Ca(NO ₃) ₂ X 4H ₂ O	295,00
1	KH ₂ PO ₄	90,00
1	K ₂ HPO ₄	12,60
2	MgSO ₄ * 7H ₂ O	100,00
	Mikroelementi	µg/l
4	H ₃ BO ₃	120,00
4	ZnSO ₄ * 7H ₂ O	180,00
4	Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	44,00
4	MnCl ₂ * 4H ₂ O	180,00
5	FeCl ₃ * 6H ₂ O	760,00
6	EDTA	1500,00

Založne raztopine 1, 2 in 3 smo pripravili po 1000 ml, raztopine 4, 5 in 6 pa po 100 ml. Vse založne raztopine razen 5 in 6 smo avtoklavirali. Hranili smo jih v hladilniku pri 4 °C.

Za pripravo hranilnega gojišča smo uporabili po 20 ml založnih raztopin 1, 2 in 3 in po 3 ml založnih raztopin 4, 5 in 6. Te sestavine smo dali v litrsko stekleno posodo, v katero smo nato dolili destilirano vodo do končnega volumna 1000 ml. Pred uporabo smo hranilnemu gojišču uravnali pH na vrednost 5,6. Hranilno gojišče smo pripravili sveže tik pred uporabo.

Rastline so rasle v rastni komori pod nadzorovanimi pogoji pri temperaturi 25 ± 1 °C, osvetlitvi s hladno belo fluorescentno svetlobo 160 µM m⁻²s⁻¹ in fotoperiodi 18h svetlobe / 8h teme. Rastline smo prenesli v sveže gojišče vsakih sedem dni.

3.2 STANDARDNI TEST INHIBICIJE RASTI ISO/CD 20079 (2001)

Test ISO/CD 20079 je zasnovan za merjenje rasti male vodne leče v gojišču, ki vsebuje različne potencialno škodljive snovi. V primeru naše raziskave smo preučevali vpliv delcev titanovega dioksida (TiO₂) in bakrovega oksida (CuO) v nano in makro obliki. Malo vodno lečo smo gojili sedem dni v hranilnem gojišču z dodanimi različnimi koncentracijami delcev, in sicer 0,1, 1, 10, 100 in 1000 μM TiO₂ oz. CuO. Po dveh, štirih in sedmih dneh izpostavitve smo ocenili rast in stanje rastlin. Prešteli smo število členkov in število kolonij, izmerili smo dolžino členkov in dolžino najdaljše korenine, ocenili smo barvo členkov, pojavljanje kloroz, nekroz in alg.

Vsako koncentracijo delcev v gojišču smo pripravili v treh paralelkah (biološke ponovitve A, B, C). Kot negativno kontrolo smo uporabili hranilno gojišče brez delcev TiO₂ in CuO.

V 200 ml steklene posodice smo nalili po 162 ml hranilnega gojišča. Lečo smo prenesli v posodice, preden smo vanje dodali TiO₂ ali CuO in tako zagotovili, da so bile vse rastline približno istočasno izpostavljene stresu. Iz založne kulture smo v vsako izmed posodic prenesli po eno kolonijo z dvema členkoma. Izbirali smo kolonije v dobrem fiziološkem stanju (barva členkov zelena do temno zelena, dolžina koreninice večja od 10 mm). S tem postopkom smo nadaljevali, dokler nismo imeli v vsaki posodici po 7 kolonij z dvema členkoma. Če bi vsako posodico takoj zapolnili z ustreznim številom členkov, bi v prvih posodicah dobili morfološko boljše členke kot v ostalih.

Na koncu smo dodali še po 18 ml raztopine TiO₂ oziroma CuO ustreznih koncentracij. Kontrolna raztopina je vsebovala le 180 ml hranilnega gojišča.

Posodice smo pokrili s prozornimi plastičnimi petrijevskami premera 9 cm, jih dali na pladnje s črno podlago in jih postavili v rastno komoro. Vsak poskus smo ponovili dvakrat.

3.2.1 Priprava raztopin z delci titanovega dioksida in bakrovega oksida

Rastline so rastle v hranilnem gojišču z 0,1, 1, 10, 100 in 1000 μM TiO₂ oz. CuO v nano oziroma makro obliki.

Vsi nanodelci in makrodelci so bili proizvedeni v Nemčiji, proizvajalec je Aldrich. Čistost makrodelcev TiO₂ je bila 99,8 %, nanodelcev pa 99,7 %. Nanodelci CuO so bili veliki do 50 nm, čistost makrodelcev pa je bila več kot 99 %. Ti so imeli na etiketi opisano sestavo: netopljiva snov v obliki HCl ≤ 0,02 %, žveplo v obliki SO₄ ≤ 0,03 %, N ≤ 0,002 %, Cl ≤ 0,005 %, Ca ≤ 0,01 %, Cd ≤ 0,001 %, Co ≤ 0,001 %, Cr ≤ 0,005 %, Fe ≤ 0,05 %, K ≤ 0,005 %, Mg ≤ 0,01 %, Mn ≤ 0,001 %, Na ≤ 0,05 %, Ni ≤ 0,005 %, Pb ≤ 0,05 %, Zn ≤ 0,005 %.

Najprej smo v hranilnem gojišču pripravili začetno raztopino delcev s koncentracijo 10 mM. V 100 ml erlenmajerico smo natehtali 0,7 g TiO₂ oz. CuO in dodali 70 ml hranilnega gojišča. Z magnetnim mešalom smo poskrbeli, da so se delci čim bolj enakomerno porazdelili. Za izpostavitve vodne leče 1000 µM koncentraciji delcev smo v tri paralelke odpipetirali po 18 ml izhodne 10 mM raztopine. Nato smo preostali izhodni raztopini dodali 54 ml hranilnega gojišča in tako pripravili 10-krat nižjo koncentracijo. Postopek smo nadaljevali za pripravo vseh raztopin z različnimi koncentracijami delcev. Pred prenosom v posodice z lečo smo raztopino dobro premešali.

3.2.2 Štetje in opazovanje členkov

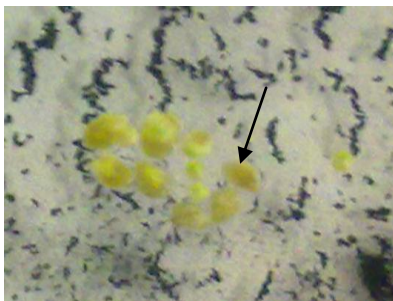
Po nastavitvi poskusa smo opazovali rast in stanje rastlin na 2., 4. in 7. dan po izpostavitvi.

Opazovali smo:

- a) členke (število, dolžino)
- b) kolonije (število kolonij, število členkov na kolonijo)
- c) korenine (prisotnost, dolžina)
- d) barvo členkov
- e) kloroze in nekroze
- f) spremembe v gojišču (prisotnost alg)

Med opazovanjem smo postavili posodice na belo podlago za lažje pregledovanje.

Členke smo prešteli, dolžino smo izmerili z milimetrskim papirjem, ki smo ga približali členu. Število členkov na kolonijo smo izračunali iz števila členkov in števila kolonij. Dolžino korenine smo izmerili tako, da smo kolonijo s pinceto vzeli iz gojišča, korenino pa prislonili na ravnilo. Rastline, ki raste v prisotnosti CuO so imele krhke korenine, zato smo njihovo dolžino ocenili kar v gojišču.



Slika 2: Primer členkov z nekrozami

Slikana je leča na sedmi dan izpostavljenosti koncentraciji 1000 µM makrodelcev CuO. Nekrotičen členek je označen s puščico.

3.3 MERJENJE POTENCIALNE FOTOKEMIČNE UČINKOVITOSTI

V rastlinah male vodne leče smo z modulacijskim fluorometrom izmerili potencialno fotokemično učinkovitost. Pri rastlinah, ki so bile izpostavljene TiO₂, smo meritve opravili po 14 dneh z aparatom tipa PAM 2100 (proizvajalec Walz, Nemčija), pri CuO pa po 7 dneh z aparatom tipa OS-500 (Opti-.Sciences, Tyngsboro, MA, ZDA).

Filter papir smo razrezali v krogce s premerom do 1 cm. Ko smo popisali stanje leče, smo iz posamezne posodice previdno s pinceto prenesli toliko členkov leče, da smo z njimi pokrili površino filter papirja ter jih vstavili v ščipalke za temotno adaptacijo. Po 15 minutah smo ščipalko osvetlili s saturacijskim impulzom bele svetlobe ($\gg 8000 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 0,8 s) ter odčitali vrednost potencialne fotokemične učinkovitosti (F_v/F_m). Je razmerje med razliko v fluorescenci klorofola a in b ter obsegom redukcije kinona A. Preden smo izmerili vrednost, smo se prepričali, da je dejanska fotokemična učinkovitost (Y) med vrednostma 200 in 300. Če smo imeli na voljo dovolj rastlinskega materiala, smo meritve ponovili.



Slika 3: Modulacijski fluorometer PAM 2100

3.4 MERJENJE ENCIMSKE AKTIVNOSTI

Po merjenju potencialne fotokemične učinkovitosti smo vse rastline iz posamezne posodice prenesli na papirnato brisačo, jih osušili, zavili v Al-folijo, označili in zamrznili v tekočem dušiku. Vsako biološko ponovitev (paralelko) smo shranili posebej. Vzorce smo hranili pri temperaturi -80 °C.

Pred začetkom obdelave rastlinskega materiala smo vzorce natehtali, strli in pripravili za nadaljnje delo. Za merjenje encimske aktivnosti smo potrebovali 100 mg sveže teže. Kjer je bila masa vzorca premajhna, smo združili tri paralelke iste koncentracije, da smo dobili dovolj veliko maso. V primeru, da je bilo vzorca še vedno premalo, smo v nadaljevanju ustrezno zmanjšali volumen ekstrakcijskega pufra. Rastlinski material smo strli v hladni

terilnici in dodali 1,5 ml 100 mM kalij fosfatnega pufru (pH 7) za ekstrakcijo proteinov. Homogeniziran vzorec smo prelili v epico in ga takoj postavili na led. Vzorce smo centrifugirali 10 minut pri 14000 obratih in pri temperaturi 4 °C. Supernatant smo odpipetirali v nove, primerno označene epice, jih hranili na ledu in še isti dan opravili spektrofotometrične meritve encimske aktivnosti. Celotno ponovitev poskusa smo izmerili v enem dnevu.

3.4.1 Priprava založnih raztopin

Za ekstrakcijo proteinov smo uporabili 100 mM kalij fosfatni pufer (KP pufer), ki smo ga pripravili iz 100 mM raztopine KH₂PO₄ in 100 mM raztopine K₂HPO₄. Založne in delovne raztopine smo pripravili na naslednji način:

100 mM K₂HPO₄ = 8,71 g K₂HPO₄ + 500 ml dH₂O

100 mM KH₂PO₄ = 6,805 g KH₂PO₄ + 500 ml dH₂O

100 mM KP pufer (pH 7) = 61,5 ml raztopine 100 mM K₂HPO₄ + 38,5 ml raztopine 100 mM KH₂PO₄

Za nadaljnje encimske teste smo večinoma uporabljali 50 mM KP pufer (pH 7), ki smo ga pripravili iz 100 mM KP pufru in ga razredčili z destilirano vodo v razmerju 1:1.

100 mM KP pufer (pH 7,6) smo pripravili iz 86,6 ml raztopine 100 mM K₂HPO₄ in 13,4 ml raztopine 100 mM KH₂PO₄.

Vse raztopine in pufre smo avtoklavirali in hranili v hladilniku pri 4 °C.

3.4.2 Vsebnost proteinov v vzorcih

Koncentracijo proteinov v vzorcu smo določili s kompletom za določanje koncentracije proteinov BCA (BCA Protein Assay Kit, Pierce, ZDA) po naslednjem postopku.

Za pripravo umeritvene krivulje smo uporabili albumin govejega seruma v koncentracijah 0, 0,5, 1, 1,5 in 2 mg/ml, vsako v treh ponovitvah. V razmerju 1:50 smo zamešali reagenta A in B iz kompleta BCA. V epice smo odpipetirali po 1 ml reagenta AB in dodali 50 µl albumina govejega seruma ustrezne koncentracije, razredčenega z ekstrakcijskim 100 mM KP pufrom. Pripravljene raztopine smo inkubirali 30 min pri 37 °C v termostabilni vodni kopeli. Po zaključeni inkubaciji smo vzorce ohladili na sobno temperaturo, jih prelili v kivete PVC (Brand) in s spektrofotometrom (znamke Shimadzu, Japonska) pri valovni dolžini 562 nm izmerili njihovo absorpcijo. Iz teh meritev smo oblikovali umeritveno krivuljo, ki smo jo uporabili za preračunavanje koncentracije proteinov v vzorcih male

vodne leče. Vsebnost proteinov v rastlinskih vzorcih smo izmerili po enakem postopku kot standardne vzorce.

3.4.3 Encimska aktivnost antioksidativnih encimov

V nalogi smo izmerili encimsko aktivnost štirih antioksidativnih encimov: katalaze, guaiakol in askorbat peroksidaze ter glutation reduktaze. Aktivnost smo izmerili v istih vzorcih, v katerih smo izmerili tudi koncentracijo proteinov. Iz obeh dobljenih podatkov smo izračunali specifično encimsko aktivnost:

specifična encimska aktivnost (SEA) = encimska aktivnost / koncentracija proteinov

Za potek encimske reakcije smo pripravili reagenčno mešanico, ki je vsebovala pufer in substrat za encim. Reagenčni mešanici smo tik pred spektrofotometrično meritvijo v ustreznem razmerju dodali rastlinski vzorec in tako dobili testno mešanico, kateri smo izmerili spremembo absorpcije v času ene minute. Reagenčno mešanico smo pripravili svežo tik pred uporabo.

3.4.3.1 Merjenje encimske aktivnosti katalaze (CAT, EC 1.11.1.6)

Encimsko aktivnost (EA) katalaze smo določili spektrofotometrično z merjenjem porabe H₂O₂ pri 240 nm. Uporabili smo kvarčne ali PVC kivete (Brand), ki prepuščajo UV svetlobo. Reagenčne raztopine, ki smo jih uporabili, smo ogreli na sobno temperaturo.

a) Reagenčna raztopina za merjenje EA CAT

40 ml 50 mM KP pufera (pH 7,0) in 31,2 µl 30 % H₂O₂

Raztopino smo dobro premešali. Ker je vodikov peroksid občutljiv na svetlobo, smo stekleničko z raztopino zavili v Al-folijo.

b) Testna raztopina

V kiveto, ki prepušča sevanje UV pri 240 nm, smo odpipetirali 950 µl reagenčne raztopine in 50 µl vzorca. Raztopino smo dobro premešali in izmerili spremembo absorpcije.

c) Postopek meritev

EA smo merili s programom UV probe eno minuto in s 5 sekundnim intervalom odčitavanja absorpcije. Iz dobljenih podatkov smo izračunali encimsko aktivnost CAT po formuli 1.

d) Izračun encimske aktivnosti

$$\text{---} \qquad \qquad \qquad \dots(2)$$

ΔA = sprememba absorpcije

l = debelina kivete = 1 cm

ϵ = ekstincijski koeficient H₂O₂ pri 240 nm = 40/mM*cm

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

Encimsko aktivnost (EA) askorbat peroksidaze smo določili spektrofotometrično z merjenjem porabe oksidacije askorbata pri 290 nm. Uporabili smo UV-PVC kivete (Brand). Reagenčne raztopine, ki smo jih uporabili, smo ogreli na sobno temperaturo.

a) Priprava reagenčne raztopine za merjenje EA A-POD

Raztopino smo pripravljali svežo. Najprej smo pripravili 0,5 ml 5 mM askorbata iz 0,0099 g natrijevega askorbata in 10 ml dH₂O.

Nato smo zmešali reagenčno raztopino:

39,6 ml 50 mM KP pufru s pH 7,0 + 31,2 μ l 30 % H₂O₂ + 0,4 ml 5 mM askorbata

Raztopino smo dobro premešali. Ker sta vodikov peroksid in askorbat občutljiva na svetlobo, smo stekleničko z raztopino zavili v Al-folijo.

b) Testna raztopina

V kiveto, ki prepušča sevanje UV pri 290 nm, smo odpipetirali 950 μ l pufru in 50 μ l vzorca. Po mešanju smo izmerili spremembo absorpcije.

c) Postopek meritev

EA smo merili s programom UV probe eno minuto in s 5 sekundnim intervalom odčitavanja absorpcije. Iz dobljenih podatkov smo izračunali encimsko aktivnost A-POD po formuli 2, kjer je ekstincijski koeficient askorbata pri 290 nm $\epsilon = 2,8/\text{mM}\cdot\text{cm}$.

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

EA G-POD smo določili spektrofotometrično z merjenjem naraščanja absorpcije pri 470 nm, kot posledice polimerizacije guaiakola v tetraguaiakol. Uporabili smo PVC kivete (Brand), ki prepuščajo vidni spekter svetlobe. Reagenčne raztopine, ki smo jih uporabljali, smo ogreli na sobno temperaturo.

a) Priprava reagenčne raztopine za merjenje EA G-POD

39,6 ml 50 mM KP pufra s pH 7,0 + 31,2 μ l 30 % H₂O₂ + 0,4 ml guaiakola

Raztopino smo dobro premešali. Ker je vodikov peroksid občutljiv na svetlobo, smo stekleničko z reagenčno raztopino zavili v Al-folijo.

b) Testna raztopina

V kiveto, ki prepušča sevanje pri 470 nm, smo odpipetirali 950 μ l pufra in 50 μ l vzorca. Po mešanju smo izmerili spremembo absorpcije.

c) Postopek meritev

EA smo merili s programom UV probe eno minuto in s 5 sekundnim intervalom odčitavanja absorpcije. Iz dobljenih podatkov smo izračunali encimsko aktivnost G-POD po formuli 2, kjer je ekstincijski koeficient tetraguaiakola pri 470 nm $\epsilon = 26,6/\text{mM}\cdot\text{cm}$.

3.4.3.4 Merjenje encimske aktivnosti glutation reduktaze (GR, EC 1.6.4.2)

EA GR smo določili spektrofotometrično z merjenjem naraščanja absorpcije pri 412 nm, kot posledico redukcije DTNB (5,5-dithio-bis (2- nitrobenzojska kislina)) v TNB (2-nitro-5-thiobenzojsko kislino). Uporabili smo PVC kivete (Brand), ki prepuščajo vidni del spektra svetlobe.

a) Priprava reagenčne raztopine za merjenje EA GR

Raztopino smo pripravljali svežo.

40 ml 100 mM KP pufra s pH 7,6
+ 0,006 g NADPH
0,0756 g Na-EDTA
0,240 g DTNB

Raztopino smo dobro premešali. Steklениčko z reagenčno raztopino smo zavili v Al-folijo.

b) Testna raztopina

V kiveto, ki prepušča sevanje pri 412 nm, smo odpipetirali raztopine po sledečem vrstnem redu:

1. 850 μ l pufra
2. 50 μ l že pripravljenega 20 mM GSSG (oksidirani glutation). Hranili smo ga v zamrzovalniku na -20 °C.
3. 100 μ l vzorca

c) Postopek meritev

EA smo merili s programom UV probe eno minuto in s 5 sekundnim intervalom odčitavanja absorpcije. Iz dobljenih podatkov smo izračunali encimsko aktivnost GR po formuli 2, kjer je ekstincijski koeficient TNB pri 412 nm $\epsilon = 13,6/\text{mM}\cdot\text{cm}$.

4 REZULTATI

4.1 TEST INHIBICIJE RASTI (ISO/CD 20079)

Malo vodno lečo (*Lemna minor*) smo izpostavili različnim koncentracijam TiO₂ oz. CuO v nano in makro obliki. Vsak poskus je trajal 7 dni in smo ga neodvisno ponovili dvakrat.

4.1.1 Vpliv nanodelcev TiO₂ na rast male vodne leče

Iz tabele 2 lahko razberemo, da nobena koncentracija nanodelcev TiO₂ v gojišču ni bila tako toksična, da bi povzročila 50 odstotno inhibicijo rasti (EC₅₀) male vodne leče. Na začetku poskusa so kolonije vsebovale 14 členkov. Njihovo število se je povečevalo neodvisno od koncentracije. Pri koncentraciji 100 μM nanodelcev TiO₂ v gojišču smo opazili 7,16-kratno povečanje števila členkov. Prav tako se je tekom poskusa povečalo število kolonij, povečevanje števila členkov na kolonijo pa je bilo prav tako kot število členkov, neodvisno od koncentracije nanodelcev TiO₂ v gojišču. Enakomerno se je podaljševala dolžina najdaljše korenine v koloniji.

Tabela 3 prikazuje stanje členkov vodne leče tekom trajanja poskusa. Iz nje lahko razberemo, da se je po sedmih dneh delež zelenih in temno zelenih členkov pri koncentraciji 1000 μM v gojišču zmanjšal, povečal pa se je delež rumenih in rumeno zelenih členkov. Delež kloroz in nekroz se je spreminjal, vendar nismo opazili doznega ali časovnega odgovora.

Količina zelenih alg se je povečevala tekom trajanja poskusa. Ocenili smo, da je bila količina alg v kontrolni posodici večja kot pri najvišji koncentraciji nanodelcev titanovega dioksida v gojišču.

Preglednica 2: Rast male vodne leče (*L. minor*) med sedemdnevnim standardnim testom inhibicije rasti pri različnih koncentracijah nanodelcev TiO₂

Vrednosti predstavljajo povprečje dveh neodvisnih poskusov (N=2) s tremi biološkimi ponovitvami za vsak poskus (tabele posameznih poskusov so v prilogi, prav tako tabele s standardnimi napakami).

Konc. nano TiO ₂ [μM]	Število členkov	Dolžina členkov [mm]	Število kolonij	Število členkov na kolonijo	Dolžina najdaljše korenine [mm]
2. dan					
0	23,67	2,54	7,50	3,17	22,87
0,1	23,67	2,72	7,33	3,24	21,87
1	24,67	2,56	7,67	3,23	19,02
10	22,83	2,60	7,50	3,06	23,11
100	23,33	2,75	7,17	3,26	22,35
1000	23,83	2,67	7,83	3,07	20,37
4. dan					
0	42,83	2,72	7,83	5,58	25,87
0,1	44,17	2,74	7,50	5,93	25,41
1	40,83	2,61	7,83	5,23	24,57
10	40,33	2,71	8,00	5,19	26,41
100	37,17	2,70	7,17	5,21	25,76
1000	36,67	2,90	7,83	4,79	25,17
7. dan					
0	91,33	3,02	18,00	6,30	29,20
0,1	98,17	2,86	16,67	7,37	31,42
1	99,33	2,82	16,17	7,07	30,28
10	97,83	2,88	16,83	6,64	30,80
100	100,17	2,91	23,67	4,65	28,43
1000	91,67	2,91	18,67	6,85	29,06

Preglednica 3: Stanje členkov male vodne leče (*L. minor*) in prisotnost alg med sedemdnevni standardnim testom inhibicije rasti pri različnih koncentracijah nanodelcev TiO₂

Vrednosti predstavljajo povprečje dveh neodvisnih poskusov (N=2) s tremi biološkimi ponovitvami za vsak poskus (tabele posameznih poskusov so v prilogi, prav tako tabele s standardnimi napakami)

Konc. nano TiO ₂ [μM]	Barva členkov [%]					Kloroze [%]	Nekroze [%]	Alge
	Temno zelena	Zelena	Rumeno zelena	Rumena	Bela			
2. dan								
0	69,52	30,48	0,00	0,00	0,00	2,81	1,45	0,00
0,1	60,27	36,34	2,78	0,62	0,00	4,41	1,52	0,00
1	53,35	42,53	4,12	0,00	0,00	4,73	0,72	0,00
10	52,61	39,38	8,00	0,00	0,00	2,24	0,72	0,00
100	50,09	46,41	3,50	0,00	0,00	2,19	0,00	0,00
1000	38,75	51,65	8,28	1,32	0,00	2,93	0,00	0,00
4. dan								
0	46,47	37,88	10,18	5,47	0,00	2,41	2,57	1,48
0,1	48,96	31,50	8,80	10,74	0,00	2,63	0,81	1,33
1	46,24	32,21	12,81	8,73	0,00	4,61	2,09	1,17
10	45,41	33,79	13,68	7,12	0,00	9,18	4,60	1,08
100	51,12	32,00	10,14	6,74	0,00	1,75	2,79	0,83
1000	44,90	34,69	13,47	6,94	0,00	4,02	2,41	0,58
7. dan								
0	47,06	28,24	18,65	5,09	0,95	0,00	0,00	2,08
0,1	29,53	28,43	30,78	9,42	1,84	0,74	0,00	2,00
1	25,57	24,35	41,53	8,55	0,00	0,76	0,23	2,00
10	32,60	22,67	34,95	9,77	0,00	1,00	4,06	1,50
100	30,33	33,55	27,84	8,28	0,00	1,63	2,67	1,50
1000	28,14	39,22	21,70	10,94	0,00	2,42	1,81	1,25

Prisotnost alg: 0 – ni alg; 1 – malo; 2 – srednje; 3 – veliko. Vrednosti v tabeli se razlikujejo od opisanih vrednosti, saj je izračunano povprečje šestih paralelk (po 3 iz vsake ponovitve).

4.1.2 Vpliv makrodelcev TiO₂ na rast male vodne leče

Iz tabele 4 lahko razberemo, da v našem poskusu nobena koncentracija v gojišču ni bila tako toksična, da bi povzročila 50 odstotno inhibicijo rasti (EC₅₀). Koncentracija 100 µM TiO₂ v gojišču je imela po sedmih dneh 41 % inhibicijo rasti v primerjavi s kontrolo. Na začetku poskusa so kolonije vsebovale 14 členkov. Po sedmih dneh trajanja poskusa smo pri koncentraciji 100 µM v gojišču opazili za 35 % manj členkov kot v kontroli. Tudi število kolonij je bilo pri koncentraciji 1000 µM makrodelcev TiO₂ v gojišču manjše za 47,38 % v primerjavi s kontrolo. Dolžina členkov se ni spreminjala, število členkov na kolonijo pa je bilo pri koncentraciji 1000 µM makrodelcev TiO₂ v gojišču za 20 % višje v kot pri kontroli.

V tabeli 5 vidimo, da so bili členki na sedmi dan poskusa pri višjih koncentracijah titanovega dioksida v gojišču svetlejših barv kot v kontrolnih pogojih. Kloroze in nekroze so se pojavljale neodvisno od koncentracije TiO₂ v gojišču in trajanja izpostavljenosti delcem. Kot je razvidno iz tabele, je bila rast alg manjša v gojišču z dodanimi delci TiO₂.

Preglednica 4: Rast male vodne leče (*L. minor*) med sedemdnevnim standardnim testom inhibicije rasti pri različnih koncentracijah makrodelcev TiO₂

Vrednosti predstavljajo povprečje dveh neodvisnih poskusov (N=2) s tremi biološkimi ponovitvami za vsak poskus (tabele posameznih poskusov so v prilogi, prav tako tabele s standardnimi napakami).

Konc. TiO ₂ [μM]	Število členkov	Dolžina členkov [mm]	Število kolonij	Število členkov na kolonijo	Dolžina najdaljše korenine [mm]
2. dan					
0	28,50	2,48	7,17	3,94	16,96
0,1	26,17	2,55	7,00	3,74	18,47
1	25,00	2,75	7,00	3,57	17,62
10	26,00	2,60	7,17	3,63	15,36
100	24,50	2,61	6,83	3,56	15,60
1000	23,50	2,51	6,83	3,43	15,87
4. dan					
0	62,00	2,72	9,83	6,41	22,20
0,1	56,17	2,74	8,33	6,88	23,05
1	55,67	2,76	7,33	7,63	24,38
10	46,67	2,78	8,17	5,70	22,65
100	42,33	2,66	7,33	5,79	21,90
1000	41,83	2,66	7,00	5,98	24,90
7. dan					
0	90,67	2,98	15,83	5,77	27,49
0,1	85,00	2,95	15,83	5,52	28,47
1	82,50	3,02	12,33	6,70	30,78
10	64,33	2,93	10,17	6,65	28,13
100	53,50	2,90	9,17	5,97	26,15
1000	58,67	2,80	8,33	7,25	31,84

Preglednica 5: Stanje členkov male vodne leče (*L. minor*) in prisotnost alg med sedemdnevnim standardnim testom inhibicije rasti pri različnih koncentracijah makrodelcev TiO₂

Vrednosti predstavljajo povprečje dveh neodvisnih poskusov (N=2) s tremi biološkimi ponovitvami za vsak poskus (tabele posameznih poskusov so v prilogi, prav tako tabele s standardnimi napakami).

Konc. TiO ₂ [μM]	Barva členkov [%]					Kloroze [%]	Nekroze [%]	Alge
	Temno zelena	Zelena	Rumeno zelena	Rumena	Bela			
2. dan								
0	46,94	40,72	12,34	0,00	0,00	12,33	0,00	0,50
0,1	38,75	57,71	3,54	0,00	0,00	8,37	7,35	0,50
1	45,67	54,33	0,00	0,00	0,00	5,10	3,07	0,42
10	34,84	61,48	3,07	0,00	0,62	1,79	0,00	0,17
100	35,35	56,22	6,08	0,57	1,77	13,81	2,32	0,33
1000	34,24	60,71	2,38	1,33	1,33	3,46	4,95	0,17
4. dan								
0	32,59	50,88	16,53	0,00	0,00	1,43	2,82	1,42
0,1	32,68	34,04	31,03	2,24	0,00	4,46	4,10	1,42
1	35,73	20,36	36,43	7,48	0,00	2,30	0,27	0,92
10	29,10	33,97	30,37	6,57	0,00	1,02	0,80	1,08
100	25,54	29,15	23,42	20,90	0,98	5,14	6,69	1,00
1000	34,30	29,86	21,75	14,09	0,00	3,59	3,66	0,75
7. dan								
0	40,25	36,44	21,27	1,89	0,15	0,86	1,75	1,83
0,1	31,46	33,03	29,31	4,63	1,57	6,32	0,49	1,83
1	29,46	25,14	29,86	15,54	0,00	0,18	0,15	1,50
10	30,83	22,99	27,29	18,89	0,00	0,24	1,35	1,50
100	18,50	26,03	44,29	10,83	0,35	7,14	8,13	1,58
1000	24,72	42,04	24,36	8,88	0,00	4,57	1,51	1,50

Prisotnost alg smo opisali kot: 0 – ni alg; 1 – malo; 2 – srednje; 3 – veliko. Vrednosti v tabeli se razlikujejo od opisanih vrednosti, saj je izračunano povprečje šestih paralelk (po 3 iz vsake ponovitve).

4.1.3 Vpliv nanodelcev CuO na rast male vodne leče

Iz tabele 6 lahko razberemo, da je bila EC₅₀ med 0 μ M in 0,1 μ M nano CuO. Pri 0,1 μ M nanodelcev CuO je bila inhibicija rasti leče 56,4 %, pri 1000 μ M nanodelcev CuO v gojišču pa 85 %.

Število členkov, število kolonij in število členkov na kolonijo (rezultati so statistično značilni – priloga D) je po sedmih dneh trajanja poskusa močno upadlo. Tako je bilo pri 1000 μ M nanodelcev CuO v gojišču po sedmih dneh za 85 % manj členkov kot v kontroli, število kolonij pa je bilo manjše za 34 %.

Da so nanodelci CuO zavirali rast rastline, smo opazili tudi iz merjenja najdaljše korenine v koloniji. Korenine so odpadle, rast se je zmanjšala. Korenine so pri koncentraciji 1000 μ M v gojišču dosegale 4 % dolžine korenin v kontrolni posodici.

Členki so hitro začeli rumeneti. V gojišču z dodano koncentracijo 10 μ M nanodelcev CuO na četrti dan opazovanja nismo opazili nobenega temno zelenega članka, pri vseh koncentracijah nanodelcev CuO smo začeli opazovati bele členke. Sedmi dan opazovanja so bili členki v gojišču z najvišjo koncentracijo nanodelcev CuO rumeno zeleni, rumeni in beli. Temno zelenih in zelenih nismo opazili.

Delež kloroz se ni bistveno spreminjal, delež nekroz pa se je večal v odvisnosti od časa in koncentracije nanodelcev CuO. Rezultati so bili statistico značilni (priloga D). Rastline, ki so uspevale v gojišču s koncentracijo 1000 μ M nanodelcev CuO, so imele cel čas trajanja poskusa najvišji delež nekroz. Ta je narasel od drugega do sedmega dne trajanja poskusa iz 25 % na 61 %.

Nanodelci CuO so zavirali rast alg, saj alge pri dodani koncentraciji 10 μ M nano CuO niso uspevale (tabela 7).

Preglednica 6: Rast male vodne leče (*L. minor*) med sedemdnevnim standardnim testom inhibicije rasti pri različnih koncentracijah nanodelcev CuO

Vrednosti predstavljajo povprečje dveh neodvisnih poskusov (N=2) s tremi biološkimi ponovitvami za vsak poskus (tabele posameznih poskusov so v prilogi, prav tako tabele s standardnimi napakami).

Konc. nano CuO [μ M]	Število členkov	Dolžina členkov [mm]	Število kolonij	Število členkov na kolonijo	Dolžina najdaljše korenine [mm]
2. dan					
0	18,17	2,92	7,00	2,60	28,71
0,1	14,33	3,01	7,67	1,84	15,57
1	15,00	2,87	8,50	1,79	9,84
10	13,33	2,91	9,67	1,43	7,10
100	14,67	2,99	11,83	1,27	2,15
1000	12,83	3,03	11,67	1,12	9,41
4. dan					
0	38,17	3,02	7,17	5,33	29,94
0,1	21,17	2,83	9,17	2,25	8,31
1	18,83	2,77	11,00	1,70	2,48
10	15,00	2,85	11,33	1,35	1,67
100	15,50	2,88	12,67	1,27	0,65
1000	13,33	3,02	12,00	1,13	1,29
7. dan					
0	86,33	3,14	17,83	5,05	31,96
0,1	37,67	2,79	14,00	2,57	6,74
1	30,00	2,68	17,00	1,72	1,93
10	19,00	2,73	16,83	1,19	0,36
100	17,00	2,86	13,33	1,31	0,19
1000	13,00	3,02	11,83	1,12	1,29

Preglednica 7: Stanje členkov male vodne leče (*L. minor*) in prisotnost alg med sedemdnevni standardnim testom inhibicije rasti pri različnih koncentracijah nanodelcev CuO

Vrednosti predstavljajo povprečje dveh neodvisnih poskusov (N=2) s tremi biološkimi ponovitvami za vsak poskus (tabele posameznih poskusov so v prilogi, prav tako tabele s standardnimi napakami).

Konc. nano CuO [μ M]	Barva členkov [%]					Kloroze [%]	Nekroze [%]	Alge
	Temno zelena	Zelena	Rumeno zelena	Rumena	Bela			
2. dan								
0	49,29	29,78	16,17	4,76	0,00	8,72	1,11	0,50
0,1	56,37	26,21	11,36	6,06	0,00	17,22	0,00	0,00
1	39,93	36,44	14,24	7,88	1,52	5,38	0,00	0,00
10	31,14	51,92	16,95	0,00	0,00	0,00	3,75	0,00
100	14,08	62,31	16,04	7,58	0,00	0,00	4,04	0,00
1000	18,63	49,89	18,22	13,26	0,00	0,00	25,14	0,00
4. dan								
0	54,99	36,96	7,58	0,00	0,46	5,10	0,48	1,75
0,1	47,66	37,90	0,00	5,56	8,89	7,34	2,22	0,42
1	3,70	37,76	49,66	6,42	2,47	0,00	20,98	0,00
10	0,00	41,99	49,83	0,00	8,18	0,00	18,74	0,00
100	0,00	23,68	57,13	7,58	11,62	0,00	17,42	0,00
1000	0,00	37,65	48,75	13,60	0,00	5,41	26,79	0,00
7. dan								
0	43,25	21,67	25,90	8,36	0,83	1,10	0,28	3,00
0,1	30,25	40,92	20,11	1,59	7,14	0,00	13,01	0,83
1	4,60	41,94	31,47	19,42	2,57	0,52	36,59	0,42
10	0,00	12,69	29,02	53,85	4,45	0,00	57,34	0,00
100	0,00	7,33	43,23	45,57	3,86	0,00	31,07	0,00
1000	0,00	0,00	66,56	29,54	3,91	0,00	61,87	0,00

Prisotnost alg smo opisali kot: 0 – ni alg; 1 – malo; 2 – srednje; 3 – veliko. Vrednosti v tabeli se razlikujejo od opisanih vrednosti, saj je izračunano povprečje šestih paralelek (po 3 iz vsake ponovitve).

4.1.4 Vpliv makrodelcev CuO na rast male vodne leče

Iz tabele 8 lahko razberemo, da je bila EC₅₀ med 0,1 μM in 1 μM CuO. Pri 0,1 μM CuO v gojišču je bila inhibicija rasti 23 %, pri 1 μM CuO pa 55 %. Število členkov in število členkov na kolonijo je po sedmih dneh z večanjem koncentracije CuO v gojišču padlo. Število členkov na kolonijo in število členkov sta bila statistično značilna (priloga D) Pri koncentraciji 1000 μM CuO v gojišču je število členkov po sedmih dneh doseglo 29,4 % števila členkov v kontrolni posodi. Število kolonij po sedmih dneh je do koncentracije 1 μM CuO v gojišču padalo, potem pa se je povečevalo. Pri koncentraciji 1000 μM CuO v gojišču je bilo tako za 15,6 % več kolonij kot v kontroli.

Dolžina korenin pada z večanjem koncentracije CuO v gojišču. Rastline, ki so bile izpostavljene koncentraciji 1000 μM CuO, so imele za 98,9 % krajše korenine kot v kontroli.

Členki so, kot vidimo iz tabele 9, hitro začeli rumeneti. Leča, ki je uspevala v gojišču z dodanimi delci CuO v koncentracijah 100 in 1000 μM, je bila četrty dan poskusa brez temno zelenih členkov. Delež rumenih členkov se je pri teh koncentracijah opazno povečeval, pri koncentraciji 1000 μM CuO v gojišču pa smo opazili povečanje deleža belih členkov. Ta je ob koncu poskusa znašal 7,16 %. Opazno se je povečal tudi delež nekroz, pri koncentraciji 1000 μM CuO v gojišču je znašal 42,46 %. Delež kloroz se med poskusom ni bistveno spreminjal.

CuO je zaviral rast alg. Kot je razvidno iz tabele 9, je koncentracija 100 μM CuO v gojišču popolnoma zavrla rast alg.

Preglednica 8: Rast male vodne leče (*L. minor*) med sedemdnevnim standardnim testom inhibicije rasti pri različnih koncentracijah makrodelcev CuO

Vrednosti predstavljajo povprečje dveh neodvisnih poskusov (N=2) s tremi biološkimi ponovitvami za vsak poskus (tabele posameznih poskusov so v prilogi, prav tako tabele s standardnimi napakami).

Konc. CuO [μM]	Število členkov	Dolžina členkov [mm]	Število kolonij	Število členkov na kolonijo	Dolžina najdaljše korenine [mm]
2. dan					
0	16,17	2,45	7,00	2,31	21,16
0,1	17,17	2,89	7,00	2,45	23,45
1	16,33	2,93	7,00	2,33	16,45
10	15,17	2,83	7,00	2,17	18,26
100	14,50	2,83	8,00	1,82	2,92
1000	12,83	2,91	9,83	1,31	3,46
4. dan					
0	43,33	2,95	8,17	5,36	22,81
0,1	33,00	2,93	8,00	4,22	23,92
1	22,50	2,86	8,33	2,72	13,10
10	19,33	2,71	8,00	2,45	4,33
100	16,00	2,82	9,83	1,65	1,24
1000	14,50	2,71	12,00	1,21	0,35
7. dan					
0	57,17	3,09	11,67	5,14	25,30
0,1	44,17	2,91	9,17	4,70	25,92
1	25,83	2,77	8,83	3,04	14,76
10	23,83	2,69	11,33	2,17	2,11
100	19,17	2,73	12,00	1,61	1,18
1000	16,83	2,72	13,83	1,21	0,28

Preglednica 9: Stanje členkov male vodne leče (*L. minor*) in prisotnost alg med sedemdnevni standardnim testom inhibicije rasti pri različnih koncentracijah makrodelcev CuO

Vrednosti predstavljajo povprečje dveh neodvisnih poskusov (N=2) s tremi biološkimi ponovitvami za vsak poskus (tabele posameznih poskusov so v prilogi, prav tako tabele s standardnimi napakami).

Konc. CuO [μM]	Barva členkov [%]					Kloroze [%]	Nekroze [%]	Alge
	Temno zelena	Zelena	Rumeno zelena	Rumena	Bela			
2. dan								
0	51,09	30,21	18,70	0,00	0,00	5,72	0,00	0,50
0,1	48,32	34,16	16,24	1,28	0,00	2,56	0,00	0,33
1	34,38	34,21	28,52	1,97	0,93	2,12	1,04	0,00
10	38,09	31,66	12,79	16,47	0,98	1,76	3,49	0,08
100	14,83	56,37	25,33	3,47	0,00	2,58	1,19	0,00
1000	24,37	46,65	19,69	8,10	1,19	7,14	3,33	0,00
4. dan								
0	42,73	33,09	23,28	0,00	0,91	1,11	0,00	2,00
0,1	36,10	34,48	28,70	0,73	0,00	0,67	0,56	1,75
1	26,22	35,95	25,57	8,64	3,62	0,79	1,49	1,33
10	20,94	26,40	44,04	1,85	6,76	0,93	4,58	0,25
100	0,00	32,01	61,29	3,03	3,68	0,00	17,28	0,00
1000	0,00	13,14	75,82	8,54	2,50	4,17	7,19	0,00
7. dan								
0	34,05	27,46	20,58	17,91	0,00	1,27	0,00	3,00
0,1	21,63	27,14	35,87	15,37	0,00	4,16	3,46	2,00
1	14,14	26,49	42,31	15,75	1,31	0,00	1,98	1,75
10	16,07	31,26	33,26	14,67	4,75	0,67	5,34	0,58
100	0,00	26,22	66,11	7,68	0,00	0,00	36,75	0,00
1000	0,00	9,90	78,58	4,36	7,16	1,52	42,46	0,00

Prisotnost alg smo opisali kot: 0 – ni alg; 1 – malo; 2 – srednje; 3 – veliko. Vrednosti v tabeli se razlikujejo od opisanih vrednosti, saj je izračunano povprečje šestih paralelek (po 3 iz vsake ponovitve)

4.1.5 Primerjave izbranih parametrov standardnega testa inhibicije rasti (ISO/CD 20079)

Zaradi boljše predstavnosti in pomena različnih dejavnikov rasti, smo v nadaljevanju primerjalno prikazali nekaj najpomembnejših pokazateljev stanja izpostavljenih rastlin male vodne leče.

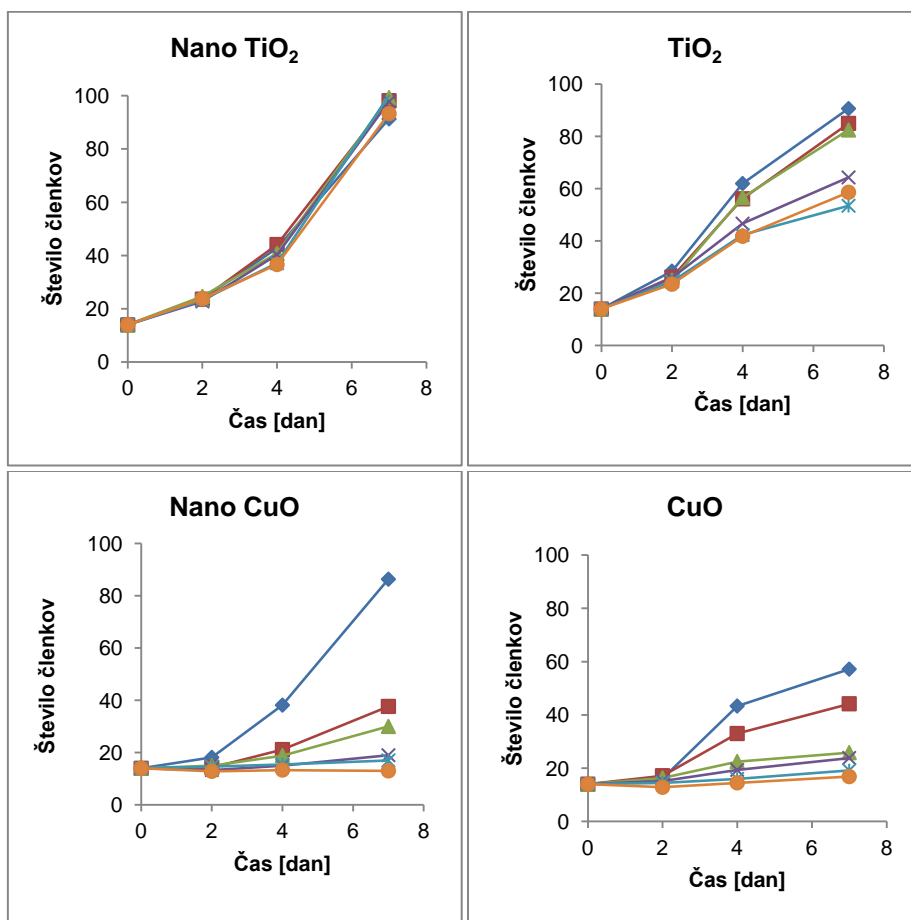
4.1.5.1 Število členkov

Rastline, ki so rastle v kontrolnih razmerah (brez delcev), so imele podobno krivuljo rasti, razen pri izpostavitvi CuO, kjer je bila slabša.

Nanodelci TiO₂ niso vplivali na rast členkov. Do četrtega dne opazovanja so imele rastline, ki so uspevale v mediju s TiO₂ večje število členkov, v nadaljevanju poskusa pa je TiO₂ zmanjšal rast členkov pri koncentracijah, ki so bile višje od 10 µM za okoli 30 %.

Razlike pri CuO v nano in makro obliki so bile manjše. V mediju s koncentracijo 1 µM nano CuO je bilo členkov za 13,9 % več kot pri 1 µM CuO, iz česar lahko sklepamo, da je nano CuO pri tej koncentraciji za rastlino manj škodljiv od CuO. Razlika je bila opazna tudi v kontrolnih pogojih. V poskusu, kjer smo lečo tretirali s CuO, je zraslo 50 % manj členkov kot pri nano obliki.

Primerjava med delci CuO in TiO₂ pokaže, da so delci CuO bolj zavirali rast členkov in da je bila razlika v vplivu večja, če so bili delci v nano obliki CuO (slika 4).



Legenda: ◆=0 μM ; ■=0,1 μM ; ▲=1 μM ; ×=10 μM ; * =100 μM ; ●=1000 μM

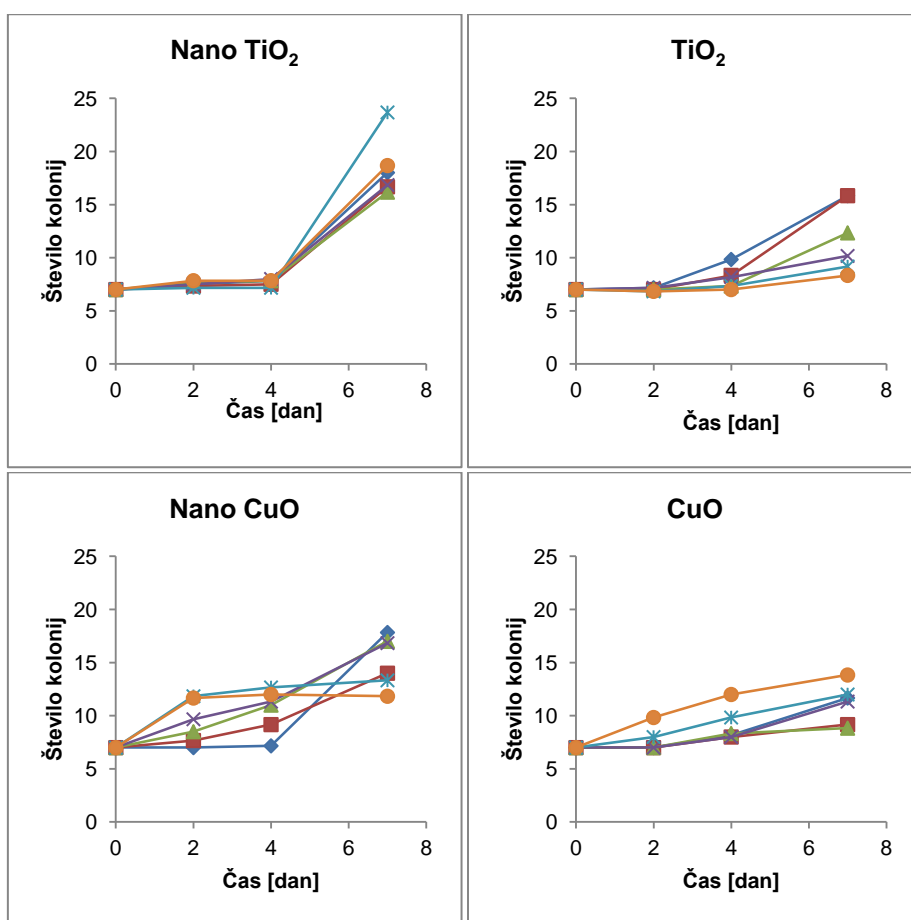
Slika 4: Število členkov male vodne leče (*L. minor*) po izpostavitvi TiO_2 in CuO v nano in makro obliki med sedemdnevnim testom rasti

Prikazane vrednosti so povprečje dveh poskusov (N=2), v vsakem so bile po 3 biološke ponovitve za posamezno koncentracijo.

4.1.5.2 Število kolonij

Iz slike 5 vidimo, da so imele rastline, ki so rastle v gojišču s 1000 μM TiO₂ za 55,38 % manj kolonij kot tiste, ki so rastle v prisotnosti 1000 μM nano TiO₂. Iz tega lahko sklepamo, da je nano oblika delcev TiO₂ manj škodljiva od makro oblike.

Nano CuO je bil bolj strupen kot CuO, kjer so imele rastline, ki so rastle v prisotnosti 1000 μM CuO celo največ kolonij. Sledili sta gojišči s 100 in 0 μM CuO. Pri nano CuO je število kolonij po 7 dneh rasti padalo z večanjem koncentracije delcev.



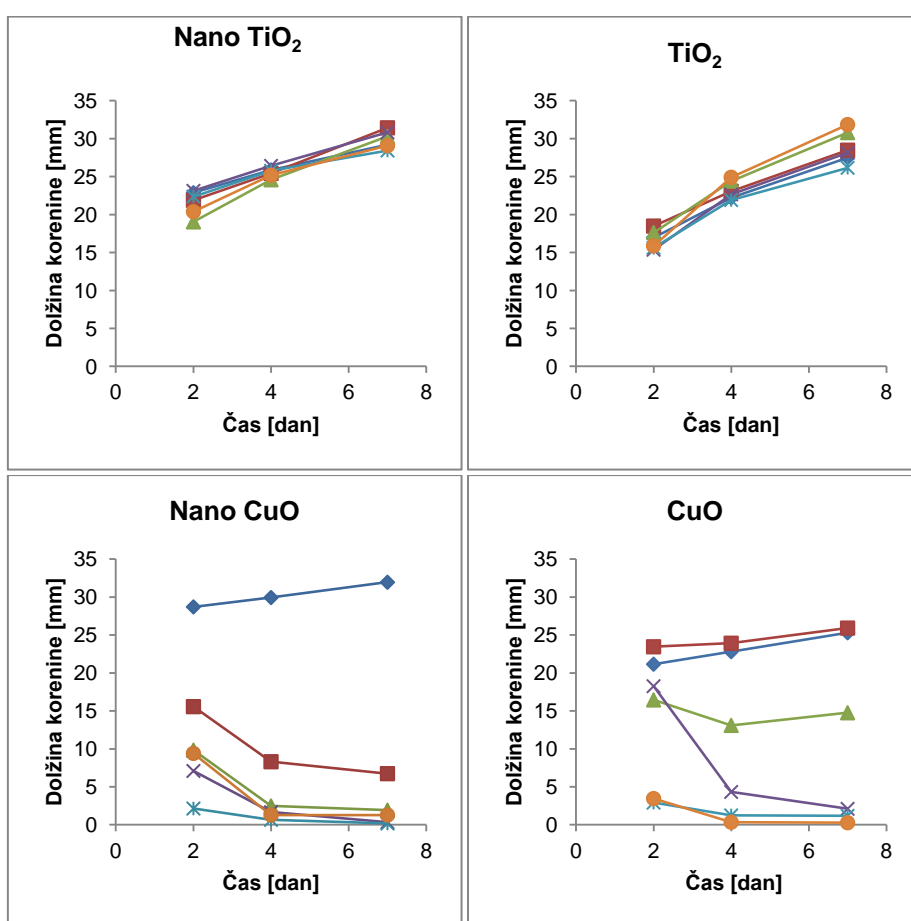
Legenda: ◆=0 μM ; ■=0,1 μM ; ▲=1 μM ; ×=10 μM ; * =100 μM ; ●=1000 μM

Slika 5: Število kolonij male vodne leče (*L. minor*) po izpostavitvi TiO₂ in CuO v nano in makro obliki med sedemdnevnim testom rasti

Prikazane vrednosti so povprečje dveh poskusov (N=2), v vsakem so bile po 3 biološke ponovitve za posamezno koncentracijo.

4.1.5.3 Dolžina najdaljše korenine

Korenine so cel čas poskusa rasle enako, ne glede na prisotnost, koncentracijo in velikost delcev TiO_2 (statistično značilne rezultate smo zasledili pri lečah, izpostavljene makrodelcem TiO_2 ; rezultati so v prilogi D). Po drugi strani pa je CuO je močno zmanjšal rast korenin. Nano oblika delcev je bolj zavrla rast korenin kot makro oblika, obe obliki pa sta povzročili statistično značilne rezultate (priloga D). Manjša dolžina korenin je v največji meri posledica odpadanja in upočasnjene rasti. Že koncentracija $1 \mu\text{M}$ nano CuO je po štirih dneh poskusa povzročila odpadanje korenin in povprečna dolžina je padla pod 5 mm (slika 6).



Legenda: \blacklozenge =0 μM ; \blacksquare =0,1 μM ; \blacktriangle =1 μM ; \times =10 μM ; \ast =100 μM ; \bullet =1000 μM

Slika 6: Dolžina korenine male vodne leče (*L. minor*) po izpostavitvi TiO_2 in CuO v nano in makro obliki med sedemdnevnim testom rasti

Prikazane vrednosti so povprečje dveh poskusov (N=2), v vsakem so bile po 3 biološke ponovitve za posamezno koncentracijo.

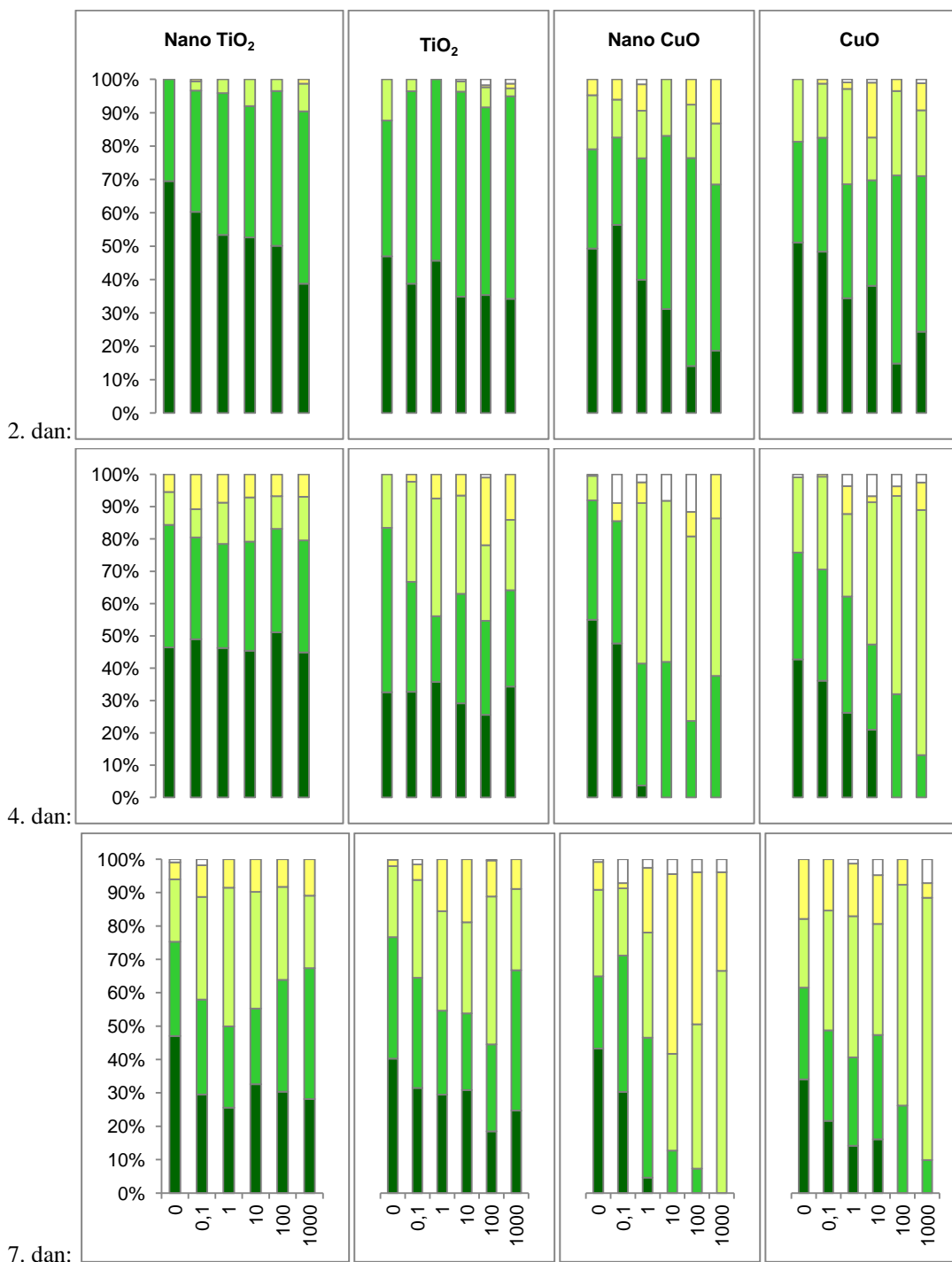
4.1.5.4 Barva členkov

Delež temno zelenih členkov je drugi dan opazovanja rastlin presegel 40 % tako pri rastlinah, ki so rastle v TiO₂, kot pri tistih z dodanim nano TiO₂ v gojišču. Rumeno zelenih členkov je bilo v obeh primerih manj kot 10 %. Rastline, ki so rastle v koncentraciji 100 μM CuO, so imele drugi dan najnižji delež temno zelenih členkov; 10 %. Že drugi dan smo opazili razliko med rastlinami, ki so uspevale v gojišču z dodanim TiO₂ ali CuO. Delež rumeno zelenih členkov je bil namreč pri CuO višji kot pri TiO₂ (slika 7).

Četrty dan opazovanja smo še vedno opazili visok delež temno zelenih členkov pri rastlinah, ki so rasle v prisotnosti TiO₂. Nasprotno pa pri rastlinah, ki so uspevale pri koncentraciji 100 μM CuO, temno zeleni členkov nismo opazili. Zaznali pa smo povečanje deleža rumenih in rumeno zelenih členkov.

Na sedmi dan je bil delež svetlejših členkov pri rastlinah, ki so uspevale v prisotnosti TiO₂ večji kot pri prejšnjih opazovanjih, a še vedno smo pri vseh koncentracijah TiO₂ opazili temno zelene členke rastlin. CuO in nanodelci CuO so na obarvanost rastlin bolj vplivali kot delci TiO₂. Na sedmi dan so bile rastline, ki so uspevale v hranilnem gojišču z dodanimi delci nano CuO v koncentraciji 1000 μM, brez zelenih in temno zelenih členkov. TiO₂ ni deloval tako toksično kot CuO. Rastline, ki so uspevale v gojišču s koncentracijo 1000 μM TiO₂, so imele 10 % zeleno obarvanih členkov.

Iz primerjave lahko sklepamo, da je CuO bolj škodljiv kot TiO₂, saj je povzročil močnejše rumenenje členkov. Negativni učinki na barvi členkov so bili vidni že drugi dan. Po sedmih dneh smo opazili, da je bil CuO v nano obliki bolj toksičen kot v makro obliki.



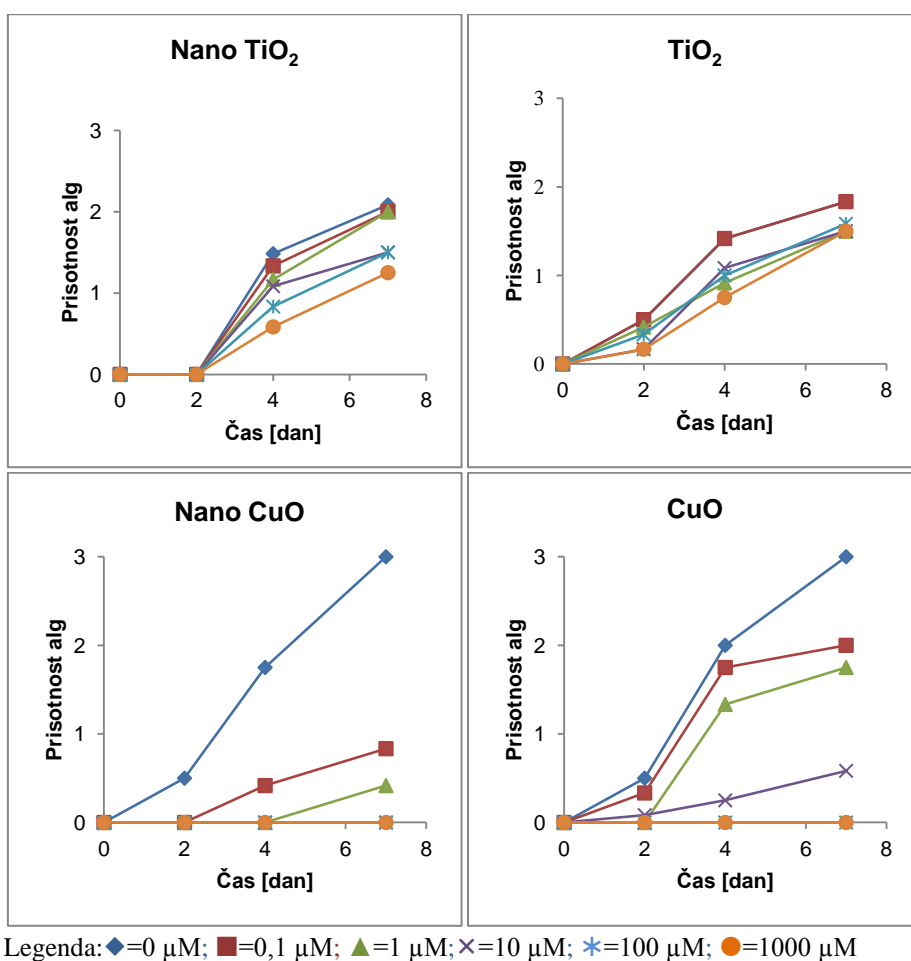
Slika 7: Barva členkov male vodne leče (*L. minor*) po izpostavitvi TiO₂ in CuO v nano in makro obliki med sedemdnevним testom rasti

Prikazane vrednosti so povprečje dveh poskusov (N=2), v vsakem so bile po 3 biološke ponovitve za posamezno koncentracijo.

Na ordinatni osi so deleži različnih barv (temno zelene, zelene, rumeno zelene, rumene in bele); na abscisni osi pa koncentracija delcev [μM].

4.1.5.5 Prisotnost alg v gojišču

Opazili smo, da se alge pri višjih koncentracijah tako CuO v nano kot makro obliki, niso pojavile. Rezultati so bili statistično značilni (priloga D). Pri CuO v nano obliki so bile alge po sedmih dneh prisotne v gojiščih z $0,1 \mu\text{M}$ in $1 \mu\text{M}$ nano CuO . Pri CuO alge po sedmih dneh niso bile prisotne le pri dveh najvišjih koncentracijah. Alge so se pri TiO_2 v nano in makro obliki pojavile in dosegle srednje visoko poraslost gojišča. Nano oblika TiO_2 je nekoliko zmanjšala rast alg, medtem ko so alge rastle v prisotnosti TiO_2 enako kot v kontrolnem gojišču (slika 8).



Legenda: $\blacklozenge=0 \mu\text{M}$; $\blacksquare=0,1 \mu\text{M}$; $\blacktriangle=1 \mu\text{M}$; $\times=10 \mu\text{M}$; $\ast=100 \mu\text{M}$; $\bullet=1000 \mu\text{M}$

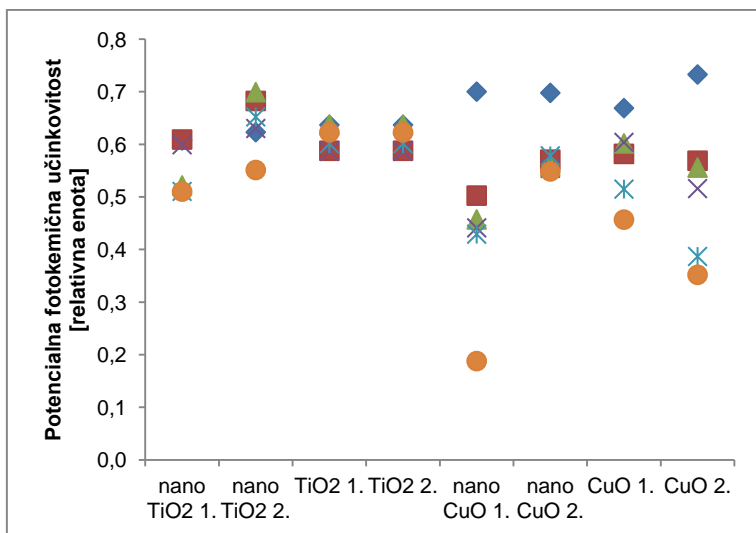
Slika 8: Prisotnost alg v gojišču po izpostavitvi TiO_2 in CuO v nano in makro obliki med sedemdnevnim testom rasti

Prikazane vrednosti so povprečje dveh poskusov ($N=2$), v vsakem so bile po 3 biološke ponovitve za posamezno koncentracijo.

4.2 POTENCIALNA FOTOKEMIČNA UČINKOVITOST

Iz slike 9 je razvidno, da je bila izmerjena vrednost potencialne fotokemične učinkovitosti pri rastlinah, ki so bile izpostavljene različnim koncentracijam TiO₂ v obeh oblikah, približno enaka. Kontrolne rastline so imele najvišje izmerjene vrednosti fotokemične učinkovitosti, medtem ko so imele rastline, izpostavljene koncentraciji 1000 μM nano TiO₂, za 12,31 % nižjo fotokemično učinkovitost od kontrole. V vseh poskusih, narejenih s TiO₂ delci smo izmerili potencialno fotokemično učinkovitost, večjo od 0,5.

Fotokemična učinkovitost, izmerjena pri rastlinah, ki so rasle v prisotnosti nanodelcev CuO, je padala in pri koncentraciji 1000 μM nano CuO so imele rastline v prvem poskusu 47,14 % nižjo fotokemično učinkovitost kot rastline, ki so uspevale v kontrolnih pogojih. To kaže na to, da je nano CuO negativno vplival na fotosintezo rastline. Makrodelci CuO v obeh poskusih za razliko od nano CuO niso tako zmanjšali potencialne fotokemične učinkovitosti, so pa bili statistico značilni (priloga D). Rastline, ki so rasle v gojišču s koncentracijo 1000 μM nano CuO, so imele za 16 % nižjo fotokemično učinkovitost kot rastline, ki niso bile izpostavljene nanodelcem. Leča, ki je v prvem poskusu uspevala v gojišču z nanodelci CuO je imela potencialno fotokemično učinkovitost pod vrednostjo 0,5 že od koncentracije 10 μM, tista, ki je uspevala v gojišču z dodanimi makrodelci CuO pa pri koncentracijah 100 in 1000 μM.



Legenda: ◆=0 μM; ■=0,1 μM; ▲=1 μM; ×=10 μM; *=100 μM; ●=1000 μM

Slika 9: Potencialna fotokemična učinkovitost pri mali vodni leči (*L. minor*) po sedemdnevnem standardnem testu inhibicije rasti pri različnih koncentracijah delcev TiO₂ in CuO

Točke predstavljajo povprečje treh bioloških ponovitev (N=3). Vrednosti posameznih poskusov so v prilogi.

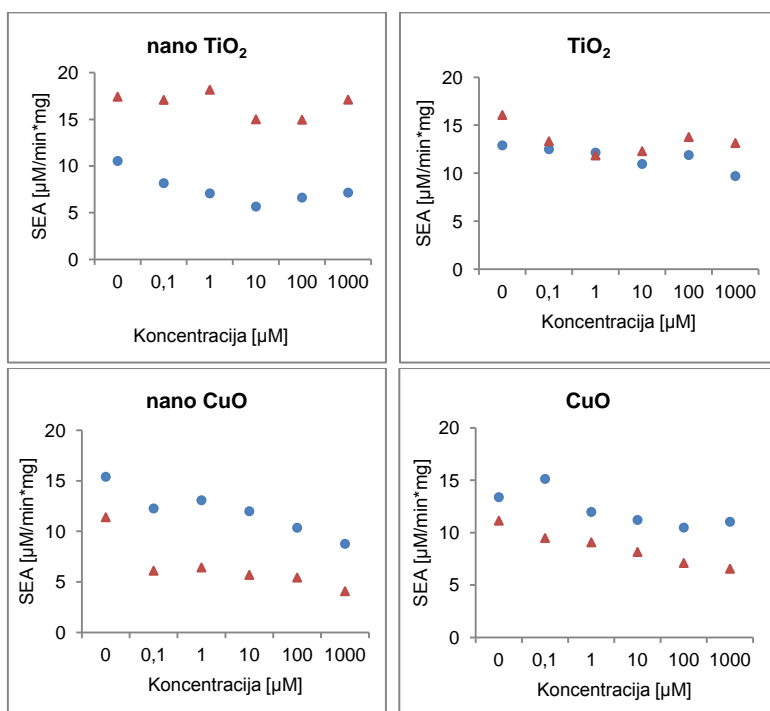
4.3 ANTIOKSIDATIVNI ENCIMI

4.3.1 Katalaza

Encimsko aktivnost katalaze smo spektrofotometrično izmerili z merjenjem porabe H₂O₂ pri 240 nm.

Iz naših opazovanj smo ugotovili, da nano in makrodelci na SEA encima katalaza niso vplivali (slika 10). Opazili smo, da je med ponovitvama poskusa, narejenih z nanodelci TiO₂ večja razlika v SEA kot pri TiO₂, kjer sta vrednosti posamezne ponovitve blizu povprečni vrednosti.

Kot pri delcih TiO₂, je tudi pri delcih CuO vrednost SEA encima CAT padala. Padec SEA je bil še večji in je znašal od 30 % pri 0,1 μM do 50 % pri najvišji, 1000 μM koncentraciji nano CuO.



Legenda: ● = 1. poskus, ▲ = 2. poskus

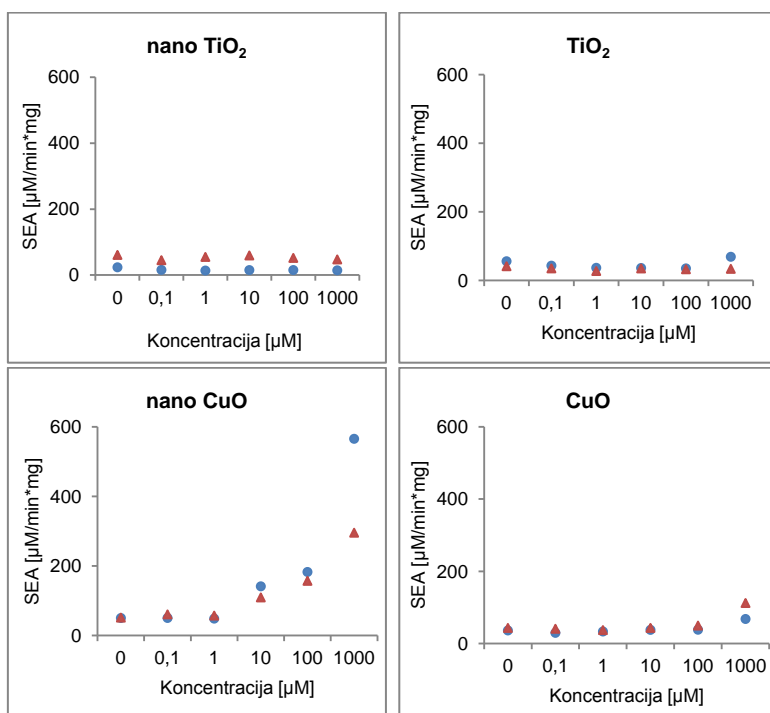
Slika 10: Specifična encimska aktivnost (SEA) katalaze v odvisnosti od koncentracije delcev TiO₂ in CuO v gojišču

Točke predstavljajo rezultate meritev SEA enega poskusa. Vsaka točka predstavlja povprečje treh paralelk (N=3) (tabele posameznih poskusov so v prilogi).

4.3.2 Askorbat peroksidaza

Encimsko aktivnost askorbat peroksidaze (A-POD) smo spektrofotometrično določili z oksidacijo askorbata pri 290 nm.

SEA A-POD vodne leče se zaradi izpostavitve delcem TiO₂ ni spremenila. Delci CuO pa so po drugi strani povišali SEA A-POD rastline. Nanodelci CuO so povišali SEA pri koncentracijah v gojišču, višjih od 10 μM. Pri koncentraciji 1000 μM je povišanje največje, in sicer za 845 % več od kontrole, je pa pri tej koncentraciji nanodelcev CuO največ razlike med prvo in drugo ponovitvijo poskusa. Makrodelci CuO niso povzročili tolikšnega zvišanja SEA. Pri koncentraciji 1000 μM CuO je SEA za 56 % višji od kontrole (slika 11). CuO je povzročil statistično značilno povišanje SEA pri 1000 μM v nano (p = 0,0177) in ne pri makro obliki (p = 0,0442) (priloga D).



Legenda: ● = 1. poskus, ▲ = 2. poskus

Slika 11: Specifična encimska aktivnost (SEA) askorbat peroksidaze v odvisnosti od koncentracije delcev TiO₂ in CuO v gojišču

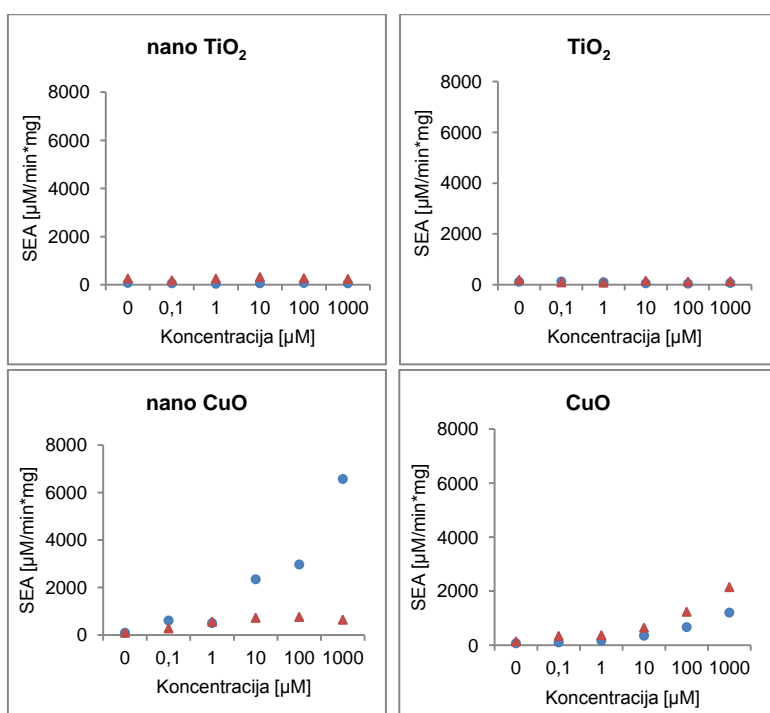
Točke predstavljajo rezultate meritev SEA enega poskusa. Vsaka točka predstavlja povprečje treh paralelk (N=3) (tabele posameznih poskusov so v prilogi).

4.3.3 Guaiakol peroksidaza

Encimsko aktivnost guaiakol peroksidaze (G-POD) smo spektrofotometrično izmerili z merjenjem polimerizacije guaiakola v tetraguaiakol pri 470 nm.

SEA G-POD *L. minor* se zaradi izpostavitve delcem TiO₂ ni spremenila. Pri izpostavitvi rastlin nanodelcem CuO smo pri večanju koncentracije opazili povečanje SEA G-POD. Povprečne vrednosti SEA leče, ki je rasla v koncentraciji 1000 μM nano CuO so bile v prvem poskusu za 6831,69 % večje od kontrolnih.

Vrednosti SEA, izmerjene v leči, ki je uspevala v prisotnosti makrodelcev CuO, so z večanjem koncentracije naraščale in so bili statistično značilni ($p=0,0233$) (priloga D). Koncentracija 1000 μM je bila za 94 % večja od kontrole. Iz slike 12 lahko vidimo, da so makrodelci CuO na SEA encima začeli vplivati pri 100 μM v gojišču, nanodelci pa pri 10 μM .



Legenda: ● = 1. poskus, ▲ = 2. poskus

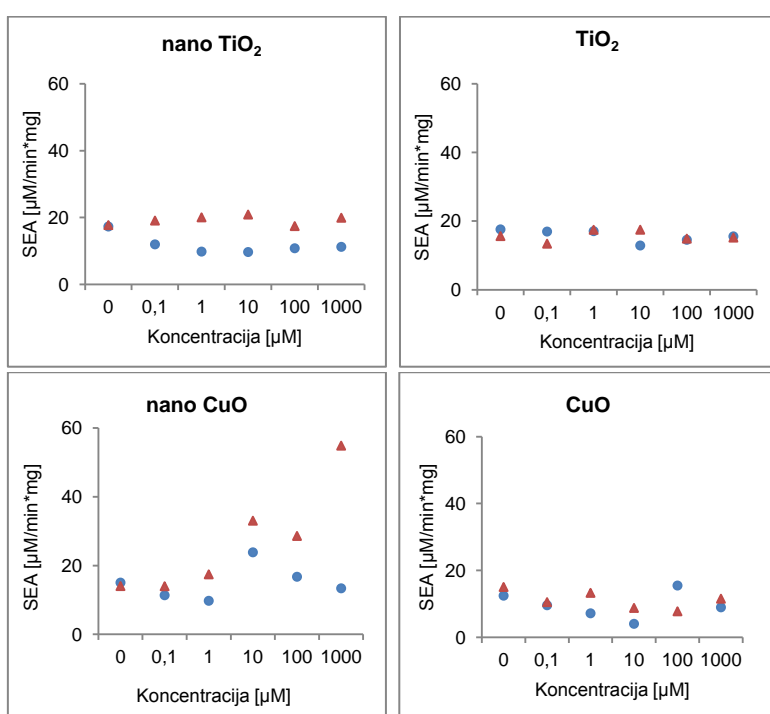
Slika 12: Specifična encimska aktivnost (SEA) guaiakol peroksidaze v odvisnosti od koncentracije delcev TiO₂ in CuO v gojišču

Točke predstavljajo rezultate meritev SEA enega poskusa. Vsaka točka predstavlja povprečje treh paralelk ($N=3$) (tabele posameznih poskusov so v prilogi).

4.3.4 Glutation reduktaza

Encimsko aktivnost glutacion reduktaze (GR) smo spektrofotometrično določili s pomočjo naraščanja absorpcije pri 412 nm, ki je posledica redukcije DTNB v TNB (2-nitro-5-tiobenzojsko kislino).

Ugotovili smo, da encim GR ni spremenil SEA v leči, izpostavljeni delcem TiO₂. Iz slike 12 lahko vidimo, da je bila SEA GR pri koncentraciji 1000 μM nano CuO za 57 % višja od kontrole. Učinek nanodelcev CuO na SEA encima GR se je pokazal že pri koncentraciji 10 μM , medtem ko pri makrodelcih CuO nismo opazili učinka (slika 13).



Slika 13: Specifična encimska aktivnost (SEA) glutacion reduktaze v odvisnosti od koncentracije delcev TiO₂ in CuO v gojišču

Točke predstavljajo rezultate meritev SEA enega poskusa. Vsaka točka predstavlja povprečje treh paralelk (N=3) (tabele posameznih poskusov so v prilogi).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Nanotehnologija se vse bolj razvija in tako je vse več umetno pridobljenih nanodelcev. Povišanje teh se pričakuje tudi v naravi, kar lahko privede do kopičenja nanodelcev v organizmu in posledično vpliva na njihovo rast in razvoj. Zaradi velikosti delcev do 100 nm, so njihove lastnosti drugačne od večjih delcev in potrebno je preučevanje pozitivnih in negativnih vplivov na žive organizme (Kahru in sod., 2008). Raziskave z bakrovimi in titanovimi spojinami so pokazale, da je baker veliko bolj škodljiv za organizme kot titan (Karlsson in sod., 2009).

Mala vodna leča je eden izmed pomembnejših testnih organizmov v ekotoksikoloških raziskavah, s katerimi ocenjujemo vpliv kemijskih snovi na fiziološko stanje osebkov. Zaradi enostavnih pogojev gojenja in hitrega razmnoževanja se jo med makrofiti najpogosteje uporablja v raziskovalne namene.

Opazovali in primerjali smo metabolni in fiziološki odziv male vodne leče na nanodelce CuO in TiO₂. Tudi naši rezultati so potrdili, da stataka nano kot makro oblika CuO imeli na rastline bolj negativni učinek kot nano- in makrodelci TiO₂, ki so na malo vodno lečo vplivali minimalno.

Ker se je področje nanotehnologije začelo razvijati, na področju vpliva nanodelcev na rastline ni narejenih veliko raziskav. Da bi bolj razumeli pomen nanodelcev in njihovo vlogo v naravi, bo potrebnih še več raziskav. Za primerjave z našimi rezultati smo zato poleg člankov, ki govorijo o vplivu nanodelcev CuO in nanodelcev TiO₂, izbrali še članke, ki opisujejo vpliv delcev CuSO₄ na rastline in vpliv drugih težkih kovin - CdCl₂ in ZnCl₂ na vodno lečo.

Več avtorjev v delih navaja, da nanodelci TiO₂ minimalno negativno vplivajo na žive organizme (Lei in sod., 2008, Foltête in sod., 2011, Asli in Neumann, 2009, Seeger in sod., 2009). Tudi naša raziskava je potrdila, da koncentracija nanodelcev TiO₂ ni vplivala na slabše stanje in razmnoževanje leče. Nasprotno od nanodelcev TiO₂ pa imajo nanodelci CuO bolj škodljiv vpliv na žive organizme. Povzročajo večji oksidativni stres in večjo encimsko aktivnost antioskidantov. Opazili smo tudi večje fiziološke spremembe kot pri stikih z nanodelci TiO₂. Tudi ostali avtorji poročajo o podobnih negativnih učinkih bakrovih delcev (Babu in sod., 2003, Hou in sod., 2007, Tiesseire in Guy, 2000, Razinger in sod., 2007, Perreault in sod., 2010).

5.1.1 Vpliv delcev TiO₂ in CuO na morfologijo in rast male vodne leče

Leča, ki je uspevala v prisotnosti 100 µM koncentracije v gojišču TiO₂ je imela sedmi dan poskusa 59 % členkov v primerjavi z lečo v kontrolni raztopini (tabela 4). Nasprotno od nje pa je imela leča, ki je uspevala v prisotnosti 100 µM nanodelcev TiO₂ za 8,8 % več členkov leče kot v kontrolnih pogojih (tabela 2). Drugačni rezultati na algah kažejo na različen odziv različnih vrst na nano in makrodelce TiO₂. Pri raziskavi Wanga in sod. (2008), kjer so opazovali rast alge *Clamydomonas reinhardtii*, je rastlina pri koncentraciji 100 mg/L dosegla 80 % rasti v kontrolni raztopini. Za mikroalgi vrste *Scenedesmus* sp. in *Chlorella* sp. je bila najmanjša koncentracija nanodelcev, pri kateri so opazili inhibicijo rasti, različna. Letalna koncentracija nanodelcev v gojišču pa je bila za obe vrsti med 12 in 24 mg/L (Sadiq in sod., 2010). V našem poskusih letalne koncentracije TiO₂ nismo dosegli. Kjer smo v gojišče dodali makrodelce CuO pa je bila letalna koncentracija med 0,1 in 1 µM CuO in pri nanodelcih CuO med 0 in 0,1 µM (tabeli 6 in 8). Ko so Razinger in sodelavci (2008) na *L. minor* opravljali poskus s CdCl₂, so letalno mejo dosegli med 21,4 in 31,4 µM. Po koncentracijah težkih kovin v gojišču, ki so dosegle letalno mejo, lahko sklepamo, da je TiO₂ v primerjavi s CuO in CdCl₂ manj škodljiv. Da so delci CuO v gojišču močno zmanjšali rast leče, smo opazili tekom poskusa.

Pri tako nizkih koncentracijah CuO in nano CuO, ki so dosegle letalno mejo, ni presenetljivo, da je leča imela na sedmi dan pri koncentraciji 1000 µM nano CuO za 85 % manjše število členkov kot v kontrolni raztopini (tabela 6). Ko smo uporabili makrodelce CuO je bil delež pri enaki koncentraciji na sedmi dan 70,1 % (tabela 8). Dolžina posameznih členkov se tekom poskusa ni spreminjala, nespremenjena je bila tudi po poskusu, kjer smo uporabili delce TiO₂.

Rastline, ki so uspevale v kontrolnih pogojih in tiste v gojišču z dodanimi delci TiO₂, so tvorile večje kolonije rastlin od tistih, ki so uspevale v pogojih s CuO. Tam sta bila po sedmih dneh v gojišču s koncentracijo, večjo od 1 µM nanodelcev CuO, največ dva člena na kolonijo. Makrodelci CuO so šele pri koncentraciji 100 M v gojišču povzročili takšno zmanjšanje kolonij. Poleg teh vplivov na rastlino smo tekom poskusa odčitavali dolžino najdaljše korenine v koloniji. Tudi pri tem parametru smo potrdili tezo, da delci TiO₂ manj vplivajo na rast leče, saj se je dolžina korenin pri visokih koncentracijah delcev daljšala podobno kot pri rastlinah, ki takem stresu niso bile izpostavljene. Na drugi stani pa so korenine v prisotnosti CuO odpadle. Koncentracije, pri kateri se je to pojavilo, so bile 100-krat višje pri nanodelcih kot pri makrodelcih (slika 6).

Pri opazovanju členkov med sedemdnevni testom smo bili pozorni na barvo in pojav nekroz in kloroz. Na splošno lahko povzamemo, da so členki hitreje rumeneli v tistih gojiščih z dodanimi delci CuO. Temno zeleni členki, ki kažejo na zdravo rastlino, so bili po enem tednu še vedno prisotni na rastlinah po izpostavitvi delcem TiO₂. V gojišču z

dodanimi nanodelci CuO v koncentraciji 10 µM temno zelenih členkov ni bilo več že pred koncem poskusa, na zadnji dan opazovanja v gojišču s koncentracijo 1000 µM pa nismo opazili ne temno zelenih, ne zelenih členkov. Tudi pri tistih rastlinah, ki so uspevale v prisotnosti makrodelcev CuO, smo opazili rumenenje členkov, ki pa ni bilo tako intenzivno kot pri leči, ki je uspevala v prisotnosti nanodelcev CuO. Temno zelenih členkov sicer nismo opazili pred koncem poskusa pri koncentraciji 100 µM v gojišču, so pa imela vsa gojišča z dodanimi makrodelci CuO na koncu poskusa nek delež zelenih členkov (slika 7).

V primeru, kjer so opazovali vpliv CuSO₄ na *Prunus cerasifera*, so opazili senescenco listov in nekroze pri koncentracijah, višjih od 50 µM (Lombardi in Sebastiani, 2005). V primerjavi z rumenenjem *L. minor* v prisotnosti makrodelcev CuO je *P. cerasifera* manj občutljiva na CuSO₄. Ker se tako iz obeh oblik bakrovih spojin sproščajo bakrovi ioni, lahko predpostavljamo, da se na bakrove ione različne vrste različno odzivajo. Leča je torej bolj občutljiva na bakrove ione kot *P. cerasifera*. Tako kot rumenenje členkov, so se pri nižjih koncentracijah začele pojavljati nekroze, delež teh pa se je z naraščajočo koncentracijo povečeval. Večji delež nekroz smo opazili pri leči, ki je rasla v prisotnosti 1000 µM nanodelcev kot pri isti koncentraciji makrodelcev CuO v gojišču.

Iz tabel 7 in 9 lahko vidimo, da so se nekroze začele pojavljati pri koncentracijah 0,1 in 1 µM delcev CuO. Pri 4 µM CuSO₄ so se pojavile nekroze pri *L. gibba* (Babu in sod., 2003), kar je večja koncentracija kot v našem primeru. Ko pa so opazovali vpliv CdCl₂ na *L. minor*, so se nekroze pojavile pri 0,1 µM CdCl₂ (Razinger in sod., 2008), torej pri približno enaki koncentraciji, kot smo v našem primeru z delci CuO opazili sami. Delci CuO kot delci CdCl₂ so pri vodnih lečah povzročili pojav nekroz pri nižjih koncentracijah kot CuSO₄. Predpostavljamo, da so zaradi tega tudi bolj škodljivi. Po drugi strani delci TiO₂ niso vplivali na pojav kloroz ali nekroz.

V našem poskusu smo poleg stanja leče ocenjevali še prisotnost alg (slika 8). Rast alg so v prisotnosti nanodelcev TiO₂ preučevali Wang in sod. (2008) ter Sadiq s sod. (2011). Naši rezultati niso tako natančni, saj alge niso bile naš objekt opazovanja, vseeno pa so Wang in sod. (2008) dobili podobne rezultate. Rast alg tudi v njihovem poskusu ni bila močno zavrtta. Številčnost smo ocenjevali s štirimi stopnjami, pri kateri je vrednost 0 pomenila, da ni bilo alg, najvišja ocena številčnosti pa je bila vrednost 3. Naše ugotovitve so bile, da so nanodelci TiO₂ bolj zavirali rast alg kot makrodelci TiO₂. Tudi Sadiq in sod. (2011) so primerjali vpliv nanodelcev z makrodelci TiO₂ in prišli do podobnih ugotovitev, da so nanodelci imeli večji negativen vpliv na alge. Oni so letalno mejo dosegli med koncentracijama 12 in 24 mg/L. V našem primeru nobena koncentracija nanodelcev TiO₂ ni zmanjšala številčnosti alg za 50 %; verjetno sta bili vrsti alg, obravnavani v članku, druge vrste kot v našem primeru. Iz prejšnjih zapisanih komentarjev rezultatov pa se lahko razbere, da se različne vrste drugače odzivajo na prisotnost škodljivih snovi v okolju.

Nobena koncentracija delcev TiO₂ rasti alg ni popolnoma zavrla, kar pa ne velja za delce CuO. Obe obliki sta pri nižjih koncentracijah močno zavrla rast alg, tako da se tam sploh niso pojavljale. Koncentracija nanodelcev CuO v gojišču je bila 10 μM, makrodelcev CuO pa 100 μM.

5.1.2 Vpliv delcev TiO₂ in CuO na encimsko aktivnost

Izmerili smo specifično encimsko aktivnost encimov katalaza (CAT), askorbat peroksidaza (A-POD), guaiakol peroksidaza (G-POD) in glutation reduktaza (GR).

Naši rezultati so pokazali, da je vrednost SEA encima CAT padala tako pri rastlinah, izpostavljenih delcem TiO₂ kot delcem CuO. Padec SEA je bil večji pri rastlinah, ki so uspevale v prisotnosti nanodelcev CuO. Pri koncentraciji 1000 μM nano CuO je bila SEA za 50 % nižja od kontrole. Podobne vrednosti SEA so dosegle rastline, izpostavljenе delcem TiO₂ in CuO, tam je bila SEA pri koncentraciji 1000 μM delcev v gojišču za največ 30 % nižja od kontrole (slika 10). Drugi avtorji, ki so merili encimsko aktivnost po izpostavitvi rastlin nanodelcem TiO₂, so navajali podobne rezultate (Lei in sod., 2008, Foltête in sod., 2008). SEA encima CAT se je po opravljenem poskusu znižala. V rastlinah vrste *Vicia faba* so Foltête in sodelavci (2008) merili encimsko aktivnost več encimov tako v koreninah kot v listih. Večji padec SEA so izmerili v rastlinskih poganjkih, vrednost SEA je bila za 54% nižja od kontrole. V naših poskusih padec SEA ni bil tako velik, na kar verjetno vpliva tudi dejstvo, da gre za različne vrste in da se le te različno odzivajo na nanodelce TiO₂. Ker nismo zasledili raziskav, kjer bi merili encimsko aktivnost rastlin, izpostavljenih nanodelcem CuO, smo za primerjavo izbrali članke, ki opisujejo vpliv delcev CuSO₄ na rastline. Hou in sod. (2007), Teisseire in Guy (2000), Lombardi in Sebastiani (2005) in Razinger s sod. (2007) so opazili močno povišanje vrednosti SEA encima CAT. Naši rezultati iz serije, kjer smo lečo izpostavili CuO so bolj podobni izpostavitvi *L. minor* CdCl₂ in ZnCl₂ (Balen in sod., 2011). SEA encima CAT je pri tretiranju z eno in drugo kovino padla, za razliko od našega poskusa so merili spremembo aktivnosti encima v času pri enaki koncentraciji kovine v gojišču. V primeru, kjer so izpostavili *L. minor* različnim koncentracijam CdCl₂, pa ne moramo določiti, ali je vrednost SEA encima odvisna od koncentracije v gojišču, saj so vrednosti SEA variirale (Razinger in sod., 2008). V našem poskusu padec encimske aktivnosti ni bil pričakovan. Pričakovali smo, da se bo SEA encima CAT pri leči, ki je uspevala v gojišču z delci CuO, povečala. Zakaj je v našem primeru SEA padala, ne vemo zagotovo. Možno je, da so Cu ioni povzročili inaktivacijo encima. Tako ioni kot agregati nanodelcev so lečo verjetno tako poškodovali, da je svojo energijo preusmerila v druge procese kot sintezo encima.

Vrednosti SEA encima A-POD so pri večanju koncentracije delcev TiO₂ v gojišču pri leči padale (slika 11). Podobne rezultate so dobili tudi pri *V. faba*, izpostavljeni nanodelcem TiO₂, torej vrednosti SEA encima A-POD so padale.

Vrednosti SEA pri leči, ki je bila izpostavljena delcem CuO so naraščale. Iz naših rezultatov smo razbrali, da je prisotnost nanodelcev v gojišču bolj povišala SEA encima kot prisotnost makrodelcev v gojišču. Kot pri izpostavitvi leče delcem TiO₂ v gojišču, tudi delci CdCl₂ povzročijo padec SEA encima A-POD (Razinger in sod., 2008).

Naši rezultati merjenja SEA encima po izpostavljenosti leče delcem CuO so bili primerljivi z rezultati avtorjev, ki so namesto z delci CuO stres v rastlinah povzročali s CuSO₄. *L. minor* je po izpostavljenosti bakrovemu sulfatu imela povišano SEA encima A-POD tako pri isti koncentraciji s podaljševanjem izpostavljenosti, kot pri višanju koncentracije CuSO₄ v gojišču (Teisseire in Guy, 2000).

Pri merjenju SEA encima G-POD smo ugotovili, da različne koncentracije delcev TiO₂ na aktivnost encima ne vplivajo (slika 12). Podobne rezultate so dobili tudi Foltête in sod. (2011), saj so vrednosti SEA encima tako v koreninah kot v listih, nihale. S časom pa je nasprotno od naših rezultatov vrednost SEA encima pri špinači padala (Lei in sod., 2008). Lahko da so rezultati drugačni zaradi obsevanja z UV-B svetlobo, ki je zavrla antioksidativno delovanje nanodelcev TiO₂. Da je CuO bolj škodljiv od TiO₂ smo opazili pri primerjavi aktivnosti encima G-POD. Tako nanodelci kot makrodelci so pri koncentraciji 1000 μM v gojišču povečali SEA encima za skoraj 100 %. Da so bakrove spojine škodljive, so opazili tudi pri izpostavitvi *L. minor* delcem CuSO₄ (Teisseire in Guy, 2000). Vrednost SEA encima G-POD se je povišala za 274 %. Ker pa so bile koncentracije CuSO₄ manjše kot v našem poskusu, lahko rečemo, da je baker v obliki sulfata bolj spodbudil aktivnost G-POD.

Pri merjenju encimske aktivnosti GR smo opazili, da so vrednosti SEA v leči nihale tako ob prisotnosti delcev TiO₂ kot CuO v gojišču pri različnih koncentracijah (slika 12). Rezultati niso bili pričakovani, saj so Foltête in sodelavci (2008) pri poskusih z *V. faba*, tretirane z nanodelci TiO₂ dobili padajoče vrednosti SEA encima. Po izpostavitvi leče delcem CdCl₂ pa je vrednost SEA encima GR naraščala (Razinger in sod., 2008). Prav tako je bila naraščajoča vrednost tudi pri poskusu z lečo, kjer so uporabili CuSO₄ (Razinger in sod., 2007). Podobne vrednosti našim rezultatom pa sta opazila Teisseire in Guy (2000), saj je SEA encima GR nihala.

5.1.3 Vpliv delcev TiO₂ in CuO na fotokemično učinkovitost *L. minor*- merjenje Fv/Fm

Opazili smo, da so vrednosti izmerjene fotokemične učinkovitosti padale z večanjem koncentracije obeh velikosti delcev TiO₂ v gojišču. Potencialna fotokemična učinkovitost je bil pri obeh delcih za 12, 3 % nižja od kontrole. Nasprotno pri vrsti *Vicia faba* niso izmerili sprememb v fotokemični učinkovitosti (Foltête in sod., 2011), prav tako o zmanjšani fotokemični učinkovitosti enocelične alge *Chlamydomonas reinhardtii* niso poročali Wang in sod. (2008). Nanodelci CuO so imeli za razliko od delcev TiO₂ bolj negativen vpliv na fotokemično učinkovitost. Iz rezultatov (slika 9) lahko vidimo, da so bili nanodelci CuO bolj škodljivi za rastlino od makrodelcev. Pri koncentraciji 1000 µM nanodelcev CuO je bila fotokemična učinkovitost za 47, 14 % nižja od kontrole, nižja pa je bila tudi od fotokemične učinkovitosti leče, ki je uspevala pri koncentraciji 1000 µM makrodelcev CuO. Iz tega lahko sklepamo, da so nanodelci bolj poškodovani fotosistem PSII kot makrodelci. Škodljiv vpliv nanodelcev CuO so ugotovili tudi Perreault in sod. (2010). Po 48 urah izpostavitve *L. gibba* nanodelcem CuO je bila fotokemična učinkovitost za 41 % manjša od kontrole. Nasprotno pa Razinger s sod. (2007) niso opazili nobene spremembe pri merjenju fotokemične učinkovitosti. Tako sklepamo, da CuSO₄ ni negativno vplival na PS, po drugi strani pa je baker v obliki CuO na PSII vplival.

5.1.4 Povzetek primerjave vpliva nanodelcev TiO₂ in CuO

Naši rezultati se skladajo s trditvijo Klarssona in sod. (2009) ter Heinlanna in sod. (2008). Primerjala sta vplive različnih nanodelcev na živalske organizme, med drugimi tudi take delce, ki smo jih uporabili v našem delu. Oba sta dokazala, da imajo nanodelci CuO bolj negativen vpliv na raziskovano telo kot nanodelci TiO₂.

Opazili smo, da so nanodelci CuO povzročili večje zaviranje rasti, večji delež pojavljanja nekroz, hitrejše rumenenje členkov in odpadanje korenin v primerjavi z nanodelci TiO₂. Statistični test Anova je pokazal, da je koncentracija nanodelcev CuO vplivala na povišano aktivnost encimov A-POD in G-POD, velikost delcev pa je vplivala na fotokemično učinkovitost. Opazili smo, da je bila fotokemična učinkovitost leče manjša v večji koncentraciji delcev.

5.2 SKLEPI

- Delci TiO₂ ne vplivajo na rast in fiziološko stanje male vodne leče, ne glede na obliko in koncentracijo delcev.
- Delci CuO zaviralno vplivajo na rast in fiziološko stanje male vodne leče.
- Nano oblika delcev CuO povzroča bolj negativne učinke kot makro oblika.
- Višje kot so koncentracije nanodelcev in mikrododelcev CuO, slabši je koreninski sistem, rast leče se upočasni, barva členkov je svetlejša, pojavljajo se nekroze.
- Nanodelci CuO so povišali aktivnost encimov APOD, G-POD in GR, ter znižali aktivnost CAT. Podobne učinke je povzročila izpostavljenost makrododelcem CuO, vendar je bila manj izrazita.
- Delci TiO₂ niso bistveno vplivali na aktivnost antioksidativnih encimov.
- Na potencialno fotokemično učinkovitost je vplivala oblika delcev. Nanodelci CuO so najbolj zmanjšali fotokemično učinkovitost, makrododelci CuO nekoliko manj, med tem ko so nano- in makrododelci TiO₂ najmanj znižali fotokemično učinkovitost.

6 POVZETEK

Nanotehnologija je panoga, ki se razvija hitro in je vse bolj vpletena v naše življenje. Njena uporaba je široka, nanodelce najdemo v medicini, farmaciji, kozmetiki, premazih za ladje, loščilih za sadje, idr. Prav zaradi možnosti vnosa nanodelcev moramo poznati vplive nanodelcev na žive organizme. Ker so nanodelci zelo majhni (njihova velikost je od 1 nm do 100 nm), so njihove lastnosti in reakcije z okoljem drugačni od večjih delcev. Nanodelci, ki smo jih uporabili pri našem delu, so bili nanodelci bakrovega oksida in titanovega dioksida. Sklepali smo, da bodo nanodelci CuO bolj negativno vplivali na lečo kot nanodelci TiO₂. Znano je, da vplivi nanodelcev niso le negativni. Ravno pri TiO₂ so odkrili pozitivne učinke, kot so pospešena kalitev, lažji prevzem nitratov.

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti, kako na metabolnem in fiziološkem nivoju nanodelci CuO in TiO₂ vplivajo na malo vodno lečo. Hkrati smo primerjali še vpliv nanodelcev in makrodelcev na vodno lečo. Izvajali smo standardiziran enotedenski test inhibicije rasti, s katerim smo ugotavljali vpliv različnih koncentracij različnih delcev in njihovih kemijskih oblik na rast male vodne leče v času enega tedna. Med testom smo na dva dni opazovali morfološke spremembe, in sicer število členkov, število kolonij, število členkov na kolonijo, barvo, prisotnost kloroz, nekroz in alg ter dolžino najdaljše korenine v kolonij. S to raziskavo smo ugotovili različen vpliv nanodelcev CuO in nanodelcev TiO₂. Slednji na lečo niso vplivali, saj je rastla podobno kot v kontrolni raztopini. Nasprotno pa so imeli nanodelci CuO velik negativen vpliv na vse merjene rastne parametre. Ugotovili smo tudi, da so imeli makrodelci CuO in TiO₂ podobne učinke na lečo kot nanodelci.

Ker so delci bakrovega oksida v obeh oblikah povzročili močno rumenenje členkov in nekroze, so se spremembe odrazile na fotokemični učinkovitosti izpostavljenih rastlin, ki se je znižala skoraj za polovico. Fotokemična učinkovitost leče, ki je rastla v prisotnosti makrodelcev TiO₂, je bila le za dobro desetino manjša od kontrole.

Fiziološko stanje izpostavljenih rastlin smo ovrednotili tudi z meritvami aktivnosti antioksidativnih encimov, s čimer lahko posredno ocenimo stopnjo oksidativnega stresa. Dobro fiziološko stanje rastlin, ki so rastle v prisotnosti delcev TiO₂, se je pokazalo tudi na ravni encimske aktivnosti CAT, A-POD, G-POD in GR, saj so bile vrednosti podobne kontrolnim. Delci CuO so večinoma povišali encimske aktivnosti v odvisnosti od koncentracije, še posebej koncentracije, višje od 10 μM, razen v primeru CAT, ko se je SEA v primerjavi s kontrolnimi rastlinami zmanjšala. Delci CuO v nano obliki so večinoma povzročali bolj izrazite spremembe v encimski aktivnosti.

7 VIRI

- Asli, S., Neumann, P. M. 2009. Colloidal suspensions of clay or titanium dioxide nanoparticles can inhibit leaf growth and transpiration via physical effects on root water transport. *Plant, Cell and Environment*, 32: 577-584
- Babu, T. S., Akhtar, T. A., Lampi, M. A., Tripuranthakam, S., Dixon, D. G., Greenberg, B. M. 2003. Similar Stress Responses are Elicited by Copper and Ultraviolet Radiation in the Aquatic Plant *Lemna gibba*: Implication of Reactive Oxygen Species as Common Signals. *Plant Cell Physiology* 44, 12: 1320-1329
- Balen, B., Tkalec, M., Šikić, S., Tolić, S., Cvjetko, P., Pavlica, M., Vidaković-Cifrek, Ž. 2011. Biochemical responses of *Lemna minor* experimentally exposed to cadmium and zinc. *Ecotoxicology*, 20: 815-826
- Cho, U.-H., Park, J.-O. 2000. Mercury-induced oxidative stress in tomato seedlings. *Plant Science*, 156: 1-9
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Breusegem, F. 2000. Review: Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular Molecular Life Science*, 57: 779-795
- Dietz, K.-J., Herth, S. 2011. Plant nanotoxicology. *Trends in Plant Science*. 16, 11: 582-589
- Ernster, L., Hochstein, P. 1963. ADP-activated lipid peroxidation coupled to the TPNH oxidase system of microsomes. *Biochemical Biophysical Research Community*, 12: 338-394
- Esterbauer, H. 1996. Estimation of peroxidative damage. *Phatologie et Biologie*, 44, 1: 25-28
- Fabian, E., Wiench, K., Wohlleben, W., Van Ravenzwaay, B. 2008. Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats. *Archives of Toxicology*, 82: 151-157
- Foltête, A.-S., Masfaraud, J.-F., Bigorgne, E., Nahmani, J., Chaurand, P., Botta, C., Labille, J., Rose, J., Féraud, J.-F., Cotellet, S. 2011. Environmental impact of sunscreen nanomaterials: Ecotoxicity and genotoxicity of altered TiO₂ nanocomposites on *Vicia faba*. *Environmental Pollution*, 159: 2515-2522

- Haber, F., Weiss, J. 1934. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron saltz. Proceedings of the Royal Society London Service, 147: 332-351
- Hartley-Whitaker, J., Ainsworth, G., Meharg, A. A. 2001. Copper- and arsenate-induced oxidative stress in *Holcus lanatus* L. clones with differential sensitivity. Plant, Cell and Environment, 24: 713-722
- Hegedűs, A., Erdei, S., Horváth, G. 2001. Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. Plant Science, 160: 1085-1093
- Heinlaan, M., Ivask, A., Blinova, I., Dubourguier, H.-C., Kahru, A. 2008. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO, and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphniamagna* and *Thamnocephalus platyurus*. Chemosphere, 71: 1308-1316
- Hodges, D. M., DeLong, J. M., Forney, C. F., Prange, R. K. 1999. Improving the thioarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. Planta, 207: 604-611
- 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
- ISO, 2001. Water quality – Determination of the toxic effect of water constituents and water waste water to duckweed (*Lemna minor*) – Duckweed growth inhibition test. V: International Organization for Standardization, International Standard ISO, 20079
- Kahru, A., Dubourguier, H.-C., Blinova, I., Ivask, A., Kasemets, K. 2008. Biotests and Biosensors for Ecotoxicology of Metal Oxide Nanoparticles: A Minireview. Sensors, 8: 5153-5170
- 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
- Kim, K. T., Klaine, S. J., Cho, J., Kim, S.-H., Kim, S. D. 2010. Oxidative stress responses of *Daphnia magna* exposed to TiO₂ nanoparticles according to size fraction. Science of the Total Environment, 408: 2268-2272

- Koehler, A., Marx, U., Broeg, K., Bahns, S., Bressling, J. 2008. Effects of nanoparticles in *Mytilus edulis* gills and hepatopancreas – a new threat to marine life? *Marine Environmental Research*, 66: 12-14
- Lee, W.-M., An, Y.-J., Yoon, H., Kweon, H.-S. 2008. Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to terrestrial plants mung bean(*Phaseolus radiatus*) and wheat(*Triticum aestivum*); Plant agar test for water-insoluble nanoparticles. *Environmental Toxicological Chemistry*, 27: 1915-1921
- Lei, Z., Mingyu, S., Xiao, W., Chao, L., Chunxiang, Q., Liang, C., Hao, H., Xiaoqing, L., Fashui, H. 2008. Antioxidant Stress is Promoted by Nano-anatase in Spinach Chloroplasts Under UV-B Radiation. *Biological Trace Elemental Research*, 121: 69-79
- Lewis, M. A. 1995. Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: A review. *Environmental Pollution*, 87: 319-336
- Lin, D., Xing, B. 2007. Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and rooth growth. *Environmental Pollution*, 150: 243-250
- Lombardi, L., Sebastiani, L. 2005. Copper toxicity in *Prunus cerasifera*: growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants. *Plant Science*, 168: 797-802
- Jogan, N. 2007. Lemnaceae. V: Mala flora Slovenije, ključ za določanje praprotnic in semenk, 4. izdaja A., Martinčič in sod. (ur.). Ljubljana, Tehniška založba Slovenije, str. 936-938
- Marinšek Logar, R., Zrimec, A., Breden Zrimec, M., Čepeljnik, T., Tišler, T. 2006. Ugotavljanje strupenosti in genotoksičnosti pitnih vod. *Vodni dnevi*, 06: 58-69
- Mascher, R., Lippmann, B., Holzinger, S., Bergmann, H. 2002. Arsenate toxicity: effects on oxidative stress response molecules and enzymes in red cover plants. *Plant Science*, 163: 961-969
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., B. Tognetti, V., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V., Van Breusegem, F. 2011. ROS signaling: the new wave?. *Trends in plant Science*. 16, 6: 300-309
- Moser, H., Pattard, M. 2009. Lemna Growth Inhibition Test. V: Ecotoxicological Characterization of Waste Moser, H., Roembke, J. (ur.) Springer Science+Business Media. 12: 137-144

- Nair, R., Varghese, S. H., Nair, B. G., Maekawa, T., Yoshida, Y., Sakthi Kumar, D. 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: 327-386
- Noctor, G., Foyer, H. C. 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. *Plant Physiological Plant Molecular Biology*, 49: 249-279
- Panda, S.K., Upadhyay, R.K. 2003. Salt stress injury induces oxidative alterations and antioxidative defence in the roots of *Lemna minor*. *Biologia plantarum*, 48, 2: 249-253
- Park, E.-J., Yi, J., Chung, K.-H., Ryu, D.-Y., Choi, J., Park, K. 2008. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology Letters*, 180: 222-229
- Perreault, F., Oukarroum, A., Pirastru, L., Sirois, L., Gerson Matias, W., Popovic, R. 2010. Evaluation of Copper Oxide Nanoparticles Toxicity Using Chlorophyll a Fluorescence Imaging *Lemna gibba*. *Journal of Botany*, Article ID 763142, 9 pages
- Razinger, J., Dermastia, M., Dolenc Koce, J., Zrimec, A. 2008. Oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.) caused by short-term cadmium exposure. *Environmental Pollution*, 153: 687-694
- Razinger, J., Dermastia, M., Drinovec, L., Drobne, D., Zrimec, A., Dolenc Koce, J. 2007. Antioxidative Responses of Duckweed (*Lemna minor* L.) to Short-Term Copper Exposure. *Environmental Science Pollution Research*, 14, 3: 194-201
- Roco, M. C. 2005. Environmentally responsible development of nanotechnology. *Environmental Science Technology*, 39: 106A-112A
- Sadiq, I. M., Dalai, S., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A. 2011. Ecotoxicity study of titania (TiO₂) NPs on two microalgae species: *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74: 1180-1187
- Sandmann, G., Böger, P. 1980. Copper-mediated Lipid Peroxidation Processes in Photosynthetic Membranes. *Plant Physiology*, 66: 797-800
- Sagrane, S., El ghazali, I., Ouahid, Y., El Hassni, M., El Hadrami, I., Bouarab, L., F. del Campo, F., Oudra, B., Vasconcelos, V. 2007. Phytotoxic effects of cyanobacteria extract

on the aquatic plant *Lemna gibba*: Microcystin accumulation, detoxication and oxidative stress induction. *Aquatic Toxicology*, 83: 284-294

Scandalios, J.G. 2002. The rise of ROS. *Trends Biochemical Sciences*, 27, 9: 483-486

Seeger, E. M., Baun, A., Kästner, M., Trapp, S. 2009. Insignificant acute toxicity of TiO₂ nanoparticles to willow trees. *J. Soils Sediments*, 9: 46-53

Sevanian, A., Ursini, F. 2000. Lipid peroxidation in membranes and low-density lipoproteins: similarities and differences. *Free Radical Biology & Medicine*, 29: 306-311

Sies, H. 1997. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82: 291-295

Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G. J.S., Griffiths, S. M., Williams, P. M., Maffei, T. G.G., Wright, C. J., Doak, S. H. 2009. NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*, 30: 3891-3194

Smeets, K., Cuypers, A., Lambrechts, A., Semane, B., Hoet, P., Van Laere, A., Vangronsveld, J. 2005. Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. *Plant Physiology Biochemistry*. 43:437-444

Stampolijs, D., Sinha, S. K., White, J. C. 2009. Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. *Environmental Science Technology*, 43: 9473-9479

Taiz, L., Zeiger, E. 2006, *Plant Physiology*, 4th ed. U.S.A., Sinauer Associates, Inc., str. 671-672

Teisseire, H., Guy, V. 2000. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). *Plant Science*, 153: 65-72

Uredba z dne 29. 11. 1996 o mejnih, opozorilnih in kritičnih imisijskih vrednostih nevarnih snovi v tleh, Uradni list RS št. 68/1996

Verma, S., Dubey, R.S. 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science*, 164: 645-655

Wang, J., Zhang, X., Chen, Y., Sommerfeld, M., Hu, Q. 2008. Toxicity assessment of manufactured nanomaterials using the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Chemosphere*, 73: 1121-1128

Zheng, L., Hong, F. S., Lu, S. P., Liu, C. 2005. Effect of nano-TiO₂ on strength of naturally and growth aged seed of spinach. *Biology Trace Elemental Research*, 104: 83-91

ZAHVALA

Ob težko pričakovanem zagovoru diplome bi se želela zahvaliti vsem, ki ste me spremljali na moji študijski poti ter me podpirali, zabavali, mi svetovali in mi dajali navdih.

Zahvaljujem se mentorici, doc. dr. Jasni Dolenc Koce za podporo, prijazne besede, vzpodbujanje in pomoč od dne, ko sem se odločila za izdelavo diplome pod njenim mentorstvom in do dne zagovora diplome.

Zahvaljujem se recenzentki, prof. dr. Damjani Drobne za pregled diplomske naloge in prijaznost ter pripravljenost pomagati. Zahvaljujem se tudi predsednici komisije, doc. dr. Katarini Vogel-Mikuš za pregled naloge.

Brez družine bi težko postala to kar sem. Mami, oči, Andrej, hvala, ker ste me skozi ta leta prenašali, mi svetovali in me podpirali na moji študijski poti.

Zahvaljujem se Simoni za prevod v angleščino, mami za lektoriranje.

Hvala tudi vsem prijateljem, ki ste me v težkih in dobrih časih razveseljevali in mi lajšali težave.

PRILOGE

PRILOGA A1: Stanje male vodne leče (*L. minor*) med sedemdnevni standardni testom inhibicije rasti pri različnih koncentracijah nanodelcev TiO₂(prva ponovitev poskusa)

Vrednosti predstavljajo povprečje treh bioloških ponovitev.

	Konc. nano TiO ₂ [μM]	Število členkov	Število kolonij	Število členkov na kolonijo	Dolžina členkov [mm]	Barva [%]					Dolžina najdaljše korenine [mm]	Kloroze [%]	Nekroze [%]	Alge
						temno zelena	zelena	rumeno zelena	rumena	bela				
2.dan	0	24,00	7,33	3,28	2,73	74,92	25,08	0,00	0,00	0,00	19,54	2,84	2,90	0,00
	0,1	22,00	7,33	3,01	2,92	46,97	53,03	0,00	0,00	0,00	19,27	7,58	3,03	0,00
	1	24,67	7,33	3,37	2,69	52,11	43,55	8,70	0,00	0,00	15,88	8,06	1,45	0,00
	10	22,67	7,00	3,24	2,70	51,45	45,65	8,70	0,00	0,00	16,38	4,48	1,45	0,00
	100	22,33	7,00	3,19	2,78	47,75	52,25	0,00	0,00	0,00	15,88	3,10	0,00	0,00
	1000	23,33	7,00	3,33	2,92	37,12	58,71	12,50	0,00	0,00	18,05	4,42	0,00	0,00
4.dan	0	49,33	7,33	6,78	2,85	62,12	37,88	0,00	0,00	0,00	24,02	1,96	1,33	1,17
	0,1	48,00	7,67	6,33	2,81	66,91	33,09	0,00	0,00	0,00	21,69	3,50	1,63	1,17
	1	44,00	7,67	5,74	2,75	61,71	35,45	8,51	0,00	0,00	22,76	3,91	1,47	0,83
	10	44,00	7,00	6,29	2,83	58,34	40,15	0,00	0,00	0,00	22,10	3,75	0,78	1,17
	100	38,00	7,00	5,43	2,70	58,52	41,48	0,00	0,00	0,00	23,71	1,11	1,63	1,17
	1000	39,67	7,00	5,67	2,78	54,41	45,59	0,00	0,00	0,00	25,62	0,98	0,00	1,17
7.dan	0	104,00	27,00	3,85	3,33	76,79	26,91	15,79	0,00	0,00	25,35	0,00	0,00	2,17
	0,1	111,00	25,00	4,45	2,84	39,40	23,86	28,53	8,21	0,00	23,60	0,65	0,00	2,00
	1	117,00	23,33	5,04	2,81	29,67	16,71	51,55	6,78	0,00	26,35	0,60	0,00	2,00
	10	103,33	23,00	4,50	2,97	38,16	9,18	41,67	10,99	0,00	25,21	1,30	0,99	2,00
	100	94,00	25,67	3,73	2,93	30,85	28,64	30,24	15,40	0,00	23,29	0,56	4,01	2,00
	1000	92,67	28,00	3,58	2,99	34,19	36,61	15,37	10,81	0,00	24,03	0,80	2,43	2,00

Prisotnost alg smo opisali kot: 0 – ni alg; 1 – malo; 2 – srednje; 3 – veliko. Vrednosti se lahko razlikujejo, saj predstavljajo povprečja treh paralelk.

PRILOGA A2: Stanje male vodne leče (*L. minor*) med sedemdnevni standardni testom inhibicije rasti pri različnih koncentracijah nanodelcev TiO₂ (druga ponovitev poskusa)

Vrednosti predstavljajo povprečje treh bioloških ponovitev.

	Konc. nano TiO ₂ [μM]	Število členkov	Število kolonij	Število členkov na kolonijo	Dolžina členkov [mm]	Barva [%]					Dolžina najdaljše korenine [mm]	Kloroze [%]	Nekroze [%]	Alge
						temno zelena	zelena	rumeno zelena	rumena	bela				
2.dan	0	23,33	7,67	3,06	2,35	64,13	35,87	0,00	0,00	0,00	26,19	2,78	0,00	0,00
	0,1	25,33	7,33	3,46	2,51	73,57	19,64	16,67	3,70	0,00	24,46	1,23	0,00	0,00
	1	24,67	8,00	3,08	2,43	54,59	40,06	5,34	0,00	0,00	22,17	1,39	0,00	0,00
	10	23,00	8,00	2,88	2,50	59,11	33,12	13,11	0,00	0,00	29,85	0,00	0,00	0,00
	100	24,33	7,33	3,33	2,72	52,43	40,57	7,00	0,00	0,00	28,83	1,28	0,00	0,00
	1000	24,33	8,67	2,81	2,41	40,38	44,58	12,40	3,96	0,00	22,68	1,45	0,00	0,00
4.dan	0	36,33	8,33	4,38	2,59	30,82	37,88	20,37	10,94	0,00	27,72	2,86	3,81	1,80
	0,1	40,33	7,33	5,52	2,66	31,02	29,91	17,59	21,48	0,00	29,13	1,76	0,00	1,50
	1	37,67	8,00	4,71	2,48	30,77	28,98	22,79	17,47	0,00	26,38	5,31	2,72	1,50
	10	36,67	9,00	4,09	2,60	32,49	27,43	25,84	14,24	0,00	30,72	14,60	8,42	1,00
	100	36,33	7,33	4,99	2,71	43,71	22,52	21,29	18,54	0,00	27,80	2,38	3,95	0,50
	1000	33,67	8,67	3,91	3,02	35,39	23,79	26,95	13,88	0,00	24,73	7,05	4,83	0,00
7.dan	0	78,67	9,00	8,75	2,72	17,33	38,54	32,05	10,18	5,71	33,06	0,00	0,00	2,00
	0,1	85,33	8,33	10,29	2,88	19,65	33,00	33,04	10,64	5,52	39,23	0,82	0,00	2,00
	1	81,67	9,00	9,10	2,83	19,91	32,82	32,05	15,22	0,00	34,21	0,93	0,46	2,00
	10	92,33	10,67	8,78	2,78	27,04	36,17	28,24	8,55	0,00	36,40	0,70	7,12	1,00
	100	106,33	21,67	5,57	2,89	29,80	38,47	25,44	6,29	0,00	33,56	2,69	1,33	1,00
	1000	94,00	9,33	10,12	2,82	21,28	41,17	27,19	10,37	0,00	34,09	4,05	1,08	0,50

Prisotnost alg smo opisali kot: 0 – ni alg; 1 – malo; 2 – srednje; 3 – veliko. Vrednosti se lahko razlikujejo, saj predstavljajo povprečja treh paralelek.

PRILOGA A3: Stanje male vodne leče (*L. minor*) med sedemdnevni standardni testom inhibicije rasti pri različnih koncentracijah makrodelcev TiO₂(prva ponovitev poskusa)

Vrednosti predstavljajo povprečje treh bioloških ponovitev.

	Konc. TiO ₂ [μM]	Število členkov	Število kolonij	Število členkov na kolonijo	Dolžina členkov [mm]	Barva [%]					Dolžina najdaljše korenine [mm]	Kloroze [%]	Nekroze [%]	Alge
						temno zelena	zelena	rumeno zelena	rumena	bela				
2. dan	0	19,33	7,00	2,76	2,27	36,03	39,28	24,69	0,00	0,00	17,62	8,97	0,00	0,00
	0,1	19,33	7,00	2,76	2,55	42,09	50,84	10,61	0,00	0,00	22,13	1,85	0,00	0,00
	1	19,00	7,00	2,71	2,68	59,22	40,78	0,00	0,00	0,00	18,81	3,52	1,75	0,00
	10	20,67	7,00	2,95	2,53	35,85	58,02	9,20	0,00	0,00	17,05	0,00	0,00	0,00
	100	19,67	6,67	2,94	2,48	42,41	46,58	16,52	0,00	0,00	18,66	0,00	0,00	0,00
	1000	20,00	6,67	3,00	2,38	44,44	50,79	7,14	0,00	0,00	19,26	1,59	0,00	0,00
4. dan	0	57,00	8,00	7,13	2,61	35,17	31,77	33,06	0,00	0,00	25,25	2,87	0,00	0,83
	0,1	54,00	8,00	6,75	2,69	34,99	43,24	21,77	0,00	0,00	26,21	0,72	0,00	1,00
	1	60,00	7,00	8,57	2,72	29,50	25,36	35,68	8,12	0,00	26,76	2,22	0,54	0,50
	10	41,33	7,33	5,64	2,74	16,28	30,93	39,64	13,14	0,00	26,33	0,00	0,74	1,00
	100	36,33	7,33	4,96	2,69	19,42	22,60	27,40	28,61	5,88	22,85	2,68	0,88	0,67
	1000	38,00	6,33	5,98	2,69	26,92	16,86	28,05	28,18	0,00	27,97	3,79	0,93	0,50
7. dan	0	101,33	18,00	5,71	3,04	46,04	44,33	27,97	0,00	0,92	27,58	0,00	0,00	2,00
	0,1	100,33	18,00	5,86	3,10	37,79	40,49	21,34	1,16	0,00	27,00	0,00	0,00	2,17
	1	95,67	13,33	7,19	3,06	31,06	38,44	18,12	12,39	0,00	30,78	0,37	0,31	1,50
	10	65,33	8,00	8,21	2,88	24,22	25,39	28,32	22,07	0,00	28,86	0,00	1,03	1,50
	100	49,33	7,67	6,45	2,72	14,87	24,00	46,43	14,00	2,13	24,35	2,56	5,49	1,50
	1000	58,67	7,00	8,38	2,63	18,85	50,97	20,96	9,22	0,00	31,95	5,62	1,89	1,50

Prisotnost alg smo opisali kot: 0 – ni alg; 1 – malo; 2 – srednje; 3 – veliko. Vrednosti se lahko razlikujejo, saj predstavljajo povprečja treh paralelk.

PRILOGA A 4: Stanje male vodne leče (*L. minor*) med sedemdnevnim standardnim testom inhibicije rasti pri različnih koncentracijah makrodelcev TiO₂ (druga ponovitev poskusa)

Vrednosti predstavljajo povprečje treh bioloških ponovitev.

	Konc. TiO ₂ [μM]	Število členkov	Število kolonij	Število členkov na kolonijo	Dolžina členkov [mm]	Barva [%]					Dolžina najdaljše korenine [mm]	Kloroze [%]	Nekroze [%]	Alge
						temno zelena	zelena	rumeno zelena	rumena	bela				
2. dan	0	37,67	7,33	5,11	2,68	57,84	42,16	0,00	0,00	0,00	16,31	15,69	0,00	1,00
	0,1	33,00	7,00	4,71	2,55	34,27	64,58	0,00	0,00	0,00	14,81	14,88	14,71	1,00
	1	31,00	7,00	4,43	2,81	32,11	67,89	0,00	0,00	0,00	16,43	6,68	4,38	0,83
	10	31,33	7,33	4,32	2,67	33,83	64,93	0,00	0,00	3,70	13,67	3,58	0,00	0,33
	100	29,33	7,00	4,19	2,73	28,30	65,87	3,45	3,45	5,30	12,54	27,63	4,64	0,67
	1000	27,00	7,00	3,86	2,64	24,04	70,62	0,00	8,00	8,00	12,48	5,33	9,89	0,33
4. dan	0	67,00	11,67	5,70	2,82	30,02	69,98	0,00	0,00	0,00	19,15	0,00	5,64	2,00
	0,1	58,33	8,67	7,00	2,79	30,37	24,85	40,30	6,73	0,00	19,90	8,20	8,20	1,83
	1	53,33	7,67	6,97	2,80	40,72	14,13	35,60	14,34	0,00	22,01	2,38	0,00	1,33
	10	52,00	9,00	5,76	2,82	41,91	37,00	31,63	0,00	0,00	18,98	2,05	0,85	1,17
	100	48,33	7,33	6,62	2,63	31,66	35,70	18,75	22,92	0,00	20,95	7,60	12,50	1,33
	1000	45,67	7,67	5,98	2,62	41,68	42,86	23,18	0,00	0,00	21,83	3,40	6,39	1,00
7. dan	0	80,00	13,67	5,84	2,92	33,15	26,79	31,90	11,34	0,00	27,40	1,71	3,50	1,67
	0,1	69,67	13,67	5,18	2,79	25,14	25,57	37,27	8,87	4,72	29,93	12,63	0,99	1,50
	1	69,33	11,33	6,20	2,97	27,86	11,85	41,59	18,69	0,00	30,79	0,00	0,00	1,50
	10	63,33	12,33	5,09	2,99	37,44	20,60	26,25	15,71	0,00	27,39	0,48	1,67	1,50
	100	57,67	10,67	5,49	3,09	33,21	28,06	42,15	22,95	0,00	27,95	11,72	10,77	1,67
	1000	58,67	9,67	6,12	2,97	30,59	33,11	27,75	12,82	0,00	31,73	3,51	1,13	1,50

Prisotnost alg smo opisali kot: 0 – ni alg; 1 – malo; 2 – srednje; 3 – veliko. Vrednosti se lahko razlikujejo, saj predstavljajo povprečja treh paralelek.

PRLOGA A 5: Stanje male vodne leče (*L. minor*) med sedemdnevni standardni testom inhibicije rasti pri različnih koncentracijah nanodelcev CuO (prva ponovitev poskusa)

Vrednosti predstavljajo povprečje treh bioloških ponovitev.

	Konc. nano CuO [μ M]	Število členkov	Število kolonij	Število členkov na kolonijo	Dolžina členkov [mm]	Barva [%]					Dolžina najdaljše korenine [mm]	Kloroze [%]	Nekroze [%]	Alge
						temno zelena	zelena	rumeno zelena	rumena	bela				
2. dan	0	15,33	7,00	2,19	2,66	34,94	23,19	32,35	28,56	0,00	27,38	9,21	2,22	0,50
	0,1	10,33	7,00	1,48	2,87	42,12	23,03	22,73	36,37	0,00	22,38	19,39	0,00	0,00
	1	10,67	7,00	1,52	2,81	0,00	52,73	28,48	23,64	9,09	12,86	9,09	0,00	0,00
	10	10,67	7,00	1,52	2,76	0,00	66,11	33,89	0,00	0,00	14,19	0,00	3,33	0,00
	100	11,33	8,67	1,33	2,93	0,00	52,78	32,07	45,46	0,00	2,25	0,00	0,00	0,00
	1000	11,33	9,33	1,21	2,88	0,00	46,97	26,51	26,52	0,00	13,74	0,00	38,13	0,00
4. dan	0	35,67	7,00	5,10	2,89	59,98	28,58	15,77	0,00	2,78	28,58	8,58	0,95	1,50
	0,1	13,67	7,33	1,86	2,79	47,36	23,75	0,00	16,67	26,67	7,44	6,67	4,44	0,33
	1	13,33	10,33	1,30	2,83	0,00	34,98	47,25	19,25	7,41	4,96	0,00	32,78	0,00
	10	12,00	9,00	1,34	2,70	0,00	44,55	39,09	0,00	16,36	3,33	0,00	30,71	0,00
	100	11,33	8,67	1,33	2,93	0,00	0,00	61,62	22,73	23,23	1,30	0,00	21,21	0,00
	1000	12,33	10,00	1,23	2,85	0,00	23,22	57,32	27,20	0,00	2,14	10,82	41,45	0,00
7. dan	0	59,67	11,00	5,50	2,96	51,38	20,19	16,70	10,07	4,99	30,75	2,20	0,56	3,00
	0,1	18,00	11,33	1,58	2,75	21,10	43,90	31,61	9,52	21,43	3,87	0,00	12,94	0,83
	1	13,33	10,33	1,30	2,83	0,00	34,80	37,73	22,34	15,39	3,85	0,00	39,74	0,50
	10	12,00	9,33	1,30	2,70	0,00	0,00	46,26	51,52	13,34	0,71	0,00	46,28	0,00
	100	11,33	8,67	1,33	2,93	0,00	0,00	53,53	60,61	18,18	0,37	0,00	21,21	0,00
	1000	11,67	9,67	1,21	2,85	0,00	0,00	53,28	43,69	9,09	2,14	0,00	40,41	0,00

Prisotnost alg smo opisali kot: 0 – ni alg; 1 – malo; 2 – srednje; 3 – veliko. Vrednosti se lahko razlikujejo, saj predstavljajo povprečja treh paralelek.

PRILOGA A 6: Stanje male vodne leče (*L. minor*) med sedemdnevnim standardnim testom inhibicije rasti pri različnih koncentracijah nanodelcev CuO (druga ponovitev poskusa)

Vrednosti predstavljajo povprečje treh bioloških ponovitev.

	Konc. nano CuO [μ M]	Število členkov	Število kolonij	Število členkov na kolonijo	Dolžina členkov [mm]	Barva [%]					Dolžina najdaljše korenine [mm]	Kloroze [%]	Nekroze [%]	Alge
						temno zelena	zelena	rumeno zelena	rumena	bela				
2. dan	0	21,00	7,00	3,00	3,17	63,64	36,36	0,00	0,00	0,00	30,03	8,23	0,00	0,50
	0,1	18,33	8,33	2,21	3,15	70,62	29,38	0,00	0,00	0,00	8,75	15,04	0,00	0,00
	1	19,33	10,00	2,07	2,93	79,86	20,14	0,00	0,00	0,00	6,81	1,67	0,00	0,00
	10	16,00	12,33	1,33	3,06	62,28	37,72	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,17	0,00
	100	18,00	15,00	1,20	3,05	28,16	71,84	0,00	0,00	0,00	2,04	0,00	8,09	0,00
	1000	14,33	14,00	1,02	3,18	37,26	52,82	14,88	0,00	0,00	5,08	0,00	12,14	0,00
4. dan	0	40,67	7,33	5,57	3,14	50,01	45,34	13,95	0,00	0,00	31,30	1,63	0,00	2,00
	0,1	28,67	11,00	2,65	2,88	47,96	52,04	0,00	0,00	0,00	9,18	8,00	0,00	0,50
	1	24,33	11,67	2,09	2,71	22,22	40,53	78,10	0,00	0,00	0,00	0,00	9,17	0,00
	10	18,00	13,67	1,36	3,00	0,00	39,44	60,56	0,00	0,00	0,00	0,00	6,77	0,00
	100	19,67	16,67	1,21	2,83	0,00	71,05	78,95	0,00	0,00	0,00	0,00	13,63	0,00
	1000	14,33	14,00	1,02	3,18	0,00	59,83	60,26	0,00	0,00	0,44	0,00	12,14	0,00
7. dan	0	113,00	24,67	4,60	3,33	35,11	23,14	35,10	6,65	0,00	33,16	0,00	0,00	3,00
	0,1	57,33	16,67	3,56	2,82	53,47	37,93	12,91	0,00	0,00	9,61	0,00	13,08	0,83
	1	46,67	23,67	2,13	2,53	27,59	49,08	25,22	24,75	0,00	0,00	1,04	33,43	0,33
	10	26,00	24,33	1,07	2,75	0,00	25,38	22,67	59,51	0,00	0,00	0,00	68,41	0,00
	100	22,67	18,00	1,29	2,78	0,00	44,00	32,93	50,74	5,00	0,00	0,00	40,93	0,00
	1000	14,33	14,00	1,02	3,18	0,00	0,00	79,83	46,15	7,19	0,44	0,00	83,33	0,00

Prisotnost alg smo opisali kot: 0 – ni alg; 1 – malo; 2 – srednje; 3 – veliko. Vrednosti se lahko razlikujejo, saj predstavljajo povprečja treh paralelek.

PRILOGA A 7: Rast male vodne leče (*L. minor*) med sedemdnevnim standardnim testom inhibicije rasti pri različnih koncentracijah makrodelcev CuO (prva ponovitev poskusa).

Vrednosti predstavljajo povprečje treh bioloških ponovitev.

	Konc. CuO [μM]	Število členkov	Število kolonij	Število členkov na kolonijo	Dolžina členkov [mm]	Barva [%]					Dolžina najdaljše korenine [mm]	Kloroze [%]	Nekroze [%]	Alge
						temno zelena	zelena	rumeno zelena	rumena	bela				
2. dan	0	17,67	7,00	2,52	2,33	43,45	39,94	24,92	0,00	0,00	20,38	0,00	0,00	0,67
	0,1	20,00	7,00	2,86	2,91	54,59	45,41	0,00	0,00	0,00	20,10	0,00	0,00	0,50
	1	17,33	7,00	2,48	2,91	27,08	46,99	33,33	5,56	5,56	17,43	1,85	0,00	0,00
	10	16,67	7,00	2,38	2,64	23,96	40,79	28,38	14,37	5,88	19,14	3,51	0,00	0,17
	100	15,00	8,00	1,89	2,93	0,00	78,31	21,69	0,00	0,00	3,94	0,00	0,00	0,00
	1000	14,00	10,00	1,41	3,00	7,14	73,81	17,86	14,29	7,14	2,44	14,29	0,00	0,00
4. dan	0	37,33	7,67	4,92	2,85	21,63	31,70	44,85	0,00	2,73	19,95	0,00	0,00	2,00
	0,1	40,00	8,00	5,17	2,93	40,28	39,80	19,92	0,00	0,00	18,88	0,00	0,00	2,00
	1	24,33	8,33	2,96	2,92	23,50	50,50	24,67	0,00	4,00	10,12	0,00	0,00	1,50
	10	21,00	8,00	2,66	2,63	9,09	26,58	65,17	11,12	4,55	4,10	1,85	3,03	0,50
	100	19,00	10,00	1,92	2,76	0,00	43,84	50,10	18,18	0,00	2,03	0,00	3,03	0,00
	1000	15,67	12,33	1,27	2,60	0,00	0,00	91,39	9,59	6,67	0,69	8,33	6,25	0,00
7. dan	0	43,67	10,67	4,29	2,95	11,54	28,86	23,77	35,82	0,00	21,87	0,00	0,00	3,00
	0,1	56,67	10,33	5,40	2,87	17,55	31,40	24,86	26,19	0,00	20,62	0,00	0,00	2,00
	1	27,00	8,00	3,43	2,79	7,35	31,93	46,81	15,02	4,00	10,82	0,00	0,00	1,50
	10	25,33	13,33	1,94	2,71	15,62	23,43	36,92	34,00	6,57	2,32	1,33	0,00	0,83
	100	24,00	12,67	1,90	2,64	0,00	32,45	59,54	12,02	0,00	2,37	0,00	6,88	0,00
	1000	20,33	16,00	1,28	2,63	0,00	19,79	65,49	9,50	11,55	0,56	3,03	19,96	0,00

Prisotnost alg smo opisali kot: 0 – ni alg; 1 – malo; 2 – srednje; 3 – veliko. Vrednosti se lahko razlikujejo, saj predstavljajo povprečja treh paralelk.

PRILOGA A 8: Rast male vodne leče (*L. minor*) med sedemdnevni standardni testom inhibicije rasti pri različnih koncentracijah makrodelcev CuO (druga ponovitev poskusa).

Vrednosti predstavljajo povprečje treh bioloških ponovitev.

	Konc. CuO [μM]	Število členkov	Število kolonij	Število členkov na kolonijo	Dolžina členkov [mm]	Barva [%]					Dolžina najdaljše korenine [mm]	Kloroze [%]	Nekroze [%]	Alge
						temno zelena	zelena	rumeno zelena	rumena	bela				
2. dan	0	14,67	7,00	2,10	2,58	58,73	20,48	31,19	0,00	0,00	21,93	11,43	0,00	0,33
	0,1	14,33	7,00	2,05	2,88	42,05	22,91	32,48	7,70	0,00	26,81	5,13	0,00	0,17
	1	15,33	7,00	2,19	2,94	41,67	21,43	34,82	6,25	0,00	15,48	2,38	2,08	0,00
	10	13,67	7,00	1,95	3,01	52,22	22,54	20,00	27,86	0,00	17,38	0,00	6,99	0,00
	100	14,00	8,00	1,75	2,73	29,66	34,43	28,97	10,42	0,00	1,90	5,16	2,38	0,00
	1000	11,67	9,67	1,21	2,82	46,37	29,23	27,48	20,00	0,00	4,48	0,00	6,67	0,00
4. dan	0	49,33	8,67	5,79	3,05	63,82	34,48	5,10	0,00	0,00	25,67	2,22	0,00	2,00
	0,1	26,00	8,00	3,26	2,94	31,92	29,15	37,48	4,36	0,00	28,96	1,33	1,11	1,50
	1	20,67	8,33	2,48	2,80	28,94	21,40	26,47	25,92	17,72	16,07	1,59	2,98	1,17
	10	17,67	8,00	2,24	2,79	38,85	39,34	34,38	0,00	18,01	4,56	0,00	6,13	0,00
	100	13,00	9,67	1,37	2,88	0,00	30,26	72,48	0,00	11,03	0,45	0,00	31,52	0,00
	1000	13,33	11,67	1,14	2,81	0,00	39,43	60,26	16,03	8,33	0,00	0,00	8,12	0,00
7. dan	0	70,67	12,67	5,99	3,23	56,56	26,05	17,39	0,00	0,00	28,72	2,54	0,00	3,00
	0,1	31,67	8,00	4,01	2,95	25,71	22,87	46,88	6,83	0,00	31,21	8,32	6,92	2,00
	1	24,67	9,67	2,65	2,74	23,39	21,04	37,81	16,48	3,85	18,70	0,00	3,95	2,00
	10	22,33	9,33	2,40	2,66	21,72	39,09	29,59	20,00	8,79	1,90	0,00	10,68	0,33
	100	14,33	11,33	1,31	2,82	0,00	29,97	72,68	7,34	0,00	0,00	0,00	66,62	0,00
	1000	13,33	11,67	1,14	2,81	0,00	0,00	91,67	16,67	8,33	0,00	0,00	64,96	0,00

Prisotnost alg smo opisali kot: 0 – ni alg; 1 – malo; 2 – srednje; 3 – veliko. Vrednosti se lahko razlikujejo, saj predstavljajo povprečja treh paralelk.

PRILOGA A 9: Stanje male vodne leče (*L. minor*) na koncu sedemdnevnega standardnega testa inhibicije rasti pri različnih koncentracijah nanodelcev TiO₂ s standardnimi napakami

Vrednosti predstavljajo povprečje dveh poskusov (N=2), vsak poskus je imel po tri biološke ponovitve.

Koncentracija nano TiO ₂ [μM]	Število členkov		Dolžina členkov [mm]	Barva [%]					Dolžina najdaljše korenine [mm]	Kloroze [%]	Nekroze [%]	Alge	
	Število členkov	Število kolonij		na kolonijo	Temno zelena	Zelena	Rumeno zelena	Rumena					Bela
0	91,33 ± 9,95	18 ± 5,72	6,3 ± 1,56	3,02 ± 0,21	47,06 ± 22,36	28,24 ± 10,82	18,65 ± 9,27	5,09 ± 3,24	0,95 ± 1,35	29,2 ± 3,02	0 ± 0	0 ± 0	2,08 ± 0,12
0,1	98,17 ± 10,19	16,67 ± 5,44	7,37 ± 1,91	2,86 ± 0,02	29,53 ± 6,5	28,43 ± 6,4	30,78 ± 5,5	9,42 ± 2,18	1,84 ± 1,66	31,42 ± 5,05	0,74 ± 0,34	0 ± 0	2 ± 0
1	99,33 ± 12,59	16,17 ± 4,75	7,07 ± 1,32	2,82 ± 0,06	25,57 ± 4,29	24,35 ± 6,17	41,53 ± 6,1	8,55 ± 4,99	0 ± 0	30,28 ± 3,16	0,76 ± 0,63	0,23 ± 0,33	2 ± 0
10	97,83 ± 5,27	16,83 ± 3,96	6,64 ± 1,48	2,88 ± 0,07	32,6 ± 5,78	22,67 ± 9,09	34,95 ± 7,05	9,77 ± 1,64	0 ± 0	30,8 ± 3,72	1 ± 0,72	4,06 ± 3,77	1,5 ± 0,32
100	100,17 ± 12,34	23,67 ± 4,48	4,65 ± 1,03	2,91 ± 0,07	30,33 ± 2,84	33,55 ± 8,91	27,84 ± 7,48	8,28 ± 3,78	0 ± 0	28,43 ± 4,08	1,63 ± 1,19	2,67 ± 1,07	1,5 ± 0,32
1000	91,67 ± 6,04	18,67 ± 6,45	6,85 ± 2,17	2,91 ± 0,13	28,14 ± 5,42	39,22 ± 5,26	21,7 ± 5,66	10,94 ± 3,9	0 ± 0	29,06 ± 3,68	2,42 ± 1,64	1,81 ± 0,7	1,25 ± 0,47

PRILOGA A 10: Stanje male vodne leče (*L. minor*) na koncu sedemdnevnega standardnega testa inhibicije rasti pri različnih koncentracijah makrodelcev TiO₂ s standardnimi napakami

Vrednosti predstavljajo povprečje dveh poskusov (N=2), vsak poskus je imel po tri biološke ponovitve.

Koncentracija TiO ₂ [μ M]	Število členkov		Dolžina členkov [mm]	Barva [%]					Dolžina najdaljše korenine [mm]	Kloroze [%]	Nekroze [%]	Alge	
	Število členkov	Število kolonij		na kolonijo	Temno zelena	Zelena	Rumeno zelena	Rumena					Bela
0	90,67 ± 8,12	15,83 ± 3,03	5,77 ± 1,01	2,98 ± 0,11	40,25 ± 9,59	36,44 ± 5,88	21,27 ± 9,46	1,89 ± 3,24	0,15 ± 1,32	27,49 ± 2,01	0,86 ± 0	1,75 ± 0	1,83 ± 0
	0,1	85 ± 7,51	15,83 ± 3,68	5,52 ± 1,57	2,95 ± 0,09	31,46 ± 6,26	33,03 ± 3,6	29,31 ± 4,25	4,63 ± 3,32	1,57 ± 1,66	28,47 ± 4,04	6,32 ± 0,37	0,49 ± 0
1		82,5 ± 6,79	12,33 ± 1,48	6,7 ± 0,74	3,02 ± 0,1	29,46 ± 4,61	25,14 ± 3,15	29,86 ± 5,66	15,54 ± 3,31	0 ± 0	30,78 ± 2,26	0,18 ± 0,65	0,15 ± 0,36
	10	64,33 ± 9,78	10,17 ± 1,07	6,65 ± 0,71	2,93 ± 0,04	30,83 ± 2,06	22,99 ± 3,72	27,29 ± 4,51	18,89 ± 5,22	0 ± 0	28,13 ± 2,5	0,24 ± 0,49	1,35 ± 3,76
100		53,5 ± 18,8	9,17 ± 6,13	5,97 ± 0,78	2,9 ± 0,12	18,5 ± 5,41	26,03 ± 7,18	44,29 ± 10,58	10,83 ± 5,81	0,35 ± 0,5	26,15 ± 3,1	7,14 ± 1,37	8,13 ± 2,79
	1000	58,67 ± 12,79	8,33 ± 0,92	7,25 ± 0,87	2,8 ± 0,13	24,72 ± 2,34	42,04 ± 4,13	24,36 ± 3,44	8,88 ± 2,18	0 ± 0	31,84 ± 1,42	4,57 ± 1,52	1,51 ± 0,83

PRILOGA A 12: Stanje male vodne leče (*L. minor*) na koncu sedemdnevnega standardnega testa inhibicije rasti pri različnih koncentracijah makrodelcev CuO s standardnimi napakami

Vrednosti predstavljajo povprečje dveh poskusov (N=2), vsak poskus je imel po tri biološke ponovitve.

Koncentracija CuO [μ M]	Število členkov		Dolžina členkov [mm]	Barva [%]						Dolžina najdaljše korenine [mm]	Kloroze [%]	Nekroze [%]	Alge
	Število členkov	Število kolonij		Število na kolonijo	Temno zelena	Zelena	Rumeno zelena	Rumena	Bela				
0	57,17 ± 8,56	11,67 ± 1,07	5,14 ± 0,45	3,09 ± 0,04	34,05 ± 6,67	27,46 ± 6,79	20,58 ± 5,51	17,91 ± 3,17	0 ± 1,18	25,3 ± 1,52	1,27 ± 0,78	0 ± 2,43	3 ± 0,43
	44,17 ± 16,58	9,17 ± 0,95	4,7 ± 1,2	2,91 ± 0,13	21,63 ± 7,53	27,14 ± 7,8	35,87 ± 6,18	15,37 ± 2,98	0 ± 6,41	25,92 ± 8,44	4,16 ± 7,68	3,46 ± 3,87	2 ± 0,24
1	25,83 ± 18,25	8,83 ± 0,99	3,04 ± 1,6	2,77 ± 0,07	14,14 ± 8,99	26,49 ± 8,21	42,31 ± 4,32	15,75 ± 5,38	1,31 ± 3,63	14,76 ± 8,64	0 ± 0	1,98 ± 13,06	± 0,32
	23,83 ± 17,95	11,33 ± 1,73	2,17 ± 1,25	2,69 ± 0,11	16,07 ± 12,6	31,26 ± 6,95	33,26 ± 7,23	14,67 ± 11	4,75 ± 4,66	2,11 ± 8,69	0,67 ± 0,34	5,34 ± 14,96	± 0,47
100	19,17 ± 14,85	12 ± 0,94	1,61 ± 1,38	2,73 ± 0,13	0 ± 9,91	26,22 ± 10,34	66,11 ± 16,34	7,68 ± 17,29	0 ± 4,29	1,18 ± 8,84	0 ± 6,71	36,75 ± 9,61	0 ± 0,54
	16,83 ± 14,92	13,83 ± 0,47	1,21 ± 1,58	2,72 ± 0,06	0 ± 9,73	9,9 ± 10,75	78,58 ± 12,25	4,36 ± 14,01	7,16 ± 2,14	0,28 ± 9,39	1,52 ± 1,57	42,46 ± 13,57	0 ± 0,47

PRILOGA B 1: Potencialna fotokemična učinkovitost pri mali vodni leči (*L. minor*) po sedemdnevem standardnem testu inhibicije rasti pri različnih koncentracijah nanodelcev TiO₂ s standardnimi napakami

Vrednosti predstavljajo povprečje treh bioloških ponovitev.

Konc. nano TiO ₂ [μM]	1. ponovitev		2. ponovitev	
	1.meritev	2.meritev	1.meritev	2.meritev
0	0,61 ± 0,02	0,61 ± 0,03	0,62 ± 0,04	0,68 ± 0,02
0,1	0,58 ± 0,01	0,62 ± 0,02	0,68 ± 0,02	0,66 ± 0,02
1	0,52 ± 0,05	0,53 ± 0,05	0,7 ± 0,02	0,68 ± 0,02
10	0,60 ± 0,04	0,60 ± 0,04	0,63 ± 0,01	0,66 ± 0,02
100	0,51 ± 0,09	0,51 ± 0,1	0,65 ± 0,02	0,65 ± 0,02
1000	0,49 ± 0,1	0,53 ± 0,08	0,55 ± 0,04	0,61 ± 0,02

PRILOGA B 2: Potencialna fotokemična učinkovitost pri mali vodni leči (*L. minor*) po sedemdnevem standardnem testu inhibicije rasti pri različnih koncentracijah makrodelcev TiO₂ s standardnimi napakami

Vrednosti predstavljajo povprečje treh bioloških ponovitev.

Konc. TiO ₂ [μM]	1. ponovitev		2. ponovitev	
	1.meritev	2.meritev	1.meritev	2.meritev
0	0,64 ± 0,03	0,64 ± 0,02	0,64 ± 0,03	0,64 ± 0,02
0,1	0,59 ± 0,01	0,57 ± 0,01	0,59 ± 0,01	0,57 ± 0,01
1	0,64 ± 0,03	0,62 ± 0,01	0,64 ± 0,03	0,62 ± 0,01
10	0,59 ± 0,03	0,53 ± 0,05	0,59 ± 0,03	0,53 ± 0,05
100	0,6 ± 0,04	0,55 ± 0,07	0,6 ± 0,04	0,55 ± 0,07
1000	0,62 ± 0,02	0,6 ± 0,04	0,62 ± 0,02	0,6 ± 0,04

PRILOGA B 3: Potencialna fotokemična učinkovitost pri mali vodni leči (*L. minor*) po sedemdnevem standardnem testu inhibicije rasti pri različnih koncentracijah nanodelcev CuO s standardnimi napakami

Vrednosti predstavljajo povprečje treh bioloških ponovitev.

Konc. nano CuO [μ M]	1. ponovitev	2. ponovitev
0	$0,7 \pm 0,02$	$0,7 \pm 0,01$
0,1	$0,5 \pm 0,02$	$0,57 \pm 0,01$
1	$0,46 \pm 0$	$0,56 \pm 0,03$
10	$0,44 \pm 0,03$	$0,55 \pm 0,02$
100	$0,43 \pm 0,02$	$0,58 \pm 0,01$
1000	$0,19 \pm 0,03$	$0,55 \pm 0,06$

PRILOGA B 4: Potencialna fotokemična učinkovitost pri mali vodni leči (*L. minor*) po sedemdnevem standardnem testu inhibicije rasti pri različnih koncentracijah makrodelcev CuO s standardnimi napakami

Vrednosti predstavljajo povprečje treh bioloških ponovitev.

Konc. CuO [μ M]	1. ponovitev	2. ponovitev
0	$0,61 \pm 0,04$	$0,69 \pm 0,05$
0,1	$0,6 \pm 0,02$	$0,54 \pm 0,02$
1	$0,55 \pm 0,03$	$0,54 \pm 0,01$
10	$0,58 \pm 0,01$	$0,54 \pm 0,01$
100	$0,52 \pm 0$	$0,43 \pm 0,02$
1000	$0,46 \pm 0$	$0,38 \pm 0,02$

PRILOGA C 1: Specifična encimska aktivnost (SEA) encimov G-POD, GR, A-POD in CAT ob različnih koncentracijah nanodelcev TiO₂ v gojišču

Vrednosti SEA 1 in SEA 2 predstavljajo povprečje treh bioloških ponovitev

Encim	Konc.	SEA 1 [μM/min*mg]	SEA 2 [μM/min*mg]	Povprečje SEA	SD
	nano TiO ₂ [μM]				
G-POD	0	73,66	252,38	163,02	126,37
	0,1	58,90	177,52	118,21	83,88
	1	37,31	252,40	144,86	152,09
	10	59,61	318,47	189,04	183,04
	100	71,51	269,94	170,73	140,31
	1000	56,96	236,12	146,54	126,69
	GR	0	17,30	17,73	17,52
0,1		11,96	19,08	15,52	5,03
1		9,80	20,04	14,92	7,24
10		9,67	20,88	15,28	7,93
100		10,79	17,43	14,11	4,69
1000		11,22	19,92	15,57	6,16
A-POD		0	23,38	60,95	42,17
	0	15,51	44,97	30,24	20,83
	1	13,48	54,84	34,16	29,24
	10	14,95	59,28	37,11	31,35
	100	15,09	51,84	33,46	25,99
	1000	14,18	47,25	30,72	23,38
	CAT	0	10,56	17,44	14,00
0,1		8,18	17,10	12,64	6,31
1		7,08	18,19	12,63	7,85
10		5,67	15,02	10,34	6,61
100		6,63	14,97	10,80	5,90
1000		7,16	17,13	12,15	7,05

PRILOGA C 2: Specifična encimska aktivnost (SEA) encimov G-POD, GR, A-POD in CAT ob različnih koncentracijah makrodelcev TiO₂ v gojišču

Vrednosti SEA 1 in SEA 2 predstavljajo povprečje treh bioloških ponovitev

Encim	Konc. TiO ₂ [μM]	SEA 1 [μM/min*mg]	SEA 2 [μM/min*mg]	Povprečje SEA	SD
G-POD	0	114,49	191,99	153,24	54,80
	0,1	125,33	90,63	107,98	24,54
	1	95,27	80,74	88,00	10,28
	10	53,75	150,22	101,98	68,21
	100	40,04	120,02	80,03	56,55
	1000	67,24	135,63	101,44	48,36
GR	0	17,58	15,62	16,60	1,38
	0,1	16,94	13,41	15,17	2,49
	1	17,06	17,45	17,25	0,28
	10	12,87	17,47	15,17	3,25
	100	14,54	14,88	14,71	0,24
	1000	15,54	15,18	15,36	0,25
A-POD	0	55,70	41,14	48,42	10,30
	0	42,76	34,86	38,81	5,59
	1	36,55	27,25	31,90	6,58
	10	35,97	34,65	35,31	0,93
	100	34,80	32,31	33,55	1,76
	1000	68,65	33,49	51,07	24,86
CAT	0	12,91	16,07	14,49	2,24
	0,1	12,51	13,34	12,92	0,59
	1	12,16	11,86	12,01	0,21
	10	10,97	12,31	11,64	0,94
	100	11,90	13,78	12,84	1,33
	1000	9,71	13,15	11,43	2,43

PRILOGA C 3: Specifična encimska aktivnost (SEA) encimov G-POD, GR, A-POD in CAT ob različnih koncentracijah nanodelcev CuO v gojišču

Encim	Konc. nano CuO [μM]	SEA 1 [$\mu\text{M}/\text{min}*\text{mg}$]	SEA 2 [$\mu\text{M}/\text{min}*\text{mg}$]	Povprečje SEA	SD
G-POD	0	94,80	91,95	93,38	2,02
	0,1	609,62	276,53	443,08	235,53
	1	502,13	558,58	530,35	39,92
	10	2346,67	721,61	1534,14	1149,09
	100	2971,11	759,06	1865,09	1564,16
	1000	6571,43	642,58	3607,01	4192,34
GR	0	15,07	14,06	14,56	0,71
	0,1	11,39	14,01	12,70	1,85
	1	9,78	17,47	13,62	5,44
	10	23,87	33,08	28,48	6,51
	100	16,77	28,64	22,71	8,39
	1000	13,40	54,90	34,15	29,34
A-POD	0	50,34	51,62	50,98	0,90
	0	50,52	60,78	55,65	7,25
	1	48,69	57,38	53,03	6,14
	10	141,53	109,62	125,58	22,56
	100	182,86	157,36	170,11	18,03
	1000	565,94	295,81	430,88	191,01
CAT	0	15,40	11,40	13,40	2,83
	0,1	12,27	6,10	9,18	4,36
	1	13,08	6,43	9,75	4,70
	10	11,99	5,69	8,84	4,45
	100	10,36	5,43	7,89	3,49
	1000	8,76	4,08	6,42	3,31

PRILOGA C 4: Specifična encimska aktivnost (SEA) encimov G-POD, GR, A-POD in CAT ob različnih koncentracijah makrodelcev CuO v gojišču.

Encim	Konc. CuO [μM]	SEA 1 [μM/min*mg]	SEA 2 [μM/min*mg]	Povprečje SEA	SD
G-POD	0	68,50	133,75	101,12	46,14
	0,1	102,23	338,35	220,29	166,96
	1	164,22	364,64	264,43	141,72
	10	348,29	641,83	495,06	207,57
	100	667,78	1234,42	951,10	400,67
	1000	1204,75	2147,59	1676,17	666,69
GR	0	12,46	15,06	13,76	1,84
	0,1	9,59	10,53	10,06	0,66
	1	7,18	13,30	10,24	4,33
	10	4,04	8,79	6,41	3,36
	100	15,49	7,78	11,64	5,45
	1000	8,97	11,56	10,26	1,83
A-POD	0	36,20	43,27	39,74	5,00
	0	29,62	40,90	35,26	7,98
	1	33,37	37,30	35,34	2,78
	10	37,84	43,34	40,59	3,89
	100	38,21	49,76	43,98	8,17
	1000	68,04	112,27	90,15	31,28
CAT	0	13,38	11,14	12,26	1,59
	0,1	15,12	9,48	12,30	3,99
	1	11,97	9,07	10,52	2,05
	10	11,21	8,15	9,68	2,16
	100	10,48	7,10	8,79	2,39
	1000	11,04	6,55	8,79	3,17

PRILOGA D: Rezultati enosmernega testa ANOVA za vse opazovane parametre, razen barve členkov.

Vrednosti so izračinane iz povprečji obeh poskusov (N=2) (s po tremi biološkimi ponovitvami) ter standarnih deviacij.

Merjeni parameter	nano TiO ₂	TiO ₂	nano CuO	CuO
Število členkov	0,9868	0,1314	0,1027	0,0590
Število kolonij	0,9764	0,0837	0,9544	0,2624
Število členkov na kolonijo	0,9679	0,6977	0,0071	0,0060
Dolžina členkov [mm]	0,9193	0,8597	0,1966	0,0700
Dolžina najdaljše korenine [mm]	0,9981	0,0467	0,0001	0,0023
Kloroze [%]	0,4573	0,5054	0,5638	0,6646
Nekroze [%]	0,3314	0,0382	0,0366	0,3059
Prisotnost alg	0,6552	0,4414	0,0001	0,0001
Fotokemična učinkovitost	0,4514	0,0826	0,3148	0,0263
SEA encima CAT	0,4502	0,4502	0,6342	0,6372
SEA encima A-POD	0,9968	0,5038	0,0177	0,0442
SEA encima G-POD	0,9960	0,7266	0,5125	0,0233
SEA encima GR	0,9937	0,6923	0,5149	0,4741