

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Tea ROMIH

**KOPIČENJE CINKA ALI BAKRA V MODELNEM ORGANIZMU
(*Porcellio scaber*, Isopoda, Crustacea) V PRIMERU HRANJENJA Z
NANODELCI CINKOVEGA OKSIDA ALI NANODELCI BAKRA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ACCUMULATION OF ZINC OR COPPER IN THE MODEL
ORGANISM (*Porcellio scaber*, Isopoda, Crustacea) FED ON ZINC
OXIDE NANOPARTICLES OR COPPER NANOPARTICLES**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Katedri za zoologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je dne 14. 5. 2010 sprejela temo in za mentorico diplomske naloge imenovala prof. dr. Damjano Drobne.

Komisija za oceno in zagovor:

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

Članica: prof. dr. Damjana Drobne, mentorica
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Primož Zidar, recenzent
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 29. 8. 2011

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

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tea Romih

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	591.5:546:595.3(043.2)=163.6
KG	asimilacija kovin/baker/bioakumulacija/cink/izločanje kovin/nanodelci/ kopenski enakonožec <i>Porcellio scaber</i>
AV	ROMIH, Tea
SA	DROBNE, Damjana (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2011
IN	KOPIČENJE CINKA ALI BAKRA V MODELNEM ORGANIZMU (<i>Porcellio scaber</i> , Isopoda, Crustacea) V PRIMERU HRANJENJA Z NANODELCI CINKOVEGA OKSIDA ALI NANODELCI BAKRA
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIII, 94 str., 2 pregl., 38 sl., 57 pril., 142 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V zadnjem desetletju naraščata proizvodnja in potrošnja izdelkov, ki vsebujejo nanodelce, posledično pa tudi njihova prisotnost v okolju. Trenutno dostopne raziskave kažejo, da imajo nanodelci potencial za bioakumulacijo v živih organizmih ter za prenos po prehranjevalnih verigah. Naša raziskava se je ukvarjala s privzemom in izločanjem kovin iz kovinskih nanodelcev v kopenskih raki enakonožcih (<i>Porcellio scaber</i>), ki so se izkazali kot primerni modelni organizmi za raziskave delovanja kopenskih onesnažil, predvsem težkih kovin. Zanimalo nas je, kakšen je potencial za kopičenje nanodelcev cinkovega oksida in nanodelcev bakra v telesu modelnih organizmov, ali je ta potencial drugačen od potenciala cinkovih in bakrovih ionov, ali se s hrano zaužite kovine lahko po določenem času izločijo iz telesa ter kakšne so razlike med izločanjem teh kovin glede na kemijsko obliko kovine, iz katere izvirajo. Hkrati smo opazovali dinamiko prehranjevalnih parametrov v času hranjenja modelnih organizmov s tretirano in netretirano hrano. Učinka nanodelcev cinkovega oksida in nanodelcev bakra na stopnjo prehranjevanja, stopnjo iztrebljanja ter učinkovitost asimilacije hrane večinoma nismo mogli ločiti od učinkov cinkovih oziroma bakrovih ionov. Enako velja za asimilacijo kovin iz različnih spojin cinka in bakra. V času hranjenja s čisto hrano se je cink učinkovito izločil iz telesa, medtem ko se je baker zadržal v hepatopankreasu modelnih organizmov. Naše izsledke pojasnujemo z vedno bolj uveljavljeno hipotezo o odtapljanju ionov s površine nanodelcev kovin in kovinskih oksidov v stiku z biološkimi mediji.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd

DC 591.5:546:595.3(043.2)=163.6

CX bioaccumulation/metal clearance/copper/metal assimilation/nanoparticles/
 terrestrial isopod *Porcellio scaber*/zinc

AU ROMIH, Tea

AA DROBNE, Damjana (supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111

PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of biology

PY 2011

TI ACCUMULATION OF ZINC OR COPPER IN THE MODEL ORGANISM
 (*Porcellio scaber*, Isopoda, Crustacea) FED ON ZINC OXIDE
 NANOPARTICLES OR COPPER NANOPARTICLES

DT Graduation thesis, University studies

NO XIII, 94 p., 2 tab., 38 fig., 57 ann., 142 ref.

LA sl

AL sl/en

AB There has been an increase of production and consumption of nanoparticle-containing products in the last decade and consequentially an increase of their presence in the environment. According to currently available data, nanoparticles show a potential for bioaccumulation in living organisms and a potential for transfer through food chains. Our research focuses on assimilation and clearance of metals from metal-containing nanoparticles in terrestrial isopods (*Porcellio scaber*), demonstrated to be suitable organisms for toxicity testing of pollutants in the terrestrial environment, especially metals. Our aim was to study the potential of ZnO nanoparticles and Cu nanoparticles for bioaccumulation in the model organisms, the difference in bioaccumulation of nanoparticles in comparison to their corresponding ions, the possibility for clearance of metals consumed with food after a certain period of time, and, finally, the differences between clearance patterns of metals in relation to the chemical form of metal they originated from. We also observed the dynamics of feeding parameters during feeding on treated and non-treated food. Generally, we could not distinguish between the effects of nanoparticles and their corresponding ions on feeding rate, fecal production rate or food assimilation efficiency. The same was true for assimilation of zinc and copper from different sources. Zinc was efficiently cleared from animals feeding on untreated food while copper remained accumulated in the hepatopancreas. We explain our results with the increasingly accepted hypothesis on dissolution of metal and metal oxide nanoparticles in contact with biological media.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO TABEL	XI
KAZALO PRILOG	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XIII
1. UVOD	1
1.1 NAMEN IN IZHODIŠČA.....	2
1.2 HIPOTEZE	2
2. PREGLED OBJAV	3
2.1 NANODELCI.....	3
2.1.1 (Eko)toksikološka problematika nanodelcev	4
2.1.2 Reaktivnost kovinskih nanodelcev, vezana na posebne lastnosti nanometrijske velikostne skale	4
2.1.2.1 Odtapljanje ionov s površine.....	5
2.1.2.2 Katalitične lastnosti	6
2.1.2.3 Redoks modifikacije površine	6
2.1.3 Učinki nanodelcev na organizme.....	7
2.1.3.1 Strupenost.....	7
2.1.3.2 Bioakumulacija, biomagnifikacija in prenos po prehranjevalnih verigah	8
2.2 NANODELCI, UPORABLJENI V NAŠI RAZISKAVI	16
2.2.1 Nanodelci cinkovega oksida	16
2.2.1.1 Karakterizacija	16
2.2.1.2 Lastnosti cinkovega oksida v vodnih medijih	17
2.2.1.3 Strupenost in bioakumulacija	18
2.2.2 Nanodelci elementarnega bakra	20
2.2.2.1 Karakterizacija	20
2.2.2.2 Lastnosti nanodelcev bakra v vodnih medijih.....	21
2.2.2.3 Strupenost in bioakumulacija	22
2.3 MODELNI ORGANIZMI – ENAKONOŽNI RAKI VRSTE <i>Porcellio scaber</i> ..	23
2.3.1 Zgradba in delovanje prebavil v povezavi z metabolizmom kovin	24
3. MATERIAL IN METODE	27
3.1 GOJENJE POSKUSNIH ORGANIZMOV V LABORATORIJU	27

3.2	PREHRANJEVALNI POSKUSI	27
3.2.1	Priprava poskusnega materiala.....	28
3.2.2	Priprava ter nanos suspenzij in raztopin.....	28
3.2.2.1	Poskus s cinkom.....	28
3.2.2.2	Poskus z bakrom.....	29
3.2.3	Izvedba poskusov	29
3.2.3.1	Poskus s cinkom.....	29
3.2.3.2	Poskus z bakrom.....	31
3.3	ANALITSKA METODA S PLAMENSKO ATOMSKO ABSORBCIJSKO SPEKTROMETRIJO (FAAS).....	33
3.3.1	Priprava poskusnega materiala za analizo s FAAS.....	34
3.3.2	Analiza s FAAS	35
3.4	IZRAČUNI PREHRANSKIH IN DRUGIH INDEKSOV	36
3.5	STATISTIČNE METODE	37
3.6	GRAFIČNI PRIKAZ REZULTATOV	37
4.	REZULTATI.....	38
4.1	POSKUS S CINKOM	38
4.1.1	Vpliv izpostavljenosti cinku na prehranjevalne parametre.....	38
4.1.1.1	Stopnja prehranjevanja (SP) in učinkovitost asimilacije hrane (UA)	38
4.1.1.2	Stopnja iztrebljanja (SI)	40
4.1.2	Vsebnost cinka v modelnem organizmu	42
4.1.2.1	Vsebnost cinka v prebavnih žlezah	42
4.1.2.2	Vsebnost cinka v črevesu	44
4.1.2.3	Vsebnost cinka v preostanku telesa.....	46
4.1.2.4	Celokupna vsebnost cinka v telesu.....	48
4.1.3	Kopičenje cinka v modelnem organizmu	50
4.1.3.1	Ocena učinkovitosti asimilacije cinka (UA_{Zn})	50
4.1.3.2	Ocena bioakumulacijskega faktorja (BAF).....	51
4.2	POSKUS Z BAKROM.....	52
4.2.1	Vpliv izpostavljenosti bakru na prehranjevalne parametre.....	52
4.2.1.1	Stopnja prehranjevanja (SP).....	52
4.2.1.2	Učinkovitost asimilacije hrane (UA).....	54
4.2.1.3	Stopnja iztrebljanja (SI)	56
4.2.2	Vsebnost bakra v modelnem organizmu	58
4.2.2.1	Vsebnost bakra v prebavnih žlezah	58
4.2.2.2	Vsebnost bakra v črevesu	60
4.2.2.3	Vsebnost bakra v preostanku telesa	62
4.2.2.4	Celokupna vsebnost bakra v telesu	64

4.2.3	Kopičenje bakra v modelnem organizmu.....	66
4.2.3.1	Ocena učinkovitosti asimilacije bakra (UA_{Cu})	66
4.2.3.2	Ocena bioakumulacijskega faktorja (BAF).....	67
5.	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	68
5.1	RAZPRAVA	68
5.1.1	Poskus s cinkom	68
5.1.1.1	Prehranjevalni parametri v odvisnosti od čiste in tretirane hrane	68
5.1.1.2	Razporejanje cinka v telesnih delih enakonožcev in izločanje iz telesa	69
5.1.1.3	Akumulacija cinka v telesu enakonožcev	73
5.1.2	Poskus z bakrom	75
5.1.2.1	Prehranjevalni parametri v odvisnosti od čiste in tretirane hrane	75
5.1.2.2	Razporejanje bakra v telesnih delih enakonožcev in izločanje iz telesa	76
5.1.2.3	Akumulacija bakra v telesu enakonožcev	78
5.2	SKLEPI	80
6.	POVZETEK.....	82
7.	VIRI	83
ZAHVALA		
PRILOGE		

KAZALO SLIK

Slika 1. Transmisijska elektronska mikrofografija vodne suspenzije nanodelcev ZnO.....	17
Slika 2. Vrstična elektronska mikrofografija mikrodelcev (a) in nanodelcev (b) ZnO.	17
Slika 3. a) transmisijska elektronska mikrofografija uporabljenih nanodelcev Cu na mrežici za TEM, b) vrstična elektronska mikrofografija uporabljenih nanodelcev Cu.	21
Slika 4. a) skica raka enakonožca (<i>Porcellio scaber</i>), b) skica prebavnega sistema <i>P. scaber</i> , c) mikrofografija vrstične elektronske mikroskopije ene cevke prebavnih žlez, d) mikrofografija vrstične elektronske mikroskopije posameznih celic apikalnega dela prebavnih žlez (ena celica je označena), e) prečni prerez prebavne žleze, narejen s svetlobno mikroskopijo (ena celica je označena).....	25
Slika 5. Shema prehranjevalnega poskusa s cinkom.....	30
Slika 6. Shema prvega prehranjevalnega poskusa z bakrom (poskus št. 33).	32
Slika 7. a) nastanek atomskega absorpcijskega spektra, b) princip vzbujevanja elektronov ob presvetlitvi s svetlobo karakterističnih valovnih dolžin.	33
Slika 8. Idealizirana ter odklonska krivulja razmerja med koncentracijo in absorbanco vzorca.....	34
Slika 9. 14-dnevna serija: stopnja prehranjevanja <i>Porcellio scaber</i> po 14 dneh hranjenja z listi leske, tretiranimi s cinkovimi spojinami.....	38
Slika 10. 14-dnevna serija: učinkovitost asimilacije hrane v <i>Porcellio scaber</i> po 14 dneh hranjenja z listi leske, tretiranimi s cinkovimi spojinami.....	39
Slika 11. 14-dnevna serija: stopnja iztrebljanja <i>Porcellio scaber</i> po 14 dneh hranjenja z listi leske, tretiranimi s cinkovimi spojinami.....	40
Slika 12. 14+14-dnevna serija: stopnja iztrebljanja <i>Porcellio scaber</i> po 14 dneh hranjenja z netretiranimi listi leske, predhodno 14 dni hranjenih z listi leske, tretiranimi s cinkovimi spojinami.	41
Slika 13. 14-dnevna serija: izmerjena koncentracija Zn v prebavnih žlezah <i>Porcellio scaber</i> po 14 dneh hranjenja z listi leske, tretiranimi s cinkovimi spojinami.	42
Slika 14. 14+14-dnevna serija: izmerjena koncentracija Zn v prebavnih žlezah <i>Porcellio scaber</i> po 14 dneh hranjenja z netretiranimi listi leske, predhodno 14 dni hranjenih z listi leske, tretiranimi s cinkovimi spojinami.....	43

Slika 15. 14-dnevna serija: izmerjena koncentracija Zn v črevesu <i>Porcellio scaber</i> po 14 dneh hranjenja z listi leske, tretiranimi s cinkovimi spojinami.	44
Slika 16. 14+14-dnevna serija: izmerjena koncentracija Zn v črevesu <i>Porcellio scaber</i> po 14 dneh hranjenja z netretiranimi listi leske, predhodno 14 dni hranjenih z listi leske, tretiranimi z s cinkovimi spojinami.	45
Slika 17. 14-dnevna serija: izmerjena koncentracija Zn v preostanku telesa <i>Porcellio scaber</i> po 14 dneh hranjenja z listi leske, tretiranimi s cinkovimi spojinami.	46
Slika 18. 14+14-dnevna serija: izmerjena koncentracija Zn v preostanku telesa <i>Porcellio scaber</i> po 14 dneh hranjenja z netretiranimi listi leske, predhodno 14 dni hranjenih z listi leske, tretiranimi s cinkovimi spojinami.	47
Slika 19. 14-dnevna serija: izračunana celokupna koncentracija Zn v telesu <i>Porcellio scaber</i> po 14 dneh hranjenja z listi leske, tretiranimi s cinkovimi spojinami.	48
Slika 20. 14+14-dnevna serija: izračunana celokupna koncentracija Zn v telesu <i>Porcellio scaber</i> po 14 dneh hranjenja s cinkovimi spojinami.	49
Slika 21. 14-dnevna serija: učinkovitost asimilacije Zn v <i>Porcellio scaber</i> po 14 dneh hranjenja z listi leske, tretiranimi s cinkovimi spojinami.	50
Slika 22. 14-dnevna serija: bioakumulacijski faktor za Zn v <i>Porcellio scaber</i> po 14 dneh hranjenja z listi leske, tretiranimi s cinkovimi spojinami.	51
Slika 23. 14-dnevna serija: stopnja prehranjevanja <i>Porcellio scaber</i> po 14 dneh hranjenja z listi leske, tretiranimi z bakrovimi spojinami.	52
Slika 24. 14+14-dnevna serija: stopnja prehranjevanja <i>Porcellio scaber</i> po 14 dneh hranjenja z netretiranimi listi leske, predhodno 14 dni hranjenih z listi leske, tretiranimi z bakrovimi spojinami.	53
Slika 25. 14-dnevna serija: učinkovitost asimilacije hrane pri <i>Porcellio scaber</i> po 14 dneh hranjenja z listi leske, tretiranimi z bakrovimi spojinami.	54
Slika 26. 14+14-dnevna serija: učinkovitost asimilacije hrane pri <i>Porcellio scaber</i> po 14 dneh hranjenja z netretiranimi listi leske, predhodno 14 dni hranjenih z listi leske, tretiranimi z bakrovimi spojinami.	55
Slika 27. 14-dnevna serija: stopnja iztrebljanja <i>Porcellio scaber</i> po 14 dneh hranjenja z listi leske, tretiranimi z bakrovimi spojinami.	56
Slika 28. 14+14-dnevna serija: stopnja iztrebljanja <i>Porcellio scaber</i> po 14 dneh hranjenja z netretiranimi listi leske, predhodno 14 dni hranjenih z listi leske, tretiranimi z bakrovimi spojinami.	57

Slika 29. 14-dnevna serija: izmerjena koncentracija Cu v prebavnih žlezah <i>Porcellio scaber</i> po 14 dneh hranjenja z listi leske, tretiranimi z bakrovimi spojinami.	58
Slika 30. 14+14-dnevna serija: izmerjena koncentracija Cu v prebavnih žlezah <i>Porcellio scaber</i> po 14 dneh hranjenja z netretiranimi listi leske, predhodno 14 dni hranjenih z listi leske, tretiranimi z bakrovimi spojinami.	59
Slika 31. 14-dnevna serija: izmerjena koncentracija Cu v črevesu <i>Porcellio scaber</i> po 14 dneh hranjenja z listi leske, tretiranimi z bakrovimi spojinami.....	60
Slika 32. 14+14-dnevna serija: izmerjena koncentracija Cu v črevesu <i>Porcellio scaber</i> po 14 dneh hranjenja z netretiranimi listi leske, predhodno 14 dni hranjenih z listi leske, tretiranimi z bakrovimi spojinami.	61
Slika 33. 14-dnevna serija: izmerjena koncentracija Cu v preostanku telesa <i>Porcellio scaber</i> po 14 dneh hranjenja z listi leske, tretiranimi z bakrovimi spojinami.	62
Slika 34. 14+14-dnevna serija: izmerjena koncentracija Cu v preostanku telesa <i>Porcellio scaber</i> po 14 dneh hranjenja z netretiranimi listi leske, predhodno 14 dni hranjenih z listi leske, tretiranimi z bakrovimi spojinami.	63
Slika 35. 14-dnevna serija: izračunana celokupna koncentracija Cu v telesu <i>Porcellio scaber</i> po 14 dneh hranjenja z listi leske, tretiranimi z bakrovimi spojinami.	64
Slika 36. 14+14-dnevna serija: izračunana celokupna koncentracija Cu v telesu <i>Porcellio scaber</i> po 14 dneh hranjenja z netretiranimi listi leske, predhodno 14 dni hranjenih z listi leske, tretiranimi z bakrovimi spojinami.	65
Slika 37. 14-dnevna serija: učinkovitost asimilacije Cu v <i>Porcellio scaber</i> po 14 dneh hranjenja z listi leske, tretiranimi z bakrovimi spojinami.	66
Slika 38. 14-dnevna serija: bioakumulacijski faktor za Cu v <i>Porcellio scaber</i> po 14 dneh hranjenja z listi leske, tretiranimi z bakrovimi spojinami.	67

KAZALO TABEL

Tabela 1. Nastavitve analizne metode FAAS pri poskusu s cinkom.	35
Tabela 2. Nastavitve analizne metode FAAS pri poskusu z bakrom.	35

KAZALO PRILOG

- Priloga A1:** prisotnost in vrednosti statistično značilnih razlik pri parnih primerjavah različnih parametrov tretiranih skupin v prehranjevalnem poskusu s cinkom (poskus št. 14)
- Priloga A2:** prisotnost in vrednosti statistično značilnih razlik pri parnih primerjavah različnih parametrov tretiranih skupin v prehranjevalnih poskusih z bakrom (poskusa št. 33 in 36)
- Priloge B1–B28:** podatki prehranjevalnega poskusa s cinkom (poskus št. 14)
- Priloge C1–C25:** podatki prehranjevalnih poskusov z bakrom (poskusa št. 33 in 36)
- Priloga D1:** povzetek median, povprečnih vrednosti in standardnih napak za vsebnost cinka v telesnih delih enakonožcev pri prehranjevalnem poskusu s cinkom (poskus št. 14)
- Priloga D2:** povzetek median, povprečnih vrednosti in standardnih napak za vsebnost bakra v telesnih delih enakonožcev pri prehranjevalnih poskusih z bakrom (poskusa št. 33 in 36)

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BAF	bioakumulacijski faktor
BET	analiza specifične površine delcev po Brunauer-Emmett-Tellerju
DLS	<i>dynamic light scattering</i> ; dinamično sipanje svetlobe
EDS	<i>energy-dispersive X-ray spectroscopy</i> ; energijska disperzijska spektroskopija rentgenskih žarkov
FAAS	<i>flame atomic absorption spectroscopy</i> ; plamenska atomska absorpcijska spektroskopija
HSA	<i>human serum albumin</i> ; človeški serumski albumin
nano Cu	nanodelci elementarnega bakra (<50 nm)
nano ZnO	nanodelci cinkovega oksida (<1 µm)
mikro ZnO	mleti cinkov oksid z delci, večjimi od 1 µm
ROS	<i>reactive oxygen species</i> ; reaktivne kisikove zvrsti
SAED	<i>selected area electron diffraction</i> ; elektronska difrakcija
SE	<i>standard error</i> ; standardna napaka
SEM	<i>scanning electron microscopy</i> ; vrstična elektronska mikroskopija
SI	stopnja iztrebljanja
SP	stopnja prehranjevanja
SSA	<i>specific surface area</i> ; specifična površina
TEM	<i>transmission electron microscopy</i> ; transmissijska elektronska mikroskopija
UA	učinkovitost asimilacije hrane
UA _{Cu}	učinkovitost asimilacije bakra
UA _{Zn}	učinkovitost asimilacije cinka

1. UVOD

Nanotehnologija in uporaba nanomaterialov sta relativno novi področji znanosti in tehnologije, a eni najhitreje rastočih. Njuna vrednost na globalnem trgu je leta 2009 obsegala 11,7 milijarde dolarjev, do leta 2015 pa naj bi narasla na več kot 26 milijard dolarjev (Nanotechnology: A Realistic Market Assessment, 2010). Evropska organizacija potrošnikov (BEUC) in Evropski glas potrošnikov v standardizaciji (ANEC) v skupnem poročilu iz oktobra 2010 navajata, da je bilo v času njune raziskave na evropskem tržišču že 475 potrošniških izdelkov, ki so vsebovali nanomateriale, v primerjavi s 151 leta 2009 (How much nano do we buy? ANEC & BEUC updated Inventory on products claiming to contain nanomaterials, 2010).

Glede na trenutno dostopne podatke je znano, da imajo lahko nanomateriali nenavadne fizikalno-kemijske lastnosti, še posebej v vodnem mediju, ki so manj poznani kot lastnosti drugih onesnažil, npr. težkih kovin ali pesticidov. O tveganjih in koristih mnogih proizvedenih nanodelcev in potrošniških izdelkov poteka široka javna debata, ki vključuje preudarek o tveganjih za okolje. Kot nova veja toksikologije, ki proučuje škodljive učinke nanodelcev na zdravje, je nastala *nanotoksikologija* (Handy in sod. 2008; Buzea in sod., 2007).

Dandanes zakonodajna regulacija proizvedenih nanodelcev še ni mogoča zaradi pomanjkanja informacij, na katerih bi jo osnovali. Ker mnogi nadzorni organi ne razlikujejo nanotehnološko proizvedenih snovi od konvencionalnih, proizvodnja in uporaba nanotehnoloških produktov trenutno nista specifično regulirana. Tipično se snovi nanometrskih velikosti pojmujejo kot različice tehničnega materiala ali obstoječe formulacije. Čeprav je lahko toksikologija bazičnega materiala dobro definirana, je lahko strupenost nanometrskih velikostnih oblik te snovi povsem drugačna od matične. Posledično bodo novi toksikološki podatki o nanometrski obliki snovi verjetno vodili do drugačnega ocenjevanja tveganja za nanodelce (Oberdörster in sod., 2005).

Pričujoče diplomsko delo je rezultat raziskave v okviru segmenta nanotoksikološkega področja, ki se ukvarja z vplivom nanodelcev na kopenske organizme. Natančneje, raziskava se ukvarja s privzemom in izločanjem kovin iz kovinskih nanodelcev v raki enakonožcih vrste *Porcellio scaber*, ki so se izkazali kot primerni in učinkoviti modelni organizmi za raziskave delovanja kopenskih onesnažil, predvsem težkih kovin. V testih z enakonožci lahko namreč natančno določamo količino zaužitih delcev, dozo, ki so ji bile živali izpostavljene, in opazujemo interakcije nanodelcev z biološkimi sistemi na različnih nivojih njihove organizacije (Drobne, 1997).

1.1 NAMEN IN IZHODIŠČA

Namen naše raziskave je bil ugotoviti, ali izpostavljenost nanodelcem kovin ali kovinskih oksidov vpliva na različne prehranjevalne parametre modelnih organizmov, kot so stopnja prehranjevanja, stopnja iztrebljanja in učinkovitost asimilacije hrane. Želeli smo ugotoviti tudi, ali se v primeru hranjenja modelnih organizmov z nanodelci kovin ali kovinskih oksidov te kovine kopičijo v njihovem telesu. Zanimala nas je morebitna razlika v količini nakopičenih kovin, če so organizmi hranjeni z nanodelci ali z ioni te iste kovine. Nazadnje smo želeli ugotoviti, ali nakopičene kovine po določenem času ostanejo v telesu ali se izločijo.

1.2 HIPOTEZE

1. Pričakovali smo, da bo izpostavljenost kovinam zmanjšala stopnjo prehranjevanja ter stopnjo iztrebljanja modelnih organizmov, učinkovitost asimilacije hrane pa se bo povečala.
2. Pričakovali smo, da se bodo prehranjevalni parametri modelnih organizmov po prenehanju hranjenja s kovinami približali vrednostim kontrolne skupine.
3. Pričakovali smo, da bomo v primeru hranjenja modelnih organizmov z nanodelci ZnO ali nanodelci Cu v njihovem telesu zasledili povišane koncentracije teh dveh kovin.
4. Pričakovali smo, da bodo koncentracije teh kovin v telesu drugačne, če bomo organizme hranili z nanodelci ZnO ali Cu, kot če jih bomo hranili z ioni teh dveh kovin.
5. Pričakovali smo, da bo privzem kovin iz hrane, merjen preko učinkovitosti asimilacije kovin in bioakumulacijskega faktorja, v primeru hranjenja modelnih organizmov z nanodelci ZnO ali Cu drugačen kot v primeru hranjenja z ioni teh dveh kovin.
6. Pričakovali smo, da se bodo kovine po prenehanju hranjenja organizmov s kovinami do neke mere izločile iz telesa ter da bo vzorec izločanja v primeru hranjenja modelnih organizmov z nanodelci ZnO ali Cu drugačen kot v primeru hranjenja z ioni teh dveh kovin.

2. PREGLED OBJAV

2.1 NANODELCI

Nanodelci so definirani kot delci z vsaj eno dimenzijo, manjšo od 100 nm, njihova velikost pa je potencialno na atomski oziroma molekularni skali (~0,2 nm). Podrazred nanodelcev so *nanovlakna* (vključujejo nanocevke), ki imajo eno dimenzijo manjšo od 100 nm, tretja (osna) pa je lahko mnogo večja. Ker je ta definicija arbitrarna, je v ekotoksikologiji potrebno upoštevati tudi nanomateriale, ki lahko vsebujejo nekaj primarnih delcev, večjih od 100 nm, ali večje agregate nanodelcev v velikostnem razredu nekaj 100 nm (Borm in sod., 2006; Buzea in sod., 2007; Handy in sod. 2008).

Proizvedeni nanodelci so zasnovani tako, da imajo določene fizikalno-kemijske lastnosti, ki so v skladu z njihovo uporabnostjo. Materiali lahko temeljijo na ogljiku, kot so fulereni¹ in ogljikove nanocevke; lahko so kovinski nanodelci, kompozitni ali večplastni nanodelci (npr. platinasto jedro s silicijevo lupino, Pt@SiO₂) ali nanodelci z različnimi zunanjimi prevlekami (npr. funkcionalizirani nanodelci ZnO). Na trgu je trenutno na voljo veliko tipov nanodelcev, ki obljublajo veliko potencialnih koristi. Izdelki in aplikacije vključujejo elektroniko, optiko, tekstil, medicinske pripomočke, kozmetiko, prehransko embalažo, tehnologijo za čiščenje voda, gorilne celice, katalizatorje, biosenzorje in sisteme za ekoremediacijo (Handy in sod. 2008).

Naravni nanodelci obstajajo v okolju že od nastanka Zemlje dalje. Nastajajo s številnimi geološkimi in biološkimi procesi; naravni viri nanodelcev so vulkanski prah ter večina naravnih vod, prsti in sedimentov. Primeri sistemov z naravnimi nano-strukturami so mleko (nano-koloid), huminske in fulvo kisline, organske molekule, celice, bakterije, virusi itd. Organizmi so se skozi evolucijo torej razvijali v okolju, ki vsebuje naravne nanodelce, in bi po pričakovanjih morali biti nanje prilagojeni. Toda ta adaptiranost je funkcija izpostavljenosti, doze in hitrosti sprememb okoljskih razmer v habitatu (Buzea in sod., 2007; Handy in sod. 2008).

¹ International Union for Pure and Applied Chemistry (IUPAC) fulerene definira kot: »Spojine, zgrajene izključno iz sodega števila ogljikovih atomov, ki tvorijo kletkam podoben policiklični sistem iz dvanajstih petčlenskih obročev in ostalih šestčlenskih obročev; arhetipski primer je struktura iz 60 ogljikovih atomov, kjer atomi in vezi orisujejo priskeani ikozaeder. Izraz je bil razširjen, da bi vključili katerokoli strukturo v obliki zaprte kletke, ki vsebuje več kot dvajset ogljikovih atomov in v celoti sestoji iz ogljikovih atomov, povezanih s tremi vezmi« (Nomenclature for the C₆₀-I_h and C₇₀-D_{5h(6)} Fullerenes. IUPAC Recommendations 2002). V širšem pomenu besede izraz »fulereni« vključuje še druge ogljikove alotrope v obliki votlih sfer, elipsoidov ali cevk, torej tudi ogljikove nanocevke ("fullerene." Encyclopædia Britannica Online, 2011). V tem dokumentu izraz »fulereni« uporabljamo izključno v ožjem pomenu besede, kot ga opredeljuje IUPAC.

2.1.1 (Eko)toksikološka problematika nanodelcev

Proizvedeni nanodelci kažejo kompleksno koloidno in agregacijsko kemijo, na katero zelo verjetno vplivajo oblika, velikost, površina in površinski naboj, pa tudi adsorpcijske lastnosti materiala. Abiotski dejavniki, kot so pH, ionska jakost, trdota vode ter prisotnost organskih snovi lahko spremenijo agregacijsko kemijo in po pričakovanjih spodbudijo strupenost nanodelcev. Poznavanje fizikalno-kemijskih lastnosti nanodelcev je nujno za razumevanje sprememb in učinkov nanodelcev v okolju, pa tudi privzema in distribucije v organizmih ter interakcije z drugimi onesnažili (Handy in sod. 2008).

Obstaja skrb, da bi onesnaževanje z antropogenimi nanodelci lahko vplivalo na naravne procese na nanometrski skali. Obstajajo dokazi, da so nekateri naravni nanodelci strupeni (npr. vulkanski prah, kjer je strupenost povezana z velikostjo delcev), torej bi lahko bili strupeni tudi proizvedeni nanodelci. Poleg tega so mnogi naravni nanodelci v okolju prisotni le prehodno, medtem ko bi lahko proizvedeni nanodelci v okolju zastajali zaradi stabilizacije s surfaktanti ali organskimi snovmi. Nekateri proizvedeni nanodelci vsebujejo strupene spojine v koncentracijah ali strukturnih oblikah, ki se v naravi ne pojavljajo, poleg tega sta lahko oblika in velikost prav tako kritični kot kemijska reaktivnost. Nanodelci se nenačrtno tvorijo v različnih človeških aktivnostih (npr. obraba avtomobilskih pnevmatik, onesnaženje zraka v urbanih okoljih), ki lahko prav tako predstavljajo toksikološko tveganje (Handy in sod. 2008).

2.1.2 Reaktivnost kovinskih nanodelcev, vezana na posebne lastnosti nanometrskе velikostne skale

Nanodelci imajo povečano razmerje med površino in volumnom (S/V): približno 35–40% atomov je lokaliziranih na površini 10 nm velikega nanodelca v primerjavi z manj kot 20% atomov pri nanodelcih, večjih od 30 nm. To visoko razmerje S/V ustreza ekstrinzični lastnosti specifične površine (SSA), ki ima pri nanodelcih zelo veliko vrednost in je lahko povezana z večimi intrinzičnimi lastnostmi, ki so odvisne od površine (npr. močna površinska reaktivnost). Zato lahko nanodelci (še posebej tisti, ki so manjši od 20 nm) kažejo nove lastnosti v primerjavi z delci večjih velikosti. Npr. delci zlata so znani kot kemijsko inertni in odporni na oksidacijo na makroskopski skali, medtem ko imajo nekaj nanometrov veliki delci kemijsko reaktivno površino. Posledično pod neko kritično velikostjo ni mogoče preprosto predvideti lastnosti nanodelcev, tako da bi ekstrapolirali površinske lastnosti delcev večjih velikosti (Auffan in sod., 2009).

Biološki učinek kovin se lahko popolnoma spremeni z oksidacijskim stanjem, vezavo s specifičnimi ligandi ter koncentracijo v raztopini. Ali se bodo kovinski nanodelci spremenili *in vitro*, je odvisno od njihove koncentracije, pH, ionske jakosti, termodinamskih omejitev, kinetičnega pospeševanja prenosov elektronov in redoks pogojev v biološkem mediju. Poleg vseh naštetih dejavnikov na stabilnost nanodelcev vplivata tudi agregacija, pri kateri se zmanjša njihova SSA, ter površinska adsorpcija snovi iz raztopine. Posledično se lahko biološka aktivnost in potencialna strupenost v različnih okoljih močno razlikujeta (Auffan in sod., 2009).

Mehanizmi strupenosti, povezani s kemijsko destabilizacijo kovinskih nanodelcev, so lahko (po Auffan in sod., 2009):

1. neposredno sproščanje kovin v raztopino (proces odtapljanja),
2. katalitične lastnosti nanodelcev,
3. spremembe redoks stanja površine, ki lahko oksidirajo proteine, tvorijo reaktivne kisikove zvrsti (ROS) in inducirajo oksidativni stres.

2.1.2.1 Odtapljanje ionov s površine

Odtapljanje je lahko kritični korak za nekatere kovinske nanodelce pri določanju usode v okolju in v organizmih. Gonilna sila za odtapljanje je odvisna od topnosti kovine v danem okolju ter od koncentracijskega gradienta med površino delca in raztopino. Poleg učinka SSA lahko odtapljanje povečajo dodatni dejavniki, kot so od velikosti odvisne spremembe ukrivljenosti in strukturiranost površine, pa tudi prisotnost proteinov in soli ter pH izven nevtralnega območja (Cai in sod., 2005; Borm in sod., 2006; Yang in Xie, 2006; Midander in sod., 2007, 2009; Auffan in sod., 2009).

V posebnih primerih je mogoče nadzorovati odtapljanje kovinskih nanodelcev in njihove toksične učinke s prevlekami na površini. Znotrajcelična oksidacija in strupenost kvantnih pik (polprevodniški kristali iz Cd/Se jedra in ZnS plašča) sta posledici sproščanja Cd^+ ionov, toda če površino kvantnih pik prekrijemo z organskimi molekulami, s tem omejimo odtapljanje in citotoksičnost se zmanjša (Derfus in sod. 2004, cit. po Auffan in sod. 2009). Podobne rezultate je dala tudi raziskava Studer in sod. (2010), v kateri so bili nanodelci Cu s prevleko iz ogljika manj topni ter posledično tudi manj citotoksični od nanodelcev CuO, ki so kazali podobno stopnjo citotoksičnosti kot bakrove soli. Čisti ogljikovi nanodelci v pozitivni kontroli, s katero so želeli izključiti vpliv površine, niso pokazali nobenih kratkotrajnih citotoksičnih učinkov.

Veliko zanimanje za procese odtapljanja s površine vlada pri aplikacijah na podlagi biocidnih lastnosti nanodelcev (barve, čistila, tekstil). Npr. široko uporabljane antibakterijske in protiglivične lastnosti Ag^0 in Cu^0 nanodelcev so odvisne od sproščanja Ag^+ in Cu^{2+} ionov v raztopino zaradi redoks potenciala, značilnega za ti dve kovini, in vezave površinskih atomov na elektrondonorske skupine, ki vsebujejo žveplo, kisik ali dušik (Auffan in sod., 2009).

2.1.2.2 Katalitične lastnosti

Kot primer lahko navedemo nanodelce TiO_2 , ki so eni najpogostejše uporabljenih fotokatalizatorjev. Učinkovito spodbujajo svetlobno inducirano redoks aktivnost z molekulami, adsorbiranimi na njihovo površino. TiO_2 kaže od velikosti odvisno fotokatalitično aktivnost, ki jo spremljajo od velikosti odvisni biološki učinki (Auffan in sod., 2009).

Kristalinični TiO_2 je močno občutljiv za fazno transformacijo pri zmanjševanju velikosti. Obstajata dve glavni kristalinični obliki TiO_2 , anataz in rutil, pri čemer anatazna oblika prevladuje pri nanodelcih, manjših od 15 nm. Razlika v kristalnih oblikah vpliva na mesta oksidacije in redukcije. V mešanici delcev TiO_2 anataznega in rutilnega tipa je redukcija O_2 v $\text{HO}_2\cdot$ odvisna izključno od anatazne faze na podlagi redoks potenciala $\text{O}_2/\text{HO}_2\cdot$. Te od velikosti odvisne fazne spremembe vplivajo tudi na strupenost TiO_2 . Anataz je biološko bolj aktiven od rutila z vidika citotoksičnosti ali oksidativnih poškodb DNA. Pri nanodelcih TiO_2 z velikostjo od 15 do 30 nm se baktericidni učinki na vrsti *Escherichia coli* in *Pseudomonas aeruginosa* povečujejo, ko se velikost nanodelcev zmanjšuje in masni delež anataza povečuje (Auffan in sod., 2009).

2.1.2.3 Redoks modifikacije površine

Oksidacijski ali redukcijski procesi lahko vodijo do sproščanja ionov v raztopino, redoks reakcije pa se lahko pojavijo tudi na površini nanodelcev in vodijo v spremembo kristalne strukture. Oba fenomena se lahko pojavljata ločeno ali simultano. Med kristaliničnimi transformacijami lahko pride do prenosov elektronov, kar vodi v oksidacijo proteinov ali tvorbo ROS in oksidativni stres v organizmih. Obstajata dve vrsti kovinskih nanodelcev: a) popolnoma ali delno oksidirani nanodelci z E_h , višjim od E_h biološko aktivnih redoks parov, in b) popolnoma ali delno reducirani nanodelci z E_h , nižjim od E_h biološko aktivnih redoks parov (Auffan in sod., 2009).

Oksidativni stres je stanje redoks neravnovesja, v katerem tvorba reaktivnih kisikovih zvrsti (s strani celice ali nanomateriala samega) prevlada nad antioksidativno obrambno kapaciteto celic, kar vodi v škodljive biološke posledice: poškodbo makromolekul, lipidov, DNA ali proteinov ter posledično v prekomerno namnožitev celic, apoptozo, lipidno peroksidacijo ali mutagenozo. Znano je, da kovinski nanodelci inducirajo oksidativni stres preko tvorbe ROS z motnjami elektronskega in ionskega pretoka v redoks reakcijah, preko motenj prepustnosti celičnih por in z osiromašenjem zalog glutationa v celicah (Auffan in sod. 2009).

2.1.3 Učinki nanodelcev na organizme

Glavne poti vstopa nanodelcev v vretenčarski organizem so respiratorne površine, koža in prebavni trakt. Delež, ki ga migetalčni epitel in makrofagi v dihalih ter M-celice in defekacija v prebavilih ne uspejo odstraniti, se lahko vsrka v kri in limfo ter potuje v jetra, vranico in druge notranje organe. Preko kože lahko v telo vstopijo inter- ter intracelularno in preko lasnih mešičkov. Prodrejo lahko tudi neposredno v možgane preko znotrajaksonskega in trans-sinaptičnega transporta v vohalnih nevronih ali prečkajo krvno-možgansko pregrado. V splošnem je njihova nadaljnja usoda odvisna od kemijskih in površinskih lastnosti: lahko interagirajo z organskimi molekulami, se vključijo v metabolizem ali pa se izločijo iz telesa (Borm in sod. 2006).

Glavni faktor, ki povezuje različne škodljive učinke nanodelcev na organizme, so vnetni procesi. Slabo topni nanodelci z zelo nizko vsebnostjo organskih snovi ali kovin, npr. črni ogljik, inducirajo vnetne procese sorazmerno s površino in njenimi učinki (tudi modifikacijami, npr. površinskimi prevlekami). Odtopljene kovine so udeležene v redoks kroženju kinonov ter učinkujejo sinergistično s površino matičnih nanodelcev pri sprožanju vnetij (Borm in sod., 2006).

2.1.3.1 Strupenost

Večina dosedanjih ekotoksikoloških študij je temeljila na opazovanju ali eksperimentih »dokazovanja principa«, ki so skušali dokumentirati strupene učinke ter koncentracije nanodelcev, ki povzročijo te učinke v različnih skupinah organizmov. Študije na sesalskih modelih so se osredotočile na respiratorno toksikologijo in vnetne reakcije pri izpostavljenosti nanodelcem. Epitel sesalskih pljuč ima pomen tudi za ekotoksikologijo, saj je reprezentativni primer mukoznega epitelnega tkiva in ni bistveno drugačen od drugih epitelov, kot so škrge in prebavila vodnih organizmov ali telesna površina zemeljskih

kolobarnikov. Vnetni in imunski odzivi sesalcev vzbujajo skrb glede odpornosti in dolgoročnega zdravja drugih organizmov, izpostavljenih nanodelcem. Študije na sesalcih potrjujejo tudi predpostavko, da so oblika, velikost in površina nanodelcev lahko pomembni dejavniki za privzem in strupenost nanodelcev (Handy in sod., 2008).

Kahru in Dubourguier (2010) sta zbrala 77 vrednosti za učinke 7 nanodelcev na 7 vrst organizmov in jih preračunala v 34 medianih (ali povprečnih, če sta bila na voljo le dva podatka) vrednosti za $L(E)C_{50}$. Primerjala sta jih s toksikološkimi podatki za mikrodolge 3 kovinskih oksidov (ZnO, TiO_2 , CuO) in 4 druge referenčne kemikalije (topne bakrove in cinkove soli, pentaklorofenol in anilin). Podatki so se celo za isti tip nanodelcev in isto skupino organizmov močno razlikovali, tudi za več velikostnih redov, kar je bilo povezano z variacijami testnih protokolov. Kljub temu sta prepoznala nekaj splošnih trendov: najbolj občutljive okoljsko relevantne vrste za nanodelce so alge in raki (ceponožci), sledijo jim ribe, najmanj občutljive pa so bakterije². Najmanj podatkov trenutno obstaja za migetalkarje, gliste in kvasovke. Nanodelce sta razvrstila v strupenostne razrede glede na klasifikacijsko shemo po EU-Direktivi 93/67/EEC. Najbolj strupeni so nanodelci Ag in ZnO ($L(E)C_{50} < 0,1$ mg/L), ki jim sledijo CuO in C_{60} -fulereni ($L(E)C_{50}$ 0,1–1 mg/L). Tako makro kot nano TiO_2 sta manj strupena, a še vedno škodljiva ($L(E)C_{50}$ 10–100 mg/L); redki dostopni podatki nakazujejo, da so ogljikove nanocevke verjetno manj strupene od fulerenov in kovinskih nanodelcev ($L(E)C_{50}$ 1–10 mg/L). Ker pa vsi obravnavani nanodelci kažejo škodljive učinke pri zelo nizkih koncentracijah, lahko vodijo v motnje prehranjevalnih verig, kar ima lahko posledice za celoten ekosistem.

2.1.3.2 Bioakumulacija, biomagnifikacija in prenos po prehranjevalnih verigah

Naša študija se osredotoča na procese privzema in izločanja kovinskih nanodelcev v modelnem organizmu; tako kot raziskave na področju strupenosti so tudi raziskave bioakumulacije dale različne rezultate, odvisno od vrste modelnih organizmov ter kemijskih in fizikalnih lastnosti uporabljenih nanodelcev – njihove velikosti, kemijske sestave (ogljikovi ali kovinski nanodelci), prisotnosti in vrste površinskih prevlek, topnosti ter lipofilnosti.

² Čeprav je potrebno upoštevati, da sta avtorja obravnavala le vrednosti za $L(E)C_{50}$ in da nekatere mediane temeljijo zgolj na eni vrednosti.

2.1.3.2.1 Bioakumulacija v kopenskih organizmih

Prva izmed študij na področju bioakumulacije nanodelcev se je ukvarjala s privzemom in izločanjem vodotopnih fulerenov v telesu podgan. Pri oralnem vnosu se fulereni niso učinkovito absorbirali in so se večinoma izločili s fecesom. Šele pri intravenoznem vnosu so se hitro razporedili v različna tkiva (večinoma v jetra – 91,7%, delno v vranico – 1,6%, in druge organe) in se večinoma zadržali v telesu tudi po tednu dni (Yamago, 1995). Podobno so se nanodelci zlata po intraperitonealnem injiciranju v miši razporedili po celotnem telesu in prodrli tudi čez krvno-možgansko pregrado, vendar je bila v možganih koncentracija od vseh organov najnižja. Privzem je bil sorazmeren z odmerkom, toksičnost pa ni bila opažena (Lasagna-Reeves in sod., 2010). Oralna administracija nanodelcev ZnO je povzročila od odmerka odvisne patološke spremembe na želodcu, jetrih, srcu, vranici in trebušni slinavki odraslih miši, medtem ko so bila glavna mesta akumulacije cinka kosti, ledvice in trebušna slinavka (Wang in sod., 2008).

Pri hranjenju piščancev (brojlerjev) z nanodelci srebra so bila glavna mesta akumulacije srebra mišice, vranica, trebušna slinavka, priželjce in srce, v tem vrstnem redu (Ahmadi in Kordestany, 2011), kar je povzročilo negativne učinke na telesno maso, hranjenje, presnovo ter akumulacijo trebušne maščobe piščancev (Ahmadi in Rahimi, 2011).

Različni ogljikovi nanodelci (črni ogljik, fulereni, ogljikove nanocevke z enojno ali dvojno steno) so imeli kljub visoki akumulaciji v larvah vinskih mušic (*Drosophila melanogaster*) nanje minimalen vpliv. Ogljikovi nanodelci, ki so jih skupaj s hrano požrle larve, so se akumulirali v lumnu črevesa, prehajali pa so tudi čez njegovo steno in se inkorporirali v tkiva imagov, ki so se razvili iz izpostavljenih larv. Delci črnega ogljika so bili lokalizirani na mestih visoke gostote senzornih ščetin. Kljub temu prisotnost nanodelcev v tkivih ni zmanjšala preživetja ali plodnosti imagov (Liu in sod., 2009). Akumulacija srebra v odraslih vinskih mušicah, ki so bile kot <12 ur stari embrii izpostavljene hrani z nanodelcem srebra v konc. 10 ppm, je bila sorazmerna z velikostjo nanodelcev: pri delcih velikosti 20–30 nm so v telesu vsebovale $385.64 \pm 20.19 \mu\text{g/g}$ sveže mase, pri velikosti 100 nm so vsebovale $69.03 \pm 0.97 \mu\text{g/g}$ g sveže mase, pri velikosti 500–1200 nm pa le $14.17 \pm 0.17 \mu\text{g/g}$ sveže mase srebra. Preživetje jajčec in razvoj v image sta bila odvisna od koncentracije in oblike nanodelcev (Gorth in sod., 2011).

Uspešen je bil privzem nanodelcev zlata iz prsti v deževnike (*Eisenia foetida*), pri čemer se je največ nanodelcev zadržalo v črevesu, manjši del pa je prešel skozi črevesno steno in se razporedil po telesu. Do odtapljanja Au^+ ionov ni prišlo, so pa nanodelci zlata zavrli razmnoževanje deževnikov in negativno vplivali na preživetje mladičev (Unrine in sod.,

2010b). Nasprotno se s prstjo požrti fulereni v *E. foetida* (Li in sod., 2010) ter ogljikove nanocevk v *E. foetida* (Petersen in sod., 2008a) in *Lumbriculus variegatus* (Petersen in sod., 2008b) niso absorbirali v organizme, pač pa so aglomerirali v črevesju in se zelo hitro izločili iz telesa (več kot 80% po začetnih 6 h v študiji Petersen in sod., 2008b). Zaradi hidrofobne narave so se ogljikovi nanodelci verjetno močno adsorbirali na organske snovi v prsti; tudi radioaktivni signal, ki je ostal v črevesu po koncu izločanja, je verjetno izviral iz nanocevk, vezanih na delce prsti, in ne iz nanocevk, ki bi se absorbirale v tkiva (Petersen in sod., 2008b). Sorazmerno z odmerkom so se v deževnike *E. fetida* privzemali nanodelci ZnO in TiO₂, vendar ni jasno, ali so se tudi absorbirali v tkiva ali je povišana vsebnost Zn in Ti v živalih izhajala zgolj iz ostankov kontaminirane prsti, ki se je po 24-urnem obdobju izločanja zadžala v črevesu (Hu in sod., 2010). Druga študija je pokazala, da svetlobno postarani nanokompozitni delci TiO₂ (kratke paličice iz TiO₂ jedra, prevlečenega z Al(OH)₃ in polidimetil siloksanom) niso prehajali čez steno črevesnega epitela ali kloragogenega tkiva v celomsko tekočino ali čez kutikulo v mišice deževnikov *L. terrestris*, zato bioakumulacija nanokompozitov ni bila opažena. Prisotni so bili le v lumnu črevesa, kjer so povečali apoptotsko aktivnost epitela (Lapied in sod., 2011). Bioakumulacija aluminija iz nanodelcev Al₂O₃, ki je ostal v telesu deževnikov *E. fetida* po 24-urnem obdobju praznjenja črevesa, je bila značilno večja kot v primeru mikrododelcev iste spojine. Kljub temu so se škodljivi učinki (zmanjšanje telesne mase in števila kokonov) ter izogibalno vedenje pojavili šele pri zelo visokih koncentracijah Al₂O₃ v prsti, tj. > 2500 mg/kg, ki v okolju niso verjetne (Coleman in sod., 2010).

Nanodelci srebra treh različnih velikosti s prevleko iz citrata ali polivinilpirolidona so po zaužitju prehajali v črevo in od tam v tkiva glist *Caenorhabditis elegans*. Toksičnost je bila delno posledica odtapljanja srebrovih ionov; le linija, nezmožna tvoriti metalotioneine, je bila na učinke srebra bolj občutljiva od divjega tipa. Pri osebk, kjer so se jajčeca zaradi stresa razvila v telesu, je bil opažen tudi prenos nanodelcev v jajčeca (Meyer in sod., 2010).

2.1.3.2.2 Bioakumulacija v vodnih organizmih

Ogljikove nanocevk z dvojno steno so tvorile skupke na površini škrg ter v lumnu črevesa embriev žab vrste *Xenopus laevis*, niso pa bile prisotne na oz. v epitelu, horionu ali drugih tkivih. Akutna toksičnost v visokih koncentracijah bi lahko zato bila posledica fizične blokade škrg in črevesa (Mouchet in sod., 2008). Nanodelci CuO, TiO₂ in ZnO so med embrionalnim razvojem *X. laevis* močno poškodovali prebavni trakt larv, predvsem želodec in črevo, ne pa tudi kože. Skozi nastale lezije so prodrli v črevesni epitel, kjer so

bili opaženi na različnih globinah črevesne stene. Nanodelci ZnO so se posebej močno akumulirali ob bazalni membrani in v vezivnem tkivu. Preferenčno so se nahajali v intersticijih med sosednjimi celicami, kjer so tvorili več 100 nm velike agregate, medtem ko pri ostalih dveh spojinah ta pojav ni bil opažen (Bacchetta in sod., 2011).

V šarenkah (*Oncorhynchus mykiss*) se je po intravenoznem injiciranju nanodelcev TiO₂ 10–19% titana absorbiralo v ledvice; ta delež se je skoraj v celoti zadržal do 21. dneva in se delno izločil šele do 90. dneva po injiciranju, vendar to funkcije ledvic ni prizadelo. Minimalna absorpcija titana je bila opažena v jetrih in krvi; v možganih, škrgah in vranici pa se ni akumuliral (Scown in sod., 2009). Nanodelci TiO₂ iz okoliške vode so se v 9 dneh izpostavitve pri konc. 500 in 5000 µg/L akumulirali v škrgah šarenk, s hrano zaužiti nanodelci TiO₂ v obdobju 21 dni pa v njihovem črevesju (Johnston in sod., 2010). Zelo nizka, a merljiva stopnja akumulacije srebra iz srebrovih nanodelcev različnih velikosti, prisotnih v okoliški vodi, je bila po 10 dneh opažena v škrgah in ledvicah šarenk; skladno z nizkim privzemom ni prišlo do lipidne peroksidacije ali histoloških poškodb (Scown in sod., 2010).

Kashiwada (2006) je sledil razporejanju fluorescentnih polistirenskih nanodelcev v jajčecih in telesih prosojne japonske riževke oz. medake (*Oryzias latipes*). Ti so se adsorbirali na horion in akumulirali v oljnih telescih; med embrionalnim razvojem so potovali v rumenjaki in žolčnik, kar nakazuje lipofilni značaj. Odrasle medake so nanodelce akumulirale predvsem v škrgah in črevesu, v manjši meri pa so potovali tudi v možgane, testise, jetra in kri, torej so uspeli prodreti skozi krvno-možgansko pregrado. Odrasle cebrice (*Danio rerio*) so v 36-dnevem eksperimentu nanodelce zlata iz hrane akumulirale le pri najvišji izpostavitveni koncentraciji (100 ng Au/osebek/dan), vendar v zelo nizkih količinah (v rangi µg/g tkiva), pri čemer se jih je največ akumuliralo v možganih, manj v jetrih in najmanj v skeletnih mišicah (Geffroy in sod., 2011). Pri cebricah, ki so bile za 7 dni izpostavljene nanodelcem CeO₂ in nanodelcem ZnO v okoliški vodi v konc. 500 in 5000 µg/L, je prišlo do akumulacije nanodelcev CeO₂ zgolj v ledvicah, nanodelcev ZnO pa ni bilo mogoče zaslediti v nobenem od analiziranih tkiv (škrge, jetra, možgani in ledvice) (Johnston in sod., 2010).

Kompozitni fluorescentni silicijevi nanodelci (Ru@SiO₂ in Cy5.5@SiO₂) iz okoliške vode so ostali adsorbirani na horion embrijev cebric in niso prodrli v telo (Fent in sod., 2010), po izleganju iz horiona, ki je zadrževal privzem, pa so se sorazmerno z odmerkom v embriih cebric akumulirale kvantne pike, ki so vanje prodrle čez škrge in epitel (King-Heiden in sod., 2009). Lee in sod. (2007) so s sledenjem posameznim nanodelcem Ag velikosti 5–46 nm ugotovili, da prehajajo v in iz embrijev cebric skozi porne kanale v

horionu z difuzijo in ne aktivnim transportom. Nekateri so ostali omejeni na horionski prostor in notranjo celično maso. Drugi so se v kanalih zagostili in delovali kot nukleacijska jedra za agregacijo z drugimi nanodelci v večje skupke. Raziskovalci menijo, da je bioakumulacija zaradi pasivne difuzije glavni vzrok za posledične toksične učinke, ki so odvisni od odmerka. Enako pot prehajanja nanodelcev Ag čez horion in akumulacijo v embriih črnoglavega pisanca (*Pimephales promelas*) so že po 24 h opazili tudi Laban in sod. (2010). Po akumulaciji v embrie cebric so se nanodelci Ag razporedili v kožo, možgane, srce, rumenjak in kri; večina nanodelcev se je akumulirala v jedrih celic, v citoplazmi pa so bili prisotni le posamični delci (Asharani in sod., 2008). Privzem iz okoliškega medija v embrije cebric je bil poleg nanodelcev Ag prisoten tudi pri nanodelcih zlata in platine; nanodelci Ag in Pt so povzročili močne deformacije, nanodelci Au pa niso kazali nobenih toksičnih učinkov (Bar-Ilan in sod., 2009; Asharani in sod., 2011). Povišane koncentracije teh kovin so bile prisotne tudi v navidez normalno razvitih embriih, in sicer v vrstnem redu $Ag > Au > Pt$ (Asharani in sod., 2011).

Rosenkranz in sod. (2009) so prehajanje polistirenskih nanodelcev skozi črevesni epitel in potovanje v oljna telesa opazili tudi pri vodnih bolhah (*Daphnia magna*), čeprav se je večina nanodelcev zadržala v lumnu črevesa. V primerjavi z 1 μm velikimi polistirenskimi delci, ki so se po 4 h iz telesa izločili več kot 90%, je bila učinkovitost izločanja 20 nm velikih delcev po 4 h le 40%. Tao in sod. (2009) glede na rezultate svoje raziskave o akumulaciji fulerenov v samicah vodnih bolh in njihovih potomcih predvidevajo, da je akumulacija sorazmerna z vsebnostjo lipidov v telesu, ki je zaradi rumenjaka bistveno višja v fetusih kot v odraslih živalih. Maksimalna vsebnost fulerenov v fetusih je bila tako 7000 mg/kg (0,7% telesne mase), v odraslih samicah pa 240 mg/kg. Z akumulacijo fulerenov je bila sorazmerna tudi smrtnost.

Skupno študijam privzema različnih nanodelcev v vodne bolhe je, da so z izjemami opazile veliko zadrževanje v črevesju in le manjše prehajanje v telo, opažena pa je bila adsorpcija na telesno površino. Tako je ena izmed študij na kvantnih pikah pokazala, da so bile po privzemu omejene na črevo vodnih bolh in se niso absorbirale v njihovo telo (Jackson in sod., 2009), medtem ko je druga študija največjo fluorescenco kristalov zaznala v območju torakalnih okončin in veliko akumulacijo po celotnem telesu (Ingle in sod., 2008), tretja pa oboje (Lewinski in sod., 2010); adsorpcija na eksoskelet vodnih bolh je bila opažena tudi v primeru diamantnih nanodelcev, še posebej v visokih koncentracijah (Mendonça in sod., 2011). Nobena izmed študij ni pokazala toksičnosti kvantnih pik za organizme pri uporabljenih koncentracijah, niti odtapljanja Cd^{2+} ali Se^{2+} ionov iz pik, torej je ZnS plašč učinkovito zaščitil jedro kristala pred interakcijo z vodo in telesnimi tekočinami. Tudi fulereni so se kljub hitremu privzemu iz vode (90% ravnovesne doze je bilo doseženih po

21 h) zadržali v črevesu in bolhe so jih po 24 h izločile 46%, po 48 h pa 72% (Tervonen in sod., 2009); podobno je bilo z nanodelci Au v času 24-urnega izločanja (Lovern in sod., 2008). Sposobnost izločanja je bila povezana s prisotnostjo hrane: po koncu 24-urne izpostavitve nanodelcem TiO_2 , ki so se ob prehranjevanju akumulirali v telesu vodnih bolh, je 72 ur trajajoče prehranjevanje s čistimi algami v primerjavi s stradanjem pospešilo izločanje nanodelcev, a kljub temu se je v obeh primerih precejšen delež TiO_2 zadržal v telesu vodnih bolh (Zhu in sod. 2010a). Modificiranje površine ogljikovih nanocevk s polietileniminom, ki je povečalo stabilnost v vodnih suspenzijah in jim dalo pozitivni, negativni ali nevtralni naboj, ni pomembno vplivalo na stopnjo akumulacije ali izločanja v vodnih bolhah. Nanocevkke so se agregirale v črevesu vodnih bolh in po 48 urah hranjenja z algami skoraj v celoti izločile, medtem ko je bilo izločanje v odsotnosti hranjenja minimalno (Petersen in sod., 2011). So pa različne površinske prevleke (laktat, polivinilpirolidon in natrijev dodecilbenzen sulfonat) različno vplivale na 48-urno bioakumulacijo nanodelcev srebra v vodnih bolhah, pri čemer je bila največja v primeru laktata. Različen je bil tudi delež odtopljenih Ag^+ ionov, ki so največ prispevali k toksičnosti srebrovih nanodelcev. Poskus z izločanjem v tej raziskavi ni bil izveden (Zhao in Wang, 2011b). V drugi študiji so po 2 dneh privzema in 4 dneh izločanja vodne bolhe v telesu zadržale zgolj okoli 5% nanodelcev Ag (Zhao in Wang, 2010). Kasneje je bilo potrjeno, da lahko po 21 dneh izpostavitve brez izločanja najvišja konc. srebra iz nanodelcev Ag v telesu vodnih bolh doseže kar 22,9 mg/g suhe mase pri najvišjem izpostavitvenem odmerku, ki je znašal 500 $\mu\text{g/L}$ (Zhao in Wang, 2011a).

Raziskovalci menijo, da je razlog za večino zgoraj opisanih pojavov v načinu prebave vodnih bolh. Zaužite delce v črevesu obdaja acelična, selektivno prepustna peritrofná membrana, ki jo izloča obroč celic. Med prebavo se raztopijo in raztopina se vsrka v črevesni epitel. Stabilni, netopni agregati nanodelcev, ki ne morejo prehajati čez epitel, se morda zadržijo v lumnu črevesa in tvorijo skupke, ki so preveliki, da bi jih vodne bolhe lahko izločile (Lovern in sod., 2008; Lewinski in sod., 2010; Zhu in sod., 2010a; Mendonça in sod., 2011; Zhao in Wang, 2011a). Ta razlaga bi lahko pojasnila tudi prej opisane primere zadrževanja netopnih nanodelcev v vodnih bolhah, nakazuje pa tudi potencial za trofični prenos v plenilce. V študiji Zhu in sod. (2009a) sta bila prehranski privzem in adsorpcija različnih nanodelcev na telesno površino vodnih bolh tako velika, da so osebkom preprečili gibanje po vodnem stolpcu in povzročili, da so potonili na dno čaš.

Ogljikove nanocevkke se niso zadržale v lumnu črevesa morske strige *Arenicola marina* niti niso prehajale v tkiva, medtem ko so nanodelci TiO_2 po 24-urnem obdobju stradanja, ki je sledilo 10-dnevni izpostavitvi, tvorili >200 nm agregate okoli mikrovilov celic črevesnega epitela, vendar do privzema v tkiva prav tako ni prišlo (Galloway in sod., 2010). Nanodelci

CuO so se absorbirali v telo morske strige *Hediste diversicolor*, in to v enaki koncentraciji kot v primeru bakrove soli, čeprav metoda DGT (difuzni gradient v tankem filmu) ni pokazala odtapljanja ionov z nanodelcev CuO (Buffet in sod., 2011). V telesu morskih strig *Nereis diversicolor* so bili nanodelci srebra najdeni v lumnu črevesa ter asociirani z apikalno plazmatsko membrano, v endocitotskih ugreznitvah in v endosomih. Subcelularna frakcionacija je pokazala, da je bilo srebro, akumulirano iz nanodelcev, pretežno povezano z anorganskimi granulami, organeli in toplotno denaturiranimi proteini (*heat denatured proteins*, HDP); srebro, izvirajoče iz AgNO₃, pa je bilo lokalizirano v frakciji metalotioneinov. To nakazuje različne poti celičnega privzema nadaljnje *in vivo* usode za nanodelce srebra v primerjavi s srebrovimi ioni, pri čemer je bila endocitoza glavna pot celičnega privzema srebrovih nanodelcev (García-Alonso in sod., 2011).

Večina študij privzema nanodelcev v morske in sladkovodne školjke je pokazala, da se akumulirajo v škrgah in prebavnih žlezah, od koder lahko prodrejo v druga tkiva. Tako je bila akumulacija CdTe kvantnih pik po 24 urah izpostavitve prisotna v hemocitah in prebavnih žlezah, ne pa tudi v škrgah rečnih brezzobk (*Elliptio complanata*) (Gagné in sod., 2008). V klapavicah (*Mytilus edulis*) je bila po 24 urah akumulacija zlata iz 13 nm velikih nanodelcev Au s citratnim plaščem večja v prebavnih žlezah kot v škrgah (Tedesco in sod., 2008); v kasnejši študiji z manjšimi nanodelci Ag (5 nm) so isti avtorji odkrili, da se je kar 95% zlata akumuliralo v prebavnih žlezah, le 3,9% v škrgah in 1,5% v plašču (Tedesco in sod., 2010). V klapavicah, izpostavljenih stekleni volni (SiO₂; vlakna 3–7 µm dolžine in 0.18–1 µm širine), so bile v epitelnih celicah škrg prisotne večje fibrile kot v hepatopankreasu, kar nakazuje, da se je material najprej sortiral in transportiral preko škrg. Po 12 urah je bil opažen privzem v lizosome (125–200 nm) in mitrohondrije epitelnih celic škrg. Delci različnih velikosti (do 7 µm) so se najprej akumulirali v želodcu, samo majhni in fini pa so se po 12 h transportirali v primarne tubule in se po 24 h pojavili v sekundarnih tubulih prebavnih žlez, kjer so delci nanometrskih velikosti vstopili v lizosome in endocitotske vezikle prebavnih celic (Koehler in sod., 2008). Po kratkotrajnem obdobju privzemanja (3 h 30 min) in izločanja (72 h) radioaktivno označenih nanodelcev ter ionov srebra je približno 90% začetne radioaktivnosti izviralo iz školjk; 2–7% nanodelcev Ag in 10–18% srebrovih ionov se je adsorbiralo na stene in na prezračevalni sistem poskusnih akvarijev. Školjke so po obdobju izločanja pri obeh izpostavitvah v mehkih tkivih akumulirale >60% srebra, poleg tega je bila razporeditev srebra v telesu enaka ne glede na izvor, najvišje koncentracije pa so se pojavile v prebavnih organih (Zuykov in sod., 2011). Nanodelci CuO so se absorbirali v telo morske školjke *Scrobicularia plana* v enaki koncentraciji kot v primeru bakrove soli, čeprav metoda DGT (difuzni gradient v tankem filmu) ni pokazala odtapljanja ionov z nanodelcev CuO (Buffet in sod., 2011).

Croteau in sod. (2011b) so primerjali biodostopnost srebra za sladkovodne polže (*Lymnaea stagnalis*) po izpostavitvi srebrovim ionom ali nanodelcem srebra z vezanim citratom ali huminskimi kislinami. Polži so učinkovito akumulirali Ag v vseh oblikah, tako ob izpostavitvi v vodi kot v hrani. Pri obeh poteh izpostavitve je bil privzem srebrovih ionov hitrejši kot privzem nanodelcev Ag. Polži so učinkovito asimilirali Ag tako iz nanodelcev, pomešanih z diatomejami (AE = 49–58%), kot iz diatomej, predhodno izpostavljenih srebrovim ionom (AE = 73%). Nanodelci Ag so zmanjšali prehranjevanje polžev, ti pa so neučinkovito prebavljali zaužito hrano, kar je zavrlo njihovo rast. Stopnja izločanja Ag je bila hitrejša za nanodelce kot za ione, v obeh primerih pa je bila zelo počasna (največ ~5% na dan).

Pri morskih kotačnikih vrste *Brachionus manjavacas* je bila akumulacija fluorescentnih polistirenskih nanodelcev v telo odvisna od velikosti delcev: kotačniki so zaužili nanodelce vseh velikosti, s premerom od 37 do 2980 nm. Nanodelci s povprečnim premerom 83 nm (velikostna kategorija 100 nm) in večji so ostali omejeni na želodec in črevo, dokler se niso izločili iz iztrebljanjem. Nasprotno so nanodelci s povprečnim premerom 37 nm (velikostna kategorija 50 nm) skozi črevesno steno prehajali v tkiva in potovali v psevdocelom, mastaks in vitelarij. 37 nm veliki nanodelci so prehajali tudi iz mater v jajčeca (Snell in Hicks, 2009).

2.1.3.2.3 Biomagnifikacija in prenos po prehranjevalnih verigah

Več raziskav je pokazalo, da je mogoč trofični prenos nanodelcev po enostavnih prehranjevalni verigah:

- CdS kvantnih pik iz bakterij *Pseudomonas aeruginosa* v migetalkarje *Tetrahymena termophila* (Werlin in sod., 2011), iz bakterij *Escherichia coli* preko migetalkarjev *Tetrahymena pyriformis* v kotačnike *Brachionus calyciflorus* (Holbrook in sod., 2008) ter iz alg *Pseudokirchneriella subcapitata* v vodne bolhe *Ceriodaphnia dubia* (Bouldin in sod., 2008);
- nanodelcev TiO₂ iz alg *Chlorella vulgaris* v vodne bolhe *D. magna* (Morgalev in sod., 2010) ter iz vodnih bolh *D. magna* v cebrice (Zhu in sod. 2010b);
- nanodelcev Ag iz alg *Chlamydomonas reinhardtii* v vodne bolhe *D. magna* (Zhao in sod., 2010);
- nanodelcev Au iz rastlin tobaka (*Nicotiniana tabacum* cv. *Xanthi*) v gosenice metulja *Manduca sexta* (Judy in sod., 2011).

Biomagnifikacija nanodelcev med trofičnim prenosom je bila opažena le v študijah Judy in sod. (2011) ter Werlin in sod. (2011).

Doslej najobširnejšo študijo razporejanja nanodelcev med različnimi biološkimi kompartmenti v mezokozmosu so izvedli Ferry in sod. (2009) v treh umetnih estuarijskih ekosistemih, ki so vsebovali morsko vodo, sedimente, morsko travo, mikrobe, biofilme, polže, školjke, rake in ribe. V vsak mezokozmos so dodali dozo zlatih nanopaličic (z dolžino 65 nm in premerom 15 nm) ter 12 dni opazovali njihovo dinamiko v vodni fazi in sedimentu. Nanopaličice so se razporedile med biofilme, sedimente, rastline, živali in vodo z 84,4% obnovljivostjo. Največ nanodelcev na enoto mase so akumulirali školjke in biofilmi, prisotni pa so bili tudi v ostalih organizmih, kar nakazuje, da lahko zlate nanopaličice prehajajo iz vodnega stolpca v morsko prehransko verigo.

2.2 NANODELCI, UPORABLJENI V NAŠI RAZISKAVI

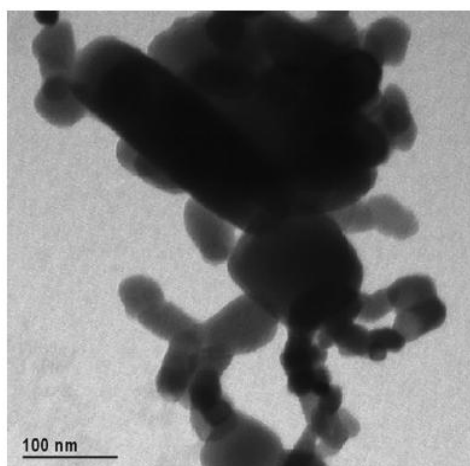
2.2.1 Nanodelci cinkovega oksida

Nanodelci ZnO se uporabljajo v medicini in elektroniki, v proizvodnji gume, keramike, tekstila in kozmetike, pri čiščenju odpadnih voda, kot biosenzorji, baktericidi, fungicidi ter prehranski dodatki. Zaradi učinkovite absorpcije UV sevanja in prepustnosti za vidno svetlobo, ki se povečuje z manjšanjem velikosti delcev, so še posebej perspektivni kot sestavine krem za sončenje ter pigmenti v barvah in premazih.

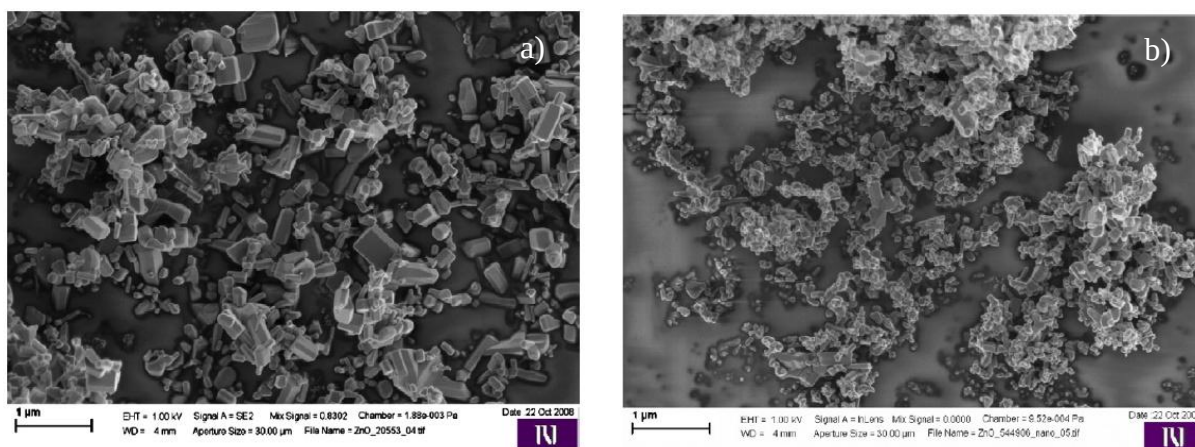
2.2.1.1 Karakterizacija

Pipan-Tkalec in sod. (2010) so v raziskavi opravili karakterizacijo enakih makro- in nanodelcev ZnO, kot smo jih uporabili v pričujočem diplomskem delu. SSA, ocenjena z metodo BET, je bila $12,39 \pm 0,0270 \text{ m}^2/\text{g}$, premer enega nanodelca pa je bil po izračunih 84,9 nm. Velikost nanodelcev je bila v skladu z informacijami proizvajalca, toda izmerjena SSA je bila nižja od specificirane ($15\text{--}25 \text{ m}^2/\text{g}$). DLS analiza suspenzije nano ZnO (100 mg/L) v ultra-čisti, deionizirani vodi (pH = 5,7), prefiltrirane skozi 0,2 μm sito, je pokazala široko distribucijo velikosti delcev. Povprečni hidrodinamski premer delcev je bil 614 nm. TEM slike vodnih suspenzij nano ZnO je pokazala precejšnjo agregacijo delcev z velikostmi od nekaj desetink nanometra do nekaj sto nanometrov (**Slika 1**). Oblika delcev je bila sferična do elipsoidna. SEM je pokazala, da je mikroprah ZnO vseboval delce različnih velikosti, od nekaj deset nanometrov do enega mikrometra (**Slika 2**). Nanodelci

ZnO so bili značilno manjši od mikrodcelcev ZnO. Tako TEM kot SEM sta pokazali, da so bili nanodelci precej večji od nominalne velikosti (100 nm), ki jo je navajal proizvajalec.



Slika 1. Transmisijska elektronska mikrofografija vodne suspenzije nanodelcev ZnO (vir: Pipan-Tkalec in sod., 2010, str. 200).

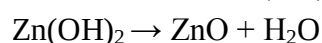
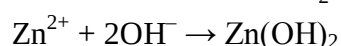
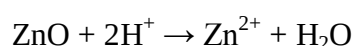


Slika 2. Vrstična elektronska mikrofografija mikrodcelcev (a) in nanodelcev (b) ZnO (vir: Pipan-Tkalec in sod., 2010, str. 200).

2.2.1.2 Lastnosti cinkovega oksida v vodnih medijih

ZnO je amfoterna spojina. Topnost ZnO v vodi v splošnem znaša 1,6 mg/L pri 29°C, topen pa je tudi v razredčenih kislinah in šibkih bazah (Toxicological Profile for Zinc, 2005). V stiku z zrakom absorbira tako vodno paro kot CO₂, s katerima tvori bazični ZnCO₃ (Physical Properties of Zinc Oxide - CAS 1314-13-2, 2011).

Yang in Xie (2006) sta preučevala sproščanje Zn^{2+} ionov z nano- in mikrodolcev ZnO v simulirani znotrajmaternični raztopini. Približno 2 mg ZnO sta inkubirala v 250 mL raztopine pri 37°C, sonicirala in v časovnih intervalih spremljala stopnjo sproščanja Zn^{2+} ionov, definirano kot razmerje med Zn^{2+} ioni v raztopini glede na celokupno količino Zn v vzorcu. Prišlo je do odtapljanja Zn^{2+} ionov s površine nano- in mikrodolcev ZnO. Odtapljanje je bilo pri nanodelcih ZnO približno dvakrat hitrejše kot pri delcih mikrometrskih velikosti. Najvišja stopnja sproščanja Zn^{2+} je bila 95% za nanodelce po 50 urah in 86% za mikrodolce ZnO po 250 urah inkubacije. Stopnja sproščanja se je z znižanjem pH povečala, a zmanjšala, ko se je pH zvišal nad 6. Pri tem so potekale sledeče kemijske reakcije (po Yang in Xie, 2006):



Prisotnost človeškega serumskega albumina (HSA) je pospešila sproščanje Zn^{2+} ionov z nanodelcev Zn in ZnO, vplivala pa je tudi na časovno dinamiko pH v raztopini. HSA se v sloju adsorbira na površino delcev ZnO. Nato se tvori kompleks z vezavo Zn in HSA preko C–N skupin, ki se sprosti v raztopino, kar vodi v odtapljanje ZnO (Yang in Xie, 2006).

2.2.1.3 Strupenost in bioakumulacija

Številne študije so pokazale, da je lahko toksičnost nanodelcev ZnO za različne vrste evkariontskih organizmov (kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*, Kasemets in sod., 2009; alge *Pseudokirchneriella subcapitata*, Franklin in sod., 2007, ter Aruoja in sod., 2009; migetalkarje *Tetrahymena thermophila*, Blinova in sod., 2010, ter Mortimer in sod., 2010; ceponožce *Daphnia magna* in *Thamnocephalus platyurus*, Heinlaan in sod., 2008, Wiench in sod., 2009, ter Blinova in sod., 2010; glisto *Caenorhabditis elegans*, Ma in sod., 2009; embrie žabe *Xenopus laevis*, Nations in sod., 2011a, 2011b; pet vrst morskih organizmov, Wong in sod., 2010) ter citotoksičnost za sesalske celice *in vitro* (Brunner in sod., 2006; Xia in sod., 2008; Song in sod., 2010) pripišemo predvsem odtopljenim Zn^{2+} ionom. Nekatere študije na glisti *C. elegans* (Wang in sod., 2009), deževnikih *E. fetida* (Li in sod., 2011), embrijih cebric (Zhu in sod., 2009b; Bai in sod., 2010) in odraslih cebricah (Xiong in sod., 2011), embriih žab (Bacchetta in sod., 2011) ter podganah (Cho in sod., 2011) pa so pokazale, da odtapljanje Zn^{2+} ionov ne more pojasniti celokupnih toksičnih učinkov na te organizme ter da imajo Zn^{2+} ioni in nanodelci ZnO različne načine delovanja oziroma sinergistične učinke. Najbolj prepričljiv argument v prid tej hipotezi je dala študija

Poynton in sod. (2011), ki je preučevala diferencialno ekspresijo genov v *D. magna*. Od 51 genov, izraženih ob izpostavitvi nanodelcem ZnO, in 40 genov, izraženih ob izpostavitvi ZnSO₄, so v genskih profilih obeh izpostavitvev sovpadali le štirje. Analiza s q-RT-PCR je potrdila diferencialno ekspresijo treh biomarkerskih genov pri primerjavi izpostavitve 0,4 mg/L Zn²⁺ ionov v obliki ZnSO₄ z odtopljenimi v suspenziji nanodelcev ZnO.

Nanodelci ZnO morda delujejo citotoksično delno tudi preko mehanizma tvorbe ROS, vendar odnos med tvorbo ROS in vplivom odtopljenih Zn²⁺ ionov še ni razrešen (Song in sod., 2010). Toksičnost nanodelcev ZnO je bila v navedenih študijah primerljiva s toksičnostjo cinkovih soli in večja ali enaka kot toksičnost mikrododelcev ZnO, odvisno od eksperimentalnih pogojev ter lastnosti uporabljenih delcev (velikost, agregacija, proizvajalec).

Pipan-Tkalec in sod. (2010) so preučevali privzem Zn iz cinkovih spojin v treh različnih oblikah (nano- in mikrododelci ZnO ter ZnCl₂) in dveh različnih koncentracijah (2000 in 5000 µg/g hrane) v kopenske enakonožce vrste *Porcellio scaber*. Med živalmi, hranjenimi z različnimi oblikami Zn v isti koncentraciji, niso opazili razlik v koncentraciji Zn v telesu poskusnih organizmov, v učinkovitosti asimilacije Zn in v bioakumulacijskem faktorju (BAF), torej je bil bioakumulacijski potencial za Zn enak ne glede na njegov vir. Količina asimilirane Zn ter BAF sta bila odvisna od odmerka. Kapaciteta za asimilacijo Zn je znašala do 16% zaužitega Zn in je bila neodvisna od izpostavitvenih koncentracij. Hranjenje s cinkovimi spojinami ni vplivalo na stopnjo prehranjevanja ali defekacije enakonožcev, učinkovitost asimilacije hrane pa se je zvišala zgolj v skupini, hranjeni z ZnCl₂ v konc. 5000 µg/g hrane, v primerjavi s konc. 2000 µg/g hrane.

Croteau in sod. (2011a) so opravili raziskavo bioakumulacije ⁶⁷Zn iz izotopsko modificiranih nanodelcev ⁶⁷ZnO in ⁶⁷Zn ionov, zaužitih z diatomejami (*Nitzschia palea*) ali iz vodne raztopine, v vodnih polžih (*Lymnaea stagnalis*). Obe obliki cinka sta bili za polže enako biodostopni, učinkovitost asimilacije ⁶⁷Zn pa je bila 70–90%. Hranjenje z nanodelci ZnO je povzročilo zmanjšanje prehranjevanja in defekacije, vendar le pri zelo visokih koncentracijah (približno 26.000 in 52.000 g/kg), medtem ko nižje koncentracije niso imele vpliva. Polži so ob izpostavitvi visokim koncentracijam ZnO tudi neučinkovito prebavljali zaužito hrano. Med obdobjem 15 dni hranjenja z netretirano hrano se je v prvih nekaj dneh z defekacijo izločilo skoraj 20% zaužitega cinka, kasneje pa je bila izguba v tkiva inkorporiranega cinka počasna, 8% na dan, in približno enaka ne glede na obliko cinka, ki so ji bili polži izpostavljeni (tj. nanodelcem ZnO ali cinkovim ionom). Študija ni dala jasnih izsledkov, ali je bila toksičnost posledica visoke doze cinkovih ionov, pridobljenih z nanodelci ZnO, ali nanodelcev samih.

Hooper in sod. (2011) so deževnike *Eisenia veneta* za 21 dni izpostavili nanodelcem ZnO v prsti in hrani s konc. cinka 250 in 750 mg/kg. Učinke izpostavitve na preživetje, razmnoževanje, telesno maso, imunsko aktivnost in vsebnost Zn v telesu so primerjali z učinki ZnCl_2 v ekvivalentnih koncentracijah. Nanodelci ZnO so imeli manjši vpliv na deževnike kot ZnCl_2 : pri konc. 750 mg/kg so nanodelci ZnO zmanjšali razmnoževanje za 50%, medtem ko ga je ZnCl_2 povsem zavrl; podobno nanodelci ZnO niso vplivali na imunsko aktivnost, medtem ko jo je ZnCl_2 zmanjšal za 20%. Analiza tkiv deževnikov s SEM po 24 urah izpostavitve vodni suspenziji nanodelcev ZnO je pokazala, da so se le-ti akumulirali v telesni steni (in niso ostali zgolj ujeti v mukus na telesni površini), kjer so bili prisotni v obliki agregatov velikosti od $<0,5 \mu\text{m}$ do $\geq 1 \mu\text{m}$.

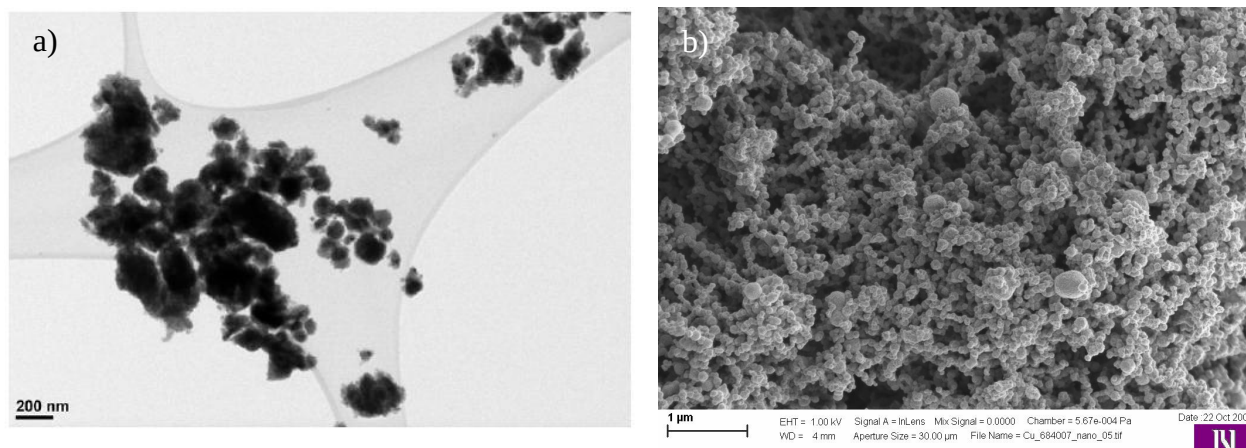
2.2.2 Nanodelci elementarnega bakra

Nanodelci Cu se uporabljajo v elektroniki (npr. za prevleke v električnih vezjih in baterijah), proizvodnji keramike, polimerov, črnih in industrijskih lubrikantov, v vodnih in zračnih filtrih ter za povečanje toplotne in električne prevodnosti v premazih, tesnilih in avtomobilskih zavornih sistemih. Zelo perspektivni se kažejo v zdravljenju osteoporoze, aditivih k živalski krmi, kozmetiki, antibakterijskih materialih in znotrajmaterničnih kontracepcijskih pripomočkih.

2.2.2.1 Karakterizacija

Analizo nanodelcev Cu, uporabljenih v naši raziskavi (Sigma-Aldrich, $<50 \text{ nm}$), s TEM je januarja 2011 opravil dr. Darko Makovec z Inštituta Jožefa Stefana (IJS). Nanodelci so bili pripravljeni za TEM analizo z nanosom na Cu mrežico za TEM.

Vzorec so sestavljali večji delci velikosti med nekaj 10 in nekaj 100 nm, na katerih so bili manjši delci velikosti $<10 \text{ nm}$. Večina večjih delcev je bila nanokristalinična; delci so bili sestavljeni iz nanokristalitov velikosti $<10 \text{ nm}$ (**Slika 2**). Redkeje so bili najdeni večji monokristalni delci. Pripadajoča elektronska difrakcija (SAED) je razen obročev, ki so se skladali s kubičnim bakrom, pokazala še dva dodatna obroča, ki nista pripadala bakru. Možno je, da je šlo za oksid. Elektronska disperzijska spektroskopija (EDS) je razen Cu pokazala še majhna vrhova, pripadajoča Si in O.

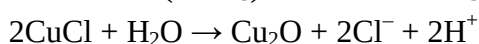
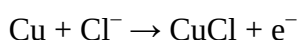


Slika 3. a) transmisijska elektronska mikrofografija uporabljenih nanodelcev Cu na mrežici za TEM (foto: dr. Darko Makovec, Inštitut Jožefa Stefana, 2011), **b)** vrstična elektronska mikrofografija uporabljenih nanodelcev Cu (foto: dr. Marjan Bele, Kemijski inštitut, 2008).

2.2.2.2 Lastnosti nanodelcev bakra v vodnih medijih

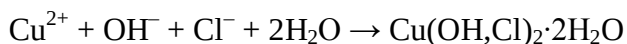
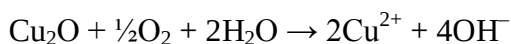
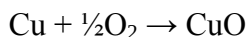
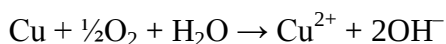
Bakrovi nanodelci so sestavljeni iz kovinskega jedra iz elementarnega Cu ter oksidirane površinske plasti, katere notranji sloj tvori manj oksidirani Cu_2O , zunanji sloj pa bolj oksidirani CuO , ki se tvori zaradi močne površinske reaktivnosti bakrovih nanodelcev. (Elzey in Grassian, 2010).

Cai in sod. (2005) so preučevali sproščanje Cu^{2+} ionov z nano- in mikrododelcev Cu v simulirani znotrajmaternični raztopini. Približno 2 mg Cu so inkubirali v 500 mL raztopine pri 37°C , sonicirali in v časovnih intervalih spremljali stopnjo sproščanja Cu^{2+} ionov, definirano kot razmerje med Cu^{2+} ioni v raztopini glede na celokupno količino Cu v vzorcu. Prišlo je do odtapljanja Cu^{2+} ionov s površine nano- in mikrododelcev Cu. Najvišja stopnja sproščanja Cu^{2+} je bila 98% za nanodelce po 120 urah in 59% za mikrododelce Cu po 170 urah inkubacije. Prisotnost HSA je pospešila sproščanje Cu^{2+} ionov z nanodelcev Cu. Zaradi prisotnosti soli v raztopini so potekale dodatne reakcije (po Cai in sod., 2005):



V raziskavi Xia in sod. (2006) je do odtapljanja Cu^{2+} ionov z nanodelcev Cu prišlo tudi v destilirani vodi (protokol poskusa je bil enak kot v raziskavi Cai in sod. (2005), le da je bila uporabljena količina nano- in mikrododelcev Cu 12 mg). Odtapljanje je bilo pri nanodelcih Cu veliko hitrejše kot pri delcih mikrometrskih velikosti; najvišja stopnja

sproščanja Cu^{2+} je bila 10% za nanodelce po 10 urah in 6% za mikodelce Cu po 200 urah inkubacije. Korozijski produkti nanodelcev so bili Cu, CuO, $\text{Cu}(\text{OH}, \text{Cl})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in $\text{Cu}(\text{CO}_3)(\text{OH})_2$, ki so v nasprotju z mikodelci obdajali tudi površino nanodelcev, medtem ko sta bila korozijska produkta mikodelcev le Cu in CuO. Možne reakcije njihovega nastanka so (po Xia in sod., 2006):



Midander in sod. (2007) so preučevali sproščanje bakra iz delcev različnih bakrovih materialov, vključno z umetno bakrovo patino, Cu_2O in elementarnim Cu ob stiku različnimi umetnimi biološkimi mediji. V Gambleovi raztopini, ki posnema intersticijske pogoje v pljučih, sta bili tako hitrost sproščanja kot količina sproščenega Cu največji v primeru nanodelcev Cu. V kasnejši študiji (Midander in sod., 2009) so prišli do podobnih zaključkov glede kinetike odtapljanja Cu z nano- in mikodelcev Cu v standardni fiziološki raztopini; poleg tega so ugotovili, da so se v fiziološki raztopini ohranili približno 300 nm veliki primarni agregati nanodelcev Cu. Soniciranje nanodelcev Cu v serumskem celičnem mediju (obogatenem Dulbeccovem minimalnem esencialnem mediju, DMEM+) je uspelo uspešno razbiti agregate in za dvakrat povečati stopnjo sproščanja bakra v primerjavi z nesoniciranimi nanodelci Cu, pa tudi soniciranimi in nesoniciranimi mikodelci Cu, pri katerih v stopnji sproščanja bakra ni bilo bistvenih razlik.

2.2.2.3 Strupenost in bioakumulacija

Večina študij (cito)toksičnosti nanodelcev bakrovih spojin se je osredotočila na nanodelce CuO; njihovi zaključki so podobni kot v primeru nanodelcev ZnO (Heinlaan in sod., 2008; Aruoja in sod., 2009; Kasemets in sod. 2009; Mortimer in sod., 2010; Studer in sod., 2010). Toda podobne rezultate so dale tudi študije z nanodelci elementarnega Cu: toksičnost *in vivo* (za miši, Chen in sod., 2006, ter Meng in sod., 2007a, 2007b) ter citotoksičnost *in vitro* (za sesalske celice, Meng in sod., 2007a, Midander in sod., 2009) lahko pripišemo predvsem odtopljenim Cu^{2+} ionom, ki povzročijo sekundarne škodljive učinke na biološke sisteme. Toksičnost nanodelcev Cu je bila v navedenih študijah primerljiva s toksičnostjo bakrovih soli in večja ali enaka kot toksičnost makrodelcev Cu. Nekateri avtorji pa menijo, da kljub prisotnosti odtapljanja vpliv ionov Cu^{2+} ne zadošča za pojasnitev toksičnih učinkov na različne vodne organizme (Griffit in sod., 2007, 2008).

Pomemben argument v tej smeri je dala študija Griffit in sod. (2009), ki je preučevala učinke nanodelcev bakra na morfološke in histološke lastnosti, vsebnost kovin in diferencialno ekspresijo genov v škrgah cebric. Nanodelci Cu so povzročili 3,5-kratno razširitev škržnih filamentov v primerjavi z 2-kratnim pri bakrovih ionih, medtem ko je bila vsebnost bakra v škrgah ter v celotnem telesu enaka v obeh tretmajih, kar kaže, da so bakrovi nanodelci delovali na površino škrg. Kljub zelo podobni koncentraciji ionov v raztopini bakrove soli ter suspenzije nanodelcev (prišlo je do 51% disolucije bakrovih nanodelcev, ki se je stabilizirala že po 24 urah) sta bila tudi transkripcijska profila med obema tretmajema bistveno različna.

Unrine in sod. (2010a) so deževnike *E. foetida* za 28 dni izpostavili nanodelcem Cu velikosti 20–40 nm in <100 nm v konc. 5, 20 in 50 mg/kg suhe mase prsti ter njihove učinke primerjali s CuSO₄ v konc. 2, 10 in 20 mg/kg suhe mase prsti. Izpostavitvene koncentracije nanodelcev Cu do 65 mg/kg niso imele škodljivih učinkov na ekološko relevantne parametre, kot so smrtnost, rast, razmnoževanje in ekspresija različnih genov, povezanih s homeostazo kovin, splošnim ter oksidativnim stresom. Povečana ekspresija metalotioneinov se je pojavila pri koncentracijah >20 mg/kg za nanodelce Cu in >10 mg/kg za CuSO₄. Vsebnost Cu v tkivih deževnikov je naraščala z izpostavitveno koncentracijo bakrovih spojin v prsti: pri CuSO₄ je znašala 1,87–3,16 mg/kg, pri 20–40 nm velikih nanodelcih Cu 1,79–4,54 mg/kg, pri <100 nm velikih nanodelcih Cu pa 2,76–6,71 mg/kg tkiva. Metoda μ SXRF je tako v primeru nanodelcev Cu kot v primeru CuSO₄ pokazala enakomerno razporeditev Cu v tkivih črevesa in mišicah telesne stene deževnikov. Glede na razmerje med ekspresijo metalotioneinov in koncentracije Cu v tkivih raziskovalci zaključujejo, da je prišlo do privzema tako bakrovih ionov kot nanodelcev Cu v tkiva deževnikov.

2.3 MODELNI ORGANIZMI – ENAKONOŽNI RAKI VRSTE *Porcellio scaber*

Le redke živalske vrste izpolnjujejo kriterije za uporabo kot testni organizmi za učinke onesnažil na kopnem. Ključnega pomena je poznavanje biologije vrste, subletalnih odgovorov na kemikalije in informacij, s katerimi lahko ločimo merjene učinke od naravne variabilnosti. Najpogostejši merljivi kriteriji za toksične učinke onesnažil so smrtnost, reprodukcija in rast, pri čemer je smrtnost nizko občutljiv parameter, ostala dva pa sta neugodna zaradi potrebe po dolgotrajni izpostavljenosti ter visoki individualni variabilnosti odgovora. Najbolj občutljivi parametri so biokemijski, histološki in fiziološki (Drobne, 1997).

V naši raziskavi smo kot modelne organizme uporabili kopenske rake vrste *Porcellio scaber*, ki spadajo med višje rake (razred Malacostraca), valilničarje (nadred Peracarida), enakonožce (red Isopoda) in prašičke ali kočiče (podred Oniscoidea). Enakonožni raki so kozmopoliti; večina vrst živi v morju, poselili pa so tudi sladkovodne habitate in kopno. Kopenske vrste najdemo v zmerno vlažnih predelih, v naravi med lubjem, pod gnijočimi debli in kamenjem ter v človeškem okolju, še posebej v zgornjih plasteh kompostnih gomil. Prehranjujejo se z algami, glivami, mahom, lubjem ter razpadajočim rastlinskim in živalskim materialom. Imajo pomembno vlogo kot dekompozitorji, predvsem pri fragmentaciji odmrlega rastlinskega materiala. (Ruppert in sod., 2004).

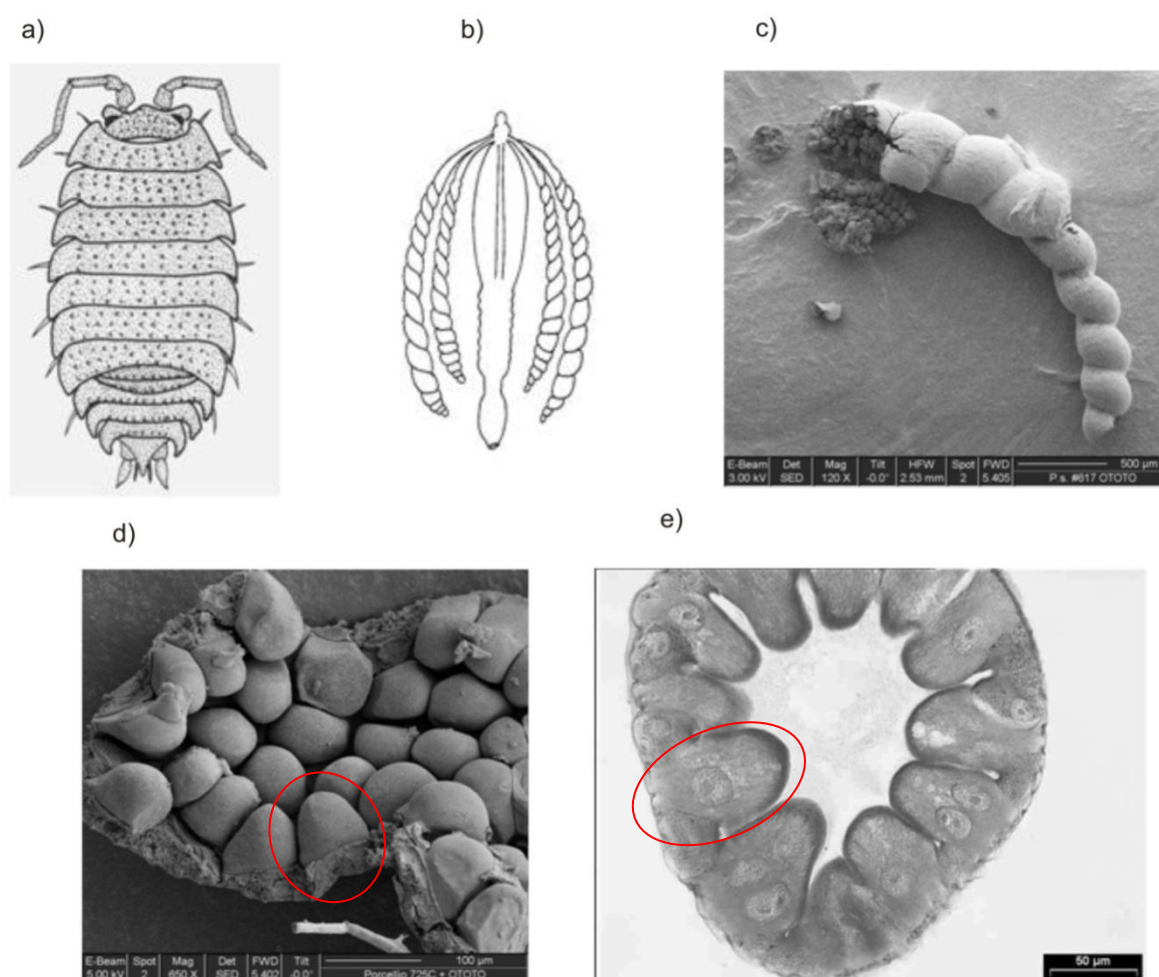
Kopenski enakonožci so eni najpogostejše uporabljanih kopenskih nevretenčarjev v kopenski ekotoksikologiji. So ustrezne velikosti ter abundance, enostavni za identifikacijo in ravnanje v laboratoriju, poleg tega so (sekundarno) razširjeni po vsem svetu in pogosti v različnih kopenskih okoljih. Kakršnekoli spremembe v prehranjevalnem vedenju kopenskih enakonožcev lahko vplivajo na dekompozicijo odmrlega rastlinskega materiala in posledično na pretok snovi in energije skozi ekosisteme. Pomembna lastnost za ekotoksikološke razskave je, da lahko tolerirajo visoke koncentracije kovin, njihovi odzivi na kovine na različnih nivojih biološke organizacije pa so dobro raziskani (Drobne in Hopkin, 1994; Drobne, 1997).

2.3.1 Zgradba in delovanje prebavil v povezavi z metabolizmom kovin

Prebavilo enakonožnih rakov je sestavljeno iz prebavne cevi in prebavnih žlez (hepatopankreasa). Prebavna cev je razdeljena na krajše sprednje in daljše zadnje črevo ki zavzema 80–90% celotne dolžine prebavnega trakta. Sprednji del prebavne cevi je iz kratkega požiralnika in želodca, ki je povezan s črevesom in prebavnimi žlezami. Funkcija želodca je filtriranje, mletje, transport in encimska razgradnja hrane. Tekočine in zelo droben material prehajajo skozi primarni in sekundarni filter v prebavne žleze. V zadnjem črevesu potekata resorpcija in transport prebavnih produktov, vpleteno pa je tudi v vodno in ionsko ravnotežje (Hames in Hopkin, 1989; Zimmer, 2002).

Prebavne žleze sestavljata dva para cevki. Izhajajo iz atrija v posteriornem delu želodca in potekajo vzporedno z zadnjim delom črevesa. Osnovna enota je slepo zaprta cevka iz enoslojnega epitela. Slepki konci vsebujejo večinoma nediferencirane celice, ki se distalno mitotično delijo. Primarna funkcija cevki je sekrecija encimov, absorpcija hranil, shranjevanje lipidov ter kopičenje kovin (Hames in Hopkin, 1989).

Cevke prebavnih žlez sestavljata dva tipa celic. Velike celice (celice S) skladiščijo lipide in glikogen ter imajo vlogo sekrecije in absorpcije. Funkcija malih celic (celic B) je predvsem sekrecija. Vsebujejo različne tipe intracelularnih granul, ki so mesta akumulacije kovin in mesta ekskrecije odpadnih produktov. V celicah S se nahajajo sferične granule, ki vsebujejo Cu, S, Na, Ca, Mg in P, pri enakonožcih iz onesnaženih habitatov tudi Zn, Cd in Pb. Zaradi kopičenja velikih količin bakra imenujemo te organele tudi kuprosomi; prisotnost žvepla v njih kaže, da so kovine vezane v kompleksih z metalotioneini. V celicah B so kosmičasti depoziti, ki vsebujejo Fe, pri enakonožcih z onesnaženih habitatov tudi Zn in Pb. Kuprosomi in »železove« granule so se verjetno razvili kot mesta skladiščenja esencialnih kovin za uporabo v času, ko potrebe v telesu presežejo stopnjo privzema iz hrane (Hopkin in Martin, 1982; Valant, 2010).



Slika 4. **a)** skica raka enakonožca (*Porcellio scaber*), **b)** skica prebavnega sistema *P. scaber*, **c)** mikrofotografija vrstične elektronske mikroskopije ene cevke prebavnih žlez, **d)** mikrofotografija vrstične elektronske mikroskopije posameznih celic apikalnega dela prebavnih žlez (ena celica je označena), **e)** prečni prerez prebavne žleze, narejen s svetlobno mikroskopijo (ena celica je označena) (vir: Valant, 2010, str. 32).

Enakonožci se zastrupitvi s kovinami izogibajo na več načinov: z izogibalnim vedenjem, regulacijo stopnje prehranjevanja in/ali z ekskrecijo preko fecesa, morda tudi urina (povzeto po Drobne in Hopkin, 1995). Najpomembnejši mehanizem je skladiščenje potencialno nevarnih količin esencialnih in neesencialnih kovin v hepatopankreasu v relativno netopni obliki znotraj granul ter kompleksacija z metalotioneini (Hopkin in Martin, 1982; Hopkin, 1990a). Zastrupitev s kovinami se skoraj gotovo pojavi takrat, ko je skladiščna kapaciteta hepatopankreasa prekoračena (Hopkin, 1990b). Stres zaradi subletalne preobremenitve s kovinami pa vodi v zmanjšano absorpcijo nutrientov, splošno pomanjkanje energije in različne simptome stradanja na tkivnem nivoju (Köhler in sod., 1996; Žnidaršič in sod., 2003).

3. MATERIAL IN METODE

Za namen študije interakcij med nanodelci ZnO ali nanodelci Cu ter ioni teh dveh kovin in biološkim sistemom *in vivo* smo izvedli ločena poskusa, v katerih smo modelne organizme hranili z omenjenimi spojinami v obliki premazov na posušenih listih leske (*Corylus avellana*) in črne jelše (*Alnus glutinosa*). Po izteku poskusa smo modelne organizme secirali, pri čemer smo ločili prebavne žleze in črevo od preostanka telesa. Vse te telesne dele smo pripravili za analizo z atomsko absorpcijsko spektroskopijo, s pomočjo katere smo preučevali vsebnost Zn in Cu v telesnih delih modelnih organizmov ter dinamiko njunega kopičenja in izločanja. Popisali smo tudi različne prehranjevalne parametre modelnih organizmov tekom prehranjevalnih poskusov.

3.1 GOJENJE POSKUSNIH ORGANIZMOV V LABORATORIJU

Poskusne živali, kopenske rake enakonožce vrste *P. scaber*, smo nabrali v kompostu iz neonesnaženega okolja v kraju Dobrova pri Ljubljani. Po prenosu v laboratorij smo jih namestili v gojitvene posode – steklene terarije dimenzij 35×18×21 cm, ki smo jih do višine 5 cm napolnili s prstjo in rastlinskim materialom iz izvornega komposta. Dodali smo jim tudi suhe liste leske in sveže nabrane rastline regrata (*Taraxacum officinale* agg.) iz okolice Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete ter kose lubja lipovca (*Tilia cordata*) iz Trnovelj pri Celju. Posode smo na vrhu pokrili s papirnatimi brisačami in čeznje položili steklene pokrove primerne velikosti in oblike, tako da posod niso nepredušno zapirali. S tem smo omogočili izmenjavo plinov med notranjostjo posode in okoliškim zrakom.

Gojitvene posode smo več kot 14 dni hranili v kontroliranih pogojih pri temperaturi $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ in naravnem svetlobnem ciklu (16 ur svetlobe in 8 ur teme), da so se poskusne živali aklimatizirale na laboratorijske razmere. Hranili smo jih s suhim leskovim listjem in sveže nabranim regratom. Primerno vlažnost smo vzdrževali z občasnim (enkrat do dvakrat tedensko, odvisno od potreb) vlaženjem z destilirano vodo, s katero smo škropili stene posode in rastlinski material.

3.2 PREHRANJEVALNI POSKUSI

Na obremenitev enakonožcev s kovinami se najbolj odzivajo njihovo prehranjevanje (merjeno preko asimilacije in produkcije fecesa), levitveni cikel in struktura hepatopankreasa (Drobne, 1997). Pri izbiri testnega postopka, ki je hiter, preprost in ponovljiv, smo zato sledili protokolu, predlaganem v raziskavah Hopkina (1990b) ter Hopkina in Drobnetove (1994, 1995).

3.2.1 Priprava poskusnega materiala

V okolici Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete smo nabrali večje količine suhega, delno razgrajenega listja leske in jelše. Listje jelše in del listja leske smo nabirali novembra 2007 po nekaj tednih zmrzali, aprila 2010 pa drugi del listja leske, ki se je ohranilo od prejšnje sezone. Suho listje smo do uporabe hranili v kartonskih škatlah v vivariju Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete. Pred poskusom smo ustrezne količine suhega listja leske in jelše navlažili z destilirano vodo, ga zravnali in vložili med bele liste papirja velikosti A4. Papir smo obtežili in pustili najmanj 24 ur, da je listje ohranilo ravno obliko. Nato smo papir menjavali enkrat dnevno še nadaljnjih nekaj dni, dokler se ni listje povsem posušilo. Suho listje smo vložili med nerabljene liste papirja in ga do uporabe hranili v kartonski škatli v laboratoriju.

Zravnano suho listje smo narezali na koščke z maso 100 ± 10 mg in jih položili v ustrezno označene plastične petrijevke s premerom 9 cm, po en košček v vsako petrijevko. Ena petrijevka z enim koščkom lista je predstavljala eno testno enoto. Na tako pripravljen material smo nanесли testne kemikalije.

3.2.2 Priprava ter nanos suspenzij in raztopin

3.2.2.1 Poskus s cinkom

Kot testne kemikalije smo uporabili nano ZnO ($<1 \mu\text{m}$, Sigma-Aldrich), mikro ZnO (Merck) in ZnCl_2 (Merck), ki smo jih suspendirali oziroma raztopili v destilirani vodi. Na podlagi podatkov iz literature (Drobne, 1996; Pipan-Tkalec in sod., 2010) smo izbrali koncentracije, pri katerih nismo pričakovali izrazitega učinka na prehranjevanje izopodov. Tako smo suspenziji obeh oblik ZnO pripravili v koncentracijah cinka 1,5 mg/mL in 4 mg/mL, raztopino ZnCl_2 pa v koncentracijah cinka 1 mg/mL ter 2,5 mg/mL. Temu ustrezno so po nanosu na liste nominalne koncentracije cinka iz obeh oblik ZnO znašale 1500 in 4000 μg na gram suhe mase lista, nominalni koncentraciji cinka iz ZnCl_2 pa 1000 in 2500 μg na gram suhe mase lista. Pri vseh nadaljnjih izračunih smo uporabili nominalne koncentracije, ki jih navajamo tudi v rezultatih, medtem ko dejanske koncentracije lahko odstopajo od nominalnih do 10% (Drobne, 1996; Pipan-Tkalec in sod., 2010).

Na spodnjo stran listov smo s pipeto nanесли testne kemikalije v volumnu, ustreznem masi koščka lista (referenčna vrednost 100 μL tekočine na 100 mg suhe mase lista). S čopičem smo jih razmazali po celotni površini koščka. Liste kontrolnih skupin smo na enak način namazali z destilirano vodo. Material smo pustili najmanj 24 ur, da se je posušil. Nato smo

koščke listov še enkrat stehali in dobljene mase uporabili kot referenčne podatke za nadaljnje izračune.

3.2.2.2 Poskus z bakrom

Kot testni kemikaliji smo uporabili nano Cu (<50 nm, Sigma-Aldrich) ter $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Merck), ki smo ju suspendirali oziroma raztopili v destilirani vodi. Na podlagi predhodnega poskusa (št. 28; Miha Golobič, oktober 2009, neobjavljeni podatki) smo izbrali koncentracije, pri katerih nismo pričakovali izrazitega učinka na prehranjevanje izopodov. Tako smo obe bakrovi spojini pripravili v koncentracijah bakra 2 mg/mL in 5 mg/mL. Temu ustrezno sta po nanosu na liste nominalni koncentraciji bakra iz obeh bakrovih spojin znašali 2000 in 5000 μg na gram suhe mase lista. Pri vseh nadaljnjih izračunih smo uporabili nominalne koncentracije, ki jih navajamo tudi v rezultatih, medtem ko dejanske koncentracije lahko odstopajo od nominalnih do 10% (Miha Golobič, neobjavljeni podatki).

Suspencijo bakrovih nanodelcev smo pred nanosom na liste sonicirali in vorteksirali toliko časa, dokler se ni stabilizirala. Nanos na liste je potekal enako kot pri poskusu s cinkom, le da smo v prvotnem poskusu uporabili liste jelše, pri ponovitvi pa liste leske, kot je pojasnjeno v nadaljevanju.

3.2.3 Izvedba poskusov

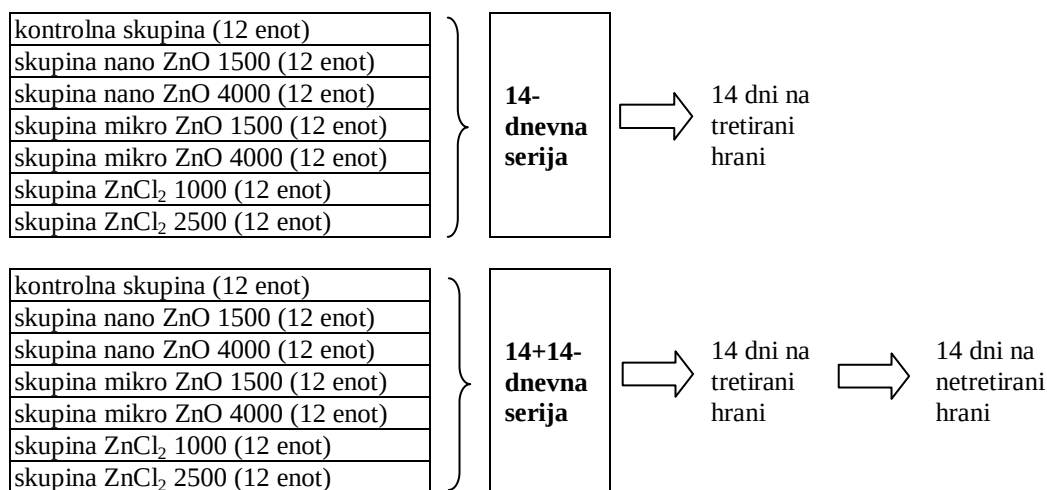
3.2.3.1 Poskus s cinkom

Zasnovali smo dve kontrolni in 12 eksperimentalnih skupin, po 2 za vsako koncentracijo vsake cinkove spojine, z nominalnimi koncentracijami cinka:

1. nano ZnO s konc. 1500 μg na gram suhe mase lista (t.i. »nano ZnO 1500«),
2. nano ZnO s konc. 4000 μg na gram suhe mase lista (t.i. »nano ZnO 4000«),
3. mikro ZnO s konc. 1500 μg na gram suhe mase lista (t.i. »mikro ZnO 1500«),
4. mikro ZnO s konc. 4000 μg na gram suhe mase lista (t.i. »mikro ZnO 4000«),
5. ZnCl_2 s konc. 1000 μg na gram suhe mase lista (t.i. » ZnCl_2 1000«),
6. ZnCl_2 s konc. 2500 μg na gram suhe mase lista (t.i. » ZnCl_2 2500«).

Vsaka eksperimentalna skupina je vsebovala 12 enot. Ena kontrolna skupina in po ena eksperimentalna skupina za vsako koncentracijo vsake cinkove spojine so predstavljale eno eksperimentalno serijo. Prva serija (t.i. »14-dnevna serija«) je bila namenjena 14-dnevni

izpostavitvi tretirani hrani (t.i. »obdobju kopičenja«), druga serija (t.i. »14+14-dnevna serija«) pa 14-dnevni izpostavitvi tretirani hrani in sledečemu 14-dnevnu izločanju kovin iz telesa na netretirani hrani (t.i. »obdobju izločanja«).



Slika 5. Shema prehranjevalnega poskusa s cinkom.

Pred poskusom smo poskusne živali stehali ter določili spol, fazo levitve (po Zidar in sod., 1998) in morebitne vidne posebnosti. Izločili smo osebkke v PE2 in PE3 fazah levitvenega ciklusa, samice z marzupiji ter spolno nezrele osebkke ($m = <25$ mg). Uporabili smo osebkke obeh spolov z maso med 25 in 80 mg. Nato smo v vsako petrijevko položili po en osebek. Petrijevke smo po notranji stani pokrovov poškopili z destilirano vodo v obliki zelo drobnih kapljic. V stolpičih smo jih zložili v večji steklen terarij, ki smo ga predhodno po dnu obložili z navlaženimi papirnatimi brisačami in po stenah poškopili z destilirano vodo. Terarij smo pokrili s steklenim pokrovom in ga po vrhu prekrili s plastično folijo, s čimer smo preprečili izhlapevanje vode.

Poskusne živali smo vzdrževali v kontroliranih pogojih, enakih kot za gojitvene kulture. Petrijevke in terarij smo vlažili po potrebi. Menjavalni smo položaj petrijevk znotraj stolpcev ter položaj stolpičev znotraj terarija, tako da so bile poskusne živali tekom poskusa izpostavljene različnim svetlobnim, temperaturnim in vlažnostnim pogojem. Do izteka poskusa smo vsak drugi ali tretji dan pregledovali stanje petrijevk in poskusnih živali ter odstranjevali poginule osebkke in samice, ki so tekom poskusa razvile marzupije.

Živali v obeh eksperimentalnih serijah smo 14 dni gojili v petrijevkah s tretiranimi listi. 14. dan smo živali iz obeh serij prestavili v petrijevke z netretiranimi listi. Živalim v prvi seriji smo dodali netretirane liste nedefinirane mase in jih tako vzdrževali 24 ur, da so izpraznile črevo, nato pa smo jih 15. dan secirali. Drugo serijo, kjer je bila masa netretiranih listov ponovno 100 ± 10 mg, smo gojili v kontroliranih pogojih nadaljnjih 14 dni in jih secirali neposredno na 28. dan poskusa.

Pred sekcijo smo živali usmrtili z dekapitacijo neposredno za cefalotoraksom. Nato smo odstranili še pleon ter iz telesa izvlekli črevo in vse štiri cevke žlez. Dele telesa smo položili na koščke filter papirja z znano maso, da so vpili telesne tekočine, in jih vstavili v epice. Telesne dele smo liofilizirali in jih po liofilizaciji namestili v eksikator za najmanj 24 ur. Določili smo maso suhih delov telesa, ki smo jo uporabili za nadaljnje izračune.

Tretirane in netretirane liste vseh skupin, ki smo jih uporabili v poskusu, smo po odvzemu živali iz petrijevk (po 14. dnevu za obe seriji ter po 28. dnevu za 14+14-dnevno serijo) posušili in jim določili suho maso. Prav tako smo določili suho maso odstranjenih iztrebkov, ki smo jih iz petrijevk pobrali vsakih 7 dni (torej 7., 14., 21. in 28. dan poskusa), s čimer smo dobili časovno dinamiko prehranjevanja in delno omejili koprofagijo³. Te podatke smo uporabili za izračun različnih prehranjevalnih indeksov.

3.2.3.2 Poskus z bakrom

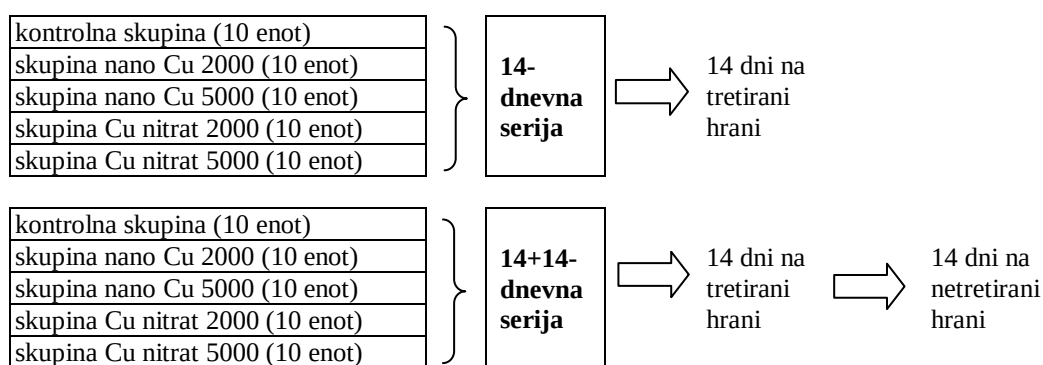
Zasnovali smo dve kontrolni in 8 eksperimentalnih skupin, po 2 za vsako koncentracijo vsake bakrove spojine, z nominalnimi koncentracijami bakra:

1. nano Cu s konc. 2000 μg na gram suhe mase lista (t.i. »nano Cu 2000«),
2. nano Cu s konc. 5000 μg na gram suhe mase lista (t.i. »nano Cu 5000«),
3. $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ s konc. 2000 μg na gram suhe mase lista (t.i. »Cu nitrat 2000«),
4. $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ s konc. 5000 μg na gram suhe mase lista (t.i. »Cu nitrat 5000«).

V našem prvem poskusu z bakrom (poskus št. 33) smo uporabili liste črne jelše. Izbor je bil osnovan na izkustvenem opažanju, da se enakonožci z jelševimi listi prehranjujejo

³ Levitveni cikel pri enakonožcih običajno traja okoli 28 dni (Steel 1980, cit. po Drobne in Štrus, 1996), torej lahko pričakujemo, da se bodo levili vsaj enkrat tekom tovrstnih poskusov. Levitev je obdobje, ko so členonožci zaradi mehkega telesa in energijskih izgub zelo ranljivi za zunanje vplive. Dokler se narastišča mišic ponovno ne utrdijo, je takoj po levitvi tudi gibanje zelo težko, če ne celo nemogoče. Po ocenah je kar 80–90% smrti pri členonožcih na nek način povezanih z levitvami (Ruppert in sod., 2004). Zato je pri rokovanju s temi organizmi za potrebe ekotoksikoloških študij nujna previdnost, čeprav izpostavljenost kovinam podaljša levitveni cikel, in to premo sorazmerno z dozo (Drobne in Štrus, 1996). Pogostejše pobiranje iztrebkov je po naših izkušnjah za enakonožce preveč stresno, lahko poveča smrtnost in vpliva na rezultate poskusa; prav tako gojenje na mrežicah, s katerimi bi koprofagijo skoraj povsem preprečili.

enako intenzivno kot z leskovimi; ker imajo jelševi listi na spodnji strani manj trihomov kot leskovi, to omogoča enakomernjši in natančnejši nanos suspenzije bakrovih nanodelcev, ki je močno podvržena agregaciji. Tretirani jelševi listi so iz neznanega razloga že po nekaj dneh začeli močno plesneti, zato smo jih po 7 dneh izpostavitve zamenjali z novimi (enakega masnega razreda in tretmaja kot na začetku poskusa), vendar se je plesenje ponovilo. Pogin poskusnih osebkov je bil po 14 dneh približno 30%, kar je izkustveno v mejah tolerance za 14-dnevne poskuse z izopodi. Ker pa je numerus dodatno zmanjšalo veliko število samic, ki so tekom poskusa razvile marzupije, bi le-ta bil premajhen, da bi v 14+14-dnevni seriji do 28. dneva ostalo signifikantno število živali. Zato smo poskus po 14 dneh prekinili, preostale živali za 24 ur prestavili na netretirane liste in jih 15. dan secirali.



Slika 6. Shema prvega prehranjevalnega poskusa z bakrom (poskus št. 33).

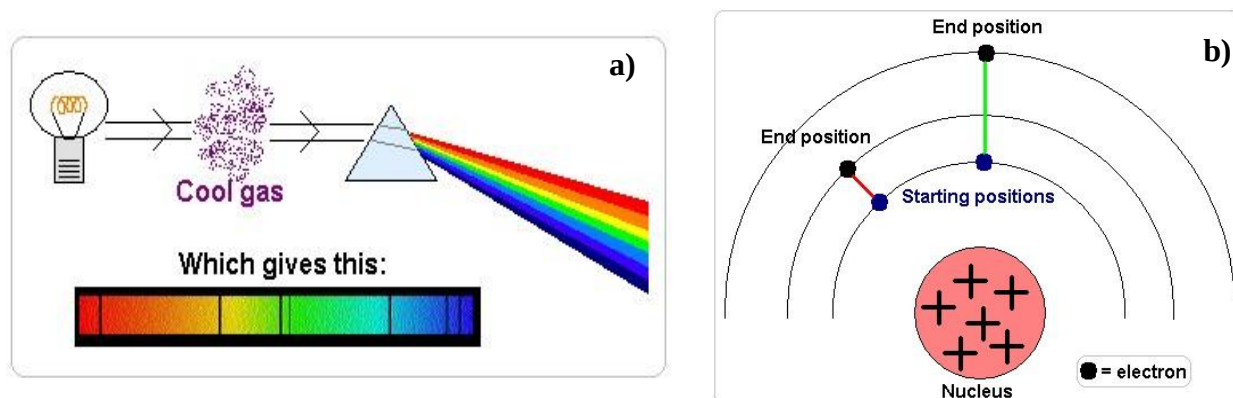
Poskus smo ponovili v enaki zasnovi kot prvotni poskus, a s to razliko, da smo v drugem poskusu (poskus št. 36) uporabili liste leske in modificirali število testnih enot v posameznih serijah. V 14-dnevni seriji smo tako pripravili po 5 poskusnih enot na skupino, v 14+14-dnevni seriji pa po 15 enot na skupino. Ponovljeni poskus smo izvedli v celoti, do 28. dneva, pri čemer je bil potek poskusa enak kot pri poskusu s cinkom.

Po primerjavi rezultatov obeh poskusov smo ugotovili, da so rezultati 14-dnevne serije ponovljenega poskusa (št. 36.) večinoma v območju rezultatov prvotnega poskusa (št. 33), tj. večinoma ne segajo izven obeh ekstremov podatkov prvotnega poskusa z bakrom (**Priloge C1–C25**). Zato smo se odločili, da bomo rezultate celotnega prvotnega poskusa z bakrom ter rezultate 14-dnevne serije ponovljenega poskusa združili in ju obravnavali kot enotno 14-dnevno serijo.

3.3 ANALITSKA METODA S PLAMENSKO ATOMSKO ABSORPCIJSKO SPEKTROMETRIJO (FAAS)

Atomska absorpcijska spektrometrija (AAS) je analitska tehnika za kvalitativno in kvantitativno določanje kemijskih elementov. Z AAS je mogoče določiti več kot 70 elementov (večinoma kovin in polkovin) v zelo nizkih koncentracijah (v območju ppm, to je mg/kg ali mg/L). Natančnost je zelo dobra, obseg merske napake je približno 1–2% (Atomic Absorption Spectrophotometry (AAS), 2011). Plamenska AAS (FAAS) je ena izmed štirih splošno uporabljenih tehnik AAS (Atomic Spectroscopy. A Guide to Selecting the Appropriate Technique and System, 2008–2010).

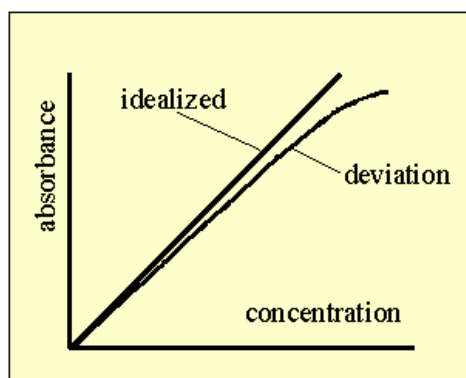
FAAS temelji na dejstvu, da atomi kovin v osnovnem stanju absorbirajo svetlobo specifičnih valovnih dolžin. Ker so vzorci običajno tekočine ali trdne snovi, jih je potrebno predhodno upariti v plamenu. Vzorec presvetlimo s svetlobo primerne valovne dolžine (v ultravijoličnem ali vidnem delu spektra), ki jo atomi absorbirajo in preidejo v vzbujeno stanje. Karakteristične valovne dolžine so specifične za posamezen element in natančne na 0.01–0.1 nm. Koncentracijo elementa v vzorcu določimo iz stopnje absorpcije, ki jo primerjamo z delovno krivuljo, dobljeno po kalibraciji inštrumenta s standardi znane koncentracije (Flame Atomic Absorption Spectrometry, 1997; Atomic-Absorption Spectroscopy (AA), 2000).



Slika 7. a) nastanek atomskega absorpcijskega spektra, **b)** princip vzbujevanja elektronov ob presvetlitvi s svetlobo karakterističnih valovnih dolžin (vir: <http://www.green-planet-solar-energy.com/atomic-absorption-spectrum.html>).

Idealizirana kalibracijska ali standardna krivulja je po Lambert-Beerovem zakonu takšna, da je absorbanca elementa v vzorcu premo sorazmerna z njegovo koncentracijo. Zaradi različnih razlogov se običajno pojavijo deviacije od linearnosti, še posebej ob povečanju koncentracije elementa v vzorcu. Ukrivljenost krivulje je mogoče zmanjšati, čeprav se ji je

nemogoče povsem izogniti. Zaželeno je, da se meritve izvajajo v območju linearnosti. Nenapisano pravilo je, da se pripravi vsaj pet standardov in t.i. »prazen« vzorec (ang. *blank*), s katerimi je mogoče dobiti dovolj informacij, da se kalibracijska krivulja približa idealni (Flame Atomic Absorption Spectrometry, 1997).



Slika 8. Idealizirana ter odklonska krivulja razmerja med koncentracijo in absorbanco vzorca (vir: <http://www.cee.vt.edu/ewr/environmental/teach/smprimer/aa/aa.html>).

3.3.1 Priprava poskusnega materiala za analizo s FAAS

Telesne dele poskusnih živali smo skupaj s pripadajočimi koščki filter papirja prenesli v 10 mL steklene epruvete in jim dodali po 1 mL mešanice 75 % HNO_3 in 60 % HClO_4 v razmerju 7:1. Postavili smo jih v grelni blok in izvedli razklop po sledečem temperaturnem režimu:

- 30 min pri 40°C,
- 30 min pri 65°C,
- 60 min pri 85°C (dokler se tekočina ne zbistri),
- 60 min pri 105°C,
- 60 min pri 125°C,
- 60 min pri 160°C (dokler se tekočina ne razbarva),
- do suhosti (tj. čez noč do naslednjega dne) pri 185°C.

Če se je pod ustjem epruvet nabral kondenz, smo naslednji dan epruvete sušili še 2–3 ure, pri čemer smo jih prestavljali med različnimi odprtini v grelnem bloku. Popolnoma suhe epruvete smo pustili, da se ohladijo. Hladne epruvete z razklopljenimi vzorci smo postavili v plastično stojalo, jih zaščitili s plastično folijo in jih do analize hranili v laboratoriju pri sobnih pogojih.

3.3.2 Analiza s FAAS

Analizo vzorcev smo izvedli z atomskim absorpcijskim spektrometrom tipa Perkin-Elmer AAnalyst100 in programsko opremo AAWinLab 3.0 za Windows NT Workstation 4.0 (Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo).

Pri poskusu s cinkom smo za umerjanje aparata uporabili standarde z Zn^{2+} ioni v koncentracijah 0,25 mg/L, 0,5 mg/L, 0,75 mg/L in 1 mg/L. Za analizo smo uporabili metodo za Zn/ZnO v majhnih vzorcih (**Tabela 1**). Pri poskusu z bakrom smo uporabili standarde s Cu^{2+} ioni v koncentracijah 0,5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L in 3 mg/L. Za analizo smo uporabili metodo za Cu/CuO v majhnih vzorcih (**Tabela 2**). Pri obeh poskusih smo za vsako serijo meritev pripravili tudi po 4 »prazne« (*blank*) vzorce.

Če se je koncentracija posameznega vzorca izkazala za previsoko, da bi omogočala točno analizo znotraj linearnega območja, smo vzorec redčili z 0,2% HNO_3 do primerno nizke koncentracije. Redčitve smo upoštevali pri nadaljnjih izračunih.

Tabela 1. Nastavitve analizne metode FAAS pri poskusu s cinkom.

Parameter	Vrednost	
Spektrometer	Valovna dolžina	213,9
	Širina reže	0,70
	Modificirane nastavitve	Ne
Signal	Tip	Korekcija ozadja atomske absorpcije
	Meritev	Časovno povprečje
Čas	Trajanje meritve (s)	3,00
	Časovni zamik meritve (s)	0,0
Plamen	Tip	Zrak/ C_2H_2
	Pretok oksidanta	10,00
	Pretok goriva	3,00

Tabela 2. Nastavitve analizne metode FAAS pri poskusu z bakrom.

Parameter	Vrednost	
Spektrometer	Valovna dolžina	324,8
	Širina reže	0,70
	Modificirane nastavitve	Ne
Signal	Tip	Korekcija ozadja atomske absorpcije
	Meritev	Časovno povprečje
Čas	Trajanje meritve (s)	3,00
	Časovni zamik meritve (s)	0,0
Plamen	Tip	Zrak/ C_2H_2
	Pretok oksidanta	10,00
	Pretok goriva	3,00

3.4 IZRAČUNI PREHRANSKIH IN DRUGIH INDEKSOV

Izračuni indeksov sledijo formulam v študiji Pipan-Tkalec in sod. (2010). Zaradi zmanjšanja obsega dela smo pri izračunu UA_k in BAF uporabili nominalne koncentracije kovin, saj dejanskih koncentracij na listih nismo merili. Vse mase in koncentracije v formulah se nanašajo na suho maso poskusnega materiala, z izjemo povprečne mase živali med poskusom v formulah (1) in (2), kjer je šlo za žive živali, torej za svežo maso.

Stopnja prehranjevanja (SP):

$$SP = \frac{\text{razlika v masi listov pred in po poskusu (mg)}}{\text{povprečna masa živali med poskusom (mg)}} \quad \dots (1)$$

Stopnja iztrebljanja (SI):

$$SI = \frac{\text{skupna masa iztrebkov (mg)}}{\text{povprečna masa živali med poskusom (mg)}} \quad \dots (2)$$

Učinkovitost asimilacije hrane (UA) :

$$UA = \frac{\text{razlika v masi listov pred in po poskusu (mg)} - \text{skupna masa iztrebkov (mg)}}{\text{razlika v masi listov pred in po poskusu (mg)}} \quad \dots (3)$$

Skupna količina zaužite kovine (skupni odmerek kovine, SO):

$$SO = \text{konc. kovine na listih pred poskusom } (\mu\text{g/g}) \times \text{razlika v masi listov pred in po poskusu (g)} \quad \dots (4)$$

Ocena učinkovitosti asimilacije kovin (UA_k , $k = \text{Zn ali Cu}$):

$$UA_k = \frac{\text{masa kov. v telesu po poskusu } (\mu\text{g}) - \text{povprečna masa kov. v kontrolnih živalih } (\mu\text{g})}{\text{skupna masa zaužite kovine } (\mu\text{g})} \times 100\% \quad \dots (5)$$

Ocena bioakumulacijskega faktorja (BAF):

$$BAF = \frac{\text{izmerjena koncentracija kovine v telesu po poskusu } (\mu\text{g/g})}{\text{nominalna koncentracija kovine na listih pred poskusom } (\mu\text{g/g})} \quad \dots (6)$$

3.5 STATISTIČNE METODE

Za določanje statističnih razlik med posameznimi skupinami smo uporabili Mann-Whitney *U*-test (program OriginPro 8 za Windows, OriginLab Corporation, Northampton, Massachusetts, ZDA). Vrednosti parametrov vseh tretiranih skupin smo primerjali z vrednostmi parametrov kontrolne skupine, poleg tega smo primerjali vrednosti parametrov tretiranih skupin pri sledečih parih skupin:

- poskus s cinkom:
 - nano ZnO 1500 in nano ZnO 4000,
 - mikro ZnO 1500 in mikro ZnO 4000,
 - ZnCl₂ 1500 in ZnCl₂ 4000,
 - nano ZnO 1500 in mikro ZnO 1500,
 - nano ZnO 1500 in ZnCl₂ 1000,
 - mikro ZnO 1500 in ZnCl₂ 1000,
 - nano ZnO 4000 in mikro ZnO 4000,
 - nano ZnO 4000 in ZnCl₂ 2500,
 - mikro ZnO 4000 in ZnCl₂ 2500.
- poskus z bakrom:
 - nano Cu 2000 in nano Cu 5000,
 - Cu nitrat 2000 in Cu nitrat 5000,
 - nano Cu 2000 in Cu nitrat 2000,
 - nano Cu 5000 in Cu nitrat 5000.

3.6 GRAFIČNI PRIKAZ REZULTATOV

Vsi strukturni prikazi s kvartili (*box-plot*) so prirejeni tako, da »brki« (*whiskers*) segajo do minimalnega in maksimalnega podatka v vzorcu. Prisotnost in velikost statistično značilnih razlik med kontrolno in tretiranimi skupinami sta upodobljeni z zvezdicami nad strukturnimi prikazi. Pri tem ena zvezdica (*) pomeni $p < 0.05$, dve zvezdici (**) $p < 0.01$ in tri zvezdice (***) $p < 0.001$. Oznaka numerusa (n) pod oznakami abscise se nanaša na kočno število podatkov, uporabljenih pri izračunu posameznih indeksov oziroma koncentracij, saj smo izločili negativne vrednosti.

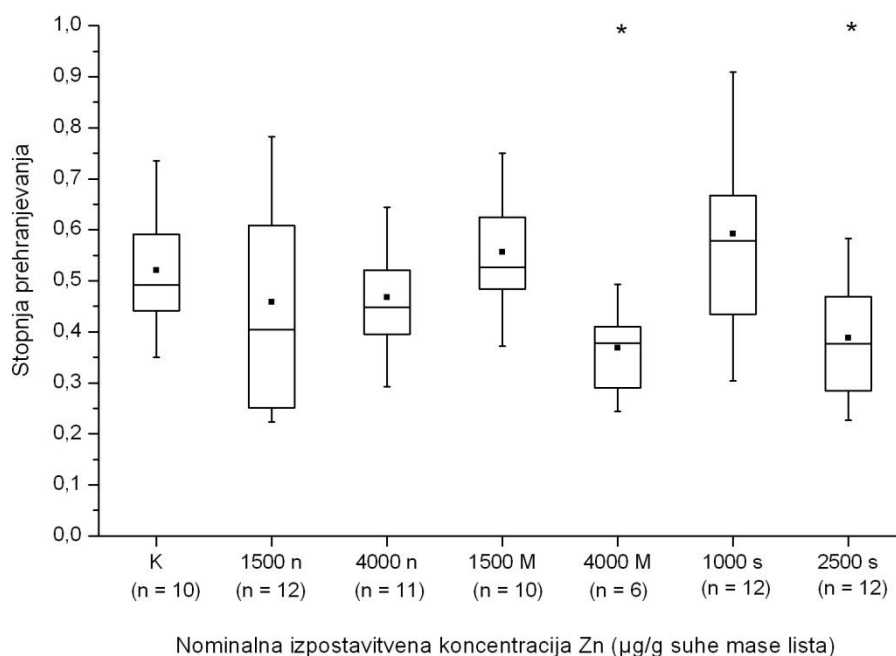
4. REZULTATI

4.1 POSKUS S CINKOM

4.1.1 Vpliv izpostavljenosti cinku na prehranjevalne parametre

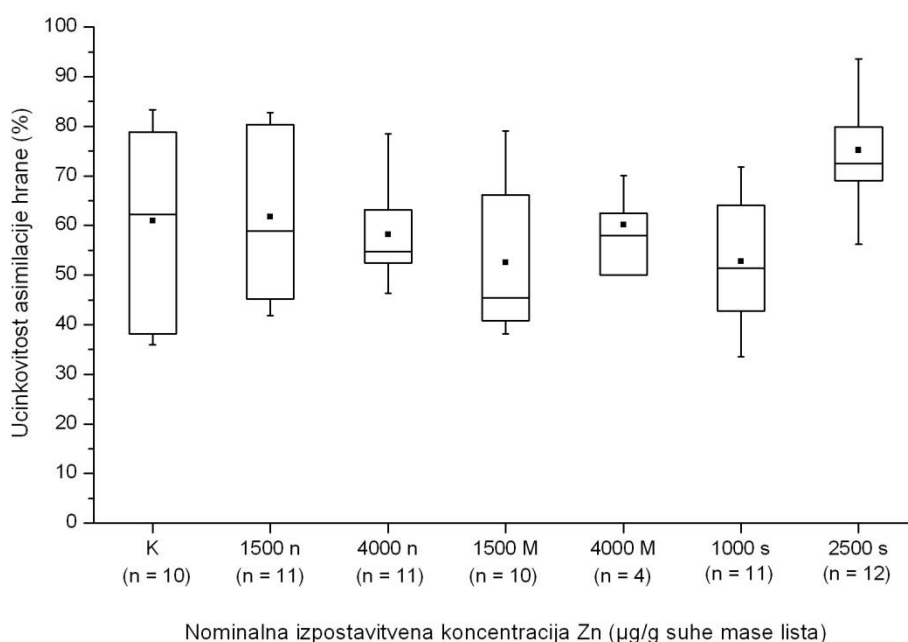
4.1.1.1 Stopnja prehranjevanja (SP) in učinkovitost asimilacije hrane (UA)

Med živalmi, ki so bile 14 dni izpostavljene tretirani hrani, je skupina, hranjena z mikrodenci ZnO v konc. 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista ($p < 0.05$) in skupina, hranjena z ZnCl_2 v konc. 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista, zaužila statistično značilno manj hrane ($p < 0.05$) od kontrolnih živali. Ostale skupine se po stopnji prehranjevanja niso razlikovale od kontrole (**Slika 9**). Stopnja prehranjevanja je bila značilno različna tudi med skupinama, hranjenima z mikrodenci ZnO v konc. 1500 in 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista ($p < 0.05$), ter med skupinama, hranjenima z ZnCl_2 v konc. 1000 in 2500 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista ($p < 0.01$) (**Priloga A1, Tabela A1-a1 in Tabela A1-a2**).



Slika 9. 14-dnevna serija: stopnja prehranjevanja *Porcellio scaber* po 14 dneh hranjenja z listi leske, tretiranimi z nanodelci ZnO v konc. 1500 in 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (1500 n in 4000 n), mikrodenci ZnO v konc. 1500 in 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (1500 M in 4000 M) in ZnCl_2 v konc. 1000 in 2500 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (1000 s in 2500 s). Na x-osi so označene nominalne izpostavitvene koncentracije Zn in število končnih podatkov, upoštevanih pri izračunu indeksa (n). Statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolno skupino (K) so označene z zvezdicami (Mann-Whitney U-test; * $p < 0.05$).

Po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano ni bilo statistično značilnih razlik v učinkovitosti asimilacije hrane med kontrolno in tretiranimi skupinami (**Slika 10**). Skupina, hranjena z ZnCl_2 v konc. 2500 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista, je učinkoviteje asimilirala zaužito hrano od skupine, hranjene z ZnCl_2 v konc. 1000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista ($p < 0.001$); skupine, hranjene z nanodelci ZnO v konc. v konc. 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista ($p < 0.01$); ter skupine, hranjene z mikrodelci ZnO v konc. 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista ($p < 0.05$) (**Priloga A1, Tabela A1-b1 in Tabela A1-b2**).

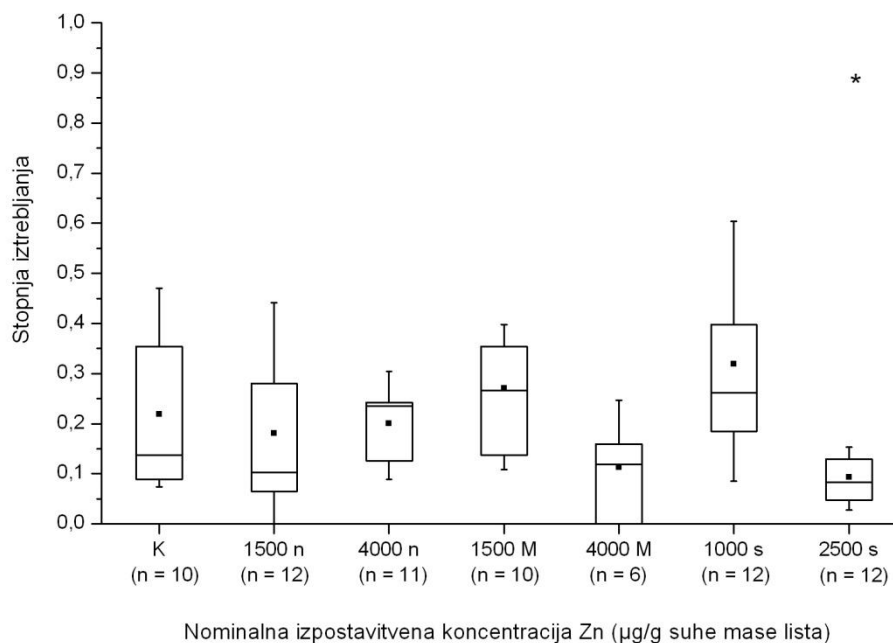


Slika 10. 14-dnevna serija: učinkovitost asimilacije hrane v *Porcellio scaber* po 14 dneh hranjenja z listi leske, tretiranimi z nanodelci ZnO v konc. 1500 in 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (1500 n in 4000 n), mikrodelci ZnO v konc. 1500 in 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (1500 M in 4000 M) in ZnCl_2 v konc. 1000 in 2500 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (1000 s in 2500 s). Na x-osi so označene nominalne izpostavitvene koncentracije Zn in število končnih podatkov, upoštevanih pri izračunu indeksa (n). K označuje kontrolno skupino.

4.1.1.2 Stopnja iztrebljanja (SI)

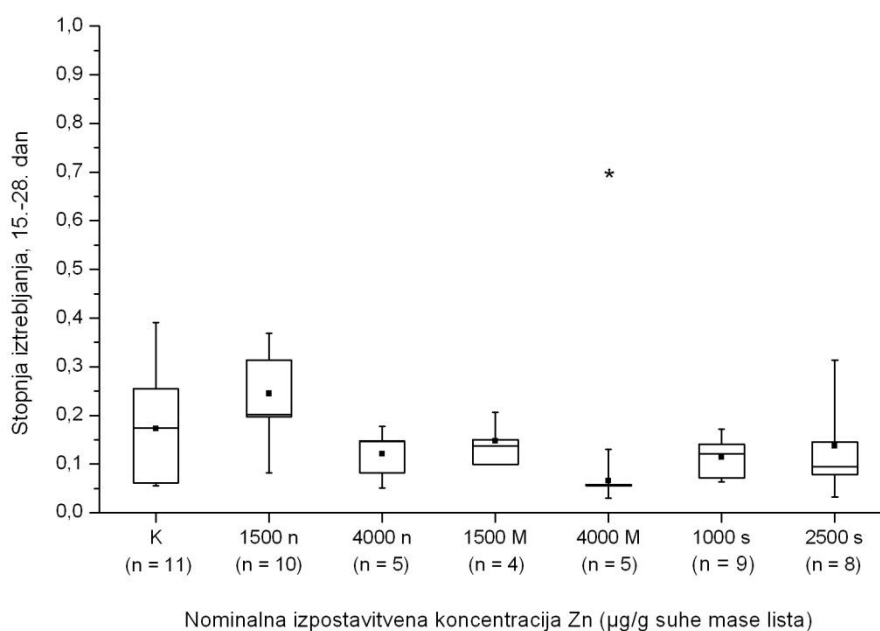
V prvi fazi poskusa ni bilo razlik v SI med 14-dnevno in 14+14-dnevno skupino (podatki niso prikazani), zato v nadaljevanju navajamo podatke 14-dnevne skupine za čas hranjenja s tretirano hrano in podatke 14+14-dnevne skupine za čas hranjenja z netretirano hrano, čeprav ni šlo za iste živali.

Med živalmi, ki so bile 14 dni izpostavljene tretirani hrani, je skupina, hranjena z ZnCl_2 v konc. 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista, iztrebljala značilno manj ($p < 0.05$) od kontrolnih živali. Ostale skupine se po stopnji iztrebljanja niso razlikovale od kontrole (**Slika 11**). Stopnja iztrebljanja je bila značilno različna tudi med skupinama, hranjenima z mikrodenci ZnO v konc. 1500 in 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista ($p < 0.05$); med skupinama, hranjenima z ZnCl_2 v konc. 1500 in 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista ($p < 0.001$); med skupinama, hranjenima z nanodelci ZnO in ZnCl_2 v nižjih koncentracijah (1500 in 1000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista, $p < 0.05$); ter med skupinama, hranjenima z nanodelci ZnO in ZnCl_2 v višjih koncentracijah (4000 in 2500 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista, $p < 0.01$) (**Priloga A1, Tabela A1-c1 in Tabela A1-c2**).



Slika 11. 14-dnevna serija: stopnja iztrebljanja *Porcellio scaber* po 14 dneh hranjenja z listi leske, tretiranimi z nanodelci ZnO v konc. 1500 in 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (1500 n in 4000 n), mikrodenci ZnO v konc. 1500 in 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (1500 M in 4000 M) in ZnCl_2 v konc. 1000 in 2500 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (1000 s in 2500 s). Na x-osi so označene nominalne izpostavitvene koncentracije Zn in število končnih podatkov, upoštevanih pri izračunu indeksa (n). Statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolno skupino (K) so označene z zvezdicami (Mann-Whitney U -test; $*p < 0.05$).

Po 14-dnevnem obdobju izločanja je skupina, hranjena z mikrodenci ZnO v konc. 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista, imela značilno nižjo stopnjo iztrebljanja od kontrolne skupine ($p < 0.05$). Ostale skupine se po stopnji iztrebljanja niso razlikovale od kontrole (**Slika 12**). Stopnja iztrebljanja je bila značilno različna tudi med skupinama, hranjenima z nanodenci ZnO v konc. 1500 in 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista ($p < 0.05$); med skupinama, hranjenima z mikrodenci ZnO v konc. 1500 in 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista ($p < 0.05$); ter med skupinama, hranjenima z nanodenci ZnO in ZnCl_2 v nižjih koncentracijah (1500 in 1000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista, $p < 0.01$) (**Priloga A1, Tabela A1-d1 in Tabela A1-d2**).

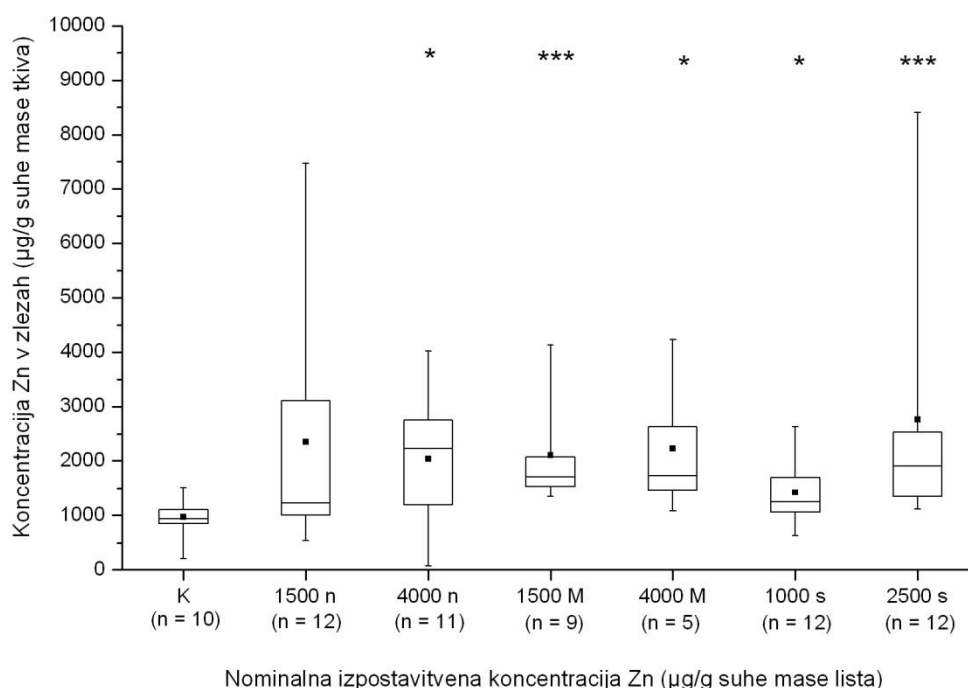


Slika 12. 14+14-dnevna serija: stopnja iztrebljanja *Porcellio scaber* po 14 dneh hranjenja z netretiranimi listi leske, predhodno 14 dni hranjenih z listi leske, tretiranimi z nanodenci ZnO v konc. 1500 in 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (1500 n in 4000 n), mikrodenci ZnO v konc. 1500 in 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (1500 M in 4000 M) in ZnCl_2 v konc. 1000 in 2500 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (1000 s in 2500 s). Na x-osi so označene nominalne izpostavitvene koncentracije Zn in število končnih podatkov, upoštevanih pri izračunu indeksa (n). Statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolno skupino (K) so označene z zvezdicami (Mann-Whitney U-test; * $p < 0.05$).

4.1.2 Vsebnost cinka v modelnem organizmu

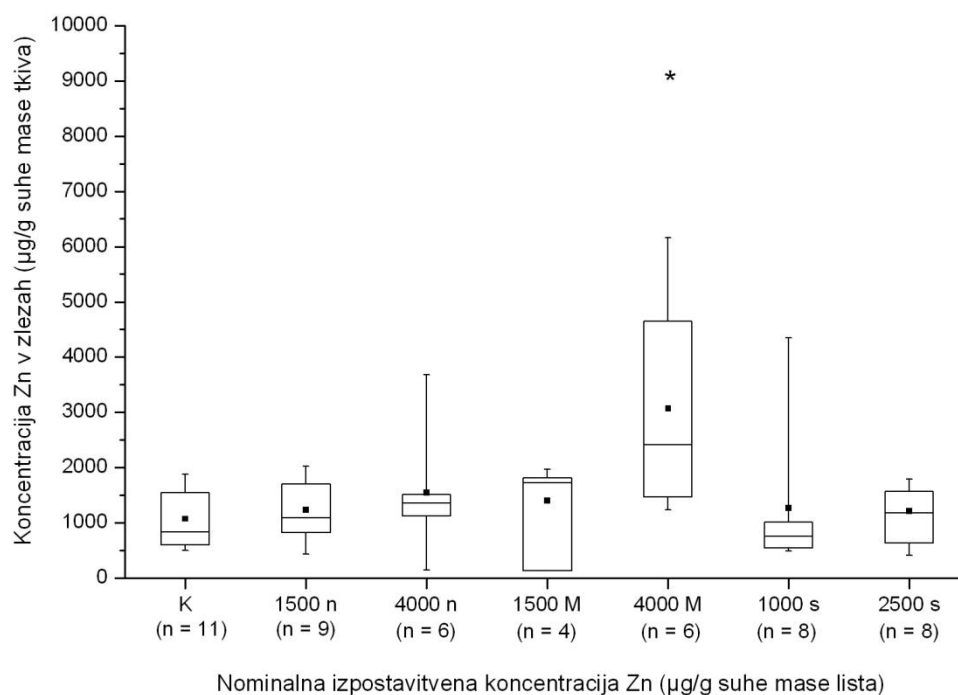
4.1.2.1 Vsebnost cinka v prebavnih žlezah

Po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano so statistično značilno višje koncentracije cinka v prebavnih žlezah glede na kontrolo vsebovale živali v vseh skupinah, razen v skupini, hranjeni z nanodelci ZnO v konc. 1500 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (**Slika 13**). Koncentracija cinka je bila značilno različna med skupinama, hranjenima z ZnCl_2 v konc. 1500 in 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista ($p < 0.05$), med ostalimi tretiranimi skupinami pa statistično značilnih razlik ni bilo (**Priloga A1, Tabela A1-e1 in Tabela A1-e2**).



Slika 13. 14-dnevna serija: izmerjena koncentracija Zn v prebavnih žlezah *Porcellio scaber* po 14 dneh hranjenja z listi leske, tretiranimi z nanodelci ZnO v konc. 1500 in 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (1500 n in 4000 n), mikrodeldci ZnO v konc. 1500 in 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (1500 M in 4000 M) in ZnCl_2 v konc. 1000 in 2500 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (1000 s in 2500 s). Na x-osi so označene nominalne izpostavitvene koncentracije Zn in število končnih podatkov, upoštevanih pri izračunu (n). Statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolno skupino (K) so označene z zvezdicami (Mann-Whitney U -test; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

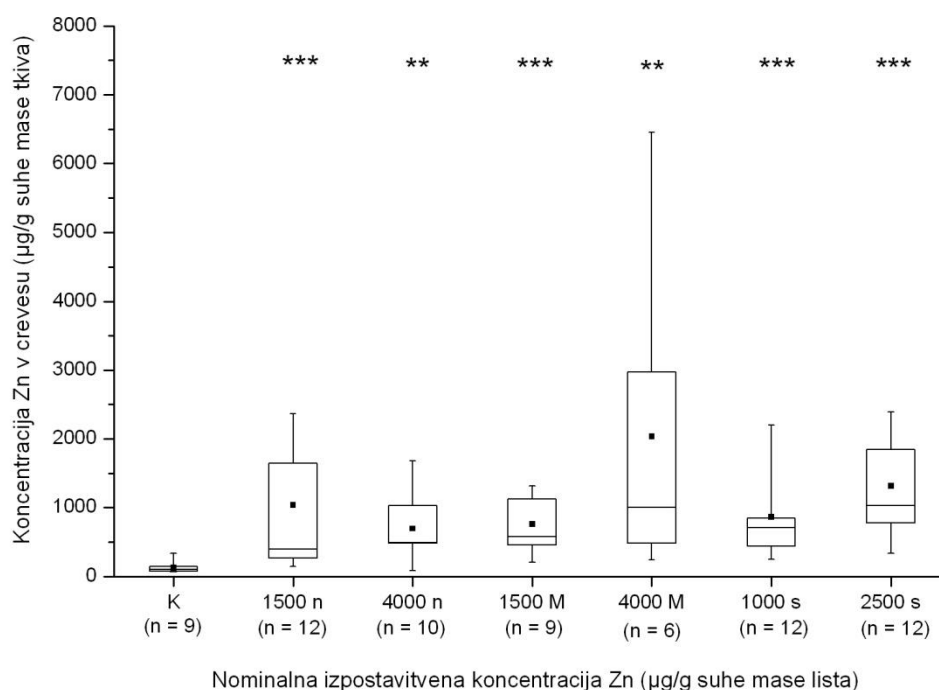
Po 14-dnevnem obdobju izločanja je značilno višjo koncentracijo cinka v prebavnih žlezah v primerjavi s kontrolno skupino imela le še skupina, hranjena z mikrodelci ZnO v konc. 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista ($p < 0.05$) (**Slika 14**). Med tretiranimi skupinami je bila koncentracija cinka značilno različna le med skupinama, hranjenima z mikrodelci ZnO in ZnCl_2 v višjih koncentracijah (4000 in 2500 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista, $p < 0.05$), med ostalimi tretiranimi skupinami pa statistično značilnih razlik ni bilo (**Priloga A1, Tabela A1-f1 in Tabela A1-f2**).



Slika 14. 14+14-dnevna serija: izmerjena koncentracija Zn v prebavnih žlezah *Porcellio scaber* po 14 dneh hranjenja z netretiranimi listi leske, predhodno 14 dni hranjenih z listi leske, tretiranimi z nanodelci ZnO v konc. 1500 in 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (1500 n in 4000 n), mikrodelci ZnO v konc. 1500 in 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (1500 M in 4000 M) in ZnCl_2 v konc. 1000 in 2500 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (1000 s in 2500 s). Na x-osi so označene nominalne izpostavitvene koncentracije Zn in število končnih podatkov, upoštevanih pri izračunu (n). Statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolno skupino (K) so označene z zvezdicami (Mann-Whitney U-test; $*p < 0.05$).

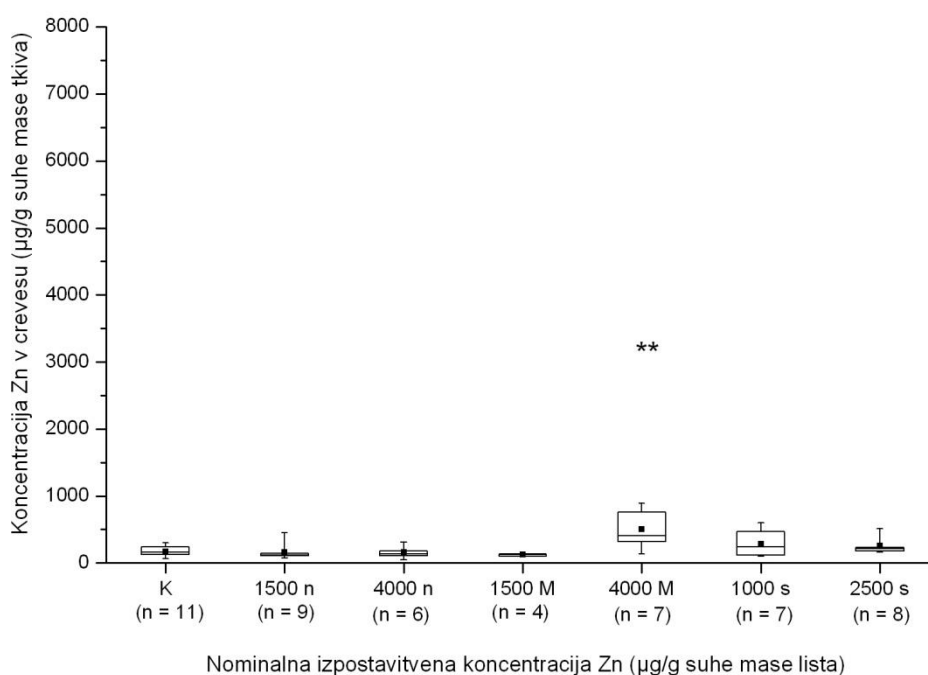
4.1.2.2 Vsebnost cinka v črevesu

Po 14 dneh izpostavitve tretirani hrani so vse tretirane skupine kazale statistično značilno višjo koncentracijo cinka v črevesu v primerjavi s kontrolno skupino (**Slika 15**). Koncentracija cinka je bila značilno različna med skupinama, hranjenima z ZnCl_2 v konc. 1500 in 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista ($p < 0.05$), ter med skupinama, hranjenima z nanodelci ZnO in ZnCl_2 v višjih koncentracijah (4000 in 2500 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista, $p < 0.05$). Med ostalimi tretiranimi skupinami statistično značilnih razlik ni bilo (**Priloga A1, Tabela A1-g1 in Tabela A1-g2**).



Slika 15. 14-dnevna serija: izmerjena koncentracija Zn v črevesu *Porcellio scaber* po 14 dneh hranjenja z listi leske, tretiranimi z nanodelci ZnO v konc. 1500 in 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (1500 n in 4000 n), mikrodenci ZnO v konc. 1500 in 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (1500 M in 4000 M) in ZnCl_2 v konc. 1000 in 2500 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (1000 s in 2500 s). Na x-osi so označene nominalne izpostavitvene koncentracije Zn in število končnih podatkov, upoštevanih pri izračunu (n). Statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolno skupino (K) so označene z zvezdicami (Mann-Whitney U-test; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

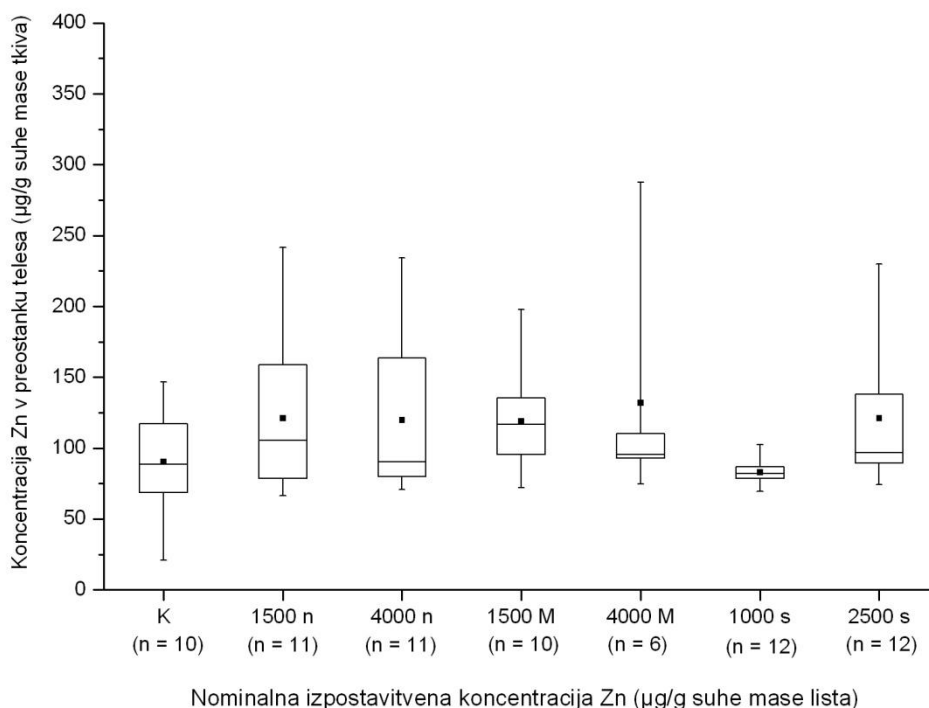
Po 14-dnevnem obdobju izločanja je statistično značilno višjo koncentracijo cinka v črevesu v primerjavi s kontrolno skupino ohranila le še skupina, hranjena z mikrodenci ZnO v konc. 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista ($p < 0.01$) (**Slika 16**). Koncentracija cinka je bila značilno različna med skupinama, hranjenima z mikrodenci ZnO v konc. 1500 in 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista ($p < 0.05$), ter med skupinama, hranjenima z nanodenci ZnO in mikrodenci ZnO v konc. 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista ($p < 0.05$) (**Priloga A1, Tabela A1-h1 in Tabela A1-h2**).



Slika 16. 14+14-dnevna serija: izmerjena koncentracija Zn v črevesu *Porcellio scaber* po 14 dneh hranjenja z netretiranimi listi leske, predhodno 14 dni hranjenih z listi leske, tretiranimi z nanodenci ZnO v konc. 1500 in 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (1500 n in 4000 n), mikrodenci ZnO v konc. 1500 in 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (1500 M in 4000 M) in ZnCl_2 v konc. 1000 in 2500 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (1000 s in 2500 s). Na x-osi so označene nominalne izpostavitvene koncentracije Zn in število končnih podatkov, upoštevanih pri izračunu (n). Statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolno skupino (K) so označene z zvezdicami (Mann-Whitney U-test; $**p < 0.01$).

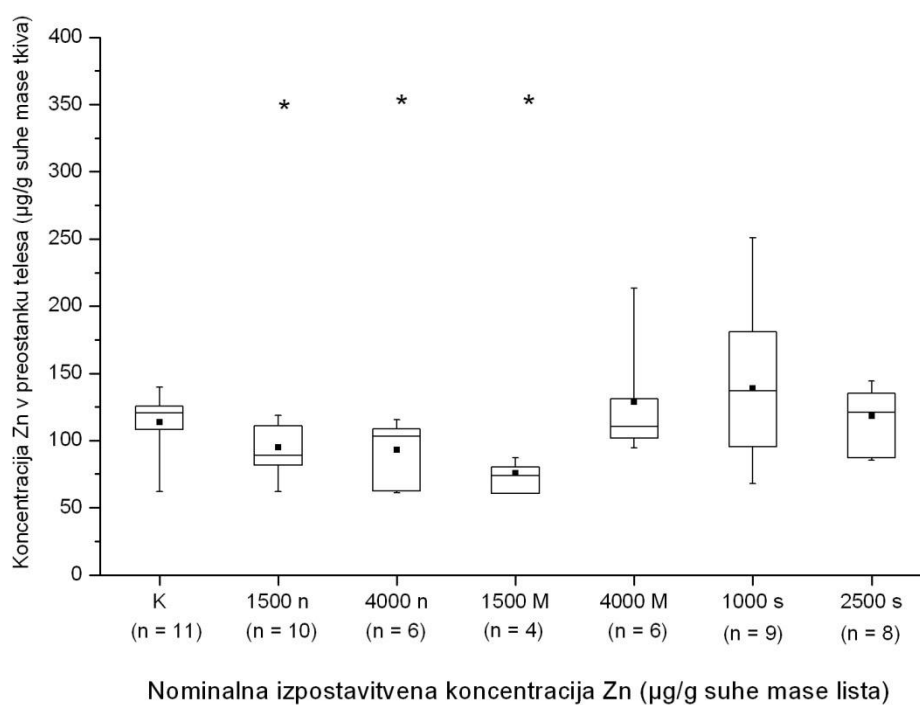
4.1.2.3 Vsebnost cinka v preostanku telesa

Po 14 dneh izpostavitve tretirani hrani med tretiranimi skupinami in kontrolno skupino ni bilo statistično značilnih razlik v koncentraciji cinka v preostanku telesa poskusnih organizmov (**Slika 17**). Koncentracija cinka je bila značilno različna med skupinama, hranjenima z ZnCl_2 v konc. 1000 in 2500 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista ($p < 0.01$), ter med skupinama, hranjenima z mikrodenci ZnO in ZnCl_2 v nižjih koncentracijah (1500 in 1000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista, $p < 0.05$). Med ostalimi tretiranimi skupinami statistično značilnih razlik ni bilo (**Priloga A1**, **Tabela A1-i1** in **Tabela A1-i2**).



Slika 17. 14-dnevna serija: izmerjena koncentracija Zn v preostanku telesa *Porcellio scaber* po 14 dneh hranjenja z listi leske, tretiranimi z nanodelci ZnO v konc. 1500 in 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (1500 n in 4000 n), mikrodenci ZnO v konc. 1500 in 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (1500 M in 4000 M) in ZnCl_2 v konc. 1000 in 2500 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (1000 s in 2500 s). Na x-osi so označene nominalne izpostavitvene koncentracije Zn in število končnih podatkov, upoštevanih pri izračunu (n). K označuje kontrolno skupino.

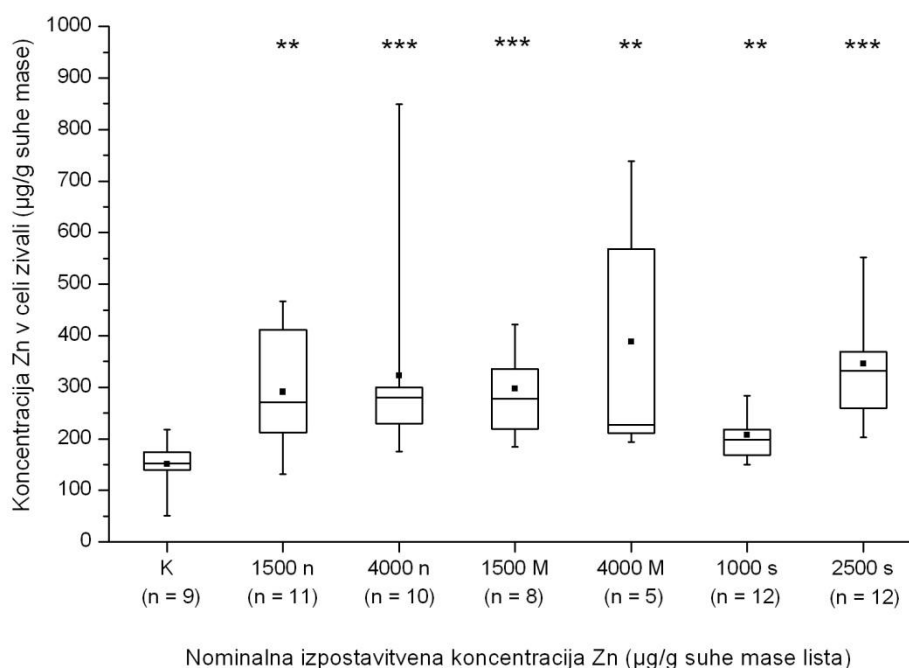
Po 14-dnevnem obdobju izločanja so statistično značilno nižjo koncentracijo cinka v preostanku telesa v primerjavi s kontrolno skupino kazale skupine, hranjene z nanodelci ZnO v konc. 1500 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista ($p < 0.05$), z nanodelci ZnO v konc. 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista ($p < 0.05$), in z mikrodenci ZnO v konc. 1500 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista ($p < 0.05$) (**Slika 18**). Koncentracija cinka je bila značilno različna med skupinama, hranjenima z mikrodenci ZnO v konc. 1500 in 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista, ($p < 0.05$), ter med skupinama, hranjenima z mikrodenci ZnO in ZnCl_2 v nižjih koncentracijah (1500 in 1000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista, $p < 0.05$) (**Priloga A1, Tabela A1-j1 in Tabela A1-j2**).



Slika 18. 14+14-dnevna serija: izmerjena koncentracija Zn v preostanku telesa *Porcellio scaber* po 14 dneh hranjenja z netretiranimi listi leske, predhodno 14 dni hranjenih z listi leske, tretiranimi z nanodelci ZnO v konc. 1500 in 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (1500 n in 4000 n), mikrodenci ZnO v konc. 1500 in 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (1500 M in 4000 M) in ZnCl_2 v konc. 1000 in 2500 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (1000 s in 2500 s). Na x-osi so označene nominalne izpostavitvene koncentracije Zn in število končnih podatkov, upoštevanih pri izračunu (n). Statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolno skupino (K) so označene z zvezdicami (Mann-Whitney U-test; * $p < 0.05$).

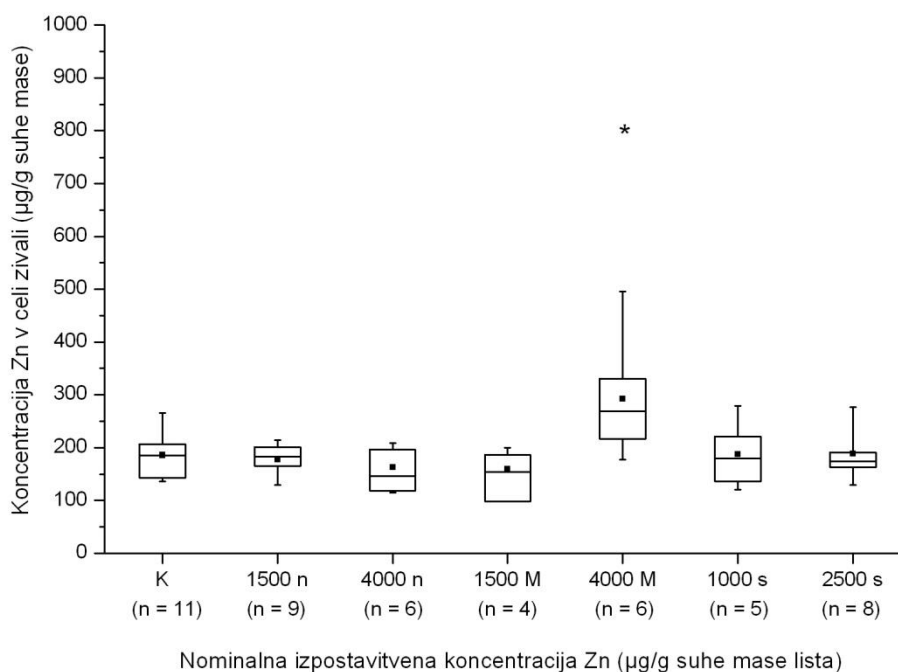
4.1.2.4 Celokupna vsebnost cinka v telesu

Po 14 dneh izpostavitve tretirani hrani so vse tretirane skupine kazale statistično značilno višjo koncentracijo cinka, izračunano glede na celotno telo, v primerjavi s kontrolno skupino (**Slika 19**). Koncentracija cinka je bila značilno različna med skupinama, hranjenima z ZnCl_2 v konc. 1000 in 2500 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista ($p < 0.001$), ter med skupinama, z mikrodenci ZnO in ZnCl_2 v nižjih koncentracijah (1500 in 1000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista, $p < 0.05$). Med ostalimi tretiranimi skupinami statistično značilnih razlik ni bilo (**Priloga A1, Tabela A1-k1 in Tabela A1-k2**).



Slika 19. 14-dnevna serija: izračunana celokupna koncentracija Zn v telesu *Porcellio scaber* po 14 dneh hranjenja z listi leske, tretiranimi z nanodelci ZnO v konc. 1500 in 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (1500 n in 4000 n), mikrodenci ZnO v konc. 1500 in 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (1500 M in 4000 M) in ZnCl_2 v konc. 1000 in 2500 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (1000 s in 2500 s). Na x-osi so označene nominalne izpostavitvene koncentracije Zn in število končnih podatkov, upoštevanih pri izračunu. Statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolno skupino (K) so označene z zvezdicami (Mann-Whitney U -test; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Po 14-dnevnem obdobju izločanja je statistično značilno višjo celokupno koncentracijo cinka v primerjavi s kontrolno skupino imela le še skupina, hranjena z mikrodenci ZnO v konc. 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista ($p < 0.05$) (**Slika 20**). Ta ista skupina je vsebovala značilno več cinka tudi od skupin, hranjenih z mikrodenci ZnO v konc. 1500 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista ($p < 0.05$), z nanodenci ZnO v konc. 4000 ($p < 0.05$) ter z ZnCl_2 v konc. 2500 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista ($p < 0.05$) (**Priloga A1, Tabela A1-I1 in Tabela A1-I2**).

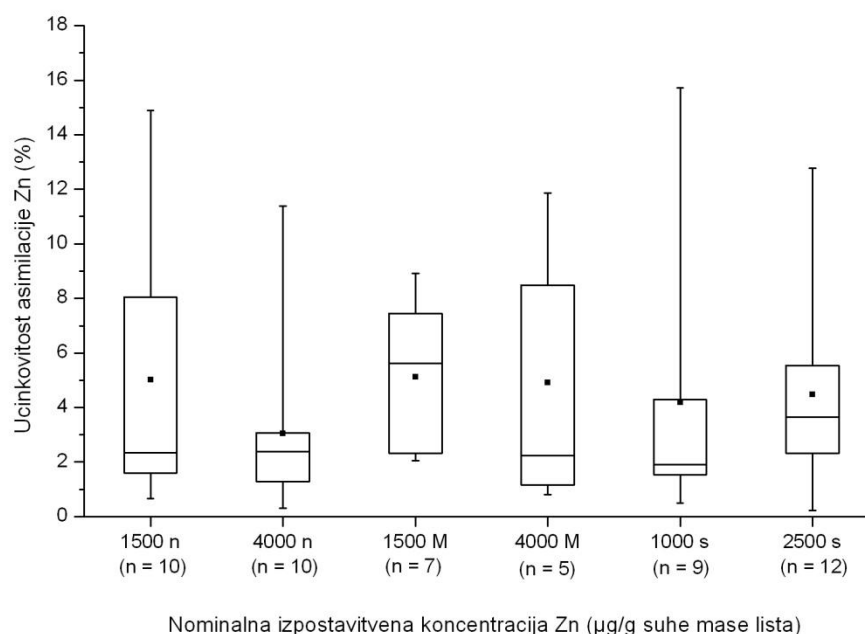


Slika 20. 14+14-dnevna serija: izračunana celokupna koncentracija Zn v telesu *Porcellio scaber* po 14 dneh hranjenja z netretiranimi listi leske, predhodno 14 dni hranjenih z listi leske, tretiranimi z nanodenci ZnO v konc. 1500 in 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (1500 n in 4000 n), mikrodenci ZnO v konc. 1500 in 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (1500 M in 4000 M) in ZnCl_2 v konc. 1000 in 2500 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (1000 s in 2500 s). Na x-osi so označene nominalne izpostavitvene koncentracije Zn in število končnih podatkov, upoštevanih pri izračunu. Statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolno skupino (K) so označene z zvezdicami (Mann-Whitney U -test; $*p < 0.05$).

4.1.3 Kopičenje cinka v modelnem organizmu

4.1.3.1 Ocena učinkovitosti asimilacije cinka (UA_{Zn})

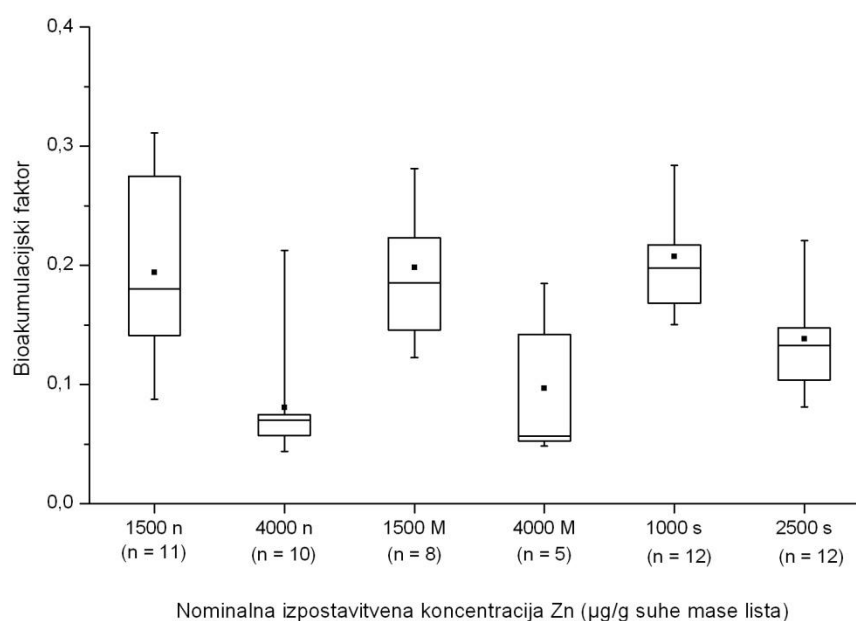
Med izpostavljenimi živalmi po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano ni bilo razlik v učinkovitosti asimilacije cinka v nobeni od tretiranih skupin (**Priloga A1, Tabela A1-m1 in Tabela A1-m2**).



Slika 21. 14-dnevna serija: učinkovitost asimilacije Zn v *Porcellio scaber* po 14 dneh hranjenja z listi leske, tretiranimi z nanodelci ZnO v konc. 1500 in 4000 µg/g suhe mase lista (1500 n in 4000 n), mikrodelci ZnO v konc. 1500 in 4000 µg/g suhe mase lista (1500 M in 4000 M) in ZnCl₂ v konc. 1000 in 2500 µg/g suhe mase lista (1000 s in 2500 s). Na x-osi so označene nominalne izpostavitvene koncentracije Zn in število končnih podatkov, upoštevanih pri izračunu indeksa (n).

4.1.3.2 Ocena bioakumulacijskega faktorja (BAF)

Po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano so bile vrednosti bioakumulacijskega faktorja za cink značilno različne med skupinami, hranjenimi z nanodelci ZnO v konc. 1500 in 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista ($p < 0.01$), z mikrodenci ZnO v konc. 1500 in 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista ($p < 0.05$) ter z ZnCl_2 v konc. 1000 in 2500 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista ($p < 0.01$). Do statistično značilne razlike je prišlo tudi med skupinama, hranjenima z nanodelci ZnO v konc. 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista ter z ZnCl_2 v konc. 2500 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista ($p < 0.05$) (**Priloga A1, Tabela A1-n1 in Tabela A1-n2**).



Slika 22. 14-dnevna serija: bioakumulacijski faktor za Zn v *Porcellio scaber* po 14 dneh hranjenja z listi leske, tretiranimi z nanodelci ZnO v konc. 1500 in 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (1500 n in 4000 n), mikrodenci ZnO v konc. 1500 in 4000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (1500 M in 4000 M) in ZnCl_2 v konc. 1000 in 2500 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (1000 s in 2500 s). Na x-osi so označene nominalne izpostavitvene koncentracije Zn in število končnih podatkov, upoštevanih pri izračunu indeksa (n).

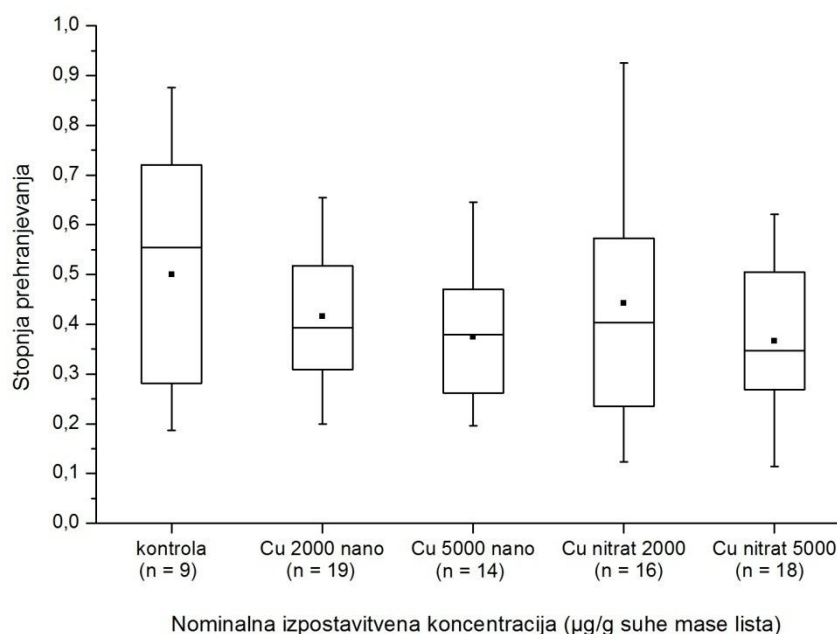
4.2 POSKUS Z BAKROM

4.2.1 Vpliv izpostavljenosti bakru na prehranjevalne parametre

4.2.1.1 Stopnja prehranjevanja (SP)

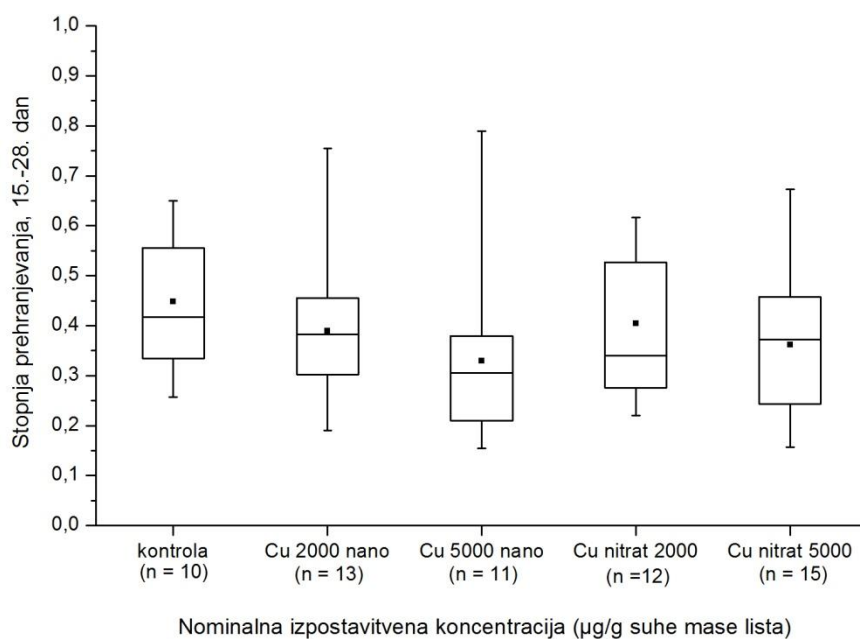
V prvi fazi poskusa ni bilo razlik v stopnji prehranjevanja med 14-dnevno in 14+14-dnevno skupino (podatki niso prikazani), zato v nadaljevanju primerjamo podatke 14-dnevne skupine za čas hranjenja s tretirano hrano in podatke 14+14-dnevne skupine za čas hranjenja z netretirano hrano, čeprav ni šlo za iste živali.

Po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano ni bilo statistično značilnih razlik v stopnji prehranjevanja niti pri primerjavi tretiranih skupin s kontrolno (**Slika 23**) niti med samimi tretiranimi skupinami (**Priloga A2, Tabela A2-a**).



Slika 23. 14-dnevna serija: stopnja prehranjevanja *Porcellio scaber* po 14 dneh hranjenja z listi leske, tretiranimi s $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ v konc. 2000 in 5000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (Cu nitrat 2000 in Cu nitrat 5000) in nanodelci Cu v konc. 2000 in 5000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (Cu 2000 nano in Cu 5000 nano). Na x-osi so označene nominalne izpostavitvene koncentracije Cu in število končnih podatkov, upoštevanih pri izračunu indeksa (n).

Tudi po 14-dnevnem obdobju izločanja ni prišlo do statističnih razlik v stopnji prehranjevanja med nobenima izmed tretiranih skupin (**Slika 24; Priloga A2, Tabela A2-b**).

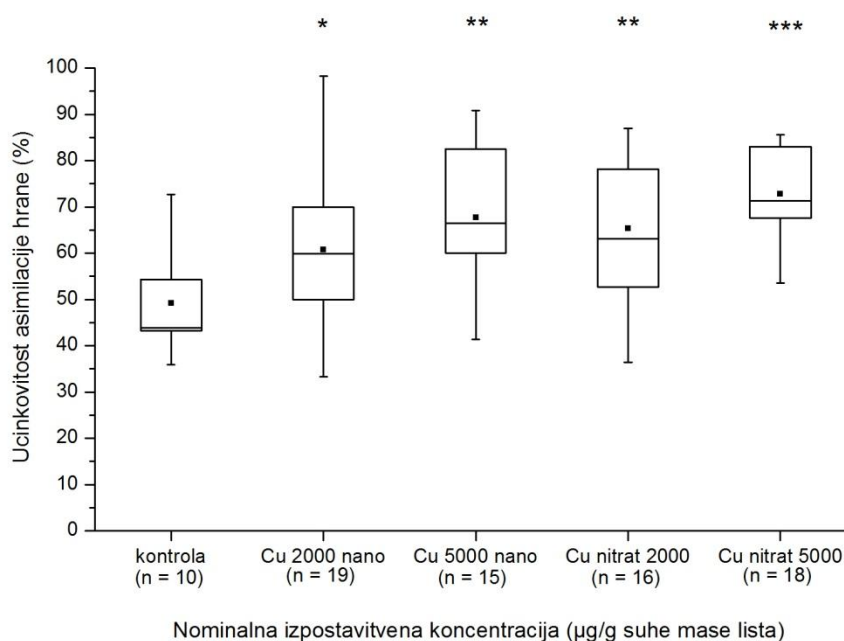


Slika 24. 14+14-dnevna serija: stopnja prehranjevanja *Porcellio scaber* po 14 dneh hranjenja z netretiranimi listi leske, predhodno 14 dni hranjenih z listi leske, tretiranimi s $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ v konc. 2000 in 5000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (Cu nitrat 2000 in Cu nitrat 5000) in nanodelci Cu v konc. 2000 in 5000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (Cu 2000 nano in Cu 5000 nano). Na x-osi so označene nominalne izpostavitvene koncentracije Cu in število končnih podatkov, upoštevanih pri izračunu indeksa (n).

4.2.1.2 Učinkovitost asimilacije hrane (UA)

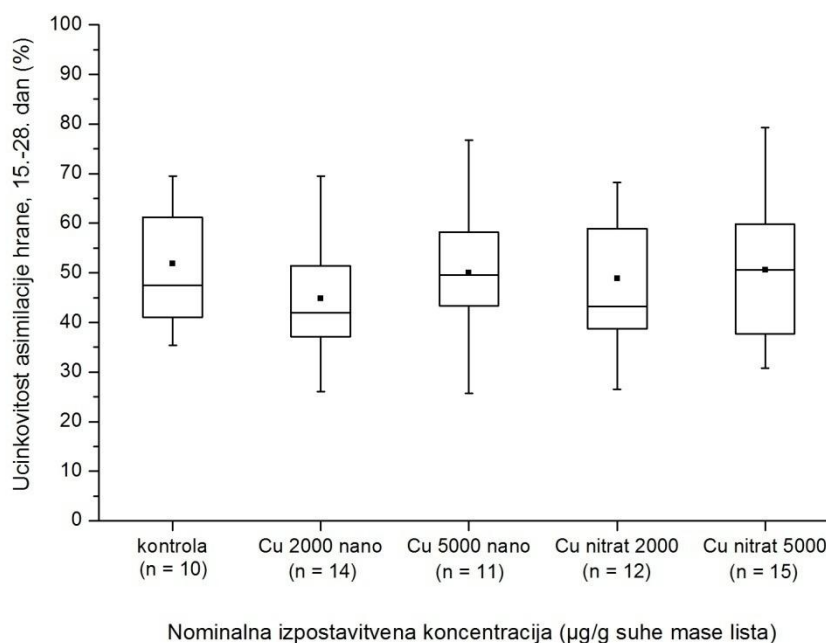
V prvi fazi poskusa ni bilo razlik v učinkovitosti asimilacije hrane med 14-dnevno in 14+14-dnevno skupino (podatki niso prikazani), zato v nadaljevanju primerjamo podatke 14-dnevne skupine za čas hranjenja s tretirano hrano in podatke 14+14-dnevne skupine za čas hranjenja z netretirano hrano, čeprav ni šlo za iste živali.

Po 14 dneh izpostavitve tretirani hrani so vse tretirane skupine kazale statistično značilno višjo učinkovitost asimilacije hrane v primerjavi s kontrolno skupino (**Slika 25**), med tretiranimi skupinami pa statistično značilnih razlik v učinkovitosti asimilacije hrane ni bilo (**Priloga A2, Tabela A2-c**).



Slika 25. 14-dnevna serija: učinkovitost asimilacije hrane pri *Porcellio scaber* po 14 dneh hranjenja z listi leske, tretiranimi s $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ v konc. 2000 in 5000 µg/g suhe mase lista (Cu nitrat 2000 in Cu nitrat 5000) in nanodelci Cu v konc. 2000 in 5000 µg/g suhe mase lista (Cu 2000 nano in Cu 5000 nano). Na x-osi so označene nominalne izpostavitvene koncentracije Cu in število končnih podatkov, upoštevanih pri izračunu indeksa (n). Statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolno skupino so označene z zvezdicami (Mann-Whitney U-test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Po 14-dnevnem obdobju izločanja v učinkovitosti asimilacije hrane ni bilo več značilnih razlik, niti med kontrolno in tretiranimi skupinami (**Slika 26**) niti med tretiranimi skupinami samimi (**Priloga A2, Tabela A2-d**).

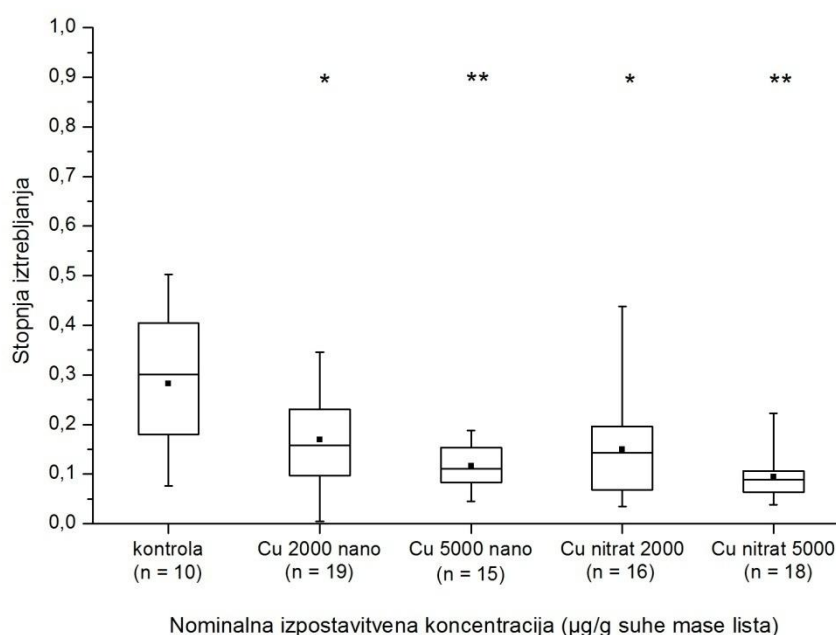


Slika 26. 14+14-dnevna serija: učinkovitost asimilacije hrane pri *Porcellio scaber* po 14 dneh hranjenja z netretiranimi listi leske, predhodno 14 dni hranjenih z listi leske, tretiranimi s $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ v konc. 2000 in 5000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (Cu nitrat 2000 in Cu nitrat 5000) in nanodelci Cu v konc. 2000 in 5000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (Cu 2000 nano in Cu 5000 nano). Na x-osi so označene nominalne izpostavitvene koncentracije Cu in število končnih podatkov, upoštevanih pri izračunu indeksa (n).

4.2.1.3 Stopnja iztrebljanja (SI)

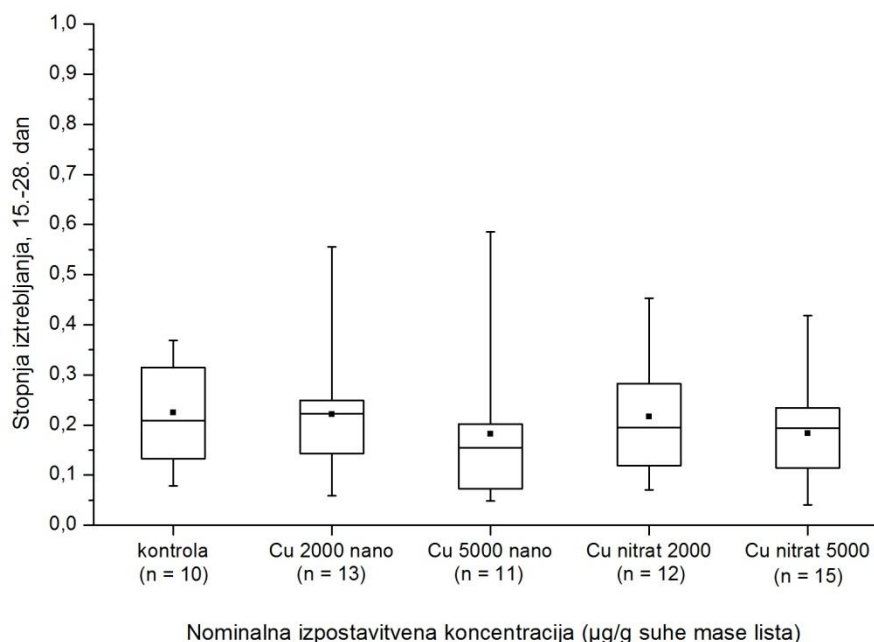
V prvi fazi poskusa ni bilo razlik v stopnji iztrebljanja med 14-dnevno in 14+14-dnevno skupino (podatki niso prikazani), zato v nadaljevanju primerjamo podatke 14-dnevne skupine za čas hranjenja s tretirano hrano in podatke 14+14-dnevne skupine za čas hranjenja z netretirano hrano, čeprav ni šlo za iste živali.

Po 14 dneh izpostavitve tretirani hrani je bila v vseh tretiranih skupinah stopnja iztrebljanja statistično značilno nižja od kontrolne skupine (**Slika 27**). Pri primerjavi tretiranih skupin med sabo je do značilnih razlik prišlo med skupinama, hranjenima z nanodelci Cu v konc. 2000 in 5000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista ($p < 0.05$) (**Priloga A2, Tabela A2-e**).



Slika 27. 14-dnevna serija: stopnja iztrebljanja *Porcellio scaber* po 14 dneh hranjenja z listi leske, tretiranimi s $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ v konc. 2000 in 5000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (Cu nitrat 2000 in Cu nitrat 5000) in nanodelci Cu v konc. 2000 in 5000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (Cu 2000 nano in Cu 5000 nano). Na x-osi so označene nominalne izpostavitvene koncentracije Cu in število končnih podatkov, upoštevanih pri izračunu indeksa (n). Statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolno skupino so označene z zvezdicami (Mann-Whitney U-test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Po 14-dnevem obdobju izločanja med kontrolno in tretiranimi skupinami statistično značilnih razlik v stopnji iztrebljanja ni bilo več (**Slika 28**), prav tako se stopnja iztrebljanja ni razlikovala med posameznimi tretiranimi skupinami (**Priloga A2, Tabela A2-f**).

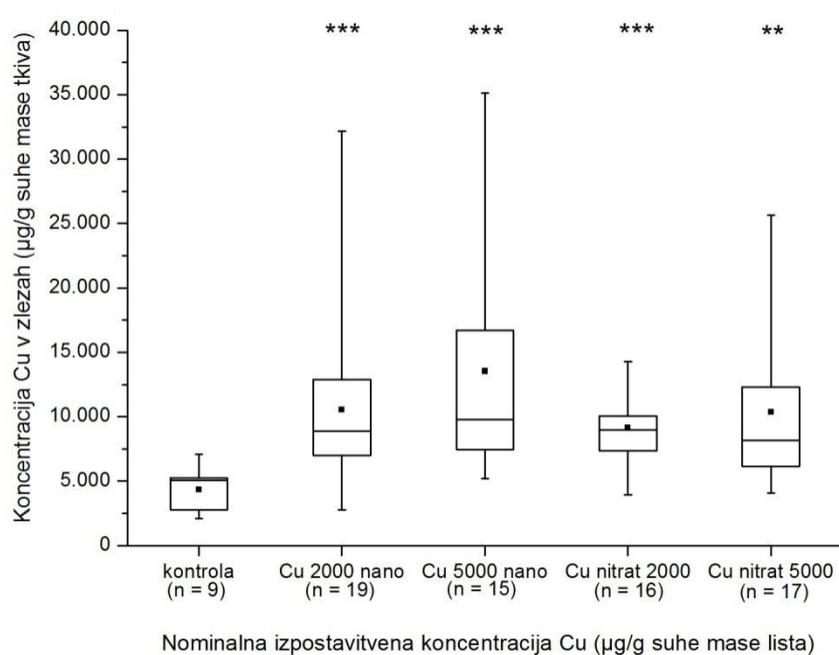


Slika 28. 14+14-dnevna serija: stopnja iztrebljanja *Porcellio scaber* po 14 dneh hranjenja z netretiranimi listi leske, predhodno 14 dni hranjenih z listi leske, tretiranimi s $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ v konc. 2000 in 5000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (Cu nitrat 2000 in Cu nitrat 5000) in nanodelci Cu v konc. 2000 in 5000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (Cu 2000 nano in Cu 5000 nano). Na x-osi so označene nominalne izpostavitvene koncentracije Cu in število končnih podatkov, upoštevanih pri izračunu indeksa (n).

4.2.2 Vsebnost bakra v modelnem organizmu

4.2.2.1 Vsebnost bakra v prebavnih žlezah

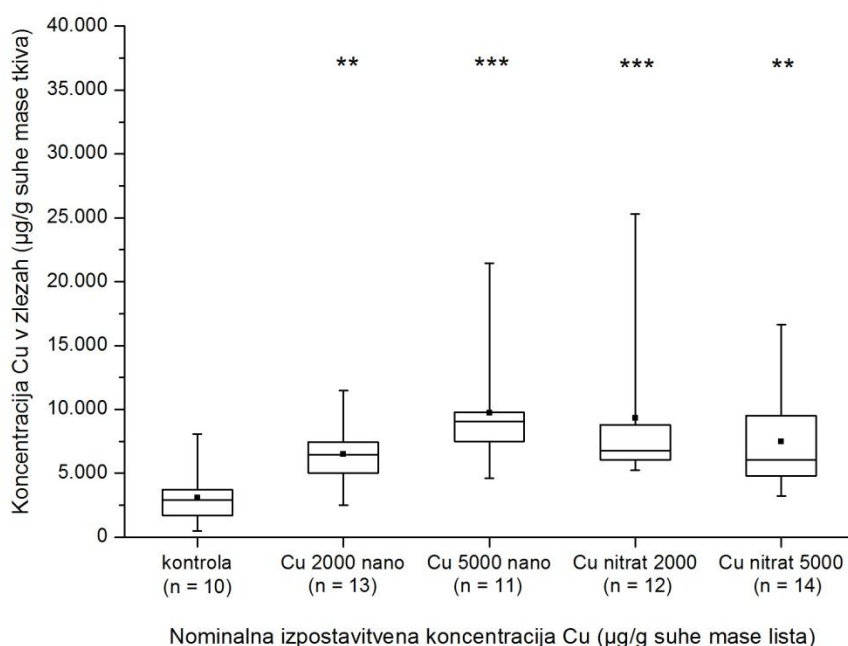
Po 14 dneh izpostavitve tretirani hrani so vse tretirane skupine vsebovale značilno več bakra v prebavnih žlezah v primerjavi s kontrolno skupino (**Slika 29**). Med tretiranimi skupinami statistično značilnih razlik v koncentraciji bakra ni bilo (**Priloga A2, Tabela A2-g**).



Slika 29. 14-dnevna serija: izmerjena koncentracija Cu v prebavnih žlezah *Porcellio scaber* po 14 dneh hranjenja z listi leske, tretiranimi s $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ v konc. 2000 in 5000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (Cu nitrat 2000 in Cu nitrat 5000) in nanodelci Cu v konc. 2000 in 5000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (Cu 2000 nano in Cu 5000 nano). Na x-osi so označene nominalne izpostavitvene koncentracije Cu in število končnih podatkov, upoštevanih pri izračunu (n). Statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolno skupino so označene z zvezdicami (Mann-Whitney *U*-test; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Po 14-dnevnem obdobju izločanja so vse tretirane skupine v prebavnih žlezah še vedno vsebovale statistično značilno višjo koncentracijo bakra kot kontrolna skupina (**Slika 30**). Skupina, hranjena z nanodelci Cu v konc. 5000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista, je vsebovala značilno več bakra od skupine, hranjene z isto spojino v konc. 2000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista ($p < 0.05$) (**Priloga A2, Tabela A2-h**).

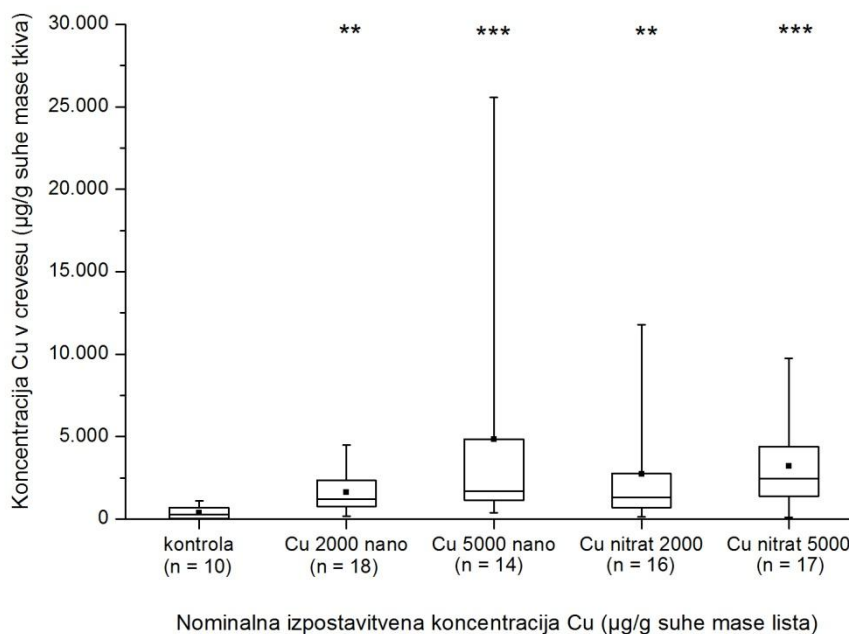
Glede na obdobje hranjenja s tretirano hrano je v tretiranih skupinah prišlo do približno 15% znižanja koncentracij bakra v prebavnih žlezah (izračunano glede na mediane), vendar primerjave tretiranih skupin med 14-dnevno in 14+14-dnevno serijo niso pokazale statistično značilnih razlik, razen med skupinama, hranjenima z nanodelci Cu v konc. 2000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista ($p < 0.05$) (**Priloga A2, Tabela A2-r**).



Slika 30. 14+14-dnevna serija: izmerjena koncentracija Cu v prebavnih žlezah *Porcellio scaber* po 14 dneh hranjenja z netretiranimi listi leske, predhodno 14 dni hranjenih z listi leske, tretiranimi s $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ v konc. 2000 in 5000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (Cu nitrat 2000 in Cu nitrat 5000) in nanodelci Cu v konc. 2000 in 5000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (Cu 2000 nano in Cu 5000 nano). Na x-osi so označene nominalne izpostavitvene koncentracije Cu in število končnih podatkov, upoštevanih pri izračunu (n). Statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolno skupino so označene z zvezdicami (Mann-Whitney U-test; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

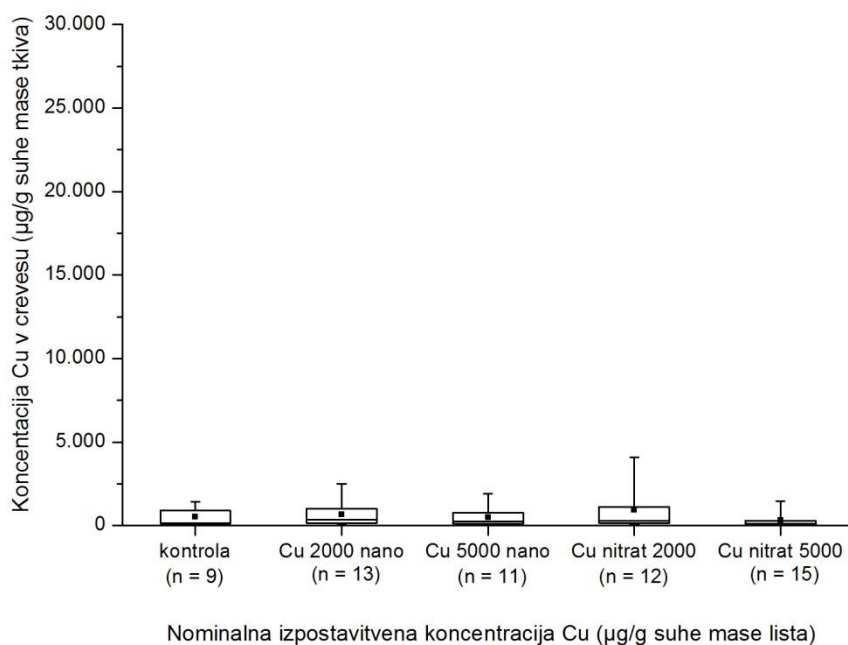
4.2.2.2 Vsebnost bakra v črevesu

Po 14 dneh izpostavitve tretirani hrani so vse tretirane skupine v črevesu vsebovale statistično značilno več bakra od kontrolne skupine (**Slika 31**). Med posameznimi tretiranimi skupinami v vsebnosti bakra ni bilo razlik (**Priloga A2, Tabela A2-i**).



Slika 31. 14-dnevna serija: izmerjena koncentracija Cu v črevesu *Porcellio scaber* po 14 dneh hranjenja z listi leske, tretiranimi s $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ v konc. 2000 in 5000 µg/g suhe mase lista (Cu nitrat 2000 in Cu nitrat 5000) in nanodelci Cu v konc. 2000 in 5000 µg/g suhe mase lista (Cu 2000 nano in Cu 5000 nano). Na x-osi so označene nominalne izpostavitvene koncentracije Cu in število končnih podatkov, upoštevanih pri izračunu (n). Statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolno skupino so označene z zvezdicami (Mann-Whitney U-test; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

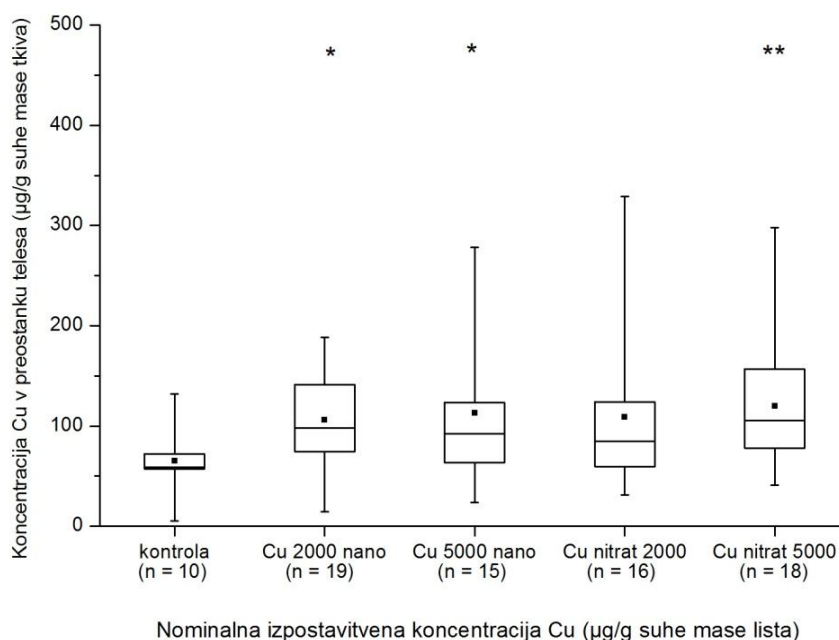
Po 14-dnevnem obdobju izločanja med kontrolno in tretiranimi skupinami v koncentraciji bakra v črevesu ni bilo več statistično značilnih razlik (**Slika 32**), prav tako ni bilo značilnih razlik v vsebnosti bakra med posameznimi tretiranimi skupinami (**Priloga A2, Tabela A2-j**).



Slika 32. 14+14-dnevna serija: izmerjena koncentracija Cu v črevesu *Porcellio scaber* po 14 dneh hranjenja z netretiranimi listi leske, predhodno 14 dni hranjenih z listi leske, tretiranimi s $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ v konc. 2000 in 5000 µg/g suhe mase lista (Cu nitrat 2000 in Cu nitrat 5000) in nanodelci Cu v konc. 2000 in 5000 µg/g suhe mase lista (Cu 2000 nano in Cu 5000 nano). Na x-osi so označene nominalne izpostavitvene koncentracije Cu in število končnih podatkov, upoštevanih pri izračunu (n).

4.2.2.3 Vsebnost bakra v preostanku telesa

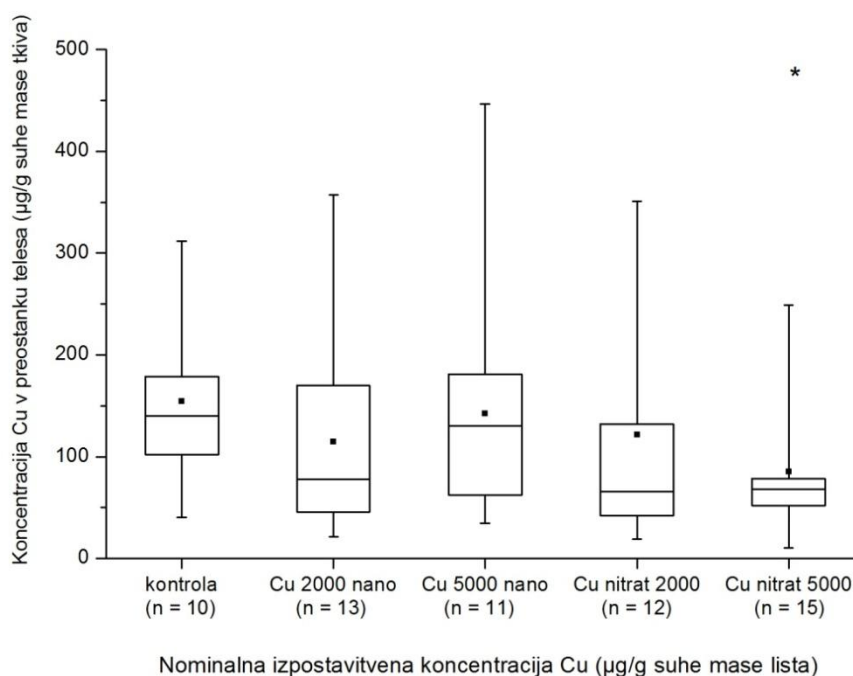
Po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano so skupine, hranjene z nanodelci Cu v konc. 2000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista ($p < 0.05$), z nanodelci Cu v konc. 5000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista ($p < 0.05$) in s $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ v konc. 5000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista ($p < 0.01$) vsebovale značilno več bakra v preostanku telesa kot kontrolna skupina (**Slika 33**). Med tretiranimi skupinami statistično značilnih razlik v koncentraciji Cu ni bilo (**Priloga A2, Tabela A2-k**).



Slika 33. 14-dnevna serija: izmerjena koncentracija Cu v preostanku telesa *Porcellio scaber* po 14 dneh hranjenja z listi leske, tretiranimi s $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ v konc. 2000 in 5000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (Cu nitrat 2000 in Cu nitrat 5000) in nanodelci Cu v konc. 2000 in 5000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (Cu 2000 nano in Cu 5000 nano). Na x-osi so označene nominalne izpostavitvene koncentracije Cu in število končnih podatkov, upoštevanih pri izračunu (n). Statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolno skupino so označene z zvezdicami (Mann-Whitney *U*-test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Po 14-dnevnem obdobju izločanja je skupina, hranjena s $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ v konc. 5000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista, v preostanku telesa vsebovala značilno manj bakra kot kontrolna skupina ($p < 0.05$), medtem ko se ostale tretirane skupine od kontrole niso razlikovale (**Slika 34**). Tako kot v predhodnem obdobju med tretiranimi skupinami statistično značilnih razlik v koncentraciji Cu ni bilo (**Priloga A2, Tabela A2-I**).

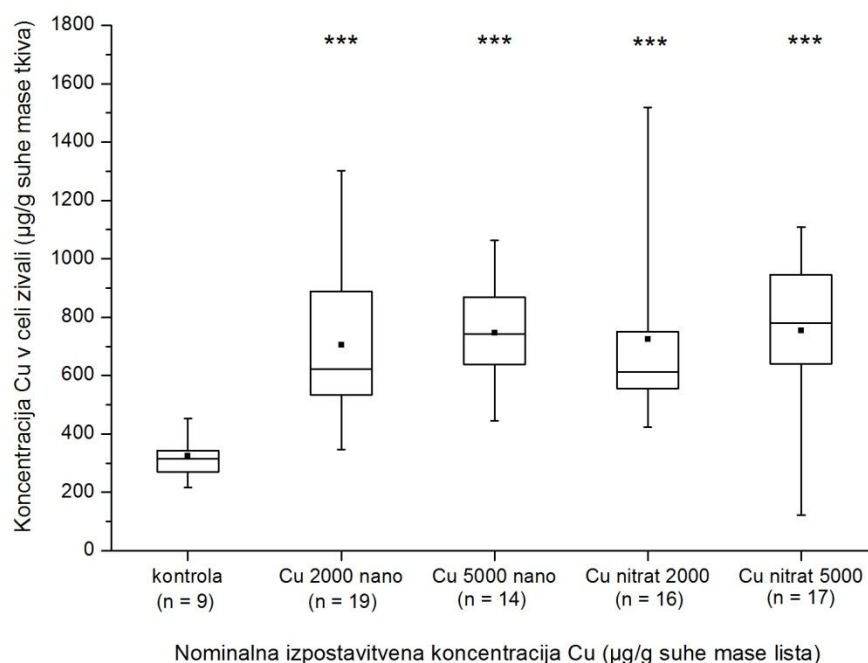
Primerjave tretiranih skupin med 14-dnevno in 14+14-dnevno serijo so pokazale statistično značilne razlike, med kontrolnima skupinama ter med skupinama, hranjenima s $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ v konc. 5000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista ($p < 0.01$) (**Priloga A2, Tabela A2-s**). Torej je večina zgoraj opisanih statistično značilnih razlik morda le artefakt, ki je posledica statistično značilnih razlik med kontrolnima skupinama, kot bo pojasnjeno v diskusiji.



Slika 34. 14+14-dnevna serija: izmerjena koncentracija Cu v preostanku telesa *Porcellio scaber* po 14 dneh hranjenja z netretiranimi listi leske, predhodno 14 dni hranjenih z listi leske, tretiranimi s $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ v konc. 2000 in 5000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (Cu nitrat 2000 in Cu nitrat 5000) in nanodelci Cu v konc. 2000 in 5000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (Cu 2000 nano in Cu 5000 nano). Na x-osi so označene nominalne izpostavitvene koncentracije Cu in število končnih podatkov, upoštevanih pri izračunu (n). Statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolno skupino so označene z zvezdicami (Mann-Whitney U-test; * $p < 0.05$).

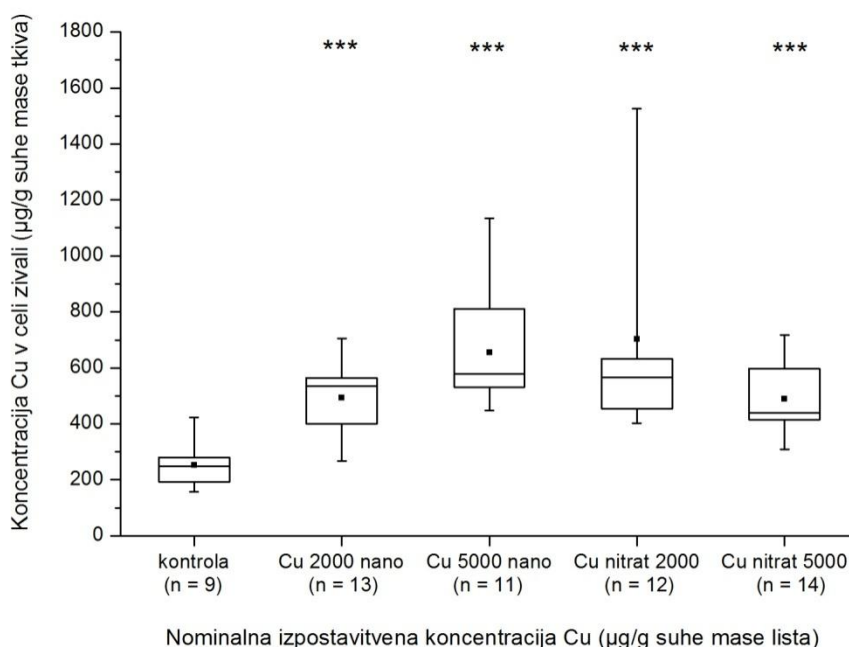
4.2.2.4 Celokupna vsebnost bakra v telesu

Po 14 dneh izpostavitve tretirani hrani so vse tretirane skupine kazale statistično značilno višjo celokupno koncentracijo bakra v telesu v primerjavi s kontrolno skupino (**Slika 35**). Med tretiranimi skupinami statistično značilnih razlik v koncentraciji bakra ni bilo (**Priloga A2, Tabela A2-m**).



Slika 35. 14-dnevna serija: izračunana celokupna koncentracija Cu v telesu *Porcellio scaber* po 14 dneh hranjenja z listi leske, tretiranimi s $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ v konc. 2000 in 5000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (Cu nitrat 2000 in Cu nitrat 5000) in nanodelci Cu v konc. 2000 in 5000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (Cu 2000 nano in Cu 5000 nano). Na x-osi so označene nominalne izpostavitvene koncentracije Cu in število končnih podatkov, upoštevanih pri izračunu (n). Statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolno skupino so označene z zvezdicami (Mann-Whitney *U*-test; *** $p < 0.001$).

Po 14-dnevnem obdobju izločanja so vse tretirane skupine še vedno vsebovale značilno višjo celokupno koncentracijo bakra v telesu kot kontrolna skupina (**Slika 36**). Statistično značilne razlike v vsebnosti bakra so bile prisotne med skupinama, hranjenima z nanodelci Cu v konc. 2000 in 5000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista ($p < 0.05$), ter med skupinama, hranjenima s $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ v konc. 2000 in 5000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista ($p < 0.05$) (**Priloga A2, Tabela A2-n**).

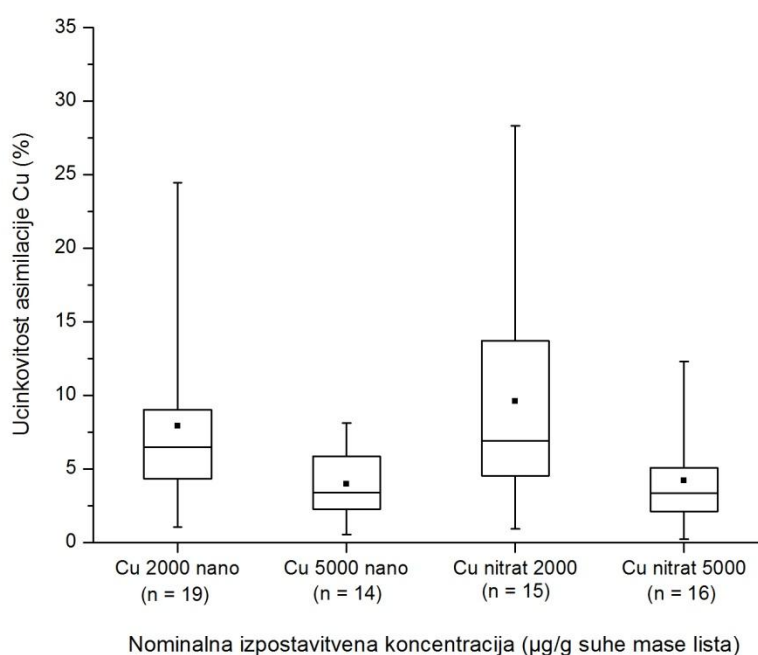


Slika 36. 14+14-dnevna serija: izračunana celokupna koncentracija Cu v telesu *Porcellio scaber* po 14 dneh hranjenja z netretiranimi listi leske, predhodno 14 dni hranjenih z listi leske, tretiranimi s $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ v konc. 2000 in 5000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (Cu nitrat 2000 in Cu nitrat 5000) in nanodelci Cu v konc. 2000 in 5000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (Cu 2000 nano in Cu 5000 nano). Na x-osi so označene nominalne izpostavitvene koncentracije Cu in število končnih podatkov, upoštevanih pri izračunu (n). Statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolno skupino so označene z zvezdicami (Mann-Whitney U-test; *** $p < 0.001$).

4.2.3 Kopičenje bakra v modelnem organizmu

4.2.3.1 Ocena učinkovitosti asimilacije bakra (UA_{Cu})

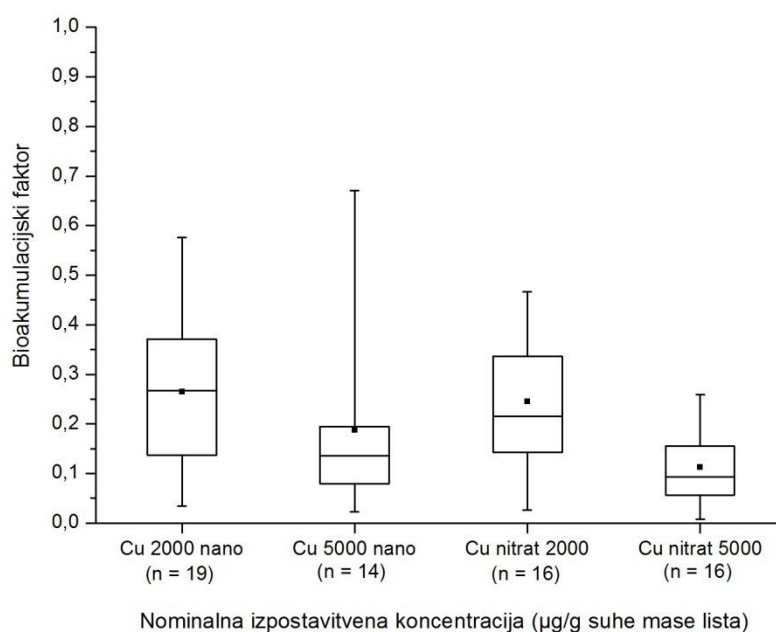
Po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano se je pojavila statistično značilna razlika v učinkovitosti asimilacije bakra med skupinama, hranjenima s $Cu(NO_3)_2$ v konc. 2000 in 5000 $\mu g/g$ suhe mase lista ($p < 0.01$). Med ostalimi tretiranimi skupinami razlik ni bilo (**Priloga A2, Tabela A2-o**).



Slika 37. 14-dnevna serija: učinkovitost asimilacije Cu v *Porcellio scaber* po 14 dneh hranjenja z listi leske, tretiranimi s $Cu(NO_3)_2$ v konc. 2000 in 5000 $\mu g/g$ suhe mase lista (Cu nitrat 2000 in Cu nitrat 5000) in nanodelci Cu v konc. 2000 in 5000 $\mu g/g$ suhe mase lista (Cu 2000 nano in Cu 5000 nano). Na x-osi so označene nominalne izpostavitvene koncentracije Cu in število končnih podatkov, upoštevanih pri izračunu indeksa (n).

4.2.3.2 Ocena bioakumulacijskega faktorja (BAF)

Statistično značilne razlike v BAF so po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano nastale med skupinama, hranjenima s $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ v konc. 2000 in 5000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista ($p < 0.001$), ter med skupinama, hranjenima z nanodelci Cu v konc. 2000 in 5000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista ($p < 0.001$). Med skupinami, hranjenimi z različnimi oblikami bakra v isti koncentraciji, razlik ni bilo (**Priloga A2, Tabela A2-p**).



Slika 38. 14-dnevna serija: bioakumulacijski faktor za Cu v *Porcellio scaber* po 14 dneh hranjenja z listi leske, tretiranimi s $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ v konc. 2000 in 5000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (Cu nitrat 2000 in Cu nitrat 5000) in nanodelci Cu v konc. 2000 in 5000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista (Cu 2000 nano in Cu 5000 nano). Na x-osi so označene nominalne izpostavitvene koncentracije Cu in število končnih podatkov, upoštevanih pri izračunu indeksa (n).

5. RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Poskus s cinkom

5.1.1.1 Prehranjevalni parametri v odvisnosti od čiste in tretirane hrane

Hranjenje poskusnih organizmov z mikrodenci ZnO v konc. 4000 µg/g hrane ter ZnCl₂ v konc. 2500 µg/g hrane je značilno zmanjšalo stopnjo prehranjevanja (SP) tako v primerjavi s kontrolno skupino kot v primerjavi s skupinama, hranjenimi z istima spojinama v nižjih koncentracijah. Pri ostalih skupinah ni bilo razlik niti s stališča koncentracij niti s stališča vrste delcev (**Slika 9**). Pri nobeni izmed tretiranih skupin ni bilo statistično značilne razlike v učinkovitosti asimilacije hrane (UA) v primerjavi s kontrolno skupino, saj je bil rang slednje zelo širok (36–83 %). Toda posamezni rangi tretiranih skupin so bili ožji, zato je med njimi prišlo do značilnih razlik (**Slika 10**), a le pri primerjavi skupine, hranjene z ZnCl₂ v konc. 2500 µg/g hrane, z ZnCl₂ v nižji koncentraciji (1000 µg/g hrane) ter z obema oblikama ZnO v najvišji koncentraciji (4000 µg/g hrane). Med skupinami, hranjenimi z ZnO, ni bilo značilnih razlik niti s stališča koncentracije niti s stališča vrste delcev.

Oba parametra nakazujeta, da imata na prehranjevanje enakonožcev največji vpliv mikro-partikulatna oblika ZnO ter visoke koncentracije cinka, predvsem v obliki cinkovih ionov. To kaže učinek odmerka in dostopnosti cinkovih ionov, kot bo pojasnjeno v nadaljevanju. Zvišanje učinkovitosti asimilacije hrane pri hranjenju s hrano, tretirano s kovinami (kot so cink, kadmij, svinec, živo srebro in druge) v visokih koncentracijah, je v splošnem pojav, povezan z znižanjem stopnje prehranjevanja (manjši vnos hrane v telo, zato večji izkoristek tistega, kar je kljub vsemu bilo požrto). Poleg tega pa lahko gre tudi za učinek dolgotrajnega zadrževanja hrane v črevesu (Drobne in Hopkin, 1995) ali koprofagije – če živali, ki pojedjo manj lista, v večji meri jedo svoje iztrebke (ki jih imajo na voljo 7 dni), je rezultat večja UA.

V času hranjenja s tretirano hrano (**Slika 11**) se je SI v primerjavi s kontrolno skupino značilno znižala le v skupini, hranjeni z ZnCl₂ v konc. 2500 µg/g hrane. Dodatno je prišlo do razlik med obema koncentracijama mikrodencov ZnO (1500 in 4000 µg/g hrane), med obema koncentracijama ZnCl₂ (1000 in 2500 µg/g hrane) ter med ZnCl₂ in nanodelci ZnO pri parnih primerjavah med skupinama (tj. obeh nižjih ter obeh višjih koncentracij). To nakazuje, da imajo višje koncentracije cinka večji vpliv na iztrebljanje od nižjih, ter da ima med cinkovimi spojinami največji vpliv ZnCl₂, ki mu sledi ZnO v mikrometrski velikosti. Ti rezultati se ujemajo s sliko, ki nam jo kažeta indeksa SP in UA.

Ker pri študijah asimilacije učinki kovin na stopnjo prehranjevanja in iztrebljanja posledično vplivajo na asimilacijo kovin, pri nadaljnjih raziskavah predlagamo uporabo še nekoliko nižjih koncentracij cinkovih spojin (pri katerih ne bo zmanjšanja hranjenja niti v primeru ZnCl_2 niti v primeru mikrodcelcev ZnO) in morebitno podaljšanje časa izpostavitve.

Po 14 dneh izločanja (**Slika 12**), so glede na predhodno obdobje ostale razlike v SI med skupinama, hranjenima z ZnCl_2 in nanodelci ZnO v nižjih koncentracijah (1000 oz. 1500 $\mu\text{g/g}$ hrane), ter med skupinama, hranjenima z mikrodcelci ZnO v obeh koncentracijah (1500 in 4000 $\mu\text{g/g}$ hrane). Poleg tega je prišlo do znižanja SI v skupini, hranjeni z mikrodcelci ZnO v konc. 4000 $\mu\text{g/g}$ hrane, v primerjavi s kontrolo, ter do razlike med obema koncentracijama nanodelcev ZnO . Ker ne gre za iste živali, so takšne razlike možne, sploh ker so v skladu s trendi, ki jih kažejo indeksi za prvih 14 dni: odvisnosti od odmerka ter vplivu ZnCl_2 in mikrodcelcev ZnO .

Nižja stopnja iztrebljanja v skupinah, kjer je v času hranjenja s tretirano hrano prišlo do zmanjšanja stopnje prehranjevanja, je logična, presenetljivo pa je, da je ta učinek tako dolgotrajen in prisoten še po tem, ko imajo enakonožci na voljo čisto hrano. Drobne in Hopkin (1995) namreč navajata, da se je po prenehanju hranjenja s cinkom v obliki ionov stopnja iztrebljanja zvišala v vseh poskusnih skupinah, izpostavljenih cinku v konc. 1000–10.000 $\mu\text{g/g}$ hrane. Podobno kakor Drobne in Hopkin (1995) poroča tudi Bibič s sod. (1997). V obeh omenjenih študijah je bil dvig stopnje iztrebljanja najbolj izrazit ravno pri najvišjih koncentracijah. Vsaj v primeru mikrodcelcev ZnO v konc. 4000 $\mu\text{g/g}$ hrane lahko ta pojav povežemo z dolgotrajnim zadrževanjem teh delcev v črevesu in posledičnim postopnim sproščanjem cinkovih ionov, kot bo pojasnjeno v nadaljevanju, za ostale tretirane skupine pa nimamo razlage.

5.1.1.2 Razporejanje cinka v telesnih delih enakonožcev in izločanje iz telesa

V študiji Pipan-Tkalec in sod. (2010) so po 28 dneh hranjenja s tretirano hrano statistično značilno več cinka v telesu vsebovale le skupine, hranjene s cinkovimi spojinami v nominalni konc. 5000 $\mu\text{g/g}$ hrane. V našem poskusu so že po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano vse tretirane skupine (koncentracija, preračunana na celotno telo) vsebovale statistično značilno več cinka od kontrolne skupine, medtem ko so koncentracije znotraj teh skupin (približno 150–850 $\mu\text{g/g}$ suhe mase tkiva) obsegale podobne vrednosti kot v v omenjeni študiji (**Slika 19**). Skupina, hranjena z ZnCl_2 v konc. 4000 $\mu\text{g/g}$ hrane, je v telesu vsebovala značilno več cinka kot skupina, hranjena isto spojino v nižji koncentraciji (1500

µg/g hrane), prav tako pa je skupina, hranjena z mikodelci ZnO v konc. 2000 µg/g hrane vsebovala značilno več cinka kot skupina, hranjena z ZnCl₂ v isti koncentraciji. Tudi tu zasledimo podoben vzorec kot pri prehranskih indeksih: vpliv ZnCl₂ in mikodelcev ZnO, pri katerih pride najbolj do izraza odvisnost od odmerka.

Po 14-dnevnem obdobju izločanja se je ohranila statistično značilna razlika v vsebnosti cinka v telesu skupine, hranjene z mikodelci ZnO v konc. 4000 µg/g hrane, v primerjavi s kontrolo in skupino, hranjeno z ZnCl₂ v konc. 2500 µg/g hrane (**Slika 20**). Koncentracije cinka v telesu vseh tretiranih skupin po obdobju hranjenja s čisto hrano so bile bistveno nižje kot v času hranjenja s tretirano hrano (obseg 150–850 µg/g suhe mase tkiva po hranjenju s tretirano in obseg 100–300 µg/g suhe mase tkiva po hranjenju s čisto hrano – slednji velja za vse skupine, razen za mikodelce ZnO). To nakazuje, da so se vse oblike cinka v času hranjenja s čisto hrano učinkovito izločile iz telesa. V telesu so se po doslej še neznanem mehanizmu delno zadržali le mikodelci ZnO.

Vse tretirane skupine, razen tiste, hranjene z nanodelci ZnO v konc. 1500 µg/g hrane, so po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano v hepatopankreasu vsebovale statistično značilno več cinka kot kontrolna skupina (**Slika 13**). Dodatno se je pojavila značilna razlika med skupinama, hranjenima z ZnCl₂, in sicer v prid koncentracije 2500 µg/g hrane. Oba rezultata sta pričakovana. Po 14-dnevnem obdobju izločanja je v primerjavi s kontrolno skupino in z ZnCl₂ v konc. 2500 µg/g hrane značilno več cinka v hepatopankreasu vsebovala le še skupina, hranjena z mikodelci ZnO v konc. 4000 µg/g hrane (**Slika 14**).

V predelu črevesa je bila dinamika kopičenja in izločanja cinka skoraj identična kot v predelu hepatopankreasa, pojavilo se je zgolj nekoliko več statistično značilnih razlik (**Slika 15**). Tako je po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano tudi skupina, hranjena z nanodelci ZnO v konc. 1500 µg/g hrane, vsebovala statistično značilno več cinka kot kontrolna skupina. Skupina, hranjena z ZnCl₂ v v konc. 2500 µg/g hrane, pa je poleg skupine, hranjene z isto obliko cinka v nižji koncentraciji, vsebovala statistično značilno več cinka tudi od skupine, hranjene z nanodelci ZnO v konc. 4000 µg/g hrane, medtem ko v primerjavi s skupino, hranjeno z mikodelci ZnO v konc. 4000 µg/g hrane, ni bilo razlik. Po 14-dnevnem obdobju izločanja je tako kot v hepatopankreasu tudi v črevesu skupina, hranjena z mikodelci ZnO v konc. 4000 µg/g hrane, zadržala značilno več cinka od kontrolne skupine (**Slika 16**). Poleg tega je ta skupina vsebovala značilno več cinka še od skupin, hranjenih z mikodelci ZnO v nižji koncentraciji (1500 µg/g hrane) ter z nanodelci ZnO v isti koncentraciji (4000 µg/g hrane).

Črevo je organ, po katerem hrana potuje skozi telo enakonožcev. Ker je obdano s kutikulo, je delež resorpcije hranil najbrž zanemarljiv, kar potrjuje tudi ultrastruktura celic črevesa (Brečko, 1992). En dan hranjenja z netretirano hrano pred sekcijo morda ni zadoščal, da bi se vsi ostanki cinka, požrti s tretiranimi listi, izločili iz črevesa. Torej bi lahko bil naš rezultat akumulacije cinka po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano le artefakt, izhajajoč iz kovine v ostankih hrane v črevesu ter na njegovi površini, in ne iz samega tkiva. To bi pojasnilo tudi skoraj popolno izločenje cinka iz črevesa po 14 dneh hranjenja s čisto hrano, razen v primeru mikrodolcev ZnO. Kutikula črevesa je pokrita s kutikularnimi trni, katerih vloga še vedno ni pojasnjena (Drobne, 1995). Prisotnost teh struktur bi lahko bila razlog za zadrževanje večjih delcev v črevesu, v našem primeru mikrodolcev ZnO. Ti so se verjetno dogotrajno zadržali v tkivu, vendar zgolj v konc. 4000 µg/g hrane. To nakazuje vpliv odmerka, saj nižja koncentracija mikrodolcev ZnO še ni presegla izločalnih sposobnosti enakonožcev.

V preostanku telesa enakonožcev po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano v nobeni izmed tretiranih skupin ni bilo statistično značilnih razlik v vsebnosti cinka v primerjavi s kontrolno skupino (**Slika 17**). Skupina, hranjena z ZnCl₂ v konc. 1000 µg/g hrane, je vsebovala značilno manj cinka v primerjavi s skupino, hranjeno z isto obliko cinka v konc. 2500 µg/g hrane, ter s skupino, hranjeno z mikrodolci ZnO v konc. 1500 µg/g hrane. Do teh razlik je prišlo na račun zelo ozke distribucije vrednosti koncentracij cinka v omenjeni skupini. Po 14-dnevnem obdobju izločanja je prišlo do nepričakovanega pojava: skupine, hranjene z nanodelci ZnO v obeh koncentracijah ter z mikrodolci ZnO v konc. 1500 µg/g hrane, so kljub enaki stopnji iztrebljanja kot pri kontrolnih živalih vsebovale statistično značilno *manj* cinka od kontrolne skupine. Za ta pojav nimamo razlage. Med ostalimi tretiranimi skupinami in kontrolno skupino razlik ni bilo (**Slika 18**). Poleg tega je skupina, hranjena z mikrodolci ZnO v konc. 1500 µg/g hrane, vsebovala značilno manj cinka v primerjavi s skupino, hranjeno z isto obliko Zn v konc. 4000 µg/g hrane, ter s skupino, hranjeno z ZnCl₂ v konc. 1000 µg/g hrane. V prvem primeru gre verjetno za učinek odmerka, v drugem pa za manjšo biodostopnost cinka v mikro-partikulatni obliki glede na ionsko obliko.

Iz naših podatkov lahko zaključimo, da pri enakonožcih obstajajo učinkoviti mehanizmi izločanja cinka iz telesa, ki jim omogočajo, da se po zadostnem času hranjenja s čisto hrano skoraj v celoti znebijo bremena cinka, ki so si ga pridobili med hranjenjem s tretirano hrano. Ta pojav so zabeležile že predhodne študije (Hames in Hopkin, 1991a, cit. po Bibič in sod., 1997; Bibič in sod., 1997). V našem poskusu so bili ti mehanizmi skoraj stoodstotno učinkoviti, saj po 14 dneh hranjenja s čisto hrano v nobeni izmed tretiranih

skupin ni bilo več statistično značilnih razlik v primerjavi s kontrolno skupino, z izjemo skupine, hranjene z mikrodenci ZnO v konc. 4000 µg/g hrane.

Naša hipoteza, da bo pri nanodelcih ZnO prišlo do manjše asimilacije cinka v telesu v primerjavi s cinkovimi ioni, se ni potrdila, saj le-ti večinoma niso pokazali nič manjšega potenciala za privzem v telo od ostalih oblik cinka. Le v predelu hepatopankreasa pri konc. 1500 µg/g hrane je bil potencial za asimilacijo manjši od ostalih oblik cinka, saj statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolo ni bilo, pa tudi v predelu črevesa je prišlo do razlike v vsebnosti cinka zgolj med skupinama, hranjenima z nanodelci ZnO in ZnCl₂ v višjih koncentracijah (2500 in 4000 µg/g hrane). Pri vseh ostalih primerjavah vsebnosti cinka v telesnih delih, ne glede na vrsto cinkove spojine ali njeno koncentracijo v hrani, razlik ni bilo. Trenutno najverjetnejša razlaga za ta pojav temelji na odtapljanju cinkovih ionov z nano- in tudi mikrodenci ZnO. pH v hepatopankreasu *P. scaber* je 5.8–6.8, v zadnjem črevesu *P. scaber* pa 5.7–6.3 (Zimmer in Brune, 2005), kar je dovolj nizko, da lahko spodbudi odtapljanje ionov s površine nanodencov kovin in kovinskih oksidov, saj do odtapljanja pride že v destilirani vodi ali umetnih bioloških medijih z nevtralnim pH (Cai in sod., 2005; Xia in sod., 2006; Midander in sod., 2007, 2009), pri čemer nastanejo predvsem Zn²⁺ in Zn(OH)₂, odtapljanje pa spodbudijo tudi biološke makromolekule, kot je HSA (Cai in sod., 2005). Predvidevamo, da je po daljšem stiku nano- in mikrodencov ZnO z biološkimi tekočinami in tkivi prišlo do močnega odtapljanja ionov s površine delcev, ki so s tem postali dostopni za asimilacijo v telesu (predvsem hepatopankreasu) enakonožcev. Odtapljanje je bilo tako veliko, da je dostopna količina prostih kovinskih ionov dosegla ali celo presegla asimilacijsko kapaciteto enakonožcev za cink iz hrane, zato nismo zaznali razlik med različnimi oblikami delcev ZnO in cinkovih ionov.

Pri mikrodenci ZnO je morda prišlo do zadrževanja v telesu, predvsem v predelu črevesa in nekoliko manj v predelu hepatopankreasa, k čemur je poleg visoke koncentracije gotovo prispevala njihova partikulatna oblika. Zaradi visoke koncentracije pa bi lahko prišlo celo do agregacije, ki bi ta učinek še povečala. Zato so se mikrodenci ZnO po še neznanem mehanizmu zadržali v tkivu prebavnega sistema, kjer smo jih preko povišane koncentracije cinka zaznali še po 14 dneh hranjenja enakonožcev s čisto hrano. V prid temu govori tudi dolgotrajno zmanjšana defekacija pri skupini, hranjeni z mikrodenci ZnO v konc. 4000 µg/g hrane. Soroden pojav so zaznale študije na deževnikih in vodnih bolhah, kjer pa je šlo za akumulacijo slabo ali povsem netopnih nanodencov, kot so nanodenci zlata (Lovern in sod., 2008; Unrine in sod., 2010), srebra (Zhao in sod., 2010), diamantov (Mendonça in sod., 2011) in TiO₂ (Zhu in sod. 2010a), kvantne pike (Jackson in sod., 2009; Lewinski in sod., 2010), fulereni (Tervonen in sod., 2009) in ogljikove nanocevke (Petersen in sod., 2011).

5.1.1.3 Akumulacija cinka v telesu enakonožcev

Učinkovitost asimilacije Zn (UA_{Zn}) pri enakonožcih je bila v našem 14-dnevnom poskusu neodvisna tako od odmerka kot od kemijske oblike cinka, ki so ji bili enakonožci izpostavljeni. V našem poskusu je mediana UA_{Zn} znašala približno 2–6% (**Slika 21**). To je nekoliko manj od rezultatov raziskave Zidarja in sod. (2003), ki je pokazala, da lahko enakonožci po 14 dneh asimilirajo 7,2–16% iz hrane, tretirane z $ZnCl_2$ v konc. 450–5400 $\mu g/g$. V kasnejši raziskavi (Zidar in sod., 2009) je bila po 28 dneh asimilacija cinka iz hrane, tretirane z $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ v konc. 720–8224 $\mu g/g$, v vseh poskusnih skupinah le okoli 5%, medtem ko je v 28-dnevni študiji Pipan-Tkalec in sod. (2010) mediana asimilacija cinka iz hrane, tretirane z nanodelci in mikrodenci ZnO ter $ZnCl_2$ v konc 2000 in 5000 $\mu g/g$, znašala 2–12 %. Poudariti pa je potrebno, da enaka UA_{Zn} (torej enak delež asimiliranega cinka) med tretiranimi skupinami še vedno pomeni različno količino privzetega cinka med skupinami, izpostavljenimi različnim koncentracijam cinka v hrani.

Alternativni in manj natančen način za izračun asimilacije kovin v telo poskusnih organizmov je bioakumulacijski faktor, ki primerja koncentracijo kovine v telesu organizma z izpostavitveno koncentracijo v hrani. Uporablja se predvsem pri organizmih, kjer natančne količine zaužite kovine ni mogoče določiti. Z namenom primerjave s tovrstnimi študijami smo ga izračunali tudi mi, vendar gre zaradi posebnosti v našem izračunu le za oceno BAF; posledično je omejena tudi njena primerljivost. Ta je namreč možna samo v primeru, da BAF računamo na telesno vsebnost kovine, šele ko doseže plato vrednost (sicer čas izpostavitve določa vrednost BAF) in na dejansko koncentracijo kovine v hrani (sicer je možna zelo velika napaka, v našem primeru zaradi odpravevanja delcev s površine listov med poskusom). Pri nadaljnjem delu zato predlagamo, da se v prehranjevalnih poskusih z enakonožci določi plato vrednost asimilacije kovine in da se izmeri koncentracija kovine na listih pred, med in po poskusu, BAF pa se izračunava iz teh – dejanskih – vrednosti.

V našem poskusu je bil BAF v nasprotju z UA_{Zn} odvisen od odmerka, in sicer so imele skupine, hranjene z vsemi tremi oblikami cinka v višjih koncentracijah (2500 oz. 4000 $\mu g/g$ hrane), po 14 dneh višji BAF od skupin, hranjenih s cinkovimi spojinami v nižjih koncentracijah (1000 oz. 1500 $\mu g/g$ hrane). Med skupinama, hranjenima z obema oblikama ZnO v isti koncentraciji, razlik ni bilo (**Slika 22**). Oba rezultata sta pričakovana. Opaženo diskrepanco med BAF in UA_{Zn} lahko pripišemo statistično značilno nižji stopnji prehranjevanja pri skupinah, hranjenih z $ZnCl_2$ v konc. 2500 $\mu g/g$ hrane in mikrodenci ZnO v konc. 4000 $\mu g/g$ hrane, v primerjavi s skupinama, hranjenima z istima spojinama v nižjih koncentracijah (1000 oz. 1500 $\mu g/g$ hrane). BAF namreč upošteva le nominalno

izpostavitveno koncentracijo kovine v hrani, ne pa dejanske količine zaužite kovine. Ker so enakonožci hrane z višjo koncentracijo cinka požrli manj, so s tem zaužili manjšo količino cinka, kot bi jo ob nespremenjeni stopnji prehranjevanja. To se je to odrazilo v praktično enaki UA_{Zn} med vsemi tretiranimi skupinami.

Naša hipoteza je bila, da bodo poskusne živali asimilirale več cinka v primeru hranjenja z $ZnCl_2$ kot v primeru hranjenja z nanodelci ZnO , zaradi predvidene višje biodostopnosti (stopnje, do katere je kovina v viru na voljo za privzem in interakcijo z organizmom) prvega. V nasprotju z našimi pričakovanji so rezultati pokazali, da je bioakumulacija cinka v enakonožcih neodvisna od uporabljenih cinkovih spojin. To govori v prid hipotezi, da po daljšem stiku nano- in mikrodlecev ZnO z biološkimi tekočinami in tkivi pride do močnega odtapljanja cinkovih ionov s površine delcev, ki je tako veliko, da dostopna količina prostih cinkovih ionov dosega ali celo presega asimilacijsko kapaciteto enakonožcev za cink iz hrane. Pri tem imamo v mislih asimilacijsko kapaciteto po 14-dnevem obdobju izpostavitve, ki ni bila nujno enaka absolutnemu asimilacijskemu platoju (ki bi ga morali določiti posebej). Zato razlika v asimilaciji cinka iz cinkove soli v primerjavi z nano- in mikrodleci ZnO ni bila zaznavna.

Naši podatki o podobnosti bioasimilacije različnih oblik cinka so v skladu z rezultati študij biodostopnosti cinka iz nanodelcev ZnO (Pipan-Tkalec in sod., 2010; Croteau in sod., 2011) ter številnih toksikoloških študij, ki so preučevale strupenost nanodelcev ZnO (Franklin in sod., 2007; Heinlaan in sod., 2008; Aruoja in sod., 2009; Kasemets in sod., 2009; Ma in sod., 2009; Wiench in sod., 2009; Blinova in sod., 2010; Mortimer in sod., 2010; Wong in sod. 2010; Nations in sod., 2011a, 2011b).

5.1.2 Poskus z bakrom

5.1.2.1 Prehranjevalni parametri v odvisnosti od čiste in tretirane hrane

Dvotedensko hranjenje enakonožcev s tretirano hrano ni vplivalo na njihovo stopnjo prehranjevanja, niti s stališča primerjave tretiranih skupin s kontrolno niti s stališča primerjave tretiranih skupin med sabo (**Slika 23**). Tudi po 14 dneh hranjenja s čisto hrano, ki je sledilo, 14 dnem hranjenja s tretirano hrano, je ta situacija ostala nespremenjena (**Slika 24**). Ta rezultat je nepričakovan, saj je v nasprotju z izsledki študije Farkas in sod. (1996), kjer je 4 tedne trajajoče hranjenje s Cu že v konc. 500 mg/kg hrane (ekvivalentno 500 µg/g hrane) zmanjšalo stopnjo prehranjevanja enakonožcev, ter rezultati študije Zidarja in sod. (2003), kjer je do znižanja stopnje prehranjevanja prišlo po 14 dneh hranjenja s Cu v konc. 1200 µg/g hrane. V kasnejši študiji (Zidar in sod., 2004) je do zmanjšanja stopnje prehranjevanja prišlo tudi v primerih, ko so enakonožci imeli na izbiro čisto hrano ter hrano, tretirano s Cu v konc. 650–2300 µg/g hrane; ko so bili po 14 dneh izpostavitve najvišji koncentraciji Cu (2300 µg/g hrane) enakonožci preneseni na čisto hrano, pa je bila njihova stopnja prehranjevanja enaka kot v skupini, ki je bila s čisto hrano hranjena vseh 28 dni. Za to razhajanje nimamo razlage, vendar se naši rezultati ujemajo z rezultati večih predhodnih poskusov s hranjenjem enakonožcev z nanodelci Cu in Cu(NO₃)₂ (Miha Golobič in Sara Novak, neobjavljeni podatki).

V vseh tretiranih skupinah se je po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano učinkovitost asimilacije hrane v primerjavi s kontrolno skupino statistično značilno zvišala (**Slika 25**), stopnja iztrebljanja pa posledično statistično značilno znižala (**Slika 27**). Primerjave med tretiranimi skupinami za nobenega od teh parametrov niso pokazale statistično značilnih razlik. Ena od možnih razlag za ta pojav je, da je to posledica koprofagije, druga pa, da je hranjenje z visokimi koncentracijami Cu prizadelo proces prebave pri enakonožcih, pri čemer pa je bil ta pojav v celoti posledica količine kovine v hrani, in ne njene kemijske oblike. V prid temu govori tudi dejstvo, da se je tekom dvotedenske izpostavitve tretirani hrani povprečna masa živali v vseh skupinah znižala, kljub visoki učinkovitosti asimilacije hrane (**Priloge B1–B5**). Pri stopnji iztrebljanja je bila vidna tudi statistično značilno nižja vrednost v skupini, hranjeni z nanodelci Cu v konc. 5000 µg/g hrane, v primerjavi z nanodelci Cu v konc. 2000 µg/g hrane, kar kaže na odvisnost od odmerka. Po 14-dnevnem obdobju izločanja sta se tako učinkovitost asimilacije hrane (**Slika 26**) kot stopnja iztrebljanja (**Slika 28**) povrnila na raven vrednosti v kontrolni skupini, pa tudi primerjave med tretiranimi skupinami pri teh dveh parametrih niso zaznale statistično značilnih razlik. To pomeni, da je hranjenje s tretirano hrano potekalo dovolj kratek čas, da je bil proces reverzibilen in so si poskusne živali ob hranjenju z netretirano hrano opomogle.

5.1.2.2 Razporejanje bakra v telesnih delih enakonožcev in izločanje iz telesa

V vseh telesnih delih enakonožcev (hepatopankreasu, črevesu in preostanku telesa) je pri vseh tretiranih skupinah po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano prišlo do statistično značilnega povišanja koncentracije Cu glede na kontrolno skupino (**Slika 29**, **Slika 31**, **Slika 33**); izjema je bil le preostanek telesa pri skupini, hranjeni s $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ v konc. 2000 $\mu\text{g/g}$ hrane. Enak trend se je posledično odrazil tudi v koncentracijah, preračunanih na celotno telo (**Slika 35**). Pri tem je izračunana celokupna koncentracija Cu v vseh tretiranih skupinah znašala približno 700 $\mu\text{g/g}$ suhe mase telesa, kar je skoraj dvakrat več, kot navajajo Zidar in sod. (2003) za svoj dvotedenski poskus (tj. približno 400 $\mu\text{g/g}$ suhe mase telesa enakonožcev). Delno je razhajanje moč pripisati dejstvu, da je Zidar s sod. meril vsebnost bakra v celi živali, naši podatki za celo žival pa so seštevek vrednosti posameznih telesnih frakcij. Primerjave med tretiranimi skupinami za noben del telesa niti za celotno telo niso pokazale statistično značilnih razlik v vsebnosti bakra, kar kaže, da so imeli bakrovi ioni, ne glede na izvor (iz nanodelcev Cu ali $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$), povsem enako dinamiko razporejanja po telesu.

Pri preostanku telesa so statistično značilne razlike med tretiranimi skupinami v primerjavi s kontrolno po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano morda le artefakt, saj je koncentracija bakra v 14-dnevni kontrolni skupini bila statistično značilno nižja od koncentracije bakra v 14+14-dnevni kontrolni skupini, medtem ko so bile vrednosti v tretiranih skupinah med obema serijama primerljive (**Priloga A2**, **Tabela A2-s**). Pri tem je potrebno poudariti, da so vrednosti 14-dnevne kontrolne skupine 36. poskusa primerljive z vrednostmi 14-dnevne kontrolne skupine 33. poskusa, a nižje od vrednosti 28-dnevne kontrolne skupine 36. poskusa (**Priloga C16**, **Priloga C21**). Za ta pojav nimamo razlage.

Hopkin (1990b) poroča, da je vsebnost bakra v preostanku telesa enakonožcev vrste *P. scaber* iz nekontaminiranega habitata takoj po odvzemu iz narave znašala $70,0 \pm 2,6$ $\mu\text{g/g}$ suhe mase, po 20 tednih hranjenja z nekontaminirano hrano pa $51,9 \pm 2,1$ $\mu\text{g/g}$ suhe mase. V našem poskusu je mediana vsebnost bakra v preostanku telesa 14-dnevne kontrolne skupine znašala 61,8 $\mu\text{g/g}$ suhe mase, kar je primerljivo z omenjenimi izsledki, medtem ko je mediana vrednost 14+14-dnevne kontrolne skupine znašala 146,8 $\mu\text{g/g}$ suhe mase. Predvidevamo, da to ni posledica poškodbe hepatopankreasa pri sekciji 14+14-dnevne serije. V splošnem so bile prebavne žleze osebkov 14+14-dnevne serije brez posebnosti, v vsaki od skupin pa so le pri 2–3 osebkih v preostanku telesa ostali ostanki žlez (kar pri sekcijah sicer ni nič neobičajnega); največ, 4, so bili prisotni v skupini, hranjeni s $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ v konc. 5000 $\mu\text{g/g}$ hrane, ki je vsebovala celo statistično značilno manj bakra od

kontrolne skupine. Poleg tega se individualni podatki o poškodbi prebavnih žlez pri sekciji ne ujemajo s podatki o najvišjih koncentracijah bakra v preostanku telesa.

V predhodnem poskusu (št. 28) med kontrolno in tretiranimi skupinami po 14 dneh hranjenja s hrano, tretirano z istima bakrovima spojinama v istih koncentracijah, ni bilo razlik (Miha Golobič, neobjavljeni podatki). V skladu s prej omenjenimi argumenti to nakazuje, da se baker v preostanek telesa bodisi ne asimilira (in so naši rezultati artefakt) bodisi gre za neznane fiziološke mehanizme notranjega prerazporejanja bakra v telesu, ki so se odrazili v 28 dneh trajanja poskusa in iz katerih bi izhajala razlika med kontrolnima skupinama v 14-dnevni ter 14+14-dnevni seriji.

Po 14-dnevnem obdobju izločanja smo v predelu hepatopankreasa pri vseh tretiranih skupinah izmerili vsebnosti bakra, ki so se le malo razlikovale od živali, ki so bile žrtvovane po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano (**Slika 30, Slika 31**), pri čemer je skupina, hranjena z nanodelci Cu v konc. 2000 µg/g hrane, vsebovala značilno manj Cu od skupine, hranjene z isto obliko bakra v konc. 5000 µg/g hrane. Iz črevesa (**Slika 32**) se je pri vseh tretiranih skupinah baker, asimilirani v času hranjenja s tretirano hrano, med hranjenjem z netretirano hrano v celoti izločil.

Količina bakra, ki je po hranjenju z netretirano hrano ostala v hepatopankreasu, je bila tako visoka, da se je to odrazilo na izračunani celokupni telesni koncentraciji bakra, ki je bila prav tako pri vseh tretiranih skupinah statistično značilno višja od kontrolne (**Slika 36**). Iz primerjave medianih vrednosti bi lahko sklepali, da je tudi v hepatopankreasu v manjši meri prišlo do izločanja: po 14 dneh izpostavitve tretirani hrani je mediana koncentracija bakra znašala približno 8000–10.000 µg/g suhe mase telesa, po 14 dneh hranjenja s čisto hrano pa približno 6300–9000 µg/g suhe mase telesa, kar ustreza okoli 15% znižanju. Podobna stopnja znižanja je vidna pri mediani celokupni koncentraciji Cu v telesu, ki je po 14 dneh izpostavitve tretirani hrani znašala približno 600–800 µg/g suhe mase telesa, po 14 dneh hranjenja s čisto hrano pa približno 450–600 µg/g suhe mase telesa. Čeprav statistične primerjave vsebnosti bakra med 14-dnevno ter 14+14-dnevno serijo niti za hepatopankreas niti za preostanek telesa ne kažejo značilnih razlik (**Priloga A2, Tabela A2-r in Tabela A2-s**), so bile podobne celokupne koncentracije opažene tudi v študiji Zidarja in sod. (2004) pri enakonožcih, ki so bili po 14 dneh izpostavitve $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ v konc. 2300 µg/g hrane preneseni na čisto hrano za 14 dni, v primerjavi z enakonožci, ki so bili žrtvovani takoj po 14 dneh izpostavitve.

Če glede na rezultate našega poskusa primerjamo dinamiko razporejanja bakra v primerjavi z dinamiko razporejanja cinka po telesu enakonožcev, vidimo, da ima baker

večji potencial za zadrževanje v hepatopankreasu kot cink, medtem ko se iz ostalih delov telesa obe kovini v 14 dneh hranjenja s čisto hrano učinkovito izločita. Podatki iz literature navajajo, da je kritična koncentracija cinka v telesu za *P. scaber* približno 25 mg/g, medtem ko lahko tolerirajo tudi 30 mg/g bakra brez očitnih škodljivih učinkov (Hopkin, 1990b). Enakonožci imajo razvite učinkovite regulacijske mehanizme za cink (Donker in sod., 1996; Vijver in sod., 2006). Pri adaptiranih enakonožcih z okolice topilnic rud je stopnja ekskrecije cinka višja kot pri enakonožcih iz neonesnaženega okolja (Donker in sod., 1996). Nasprotno pa ima baker večji potencial za kopičenje v telesu *P. scaber*, kar se odraža v višjem koncentracijskem faktorju (Hopkin, 1990b).

5.1.2.3 Akumulacija bakra v telesu enakonožcev

V našem poskusu je mediana vrednost učinkovitosti asimilacije Cu (UA_{Cu}) znašala 3–7%, (**Slika 37**). Te vrednosti so nekoliko nižje od izsledkov študije Zidarja in sod. (2003), v kateri so *P. scaber* asimilirali največji delež Cu v obliki $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ pri izpostavitveni koncentraciji 300 $\mu g/g$ hrane, in sicer 19,9%, pri izpostavitveni koncentraciji 2400 $\mu g/g$ hrane pa so asimilirali 12,8% Cu.

Pri nanodelcih Cu je bila UA_{Cu} neodvisna od koncentracije, v primeru $Cu(NO_3)_2$ pa je bila statistično značilno višja pri koncentraciji 2000 $\mu g/g$ hrane. Slednji rezultat bi bil pričakovan, saj se pri nižjih koncentracijah kovin asimilacijska kapaciteta organizma zasiti počasneje kot pri višjih, zato je logično, da bi bila pri nižjih koncentracijah bakra UA_{Cu} višja kot pri nižjih. Vendar pa ta statistično značilna razlika ni zanesljiva, saj primerjava mase asimiliranega bakra (izračunane kot razlika med maso bakra v telesu posameznih osebkov iz tretiranih skupin in povprečno maso bakra kontrolne skupine) med tretiranimi skupinami ni pokazala nobenih razlik (**Priloga A2, Tabela A2-t**). Menimo, da je to posledica enake biodostopnosti bakra za modelne organizme, ne glede na vir, ki je zaradi visoke koncentracije zasičil njihovo asimilacijsko kapaciteto že v koncentraciji 2000 $\mu g/g$ hrane. Ker je bila stopnja prehranjevanja med vsemi tretiranimi skupinami primerljiva, ni vplivala na količino zaužite kovine in s tem na UA_{Cu} .

BAF je pokazal koncentracijsko odvisnost asimilacije bakra (**Slika 38**); diskrepanco med UA_{Cu} in BAF pripisujemo manjši natančnosti BAF, ki ne upošteva dejanske asimilacije zaužite kovine. Med skupinami, tretiranimi z različnima oblikama bakra v istih koncentracijah, niti UA_{Cu} niti BAF nista zaznala statistično značilnih razlik, torej so bili nanodelci Cu za enakonožce enako biodostopni kot bakrovi ioni. Tako kot v primeru nanodelcev ZnO se tudi v tem poskusu ni potrdila naša hipoteza, da bodo poskusne živali

asimilirale več bakra v obliki $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ kot v obliki nanodelcev Cu, zaradi predvidene višje biodostopnosti prvega. Tako kot v primeru nanodelcev ZnO tudi tu predvidevamo, da je vzrok za to odtapljanje bakrovih ionov z nanodelcev Cu, ki najmanj dosega ali celo presega asimilacijsko kapaciteto enakonožcev za baker iz hrane. To je v skladu z izsledki nekaterih toksikoloških študij, ki so preučevale toksičnost nanodelcev Cu *in vivo* ter *in vitro* (Chen in sod., 2006; Meng in sod., 2007a, 2007b; Midander in sod., 2009).

Zaenkrat izpusti nanodelcev v okolje verjetno še niso visoki, a z razmahom množične proizvodnje ter porabe izdelkov, ki jih vsebujejo, lahko pričakujemo, da se bodo povečevali. Skrb vzbuja tudi možnost tovarniških in drugih nesreč, kot je bil na primer izpust kovinskega prahu pri prekladanju tovora v Luki Koper v drugi polovici marca 2011, ki je vseboval železove okside, magnezij, aluminij, kobalt in nikelj. V primeru, da bi bili enakonožci v naravi izpostavljeni listnemu opadu ali prsti, onesnaženi z nanodelci ZnO ali nanodelci Cu, na podlagi rezultatov naše študije predpostavljamo, da bi prišlo vsaj do začasne asimilacije teh kovin iz hrane ter akumulacije v njihovih telesih – podobno kot na območjih, onesnaženih s kovinami zaradi delovanja topilnic rud (Hopkin, 1990b). Zaradi akumulacije kovin v telesu, predvsem bakra, to ustvarja potencial za prenos teh kovin po prehranjevalnih verigah (ne le v obliki nanodelcev, pač pa tudi v ionski ali biološko vezani obliki). Od fiziologije organizmov na višjih trofičnih nivojih je odvisno, ali to pomeni tudi potencial za biomagnifikacijo ali ne. Tako so pajki vrste *Dysdera crocata*, specializirani plenilci mokric, regulatorji kovin, ki v telesu vzdržujejo bolj ali manj konstantno koncentracijo, ne glede na vsebnost v hrani (Hopkin, 1990a). Po drugi strani lahko strige vrste *Lithobius variegatus* nekatere kovine, kot so cink, kadmij in baker (ne pa tudi svinec), skladiščijo v srednjem črevesu in subkutikularnih tkivih, zato se vsebnost kovin v njihovem telesu ob presežni koncentraciji v hrani (mokricah) lahko poveča (Hopkin in Martin, 1984).

5.2 SKLEPI

1. Izpostavljenost cinku je zmanjšala stopnjo prehranjevanja samo pri živalih, hranjenih z mikrodenci ZnO v konc. 4000 µg/g hrane in ZnCl₂ v konc. 2500 µg/g hrane, v ostalih tretiranih skupinah pa ne. Cink v nobeni od tretiranih skupin ni imel vpliva na stopnjo iztrebljanja enakonožcev, učinkovitost asimilacije hrane pa se je zvišala samo pri hranjenju z ZnCl₂ v konc. 2500 µg/g hrane. Prav tako ni bilo skoraj nobenih razlik med učinkom nanodelcev in ionov cinka. Izpostavljenost bakru ni zmanjšala stopnje prehranjevanja modelnih organizmov, niti v primeru hranjenja z nanodelci bakra niti v primeru hranjenja z bakrovimi ioni. Hranjenje z bakrom je zmanjšalo stopnjo iztrebljanja in povišalo učinkovitost asimilacije hrane v vseh tretiranih skupinah.
2. V poskusu s cinkom je po hranjenju s čisto hrano stopnja iztrebljanja ostala znižana v skupini, hranjeni z mikrodenci ZnO v konc. 4000 µg/g hrane, pri ostalih skupinah pa se je povrnila na raven kontrolne skupine. V poskusu z bakrom je po hranjenju z netretirano hrano stopnja prehranjevanja v vseh skupinah ostala nespremenjena glede na obdobje hranjenja s tretirano hrano, vrednosti tako stopnje iztrebljanja kot učinkovitosti asimilacije hrane pa sta se v vseh tretiranih skupinah povrnila na raven kontrolne skupine. Med učinkom nanodelcev in ionov bakra ni bilo razlik.
3. Pri hranjenju modelnih organizmov s cinkom in bakrom smo zaznali povišane koncentracije teh kovin v vseh tretiranih skupinah. Pri cinku je do povišanja prišlo le v predelu hepatopankreasa in črevesa. Enako velja za baker, medtem ko za preostanek telesa ne moremo z gotovostjo trditi, ali je do povišanja prišlo ali ne.
4. V splošnem je bila koncentracija obeh kovin v vseh telesnih delih neodvisna tako od koncentracije v hrani kot od kemijske oblike. Pri vsebnosti cinka v telesu modelnih organizmov je do razlik med tretiranimi skupinami večinoma prišlo na račun ZnCl₂ v konc. 2500 µg/g hrane, medtem ko pri vsebnosti bakra razlik med tretiranimi skupinami ni bilo.
5. Učinkovitosti asimilacije cinka in bakra večinoma nista bili koncentracijsko odvisni, razen med skupinama, hranjenima s Cu(NO₃)₂ v koncentracijah 2000 in 5000 µg/g hrane. Razlik glede na kemijsko obliko kovine (partikulatna kovina oziroma partikulatni kovinski oksid v primerjavi z ioni te kovine) ni bilo. Mediane vrednosti tega parametra so bile pri obeh kovinah v vseh koncentracijah nizke in niso presegle 6% za cink ter 7% za baker. Bioakumulacijski faktor je pri obeh

kovinah pokazal koncentracijsko odvisnost, ni pa zaznal razlike med kemijskimi oblikami v istih nominalnih koncentracijah pri nobeni izmed preučevanih kovin.

6. Po obdobju hranjenja s čisto hrano se je akumulirani cink učinkovito izločil iz vseh delov telesa v vseh tretiranih skupinah, z izjemo mikrodolcev ZnO v konc. 4000 µg/g hrane, kjer se je zadržal v hepatopankreasu in črevesu. Predvidevamo, da je k temu pripomogla njegova partikulatna oblika, zaradi katere se je ujel v tkivo in ga enakonožci niso mogli učinkovito izločiti. Akumulirani baker se je pri vseh tretiranih skupinah učinkovito izločil iz črevesa, medtem ko je v hepatopankreasu do manjšega znižanja koncentracije glede na obdobje hranjenja s tretirano hrano sicer prišlo, a to znižanje ni bilo statistično značilno. Za preostanek telesa zaključkov ne moremo podati. Med izločanjem nanodelcev in ionov bakra ni bilo razlik.

6. POVZETEK

V našem diplomskem delu nas je zanimalo, kolikšen potencial za kopičenje v telesu modelnih organizmov, kopenskih enakonožcev vrste *Porcellio scaber*, imajo nanodelci cinkovega oksida in nanodelci bakra. Zanimalo nas je, ali je ta potencial drugačen od potenciala cinkovih in bakrovih ionov, ali se s hrano zaužite kovine lahko po določenem času izločijo iz telesa ter kakšne so razlike med izločanjem teh kovin glede na kemijsko obliko kovine, iz katere izvirajo. Hkrati smo opazovali dinamiko prehranjevalnih parametrov v času hranjenja poskusnih organizmov s tretirano in čisto hrano.

Hranjenje s cinkovimi spojinami ni vplivalo na stopnjo prehranjevanja, stopnjo iztrebljanja in učinkovitost asimilacije hrane poskusnih organizmov, razen v najvišjih koncentracijah ter v mikro-partikulatni obliki. V času hranjenja s tretirano hrano se je zaužiti cink akumuliral v hepatopankreasu in črevesu enakonožcev, v času hranjenja z netretirano hrano pa učinkovito izločil, razen v skupini, hranjeni z mikrodenci ZnO v koncentraciji 4000 µg/g hrane. Predvidevamo, da je k temu pripomogla njegova partikulatna oblika, zaradi katere se je zadržal v tkivih. Bioakumulacijski faktor je bil koncentracijsko odvisen, učinkovitost asimilacije cinka pa ne. V splošnem med različnimi kemijskimi oblikami cinka ni bilo razlik; te so bile kvečjemu koncentracijsko odvisne, ne glede na vir.

Hranjenje z bakrom ni vplivalo na stopnjo prehranjevanja, zmanjšalo pa je stopnjo iztrebljanja in zvišalo učinkovitost asimilacije hrane modelnih organizmov. Slednji sta se po obdobju hranjenja s čisto hrano povrnili na raven kontrolne skupine. V času hranjenja s tretirano hrano se je zaužiti baker asimiliral v hepatopankreas in črevo, medtem ko se je v času hranjenja s čisto hrano učinkovito izločil le iz črevesa, v hepatopankreasu pa se je njegova koncentracija znižala le za približno 15%. Za preostanek telesa zaključkov ne moremo podati. Vzrok za to bi lahko bila drugačna fiziologija skladiščenja in izločanja bakra pri modelnih organizmih v primerjavi s cinkom. Bioakumulacijski faktor je bil koncentracijsko odvisen, učinkovitost asimilacije bakra pa ne. V splošnem med različnimi kemijskimi oblikami bakra ni bilo razlik, niti koncentracijsko odvisnih.

Rezultati naših poskusov so ovrgli večino naših hipotez, saj učinka ter akumulacije nanodelcev cinkovega oksida in nanodelcev bakra večinoma nismo mogli ločiti od učinkov ter akumulacije cinkovih oziroma bakrovih ionov. Naše izsledke v splošnem pojasnjujemo z vedno bolj uveljavljeno hipotezo o odtapljanju ionov s površine nanodelcev kovin in kovinskih oksidov v stiku z biološkimi mediji. Ti zaradi ne-nevtralnega pH ter prisotnosti bioloških makromolekul ustvarjajo okolje, ki lahko spodbudi reaktivnost nanodelcev, že samo po sebi povečano zaradi močnih površinskih učinkov na nanometrski velikostni skali.

7. VIRI

- Atomic Spectroscopy. A Guide to Selecting the Appropriate Technique and System (2008–2010). PerkinElmer, Inc., Waltham, Massachusetts, ZDA
http://las.perkinelmer.com/Content/RelatedMaterials/Brochures/BRO_WorldLeaderAAICPMSICPMS.pdf (5. 2. 2011)
- Ahmadi F., Kordestany A.H. 2011. Investigation on Silver Retention in Different Organs and Oxidative Stress Enzymes in Male Broiler Fed Diet Supplemented with Powder of Nano Silver. *American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences*, 3 (1): 28–35
- Ahmadi F., Rahimi F. 2011. The Effect of Different Levels of Nano Silver on Performance and Retention of Silver in Edible Tissues of Broilers. *World Applied Sciences Journal*, 12 (1): 1–4
- Aruoja V., Dubourgier H.-C., Kasemets, K., Kahru A. 2009. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokircneriella subcapitata*. *Science of the Total Environment* 107: 1461–1468
- Asharani P.V., Lian Wu Y., Gong Z., Valiyaveetil S. 2009. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology*, 19: 255102 (8pp)
- Asharani P.V., Lianwu Y., Gong Z., Valiyaveetil S. 2011. Comparison of the toxicity of silver, gold and platinum nanoparticles in developing zebrafish embryos. *Nanotoxicology*, 5 (1): 43–54
- Auffan M., Rose J., Wiesner M.R., Bottero J.Y. 2009. Chemical stability of metallic nanoparticles: a parameter controlling their potential cellular toxicity in vitro. *Environmental Pollution*, 157: 1127–1133
- Bacchetta R., Santo N., Fascio U., Moschini E., Freddi S., Chirico G., Camatini M., Mantecca P. 2011. Nano-sized CuO, TiO₂ and ZnO affect *Xenopus laevis* development. *Nanotoxicology*, Early Online, 1–18
- Bai W., Zhang Z., Tian W., He X., Ma Y., Zhao Y., Chai Z. 2010. Toxicity of zinc oxide nanoparticles to zebrafish embryo: a physiochemical study of toxicity mechanism. *Journal of Nanoparticle Research*, 12: 1645–1654
- Bar-Ilan O., Albrecht R.M., Fako V.E., Furgeson D.Y. 2009. Toxicity Assessments of Multisized Gold and Silver Nanoparticles in Zebrafish Embryos. *Small*, 5 (16): 1897–1910
- Bibič A., Drobne D., Štrus J., Byrne A.J. 1997. Assimilation of zinc by *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea) exposed to zinc. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 58: 814–821.
- Blinova I., Ivask A., Heinlaan M., Mortimer M., Kahru A. 2010. Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water. *Environmental Pollution*, 158: 41–47

- Borm P.J.A., Robbins D., Haubold S., Kuhlbusch T., Fissan H., Donaldson K., Schins R., Stone V., Kreyling W., Lademann J., Krutmann J., Warheit D., Oberdorster E. 2006. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Particle and Fibre Toxicology*, 11 (3)
- Bouldin J.L., Ingle T.M., Sengupta A., Alexander R., Hannigan R.E., Buchanan R.A. 2008. Aqueous toxicity and food chain transfer of quantum dots™ in freshwater algae and *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27 (9): 1958–1963
- Brečko D. 1992. Morfologija prebavila in akumulacija težkih kovin v prebavilu izopodov. Magistrska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Brunner T.J., Wick P., Manser P., Spohn P., Grass R.N., Limbach L.K., Bruinink A., Stark W.J. 2006. In Vitro Citotoxicity of Oxide Nanoparticles: Comparison to Asbestos, Silica, and the Effect of Particle Solubility. *Environmental Science and Technology* 40: 4374–4381
- Buffet P.-E., Fossi Tankoua O., Pan J.-F., Berhanu D., Herrenknecht C., Poirier L., Amiard-Triquet C., Amiard J.-C., Bérard J.-B., Risso C., Guibbolini M., Roméo M., Reip P., Valsami-Jones E., Mouneyrac C. 2011. Behavioural and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles. *Chemosphere*, 84, 166–174
- Buzea C., Pacheco Blandino I.I., Robbie K. 2007. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases* 4 (2): MR17–MR172
- Cai S., Xia X., Xie C. 2005. Research on Cu²⁺ transformations of Cu and its oxides particles with different sizes in the simulated uterine solution. *Corrosion Science*, 47: 1093–1047
- Chen Z., Meng H., Xing G., Chen C., Zhao Y., Jia G., Wang T., Yuan H., Ye C., Zhao F., Chai Z., Zhu C., Fang X., Ma B., Wan L. 2006. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. *Toxicology Letters* 163: 109–120
- Coleman J.G., Johnson D.R., Stanley J.K., Bednar A.J., Weiss jr. C.A., Boyd R.E., Steevens J.A. 2010. Assessing the fate and effects of nano aluminum oxide in the terrestrial earthworm, *Eisenia fetida*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29 (7): 1575–1580
- Cho W.-S., Duffin R., Poland C.A., Duschl A., Janneke Oostingh G., Macnee W., Bradley M., Megson I.L., Donaldson K. 2011. Differential pro-inflammatory effects of metal oxide nanoparticles and their soluble ions *in vitro* and *in vivo*; zinc and copper nanoparticles, but not their ions, recruit eosinophils to the lungs. *Nanotoxicology*, Early Online, 1–14
- Croteau M.-N., Dybowska A.D., Luoma S.N., Valsami-Jones E. 2011a. A novel approach reveals that zinc oxide nanoparticles are bioavailable and toxic after dietary exposures. *Nanotoxicology*, 5 (1): 79–90

- Croteau M.-N., Misra S.K., Luoma S.N., Valsami-Jones E. 2011b. Silver bioaccumulation dynamics in a freshwater invertebrate after aqueous and dietary exposures to nanosized and ionic Ag. *Environmental Science and Technology*, Just Accepted Manuscript, DOI: 10.1021/es200880c, Publication Date (Web): 13. 6. 2011
- Dallinger R., Wieser W. 1977. The Flow of Copper Through a Terrestrial Food Chain I. Copper and Nutrition in Isopods. *Oecologia*, 30: 253–264
- Donker M.H., Raedecker M.H., van Straalen N.M. 1996. The role of zinc regulation in the zinc tolerance mechanism of the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Journal of Applied Ecology*, 33: 955–964
- Drobne D., Hopkin S.P. 1994. The Toxicity of Zinc to Terrestrial Isopods in a »Standard« Laboratory Test. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 31: 1–6
- Drobne D., Hopkin S.P. 1995. Ecotoxicological laboratory test for assessing the effects of chemicals on terrestrial isopods. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 53: 390–397.
- Drobne D. 1995. Bacteria adherent to the hindgut of terrestrial isopods. *Acta microbiologica et immunologica hungarica*, 42(1): 45–52
- Drobne D. 1996. Strupenost cinka za kopenske izopode (Isopoda, Crustacea). Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Drobne D., Štrus J. 1996. Moulting frequency of the isopod *Porcellio scaber*, as a measure of zinc-contaminated food. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15 (2): 126–130
- Drobne D. 1997. Terrestrial Isopods—A Good Choice for Toxicity Testing of Pollutants in the Terrestrial Environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16: 1159–1164.
- Elzey S., Grassian V.H. 2010. Nanoparticle Dissolution from the Particle Perspective: Insights from Particle Sizing Measurements. *Langmuir* 26 (15): 12505–12508
- Farkas S., Hornung E., Fischer E. 1996. Toxicity of Copper to *Porcellio scaber* Latr. (Isopoda) Under Different Nutritional Status. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 57: 582–588
- Fent K., Weisbrod C.J., Wirth-Heller A., Pielkes U. 2010. Assessment of uptake and toxicity of fluorescent silica nanoparticles in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. *Aquatic Toxicology*, 100: 218–228
- Ferry J.L., Craig P., Hexel C., Sisco P., Frey R., Pennington P.L., Fulton M.H., Scott I.G., Decho A.W., Kashiwada S., Murphy C.J., Shaw T.J. 2009. Transfer of gold nanoparticles from the water column to the estuarine food web. *Nature Nanotechnology*, 4 (7): 441–444
- Franklin, N.M., Rogers, N.J., Apte, S.C., Batley, G.E., Gadd, G.E., Casey, P.S. 2007. Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl₂ to a freshwater

- microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): the importance of particle solubility. *Environmental Science and Technology*, 41: 8484–8490.
- "fullerene." *Encyclopædia Britannica. Encyclopædia Britannica Online*. Encyclopædia Britannica, 2011
<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/221916/fullerene> (14. 8. 2011)
- Gagnè, F., Auclair, J., Turcotte, P., Fournier, M., Gagnon, C., Sauvè, S., Blaise, C., 2008. Ecotoxicity of CdTe quantum dots to freshwater mussel: impacts on immune system, oxidative stress and genotoxicity. *Aquatic Toxicology*, 86: 333–340
- Galloway T., Lewis C., Dolciotti I., Johnston B.D., Moger J., Regoli F. Sublethal toxicity of nano-titanium dioxide and carbon nanotubes in a sediment dwelling marine polychaete. *Environmental Pollution*, 158: 1748–1755
- García-Alonso J., Khan F.R., Misra S.K., Turmaine M., Smith B.D., Rainbow P.S., Luoma S.N., Valsami-Jones E. 2011. Cellular Internalization of Silver Nanoparticles in Gut Epithelia of the Estuarine Polychaete *Nereis diversicolor*. *Environmental Science and Technology*, 45, 4630–4636
- Geffroy B., Ladhar C., Cambier S., Treguer-Delapierre M., Brethès D., Bourdineaud J.-P. 2011. Impact of dietary gold nanoparticles in zebrafish at very low contamination pressure: The role of size, concentration and exposure time. *Nanotoxicology*, Early Online, 1–17
- Gorth D.J., Rand D.M., Webster T.J. 2011. Silver nanoparticle toxicity in *Drosophila* - size does matter. *International Journal of Nanomedicine*, 6: 343–350
- Griffit R.J., Weil R., Hyndman K.A., Denslow N.D., Powers K., Taylor D., Barber D.S. 2007. Exposure to Copper Nanoparticles Causes Gill Injury and Acute Lethality in Zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science and Technology*, 41 (23): 8178–8186
- Griffit R.J., Luo J., Gao J., Bonzongo J.-C., Barber D.S. 2008. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27 (9): 1972–1978
- Griffit R.J., Hyndman K., Denslow N.D., Barber D.S. Comparison of Molecular and Histological Changes in Zebrafish Gills Exposed to Metallic Nanoparticles. *Toxicological Sciences*, 107 (2): 404–415
- Hames C.A.C., Hopkin S.P. 1989. The structure and function of the digestive system of terrestrial isopods. *Journal of Zoology* 217 (4): 599–627
- Handy R.D., Owen R., Valsami-Jones E. 2008. The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology*, 17: 315–325

- Heinlaan M., Ivask A., Blinova I., Dubourgier H.-C., Kahru A. 2008. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere*, 71: 1308–1316
- Holbrook R.D., Murphy K.E., Morrow J.B., Cole K.D. 2008. Trophic transfer of nanoparticles in a simplified invertebrate food web. *Nature Nanotechnology* 3: 352–355
- Hooper H.L., Jurkschat K., Morgan A.J., Bailey J., Lawlor A.J., Spurgeon D.J., Svendsen C. 2011. Comparative chronic toxicity of nanoparticulate and ionic zinc to the earthworm *Eisenia veneta* in a soil matrix. *Environment International*, 37: 1111–1117
- Hopkin S.P., Martin M.H. 1982. The distribution of zinc, cadmium, lead and copper within the hepatopancreas of a woodlouse. *Tissue and Cell* 14 (4): 703–715
- Hopkin S.P., Martin M.H. 1984. Assimilation of zinc, cadmium, lead and copper by the centipede *Lithobius variegatus* (Chilopoda). *Journal of Applied Ecology*, 21: 535–546
- Hopkin S.P. 1990a. Critical concentrations, pathways of detoxification and cellular ecotoxicology of metals in terrestrial arthropods. *Functional Ecology*, 4: 321–327
- Hopkin S.P. 1990b. Species-specific differences in the net assimilation of zinc, cadmium, lead, copper and iron by the terrestrial isopods *Oniscus asellus* and *Porcellio scaber*. *Journal of Applied Ecology*, 27: 460–474
- How much nano do we buy? ANEC & BEUC updated Inventory on products claiming to contain nanomaterials. European Consumers' Organisation (BEUC), European Consumer Voice in Standardisation (ANEC) (25. 10. 2010)
<http://docshare.beuc.org/Common/GetFile.asp?ID=30509&mfd=off&LogonName=GuestEN> (letak, 9. 2. 2011)
<http://docshare.beuc.org/Common/GetFile.asp?ID=30511&mfd=off&LogonName=GuestEN> (inventar, 9. 2. 2011)
- Hu C.W., Li M., Cui Y.B., Li D.S., Chen J., Yang L.Y. 2010. Toxicological effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles in soil on earthworm *Eisenia fetida*. *Soil Biology & Biochemistry*, 42: 586–591
- Ingle T.M., Alexander R., Bouldin J., Buchanan R.M. 2008. Absorption of Semiconductor Nanocrystals by the Aquatic Invertebrate *Ceriodaphnia dubia*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 81: 249–252
- Jackson B.P., Pace H.E., Lanzirotti A., Smith R., Ranville J.F. 2009. Synchrotron X-ray 2D and 3D elemental imaging of CdSe/ZnS quantum dot nanoparticles in *Daphnia magna*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 394: 911–917

- Johnston B.D., Scown T.M., Moger J., Cumberland S.A., Baalousha M., Linge K., van Aerle R., Jarvis K., Lead J.R., Tyler C.R. 2010. Bioavailability of Nanoscale Metal Oxides TiO₂, CeO₂, and ZnO to Fish. *Environmental Science and Technology*, 44: 1144–1151
- Judy J.D., Unrine J.M., Bertsch P.M. 2011. Evidence for Biomagnification of Gold Nanoparticles Within a Terrestrial Food Chain. *Environmental Science and Technology* 45: 776–781
- Kahru A., Dubourgier H.-C. 2010. From ecotoxicology to nanoecotoxicology. *Toxicology* 269: 105–119.
- Kasemets K., Ivask A., Dubourgier H.-C., Kahru A. 2009. Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO₂ to yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicology in Vitro* 23: 1116–1122
- Kashiwada S. 2006. Distribution of Nanoparticles in the See-through Medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Health Perspectives* 114 (11): 1697–1702
- King-Heiden T.C., Wiecinski P.N., Mangham A.N., Metz K.M., Nesbit D., Pedersen J.A., Hamers R.J., Heideman W., Peterson R.E. 2009. Quantum Dot Nanotoxicity Assessment Using the Zebrafish Embryo. *Environmental Science and Technology*, 43: 1605–1611
- 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
- Köhler H.-R., Hüttenrauch K., Berkus M., Gräff S., Alberti G. 1996. Cellular hepatopancreatic reactions in *Porcellio scaber* (Isopoda) as biomarkers for the evaluation of heavy metal toxicity in soils. *Applied Soil Ecology* 3: 1–15
- Laban G., Nies L.F., Turco R.F., Bickham J.W., Sepúlveda M.S. 2010. The effects of silver nanoparticles on fathead minnow (*Pimephales promelas*) embryos. *Ecotoxicology*, 19: 185–195
- Lapied E., Nahmani J.Y., Moudilou E., Chaurand P., Labille J., Rose J., Exbrajat J.-M., Oughton D.H., Joner E.J. 2011. Ecotoxicological effects of an aged TiO₂ nanocomposite measured as apoptosis in the anecic earthworm *Lumbriculus terrestris* after exposure through water, food and soil. *Environment International*, 37, 1105–1110
- Lasagna-Reeves C., Gonzalez-Romero D., Barria M.A., Olmedo I., Clos A., Sadagopa Ramanujam V.M., Urayama A., Vergara L., Kogan M.J., Soto C. 2010. Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393: 649–655

- Lee K.J., Nallathamby P.D., Browning L.M., Osgood C.J., Xu X.-H. N. 2007. In Vivo Imaging of Transport and Biocompatibility of Single Silver Nanoparticles in Early Development of Zebrafish Embryos. *ACS Nano*, 1 (2): 133–143
- Lewinski N.A., Zhu H., Jo H.-J., Pham D., Kamath R.R., Ouyang C.R., Vulpe C.R., Colvin V.L., Drezek R.A. 2010. Quantification of Water Solubilized CdSe-ZnS Quantum Dots in *Daphnia magna*. *Environmental Science and Technology*, 44: 1841–1846
- Li D., Fortner J.D., Johnson D.R., Chen C., Li Q., Alvarez P.J.J. 2010. Bioaccumulation of $^{14}\text{C}_{60}$ by the Earthworm *Eisenia fetida*. *Environmental Science and Technology*, 44: 9170–9175
- Li L.-Z., Zhou D.-M., Peijnenburg W.J.G.M., van Gestel C.A.M., Jin S.-Y., Wang Y.-J., Wang P. 2011. Toxicity of zinc oxide nanoparticles in the earthworm, *Eisenia fetida* and subcellular fractionation of Zn. *Environment International*, 37: 1098–1104
- Liu X., Vinson D., Abt D., Hurt R.H., Rand D.M. 2009. Differential Toxicity of Carbon Nanomaterials in *Drosophila* - Larval Dietary Uptake Is Benign, but Adult Exposure Causes Locomotor Impairment and Mortality. *Environmental Science and Technology*, 43: 6357–6363
- Lovern S.B., Owen H.A., Klaper R. 2008. Electron microscopy of gold nanoparticle intake in the gut of *Daphnia magna*. *Nanotoxicology*, 2 (1): 43–48
- Ma G., Wison González G. 1997. Flame Atomic Absorption Spectrometry. The Charles E. Via, Jr. Department of Civil and Environmental Engineering, VirginiaTech, Blacksburg, Virginia, ZDA (10. 9. 1997)
<http://www.cee.vt.edu/ewr/environmental/teach/smprimer/aa/aa.html> (4. 2. 2011)
- Ma H., Bertsch P.M., Glenn T.C., Kabengi N.J., Williams P.L. 2009. Toxicity of manufactured zinc oxide nanoparticles in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28: 1324–1330
- McWilliams A. 2010. Nanotechnology: A Realistic Market Assessment. BCC Research, Wellesley, Massachusetts, ZDA (2010)
<http://www.bccresearch.com/report/NAN031D.html> (9. 2. 2011)
- Mendonça E., Diniz M., Silva L., Peres I., Castro L., Brito Correia J., Picado A. 2011. Effects of diamond nanoparticle exposure on the internal structure and reproduction of *Daphnia magna*. *Journal of Hazardous Materials*, 186: 265–271
- Meng H., Chen Z., Xing G., Yuan H., Chen C., Zhao F., Zhang C., Wang Y., Zhao Y. 2007a. Ultrahigh reactivity provokes nanotoxicity: Explanation of oral toxicity of nano-copper particles. *Toxicology Letters* 175: 102–110
- Meng H., Chen Z., Xing G., Yuan H., Chen C., Zhao F., Zhang C., Wang Y., Zhao Y. 2007b. Ultrahigh reactivity and grave nanotoxicity of copper nanoparticles. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 272 (3): 595–598

- Meyer J.N., Lord C.A., Yang X.Y., Turner E.A., Badireddy A.R., Marinakos S.M., Chilkoti A., Wiesner M.R., Auffan M. Intracellular uptake and associated toxicity of silver nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*. *Aquatic Toxicology*, 100: 140–150
- Midander K., Odnevall Wallinder I., Leygraf C. 2007. In vitro studies of copper release from powder particles in synthetic biological media. *Environmental Pollution* 145: 51–59
- Midander K., Cronholm P., Karlsson H.L., Elihn K., Möller L., Leygraf C., Odnevall Wallinder I. 2009. Surface Characteristics, Copper Release, and Toxicity of Nano- and Micrometer-Sized Copper and Copper(II) Oxide Particles: A Cross-Disciplinary Study. *Small*, 5 (3): 389–399
- Morgalev Y.N., Khoch N.S., Morgaleva T.G., Gulik E.S., Borilo G.A., Bulatova U.A., Morgalev S.Y., Ponyavina E.V. 2010. Biotesting Nanomaterials: Transmissibility of Nanoparticles into a Food Chain. *Nanotechnologies in Russia*, 5: 851–856
- Mortimer M., Kasemets K., Kahru A. 2010. Toxicity of ZnO and CuO nanoparticles to ciliated protozoa *Tetrahymena thermophila*. *Toxicology*, 269: 182–189
- Mouchet F., Landois P., Sarremejean E., Bernard G., Puech P., Pinelli E., Flahaut E., Gauthier L. 2008. Characterisation and in vivo ecotoxicity evaluation of double-wall carbon nanotubes in larvae of the amphibian *Xenopus laevis*. *Aquatic Toxicology*, 87: 127–137
- Nations S., Long M., Wages M., Cañas J., Maul J.D., Theodorakis C., Cobb G. 2011a. Effects of ZnO nanomaterials on *Xenopus laevis* on growth and development. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74: 203–210
- Nations S., Wages M., Cañas J.E., Maul J., Theodorakis C., Cobb G.P. 2011b. Acute effects of Fe₂O₃, TiO₂, ZnO and CuO nanomaterials on *Xenopus laevis*. *Chemosphere*, 83: 1053–1061
- Nomenclature for the C₆₀-I_h and C₇₀-D_{5h(6)} Fullerenes. IUPAC Recommendations 2002, Fu-0 to Fu-3. International Union For Pure and Applied Chemistry, School of Biological & Chemical Sciences at Queen Mary, University of London, London, Velika Britanija (28. 12. 2010)
<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/fullerene/Fu01t03.html#p11> (14. 8. 2011)
- Oberdörster G., Oberdörster E., Oberdörster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives*, 113 (7): 823–839
- Petersen E.J., Huang Q., Weber Jr. W.J. 2008a. Bioaccumulation of Radio-Labeled Carbon Nanotubes by *Eisenia foetida*. *Environmental Science and Technology*, 42: 3090–3095

- Petersen E.J., Huang Q., Weber Jr. W.J. 2008b. Ecological Uptake and Depuration of Carbon Nanotubes by *Lumbriculus variegatus*. *Environmental Health Perspectives*, 116 (4): 496–500
- Petersen E.J., Pinto R.A., Mai D.J., Landrum P.F., Weber Jr. W.J. 2011. Influence of Polyethyleneimine Graftings of Multi-Walled Carbon Nanotubes on their Accumulation and Elimination by and Toxicity to *Daphnia magna*. *Environmental Science and Technology*, 45: 1133–1138
- Physical Properties of Zinc Oxide – CAS 1314-13-2. International Zinc Association, Bruselj, Belgija
<http://www.znoxide.org/properties.html> (29. 5. 2011)
- Pipan-Tkalec Ž., Drobne D., Jemec A., Romih T., Zidar P., Bele M. 2010. Zinc bioaccumulation in a terrestrial invertebrate fed a diet treated with particulate ZnO or ZnCl₂ solution. *Toxicology*, 269, 198–203.
- Poynton H.C., Lazorchak J.M., Impellitteri C.A., Smith M.E., Rogers K., Patra M., Hammer K.A., Allen H.J., Vulpe C.D. 2011. Differential Gene Expression in *Daphnia magna* Suggests Distinct Modes of Action and Bioavailability for ZnO Nanoparticles and Zn Ions. *Environmental Science and Technology*, 45: 762–768
- Rosenkranz P., Chaudhry Q., Stone V., Fernandes T.F. 2009. A comparison of nanoparticle and fine particle uptake by *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28 (10): 2142–2149
- Ruppert E.E., Fox R.S., Barnes R.D. 2004. *Invertebrate Zoology. A Functional Evolutionary Approach*. 7th edition. Belmont, ZDA, Brooks/Cole – Thomson Learning: 661–667
- Scown T.M., van Aerle R., Johnston B.D., Cumberland S., Lead J.R., Owen R., Tyler C.R. 2009. High Doses of Intravenously Administered Titanium Dioxide Nanoparticles Accumulate in the Kidneys of Rainbow Trout but with no Observable Impairment of Renal Function. *Toxicological Sciences*, 109 (2): 372–380
- Scown T.M., Santos E.M., Johnston B.D., Gaiser B., Baalousha M., Mitov S., Lead J.R., Stone V., Fernandes T.F., Jepson M., van Aerle R., Tyler C.R. 2010. Effects of Aqueous Exposure to Silver Nanoparticles of Different Sizes in Rainbow Trout. *Toxicological Sciences*, 115 (2): 521–534
- Snell T.W., Hicks D.G. 2009. Assessing Toxicity of Nanoparticles Using *Brachionus manjavacas* (Rotifera). *Environmental Toxicology*, 26: 146–152
- Song W., Zhang J., Guo J., Zhang J., Ding F., Li L., Sun Z. 2010. Role of the dissolved zinc ion and reactive oxygen species in cytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Toxicology Letters* 199: 389–397
- Studer A.M., Limbach L.K., Van Duc L., Krumeich F., Athanassiou E.K., Gerber L.C., Moch H., Stark W.J. 2010. Nanoparticle cytotoxicity depends on intracellular

- solubility: Comparison of stabilized copper metal and degradable copper oxide nanoparticles. *Toxicology Letters* 197: 169–174
- Szalay L. Atomic Absorption Spectrophotometry (AAS). Petrik Lajos Vocational School for Chemistry, Environmental Sciences and Information Technology, Budimpešta, Madžarska
<http://www.standardbase.hu/tech/FinalHUTechAAS.pdf> (4. 2. 2011)
- Tao X., Fortner J.D., Zhang B., He Y., Chen Y., Hughes J.B. 2009. Effect of aqueous stable fullerene nanocrystals (nC₆₀) on *Daphnia magna*: Evaluation of sub-lethal reproductive responses and accumulation. *Chemosphere*, 77: 1482–1487
- Tedesco S., Doyle H., Redmond G., Sheehan D. 2008. Gold nanoparticles and oxidative stress in *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research*, 66: 131–133
- Tedesco S., Doyle H., Blasco J., Redmond G., Sheehan D. 2010. Oxidative stress and toxicity of gold nanoparticles in *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*, 100: 178–186
- Tervonen K., Waissi G., Petersen E.J., Akkanen J., Kukkonen V.K. 2010. Analysis of fullerene-C₆₀ and kinetic measurements for its accumulation and depuration in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29 (5): 1072–1078
- Tissue B.M. 2000. Atomic-Absorption Spectroscopy (AA). Department Of Chemistry, VirginiaTech, Blacksburg, Virginia, ZDA
<http://www.files.chem.vt.edu/chem-ed/spec/atomic/aa.html> (4. 2. 2011)
- Toxicological Profile for Zinc (avgust 2005). U.S. Department Of Health And Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Atlanta, Georgia, ZDA
- Unrine J.M., Tsyusko O.V., Hunyadi S.E., Judy J.D., Bertsch P.M. 2010a. Effects of Particle Size on Chemical Speciation and Bioavailability of Copper to Earthworms (*Eisenia fetida*) Exposed to Copper Nanoparticles. *Journal of Environmental Quality* 39: 1942–1953
- Unrine J.M., Hunyadi S.E., Tsyusko O.V., Rao W., Shoults-Wilson W.A., Bertsch P.M. 2010b. Evidence for Bioavailability of Au Nanoparticles from Soil and Biodistribution within Earthworms (*Eisenia fetida*). *Environmental Science and Technology*, 44: 8308–8313
- Valant J. 2010. Interakcije med nanodelci in modelnim sistemom celica-tkivo-organ pri nevretenčarjih. Doktorska disertacija. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 30–32
- Vijver M.G., Vink J.P.M., Jager T., van Straalen N.M., Wolterbeek H.T., van Gestel C.A.M. 2006. Kinetics of Zn and Cd accumulation in the isopod *Porcellio scaber* exposed to contaminated soil and/or food. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 1554–1563
- Wang B., Feng W., Wang M., Wang T., Gu Y., Zhu M., Ouyang H., Shi J., Zhang F., Zhao Y., Chai Z., Wang H., Wang J. 2008. Acute toxicological impact of nano- and

- submicro-scaled zinc oxide powder on healthy adult mice. 2008. *Journal of Nanoparticle Research*, 10: 263–276
- Wang H., Wick R.L., Xing B. 2009. Toxicity of nanoparticulate and bulk ZnO, Al₂O₃ and TiO₂ to the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Pollution* 157: 1171–1177
- Werlin R., Priester J.H., Mielke R.E., Krämer S., Jackson S., Stoimenov P.K., Stucky G.D., Cherr G.N., Orias E., Holden P.A. 2011. Bioaccumulation of cadmium selenide quantum dots in a simple experimental microbial food chain. *Nature Nanotechnology*, 6: 65–71
- Wiench K., Wohlleben W., Hisgen V., Radke K., Salinas E., Zok S., Landsiedel R. 2009. Acute and chronic effects of nano- and non-nano-scale TiO₂ and ZnO particles on mobility and reproduction of the freshwater invertebrate *Daphnia magna*. *Chemosphere* 76: 1356–1365
- Wong S.W.Y., Leung P.T.Y., Djurišić A.B., Leung K.M.Y. 2010. Toxicities of nano zinc oxide to five marine organisms: influences of aggregate size and ion solubility. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396: 609–618
- Xia T., Kovochich M., Liong M., Mädler L., Gilbert B., Shi H., Yeh J.I., Zink J.I., Nel A.E. 2008. Comparison of the Mechanism of Toxicity of Zinc Oxide and Cerium Oxide Nanoparticles Based on Dissolution and Oxidative Stress Properties. *ACS Nano* 10 (2): 2121–2134
- Xia X., Xie C., Cai S., Yang Z., Yang X. 2006. Corrosion characteristics of copper microparticles and copper nanoparticles in distilled water. *Corrosion Science* 48: 3924–3932
- Xiong D., Fang T., Yu L., Sima X., Zhu W. 2011. Effects of nano-scale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: Acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. *Science of the Total Environment*, 409: 1444–1452
- Yamago S., Tokuyama H., Nakamura E., Kikuchi K., Kanaishi S., Sueki K., Nakahara H., Enomoto S., Ambe F. 1995. In vivo biological behavior of a water-miscible fullerene: ¹⁴C labeling, absorption, distribution, excretion and acute toxicity. *Chemistry and Biology*, 2: 385–389
- Yang Z., Xie C. 2006. Zn²⁺ release from zinc and zinc oxide particles in simulated uterine solution. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 47: 140–145
- Zhao C.-M., Wang W.-X. 2010. Biokinetic Uptake and Efflux of Silver Nanoparticles in *Daphnia magna*. *Environmental Science and Technology* 44: 7699–7704
- Zhao C.-M., Wang W.-X. 2011a. Comparison of acute and chronic toxicity of silver nanoparticles and silver nitrate to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30 (4): 885–892

- Zhao C.-M., Wang W.-X. 2011b. Importance of surface coatings and soluble silver in silver nanoparticles toxicity to *Daphnia magna*. *Nanotoxicology*, Early Online, 1–10
- Zhu X., Zhu L., Chen Y., Tian S. 2009a. Acute toxicities of six manufactured nanomaterial suspensions to *Daphnia magna*. *Journal of Nanoparticle Research*, 11: 67–75
- Zhu X., Wang J., Zhang X., Chang Y., Chen Y. 2009b. The impact of ZnO nanoparticle aggregates on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Nanotechnology*, 20: 195103 (9pp)
- Zhu X., Chang Y., Chen Y. 2010a. Toxicity and bioaccumulation of TiO₂ nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 78: 209–215
- Zhu X., Wang J., Zhang X., Chang Y., Chen Y. 2010b. Trophic transfer of TiO₂ nanoparticles from daphnia to zebrafish in a simplified freshwater food chain. *Chemosphere*, 79: 928–933
- Zidar P., Drobne D., Štrus J. 1998. Determination of Moulting Stages of *Porcellio scaber* for Routine Use. *Crustaceana* 71 (6): 646–654
- Zidar P., Drobne D., Štrus J., Blejec A. 2003. Intake and Assimilation of Zinc, Copper, and Cadmium in the Terrestrial Isopod *Porcellio Scaber* Latr. (Crustacea, Isopoda). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 70: 1028–1035
- Zidar P., Drobne D., Štrus J., Van Gestel C.A.M., Donker M. 2004. Food selection as a means of Cu intake reduction in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Crustacea, Isopoda). *Applied Soil Ecology*, 25: 257–265
- Zidar P., Božič J., Štrus J. 2005. Behavioral Response in the Terrestrial Isopod *Porcellio scaber* (Crustacea) Offered a Choice of Uncontaminated and Cadmium-Contaminated Food. *Ecotoxicology*, 14 (5): 493–502
- Zidar P., Van Gestel C.A.M., Štrus J. 2009. Single and joint effects of Zn and Cd on *Porcellio scaber* (Crustacea, Isopoda) exposed to artificially contaminated food. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 2075–2082
- Zimmer M. 2002. Nutrition in terrestrial isopods (Isopoda: Oniscidea): an evolutionary ecological approach. *Biology Reviews* 77: 455–493
- Zimmer M., Brune A. 2005. Physiological properties of the gut lumen of terrestrial isopods (Isopoda: Oniscidea): adaptive to digesting lignocellulose? *Journal of Comparative Physiology B*, 175 (4): 275–283
- Zuykov M., Pelletier E., Demers S. 2011. Colloidal complexed silver and silver nanoparticles in extrapallial fluid of *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research*, 71: 17–21
- Žnidaršič N., Štrus J., Drobne D. 2003. Ultrastructural alterations of hepatopancreas in *Porcellio scaber* under stress. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13: 161–174

ZAHVALA

V prvi vrsti gre zahvala moji mentorici, prof. dr. Damjani Drobne, ki me je vsa leta dela v njeni raziskovalni skupini budno spremljala, me usmerjala in mi pomagala z nasveti. Najlepša hvala za strokovno vodstvo, človeško toplino, veliko mero zaupanja in zmeraj odprta vrata Vašega kabineta. Omogočili ste mi vpogled v fascinantni svet nanodelcev in njihovo ekotoksikološko problematiko, kar je bila ena od neprecenljivih izkušenj mojega življenja. Zelo sem vesela, da sem imela možnost delati pod Vašim mentorstvom.

Doc. dr. Primožu Zidarju se zahvaljujem za strokovne nasvete pri laboratorijskem delu, še posebej v zvezi s pripravo vzorcev za FAAS, delovanjem analiznega aparata in njegovo programsko opremo. Hvala tudi za obsežno delo, ki ste ga opravili v vlogi recenzenta. Vaši nasveti in predlogi so bili nepogrešljivi.

Hvala vsem članom *BioNanoTeam* za podporo in prijetno vzdušje ob mojem delu. Hvala Sari, Živi in Mihi za pomoč pri izvedbi sekcij ter analiz s FAAS, za nasvete v zvezi z izvedbo poskusov in za oskrbo poskusnih živali med mojo občasno odsotnostjo. Hvala Janezu, Barbari, Tini, Tamari, Sabini in Blažu za prijetne klepete v laboratoriju. Hvala Meliti Korošec za tehnično pomoč pri izvedbi poskusa s cinkom.

Hvala tehničnima sodelavkama, ge. Jožici Murko-Bulić in ge. Mileni Kubelj, da sta mi bili vedno na voljo, ko sem ju potrebovala, ter za prijaznost, ki mi je polepšala še tako siv dan.

Hvala vsem zaposlenim na Katedri za zoologijo, da so me kot študentko lepo sprejeli medse. Še posebej hvala prof. dr. Jasni Štrus, da me je predstavila moji mentorici in mi s tem že zelo zgodaj omogočila prve nadebudne korake v svet znanstvenega dela. Delo v laboratoriju je pomembno obogatilo in osmislilo moj študij.

Hvala sosedom in sorodnikom, ki so me ne glede na moje nenavadne želje oskrbovali s poskusnim materialom tiste vrste, ki se najde v vsaki domači garaži. Še posebej hvala družini Lozej, ki mi je večkrat velikodušno dovolila nabirati mokrice v svojem kompostu.

Za konec hvala tudi študijskim kolegom, da so v več pogledih polepšali moja študijska leta. Hvala članom ŠSBF za poučne nove izkušnje ter vsem pedagoškim delavcem, s katerimi sem sodelovala, predvsem za vse ure formalnih in neformalnih pogovorov, ki so mi jih naklonili. Hvala Mojci in Sabini, da je v vseh teh letih naše prijateljstvo ostalo trdno. Hvala staršema, ki jima ne bom mogla nikoli povrniti časa, truda in skrbi, ki sta jih vložila vame. Hvala Jasni za sodelovanje in moralno podporo v zadnjih preddiplomskih dneh.

PRILOGA A1

Prisotnost in vrednosti statistično značilnih razlik pri parnih primerjavah tretiranih skupin v prehranjevalnem poskusu s cinkom (poskus št. 14), izračunanih z Mann-Whitneyjevim *U*-testom. Na prisotnost statistično značilnih razlik kažejo vrednosti, manjše od 0,05.

Tabela A1-a1. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah med različnimi oblikami cinka v isti koncentraciji za stopnjo prehranjevanja modelnih organizmov po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	ZnO 1500 nano	ZnO 1500 mikro	ZnO 4000 mikro	ZnCl ₂ 2500
ZnO 1500 mikro	- $p = 0,277$			
ZnCl ₂ 1000	- $p = 0,089$	- $p = 0,575$		
ZnO 4000 nano			- $p = 0,079$	- $p = 0,103$
ZnO 4000 mikro				- $p = 0,815$

Tabela A1-a2. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah med istimi oblikami cinka v različnih koncentracijah za stopnjo prehranjevanja modelnih organizmov po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	ZnO 1500 nano	ZnO 1500 mikro	ZnCl ₂ 1000
ZnO 4000 nano	- $p = 0,829$		
ZnO 4000 mikro		+ $p = 0,011$	
ZnCl ₂ 2500			+ $p = 0,003$

Tabela A1-b1. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah med različnimi oblikami cinka v isti koncentraciji za učinkovitost asimilacije hrane po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	ZnO 1500 nano	ZnO 1500 mikro	ZnO 4000 mikro	ZnCl ₂ 2500
ZnO 1500 mikro	- $p = 0,130$			
ZnCl ₂ 1000	- $p = 0,189$	- $p = 0,647$		
ZnO 4000 nano			- $p = 0,647$	+ $p = 0,001$
ZnO 4000 mikro				+ $p = 0,045$

Tabela A1-b2. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah med istimi oblikami cinka v različnih koncentracijah za učinkovitost asimilacije hrane po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	ZnO 1500 nano	ZnO 1500 mikro	ZnCl ₂ 1000
ZnO 4000 nano	- $p = 0,693$		
ZnO 4000 mikro		- $p = 0,288$	
ZnCl ₂ 2500			+ $p = 0,001$

Tabela A1-c1. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah med različnimi oblikami cinka v isti koncentraciji za stopnjo iztrebljanja modelnih organizmov po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	ZnO 1500 nano	ZnO 1500 mikro	ZnO 4000 mikro	ZnCl ₂ 2500
ZnO 1500 mikro	- $p = 0,138$			
ZnCl ₂ 1000	+ $p = 0,035$	- $p = 0,717$		
ZnO 4000 nano			- $p = 0,119$	+ $p = 0,002$
ZnO 4000 mikro				- $p = 0,542$

Tabela A1-c2. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah med istimi oblikami cinka v različnih koncentracijah za stopnjo iztrebljanja modelnih organizmov po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	ZnO 1500 nano	ZnO 1500 mikro	ZnCl ₂ 1000
ZnO 4000 nano	- $p = 0,406$		
ZnO 4000 mikro		+ $p = 0,034$	
ZnCl ₂ 2500			+ $p = 0,0002$

Tabela A1-d1. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah med različnimi oblikami cinka v isti koncentraciji za stopnjo iztrebljanja modelnih organizmov po 14 dneh hranjenja s čisto hrano, ki je sledilo 14 dnevno hranjenja s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	ZnO 1500 nano	ZnO 1500 mikro	ZnO 4000 mikro	ZnCl ₂ 2500
ZnO 1500 mikro	- $p = 0,104$			
ZnCl ₂ 1000	+ $p = 0,002$	- $p = 0,396$		
ZnO 4000 nano			- $p = 0,143$	- $p = 0,941$
ZnO 4000 mikro				- $p = 0,092$

Tabela A1-d2. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah med istimi oblikami cinka v različnih koncentracijah za stopnjo iztrebljanja modelnih organizmov po 14 dneh hranjenja s čisto hrano, ki je sledilo 14 dnevno hranjenja s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	ZnO 1500 nano	ZnO 1500 mikro	ZnCl ₂ 1000
ZnO 4000 nano	+ $p = 0,017$		
ZnO 4000 mikro		+ $p = 0,037$	
ZnCl ₂ 2500			- $p = 0,096$

Tabela A1-e1. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah med različnimi oblikami cinka v isti koncentraciji za vsebnost cinka v prebavnih žlezah po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	ZnO 1500 nano	ZnO 1500 mikro	ZnO 4000 mikro	ZnCl ₂ 2500
ZnO 1500 mikro	- $p = 0,337$			
ZnCl ₂ 1000	- $p = 0,751$	- $p = 0,051$		
ZnO 4000 nano			- $p = 0,734$	- $p = 0,559$
ZnO 4000 mikro				- $p = 0,635$

Tabela A1-e2. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah med istimi oblikami cinka v različnih koncentracijah za vsebnost cinka v prebavnih žlezah po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	ZnO 1500 nano	ZnO 1500 mikro	ZnCl ₂ 1000
ZnO 4000 nano	- $p = 0,689$		
ZnO 4000 mikro		- $p = 1$	
ZnCl ₂ 2500			+ $p = 0,019$

Tabela A1-f1. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah med različnimi oblikami cinka v isti koncentraciji za vsebnost cinka v prebavnih žlezah po 14 dneh hranjenja s čisto hrano, ki je sledilo 14 dnevno hranjenja s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	ZnO 1500 nano	ZnO 1500 mikro	ZnO 4000 mikro	ZnCl ₂ 2500
ZnO 1500 mikro	- $p = 0,487$			
ZnCl ₂ 1000	- $p = 0,268$	- $p = 0,445$		
ZnO 4000 nano			- $p = 0,128$	- $p = 1$
ZnO 4000 mikro				+ $p = 0,033$

Tabela A1-f2. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah med istimi oblikami cinka v različnih koncentracijah za vsebnost cinka v prebavnih žlezah po 14 dneh hranjenja s čisto hrano, ki je sledilo 14 dnevno hranjenja s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	ZnO 1500 nano	ZnO 1500 mikro	ZnCl ₂ 1000
ZnO 4000 nano	- $p = 0,596$		
ZnO 4000 mikro		- $p = 0,241$	
ZnCl ₂ 2500			- $p = 0,431$

Tabela A1-g1. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah med različnimi oblikami cinka v isti koncentraciji za vsebnost cinka v črevesu po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	ZnO 1500 nano	ZnO 1500 mikro	ZnO 4000 mikro	ZnCl ₂ 2500
ZnO 1500 mikro	- $p = 0,804$			
ZnCl ₂ 1000	- $p = 0,931$	- $p = 0,696$		
ZnO 4000 nano			- $p = 0,255$	+ $p = 0,023$
ZnO 4000 mikro				- $p = 1$

Tabela A1-g2. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah med istimi oblikami cinka v različnih koncentracijah za vsebnost cinka v črevesu po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	ZnO 1500 nano	ZnO 1500 mikro	ZnCl ₂ 1000
ZnO 4000 nano	- $p = 0,717$		
ZnO 4000 mikro		- $p = 0,444$	
ZnCl ₂ 2500			+ $p = 0,040$

Tabela A1-h1. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah med različnimi oblikami cinka v isti koncentraciji za vsebnost cinka v prebavnih žlezah po 14 dneh hranjenja s čisto hrano, ki je sledilo 14 dnevno hranjenja s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	ZnO 1500 nano	ZnO 1500 mikro	ZnO 4000 mikro	ZnCl ₂ 2500
ZnO 1500 mikro	- $p = 0,817$			
ZnCl ₂ 1000	- $p = 0,244$	- $p = 0,219$		
ZnO 4000 nano			+ $p = 0,012$	- $p = 0,081$
ZnO 4000 mikro				- $p = 0,093$

Tabela A1-h2. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah med istimi oblikami cinka v različnih koncentracijah za vsebnost cinka v prebavnih žlezah po 14 dneh hranjenja s čisto hrano, ki je sledilo 14 dnevno hranjenja s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	ZnO 1500 nano	ZnO 1500 mikro	ZnCl ₂ 1000
ZnO 4000 nano	- $p = 0,860$		
ZnO 4000 mikro		+ $p = 0,018$	
ZnCl ₂ 2500			- $p = 0,954$

Tabela A1-i1. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah med različnimi oblikami cinka v isti koncentraciji za vsebnost cinka v preostanku telesa po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	ZnO 1500 nano	ZnO 1500 mikro	ZnO 4000 mikro	ZnCl ₂ 2500
ZnO 1500 mikro	- $p = 0,647$			
ZnCl ₂ 1000	- $p = 0,079$	+ $p = 0,016$		
ZnO 4000 nano			- $p = 0,580$	- $p = 1$
ZnO 4000 mikro				- $p = 0,673$

Tabela A1-i2. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah med istimi oblikami cinka v različnih koncentracijah za vsebnost cinka v preostanku telesa po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	ZnO 1500 nano	ZnO 1500 mikro	ZnCl ₂ 1000
ZnO 4000 nano	- $p = 0,844$		
ZnO 4000 mikro		- $p = 1$	
ZnCl ₂ 2500			+ $p = 0,005$

Tabela A1-j1. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah med različnimi oblikami cinka v isti koncentraciji za vsebnost cinka v preostanku telesa po 14 dneh hranjenja s čisto hrano, ki je sledilo 14 dnevno hranjenja s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	ZnO 1500 nano	ZnO 1500 mikro	ZnO 4000 mikro	ZnCl ₂ 2500
ZnO 1500 mikro	- $p = 0,077$			
ZnCl ₂ 1000	- $p = 0,094$	+ $p = 0,025$		
ZnO 4000 nano			- $p = 0,173$	- $p = 0,137$
ZnO 4000 mikro				- $p = 0,948$

Tabela A1-j2. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah med istimi oblikami cinka v različnih koncentracijah za vsebnost cinka v preostanku telesa po 14 dneh hranjenja s čisto hrano, ki je sledilo 14 dnevom hranjenja s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	ZnO 1500 nano	ZnO 1500 mikro	ZnCl ₂ 1000
ZnO 4000 nano	- $p = 0,957$		
ZnO 4000 mikro		+ $p = 0,014$	
ZnCl ₂ 2500			- $p = 0,532$

Tabela A1-k1. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah med različnimi oblikami cinka v isti koncentraciji za celokupno vsebnost cinka v telesu po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	ZnO 1500 nano	ZnO 1500 mikro	ZnO 4000 mikro	ZnCl ₂ 2500
ZnO 1500 mikro	- $p = 0,836$			
ZnCl ₂ 1000	- $p = 0,053$	+ $p = 0,012$		
ZnO 4000 nano			- $p = 0,759$	- $p = 0,176$
ZnO 4000 mikro				- $p = 0,792$

Tabela A1-k2. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah med istimi oblikami cinka v različnih koncentracijah za celokupno vsebnost cinka v telesu po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	ZnO 1500 nano	ZnO 1500 mikro	ZnCl ₂ 1000
ZnO 4000 nano	- $p = 0,972$		
ZnO 4000 mikro		- $p = 1$	
ZnCl ₂ 2500			+ $p = 0,0005$

Tabela A1-l1. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah med različnimi oblikami cinka v isti koncentraciji za celokupno vsebnost cinka v telesu po 14 dneh hranjenja s čisto hrano, ki je sledilo 14 dnevom hranjenja s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	ZnO 1500 nano	ZnO 1500 mikro	ZnO 4000 mikro	ZnCl ₂ 2500
ZnO 1500 mikro	- $p = 0,589$			
ZnCl ₂ 1000	- $p = 0,894$	- $p = 0,713$		
ZnO 4000 nano			+ $p = 0,020$	- $p = 0,561$
ZnO 4000 mikro				- $p = 0,033$

Tabela A1-l2. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah med istimi oblikami cinka v različnih koncentracijah za celokupno vsebnost cinka v telesu po 14 dneh hranjenja s čisto hrano, ki je sledilo 14 dnevno hranjenja s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	ZnO 1500 nano	ZnO 1500 mikro	ZnCl ₂ 1000
ZnO 4000 nano	- $p = 0,596$		
ZnO 4000 mikro		+ $p = 0,04$	
ZnCl ₂ 2500			- $p = 1$

Tabela A1-m1. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah med različnimi oblikami cinka v isti koncentraciji za učinkovitost asimilacije cinka 14 dnevno hranjenja s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	ZnO 1500 nano	ZnO 1500 mikro	ZnO 4000 mikro	ZnCl ₂ 2500
ZnO 1500 mikro	- $p = 0,591$			
ZnCl ₂ 1000	- $p = 0,595$	- $p = 0,169$		
ZnO 4000 nano			- $p = 1$	- $p = 0,093$
ZnO 4000 mikro				- $p = 0,712$

Tabela A1-m2. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah med istimi oblikami cinka v različnih koncentracijah za učinkovitost asimilacije cinka po 14 dnevno hranjenja s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	ZnO 1500 nano	ZnO 1500 mikro	ZnCl ₂ 1000
ZnO 4000 nano	- $p = 0,427$		
ZnO 4000 mikro		- $p = 0,626$	
ZnCl ₂ 2500			- $p = 0,374$

Tabela A1-n1. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah med različnimi oblikami cinka v isti koncentraciji za bioakumulacijski faktor po 14 dnevno hranjenja s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	ZnO 1500 nano	ZnO 1500 mikro	ZnO 4000 mikro	ZnCl ₂ 2500
ZnO 1500 mikro	- $p = 0,836$			
ZnCl ₂ 1000	- $p = 0,479$	- $p = 0,563$		
ZnO 4000 nano			- $p = 0,759$	+ $p = 0,001$
ZnO 4000 mikro				- $p = 0,188$

Tabela A1-n2. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah med istimi oblikami cinka v različnih koncentracijah za bioakumulacijski faktor po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	ZnO 1500 nano	ZnO 1500 mikro	ZnCl ₂ 1000
ZnO 4000 nano	+ $p = 0,001$		
ZnO 4000 mikro		+ $p = 0,023$	
ZnCl ₂ 2500			+ $p = 0,001$

PRILOGA A2

Prisotnost in vrednosti statistično značilnih razlik pri parnih primerjavah tretiranih skupin v prehranjevalnih poskusih z bakrom (poskusa št. 33 in 36), izračunanih z Mann-Whitneyjevim *U*-testom. Na prisotnost statistično značilnih razlik kažejo vrednosti, manjše od 0,05.

Tabela A2-a. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah tretmajev za stopnjo prehranjevanja modelnih organizmov po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	Cu 2000 nano	Cu 5000 nano	Cu(NO ₃) ₂ 2000
Cu 5000 nano	- <i>p</i> = 0,392		
Cu(NO ₃) ₂ 2000	- <i>p</i> = 0,987		
Cu(NO ₃) ₂ 5000		- <i>p</i> = 0,864	- <i>p</i> = 0,379

Tabela A2-b. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah tretmajev za stopnjo prehranjevanja modelnih organizmov po 14 dneh hranjenja s čisto hrano, ki je sledilo 14-dnevnu hranjenju s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	Cu 2000 nano	Cu 5000 nano	Cu(NO ₃) ₂ 2000
Cu 5000 nano	- <i>p</i> = 0,164		
Cu(NO ₃) ₂ 2000	- <i>p</i> = 0,605		
Cu(NO ₃) ₂ 5000		- <i>p</i> = 0,276	- <i>p</i> = 0,510

Tabela A2-c. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah tretmajev za učinkovitost asimilacije hrane po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	Cu 2000 nano	Cu 5000 nano	Cu(NO ₃) ₂ 2000
Cu 5000 nano	- <i>p</i> = 0,188		
Cu(NO ₃) ₂ 2000	- <i>p</i> = 0,282		
Cu(NO ₃) ₂ 5000		- <i>p</i> = 0,286	- <i>p</i> = 0,152

Tabela A2-d. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah tretmajev za učinkovitost asimilacije hrane po 14 dneh hranjenja s čisto hrano, ki je sledilo 14-dnevnu hranjenju s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	Cu 2000 nano	Cu 5000 nano	Cu(NO ₃) ₂ 2000
Cu 5000 nano	- $p = 0,366$		
Cu(NO ₃) ₂ 2000	- $p = 0,368$		
Cu(NO ₃) ₂ 5000		- $p = 0,917$	- $p = 0,941$

Tabela A2-e. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah tretmajev za stopnjo iztrebljanja modelnih organizmov po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	Cu 2000 nano	Cu 5000 nano	Cu(NO ₃) ₂ 2000
Cu 5000 nano	+ $p = 0,044$		
Cu(NO ₃) ₂ 2000	- $p = 0,363$		
Cu(NO ₃) ₂ 5000		- $p = 0,093$	- $p = 0,125$

Tabela A2-f. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah tretmajev za stopnjo iztrebljanja modelnih organizmov po 14 dneh hranjenja s čisto hrano, ki je sledilo 14-dnevnu hranjenju s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	Cu 2000 nano	Cu 5000 nano	Cu(NO ₃) ₂ 2000
Cu 5000 nano	- $p = 0,164$		
Cu(NO ₃) ₂ 2000	- $p = 0,605$		
Cu(NO ₃) ₂ 5000		- $p = 0,276$	- $p = 0,510$

Tabela A2-g. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah tretmajev za vsebnost bakra v prebavnih žlezah po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	Cu 2000 nano	Cu 5000 nano	Cu(NO ₃) ₂ 2000
Cu 5000 nano	- $p = 0,510$		
Cu(NO ₃) ₂ 2000	- $p = 0,728$		
Cu(NO ₃) ₂ 5000		- $p = 0,273$	- $p = 0,986$

Tabela A2-h. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah tretmajev za vsebnost bakra v prebavnih žlezah po 14 dneh hranjenja s čisto hrano, ki je sledilo 14-dnevnu hranjenju s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	Cu 2000 nano	Cu 5000 nano	Cu(NO ₃) ₂ 2000
Cu 5000 nano	+ $p = 0,032$		
Cu(NO ₃) ₂ 2000	- $p = 0,201$		
Cu(NO ₃) ₂ 5000		- $p = 0,106$	- $p = 0,316$

Tabela A2-i. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah tretmajev za vsebnost bakra v črevesu po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	Cu 2000 nano	Cu 5000 nano	Cu(NO ₃) ₂ 2000
Cu 5000 nano	- $p = 0,247$		
Cu(NO ₃) ₂ 2000	- $p = 0,679$		
Cu(NO ₃) ₂ 5000		- $p = 0,736$	- $p = 0,214$

Tabela A2-j. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah tretmajev za vsebnost bakra v črevesu po 14 dneh hranjenja s čisto hrano, ki je sledilo 14-dnevnu hranjenju s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	Cu 2000 nano	Cu 5000 nano	Cu(NO ₃) ₂ 2000
Cu 5000 nano	- $p = 0,862$		
Cu(NO ₃) ₂ 2000	- $p = 0,683$		
Cu(NO ₃) ₂ 5000		- $p = 0,213$	- $p = 0,067$

Tabela A2-k. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah tretmajev za vsebnost bakra v preostanku telesa po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	Cu 2000 nano	Cu 5000 nano	Cu(NO ₃) ₂ 2000
Cu 5000 nano	- $p = 0,755$		
Cu(NO ₃) ₂ 2000	- $p = 0,655$		
Cu(NO ₃) ₂ 5000		- $p = 0,481$	- $p = 0,438$

Tabela A2-l. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah tretmajev za vsebnost bakra v preostanku telesa po 14 dneh hranjenja s čisto hrano, ki je sledilo 14-dnevnu hranjenju s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	Cu 2000 nano	Cu 5000 nano	Cu(NO ₃) ₂ 2000
Cu 5000 nano	- $p = 0,271$		
Cu(NO ₃) ₂ 2000	- $p = 0,892$		
Cu(NO ₃) ₂ 5000		- $p = 0,108$	- $p = 0,510$

Tabela A2-m. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah tretmajev za celokupno vsebnost bakra v telesu po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	Cu 2000 nano	Cu 5000 nano	Cu(NO ₃) ₂ 2000
Cu 5000 nano	- $p = 0,283$		
Cu(NO ₃) ₂ 2000	- $p = 0,987$		
Cu(NO ₃) ₂ 5000		- $p = 0,487$	- $p = 0,257$

Tabela A2-n. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah tretmajev za celokupno vsebnost bakra v telesu po 14 dneh hranjenja s čisto hrano, ki je sledilo 14-dnevnu hranjenju s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	Cu 2000 nano	Cu 5000 nano	Cu(NO ₃) ₂ 2000
Cu 5000 nano	+ $p = 0,037$		
Cu(NO ₃) ₂ 2000	- $p = 0,068$		
Cu(NO ₃) ₂ 5000		+ $p = 0,046$	- $p = 0,095$

Tabela A2-o. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah tretmajev za učinkovitost asimilacije bakra po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	Cu 2000 nano	Cu 5000 nano	Cu(NO ₃) ₂ 2000
Cu 5000 nano	- $p = 0,084$		
Cu(NO ₃) ₂ 2000	- $p = 0,651$		
Cu(NO ₃) ₂ 5000		- $p = 1$	+ $p = 0,005$

Tabela A2-p. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah tretmajev za bioakumulacijski faktor po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	Cu 2000 nano	Cu 5000 nano	Cu(NO ₃) ₂ 2000
Cu 5000 nano	+ $p = 0,0003$		
Cu(NO ₃) ₂ 2000	- $p = 0,987$		
Cu(NO ₃) ₂ 5000		- $p = 0,308$	+ $p = 0,0002$

Tabela A2-r. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah tretmajev za vsebnost bakra v prebavnih žlezah modelnih organizmov med 14-dnevno ter 14+14-dnevno serijo.

IZPOSTAVITEV	Kontrola 14d	Cu 2000 nano 14d	Cu 5000 nano 14d	Cu(NO ₃) ₂ 2000 14d	Cu(NO ₃) ₂ 5000 14d
Kontrola 14+14d	- $p = 0,236$				
Cu 2000 nano 14+14d		+ $p = 0,016$			
Cu 5000 nano 14+14d			- $p = 0,568$		
Cu(NO ₃) ₂ 2000 14+14d				- $p = 0,265$	
Cu(NO ₃) ₂ 5000 14+14d					- $p = 0,126$

Tabela A2-s Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah tretmajev za vsebnost bakra v preostanku telesa modelnih organizmov med 14-dnevno ter 14+14-dnevno serijo.

IZPOSTAVITEV	Kontrola 14d	Cu 2000 nano 14d	Cu 5000 nano 14d	Cu(NO ₃) ₂ 2000 14d	Cu(NO ₃) ₂ 5000 14d
Kontrola 14+14d	+ $p = 0,021$				
Cu 2000 nano 14+14d		- $p = 0,378$			
Cu 5000 nano 14+14d			- $p = 0,568$		
Cu(NO ₃) ₂ 2000 14+14d				- $p = 0,798$	
Cu(NO ₃) ₂ 5000 14+14d					+ $p = 0,00974$

Tabela A2-t. Rezultati statističnih testov pri parnih primerjavah tretmajev za maso asimiliranega bakra v telesu po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano.

IZPOSTAVITEV	Cu 2000 nano	Cu 5000 nano	Cu(NO ₃) ₂ 2000
Cu 5000 nano	- $p = 0,531$		
Cu(NO ₃) ₂ 2000	- $p = 0,678$		
Cu(NO ₃) ₂ 5000		- $p = 0,633$	- $p = 0,465$

PRILOGA B1: 14. poskus (Zn), prehranjevanje, 14-dnevna kontrolna skupina

Kontrola, 14 dni												
Poskusni osebek	Masa listov pred poskusom [mg]	Masa listov po poskusu [mg]	Razlika mase listov [mg]	Masa živali pred poskusom [mg]	Masa živali po poskusu [mg]	Razlika mase živali [mg]	Masa iztrebkov po 7 dneh [mg]	Masa iztrebkov po 14 dneh [mg]	Skupna masa iztrebkov [mg]	Stopnja preh. (SP)	Stopnja iztr. (SI)	Učinkovitost asimilacije hrane (UA) [%]
1	103,7	73,7	30,0	52,1	49,5	-2,6	9,10	10,10	19,20	0,59	0,38	36,0
2	109,5	76,1	33,4	45,8	45,1	-0,7	10,90	10,50	21,40	0,73	0,47	35,9
3	107,9	78,9	29,0	42,5	39,5	-3,0	5,50	8,20	13,70	0,71	0,33	52,8
4	90,7	76,3	14,4	32,9	32,4	-0,5	1,30	1,10	2,40	0,44	0,07	83,3
5 (poginil)												
6 (poginil)												
7	108,2	82,8	25,4	44,5	44,2	-0,3	11,70	4,00	15,70	0,57	0,35	38,2
8	109,4	88,1	21,3	44,4	42,2	-2,2	0,10	4,40	4,50	0,49	0,10	78,9
9	96,6	79,7	16,9	40,8	33,2	-7,6	3,30	3 iztr.	3,30	0,46	0,09	80,5
10	104,9	81,8	23,1	47,5	45,0	-2,5	3,10	4,60	7,70	0,50	0,17	66,7
11	105,6	85,2	20,4	57,7	54,6	-3,1	3,00	4,70	7,70	0,36	0,14	62,3
12	108,4	89,8	18,6	54,7	51,6	-3,1	1,90	2,80	4,70	0,35	0,09	74,7
mediana	106,8	80,8	22,2	45,2	44,6	-2,6	3,20	4,60	7,70	0,50	0,15	64,5
povprečje	104,5	81,2	23,3	46,3	43,7	-2,6	4,99	5,60	10,03	0,52	0,22	60,9
SE	2,0	1,7	1,9	2,3	2,3	0,7	1,31	1,09	2,19	0,04	0,05	6,02

PRILOGA B2: 14. poskus (Zn), prehranjevanje, skupina ZnO 1500 nano, 14 dni na tretirani hrani

ZnO 1500 nano, 14 dni na tretirani hrani												
Poskusni osebek	Masa listov pred poskusom [mg]	Masa listov po poskusu [mg]	Razlika mase listov [mg]	Masa živali pred poskusom [mg]	Masa živali po poskusu [mg]	Razlika mase živali [mg]	Masa iztrebkov po 7 dneh [mg]	Masa iztrebkov po 14 dneh [mg]	Skupna masa iztrebkov [mg]	Stopnja preh. (SP)	Stopnja iztr. (SI)	Učinkovitost asimilacije hrane (UA) [%]
1	97,6	83,5	14,1	56,5	55,9	-0,6	4,40	1,40	5,80	0,25	0,10	58,9
2	92,5	65,8	26,7	51,3	47,8	-3,5	2,40	11,50	13,90	0,54	0,28	47,9
3	86,9	55,9	31,0	39,7	39,5	-0,2	10,00	7,50	17,50	0,78	0,44	43,5
4	107,5	88,3	19,2	39,3	38,2	-1,1	3,40	2,70	6,10	0,50	0,16	68,2
5	86,7	74,5	12,2	54,3	52,5	-1,8	2,60	2,80	5,40	0,23	0,10	55,7
6	93,2	83,7	9,5	43,5	41,3	-2,2	2 iztr.	0,00	0,00	0,22	0,00	
7	90,8	79,1	11,7	30,0	27,9	-2,1	1,00	1,30	2,30	0,40	0,08	80,3
8	103,9	90,5	13,4	38,9	37,8	-1,1	0,10	2,40	2,50	0,35	0,07	81,3
9	103,2	89,3	13,9	42,1	42,3	0,2	0,80	1,60	2,40	0,33	0,06	82,7
10	102,5	71,7	30,8	48,6	48,6	0,0	3,70	13,20	16,90	0,63	0,35	45,1
11	103,4	69,0	34,4	57,2	55,8	-1,4	40,20	4,70	44,90	0,61	0,16	74,1
12	104,3	79,7	24,6	36,5	37,6	1,1	4,50	9,80	14,30	0,66	0,39	41,9
mediana	100,1	79,4	16,7	42,8	41,8	-1,1	3,40	2,75	5,95	0,45	0,13	58,9
povprečje	97,7	77,6	20,1	44,8	43,8	-1,1	6,65	4,91	12,00	0,46	0,18	61,8
SE	2,1	3,0	2,6	2,5	2,4	0,4	0,81	1,29	1,78	0,05	0,04	4,86

PRILOGA B3: 14. poskus (Zn), prehranjevanje, skupina ZnO 4000 nano, 14 dni na tretirani hrani

ZnO 4000 nano, 14 dni na tretirani hrani												
Poskusni osebek	Masa listov pred poskusom [mg]	Masa listov po poskusu [mg]	Razlika mase listov [mg]	Masa živali pred poskusom [mg]	Masa živali po poskusu [mg]	Razlika mase živali [mg]	Masa iztrebkov po 7 dneh [mg]	Masa iztrebkov po 14 dneh [mg]	Skupna masa iztrebkov [mg]	Stopnja preh. (SP)	Stopnja iztr. (SI)	Učinkovitost asimilacije hrane (UA) [%]
1	106,6	86,0	20,6	60,9	59,5	-1,4	0,30	7,30	7,60	0,34	0,13	63,1
2	108,9	79,4	29,5	55,9	57,3	1,4	0,50	13,20	13,70	0,52	0,24	53,6
3	107,3	87,4	19,9	52,7	47,9	-4,8	2,00	7,00	9,00	0,40	0,18	54,8
4	102,7	87,5	15,2	54,4	49,4	-5,0	2,60	2,00	4,60	0,29	0,09	69,7
5	104,4	81,3	23,1	51,7	51,3	-0,4	6,90	5,50	12,40	0,45	0,24	46,3
6	100,7	79,2	21,5	42,6	44,8	2,2	0,90	9,40	10,30	0,49	0,24	52,1
7	93,1	73,0	20,1	44,8	46,9	2,1	0,00	7,80	7,80	0,44	0,17	61,2
8 (poginil)												
9	109,6	93,8	15,8	37,9	38,1	0,2	1,70	1,70	3,40	0,42	0,09	78,5
10	102,4	70,4	32,0	49,4	49,9	0,5	3,60	10,60	14,20	0,64	0,29	55,6
11	108,3	86,8	21,5	43,0	40,8	-2,2	0,90	9,20	10,10	0,51	0,24	53,0
12	109,7	84,7	25,0	39,5	38,7	-0,8	3,00	8,90	11,90	0,64	0,30	52,4
mediana	106,6	84,7	21,5	49,4	47,9	-0,4	1,70	7,80	10,10	0,45	0,24	54,8
povprečje	104,9	82,7	22,2	48,4	47,7	-0,7	2,04	7,51	9,55	0,47	0,20	58,2
SE	1,5	2,1	1,5	2,2	2,1	0,7	0,60	1,04	1,06	0,03	0,02	2,79

PRILOGA B4: 14. poskus (Zn), prehranjevanje, skupina ZnO 1500 mikro, 14 dni na tretirani hrani

ZnO 1500 mikro, 14 dni na tretirani hrani												
Poskusni osebek	Masa listov pred poskusom [mg]	Masa listov po poskusu [mg]	Razlika mase listov [mg]	Masa živali pred poskusom [mg]	Masa živali po poskusu [mg]	Razlika mase živali [mg]	Masa iztrebkov po 7 dneh [mg]	Masa iztrebkov po 14 dneh [mg]	Skupna masa iztrebkov [mg]	Stopnja preh. (SP)	Stopnja iztr. (SI)	Učinkovitost asimilacije hrane (UA) [%]
1	99,7	84,4	15,3	29,5	29,2	-0,3	2 iztr.	3,20	3,20	0,52	0,11	79,1
2	93,2	60,9	32,3	48,6	51,8	3,2	1,50	17,60	19,10	0,64	0,38	40,9
3	100,4	72,9	27,5	36,3	37,0	0,7	5,50	9,10	14,60	0,75	0,40	46,9
4	103,8	87,2	16,6	35,2	34,6	-0,6	2,40	2,40	4,80	0,48	0,14	71,1
5	99,4	82,6	16,8	45,1	45,1	0,0	1,90	3,80	5,70	0,37	0,13	66,1
6 (poginil)												
7 (poginil)												
8	98,1	63,7	34,4	57,2	61,9	4,7	6,30	9,60	15,90	0,58	0,27	53,8
9	101,7	72,3	29,4	53,1	58,7	5,6	1,20	17,00	18,20	0,53	0,33	38,1
10	98,7	75,6	23,1	37,5	40,5	3,0	4,00	9,80	13,80	0,59	0,35	40,3
11	92,0	69,7	22,3	35,4	36,0	0,6	5,50	6,90	12,40	0,62	0,35	44,4
12	97,4	78,0	19,4	41,5	38,7	-2,8	2,60	8,00	10,60	0,48	0,26	45,4
mediana	99,1	74,3	22,7	39,5	39,6	0,7	2,60	8,55	13,10	0,55	0,30	46,1
povprečje	98,4	74,7	23,7	41,9	43,4	1,4	3,43	8,74	11,83	0,56	0,27	52,6
SD	1,1	2,7	2,2	2,8	3,4	0,8	0,64	1,66	1,78	0,03	0,03	4,57

PRILOGA B5: 14. poskus (Zn), prehranjevanje, skupina ZnO 4000 mikro, 14 dni na tretirani hrani

ZnO 4000 mikro, 14 dni na tretirani hrani												
Poskusni osebek	Masa listov pred poskusom [mg]	Masa listov po poskusu [mg]	Razlika mase listov [mg]	Masa živali pred poskusom [mg]	Masa živali po poskusu [mg]	Razlika mase živali [mg]	Masa iztrebkov po 7 dneh [mg]	Masa iztrebkov po 14 dneh [mg]	Skupna masa iztrebkov [mg]	Stopnja preh. (SP)	Stopnja iztr. (SI)	Učinkovitost asimilacije hrane (UA) [%]
1	98,6	77,2	21,4	58	55,4	-2,6	2,40	6,60	9,00	0,38	0,16	57,9
2 (poginil)												
3 (poginil)												
4 (poginil)												
5 (poginil)												
6	107,1	84,7	22,4	44,9	45,9	1,0	5,50	5,70	11,20	0,49	0,25	50,0
7	103,1	84,7	18,4	47,5	45,5	-2,0	1,30	4,20	5,50	0,40	0,12	70,1
8 (poginil)												
9	105,1	96,9	8,2	34,5	32,6	-1,9	0,00	1 iztr.	0,00	0,24	0,00	
10 (poginil)												
11	102,2	81,4	20,8	51,2	50,3	-0,9	2,70	5,10	7,80	0,41	0,15	62,5
12	102,0	89,4	12,6	41,8	44,9	3,1	0,00	0,00	0,00	0,29	0,00	
mediana	102,7	84,7	19,6	46,2	45,7	-1,4	1,85	5,10	6,65	0,39	0,14	60,2
povprečje	103,0	85,7	17,3	46,3	45,8	-0,6	1,98	4,32	5,58	0,37	0,11	60,1
SE	1,2	2,8	2,3	3,3	3,1	0,9	0,84	1,15	1,92	0,04	0,04	4,21

PRILOGA B6: 14. poskus (Zn), prehranjevanje, skupina, ZnCl₂ 1000, 14 dni na tretirani hrani

ZnCl₂ 1000, 14 dni na tretirani hrani												
Poskusni osebek	Masa listov pred poskusom [mg]	Masa listov po poskusu [mg]	Razlika mase listov [mg]	Masa živali pred poskusom [mg]	Masa živali po poskusu [mg]	Razlika mase živali [mg]	Masa iztrebkov po 7 dneh [mg]	Masa iztrebkov po 14 dneh [mg]	Skupna masa iztrebkov [mg]	Stopnja preh. (SP)	Stopnja iztr. (SI)	Učinkovitost asimilacije hrane (UA) [%]
1	98,8	66,6	32,2	35,5	35,3	-0,2	10,20	11,20	21,40	0,91	0,60	33,5
2	98,3	75,6	22,7	39,0	39,2	0,2	3 iztr.	6,50	6,50	0,58	0,17	71,4
3	99,3	62,5	36,8	64,9	64,0	-0,9	25,40	12,50	37,90	0,57	0,59	
4	104,9	77,5	27,4	41,1	41,0	-0,1	6,30	7,80	14,10	0,67	0,34	48,5
5	104,9	90,0	14,9	47,5	50,6	3,1	1,40	2,80	4,20	0,30	0,09	71,8
6	107,4	90,4	17,0	32,5	33,5	1,0	2,20	3,90	6,10	0,52	0,18	64,1
7	107,2	78,9	28,3	41,1	45,4	4,3	4,30	10,70	15,00	0,65	0,35	47,0
8	96,3	75,1	21,2	50,0	47,7	-2,3	3,00	7,30	10,30	0,43	0,21	51,4
9	93,9	71,4	22,5	53,2	50,9	-2,3	4,70	5,50	10,20	0,43	0,20	54,7
10	106,5	76,3	30,2	36,6	39,7	3,1	2,00	15,30	17,30	0,79	0,45	42,7
11	85,9	61,8	24,1	42,5	40,8	-1,7	5,00	5,90	10,90	0,58	0,26	54,8
12	101,4	74,2	27,2	39,2	41,7	2,5	6,90	9,20	16,10	0,67	0,40	40,8
mediana	100,4	75,4	25,7	41,1	41,4	0,1	4,70	7,55	12,50	0,58	0,30	51,4
povprečje	100,4	75,0	25,4	43,6	44,2	0,6	6,49	8,22	14,17	0,59	0,32	52,8
SE	1,8	2,6	1,8	2,6	2,4	0,6	2,04	1,06	2,60	0,05	0,05	3,71

PRILOGA B7: 14. poskus (Zn), prehranjevanje, skupina ZnCl₂ 2500, 14 dni na tretirani hrani

ZnCl₂ 2500, 14 dni na tretirani hrani												
Poskusni osebek	Masa listov pred poskusom [mg]	Masa listov po poskusu [mg]	Razlika mase listov [mg]	Masa živali pred poskusom [mg]	Masa živali po poskusu [mg]	Razlika mase živali [mg]	Masa iztrebkov po 7 dneh [mg]	Masa iztrebkov po 14 dneh [mg]	Skupna masa iztrebkov [mg]	Stopnja preh. (SP)	Stopnja iztr. (SI)	Učinkovitost asimilacije hrane (UA) [%]
1	100,1	86,2	13,9	32,9	34,5	1,6	1,40	1,40	2,80	0,41	0,08	79,9
2	105,1	92,3	12,8	44,8	45,1	0,3	1,30	1,30	2,60	0,28	0,06	79,7
3	97,5	86,3	11,2	39,4	38,7	-0,7	1,10	0,00	1,10	0,29	0,03	90,2
4	99,5	83,0	16,5	32,0	34,4	2,4	1,40	3,70	5,10	0,50	0,15	69,1
5	101,3	84,6	16,7	35,5	35,5	0,0	0,80	3,80	4,60	0,47	0,13	72,5
6	107,1	88,0	19,1	49,6	51,7	2,1	2,10	5,30	7,40	0,38	0,15	61,3
7	96,0	77,7	18,3	43,8	43,9	0,1	1,60	3,90	5,50	0,42	0,13	69,9
8	97,5	85,6	11,9	32,4	32,6	0,2	0,90	1,80	2,70	0,37	0,08	77,3
9	105,1	87,5	17,6	35,9	39,2	3,3	3,60	1,60	5,20	0,47	0,14	70,5
10	93,8	79,4	14,4	63,9	63,2	-0,7	2,50	3,80	6,30	0,23	0,10	56,3
11	105,5	85,2	20,3	34,7	34,9	0,2	1,30	0,00	1,30	0,58	0,04	93,6
12	92,5	81,4	11,1	42,9	41,3	-1,6	1,10	0,90	2,00	0,26	0,05	82,0
mediana	99,8	85,4	15,5	37,7	39,0	0,2	1,35	1,70	3,70	0,39	0,09	74,9
povprečje	100,1	84,8	15,3	40,7	41,3	0,6	1,59	2,29	3,88	0,39	0,09	75,2
SE	1,4	1,1	0,9	2,7	2,6	0,4	0,23	0,50	0,60	0,03	0,01	3,14

PRILOGA B8: 14. poskus (Zn), prehranjevanje, 28-dnevna kontrolna skupina

Kontrola, 28 dni																	
Poskusni osebek	<i>m</i> tret. listov pred p. [mg]	<i>m</i> tret. listov po p. [mg]	Δm tret. listov [mg]	<i>m</i> živali pred p. [mg]	<i>m</i> živali po p. [mg]	Δm živali [mg]	<i>m</i> iztr. po 7 dneh [mg]	<i>m</i> iztr. po 14 dneh [mg]	Skupna <i>m</i> iztr. na tret. hrani [mg]	<i>m</i> iztr. po 21 dneh [mg]	<i>m</i> iztr. po 28 dneh [mg]	Skupna <i>m</i> iztr. na čisti hrani [mg]	SP med 14d na tret. hrani	SI med 14d na tret. hrani	SI med 14d na čisti hrani	Skupna SI (14d na tret. + 14d na čisti hrani)	UA [%] med 14d na tret. hrani
1	88,8	66,8	22,0	32,8	34,4	1,6	8,80	2,30	11,10	0,30	6,30	6,60	0,65	0,33	0,19	0,52	49,5
2	84,7	68,6	16,1	37,4	34,3	-3,1	1,00	4,80	5,80	3,60	2,00	5,60	0,45	0,16	0,06	0,22	64,0
3	99,9	68,5	31,4	34,1	32,4	-1,7	11,30	6,70	18,00	3,30	13,00	16,30	0,94	0,54	0,39	0,93	42,7
4	94,1	72,4	21,7	55,2	52,1	-3,1	12,70	5,20	17,90	2,10	4,60	6,70	0,40	0,33	0,09	0,42	17,5
5 (poginil)																	
6	98,1	74,8	23,3	50,9	50,1	-0,8	1,30	6,90	8,20	6,80	9,70	16,50	0,46	0,16	0,19	0,35	64,8
7	89,1	58,5	30,6	48,2	45,3	-2,9	12,20	9,20	21,40	12,20	13,30	25,50	0,65	0,46	0,28	0,74	30,1
8	94,2	69,9	24,3	49,4	41,3	-8,1	6,70	1 iztr.	6,70	1,30	7,40	8,70	0,54	0,15	0,16	0,31	72,4
9	112,0	82,5	29,5	45,3	47,2	1,9	9,40	20,30	29,70	29,70	11,80	41,50	0,64	0,64	0,26	0,90	
10	85,1	72,7	12,4	29,7	29,1	-0,6	2 iztr.	5,60	5,60	4,90	1,80	6,70	0,42	0,19	0,06	0,25	54,8
11	101,2	73,8	27,4	61,8	67,5	5,7	1,60	18,80	20,40	18,80	11,30	30,10	0,42	0,32	0,17	0,49	25,5
12	103,1	85,3	17,8	54,0	50,9	-3,1	0,80	3,60	4,40	3,00	3,10	6,10	0,34	0,08	0,06	0,14	75,3
mediana	94,2	72,4	23,3	48,2	45,3	-1,7	7,75	6,15	11,10	3,60	7,40	8,70	0,46	0,32	0,17	0,42	52,2
povprečje	95,5	72,2	23,3	45,3	44,1	-1,3	6,58	8,34	13,56	7,82	7,66	15,48	0,54	0,31	0,17	0,48	49,7
SE	2,5	2,2	1,9	3,1	3,4	1,1	1,57	1,96	2,52	2,73	1,33	3,64	0,05	0,05	0,03	0,08	6,4

Oznake in kratice:

m – masa

Δm – razlika mase

tret. – tretiranih

p. – poskus

iztr. – iztrebki

14d – 14 dni

SP – stopnja prehranjevanja

SI – stopnja iztrebljanja

UA – učinkovitost asimilacije hrane

PRILOGA B9: 14. poskus (Zn), prehranjevanje, skupina ZnO 1500 nano, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani

ZnO 1500 nano, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani																	
Poskusni osebek	<i>m</i> tret. listov pred p. [mg]	<i>m</i> tret. listov po p. [mg]	Δm tret. listov [mg]	<i>m</i> živali pred p. [mg]	<i>m</i> živali po p. [mg]	Δm živali [mg]	<i>m</i> iztr. po 7 dneh [mg]	<i>m</i> iztr. po 14 dneh [mg]	Skupna <i>m</i> iztr. na tret. hrani [mg]	<i>m</i> iztr. po 21 dneh [mg]	<i>m</i> iztr. po 28 dneh [mg]	Skupna <i>m</i> iztr. na čisti hrani [mg]	SP med 14d na tret. hrani	SI med 14d na tret. hrani	SI med 14d na čisti hrani	Skupna SI (14d na tret. + 14d na čisti hrani)	UA [%] med 14d na tret. hrani
1	99,0	72,5	26,5	36,4	38,5	2,1	2,80	3,80	6,60	11,40	12,10	23,50	0,71	0,18	0,32	0,50	75,1
2	104,0	82,5	21,5	33,0	32,2	-0,8	4,40	5,40	9,80	4,30	6,60	10,90	0,66	0,30	0,20	0,50	54,4
3	94,1	54,7	39,4	54,6	54,5	-0,1	21,10	14,80	35,90	3,50	17,10	20,60	0,72	0,66	0,31	0,97	8,9
4	109,7	91,5	18,2	30,8	30,0	-0,8	4,80	3,60	8,40	5,50	4,90	10,40	0,60	0,28	0,16	0,44	53,8
5	95,8	81,6	14,2	35,1	33,3	-1,8	2,90	1,80	4,70	0,70	2,80	3,50	0,42	0,14	0,08	0,22	66,9
6	153,3	79,4	73,9	38,9	39,1	0,2	3,40	5,60	9,00	8,00	7,70	15,70	1,89	0,23	0,20	0,43	87,8
7	96,4	70,0	26,4	43,7	40,9	-2,8	8,20	7,90	16,10	7,80	8,50	16,30	0,62	0,38	0,20	0,58	39,0
8	97,7	62,6	35,1	43,0	41,5	-1,5	21,30	7,40	28,70	6,60	12,20	18,80	0,83	0,68	0,29	0,97	18,2
9 (poginil)																	
10	96,6	63,3	33,3	29,7	32,7	3,0	14,20	1,80	16,00	4,30	9,80	14,10	1,07	0,51	0,31	0,83	52,0
11	105,7	76,7	29,0	32,7	32,9	0,2	6,00	5,30	11,30	4,50	12,10	16,60	0,88	0,34	0,37	0,71	61,0
12 (poginil)																	
mediana	98,4	74,6	27,8	35,8	35,9	-0,4	5,40	5,35	10,55	5,00	9,15	16,00	0,71	0,32	0,25	0,54	54,1
povprečje	105,2	73,5	31,8	37,8	37,6	-0,2	8,91	5,74	14,65	5,66	9,38	15,04	0,84	0,37	0,25	0,61	51,7
SE	5,6	3,5	5,3	2,4	2,3	0,6	2,31	1,20	3,20	0,93	1,32	1,81	0,13	0,06	0,03	0,08	7,7

Oznake in kratice:

m – masa

Δm – razlika mase

tret. – tretiranih

p. – poskus

iztr. – iztrebki

14d – 14 dni

SP – stopnja prehranjevanja

SI – stopnja iztrebljanja

UA – učinkovitost asimilacije hrane

PRILOGA B10: 14. poskus (Zn), prehranjevanje, skupina ZnO 4000 nano, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani

ZnO 4000 nano, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani																	
Poskusni osebek	<i>m</i> tret. listov pred p. [mg]	<i>m</i> tret. listov po p. [mg]	Δm tret. listov [mg]	<i>m</i> živali pred p. [mg]	<i>m</i> živali po p. [mg]	Δm živali [mg]	<i>m</i> iztr. po 7 dneh [mg]	<i>m</i> iztr. po 14 dneh [mg]	Skupna <i>m</i> iztr. na tret. hrani [mg]	<i>m</i> iztr. po 21 dneh [mg]	<i>m</i> iztr. po 28 dneh [mg]	Skupna <i>m</i> iztr. na čisti hrani [mg]	SP med 14d na tret. hrani	SI med 14d na tret. hrani	SI med 14d na čisti hrani	Skupna SI (14d na tret. + 14d na čisti hrani)	UA [%] med 14d na tret. hrani
1 (poginil)																	
2 (poginil)																	
3 (poginil)																	
4 (poginil)																	
5 (poginil)																	
6 (poginil)																	
7	97,7	73,5	24,2	45,0	45,3	45,2	0,3	12,50	8,30	20,80	26,60	3,70	0,54	0,46	0,08	0,54	14,0
8	88,6	72,3	16,3	31,0	31,5	31,3	0,5	2,20	14,60	16,80	2,20	4,60	0,52	0,54	0,15	0,68	
9 (poginil)																	
10	90,7	77,9	12,8	43,3	38,4	40,9	-4,9	1,30	11,40	12,70	18,00	2,10	0,31	0,31	0,05	0,36	
11	94,1	77,4	16,7	38,3	34,2	36,3	-4,1	1,00	2,10	3,10	4,10	5,30	0,46	0,09	0,15	0,23	81,4
12	107,5	80,9	26,6	53,5	53,0	53,3	-0,5	4,40	11,20	15,60	2,90	9,50	0,50	0,29	0,18	0,47	41,4
mediana	94,1	77,4	16,7	43,3	38,4	-0,5	2,20	11,20	15,60	4,10	4,60	12,40	0,50	0,31	0,15	0,47	14,0
povprečje	95,7	76,4	19,3	42,2	40,5	41,4	-1,7	4,28	9,52	13,80	10,76	5,04	0,47	0,34	0,12	0,46	34,4
SE	3,3	1,6	2,6	3,7	3,9	3,8	1,1	2,14	2,11	2,97	4,91	1,24	0,04	0,08	0,02	0,08	15,7

Oznake in kratice:

m – masa

Δm – razlika mase

tret. – tretiranih

p. – poskus

iztr. – iztrebki

14d – 14 dni

SP – stopnja prehranjevanja

SI – stopnja iztrebljanja

UA – učinkovitost asimilacije hrane

PRILOGA B11: 14. poskus (Zn), prehranjevanje, skupina ZnO 1500 mikro, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani

ZnO 1500 mikro, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani																	
Poskusni osebek	<i>m</i> tret. listov pred p. [mg]	<i>m</i> tret. listov po p. [mg]	Δm tret. listov [mg]	<i>m</i> živali pred p. [mg]	<i>m</i> živali po p. [mg]	Δm živali [mg]	<i>m</i> iztr. po 7 dneh [mg]	<i>m</i> iztr. po 14 dneh [mg]	Skupna <i>m</i> iztr. na tret. hrani [mg]	<i>m</i> iztr. po 21 dneh [mg]	<i>m</i> iztr. po 28 dneh [mg]	Skupna <i>m</i> iztr. na čisti hrani [mg]	SP med 14d na tret. hrani	SI med 14d na tret. hrani	SI med 14d na čisti hrani	Skupna SI (14d na tret. + 14d na čisti hrani)	UA [%] med 14d na tret. hrani
1(poginil)																	
2	82,7	68,0	14,7	46,3	44,6	-1,7	0,00	3,70	3,70	5,30	4,50	9,80	0,32	0,08	0,10	0,18	74,8
3	101,1	77,0	24,1	47,7	47,1	-0,6	4,50	8,50	13,00	18,30	6,50	24,80	0,51	0,27	0,14	0,41	46,1
4 (poginil)																	
5	82,1	63,6	18,5	40,0	39,9	-0,1	1,90	15,90	17,80	5,40	6,00	11,40	0,46	0,45	0,15	0,60	3,8
6	106,3	79,8	26,5	54,8	55,8	1,0	1,00	4,20	5,20	12,60	11,40	24,00	0,48	0,09	0,21	0,30	80,4
7 (poginil)																	
8 (poginil)																	
9 (poginil)																	
10 (poginil)																	
11 (poginil)																	
12 (poginil)																	
mediana	91,9	72,5	21,3	47,0	45,9	-0,4	1,45	6,35	9,10	9,00	6,25	17,70	0,47	0,18	0,14	0,36	60,4
povprečje	93,1	72,1	21,0	47,2	46,9	-0,4	1,9	8,08	9,93	10,40	7,10	17,50	0,44	0,22	0,15	0,37	51,3
SE	6,2	3,8	2,7	3,0	3,3	0,6	0,96	2,82	3,32	3,14	1,49	4,00	0,04	0,09	0,02	0,09	17,5

Oznake in kratice:

m – masa

Δm – razlika mase

tret. – tretiranih

p. – poskus

iztr. – iztrebki

14d – 14 dni

SP – stopnja prehranjevanja

SI – stopnja iztrebljanja

UA – učinkovitost asimilacije hrane

PRILOGA B12: 14. poskus (Zn), prehranjevanje, skupina ZnO 4000 mikro, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani

ZnO 4000 mikro, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani																	
Poskusni osebki	<i>m</i> tret. listov pred p. [mg]	<i>m</i> tret. listov po p. [mg]	Δm tret. listov [mg]	<i>m</i> živali pred p. [mg]	<i>m</i> živali po p. [mg]	Δm živali [mg]	<i>m</i> iztr. po 7 dneh [mg]	<i>m</i> iztr. po 14 dneh [mg]	Skupna <i>m</i> iztr. na tret. hrani [mg]	<i>m</i> iztr. po 21 dneh [mg]	<i>m</i> iztr. po 28 dneh [mg]	Skupna <i>m</i> iztr. na čisti hrani [mg]	SP med 14d na tret. hrani	SI med 14d na tret. hrani	SI med 14d na čisti hrani	Skupna SI (14d na tret. + 14d na čisti hrani)	UA [%] med 14d na tret. hrani
1(poginil)																	
2	104,3	84,4	19,9	41,4	39,9	-1,5	2,40	6,40	8,80	7,40	5,30	12,70	0,49	0,22	0,13	0,35	55,8
3 (poginil)																	
4	103,2	89,7	13,5	41,6	38,7	-2,9	2,10	0,70	2,80	0,10	1,20	1,30	0,34	0,07	0,03	0,10	79,3
5	109,4	96,0	13,4	44,3	43,7	-0,6	0,90	0,60	1,50	1 iztr.	1,00		0,30				88,8
6 (poginil)																	
7 (poginil)																	
8 (poginil)																	
9	104,8	85,6	19,2	56,7	63,0	6,3	7,70	2,20	9,90	2,70	3,50	6,20	0,32	0,17	0,06	0,22	48,4
10	92,2	68,0	24,2	42,8	41,1	-1,7	5,70	4,30	10,00	6,80	8,40	15,20					58,7
11	105,7	92,4	13,3	34,4	34,2	-0,2	0,90	2,50	3,40	0,70	2,00	2,70	0,39	0,10	0,06	0,16	74,4
12	103,7	89,6	14,1	56,5	51,2	-5,3	1,50	4,00	5,50	7,70	3,00	10,70	0,26	0,10	0,06	0,16	61,0
mediana	104,3	89,6	14,1	42,8	41,1	-1,5	2,10	2,50	5,50	4,75	3,00	8,45	0,33	0,10	0,06	0,16	61,0
povprečje	103,3	86,5	16,8	45,4	44,5	-0,8	3,03	2,96	5,99	4,23	3,49	8,13	0,35	0,13	0,07	0,20	66,6
SE	2,0	3,4	1,6	3,1	3,7	1,4	1,00	0,79	1,35	1,42	0,99	2,29	0,03	0,03	0,02	0,04	5,5

Oznake in kratice:

m – masa

Δm – razlika mase

tret. – tretiranih

p. – poskus

iztr. – iztrebki

14d – 14 dni

SP – stopnja prehranjevanja

SI – stopnja iztrebljanja

UA – učinkovitost asimilacije hrane

PRILOGA B13: 14. poskus (Zn), prehranjevanje, skupina ZnCl₂ 1000, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani

ZnCl ₂ 1000, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani																	
Poskusni osebek	<i>m</i> tret. listov pred p. [mg]	<i>m</i> tret. listov po p. [mg]	Δm tret. listov [mg]	<i>m</i> živali pred p. [mg]	<i>m</i> živali po p. [mg]	Δm živali [mg]	<i>m</i> iztr. po 7 dneh [mg]	<i>m</i> iztr. po 14 dneh [mg]	Skupna <i>m</i> iztr. na tret. hrani [mg]	<i>m</i> iztr. po 21 dneh [mg]	<i>m</i> iztr. po 28 dneh [mg]	Skupna <i>m</i> iztr. na čisti hrani [mg]	SP med 14d na tret. hrani	SI med 14d na tret. hrani	SI med 14d na čisti hrani	Skupna SI (14d na tret. + 14d na čisti hrani)	UA [%] med 14d na tret. hrani
1	107,1	89,3	17,8	37,7	38,4	0,7	1,80	3,50	5,30	10,90	4,60	15,50	0,47	0,14	0,12	0,26	70,2
2(poginil)																	
3 (poginil)																	
4	94,9	80,5	14,4	46,1	46,8	0,7	1,20	3,50	4,70	11,40	3,10	14,50	0,31	0,10	0,07	0,17	67,4
5	90,4	74,3	16,1	51,0	49,5	-1,5	3,70	12,30	16,00	10,90	3,60	14,50	0,32	0,32	0,07	0,39	0,6
6	101,7	89,1	12,6	43,3	40,9	-2,4	1,00	10,20	11,20	12,50	2,70	15,20	0,30	0,27	0,06	0,33	11,1
7	85,9	63,5	22,4	43,9	44,5	0,6	4,80	5,20	10,00	9,30	7,60	16,90	0,51	0,23	0,17	0,40	55,4
8	107,6	90,2	17,4	44,6	43,4	-1,2	2,50	14,50	17,00	18,80	6,10	24,90	0,40	0,39	0,14	0,53	2,3
9	101,3	79,5	21,8	42,6	42,1	-0,5	7,00	7,40	14,40	4,70	6,40	11,10	0,51	0,34	0,15	0,49	33,9
10	103,9	86,7	17,2	31,0	28,0	-3,0	3,20	2,50	5,70	5,40	3,00	8,40	0,58	0,19	0,10	0,29	66,9
11	104,5	89,2	15,3	29,7	27,0	-2,7	2,10	3,50	5,60	0,00	4,00	4,00	0,54	0,20	0,14	0,34	63,4
12 (poginil)																	
mediana	101,7	86,7	17,2	43,3	42,1	-1,2	2,50	5,20	10,00	10,90	4,00	14,50	0,47	0,23	0,12	0,34	55,4
povprečje	99,7	82,5	17,2	41,1	40,1	-1,0	3,03	6,96	9,99	9,32	4,57	13,89	0,44	0,24	0,11	0,36	41,2
SE	2,5	3,0	1,1	2,3	2,6	0,5	0,64	1,47	1,64	1,80	0,58	1,94	0,04	0,03	0,01	0,04	9,9

Oznake in kratice:

m – masa

Δm – razlika mase

tret. – tretiranih

p. – poskus

iztr. – iztrebki

14d – 14 dni

SP – stopnja prehranjevanja

SI – stopnja iztrebljanja

UA – učinkovitost asimilacije hrane

PRILOGA B14: 14. poskus (Zn), prehranjevanje, skupina ZnCl₂ 2500, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani

ZnCl ₂ 2500, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani																	
Poskusni osebki	<i>m</i> tret. listov pred p. [mg]	<i>m</i> tret. listov po p. [mg]	Δm tret. listov [mg]	<i>m</i> živali pred p. [mg]	<i>m</i> živali po p. [mg]	Δm živali [mg]	<i>m</i> iztr. po 7 dneh [mg]	<i>m</i> iztr. po 14 dneh [mg]	Skupna <i>m</i> iztr. na tret. hrani [mg]	<i>m</i> iztr. po 21 dneh [mg]	<i>m</i> iztr. po 28 dneh [mg]	Skupna <i>m</i> iztr. na čisti hrani [mg]	SP med 14d na tret. hrani	SI med 14d na tret. hrani	SI med 14d na čisti hrani	Skupna SI (14d na tret. + 14d na čisti hrani)	UA [%] med 14d na tret. hrani
1	92,4	80,7	11,7	32,5	32,5	0,0	0,00	2,20	2,20	4,30	3,10	7,40	0,36	0,07	0,10	0,16	81,2
2	94,4	69,9	24,5	29,5	28,9	-0,6	4,80	3,10	7,90	1,60	7,20	8,80	0,84	0,27	0,25	0,52	67,8
3	83,9	60,2	23,7	32,3	31,4	-0,9	4,60	1,20	5,80	0,10	10,00	10,10	0,74	0,18	0,31	0,50	75,5
4	96,9	84,9	12,0	56,3	47,0	-9,3	2,70	1,40	4,10	1,90	1,70	3,60	0,23	0,08	0,03	0,11	65,8
5 (poginil)																	
6	95,5	80,9	14,6	47,5	45,6	-1,9	1,10	6,80	7,90	1,20	4,40	5,60	0,31	0,17	0,09	0,26	45,9
7																	
8																	
9																	
10	91,8	79,6	12,2	29,7	31,4	1,7	1,30	8,70	10,00	1,90	2,40	4,30	0,40	0,33	0,08	0,41	18,0
11	89,7	74,9	14,8	34,8	34,0	-0,8	3,40	8,80	12,20	0,00	3,10	3,10	0,43	0,35	0,09	0,44	17,6
12	102,0	80,6	21,4	40,1	41,0	0,9	7,30	9,20	16,50	24,70	5,90	30,60	0,53	0,41	0,15	0,55	22,9
mediana	93,4	80,1	14,7	33,7	33,3	-0,7	3,05	4,95	7,90	1,75	3,75	6,50	0,41	0,23	0,09	0,43	55,9
povprečje	93,3	76,5	16,9	37,8	36,5	-1,4	3,15	5,18	8,33	4,46	4,73	9,19	0,48	0,23	0,14	0,37	49,3
SE	1,9	2,8	1,9	3,4	2,5	1,2	0,84	1,25	1,62	2,93	0,99	3,18	0,07	0,04	0,03	0,06	9,5

Oznake in kratice:

m – masa

Δm – razlika mase

tret. – tretiranih

p. – poskus

iztr. – iztrebki

14d – 14 dni

SP – stopnja prehranjevanja

SI – stopnja iztrebljanja

UA – učinkovitost asimilacije hrane

PRILOGA B15: 14. poskus (Zn), vsebnost kovine v telesnih delih enakonožcev, 14-dnevna kontrolna skupina

Kontrola, 14 dni na tretirani hrani												
Poskusni osebek	konc. Zn v delu telesa [µg/g suhe mase]				suha masa telesa [mg]				masa Zn v telesu [µg]			
	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ
1	1506	71,1	93,37	163,29	0,77	1,15	13,27	15,19	1,16	0,08	1,24	2,48
2	865		146,60		0,93		10,53	8,98	0,80		1,54	
3	208	79,7	20,83	50,85	1,47	0,54	8,20	10,21	0,31	0,04	0,17	0,52
4	683	140,3	88,37	151,61	1,05	0,26	8,77	10,08	0,72	0,04	0,78	1,53
5 (poginil)												
6 (poginil)												
7	1384	98,4	74,50	182,58	1,11	1,27	11,35	13,73	1,54	0,12	0,85	2,51
8	940	69,4	117,40	135,34	0,34	0,42	13,71	14,47	0,32	0,03	1,61	1,96
9	851	333,3	126,50	217,65	0,79	0,83	6,54	8,16	0,67	0,28	0,83	1,78
10	1092	139,7	68,65	173,86	1,25	0,52	10,74	12,51	1,37	0,07	0,74	2,17
11	1049	75,4	68,86	148,33	1,56	0,71	17,03	19,30	1,64	0,05	1,17	2,86
12	1102	102,5	100,30	139,19	0,61	1,38	13,80	15,79	0,67	0,14	1,38	2,20
mediana	995	98,4	90,87	151,61	0,99	0,71	11,05	13,12	0,76	0,07	1,01	2,17
povprečje	968	123,3	90,54	151,41	0,99	0,79	11,39	12,84	0,92	0,10	1,03	2,00
SE	115	27,8	11,22	15,15	0,12	0,13	0,99	1,11	0,15	0,03	0,14	0,23

Oznake:

Hep – hepatopankreas

Gut – črevo

Rest – preostanek telesa

PRILOGA B16: 14. poskus (Zn), vsebnost kovine v telesnih delih enakonožcev, skupina ZnO 1500 nano, 14 dni na tretirani hrani

ZnO 1500 nano, 14 dni na tretirani hrani															
Poskusni osebek	konc. Zn v delu telesa [µg/g suhe mase]				suha masa telesa [mg]				masa Zn v telesu [µg]				Zaužiti Zn skupno [µg]	UA_{Zn} [%]	BAF
	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ			
1	534	143,9	85,28	131,66	1,70	0,69	14,94	17,33	0,91	0,10	1,27	2,28	21,2	1,3	0,09
2	1202	348,8	159,00	222,79	0,71	1,21	13,29	15,21	0,85	0,42	2,11	3,39	40,1	3,5	0,15
3	1001	396,3	116,10	211,84	0,87	0,43	8,00	9,30	0,87	0,17	0,93	1,97	46,5		0,14
4	1226	349,1	203,10	270,12	0,47	0,43	7,21	8,11	0,58	0,15	1,46	2,19	28,8	0,7	0,18
5	1359	199,6	66,72	165,50	1,08	0,41	13,19	14,68	1,47	0,08	0,88	2,43	18,3	2,3	0,11
6	7465	266,3			0,13	0,44	8,18	8,75	0,97	0,12			14,3		
7	570	1314,0	241,90	314,61	0,30	0,40	6,55	7,25	0,17	0,53	1,58	2,28	17,6	1,6	0,21
8	5006	1647,0	105,80	466,40	0,53	0,43	8,08	9,04	2,65	0,71	0,85	4,22	20,1	11,0	0,31
9	3115	2365,0	92,91	418,18	0,63	0,91	10,67	12,21	1,96	2,15	0,99	5,11	20,9	14,9	0,28
10	1022	1440,0	78,55	241,62	1,14	0,70	10,60	12,44	1,17	1,01	0,83	3,01	46,2	2,2	0,16
11	3609	1966,0	108,50	411,75	0,86	0,82	13,27	14,95	3,10	1,61	1,44	6,16	51,6	8,1	0,27
12	2037	2045,0	76,58	347,93	0,72	0,74	9,11	10,57	1,47	1,51	0,70	3,68	36,9	4,5	0,23
mediana	1293	855,2	105,80	270,12	0,72	0,57	9,86	11,39	1,07	0,47	0,99	3,01	25,0	2,9	0,18
povprečje	2345	1040	121,31	291,13	0,76	0,63	10,26	11,65	1,35	0,71	1,19	3,34	30,2	5,0	0,19
SE	610	241,6	17,06	33,06	0,12	0,07	0,81	0,95	0,25	0,20	0,13	0,41	3,8	1,5	0,02

Oznake in kratice:

Hep – hepatopankreas

Gut – črevo

Rest – preostanek telesa

UA_{Zn} – učinkovitost asimilacije Zn

BAF – bioakumulacijski faktor

PRILOGA B17: 14. poskus (Zn), vsebnost kovine v telesnih delih enakonožcev, skupina ZnO 4000 nano, 14 dni na tretirani hrani

ZnO 4000 nano, 14 dni na tretirani hrani															
Poskusni osebek	konc. Zn v delu telesa [µg/g suhe mase]				suha masa telesa [mg]				masa Zn v telesu [µg]				Zaužiti Zn skupno [µg]	UA_{Zn} [%]	BAF
	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ			
1	1398	1046,0	70,69	228,66	0,98	1,70	16,05	18,73	1,37	1,78	1,13	4,28	82,40	2,8	0,06
2	1403	1677,0	90,30	280,33	1,33	0,95	14,84	17,12	1,87	1,59	1,34	4,80	118,00	2,4	0,07
3	3425	616,8	184,10	299,06	0,44	0,78	14,12	15,34	1,51	0,48	2,60	4,59	79,60	3,3	0,07
4	4019	480,7	234,30	359,92	0,32	0,55	9,85	10,72	1,29	0,26	2,31	3,86	60,80	3,1	0,09
5	2504	80,4	117,00	290,06	1,17	2,26	12,23	15,66	2,93	0,18	1,43	4,54	92,40	2,8	0,07
6	1194	1033,0	810,80	849,47	0,96	0,76	12,16	13,88	1,15	0,79	9,86	11,79	86,00	11,4	0,21
7	2422	489,1	102,80	231,73	0,59	0,83	11,68	13,10	1,43	0,41	1,20	3,04	80,40	1,3	0,06
8 (poginil)															
9	66		83,91		10,04		8,48	4,73	0,66		0,71		63,20		
10	2749	696,1	163,70	291,45	0,67	0,60	14,79	16,06	1,84	0,42	2,42	4,68	128,00	2,1	0,07
11	2232	480,8	73,85	218,71	0,76	1,01	12,39	14,16	1,70	0,49	0,92	3,10	86,00	1,3	0,05
12	1030	326,8	80,19	174,64	1,15	0,63	11,43	13,21	1,18	0,21	0,92	2,31	100,00	0,3	0,04
mediana	2232	553,0	102,80	285,19	0,96	0,81	12,23	14,16	1,43	0,45	1,34	4,41	86,0	2,6	0,07
povprečje	2040	692,7	182,88	322,40	1,67	1,01	12,55	13,88	1,54	0,66	2,26	4,70	88,8	3,1	0,08
SE	346	143,6	64,77	60,84	0,84	0,17	0,68	1,12	0,17	0,18	0,79	0,83	6,2	1,0	0,02

Oznake in kratice:

Hep – hepatopankreas

Gut – črevo

Rest – preostanek telesa

UA_{Zn} – učinkovitost asimilacije Zn

BAF – bioakumulacijski faktor

PRILOGA B18: 14. poskus (Zn), vsebnost kovine v telesnih delih enakonožcev, skupina ZnO 1500 mikro, 14 dni na tretirani hrani

ZnO 1500 mikro, 14 dni na tretirani hrani															
Poskusni osebek	konc. Zn v delu telesa [µg/g suhe mase]				suha masa telesa [mg]				masa Zn v telesu [µg]				Zaužiti Zn skupno [µg]	UA _{Zn} [%]	BAF
	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ			
1	1529		121,50		0,70	0,27	5,99	6,96	1,07		0,73		23,0		
2	1510	445,0	77,73	184,13	1,05	0,61	14,58	16,24	1,59	0,27	1,13	2,99	48,5	2,0	0,12
3	1699	487,1	100,30	218,89	0,52	0,61	7,87	9,00	0,88	0,30	0,79	1,97	41,3		0,15
4	4137	1241,0	197,90	421,94	0,39	0,34	7,71	8,44	1,61	0,42	1,53	3,56	24,9	6,3	0,28
5	1343	1032,0	95,46	277,93	0,83	0,87	8,44	10,14	1,11	0,90	0,81	2,82	25,2	3,2	0,19
6 (poginil)															
7 (poginil)															
8		451,2	133,90			2,52	38,58	41,10		1,14	5,17		51,6		
9	1799	576,7	72,03	305,08	2,07	0,91	14,33	17,31	3,72	0,52	1,03	5,28	44,1	7,4	0,20
10	2072	1121,0	116,70	335,10	0,95	0,71	10,11	11,77	1,97	0,80	1,18	3,94	34,7	5,6	0,22
11	1596	203,5	135,50	246,29	0,77	1,84	8,67	11,28	1,23	0,37	1,17	2,78	33,5	2,3	0,16
12	3287	1311,0	138,80	391,90	0,73	0,57	10,42	11,72	2,40	0,75	1,45	4,59	29,1	8,9	0,26
mediana	1699	576,7	119,10	291,50	0,77	0,66	9,39	11,50	1,59	0,52	1,15	3,28	34,1	5,6	0,19
povprečje	2108	763,2	118,98	297,66	0,89	0,93	12,67	14,40	1,73	0,61	1,50	3,49	35,6	5,8	0,20
SE	319	137,0	11,52	29,25	0,16	0,22	3,01	3,14	0,30	0,10	0,42	0,38	3,3	1,0	0,02

Oznake:

Hep – hepatopankreas

Gut – črevo

Rest – preostanek telesa

UA_{Zn} – učinkovitost asimilacije Zn

BAF – bioakumulacijski faktor

PRILOGA B19: 14. poskus (Zn), vsebnost kovine v telesnih delih enakonožcev, skupina ZnO 4000 mikro, 14 dni na tretirani hrani

ZnO 4000 mikro, 14 dni na tretirani hrani															
Poskusni osebek	konc. Zn v delu telesa [µg/g suhe mase]				suha masa telesa [mg]				masa Zn v telesu [µg]				Zaužiti Zn skupno [µg]	UA_{Zn} [%]	BAF
	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ			
1	1727	244,6	95,47	193,68	0,88	0,56	14,03	15,47	1,52	0,14	1,34	3,00	85,60	1,2	0,05
2 (poginil)															
3 (poginil)															
4 (poginil)															
5 (poginil)															
6	1084	1002,0	110,30	210,40	0,56	0,84	11,53	12,93	0,61	0,84	1,27	2,72	89,60	0,8	0,05
7	1465	487,5	92,90	227,24	1,28	1,02	13,77	16,07	1,88	0,50	1,28	3,65	73,60	2,2	0,06
8 (poginil)															
9		2966,0	1158,00										32,80		
10 (poginil)															
11	2627	6458,0	74,76	738,83	1,08	1,24	13,75	16,07	2,84	8,01	1,03	11,87	83,20	11,9	0,18
12	4232	1047,0	287,40	568,06	0,74	0,24	10,07	11,05	3,13	0,25	2,89	6,28	50,40	8,5	0,14
mediana	1727	1024,5	102,89	227,24	0,88	0,84	13,75	15,47	1,88	0,50	1,28	3,65	78,4	2,2	0,06
povprečje	2227	2034,2	303,14	387,64	0,91	0,78	12,63	14,32	1,99	1,95	1,56	5,50	69,2	4,9	0,10
SE	562	967,4	173,94	111,95	0,13	0,18	0,78	1,00	0,46	1,52	0,34	1,71	9,3	2,2	0,03

Oznake:

Hep – hepatopankreas

Gut – črevo

Rest – preostanek telesa

UA_{Zn} – učinkovitost asimilacije Zn

BAF – bioakumulacijski faktor

PRILOGA B20: 14. poskus (Zn), vsebnost kovine v telesnih delih enakonožcev, skupina ZnCl_2 1000, 14 dni na tretirani hrani

ZnCl_2 1000, 14 dni na tretirani hrani															
Poskusni osebek	konc. Zn v delu telesa [$\mu\text{g/g}$ suhe mase]				suha masa telesa [mg]				masa Zn v telesu [μg]				Zaužiti Zn skupno [μg]	UA_{Zn} [%]	BAF
	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ			
1	1203	845,3	78,71	197,77	0,72	0,64	9,56	10,92	0,87	0,54	0,75	2,16	32,2	0,5	0,20
2	1696	437,9	72,10	168,36	0,52	0,71	10,24	11,47	0,88	0,31	0,74	1,93	22,7		0,17
3	2630	2197,0	83,32	266,21	0,79	0,52	15,70	17,01	2,08	1,14	1,31	4,53	36,8	6,9	0,27
4	2017	705,1	86,65	208,27	0,53	0,68	10,66	11,87	1,07	0,48	0,92	2,47	27,4	1,7	0,21
5	1740	1470,0	69,40	283,90	0,95	1,21	13,14	15,30	1,65	1,78	0,91	4,34	14,9	15,7	0,28
6	1132	741,1	79,98	188,58	0,75	0,40	8,55	9,70	0,85	0,30	0,68	1,83	17,0		0,19
7	1406	1482,0	81,53	235,72	0,89	0,66	12,09	13,64	1,25	0,98	0,99	3,22	28,3	4,3	0,24
8	759	276,5	82,10	150,26	1,42	0,49	13,58	15,49	1,08	0,14	1,11	2,33	21,2	1,5	0,15
9	1557	250,1	82,25	215,38	1,16	0,46	11,81	13,43	1,81	0,12	0,97	2,89	22,5	4,0	0,22
10	1250	733,2	91,98	217,13	0,79	0,89	10,19	11,87	0,99	0,65	0,94	2,58	30,2	1,9	0,22
11	632	611,1	102,60	165,94	0,62	0,82	10,32	11,76	0,39	0,50	1,06	1,95	24,1		0,17
12	1057	591,0	86,66	192,20	1,04	0,55	10,60	12,19	1,10	0,33	0,92	2,34	27,2	1,3	0,19
mediana	1328	719,2	82,18	203,02	0,79	0,65	10,63	12,03	1,07	0,49	0,93	2,41	25,7	1,9	0,20
povprečje	1423	861,7	83,11	207,48	0,85	0,67	11,37	12,89	1,17	0,60	0,94	2,71	25,4	4,2	0,21
SE	160	165,7	2,50	11,50	0,08	0,06	0,57	0,62	0,14	0,14	0,05	0,26	1,8	1,6	0,01

Oznake:

Hep – hepatopankreas

Gut – črevo

Rest – preostanek telesa

UA_{Zn} – učinkovitost asimilacije Zn

BAF – bioakumulacijski faktor

PRILOGA B21: 14. poskus (Zn), vsebnost kovine v telesnih delih enakonožcev, skupina ZnCl₂ 2500, 14 dni na tretirani hrani

ZnCl₂ 2500, 14 dni na tretirani hrani															
Poskusni osebek	konc. Zn v delu telesa [µg/g suhe mase]				suha masa telesa [mg]				masa Zn v telesu [µg]				Zaužiti Zn skupno [µg]	UA_{Zn} [%]	BAF
	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ			
1	1902	1946,0	230,00	552,24	0,68	0,62	5,53	6,83	1,29	1,21	1,27	3,77	34,8	5,1	0,22
2	2503	965,5	81,76	288,54	0,85	0,83	11,82	13,50	2,13	0,80	0,97	3,90	32,0	5,9	0,12
3	1236	751,1	94,36	225,53	1,09	0,45	10,20	11,74	1,35	0,34	0,96	2,65	28,0	2,3	0,09
4	2384	2386,0	97,01	368,60	0,50	0,63	8,39	9,52	1,19	1,50	0,81	3,51	41,3	3,7	0,15
5	1897	1032,0	154,50	309,64	0,61	0,44	8,29	9,34	1,16	0,45	1,28	2,89	41,8	2,1	0,12
6	3432	1841,0	89,45	331,66	0,48	1,02	12,50	14,00	1,65	1,88	1,12	4,64	47,8	5,5	0,13
7	1893	2254,0	138,10	365,89	1,02	0,56	11,48	13,06	1,93	1,26	1,59	4,78	45,8	6,1	0,15
8	4523	1326,0	176,20	411,29	0,22	0,53	5,91	6,66	1,00	0,70	1,04	2,74	29,8	2,5	0,16
9	2533	1352,0	89,88	332,55	0,67	0,77	9,31	10,75	1,70	1,04	0,84	3,57	44,0	3,6	0,13
10	8404	777,4	124,30	501,43	0,53	0,88	11,75	13,16	4,45	0,68	1,46	6,60	36,0	12,8	0,20
11	1346	335,1	102,80	202,90	0,76	0,41	9,22	10,39	1,02	0,14	0,95	2,11	50,8	0,2	0,08
12	1118	821,8	74,35	259,50	1,11	1,43	9,49	12,03	1,24	1,18	0,71	3,12	27,8	4,0	0,10
mediana	2143	1179,0	99,91	332,11	0,68	0,63	9,40	11,25	1,32	0,92	1,00	3,54	38,6	3,9	0,13
povprečje	2764	1315,7	121,06	345,81	0,71	0,71	9,49	10,92	1,68	0,93	1,08	3,69	38,3	4,5	0,14
SE	583	189,1	13,39	30,07	0,08	0,09	0,65	0,71	0,27	0,15	0,08	0,35	2,3	0,9	0,01

Oznake:

Hep – hepatopankreas

Gut – črevo

Rest – preostanek telesa

UA_{Zn} – učinkovitost asimilacije Zn

BAF – bioakumulacijski faktor

PRILOGA B22: 14. poskus (Zn), vsebnost kovine v telesnih delih enakonožcev, 28-dnevna kontrolna skupina

Kontrola, 28 dni												
Poskusni osebek	konc. Zn v delu telesa [µg/g suhe mase]				suha masa telesa [mg]				masa Zn v telesu [µg]			
	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ
1	596	70,3	120,60	136,06	0,46	1,10	8,99	10,55	0,27	0,08	1,08	1,44
2	835	279,3	117,20	153,17	0,42	0,32	9,08	9,82	0,35	0,09	1,06	1,50
3	813	104,4	139,70	194,11	0,70	0,63	6,92	8,25	0,57	0,07	0,97	1,60
4	544	124,4	88,03	143,00	1,42	0,71	10,11	12,24	0,77	0,09	0,89	1,75
5 (poginil)												
6	1541	136,2	108,20	206,42	1,03	0,86	13,38	15,27	1,59	0,12	1,45	3,15
7	826	143,2	125,40	188,11	1,06	0,65	10,32	12,03	0,88	0,09	1,29	2,26
8	1529	163,3	121,80	264,94	1,00	0,86	8,22	10,08	1,53	0,14	1,00	2,67
9	1883	175,4	121,50	259,51	0,89	0,77	10,00	11,66	1,68	0,14	1,22	3,03
10	926	297,3	117,70	185,58	0,53	0,46	6,54	7,53	0,49	0,14	0,77	1,40
11	1772	181,7	62,07	171,66	1,08	1,40	15,90	18,38	1,91	0,25	0,99	3,16
12	502	236,1	128,40	142,80	0,35	0,40	11,32	12,07	0,18	0,09	1,45	1,72
mediana	835	163,3	120,60	185,58	0,89	0,71	10,00	11,66	0,77	0,09	1,06	1,75
povprečje	1070	173,8	113,69	185,94	0,81	0,74	10,07	11,63	0,93	0,12	1,11	2,15
SE	154	21,5	6,46	13,35	0,10	0,09	0,82	0,93	0,19	0,02	0,07	0,22

Oznake:

Hep – hepatopankreas

Gut – črevo

Rest – preostanek telesa

PRILOGA B23: 14. poskus (Zn), vsebnost kovine v telesnih delih enakonožcev, skupina ZnO 1500 nano, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani

ZnO 1500 nano, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani												
Poskusni osebek	konc. Zn v delu telesa [µg/g suhe mase]				suha masa telesa [mg]				masa Zn v telesu [µg]			
	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ
1	1086	111,2	76,19	134,61	0,65	1,21	10,10	11,96	0,71	0,13	0,77	1,61
2	433	450,7	118,00	165,40	0,65	0,62	7,40	8,67	0,28	0,28	0,87	1,43
3	1352	122,8	88,96	183,99	1,04	1,23	11,99	14,26	1,41	0,15	1,07	2,62
4	792	79,0	105,40	179,58	0,89	1,55	5,24	7,68	0,70	0,12	0,55	1,38
5	1708	214,4	110,70	182,39	0,34	0,28	7,36	7,98	0,58	0,06	0,81	1,46
6	2021	122,9	85,08	201,39	0,60	0,78	8,86	10,24	1,21	0,10	0,75	2,06
7	828	106,9	61,94	129,73	1,15	0,92	11,53	13,60	0,95	0,10	0,71	1,76
8	1794	144,6	81,90	213,99	0,84	1,08	9,48	11,40	1,51	0,16	0,78	2,44
9 (poginil)												
10	1074	143,3	100,50	202,65	0,83	1,36	6,29	8,48	0,89	0,19	0,63	1,72
11			118,90				10,73				1,28	
12 (poginil)												
mediana	1086	122,9	94,73	182,39	0,83	1,08	9,17	10,24	0,89	0,13	0,77	1,72
povprečje	1232	166,2	94,76	177,08	0,78	1,00	8,90	10,47	0,92	0,14	0,82	1,83
SE	176	37,7	6,00	9,77	0,08	0,13	0,72	0,82	0,13	0,02	0,07	0,15

Oznake:

Hep – hepatopankreas

Gut – črevo

Rest – preostanek telesa

PRILOGA B24: 14. poskus (Zn), vsebnost kovine v telesnih delih enakonožcev, skupina ZnO 4000 nano, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani

ZnO 4000 nano, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani												
Poskusni osebek	konc. Zn v delu telesa [µg/g suhe mase]				suha masa telesa [mg]				masa Zn v telesu [µg]			
	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ
1 (poginil)												
2 (poginil)												
3 (poginil)												
4 (poginil)												
5 (poginil)												
6 (poginil)												
7	1515	182,7	107,50	196,48	0,74	0,81	10,84	12,39	1,12	0,15	1,17	2,43
8	3683	47,2	102,90	194,93	0,27	2,02	6,99	9,28	0,99	0,10	0,72	1,81
9	1419	132,2	62,55	114,93	0,41	1,01	10,54	11,96	0,58	0,13	0,66	1,37
10	1355	309,5	108,80	208,20	0,57	0,20	6,78	7,55	0,77	0,06	0,74	1,57
11	148	111,1	115,40	118,09	0,90	0,97	7,43	9,30	0,13	0,11	0,86	1,10
12	1126	169,9	60,82	145,56	1,23	0,62	14,41	16,26	1,38	0,11	0,88	2,37
mediana	1387	151,1	105,20	170,24	0,66	0,89	8,99	10,63	0,88	0,11	0,80	1,69
povprečje	1541	158,8	93,00	163,03	0,69	0,94	9,50	11,12	0,83	0,11	0,84	1,78
SE	474	36,0	10,04	17,14	0,14	0,25	1,22	1,27	0,18	0,01	0,07	0,22

Oznake:

Hep – hepatopankreas

Gut – črevo

Rest – preostanek telesa

PRILOGA B25: 14. poskus (Zn), vsebnost kovine v telesnih delih enakonožcev, skupina ZnO 1500 mikro, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani

ZnO 1500 mikro, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani												
Poskusni osebek	konc. Zn v delu telesa [µg/g suhe mase]				suha masa telesa [mg]				masa Zn v telesu [µg]			
	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ
1 (poginil)												
2 (poginil)	135	131,8	87,12	97,82	1,35	0,66	6,76	8,77	0,18	0,09	0,59	0,86
3	1961	128,4	80,34	199,48	0,85	0,80	12,09	13,74	1,67	0,10	0,97	2,74
4 (poginil)												
5	1809	100,2	60,59	153,39	0,60	1,09	10,08	11,77	1,09	0,11	0,61	1,81
6	1725	142,1	73,79	186,30	1,02	1,12	13,51	15,65	1,76	0,16	1,00	2,92
7 (poginil)												
8 (poginil)												
9 (poginil)												
10 (poginil)												
11 (poginil)												
12 (poginil)												
mediana	1767	130,1	77,07	169,84	0,94	0,95	11,09	12,76	1,38	0,11	0,79	2,27
povprečje	1407	125,6	75,46	159,25	0,96	0,92	10,61	12,48	1,17	0,11	0,79	2,08
SE	427	9,0	5,65	22,65	0,16	0,11	1,46	1,47	0,36	0,02	0,11	0,47

Oznake:

Hep – hepatopankreas

Gut – črevo

Rest – preostanek telesa

PRILOGA B26: 14. poskus (Zn), vsebnost kovine v telesnih delih enakonožcev, skupina ZnO 4000 mikro, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani

ZnO 4000 mikro, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani												
Poskusni osebek	konc. Zn v delu telesa [µg/g suhe mase]				suha masa telesa [mg]				masa Zn v telesu [µg]			
	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ
1 (poginil)												
2	1466	133,7	120,70	215,95	0,84	0,63	10,48	11,95	1,23	0,08	1,26	2,58
3 (poginil)												
4	6163	756,9	213,40	495,84	0,37	0,45	7,84	8,66	2,28	0,34	1,67	4,29
5		893,0				0,65	12,06					
6 (poginil)												
7 (poginil)												
8 (poginil)												
9	4645	405,9	94,66	270,06	0,61	0,42	15,54	16,57	2,83	0,17	1,47	4,47
10	2536	321,9	110,60	268,96	0,59	0,67	8,67	9,93	1,50	0,22	0,96	2,67
11	1231	632,3	101,80	176,94	0,30	0,52	7,36	8,18	0,37	0,33	0,75	1,45
12	2409	355,1	130,80	329,93	0,98	0,22	10,26	11,46	2,36	0,08	1,34	3,78
mediana	2473	405,9	115,65	269,51	0,60	0,52	10,26	10,70	1,89	0,19	1,30	3,23
povprečje	3075	499,8	128,66	292,95	0,62	0,51	10,32	11,13	1,76	0,20	1,24	3,21
SE	790	101,6	17,75	45,83	0,11	0,06	1,07	1,25	0,37	0,05	0,14	0,48

Oznake:

Hep – hepatopankreas

Gut – črevo

Rest – preostanek telesa

PRILOGA B27: 14. poskus (Zn), vsebnost kovine v telesnih delih enakonožcev, skupina ZnCl_2 1000, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani

ZnCl₂ 1000, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani												
Poskusni osebek	konc. Zn v delu telesa [µg/g suhe mase]				suha masa telesa [mg]				masa Zn v telesu [µg]			
	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ
1	1246		95,47		0,54		9,09		0,67	0,00	0,87	1,54
2 (poginil)												
3 (poginil)												
4	494	605,1	67,92	119,88	0,55	0,58	9,38	10,51	0,27	0,35	0,64	1,26
5	1011	306,7	137,00	180,01	0,51	0,27	10,65	11,43	0,52	0,08	1,46	2,06
6	970	136,5	103,60		1,07		10,50		1,04		1,09	
7	754	102,6	88,66	136,44	0,86	0,70	10,61	12,17	0,65	0,07	0,94	1,66
8	4351		139,70		0,58	0,95	10,36		2,52		1,45	
9	717	118,6	250,90	278,96	0,95	0,87	9,85	11,67	0,68	0,10	2,47	3,26
10	548	243,9	185,70	221,29	0,59	0,17	5,52	6,28	0,32	0,04	1,03	1,39
11		472,6	180,90			0,49	4,24			0,23	0,77	
12 (poginil)												
mediana	862	243,9	137,00	180,01	0,59	0,58	9,85	11,43	0,66	0,08	1,03	1,60
povprečje	1261	283,7	138,87	187,32	0,71	0,58	8,91	10,41	0,83	0,13	1,19	1,86
SE	450	72,8	19,44	28,93	0,08	0,11	0,79	1,07	0,26	0,05	0,19	0,30

Oznake:

Hep – hepatopankreas

Gut – črevo

Rest – preostanek telesa

PRILOGA B28: 14. poskus (Zn), vsebnost kovine v telesnih delih enakonožcev, skupina ZnCl₂ 2500, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani

ZnCl ₂ 2500, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani												
Poskusni osebek	konc. Zn v delu telesa [µg/g suhe mase]				suha masa telesa [mg]				masa Zn v telesu [µg]			
	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ
1	637	210,1	85,29	129,39	0,48	0,42	6,29	7,19	0,31	0,09	0,54	0,93
2	1174	396,4	142,20	190,68	0,16	0,51	5,41	6,08	0,19	0,20	0,77	1,16
3	1567	177,1	96,99	174,60	0,39	0,70	7,02	8,11	0,61	0,12	0,68	1,42
4	413	510,1	134,20	174,92	0,86	0,18	6,51	7,55	0,36	0,09	0,87	1,32
5 (poginil)												
6	1757	225,3	135,00	276,40	0,99	0,46	10,20	11,65	1,74	0,10	1,38	3,22
7 (poginil)												
8 (poginil)												
9 (poginil)												
10	1450	175,3	87,17	171,73	0,48	0,56	7,28	8,32	0,70	0,10	0,63	1,43
11	861	227,7	121,00	162,74	0,41	0,51	7,65	8,57	0,35	0,12	0,93	1,39
12	1787	159,4	144,10	231,51	0,52	0,72	8,66	9,90	0,93	0,11	1,25	2,29
mediana	1312	217,7	127,60	174,76	0,48	0,51	7,15	8,22	0,48	0,11	0,82	1,41
povprečje	1206	260,2	118,24	188,99	0,54	0,51	7,38	8,42	0,65	0,12	0,88	1,65
SE	184	44,3	8,75	16,03	0,09	0,06	0,53	0,60	0,18	0,01	0,10	0,26

Oznake:

Hep – hepatopankreas

Gut – črevo

Rest – preostanek telesa

PRILOGA C1: združeni podatki 33. in 36. poskusa (Cu), prehranjevanje, 14-dnevna kontrolna skupina

Kontrola, 14 dni												
Zaporedna številka poskusa	Poskusni osebek	Masa listov pred poskusom [mg]	Razlika mase listov [mg]	Masa živali pred poskusom [mg]	Masa živali po poskusu [mg]	Razlika mase živali [mg]	Masa iztrebkov po 7 dneh [mg]	Masa iztrebkov po 14 dneh [mg]	Skupna masa iztrebkov [mg]	Stopnja preh. (SP)	Stopnja iztr. (SI)	Učinkovitost asimilacije hrane (UA) [%]
33.	1	105,3	27,8	40,0	37,2	-2,8	12,4	3,2	15,6	0,72	0,40	43,9
	2	108,6	25,2	40,7	42,4	1,7	7,4	5,1	12,5	0,61	0,30	50,4
	3	110,4	24,2	46,5	40,8	-5,7	5,1	8,0	13,1	0,55	0,30	45,7
	4	110,3	33,8	41,6	35,6	-6,0	15,1	4,3	19,4	0,88	0,50	42,7
	5	109,4	31,2	47,0	34,7	-12,3	8,7	8,8	17,5	0,76	0,43	43,8
	6	111,7	45,2	34,7	34,2	-0,5	5,9	6,5	12,4	1,31	0,36	72,7
36.	7	97,2	11,6	61,9	60,4	-1,5	3,9	1,4	5,3	0,19	0,09	54,3
	8	95,0	19,2	68,6	68,0	-0,6	8,0	4,3	12,3	0,28	0,18	35,9
	9	92,3	16,9	54,0	51,4	-2,6	3,7	5,9	9,6	0,32	0,18	43,2
	10	95,1	13,3	71,9	70,5	-1,4	3,1	2,3	5,4	0,19	0,08	59,4
mediana			24,7	46,8	41,6	-2,1	6,6	4,7	12,4	0,58	0,30	44,8
povprečje			24,8	50,7	47,5	-3,2	7,3	5,0	12,3	0,58	0,28	49,2
SE			3,2	4,1	4,5	1,3	1,2	0,8	1,5	0,11	0,05	3,3

PRILOGA C2: združeni podatki 33. in 36. poskusa (Cu), prehranjevanje, skupina Cu nano 2000, 14 dni na tretirani hrani

Cu nano 2000, 14 dni na tretirani hrani												
Zaporedna številka poskusa	Poskusni osebek	Masa listov pred poskusom [mg]	Razlika mase listov [mg]	Masa živali pred poskusom [mg]	Masa živali po poskusu [mg]	Razlika mase živali [mg]	Masa iztrebkov po 7 dneh [mg]	Masa iztrebkov po 14 dneh [mg]	Skupna masa iztrebkov [mg]	Stopnja preh. (SP)	Stopnja iztr. (SI)	Učinkovitost asimilacije hrane (UA) [%]
33.	1	103,8	22,8	47,5	47,1	-0,4	5,0	6,0	11,0	0,48	0,23	51,6
	2	105,5	17,6	42,8	45,9	3,1	2,4	5,4	7,8	0,40	0,18	55,4
	3	105,8	20,0	30,0	31,1	1,1	2,8	7,6	10,4	0,65	0,34	47,9
	4	105,0	13,4	50,1	51,9	1,8	0,9	3,0	3,9	0,26	0,08	71,1
	5	104,5	16,6	42,3	42,3	0,0	2,8	3,9	6,7	0,39	0,16	59,9
	6	105,5	8,9	35,2	31,1	-4,1	0,1	0,0	0,1	0,27	0,00	98,3
	7	105,3	16,5	53,1	54,3	1,2	3,0	4,1	7,1	0,31	0,13	57,0
	8	106,3	13,3	38,2	35,5	-2,7	2,3	2,7	5,0	0,36	0,14	62,2
	9	106,4	22,6	43,6	35,2	-8,4	4,4	4,9	9,3	0,57	0,24	58,8
	10	106,0	10,5	30,8	24,4	-6,4	0,6	2,0	2,6	0,38	0,09	75,0
	11	101,4	13,6	28,9	26,6	-2,3	2,0	2,1	4,1	0,49	0,15	69,9
	12	104,7	17,4	30,7	30,8	0,1	1,1	4,4	5,5	0,57	0,18	68,2
	13	104,4	8,9	24,3	25,2	0,9	0,9	1,5	2,4	0,36	0,10	73,1
	14	108,3	14,6	24,5	25,1	0,6	2,3	3,1	5,4	0,59	0,22	63,2
36.	15	93,4	10,9	56,2	53,4	-2,8	3,2	0,1	3,3	0,20	0,06	69,7
	16	96,5	18,0	58,6	58,0	-0,6	4,4	4,6	9,0	0,31	0,15	50,0
	17	95,7	16,8	41,1	38,8	-2,3	5,5	3,7	9,2	0,42	0,23	45,2
	18	94,2	13,6	39,0	35,4	-3,6	4,5	3,2	7,7	0,37	0,21	43,4
	19	95,3	18,0	35,3	34,2	-1,1	6,0	6,0	12,0	0,52	0,35	33,3
mediana			16,5	39,0	35,4	-0,6	2,8	3,7	6,7	0,39	0,16	59,9
povprečje			15,5	39,6	38,2	-1,4	2,9	3,6	6,5	0,42	0,17	60,7
SE			0,9	2,4	2,5	0,7	0,4	0,5	0,7	0,03	0,02	3,3

PRILOGA C3: združeni podatki 33. in 36. poskusa (Cu), prehranjevanje, skupina Cu nano 5000, 14 dni na tretirani hrani

Cu nano 5000, 14 dni na tretirani hrani												
Zaporedna številka poskusa	Poskusni osebek	Masa listov pred poskusom [mg]	Razlika mase listov [mg]	Masa živali pred poskusom [mg]	Masa živali po poskusu [mg]	Razlika mase živali [mg]	Masa iztrebkov po 7 dneh [mg]	Masa iztrebkov po 14 dneh [mg]	Skupna masa iztrebkov [mg]	Stopnja preh. (SP)	Stopnja iztr. (SI)	Učinkovitost asimilacije hrane (UA) [%]
33.	1	104,5	15,0	31,3	32,1	0,8	2,6	1,9	4,5	0,47	0,14	69,9
	2	106,2	15,0	44,1	35,0	-9,1	0,7	1,1	1,8	0,38	0,05	88,0
	3	103,9	17,1	59,2	56,4	-2,8	3,1	1,7	4,8	0,30	0,08	72,0
	4	109,6	20,9	37,1	27,7	-9,4	1,1	2,6	3,7	0,65	0,11	82,5
	5	114,3	30,5	27,7	22,9	-4,8	0,4	2,4	2,8	1,21	0,11	90,9
	6	108,5	20,4	45,5	43,4	-2,1	4,4	3,3	7,7	0,46	0,17	62,1
	7	107,7	19,0	44,9	35,9	-9,0	5,0	2,6	7,6	0,47	0,19	60,1
	8	106,9	11,4	33,1	24,9	-8,2	0,4	3,4	3,8	0,39	0,13	66,5
	9	104,5	12,5	27,2	22,3	-4,9	1,9		1,9	0,51	0,08	84,8
	10	102,7	7,8	26,2	20,5	-5,7	0,7	1,8	2,5	0,33	0,11	67,7
	11	106,6	10,9	25,4	25,1	-0,3	2,4	1,6	4,0	0,43	0,16	62,8
36.	12	93,4	10,9	56,6	55,0	-1,6	3,7	1,9	5,6	0,20	0,10	48,6
	13	96,3	14	55,4	51,8	-3,6	4,5	3,7	8,2	0,26	0,15	41,4
	14	95,4	9,5	47,4	48,0	0,6	0,4	3,0	3,4	0,20	0,07	64,2
	15	96,2	12,9	66,0	63,3	-2,7	5,1	0,9	6,0	0,20	0,09	53,5
mediana			14,0	44,1	35,0	-3,6	2,4	2,2	4,0	0,39	0,11	66,5
povprečje			15,2	41,8	37,6	-4,2	2,4	2,3	4,6	0,43	0,12	67,7
SE			1,5	3,4	3,7	0,9	0,5	0,2	0,5	0,06	0,01	3,7

PRILOGA C4: združeni podatki 33. in 36. poskusa (Cu), prehranjevanje, skupina $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 2000, 14 dni na tretirani hrani

$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 2000, 14 dni na tretirani hrani												
Zaporedna številka poskusa	Poskusni osebek	Masa listov pred poskusom [mg]	Razlika mase listov [mg]	Masa živali pred poskusom [mg]	Masa živali po poskusu [mg]	Razlika mase živali [mg]	Masa iztrebkov po 7 dneh [mg]	Masa iztrebkov po 14 dneh [mg]	Skupna masa iztrebkov [mg]	Stopnja preh. (SP)	Stopnja iztr. (SI)	Učinkovitost asimilacije hrane (UA) [%]
33.	1	108,1	29,5	70,8	53,7	-17,1	12,5	3,8	16,3	0,47	0,26	44,9
	2	105,2	13,1	36,7	36,6	-0,1	1,9	3,5	5,4	0,36	0,15	58,7
	3	100,7	17,4	40,7	43,0	2,3	4,2	4,5	8,7	0,42	0,21	49,8
	4	105,9	18,2	45,8	38,1	-7,7	6,1	2,1	8,2	0,43	0,20	54,8
	5	104,8	17,2	50,0	50,0	0,0	1,1	2,6	3,7	0,34	0,07	78,2
	6	105,3	20,0	56,3	42,9	-13,4	3,3	0,1	3,4	0,40	0,07	83,1
	7	110,1	25,1	31,6	33,6	2,0	2,4	0,9	3,3	0,77	0,10	87,0
	8	110,4	23,1	38,3	32,2	-6,1	2,2	2,8	5,0	0,66	0,14	78,2
	9	105,8	24,9	35,6	35,2	-0,4	4,5	2,5	7,0	0,70	0,20	71,8
	10	103,2	27,9	29,5	30,8	1,3	5,9	7,3	13,2	0,93	0,44	52,7
	11	105,1	19,1	32,5	34,2	1,7	3,9	1,4	5,3	0,57	0,16	72,3
36.	12	94,3	13,3	61,9	59,6	-2,3	3,6	0,3	3,9	0,22	0,06	70,7
	13	89,4	8,5	44,2	43,2	-1,0	0,5	1,0	1,5	0,19	0,03	82,4
	14	94,8	10,7	43,7	39,8	-3,9	4,7	2,1	6,8	0,26	0,16	36,4
	15	95,6	14,1	60,6	59,5	-1,1	2,5	2,7	5,2	0,23	0,09	63,1
	16	94,4	7,6	62,2	60,8	-1,4	2,1	0,8	2,9	0,12	0,05	61,8
mediana			17,8	44,0	41,4	-1,1	3,4	2,3	5,3	0,41	0,15	66,9
povprečje			18,1	46,3	43,3	-3,0	3,8	2,4	6,2	0,44	0,15	65,4
SE			1,7	3,2	2,6	1,4	0,7	0,5	1,0	0,06	0,03	3,7

PRILOGA C5: združeni podatki 33. in 36. poskusa (Cu), prehranjevanje, skupina $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 5000, 14 dni na tretirani hrani

$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 5000, 14 dni na tretirani hrani												
Zaporedna številka poskusa	Poskusni osebek	Masa listov pred poskusom [mg]	Razlika mase listov [mg]	Masa živali pred poskusom [mg]	Masa živali po poskusu [mg]	Razlika mase živali [mg]	Masa iztrebkov po 7 dneh [mg]	Masa iztrebkov po 14 dneh [mg]	Skupna masa iztrebkov [mg]	Stopnja preh. (SP)	Stopnja iztr. (SI)	Učinkovitost asimilacije hrane (UA) [%]
33.	1	107,3	13,0	39,0	40,0	1,0	2,4	0,1	2,5	0,33	0,06	80,6
	2	103,4	13,5	38,3	36,1	-2,2	2,6	1,6	4,2	0,36	0,11	68,6
	3	104,8	16,6	41,7	40,4	-1,3	2,7	2,4	5,1	0,40	0,12	69,4
	4	104,3	13,7	43,4	42,7	-0,7	3,0	1,4	4,4	0,32	0,10	67,7
	5	98,6	17,4	32,7	29,9	-2,8	4,0	3,0	7,0	0,56	0,22	60,1
	6	104,7	12,6	43,3	37,9	-5,4	1,7	1,5	3,2	0,31	0,08	74,4
	7	111,7	17,4	85,3	71,4	-13,9	1,1	2,1	3,2	0,22	0,04	81,4
	8	110,1	16,3	34,7	25,1	-9,6	1,1	1,6	2,7	0,55	0,09	83,5
	9	110,2	17,8	35,4	29,2	-6,2	2,5	0,3	2,8	0,55	0,09	84,3
	10	101,3	12,3	36,8	30,1	-6,7	1,7	1,8	3,5	0,37	0,11	71,3
	11	104,7	16,4	48,1	40,7	-7,4	3,1	0,8	3,9	0,37	0,09	76,0
	12	110,8	16,7	30,8	23,0	-7,8	1,1	1,7	2,8	0,62	0,10	83,4
	13	107,3	12,9	38,3	36,0	-2,3	1,7	0,5	2,2	0,35	0,06	82,9
	14	108,1	8,5	32,9	30,3	-2,6	1,1	0,1	1,2	0,27	0,04	85,6
	15	106,0	13,8	26,4	28,3	1,9	2,8	1,7	4,5	0,50	0,16	67,6
36.	16	96,3	5,6	49,9	47,8	-2,1	2,1	0,5	2,6	0,11	0,05	53,6
	17	96,5	10,4	48,4	45,9	-2,5	1,8	2,7	4,5	0,22	0,10	56,7
	18	97,3	8,5	50,9	47,7	-3,2	1,7	1,4	3,1	0,17	0,06	63,5
mediana			13,6	38,7	37,0	-2,7	2,0	1,6	3,2	0,36	0,09	72,8
povprečje			13,5	42,0	37,9	-4,1	2,1	1,4	3,5	0,37	0,09	72,8
SE			0,8	3,0	2,7	0,9	0,2	0,2	0,3	0,03	0,01	2,4

PRILOGA C6: 36. poskus (Cu), prehranjevanje, 28-dnevna kontrolna skupina

Kontrola, 28 dni														
Poskusni osebek	Zač. <i>m</i> listov (1.–14. dan) [mg]	Kon. <i>m</i> listov (1.–14. dan) [mg]	Δ <i>m</i> listov (1.–14. dan) [mg]	Zač. <i>m</i> listov (15.–28. dan) [mg]	Kon. <i>m</i> listov (15.–28. dan) [mg]	Δ <i>m</i> listov (15.–28. dan) [mg]	<i>m</i> živali pred p. [mg]	<i>m</i> živali po p. [mg]	Δ <i>m</i> živali [mg]	<i>m</i> iztr. po 7 dneh [mg]	<i>m</i> iztr. po 14 dneh [mg]	<i>m</i> iztr. po 21 dneh [mg]	<i>m</i> iztr. po 28 dneh [mg]	Skupna <i>m</i> iztr. [mg]
1	94,0	82,2	11,8	97,4	76,4	21,0	33,1	31,5	-1,6	2,2	2,8	8,4	3,5	16,90
2 (poginil do 25. 10.)	96,5						33,9			1,6				
3	92,1	82,1	10,0	86,4	71,7	14,7	45,0	43,1	-1,9	4,1	2,0	2,4	2,5	11,00
4 (poginil do 2. 11.)	86,0	77,6	8,4	98,9			33,9			3,9	0,0			
5 (poginil do 15. 10.)	90,3						35,8							
6	89,9	72,5	17,4	98,6	80,8	17,8	33,6	32,6	-1,0	7,7	5,1	3,8	3,1	19,70
7 (poginil do 8. 11.)	88,8	79,6	9,2	93,5			39,7			3,0	2,2	3,0		
8	90,5	78,3	12,2	99,2	88,4	10,8	44,4	39,8	-4,6	6,6	2,3	2,4	0,9	12,20
9	94,8	83,4	11,4	91,5	66,6	24,9	52,6	49,6	-3,0	3,6	2,4	4,4	11,7	22,10
10	92,2	86,2	6,0	96,8	78,8	18,0	44,1	42,2	-1,9	1,8	1,3	4,6	6,0	13,70
11	92,8	84,3	8,5	91,1	74,2	16,9	43,7	44,7	1,0	2,1	2,5	4,6	2,4	11,60
12	94,5	78,7	15,8	99,4	77,5	21,9	39,2	37,8	-1,4	4,7	4,9	8,6	4,6	22,80
13	93,6	85,1	8,5	98,0	75,5	22,5	41,6	39,4	-2,2	2,8	1,2	7,2	4,6	15,80
14 (poginil do 8. 11.)	95,0	87,0	8,0	100,2			33,5			1,7	1,5	3,3		
15	94,8	83,3	11,5	96,8	79,5	17,3	59,6	57,2	-2,4	3,2	2,1	4,6	3,1	13,00
mediana	92,8	82,2	10,0	97,4	77,0	17,9	39,7	41,0	-1,9	3,1	2,2	4,5	3,3	14,75
povprečje	92,4	81,6	10,7	96,0	76,9	18,6	40,9	41,8	-1,9	3,5	2,3	4,8	4,2	15,88
SE	0,7	1,1	0,9	1,1	1,8	1,3	2,0	2,4	0,5	0,5	0,4	0,6	0,9	1,4

Oznake in kratice:

m – masa

Δ *m* – razlika mase

zač. – začetna

kon. – končna

tret. – tretiranih

p. – poskus

iztr. – iztrebki

PRILOGA C7: 36. poskus (Cu), prehranjevanje, skupina Cu nano 2000, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani

Cu nano 2000, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani														
Poskusni osebek	Zač. <i>m</i> tret. listov (1.–14. dan) [mg]	Kon. <i>m</i> tret. listov (1.–14. dan) [mg]	Δ <i>m</i> tret. listov (1.–14. dan) [mg]	Zač. <i>m</i> čistih listov (15.–28. dan) [mg]	Kon. <i>m</i> čistih listov (15.–28. dan) [mg]	Δ <i>m</i> čistih listov (15.–28. dan) [mg]	<i>m</i> živali pred p. [mg]	<i>m</i> živali po p. [mg]	Δ <i>m</i> živali [mg]	<i>m</i> iztr. po 7 dneh [mg]	<i>m</i> iztr. po 14 dneh [mg]	<i>m</i> iztr. po 21 dneh [mg]	<i>m</i> iztr. po 28 dneh [mg]	Skupna <i>m</i> iztr. [mg]
1	95,5	89,1	6,4	98,9	67,1	31,8	42,3	41,9	-0,4	1,5	3 iztr.	12,3	11,1	24,90
2	94,0	84,0	10,0	85,0	62,2	22,8	69,8	65,8	-4,0	5,0	0,3	7,7	5,8	18,80
3	94,2	79,9	14,3	98,4	76,0	22,4	61,0	56,2	-4,8	5,4	1,9	9,0	4,0	20,30
4	94,5	84,1	10,4	93,5	73,2	20,3	46,3	43,0	-3,3	2,8	3,0	5,9	5,2	16,90
5	93,7	66,6	27,1	96,6	70,7	25,9	57,7	56,7	-1,0	8,4	9,3	12,9	4,1	34,70
6	92,8	85,9	6,9	99,8	85,4	14,4	76,6	74,3	-2,3	1,6	0,8	2,8	1,6	6,80
7	94,8	83,3	11,5	96,3	77,9	18,4	39,3	38,4	-0,9	3,4	2,7	4,2	4,8	15,10
8	92,1	80,5	11,6	99,6	78,2	21,4	69,4	69,5	0,1	1,7	1,8	5,7	4,2	13,40
9	94,1	83,5	10,6	97,1	87,5	9,6	41,0	38,2	-2,8	2,9	1,3	3,0	0,3	7,50
10 (poginil do 2. 11.)	92,1	84,2	7,9	100,2			41,4			0,2	2 iztr.			
11	94,5	72,6	21,9	89,9	72,2	17,7	59,5	57,5	-2,0	2,9	10,8	5,8	5,3	24,80
12	94,0	80,3	13,7	93,6	83,3	10,3	42,5	40,5	-2,0	5,7	4,0	3,9	1,1	14,70
13	92,3	76,2	16,1	100,3	75,0	25,3	55,5	52,8	-2,7	5,9	4,2	10,9	5,0	26,00
14 (marzupij)	95,2	80,2	15,0	95,6	60,0	35,6	63,0			5,4	3,1	14,6	11,7	34,80
15	96,7	82,3	14,4	98,0	77,1	20,9	48,7	45,0	-3,7	4,4	2,8	7,5	3,4	18,10
mediana	94,1	82,3	11,6	97,1	75,5	21,2	55,5	52,8	-2,3	3,4	2,7	6,7	4,5	18,45
povprečje	94,0	80,8	13,2	96,2	74,7	21,2	54,3	52,3	-2,3	3,8	3,1	7,6	4,8	19,77
SE	0,3	1,4	1,4	1,1	2,1	1,9	3,1	3,4	0,4	0,6	0,8	1,0	0,9	2,3

Oznake in kratice:

m – masa

Δ *m* – razlika mase

zač. – začetna

kon. – končna

tret. – tretiranih

p. – poskus

iztr. – iztrebki

PRILOGA C8: 36. poskus (Cu), prehranjevanje, skupina Cu nano 5000, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani

Cu nano 5000, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani														
Poskusni osebek	Zač. <i>m</i> tret. listov (1.–14. dan) [mg]	Kon. <i>m</i> tret. listov (1.–14. dan) [mg]	Δ <i>m</i> tret. listov (1.–14. dan) [mg]	Zač. <i>m</i> čistih listov (15.–28. dan) [mg]	Kon. <i>m</i> čistih listov (15.–28. dan) [mg]	Δ <i>m</i> čistih listov (15.–28. dan) [mg]	<i>m</i> živali pred p. [mg]	<i>m</i> živali po p. [mg]	Δ <i>m</i> živali [mg]	<i>m</i> iztr. po 7 dneh [mg]	<i>m</i> iztr. po 14 dneh [mg]	<i>m</i> iztr. po 21 dneh [mg]	<i>m</i> iztr. po 28 dneh [mg]	Skupna <i>m</i> iztr. [mg]
1 (poginil do 3. 11.)	96,2	86,9	9,3	98,7			39,1			0,0	0,0	0,1		
2	94,4	81,2	13,2	100,9	71,0	29,9	39,1	36,7	-2,4	4,4	2,4	14,9	7,3	29,00
3 (poginil do 8. 11.)	92,5	83,4	9,1	99,9			43,9			2,2	1,0	1,9		
4	96,7	86,7	10,0	98,0	79,4	18,6	49,1	49,0	-0,1	4,6	0,8	6,3	3,4	15,10
5 (poginil do 15. 10.)	95,2						47,6							
6	91,7	79,7	12,0	98,6	83,5	15,1	72,0	71,8	-0,2	4,9	1,1	2,2	1,3	9,50
7	95,0	88,0	7,0	97,9	89,0	8,9	58,8	56,4	-2,4	2,1	1,0	2,1	0,8	6,00
8	92,0	78,5	13,5	98,3	81,3	17,0	56,0	51,0	-5,0	6,4	3,6	7,3	4,5	21,80
9	95,2	85,6	9,6	97,9	84,8	13,1	44,0	41,6	-2,4	1,0	1,7	5,0	1,6	9,30
10	95,4	85,0	10,4	94,3	79,3	15,0	44,9	46,6	1,7	2,2	0,7	4,8	3,7	11,40
11 (poginil do 18. 10.)	94,8						36,7							
12	96,2	88,8	7,4	103,4	90,1	13,3	53,3	41,5	-11,8	1,7	0,5	4,3	1,9	8,40
13	94,1	87,8	6,3	101,6	86,8	14,8	39,4	38,0	-1,4	2,1	1,3	5,0	2,8	11,20
14	94,9	87,0	7,9	92,0	78,6	13,4	77,5	77,1	-0,4	1,5	1,7	3,6	2,0	8,80
15	91,3	82,9	8,4	91,5	71,2	20,3	69,6	65,1	-4,5	2,8	0,9	5,0	5,0	13,70
mediana	94,9	85,6	9,3	98,3	81,3	15,0	47,6	49,0	-2,4	2,2	1,0	4,8	2,8	11,20
povprečje	94,4	84,7	9,5	97,9	81,4	16,3	51,4	52,3	-2,6	2,8	1,3	4,8	3,1	13,11
SE	0,4	0,9	0,6	1,0	1,9	1,6	3,3	4,2	1,1	0,5	0,3	1,0	0,6	2,0

Oznake in kratice:

m – masa

Δ *m* – razlika mase

zač. – začetna

kon. – končna

tret. – tretiranih

p. – poskus

iztr. – iztrebki

PRILOGA C9: 36. poskus (Cu), prehranjevanje, skupina $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 2000, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani

$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 2000, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani														
Poskusni osebek	Zač. <i>m</i> tret. listov (1.–14. dan) [mg]	Kon. <i>m</i> tret. listov (1.–14. dan) [mg]	Δm tret. listov (1.–14. dan) [mg]	Zač. <i>m</i> čistih listov (15.–28. dan) [mg]	Kon. <i>m</i> čistih listov (15.–28. dan) [mg]	Δm čistih listov (15.–28. dan) [mg]	<i>m</i> živali pred p. [mg]	<i>m</i> živali po p. [mg]	Δm živali [mg]	<i>m</i> iztr. po 7 dneh [mg]	<i>m</i> iztr. po 14 dneh [mg]	<i>m</i> iztr. po 21 dneh [mg]	<i>m</i> iztr. po 28 dneh [mg]	Skupna <i>m</i> iztr. [mg]
1 (poginil do 15. 10.)	96,3						59,0							
2 (poginil do 25. 10.)	94,3						64,2			0,0				
3 (poginil do 25. 10.)	96,1						42,4			1,4				
4	90,8	83,3	7,5	100,4	74,6	25,8	81,4	79,8	-1,6	1,9	1,3	13,3	2,4	18,90
5	95,3	87,7	7,6	99,0	69,3	29,7	67,7	61,4	-6,3	3,0	1,0	9,2	9,0	22,20
6	92,3	80,8	11,5	99,7	81,6	18,1	57,9	54,7	-3,2	3,3	3,4	5,8	5,7	18,20
7	94,5	77,3	17,2	98,6	67,0	31,6	51,2	51,4	0,2	3,7	5,2	13,3	9,9	32,10
8	89,8	77,9	11,9	95,6	77,5	18,1	67,7	63,6	-4,1	5,0	0,1	5,3	2,5	12,90
9	92,5	83,9	8,6	96,5	77,2	19,3	38,0	35,3	-2,7	3,1	0,8	3,5	5,0	12,40
10	95,7	85,7	10,0	93,2	58,9	34,3	61,7	62,0	0,3	3,7	1,7	8,6	11,3	25,30
11	90,4	80,9	9,5	88,7	67,9	20,8	36,8	35,9	-0,9	3,1	1,7	7,5	4,3	16,60
12	90,4	73,3	17,1	91,8	72,1	19,7	59,3	56,7	-2,6	4,6	6,4	2,4	5,7	19,10
13	94,0	85,5	8,5	96,2	81,7	14,5	66,4	65,4	-1,0	2,7	2,2	4,6	1 iztr.	9,50
14	92,8	79,9	12,9	95,6	77,5	18,1	48,4	43,4	-5,0	5,5	2,9	3,8	3,2	15,40
15	94,5	79,5	15,0	97,0	84,1	12,9	54,8	44,0	-10,8	2,7	5,7	3,4	1,8	13,60
mediana	94,0	80,9	10,8	96,4	75,9	19,5	59,0	55,7	-2,7	3,1	2,0	5,6	4,7	17,40
povprečje	93,3	81,3	11,4	96,0	74,1	21,9	57,1	54,5	-3,1	3,1	2,7	6,7	5,1	18,02
SE	0,6	1,2	1,0	1,0	2,1	2,0	3,2	3,8	0,9	0,4	0,6	1,1	1,0	1,8

Oznake in kratice:

m – masa

Δm – razlika mase

zač. – začetna

kon. – končna

tret. – tretiranih

p. – poskus

iztr. – iztrebki

PRILOGA C10: 36. poskus (Cu), prehranjevanje, skupina $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 5000, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani

$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 5000, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani														
Poskusni osebek	Zač. m tret. listov (1.–14. dan) [mg]	Kon. m tret. listov (1.–14. dan) [mg]	Δm tret. listov (1.–14. dan) [mg]	Zač. m čistih listov (15.–28. dan) [mg]	Kon. m čistih listov (15.–28. dan) [mg]	Δm čistih listov (15.–28. dan) [mg]	m živali pred p. [mg]	m živali po p. [mg]	Δm živali [mg]	m iztr. po 7 dneh [mg]	m iztr. po 14 dneh [mg]	m iztr. po 21 dneh [mg]	m iztr. po 28 dneh [mg]	Skupna m iztr. [mg]
1	90,7	85,2	5,5	98,2	81,8	16,4	36,6	31,6	-5,0	0,0	0,6	3,4	3,2	7,20
2	94,8	77,2	17,6	92,6	72,6	20,0	43,8	43,5	-0,3	4,7	2,1	7,8	3,0	17,60
3	97,7	86,9	10,8	96,5	67,1	29,4	44,1	43,3	-0,8	5,0	1,5	9,6	8,7	24,80
4	89,1	78,7	10,4	99,7	80,3	19,4	72,0	68,3	-3,7	4,8	2,7	6,8	4,4	18,70
5	95,5	82,8	12,7	100,8	82,3	18,5	49,8	47,0	-2,8	1,7	1,1	4,2	5,5	12,50
6	96,6	84,9	11,7	101,3	84,8	16,5	36,3	35,3	-1,0	1,1	2 iztr.	5,2	2,1	8,40
7	93,5	88,3	5,2	94,5	72,4	22,1	51,2	50,4	-0,8	2,4	5 iztr.	6,0	4,9	13,30
8	93,4	87,8	5,6	86,7	64,1	22,6	67,1	64,8	-2,3	2,7	2 iztr.	10,2	5,2	18,10
9	96,4	85,9	10,5	100,3	88,3	12,0	58,6	56,4	-2,2	0,6	0,4	4,0	4,3	9,30
10	94,0	86,4	7,6	92,8	82,6	10,2	64,8	65,2	0,4	1,0	0,0	3,6	0,7	5,30
11	95,9	89,2	6,7	99,9	84,6	15,3	47,7	45,6	-2,1	2,7	0,9	3,7	1,6	8,90
12	94,0	81,7	12,3	99,5	82,2	17,3	47,6	45,4	-2,2	0,8	1,2	4,4	1,2	7,60
13	86,9	79,2	7,7	89,1	72,9	16,2	67,6	65,8	-1,8	3,3	0,5	5,5	2,1	11,40
14	98,0	83,5	14,5	92,4	74,1	18,3	47,8	41,3	-6,5	1,8	2,4	8,2	3,9	16,30
15	95,9	86,4	9,5	96,1	87,4	8,7	45,4	43,6	-1,8	1,0	0,0	0,8	1,0	2,80
mediana	94,8	85,2	10,4	96,5	81,8	17,3	47,8	45,6	-2,1	1,8	0,6	5,2	3,2	11,40
povprečje	94,2	84,3	9,9	96,0	78,5	17,5	52,0	49,8	-2,2	2,2	0,9	5,6	3,5	12,15
SE	0,8	0,9	0,9	1,2	1,9	1,3	2,9	3,0	0,5	0,4	0,2	0,7	0,6	1,5

Oznake in kratice:

m – masa

Δm – razlika mase

zač. – začetna

kon. – končna

tret. – tretiranih

p. – poskus

iztr. – iztrebki

PRILOGA C11: 36. poskus (Cu), prehranski indeksi, 28-dnevna kontrolna skupina

Kontrola, 28 dni							
Poskusni osebek	Stopnja prehranjevanja (SP), 1.–14. dan	Stopnja prehranjevanja (SP), 15. –28. dan	Stopnja iztrebljanja (SI), 1.–14. dan	Stopnja iztrebljanja (SI), 15. –28. dan	Stopnja iztrebljanja (SI), skupno	Učinkovitost asimilacije hrane (UA), 1.–14. dan [%]	Učinkovitost asimilacije hrane (UA), 15. –28. dan [%]
1	0,37	0,65	0,15	0,37	0,52	57,6	43,3
2 (poginil do 25. 10.)							
3	0,23	0,33	0,14	0,11	0,25	39,0	66,7
4 (poginil do 2. 11.)						53,6	
5 (poginil do 15. 10.)							
6	0,53	0,54	0,39	0,21	0,60	26,4	61,2
7 (poginil do 8. 11.)						43,5	
8	0,29	0,26	0,21	0,08	0,29	27,0	69,4
9	0,22	0,49	0,12	0,32	0,43	47,4	35,3
10	0,14	0,42	0,07	0,25	0,32	48,3	41,1
11	0,19	0,38	0,10	0,16	0,26	45,9	58,6
12	0,41	0,57	0,25	0,34	0,59	39,2	39,7
13	0,21	0,56	0,10	0,29	0,39	52,9	47,6
14 (poginil do 8. 11.)						60,0	
15	0,20	0,30	0,09	0,13	0,22	53,9	55,5
mediana	0,23	0,45	0,13	0,23	0,35	47,4	51,5
povprečje	0,28	0,45	0,16	0,23	0,39	45,8	51,8
SE	0,04	0,04	0,03	0,03	0,04	2,9	3,8

PRILOGA C12: 36. poskus (Cu), prehranski indeksi, skupina Cu nano 2000, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani

Cu nano 2000, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani							
Poskusni osebek	Stopnja prehranjevanja (SP), 1.–14. dan	Stopnja prehranjevanja (SP), 15. –28. dan	Stopnja iztrebljanja (SI), 1.–14. dan	Stopnja iztrebljanja (SI), 15. –28. dan	Stopnja iztrebljanja (SI), skupno	Učinkovitost asimilacije hrane (UA), 1.–14. dan [%]	Učinkovitost asimilacije hrane (UA), 15. –28. dan [%]
1	0,15	0,76	0,04	0,56	0,59	76,6	26,4
2	0,15	0,34	0,08	0,20	0,28	47,0	40,8
3	0,24	0,38	0,12	0,22	0,35	49,0	42,0
4	0,23	0,45	0,13	0,25	0,38	44,2	45,3
5	0,47	0,45	0,31	0,30	0,61	34,7	34,4
6	0,09	0,19	0,03	0,06	0,09	65,2	69,4
7	0,30	0,47	0,16	0,23	0,39	47,0	51,1
8	0,17	0,31	0,05	0,14	0,19	69,8	53,7
9	0,27	0,24	0,11	0,08	0,19	60,4	65,6
10 (poginil do 2. 11.)						97,5	
11	0,37	0,30	0,23	0,19	0,42	37,4	37,3
12	0,33	0,25	0,23	0,12	0,35	29,2	51,5
13	0,30	0,47	0,19	0,29	0,48	37,3	37,2
14 (marzupij)						43,3	26,1
15	0,31	0,45	0,15	0,23	0,39	50,0	47,8
mediana	0,27	0,38	0,13	0,22	0,38	47,0	43,6
povprečje	0,26	0,39	0,14	0,22	0,36	52,6	44,9
SE	0,03	0,04	0,02	0,03	0,04	4,7	3,4

PRILOGA C13: 36. poskus (Cu), prehranski indeksi, skupina Cu nano 5000, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani

Cu nano 5000, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani							
Poskusni osebek	Stopnja prehranjevanja (SP), 1.–14. dan	Stopnja prehranjevanja (SP), 15. –28. dan	Stopnja iztrebljanja (SI), 1.–14. dan	Stopnja iztrebljanja (SI), 15. –28. dan	Stopnja iztrebljanja (SI), skupno	Učinkovitost asimilacije hrane (UA), 1.–14. dan [%]	Učinkovitost asimilacije hrane (UA), 15. –28. dan [%]
1 (poginil do 3. 11.)							
2	0,35	0,79	0,18	0,59	0,77	48,5	25,8
3 (poginil do 8. 11.)						64,8	
4	0,20	0,38	0,11	0,20	0,31	46,0	47,8
5 (poginil do 15. 10.)							
6	0,17	0,21	0,08	0,05	0,13	50,0	76,8
7	0,12	0,15	0,05	0,05	0,10	55,7	67,4
8	0,25	0,32	0,19	0,22	0,41	25,9	30,6
9	0,22	0,31	0,06	0,15	0,22	71,9	49,6
10	0,23	0,33	0,06	0,19	0,25	72,1	43,3
11 (poginil do 18. 10.)							
12	0,16	0,28	0,05	0,13	0,18	70,3	53,4
13	0,16	0,38	0,09	0,20	0,29	46,0	47,3
14	0,10	0,17	0,04	0,07	0,11	59,5	58,2
15	0,12	0,30	0,05	0,15	0,20	56,0	50,7
mediana	0,17	0,31	0,06	0,15	0,22	55,8	49,6
povprečje	0,19	0,33	0,09	0,18	0,27	55,6	50,1
SE	0,02	0,05	0,02	0,04	0,06	3,9	4,4

PRILOGA C14: 36. poskus (Cu), prehranski indeksi, skupina $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 2000, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani

$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 2000, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani							
Poskusni osebek	Stopnja prehranjevanja (SP), 1.–14. dan	Stopnja prehranjevanja (SP), 15. –28. dan	Stopnja iztrebljanja (SI), 1.–14. dan	Stopnja iztrebljanja (SI), 15. –28. dan	Stopnja iztrebljanja (SI), skupno	Učinkovitost asimilacije hrane (UA), 1.–14. dan [%]	Učinkovitost asimilacije hrane (UA), 15. –28. dan [%]
1 (poginil do 15. 10.)							
2 (poginil do 25. 10.)							
3 (poginil do 25. 10.)							
4	0,09	0,32	0,04	0,19	0,23	57,3	39,1
5	0,12	0,46	0,06	0,28	0,34	47,4	38,7
6	0,20	0,32	0,12	0,20	0,32	41,7	36,5
7	0,34	0,62	0,17	0,45	0,63	48,3	26,6
8	0,18	0,28	0,08	0,12	0,20	57,1	56,9
9	0,23	0,53	0,11	0,23	0,34	54,7	56,0
10	0,16	0,55	0,09	0,32	0,41	46,0	42,0
11	0,26	0,57	0,13	0,32	0,46	49,5	43,3
12	0,29	0,34	0,19	0,14	0,33	35,7	58,9
13	0,13	0,22	0,07	0,07	0,14	42,4	68,3
14	0,28	0,39	0,18	0,15	0,34	34,9	61,3
15	0,30	0,26	0,17	0,11	0,28	44,0	59,7
mediana	0,22	0,37	0,11	0,20	0,33	46,7	49,6
povprečje	0,22	0,41	0,12	0,22	0,33	46,6	48,9
SE	0,02	0,04	0,01	0,03	0,04	2,1	3,7

PRILOGA C15: 36. poskus (Cu), prehranski indeksi, skupina Cu(NO₃)₂·3H₂O 5000, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani

Cu(NO ₃) ₂ ·3H ₂ O 5000, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani							
Poskusni osebek	Stopnja prehranjevanja (SP), 1.–14. dan	Stopnja prehranjevanja (SP), 15. –28. dan	Stopnja iztrebljanja (SI), 1.–14. dan	Stopnja iztrebljanja (SI), 15. –28. dan	Stopnja iztrebljanja (SI), skupno	Učinkovitost asimilacije hrane (UA), 1.–14. dan [%]	Učinkovitost asimilacije hrane (UA), 15. –28. dan [%]
1	0,16	0,48	0,02	0,19	0,21	89,1	59,8
2	0,40	0,46	0,16	0,25	0,40	61,4	46,0
3	0,25	0,67	0,15	0,42	0,57	39,8	37,8
4	0,15	0,28	0,11	0,16	0,27	27,9	42,3
5	0,26	0,38	0,06	0,20	0,26	78,0	47,6
6	0,33	0,46	0,03	0,20	0,23	90,6	55,8
7	0,10	0,44	0,05	0,21	0,26	53,8	50,7
8	0,08	0,34	0,04	0,23	0,27	51,8	31,9
9	0,18	0,21	0,02	0,14	0,16	90,5	30,8
10	0,12	0,16	0,02	0,07	0,08	86,8	57,8
11	0,14	0,33	0,08	0,11	0,19	46,3	65,4
12	0,26	0,37	0,04	0,12	0,16	83,7	67,6
13	0,12	0,24	0,06	0,11	0,17	50,6	53,1
14	0,33	0,41	0,09	0,27	0,37	71,0	33,9
15	0,21	0,20	0,02	0,04	0,06	89,5	79,3
mediana	0,18	0,37	0,05	0,19	0,23	71,0	50,7
povprečje	0,21	0,36	0,06	0,18	0,24	67,4	50,6
SE	0,02	0,03	0,01	0,02	0,03	5,5	3,6

PRILOGA C16: združeni podatki 33. in 36. poskusa (Cu), vsebnost kovine v telesnih delih enakonožcev, 14-dnevna kontrolna skupina

Kontrola, 14 dni													
Zaporedna številka poskusa	Poskusni osebek	konc. Cu v delu telesa [µg/g suhe mase]				suha masa telesa [mg]				masa Cu v telesu [µg]			
		Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ
33.	1	5676	677,1	65,01	309,40	0,28	0,32	6,63	7,23	1,59	0,22	0,43	2,24
	2	2756	293,5	77,06	216,94	0,43	0,94	8,32	9,69	1,19	0,28	0,64	2,10
	3	2498	487,3	72,20	269,46	0,72	0,44	8,62	9,78	1,80	0,21	0,62	2,64
	4	2080	784,1	69,92	334,62	1,06	0,23	7,38	8,67	2,20	0,18	0,52	2,90
	5	5252	480,5	131,7	314,91	0,36	0,43	10,09	10,88	1,89	0,21	1,33	3,43
	6		1092	56,24			0,19	14,04		0,00	0,21	0,79	1,00
36.	7	7073	13,17	4,99	453,17	0,64	0,38	9,08	10,10	4,53	0,01	0,05	4,58
	8	3563	37,14	57,18	342,51	1,16	0,74	12,30	14,20	4,13	0,03	0,70	4,86
	9	5212	33,44	57,56	265,00	0,48	1,09	10,23	11,80	2,50	0,04	0,59	3,13
	10	5052	29,86	58,52	422,43	1,09	1,10	12,68	14,87	5,51	0,03	0,74	6,28
mediana		5052	387,0	61,77	314,91	0,64	0,43	9,58	10,10	2,05	0,19	0,63	3,01
povprečje		4351	392,8	65,04	325,38	0,69	0,59	9,94	10,80	2,53	0,14	0,64	3,31
SE		565	119,3	9,72	25,01	0,11	0,11	0,76	0,83	0,53	0,03	0,10	0,49

Oznake:

Hep – hepatopankreas

Gut – črevo

Rest – preostanek telesa

PRILOGA C17: združeni podatki 33. in 36. poskusa (Cu), vsebnost kovine v telesnih delih enakonožcev, skupina Cu nano 2000, 14 dni na tretirani hrani

Cu nano 2000, 14 dni na tretirani hrani																
Zaporedna številka poskusa	Poskusni osebek	konc. Cu v delu telesa [µg/g suhe mase]				suha masa telesa [mg]				masa Cu v telesu [µg]				Zaužiti Cu skupno [µg]	UA _{Cu} [%]	BAF
		Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ			
33.	1	12902	4475	90,9	1253,04	0,55	0,98	8,23	9,76	7,10	4,39	0,75	12,23	45,6	19,6	0,63
	2	11996	1221	114,6	738,24	0,35	1,01	7,10	8,46	4,20	1,23	0,81	6,25	35,2	8,3	0,37
	3	14088	2637	169,2	932,97	0,26	0,83	6,33	7,42	3,66	2,19	1,07	6,92	40,0	9,0	0,47
	4	8870	1759	80,21	511,16	0,49	0,52	11,01	12,02	4,35	0,91	0,88	6,14	26,8	10,6	0,26
	5	15616		98,34	605,77	0,31		9,17	9,48	4,84	0,00	0,90	5,74	33,2	7,3	0,30
	6	12568	751,8	54,38	424,86	0,24	0,48	8,29	9,01	3,02	0,36	0,45	3,83	17,8	2,9	0,21
	7	32160	1291	130,3	1301,72	0,27	1,37	7,10	8,74	8,68	1,77	0,93	11,38	33,0	24,4	0,65
	8	8276	695,0	93,93	590,49	0,42	0,52	6,61	7,55	3,48	0,36	0,62	4,46	26,6	4,3	0,30
	9	7016	2543	97,71	715,41	0,68	0,39	8,09	9,16	4,77	0,99	0,79	6,55	45,2	7,2	0,36
	10	9408	2334	126,0	690,09	0,37	0,33	6,68	7,38	3,48	0,77	0,84	5,09	21,0	8,5	0,35
	11	5626	1188	171,6	613,70	0,44	0,44	5,56	6,44	2,48	0,52	0,95	3,95	27,2	2,4	0,31
	12	8022	2121	85,61	675,99	0,43	0,58	6,77	7,78	3,45	1,23	0,58	5,26	34,8	5,6	0,34
	13	2758	1078	74,31	533,08	0,77	0,35	4,15	5,27	2,12	0,38	0,31	2,81	17,8		0,27
	14	10660	2348	69,82	913,88	0,29	0,56	4,30	5,15	3,09	1,31	0,30	4,71	29,2	4,8	0,46
36.	15	7774	166,8	188,42	346,52	0,26	0,47	11,68	12,41	2,02	0,08	2,20	4,30	21,8	4,5	0,17
	16	14222	951,4	37,56	888,08	0,55	0,37	8,65	9,57	7,82	0,35	0,32	8,50	36,0	14,4	0,44
	17	4815	438,6	178,24	480,51	0,48	0,31	6,84	7,63	2,31	0,14	1,22	3,67	33,6	1,1	0,24
	18	8376	438,6	14,72	561,32	0,42	0,11	5,98	6,51	3,52	0,05	0,09	3,65	27,2	1,3	0,28
	19	5361	3008	141,48	622,72	0,72	0,21	8,13	9,06	3,86	0,63	1,15	5,64	36,0	6,5	0,31
mediana		8870	1256	97,71	622,72	0,42	0,48	7,10	8,46	3,52	0,63	0,81	5,26	33,0	6,8	0,31
povprečje		10553	1636	106,18	705,24	0,44	0,55	7,40	8,36	4,12	0,93	0,80	5,85	30,9	7,9	0,35
SE		1447	262	11,11	58,52	0,04	0,07	0,44	0,44	0,43	0,24	0,11	0,58	0,9	0,9	0,58

Oznake in kratice:

UA_{Cu} – ocena učinkovitosti asimilacije Cu

BAF – ocena bioakumulacijskega faktorja

Hep – hepatopankreas

Gut – črevo

Rest – preostanek telesa

PRILOGA C18: združeni podatki 33. in 36. poskusa (Cu), vsebnost kovine v telesnih delih enakonožcev, skupina Cu nano 5000, 14 dni na tretirani hrani

Cu nano 5000, 14 dni na tretirani hrani																
Zaporedna številka poskusa	Poskusni osebek	konc. Cu v delu telesa [µg/g suhe mase]				suha masa telesa [mg]				masa Cu v telesu [µg]				Zaužiti Cu skupno [µg]	UA _{Cu} [%]	BAF
		Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ			
33.	1	7808	1703	78,22	639,04	0,35	0,72	5,84	6,91	2,73	1,23	0,46	4,42	75,0	1,5	0,13
	2	6598	1436	119,3	544,48	0,47	0,19	7,09	7,75	3,10	0,27	0,85	4,22	75,0	1,2	0,11
	3	7402	1123	61,01	445,54	0,50	1,66	11,97	14,13	3,70	1,86	0,73	6,30	85,5	3,5	0,09
	4	7784	4836	250,6	742,90	0,41	0,21	7,61	8,23	3,19	1,02	1,91	6,11	104,5	2,7	0,15
	5	19840		119,5		0,16		5,19		3,17	0,00	0,62	3,79			
	6	33210	2502	78,15	906,30	0,17	0,70	7,98	8,85	5,65	1,75	0,62	8,02	102,0	4,6	0,18
	7	16700	25570	278,2	868,25	0,24	0,07	9,37	9,68	4,01	1,79	2,61	8,40	95,0	5,4	0,17
	8	13390	10000	96,67	774,51	0,27	0,09	6,25	6,61	3,62	0,90	0,60	5,12	57,0	3,2	0,15
	9	12970	12480	123,1	1064,06	0,23	0,15	4,73	5,11	2,98	1,87	0,58	5,44	62,5	3,4	0,21
	10	9779	1978	187,3	842,32	0,26	0,14	3,79	4,19	2,54	0,28	0,71	3,53	39,0	0,6	0,17
	11	35140	2422	92,28	922,60	0,08	0,55	4,29	4,92	2,81	1,33	0,40	4,54	54,5	2,3	0,18
36.	12	11484	1152,6	70,34	748,32	0,50	0,91	8,46	9,87	5,74	1,05	0,60	7,39	54,5	7,5	0,15
	13	8169	387,8	23,64	732,60	0,89	0,34	9,17	10,40	7,27	0,13	0,22	7,62	70,0	6,2	0,15
	14	5187	1062,4	63,44	553,39	0,97	0,42	9,61	11,00	5,03	0,45	0,61	6,09	47,5	5,8	0,11
	15	7416	936,0	56,66	674,52	1,02	0,38	11,29	12,69	7,56	0,36	0,64	8,56	64,5	8,1	0,13
mediana		9779	1841	92,28	745,61	0,35	0,36	7,61	8,54	3,62	1,02	0,62	6,09	67,3	3,4	0,15
povprečje		13525	4828	113,23	747,06	0,43	0,47	7,51	8,60	4,21	0,95	0,81	5,97	70,5	4,0	0,15
SE		2400	1864	18,67	44,95	0,08	0,12	0,65	0,78	0,43	0,17	0,16	0,44	0,2	0,4	0,44

Oznake in kratice:

Hep – hepatopankreas

Gut – črevo

Rest – preostanek telesa

UA_{Cu} – ocena učinkovitosti asimilacije Cu

BAF – ocena bioakumulacijskega faktorja

PRILOGA C19: združeni podatki 33. in 36. poskusa (Cu), vsebnost kovine v telesnih delih enakonožcev, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 2000, 14 dni na tretirani hrani

$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 2000, 14 dni na tretirani hrani																
Zaporedna številka poskusa	Poskusni osebek	konc. Cu v delu telesa [$\mu\text{g/g}$ suhe mase]				suha masa telesa [mg]				masa Cu v telesu [μg]				Zaužiti Cu skupno [μg]	UA_{Cu} [%]	BAF
		Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ			
33.	1	9450	7181	186,5	599,72	0,47	0,50	18,03	19,00	4,44	3,59	3,36	11,39	59,0	13,7	0,30
	2	11860	571,3	47,17	555,29	0,29	0,89	6,48	7,66	3,44	0,51	0,31	4,25	26,2	3,6	0,28
	3	10030	1306	50,61	656,69	0,43	1,12	7,85	9,40	4,31	1,46	0,40	6,17	34,8	8,2	0,33
	4	10840	5777	329,1	1517,33	0,53	0,55	6,13	7,21	5,75	3,18	2,02	10,94	36,4	21,0	0,76
	5	3925	684,9	132,2	434,20	0,79	1,07	10,02	11,88	3,10	0,73	1,32	5,16	34,4	5,4	0,22
	6	8976	1912	149,3	482,10	0,34	0,75	11,90	12,99	3,05	1,43	1,78	6,26	40,0	7,4	0,24
	7	9710	2334	62,91	599,70	0,30	0,21	5,77	6,28	2,91	0,49	0,36	3,77	50,2	0,9	0,30
	8	7563	3663	117,0	749,76	0,59	0,31	7,78	8,68	4,46	1,14	0,91	6,51	46,2	6,9	0,37
	9	7916	11780	117,0	1159,60	0,56	0,22	5,87	6,65	4,43	2,59	0,69	7,71	49,8	8,8	0,58
	10	14290	2761	123,9	1087,80	0,28	0,89	5,38	6,55	4,00	2,46	0,67	7,13	55,8	6,8	0,54
	11	9231	1176	120,8	652,44	0,37	0,68	6,64	7,69	3,42	0,80	0,80	5,02	38,2	4,5	0,33
36.	12	7341	141,8	69,84	623,89	1,01	0,81	11,54	13,36	7,41	0,11	0,81	8,34			0,31
	13	7173	745,0	65,46	424,02	0,46	0,27	8,90	9,63	3,30	0,20	0,58	4,08	17,0	4,5	0,21
	14	7314	1932	30,90	612,07	0,50	0,31	6,47	7,28	3,66	0,60	0,20	4,46	21,4	5,4	0,31
	15	13314	637,0	59,38	853,05	0,56	0,89	8,55	10,00	7,46	0,57	0,51	8,53	28,2	18,5	0,43
	16	7437	777,6	84,84	598,49	0,83	0,63	11,27	12,73	6,17	0,49	0,96	7,62	15,2	28,3	0,30
mediana		9104	1609	100,92	617,98	0,48	0,65	7,81	9,04	4,16	0,77	0,74	6,39	36,4	6,9	0,31
povprečje		9148	2711	109,18	725,38	0,52	0,63	8,66	9,81	4,46	1,27	0,98	6,71	36,9	9,6	0,36
SE		646	778	18,15	73,84	0,05	0,08	0,83	0,86	0,37	0,27	0,20	0,58	1,8	1,8	0,58

Oznake in kratice:

Hep – hepatopankreas

Gut – črevo

Rest – preostanek telesa

UA_{Cu} – ocena učinkovitosti asimilacije Cu

BAF – ocena bioakumulacijskega faktorja

PRILOGA C20: združeni podatki 33. in 36. poskusa (Cu), vsebnost kovine v telesnih delih enakonožcev, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 5000, 14 dni na tretirani hrani

$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 5000, 14 dni na tretirani hrani																
Zaporedna številka poskusa	Poskusni osebek	konc. Cu v delu telesa [$\mu\text{g/g}$ suhe mase]				suha masa telesa [mg]				masa Cu v telesu [μg]				Zaužiti Cu skupno [μg]	UA_{Cu} [%]	BAF
		Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ			
33.	1	12660	1852	85,07	748,56	0,31	0,55	6,48	7,34	3,92	1,02	0,55	5,49	65,0	3,4	0,15
	2	11560	4377	156,8	944,41	0,26	0,63	6,25	7,14	3,01	2,76	0,98	6,74	67,5	5,1	0,19
	3	8151	4848	71,43	1035,64	0,54	0,54	6,12	7,20	4,40	2,62	0,44	7,46	83,0	5,0	0,21
	4	20610	1246	162,9	949,33	0,24	1,14	6,43	7,81	4,95	1,42	1,05	7,41	68,5	6,0	0,19
	5	19290	1392	113,9	994,59	0,23	0,78	5,13	6,14	4,44	1,09	0,58	6,11	87,0	3,2	0,20
	6	7642	2457	97,24	639,49	0,50	0,35	7,63	8,48	3,82	0,86	0,74	5,42	63,0	3,4	0,13
	7		992,5	62,46		0,80	1,19	15,66	17,65	0,00	1,18	0,98	2,16			
	8	7458	4982	297,7	923,87	0,38	0,28	5,78	6,44	2,83	1,39	1,72	5,95	81,5	3,2	0,18
	9	4311	3271	178,3	790,39	0,63	0,31	4,88	5,82	2,72	1,01	0,87	4,60	89,0	1,4	0,16
	10	5845	2192	118,6	780,59	0,64	0,71	6,41	7,76	3,74	1,56	0,76	6,06	61,5	4,5	0,16
	11	12310	9737	114,7	1108,99	0,39	0,29	6,91	7,59	4,80	2,82	0,79	8,42	82,0	6,2	0,22
	12	7356	7786	131,9	753,26	0,45	0,12	6,14	6,71	3,31	0,93	0,81	5,05	83,5	2,1	0,15
	13	8447		105,6		0,52		7,47		4,39	0,00	0,79	5,18			
	14	25650	3084	99,92	813,52	0,13	0,47	6,02	6,62	3,33	1,45	0,60	5,39	42,5	4,9	0,16
	15	6134	3491	74,26	604,55	0,37	0,23	5,11	5,71	2,27	0,80	0,38	3,45	69,0	0,2	0,12
36.	16	10242	1975,4	40,98	746,24	0,56	0,35	8,15	9,06	5,74	0,69	0,33	6,76	28,0	12,3	0,15
	17	4059	100,8	163,98	357,73	0,49	0,34	8,91	9,74	1,99	0,03	1,46	3,48	52,0	0,3	0,07
	18	4584	790,0	77,98	490,33	1,04	0,31	10,55	11,90	4,77	0,24	0,82	5,83	42,5	5,9	0,10
mediana		8151	2457	109,75	785,49	0,47	0,35	6,42	7,34	3,78	1,05	0,79	5,66	68,0	3,9	0,16
povprečje		10371	3210	119,65	792,59	0,47	0,51	7,22	8,18	3,58	1,22	0,81	5,61	66,6	4,2	0,16
SE		1498	617	13,82	50,43	0,05	0,07	0,60	0,70	0,32	0,20	0,08	0,36	0,8	0,8	0,08

Oznake in kratice:

UA_{Cu} – ocena učinkovitosti asimilacije Cu

BAF – ocena bioakumulacijskega faktorja

Hep – hepatopankreas

Gut – črevo

Rest – preostanek telesa

PRILOGA C21: 36. poskus (Cu), vsebnost kovine v telesnih delih enakonožcev, 28-dnevna kontrolna skupina

Kontrola, 28 dni												
Poskusni osebek	konc. Cu v delu telesa [µg/g suhe mase]				suha masa telesa [mg]				masa Cu v telesu [µg]			
	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ
1	8058	106,9	178,6	249,83	0,07	0,46	6,75	7,28	0,56	0,05	1,21	1,82
2 (poginil do 25. 10.)												
3												
4 (poginil do 2. 11.)	2995	82,16	153,6	251,87	0,41	0,35	10,84	11,60	1,23	0,03	1,67	2,92
5 (poginil do 15. 10.)												
6	5297	156,8	176,7	326,64	0,21	0,16	6,78	7,15	1,11	0,03	1,20	2,34
7 (poginil do 8. 11.)												
8	3104	1416	312,0	423,46	0,20	0,22	6,77	7,19	0,62	0,31	2,11	3,04
9	496,6	159,1	138,6	156,60	0,59	0,97	11,28	12,84	0,29	0,15	1,56	2,01
10	1691	703,6	48,67	169,90	0,55	0,57	9,41	10,53	0,93	0,40	0,46	1,79
11	3711	1045,4	40,62	278,96	0,48	0,64	8,97	10,09	1,78	0,67	0,36	2,81
12	2921	87,88	102,0	229,55	0,37	0,43	7,33	8,13	1,08	0,04	0,75	1,87
13	571,6	896,8	140,0	193,53	0,40	0,54	9,92	10,86	0,23	0,48	1,39	2,10
14 (poginil do 8. 11.)												
15	2299		255,8		0,60		11,75		1,38		3,01	
mediana	2958	159,1	146,80	249,83	0,41	0,46	9,19	10,09	1,01	0,15	1,30	2,10
povprečje	3114	517,2	154,7	253,37	0,39	0,48	8,98	9,52	0,92	0,24	1,37	2,30
SE	712	169,4	26,6	27,8	0,06	0,08	0,62	0,71	0,16	0,08	0,25	0,17

Oznake:

Hep – hepatopankreas

Gut – črevo

Rest – preostanek telesa

PRILOGA C22: 36. poskus (Cu), vsebnost kovine v telesnih delih enakonožcev, skupina Cu nano 2000, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani

Cu nano 2000, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani												
Poskusni osebek	konc. Cu v delu telesa [µg/g suhe mase]				suha masa telesa [mg]				masa Cu v telesu [µg]			
	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ
1	3496	69,36	357,2	405,19	0,29	1,54	7,90	9,73	1,01	0,11	2,82	3,94
2	3031	1844	170,3	400,11	1,20	0,15	14,68	16,03	3,64	0,28	2,50	6,41
3	6776	357,2	300,9	574,24	0,57	1,20	11,98	13,75	3,86	0,43	3,60	7,90
4	5789	1106	45,58	534,11	0,69	0,34	7,82	8,85	3,99	0,38	0,36	4,73
5	7253	194,5	21,70	538,91	0,92	0,53	11,59	13,04	6,67	0,10	0,25	7,03
6	6356	384,0	173,0	474,51	0,91	0,57	17,58	19,06	5,78	0,22	3,04	9,04
7	5034	130,0	59,56	393,27	0,74	0,47	9,92	11,13	3,73	0,06	0,59	4,38
8	7975	60,72	77,89	373,48	0,69	0,76	16,94	18,39	5,50	0,05	1,32	6,87
9	2529	195,7	87,56	267,91	0,67	0,65	8,14	9,46	1,69	0,13	0,71	2,53
10 (poginil do 2. 11.)												
11	10680	2482	25,65	623,64	0,48	1,28	12,05	13,81	5,13	3,18	0,31	8,61
12	11470	1017	62,00	705,28	0,42	0,56	7,30	8,28	4,82	0,57	0,45	5,84
13	6459	640,4	26,83	564,88	0,88	0,57	9,72	11,17	5,68	0,37	0,26	6,31
14 (marzupij)												
15	7455	42,08	83,40	559,59	0,61	0,61	8,17	9,39	4,55	0,03	0,68	5,25
mediana	6459	357,2	77,89	534,11	0,69	0,57	9,92	11,17	4,55	0,22	0,68	6,31
povprečje	6485	655,6	114,7	493,47	0,70	0,71	11,06	12,47	4,31	0,45	1,30	6,07
SE	740	212,1	29,7	33,37	0,07	0,11	0,97	1,00	0,44	0,23	0,34	0,52

Oznake:

Hep – hepatopankreas

Gut – črevo

Rest – preostanek telesa

PRILOGA C23: 36. poskus (Cu), vsebnost kovine v telesnih delih enakonožcev, skupina Cu nano 5000, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani

Cu nano 5000, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani												
Poskusni osebek	konc. Cu v delu telesa [µg/g suhe mase]				suha masa telesa [mg]				masa Cu v telesu [µg]			
	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ
1 (poginil do 3. 11.)												
2	6320	1893	446,5	585,71	0,14	0,34	8,96	9,44	0,88	0,64	4,00	5,53
3 (poginil do 8. 11.)												
4	4624	751,8	181,1	553,65	0,87	0,46	9,75	11,08	4,02	0,35	1,77	6,13
5 (poginil do 15. 10.)												
6	8666	295,4	171,6	530,87	0,77	0,68	16,99	18,44	6,67	0,20	2,92	9,79
7	9104	80,42	34,94	448,43	0,58	1,08	11,18	12,84	5,28	0,09	0,39	5,76
8	13396	107,7	62,57	896,28	0,76	2,87	8,68	12,31	10,18	0,31	0,54	11,03
9	9798	248,0	80,80	810,36	0,58	0,37	6,86	7,81	5,68	0,09	0,55	6,33
10	9181	62,1	44,15	490,02	0,57	0,73	10,41	11,71	5,23	0,05	0,46	5,74
11 (poginil do 18. 10.)												
12	21460	905,8	186,6	1134,97	0,35	0,17	7,46	7,98	7,51	0,15	1,39	9,06
13	7497	195,6	137,5	578,77	0,51	1,02	7,11	8,64	3,82	0,20	0,98	5,00
14	7896	146,9	91,68	602,33	1,21	0,90	16,48	18,59	9,55	0,13	1,51	11,20
15	9061	695,8	130,5	574,56	0,72	0,77	13,97	15,46	6,52	0,54	1,82	8,88
mediana	9061	248,0	130,5	578,77	0,58	0,73	9,75	11,71	5,68	0,20	1,39	6,33
povprečje	9728	489,3	142,5	655,08	0,64	0,85	10,71	12,21	5,94	0,25	1,48	7,68
SE	1346	166,5	34,5	62,39	0,08	0,22	1,09	1,17	0,79	0,06	0,34	0,71

Oznake:

Hep – hepatopankreas

Gut – črevo

Rest – preostanek telesa

PRILOGA C24: 36. poskus (Cu), vsebnost kovine v telesnih delih enakonožcev, skupina $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 2000, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani

$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 2000, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani												
Poskusni osebek	konc. Cu v delu telesa [$\mu\text{g/g}$ suhe mase]				suha masa telesa [mg]				masa Cu v telesu [μg]			
	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ
1 (poginil do 15. 10.)												
2 (poginil do 25. 10.)												
3 (poginil do 25. 10.)												
4	6278	848,0	351,2	555,07	0,69	0,55	20,16	21,40	4,33	0,47	7,08	11,88
5	8149	188,9	42,46	453,88	0,78	1,52	13,61	15,91	6,36	0,29	0,58	7,22
6	5313	126,2	99,55	427,84	0,84	1,48	11,14	13,46	4,46	0,19	1,11	5,76
7	5252	510,8	19,28	631,97	1,17	0,67	8,69	10,53	6,14	0,34	0,17	6,65
8	8769	111,6	33,79	566,23	0,92	0,66	13,61	15,19	8,07	0,07	0,46	8,60
9	8485	1099	87,04	577,40	0,48	0,31	8,07	8,86	4,07	0,34	0,70	5,12
10	6064	67,86	212,8	402,29	0,56	1,14	14,72	16,42	3,40	0,08	3,13	6,61
11	6782	195,0	66,09	534,19	0,57	0,77	7,05	8,39	3,87	0,15	0,47	4,48
12	14746	1728	299,1	1300,27	0,76	0,99	10,63	12,38	11,21	1,71	3,18	16,10
13	6150	2020	61,02	586,33	1,27	0,52	14,87	16,66	7,81	1,05	0,91	9,77
14	10840	4070	57,89	864,35	0,38	0,82	7,96	9,16	4,12	3,34	0,46	7,92
15	25290	271,8	132,3	1526,35	0,43	0,40	6,97	7,80	10,87	0,11	0,92	11,91
mediana	7466	391,3	76,57	571,82	0,73	0,72	10,89	12,92	5,30	0,31	0,80	7,57
povprečje	9343	936,4	121,9	702,18	0,74	0,82	11,46	13,01	6,23	0,68	1,60	8,50
SE	1647	342,4	31,3	102,71	0,08	0,11	1,16	1,22	0,79	0,28	0,58	0,98

Oznake:

Hep – hepatopankreas

Gut – črevo

Rest – preostanek telesa

PRILOGA C25: 36. poskus (Cu), vsebnost kovine v telesnih delih enakonožcev, skupina $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 5000, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani

$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 5000, 14 dni na tretirani + 14 dni na čisti hrani												
Poskusni osebek	konc. Cu v delu telesa [$\mu\text{g/g}$ suhe mase]				suha masa telesa [mg]				masa Cu v telesu [μg]			
	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ	Hep	Gut	Rest	SKUPAJ
1	5952	33,62	35,24	309,67	0,31	0,61	5,76	6,68	1,85	0,02	0,20	2,07
2	11650	534,6	99,05	651,17	0,44	0,83	8,59	9,86	5,13	0,44	0,85	6,42
3	9504	1245	247,5	718,20	0,45	0,85	9,35	10,65	4,28	1,06	2,31	7,65
4	12190	202,0	68,46	553,32	0,62	0,69	14,38	15,69	7,56	0,14	0,98	8,68
5	7245	1466	35,28	605,96	0,63	1,40	9,44	11,47	4,56	2,05	0,33	6,95
6	16640	293,4	249,2	438,62	0,11	0,65	8,91	9,67	1,83	0,19	2,22	4,24
7	5793	113,5	67,50	415,61	0,81	0,89	11,74	13,44	4,69	0,10	0,79	5,59
8	6554	86,68	56,93	597,68	1,29	0,74	13,51	15,54	8,45	0,06	0,77	9,29
9	3692	81,88	73,39	347,72	1,24	0,44	14,69	16,37	4,58	0,04	1,08	5,69
10	3227	60,80	76,81	321,82	1,35	0,57	15,40	17,32	4,36	0,03	1,18	5,57
11	4792	17,10	55,33	417,77	0,98	0,45	11,33	12,76	4,70	0,01	0,63	5,33
12	7503	205,4	78,60	497,57	0,57	0,46	9,21	10,24	4,28	0,09	0,72	5,10
13		114,7	52,15		1,32	0,49	15,85	17,66		0,06	0,83	
14	6068	21,26	10,52	556,42	0,77	0,30	7,48	8,55	4,67	0,01	0,08	4,76
15	4278	234,6	71,78	418,59	0,99	0,39	10,81	12,19	4,24	0,09	0,78	5,10
mediana	6311	114,7	68,46	468,10	0,77	0,61	10,81	12,19	4,57	0,09	0,79	5,58
povprečje	7506	314,0	85,2	489,30	0,79	0,65	11,10	12,54	4,65	0,29	0,92	5,89
SE	1010	115,0	18,0	34,06	0,10	0,07	0,80	0,87	0,47	0,14	0,16	0,49

Oznake:

Hep – hepatopankreas

Gut – črevo

Rest – preostanek telesa

Priloga D1

Povzetek median, povprečnih vrednosti in standardnih napak za vsebnost cinka v telesni delih enakonožcev pri prehranjevalnem poskusu s cinkom (poskus št. 14).

Tabela D1-a. Koncentracije Zn v telesnih delih modelnih organizmov po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano, določene z metodo FAAS.

TRETMA		Hepatopankreas (µg/g suhe mase)	Črevo (µg/g suhe mase)	Preostanek telesi (µg/g suhe mase)	Celo telo (µg/g suhe mase)
Kontrola	mediana	995	98	91	152
	povprečje	968	123	91	151
	SE	115	28	11	15
ZnO nano 1500	mediana	1293	855	106	270
	povprečje	2345	1040	121	291
	SE	610	242	17	33
ZnO nano 4000	mediana	2232	553	103	285
	povprečje	2040	693	183	322
	SE	346	144	65	61
ZnO mikro 1500	mediana	1699	577	119	292
	povprečje	2108	763	119	298
	SE	319	137	12	29
ZnO mikro 4000	mediana	1727	1025	103	227
	povprečje	2227	2034	303	388
	SE	562	967	174	112
ZnCl₂ 1000	mediana	1328	719	82	203
	povprečje	1423	862	83	208
	SE	160	166	3	12
ZnCl₂ 2500	mediana	2143	1179	100	332
	povprečje	2764	1316	121	346
	SE	583	189	14	30

Tabela D1-b. Koncentracije Zn v telesnih delih modelnih organizmov po 14 dneh hranjenja s čisto hrano, ki je sledilo 14 dnevni izpostavitvi tretirani hrani, določene z metodo FAAS.

TRETMA		Hepatopankreas (µg/g suhe mase)	Črevo (µg/g suhe mase)	Preostanek telesi (µg/g suhe mase)	Celo telo (µg/g suhe mase)
Kontrola	mediana	835	163	121	186
	povprečje	1070	174	114	186
	SE	511	22	5	13
ZnO nano 1500	mediana	1086	123	95	182
	povprečje	1232	166	95	177
	SE	176	38	6	8
ZnO nano 4000	mediana	1387	151	105	170
	povprečje	1541	159	93	163
	SE	474	36	10	17
ZnO mikro 1500	mediana	1767	130	77	170
	povprečje	1407	126	75	159
	SE	427	9	6	23
ZnO mikro 4000	mediana	2473	406	116	270

	povprečje	3075	500	129	293
	SE	790	101	18	46
ZnCl₂ 1000	mediana	2473	406	116	270
	povprečje	1261	284	139	187
	SE	450	73	19	29
ZnCl₂ 2500	mediana	1312	218	128	175
	povprečje	1206	260	118	190
	SE	184	44	9	16

Priloga D2

Povzetek median, povprečnih vrednosti in standardnih napak za vsebnost bakra v telesni delih enakonožcev pri prehranjevalnih poskusih z bakrom (poskusa št. 33 in 36).

Tabela D2-a. Koncentracije Cu v telesnih delih modelnih organizmov po 14 dneh hranjenja s tretirano hrano, določene z metodo FAAS.

TRETMA		Hepatopankreas (µg/g suhe mase)	Črevo (µg/g suhe mase)	Preostanek telesa (µg/g suhe mase)	Celo telo (µg/g suhe mase)
Kontrola	mediana	5052	387	62	315
	povprečje	4351	393	65	325
	SE	565	119	10	25
Cu nano 2000	mediana	8870	1256	98	623
	povprečje	10.553	1636	106	705
	SE	1447	262	11	59
Cu nano 5000	mediana	9779	1841	92	746
	povprečje	13.525	4828	113	747
	SE	2400	1864	19	45
Cu(NO₃)₂ 2000	mediana	9104	1609	101	618
	povprečje	9148	2711	109	725
	SE	646	778	18	74
Cu(NO₃)₂ 5000	mediana	8151	2457	110	786
	povprečje	10.371	3210	120	793
	SE	1498	617	14	50

Tabela D2-b. Koncentracije Zn v telesnih delih modelnih organizmov po 14 dneh hranjenja s čisto hrano, ki je sledilo 14 dnevni izpostavitvi tretirani hrani, določene z metodo FAAS.

TRETMA		Hepatopankreas (µg/g suhe mase)	Črevo (µg/g suhe mase)	Preostanek telesa (µg/g suhe mase)	Celo telo (µg/g suhe mase)
Kontrola	mediana	2958	159	147	250
	povprečje	3114	517	155	253
	SE	712	169	27	28
Cu nano 2000	mediana	6459	357	78	534
	povprečje	6485	656	115	494
	SE	740	212	30	33
Cu nano 5000	mediana	9061	248	131	579
	povprečje	9728	489	143	655
	SE	1346	167	35	62
Cu(NO₃)₂ 2000	mediana	7466	391	77	572
	povprečje	9343	936	122	702
	SE	1647	342	31	103
Cu(NO₃)₂ 5000	mediana	6311	115	69	468
	povprečje	7506	314	85	489
	SE	1010	115	18	34