

Univerza v Ljubljani
Biotehniška fakulteta

Monika KOS

**VPLIV IONOFORNEGA KOKCIDIOSTATIKA
MONENZINA NA KINETIKO BAKRA PRI
DEŽEVNIKU *Eisenia andrei***

Magistrsko delo
Magistrski študijski program – 2. stopnja

Ljubljana, 2013

Univerza v Ljubljani
Biotehniška fakulteta

Monika KOS

**VPLIV IONOFORNEGA KOKCIDIOSTATIKA MONENZINA NA
KINETIKO BAKRA PRI DEŽEVNIKU *Eisenia andrei***

Magistrsko delo
Magistrski študij – 2. stopnja

**IMPACT OF IONOPHORE COCCIDIOSTAT MONENSIN ON THE
KINETICS OF COPPER IN AN EARTHWORM *Eisenia andrei***

M. Sc. Thesis
Master Study Programme

Ljubljana, 2013

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Strukturna in funkcionalna biologija. Opravljeno je bilo na Katedri za zoologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, na Katedri za fiziologijo rastlin Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, v Ekotoksikološkem laboratoriju Nacionalnega inštituta za biologijo v Ljubljani, v Laboratoriju za forenzično toksikologijo in ekotoksikologijo Inštituta za patologijo, sodno in upravno veterinarstvo Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani, v Laboratoriju za analizo kemijo Kemijskega inštituta v Ljubljani in v Laboratoriju za rentgensko spektrometrijo Odseka za fiziko srednjih in nizkih energij na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

Študijska komisija je dne 6. 2. 2013 sprejela temo in za mentorja magistrskega dela imenovala doc. dr. Primoža Zidarja in za recenzenta prof. dr. Damjano Drobne.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Simona PREVORČNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

Član: doc. dr. Primož ZIDAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

Član: prof. dr. Damjana DROBNE
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

Datum zagovora: 12. 09. 2013

Magistrsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Monika Kos

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	59:595.373:595.142(043.3)=163.6
KG	kokcidostatik/ionofor/monenzin/kinetika bakra/ bioakumulacija/ AAS/ XRF/ LAICPMS/deževniki/ <i>Eisenia andrei</i> /enakonožci/ <i>Porcelio scaber</i>
AV	KOS, Monika, dipl. biol.
SA	ZIDAR, Primož (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta
LI	2013
IN	Vpliv ionofornega kokcidostatika monenzina na kinetiko bakra pri deževniku <i>Eisenia andrei</i>
TD	Magistrsko delo (magistrski študij - 2. stopnja)
OP	XI, 103 str., 12 pregl., 50 sl., 2 pril., 122 vir.
IJ	Sl
JJ	sl/en
AI	Karboksilni ionoforni antibiotiki se uporabljajo v veterinarski medicini za preprečevanje in zdravljenje kokcidioze pri perutnini, kuncih in prašičih. Najpogostejše uporabljeni kokcidostatiki v Sloveniji in v severni Evropi so naravni ionoforji monenzin, salinomycin in lasalocid. Ker te snovi zdravljene živali le delno presnavljajo, se večji del kokcidostatikov izloči v aktivni obliki. Perutninski gnoj se uporablja kot gnojilo, zato lahko del kokcidostatikov konča v okolju. Baker pretežno vstopa na kmetijske površine z uporabo bakrovih herbicidov in hlevskega gnoja iz prašičjih farm, kjer se uporablja kot pospeševalec rasti. Ionoforji delujejo kot transporterji kationov preko celične membrane, tako da lahko potencialno vplivajo tudi na transport kovin, še posebno v okoljih, ki so obremenjena s težkimi kovinami. V nalogi smo raziskovali kinetiko bakra pri deževnikih <i>Eisenia andrei</i> in enakonožcih <i>Porcellio scaber</i> , ki smo jih za 14 ali 28 dni preko prsti izpostavili bakru in/ali monenzinu v koncentracijah, ki jih lahko pričakujemo tudi v okolju (Cu 80 in 160 mg/kg suhe prsti, monenzin 25 mg/kg suhe prsti). V ta namen smo za analizo uporabili naslednje metode: AAS (prst, živali), XRF (prst), histokemijo (rubeanska kislina, "rodanin", hematoksilin) in LA ICP-MS. Ugotovili smo, da monenzin v prsti poveča privzem in kopičenje bakra v deževnikih, medtem ko pri enakonožcih nismo opazili vpliva. Sklepamo, da v z bakrom obremenjenih okoljih, kot so na primer vinogradi, telesna koncentracija bakra v deževnikih hitreje doseže prag strupenosti, če je sočasno prisoten tudi monenzin.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Du2
DC	59:595.373:595.142(043.3)=163.6
CX	coccidiostat/ionophore/monenzin/copper kinetics/bioaccumulation/AAS/XRF/LAICPMS /earthworms/ <i>Eisenia andrei</i> /woodlice/ <i>Porcellio scaber</i>
AU	KOS, Monika, dipl. biol.
AA	ZIDAR, Primož (supervisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB	University of Ljubljana, Biotechnical faculty
PY	2013
TI	Impact of ionophore coccidiostat monensin on the kinetics of copper in an earthworm <i>Eisenia andrei</i>
DT	M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO	XI, 103 p., 12 tab., 50 fig., 2 ann., 122 ref.
LA	Sl
AL	sl/en
AB	Carboxylic ionophore antibiotics are used in veterinary medicine for prevention and treatment of coccidiosis in poultry, rabbits and pigs. The most frequently used coccidiostats in Slovenia and in northern Europe are natural ionophores monensin, salinomycin, and lasalocid. As these substances are only partially metabolised in treated animals, the major part of coccidiostats consumed is excreted in the active form. When poultry manure is used as fertiliser, part of the coccidiostats ends up in the environment. Copper predominantly enters agricultural soils by the use of Cu-based herbicides and manure from pig farms where it is used as a growth promoter. Ionophores act as cation transporters across cell membranes, so they can potentially also impact metal transport, especially in metal-burdened environments. We studied the bioaccumulation of copper in earthworms (<i>Eisenia andrei</i>) and isopods (<i>Porcellio scaber</i>) when exposed to Cu or/and monensin via soil. In the present study, animals were exposed for 14 or 28 days to environmentally realistic concentrations of Cu (80 and 160 mg/kg dry soil) and monensin (25 mg/kg dry soil). For this purpose we used the following methods: AAS (soil, animals), XRF (soil), histochemistry (rubeanic acid, "rhodanin", hematoxylin) and LA ICP-MS. We found that monensin increases the uptake and accumulation of Cu in earthworms, while no impacts on isopods were observed. Thus we may conclude that in Cu-burdened environments like vineyards, Cu intake could reach the toxicity threshold in earthworms faster if monensin-contaminated manure from poultry farms was used frequently.

KAZALO VSEBINE

	KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
	KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
	KAZALO VSEBINE	V
	KAZALO SLIK	VIII
	KAZALO PREGLEDNIC	X
	SLOVARČEK	XI
1	UVOD	12
1.1	HIPOTEZE	13
1.2	NAMEN	13
2	PREGLED OBJAV	14
2.1	KOKCIDIOSTATIKI	15
2.2	BAKER V KOPENSKEM OKOLJU	16
2.3	BIOLOGIJA POSKUSNIH ORGANIZMOV	17
2.3.1	Rdeči tigrasti deževnik, <i>Eisenia andrei</i>	17
2.3.2	Navadni prašiček, <i>Porcellio scaber</i>	20
2.4	VPLIV BAKRA IN MONENZINA NA BIOLOŠKE SISTEME	22
3	MATERIALI IN METODE	24
3.1	POSKUSNA ORGANIZMA	24
3.2	SPLOŠNA ZASNOVA POSKUSA	24
3.3	PRIPRAVA PRSTI	26
3.4	MERITEV ZADRŽEVALNE KAPACITETE VODE PRSTI (WHC)	26
3.5	MERITEV pH PRSTI	27
3.6	POSKUS Z DEŽEVNIKI	28
3.6.1	Priprava poskusnih posod z deževniki <i>Eisenia andrei</i>	28
3.6.2	Razmnoževanje deževnikov	28
3.7	PRIPRAVA POSKUSNIH POSOD Z ENAKONOŽCI <i>Porcellio scaber</i>	29
3.8	MERITEV KONCENTRACIJE MONENZINA V PRSTI Z METODO VISOKOTLAČNE TEKOČINSKE KROMATOGRAFIJE (HPLC)	29
3.9	MERITEV KONCENTRACIJE BAKRA V PRSTI Z METODO ATOMSKE ABSORBCIJSKE SPEKTROSKOPIJE (AAS)	30
3.9.1	Priprava steklovine	30
3.9.2	Priprava bakrovih standardov	31
3.9.3	Analiza bakra v prsti	31
3.9.4	Analiza bakra v poskusnih organizmih	33
3.9.5	Analiza bakra v hrani	34
3.10	MERITEV KONCENTRACIJE KOVIN V PRSTI Z METODO RENTGENSKE FLUORESCENCE (XRF)	34
3.10.1	Priprava vzorcev prsti	34

3.10.2	Meritev	35
3.11	LOKALIZACIJA BAKRA V TKIVIH POSKUSNIH ORGANIZMOV S HISTOKEMIJSKIMI METODAMI	35
3.11.1	Sekcija živali	35
3.11.2	Priprava zamrznjenih (krio) rezin	36
3.11.3	Priprava stekelc s polilizinskim premazom	36
3.11.4	Priprava vodnega medija glicerol-želatine za prekrivanje	37
3.11.5	Priprava barvil za histokemijo in barvanje	37
3.11.5.1	Priprava rubeanske kisline in barvanje	38
3.11.5.2	Priprava rodanina in barvanje	38
3.11.5.3	Priprava hematoksilina in barvanja	39
3.11.6	Pregled mikroskopskih preparatov	39
3.13	MAPIRANJE PORAZDELITVE BAKRA V LIOFILIZIRANIH KRIO REZINAH Z METODO LASERSKE ABLACIJE ICP-MS	40
3.13.1	Priprava vzorcev	40
3.13.2	Mapiranje porazdelitve bakra v tkivih deževnikov <i>Eisenia andrei</i>	41
3.14	ANALIZA PODATKOV	42
4	REZULTATI	43
4.1	ZNAČILNOSTI POSKUSNE PRSTI	43
4.11	Fizikalno-kemijske lastnosti prsti	43
4.1.2	Vsebnost monenzina v prsti	44
4.1.3	Vsebnost bakra v prsti	45
4.2	REZULTATI ANALIZE HRANE	46
4.3	REZULTATI ANALIZE AKUMULACIJE Cu V POSKUSNIH ŽIVALIH	46
4.3.1	Vsebnost bakra v telesu poskusnih organizmov	46
4.3.2	Bioakumulacijski faktor (BAF) za baker pri poskusnih organizmih	49
4.4	DRUGI MERJENI PARAMETRI	20
4.4.1	Razmerje med svežo in suho telesno maso poskusnih organizmov glede na tretma	50
4.4.2	Smrtnost poskusnih organizmov	52
4.4.3	Razmnoževanje deževnikov	53
4.5	LOKALIZACIJA BAKRA V TKIVIH POSKUSNIH ORGANIZMOV	54
4.5.1	Lokalizacija in semikvantitativna ocena količine bakra v tkivih deževnikov z rubeansko kislino in rodaninom	54
4.5.2	Lokalizacija in semikvantitativna ocena količine bakra v tkivih enakonožcev z rubeansko kislino in rodaninom	60
4.5.3	Lokalizacija bakra v tkivih enakonožcev in deževnikov s hematoksilinom	64
4.5.4	Lokalizacija in mape porazdelitve bakra v liofiliziranih krio rezinah deževnikov z LA ICP-MS	66
5	RAZPRAVA	77

5.1	ANALIZA PRSTI	77
5.1.1	Vpliv poskusnih pogojev na poskusna organizma	77
5.1.2	Primerjava uporabljenih metod AAS in XRF za meritev koncentracije bakra v prsti	77
5.1.3	Vsebnost in razpolovna doba doba monenzina v poskusni prsti v primerjavi s podatki v literaturi	79
5.2	ANALIZA AKUMULACIJE BAKRA V POSKUSNIH ŽIVALIH	80
5.3	DRUGI MERJENI PARAMETRI	82
5.3.1	Vpliv tretmajev na razmerje med svežo in suho telesno maso poskusnih organizmov	82
5.3.2	Vpliv tretmajev na smrtnost poskusnih organizmov	82
5.3.3	Vpliv tretmajev na razmnoževanje deževnikov <i>Eisenia andrei</i>	83
5.4	PORAZDELITEV BAKRA V TKIVIH POSKUSNIH ORGANIZMOV	83
5.4.1	Porazdelitev bakra v tkivih deževnikov <i>Eisenia andrei</i>	84
5.4.2	Porazdelitev bakra v tkivih enakonožcev <i>Porcellio scaber</i>	85
5.4.3	Porazdelitev bakra v tkivih enakonožcev <i>Porcellio scaber</i> in deževnikov <i>Eisenia andrei</i> po histolokalizaciji s hematoksilinom	86
5.4.4	Opažanja pri histokemijskem delu	86
6	SKLEPI	87
7	POVZETEK	88
8	VIRI	90
	ZAHVALA	
	PRILOGA	

KAZALO SLIK

Slika 1:	Strukturna formula monenzina	15
Slika 2:	Rdeči tigrasti deževnik, <i>Eisenia andrei</i>	17
Slika 3:	Izleganje deževnika <i>Eisenia andrei</i> iz kokona, kokon	18
Slika 4:	Splošna skica prečnega prereza deževnika v predelu za sedlom z oznakami	20
Slika 5:	Enakonožec navadni prašiček, <i>Porcellio scaber</i>	20
Slika 6:	Splošna skica enakonožca z oznakami prebavnega sistema	21
Slika 7:	Pravokotna polipropilenska posoda (160 × 110 mm, 1,5 l)	25
Slika 8:	Merjenje WHC prsti	27
Slika 9:	Termoblok z ročno nastavlјivim temperaturnim režimom	31
Slika 10:	Plamenski atomski absorpcijski spektrofotometer	32
Slika 11:	IR luč, hidravlična stiskalnica in model za pripravo tablet	34
Slika 12:	Območje sekcije pri deževniku <i>Eisenia andrei</i>	35
Slika 13:	Kriostat Leica CM1850	36
Slika 14:	Območje serijskih rezin pri enakonožcu <i>Porcellio scaber</i>	36
Slika 15:	Strukturna formula rubeanske kisline, rodanina in hematoksilina	37
Slika 16:	Vodna kopel za barvanje z rubeansko kislino in rodaninom	38
Slika 17:	Stereolupa MZ FLIII, Leica in Aksioskop, Leica	39
Slika 18:	Kovinski nosilčki za prenos rezin v liofilizator	40
Slika 19:	Priprava nosilcev iz parafilma za LA ICP-MS	40
Slika 20:	Pripravljen nosilec z rezinami za LA ICP-MS	41
Slika 21:	Naprava za lasersko ablacijo ICP-MS	41
Slika 22:	Koncentracija bakra v celih deževnikih <i>Eisenia andrei</i> po 14-dnevni izpostavitvi	47
Slika 23:	Koncentracija bakra v celih deževnikih <i>Eisenia andrei</i> po 28-dnevni izpostavitvi	47
Slika 24:	Koncentracija bakra v celih enakonožcih <i>Porcellio scaber</i> po 14-dnevni izpostavitvi	48
Slika 25:	Koncentracija bakra v celih enakonožcih <i>Porcellio scaber</i> po 28-dnevni izpostavitvi	48
Slika 26:	Delež suhe telesne mase <i>Eisenia andrei</i> po 14-dnevni izpostavitvi	50
Slika 27:	Delež suhe telesne mase <i>Eisenia andrei</i> po 28-dnevni izpostavitvi	50
Slika 28:	Delež suhe telesne mase pri enakonožcih <i>Porcellio scaber</i> po 14-dnevni izpostavitvi	51
Slika 29:	Delež suhe telesne mase pri enakonožcih <i>Porcellio scaber</i> po 28-dnevni izpostavitvi	51
Slika 30:	Obarvanje metanefridijev po barvanju z rubeansko kislino	54
Slika 31:	Okrogle votle granule v področju žil deževnikov (RU)	55
Slika 32:	Okrogle votle granule v kloragognem tkivu deževnikov (ROD)	55
Slika 33:	Okrogle polne granule v metanefridiju deževnikov (ROD)	56
Slika 34:	Kategorije za količino reakcijskega produkta histokemijske reakcije lokalizacije Cu z rubeansko kislino in rodaninom pri deževnikih <i>Eisenia andrei</i>	57
Slika 35:	Kategorije za količino reakcijskega produkta histokemijske reakcije lokalizacije Cu z rubeansko kislino in rodaninom pri	58

	enakonožcih <i>Porcellio scaber</i>	
Slika 36:	Okrogle votle granule (RU) in okrogle polne granule (ROD) v hepatopankreasu enakonožcev <i>Porcellio scaber</i>	60
Slika 37:	Splošna skica prečnega prereza enakonožca v predelu zadnjega prebavila z oznakami	61
Slika 38:	Kategorije za količino reakcijskega produkta histokemijske reakcije lokalizacije Cu z rubeansko kislino in rodaninom pri enakonožcih <i>Porcellio scaber</i>	62
Slika 39:	Barvanje s hematoksilinom: prikaz reprezentativnih rezin enakonožcev <i>Porcellio scaber</i>	64
Slika 40:	Barvanje s hematoksilinom: prikaz reprezentativnih rezin deževnikov <i>Eisenia andrei</i>	65
Slika 41:	Fotografije rezin prečnih prerezov deževnikov <i>Eisenia andrei</i> iz 14-dnevne izpostavitve pred lasersko ablacijo	67
Slika 42:	Mapa porazdelitve bakra v tkivih deževnikov <i>Eisenia andrei</i> po 14-dnevni izpostavitvi (5000 cps)	68
Slika 43:	Mapa porazdelitve bakra v tkivih deževnikov <i>Eisenia andrei</i> po 14-dnevni izpostavitvi (10000 cps)	69
Slika 44:	Mapa porazdelitve bakra v tkivih deževnikov <i>Eisenia andrei</i> po 14-dnevni izpostavitvi (20000 cps)	70
Slika 45:	Mapa porazdelitve bakra v tkivih deževnikov <i>Eisenia andrei</i> po 14-dnevni izpostavitvi (40000 cps)	71
Slika 46:	Fotografije rezin prečnih prerezov deževnikov iz 28-dnevne izpostavitve pred lasersko ablacijo	72
Slika 47:	Mapa porazdelitve bakra v tkivih deževnikov <i>Eisenia andrei</i> po 28-dnevni izpostavitvi (5000 cps)	73
Slika 48:	Mapa porazdelitve bakra v tkivih deževnikov <i>Eisenia andrei</i> po 28. dnevni izpostavitvi (10000 cps)	74
Slika 49:	Mapa porazdelitve bakra v tkivih deževnikov <i>Eisenia andrei</i> po 28-dnevni izpostavitvi (20000 cps)	75
Slika 50:	Mapa porazdelitve bakra v tkivih deževnikov <i>Eisenia andrei</i> po 28-dnevni izpostavitvi (40000 cps)	76

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica	1:	Pregled tretmajev pri dveh poskusnih organizmih, deževnikih <i>Eisenia andrei</i> in enakonožcih <i>Porcellio scaber</i> , v dveh časovnih obdobjih z nominalnimi koncentracijami poskusnih kemikalij	25
Preglednica	2:	Priprava raztopin bakrovega standarda	31
Preglednica	3:	Pregled fizikalno-kemijskih lastnosti prsti Lufa 2.2	43
Preglednica	4:	Nominalne in izmerjene koncentracije monenzina v prsti Lufa 2.2	44
Preglednica	5:	Nominalne in izmerjene koncentracije Cu v prsti Lufa 2.2 na začetku poskusa	45
Preglednica	6:	Koncentracija bakra v založnem konjskem gnoju (deževniki) in nepojedenih leskovih listih (enakonožci) s konca poskusa	46
Preglednica	7:	Bioakumulacijski faktor bakra za deževnike <i>Eisenia andrei</i>	49
Preglednica	8:	Bioakumulacijski faktor bakra za enakonožce <i>Porcellio scaber</i>	49
Preglednica	9:	Smrtnost deževnikov in enakonožcev v 6 različnih tretmajih in 2 časovnih obdobjih	52
Preglednica	10:	Pregled parametrov, ki smo jih spremljali pri reprodukcijskem testu deževnikov <i>E. andrei</i> v vseh tretmajih	53
Preglednica	11:	Delež deževnikov <i>E. andrei</i> v posamezni kategoriji (nič, malo, srednje, veliko, granule), ki opredeljuje količino reakcijskega produkta histokemijske reakcije lokalizacije Cu	59
Preglednica	12:	Delež enakonožcev <i>P. scaber</i> v posamezni kategoriji (sledi, malo, srednje, veliko), ki opredeljuje količino reakcijskega produkta histokemijske reakcije lokalizacije Cu	63

SLOVARČEK

WHC	Zadrževalna kapaciteta vode (ang. water holding capacity)
AAS	Atomska absorpcijska spektroskopija
XRF	Rentgenska fluorescenca (ang. X-ray fluorescence)
LOD	Meja detekcije (ang. limit of detection)
LA ICP-MS	laserska ablacijska masna spektroskopija z induktivno sklopljeno plazmo (ang. laser ablation inductively coupled plasma with mass spectroscopy)
HPLC	Visokotlačna tekočinska kromatografija (ang. high pressure liquid chromatography)
liofilizacija	Zamrznjeno sušenje pri nizki temperaturi in znižanem tlaku
PEC	Pričakovana koncentracija snovi v okolju (ang. predicted environmental concentration)
NOEC	Koncentracija, pri kateri ne opazimo biološkega odziva (ang. no observed effect concentration)
EC	Koncentracija, ki izzove biološki odziv (ang. effect concentration)
LC	Smrtna koncentracija (ang. lethal concentration)

1 UVOD

Ionoformi karboksilni antibiotiki se uporabljajo v veterinarski medicini za preprečevanje in zdravljenje kokcidioze pri domačih živalih, še posebej pri perutnini, kuncih in prašičih. So produkt bakterij rodu *Streptomyces* spp. z odlično antiprotazojsko aktivnostjo. Najpogosteje uporabljeni ionoformi kokcidostatiki v Sloveniji in v severni Evropi so naravni ionofori monenzin, salinomycin in lasalocid (Hansen s sod. 2009, Žižek in Zidar 2013). Monenzin je naravni karboksilni ionofor, ki se le delno asimilira in se primarno izloča skupaj z iztrebkom. Perutninski in prašičji gnoj se uporablja kot gnojilo kmetijskih površin. Na tak način kokcidostatiki pridejo v okolje, kjer razpadajo pod vplivom biotskih in abiotskih dejavnikov (Vertesy s sod., 1987; Sassman in Lee, 2007; Hansen s sod., 2009; Hansen s sod., 2012). Ocenjena razpolovna doba monenzina v prsti je ocenjena med 2 (Sassman in Lee, 2007) in 24,6 dnevi (Žižek s sod., 2011). Podatki o pričakovanih okoljskih koncentracijah monenzina so zelo različni in znašajo od 0,05 mg/kg prsti (Žižek s sod., 2011) do 1,12 mg/kg prsti (EFSA, 2005).

Ionoformi vežejo mono- in divalentne katione in tako vplivajo na transport ionov skozi celične membrane (Celis, 1974; Elsasser, 1984). Monenzin je navadno opredeljen kot monovalentni ionofor, ki se povezuje z Na^+ in K^+ ioni (Dowling, 1992), a sodeluje tudi pri transportu divalentnih kationov, kot je na primer Ca^{2+} , ki v celicah igra pomembno vlogo (Ambroz, 1990). Znano je tudi, da monenzin vpliva na celični transport Pb pri podganah (Hamidinia s sod., 2002, 2006).

Številna kmetijska zemljišča so preobremenjena tudi s kovinami, zlasti z bakrom, kadmijem, cinkom in svincem. Baker vstopa na kmetijske površine pretežno z uporabo bakrovih herbicidov (Rusjan s sod., 2007;) in z gnojevko s prašičjih farm, kjer se baker uporablja kot rastni promotor (Li s sod., 2010; Xiang s sod., 2010). V vinogradih, kjer se pogosto in dolgotrajno uporabljajo bakrovi fungicidi, lahko koncentracije bakra presežejo več sto mg bakra na kilogram prsti (Komarek s sod., 2010). Li s sod. (2010) poroča, da koncentracije bakra v prašičjem gnoju lahko presežejo vrednost 830 mg/kg. Na kmetijskih površinah, kot so sadovnjaki, vinogradi ali pašniki, se lahko srečajo ionofori in baker. Dostopne informacije (Starnes s sod. 1984 v Kirk s sod. 1994; Khan, 1993) kažejo na to, da bi monenzin lahko imel vpliv na razpoložljivost bakra za netarčne talne organizme, kot so deževniki in enakonožci. Pri talnih organizmih se lahko spremeni kinetika kovin (privzem, kopičenje, izločanje), kar ima lahko kratkotrajni ali dolgotrajni vpliv na prehranjevalno verigo in s tem stabilnost ekosistema.

V študiji smo želeli preučiti učinek ionofora monenzina na kinetiko (t.j. privzem, kopičenje in izločanje) bakra pri kompostnem deževniku *Eisenia andrei* Bouché, 1972 (Oligochaeta: Annelida, Lumbricidae). Rezultate pridobljene na deževnikih smo primerjali z enakonožci *Porcellio scaber* Latreille, 1804 (Crustacea: Isopoda), pri katerih sta privzem in

akumulacija bakra dobro poznana (Wieser, 1968; Hopkin 1993; Žnidaršič, 2003; Žnidaršič in Štrus, 2004; Zdešar, 2005).

1.1 HIPOTEZE

1. Koncentracija bakra v deževnikih in enakonožcih narašča z naraščajočo koncentracijo bakra v prsti.
2. Deževniki in enakonožci akumulirajo več bakra, če je poleg bakra v prsti prisoten tudi monenzin.
3. Osrednje mesto akumulacije bakra v deževnikih je kloragogno tkivo.

1.2 NAMEN

Ugotoviti vpliv ionofornega kokcidostatika monenzina na kinetiko (t.j. privzem, kopičenje in izločanje) bakra v deževniku *Eisenia andrei* in enakonožcu *Porcellio scaber*.

2 PREGLED OBJAV

2.1 KOKCIDIOSTATIKI

Kokcidostatiki so naravni in sintetični antibiotiki. Naravnega izvora so polietrni ionoforni kokcidostatiki, ostalih 5 od 11 dovoljenih kokcidostatikov v Evropski Uniji pa je sintetičnih (EU 1831/2003/EC, 2003). Kokcidostatiki se primarno uporabljajo za zdravljenje in preprečevanje kokcidoze, ki jo povzročajo trosovci kokcidiji v prebavilu domačih živali, še posebej pri perutnini, kuncih, ovcah in prašičih. Ti paraziti povzročajo diarejo, izgubo telesne mase in visoko umrljivost (Mehlhorn, 2008). V Evropski Uniji so kokcidostatiki edini antibiotiki, ki se lahko uporabljajo kot prehranski dodatki po prepovedi l. 2006 (EU, 2005; VMD, 2011). V ZDA in Avstraliji se ionoforni kokcidostatiki lahko uporabljajo tudi kot rastni promotorji (Page, 2003).

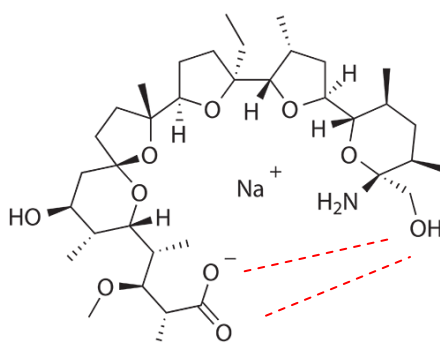
Danes je na tržišču vsaj 20 različnih kokcidostatikov (v EU le 11), med njimi so najpogosteje uporabljeni karboksilni ionofori. Karboksilni ionofori so naravni antibiotiki in so produkt bakterij rodu *Streptomyces* spp. z odlično antiprotazojsko aktivnostjo. Ionofori ("prenašalci ionov" (Pressman, 1976)) so bili izolirani in karakterizirani leta 1951 (Pressman, 1976). Zelo pogosto uporabljeni naravni karboksilni ionofori so monenzin, lasalocid, salinomycin, narazin in maduramicin (Douling, 1992; Sassman in Lee, 2007; Hansen s sod., 2009; Žižek in Zidar, 2013). Kljub temu, da so v uporabi že dobrih 50 let, pa o njihovi poti po prehodu v okolje nimamo veliko informacij, še manj pa o vplivu na vodne in še občutljivejše talne ekosisteme.

Monenzin se v zdravljenih živalih le delno asimilira. Z iztrebkom se ga lahko pri perutnini izloči celo do 50 %, odvisno od oblike, v kateri ga živali prejmejo: na primer v obliki želatinastih kapsul v enkratnem odmerku (Davison, 1984) ali pa v hrani (EFSA, 2010). Monenzin ni prisoten v urinu, kar kaže na to, da so jetra glavno mesto njegovega metabolizma in izločanja ter pri govedu in podganah tudi skladiščenja (Dunoho, 1978; Herberg, 1978 v Chapman s sod., 2010).

Živalski gnoj se pogosto uporablja za gnojenje kmetijskih površin. Na ta način ionoforni kokcidostatiki pridejo v okolje, kjer razpadajo pod vplivom biotskih in abiotskih dejavnikov (Vertesy s sod., 1987; Sassman and Lee, 2007; Hansen s sod., 2009; Hansen s sod., 2012). Med biotskimi dejavniki prevladuje mikrobná razgradnja (Sassman in Lee, 2007). Hitrost razpada je odvisna od količine organske snovi v prsti, vlage, pH, temperature in pa svetlobe (Sassman in Lee, 2007; Yoshida s sod., 2010; Bohn s sod., 2013). Bohn s sod. (2013) so ocenili, da monenzin, salinomycin in narazin hidrolizirajo pri temperaturi 25 °C in pH 4. V takih pogojih je imel monenzin razpolovno dobo 13 dni, salinomycin in narazin pa krajšo od 1 dneva (Bohn s sod., 2013). Pri lasalocidu je znana

fotoliza, medtem ko monenzin, salinomycin in narazin na svetlobi ne razpadajo (Bohn s sod., 2013). Ocenjena razpolovna doba monenzina v prsti je od 2 (Sassman in Lee, 2007) do 24,6 dni (Žižek s sod., 2011). Podobno kot Zidar in Žižek (2012) je razpolovno dobo ocenil tudi Yoshida s sod. (2010), in sicer 22,7 dni. Podatki o predvidenih okoljskih koncentracijah (PEC) monenzina v prsti se zelo razlikujejo. Vrednosti monenzina v okolju tako znašajo 0,013 - 0,05 mg/kg prsti po gnojenju s 3 mesece odležanim gnojem (Žižek s sod., 2011) in po gnojenju z gnojem brez predhodnega odležanja 1,12 mg/kg prsti (EFSA, 2005).

Karboksilni ionofori so topni v lipidih. Ionofori z mono- in divalentnimi kationi (Na^+ , K^+ , Li^+ , Ti^+ , Ag^+ , Rb^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) zelo dinamično in reverzibilno tvorijo komplekse, zato lahko sodelujejo pri transportu ionov skozi biološke membrane (Celis, 1974; Elsasser, 1984; Dowling, 1992; Novilla, 1992). Monenzin je navadno opredeljen kot monovalentni ionofor, ki se povezuje z Na^+ in K^+ ioni (Dowling, 1992), a sodeluje lahko tudi pri transport divalentnih kationov, kot je na primer tudi Ca^{2+} , ki v celicah igra pomembno vlogo (Ambroz, 1990). Znano je tudi, da monenzin sodeluje pri transmembranskem transport Pb pri podganah (Hamidinia s sod., 2002, 2006). Monenzin lahko oblikuje ciklično konformacijo, pri čemer se z vodikovimi vezmi povežeta hidroksilna in karboksilna skupina na obeh skrajnih koncih molekule (sl. 1). Na notranji strani obroča so kisikovi atomi, ki tvorijo komplekse z ioni, na zunanji strani obroča pa so alkilne skupine, ki tvorijo vezi z lipidi v membranah. Te lastnosti monenzinu omogočajo prehod skozi celično membrano in prenos kationov vzdolž koncentracijskega gradienta (Pressman, 1976).



Slika 1: Strukturna formula monenzina (rdeča črtkana črta ponazarja nastanek vodikovih vezi) (Chapman s sod., 2010)

2.2 BAKER V KOPENSKEM OKOLJU

Baker je naravno prisoten element ($< 0,1 \%$) v Zemljini skorji in je kot rezultat geoloških procesov del mnogih mineralov: sulfidov, sulfatov, karbonatov (Adriano, 2001; Vijver s sod., 2011). Povprečna vrednost koncentracije bakra v prsti v svetovnem merilu je 30 mg/kg suhe prsti (razpon 2-250 mg/kg suhe prsti; Adriano, 1986 v Adriano, 2001). Povišana koncentracija bakra v določenem okolju pa je pogosto posledica človekove dejavnosti. Sodi med težke kovine. Termin težke kovine se nanaša na elemente z gostoto večjo od $5,0 \text{ g/cm}^3$, ki so večinoma povezani z onesnaževanjem in strupenostjo. Nekatere kovine so obenem tudi esencialne za organizme, v katerih so vključene kot strukturni elementi ali kofaktorji proteinov (Vijver s sod., 2011). Esencialni elementi za rastline so: N, Mg, P, S, K, Ca, Zn, Mn, Cu, Fe, Mo, B, Cl, Na, Si, Se in Co pa so koristni elementi; in za živali: N, Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca, Cu, Co, Fe, Mn, Mo, Zn, Cr, F, Ni, Se, V, I 8 Agri-fax, 1998). Kljub esencialnosti pa Cu lahko že v nizkih koncentracijah povzroča okoljske motnje tako v v kopenskih, kot tudi vodnih ekosistemih. Najdemo ga na okoljsko obremenjenih mestih, kot so nekdanje predelovalnice lesa (Hingston s sod., 2001, 2006) in na kmetijske površine (ostanki pesticidov, komercialnih gnojil, prašičje gnojevke) (Ma, 1988; van Zwieten s sod., 2004; Rusjan s sod., 2007; Xiang s sod., 2010; Adriano, 2001)). Baker pride v vodne ekosisteme s spiranjem omenjenih površin v podtalnico, v stoječe in tekoče celinske vode ter v morje (Phillips, 1977; Adriano, 2001), pa tudi s posrednimi ali neposrednimi izpusti iz predelovalnic odpadkov ter čistilnih naprav (Adriano, 2001; Pan s sod., 2003).

Baker je dragocena in široko uporabna kovina zaradi dobre temperaturne in električne prevodnosti, kovnosti in odpornosti na rjo. Pridobivajo ga v dnevnih kopih in podzemnih rudnikih. Nekateri načini uporabe bakra:

- v medicini (Welch in Compton, 2006; Hubacher, 2007),
- v elektrotehniki (električni generatorji, motorji, električne naprave, žice in napeljave, navigacijska in geodetska oprema),
- v energetiki (avtomobilski radiatorji, klimatske naprave, ogrevalni sistemi)
- v ladjedelništvu,
- za vodovodne napeljave,
- v kovinarstvu (priprava zlitin, npr. medenine, kovanci, nakit),
- v kmetijstvu (fitofarmaceutiki (bakrovi fungicidi, npr. bakrov sulfat)), živinoreja (pospeševalci rasti)), itd. (Adriano, 2001; Oresome resources, 2010).

Kmetijska dejavnost, v najširšem pomenu besede, je med vsemi omenjenimi zastopana po celem svetu in kot taka vir številnih kemikalij v okolju. Bakrovi fungicidi so najpogostejše uporabljena zaščitna sredstva, ki se redno uporabljajo v sadjarstvu in vinogradništvu. Uporaba Cu fungicidov se s staranjem vinogradov in sadovnjakov zmanjšuje (Rusjan s sod., 2007). V raziskavi primorskih vinogradov so Rusjan in sod. (2007) ugotovili, da se

koncentracije Cu v prsti vinogradov kljub rednemu vnosu ne seštevajo, kar kaže na to, da se Cu ob močnih padavinah najverjetneje spira v globlje sloje prsti in podtalnico, se bioakumulira v talnih organizmih in se vzdolž prehranjevalne verige razporeja po agrarnem ekosistemu. Na intenzivnih vinogradniških področjih, kjer se pogosto in dolgotrajno uporabljajo bakrovi fungicidi, lahko koncentracije Cu presežejo več 100 mg Cu/kg suhe prsti (Komarek s sod., 2010): Bordeaux (800 mg Cu/kg suhe prsti), Burgundy in Champagne (400-500 mg Cu/kg suhe prsti) (Rusjan s sod., 2007). V prsti kmetijskih površin v ekstenzivni rabi je pričakovana koncentracija bakra 1-50 mg/kg suhe prsti (Gilbert, 1952).

V živinoreji se baker uporablja kot pospeševalec rasti (Ma, 1988; Adriano, 2001; Xiang s sod., 2010; Li s sod., 2010). Xiang in sod. (2010) so v raziskavi ocenili koncentracijo Cu v prašičjem, kravjem, kokošnjem in ovčjem gnoju. Vrednosti koncentracij Cu so bile 699,6, 31,8, 81,8, and 66,85 mg /kg. Li s sod. (2010) pa poroča, da lahko v prašičjem gnoju te vrednosti presežejo 830 mg/kg.

2.3 BIOLOGIJA POSKUSNIH ORGANIZMOV

2.3.1 Rdeči tigrasti deževnik, *Eisenia andrei*

Rod *Eisenia* ima izvor na evropskih tleh, a ga je človek zanesel na večino ostalih kontinentov (tropski predeli jim ne odgovarjajo), zaradi visoke učinkovitosti pri kompostiranju (Venter in Reinecke, 1988; Haimi, 1990; Edwards in Bohlen, 1996; Garg s sod., 2005). Rod *Eisenia* je pogosto predmet različnih raziskav, tako ekoloških (študij razvoja v različnih fizikalno-kemijskih pogojih, na različnih substratih, študij razmnoževalnega potenciala za komercialne namene), kot tudi toksikoloških (študij vpliva kemijskih agensov na razvoj in razmnoževanje) (Venter in Reinecke, 1988; Hopkin, 1989; Garg s sod., 2005; Spurgeon s sod., 1992; Edwards in Bohlen, 1996; Dabke, 2013).

Deževniki vrste *Eisenia andrei* (sl. 2) so epigeične talne živali, ustreza jim zgornji horizont tal (Jégou, 1998). Vedno jih najdemo tam, kjer so prisotni organski odpadki (komposti) in živalski iztrebki (farme). So del prehranjevalne verige, saj so bogat vir beljakovin.



Slika 2: Rdeči tigrasti deževnik *Eisenia andrei* (Vir: www)

Kot vsi deževniki, je tudi *E. andrei* hermafrodit s kompleksnim reproduktivnim sistemom. Oploditev in embriogeneza potekata v kokonu, t.j. proteinski strukturi, ki jo izloči sedlo (sl. 2). Pri *E. andrei* se mladiči izlegajo po približno treh tednih (Van Gestel s sod., 1988 v OECD/OCDE, 2004; Venter in Reinecke, 1988; Garg s sod., 2005). Vsak stres (abiotiski ali biotski) nemudoma vpliva na stopnjo razmnoževanja oz. produkcijo kokonov, ki se zmanjša. Stopnja razmnoževanja *E. andrei* in drugih deževnikov je zato pogosto uporabljen biomarker v ekotoksikoloških poskusih (Spurgeon s sod., 1992; Kula in Larink, 1998; OECD/OCDE, 2004; Žižek s sod., 2011).

Razlogi za izbiro deževnika *E. andrei* za poskus:

- Je nevretenčar in za delo z njim ne potrebujemo dodatnega dovoljenja.
- Je kopenski organizem, katerega biologija je dobro poznana.
- Je relativno majhen deževnik (odrasli dolgi 10 cm, široki 0,5 cm) in za gojenje ne potrebujemo velikih zabojnikov in veliko prostora.
- Ima kratek generacijski čas (od kokona do odraslega deževnika: 2-3 mesece).
- Odgovarjajo mu pogoji, ki jih je lahko vzdrževati v običajnih vivarijih (temperatura 20 °C, zmerna vlažnost (60 % WHC) in dnevno-nočni ritem 16/8 h) (Kula in Larink, 1998; OECD/OCDE, 2004).
- Je epigeični deževnik in kot detritivor prispeva k razgradnji ter mešanju organskega opada in organskega sloja prsti. Preko hrane in intersticielne vode (Vijver, 2005) lahko pride v stik s težkimi kovinami, nanodelci in drugimi kemikalijami, ki se z vetrom, padavinami ali antropogeno odložitjo/sperejo na površino organskega opada in prsti. To stanje lahko simuliramo v laboratoriju.



Slika 3: Izleganje deževnika *Eisenia andrei* iz kokona, kokon (Merilo: rdeča črta – 5 mm) (Vir: www)

Eisenia andrei sodi med vrste, ki se uspešno uporabljajo v remediaciji prsti, ki so onesnažene s težkimi kovinami (Dabke, 2013). Deževniki so na splošno precej tolerantni organizmi na mnoga onesnaževala v prsti, kot so težke kovine, pesticidi in lipofilne organske kemikalije. Nekatere vrste so celo sposobne bioakumulacije teh snovi: *Eisenia fetida/andrei*, *Aporrectodea tuberculata*, *Lumbricus terrestris*, *Lumbricus rubellus*, *Dendrobaena rubida*, *Dendrobaena veneta*, *Eisenella tetraedra* in *Allolobophora chlorotica* (Contreras-Ramos s sod., 2006). Deževniki so hrana mnogim drugim živalim, kot so ptiči, dvoživke, plazilci, sesalci in če ti nimajo učinkovitih biokemijskih in

fizioloških mehanizmov za izločanje težkih kovin in drugih kemikalij, lahko pride do bioakumulacije in biomagnifikacije vzdolž prehranjevalne verige (Hopkin, 1989; Edwards in Bohlen, 1996).

Kemikalije in kovine pa deževniki lahko privzamejo po dveh poteh: po dermalni poti skozi telesno steno in skozi steno prebavila. Saxe s sod. (2001) in Vijver s sod. (2003) so mnenja, da se večino Pb in Cu (96 %) privzame skozi telesno steno, za Zn in Cd pa naj bi bil pomembnejši privzem skozi steno prebavila. Vir kovin za eno ali drugo vrsto privzema so lahko različne frakcije prsti. Pomemben vir kovin za privzem skozi telesno steno je intersticijska voda v prsti z raztopljenimi kovinami. Vir kovin za privzem skozi steno prebavila je intersticijska voda z raztopljenimi kovinami, ki jo žival pije ali pa prst in organska snov z vezanimi kovinami, ki predstavljata trdno fazo, in jo žival poje (Vijver, 2005). Privzem po eni ali drugi poti ni težaven, saj so epiteli pri deževnikih enostavni in enoslojni. Telesno steno deževnika prekriva enoslojni epidermis s tanko kolagensko kutikulo (nekaj μm), ki ima številne pore. Skozi pore se med drugim izloča mukus žleznih celic epidermisa, ki skupaj s celomsko tekočino vlaži površino deževnika, preprečuje izsuševanje in omogoča izmenjavo dihalnih plinov. V mukusu se poleg dihalnih plinov lahko raztopijo tudi kovine, ki skozi epidermis preidejo v krvni obtok (Edwards in Bohlen, 1996).

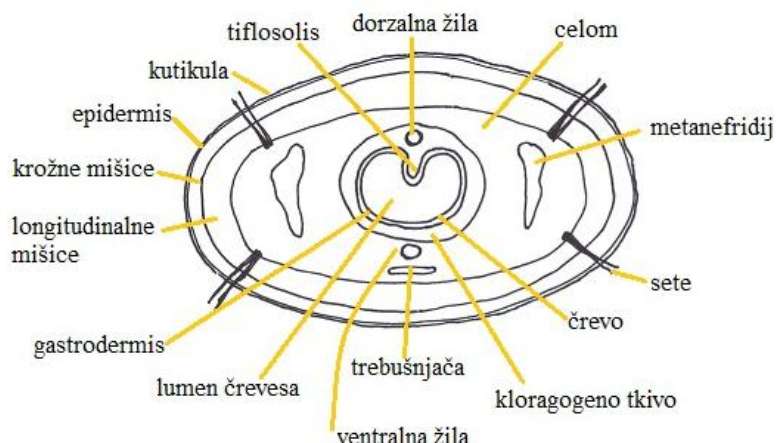
Prebavilo deževnikov je preprosta ravna cev. Usta se nadaljujejo v požiralnik, ki mu sledita golša in mlinček. Za mlinčkom je črevo, ki ima pri večini vrst dorzalno gubo (tiflosolis) (sl. 4). Črevo obdaja nežno kloragogno tkivo, ki ima podobno vlogo kot jetra pri vretenčarjih: je mesto skladiščenja energetskih zalog (glikogena, lipidov) ter intenzivnega metabolizma in tudi akumulacije odpadnih produktov presnove (Edwards in Bohlen, 1996).

Asimilirane kovine se iz telesa lahko izločijo na različne načine (pregled v Hopkin, 1989):

- S propadom epitelnih celic črevesa in izločitvijo z iztrebki v okolje;
- Z začasno shrambo v kloragocitih in s sproščanjem v celomsko tekočino, nato pa z izločanjem po več možnih poteh:
 - o Skozi metanefridije v okolje;
 - o S celomsko tekočino neposredno skozi hrbtni porus;
 - o Prek apnenih žlez nazaj v prebavilo.

Lahko pa se kovine v telesu tudi shranijo (pregled v Hopkin, 1989):

- Trajno v kloragocitih;
- Trajno v odpadnih celomskih veziklih v posteriornem delu telesa.



Slika 4: Splošna skica prečnega prereza deževnika v predelu za sedlom z oznakami (Kos M., 2013)

2.3.2 Navadni prašiček, *Porcellio scaber*

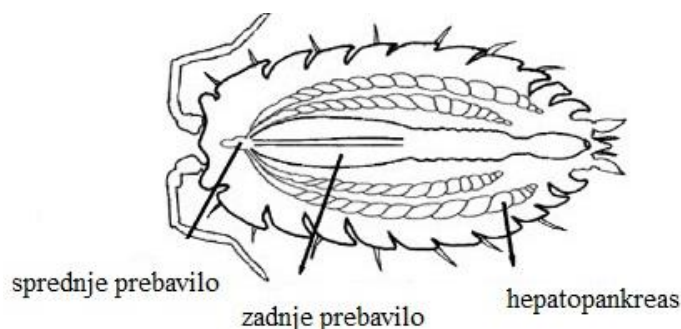
Navadni prašiček, *Porcellio scaber*, sodi med kopenske rake enakonožce, ki jih najdemo v vlažnih habitatih v bližini človekovih bivališč (sl. 5). Hranijo se z razpadlim organskim materialom in so pomembni dekompozitorji (Mršič, 1997).



Slika 5: Enakonožec navadni prašiček, *Porcellio scaber* (Vir: www)

Enakonožni raki so primeren nevretenčarski model za izvedbo številnih fizioloških, histoloških in citoloških študij (Drobne, 1997). Mednje sodijo tudi študije strupenosti kemikalij in v zadnjem času nanodelcev (Drobne s sod., 2007). Študije strupenosti pogosto vključujejo tudi raziskave sprememb v zgradbi in delovanju prebavnih žlez. Prebavne žleze ali hepatopankreas so del preprostega prebavnega sistema kopenskih rakov enakonožcev, ki je sestavljen iz prebavne cevi (sprednjega in zadnjega prebavilo) in hepatopankreasa, sestavljenega iz dveh parov cev (sl. 6) (Hames in Hopkin, 1989). Prebavilo je tudi poglavitno mesto asimilacije kovin iz okolja (Hopkin 1989), ki so lahko vezane na različne frakcije prsti (Vijver, 2005). Vir kovin za privzem skozi steno prebavila je intersticijska voda z raztopljenimi kovinami, ki jo žival pije ali pa prst in organska snov z vezanimi kovinami, ki predstavljata trdno fazo, in jo žival poje (Vijver, 2005). Telo kopenskih enakonožcev namreč pokriva debela večlojna kutikula (Waagele, 1992), ki verjetno ne omogoča znatnejšega vnosa snovi v telo. Znano pa je, da lipofilne snovi, kot so nekateri

pesticidi (Vink s sod. 1995), prehajajo v telo tudi skozi telesno površino. Hepatopankreas je osrednji presnovni in založni organ. Ima pomembno vlogo v homeostazi esencialnih (Ca, Cu, Zn) in neesencialnih kovin (Pb, Cd) (Hopkin, 1989). V hepatopankreasu je tudi glavno mesto sinteze in skladiščenja dihalnega pigmenta hemocianina, ki ima za prostetično skupino Cu. Stena hepatopankreasa je iz enoslojnega epitela, v katerem ločimo dva funkcionalno in morfološko različna celična tipa: celice B in S. Refluks vsebine iz prebavila po tiflosoličnih kanalih zanese hrano v hepatopankreas (Hopkin, 1989). Kovine iz hrane se transportirajo v celice S po koncentracijskem gradientu, kjer se kopičijo v številnih membranskih veziklih, ki jih v splošnem imenujemo granule tipa B (pregled v Hopkin, 1989). Za omenjene granule je značilno, da vsebujejo S, od kovin pa poleg Cu tudi Cd, Hg, Zn, Pb in Fe (Hopkin, 1989). Oblikovanje citoplazemskih granul pri enakonožcih je primer oblike detoksifikacije. Celice z granulami lahko potencialno propadejo in se skupaj z neprebavljeno hrano izločijo iz telesa.



Slika 6: Splošna skica enakonožca z oznakami prebavnega sistema (prilagojeno po Lešer s sod., 2008)

Razlogi za izbiro enakonožca *P. scaber* za poskus:

- Je nevretenčar in za delo z njim ne potrebujemo dodatnega dovoljenja.
- Je kopenski organizem, katerega biologija je dobro poznana.
- Odgovarjajo mu pogoji, ki jih je lahko vzdrževati v običajnih vivarijih (temperatura 20 °C, zmerna vlažnost (< 50 % WHC) in dnevno-nočni ritem 16/8 h) (Hornung s sod., 1998).
- Je drobilec listnega opada in se zakopava tudi v prst. S pitjem intersticielne vode, požiranjem delcev prsti in hrane (Vijver, 2005) lahko pride v stik s težkimi kovinami, nanodelci in drugimi kemikalijami, ki se z vetrom, padavinami ali antropogeno odložijo na površino listov ali prsti. To stanje lahko simuliramo v laboratoriju.
- Je odlična pozitivna kontrola za uporabo v histokemijskem barvanju Cu, saj tudi hepatopankreas živali iz neonesnaženega okolja vsebuje znatno količino Cu.

2.4 VPLIV BAKRA IN MONENZINA NA BIOLOŠKE SISTEME

Baker je esencialni element za evkarionte in večino prokariontov. Homeostaza Cu v organizmih je verjetno zelo natančno uravnana, saj nenadzorovani prosti Cu lahko vstopa v številne redoks reakcije v celici in povzroči škodo (Banci s sod., 2010). Mnogo encimov (>30) za svoje delovanje potrebuje baker (Arredondo in Núñez, 2005). Mehanizmi za skladiščenje in transport Cu še niso popolnoma znani, so pa prilagojeni tako, da zadovoljijo potrebe celic in obenem zmanjšajo strupenost (Arredondo s sod., 2005; Kim s sod., 2008; Bertini s sod., 2010). Rastline imajo mehanizme za aktivno regulacijo Cu, ki preprečujejo vstop zanje škodljivi količini Cu v fotosintezna aktivna tkiva (Cestone s sod., 2012).

Pri sesalcih je pomanjkanje bakra zelo redko stanje. Pogostejša je prekomerna akumulacija bakra v določenih organih (jetrih, ledvicah, živčevju, kornei), ki je povezana z različnimi boleznimi, kot na primer Willsonovo boleznijo, ko se baker kopiči zaradi presnovne motnje (Fraga, 2005). Kopičenje bakra v telesu povzroči okvare jeter in živčevja.

Povišana koncentracija težkih kovin v prsti je za organizme problematična, saj se kovine kemično in biološko ne morejo razgraditi v enostavnejše snovi. Kovine je zato tudi zelo težko odstraniti iz onesnažene prsti. V ta namen se danes razvijajo različne metode z uporabo nekaterih vrst rastlin in tudi deževnikov, ki uporabljajo princip bioakumulacije (t.i. fitoremediacijo in »vermiremediacijo« prsti) (Raskin, 1997; Kos in Leštan, 2004; Pattnaik in Reddy, 2011; Dabke, 2013).

Topnost in razpoložljivost težkih kovin v prsti sta določeni s temeljnimi kemijskimi reakcijami med kovinami in sestavinami prsti. Železovi, aluminijevi in manganovi oksidi, organska snov, karbonati, fosfati in sulfidi v prsti so pomembna vezavna mesta za kovine (Basta s sod., 2005; Vijver s sod., 2011). Poskusna prst Lufa 2.2 v našem poskusu ima dovolj mest, na katere se lahko veže Cu, saj je sestavljena iz vsaj 10 % šote, 30 % kaolinitne gline ($\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$) in 60 % kremenčevega peska (SiO_2 ; >70 % delcev večjih od 0,05 mm). Obenem pa, glede na velikost delcev, ponuja dovolj intersticielnih prostorov, kjer se lahko zadrži voda z raztopljenimi snovmi.

Koncentracije v vodi topnega bakrovega nitrata, ki smo jih izbrali za poskus (80 in 160 mg/kg suhe prsti), ustrezajo koncentracijam bakra v zgornjih slojih prsti, ki so značilne za primorsko vinorodno področje (70–160 mg/kg suhe prsti) (Rusjan s sod., 2007).

Znano je, da deževniki in enakonožci učinkovito regulirajo koncentracije esencialnih elementov Zn, Cu in Mn (Hopkins, 1989; Edwards in Bohlen, 1996). Baker je precej strupen za deževnike. Koncentracije bakra v prsti, ki povzročijo pogin polovice poskusnih živali v 14 dneh (LC_{50} = 335–619 mg/kg suhe teže prsti), so precej odvisne od lastnosti

prsti (Daoust s sod., 2006). Criel s sod. (2008) je ugotovil, da 87,5 mg Cu/kg suhe mase prsti ne vpliva na razmnoževanje deževnikov (28 dni, Lufa 2.2), medtem, ko 159 mg Cu/kg suhe mase prsti že vpliva (28 dni, Lufa 2.2). Koncentraciji bakra 80 in 160 mg/kg nimata učinka na enakonožce, saj ti tolerirajo zelo visoke koncentracije bakra v prsti (>1200 mg/kg suhe mase prsti, Hopkin s sod. 1986) ali hrani (LC_{50} =1117 mg/kg suhe mase javorjevih listov, Farkas s sod, 1996). Koncentracije monenzina, ki smo jih izbrali za poskus (25 mg/kg suhe prsti), ustrezajo koncentracijam monenzina v svežem nekompostiranem perutninskem gnoju (Žižek s sod., 2011). Ta koncentracija ima vpliv na stopnjo razmnoževanja deževnikov (NOEC 3,5 mg/kg, EC_{50} 12,7 mg/kg), medtem ko na enakonožce nima vpliva (NOEC v prsti > 849 mg/kg, NOEC v hrani > 357 mg/kg) (EFSA, 2005; Žižek s sod., 2011).

Na pašnikih ovac in goveda ter na drugih kmetijskih površinah, ki so umetno gnojene z iztrebki perutninskih farm, kokcidostatiki prihajajo v stik z netarčnimi talnimi organizmi. Ker so številna kmetijska zemljišča preobremenjena tudi s kovinami, zlasti s Cu, Cd, Zn in Pb, se ob sočasni prisotnosti kokcidostatikov lahko spremeni kinetika kovin (privzem, kopičenje, izločanje) pri talnih organizmih. Dostopne informacije (Starnes s sod., 1984 v Kirk s sod. 1994; Khan, 1993) kažejo na to, da bi monenzin lahko imel vpliv na razpoložljivost Cu za kopenske nevretenčarje.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 TESTNI ORGANIZMI

V poskusu smo uporabili dva nevretenčarja: deževnika vrste *Eisenia andrei* Bouché, 1972 (Annelida: Oligochaeta: Lumbricidae) in enakonožnega raka, vrste *Porcellio scaber* Latreille, 1804 (Crustacea: Isopoda: Oniscidea).

Deževnike smo dobili iz kontrolirane vzgoje Laboratorija za forenzično toksikologijo in ekotoksikologijo na Veterinarski fakulteti Univerze v Ljubljani. Živali so bile gojene v klimatizirani sobi pri temperaturi 20 ± 1 °C, z dnevno-nočnim ritmom 12/12 h in pri relativni vlažnosti 80 %. Gojitvene posode iz pleksi stekla so bile napolnjene z vlažno zemljo in šoto. Vrednost pH substrata je bil uravnan na vrednost 6. Živali so bile redno hranjene z zmletim posušenim konjskim gnojem netretiranih konj. Za poskus smo iz kulture izbrali spolno zrele osebkke z dobro izraženim sedlom in maso med 200 in 400 mg.

Enakonožne rake smo dobili iz kontrolirane vzgoje Katedre za zoologijo na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani. Živali so bile gojene v klimatizirani sobi pri temperaturi 20 ± 1 °C, z dnevno-nočnim ritmom 16/8 h in pri relativni vlažnosti 80 %. Steklene gojitvene posode so bile napolnjene z vlažno prstjo in listno steljo. Živali so bile redno hranjene s posušenimi listi različnih dreves iz neonesnaženega gozda v bližini Ljubljane, občasno tudi s krompirjem, zelenjavo, jabolki in pripravljeno hrano za kunce (Hobby Vit, HP Hobby program, Hoče, Slovenija). Za poskus smo iz kulture izbrali odrasle osebkke obeh spolov v medlevitveni fazi (Zidar s sod., 1998) in maso med 30 in 50 mg. Živali v predlevitvenih fazah levitvenega cikla in oplojene samice smo izključili.

3.2 SPLOŠNA ZASNOVA POSKUSA

Poskus smo vzdrževali v klimatizirani sobi Laboratorija za forenzično toksikologijo in ekotoksikologijo VF pri temperaturi 20 ± 1 °C, z dnevno-nočnim ritmom 12/12 h in pri relativni vlažnosti 80 %. Pravokotne polipropilenske posode (160 × 110 mm, volumen 1,5 l) smo napolnili s standardizirano naravno prstjo Lufa 2.2 (Speyer, Nemčija) (sl. 7). Tip prsti je bil opredeljen kot ilovnati pesek (velikost delcev: < 0,002 mm: $7,3 \pm 1,2$ %, 0,002 – 0,05 mm: $13,8 \pm 2,7$ %, 0,05 – 2,0 mm: $78,9 \pm 3,5$ %). Vsebnost organskega ogljika v prsti je bila $1,77 \pm 0,2$ %, dušika pa $0,17 \pm 0,02$ %. Vrednost pH (0,01 M CaCl₂) je bila $5,5 \pm 0,2$ in vrednost kationske izmenjevalne kapacitete $10,1 \pm 0,5$ meq/100 g. Zadrževalna kapaciteta vode (Water Holding Capacity, WHC) je bila $41,8 \pm 3,0$ g/100 g suhe prsti. Vlažnost prsti v poskusu je bila 60 % WHC.



Slika 7: Pravokotna polipropilenska posoda (160 × 110 mm, volumen 1,5 l) s perforiranim pokrovom za izmenjavo zraka (Kos M., 2013)

Prst smo kontaminirali z ionofornim kokcidiostatikom monenzinom in/ali bakrom. Ionoforni kokcidiostatik monenzin smo uporabili v obliki monenzin natrijeve soli (Sigma-Aldrich; 90 % čistost), ki smo ga hranili dobro zaprtega v hladilniku pri 4 °C. Baker smo uporabili v obliki soli bakrovega nitrata-tri-hidrata ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (Merck; 99,5 % čistost), ki smo jo pred poskusom razvlažili v eksikatorju pri sobni temperaturi.

Živali smo izpostavili 6 različnim tretmajem: netretirani prsti (kontrola), monenzinu (25 mg/kg suhe prsti), bakru (80 ali 160 mg/kg suhe prsti) ter kombinaciji bakra (80 ali 160 mg/kg suhe prsti) in monenzina (25 mg/kg suhe prsti) in dvema časovnima obdobjema izpostavljenosti (14 in 28 dni) (pregl. 1).

Preglednica 1: Pregled tretmajev pri dveh poskusnih organizmih, deževniku *E. andrei* in enakonožcu *P. scaber*, v dveh časovnih obdobjih z nominalnimi koncentracijami poskusnih kemikalij (mg/kg suhe mase prsti)

Organizem, časovno obdobje				
Deževniki, 14 dni		Deževniki, 28 dni	Enakonožci, 14 dni	Enakonožci, 28 dni
Tretma	1 Kontrola dH ₂ O	Kontrola dH ₂ O	Kontrola dH ₂ O	Kontrola dH ₂ O
	2 Cu 80	Cu 80	Cu 80	Cu 80
	3 Cu 160	Cu 160	Cu 160	Cu 160
	4 Monenzin 25	Monenzin 25	Monenzin 25	Monenzin 25
	5 Cu 80+monenzin 25	Cu 80+monenzin 25	Cu 80+monenzin 25	Cu 80+ monenzin 25
	6 Cu 160+monenzin 25	Cu 160+monenzin 25	Cu 160+monenzin 25	Cu 160+monenzin 25

V poskusu smo uporabili 240 deževnikov in 240 enakonožcev, ki smo jih razdelili na 12 skupin za posamezno vrsto, tako da smo v vsako posodo dodali 20 živali. Živali smo vzorčili po 14. in 28. dneh. Po deset živali iz vsakega tretmaja smo uporabili za analizo celokupne telesne vsebnosti bakra s plamensko atomsko absorpcijsko spektroskopijo (AAS), preostale preživele živali pa smo uporabili za histokemijsko analizo ter za mapiranje porazdelitve Cu v liofiliziranih krio rezinah.

3.3 PRIPRAVA PRSTI

Prst smo najprej posušili v ventilacijski pečici pri 105 °C do konstantne mase. V tretmajih, kjer smo prst kontaminirali le z bakrom, smo sol raztopili v manjši količini destilirane vode in jo primešali prsti. Po dodatku raztopine soli smo prst navlažili s preostankom destilirane vode.

Za vse tretmaje, kjer smo prst kontaminirali s 25 mg monenzina/kg suhe prsti, smo monenzin raztopili v 50 ml acetona (Sigma Aldrich) na kg suhe prsti, raztopino dobro zamešali v prst in pustili preko noči v digestoriju, da je aceton izhlapel. Prst smo pripravili za vse tretmaje z monenzinom skupaj. Naslednji dan smo kontaminirano prst razdelili v polipropilenske posode, v nekatere dodali še bakrovo raztopino ter vse ustrezno navlažili z destilirano vodo. Kontrolni prsti smo dodali le destilirano vodo.

3.4 MERJENJE ZADRŽEVALNE KAPACITETE VODE PRSTI (WHC)

Pred začetkom poskusa smo izračunali vsebnost vode v založni prsti (a) in obenem tudi preverili podatek o WHC iz specifikacije proizvajalca (b).

(a) Za izračun vsebnosti vode v založni prsti smo vzeli 5 vzorcev prsti (cca. 10 g), jih stehali in nato sušili pri 105 °C do konstantne mase. Glede na podatek proizvajalca o WHC smo izračunali vsebnost vode v založni prsti.

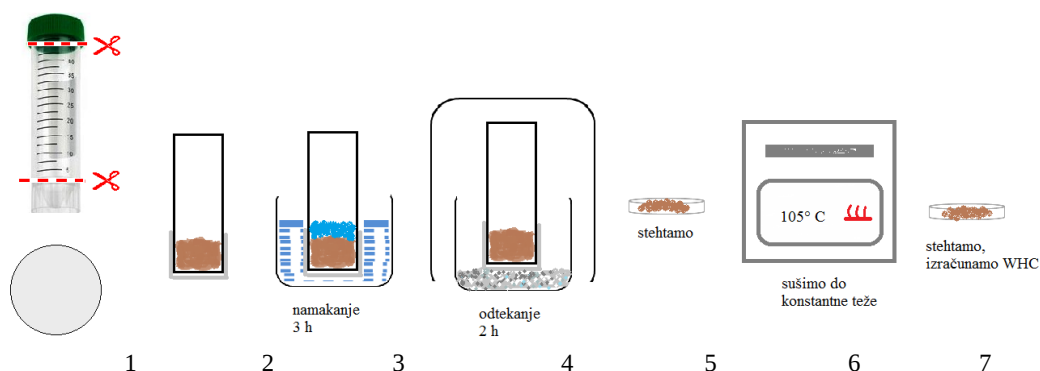
(b) Za meritev WHC (sl. 8) smo uporabili samostoječo centrifugirko (50 ml, Sigma Aldrich), ki smo ji odrezali dno. Na en konec centrifugirke smo namestili dvojni filtrirni papir in ga pritrdili z gumijasto elastiko. V centrifugirko smo zatehtali 10 g prsti. Pripravili smo si vodno kopel in centrifugirko postopno potapljali, dokler ni bil nivo vode v njej 1 cm nad prstjo. Prst smo nato pustili namakati 3 ure. Po 3 urah smo centrifugirko za 2 uri prestavili na dobro omočen fin kremenčev pesek in pustili, da se je nevezana voda odtekla. Sušenje smo preprečili z večjo čašo, ki smo jo poveznili čez centrifugirko. Potem smo vzorec prsti stehali in ga pri 105 °C sušili do konstantne mase. WHC smo izračunali po enačbi (1) (ISO, 1996).

$$WHC \text{ (v \% suhe mase)} = (S-D)/D * 100 \quad \dots(1)$$

Kjer je:

S = masa z vodo nasičene prsti

D = suha masa prsti.



Slika 8: Merjenje WHC prsti. Od leve proti desni: 1. priprava valja; 2. valj napolnimo s prstjo; 3. prst namakamo v vodi 3 h; 4. prst odcedimo na kremenčevem pesku; 5. tehtanje; 6. sušenje; 7. Tehtanje (Kos M., 2013)

3.5 MERJENJE pH PRSTI

Pred pripravo osrednjega poskusa smo preverili pH založne prsti. Vrednost pH je bila nizka, med 5 in 5,5. Za uravnanje pH smo pred kontaminacijo prsti primešali 1 g čistega CaCO_3 (Merck) na 0,5 kg suhe prsti in pH vrednost dvignili na 6,5-7.

Vrednost pH prsti smo merili pred začetkom (pred vnosom živali) in po koncu poskusa (po odstranitvi živali). Za meritev smo uporabili 5 g prsti, ki smo jo zalili s 5x volumnom 0,1 M CaCl_2 . Za pripravo 100 ml 0,01 M CaCl_2 smo natehtali 110,98 mg CaCl_2 ($M=110,9834$ g/mol). Suspenzijo smo nato stresali 5 minut in jo pustili stati 2 uri. Za merjenje pH tekoče faze smo uporabili pH meter (Seven compact Mettler Toledo, Francija), ki smo ga umerili s serijo pufernih raztopin (pH=4, 7 in 9).

3.6 POSKUS Z DEŽEVNIKI

3.6.1 Priprava poskusnih posod z deževniki

Dvanajst posod smo napolnili s po 1,1 kg suhe prsti, kar ustreza smernicam standarda OECD/OCDE (2004), ki predvideva 50 – 60 g suhe prsti na deževnika. Deževnike smo naključno izbrali iz založne kulture in jih za 3 dni namestili v kontrolno prst brez dodane hrane. V vsako poskusno posodo smo vnesli 20 deževnikov. Živali smo stehali ob začetku (polno prebavilo) in koncu poskusa (izpraznjeno prebavilo; živali za analizo z AAS). Ob koncu poskusa smo prešteli preživele živali.

Deževnike smo hranili z zmletim posušenim konjskim gnojem netretiranih konj. Za 20 deževnikov smo natehtali 10 g gnoja, ki smo ga omočili z 10 ml destilirane vode (OECD/OCDE, 2004). Gnoj smo zamešali v prst ob začetku poskusa in po 14 dnevih.

3.6.2 Razmnoževanje deževnikov

Ob koncu poskusa, po 14. in po 28. dneh, smo celoten substrat iz vsake poskusne posode trikrat zapored pregledali in prešteli najdene kokone. Ročno prebiranje kokonov je zamudno in lahko tudi nenatančno, zato smo po 4 tednih od konca poskusa preverili še prisotnost juvenilnih deževnikov, ki so se v tem času izlegli iz kokonov. Van Gestel s sod. (1988 v OECD/OCDE, 2004) za štetje juvenilnih deževnikov navaja dve alternativni metodi (vodno kopel in spiranje preko sita). Mi smo za štetje juvenilnih deževnikov uporabili vodno kopel. Testne posode smo namestili na vodno kopel z začetno temperaturo 40 °C, ki smo jo postopno segrevali do 60 °C. Po pol ure so se juvenilni deževniki pojavili na površini prsti, od koder smo jih odstranili in prešteli.

V predhodnem poskusu smo ocenili število izleženih juvenilnih deževnikov na kokon iz 10 kokonov. Pripravili smo petrijevke z omočenim filtrirnim papirjem in malo omočene prsti Lufa 2.2 v sredini petrijevke. V prst smo namestili kokon. Vlažnost v petrijevki smo uravnavali vsak 2. dan z dodatkom destilirane vode. Petrijevke smo vzdrževali v klimatizirani sobi pri temperaturi 20 ± 1 °C, z dnevno-nočnim ritmom 12/12 h in pri relativni vlažnosti 80 %. Inkubacija kokonov je trajala 3 tedne (Venter in Reinecke, 1988; Garg s sod., 2005), po tem času pa smo dvakrat na dan preverili, ali je do izleganja mladičev že prišlo in mladiče prešteli.

3.7 PRIPRAVA POSKUSNIH POSOD Z ENAKONOŽCI

Enakonožce smo naključno izbrali iz založne kulture in jih za 2 dni namestili na kontrolno prst Lufa 2.2 z leskovimi listi. Posodice smo napolnili s po 0,6 kg suhe prsti. V vsako poskusno posodo smo vnesli 20 enakonožcev. Živali smo stehali ob začetku in koncu poskusa (živali za analizo z AAS). Ob koncu poskusa smo prešteli preživele živali.

Enakonožce smo med poskusom hranili s posušenimi leskovimi listi. Za 20 enakonožcev smo na površino prsti položili po 3 liste (cca. 400 mg/list). Vsak teden smo nepojedene liste odstranili iz posode in jih nadomestili z novimi.

3.8 MERJENJE KONCENTRACIJE MONENZINA V PRSTI

Vsebnost monenzina v prsti smo določili z metodo visokotlačne tekočinske kromatografije (v nadaljevanju HPLC) v Laboratoriju za forenzično toksikologijo in ekotoksikologijo Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani. Po en vzorec z monenzinom tretirane prsti (50 g) smo zajeli iz vsake posode na začetku (0. dan, pred dodatkom živali) in ob koncu poskusa (14. ali 28. dan poskusa, po odstranitvi živali). Vzorce smo do analize s HPLC hranili v zamrzovalniku pri -30 °C. Iz vsakega vzorca prsti smo naredili 3 podvzorce, ki smo jih nadalje analizirali. Za analizo smo uporabili 0,5 g prsti. Prst smo homogenizirali v 5 ml raztopini izooktana-etilacetata (9:1 v/v) (Merck). Vzorce smo 20 minut pustili stresati na stresalniku, nato smo jih centrifugirali 5 min pri 3000 obratih/min. Supernatant smo odpipetirali v svežo epruveto, oborino pa smo ponovno zalili s 5 ml zmesi izooktana-etilacetata (9:1 v/v) (Merck). Vzorce smo ponovno dali na stresalnik in jih centrifugirali. Supernatant smo odpipetirali in ga združili s prvim supernatantom. Supernatant smo očistili na SPE silikatnih kolonah (JT Baker, 500 mg, 3 ml). Monenzin smo eluirali s 5 ml zmesi diklorometan-metanola (9:1 v/v) (Merck). Vzorce smo nato uparili na vodni kopeli pri 45 °C pod tokom dušika in jih raztopili v metanolu (Merck).

Meritve koncentracije monenzina smo izvedli s sistemom HPLC (Waters Alliance 2695, Waters, Milford, MA, ZDA) z naslednjo opremo: PC s programom Millennium za kontrolo sistema in procesiranjem podatkov, kolono Prodigy (5 µm ODS(2), 250 x 4,60 mm) (Phenomenex, Torrance, CA, ZDA), postkolonskim reaktorjem z 1000 µl reakcijsko spiralo (Waters RXN 1000) in UV/VIS detektorjem. Hitrost mobilne faze je bila 0,9 ml/min, injiciran volumen 100 µl in temperatura kolone je bila nastavljena na sobno vrednost. Mobilno fazo smo pripravili iz 940 ml metanola (Merck), 60 ml destilirane vode (MilliQ) in 1 ml očetne kisline (Merck). Za reagent v postkolonskem reaktorju smo uporabili vanilin, ki z monenzinom tvori obarvan kompleks (Goras in Lacourse, 1984; Lapointe in Cohen, 1988). Za postkolonski reagent smo v 950 ml metanola previdno in postopno dodali 20 ml žveplove kisline H₂SO₄, nato smo v ohlajeno zmes primešali 30 g

vanilina. Pretok v postkolonskem reaktorju je bil 0,9 ml/min, temperatura pa je bila nastavljena na 98 °C. Detekcijo obarvanega kompleksa smo izvedli pri valovni dolžini 592 nm. Retencijski čas je bil 8,7 minut. Koncentracije monenzina smo izrazili v mg/kg suhe prsti. V ta namen smo vzorce prsti posušili pri 105 °C do konstantne mase in izračunali vsebnost vode v prsti.

Izračunali smo razpolovno dobo monenzina po enačbi (2 in 3), pri tem pa smo predpostavili, da je razpad monenzina kemijska reakcija prvega reda (McMurry in Fay, 2003; Wikipedia, 10.7.2013):

$$\ln c_k / c_0 = -kt \quad \dots(2)$$

$$t_{0,5} = \ln(2)/k. \quad \dots(3)$$

Kjer je:

c_k = koncentracija monenzina na koncu poskusa

c_0 = koncentracija monenzina na začetku poskusa

k = konstanta hitrosti reakcije prvega reda

t = čas trajanja poskusa [tedni]

$t_{0,5}$ = razpolovna doba [tedni].

3.9 MERJENJE KONCENTRACIJE BAKRA Z METODO ATOMSKE ABSORPCIJSKE SPEKTROSKOPIJE (AAS)

3.9.1 Priprava steklovine

Vso steklovino, ki smo jo uporabljali za analize kovin, smo predhodno:

- temeljito pomili pod tekočo vodo,
- namočili za vsaj 1 dan v 2 % detergent Kemex,
- oprali v pralnici,
- namočili za vsaj 1 dan v 0,2 % HNO₃,
- sprali z destilirano vodo (Mili Q-185) in
- posušili v ventilacijski pečici pri 105 °C.

Do uporabe smo steklovino zaščitili pred kontaminacijo in zapraševanjem.

3.9.2 Priprava bakrovih standardov

Za umeritveno krivuljo pri metodi plamenske atomske absorpcijske spektroskopije (AAS) smo iz založnega bakrovega standarda (1000 mg/l; Sigma Aldrich) pripravili raztopine bakrovega standard v bučkah z definiranim volumnom (pregl. 2). Standarde smo hranili v hladilniku pri 4 °C in jih 1 dan pred meritvijo prestavili na sobno temperaturo.

Preglednica 2: Priprava raztopin bakrovega standarda

umeritvena koncentracija standarda	volumen standarda	volumen bučke	volumen dH ₂ O
0,5 mg/l	125 µl	250 ml	dopolnimo
1 mg/l	200 µl	200 ml	do oznake
3 mg/l	600 µl	200 ml	na bučki
5 mg/l	500 µl	100 ml	

3.9.3 Analiza bakra v prsti

Iz vsakega tretmaja smo pred začetkom poskusa vzeli 2 vzorca prsti (30 g). Vzorce prsti smo sušili 3 dni pri temperaturi 105 °C. Prst smo nato s stekleno palčko homogenizirali, pri tem smo pazili, da vzorcev nismo kontaminirali. Iz obeh vzorcev prsti smo naredili 5 podvzorcev prsti. Za razklop smo vzeli 100 mg prsti, ki smo jo zalili s 3 ml aqua regie (zmes koncentrirane dušikove in klorovodikove kisline 1:3 v/v). Prst smo najprej zalili z 1,5 ml aqua regie in ji čez 1 uro ponovno dolili enako količino aqua regie. Razklop smo izvedli v termobloku (TBSE) (sl. 9).



Slika 9: Termoblok z ročno nastavlјivim temperaturnim režimom (Kos M., 2013)

Pri razklopu smo se ravnali po naslednjem temperaturnem režimu:

1. dan:

zlijemo s 3 ml aqua regie, inkubiramo 24 ur pri sobni temperaturi

2. dan:

30 min 45 °C

3 h 65 °C

4 h 85 °C (do zbistritve)

Preko noči 105 °C

3. dan:

Termoblok ohladimo na ledu, vzorec zalijemo z 2 ml aqua regie

30 min 85 °C

1 h 105 °C

4 h 115 °C

4 h 125 °C

135 °C (do izhlapitve raztopine, preko noči)

4. dan:

150 °C (do popolne izhlapitve, izključimo ventilacijo v digestoriju)

Do meritev smo epruvete z razklopljenim materialom zaščitili pred kontaminacijo in zapraševanjem ter shranili pri sobni temperaturi. Za meritev z AAS smo razklopljeno oborino zalili s 3 ml 0,2 % HNO_3 in pustili stati pol ure. Avtomatsko pipeto smo pred tem umerili po navodilih proizvajalca (Brand). Epruvete smo zaprli in nato vzorce dobro premešali. Homogenizirane vzorce smo hipoma prelili v centrifugirke in jih centrifugirali 3 min pri 2500 obratih/min. Vsebnost bakra v prsti smo določili s plamensko atomsko absorpcijsko spektroskopijo (Perkin Elmer AAnalyst 100) (sl. 10). Za umeritveno krivuljo smo uporabili pripravljene bakrove standarde.



Slika 10: Plamenski atomski absorpcijski spektrofotometer Laboratorija za AAS na Katedri za zoologijo Oddelka za biologijo BF (Kos M., 2013)

3.9.4 Analiza bakra v poskusnih organizmih

Po izpostavitvi smo odvzete živali sprali z destilirano vodo in jih za 24 h namestili na omočen filtrirni papir v petrijevke, da so izpraznile prebavilo. Vmes smo po 6. in 12. urah zamenjali filtrirni papir. Živali smo sprali z destilirano vodo, jih osušili na filtrirnem papirju in stehali ter narkotizirali v 7 % etanolu. Živali smo zaprli v Eppendorf epruvete (v nadaljevanju epice) in jih do uporabe hranili v zamrzovalni skrinji pri -30 °C. Živali smo nato liofilizirali 3 dni pri temperaturi -30 °C in tlaku 0,121 mbar. Po liofilizaciji smo jih prenesli v eksikator, da so se segrele na sobno temperaturo, nato smo jih stehali.

Pri razklopu smo se ravnali po naslednjem temperaturnem režimu:

1. dan:

zlijemo z 1,5 ml zmesi dušikove in perklorne kisline, inkubiramo 24 ur pri sobni temperaturi

2. dan:

30 min 45 °C

1 h 65 °C

1 – 2 h 85 °C (do zbistritve raztopine)

2 h 105 °C

1 h 115 °C (zmes vre pri 110 °C)

1 h 125 °C

1 h 135 °C

1 h 145 °C

160 °C (do razbarvanja raztopine)

185 °C (preko noči)

3. dan:

205 °C (do popolne izhlapitve, izključimo ventilacijo v digestoriju)

Do meritev z AAS smo epruvete z razklopljenim materialom zaščitili pred kontaminacijo in zapraševanjem ter shranili pri sobni temperaturi. Za meritev z AAS smo razklopljeno oborino zalili z 2 ml 0,2 % HNO₃ in pustili stati pol ure. Epruvete smo zaprli in pred meritvijo na mešalniku premešali do popolne raztopitve usedline.

Na podlagi izmerjenih koncentracij bakra v celih deževnikih, enakonožcih in koncentracij bakra v prsti smo izračunali bioakumulacijski faktor (BAF) po enačbi (4):

$$BAF = c(\text{Cu v živali})/c(\text{Cu v prsti}) \quad \dots(4)$$

3.9.5 Analiza bakra v hrani

Z AAS smo analizirali vsebnost bakra v hrani deževnikov (v konjskem gnoju) in enakonožcev (v leskovih listih). Leskove liste, ki jih enakonožci niso pojedli, smo odstranili s površine prsti in jih dobro sprali z destilirano vodo, da smo odstranili morebitne delce prsti. Založni konjski gnoj in leskove liste iz posameznega tretmaja smo posušili do konstantne mase pri 105 °C. Hrano smo homogenizirali s stekleno palčko. Za razklop smo uporabili 30 mg hrane. Konjski gnoj in leskove liste smo popolnoma razklopili v zmesi koncentrirane dušikove in perklorne kisline (7:1 v/v). Razklop smo izvedli v termobloku po protokolu opisanem v poglavju 3.9.4.

3.10 MERITVE KONCENTRACIJE KOVIN V PRSTI Z METODO RENTGENSKE FLUORESCENCE (XRF)

3.10.1 Priprava vzorcev prsti

Vzorci prsti smo pripravili in analizirali z metodo XRF v Laboratoriju za rentgensko spektrometrsko analizo Odseka za fiziko nizkih in srednjih energij na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani. Vzorce prsti smo najprej sušili 3 dni pri temperaturi 105 °C. Prst smo nato homogenizirali s pomočjo steklene palčke. Za analizo smo uporabili 1 g vzorca. Osnova prsti Lufa 2.2 so alumnosilikati, ki so otežili pripravo čvrstih tablet. Za boljšo čvrstost tablet smo v vzorec prsti primešali nekaj kapljic raztopine polistirena, raztopljenega v acetonu, ki je povezal delce prsti, in vzorec za nekaj minut obsevali z IR lučjo, da je topilo izhlapelo. Iz prsti smo s pomočjo modela za tablete in hidravlične stiskalnice (Schneider, Mod.MU 100, 10.000 kPa) naredili tablete s površino 4,9 cm² (sl. 11). Tablete smo prenesli v plastične posodice, kjer so bile zaščitene pred poškodbami in kontaminacijo pred meritvijo. Tablete smo pred meritvijo stehali (XS205 Dual Range, Mettler Toledo). Kovinski material, ki smo ga uporabljali za pripravo tablet, smo sproti očistili s 70 % etanolom in papirnimi brisačami. (Kump s sod., 1996; Nečemer s sod., 2003; Vogel-Mikuš s sod., 2006).



Slika 11: IR luč, hidravlična stiskalnica (levo) in sestavljeni kovinski model za pripravo tablet (desno) v Laboratoriju za rentgensko spektrometrsko analizo na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani (Kos M., 2013)

3.10.2 Meritev

Za meritev smo tableto iz prsti položili na radioizotopni vir. Za fluorescenčno ekscitacijo smo uporabili Cd-109 (300 MBq) obročasti radioizotopni vir (Isotope Products Laboratories, U.S.A.) (Kump s sod., 1996; Nečemer s sod., 2003; Vogel-Mikuš s sod., 2006). Meritev enega vzorca je potekala 2000 sekund. Energijska ločljivost spektrometra je bila 175 eV pri 5.9 keV (Nečemer s sod., 2003). Poleg koncentracije bakra smo določili še koncentracije drugih elementov, ki so bili prisotni v vzorcu prsti. Z XRF ne moremo meriti lahkih elementov, ki predstavljajo t.i. "temno matriko" ali rezidualni matriks. Pri kvantifikaciji smo matriko privzeli - v primeru prsti so bili to oksidi in alumosilikati.

3.11 LOKALIZACIJA BAKRA V TKIVIH POSKUSNIH ORGANIZMOV S HISTOKEMIJSKIMI METODAMI

3.11.1 Sekcija živali

V predhodnem poskusu smo deževnike narkotizirali s karbonatno vodo Radensko (Dittbrenner s sod., 2011). Deževnike smo namakali 3 minute, a pri nekaterih je bil ta čas prekratek, saj so se ob sekciji premaknili in zakrčili. Ker je tak način narkotizacije ni bil optimalen, smo deževnike in enakonožce nadalje narkotizirali v 7 % etanolu. Deževniki so se v etanolu zelo zasluzili, zato smo jih pred sekcijo osušili na filtrirnem papirju.

Za histološko analizo smo izbrali telesni segment med predzadnjim členom sedla (28. telesni obroč) in 50. telesnim obročem, dolg približno 1 cm (sl. 12). Pri sekciji smo živali obrnili na hrbtno stran in hitro zarezali čez trebušnjačo.

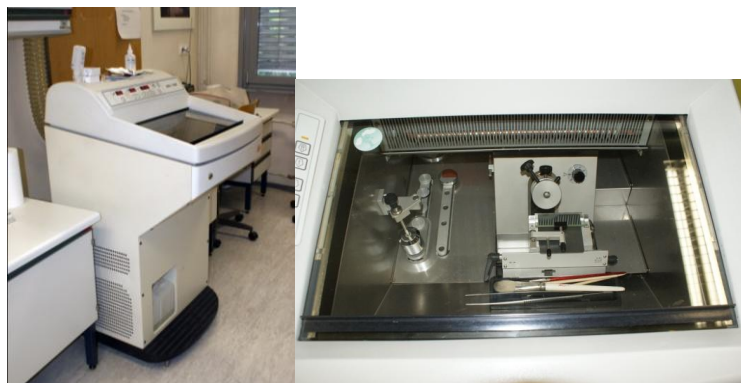
Za enakonožce sta Žnidaršič in Štrus (2004) razvili primerno metodo za semikvantitativno oceno razporeditve bakrovih granul v hepatopankreasu na celičnem in organskem nivoju, pri čemer sta uporabili izolirane celotne žlezne cevke. V našem poskusu enakonožcev nismo secirali, za analizo smo uporabili cele živali. Enakonožce smo narkotizirali v 7 % etanolu, jih osušili na filtrirnem papirju in jim odstranili antene in noge zaradi lažjega vklapljanja v zamrzovalni medij.



Slika 12: Območje sekcije pri deževniku *Eisenia andrei* (Kos M., 2013)

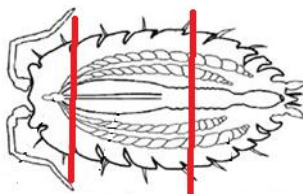
3.11.2 Priprava zamrznjenih (krio) rezin

Košček deževnika in celega enakonožca smo dali v nosilec iz trde aluminijaste folije, ga orientirali, zalili z zamrzovalnim medijem Jung (Leica) in klasično zamrznili pri $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Do uporabe smo jih hranili v zamrzovalniku pri $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zamrznjene koščke smo rezali v kriostatu (Leica CM1850) (sl. 13) Košček smo pritrdili na nosilec, ga obrezali ter namestili na kriotom. Temperatura komore med rezanjem je bila med -20 in $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Slika 13: Kriostat Leica CM1850 v Laboratoriju za histologijo in elektronsko mikroskopijo Katedre za zoologijo Oddelka za biologijo BF (levo). Pogled v komoro kriostata (desno) (Kos M., 2013)

Debelino rezin smo nastavili na $20\text{ }\mu\text{m}$. Delali smo serijske rezine. Deževnike smo narezali od predzadnjega člena sedla v posteriorni smeri (sl. 12). Pri enakonožcih smo predel glave in sprednjega prebavila zavrgli, za analizo pa smo nato uporabili serijske rezine med začetkom črevesa do zadnje tretjine hepatopankreasa (sl. 14). Rezine smo pobrali s stekelci s polilizinskim premazom. Sosednje sklope serijskih rezin (5-8 $20\text{ }\mu\text{m}$ rezin) smo pobrali z ločenimi objektniki in jih namenili za enega od histokemijskih barvanj, da smo lahko primerjali različna barvanja med seboj.



Slika 14: Območje serijskih rezin pri enakonožcu *Porcellio scaber* (prirejeno Lešer s sod., 2008)

3.11.3 Priprava stekelc s polilizinskim premazom

Objektnike smo namestili v steklene nosilce in jih 30 minut namakali v nerazredčenem detergentu Kemex. Nato smo detergent odlili in stekelca 30 min spirali pod tekočo vodo. Zatam smo stekelca namočili dvakrat po 5 minut v destilirano vodo. Nosilec s stekelci smo

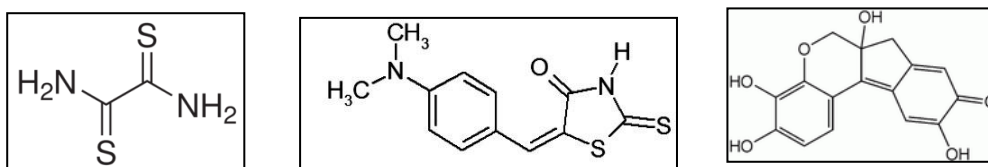
dobro odtekli in ga za 5 minut potopili v 0,01 % raztopino poli-L-lizina (10x redčitev iz 0,1 % založne raztopine poli-L-lizina). Nosilec s stekelci smo nato dobro odtekli, stekelca pa pustili sušiti 24 ur pri sobni temperaturi in jih zaščitili pred zapraševanjem. Po uporabi smo delavno raztopino poli-L-lizina prefiltrirali in jo shranili v hladilnik pri 4 °C.

3.11.4 Priprava vodnega medija glicerol-želatine za prekrivanje

Zatehtali smo 10 g želatine v lističih (Dr. Oetker, Nemčija) in jo namočili v 60 ml destilirane vode. Želatino smo 10 minut pustili nabrekati in jo nato na vodni kopeli postopno segrevali do 60 °C, da se je popolnoma raztopila. Želatino smo nato odmaknili z vodne kopeli in dodali 70 ml glicerola ter počasi premešali, da nismo ustvarjali zračnih mehurčkov. Želatino smo hranili v hladilniku pri 4 °C in jo za uporabo ponovno segreli na 60 °C.

3.11.5 Priprava barvil za histokemijo in barvanje

Za histokemijsko lokalizacijo bakra v tkivih so na razpolago različni reagenti: rubeanska kislina, 5-p-dimetilaminobenziliden-rodanin, orcein, difenilkarbazid, difeniltiokarbazon, Alizarin modro, srebrov sulfid, hematoksilin itd., ki pa se med seboj razlikujejo po specifičnosti, občutljivosti, obstojnosti produktov in zahtevnosti postopka priprave reagent in barvanja (Kiernan, 1990). V poskusu smo za histokemijsko lokalizacijo bakra uporabili: rubeansko kislino, rodaninin hematoksilin (sl. 15). Rubeanska kislina in rodanin sta dva izmed najpogostejše uporabljenih reagentov za lokalizacijo bakra, ki zadovoljivo izpolnjujeta prej omenjene kriterije (Lindquist, 1969; Kiernan, 1990). Poleg omenjenih tehnik barvanja pa je barvanje s hematoksilinom visoko občutljivo, a ima nizko specifičnost, saj poleg bakra obarva tudi nekatere druge elemente (Al, Be, Bi, Cr, Cu, Dy, Fe, Ga, Hf, Ho, In, Ir, Mn, Mo, Nb, Nd, Ni, Os, Pb, Pt, Rh, Sn, Ta, Ti, Tl, U, Yb, Zn, Zr) (Lillie in Fulmer, 1976).



Slika 15: Strukturna formula rubeanske kisline (ditiooxamida) (levo), rodanina (5-p-dimetilaminobenziliden-rodanina) (v sredini), hematoksilina (7,11b-dihidroindeno[2,1-c]kromen-3,4,6a,9,10(6H)-pentol) (desno)
(Vir: www)

3.11.5.1 Priprava rubeanske kisline in barvanje

Za pripravo raztopine rubeanske kisline smo natehtali 0,2 g ditiooxamida (rubeanske kisline) (Merck) in 0,4 g natrijevega acetata (CH_3COONa) (Merck) ter ju raztopili v 200 ml 70 % etanola (Kiernan, 1990 in 2010). Raztopino smo pustili mešati preko noči. Objektnike s svežimi rezinami smo razvrstili v banjico z rubeansko kislino. Banjico smo za 16 ur dali na vodno kopel, ki smo jo ogreli na 37 °C (sl. 16). Po končanem barvanju smo objektnike sprali v dveh menjavah 70 % etanola. Odvečni etanol smo odtekli in rezine prekrili z vodnim medijem glicerol-želatino. Kot negativno kontrolo smo uporabili 70 % etanol, s katero smo ravnali enako kot v primeru barvanja z rubeansko kislino. Bakrovi depoziti so se obarvali temno zeleno-črno, pri negativni kontroli do obarvanja ni prišlo.

3.11.5.2 Priprava rodanina in barvanje

Natehtali smo 4 g natrijevega acetata tri hidrata ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (Merck) ter ga raztopili v 200 ml destilirane vode (Lindquist, 1969). Raztopino smo pustili mešati preko noči. Na dan uporabe smo pripravili raztopino 5-p-dimetilaminobenziliden-rodanina (v nadaljevanju rodanina). Raztopili smo 106,8 mg rodanina (Merck) v 26,6 ml absolutnega etanola in raztopino pustili mešati 2 uri. Za pripravo delavne raztopine rodanina smo celotno raztopino rodanina prefiltrirali v 200 ml raztopine natrijevega acetata. Po potrebi smo filtriranje ponovili. Objektnike s svežimi rezinami smo razvrstili v banjico z rodaninom. Banjico smo za 16 ur dali na vodno kopel, ki smo jo ogreli na 37 °C (sl. 16). Po končanem barvanju smo objektnike sprali v 5 menjavah destilirane vode. Odvečno vodo smo odtekli in rezine prekrili z vodnim medijem glicerol-želatino. Kot negativno kontrolo smo uporabili 10 % etanol, s katero smo ravnali enako kot v primeru barvanja z rodaninom. Bakrovi depoziti so se obarvali oranžno-rdeče-temno rdeče-rjavo, pri negativni kontroli do obarvanja ni prišlo.



Slika 16: Vodna kopel (37 °C) za barvanje z rubeansko kislino in rodaninom (Kos M., 2013)

3.11.5.3 Priprava hematoksilina in barvanje

Natehtali smo 50 mg hematoksilina (C.I.75290) (Merck) in ga raztopili v 1 ml absolutnega etanola ter dodali 99 ml bidestilirane vode (Kiernan, 1990). Raztopina je bila sprva brezbarvna, nato se je v 24. urah obarvala rožnato. Na dan uporabe smo pripravili svežo raztopino hematoksilina. Objektlike s svežimi rezinami smo za 5 minut namočili v bidestilirano vodo. Objektlike smo nato dobro odtekli in jih prestavili v banjico s hematoksilinom preko noči. Po barvanju smo odvečno barvilo odtekli in objektlike prestavili za 15 min v 95 % etanol, za 15 min v absolutni etanol (2x), za 15 min v ksilen in jih končno prekrili s sintetičnim medijem Pertex (HD Scientific). Kot negativno kontrolo smo uporabili 1 % etanol, s katero smo ravnali enako kot v primeru barvanja s hematoksilinom. Pri negativni kontroli do obarvanja ni prišlo.

Barve kovinskih kompleksov po Lillie in Fullmer (1976 v Kiernan, 1990) (omenjene so kovine, ki so bile prisotne v prsti Lufa 2.2 (>50 mg/kg suhe prsti) glede na analizo XRF (pril. A)):

Cr	Modro-črna
Cu	Zeleno-modra
Fe	Modro-črna
Mn	Modra
Ni	Modra
Pb	Modra
Ti	Rjava
Zr	Modro-črna.

3.11.6 Pregled mikroskopskih preparatov

Za pregled in posnetke mikroskopskih preparatov smo uporabili stereolupo Leica MZ FLIII in Aksioskop, Leica (sl. 17).



Slika 17: Stereolupa MZ FLIII, Leica (levo) in Aksioskop, Leica (desno) (Kos M., 2013)

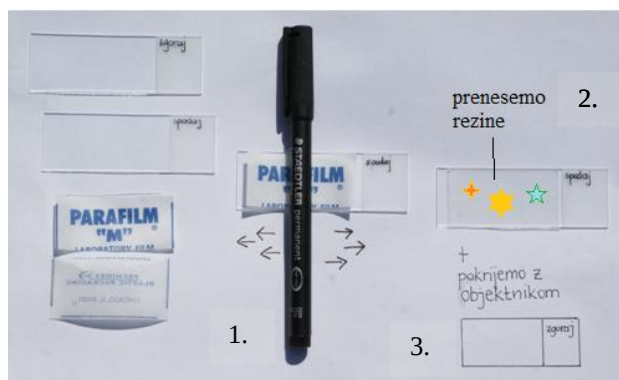
3.13 MAPIRANJE PORAZDELITVE BAKRA V LIOFILIZIRANIH KRIO REZINAH Z METODO LASERSKE ABLACIJE ICP-MS

3.13.1 Priprava vzorcev

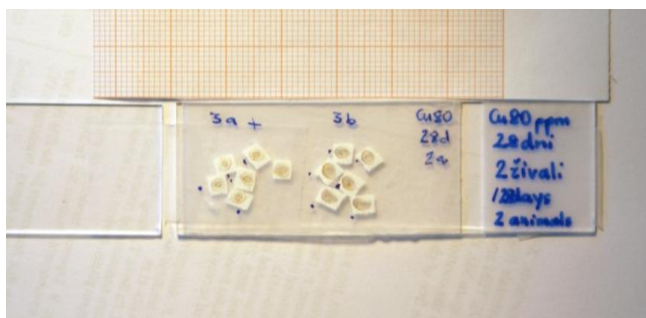
Z metodo laserske ablacijske masne spektroskopije z induktivno sklopljeno plazmo (v nadaljevanju LA ICP-MS) smo analizirali liofilizirane krio rezine deževnikov, pri katerih smo dobili dobre rezultate s histokemijsko analizo (pozitivno obarvanje, bakrove granule v organih). Med rezanjem 20 μm serijskih rezin smo na vsakih nekaj 100 μm spremenili debelino rezine na 60 μm in lepe rezine prenesli na filtrirni papir v ohlajeni kovinski nosilec (sl. 18). Kovinske nosilce z rezinami smo v tekočem dušiku prenesli v liofilizator, kjer so se zamrznjeno sušile 3 dni pri temperature $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ in tlaku 0,121 mbar. Po liofilizaciji smo kovinske nosilce prenesli v eksikator, kjer so se segreli na sobno temperaturo. Rezine smo prenesli na nosilec iz parafilma, kar prikazujeta sliki 19 in 20. V izogib zmešnjavi smo vzorce označili na samem parafilmu.



Slika 18: Kovinski nosilčki za prenos rezin v liofilizator (rdeča črta – 1,5 cm) (Kos M., 2013)



Slika 19: Priprava nosilcev iz parafilma od leve proti desni: 1. na očiščeno objektno steklenico položimo parafilm in podrgnemo po hrbtni strani; 2. na parafilm prenesemo rezine; 3. pokrijemo z očiščenim objektnim stekelcem in ob straneh zalepimo z lepilnim trakom (Kos M., 2013)



Slika 20: Pripravljen nosilec z rezinami za LA ICP-MS (Kos M., 2013)

3.13.2 Mapiranje porazdelitve bakra v tkivih deževnikov *Eisenia andrei*

Mapiranje porazdelitve Cu z metodo LA ICP-MS (quadropol ICP-MS (Agilent 7500ce, Palo Alto, ZDA) z 213 nm Nd:YAG laserskim ablacijskim sistemom (New Wave Research UP 213, Fremont, SA)) smo izvedli v Laboratoriju za analizo kemijo Kemijskega inštituta v Ljubljani (sl. 21). Za samo meritev smo parafilm prenesli na krajše objektno stekelce, prekrito z dvojnim lepilnim trakom. Nosilec smo pritrdili v merilno komoro. S pomočjo kamere smo izbrali primerno rezino in jo fotografirali. Nastavili smo območje, parametre za ablacijo in izbrali elemente za analizo. Parametri meritve so bili naslednji: premer laserskega žarka 25 μm , razmik vrstic 25 μm , frekvenca 20 Hz, hitrost skeniranja 40 $\mu\text{m/s}$, volumen cevi 10 ml, čas zajema 0,62 s. Tok helija (16 ml/s) je prenesel abliran material v induktivno sklopljeno plazmo. Ioni iz ICP so bili ekstrahirani v kvadropolnem masnem spektrometru in ločeni glede na razmerje med maso in nabojem. Meritev ozadja plinov He/Ar je služila kot slep signal za meritve elementov (Han s sod., 2013). Rezultate smo analizirali s pomočjo programskih orodij, ki so navedena v Poglavju 3.14.



Slika 21: Naprava za lasersko ablacijsko ICP-MS (New wave UP 213-Agilent 7500ce) na Oddelku za analizo kemijo Kemijskega inštituta v Ljubljani. Od leve proti desni: en od dveh računalnikov za nastavitve parametrov, sprejemanje podatkov in krmiljenje sistema, laserski ablator, ICP-MS (Kos M., 2013)

3.14 ANALIZA PODATKOV

Za statistično analizo podatkov smo uporabili Mann-Whitney-ev test. Zmanjšano ali povišano koncentracijo kovine v živalih smo pripisali delovanju monenzina, če je bila izmerjena koncentracija kovine statistično značilno različna ($p < 0.05$) od koncentracije pri živalih, ki so bile izpostavljene le kovini. Za test smo uporabili statistični program SPSS 17.0 (USA).

Mikroskopske preparate smo fotografirali in zajeli v program LAS. Fotografije smo uredili v programih Adobe Illustrator CS5 in Adobe Photoshop CS4.

Spektre pridobljene z XRF smo analizirali s programskim orodjem AXIL, za kvantitativno analizo smo uporabili program QAES (Quantitative Analysis of Enviromental Samples, Inštitut Jožef Stefan). Fitiranje XRF spektrov smo izvedli s programom AXIL (Van Espen in Janssens, 1993) kvantitativno analizo pa s programom QAES (Kump s sod., 2007).

Podatke, ki smo jih dobili z metodo LA ICP-MS smo obdelali v programih Origin 8.5.1, Microsoft Office Excel in PyMca 4.6.2.

4 REZULTATI

4.1 ZNAČILNOSTI POSKUSNE PRSTI

4.1.1 Fizikalno-kemijske lastnosti prsti

V času poskusa se pH prsti ni značilno spremenil, prav tako je bila v času poskusa stabilna temperatura okolice (pregl. 3). Manjše spremembe vlažnosti prsti (WHC), do katerih je prihajalo zaradi izhlapevanja vode, smo tedensko korigirali.

Preglednica 3: Pregled fizikalno-kemijskih lastnosti prsti Lufa 2,2: pH po specifikaciji proizvajalca (0,01M CaCl_2), pH pred dodatkom CaCO_3 (0,01M CaCl_2), pH pred začetkom in po koncu poskusa (0,01M CaCl_2), zadrževalna kapaciteta vode WHC, sprememba WHC na teden, temperature okolja. Vrednosti so podane za vse tretmaje kot srednja vrednost in standardni odklon treh neodvisnih meritev.

	pH po specifikaciji proizvajalca	pH pred dod. CaCO_3	pH začetek (0 dni)	pH konec (14, 28 dni)	WHC [%]	Δ WHC/ teden [%]	T [°C] okolja
vsi tretmaji	5,1±0,3	5,2±0,2	6,75±0,25	6,85±0,35	60	1-2	20±1

4.1.2 Vsebnost monenzina v prsti

Izmerjene koncentracije monenzina na začetku poskusa so bile do 18 % nižje od nominalne koncentracije (pregl. 4). Izmerjene končne koncentracije monenzina v vzorcih prsti deževnikov so po 28. dneh v povprečju znašale 11,2 mg/kg suhe prsti. Izmerjene končne koncentracije monenzina v vzorcih prsti enakonožcev so bile po 28. dneh nekoliko nižje kot v primeru deževnikov in so v povprečju znašale 7,4 mg/kg suhe prsti. Iz koncentracij monenzina v prsti na začetku poskusa in po 28. dneh smo izračunali razpolovno dobo monenzina, ki je v poskusu z deževniki znašala v povprečju 4,41 tedna, v poskusu z enakonožci pa 2,73 tedna.

Preglednica 4: Nominalne in izmerjene koncentracije monenzina v prsti Lufa 2.2. Koncentracije so podane v mg/kg suhe prsti kot srednja vrednost in standardni odklon treh neodvisnih meritev. (28 – 28 dni, M – monenzin: 25 mg/kg suhe mase prsti; Cu 80 ali 160 mg/kg suhe mase prsti)

tretma	nominalna koncentracija [mg/kg suhe prsti]	začetna koncentracija [mg/kg suhe prsti]	končna koncentracija [mg/kg suhe prsti]	ocenjena razpolovna doba [tedni]
deževniki				
28 M	25		9,94 ± 1,0	3,66
28 Cu80 + M	25	21,2 ± 1,8	12,4 ± 0,8	5,17
28 Cu160 + M	25		11,3 ± 1,4	4,40
enakonožci				
28 M	25		7,19 ± 1,3	2,65
28 Cu80 + M	25	20,5 ± 0,8	6,62 ± 0,9	2,46
28 Cu160 + M	25		8,32 ± 1,1	3,07

4.1.3 Vsebnost bakra v prsti

Koncentracijo Cu v vzorcih prsti smo izmerili z metodama AAS in XRF (pregl. 5). Koncentracije, izmerjene z metodo AAS, so bile okoli 20 % nižje od nominalnih koncentracij, medtem ko so bile koncentracije, izmerjene z metodo XRF, za okoli 20 % višje. Pri XRF je bil rezidualni matriks opredeljen kot zmes alumosilikatov in oksidov lahkih elementov, ki jih nismo merili. Pri XRF je bila meja detekcije (LOD) za Cu 10 mg/kg suhe prsti.

Preglednica 5: Nominalne in izmerjene koncentracije Cu v prsti Lufa 2.2 na začetku poskusa. Koncentracije so podane v mg/kg suhe prsti kot srednja vrednost in standardni odklon meritve z XRF in 8 neodvisnih meritev z AAS. (M – monenzin: 25 mg/kg suhe mase prsti; Cu 80 ali 160 mg/kg suhe mase prsti)

tretma	nominalna koncentracija	AAS	XRF			
		14 dni	28 dni	14 dni	28 dni	
deževniki						
Kontrola	0	2,76±0,36	2,92±0,31	29,1±2,2		
M	0	2,98±0,31	3,35±0,35	40,70±3,64		
Cu80	80	57,24±3,24	62,24±5,21	127,0±23,1	138,0±22,7	
Cu80 + M	80	64,86±6,09	66,19±5,21	117,0±7,75	131,0±26,1	
Cu160	160	121,6±1,3	130,7±12,9	200,0±26,7	212±27	
Cu160 + M	160	141,7±4,1	133,11±5,51	263,0±38,7	218,0±21,9	
enakonožci						
Kontrola	0	3,08±0,37	2,93±0,14	47,3±17,9		
M	0	3,16±0,39	3,22±0,38	39,90±3,15		
Cu80	80	68,37±4,95	67,98±6,17	104,0±24,4	99,40±6,71	
Cu80 + M	80	71,19±5,83	78,01±4,77	89,6±24,2	105,0±28,6	
Cu160	160	129,72±5,98	139,3±7,81	206±31	261,0±33,8	
Cu160 + M	160	139,36±5,59	137,56±4,81	265,0±32,1	250,0±29,5	

4.2 REZULTATI ANALIZE HRANE

Koncentracija Cu v konjskem gnoju, izmerjena z AAS, ki je bil uporabljen kot hrana za deževnike, je bila $7,6 \pm 0,9$ mg/kg suhe hrane (pregl. 6). Podobno koncentracijo smo izmerili tudi v leskovih listih. Koncentracija Cu v leskovih listih izmerjena na koncu poskusa s preostalimi tretmaji je bila do 2,4-krat višja.

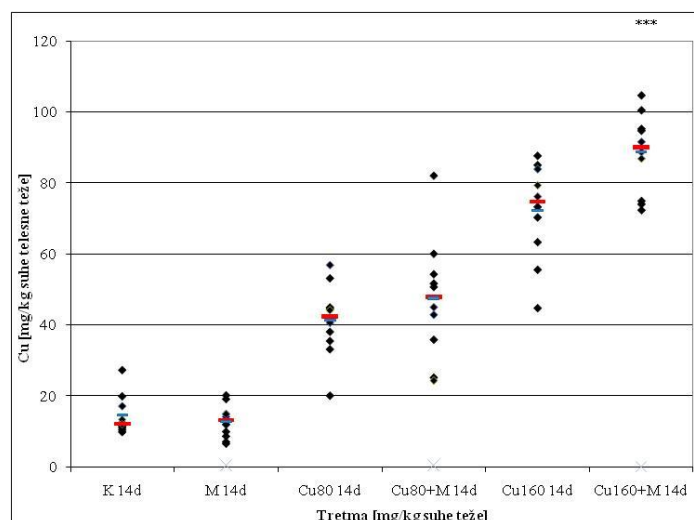
Preglednica 6: Koncentracija bakra v založnem konjskem gnoju (za deževnike) in nepojedenih leskovih listih (za enakonožce) po koncu poskusa. Koncentracije so podane v mg/kg suhe hrane kot srednja vrednost in standardni odklon 5 neodvisnih meritev. (M – monenzin)

	konjski gnoj	leskovi listi
Kontrola		$7,5 \pm 0,7$
M		$12,0 \pm 0,8$
Cu80	$7,6 \pm 0,9$	$15,9 \pm 0,9$
Cu80+M		$12,50 \pm 1,96$
Cu160		$18,1 \pm 1,8$
Cu160+M		$15,7 \pm 1,0$

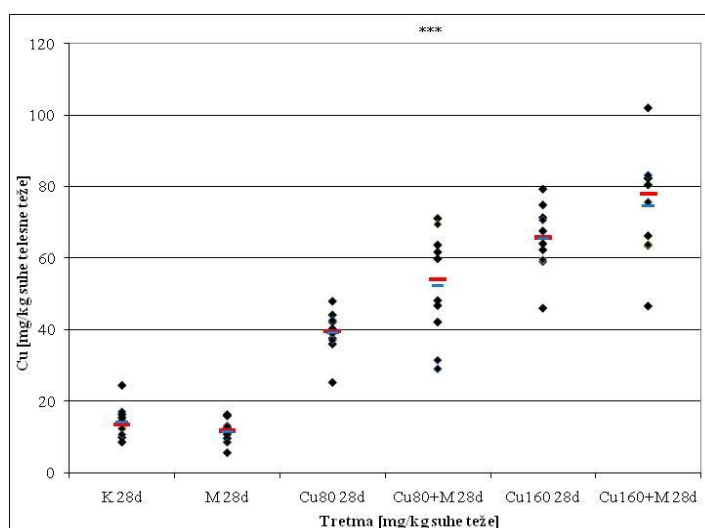
4.3 REZULTATI ANALIZE AKUMULACIJE BAKRA V POSKUSNIH ŽIVALIH

4.3.1 Vsebnost bakra v telesu poskusnih organizmov

V telesu deževnikov (sl. 22 in 23), ki so bili 14 oziroma 28 dni izpostavljeni netretirani zemlji smo z AAS izmerili $14,65$ oziroma $14,2$ mg Cu/kg suhe telesne mase. Izmerjene koncentracije bakra v deževnikih, ki so bili izpostavljeni le monenzinu so bile nekoliko nižje vendar razlike niso bile statistično značilne (Mann-Whitney test). Telesna koncentracija bakra je pri deževnikih naraščala s koncentracijo bakra v njihovi prsti a značilnih razlik med 14- in 28-dnevno izpostavitvijo nismo zasledili. Deževniki, ki so bili hkrati izpostavljeni bakru in monenzinu, so akumulirali več bakra. Statistično značilne razlike smo ugotovili med deževniki tretiranimi s Cu 80 mg/kg suhe prsti in deževniki tretiranimi s Cu 80 mg/kg suhe prsti z monenzinom po 28. dneh (Mann Whitney, $p < 0,05$) (sl. 23) ter med deževniki, tretiranimi s Cu 160 mg/kg suhe prsti in deževniki tretiranimi s Cu 160 mg/kg suhe prsti z monenzinom po 14. dneh (Mann Whitney, $p < 0,05$) (sl. 22).

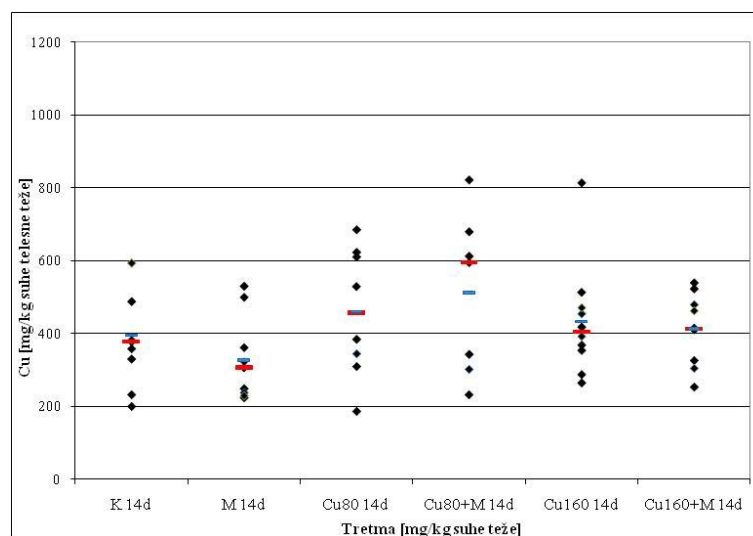


Slika 22: Koncentracija bakra v celih deževnikih *Eisenia andrei* po 14-dnevni izpostavitvi neonesnaženi prsti Lufa 2.2/ onesnaženi prsti s Cu 80 ali 160 ppm ali monenzinom 25 ppm/ onesnaženi prsti s Cu 80 ppm in monenzinom ali Cu 160 ppm in monenzinom (nominalne koncentracije) (črni karo – posamezne vrednosti; daljša rdeča črta – mediana; krajša modra črta – povprečje; *** - $p < 0,05$ Mann Whitney) (Kos M., 2013)

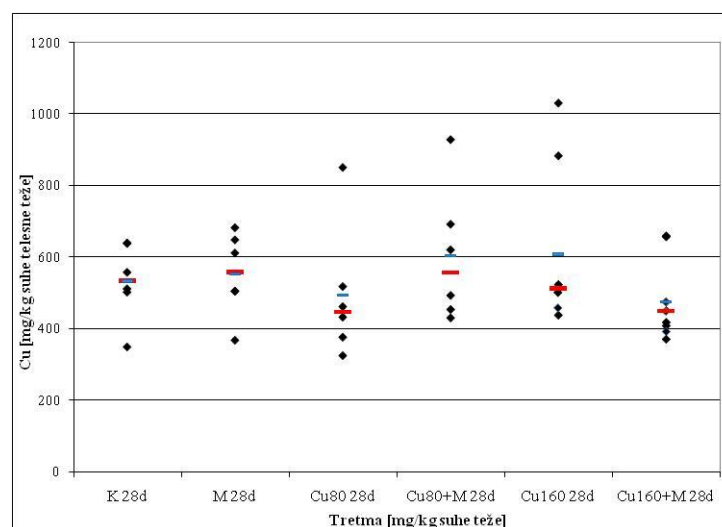


Slika 23: Koncentracija bakra v celih deževnikih *Eisenia andrei* po 28-dnevni izpostavitvi neonesnaženi prsti Lufa 2.2/ onesnaženi prsti s Cu 80 ali 160 ppm ali monenzinom 25 ppm/ onesnaženi prsti s Cu 80 ppm in monenzinom ali Cu 160 ppm in monenzinom (nominalne koncentracije) (črni karo – posamezne vrednosti; daljša rdeča črta – mediana; krajša modra črta – povprečje; *** - $p < 0,05$ Mann Whitney) (Kos M., 2013)

Povprečna koncentracija bakra v telesu enakonožcev kontrolne skupine je bila 394,6 mg/kg suhe telesne mase (14 dni) in 532,7 mg/kg suhe telesne mase (28 dni). Pri enakonožcih izpostavljenih bakru v prsti se telesna koncentracija bakra ni razlikovala od kontrolnih živali. Prav tako v telesu enakonožcev, ki so bili izpostavljeni bakru in monenzinu hkrati nismo izmerili koncentracij bakra, ki bi značilno odstopale od živali izpostavljenih le bakru.



Slika 24: Koncentracija bakra v celih enakonožcih *Porcellio scaber* po 14-dnevni izpostavitvi neonesnaženi prsti Lufa 2.2/ onesnaženi prsti s Cu 80 ali 160 ppm ali monenzinom 25 ppm/ onesnaženi prsti s Cu 80 ppm in monenzinom ali Cu 160 ppm in monenzinom (nominalne koncentracije) (črni karo – posamezne vrednosti; daljša rdeča črta – mediana; krajša modra črta – povprečje) (Kos M., 2013)



Slika 25: Koncentracija bakra v celih enakonožcih *Porcellio scaber* po 28-dnevni izpostavitvi neonesnaženi prsti Lufa 2.2/ onesnaženi prsti s Cu 80 ali 160 ppm ali monenzinom 25 ppm/ onesnaženi prsti s Cu 80 ppm in monenzinom ali Cu 160 ppm in monenzinom (nominalne koncentracije) (črni karo – posamezne vrednosti; daljša rdeča črta – mediana; krajša modra črta – povprečje) (Kos M., 2013)

4.3.2 Bioakumulacijski faktor (BAF) za baker pri poskusnih organizmih

Iz koncentracij bakra v poskusnih živali izmerjenih po 14. in 28. dneh poskusa in koncentracij bakra v prsti na začetku poskusa smo izračunali bioakumulacijski faktor (BAF) (pregl. 7 in 8). Pri deževnikih (pregl. 7) so bile izračunane vrednosti BAF v povprečju najmanj 10-krat nižje kot pri enakonožcih (pregl. 8). Neodvisno od časa izpostavitve in metode, s katero smo izmerili vsebnost bakra v zemlji, je opazen trend upada BAF pri deževnikih izpostavljenih le monenzinu v primerjavi s kontrolo ter dvig BAF pri deževnikih, ki so bili izpostavljeni bakru skupaj z monenzinom. Podoben trend smo opazili tudi pri enakonožcih, le da je pri višji koncentraciji bakra v zemlji ob dodatku monenzina BAF nižji (pregl. 8).

Preglednica 7: Bioakumulacijski faktor (BAF; povprečje $\pm$ SD) bakra za deževnike *Eisenia andrei* po 14- in 28-dnevni izpostavitvi 6 različnim tretmajem. (M – monenzin (25 mg/kg suhe mase prsti); Cu 80 ali 160 mg/kg suhe mase prsti; BAF (c_{AAS}) – izračunan glede na izmerjene koncentracije v zemlji z metodo AAS; BAF (c_{XRF}) - izračunan glede na izmerjene koncentracije v zemlji z metodo XRF)

tretma	BAF (c_{AAS})	BAF (c_{XRF})	BAF (c_{AAS})	BAF (c_{XRF})
	14 dni		28 dni	
Kontrola	5,23 $\pm$ 1,97	0,50 $\pm$ 0,19	4,86 $\pm$ 1,56	0,49 $\pm$ 0,16
M	4,26 $\pm$ 1,58	0,31 $\pm$ 0,12	3,41 $\pm$ 1,02	0,28 $\pm$ 0,08
Cu80	0,72 $\pm$ 0,18	0,32 $\pm$ 0,08	0,63 $\pm$ 0,10	0,28 $\pm$ 0,04
Cu80+M	0,73 $\pm$ 0,26	0,40 $\pm$ 0,15	0,79 $\pm$ 0,23	0,40 $\pm$ 0,12
Cu160	0,59 $\pm$ 0,11	0,36 $\pm$ 0,07	0,50 $\pm$ 0,07	0,31 $\pm$ 0,04
Cu160+M	0,62 $\pm$ 0,08	0,37 $\pm$ 0,05	0,56 $\pm$ 0,11	0,34 $\pm$ 0,07

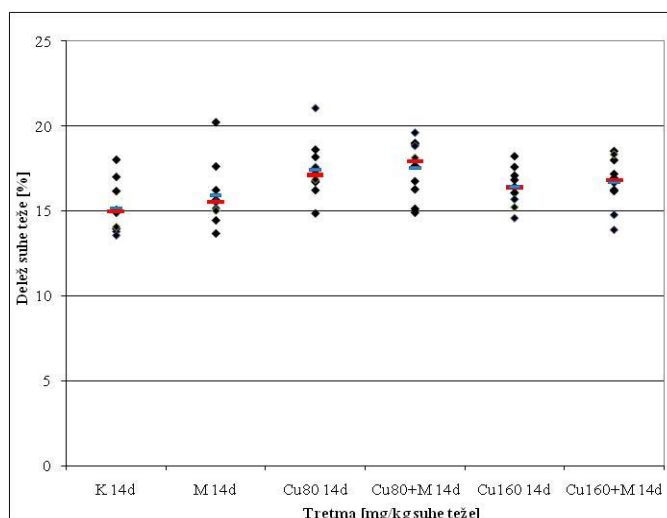
Preglednica 8: Bioakumulacijski faktor (BAF; povprečje $\pm$ SD) bakra za enakonožce *Porcellio scaber* po 14- in 28-dnevni izpostavitvi 6 različnim tretmajem. (M – monenzin (25 mg/kg suhe mase prsti); Cu 80 ali 160 mg/kg suhe mase prsti; BAF (c_{AAS}) – izračunan glede na izmerjene koncentracije v zemlji z metodo AAS; BAF (c_{XRF}) - izračunan glede na izmerjene koncentracije v zemlji z metodo XRF)

tretma	BAF (c_{AAS})	BAF (c_{XRF})	BAF (c_{AAS})	BAC (c_{XRF})
	14 dni		28 dni	
Kontrola	128,13 $\pm$ 45,49	8,34 $\pm$ 2,96	181,82 $\pm$ 36,86	11,26 $\pm$ 2,28
M	103,28 $\pm$ 34,58	8,18 $\pm$ 2,74	171,75 $\pm$ 36,32	11,15 $\pm$ 6,09
Cu80	6,71 $\pm$ 2,60	4,41 $\pm$ 1,71	7,26 $\pm$ 2,76	4,97 $\pm$ 1,89
Cu80+M	7,19 $\pm$ 3,10	5,71 $\pm$ 2,46	7,73 $\pm$ 2,42	5,74 $\pm$ 1,80
Cu160	3,34 $\pm$ 1,19	2,10 $\pm$ 0,75	4,36 $\pm$ 1,59	2,33 $\pm$ 0,85
Cu160+M	2,96 $\pm$ 0,68	1,56 $\pm$ 0,36	3,45 $\pm$ 0,74	1,90 $\pm$ 0,41

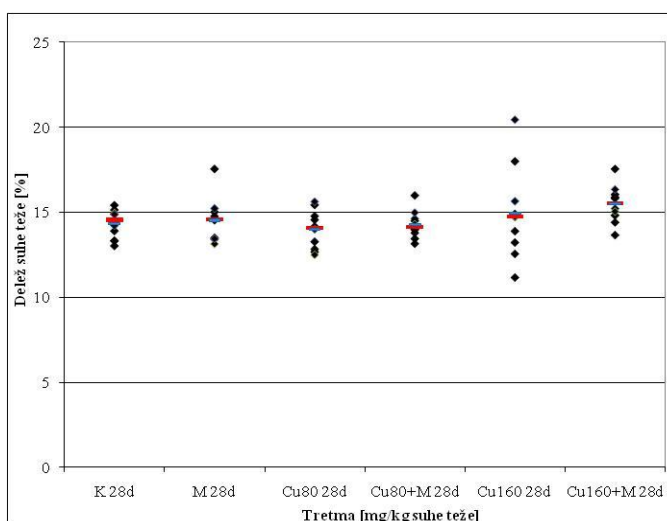
4.4 DRUGI MERJENI PARAMETRI

4.4.1 Razmerje med svežo in suho telesno maso poskusnih organizmov glede na tretma

Na koncu izpostavitve smo izmerili svežo telesno maso živali z izpraznjenim prebavilom in suho telesno maso živali. Pri deževnikih je delež suhe telesne mase (sl. 26 in 27) v povprečju predstavljal 15 – 18 % sveže telesne mase. Pri deževnikih po 14-dnevni izpostavitvi je bil delež suhe telesne mase nekoliko višji kakor pri enako tretiranih deževnikih po 28. dneh.

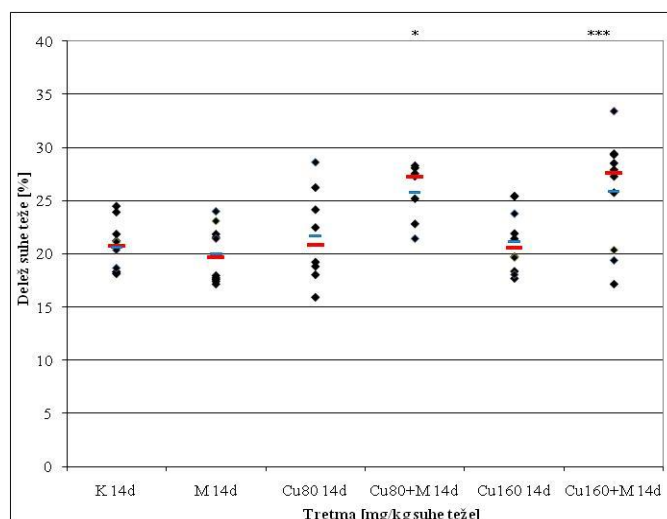


Slika 26: Delež suhe telesne mase *Eisenia andrei* po 14-dnevni izpostavitvi neonesnaženi prsti Lufa 2.2/ onesnaženi prsti s Cu 80 ali 160 ppm ali monenzinom 25 ppm/ onesnaženi prsti s Cu 80 ppm in monenzinom ali Cu 160 ppm in monenzinom (nominalne koncentracije) (črni karo – posamezne vrednosti; daljša rdeča črta – mediana; krajša modra črta – povprečje) (Kos M., 2013)

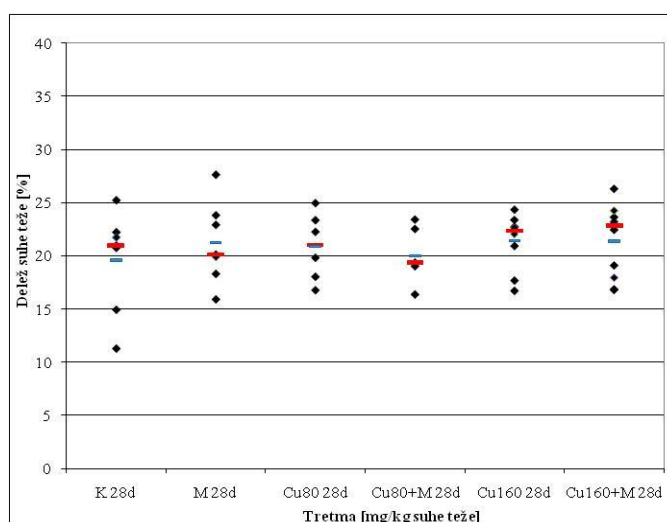


Slika 27: Delež suhe telesne mase *Eisenia andrei* po 28-dnevni izpostavitvi neonesnaženi prsti Lufa 2.2/ onesnaženi prsti s Cu 80 ali 160 ppm ali monenzinom 25 ppm/ onesnaženi prsti s Cu 80 ppm in monenzinom ali Cu 160 ppm in monenzinom (nominalne koncentracije) (črni karo – posamezne vrednosti; daljša rdeča črta – mediana; krajša modra črta – povprečje) (Kos M., 2013)

Suha telesna masa enakonožcev (sl. 28 in 29) je v povprečju predstavljala med 20 in 26 % žive telesne mase. Pri enakonožcih po 14-dnevni izpostavitvi je bil delež suhe telesne mase značilno višji pri živalih, ki so bile hkrati z bakrom izpostavljene tudi monenzinu.



Slika 28: Delež suhe telesne mase pri enakonožcih *Porcellio scaber* po 14-dnevni izpostavitvi neonesnaženi prsti Lufa 2.2/ onesnaženi prsti s Cu 80 ali 160 ppm ali monenzinom 25 ppm/ onesnaženi prsti s Cu 80 ppm in monenzinom ali Cu 160 ppm in monenzinom (nominalne koncentracije) (črni karo – posamezne vrednosti; daljša rdeča črta – mediana; krajša modra črta – povprečje; * in *** - $p < 0,05$ Mann Whitney) (Kos M., 2013)



Slika 29: Delež suhe telesne mase pri enakonožcih *Porcellio scaber* po 28-dnevni izpostavitvi neonesnaženi prsti Lufa 2.2/ onesnaženi prsti s Cu 80 ali 160 ppm ali monenzinom 25 ppm/ onesnaženi prsti s Cu 80 ppm in monenzinom ali Cu 160 ppm in monenzinom (nominalne koncentracije) (črni karo – posamezne vrednosti; daljša rdeča črta – mediana; krajša modra črta – povprečje) (Kos M., 2013)

4.4.2 Smrtnost poskusnih organizmov

Pri deževnikih sta v času poskusa poginila le dva deževnika (10 % smrtnost) v skupini z višjo koncentracijo bakra in monenzinom (pregl. 9). Pri enakonožcih je bila smrtnost v splošnem visoka. Smrtnost je bila višja v tretmajih pri 28-dnevni izpostavitvi, kjer je v nekaterih skupinah presegla 50 %.

Preglednica 9: Smrtnost deževnikov *Eisenia andrei* in enakonožcev *Porcellio scaber* izpostavljenih Cu in/ali monenzinu v prsti: 6 različnih tretmajev in 2 časovni obdobji. Vrednosti so izražene v %. (M – monenzin: 25 mg/kg suhe mase prsti; Cu 80 ali 160 mg/kg suhe mase prsti)

	Deževniki		Enakonožci	
	14 dni	28 dni	14 dni	28 dni
Kontrola	0	0	13,6	50
M	0	0	40	40,9
Cu80	0	0	14,3	33,3
Cu80+M	0	0	9,5	47,6
Cu160	0	0	30	52,4
Cu160+M	0	10	9,5	23,8

4.4.3 Razmnoževanje deževnikov

Pri 14-dnevni izpostavitvi smo kokone našli v kontrolnem tretmaju in v obeh tretmajih z bakrom (pregl. 10), v tretmajih z monenzinom pa kokonov in mladičev ni bilo. Pri 28-dnevni izpostavitvi smo kokone našli v vseh tretmajih, le v tretmaju z najvišjo koncentracijo bakra in monenzinom kokonov in mladičev nismo našli. Število kokonov je po tretmajih naraščalo v naslednjem vrstnem redu: Cu160+M (0) < Cu80+M (2) < M (6) < Cu160 (16) < Cu80 (21) < kontrola (25). Pri obeh obdobjih izpostavljenosti v kontrolnem tretmaju in v obeh tretmajih z bakrom ni bilo bistvenih razlik v stopnji razmnoževanja, ki smo jo ovrednotili s številom kokonov na teden. Pri 28-dnevnem obdobju izpostavljenosti se je v kontrolnem tretmaju in v obeh tretmajih z bakrom število kokonov na deževnika povečalo za 100 %.

Preglednica 10: Razmnoževanje deževnikov *Eisenia andrei* izpostavljenih Cu in/ali monenzinu v prsti: 6 različnih tretmajev in 2 časovni obdobji (M – monenzin: 25 mg/kg suhe mase prsti; Cu 80 ali 160 mg/kg suhe mase prsti; N=20 deževnikov/tretma)

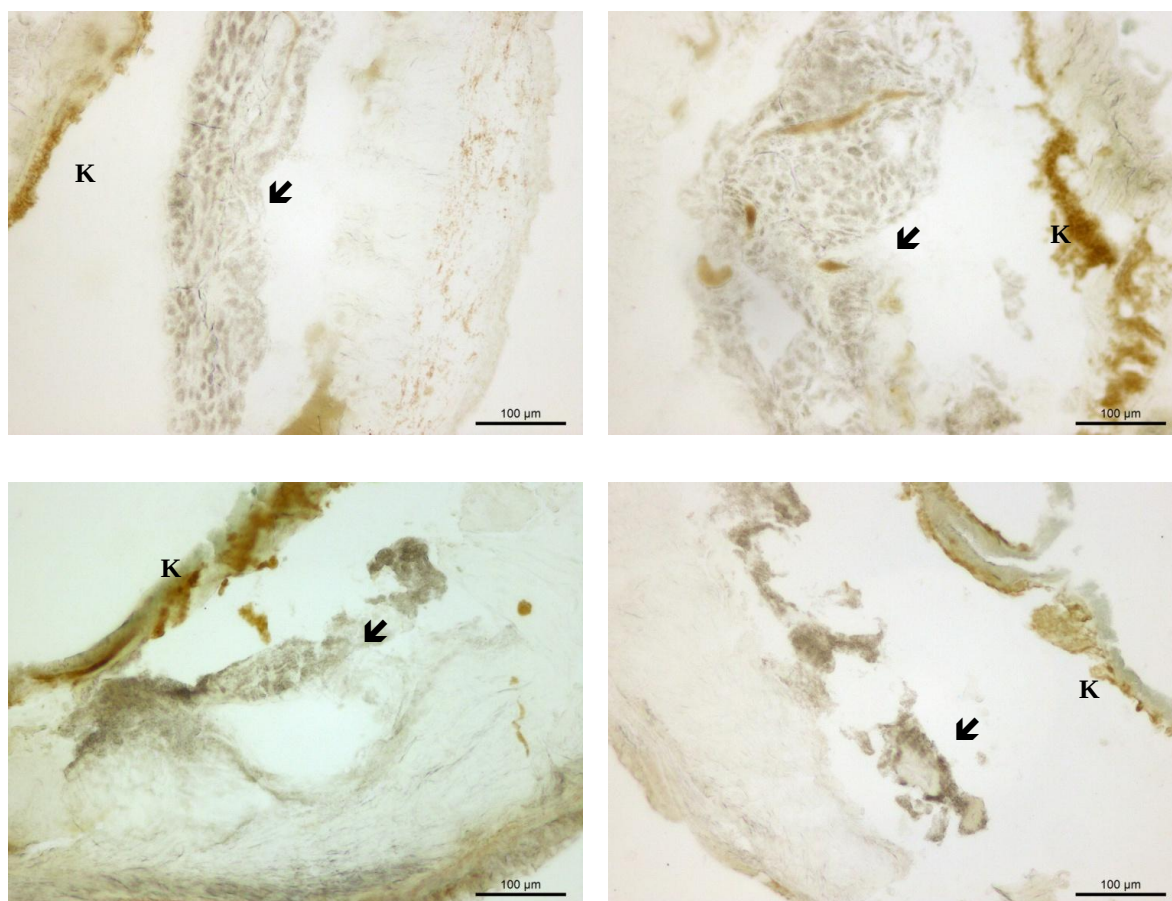
	št. mladičev	št. zgrešenih kokonov	skupno št. kokonov*	št. kokonov/ teden	št. kokonov/ deževnika
14 dni					
Kontrola	2	1	13	6,5	0,65
M	0	0	0	0	0
Cu80	0	0	10	5	0,5
Cu80+M	0	0	0	0	0
Cu160	1	1	6	3	0,3
Cu160+M	0	0	0	0	0
28 dni					
Kontrola	5	2	25	6,25	1,25
M	3	1	6	1,5	0,3
Cu80	0	0	21	5,25	1,05
Cu80+M	1	1	2	0,5	0,1
Cu160	2	1	16	4	0,8
Cu160+M	0	0	0	0	0

Opomba: *Pri izračunu skupnega števila kokonov je bil upoštevan popravek za število zgrešenih kokonov (2,6 mladiča/kokon).

4.5 LOKALIZACIJA BAKRA V TKIVIH POSKUSNIH ORGANIZMOV

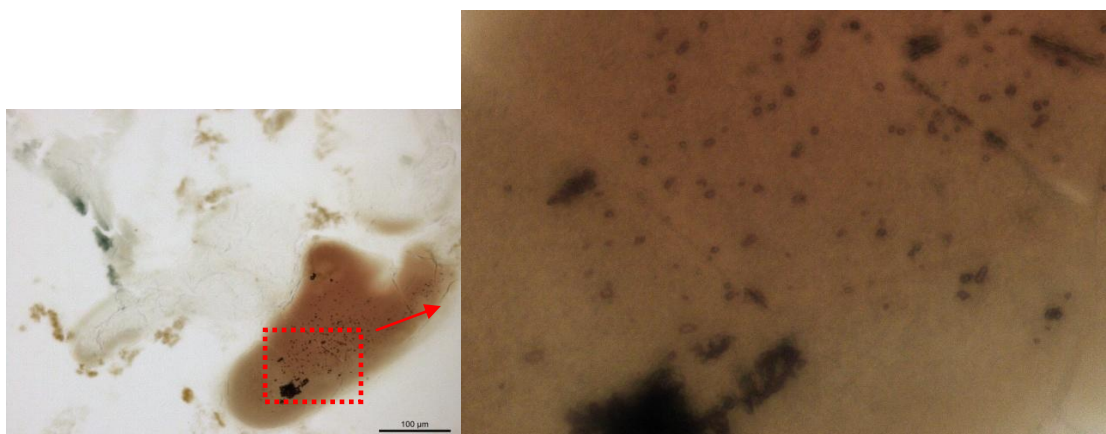
4.5.1 Lokalizacija in semikvantitativna ocena količine bakra v tkivih deževnikov z rubeansko kislino in rodaninom

Na histoloških rezinah kontrolnih živali in živali izpostavljenih le monenzinu, ki smo jih tretirali z rubeansko kislino in rodaninom, nismo opazili barvne reakcije. Pri deževnikih izpostavljenih bakru ali bakru z monenzinom smo zasledili obarvanje zlasti v področju gastrodermisa, kaj je v nadaljevanju prikazano na sliki 34. Pri živalih izpostavljenih višji koncentraciji bakra in živalih hkrati izpostavljenih bakru in monenzinu smo opazili obarvanje tudi v področju kloragognega tkiva in pri barvanju z rubeansko kislino tudi temnejše (sivo) obarvanje metanefridijev (sl. 30). V telesni steni: peritoneju, krožnih in vzdolžnih mišicah ter v epidermisu, nismo opazili pozitivnega obarvanja ne z rubeansko kislino, kakor tudi ne z rodaninom.

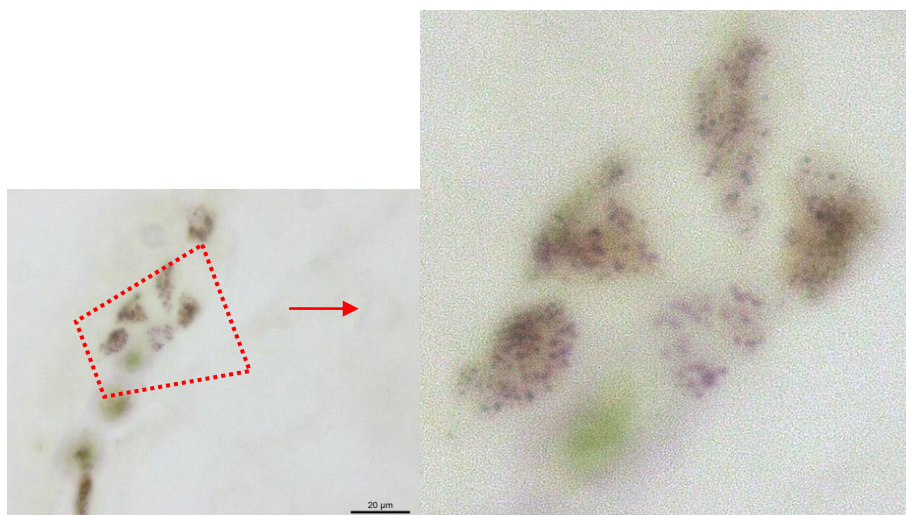


Slika 30: Obarvanje metanefridijev deževnikov *Eisenia andrei* po barvanju z rubeansko kislino v tretmajih z bakrom in monenzinom po daljši izpostavitvi (puščica – metanefridij; K – kloragogno tkivo) (Kos M., 2013)

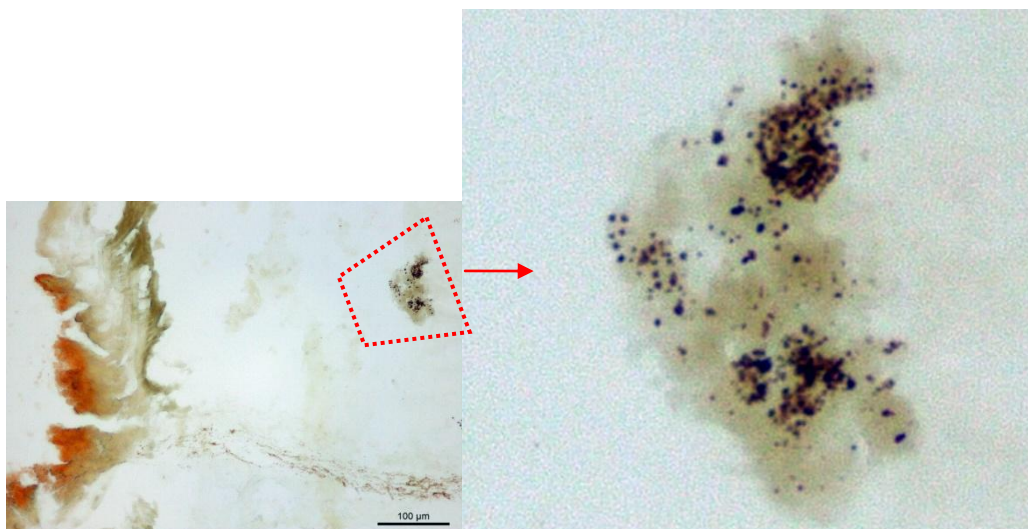
Okrogle votle ali polne granule ($<2\ \mu\text{m}$) so bile v tkivih deževnikov redko prisotne in so se pojavljale nesistematično. Opazili smo jih le v tretmaju z višjo koncentracijo bakra ter v tretmajih z bakrom in monenzinom v obeh časovnih obdobjih izpostavljenosti. Granule so se pojavljale v kloragognem tkivu, v metanefridijih in v področju žil, ki obdajajo prebavilo. Granule v kloragognem tkivu in metanefridijih so se obarvale z rubeansko kislino in rodaninom (sl. 32 in 33), granule v področju žil pa le z rubeansko kislino (sl. 31). Pri zaporednih rezinah iste živali, pri kateri smo z rodaninom uspešno pobarvali granule v kloragognem tkivu, le-teh nismo uspeli obarvati tudi z rubeansko kislino in obratno.



Slika 31: Okrogle votle granule v področju žil deževnikov *Eisenia andrei* (barvanje z rubeansko kislino) (Kos M., 2013)



Slika 32: Okrogle votle granule v kloragognem tkivu deževnikov *Eisenia andrei* (barvanje z rodaninom) (Kos M., 2013)



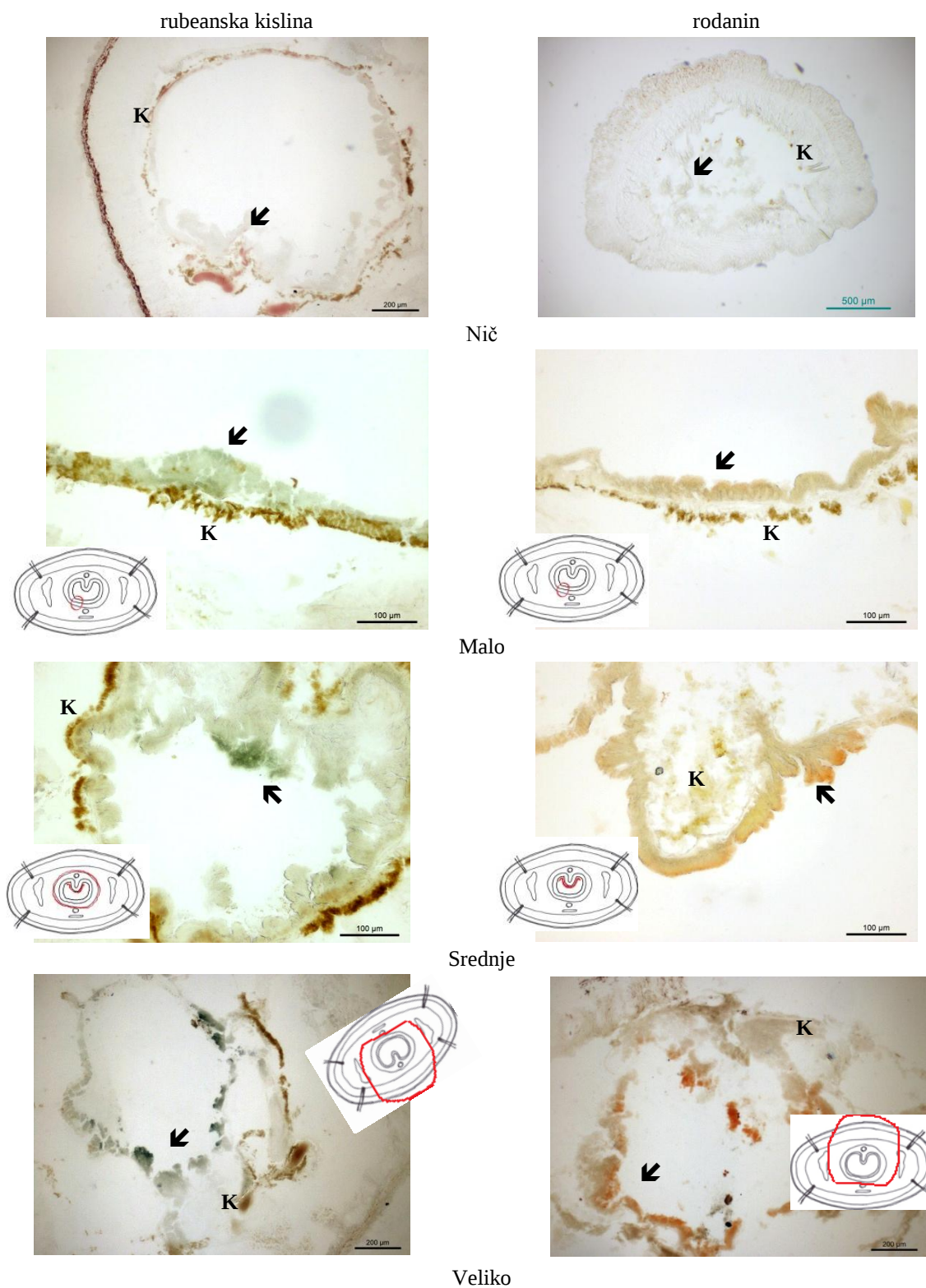
Slika 33: Okrogle polne granule v metanefridiju deževnikov *Eisenia andrei* (barvanje z rodaninom) (Kos M., 2013)

Največjo intenziteto reakcijskega produkta smo opazili v posteriornem delu izoliranega prebavila. Raznolikost obarvanja vzdolž prebavila deževnikov je bila večja v anteriornem delu, torej tik za sedlom, in se je z oddaljenostjo od sedla zmanjševala v posteriorni smeri. Opazili smo, da je bila intenziteta obarvanja in verjetnost prisotnosti granul večja in bolj konsistentna v posteriornih členih (za 40. členom) kot pa v segmentih takoj za sedlom.

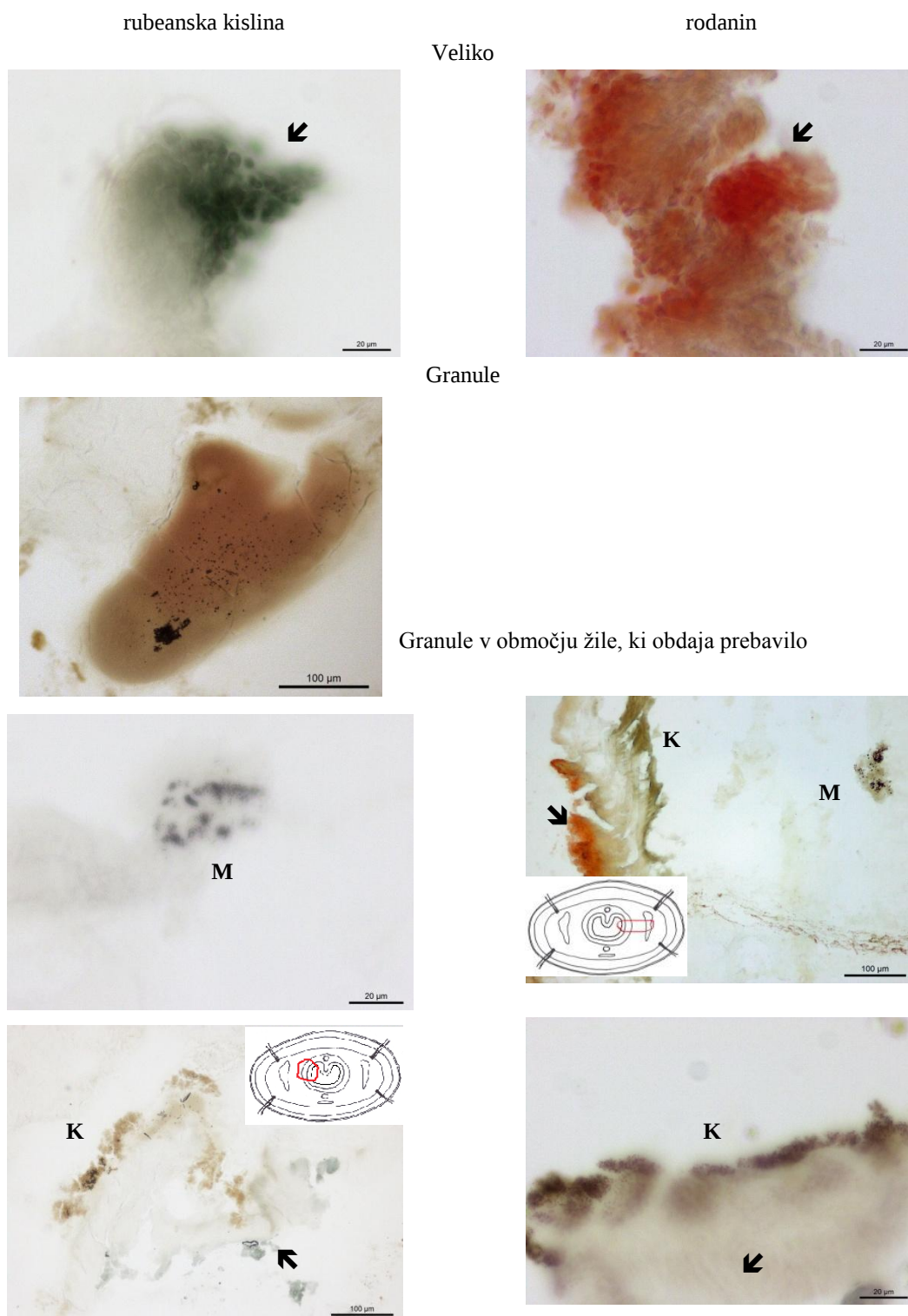
Pri deževnikih je bila intenziteta obarvanja proporcionalna koncentraciji bakra v prsti in izmerjeni koncentraciji bakra v telesu deževnikov. Z rubeansko kislino (RU) in rodaninom (ROD) smo pri zaporednih sklopih rezin dosegli primerljivo intenziteto obarvanja.

Na podlagi količine reakcijskega produkta histokemijske reakcije (jakosti in mesta obarvanja) z rubeansko kislino (RU) in rodaninom (ROD) smo količino bakra v tkivih deževnikov opredelili s 5 kategorijami (sl. 34 in 35):

- 1 – **nič**: v tkivih ne zasledimo pozitivnega obarvanja ;
- 2 – **malo**: na redkih posameznih delih gastrodermisa opazimo nežno pozitivno obarvanje:
 RU: nežno zeleno obarvanje gastrodermisa, lahko nežno sivo obarvanje metanefridijev;
 ROD: nežno oranžno obarvanje gastrodermisa;
- 3 – **srednje**: na posameznih delih gastrodermisa opazimo bolj intenzivno obarvanje:
 RU: bolj temno zeleno obarvanje gastrodermisa in sivo obarvanje metanefridijev;
 ROD: bolj temno oranžno obarvanje gastrodermisa;
- 4 – **veliko**: na večjem območju gastrodermisa opazimo intenzivno obarvanje:
 RU: temno zeleno obarvanje gastrodermisa, temneje sivo obarvanje metanefridijev;
 ROD: temno oranžno-rdeče obarvanje gastrodermisa;
- 5- **prisotnost granul**: vidne so granule na območju žil (le RU) ali metanefridijev ali kloragognega tkiva (RU in ROD).



Slika 34: Kategorije za količino reakcijskega produkta histokemijske reakcije lokalizacije Cu z rubeansko kislino in rodaninom pri deževnikih *Eisenia andrei*: nič, malo, srednje, veliko, s splošno skico območja (puščica – gastrodermis; K – kloragogno tkivo) (Kos M., 2013)



Slika 35: Kategorije za količino reakcijskega produkta histokemijske reakcije lokalizacije Cu z rubeansko kislino in rodaninom pri deževnikih *Eisenia andrei*: veliko, granule (puščica – gastrodermis; K – kloragogeno tkivo; M – metanefridij) (Kos M., 2013)

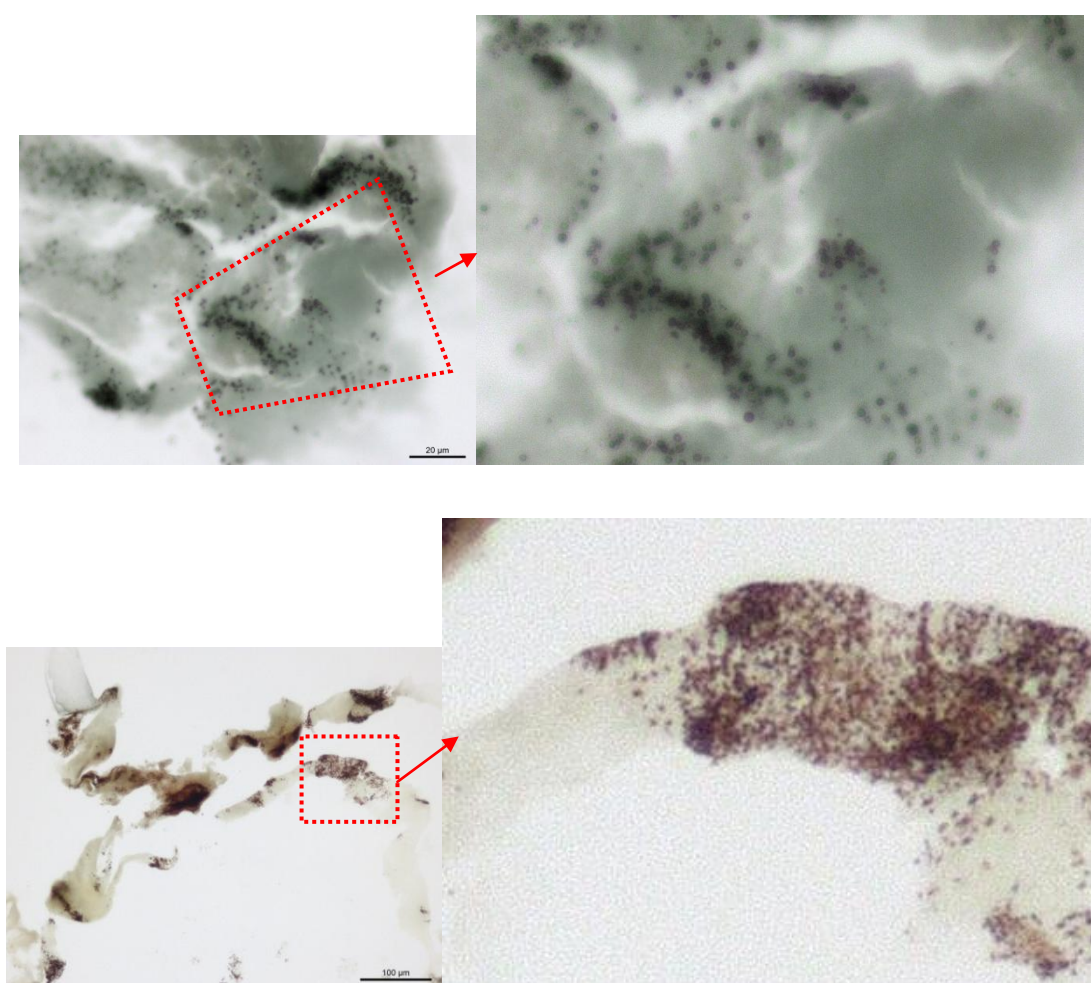
Pregledali smo serijske rezine 66. deževnikov in jih uvrstili v omenjenih 5 kategorij (pregl. 11). V kontrolnem tretmaju in tretmaju z monenzinom nismo zasledili pozitivnega obarvanja, zato smo vse živali uvrstili v kategorijo "0".

Preglednica 11: Delež deževnikov *E. andrei* v posamezni kategoriji (nič, malo, srednje, veliko, granule), ki opredeljuje količino reakcijskega produkta (=intenziteto obarvanja) histokemijske reakcije lokalizacije Cu (N – število; K – kloragogno tkivo; M – metanefridiji; Ž - žila; RU - rubeanska k.; ROD - rodanin)

tetma	N	kategorija [%]										
		veliko	srednje	malo	0		granule [N]					
							K		M		Ž	
							RU	ROD	RU	ROD	RU	ROD
14 dni												
Kontrola	4				100							
M	4				100							
Cu80	6			50	50							
Cu80+M	6		17	83		1					2	
Cu160	6		50	50							1	
Cu160+M	7	43	57						1	2	1	
28 dni												
Kontrola	4				100							
M	4				100							
Cu80	7		14	57	29							
Cu80+M	6		50	50				1			1	
Cu160	7	57	43			1					2	
Cu160+M	5	80	20					1			2	
Σ [N]	66	11	16	18	21	2	2		1	2	9	0
Σ [%]		17	24	27	32	3	3		2	3	14	0

4.5.2 Lokalizacija in semikvantitativna ocena količine bakra v tkivih enakonožcev z rubeansko kislino in rodaninom

Z rubeansko kislino, rodaninom se je barvalo tkivo hepatopankreasa in tudi stena črevesa v bližini hepatopankreasa (sl. 38). Večjo intenziteto reakcijskega produkta smo opazili v anteriorni polovici hepatopankreasa. Koncentracija bakra je padala vzdolž hepatopankreasa v posteriorni smeri. Intenziteta obarvanja ni sovpadala s koncentracijo bakra v prsti ali celokupno izmerjeno koncentracijo bakra v telesih enakonožcev iz enakega tretmaja. V hepatopankreasu enakonožcev smo opazili okrogle votle in polne granule, velike $<2\ \mu\text{m}$ (sl. 36).

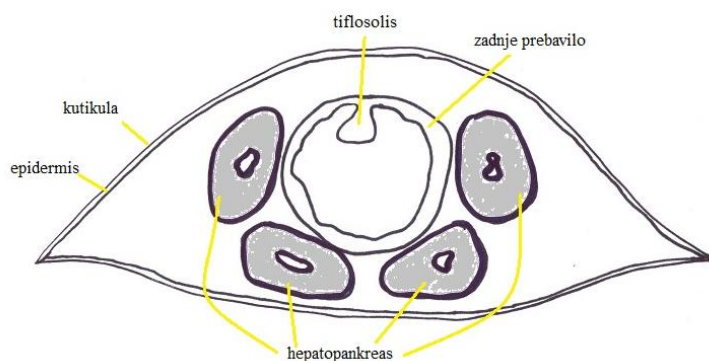


Slika 36: Okrogle votle granule (barvanje z rubeansko kislino - zgoraj) in okrogle polne granule (barvanje z rodaninom – spodaj) v hepatopankreasu enakonožcev *Porcellio scaber* (Kos M., 2013)

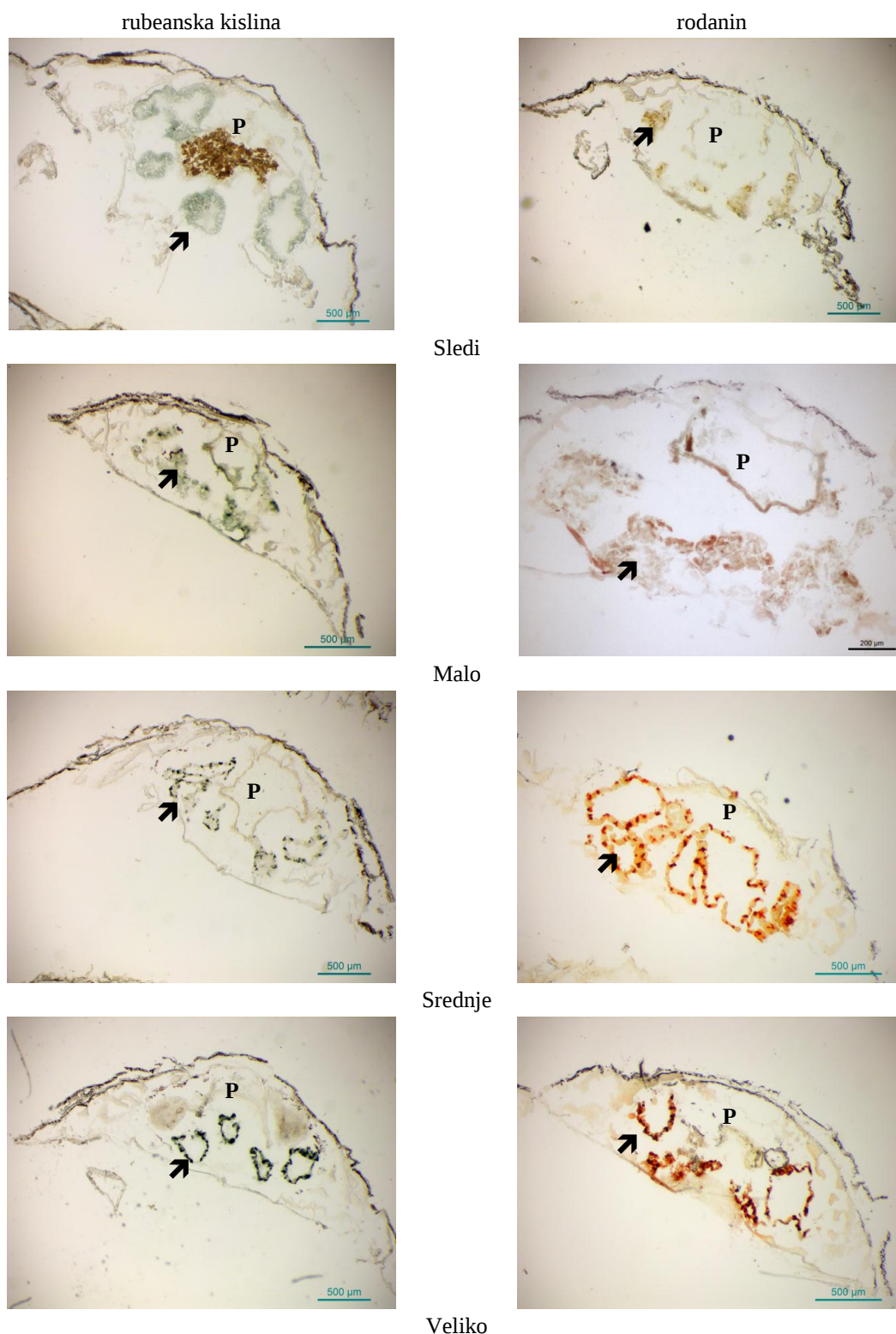
Na podlagi količine reakcijskega produkta histokemijske reakcije (jakosti obarvanja) z rubeansko kislino (RU) in rodaninom (ROD) smo količino bakra v tkivih enakonožcev opredelili s 4 kategorijami (prilagojeno po Zdešar, 2006) (sl. 38):

- 1 – **sledi**: v hepatopankreasu zasledimo pozitivno obarvanje brez granul;
RU: nežno zeleno do sivo obarvanje, brez granul;
ROD: nežno oranžno do rjavo obarvanje, brez granul;
- 2 – **malo**: v hepatopankreasu zasledimo pozitivno obarvanje z zelo redkimi granulami;
RU: sivo obarvanje, posamezne črne granule;
ROD: rjavo-rdeče obarvanje, posamezne rjave granule;
- 3 – **srednje**: v hepatopankreasu zasledimo intenzivnejše pozitivno obarvanje z večjimi skupki granul;
RU: sivo obarvanje, večji skupki črnih granul;
ROD: oranžno-rdeče obarvanje, posamezne večji skupki rdeče-rjavih granul;
- 4 – **veliko**: v hepatopankreasu zasledimo intenzivno pozitivno obarvanje z veliko granulami;
RU: temno sivo obarvanje, veliko črnih granul;
ROD: temno oranžno-rdeče obarvanje, veliko rdeče-rjavih granul.

S splošno skico na sliki 37 smo ponazorili prečni prerez enakonožca v predelu zadnjega prebavila z oznakami delov, ki jih vidimo na sliki 38.



Slika 37: Splošna skica prečnega prereza enakonožca v predelu zadnjega prebavila z oznakami (Kos M., 2013)



Slika 38: Kategorije za količino reakcijskega produkta histokemijske reakcije lokalizacije Cu z rubeansko kislino in rodaninom pri enakonožcih *Porcellio scaber*: sledi, malo, srednje, veliko reakcijskega produkta (puščica – cevka hepatopankreasa; P – prebavilo) (Kos M., 2013)

Pregledali smo serijske rezine 43. enakonožcev. Kar 49 % vseh pregledanih živali smo po količini reakcijskega produkta uvrstili v kategorijo “srednje” (pregl. 12).

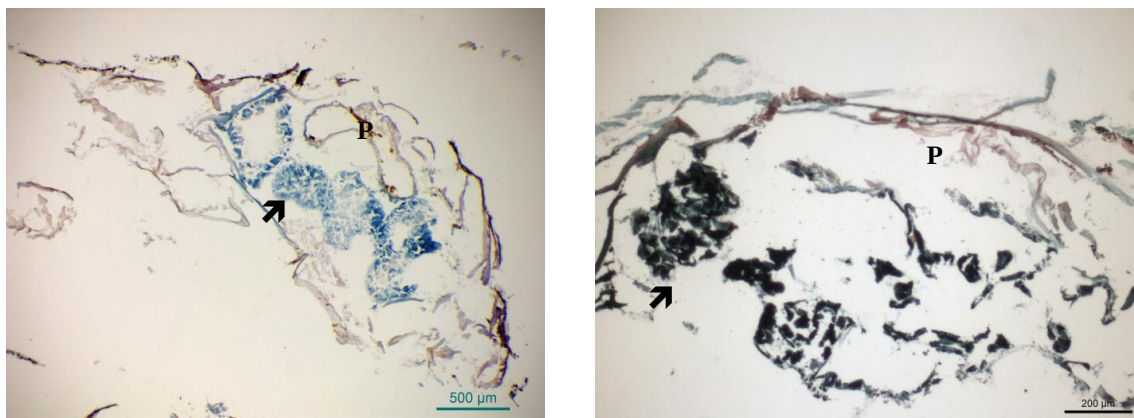
Preglednica 12: Delež enakonožcev *Porcellio scaber* v posamezni kategoriji (sledi, malo, srednje, veliko), ki opredeljuje količino reakcijskega produkta (=intenziteto obarvanja) histokemijske reakcije lokalizacije Cu

tetma	N	kategorija [%]			
		veliko	srednje	malo	sledi
14 dni					
Kontrola	4	25	50	25	
M	4	25	25	25	25
Cu80	4	25	50		25
Cu80+M	4	25	25	25	25
Cu160	4		50	25	25
Cu160+M	4		25	50	25
28 dni					
Kontrola	3	67	33		
M	3	33	67		
Cu80	3		100		
Cu80+M	2		100		
Cu160	4	50	50		
Cu160+M	4		50	50	
Σ [N]	43	9	21	8	5
Σ [%]		21	49	19	12

4.5.3 Lokalizacija bakra v tkivih enakonožcev in deževnikov s hematoksilinom

Barvanje s hematoksilinom smo izvedli bolj iz radovednosti in le kot dodatek k histolokalizaciji bakra s specifičnim barvilom rubeansko kislino in rodaninom. Iz tega razloga nismo pripravili semikvantitativnih kategorij, rezultate barvanja smo razvrstili le glede na posamezne tretmaje. Na slikah 39 in 40 smo prikazali nekatere reprezentativne rezine enakonožcev in deževnikov. Barvanje s hematoksilinom je nizko specifično, saj poleg bakra obarva tudi nekatere druge elemente. Glede na analizo prsti z XRF (pril. A), bi v tkivih obeh živali lahko pričakovali predvsem naslednje elemente (>50 mg/kg suhe prsti): Cr (modro-črna obarvanost), Cu (zeleno-modra obarvanost), Fe (modro-črna obarvanost), Mn (modra obarvanost), Ni (modra obarvanost), Pb (modra obarvanost), Ti (rjava obarvanost), Zr (modro-črna obarvanost). V prsti posameznih tretmajev je bila koncentracija omenjenih elementov podobna, spreminjala se je le koncentracija Cu. Glede na obarvanje hepatopankreasa pri enakonožcih bi obarvanje označili bolj kot (temno) modro ali modro-črno in ne zeleno-modro. Na sl. 39 sta prikazana 2 enakonožca z različno intenziteto obarvanja hepatopankreasa. Zaporedne rezine obeh živali smo obarvali tudi z rubeansko kislino in rodaninom in glede na intenziteto obarvanja smo živali uvrstili v kategorijo "sledí" in "srednje".

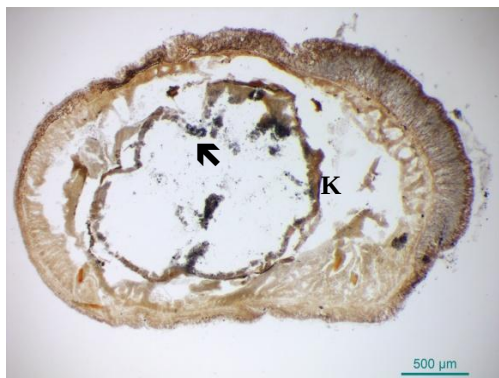
Enakonožci



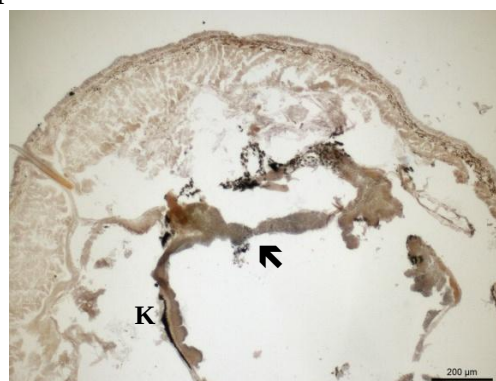
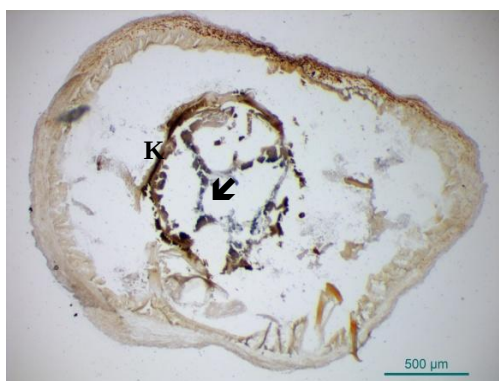
Slika 39: Barvanje s hematoksilinom: prikaz 2 reprezentativnih rezin enakonožcev *Porcellio scaber* z različno intenziteto obarvanja hepatopankreasa (Kos M., 2013)

Pri pregledu obarvanih rezin deževnikov smo zasledili prav vse prej omenjene barvne odtenke. Pri deževnikih smo v vseh tretmajih opazili temno obarvanje okrog prebavila (kloragogno tkivo, žile, ki obdajajo prebavilo). V tretmajih z bakrom z/brez monenzina smo opazili temno modro obarvanje gastrodermisa (sl. 40). Pri negativni kontroli do obarvanja ni prišlo.

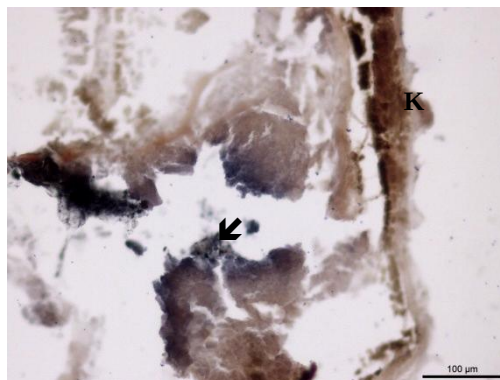
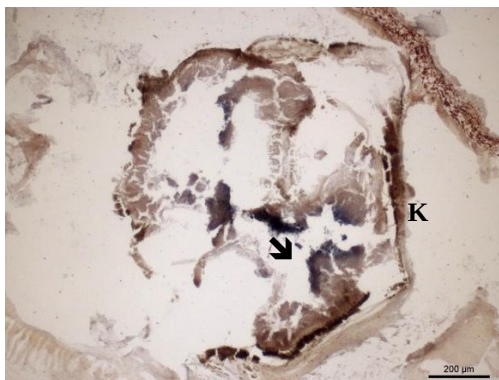
Deževniki
Kontrola



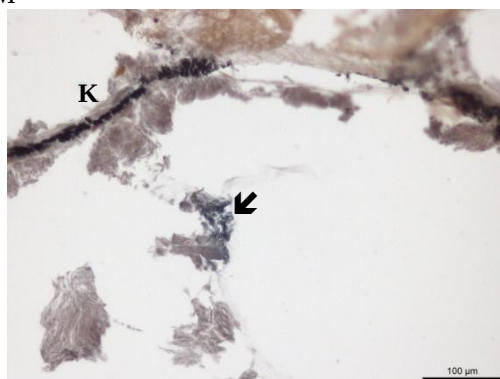
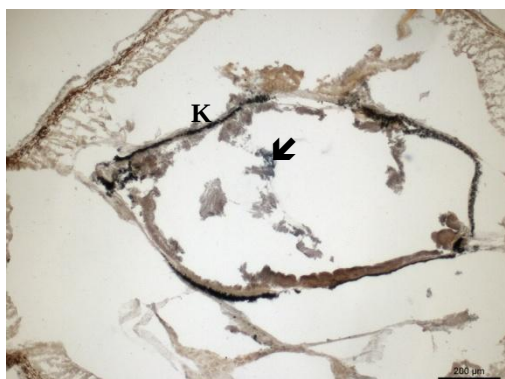
Cu80+M



Cu160



Cu160+M



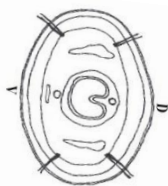
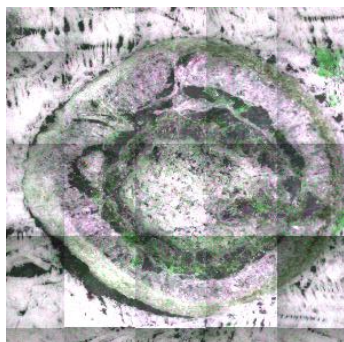
Slika 40: Barvanje s hematoksilinom: prikaz reprezentativnih rezin deževnikov *Eisenia andrei* (puščica – gastrodermis; K – kloragogno tkivo) (Kos M., 2013)

4.5.4 Lokalizacija in mape porazdelitve bakra v liofiliziranih krio rezinah deževnikov *Eisenia andrei* z metodo laserske ablacije ICP-MS

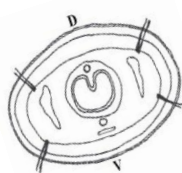
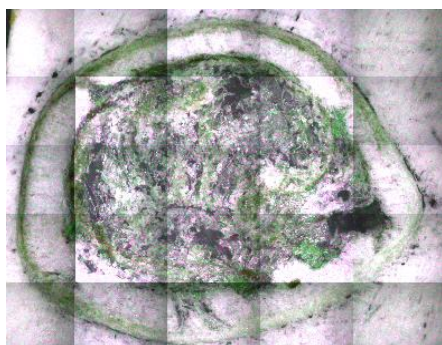
Z metodo laserske ablacijske ICP-MS smo analizirali prostorsko porazdelitev Cu v vzorcih deževnikov iz 5 tretmajev (kontrola, Cu80, Cu160, Cu80+M in Cu160+M) 14- in 28-dnevne izpostavitve. Vzorcev enakonožcev z metodo LA ICP-MS nismo analizirali. Na slikah 41 in 46 so združene fotografije rezin prečnih prerezov deževnikov pred LA ICP-MS. Poleg vsake fotografije je tudi splošna skica prečnega prereza deževnika v predelu za sedlom z označeno orientacijo, ki se nanaša na orientacijo fotografije. Na naslednjih slikah (sl. 42-45 in sl. 47-50) so združene mape porazdelitve bakra v tkivih deževnikov po posameznih tretmajih. Slike smo pripravili s 5 različnimi maksimalnimi intenzitetami Cu, da smo zagotovili različen kontrast map in sicer: 5000, 10000, 20000 in 40000 cps (counts per second oz. sunkih na sekundo; t.j. intenzitetnih enotah, ki se nanašajo na relativno koncentracijo Cu). Z barvno legendo je ponazorjena relativna koncentracija bakra v tkivih: rdeča barva ponazarja najvišjo koncentracijo, z modro barvo pa so ponazorjene najnižje koncentracije.

Pri obeh kontrolnih rezinah je bila najvišja vsebnost Cu izmerjena v območju prebavila (gastrodermisa, kloragognega tkiva). Pri ostalih tretmajih s Cu v obeh obdobjih izpostavitve pa je bil Cu prisoten tudi območju metanefridijev in telesne stene: v epidermisu, vzdolžnih in krožnih mišicah s peritonejem. Najvišjo intenziteto signala smo dobili v tretmajih z višjo koncentracijo bakra z/brez monenzina v obeh obdobjih izpostavitve. Med rezultati izstopa rezina živali iz krajše izpostavitve tretmaja Cu160 z monenzinom, kjer je veliko bakra v vseh tkivih v primerjavi z ostalimi. Dopuščamo možnost, da je rezina zajela prav območje med dvema telesnima členoma, ki ju ločuje septa, prekrita s peritonejem. Pri daljši izpostavitvi v rezini deževnika iz tretmaja Cu 160 z monenzinom opazimo, da ima več Cu v telesni steni v primerjavi z rezino deževnika iz tretmaja Cu 160. Na rezini deževnika iz tretmaja Cu 160 pri daljši izpostavitvi opazimo visoko intenziteto obarvanja ventralno na levi strani. Glede na orientacijo rezine (sl. 46) bi lahko bilo ne tem mestu izvodilo metanefridija.

14-dnevna izpostavitve

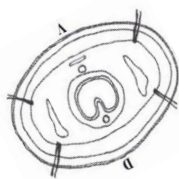
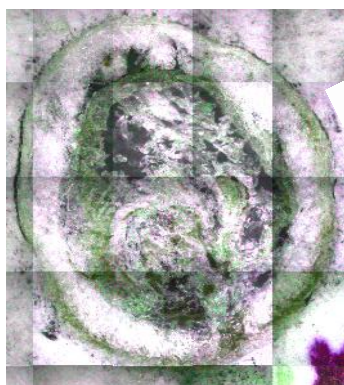


Kontrola Cu_14 d

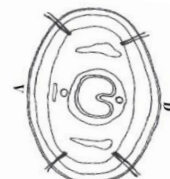


Cu 80_14

d



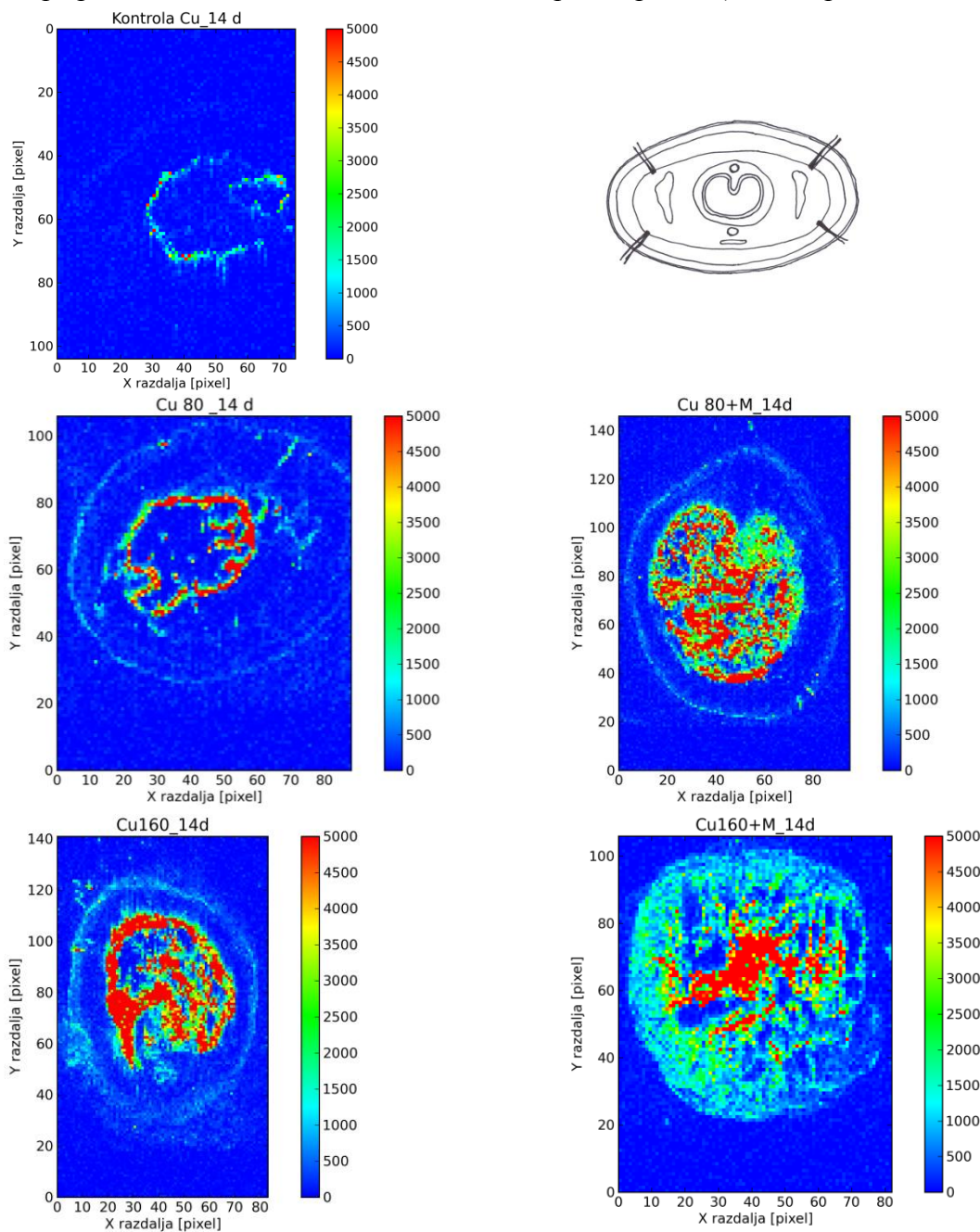
Cu160_14 d



Cu160+M_14 d

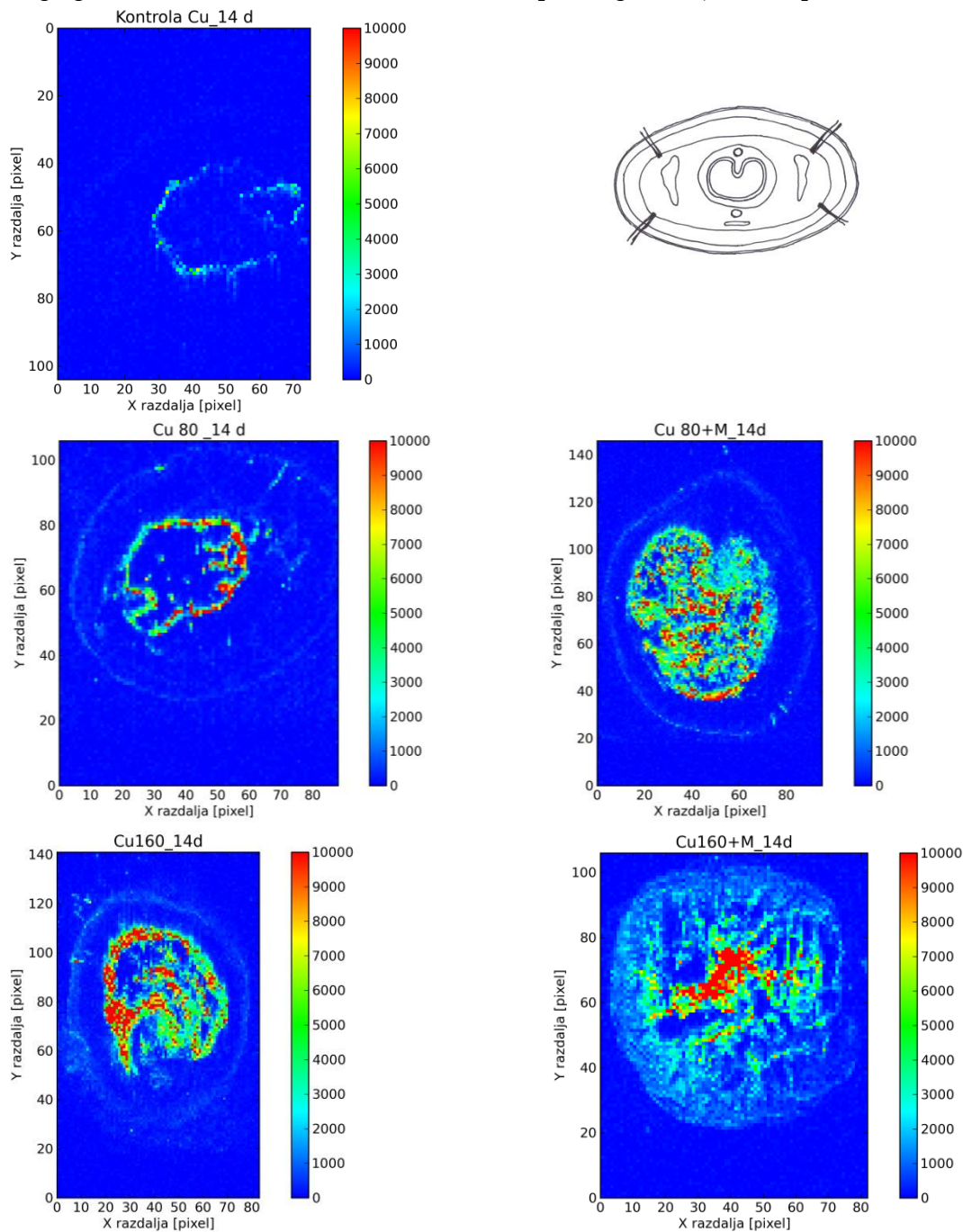
Slika 41: Fotografije rezin prečnih prerezov deževnikov *Eisenia andrei* iz tretmajev po 14-dnevni izpostavitvi pred LA ICP-MS, ki so bile zajete s kamero laserskega ablacijskega sistema. Poleg vsake fotografije je splošna skica prečnega prereza deževnika v predelu za sedlom z označeno orientacijo, ki se nanaša na orientacijo fotografije (D – dorzalna stran; V – ventralna stran deževnika) (Kos M., 2013)

Mapa porazdelitve bakra v tkivih deževnika – prečni prerez (min=0 cps, max=5000 cps)



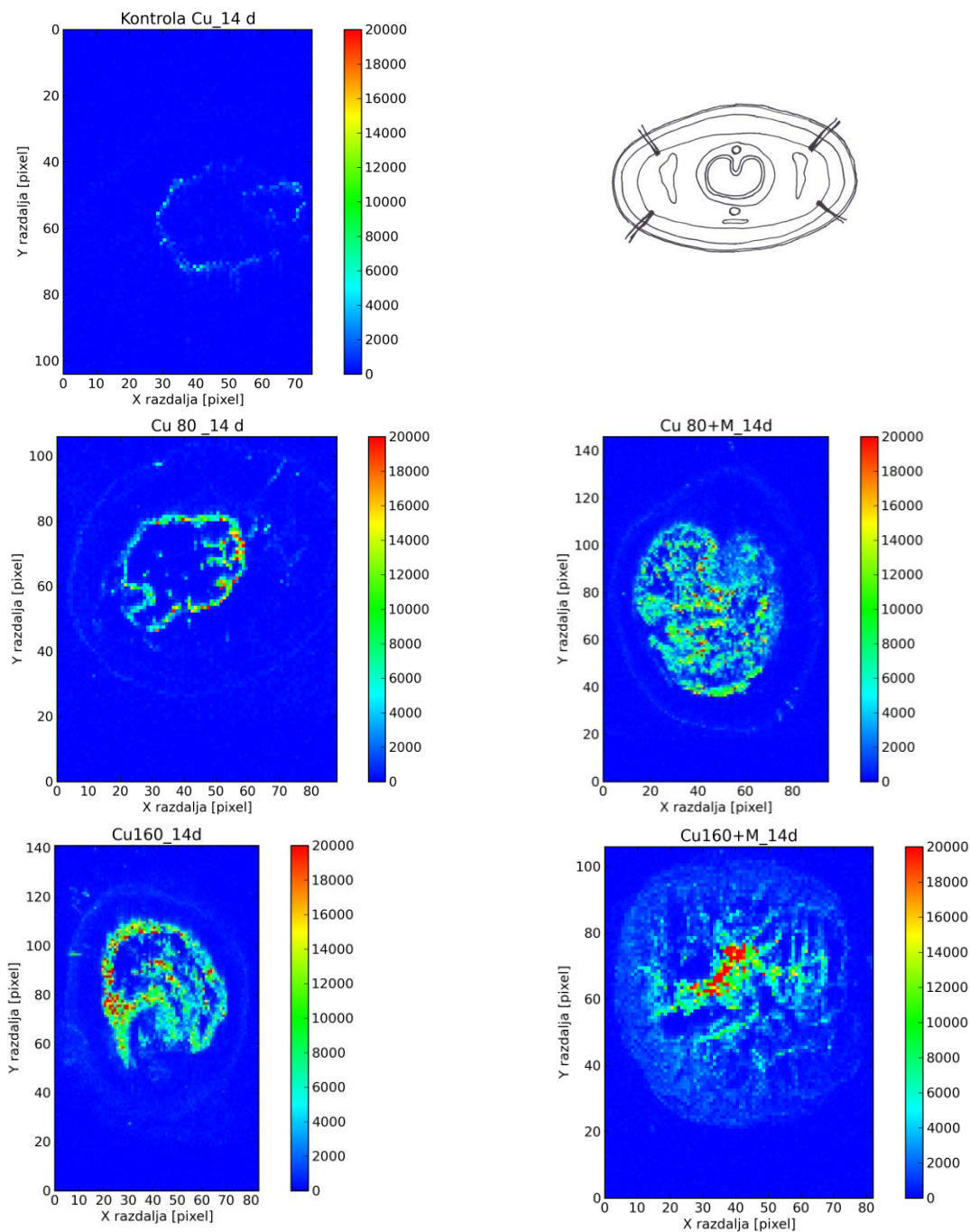
Slika 42: Mapa porazdelitve bakra v tkivih deževnikov *Eisenia andrei* po 14. dnevi izpostavitvi neonesnaženi prsti Lufa 2.2/ onesnaženi prsti s Cu 80 ali 160 ppm/ onesnaženi prsti s Cu 80 ppm in monenzinom 25 ppm ali Cu 160 ppm in monenzinom 25 ppm. Barvna legenda označuje intenziteto analita (Cu) v sunkih na sekundo (min=0 cps, max=5000 cps). V zgornjem desnem kotu je splošna skica prečnega prereza deževnika v predelu za sedlom (Kos M., 2013)

Mapa porazdelitve bakra v tkivih deževnika – prečni prerez (min=0 cps, max=10000 cps)



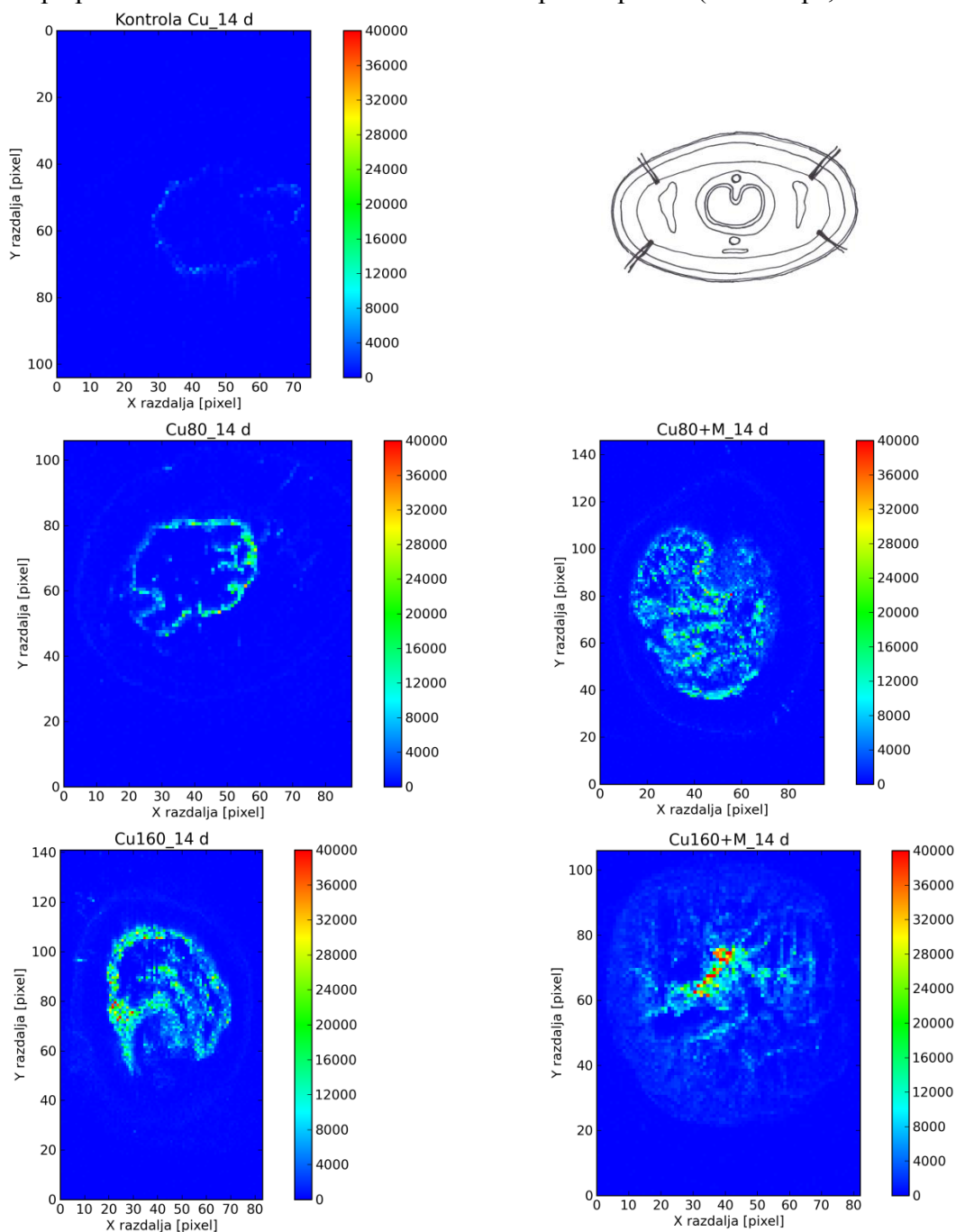
Slika 43: Mapa porazdelitve bakra v tkivih deževnikov *Eisenia andrei* po 14. dnevi izpostavitvi neonesnaženi prsti Lufa 2.2/ onesnaženi prsti s Cu 80 ali 160 ppm/ onesnaženi prsti s Cu 80 ppm in monenzinom 25 ppm ali Cu 160 ppm in monenzinom 25 ppm. Barvna legenda označuje intenziteto analita (Cu) v sunkih na sekundo (min=0 cps, max=10000 cps). V zgornjem desnem kotu je splošna skica prečnega prereza deževnika v predelu za sedlom (Kos M., 2013)

Mapa porazdelitve bakra v tkivih deževnika – prečni prerez (min=0 cps, max=20000 cps)



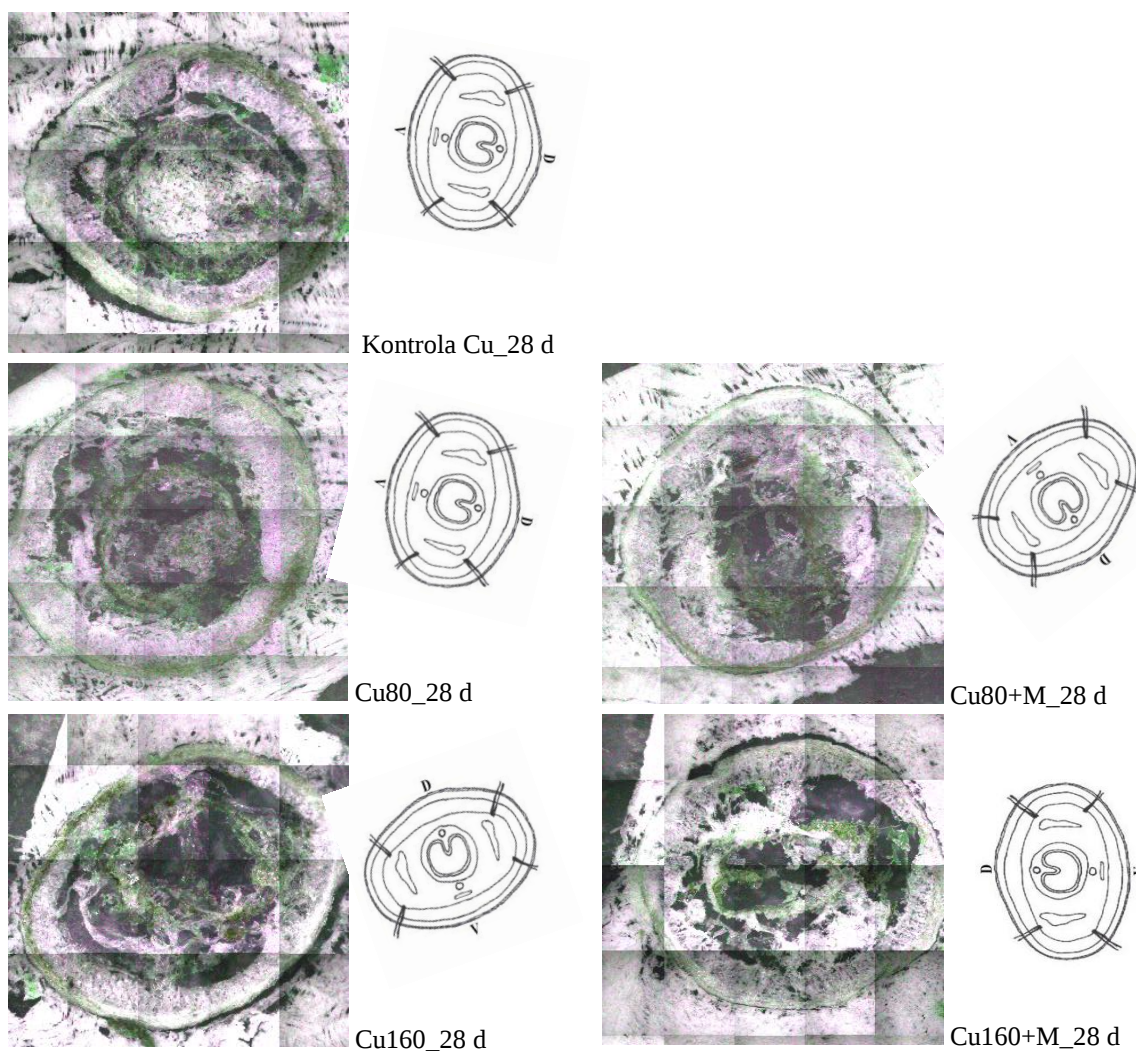
Slika 44: Mapa porazdelitve bakra v tkivih deževnikov *Eisenia andrei* po 14. dnevi izpostavitvi neonesnaženi prsti Lufa 2.2/ onesnaženi prsti s Cu 80 ali 160 ppm/ onesnaženi prsti s Cu 80 ppm in monenzinom 25 ppm ali Cu 160 ppm in monenzinom 25 ppm. Barvna legenda označuje intenziteto analita (Cu) v sunkih na sekundo (min=0 cps, max=20000 cps). V zgornjem desnem kotu je splošna skica prečnega prereza deževnika v predelu za sedlom (Kos M., 2013)

Mapa porazdelitve bakra v tkivih deževnika – prečni prerez (min=0 cps, max=40000 cps)



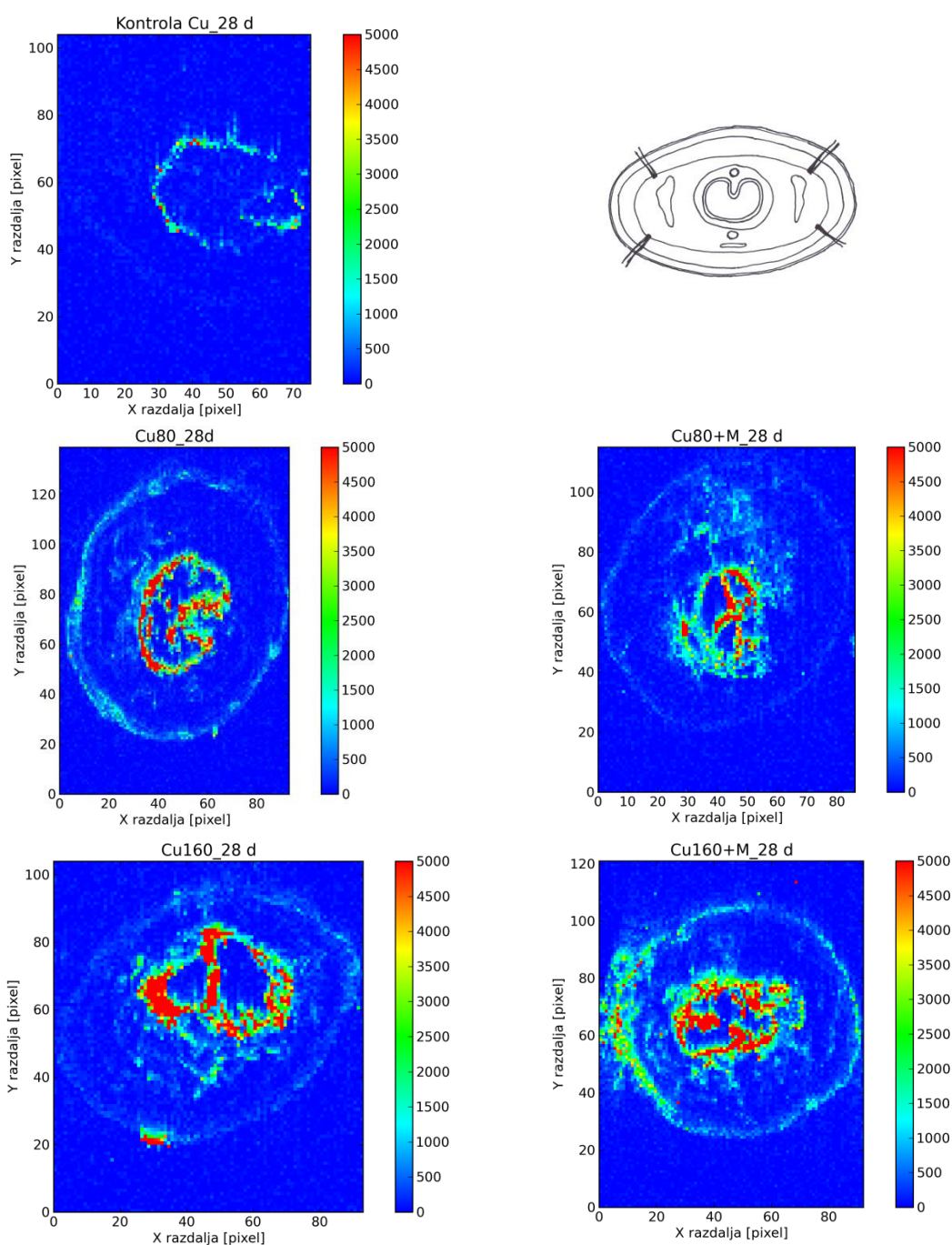
Slika 44: Mapa porazdelitve bakra v tkivih deževnikov *Eisenia andrei* po 14. dnevi izpostavitvi neonesnaženi prsti Lufa 2.2/ onesnaženi prsti s Cu 80 ali 160 ppm/ onesnaženi prsti s Cu 80 ppm in monenzinom 25 ppm ali Cu 160 ppm in monenzinom 25 ppm. Barvna legenda označuje intenziteto analita (Cu) v sunkih na sekundo (min=0 cps, max=40000 cps). V zgornjem desnem kotu je splošna skica prečnega prereza deževnika v predelu za sedlom (Kos M., 2013)

28-dnevna izpostavitve



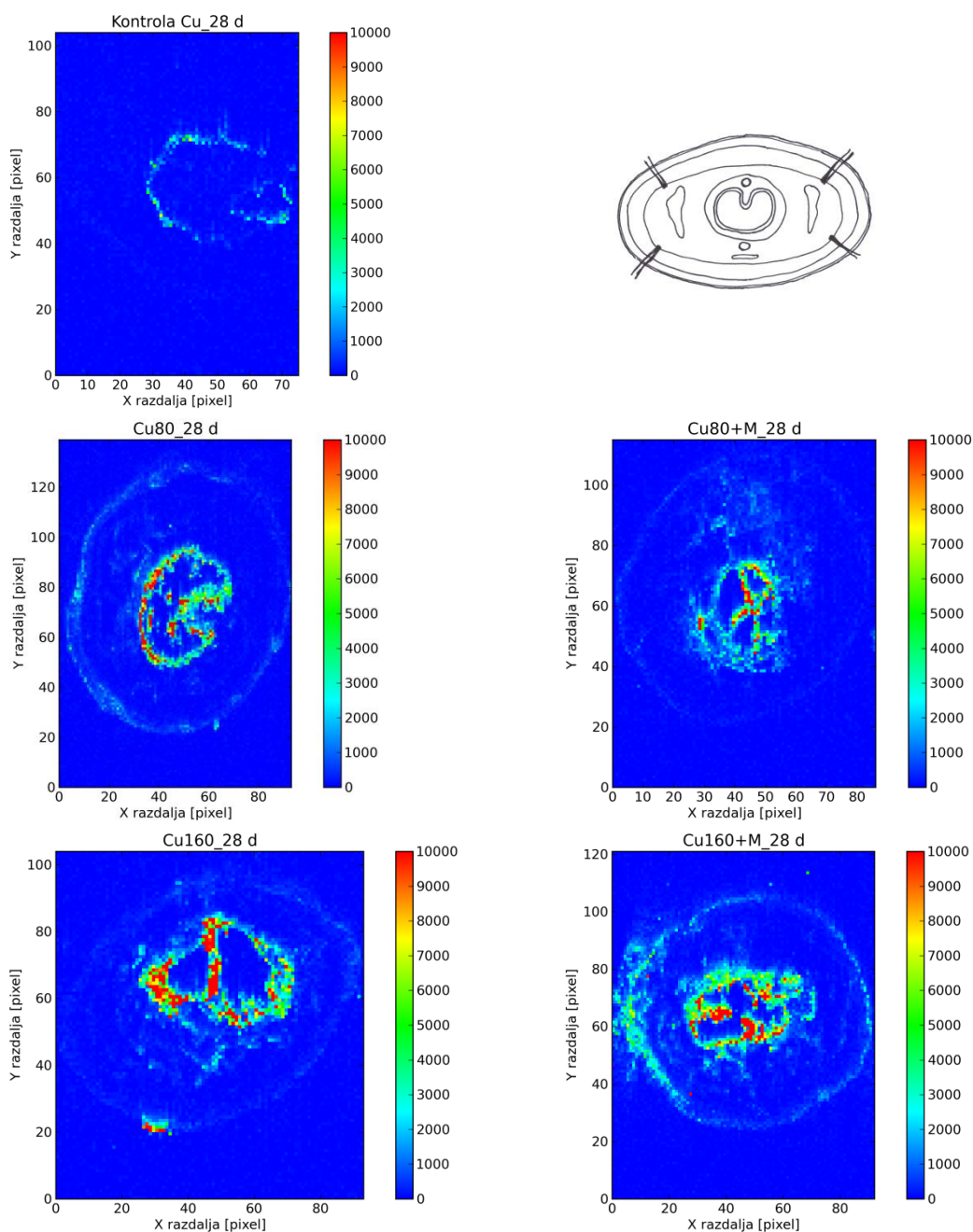
Slika 46: Fotografije rezin prečnih prerezov deževnikov *Eisenia andrei* iz tretmajev po 28-dnevni izpostavitvi pred LA ICP-MS, ki so bile zajete s kamero laserskega ablacijskega sistema. Poleg vsake fotografije je splošna skica prečnega prereza deževnika v predelu za sedlom z označeno orientacijo, ki se nanaša na orientacijo fotografije (D – dorzalna stran; V – ventralna stran deževnika) (Kos M., 2013)

Mapa porazdelitve bakra v tkivih deževnika – prečni prerez (min=0 cps, max=5000 cps)



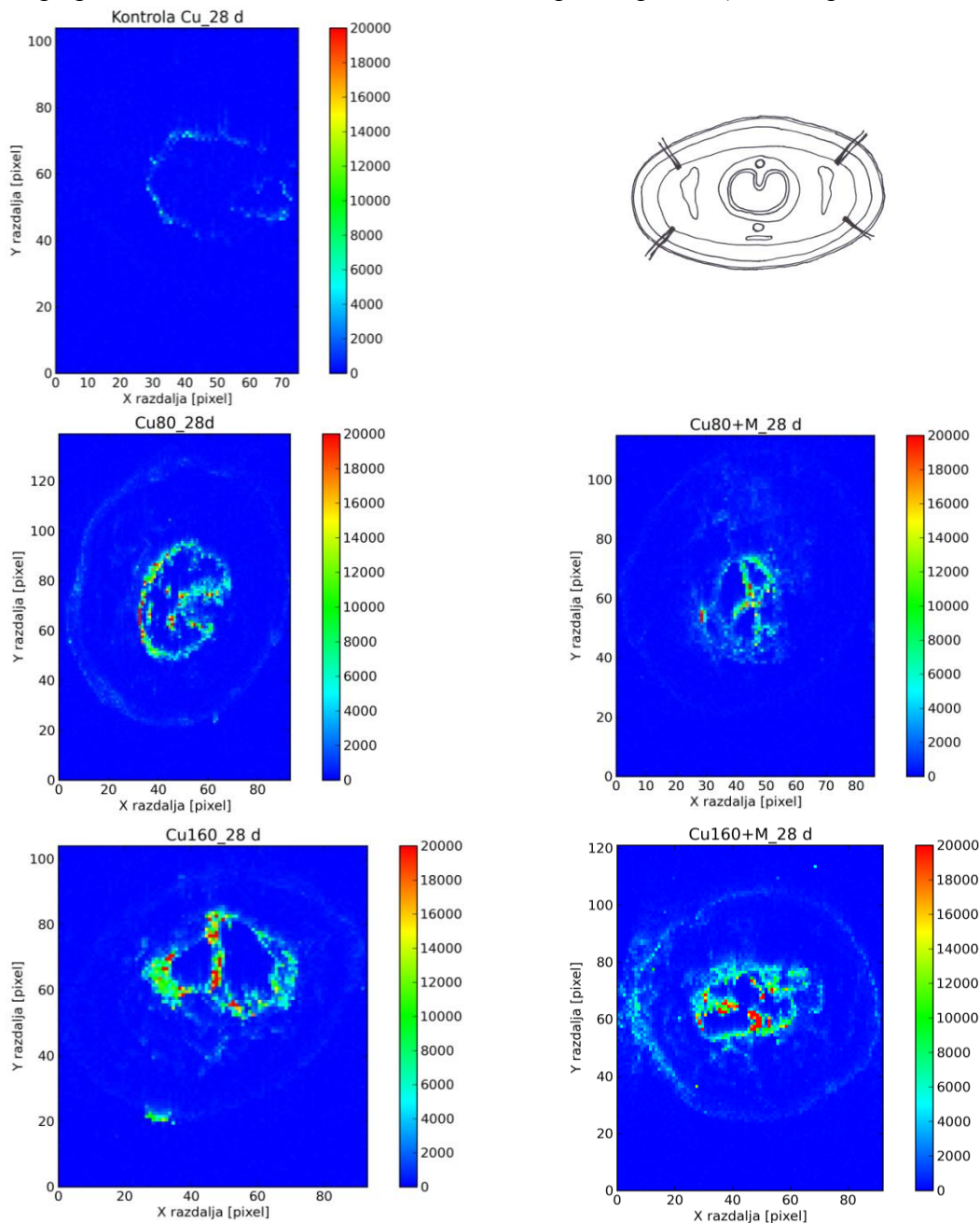
Slika 47: Mapa porazdelitve bakra v tkivih deževnikov *Eisenia andrei* po 28. dnevi izpostavitvi neonesnaženi prsti Lufa 2.2/ onesnaženi prsti s Cu 80 ali 160 ppm/ onesnaženi prsti s Cu 80 ppm in monenzinom 25 ppm ali Cu 160 ppm in monenzinom 25 ppm. Barvna legenda označuje intenziteto analita (Cu) v sunkih na sekundo (min=0 cps, max=5000 cps). V zgornjem desnem kotu je splošna skica prečnega prereza deževnika v predelu za sedlom (Kos M., 2013)

Mapa porazdelitve bakra v tkivih deževnika – prečni prerez (min=0 cps, max=10000 cps)



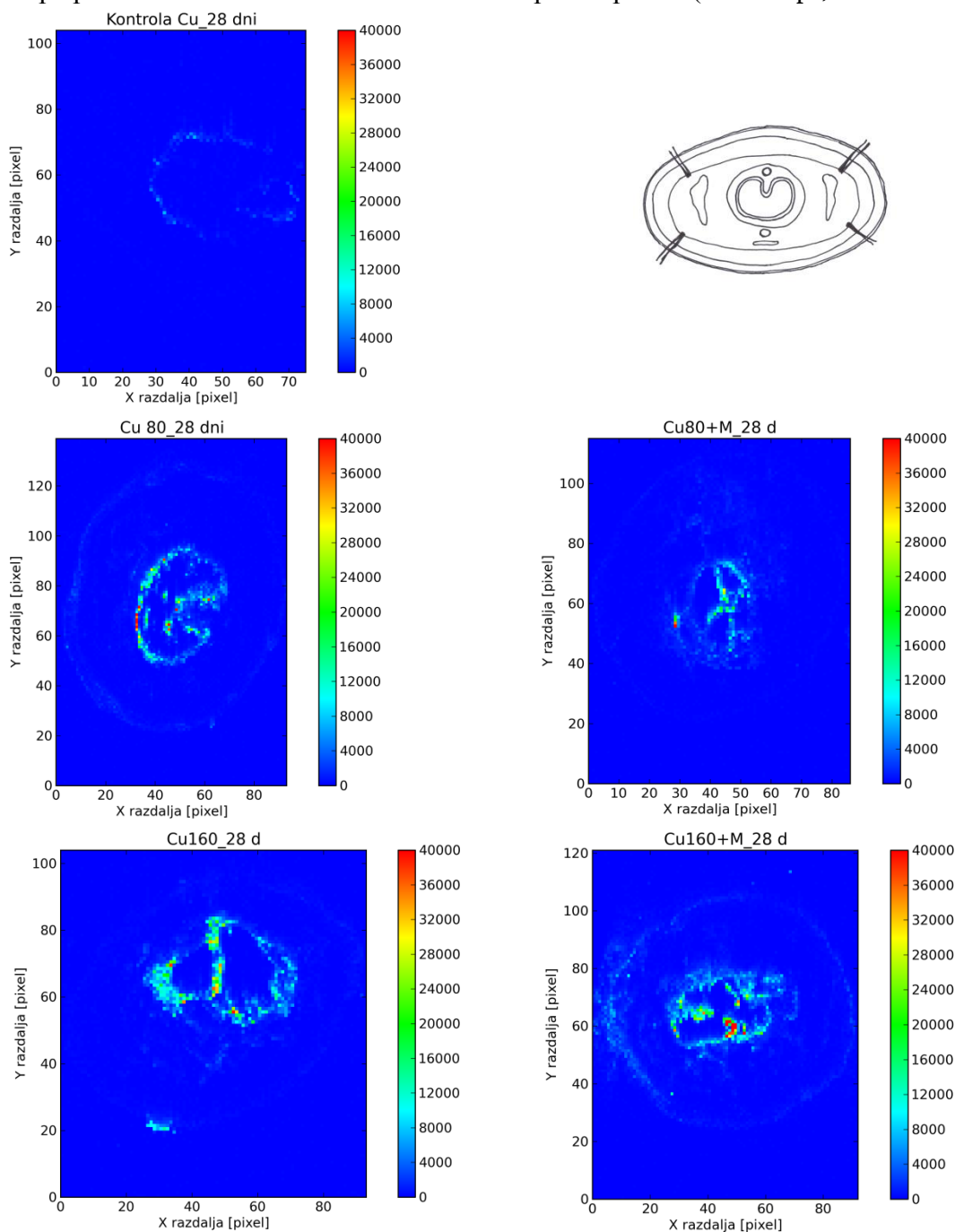
Slika 48: Mapa porazdelitve bakra v tkivih deževnikov *Eisenia andrei* po 28. dnevi izpostavitvi neonesnaženi prsti Lufa 2.2/ onesnaženi prsti s Cu 80 ali 160 ppm/ onesnaženi prsti s Cu 80 ppm in monenzinom 25 ppm ali Cu 160 ppm in monenzinom 25 ppm. Barvna legenda označuje intenziteto analita (Cu) v sunkih na sekundo (min=0 cps, max=10000 cps). V zgornjem desnem kotu je splošna skica prečnega prereza deževnika v predelu za sedlom (Kos M., 2013)

Mapa porazdelitve bakra v tkivih deževnika – prečni prerez (min=0 cps, max=20000 cps)



Slika 49: Mapa porazdelitve bakra v tkivih deževnikov *Eisenia andrei* po 28. dnevi izpostavitvi neonesnaženi prsti Lufa 2.2/ onesnaženi prsti s Cu 80 ali 160 ppm/ onesnaženi prsti s Cu 80 ppm in monenzinom 25 ppm ali Cu 160 ppm in monenzinom 25 ppm. Barvna legenda označuje intenziteto analita (Cu) v sunkih na sekundo (min=0 cps, max=20000 cps). V zgornjem desnem kotu je splošna skica prečnega prereza deževnika v predelu za seldom (Kos M., 2013)

Mapa porazdelitve bakra v tkivih deževnika – prečni prerez (min=0 cps, max=40000 cps)



Slika 50: Mapa porazdelitve bakra v tkivih deževnikov *Eisenia andrei* po 28. dnevnici izpostavitvi neonesnaženi prsti Lufa 2.2/ onesnaženi prsti s Cu 80 ali 160 ppm/ onesnaženi prsti s Cu 80 ppm in monenzinom 25 ppm ali Cu 160 ppm in monenzinom 25 ppm. Barvna legenda označuje intenziteto analita (Cu) v sunkih na sekundo (min=0 cps, max=40000 cps). V zgornjem desnem kotu je splošna skica prečnega prereza deževnika v predelu za seldom (Kos M., 2013)

5 RAZPRAVA

5.1 ANALIZA PRSTI

5.1.1 Vpliv poskusnih pogojev na poskusna organizma

V ekotoksikoloških poskusih organizme navadno izpostavimo optimalnim pogojem in tudi v našem poskusu smo zagotovili konstantne pogoje (temperatura, dnevno-nočni ritem, pH, vlažnost prsti) (pregl. 3). V naravi so optimalni pogoji redkost, zato učinek naravnih stresorjev (vročine, mraza, suše, znižanega parcialnega tlaka kisika, patogenov organizmov in drugih dejavnikov, ki znižajo odpornost organizmov) lahko spremenijo učinek kemikalije (Holmstrup s sod., 2010). Višje in nižje temperature od temperaturnega tolerančnega območja, dokazano povečajo strupenost Cu pri deževniku *Dendrobaena octaedra* in *Aporrectodea caliginosa* (Holmstrup, 1998; Valko s sod., 2005; Khan s sod., 2007; Bindesbol s sod., 2005 in 2009).

V našem poskusu so bili temperatura, pH in vlažnost optimalni za deževnika *Eisenia andrei* in enakonožca *Porcellio scaber* (Kula in Larink, 1998; Hornung s sod., 1998; OECD/OCDE, 2004). Vrednost pH prsti ima pomemben vpliv na mobilnost kovin (Gupta in Aten, 1993; Criel s sod., 2008). Mobilnost Cu naj bi bila najvišja pri pH 5,7-6,6 (Marschner, 1995). pH založne prsti Lufa 2.2 je bil nizek, zato smo pH uravnali na 6,5-7 (OECD/OCDE, 2004). Po Rusjanu s sod. (2007) bi naša prst glede na pH sodila v razred zelo šibko kisle in razred nevtralne-zelo šibko bazične prsti. Tudi vlažnost prsti je pomembna, saj določa količino intersticielne vode, v kateri se lahko raztopijo snovi. Vlažnost in pH prsti sta bili podobni v vseh tretmaji, zato lahko rečemo, da je bila razpoložljivost Cu podobna za oba poskusna organizma.

5.1.2 Primerjava uporabljenih metod AAS in XRF za meritev koncentracije Cu v prsti

Za meritev koncentracije Cu v prsti smo uporabili metodo AAS in XRF. V primerjavi z nominalno koncentracijo Cu smo z metodo AAS izmerili nižjo, z metodo XRF pa višjo koncentracijo Cu v prsti. Opazili smo tudi, da smo z obema metodama izmerili različno koncentracijo Cu v enakih tretmajih pri 14- in 28-dnevni izpostavitvi, kljub temu, da smo tretmaje pripravili na popolnoma enak način. To odstopanje bi lahko pripisali različnemu vzorčenju. Ob pripravi posameznega vzorca za razklop ali tableto smo namreč lahko zajeli podvzorec, ki je imel večji delež peska in manj organske snovi ter obratno. Prst Lufa 2.2 ima razgibano sestavo: ima določen delež šote, kaolinitne glin in kremenčevega peska (OECD/OCDE, 2004; LUFA Spreyer, 2012). Pričakovati je, da je Cu vezan na organskih in kaolinitnih delcih prsti (Basta s sod., 2005; Owojori s sod., 2010).

Primerjava izmerjenih koncentracij Cu z obema metodama kaže na to, da je bila uspešnost razklopa prsti za meritev z AAS slaba (do 60 %). Za optimalno meritev z AAS moramo material razgraditi do osnovnih gradnikov, atomov. Pokazatelj popolnega razklopa snovi je bela oborina, ki ostane na dnu epruvete po končanem razklopu. V našem primeru je bila oborina obarvana nežno rumeno, kar kaže na to, da po uporabljenem protokolu za razklop prsti Lufa 2.2 nismo popolnoma razklopili. Del Cu v vzorcu je ostal vezan na delce prsti in pomerili smo lahko le nevezani elementarni Cu. Za popoln razklop prsti bi morali še dodatno optimizirati razklop z dodatkom HF, ki raztopi sililikatne delce ali pa se poslužiti razklopa v mikrovalovni pečici. Da smo dobili zvezo med absorbanco in koncentracijo Cu smo pripravili linearne Cu standardne raztopine iz svežega Cu standarda. Korelacijski koeficient je bil visok $r \geq 0,995$, ta pogoj za uspešnost meritve je bil torej izpolnjen.

Pri rezultatih XRF meritev smo opazili večje standardne odklone (SD). Rousseau (2001) v svojem delu navaja nekatere možne vzroke za večje standardne odklone pri meritvah z XRF. Vzroke za večjo negotovost bi lahko iskali predvsem v heterogenosti vzorcev prsti, saj jih pred pripravo tablet nismo homogenizirali ali presejali (Nečemer, 2006). Debelina, površina in gostota tablet je lahko zaradi večjih delcev ($<0,2$ mm) peska varirala. V vsaki tableti je bil tudi različen delež alumosilikatov in oksidov lahkih elementov, ki jih z metodo XRF ne moremo meriti in predstavljajo tako imenovano "temno matriko".

Vsaka od uporabljenih metod AAS in XRF ima svoje prednosti in pomanjkljivosti, nobena pa ni idelana. Uporaba vsaj 2 komplementarnih metod za analizo enakega vzorca, kadar je le mogoče, se zato zdi odlična ideja. Kump s sod. (1995) in Nečemer s sod. (2006) sta v svojih raziskavah preizkusila in primerjala različne analize metode kemijskih elementov (med drugimi tudi AAS in XRF) na osnovi občutljivosti, natančnosti, priprave vzorca in cene priprave vzorca. Metoda XRF ima kar nekaj prednosti pred metodo AAS. Omogoča namreč multielementno analizo, pri čemer dobimo "osebno izkaznico" vzorca, predstavljeno z X-žarkovnim spektrom (pril. A), medtem ko ta pri AAS ni mogoča. Pri XRF ni potrebna predhodna kemijska obdelava vzorca, priprava tablet je zato enostavna in poceni, saj skoraj ne potrebujemo kemikalij za analizo. Priprava vzorcev za AAS je resda tudi časovno zamudna, a ko so vzorci pripravljeni, meritve potekajo hitro (nekaj sekund/vzorec), medtem ko meritev enega vzorca z XRF traja vsaj 1000 sekund. Omenimo še lahko, da je natančnost meritev (t.j. ponovljivost meritev) koncentracij elementov, ki so na meji detekcije, slabša pri obeh metodah. Meja detekcije pri XRF je zaradi t.i. matričnih efektov, še posebno za lahke elemente (npr. K, Ca, Mn, Fe), višja kot pri AAS.

5.1.3 Vsebnost in razpolovna doba monenzina v poskusni prsti v primerjavi s podatki v literaturi

Izmerjene začetne koncentracije monenzina se od nominalne koncentracije (25 mg/kg suhe prsti) niso razlikovale za več kot 20 %. Žižek s sod. (2011) v svoji raziskavi poroča o

največ 30 % odstopanju izmerjenih koncentracij od nominalnih koncentracij monenzina v prsti. Zidar in Žižek (2012) pa poročata o kar 70 % odstopanju izmerjenih koncentracij monenzina v hrani enakonožcev (povpr. 1,8 in 15,3 mg/kg suhe hrane) od nominalnih koncentracij (5 in 50 mg/kg), vendar pa opisana priprava hrane zahteva toplotno obdelavo do okoli 65 °C. Hitrost razpada monenzina v tretmajih z deževniki je bila manjša v primerjavi s tretmaji z enakonožci. Razpolovno dobo smo ocenili na 2,7 tedna v tretmajih z enakonožci in 4,4 tedna v tretmajih z deževniki. Sassman in Lee (2007) sta razpolovno dobo monenzina v prsti v laboratorijskem poskusu ocenila na le 2 dneva. Žižek s sod. (2011) pa je razpolovno dobo monenzina v prsti ocenila med 2,98 in 3,5 tedni v tretmajih z deževniki in mnogo daljšo v tretmajih z enakonožci: med 9,2 in 36,4 tedni. V živalskem (kravjem in perutninskem) gnoju je razpolovna doba monenzina med 6. in 12. tedni (Donoho, 1984). V prsti pa monenzin razpada hitreje. Različen tip prsti, nižja temperatura, pH, prisotnost talnih organizmov in delno razgrajene hrane (konjskega gnoja/leskovih listov) v našem poskusu bi lahko pojasnilo razliko v opazovani razpolovni dobi v primerjavi z rezultati Sassman-a in Lee-ja (2007). Razpolovna doba v našem primeru je morda celo nekoliko daljša. V poskusu smo namreč izmerili koncentracijo monenzina ob začetku poskusa in ob koncu poskusa. Prst ob koncu poskusa je bila nekoliko razredčena, saj smo pri deževnikih dodali 40 g konjskega gnoja/posodo, pri enakonožcih pa je prst vsebovala tudi delež zdrobljenega listja in iztrebkov.

5.1.4 Analiza Cu v hrani

V poskusu smo izmerili Cu v hrani poskusnih živali (pregl. 8). Koncentracija Cu v založnem gnoju (za deževnike) in v založnih leskovih listih (za enakonožce) kontrolnih živali je bila podobna. Koncentracija Cu v leskovih listih, ki so ležali na prsti z dodanim bakrom, je bila na koncu poskusa nekoliko višja navkljub spiranju z destilirano vodo ($\text{monenzin} < \text{Cu}_{80} + \text{M} < \text{Cu}_{80} < \text{Cu}_{160} + \text{M} < \text{Cu}_{160}$). Uporabili smo na zraku sušene liste iz opada v neonesnaženem gozdu. Od celic odmrlih rastlinskih tkiv ostanejo le še celične stene. Cu ima visoko afiniteto do peptidov, tiolnih, karboksilnih in fenolnih skupin, ki jih najdemo v celični steni rastlinskih celic (Marschner, 1995). Možno je, da se je Cu iz prsti vezal na komponente odmrlih celičnih sten listov. Ne smemo pa pozabiti, da tako pripravljeni listi niso sterilni. Liste prekrivajo dekompozitorski mikroorganizmi, kot so glive, bakterije. Ker monenzin deluje le na živih celicah, smo razliko v koncentraciji Cu v listih med tretmaji s Cu in tretmajih s Cu in monenzinom verjetno izmerili prav na račun mikroorganizmov.

5.2 ANALIZA AKUMULACIJE BAKRA V POSKUSNIH ŽIVALIH

Pri deževniku *Eisenia andrei* naj bi kar 96 % Cd, Cu in Pb privzema potekalo skozi telesno površino, medtem ko naj bi privzem Zn potekal predvsem z zaužitim substratom skozi

steno prebavila (82 %) (Saxe, 2001; Vijver s sod., 2005). Kopenski enakonožci potreben Cu pridobijo predvsem s hrano (Hopkin 1989, 1993). Omenjeno je verjetno poglavitni razlog, da je telesna koncentracija pri deževnikih v naših poskusih sledila koncentraciji bakra v prsti, pri enakonožcih pa ne.

Koncentracija Cu v deževnikih, ki so bili izpostavljeni le monenzinu, je bila malenkost manjša kot v deževnikih iz kontrolnega tretmaja, vendar razlike med njimi niso bile statistično značilne. Deževniki, ki so bili izpostavljeni Cu in monenzinu so imeli višjo koncentracijo bakra v primerjavi z deževniki, ki so bili izpostavljeni le Cu. To je skladno z našimi pričakovanji, saj monensin deluje kot prenašalec ionov v smeri koncentracijskega gradienta (Pressman, 1976). V literaturi podobnih podatkov za nevretenčarje ni na voljo, so pa Elsasser (1985) ter van Ryssen in Barrowman (1987) podobno opazili pri vretenčarjih. V kokoših in ovcah, ki so bile zdravljene z monenzinom, so opazili povišanje koncentracije Cu v primerjavi s kontrolno skupino. Koncentracije Cu v deževnikih iz tretmajev s Cu po 28-dnevni izpostavitvi so bile malenkost nižje, a se v splošnem niso statistično razlikovale od izmerjenih po 14-dnevni izpostavitvi. Iz tega sklepamo, da je koncentracija Cu v telesu že v prvih dveh tednih dosegla ravnotežje med privzemom in izločanjem Cu. Fiziološki mehanizem, ki deževnikom omogoča preživetje tudi v s kovinami obremenjenem okolju je predvsem izločanje presežkov kovin podobno kakor pri skakačih (Colembola, Hexapoda) (Van Straalen in Donker, 1994). Poleg tega je s časom izpostavitve vpliv monenzina na akumulacijo Cu upadal saj se je, zaradi kratke razpolovne dobe (2-3 tedne), njegova koncentracija po 14. dnevih verjetno že skoraj prepolovila.

Pri enakonožcih nismo opazili vpliva kemikalije na akumulacijo bakra. Podobno sta opazila tudi Zidar in Žižek (2012), saj koncentracija monenzina 18 mg/kg suhe hrane ni imela učinka na akumulacijo neesencialnega elementa Cd. Izmerjene koncentracije Cu v enakonožcih se niso razlikovale med tretmaji. Koncentracije Cu v enakonožcih znotraj posameznega tretmaja so bile zelo raznolike in so bile v splošnem višje od koncentracij, ki so jih izmerili v študiji Zidarja s sod. (2003) (200 mg/kg suhe mase živali v kontrolni populaciji iz narave), kjer so živali Cu izpostavili preko hrane. V 28-dnevni izpostavitvi je bila smrtnost enakonožcev v vseh tretmajih visoka (do 50 %). Za enakonožce je značilen tudi kanibalizem, poginule živali so nemudoma pojedle preostale živali in s tem prejele večje količine Cu. S časom izpostavitve je telesna koncentracija bakra pri enakonožcih v splošnem naraščala. Fiziološki mehanizem enakonožcev, ki omogoča nevtralizacijo vpliva presežkov kovin, je skladiščenje kovin v neaktivnih oblikah (Hopkin, 1989; Van Straalen in Donker, 1994) kar odraža tudi visok BAF (v nadaljevanju).

5.2.1 Bioakumulacijski faktor (BAF) za baker pri deževnikih *E. andrei* in enakonožcih *P. scaber*

Iz telesnih koncentracij bakra poskusnih živalih in koncentracij bakra v prsti (izmerjenih z

AAS/izmerjenih z XRF) smo izračunali bioakumulacijski faktor (pregl. 7 in 8). Zaradi nepopolnega razklopa prsti za meritev z AAS smo pri kontrolni prsti in prsti z monenzinom izračunali visok BAF, ki odstopa od vseh ostalih vrednosti. V postopku priprave vzorcev prsti za AAS je del Cu najverjetneje ostal vezan na sestavine prsti, kar je vplivalo tudi na izračun. Če za BAF upoštevamo koncentracije Cu pridobljene metodo XRF dobimo verjetno realnejše vrednosti BAF. Ne glede na metodo pa lahko rezultate primerjamo po času izpostavitve in ocenimo vpliv monenzina. S časom izpostavitve tako BAF pri deževnikih upade, pri enakonožcih pa naraste. Pri deževnikih in tudi pri enakonožcih, ki so bili izpostavljeni nižji koncentraciji Cu, je izračunani BAF nekoliko višji ob dodatku monenzina.

Povprečna vrednost $BAF_{(XRF)}$ za *Eisenia andrei* v našem poskusu je bila 0,36. Pietz s sod. (1984) je dobil podobne vrednosti za vrsto *Aporrectodea tuberculata*, Beyer s sod. (1987) pa za isto vrsto kar 0,79. Kruse in Barret (1985) sta za vrsto *Lumbricus rubellus* izračunala BAF 0,9, kar je po naših podatkih najvišja zabeležena vrednost BAF za Cu pri deževnikih. V literaturi pa smo našli tudi zelo nizko vrednost BAF za Cu. Kılıç (2011) poroča o zelo nizkih koncentracijah Cu v tkivih *Lumbricus terrestris* glede na koncentracije Cu v prsti iz antropogeno onesnaženega območja reke Pursuk (Turčija). Glede na njihove podatke lahko izračunamo BAF, ki je nižji od 0,1. Iz podatkov, ki so na voljo v literaturi, lahko sklepamo, da so velike razlike v bioakumulacijskih sposobnostih in sposobnostih regulacije esencijskih in neesencijskih kovin med posameznimi vrstami deževnikov. Pomembno vlogo pri tem imajo biotski (makro- mikrofavna, talna mikrobiota) in abiotski dejavniki (pH, vlažnost, kationska izmenjevalna kapaciteta, delež organske snovi, mineralna osnova prsti, klima, relief, itd.), ki določajo biorazpoložljivost kovin v prsti (Beyer s sod., 1987; Criel s sod., 2008; Holmstrup s sod., 2010).

Enakonožci so naravni akumulatorji bakra, zato so bile vrednosti BAF višje od 1. Vrednosti BAF upadajo v smeri kontrola > monenzin > Cu80+M > Cu80 > Cu160 > Cu160+M, kar nakazuje, da koncentracija Cu v prsti ni imela izrazitejšega vpliva na koncentracijo Cu v enakonožcih. BAF se ne ujema s koncentracijo Cu v živalih, saj BAF izrazito upada s tretmajem, medtem ko dejanska koncentracija Cu v živalih ne.

5.3 DRUGI MERJENI PARAMETRI

5.3.1 Vpliv tretmajev na razmerje med svežo in suho telesno maso poskusnih organizmov

Žižek s sod. (2011) poroča o povečanju sveže telesne mase pri deževnikih, ki so bili 28 dni izpostavljeni monenzinu v prsti (3,5, 24,6 in 48,1 mg/kg suhe prsti). Avtorica to pripisuje privzemanju vode zaradi porušenega ionskega ravnovesja, saj je bil tovrsten učinek

monenzina predhodno ugotovljen pri eritrocitih (Clark s sod. 1982). V našem poskusu spremembe mase živali v času poskusa nismo spremljali. Ugotovili pa smo, da se delež suhe telesne mase (hidracija) poskusnih živali, ki so bile 28 dni izpostavljene monenzinu, ni razlikoval od kontrolnih živali. Pri živalih, zlasti enakonožcih, ki so bile 14 dni izpostavljene prsti z monenzinom in bakrom, se je delež suhe mase celo povečal. To lahko pripišemo dehidraciji zaradi pretežnega zadrževanja na površini prsti ali pa rasti zaradi večjega privzema hrane, saj so enakonožci iz 14-dnevnih tretmajev z monenzinom zaužili več hrane kot ostali iz drugih tretmajev. Morebitno povečanje telesne mase na račun privzemanja vode kot posledico izpostavitve monenzinu, tako ne moremo potrditi. Žižek s sod. (2011) so deževnike po končanem poskusu stekali s polnim prebavilom. V našem primeru smo deževnike po končanem poskusu za 24 h prestavili na z destilirano vodo omočen filtrni papir, da so izpraznili prebavilo. Znano je, da do 85 % sveže mase deževnika predstavlja voda v celomski tekočine in krvi. Deževniki v prsti večinoma niso 100 % hidrirani in lahko svojo maso povečajo za 15 %, če jih damo v vodo ali v popolnoma omočen substrat, a enak delež vode zopet izgubijo, če jih prestavimo nazaj v prst (Wolf, 1940). Hidracija deževnika je torej zelo odvisna od vlažnosti okolice (Edwards in Bohlen, 1996). Če so bile tudi v našem primeru razlike v masi deževnikov med tretmaji z/brez monenzina, so se morda zmanjšale zaradi predhodne inkubacije na omočenem filtrirnem papirju.

5.3.2 Vpliv tretmajev na smrtnost poskusnih organizmov

Pri enakonožcih je bila smrtnost v splošnem visoka (do 52,4 %). V kontrolni skupini je preživela le polovica živali kar postavlja pod vprašaj verodostojnost rezultatov pridobljenih na enakonožcih. Smrtnost ni bila v sorazmerju s tretmajem, to je s koncentracijo bakra v prsti ali s prisotnostjo monenzina. Smrtnost je bila višja pri daljši izpostavljenosti. Baker je esencialen in nujno potreben element za enakonožce, saj je del hemocianina, proteinskega kompleksa za prenos kisika. Enakonožci tolerirajo zelo visoke koncentracije bakra v prsti (>1200 mg/kg suhe mase prsti, Hopkin s sod., 1986) ali hrani (LC₅₀=1117 mg/kg suhe mase javorjevih listov, Farkas s sod, 1996). Pri uporabljeni koncentraciji monenzina povišana smrtnost enakonožcev v predhodnih poskusih ni bila ugotovljena (Žižek s sod. 2011; Zidar in Žižek 2012). Zidar in Žižek (2012) sta pogin živali pripisali predvsem levitvi. Med levitvijo so enakonožci namreč zelo občutljivi na okoljske pogoje in ranljivi. Kot take pa jih radi napadejo in pojejo sovratniki. Po pregledu naših poskusnih posod po koncu poskusa smo našli le nekaj eksosekletonov, precej več je bilo kadavrov in še nepojedenih ostankov enakonožcev. V našem poskusu zato visoke stopnje smrtnosti nismo pripisali ranljivosti zaradi levitve. Enakonožci iz laboratorijske kulture so bili lahko v slabi kondiciji, morda celo okuženi (Drobne s sod., 1999; Kostanjšek s sod., 2004) in izpostavitve stresnim pogojem v poskusu je le še zmanjšala sposobnost preživetja.

Smrtnost deževnikov je bila zanemarljivo majhna, le v tretmaju z višjo koncentracijo bakra

z monenzinom sta poginila 2 deževnika. Deževnika sta bila verjetno v slabši kondiciji, saj uporabljene koncentracije Cu po podatkih iz literature na preživetje ne vplivajo ($LC_{50} = 643$ mg/kg suhe prsti, Neuhauser s sod., 1985). Prav tako uporabljena koncentracija monenzina za odrasle deževnike ni strupena ($LC_{50} = 49,3$ mg/kg suhe mase prsti, Žižek s sod., 2011).

5.3.3 Vpliv tretmajev na razmnoževanje deževnikov *Eisenia andrei*

Criel s sod. (2008) je ugotovil, da 87,5 mg Cu/kg suhe mase prsti ne vpliva na razmnoževanje deževnikov (28 dni, Lufa 2.2), medtem, ko 159 mg Cu/kg suhe mase prsti že vpliva. Tudi v našem poskusu smo tako po 14. kakor tudi po 28. dneh opazili značilen upad števila kokonov pri 160 mg Cu/kg suhe mase prsti, medtem ko je bil upad kokonov pri nižji koncentraciji neznačilen. Podobno kot pri Žižek s sod. (2011) je tudi v našem poskusu monenzin značilno vplival na stopnjo razmnoževanja pri deževnikih. Po 14-dnevni izpostavljenosti prsti z monenzinom (z in brez bakra) kokonov nismo našli. Po 28. dneh, ko se je koncentracija monenzina v prsti že skoraj prepolovila pa smo nekaj kokonov zasledili tudi v prsti z monenzinom in tudi prsti z monenzinom ter nižjo vsebnostjo bakra. Pri višji koncentraciji bakra v kombinaciji z monenzinom kokonov nismo našli. To jasno nakazuje na seštevanje toksičnih učinkov bakra in monenzina na razmnoževanje deževnikov. Stopnja razmnoževanja v kontrolni prsti Lufa 2.2 je bila primerljiva s stopnjo razmnoževanja, ki jo je opazila Žižek s sod. (2011). Kokoni iz vseh tretmajev so bili viabilni.

5.4 PORAZDELITEV BAKRA V TKIVIH POSKUSNIH ORGANIZMOV

Za histokemijsko lokalizacijo bakra v tkivih so na razpolago različni reagenti, ki pa se med seboj razlikujejo po specifičnosti, občutljivosti, obstojnosti produktov in zahtevnosti postopka priprave reagentov in barvanja (Kiernan, 1990). V poskusu smo za histokemijsko lokalizacijo bakra uporabili: rubeansko kislino, rodanin in hematoksilin. Rubeanska kislina in rodanin sta dva izmed najpogostejše uporabljenih reagentov za lokalizacijo bakra, ki sta tudi v našem poskusu zadovoljivo izpolnila prej omenjene kriterije (Lindquist, 1969; Kiernan, 1990). V histokemijskih krogih (Irons s sod., 1977; Kiernan, 1990) prevladuje mnenje, da naj bi le z rodaninom dosegli intenziteto obarvanja, ki je proporcionalna koncentraciji bakra v tkivu. Rubeanska kislina naj bi bila namreč bolj občutljiva za bakrove $2+$ ione (Cu^{2+}), s katerimi v bazični raztopini tvori netopen temno zelen do črn kelat. Kovine, kot so kobalt, nikelj in srebro, v splošnem prav tako tvorijo obarvane komplekse z rubeansko kislino, a v takih pogojih ne reagirajo ali pa so njihovi kompleksi topni. Rodanin pa naj bi reagiral tako z bakrovimi $1+$ kot tudi z bakrovimi $2+$ ioni in tudi z bakrom vezanim na proteine (Lindquist, 1969). V našem poskusu sta se rubeanska kislina in rodanin izkazala popolnoma enakovredno: tako pri deževnikih, kot tudi enakonožcih smo z obema reagentoma pri zaporednih sklopih rezin dosegli enako intenziteto obarvanja.

5.4.1 Porazdelitev bakra v tkivih deževnikov *Eisenia andrei*

Pri deževnikih iz kontrole in tretmaja z monenzinom s histokemijsko metodo nismo zasledili pozitivnega obarvanja. Baker je esencialni element, ki je prisoten tudi v deževnikih (AAS: 12 mg/kg suhe teže deževnika). Metoda laserske ablacijske ICP-MS pa je bila dovolj občutljiva, da smo pri deževniku iz kontrole potrdili prisotnost Cu v območju prebavila, verjetno v gastrodermisu in kloragognem tkivu, ki velja za mesto skladiščenja kovin pri deževnikih (Hopkin, 1989). Za pozitivno histokemijsko reakcijo pa namreč potrebujemo zadostno koncentracijo Cu v tkivu (vsaj 15 $\mu\text{g/g}$ v 1 cm^3 tkiva; Irons s sod., 1977).

Osredji del absorpcije pri deževnikih iz rodu *Eisenia* naj bi bilo v področju srednjega črevesa od 44. telesnega člena naprej (van Gansen, 1963; Edwards in Bohlen, 1996). Prav v tem področju smo opazili večjo intenziteto in konsistenco obarvanja, v primerjavi z bolj anteriornim področjem takoj za sedlom, kjer je bilo obarvanje bolj raznoliko.

Z rubeansko kislino se je obarvalo območje gastrodermisa (odtenki zelene barve), granule v kloragognem tkivu, granule v področju žil, metanefridiji (odtenki sive barve) in granule v metanefridijih. Z rodanimom se je obarvalo območje gastrodermisa (odtenki oranžne in rdeče barve), granule v kloragognem tkivu in metanefridijih (rjave barve). V telesni steni pa z nobenim od barvil nismo dobili pozitivnega obarvanja. Intenziteta obarvanja je bila proporcionalna koncentraciji bakra v prsti in večja pri daljši izpostavitvi v vseh tretmajih.

Baker se pojavlja v t.i. granulah tipa B, ki vedno vsebujejo žveplo, od kovin pa poleg Cu tudi Cd, Hg, Zn, Pb in Fe (Hopkin, 1989). Granule, ki vsebujejo kovine so v literaturi opisane pri različnih organizmih (pregled v Brown 1982; Hopkin, 1989). Pri deževnikih se sicer omenja možnost pojavljanja Cu v granulah (Hopkin, 1989), vendar pa po našem vedenju dejanskega obstoja bakrovih granul pri deževnikih do sedaj niso dokazali. V našem poskusu smo uspeli lokalizirati granule, za katere glede na specifičnost barvil predvidevamo, da bi lahko bile bakrove granule. Granule so bile v tkivih deževnikov *E. andrei* prisotne le na posameznih območjih (v območju žil ali v metanefridijih ali v kloragognem tkivu) in ne konstantno vzdolž celega analiziranega dela deževnika.

Baker je v celicah deževnikov verjetno prisoten v obeh ionskih oblikah (Cu^{1+} in Cu^{2+}), vezan na proteine ali v granulah (Hopkin, 1989). Različna občutljivost uporabljenih barvil na različno speciacijo Cu v celicah različnih organov deževnika bi lahko pojasnila razlike v histokemijski reakciji na področju metanefridijev in žil na zaporednih rezinah iste živali.

Pri živalih izpostavljenih Cu (z ali brez monenzina) smo z metodo LA ICP-MS lokalizirali Cu tudi v področju telesne stene. Cu v telesni steni, ki ga pri kontrolnih živalih nismo zaznali, je bil lahko posledica dermalne absorpcije ali pa transporta Cu iz stene prebavila (gastrodermisa in kloragognega tkiva) v telesno steno (t.j. peritonej, mišice in epidermis)

skozi celomsko tekočino. Nekateri podatki iz literature pa kažejo, da deževniki lahko večino Cu privzamejo skozi telesno površino (Saxe, 2001; Vijver s sod. 2003). Hopkin (1989) pa nasprotno izpostavlja predvsem pot privzema skozi prebavilo. Ker smo v našem primeru s histokemijsko metodo in metodo laserske ablacije ICP-MS najvišje deleže Cu lokalizirali predvsem v področju prebavila (gastrodermisa) in z metodo LA ICP-MS le manjši delež v področju telesne stene (epidermisa) menimo, da je privzem Cu pri deževnikih vezan predvsem na prebavilo. Prebavilo je verjetno tudi mesto izločanja Cu, ki se v lumen prebavne cevi sprošča verjetno s propadanjem celic (Hopkin, 1989). Lokalizacija Cu v področju metanefridijev je verjetno prav tako povezana z izločanjem Cu, kakor opisuje tudi Hopkin (1989). Med vsemi rezinami izstopa rezina deževnika iz tretmaja Cu160 z monenzinom iz krajše izpostavitve, pri katerem bi lahko rekli, da je več Cu v celomu in posledično v telesni steni, v primerjavi z ostalimi. Asimilacija Cu je bila verjetno pospešena in izločanje Cu ni sledilo več asimilaciji Cu. Obarvanje metanefridijev s histokemijsko metodo in na mapah porazdelitve Cu je bilo izrazitejše ob daljši izpostavitvi, kar nakazuje na intenzivnejše izločanje. Po 28. dneh se verjetno vzpostavi ravnovesje med privzemanjem in izločanjem Cu, zato telesna vsebnost Cu izmerjena z AAS po 28. dneh v povprečju ni presegala koncentracij po 14. dneh. Smo pa z metodo LA ICP-MS v deževniku, ki je bil 28 dni izpostavljen višji koncentraciji Cu z monenzinom, zaznali več Cu v telesni steni, kot pri deževniku, izpostavljenemu le višji koncentraciji Cu. Monenzin je verjetno povečal privzem Cu skozi steno prebavila v smeri proti telesni steni. Na privzem skozi telesno površino monenzin verjetno ni imel vpliva, saj so pore v kolagenski kutikuli verjetno premajhne, poleg tega pa je monenzin hidrofoben, zato do celic epidermis verjetno sploh ne pride.

5.4.2 Porazdelitev bakra v tkivih enakonožcev *Porcellio scaber*

Pri enakonožcih je bila intenziteta obarvanja zelo raznolika in ni bila proporcionalna koncentraciji bakra v prsti, kakor tudi ne izmerjenim telesnim koncentracijam bakra živali iz enakega tretmaja. Z rubeansko kislino, rodaninom in hematoksilinom se je obarvalo tkivo hepatopankreasa in v nekaterih primerih tudi stena črevesa, kjer se je stikala s hepatopankreasom. Kategorije s katerimi smo opredelili količine reakcijskega produkta histokemijske reakcije v tkivih enakonožcev smo povzeli po Zdešar (2006). Podobno kot Zdešar (2006) smo opazili okrogle polne in votle granule. Poleg granul pa smo v hepatopankreasu opazili tudi različne odtenke sivine pri barvanju z rubeansko kislino ali odtenke oranžne-rjave barve pri barvanju z rodaninom. Omenjena razlika je lahko posledica različne priprave rezin. Zdešar (2006) je namreč uporabila metodo, ki sta jo razvili Žnidaršič in Štrus (2004). Žleze je izolirala, barvala in nato pripravila po postopku za parafinske rezine. Kar polovico vseh pregledanih živali smo po količini reakcijskega produkta uvrstili v kategorijo "srednje". Pri enakonožcih smo večjo intenziteto reakcijskega produkta opazili v anteriorni polovici hepatopankreasa. Koncentracija bakra je padala vzdolž hepatopankreasa v posteriorni smeri, zato priporočamo, da se za

semikvantitativne analize na prečnih rezinah celih enakonožcev, kakršna je bila tudi naša, uporabi prva polovica hepatopankreasa. Podobno sta opazila tudi Žnidaršič (2003) in Zdešar (2006) pri semikvantitativni analizi celih hepatopankreasov.

5.4.3 Porazdelitev bakra v tkivih enakonožcev *Porcellio scaber* in deževnikov *Eisenia andrei* po histolokalizaciji s hematoksilinom

Barvanje s hematoksilinom se je izkazalo za občutljivo, a nizko specifično, saj poleg bakra obarva tudi nekatere druge elemente (Lillie in Fullmer, 1976 v Kiernan, 1990). Metoda je primerna le za vzorce, v katerih pričakujemo, da bo element, ki nas zanima, prevladoval in bo zasenčil vse ostale elemente. Pri pregledu obarvanih deževnikov smo na primer zasledili več barvnih odtenkov. Pri deževnikih smo v vseh tretmajih opazili temno obarvanje okrog prebavila (kloragogno tkivo, žile, ki obdajajo prebavilo): med drugimi sta se lahko obarvala Zn in Fe, ki sta esencialna elementa. Dihalni pigment deževnikov je hemoglobin in njegovo osrednje sintezno in založno mesto je kloragogno tkivo (Edwards in Bohlen, 1996). V tretmajih z bakrom (z ali brez monenzina) smo opazili temno modro obarvanje gastrodermisa, ki bi ga lahko glede na komplementarni specifični barvanji pripisali Cu, brez komplementarnih barvanj z rubeansko kislino in rodaninom pa z gotovostjo tega ne bi mogli trditi. Glede na obarvanje hepatopankreasa bi obarvanje Cu označili bolj kot (temno) modro ali modro-črno in ne zeleno-modro. Barvni odtenek je od Lillie in Fulmer (1976, v Kiernan, 1990) odstopal najverjetneje zaradi prisotnosti Zn, ki se poleg Cu prav tako akumulira v hepatopankreasu. Hopkin s sod. (1985) je namreč v *P. scaber* iz neonesnaženega področja izmeril 367 mg/kg Zn in 243 mg/kg Cu.

5.4.4 Opažanja pri histokemijskem delu

Pri histokemijskem delu smo opazili nekatere stvari, na katere bi želeli opozoriti:

- Objektna stekelca smo označevali z grafitnim svinčnikom. Opazili smo, da se odvečni delci grafitu sperejo in lahko kontaminirajo rezine. Pod povečavo so delci grafitu videti črni, lahko celo okrogle oblike in šele ob premikanju mikrometerskega vijaka opazimo, da delci niso v isti optični ravnini kot tkivo. To predstavlja težavo v primeru, da je produkt histokemijske reakcije črn (kot npr. kompleks rubeanske kisline in Cu v obliki granul), kar neizkušenega opazovalca hitro zavede.
- Svetujemo uporabo svežih barvil, saj vplivajo na kvaliteto obarvanja, še posebej pri tehniki z rodaninom. Zamrzovalni medij in tkivo deževnikov vsebujejo določen delež vode, ki ob večkratni uporabi barvilo dodatno razredči in zmanjša njegovo kvaliteto.
- Svetujemo optimizacijo postopka barvanja za vsako vrsto tkiva/organizma posebej. Opazili smo, da je čas barvanja z rubeansko kislino po Kiernanu (1990) 0,5 ure prekratek celo za hepatopankreas enakonožcev, za katerega vemo, da ima v celicah S visoke koncentracije bakra. Bolj intenzivno obarvanje hepatopankreasa dobimo, če pustimo barvati preko noči na topli vodni kopeli (37 °C).

6 SKLEPI

- V naših poskusnih pogojih je telesna vsebnost bakra pri deževnikih naraščala s koncentracijo bakra v prsti, ne pa tudi pri enakonožcih, kar kaže na različne mehanizme privzema in izločanja bakra pri obeh organizmih.
- V naših poskusnih pogojih je telesna vsebnost bakra pri enakonožcih naraščala s časom izpostavitve, ne pa tudi pri deževnikih.
- V naših poskusnih pogojih je sočasna kontaminacija prsti z monenzinom in bakrom povišala privzem bakra pri deževnikih ne pa tudi pri enakonožcih, kar kaže na različno učinkovanje monenzina na testna organizma.
- S histokemijsko lokalizacijo smo kot glavno mesto akumulacije bakra pri deževnikih prepoznali gastrodermis prebavila in ne kloragogeno tkivo. Po intenziteti obarvanja v gastrodermisu si tretmaji sledijo v naslednjem padajočem redu: Cu160+monenzin > Cu160 > Cu80+monenzin > Cu80. Barvno reakcijo na baker smo zaznali tudi v področju kloragogenega tkiva, metanefridijev in žil.
- Pri deževnikih smo z rubeansko kislino in rodaninom obarvali granule v kloragogenem tkivu in metanefridijev, le z rubeansko kislino pa tudi v področju žil.
- Z metodo LA ICP-MS smo potrdili, da je Cu pri deževnikih prisoten predvsem v območju prebavila. V tretmajih s Cu pa je bil Cu prisoten tudi v območju metanefridijev in telesne stene: epidermisa, krožnih in vzdolžnih mišic ter peritoneja.
- V naših poskusnih pogojih je monenzin povečal privzem Cu v deževnikih pri okoljsko realnih koncentracijah Cu in monenzina. Iz rezultatov tudi lahko sklepamo, da se škodljiv vpliv monenzina in bakra na razmnoževanje deževnikov *Eisenia andrei* sešteva. Redna uporaba gnoj iz perutninskih farm brez predhodnega odležanja v agrarnem okolju, kot so vinogradi in sadovnjaki, bi lahko zelo zmanjšala številčnost populacije deževnikov v prsti.
- Redna uporaba gnoj iz perutninskih farm brez predhodnega odležanja bi lahko povečala privzem kovin, katerih koncentracija bi lahko hitreje dosegla prag strupenosti pri talnih organizmih.

7 POVZETEK

Karboksilni ionoforni antibiotiki se uporabljajo v veterinarski medicini za preprečevanje in zdravljenje kokcidioze pri domačih živalih, še posebej pri perutnini, kuncih in prašičih. Pogosto uporabljen ionoforni kokcidiostaik je monenzin. Zdravljene živali monenzin le delno presnavljajo, zato se ga velik del (okoli 50 %) izloči v aktivni obliki. Perutninski gnoj se uporablja kot gnojilo, zato lahko del kokcidiostatikov konča v okolju. Baker vstopa na kmetijske površine z uporabo bakrovih herbicidov in hlevskega gnoja iz perutninskih in prašičjih farm, kjer se uporablja kot pospeševalec rasti. Ionoforji delujejo kot transporterji kationov skozi celične membrane, tako da lahko potencialno vplivajo tudi na transport kovin, še posebno v okoljih, ki so obremenjena s težkimi kovinami. V nalogi smo raziskovali učinek ionofora monenzina na privzem, kopičenje in izločanje Cu pri deževnikih *Eisenia andrei*, ki smo jih izpostavili bakru in/ali monenzinu v prsti. Rezultate, pridobljene na deževnikih, smo primerjali z enakonožci *Porcellio scaber*, ki smo jih izpostavili na enak način kakor deževnike.

V ekotoksikoloških poskusih organizme navadno izpostavimo optimalnim pogojem in tudi v našem poskusu smo zagotovili konstatntne pogoje (temperature 20 ± 1 °C, dnevno-nočni ritem 12/12 h, pH 6,5-7, vlažnost prsti 60 %), ki so bili optimalni za deževnika *E. andrei* in enakonožca *P. scaber*. V poskusu smo uporabili dve koncentraciji bakra (80 in 160 mg/kg suhe prsti), ki so jih izmerili tudi v vinogradih na Primorskem. Za meritev koncentracije Cu v prsti smo uporabili metodo AAS in XRF. V primerjavi z nominalno koncentracijo Cu smo z AAS izmerili nižjo (20 %), z XRF pa višjo (20 %) koncentracijo Cu v prsti, kar kaže na to, da že v osnovi uporabljena prst vsebuje nekaj Cu. Z AAS verjetno nismo pomerili vsega Cu, saj razklop silikatnega substrata ni bil popoln in bi morali poleg aqua regie uporabiti še kislino HF, da bi raztopili mineralni ostanek. V poskusu smo uporabili koncentracijo monenzina (25 mg/kg suhe prsti), ki jo pričakujemo v svežem, neodležanem perutninskem gnoju. Izmerjene začetne koncentracije monenzina z metodo HPLC se od nominalne koncentracije niso razlikovale za več kot 20%. V literaturi pa poročajo o večjem odstopanju. Razpolovno dobo monenzina smo ocenili na 2,7 tedna v tretmajih z enakonožci in 4,4 tedna v tretmajih z deževniki.

Za analizo privzema in lokalizacijo bakra v živalih smo uporabili naslednje metode: AAS, histokemijo (rubeanska kislina, rodanin, hematoksilin) in LA ICP-MS. Z metodo AAS smo pomerili koncentracijo bakra v celih živalih. V telesu deževnikov ki so bili izpostavljeni netretirani zemlji smo izmerili 14 mg Cu/kg suhe telesne mase. Izmerjene koncentracije Cu v deževnikih, ki so bili izpostavljeni le monenzinu so bile nekoliko nižje vendar razlike niso bile statistično značilne od kontrolnih. Telesna koncentracija bakra je pri deževnikih naraščala s koncentracijo Cu v njihovi prsti, a značilnih razlik med 14- in 28-dnevno izpostavitvijo nismo zasledili. Deževniki, ki so bili hkrati izpostavljeni bakru in monenzinu, so akumulirali več bakra (Mann-Whitney test). Povprečna koncentracija Cu v telesu enakonožcev kontrolne skupine je bila 390 mg/kg suhe telesne mase (14 dni) in 530 mg/kg suhe telesne mase (28 dni), kar je višje od koncentracij, ki so bile izmerjene v kontrolni populaciji iz narave (200 mg/kg suhe telesne mase). Pri enakonožcih, izpostavljenih Cu v prsti, se telesna koncentracija Cu statistično ni razlikovala od kontrolnih živali. Prav tako v telesu enakonožcev, ki so bili izpostavljeni Cu in monenzinu hkrati, nismo izmerili koncentracij Cu, ki bi značilno odstopale od živali izpostavljenih le

Cu. Telesna vsebnost Cu je pri enakonožcih naraščala s časom izpostavitve, ne pa tudi pri deževnikih. Iz telesnih koncentracij Cu poskusnih živalih in koncentracij Cu v prsti smo izračunali tudi bioakumulacijski faktor. Povprečna vrednost $BAF_{(XRF)}$ za *Eisenia andrei* v našem poskusu je bila 0,36. Enakonožci so naravni akumulatorji Cu, zato so bile vrednosti BAF višje od 1.

V poskusu smo spremljali tudi nekatere druge parametre: spreminjanje suhe teže in smrtnost obeh organizmov ter razmnoževanje deževnikov. Spreminjanje suhe teže pri deževnikih in enakonožcih nismo mogli povezati s tretmajem. Smrtnost deževnikov je bila zanemarljivo majhna, le v tretmaju z višjo koncentracijo Cu z monenzinom sta poginila dva deževnika. Deževnika sta bila verjetno v slabši kondiciji, saj uporabljene koncentracije Cu in monenzina po podatkih iz literature na preživetje ne vplivajo. Pri enakonožcih je bila smrtnost v splošnem visoka (do 52,4 %). V kontrolni skupini je preživela le polovica živali, kar postavlja pod vprašaj verodostojnost rezultatov pridobljenih na enakonožcih. Smrtnost ni bila v sorazmerju s tretmajem, to je s koncentracijo bakra v prsti ali s prisotnostjo monenzina. Smrtnost je bila višja pri daljši izpostavljenosti. Enakonožci iz laboratorijske kulture so bili najverjetneje v slabi kondiciji, morda celo okuženi in izpostavitve stresnim pogojem v poskusu je le še zmanjšala sposobnost preživetja. Stopnja razmnoževanja pri deževnikih je bila pogojena s tretmajem. Po 14-dnevni izpostavljenosti smo kokone našli v kontrolnem tretmaju in v obeh tretmajih z bakrom, v prsti z monenzinom (z in brez bakra) pa kokonov nismo našli. Po 28. dneh, ko se je koncentracija monenzina v prsti že skoraj prepolovila pa smo nekaj kokonov zasledili tudi v prsti z monenzinom in tudi prsti z monenzinom ter nižjo vsebnostjo Cu. Pri višji koncentraciji bakra v kombinaciji z monenzinom kokonov nismo našli. To jasno nakazuje na seštevaje toksičnih učinkov Cu in monenzina na razmnoževanje deževnikov. Kokoni iz vseh tretmajev so bili viabilni.

V poskusu smo za histokemijsko lokalizacijo Cu uporabili: rubeansko kislino, rodanin in hematoksilin. V našem poskusu sta se rubeanska kislina in rodanin izkazala popolnoma enakovredno: tako pri deževnikih, kot tudi enakonožcih smo z obema reagentoma pri zaporednih sklopih rezin dosegli enako intenziteto obarvanja. S histokemijsko lokalizacijo smo kot glavno mesto akumulacije bakra pri deževnikih prepoznali gastrodermis prebavila. Po intenziteti obarvanja v gastrodermisu si tretmaji sledijo v naslednjem padajočem redu; Cu160+monenzin > Cu160 > Cu80+monenzin > Cu80. Barvno reakcijo na baker smo zaznali tudi v področju kloragognega tkiva, metanefridijev in žil. Pri deževnikih smo z rubeansko kislino in rodaninom obarvali granule v kloragognem tkivu, v področju žil in metanefridijev. Z metodo LA ICP-MS smo potrdili, da je Cu pri deževnikih prisoten predvsem v področju prebavila (gastrodermis in kloragogno tkivo). V tretmajih s Cu pa je bil Cu prisoten tudi v področju metanefridijev in telesne stene (epidermisa, krožnih in vzdolžnih mišic ter peritoneja). S histokemijsko lokalizacijo smo kot glavno mesto akumulacije Cu pri enakonožcih prepoznali hepatopankreas. Barvanje s hematoksilinom se je izkazalo za občutljivo, a nizko specifično, saj poleg Cu obarva tudi nekatere druge elemente. Metoda je primerna le za vzorce, v katerih pričakujemo, da bo element, ki nas zanima, prevladoval in bo zasenčil vse ostale elemente.

8 VIRI

- Adriano, D.C. 2001. Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability and risk of metals, 2nd ed. Springer, New York: 833 str. <http://books.google.si/books?id=H17Tw8NujfYC&printsec=frontcover&hl=sl#v=onepage&q&f=false> (29. jul. 2013)
- Agri-fax. 1998. Minerals for Plants, Animals and Man. Alberta Agriculture, Food and Rural Development, 1-4
[http://www1.agric.gov.ab.ca/\\$department/deptdocs.nsf/all/agdex789/\\$file/531-3.pdf?OpenElement](http://www1.agric.gov.ab.ca/$department/deptdocs.nsf/all/agdex789/$file/531-3.pdf?OpenElement) (2. sep. 2013)
- Arredondo, M., Núñez, M.T. 2005. Iron and copper metabolism. Molecular Aspects of Medicine, 26, 4–5: 313–327
- Arnold, R.E., Hodson, M.E. 2007. Effect of time and mode of depuration on tissue copper concentrations of the earthworms *E. andrei*, *L. rubellus* and *L. terrestris*. Environmental Pollution, 148: 21-30
- Bak, S.A., Hansen, M., Munk Pedersen, K., Halling-Sørensen, B., Björklund, E. 2013. Quantification of four ionophores in soil, sediment and manure using pressurised liquid extraction. Journal of Chromatography A, 1307: 27–33
- Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Kozyreva, T., Zovo, K., Palumaa, P. 2010. Affinity gradients drive copper to cellular destinations. Nature, 465: 645–648
- Basta, N.T., Ryan, J.A., Chaney, R.L. 2005. Trace element chemistry in residual treated soil: key concepts and metal bioavailability. Journal of Environmental Quality, 34, 1: 49-63
- Bertini, I., Cavallaro, G., McGreevy, K. 2010. Cellular copper management – a user's guide. Coordination Chemistry Reviews, 254: 506–524
- Beyer, W.N., Hensler, G., Moore, J. 1987. Relation of pH and other soil variables to concentration of Pb, Cu, Zn, Cd and Se in earthworms. Pedobiologia, 30: 167-172
- Bindesbøl, A.M., Holmstrup, M., Damgaard, C., Bayley, M. 2005. Stress synergy between environmentally realistic levels of copper and frost in the earthworm *Dendrobaena octaedra*. Environmental Toxicology and Chemistry, 24: 1462-1467
- Bindesbøl, A.M., Bayley, M., Damgaard, C., Hedlund, K., Holmstrup, M. 2009. Changes in membrane phospholipids as a mechanistic explanation for decreased freeze tolerance in earthworm exposed to sublethal copper concentrations. Environmental Science and Technology, 43: 5495-5500
- Bohn, P., Bak, S.A., Björklund, E., Krogh, K.A., Hansen, M. 2013. Abiotic degradation of antibiotic ionophores. Environmental Pollution, 182: 177–183

- Cestone, B., Vogel Mikuš, K., Quartacci, M.F., Rascio, N., Pongrac, P., Pelicon, P. 2012. Use of micro-PIXE to determine spatial distributions of copper in *Brassica carinata* plants exposed to CuSO₄ or CuEDDS. *Science of Total Environment*, 427-428: 339-346
- Clark, M.R., Mohandas, N., Shohet, S.B., Hoesch, R.M. 1982. Hydration of sickle cells using sodium ionophore monenzin. A model for therapy. *Journal of Clinical Investigation*, 70: 1074-1080
- Chapman, H.D., Jeffers, T.K., Williams, R.B. 2010. Forty years of monenzin for the control of coccidiosis in poultry (invited review). *Poultry Science*, 80: 1788-1801
- Contreras-Ramos, S.M., Alvarez-Bernal, D., Dendooven, L. 2006. *Eisenia fetida* increased removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil. *Environmental Pollution*, 141, 3: 396-401
- Criel, P., Lock, K., van Eeckhout, H., Oorts, K., Smolders, E., Janssen, C.R. 2008. Influence of soil properties on copper toxicity for two soil invertebrates. *Environmental Toxicology And Chemistry*, 27, 8: 1748-1755
- Dabke, S.V. 2013. Vermi-remediation of heavy metal-contaminated soil. Blacksmith Institute, *Journal of Health and Pollution*, 3, 4: 4-10
- Davison, K.L. 1984. Monenzin absorption and metabolism in calves and chickens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32: 1273-1277
- Dittbrenner, N., Schmitt, H., Capowiez, Y., Triebkorn, R. 2011. Sensitivity of *Eisenia fetida* in comparison to *Aporrecta caliginosa* and *Lumbricus terrestris* after imidacloprid exposure. Body mass change and histopathology. *Journal of Soils and Sediments*, 11: 1000-1010
- Donoho, A.L. 1984. Biochemical studies on the fate of monenzin in animals and in the environment. *Journal of Animal Science*, 58: 1528-1539
- Dowling, L. 1992. Ionophore toxicity in chickens – a review of pathology and diagnosis. *Avian Pathology*, 21: 355-368
- Drobne, D., 1997. Terrestrial Isopods—a good choice for toxicity testing of Pollutants in the terrestrial environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16, 6: 1159–1164
- Drobne, D., Štrus, J., Žnidaršič, N., Zidar, P. 1999. Morphological Description of Bacterial Infection of Digestive Glands in the Terrestrial Isopod *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea). *Journal of Invertebrate Pathology*, 73, 1: 113–119
- Drobne, D. 2007. Nanotoxicology for safe and sustainable nanotechnology. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 58: 471–478

- Edwards, C.A., Bohlen, P.J. 1996. Biology and Ecology of earthworms, 3rd edition, London, Chapman and Hall: 425 str.
- European Union. 2003. Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22. September 2003 on additives for use in animal nutrition. Official Journal of the European Union: 15 str.
<http://irmm.jrc.ec.europa.eu/SiteCollectionDocuments/EC-1831-2003.pdf> (30. avg. 2013)
- European Union. 2005. Commission regulation (EC) No 378/2005 of 4. March 2005 on detailed rules for the implementation of Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council as regards the duties and tasks of the Community Reference Laboratory concerning applications for authorisations of feed additives. Official Journal of the European Union: 4 str.
<http://irmm.jrc.ec.europa.eu/sitecollectiondocuments/ec-378-2005.pdf> (2. avg. 2013)
- van Espen, P., Janssens, K. 1993. Spectrum Evaluation. V: Van Grieken, R., Markowicz, A. (ur.) Handbook of X-ray Spectrometry, Methods and techniques. Marcel Dekker, New York: 181–293 str.
- FDA. 2005. Animal Veterinary: Development approval process-environmental assessments
<http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/DevelopmentApprovalProcess/EnvironmentalAssessments/UCM324418.pdf> (2. avg. 2013)
- Fraga, C. G. 2005. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. Molecular Aspects of Medicine, 26, 4–5: 235–244
- Van Gansen, P.S. 1963. Structure and functions of the digestive canal of the earthworm *Eisenia fetida* Savigny. Annales de la Societe Royal Zoologique de Belgique, 93: 1-120
- Garg V.K., Chand S., Chillar A., Yadav A. 2005. Growth and reproduction of *Eisenia fetida* in various animal wastes during vermicomposting, Applied ecology and environmental research, 3, 2: 51-59
- Gerber, F., Krummen, M., Potgeter, H., Roth, A., Siffrin, C., Spoendlin, C. 2004. Practical aspects of fast reversed-phase high-performance liquid chromatography using 3 µm particle packed columns and monolithic columns in pharmaceutical development and production working under current good manufacturing practice. Journal of Chromatography A, 1036, 2: 127–133
- Gilbert, F.A. 1952. Copper in nutrition. Advances in Agronomy, 4: 47-177
- Gilmour, C., Riedel, G. 2009. Biogeochemistry of Trace Metals and Mettalooids. Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences. Encyclopedia of Inland Waters, 7 – 15 str.

- Goras, J.T., Lacourse, W.R. 1984. Liquid chromatographic determination of sodium salinomycin in feeds, with post-column reaction. *Journal of AOAC International*, 67: 701-706
- Gupta, S.K., Aten, C. 1993. Comparison and evaluation of extraction media and their solubility in a simple model to predict the biological relevance of heavy metal concentrations in contaminated soils. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 51: 25-46
- Hames, C.A.C., Hopkin, S.P. 1989. The structure and function of the digestive system of terrestrial isopods. *Journal of Zoology*, 217: 599-627
- Haimi, J. 1990. Growth and reproduction of the compost-living earthworms *Eisenia andrei* and *E. fetida*. *Revue d'Écologie et de Biologie du Sol*, 27, 4: 415-421
- Hamidinia, S.A., Shimelis, O.I., Tan, B., Erdahl, W.L., Chapman, C.J., Renkes, G.D. 2002. Monenzin mediates a rapid and highly selective transport of Pb²⁺: possible application of monenzin for the treatment of Pb²⁺ intoxication. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 38111–38120
- Hamidinia, S.A., Tan, B., Erdahl, W.L., Chapman, C.J., Taylor, R.W., Pfeiffer, D.R. 2004. The ionophore nigericin transports Pb²⁺ with high activity and selectivity: a comparison to monenzin and ionomycin. *Biochemistry*, 43: 15956–15965
- Hamidinia, S.A., Tan, B., Erdahl, W.L., Chapman, C.J., Taylor, R.W., Steinbaugh, G.E., Pfeiffer, D.R. 2006. Monenzin Improves the Effectiveness of meso-Dimercaptosuccinate when Used to Treat Lead Intoxication in Rats. *Environmental Health Perspectives*, 114, 4: 484–493
- Han, R., Quinet, M., Andre', E., van Elteren, J.T., Destrebecq, F., Vogel-Mikus, K., Cui, G., Debeljak, M., Lefe`vre, I., Lutts, S. 2013. Accumulation and distribution of Zn in the shoots and reproductive structures of the halophyte plant species *Kosteletzkya virginica* as a function of salinity. *Planta*, 238, 3: 441-457
- Hartenstein, R., Neuhauser, E. F., Kaplan, D. L. 1979. Reproductive potential of the earthworm *Eisenia fetida*, *Oecologia*, 43, 3: 329-340
- Hingston, J.A., Murphy, R.J., Lester, J.N. 2006. Monitoring losses of copper based wood preservatives in the Thames estuary. *Environmental Pollution*, 143, 2: 367–375
- Holmstrup, M., Petersen, B.F., Larsen, M.M. 1998. Combined effects of copper, desiccation and frost on the viability of earthworm cocoons. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17: 897-901
- Holmstrup, M., Bindesbol, A.M., Oostingh, G.J., Duschl, A., Scheil, V., Kohler, H.R. s sod. 2010. Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: A review. *Science of Total Environment*, 408: 3746-3762

- Hopkin, S.P. 1989. Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates. Elsevier Applied Science, London: 366 str.
- Hopkin, S.P., Martin, M.H., Moss, S.M. 1985. Heavy metals in isopods from the supra-littoral zone on the southern shore of the Severn Estuary, UK Environmental Pollution, 9B: 239-54
- Hornung, E., Farkas, S., Fischer, E. 1998. Tests on the isopod *Porcellio scaber*. V: Handbook of soil Invertebrate toxicity tests. Løkke, H., van Gestel, C.A.M. (ur.). Chichester, John Wiley and Sons: 207-226 str.
- Hubacher, D. 2007. Copper intrauterine device use by nulliparous women: review of side effects. Contraception, 75, 6, Supplement: S8–S11
- Irons, R.D., Schenk, E.A., Lee, C.K. 1977. Cytochemical methods for copper. Archives of Pathology and Laboratory Medicine, 101: 98-301
- ISO 10390. Soil quality –Determination of pH, ISO. 1994
- Jégou, D., Cluzeau, D., Balesdent, Tréhen, P. 1998. Effects of four ecological categories of earthworms on carbon transfer in soil. Applied Soil Ecology, 9, 1–3: 249–255
- LUFA Speyer. 2012. Analysis Data Sheet For Standard Soils According to GLP (Priloga B)
- Khan, M.A.Q., Ahmed, S.A., Salazar, A., Gurumendi, J., Khan, A., Vargas, M. 2007. Effect of temperature on heavy metal toxicity to earthworm *Lumbricus terrestris* (Annelida: Oligochaeta). Environmental Toxicology, 22: 487-494
- Khan, S.J., Roser, D.J., Davies, C.M., Peters, G.M., Stuetz, R.M. Tucker, R. Ashbolt, N.J. 2008. Chemical contaminants in feedlot wastes: concentrations, effects and attenuation. Environment International, 34: 839–859
- Kim, B. E., Nevitt, T., Thiele, D. J. 2008. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. Nature Chemistry and Biology 4, 176–185
- Kiernan, J.A. 1990. Histological and Histochemical methods: Theory and Practice. 2nd edition. New York, Pergamon Press: 433 str.
- Kiernan, J.A. 2010. FAQ: Staining, histochemistry and histotechnology. University of Western Ontario, London, Canada
<http://publish.uwo.ca/~jkiernan/faqlist.htm#COPPER> (16. jul. 2013)
- Kılıç, G.A. 2011. Histopathological and biochemical alterations of the earthworm (*Lumbricus terrestris*) as biomarker of soil pollution along Porsuk River Basin (Turkey). Chemosphere, 83, 8: 1175–1180

- Komarek, M.; Cadkova, E.; Chrastny, V.; Bordas, F. in Bollinger, J.C. 2010. Contamination of vineyard soils with fungicides: A review of environmental and toxicological aspects. *Environment International*, 36: 138 – 151
- Kos, M. 2013. Vpliv ionofornega kokcidiostatika monenzina na kinetiko bakra pri deževniku *Eisenia andrei*. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 104 str.
- Kos, B., Leštan, D. 2004. Chelator induced phytoextraction and in situ soil washing of Cu. *Environmental Pollution*, 132: 333-339
- Kostanjšek, R., Štrus, J., Drobne, D., Avguštin, G. 2004. 'Candidatus *Rhabdochlamydia porcellionis*', an intracellular bacterium from hepatopancreas of the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 543-549
- Kruse, E.A., Barret, G.W. 1985. Effects of municipal sludge and fertiliser on heavy metal accumulation in earthworms. *Environmental Pollution (Ser. A.)*, 38: 235-244
- Kula, H., Larink, O. 1998. Tests on the earthworms *Eisenia fetida* in *Aporrectodea caliginosa*. V: Handbook of soil Invertebrate toxicity tests. Løkke, H., van Gestel, C.A.M. (ur.). Chichester, John Wiley and Sons: 95-112
- Kump, P., Nečemer, M., Snajder, J. 1996. Determination of trace elements in bee honey, pollen and tissue by total reflection and radioisotope X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, 51: 499-507
- Kump, P., Nečemer, M., Vogel-Mikuš, K., Rupnik, Z., Ponikvar, D., Pelicon, P., Pongrac, P., Simčič, J., Budnar, M. 2007. Improvement of the XRF quantification and enhancement of the combined applications by EDXRF and Micro PIXE. V: First research coordination meeting under co-ordinated research project on "Unification of nuclear spectrometries: integrated techniques as a new tool for materials research": report, Vienna, 16. – 20. april 2007. Vienna, IAEA: 91–95
- Lapointe, M.R., Cohen, H. 1988. High-speed liquid chromatographic determination of monenzin, narasin and salinomycin in feeds, using post-column derivatization. *Journal of AOAC International*, 71: 480-484
- Lešer, V., Drobne, D., Vilhar, B., Kladnik, A., Žnidaršič, N., Štrus, J. 2008. Epithelial thickness and lipid droplets in the hepatopancreas of *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda) in different physiological conditions. *Zoology*, 111, 6: 419–432
- Lindquist, R.R. 1969. Studies on the pathogenesis of hepatolenticular degeneration II. Cytochemical methods for the localisation of copper. *Archives of Pathology*, 87: 370-379

- Mann, R.M., Vijver, M.G., Peijnenburg, W.J.G.M. 2011. Metals and metalloids in terrestrial systems. V: Ecological impacts of toxic chemicals. Sanchez-Bayo, F., van den Brink, P.J., Mann, R.M. (ur.) Bentham e-books: 43-62 str. http://www.google.si/books?hl=sl&lr=&id=5oYEMyCTEcwC&oi=fnd&pg=PA43&dq=mechanism+of+heavy++metal+intake+in+eisenia+andrei&ots=PxuOnq2VQH&sig=IEtLTDnkTXHgN98ahYC3k9a8npE&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false (18. avg. 2013)
- Ma, W.C. 1988. Toxicity of Copper to Lumbricid Earthworms in Sandy Agricultural Soils Amended with Cu-Enriched Organic Waste Materials. Ecological Bulletins, 39: 53-56 <http://www.jstor.org/stable/20112989> (24. avg. 2013)
- Marschner, H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, Cambridge: 889 str.
- Mehlhorn, H. 2008. Encyclopedia of Parasitology, 3rd ed., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg: 1592 str.
- McMurry, J., Fay, R.C. 2003. Chemistry, 4th Edition, Prentice Hall: 1328 str.
- Morgan, J.E., Morgan, A.J. 1998. The distribution and intracellular compartmentation of metals in the endogenic earthworm *Aporrectodea caliginosa* sampled from an unpolluted and a metal-contaminated site. Environmental Pollution, 99: 167-175
- Mršič, N. 1997. Živali naših tal. Ljubljana, TZS: 416 str.
- Nečemer, M., Kump, P., Budič, B., Ponikvar, M. 2003. Determination of sulfur and chlorine in fodder by X-ray fluorescence spectral analysis and comparison with other analytical methods. Spectrochimica Acta Part B, 58: 1367-1373
- Novilla, M.N. 1992. The veterinary importance of the toxic syndrome induced by ionophores. Veterinary and Human Toxicology, 34: 66-70
- OECD/OCDE. 2004. OECD Guidelines for the testing of chemicals 222: Earthworm reproduction test (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*)
- Oresome resources. Feb. 2010. Minerals and Energy Education. http://www.oresomerresources.com/resources_view/resource/fact_sheet_copper (20. jul. 2013)
- Owojori, O.J., Reinecke, A.J., Rozanov, A.B. 2010. Influence of clay content on bioavailability of copper in the earthworm *Eisenia fetida*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 73, 3: 407-414
- Page, S.W. 2003. The Role of Enteric Antibiotics in Livestock Production. Avcare Limited, Canberra ACT, Australia: 338 str.

- Pan, S.C., Lin, C.C., Tseng, D.H. 2003. Reusing sewage sludge ash as adsorbent for copper removal from wastewater. *Resources, Conservation and Recycling*, 39, 1: 79–90
- Pattnaik, S., Reddy, M.V. 2011. Heavy metals remediation from urban wastes using three species of earthworm (*Eudrilus eugeniae*, *Eisenia fetida* and *Perionyx excavatus*). *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 3, 14: 345-356
- Phillips, D.J.H. 1977. The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments - a review. *Environmental Pollution* (1970), 13, 4: 281–317
- Pietz, R.I., Peterson, J.R., Prater, J.E., Zenz, D.R. 1984. Metal concentrations in earthworms from sewage sludge-amended soils in a strip mine reclamation site. *Journal of Environmental Quality*, 13, 4: 651-654
- Pinkerton, M., Steinrauf, L.K. 1970. Molecular structure of monovalent metal cation complexes of monensin. *Journal of Molecular Biology*, 49, 3: 533-546
- Pressman, B.C. 1976. Biological applications of ionophores. *Annual Reviews of Biochemistry*, 45: 501-530
- Raskin, I., Smith, R.D., Salt, D.E. 1997. Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opinion in Biotechnology*, 8: 221-226
- Reinecke A. J., Venter J. M., Moisture preferences, growth and reproduction of the compost worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta) (Abstract), *Biology and Fertility of Soils*, 3, 1-2: 135-141
- Reinecke, A.J., Kriel, J.R., 1981. Influence of Temperature on the Reproduction of the Earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta), *South African Journal of Zoology*, 16, 2: 96-100
- Rousseau, R.M. 2001. Detection limit and estimate of uncertainty of analytical XRF results. *The Rigaku Journal*, 18, 2: 33-47
- Rusjan, D., Strlič, M., Pucko, D., Korošec Koruza, Z. 2007. Copper accumulation regarding the soil characteristics in Sub-Mediterranean vineyards of Slovenia, *Geoderma*, 141: 111-118
- van Ryssen, J.B.J., Barrowman, P.R. 1987. Effect of ionophores on the accumulation of copper in the livers of sheep. *Animal Production*, 44, 2: 255-261
- Saxe, J.K., Impellitteri, C.A., Peijnenburg, Allen, H.E. 2001. Novel Model Describing Trace Metal Concentrations in the Earthworm, *Eisenia andrei*. *Environmental Science and Technology*, 35: 4522-4529

- Spurgeon, D.J., Hopkin, S.P., Jones, D.T. 1992. Effects of Cd, Cu, Pb and Zn on growth, reproduction and survival of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny): assessing the environmental impact of point-source metal contamination in terrestrial ecosystem. *Environmental Pollution*, 84: 123-130
- Van Gestel, C.A.M., van Breemen, E.M., Sparenburg, P.M., van Dis, W.A. 1989. Development of a standardized reproduction toxicity test with the earthworm species *Eisenia fetida andrei* using copper, pentachlorophenol, and 2,4-dichloroaniline. *Ecotoxicology and Environmental safety*, 18, 3: 305-312
- Valko, M., Morris, H., Cronin, M.T.D. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medical Chemistry*, 12: 1161-1208
- Venter, J.M., Reinecke, A.J. 1988. The life-cycle of the compost worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *South African Journal of Zoology*, 23, 3: 161-165
- Vieira Salles, M.S., Zanetti, M.A., Salles, F.A. 2008. Effect of monensin on mineral balance in growing ruminants reared under different environmental temperatures. *Animal Feed Science and Technology*, 141, 3–4: 233–245
- Vijver, M.G. 2005. The ins and outs of bioaccumulation. Metal bioaccumulation kinetics in soil invertebrates in relation to availability and physiology. Doctoral dissertation, Vrije Universiteit, Amsterdam: 179 str.
- Vijver, M.G., Vink, J.P.M., Miermans, C.J.H., van Gestel, C.A.M. 2003. Oral sealing glue: a new method to distinguish between intestinal and dermal uptake of metals in earthworms. *Soil Biology and Biochemistry*, 35: 125-132
- Vink, K., Tompot, A., Hermans, M., van Straalen, N.M., Dewi, I., Bedaux, J. 1995. The importance of the exposure route when testing the toxicity of pesticides to saprotrophic isopods. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14, 7: 1225–1232
- Vogel-Mikuš, K., Pongrac, P., Kump, P., Nečemer, M., Regvar, M. 2006. Colonisation of a Zn, Cd and Pb hyperaccumulator *Thlaspi praecox* Wulfen with indigenous arbuscular mycorrhizal fungal mixture induces changes in heavy metal and nutrient uptake. *Environmental Pollution*, 139: 362-371
- Wikipedia. 10.7.2013. Rate equation.
http://en.wikipedia.org/wiki/Rate_equation (11. avg. 2013)
- Wolf, A.V. 1940. Paths of water exchange in the earthworm. *Physical Zoology*, 13: 294-308
- Xiong, X., Li, Y., Li, W., Lin, C., Han, W., Yang, M. 2010. Copper content in animal manures and potential risk of soil copper pollution with animal manure use in agriculture. *Resources, Conservation and Recycling*. 54, 11: 985–990

- Yoshida, N., Castro, M.J.L., Cirelli, A.F., 2010. Degradation monenzin in soils: influence of organic matter and water content. *Chemical Ecology*, 26: 27-33
- Waegele, 1992. Microscopic anatomy of invertebrates. Ch. 11: Isopoda
- Welch, M.C., Compton, R.G. 2006. The use of nanoparticles in electroanalysis: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384: 601–619
- Zdešar, K. 2005. Razporeditev bakrovih granul v hepatopankrasu kopenskih rakov vrste *Porcellio scaber* med levitvenim ciklom. Diplomsko naloga. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 69 str.
- Zidar, P., Drobne, D., Štrus, J. 1998. Determination of moult stages of *Porcellio scaber* (Isopoda) for routine use. *Crustaceana*, 72: 1-9
- Zidar, P., Drobne, D., Štrus, J., Van Gestel, C.A.M., Donker, M. 2003. 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., Žižek, S. 2012. The impact of cocidiostats monenzin and lasalocid on Cd and Pb uptake in the isopod *Porcellio scaber*. *Applied Soil Ecology*, 55: 36-43
- Van Zwieten, L., Rust, J., Kongston, T., Merrington, G., Morris, S. 2004. Influence of copper fungicide residues on occurrence of earthworms in avocado orchard soils. *Science of The Total Environment*, 329, 1-3: 29-41
- Žižek, S., Hrženjak, R., Kalcher, G.T., Šrimpf, K., Šemrov, N., Zidar, P. 2011. Does monenzin in chicken manure from poultry farms pose a threat to soil invertebrates. *Chemosphere*, 83: 517-523
- Žnidaršič, N. 2003. Dinamika bakrovih in cinkovih zvrsti ter z njo povezani celični mehanizmi v prebavilu raka enakonožca *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). Doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 88 str.
- Žnidaršič, N., Štrus, J. 2004. Stain-fixation in rubeanic acid: a method for quick histochemical localisation of intracellular copper granules in hepatopancreas of isopods. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 52 (Suppl. 1): S54

ZAHVALA

Za izdelavo magistrskega dela sem imela priložnost sodelovati in učiti se od lepega števila znanstvenih sodelavcev in raziskovalcev. Na tem mestu izrekam iskreno zahvalo osebj:

- na Katedri za zoologijo,
- na Katedri za fiziologijo rastlin, še posebej ge. Mileni Kubej za liofilizacijo,
- v Ekotoksikološkem laboratoriju NIB, še posebej ge. Karmen Stanič za liofilizacijo,
- v Laboratoriju za forenzično toksikologijo in ekotoksikologijo Inštituta za patologijo, sodno in upravno veterinarstvo VF za meritve monenzina in deževnike, še posebej dr. Suzani Žižek,
- v Laboratoriju za analizo kemije KI za meritve z LA ICP-MS, dr. Johannesu van Elteru in mladi raziskovalki Marti Debeljak:

Dr. van Elteren thank you very much for your time and attention you paid to analysis of my samples, immediate answers on e-mails and results. Thank you for the meetings in a positive atmosphere and I look forward to potential new cooperation in the future.

- v Laboratoriju za rentgensko spektrometrijo Odseka za fiziko srednjih in nizkih energij na IJS za meritve z XRF, dr. Petru Kumpu in Andreji Rebek.

Iskreno se Vam zahvaljujem spoštovani mentor, dr. Primož Zidar, za odlično izoblikovano temo, ki sta jo v zadnjih letih razvijala z dr. Suzano Žižek. Hvala vam za vso znanje, nasvete, literaturo, razlage in potrpežljivost.

Zahvaljujem se tudi Vam, dr. Katarina Vogel-Mikuš, za nesebično namenjen čas in prenešeno znanje, ki ste ga tekom let nabrali. Zahvaljujem se Vam, dr. Primož Zidar, in tudi Vam, dr. Katarina Vogel-Mikuš, za vse možnosti, priložnosti in izkušnje, ki so mi bile dane zaradi vaju. Ni besed, ki bi opisale mojo hvaležnost, upam pa, da vama bom nekoč lahko to "vrnila" in opravičila vajino zaupanje.

Zahvaljujem se dr. Primožu Zidarju, dr. Katarini Vogel-Mikuš, dr. Suzani Žižek in dr. Simoni Prevorčnik za natančno prebrano nalogo, popravke in komentarje in dr. Damjani Drobne za konstruktivne pripombe. Hvala Vam!

Ob koncu se zahvaljujem tudi staršema, mami Janji in očetu Srečku, ki sta mi omogočila šolanje, mi privzgojila delavne navade, zdravo kmečko pamet in temeljne vrednote, ki jih pogrešam pri mnogih ljudeh. Zahvaljujem se staremu atu Oskarju, ki je podpihoval mojo radovednost in je med vsemi najbolj kriv, da me je življenje zaneslo na pot, po kateri hodim. Zahvaljujem se sestri Saši in najboljšemu prijatelju Roku za vse, kar smo skupaj že ušpičili in kar še bomo.

PRILOGA A

Preglednica: Rezultati meritev vzorcev poskusne prsti z metodo XRF

Element	E [keV]	Trenja	Monensin				Cu80				Cu80 + monensin				Cu160				Cu160 + monensin			
			Kontrola		D 14 in 28 dni		D 14 in 28 dni		D 14 in 28 dni		D 14 in 28 dni		D 14 in 28 dni		D 14 in 28 dni		D 14 in 28 dni		D 14 in 28 dni		D 14 in 28 dni	
			c ± SD	[µg/g]	D 14 in 28 dni	D 14 in 28 dni	D 14 in 28 dni	D 14 in 28 dni	D 14 in 28 dni	D 14 in 28 dni	D 14 in 28 dni	D 14 in 28 dni	D 14 in 28 dni	D 14 in 28 dni	D 14 in 28 dni	D 14 in 28 dni	D 14 in 28 dni	D 14 in 28 dni	D 14 in 28 dni	D 14 in 28 dni	D 14 in 28 dni	D 14 in 28 dni
K	3.314	15200 ± 887	19200 ± 2840	16600 ± 1030	17300 ± 1440	14600 ± 2570	18300 ± 2600	21900 ± 3280	18700 ± 1160	16400 ± 1050	23100 ± 3320	9650 ± 2990	19400 ± 3230	21600 ± 2930	16200 ± 2560	20700 ± 3280	15200 ± 3110	17900 ± 3540	17300 ± 2080	23900 ± 3130	16100 ± 2530	
Ca	3.692	5470 ± 327	7100 ± 1290	7300 ± 460	6540 ± 970	7550 ± 1320	9960 ± 1350	5850 ± 1460	5900 ± 400	5340 ± 386	7910 ± 1590	6490 ± 1510	10500 ± 1680	6830 ± 1320	8530 ± 1310	5940 ± 1460	5180 ± 1460	5200 ± 1530	6720 ± 955	5620 ± 1310	7050 ± 1210	
Ti	4.512	1950 ± 115	3770 ± 486	2650 ± 163	2260 ± 319	1960 ± 382	2950 ± 404	2430 ± 480	1970 ± 131	2040 ± 138	3210 ± 501	1840 ± 458	2580 ± 487	3280 ± 466	3810 ± 453	2950 ± 514	2230 ± 479	2380 ± 538	2630 ± 321	2510 ± 435	3320 ± 434	
Cr	5.415	794 ± 11.8	LOD	111.0 ± 21.2	150.0 ± 24.7	305 ± 128	LOD	LOD	LOD	138.0 ± 23.8	123.0 ± 25.6	LOD	LOD	LOD	LOD	478 ± 166	LOD	LOD	LOD	420 ± 148	LOD	
Mn	5.900	222.0 ± 14.8	282 ± 92	301.0 ± 22.7	310.0 ± 55.7	204.0 ± 86.4	270.0 ± 85.6	230 ± 102	236.0 ± 20.8	257.0 ± 22.6	LOD	LOD	LOD	452 ± 104	381.0 ± 92.1	417 ± 115	LOD	309 ± 116	178.0 ± 60.6	353 ± 101	338 ± 89	
Fe	6.405	8190 ± 462	10000 ± 614	10300 ± 583	9760 ± 411	7980 ± 502	10100 ± 613	8380 ± 534	8490 ± 480	8940 ± 505	9020 ± 575	8650 ± 551	8830 ± 560	10400 ± 634	10600 ± 645	10500 ± 654	8990 ± 569	8720 ± 578	8960 ± 531	11500 ± 700	11000 ± 664	
Ni	7.480	7.06 ± 1.91	60.4 ± 24.8	19.90 ± 3.76	50.0 ± 13.2	LOD	LOD	LOD	LOD	16.90 ± 4.04	LOD	LOD	LOD	LOD	LOD	LOD	LOD	LOD	LOD	LOD	LOD	
Cu	8.046	291 ± 2.2	47.3 ± 17.9	40.70 ± 3.64	39.90 ± 3.15	127.0 ± 23.1	138.0 ± 22.7	104.0 ± 24.4	99.40 ± 6.71	117.00 ± 7.75	131.0 ± 26.1	89.6 ± 24.2	105.0 ± 28.6	200.0 ± 26.7	212 ± 27	206 ± 31	261.0 ± 33.8	263.0 ± 38.7	218.0 ± 21.9	263.0 ± 32.1	250.0 ± 29.5	
Zn	8.637	19.90 ± 1.49	LOD	30.60 ± 2.54	51.30 ± 12.26	LOD	31.5 ± 11.1	42.9 ± 13.9	17.90 ± 2.23	22.90 ± 2.54	LOD	LOD	60.9 ± 14.3	46.8 ± 12.3	54.5 ± 12.4	42.2 ± 13.4	40.3 ± 13.1	LOD	24.40 ± 8.02	LOD	34.0 ± 11.1	
Pb	10.449	43.20 ± 2.61	44.8 ± 11.3	53.60 ± 3.54	67.0 ± 8.9	62.1 ± 12.1	48.1 ± 11.1	65.2 ± 13.6	44.70 ± 3.24	48.70 ± 3.45	54.4 ± 13.2	46.1 ± 12.8	63.9 ± 13.6	67.8 ± 12.7	64.1 ± 12.4	87.7 ± 15.7	39.9 ± 11.8	48.1 ± 14.2	57.60 ± 8.92	73.3 ± 13.5	68.4 ± 12.0	
Br	11.924	4.490 ± 0.372	LOD	5.790 ± 0.608	7.85 ± 1.95	10.1 ± 3.2	LOD	LOD	5.320 ± 0.689	3.780 ± 0.629	LOD	10.70 ± 3.76	LOD	LOD	8.54 ± 3.57	LOD	12.00 ± 3.77	10.60 ± 4.01	LOD	LOD	LOD	
Rb	13.396	59.90 ± 3.39	65.5 ± 5.2	65.10 ± 3.71	62.3 ± 4.6	51.80 ± 4.37	64.2 ± 5.3	55.60 ± 5.04	66.10 ± 3.79	59.10 ± 3.39	57.40 ± 5.09	72.50 ± 5.77	60.90 ± 5.22	60.9 ± 5.07	59.60 ± 5.09	69.70 ± 5.62	60.5 ± 5.1	45.70 ± 4.69	69.50 ± 4.86	78.60 ± 6.06	55.20 ± 4.43	
Sr	14.165	62.0 ± 3.5	69.00 ± 5.09	68.80 ± 3.91	71.10 ± 5.77	54.50 ± 4.23	68.50 ± 5.26	66.7 ± 5.3	67.60 ± 3.86	63.70 ± 3.63	61.70 ± 4.95	68.90 ± 5.22	63.30 ± 5.02	71.50 ± 5.33	70.00 ± 5.38	69.80 ± 5.32	65.6 ± 5.1	51.20 ± 4.59	77.70 ± 5.16	74.40 ± 5.54	59.50 ± 4.56	
Y	14.958	12.000 ± 0.696	13.9 ± 2.31	14.600 ± 0.888	13.1 ± 2.5	7.13 ± 1.87	13.50 ± 2.49	17.90 ± 2.69	11.700 ± 0.778	12.200 ± 0.775	12.00 ± 2.39	13.40 ± 2.33	14.60 ± 2.47	14.80 ± 2.39	19.00 ± 2.75	12.60 ± 2.38	12.10 ± 2.33	8.18 ± 2.17	12.80 ± 1.84	11.80 ± 2.49	15.20 ± 2.06	
Zr	15.775	135.0 ± 7.6	167.0 ± 10.3	178 ± 10	147.8 ± 9.3	118.00 ± 7.51	167.0 ± 10.4	144.0 ± 9.23	147.0 ± 8.3	145.00 ± 8.18	139.00 ± 8.86	148.00 ± 9.31	150.00 ± 9.46	179 ± 11	163.0 ± 10.3	149.00 ± 9.38	153.00 ± 9.56	102.00 ± 7.06	162.00 ± 9.66	161.0 ± 10.1	152.00 ± 9.24	
Nb	16.615	4.390 ± 0.274	7.00 ± 1.63	5.200 ± 0.373	4.93 ± 1.69	3.06 ± 1.31	LOD	LOD	4.64 ± 0.40	4.430 ± 0.349	3.97 ± 1.56	4.38 ± 1.50	4.30 ± 1.61	LOD	8.31 ± 1.89	LOD	3.71 ± 1.33	9.14 ± 1.74	6.45 ± 1.29	5.59 ± 1.74	5.08 ± 1.26	

D - delevniki
I - izopodi
LOD - level on detection

D - deževniki

I - izopodi

LOD - level out detection

PRILOGA B

Slika: Specifikacija poskusne prsti Lufa 2.2 (LUFA Speyer, 2012)





**BEZIRKS
VERBAND
PFALZ**

LANDWIRTSCHAFTLICHE
UNTERSUCHUNGS- UND
FORSCHUNGSANSTALT SPEYER

Obere Langgasse 40
67346 Speyer
Telefon: 0 62 32/13 60
Telefax: 0 62 32/13 61 10
E-Mail: poststelle@lufa-speyer.de
Internet: www.lufa-speyer.de

Analysis Data Sheet for Standard Soils According to GLP
(Mean values of different batch analysis according to GLP ± standard deviation. All values refer to dry matter.)

Standard Soil Type	2.1	2.2	2.3
Batch-No. (Sp=stored; F=field fresh)		Sp2.242.12	
Sampling Date		18.10.12	
Org. C in %	0.65 ± 0.10	1.77 ± 0.20	0.94 ± 0.10
Nitrogen in % N	0.05 ± 0.01	0.17 ± 0.02	0.08 ± 0.02
Particles <0.02 mm in %	7.5 ± 0.7	15.4 ± 2.3	21.5 ± 2.0
pH-Value (0,01 M CaCl ₂)	5.1 ± 0.3	5.5 ± 0.2	6.8 ± 0.2
Cation Exchange Capacity (meq/100 g)	4.3 ± 0.5	10.1 ± 0.5	10.9 ± 1.1
Particle Sizes According to German DIN (%)			
< 0,002 mm	2.4 ± 0.4	7.2 ± 1.2	8.6 ± 1.6
0,002 - 0,006 mm	1.8 ± 0.7	3.5 ± 0.7	4.2 ± 0.8
0,006 - 0,02 mm	3.2 ± 0.8	4.5 ± 1.0	8.7 ± 0.7
0,02 - 0,063 mm	6.9 ± 0.5	7.3 ± 0.9	18.2 ± 3.5
0,063 - 0,2 mm	26.6 ± 1.1	33.3 ± 1.8	30.4 ± 3.9
0,2 - 0,63 mm	56.4 ± 2.0	43.4 ± 2.0	27.4 ± 2.5
0,63 - 2,0 mm	2.7 ± 0.4	0.8 ± 0.3	2.5 ± 0.8
Soil Type	silty sand (uS)	loamy sand (IS)	silty sand (uS)
Particle Sizes According to USDA (%)			
< 0,002 mm	2.8 ± 1.1	7.3 ± 1.2	8.5 ± 1.7
0,002 - 0,05 mm	10.2 ± 1.8	13.8 ± 2.7	28.4 ± 4.5
0,05 - 2,0 mm	87.0 ± 1.5	78.9 ± 3.5	63.1 ± 5.0
Soil Type	Sand	Loamy sand	sandy loam
Water Holding Capacity (g/100 g)	31.1 ± 2.1	41.8 ± 3.0	37.3 ± 1.8
Weight per Volume (g/1000 ml)	1474 ± 28	1263 ± 33	1282 ± 30

Speyer, 07.11.12
By Order *[Signature]*

Speyer, 07.11.12
By Order *[Signature]*

(Dr. Seibert - Phone: +49(0)6232-136-125 e-mail: seibert@lufa-speyer.de) 05.04.2012