UNIVERZA V NOVI GORICI
FAKULTETA ZA ZNANOSTI O OKOLJU

Ana KETE

DOLOČANJE NIZKIH KONCENTRACIJ ACETAMIPRIDA V EKOTOKSIKOLOŠKIH MATRIKSIH TER UGOTAVLJANJE NJEGOVE STRUPENOSTI ZA KOPENSKE ENAKONOŽNE RAKE VRSTE *Porcellio scaber (Isopoda, Crustacea)*

DIPLOMSKO DELO

Mentorica: doc. dr. Polonca Trebše

Nova Gorica, 2007

ZAHVALA

Iskrena zahvala mentorici doc. dr. Polonci Trebše za trud in vodenje pri izdelavi diplomskega dela ter prof. dr. Mladenu Franku. Zahvaljujem se tudi vsem, ki so mi pri laboratorijskem delu kakorkoli pomagali in tistim, ki so mi stali ob strani.

POVZETEK

V dvotedenskem prehranjevalnem poskusu smo določali vplive acetamiprida na kopenske enakonožne rake vrste *Porcellio scaber*, ki smo jih izpostavili acetamipridu preko hrane v koncentracijah 10 in 25 µg/g suhe mase lista. V ta namen smo spremljali smrtnost, spremembo mase, količino pojedene hrane in količino iztrebkov. Izračunali smo tudi asimilacijsko učinkovitost in izmerili vsebnost proteinov in aktivnost glutation S-transferaze. Vplivov acetamiprida na preživetje, spremebo telesne mase in vsebnost proteinov nismo opazili, medtem ko smo ugotovili vplive na količino pojedene hrane in količino iztrebkov ter asimilacijsko učinkovitost pri živalih, ki so bile izpostavljene 10 in 25 µg/g suhe mase lista. V skupini, ki je bila izpostavljena 25 µg/g suhe mase lista, smo zaznali tudi znaten upad aktivnosti encima glutation S-transferaze.

V drugem delu poskusa smo skušali razviti kromatografsko metodo HPLC za določanje acetamiprida v kopenskih enakonožnih rakih vrste *Porcellio scaber*. Vzorce smo analizirali na reverzno-fazni koloni C_{18} ob uporabi izokratične elucije z acetonitrilom in 10 mM amonijevim acetatom (3:7, v/v). Za detekcijo acetamiprida smo uporabili spektrometrijo s toplotnimi lečami (TLS) in spektrofotometrično metodo z diodno matriko (DAD). Z metodo HPLC-TLS smo v primerjavi z metodo HPLC-DAD dosegli skoraj sedemkrat nižjo mejo zaznavnosti za acetamiprid v vzorcih pripravljenih iz živali, ki so bile izpostavljene acetamipridu. Kljub temu smo z metodo HPLC-TLS zaznali signal, ki ustreza acetamipridu le v dveh vzorcih. Da bi lahko določili kakšne koncentracije so bile v ostalih izpostavljenih živalih, bi morali doseči še nižjo mejo zaznavnosti.

ABSTRACT

In two-weeks experiments the effects of acetamiprid on terrestrial isopods *Porcellio scaber* were studied. Animals were exposed to acetamiprid through food in concentrations of 10 and 25 µg/g dry food and in order to get some toxicity results the following endpoints were measured: survival, body weight change, consumption rate, faecal pellets production, assimilation efficiency, protein contents and glutathione S-transferase activity. After two weeks of exposure no effects on survival, body weight change and protein contents were observed while consumption rate, faecal pellets production and assimilation efficiency were affected after the exposure to 10 and 25 µg/g dry food. The exposure to 25 µg/g dry food induced also a considerable decrease in the activity of glutathione S-transferase.

In the second part of the study a HPLC chromatographic method for determination of acetamiprid in terrestrial isopods *Porcellio scaber* was developed. Samples were analyzed on reverse-phase C_{18} chromatographic column using isocratic elution with acetonitrile and 10mM ammonium acetate (3:7, v/v) as eluent. Detection of acetamiprid was performed by thermal lens spectrometry (TLS) and diode-array (DAD) spectrophotometric method. In comparison to HPLC-DAD method nearly seven times lower limit of detection (LOD) for acetamiprid was achieved by HPLC-TLS method. This represents an important improvement. But in only two samples prepared from exposed animals acetamiprid was detected by HPLC-TLS. For detection of acetamiprid in other samples lower LOD for acetamiprid should be achieved.

KLJUČNE BESEDE: acetamiprid, *Porcellio scaber*, prehranjevalni parametri, HPLC-TLS

KEY WORDS: acetamiprid, *Porcellio scaber*, feeding parameters, HPLC-TLS

KAZALO VSEBINE

1 UVOD……1
1.1 Namen naloge……2

2 TEORETIČNE OSNOVE……3
2.1 Neonikotinoidi……3
2.1.1 Fizikalno kemijske lastnosti……4
2.1.2 Delovanje……4
2.2 Acetamiprid……5
2.2.1 Kemijska zgradba……6
2.2.2 Fizikalno kemijske lastnosti……6
2.2.3 Acetamiprid v okolju……6
2.2.3.1 Prst……7
2.2.3.2 Voda……7
2.2.3.3 Zrak……7
2.2.3.4 Rastline……8
2.2.3.4 Živali……8
2.2.4 Toksičnost……9
2.2.4.1 Nevretenčarji……9
2.2.4.2 Ribe in drugi vodni organizmi……9
2.2.4.3 Ptice……9
2.2.4.4 Čebele……9
2.2.4.5 Sesalci……10
2.2.4.6 Človek……11
2.3 Ekotoksikološke študije s kopenskimi enakonožnimi raki……12
2.3.1 Kopenski enakonožni raki……12
2.3.1.1 *Porcellio scaber*……13
2.3.2 Testi strupenosti ……13
2.3.3 Testi strupenosti s kopenskimi enakonožnimi raki……14
2.3.3.1 Učinki na fiziološke parametre……15
2.3.3.2 Učinki na molekularnem nivoju……15
2.3.3.2.1 Vsebnost proteinov……15
2.3.3.2.2 Aktivnost glutation S-transferaze……16
2.4 Določanje acetamiprida v različnih matriksih……17
2.4.1 Določanje neonikotinoidov s HPLC-TLS……17

3 EKSPERIMENTALNI DEL……19
3.1 Materiali……19
3.1.1 Kemikalije in reagenti……19
3.1.2 Priprava raztopin……19
3.1.3 Instrumenti……20
3.2 Test strupenosti……20
3.2.1 Priprava hrane, nastavitev in potek poskusa……20
3.3 Biokemijske in kemijske metode. ……21
3.3.1 Ekotoksikološki del……21
3.3.1.1 Vsebnost proteinov……21
3.3.1.2 Aktivnost glutation S-transferaze……21
3.3.1.3 Analiza podatkov……22

3.3.2 Analitski del……...….22
3.3.2.1 Določanje acetamiprida s HPLC-TLS…….…….22
3.3.2.2 Določanje acetamiprida s HPLC-DAD…….……..….……23
3.3.2.3 Določanje koncentracij acetamiprida na listih…….….…23

4 REZULTATI……..……..24
4.1 Ekotoksikološki del…….…….…….……..……..……24
4.1.1 Vpliv acetamiprida na smrtnost kopenskih enakonožnih rakov vrste *Porcellio scaber*……..……..….…24
4.1.2 Vpliv acetamiprida na spremembo telesne mase kopenskih enakonožnih rakov vrste *Porcellio scaber*…….……..…….……...….25
4.1.3 Vpliv acetamiprida na količino zaužite hrane pri kopenskih enakonožnih rakih vrste *Porcellio scaber*……..…….……...….26
4.1.4 Vpliv acetamiprida na količino iztrebkov pri kopenskih enakonožnih rakih vrste *Porcellio scaber*……..…….……....….27
4.1.5 Vpliv acetamiprida na asimilacijsko učinkovitost pri kopenskih enakonožnih rakih vrste *Porcellio scaber*……..….……...….28
4.1.6 Vpliv acetamiprida na vsebnost proteinov v homogenatih kopenskih enakonožnih rakov vrste *Porcellio scaber*……....29
4.1.7 Vpliv acetamiprida na aktivnost glutation S-transferaze v homogenatih kopenskih enakonožnih rakov vrste *Porcellio scaber*……...30
4.1.8 Diskusija…….…….…….…….….31
4.2 Analitski del.…….…….…….…….……...33
4.2.1 Določanje acetamiprida s HPLC-TLS…….33
4.2.1.1 Določanje znanih koncentracij acetamiprida s HPLC-TLS…….33
4.2.1.2 Določanje acetamiprida s HPLC-TLS v realnih vzorcih……..35
4.2.2 Določanje acetamiprida s HPLC-DAD……...……....38
4.2.2.1 Umeritvena premica za določanje acetamiprida s HPLC-DAD……...38
4.2.2.2 Določanje znanih koncentracij acetamiprida s HPLC-DAD….….….….39
4.2.2.3 Določanje acetamiprida s HPLC-DAD v realnih vzorcih ……..…....39
4.2.3 Določanje acetamiprida na listih…….…….…….…….…....39
4.3 Umeritvena premica za proteine……..…….…...40

5 ZAKLJUČEK……..……..…….41

6 VIRI…….…….…….……..42

KAZALO PRILOG

Tabela 1: Telesna masa (mg) organizmov vrste *Porcellio scaber* izpostavljenih deionizirani vodi ter 10 in 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista

Tabela 2: Količina zaužite hrane (mg lista/mg telesne mase) za vrsto *Porcellio scaber* izpostavljeno deionizirani vodi ter 10 in 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista

Tabela 3: Količina iztrebkov (mg/mg telesne mase) za vrsto *Porcellio scaber* izpostavljeno deionizirani vodi ter 10 in 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista

Tabela 4: Asimilacijska učinkovitost organizmov vrste *Porcellio scaber* izpostavljene deionizirani vodi ter 10 in 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista

Tabela 5: Vsebnost proteinov (mg/mg telesne mase) v organizmih vrste *Porcellio scaber* izpostavljenih deionizirani vodi ter 10 in 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista

Tabela 6: Aktivnost GST (nmol/min/mg proteina) v organizmih vrste *Porcellio scaber* izpostavljenih deionizirani vodi ter 10 in 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista

1 UVOD

Varstvo rastlin je v okviru sodobnega kmetijstva zelo pomembno, saj zagotavlja kvalitetnejšo proizvodnjo v velikih količinah. Uporaba rastlinskih zaščitnih sredstev omogoča nadzor nad škodljivci, ki lahko uničijo velik delež pridelkov ali zmanjšajo njihovo kakovost. Pri tem pa je potrebno upoštevati, da lahko nepravilna in nekontrolirana uporaba teh sredstev povzroča škodljive vplive v okolju in posledično na žive organizme in človeka.

Uvajanje novih rastlinskih zaščitnih sredstev na tržišče zahteva razvoj vedno bolj specifičnih in selektivnih proizvodov, ki morajo delovati predvsem na ciljne organizme in učinkovati pri majhnih količinah nanosa. Pomembno je, da so tako osnovne učinkovine kot tudi njihovi razgradni produkti v okolju obstojni le krajši čas, da so biološko razgradljivi ter kar se da nestrupeni za netarčne organizme. Zagotovitev teh kriterijev omogoča dobro pripravljanje in izvajanje zakonodajnih predpisov za zaščito živih in neživih komponent okolja.

Neonikotinoidi so dokaj nova in še vedno razvijajoča se skupina kemikalij, ki danes predstavlja najhitreje rastočo skupino insekticidov. Njihov delež na tržišču je leta 2005 po ocenah nemškega proizvajalca rastlinskih zaščitnih sredstev Bayer znašal približno 15 %. V veliki meri nadomeščajo starejše, zelo široko uporabne organofosfatne pesticide, ki imajo precej več negativnih lastnosti tako za okolje kot tudi neciljne organizme. Sintetizirani so bili na bazi naravnega rastlinskega insekticida nikotina, ki enako deluje na centralni živčni sistem insektov. Permanentno se vežejo na nikotinske acetilholinske receptorje, kar povzroča stalno vzbujanje živčnih celic in posledično paralizo, ki vodi v smrt (Jeschke in Nauen, 2005). Neonikotinoidne insekticide se uporablja v kmetijstvu predvsem na zelenjavi, citrusih, bombaževcih in orientalskih okrasnih rastlinah za zatiranje sesajočega mrčesa in nekaterih žuželk, ki se hranijo z listi.

Specifično selektivno delovanje, relativno nizko tveganje in številni načini nanosa predvidevajo v prihodnosti še hitrejši razvoj in večjo porabo (Jeschke in Nauen, 2005). Prav zaradi tega je potrebno dobro preučiti njihovo delovanje na različne vrste organizmov, procese razgradnje v različnih naravnih pogojih ter porazdelitev in akumulacijo v okolju.

Prepoznavanje neželenih učinkov na netarčne organizme in določanje nivoja strupenosti nam omogočajo testi strupenosti na različnih nivojih biološke organizacije. S pomočjo njihovih rezultatov lahko predvidevamo možne negativne vplive na živi svet; predvsem na ostale neciljne živali in rastline ter na človeka. Ena izmed zelo razširjenih skupin organizmov v okolju so tudi kopenski enakonožni raki, ki imajo pomembno vlogo pri dekompozicijskih procesih. Večje dele organskega materiala razgrajujejo na manjše delce in s tem bistveno pospešujejo mikrobiološki razkroj. O učinkovanju neonikotinoidov na te organizme je zelo malo podatkov, večinoma le o imidaklopridu, najbolj razširjenem insekticidu iz skupine neonikotinoidov, kljub temu, da so zelo primerni za uporabo v testih strupenosti, saj ustrezajo večini kriterijev, ki jih mora dober organizem za testiranje strupenosti imeti.

Razvoj vedno novih in učinkovitejših insekticidov omogoča uporabo vedno nižjih koncentracij. Zato je potrebno razvijati tudi nove metode določanja v različnih okoljskih matriksih, ki omogočajo čim enostavnejše doseganje kar se da nizkih mej detekcije. Ena izmed občutljivih tehnik, ki omogoča precej višjo občutljivost je optotermična detekcija na osnovi spektrometrije s toplotnimi lečami. Do sedaj je bila uporabljena za

določanje nekaterih organofosfatnih in karbamatnih pesticidov v sadnih sokovih, nekaterih oblik kroma v vodi, antioksidantov v živalskih oljih in tkivih, pa tudi barvil, ki se jih uporablja v tekstilni industriji (Franko *et al*., 2001).

Poskusi določanja nekaterih neonikotinoidov v vodi in na krompirju (Guzsvany *et al*., 2006) ter medu in cvetnem prahu (Mejač, 2006) so pokazali, da je omenjena metoda primerna za določanje nizkih koncentracij neonikotinoidov v različnih matriksih.

1.1 Namen naloge

Namen diplomskega dela je ugotoviti strupenost acetamiprida za kopenske enakonožne rake vrste *Porcellio scaber* in določiti njegove koncentracije s pomočjo HPLC-TLS ter HPLC-DAD v testnih organizmih ter v listih, ki smo jih uporabili kot hrano v ekotoksikoloških eksperimentih.

V ta namen smo skušali:

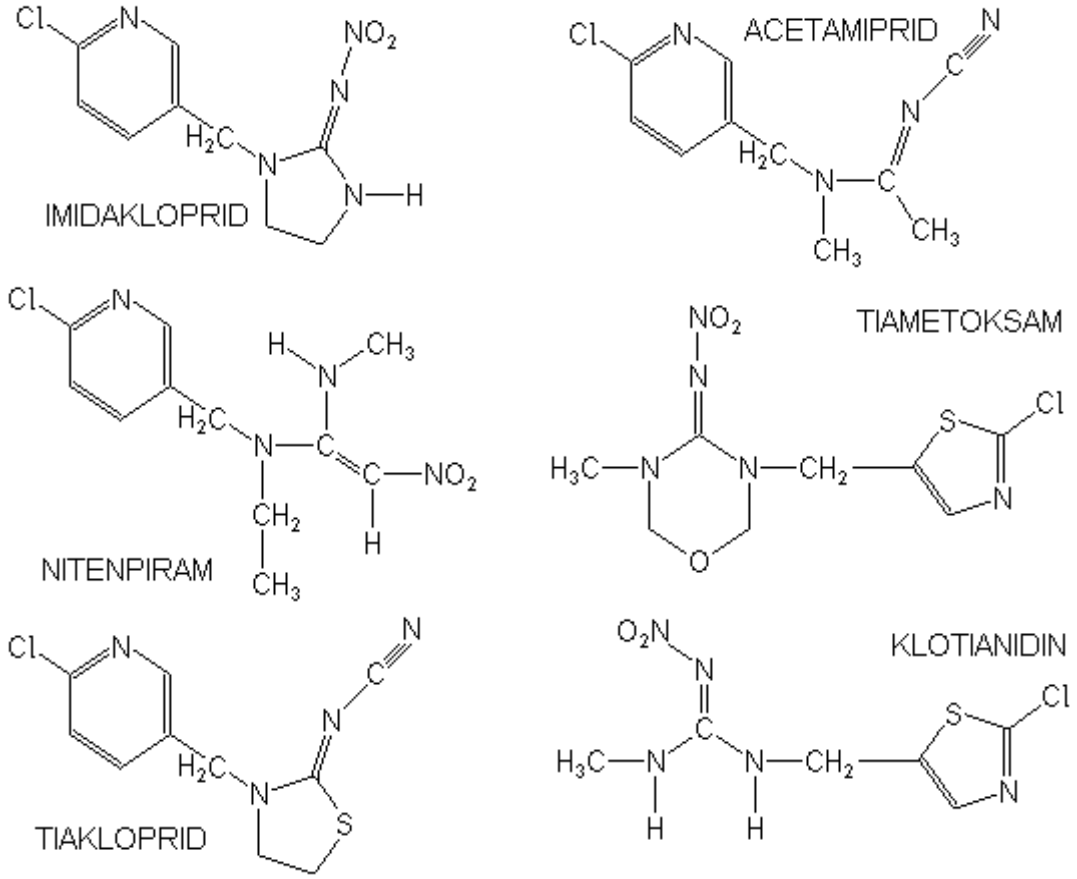
- ugotoviti, kakšne učinke povzročajo različne koncentracije acetamiprida na fiziološkem (smrtnost, sprememba telesne mase, količina pojedenih listov, količina iztrebkov in asimilacijska učinkovitost) ter molekularnem nivoju (vsebnost proteinov in aktivnost glutation S-transferaze),
- z uporabo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti v kombinaciji z občutljivo analitsko metodo optotermične detekcije na osnovi spektrometrije s toplotnimi lečami določiti koncentracije acetamiprida v homogenatih testnih organizmov,
- z uporabo iste metode določiti točne koncentracije acetamiprida na listih,
- primerjava rezultatov dobljenih na HPLC-TLS z rezultati, dobljenimi na HPLC-DAD.

2 TEORETIČNE OSNOVE

2.1 Neonikotinoidi

Neonikotinoidi so relativno nova skupina sintetiziranih organskih spojin, saj so se na tržišču pojavili v začetku devetdesetih let prejšnjega stoletja. To so visokosistemski insekticidi, sposobni translacije v rastline preko koreninskega sistema. Na ta način omogočajo zaščito pred različnimi škodljivci daljše časovno obdobje (Cox, 2001). Po uvedbi evropske direktive o rastlinskih zaščitnih sredstvih (Council Directive 91/414/EEC of 15 July 1991 concering the placing of plant protection products on the market) deloma nadomeščajo nekoč najbolj razširjene organofosfatne pesticide. Direktiva usklajuje dogovore o upravičenosti rastlinskih zaščitnih sredstev v Evropi. To dosega z uveljavljanjem soglasnih kriterijev, ki se uporabljajo pri določanju varnosti posameznih aktivnih substanc. Njen namen je zaščita človekovega zdravja ter biotskih in abiotskih komponent okolja v okviru uporabe rastlinskih zaščitnih sredstev.

Med neonikotinoide uvrščamo šest aktivnih snovi, ki so kemijsko podobne nikotinu: imidakloprid, acetamiprid, nitenpiram, tiametoksam, tiakloprid in klotianidin (*Slika 1*). Glavne skupine teh spojin so lahko nitrometilenska, nitroiminska ali cianoiminska skupina (Matsuda *et al.*, 2001). Neonikotinoidi so učinkoviti insekticidi s širokim spektrom delovanja. Uporabljajo se tako površinsko kot tudi v zemlji, pa tudi za tretiranje semen. Najbolj razširjen med njimi je imidakloprid, ki je aktivna snov mnogih pripravkov prisotnih na tržišču.



Slika 1: *Strukturne formule neonikotinoidov*

2.1.1 Fizikalno kemijske lastnosti

Neonikotinoidi so trdne, polarne in nehlapne snovi z visoko topnostjo v vodi. Pri vrednostih pH, ki jih najdemo v okolju, ne ionizirajo (Roberts *et al*., 1999). Zaradi polarnosti in visoke topnosti so zelo mobilni. Mobilnost je odvisna od vrste prsti in adsorpcijskega koeficienta (K_{OC}); višji kot je, manjša je mobilnost in obratno (*Tabela 1*).

Obstojnost je različna in odvisna od pogojev v okolju. Glavni procesi razgradnje neonikotinoidov so hidroliza, fotorazgradnja in mikrobna razgradnja. Najmanj obstojna sta acetamiprid in nitenpiram. Prvi ima razpolovni čas pod naravnimi pogoji približno 8 dni, drugi pa 15. Nekoliko obstojnejša sta tiakloprid in tiametoksam, ki imata razpolovni čas; prvi do 27 dni, drugi pa do 28 dni (Jeschke in Nauen, 2005). Najdaljši razpolovni čas imata klotianidin okrog 34 dni ter imidakloprid med 27 in 299 dni (Gupta *et al*., 2002).

Tabela 1*: Nekatere fizikalne in kemijske lastnosti neonikotinoidov (EPA. Pesticide Factsheet, 2002; Jeschke et al., 2001; Jeschke et al., 2003; Jeschke in Nauen, 2005; Ocena tveganja imidakloprida za čebele, 2004)*

Neonikotinoid	Molekulska masa [g/mol]	Gostota [g/cm^3]	Topnost v vodi [g/L]	Porazdelitveni koeficient oktanol – voda (log P_{OW})	Adsorpcijski koeficient (K_{OC}) [mL/g]	Parni tlak [Pa]
Imidakloprid	255,7	1,542	0,61	0,57	132 – 310****	4×10^{-12}
Acetamiprid	222,68	1,330	4,25	0,8	132 – 267**	$<1\times10^{-6}$
Tiakloprid	252,8	1,46	1,26	0,10	393 – 870*	3×10^{-10}**
Tiametoksam	291,7	1,57**	4,1	-0,13	10	$6,6\times10^{-9}$
Nitenpiram	270,7	1,40	$8,4\times10^{5}$	-0,64	60	$1,1\times10^{-9}$
Klotianidin	249,7	1,61	0,327	0,7	160***	$3,8\times10^{-11}$

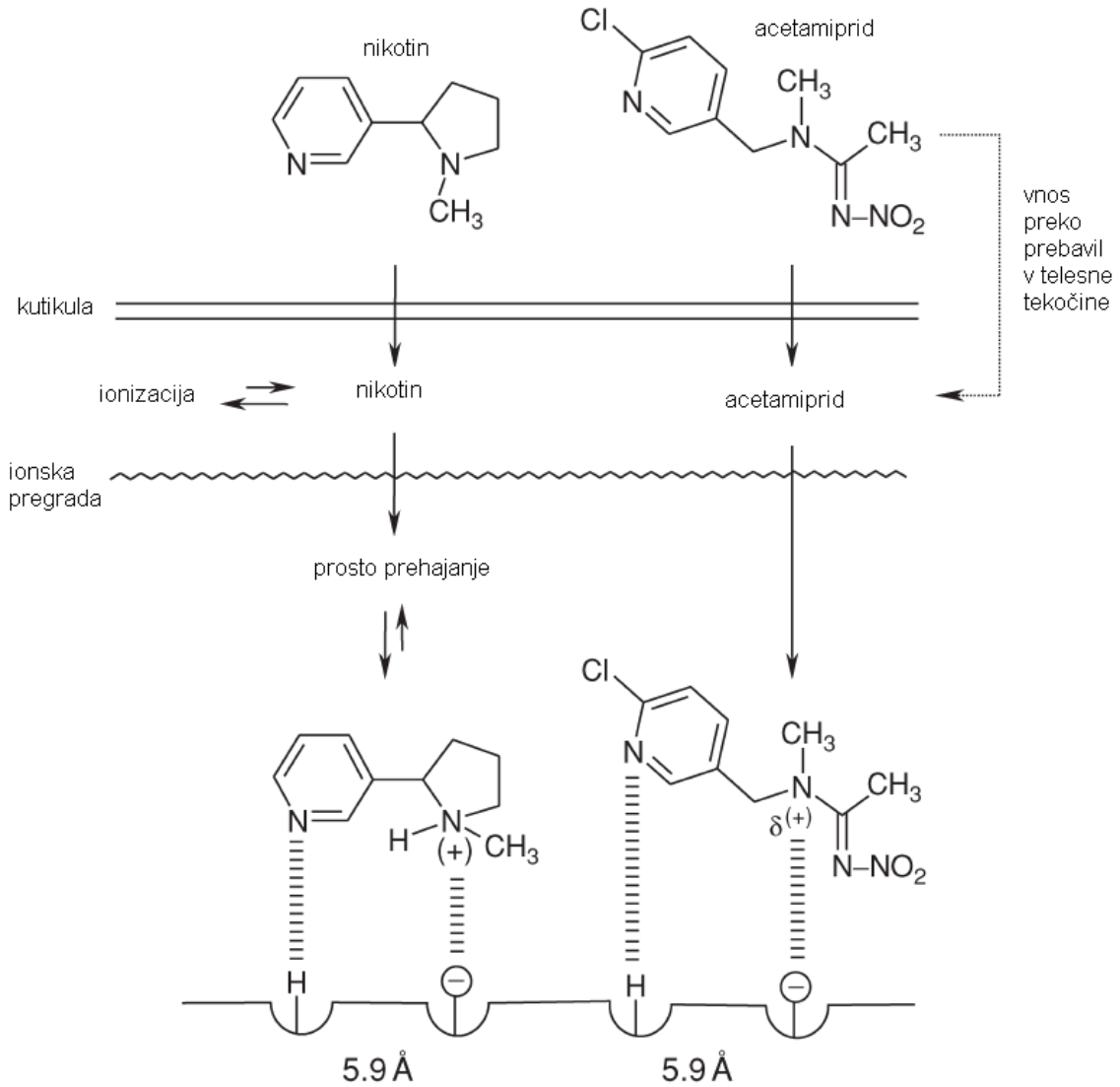
Vsi podatki so iz Jeschke in Nauen, 2005, razen: * - Jeschke et al., 2001; ** - EPA. Pesticide Factsheet, 2002; *** - Jeschke et al., 2003; **** - Ocena tveganja imidakloprida za čebele, 2004

2.1.2 Delovanje

Neonikotinoidni insekticidi imajo zaradi močnih elektronprivlačnih skupin, kot sta nitro ali ciano skupina, delno pozitiven naboj, ki jim omogoča ireverzibilno vezavo na nikotinske acetilholinske receptorje (nAChR) v sinaptičnih povezavah med živčnimi celicami, oz. živčnimi in mišičnimi celicami. To jim omogočata tudi oblika in velikost molekule (*Slika 2*).

Pri normalnem delovanju nikotinski acetilholinski receptorji sprejemajo molekule acetilholina, ki prenaša živčne impulze z ene celice na drugo. Po vezavi acetilholin hitro razpade zaradi delovanja encima acetilholinesteraze, kar povzroči inaktivacijo receptorja. Neonikotinoidi se vežejo ireverzibilno, saj se za razliko od naravnega prenašalca živčnih impulzov razgrajujejo zelo počasi ali pa se sploh ne (Cox, 2001). Permanentna vezava na receptorje povzroči neprestano vzburjenost živčnih celic, kar v končni fazi vodi do paralize in smrti organizma.

Nikotinski acetilholinski receptorji se pri žuželkah nahajajo na stikih med posameznimi živčnimi celicami, pri vretenčarjih pa v večini le na stikih med živčnimi in mišičnimi celicami. Učinki neonikotinoidnih insekticidov so največji pri žuželkah, saj vsebuje njihovo centralno živčevje precej več teh receptorjev, kot centralna živčevja ostalih skupin organizmov (Matsuda *et al*., 2001).



Slika 2: *Interakcija nikotina in acetamiprida z nikotinskimi acetilholinskimi receptorji (Jeschke in Nauen, 2005)*

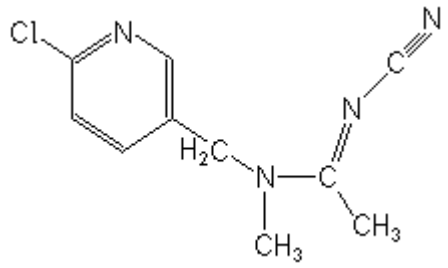
2.2 Acetamiprid

Acetamiprid je sistemski insekticid, ki spada v skupino neonikotinoidnih insekticidov s cianoiminsko skupino. Sintetiziran je bil leta 1989, prvič registriran pa 1995 na Japonskem. V Sloveniji je bilo leta 2002 registrirano trenutno edino fitofarmacevtsko sredstvo, ki vsebuje acetamiprid, to je vodotopni prašek Mospilan 20 SP, ki vsebuje 20% acetamiprida.

Pripravke, ki vsebujejo acetamiprid nanašamo največkrat v obliki škropljenja na prst ali neposredno na liste. Uporabljamo jih lahko na sadju, zelenjavi, rožah, bombaževcih in čajevcih za zatiranje sesajočega mrčesa: stenic (*Hemiptera*), metuljev (*Lepidoptera*), grizlic (*Hoplocampa*) in resarjev (*Thysanoptera*) (Fito-info, Biotehniška fakulteta, 2006; Jeschke in Nauen, 2005).

2.2.1 Kemijska zgradba

Molekula acetamiprida ((*E*)-N^1-[(6-kloro-3-piridil)meti]-N^2-ciano-N^1-metilacetamidin) je strukturno tako kot pri vseh neonikotinoidnih insekticidih sestavljena iz dveh delov (*Slika 3*). Osnova je substituiran aromatski heterociklični obroč, 6-kloro-3-piridinilni del, ki je preko metilenskega mostu povezan s cianidinaminskim delom. Terminalno skupino predstavlja substituent z veliko močjo odvzemanja elektronov, to je imino skupina (Roberts *et al*., 1999).



***Slika 3**: Strukturna formula acetamiprida*

2.2.2 Fizikalno kemijske lastnosti

***Tabela 2:** Fizikalne in kemijske lastnosti acetamiprida (EC. Health & Consumer Protection Directorate, 2004; EPA. Pesticide Fact Sheet, 2002).*

Molekulska formula	$C_{10}H_{11}ClN_4$
Agregatno stanje in oblika	trdno, kristali
Barva	bela
Vonj	brez vonja
Molekulska masa	222,68 g/mol
Parni tlak	$< 1\times10^{-6}$ Pa (25ºC)
Topnost v vodi	4250 mg/L (25ºC, destilirana voda)
Tališče	98,9 ºC
Relativna gostota	1,330 g/cm^3 (20ºC)
Henryjeva konstanta	$5,3\times10^{-8}$ Pa m^3 mol^{-1} (25ºC)
Konstanta disociacije pKa	0,7 (25ºC)
Porazdelitveni koeficient oktanol - voda log P_{OW}	0,8 (25ºC)
Koeficient adsorpcije v prsti K_d	<4,1 [mL/g] (20 ºC)
Koeficient adsorpcije na organski ogljik K_{OC}	132 – 267 [mL/g] (20 ºC)
UV/VIS absorpcija (max.) λ_{max}	247 nm, 217 nm

2.2.3 Acetamiprid v okolju

Pomembno pot razgradnje acetamiprida predstavlja aerobna razgradnja, ki poteka zelo hitro in omogoča biorazgradljivost. V pufernih raztopinah je pri pH 4, 5 in 7 ter pod vplivom sončne svetlobe stabilen za hidrolizo, počasi se razgrajuje pri pH 9 in 45 ºC. Razpad poteka tudi s fotolizo in anaerobno razgradnjo, vendar ta dva procesa pod naravnimi pogoji v primeru acetamiprida potekata bistveno počasneje, podobno kot hidroliza (Tokieda *et al*., 1998).

Acetamiprid velja za zmerno do zelo mobilno spojino, saj so študije mobilnosti na štirih različnih prsteh pri 20 ºC pokazale, da je koeficient adsorpcije acetamiprida v prsti manjši od 4,1 mL/g in koeficient adsorpcije na organski ogljik med 132 in 267 mL/g (EPA. Pesticide Fact Sheet, 2002). Podatki, ki so na razpolago, kažejo, da je acetamiprid kljub visoki mobilnosti relativno neobstojen v okolju zaradi hitrega razpada. Prav to zmanjšuje njegov potencial za pronicanje v podtalnico in nalaganje v vodnih sedimentih (EC. Health & Consumer Protection Directorate, 2004).

Razgradni produkti acetamiprida so precej obstojnejši in imajo zato večji potencial za onesnaženje podtalnice. Visoka mobilnost in obstojnost glavnega razgradnega produkta (*N*-demetil acetamiprid) v okolju bi lahko povzročila kontaminacijo podtalnih voda, v kolikor bi prišlo do prevelikih vnosov acetamiprida (EPA. Pesticide Fact Sheet, 2002).

2.2.3.1 Prst

V večini prsti se acetamiprid zelo hitro razgradi. Za glineno zemljo je razpolovni čas 1-2 dni, za poljsko zemljo pa približno 12 dni. Glavna pot razgradnje v zemlji je aerobna razgradnja z razpolovnim časom med 1 in 8,2 dni, ki vodi do nastanka *N*-demetil acetamiprida. Nadalje se precej počasneje razgrajuje vse do 6-kloronikotinske kisline. Temu sledi mineralizacija do ogljikovega dioksida (Tokieda *et al*., 1998; Roberts *et al*., 1999). Fotoliza v prsti ne predstavlja pomembnejše poti razgradnje in je zanemarljiva (EPA. Pesticide FactSheet, 2002).

2.2.3.2 Voda

Glavna pot vnosa acetamiprida v površinske vode, do katere pride zaradi nanašanja s škropljenjem ali površinskega odtoka in erozije, ki sta posledica specifičnih razmer v okolju, je posredna.

Pri temperaturah, značilnih za naravno okolje, je acetamiprid stabilen za hidrolizo. Ob izpostavitvi vodne raztopine acetamiprida visokim temperaturam (90 - 95 ºC, 2 uri) nastane s hidrolizo pretežno *N*-demetil acetamiprid. Ta nastaja tudi pri anaerobni razgradnji, pri kateri znaša razpolovni čas 45 dni. V tem primeru doseže *N*-demetil acetamiprid maksimalno vrednost šele po približno šestih mesecih. Precej hitreje poteka razgradnja v aerobnih vodnih okoljih. S pomočjo svetlobe se acetamiprid v vodi razgrajuje relativno počasi, saj je razpolovni čas pri pH 7 približno 34 dni (EC. Health & Consumer Protection Directorate, 2004; EPA. Pesticide FactSheet, 2002).

2.2.3.3 Zrak

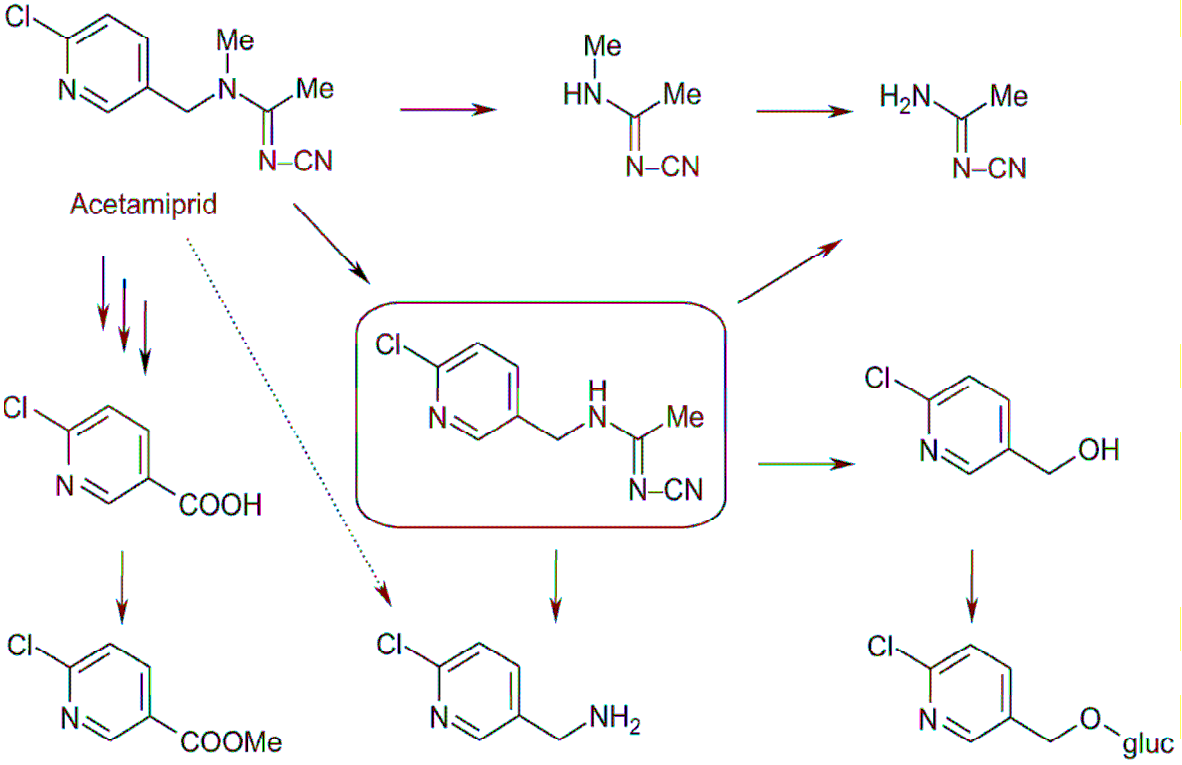
Parni tlak acetamiprida je pri 50 ºC $1{,}73\times10^{-7}$ Pa, pri 25 ºC pa pod 1×10^{-6} Pa, kar pove, da je relativno nehlapna spojina. Prav tako ima tudi nizek potencial za izhlapevanje iz vode, saj znaša Henryjeva konstanta pri 25 ºC $5{,}3\times10^{-8}$ Pa m^3 mol^{-1}. Študije kažejo, da je izhlapevanje z listnih površin in tal po 24 urah manjše od 1% (EC. Health & Consumer Protection Directorate, 2004).

O direktni fotolizi v zraku ni podatkov. V primeru fotokemične oksidativne degradacije v zraku je razpolovni čas 3 ure in pol (EC. Health & Consumer Protection Directorate, 2004).

2.2.3.4 Rastline

Glavna komponenta, ki jo lahko najdemo pri preučevanju metaboličnih sprememb v rastlinah, je acetamiprid v prvotni obliki. Produkti razgradnje so v zanemarljivih količinah.

Najpomembnejša pot razgradnje v rastlinah poteka preko *N*-demetil acetamiprida, ki se nadalje cepi do 6-kloronikotinske kisline, lahko pa oksidira tudi do 6-kloropikolil alkohola. Ta se nato metilira ali konjugira z glukozo do metil 6-kloronikotinata, ki je manj pomembnejši metabolit (Jeschke in Nauen, 2005).



***Slika 4**: Najverjetnejše poti metaboličnih pretvorb acetamiprida v rastlinah (Roberts et al., 1999)*

2.2.3.5 Živali

V prebavilih podgan se acetamiprid hitro in skoraj v celoti absorbira (>96% po 24 urah). Koncentracija je v organizmu najvišja lahko že po 30 minutah ali šele po 7 urah, odvisno od vrste. Najvišje so koncentracije v nadledvični žlezi, ščitnici, jetrih in ledvicah. V splošnem kaže acetamiprid majhen potencial za akumulacijo v organizmu (EC. Health & Consumer Protection Directorate, 2004).

Metabolne poti se pri samcih in samicah ne razlikujejo in so enake tako pri oralnem kot tudi pri intravenoznem doziranju. Metabolizira se 79-86 % acetamiprida, večinoma v 6-kloronikotinsko kislino in demetilirane oblike. Preko urina in fecesa se zelo hitro izloči iz telesa 3-7 % celotne zaužite doze. Od tega predstavlja majhen delež acetamiprid v osnovni obliki, nekaj je 6-kloronikotinske kisline, ki je lahko konjugirana z glicinom, večino pa predstavljajo *N*-demetilirane oblike. Po štirih dneh so nivoji razgradnih produktov v telesu že zelo nizki (EPA. Pesticide FactSheet, 2002).

2.2.4 Toksičnost

2.2.4.1 Nevretenčarji

Za zemeljskega črva (*Eisenia fetida*) je LD_{50} (doza, ki povzroči smrt 50 % testnih organizmov) 9 mg/kg telesne mase. Najvišji odmerek acetamiprida v primeru dolgotrajne izpostavitve (8 tednov), ki ni povzročil učinkov na reprodukcijo pri tej vrsti, je 1,26 mg/kg telesne mase dnevno. Razgradni produkti dosežejo vrednost LD_{50} pri dozah, ki so višje od 1000 mg/kg telesne mase (EC. Health & Consumer Protection Directorate, 2004).

2.2.4.2 Ribe in drugi vodni organizmi

Strupenost acetamiprida za ribe in nekatere druge vodne organizme je precej nizka, saj so vrednosti LC_{50} v primeru kratkotrajne izpostavljenosti na primer za krapa (*Cyprinus carpio)* večje od 100 mg/L vode, za vodno bolho (*Daphnia magna)* pa večje od 1000 mg/L vode (EC. Health & Consumer Protection Directorate, 2004).

EC_{50} (doza, pri kateri opazimo učinke na 50 % testnih organizmov) znaša za vodno bolho v primeru kratkotrajne izpostavljenosti 49.8 mg/kg telesne mase. Za razgradne produkte so vrednosti EC_{50} podobne ali nekoliko višje (EC. Health & Consumer Protection Directorate, 2004).

Pri daljši izpostavljenosti (21 dni) dozi 5 mg/kg telesne mase dnevno pri Daphnia magna ni opaziti negativnih učinkov (EC. Health & Consumer Protection Directorate, 2004). Prav tako niso opazili negativnih vplivov pri vrsti *Pimephales promelas*, ki je bila 35 dni izpostavljena odmerku 19,2 mg/kg telesne mase (Jeschke in Nauen, 2005).

Acetamiprid se v aerobnem vodnem v okolju razmeroma hitro razgradi in kaže majhen potencial za bioakumulacijo. V splošnem velja, da se v ribah in organskih sedimentih ne akumulira (EC. Health & Consumer Protection Directorate, 2004).

2.2.4.3 Ptice

Acetamiprid je za ptice malo strupen. Koncentracije, ki povzročajo vidne učinke, so zelo različne, odvisne predvsem od vrste. Vrednost LD_{50} je za divjo raco v primeru kratkotrajne izpostavitve 98 mg/kg telesne mase, medtem ko je za prepelico pri dolgotrajni izpostavitvi večja od 741 mg/kg telesne mase dnevno (EC. Health & Consumer Protection Directorate, 2004).

2.2.4.4 Čebele

Acetamiprid je za čebele (*Apis melifera*) bolj strupen kot za ostale netarčne organizme, saj so vrednosti LD_{50} precej nižje. V primeru kratkotrajne oralne izpostavljenosti je LD_{50} 14,53 µg/čebelo, v primeru kratkotrajne kontaktne izpostavljenosti pa 7,07 µg/čebelo. Glavni simptomi zastrupitve pri izpostavitvah čebel neonikotinoidnim insekticidom, so visoka občutljivost, hiperaktivnost in tresenje (Suchail *et al*., 2001).

Acetamiprid v primerjavi z ostalimi neonikotinoidnimi insekticidi in celo nekaterimi organofosfatnimi pesticidi (*Tabela 3*) kaže manj škodljivih učinkov na čebele (Jeschke in Nauen, 2005).

Tabela 3: *Vrednosti LD_{50} nekaterih insekticidov za čebele (California EPA. Department of pesticide regulation, 2000)*

Insekticid	LD_{50} [µg/čebelo]
Imidakloprid	0,0179
Klorpirifos	0,059
Malation	0,27
Karbaril	1,3
Permetrin	0,075
Acetamiprid	7,07
2,4-D	100
Diuron	145

Glavni razgradni produkti acetamiprida (*N*-demetil acetamiprid, 6-kloro-3-piridil metanol in 6-kloronikotinska kislina) so za čebele manj strupeni. Pri nanosu 50 µg *N*-demetil acetamiprida na hrbtno stran se smrtnost v primerjavi s kontrolno skupino ne poveča (Iwasa *et al*., 2004).

2.2.4.5 Sesalci

Acetamiprid je za sesalce relativno malo strupen in uvrščen med snovi, za katere je malo verjetno, da bi povzročale raka. Študije s podganami in zajci so pokazale, da povzroča pri sesalcih splošne in nespecifične znake strupenosti ter ne deluje na specifične organe v telesu. Ima precej nizko akutno in kronično strupenost za sesalce, ne kaže znakov karcinogenosti in nevrotoksičnosti, ter ne povzroča motenj endokrinega sistema (Jeschke in Nauen, 2005).

Pri ugotavljanju akutne toksičnosti za sesalce se izkaže, da acetamiprid ne draži kože in oči ter ne povzroča mutagenih učinkov (Jeschke in Nauen, 2005). Tudi pri dolgotrajnejši dermalni izpostavitvi je absorpcija insekticida v telo majhna, kljub temu da narašča s trajanjem izpostavitve (EPA. Pestricide FactSheet, 2002).

Vrednost LD_{50} za acetamiprid je pri oralni izpostavitvi za odraslega samca podgane 417 mg/kg, za samico pa 314 mg/kg telesne mase. V primeru dermalne izpostavitve so vrednosti višje od 2000 mg/kg telesne mase. Vrednost LC_{50} je za vnos preko dihal višja od 1,15 mg/L zraka (EC. Health & Consumer Protection Directorate, 2004).

V primeru dolgotrajne izpostavljenosti acetamipridu, ko so bile podgane dve leti izpostavljene odmerku 7 mg/kg telesne mase dnevno, niso ugotovili karcinogenih učinkov (EPA. Pestricide FactSheet, 2002). Pri višjih koncentracijah so prvi znaki zastrupitve izguba telesne teže (predvsem pri samcih), povečana potreba po uživanju vode, znižan nivo trigliceridov pri samicah, tresenje, krči in mišična oslabelost (Jeschke in Nauen, 2005; Tomizawa *et al*., 2001).

Na podganah in zajcih so bili preučevani tudi vplivi acetamiprida na reprodukcijo. Pri podganah je najvišji odmerek insekticida, ki še ne povzroča vplivov na preživetje in težo mladičev, 6,5 mg/kg telesne mase dnevno, pri zajcih pa je najvišji odmerek, ki še ne vpliva na razvoj, 15 mg/kg telesne mase dnevno (EC. Health & Consumer Protection Directorate, 2004).

Razgradni produkti acetamiprida, ki so posledica metabolizma v organizmu, so bolj toksični kot acetamiprid in povzročajo škodljive učinke. Kljub temu pa so v primeru Amesovega testa za ugotavljanje genotoksičnosti na bakterijah rezultati tako za acetamiprid kot tudi za metabolite negativni (Jeschke in Nauen, 2005).

2.2.4.6 Človek

Na podlagi precejšnjega števila študij strupenosti acetamiprida za sesalce, predvsem pa podatkov epidemioloških študij in kemijskih analiz so bile ocenjene koncentracije acetamiprida v telesu pri akutni in kronični izpostavljenosti. Po podatkih o koncentracijah nekaterih drugih insekticidov v okolju in epidemioloških študijah o dejanski izpostavljenosti ljudi le tem, so bile ocenjene in izračunane domnevne doze acetamiprida pri izpostavitvah preko hrane in vode za posamezne starostne skupine (*Tabela 4*).

Doze so v tabeli predstavljene tudi kot delež vrednosti PAD (population adjusted dose), ki je bila določena z upoštevanjem varnostnih faktorjev. Te so določili na podlagi dolgotrajnih poskusov na živalih, ki so pokazale nekatere poglavitne lastnosti acetamiprida. Pri akutni izpostavitvi acetamipridu je aPAD (acute population adjusted dose) 0,1 mg/kg, pri kronični pa je cPAD (chronic population adjusted dose) 0,023 mg/kg/dan (EPA. Pesticide FactSheet, 2002).

Tabela 4: *Najverjetnejše akutne in kronične izpostavitve acetamipridu preko hrane in vode (EPA. Pesticide FactSheet, 2002)*

	Akutna izpostavitev		Kronična izpostavitev	
	[mg/kg]	% aPAD	[mg/kg]	% cPAD
Otroci mlajši od 1. leta	0,038317	38	0,010261	45
Otroci 1-6 let	0,039606	40	0,014687	64
Otroci 7-12 let	0,022084	22	0,008072	35
Ženske 13-50 let	0,011451	11	0,003970	17
Moški 13-50 let	0,009624	10	0,003673	16
Starejši nad 55 let	0,010242	10	0,004005	17
Povprečno	0,016921	17	0,005395	24

Po zgoraj omenjeni študiji je tveganje za človeka majhno, saj so vse vrednosti pod predvidenimi vrednostmi PAD (*EPA. Pestricide FactSheet, 2002*).

Vrednost ADI (acceptable daily intake – sprejemljiv dnevni vnos) za človeka je v primeru acetamiprida 0,07 mg/kg telesne mase. Določena je bila na podlagi dvoletne študije na podganah in študiji dveh generacij v reprodukcijskem ciklu. Pri tem je bil upoštevan varnostni faktor 100 (EC. Health & Consumer Protection Directorate, 2004).

Akutna referenčna doza (ARfD) je 0,1 mg/kg telesne mase dnevno. Določena je bila na podlagi akutne nevrotoksikološke študije na podganah. Tudi tu je bil upoštevan varnostni faktor 100 (EC. Health & Consumer Protection Directorate, 2004).

2.3 Ekotoksikološke študije s kopenskimi enakonožnimi raki

2.3.1 Kopenski enakonožni raki

Kopenski enakonožni raki spadajo v obsežno skupino rakov (*Crustacea*), ki jo delimo na višje rake, vitičnjake, ceponožce, dvoklopnike in listonožce. Kopenske enakonožce (*Oniscidea*) uvrščamo med višje rake v red enakonožcev (*Isopoda*) (Hopkin, 1991).

To je edina skupina rakov, ki celoten življenjski cikel preživi na kopnem v vlažnih okoljih. Najdemo jih pod odpadlim listjem, razpadajočim lesom, v zgornjih plasteh prsti in v bližini človeških bivališč. Bolj aktivni so ponoči, ko se hranijo (Hopkin, 1991). Imajo zelo pomembno vlogo pri dekompoziciji, saj razgrajujejo različne odmrle organske materiale na manjše delce in s tem bistveno pospešujejo mikrobiološki razkroj in vnos hranilnih snovi v zemljo ter vplivajo na pretok snovi v ekosistemu (Walker *et al*., 1997).

Prehranjujejo se predvsem z odmrlim listjem, lesom, poginulimi živalmi, ličinkami, glivami in bakterijami, pa tudi s pripadniki iste vrste (kanibalizem). Zlasti mladiči so koprofagi, saj se včasih prehranjujejo z lastnimi iztrebki ali iztrebki drugih živali. So pomemben člen v prehranjevalni verigi, ker se z njimi hranijo številne vrste: rovke, ptice, žabe, kuščarji, pajkovci, hrošči, strige in nekatere druge žuželke (Hopkin, 1991).

Prebavila kopenskih enakonožnih rakov so sestavljena iz treh delov: sprednjega, srednjega in zadnjega črevesa. Požiralnik in želodec sestavljata sprednje črevo, ki se nadaljuje v hepatopankreas. To je sistem štirih zaprtih cevk v srednjem črevesu, ki proizvaja prebavne encime in jih izloča v želodec in črevo. Tu se hrana predela in pogosto tudi skladišči v obliki energijsko bogatih molekul. Zadnje črevo se konča z rektumom, ki je na koncu prebavnega sistema (Hopkin, 1991; Wägele, 1992).

Preživetje na kopnem jim omogočajo številni mehanizmi, ki so jih tekom evolucije razvili. Najpomembnejša so trahealna pljuča, ki se nahajajo na spodnji strani zadka in omogočajo izmenjavo plinov. Kutikula povečuje trdnost zunanjega ogrodja, saj je prepojena s solmi in kalcijevim karbonatom. Na hrbtni strani imajo srce, ki poganja nesklenjen krvožilni sistem. Ostanke dušika izločajo iz telesa v obliki amonija preko vodovodnega sistema. Ker zelo hitro izgubljajo vodo iz telesa preko kutikule in por na pleopodijih, potrebujejo za preživetje vlažno okolje, ki ga zaznavajo s higroreceptorji. Vodo zajemajo iz okolja s hrano, pitjem, preko kutikule in kapilarnega sistema na uropodijih. Če je okolje prevlažno, se navadno umaknejo na bolj suha območja (Hopkin, 1991; Wägele, 1992).

Razmnožujejo se večinoma spolno, saj so raki ločenih spolov. Prisotnost bakterije iz rodu *Wolbachia* sproži tvorbo ženskih spolnih hormonov pri samcih, kar lahko povzroči spremembo spola. Oploditev jajčec poteka navadno v ugodnejših razmerah, saj imajo samice posebne vrečke, spermateke, v katerih lahko shranjujejo semensko tekočino samcev. Oplojena jajčeca nosijo v valilnikih, posebej oblikovanih vrečkah na trebušni strani, dokler ne dozorijo v ličinke. Mladiči se zelo pogosto levijo do spolne zrelosti, saj oklep ne raste skupaj s telesom. Pozneje se levijo v redkejših intervalih, približno enkrat mesečno. V tem obdobju so zelo ranljivi. Po levitvi ostanek velikokrat pojedo, saj vsebuje mnogo mineralnih snovi, predvsem kalcijevega karbonata (Hopkin, 1991; Štrus *et al*., 2005).

2.3.1.1 *Porcellio scaber*

Kopenski enakonožni rak vrste *Porcellio scaber* spada v družino *Porcelionidae* in je sivkaste barve. Odtenek se spreminja v skladu s stopnjo razvoja in levitvijo. Mladiči so belkasti, mlade živali svetlo sive, odrasle pa sive do sivo-rjave. Te v dolžino merijo do 17 mm. Najdemo jih predvsem med vlažnejšimi obdobji spomladi in jeseni, saj se pred vročino in mrazom skrijejo v globlje plasti zemlje. Za to vrsto je značilno, da se zadržuje v bližini človeških bivališč.

Kot pri večini rakov je tudi pri enakonožcu vrste *Porcelio scaber* ploščato telo sestavljeno iz treh delov: glave, oprsja in zadka (*Slika 5*). Prvi člen oprsja je z glavo združen v glavoprsje. Na glavi sta dva para tipalnic; dobro viden je le drugi par, saj je prvi zakrnel in zelo majhen, ter par sestavljenih oči. Vsako oko sestavlja približno 20 enostavnih oči, ocelijev. Na spodnji strani glave se nahajajo čeljusti, ki so iz enega para mandibul in dveh parov maksil, ter čeljustne nožice, ki so preobražen prvi par oprsnih okončin (Hopkin, 1991).

***Slika 5**: Porcellio scaber (www.geocities.com)*

Oprsje je sestavljeno iz sedmih členov, od katerih ima vsak po en par enovejnatih nog. Sedmi par nog se pri mladičih pojavi po prvi levitvi, ki nastopi v roku 24-ih ur po izvalitvi. Osebki ženskega spola imajo na spodnji strani oprsja tudi rumenkaste morsupije, vrečke, ki služijo nošenju jajčec (Hopkin, 1991).

Zadek je sestavljen iz petih precej manjših členov. Vsak ima po en par zadkovih nožic, pleopodov. Na zunanji veji prvih dveh so psevdotraheje, razvejan sistem cevk, ki omogoča dihanje. Na spodnji strani zadka so tudi genitalije; pri moških osebkih sta to modificirana prva dva para pleopodijev. Na koncu zadka se nahaja telzon in par uropodijev, ki služijo izločanju odvečne vode iz telesa (Hopkin, 1991).

2.3.2 Testi strupenosti

Test strupenosti je postopek z zelo natančno določenimi koraki, v katerem merimo odzive organizma na povišane koncentracije kemikalij. Test mora biti ponovljiv in zanesljiv, dokaj enostaven, brez zapletenih korakov ter mora dati kar največ podatkov (Connell *et al*., 1999).

Za izvedbo ekotoksikološkega testa moramo izbrati primeren organizem, ki mora izpolnjevati določene pogoje. Izbrana vrsta mora imeti dobro poznane fiziološke in ekološke značilnosti ter biti preprosto določljiva. Pomembno je, da je številčna, razširjena, primerne velikosti in jo lahko brez težav gojimo v laboratoriju (Connell *et al*., 1999).

Izbrane testne organizme izpostavimo pod enakimi pogoji naraščajočim koncentracijam kemikalij za točno določeno časovno obdobje. Prav tako izpostavimo enakim laboratorijskim pogojem tudi kontrolno skupino, vendar brez dodane kemikalije (izpostavimo jo le topilu). Tekom poskusa moramo testne pogoje v laboratoriju (temperatura, svetloba, vlažnost) redno in natančno nadzorovati. Spremljamo tudi toksikološke parametre (rast, razmnoževanje, smrtnost, količino iztrebkov, obnašanje) testnih organizmov ter jih primerjamo. V primeru, da smrtnost presega 10% populacije v kontrolni skupini, moramo poskus ponoviti. Največkrat je vzrok povišane smrtnosti stres, slabo zdravstveno stanje ali slabi testni pogoji (Connell *et al*., 1999).

Za ugotavljanje vplivov kemikalije na testne organizme moramo izbrati merljiv odziv (biomarker), ki ga lahko kvantificiramo. Meritev mora biti ponovljiva, zato je zaželeno, da je izbrani merjeni odziv hiter in jasen. Da lahko potrdimo podoben učinek kemikalije na celotno populacijo, mora biti tudi čim manj variabilen. To omogoča izbira dovolj velikega vzorca, ko teoretično zajamemo vse različne organizme. Pokazatelji delovanja kemikalij so smrtnost, vplivi na rast in reprodukcijo ter morfološke, citološke, biokemijske in vedenjske spremembe (Connell *et al*., 1999).

Statistična obdelava dobljenih podatkov omogoča posploševanje na celotno populacijo in primerjavo. Seveda pa moramo upoštevati, da nam taki enostavni laboratorijski testi ne nudijo podatkov o delovanju strupenih snovi na kompleksnejše združbe, kar omejuje njihovo uporabo pri ocenjevanju tveganj v okolju (Connell *et al*., 1999).

2.3.3 Testi strupenosti s kopenskimi enakonožnimi raki

Kopenski raki so v ekotoksikoloških študijah s kopenskimi organizmi precej pogosti, saj ustrezajo večini kriterijev, ki jih zahteva pravilen izbor testnih organizmov. Uporablja se jih predvsem v študijah ocen biološke razpoložljivosti kovin (Zidar *et al*., 2005). Drugače je v primeru testiranja strupenosti z enakonožci, ki je še vedno v fazi razvoja in dopolnjevanja. Standardizacijo onemogočata predvsem dolg reprodukcijski cikel in počasna rast. Pri vrstah *Porcellio scaber* in *Oniscus asellus* potrebujejo mladiči za razvoj do spolne zrelosti najmanj 6 mesecev v optimalnih pogojih (Walker *et al*., 1997).

Eden izmed parametrov, ki jih lahko zelo preprosto spremljamo, je privzem hrane. Enakonožci zelo dobro prenašajo stradanje, saj brez hrane lahko preživijo tudi več tednov. Jedo posušene liste leske, na katere lahko z lahkoto nanesemo testno spojino. Zaužito hrano pretvorijo v ločene, zelo podobno oblikovane in kompaktne iztrebke s podobno maso. S štetjem količine iztrebkov skozi določena časovna obdobja lahko določimo, ali je prisotnost kemikalije na listih zmanjšala količino zaužite hrane. Premajhen privzem hrane še dodatno vpliva na dolžino reprodukcijskega cikla in hitrost rasti (Walker *et al*., 1996).

V literaturi lahko najdemo precej podatkov o strupenosti kovin, organofosfatnih ter karbamatnih pesticidov za kopenske rake. O neonikotinoidinih insekticidih je precej manj podatkov.

V raziskavi o strupenosti imidakloprida za vrsto *Porcellio scaber* so bili v dvotedenskem poskusu testni organizmi izpostavljeni insekticidu v različnih koncentracijah preko hrane. Nanešen je bil na posušene leskove liste v koncentracijah 10 in 25 µg/g suhe mase lista. Med poskusom so spremljali smrtnost, maso, količino iztrebkov in privzem hrane, po izpostavitvi pa so v homogenatih živali izmerili še aktivnosti acetilholinesteraze in glutation S-transferaze ter vsebnost proteinov.

Rezultati omenjene raziskave so pokazali, da se je z naraščanjem koncentracije imidakloprida precej zmanjšala količina zaužite hrane in količina iztrebkov. Povečala se je asimilacijska učinkovitost ($AE=(C–F)/C$, C=masa pojedenih listov, F=masa iztrebkov), predvsem pri skupini, ki je bila izpostavljena 25 µg/g suhe mase lista. Vplivov na vsebnost proteinov in spremembo mase ni bilo. V seriji treh poskusov se je povišana aktivnost glutation S-transferaze pri 10 µg/g pokazala le pri enemu poskusu, medtem ko je bila pri 25 µg/g vedno zelo nizka. Trend zviševanja aktivnosti encima glutation S-transferaze je bil opažen tudi v kontrolni skupini v primerjavi z živalmi iz terarija (Blažič, 2006).

2.3.3.1 Učinki na fiziološke parametre

Pesticidi, pa tudi druge kemikalije, delujejo na različne fiziološke parametre pri organizmih. Vplivi, ki jih največkrat opazujemo pri testih strupenosti so smrtnost, spremembe mase in asimilacijske učinkovitosti ter motnje razmnoževalnih procesov in razvoja. Smrtnost je razmeroma težavna za opazovanje, saj ne moremo nikoli zagotovo trditi, da je posledica delovanja kemikalije. Podobno je pri vplivih na rast in razmnoževanje, saj se razlike pojavljajo zaradi individualne variabilnosti in dolgotrajnosti teh procesov (Drobne, 1997). Povečane koncentracije kemikalij v organizmu moteče vplivajo na pridobivanje energije, kar se odraža v počasnejši rasti ali celo zmanjševanju telesne mase. Energija se porablja za delovanje obrambnih mehanizmov (detoksifikacijski in popravljalni mehanizmi, tvorba stresnih proteinov), ki še dodatno zmanjšujejo učinkovitost produkcije (Walker *et al*., 1996).

2.3.3.2 Učinki na molekularnem nivoju

Kemikalije delujejo toksično tudi na molekularnem nivoju. Njihove molekule lahko inhibirajo najrazličnejše encime v organizmu. S tem lahko blokirajo, bistveno upočasnijo ali celo pospešijo njihove biokemijske funkcije. Zasedejo lahko tudi specifična vezavna mesta za razne prenašalce, hormone in esencialne elemente in onemogočajo normalno delovanje (Conell *et al*., 1999). Delujejo lahko tudi genotoksično, ker poškodujejo DNA molekule v celicah (Walker *et al*., 1996).

2.3.3.2.1 Vsebnost proteinov

Organizmi, ki so izpostavljeni pesticidom porabijo za delovanje obrambnih mehanizmov veliko energije. Zmanjšana vsebnost proteinov v telesu kaže na zgodnji obrambni odziv. Za premagovanje stresa potrebujejo veliko energije, kar se odraža tudi v spremembi porabe in delovanja proteinov ter njihovih energijskih premestitvah. Sodelovanje proteinskih kompleksov v popravljalnih mehanizmih v obliki lipoproteinov prav tako zmanjšuje vsebnost proteinov v organizmih (Walker *et al*., 1996).

2.3.3.2.2 Aktivnost glutation S-transferaze

Nekatere spojine vplivajo na encimsko aktivnost glutation S-transferaz v organizmu, zato jo lahko izberemo kot enega izmed merljivih odzivov oz. biomarkerjev, ki kažejo na podvrženost stresu. Glutation S-tranferaze so skupina encimov, sestavljenih iz več komponent, ki sodelujejo pri detoksifikacijskih procesih velikega števila ksenobiotikov. Pomembno vlogo imajo pri zaščiti tkiv pred oksidativnim stresom, saj sodelujejo pri odstranjevanju prostih kisikovih radikalov iz telesa. Ti encimi so pomembni tudi zaradi delovanja v mehanizmih aktivacije številnih vrst kemikalij ter pri razvoju odpornosti (rezistence) nekaterih žuželk na mnoge insekticide. (Hodge *et al*., 2000). Najdemo jih tako pri bakterijah kot tudi pri rastlinah in živalih. Največ jih je v jetrih, prisotne pa so tudi v citosolih različnih tipov celic (Walker *et al*., 1996).

Sodelujejo pri fazi II biotransformacije, ko metabolite, ki nastanejo v reakcijah faze I (oksidacije, hidratacije, hidrolize, redukcije ksenobiotikov), konjugirajo z različnimi vodotopnimi endogenimi substancami. To so navadno sladkorji, aminokisline ali peptidi. Na ta način jih nevtralizirajo in naredijo bolj vodotopne (Habig *et al*. 1974).

Glutation S-transferaze katalizirajo nukleofilno adicijo tiolne skupine (-SH) reduciranega glutationa (GSH) na širok spekter elektrofilnih substratov. Pri tem nastanejo tioetri, ki se nato pretvorijo v *N*-acetil cisteine in *S*-alkilirane konjugate, ki se v končni fazi izločijo iz telesa (Keen in Jakoby, 1978; Habig in Jakoby, 1981).

2.4 Določanje acetamiprida v različnih matriksih

V literaturi najdemo veliko podatkov o analizi neonikotinoidnih insekticidov in njihovih razgradnih produktov v hrani, vodi, prsti, rastlinah in živalih, predvsem netarčnih organizmih. Največ podatkov je o imidaklopridu. Metode so za vse podobne oz. enake, saj imajo podobne kemijske lastnosti. Najbolj razširjeni postopki ekstrakcije so v primeru vseh neonikotinoidov ekstrakcija tekoče-tekoče, ekstrakcija na trdnem nosilcu in ekstrakcija trdno-tekoče. Način je odvisen predvsem od agregatnega stanja vzorca, ki ga želimo analizirati. Pri tem se kot topila lahko uporablja acetonitril, etilacetat, aceton, diklorometan ali metanol (Ahmed, 2001).

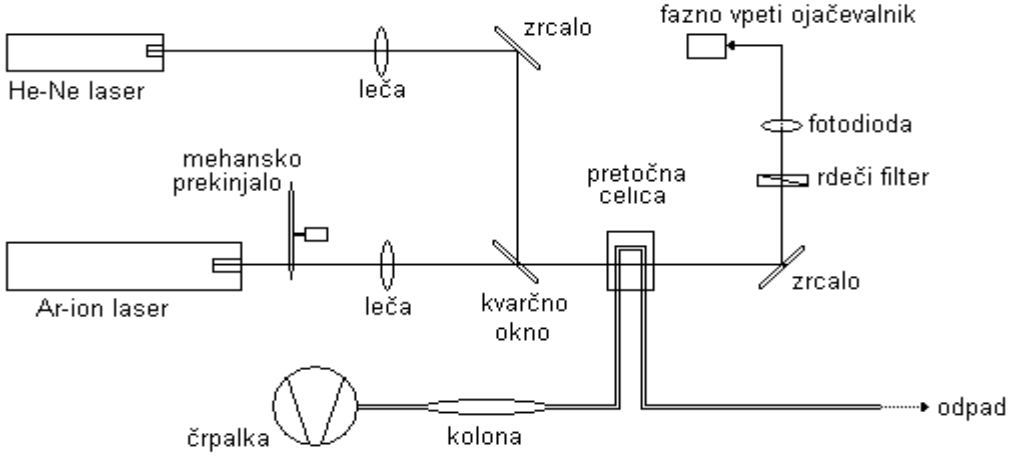
Najpogostejši uveljavljeni analizni tehniki primerni tudi za določanje acetamiprida, sta tekočinska kromatografija visoke ločljivosti v kombinaciji s spektrometrijsko detekcijo v področju UV (HPLC-UV); pri tej se za detekcijo uporablja detektor z diodno matriko (DAD) (Fernandez-Alba *et al*., 1996) in tekočinska kromatografija z masno spektrometrijo (LC-MS). Pri slednji se velikokrat uporablja ionizacijo z razprševanjem v električnem polju (ESI) (Marin *et al*., 2004), za detekcijo pa se uporablja masni analizator z ionsko pastjo (Baskaran *et al*., 1997).

Pri določanju neonikotinoidov v bioloških matriksih zaradi prisotnosti velikega števila snovi pogosto naletimo na interference, kar lahko moteče vpliva na detekcijo. V rastlinah se acetamiprid lahko določa s pomočjo plinske kromatografije z masno spektrometrijo (GC-MS). V ta namen je potrebno predhodno narediti ekstrakcijo insekticida iz rastlinskih vzorcev in ga prenesti v hlapno organsko fazo. V primeru določevanja koncentracij acetamiprida v zelenjavi so najboljše izkoristke ekstrakcij dosegli z etilacetatom. Najnižje izmerjene vrednosti so bile 0,001 mg/kg (Mateu-Sanchez *et al*., 2003).

2.4.1 Določanje neonikotinoidov s HPLC-TLS

HPLC-TLS je tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z optotermično detekcijo na osnovi spektrometrije s toplotnimi lečami. To je ena izmed optotermičnih metod, ki temeljijo na pretvorbi energije absorbiranega elektromagnetnega valovanja v toploto, kar povzroča določene spremembe nekaterih lastnosti vzorca. Meritve s fototermično detekcijo potekajo na dvožarkovnem instrumentu (*Slika 6*). Z enim laserskim žarkom vzorec vzbujamo, z drugim pa zaznavamo nastale spremembe: vzbujevalno-tipalni sistem (Guzsvany *et al*., 2006).

Pri spektrometriji s toplotnimi lečami je določanje koncentracij posredno, saj med obsevanjem z laserskim žarkom opazujemo spremembo lomnega količnika vzorca. Ta je posledica povišane temperature v obsevanem delu vzorca, ki ustvari t.i. toplotno lečo, optični element podoben leči. Pojav toplotne leče vpliva na povečanje radija tipalnega žarka, kar se kaže kot sprememba njegove intenzitete na detektorju (Franko in Tran, 1996). Kombinacija s tekočinsko kromatografijo omogoča boljšo selektivnost, ker meritve potekajo le pri eni valovni dolžini (Franko, 2001). Tehnika HPLC-TLS je za acetamiprid zelo občutljiva, saj je maksimum absorbcije svetlobe za acetamiprid pri 242 nm, kar je zelo blizu valovni dolžini vzbujanja, ki je v našem primeru pri 244 nm.



Slika 6: *Shema HPLC-TLS (Mejač, 2006)*

V poskusu določanja štirih različnih neonikotinoidov (imidakloprid, acetamiprid, tiakloprid in tiametoksam) v krompirju in rečni vodi s pomočjo HPLC-TLS so vzorce pred analizo primerno pripravili. Homogenim zmesem krompirja so dodali znane koncentracije insekticidov in jih nato ekstrahirali z diklorometanom. Izkoristki ekstrakcij so bili med 78 in 93 %. V primeru določanja neonikotinoidov v rečni vodi niso izvajali ekstrakcij. Vzorcem vode so dodali znane koncentracije insekticidov in jih nato en teden hranili v temi pri 4 ºC. Pred meritvami so vzorce prefiltrirali preko 0,45 µm membranskih filtrov (Guzsvany *et al*., 2006).

Rezultati so pokazali, da so vrednosti LOD (limit of detection – meja detekcije) v primerjavi s HPLC-DAD za nekatere neonikotinoide tudi do 8,5-krat nižje. V primeru acetamiprida je bila vrednost LOD na HPLC-TLS 3,2 mg/kg, medtem ko je bila na HPLC-DAD 26 mg/kg (Guzsvany *et al*., 2006).

Podobne rezultate najdemo tudi pri poskusu določanja istih neonikotinoidov v medu in cvetnem prahu. Ekstrakcije so bile v tem primeru izvedene z različnimi topili in njihovimi kombinacijami. Največji izkoristki so se pokazali pri uporabi kombinacije dveh topil diklorometan-aceton (1:1, v/v); v primeru acetamiprida je bil izkoristek ekstrakcije 66 % (Mejač, 2006).

3 EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 Materiali

3.1.1 Kemikalije in reagenti

- acetamiprid - (*E*)-N^1-[(6-kloro-3-piridil)meti]-N^2-ciano-N^1-metilacetamidin, 99,9% čistost, Riedel – de Haën
- etanol, 100% vol., Riedel – de Haën
- acetonitril, J.T. Baker
- kalijev hidrogen fosfat - K_2HPO_4, > 99,5 % čistost, Fluka Chemika
- kalijev dihidrogen fosfat - KH_2PO_4, ≥ 99 % čistost, Fluka Biochemika
- goveji serumski albumin, frakcija V, Merck
- Bradford reagent, Coomasie Brilliant Blue G-250, Sigma – Aldrich
- 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB), Sigma – Aldrich
- reducirani glutation (GSH), 99% čistost, Sigma – Aldrich

3.1.2 Priprava raztopin

Standardne raztopine acetamiprida:
5 mg acetamiprida smo zatehtali v 10 mL merilno steklenico in jo dopolnili do oznake z absolutnim etanolom. Tako pripravljeno osnovno raztopino smo nadalje razredčevali v 10 mL merilnih steklenicah z deionizirano vodo do ustreznih koncentracij (od 0,005 mg/L do 25 mg/L). Do uporabe smo tako pripravljene raztopine shranjevali zaščitene pred svetlobo v hladilniku pri 4 ºC.

25 mM fosfatni pufer s pH 6,5:
Zatehtali smo 2,14 g K_2HPO_4 in 5,45 g KH_2PO_4 in ju vsakega posebej raztopili v 0.5 L deionizirane vode. Nato smo raztopini združili in dobro premešali. Pufer smo shranjevali v hladilniku pri 4 ºC in ga pred uporabo segreli na sobno temperaturo.

Raztopine govejega serumskega albumina:
100 mg govejega serumskega albumina smo raztopili v 10 mL deionizirane vode. Osnovno raztopino smo nato razredčevali v 5 mL bučkah tako, da smo v vsako dali ustrezno količino (0,1, 0,25, 0,5, 0,75 in 1 mL) in jo nato dopolnili do oznake z deionizirano vodo.

60 mM 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB):
6,1 mg CDNB smo zatehtali v čašo in ga raztopili v 500 µL absolutnega etanola. Raztopino smo pripravili za vsako serijo meritev znova, jo zaščitili s parafilmom in hranili na sobni temperaturi.

40 mM reducirani glutation (GSH):
Zatehtali smo 12,3 mg reduciranega glutationa in mu dodali 1 mL deionizirane vode. Med meritvami smo pripravljeno raztopino hranili na ledu in jo vsakokrat pripravili tik pred poskusom.

3.1.3 Instrumenti

- tehtnica Mettler Toledo AB104
- centrifuga Eppendorf 5415R
- homogenizator (namizni petstopenjski vrtalnik Nutool MC350W)
- spektrofotometer Hewlett – Packard 8453
- rotavapor Laborota 4000, Heidolph
- sistem za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti z optotermično detekcijo na osnovi spektrometrije s toplotnimi lečami
- tekočinski kromatograf Hewlett – Packard 1000 Series z DAD detektorjem

3.2 Test strupenosti

V poskusu smo uporabili odrasle kopenske enakonožne rake vrste *Porcellio scaber*, ki smo jih predhodno nabrali v predvidoma neonesnaženem okolju (okolica Ajdovščine) in jih nato gojili v laboratoriju v steklenem terariju primerne velikosti (40 × 20 cm). Na dno posode smo položili približno 5 cm debelo plast peska in jo prekrili z enako debelo plastjo prsti. Na vrh smo položili veliko količino suhih leskovih listov in razpadajočega lubja iz neonesnaženega okolja ter dodali enakonožce. Tako pripravljen terarij smo nekajkrat tedensko vlažili z deionizirano vodo in ga hranili na mračnem mestu pri sobni temperaturi.

3.2.1 Priprava hrane, nastavitev in potek poskusa

Iz posušenih in prešanih listov leske smo izrezali približno enake koščke z maso okrog 100 mg. Iz osnovne raztopine acetamiprida v etanolu s koncentracijo 500 mg/kg smo pripravili testni koncentraciji 10 in 25 mg/kg v deionizirani vodi. Na spodnjo stran vsakega izmed listov smo s pipeto nanesli 150 µL pripravljenih raztopin. Nanašali smo jih v obliki kapljic, ki smo jih nato enakomerno razmazali po celotni površini lista s čopičem. Za kontrolno skupino smo na enako pripravljene liste nanesli le deionizirano vodo. 24 ur smo jih v temi in pri sobni temperaturi sušili ter jih tik pred nastavitvijo poskusa razrezali na štiri enake dele in te naključno razvrstili znotraj posamezne testne skupine z ustrezno koncentracijo.

Za poskus smo pripravili petrijevke s premerom 9 cm, ki smo jih označili s številko organizma in koncentracijo acetamiprida na listih. V vsako smo položili ustrezno pripravljen in stehtan košček leskovega lista in testni organizem, ki smo ga predhodno stehtali. Uporabili smo mlade in odrasle (nad 30 mg) živali obeh spolov z maso med 15 in 45 mg. Vsaki koncentraciji smo izpostavili 24 živali. Preden smo petrijevke zaprli, smo jim dobro navlažili pokrovčke. Nato smo jih zložili v večjo plastično posodo s pokrovom ter jih pokrili z navlaženimi papirnatimi brisačami. Posodo smo za 14 dni postavili v mračen prostor s temperaturo okoli 20 ºC in jo dobro navlažili.

Med poskusom smo spremljali smrtnost, maso in količino pojedene hrane. Redno smo skrbeli tudi za zadostno količino vlage v petrijevkah in posodi. Živali smo tehtali vsak drugi dan, liste pa le prvi in zadnji dan. Pred tehtanjem smo jih sušili na zraku pri sobni temperaturi 24 ur. Če je žival pojedla pred iztekom poskusa cel list, smo ji dodali novega. Iztrebke smo pobrali sedmi in zadnji dan. Pred tehtanjem smo jih sušili na zraku pri sobni temperaturi dva dni.

Po končanem dvotedenskem poskusu smo preživele živali homogenizirali na ledu v 1 mL fosfatnega pufra s pH 6,5. Homogenate smo prenesli v mikrocentrifugirke in jih takoj zamrznili. Pred meritvami smo počasi odtajali le nekaj vzorcev hkrati in jih centrifugirali 10 minut pri 9000 obratih na minuto. V supernatantu vsakega homogenata smo izmerili vsebnost proteinov in aktivnost glutation S-transferaze ter skušali s tehnikama HPLC-TLS in HPLC-DAD določiti vsebnost acetamiprida. Vzorce smo med meritvami hranili na ledu. Koncentracije smo določili tudi na listih.

3.3 Biokemijske in kemijske metode

3.3.1 Ekotoksikološki del

3.3.1.1 Vsebnost proteinov

Proteine smo v homogenatih živali določili kvantitativno z uporabo Bradfordove metode, ki temelji na spektrofotometričnemu določanju pri 595 nm. Pri tem smo uporabili Bradfordov reagent Coomasie Brilliant Blue G-250, ki reagira s proteini v vzorcu. V osnovi je rdeče barve, po vezavi na proteine pa preide v modro. Reakcija je dokaj hitra, saj poteče že po približno petih minutah. Obarvanost ostane enaka približno eno uro (Bradford, 1976).

V 3 mL kiveto smo dali 50 µL supernatanta iz homogenata in mu dodali 1,5 mL Bradfordovega reagenta. Po približno pol ure smo merili absorbanco na spektrofotometru pri 595 nm proti slepemu vzorcu (1,5 mL Bradfordovega reagenta). Iz govejega serumskega albumina smo pripravili proteinske standarde, ki smo jih uporabili za izdelavo umeritvene krivulje. Delali smo v dveh ponovitvah in za vsak vzorec izračunali povprečno vrednost.

3.3.1.2 Aktivnost glutation S-transferaze

Aktivnost encima glutation S-transferaze smo izmerili po prirejeni metodi po Habigu (1974). Encim omogoča konjugacijo substrata 1-kloro-2,4-dinitrobenzena (CDNB) z reduciranim glutationom (GSH), pri čemer nastane dinitrofenil tioeter. Produkt encimske reakcije smo določali spektrofotometrično pri valovni dolžini 340 nm.

V testno kiveto smo v točno določenem zaporedju dali 900 µL fosfatnega pufra, 25 µL 1-kloro-2,4-dinitrobenzena (CDNB) in 50 µL reduciranega glutationa (GSH). Absorbanco ozadja tako pripravljene raztopine smo merili 5 minut, potem pa smo ji dodali 25 µL supernatanta posameznega homogenata in merili še nadaljnjih 5 minut. Delali smo v najmanj dveh paralelkah (če sta bili dve meritvi istega vzorca med seboj zelo različni, smo ju ponovili). Za vsako meritev je potrebno znova izmeriti absorbanco ozadja. Kiveto smo med posameznimi vzorci dobro spirali z etanolom in destilirano vodo, da smo odstranili morebitne ostanke v vodi slabo topnega CDNB.

Aktivnost GST smo dobili iz razlike med absorbanco raztopine z vzorcem in absorbanco raztopine brez vzorca. Absorbance smo izračunali po formuli $A=\varepsilon \times c \times l$. Molarni ekstinkcijski koeficient ε za CDNB je pri 340 nm 9600 $cm^{-1}M^{-1}$. Specifična aktivnost je količina encima, ki omogoča nastanek 1 nmol dinitrofenil-tioetra v minuti.

3.3.1.3 Analiza podatkov

Organizme, ki so med poskusom poginili, smo upoštevali le pri določanju smrtnosti. Spremembo mase smo za vsako žival posebej izračunali iz razlike med telesno maso zadnji dan in telesno maso prvi dan. Podobno smo določili količino zaužite hrane, ki smo jo izračunali iz razlike med maso ostanka lista zadnji dan in maso lista pred nastavitvijo poskusa. Za vsako žival posebej smo jo podali na maso živali zadnji dan. Na podlagi mase pojedenih listov C in mase iztrebkov F smo izračunali asimilacijsko učinkovitost AE za vsako žival posebej: $AE = (C - F)/C$.

Dobljene podatke smo razvrstili po skupinah glede na koncentracije acetamiprida na listih, ki smo jih uporabili v poskusu. Predstavili smo jih v tabelaričnih (*Priloge*) in grafičnih oblikah (*Rezultati*). Vrednosti na grafih so predstavljene individualno, v kombinaciji z mediano. Rezultate smo statistično ovrednotili z uporabo neparametrijskega Mann – Whitney testa za obdelavo majhnega števila podatkov, ki niso normalno porazdeljeni in primerjavo posameznih skupin s kontrolno skupino. Primerjali smo razlike v posameznih rezultatih glede na mediane vseh izpostavljenih skupin.

3.3.2 Analitski del

Za meritve na HPLC-TLS in HPLC-DAD smo homogenate testnih organizmov najprej centrifugirali 10 minut pri 9000 obratih na minuto. Pred meritvami smo jih prefiltrirali preko 0,45 µm membranskih filtrov.

3.3.2.1 Določanje acetamiprida s HPLC-TLS

Podobno kot v poskusu določanja nekaterih neonikotinoidov s HPLC-TLS (Guzsvany *et al*., 2006) smo za optotermični spektrometer uporabili Ar-ionski laser (Coherent, Sabre Motofred, 244 nm, 80 mW), He-Ne laser (Uniphase, Model 1103P, 632,8 nm, 2 mW) in silicijevo diodo (Laser Components, OSD 5-E). Fazno vpeti ojačevalnik (Stanford research, SR-830) je služil zaznavanju intenzitete tipalnega žarka, uporabili pa smo tudi mehansko prekinjalo (Scientific Instruments, Model 300) in črpalko (Thermo Separation Products, Spectra System P400).

Kromatografski pogoji za HPLC-TLS:

Kolona: Hypersil ODS (150 mm x 4,6 mm)
Stacinarna faza: oktadecilsilil, C_{18} (premer delcev polnila 5 µm)
Mobilna faza: 3 : 7 (v/v) acetonitril : 10 mM amonijev acetat
Pretok: 1mL/min
Elucija: izokratična
Detektor: silicijeva dioda
Valovna dolžina merjenja: 244 nm
Frekvenca vzbujanja: 80 Hz
Časovna konstanta ojačevalnika: 1 s
Volumen injiciranja: 20µL
Temperatura: 25 – 28 ºC

Čas analize: 6 minut
Retencijski čas za acetamiprid: 3,99 min

3.3.2.2 Določanje acetamiprida s HPLC-DAD

Kromatografski pogoji za HPLC-DAD:

Kromatograf: Hewlett – Packard Agilent 1100 Series
Kolona: Hypersil ODS (150 mm x 4,6 mm)
Stacinarna faza: oktadecilsilil, C_{18} (premer delcev polnila 5 µm)
Mobilna faza: 7:3 (v/v) 10 mM amonijev acetat : acetonitril
Detektor: spektrofotometrijski detektor z diodno matriko (DAD – diode array detector)
Valovna dolžina merjenja: 254 nm

Pretok: 1mL/min
Elucija: izokratična
Volumen injiciranja: 20 µL
Temperatura: 25 – 28 ºC

Čas analize: 8 minut
Retencijski čas za acetamiprid: 3,99 min

3.3.2.3 Določanje koncentracij acetamiprida na listih

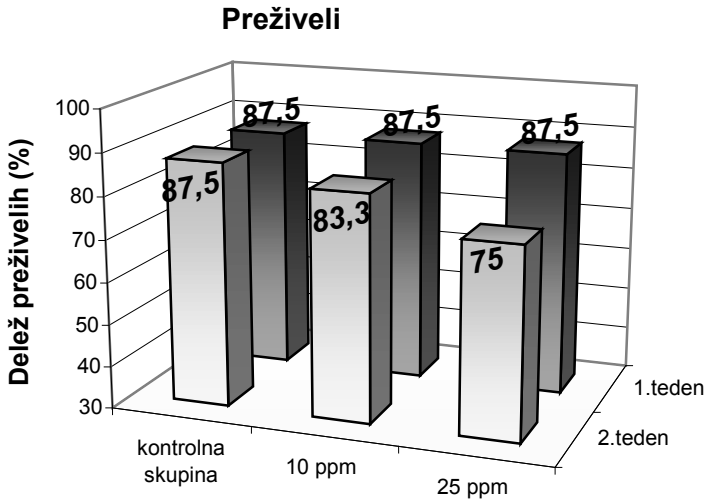
Acetamiprid na listih smo določali s pomočjo tehnik HPLC-DAD in HPLC-TLS. Za pripravo vzorcev smo naredili ekstrakcije z acetonitrilom. V tarilnici smo strli 500 mg listov z določeno koncentracijo acetamiprida in jih prenesli v čašo. Dodali smo 20 mL acetonitrila in mešali s steklenim mešalom 10 minut. Nato smo supernatant kvantitativno preko filter papirja prenesli v bučko za uparevanje. Postopek smo ponovili še dvakrat s 15 mL acetonitrila.

Na rotavaporju smo skupni ekstrakt pri 50 ºC in 90 obratih na minuto odparili do suhega. Suhi preostanek smo raztopili v 5 mL deionizirane vode. Raztopino smo nato ponovno ekstrahirali z ekstrakcijo na trdnem nosilcu t.i. SPE (solid phase extraction). Kolono C_{18} smo najprej predhodno pripravili s 5 mL metanola in 5 mL deionizirane vode, ter jo s tokom zraka osušili. Nato smo preko kolone nanesli vodno raztopino suhega preostanka. Adsorbirane snovi smo eluirali z 1 mL metanola, vzorec ponovno uparili in suhi preostanek raztopili v mobilni fazi (7 : 3 (v/v) 10 mM amonijev acetat : acetonitril).

4 REZULTATI

4.1 Ekotoksikološki del

4.1.1 Vpliv acetamiprida na smrtnost kopenskih enakonožnih rakov vrste *Porcellio scaber*



Slika 7: *Delež preživelih testnih organizmov po prvem in po drugem tednu izpostavljenosti deionizirani vodi (kontrolna skupina) ter 10 in 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista. Temnejši stolpi v ozadju prikazujejo delež preživelih v posameznih skupinah po prvem tednu, stolpi v ospredju pa delež preživelih v vsaki izmed skupin po končani dvotedenski izpostavitvi. Število testnih organizmov je bilo na prvi dan poskusa v vsaki skupini 24.*

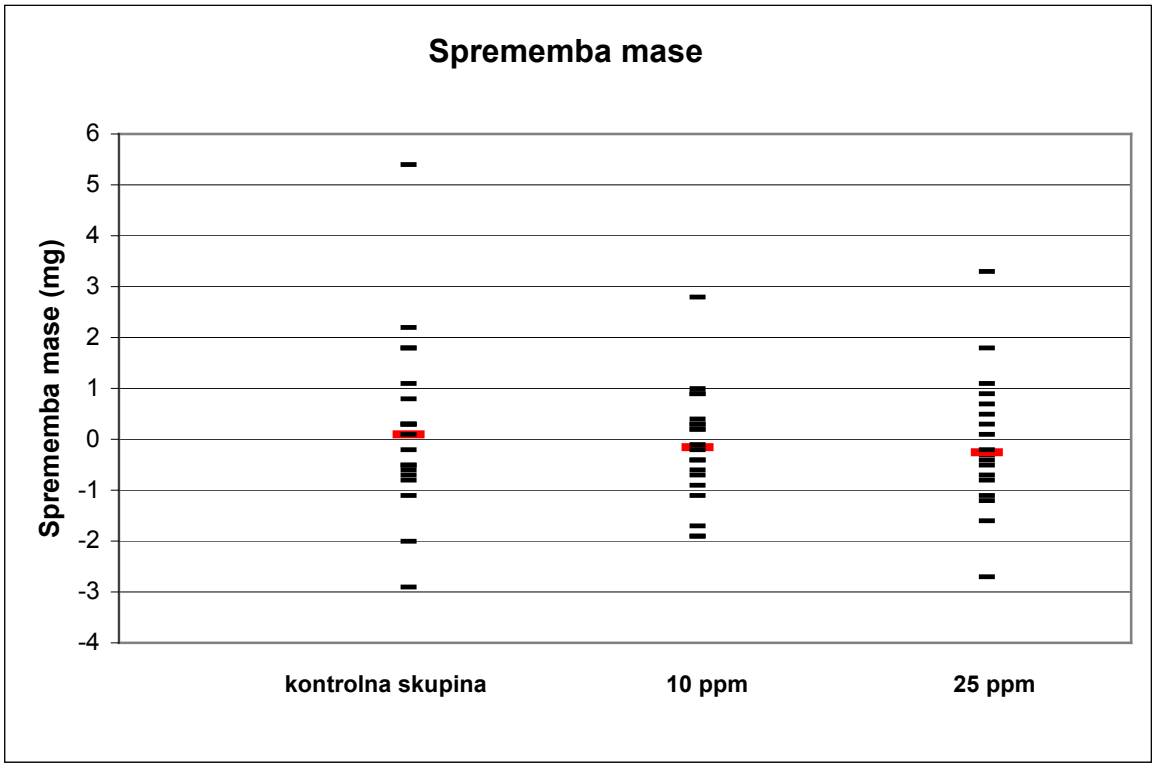
Smrtnost smo opazili tako v kontrolni skupini, kot tudi v skupinah, kjer so bili testni organizmi izpostavljeni 10 in 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista (*Tabela 5*).

Po prvem tednu so v vsaki skupini poginile tri živali, po drugem tednu pa se je povišana smrtnost pokazala pri organizmih, izpostavljenih acetamipridu. V skupini, ki je bila izpostavljena 10 µg acetamiprida/g suhe mase lista je v drugem tednu poginila še ena žival, v skupini, izpostavljeni 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista pa tri.

Tabela 5: *Število poginulih testnih organizmov vrste Porcellio scaber v prvem in drugem tednu izpostavitve destilirani vodi ter 10 in 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista*

	kontrolna skupina	10 µg acetamiprida/g suhe mase lista	25 µg acetamiprida/g suhe mase lista
število izpostavljenih živali	24	24	24
število poginulih 1. teden	3	3	3
število poginulih 2. teden	0	1	3
smrtnost	12,5 %	16,7 %	25 %

4.1.2 Vpliv acetamiprida na spremembo telesne mase kopenskih enakonožnih rakov vrste *Porcellio scaber*



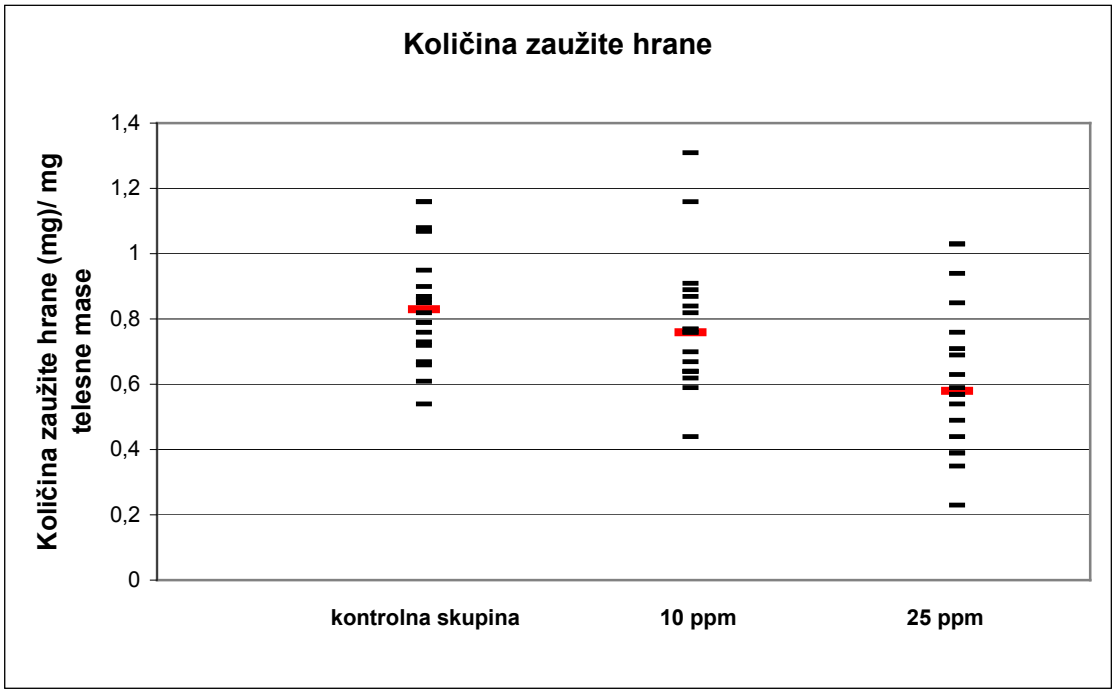
Slika 8: *Sprememba telesne mase posameznih testnih organizmov v mg po dvotedenski izpostavitvi deionizirani vodi (kontrolna skupina) ter 10 in 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista. Daljše rdeče linije prikazujejo vrednosti median po posameznih skupinah ($N_{kontrolna\ skupina}$=21, $N_{10\ ppm}$=20, $N_{25\ ppm}$=18).*

Sprememba telesne mase je bila v vseh treh izpostavljenih skupinah podobna, nekoliko bolj variabilna je bila le v skupini, ki ni bila izpostavljena acetamipridu. Vrednost mediane je bila v kontrolni skupini 0,1 mg telesne mase, saj je 11 pridobilo med 0,1 in 5,4 mg. 9 je izgubilo telesno maso in sicer v intervalu med 0,2 do 0,8 mg.

Pri živalih, ki so bile izpostavljene acetamipridu, sta srednji vrednosti spremembe telesne mase sicer negativni, vendar bistveno ne odstopata od kontrolne skupine, saj so razlike zelo majhne. V skupini, izpostavljeni 10 µg acetamiprida/g suhe mase lista je bila vrednost mediane -0,15. 8 je pridobilo nekaj mase, in sicer od 0,2 do 2,8 mg, 11 pa je izgubilo od 0,1 do 1,9 mg. V skupini, izpostavljeni 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista je bila vrednost mediane -0,25 mg, od tega je 8 pridobilo med 0,1 in 3,3 mg, 10 pa izgubilo med 0,2 in 2,7 mg.

Statistično značilnih razlik (Mann-Whitney, $p<0,05$) med spremembami telesnih mas živali v izpostavljenih skupinah v primerjavi s kontrolno skupino ni.

4.1.3 Vpliv acetamiprida na količino zaužite hrane pri kopenskih enakonožnih rakih vrste *Porcellio scaber*

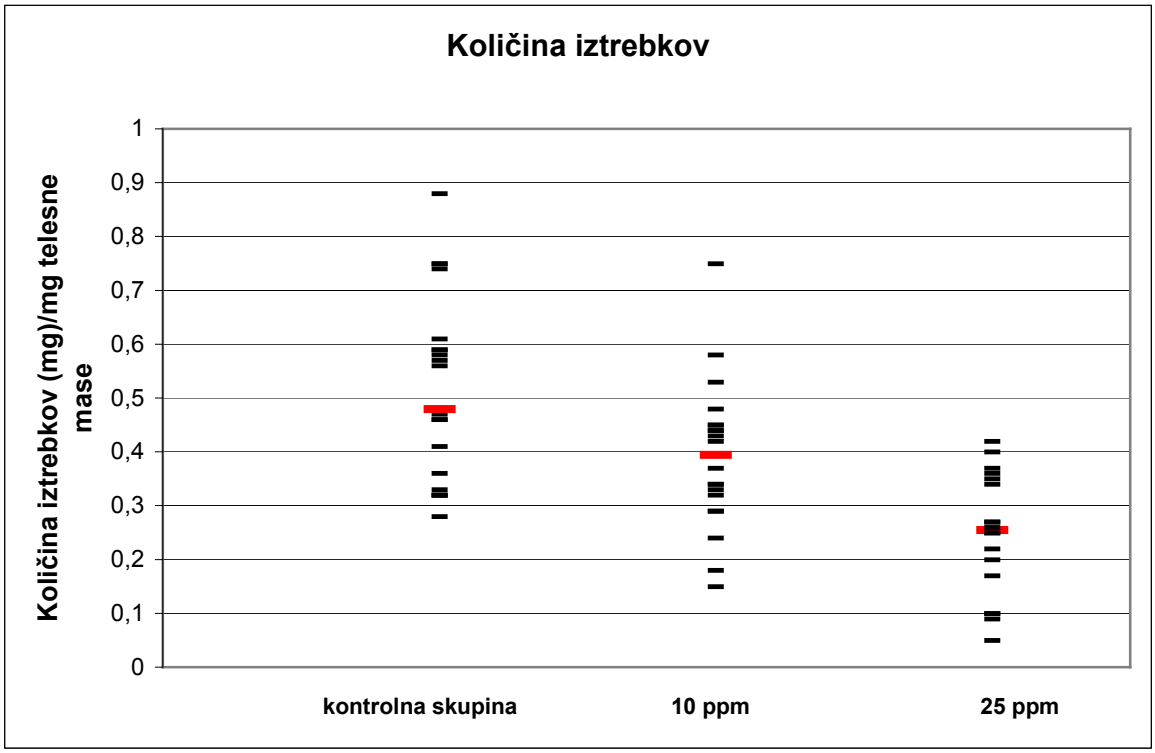


Slika 9: *Količina zaužite hrane (mg lista/mg telesne mase zadnji dan izpostavljenosti) pri testnih organizmih izpostavljenih deionizirani vodi (kontrolna skupina) ter 10 in 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista. Daljše rdeče linije prikazujejo vrednosti median po posameznih skupinah. ($N_{kontrolna\ skupina}$=21, $N_{10\ ppm}$=20, $N_{25\ ppm}$=18).*

Skupina, ki ni bila izpostavljena acetamipridu je zaužila največ hrane, z vrednostjo mediane 0,83 mg na telesno maso živali zadnji dan izpostavljenosti. Skupini, ki sta bili izpostavljeni acetamipridu, sta zaužili manj hrane. Skupina, izpostavljena 10 µg acetamiprida/g suhe mase lista, je imela vrednost mediane 0,76 mg hrane na telesno maso zadnji dan izpostavljenosti. Skupina, izpostavljena 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista, je zaužila precej manj hrane. Vrednost mediane je v tej skupini znašala le 0,58 mg na telesno maso zadnji dan izpostavljenosti.

Statistično značilen upad količine zaužite hrane (Mann-Whitney, $p<0,05$) je prisoten v skupini izpostavljeni 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista v primerjavi s kontrolno skupino.

4.1.4 Vpliv acetamiprida na količino iztrebkov pri kopenskih enakonožnih rakih vrste *Porcellio scaber*

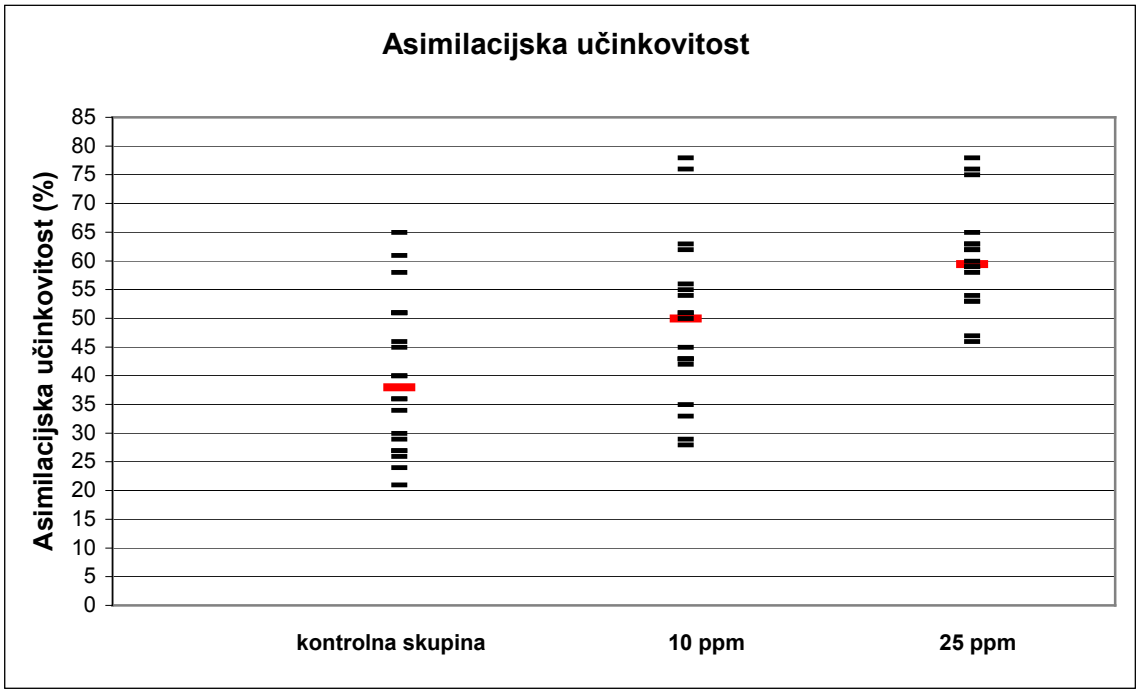


Slika 10: *Količina iztrebkov (mg/mg telesne mase zadnji dan izpostavljenosti) pri testnih organizmih izpostavljenih deionizirani vodi (kontrolna skupina) ter 10 in 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista. Daljše rdeče linije prikazujejo vrednosti median po posameznih skupinah. ($N_{kontrolna\ skupina}$=21, $N_{10\ ppm}$=20, $N_{25\ ppm}$=18).*

Med dvotedensko izpostavitvijo je bila količina iztrebkov pri kontrolni skupini najbolj variabilna. Vrednost mediane je znašala v tej skupini 0,48 mg iztrebkov na mg telesne mase zadnji dan izpostavljenosti. Živali v skupinah, ki sta bili izpostavljeni acetamipridu, sta izločili manj iztrebkov, opažen je bil upad količine iztrebkov v odvisnosti od koncentracije. Pri izpostavitvi 10 µg acetamiprida/g suhe mase lista je bila vrednost mediane 0,39 mg na mg telesne mase zadnji dan izpostavljenosti, pri izpostavitvi 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista pa še nekoliko nižja, in sicer 0,25 mg na mg telesne mase zadnji dan izpostavljenosti.

Statistično značilen upad količine iztrebkov (Mann-Whitney, $p<0,05$) je v primerjavi s kontrolno skupino prisoten v obeh skupinah, ki sta bili izpostavljeni acetamipridu.

4.1.5 Vpliv acetamiprida na asimilacijsko učinkovitost pri kopenskih enakonožnih rakih vrste *Porcellio scaber*

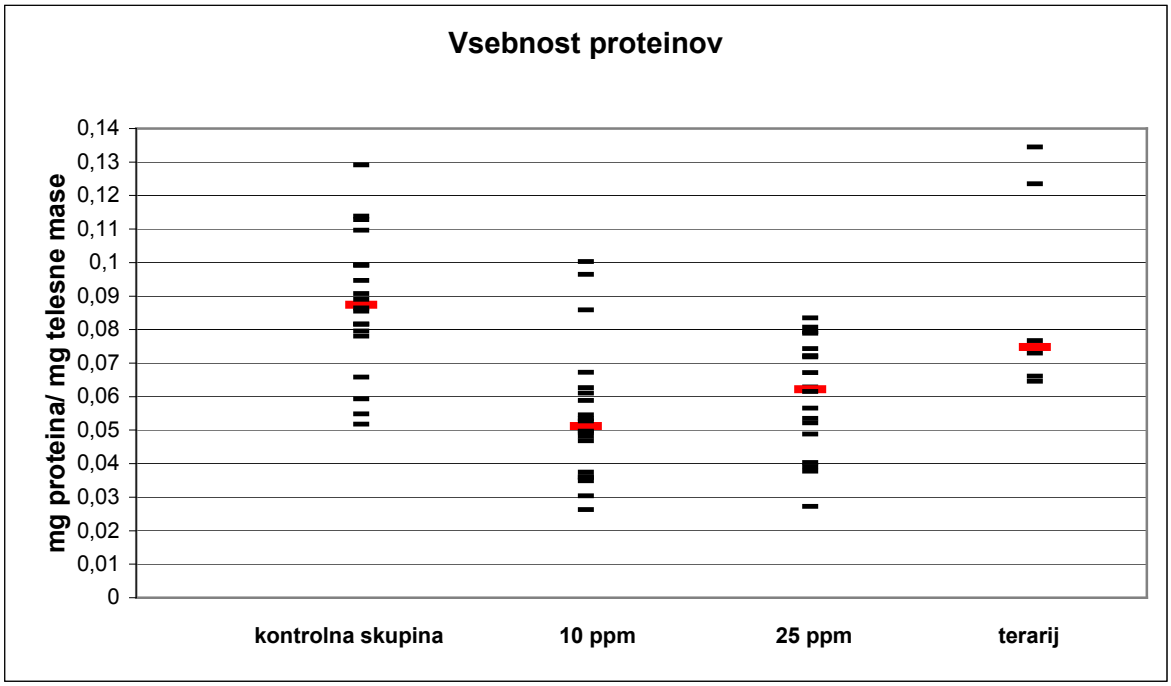


Slika 11: *Asimilacijska učinkovitost testnih organizmov izpostavljenih deionizirani vodi (kontrolna skupina) ter 10 in 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista. Daljše rdeče linije prikazujejo vrednosti median po posameznih skupinah. ($N_{kontrolna\ skupina}$=21, $N_{10\ ppm}$=20, $N_{25\ ppm}$=18).*

Učinkovitost asimilacije je bila bolj variabilna v primeru kontrolne skupine in skupine, izpostavljene 10 µg acetamiprida/g suhe mase lista. Opažen je bil trend zviševanja asimilacijske učinkovitosti v odvisnosti od koncentracije acetamiprida, dodanega v hrano. V kontrolni skupini je bila asimilacijska učinkovitost najnižja z vrednostjo mediane 38 %. Pri skupini živali, ki je bila izpostavljena 10 µg acetamiprida/g suhe mase lista, je dosegla nekoliko višjo vrednost, in sicer 50 %. V skupini, izpostavljeni 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista, pa je bila še višja, 59,5 %.

Statistično značilen porast asimilacijske učinkovitosti (Mann-Whitney, $p<0,05$) je v primerjavi s kontrolno skupino prisoten v obeh skupinah, ki sta bili izpostavljeni acetamipridu.

4.1.6 Vpliv acetamiprida na vsebnost proteinov v homogenatih kopenskih enakonožnih rakov vrste *Porcellio scaber*



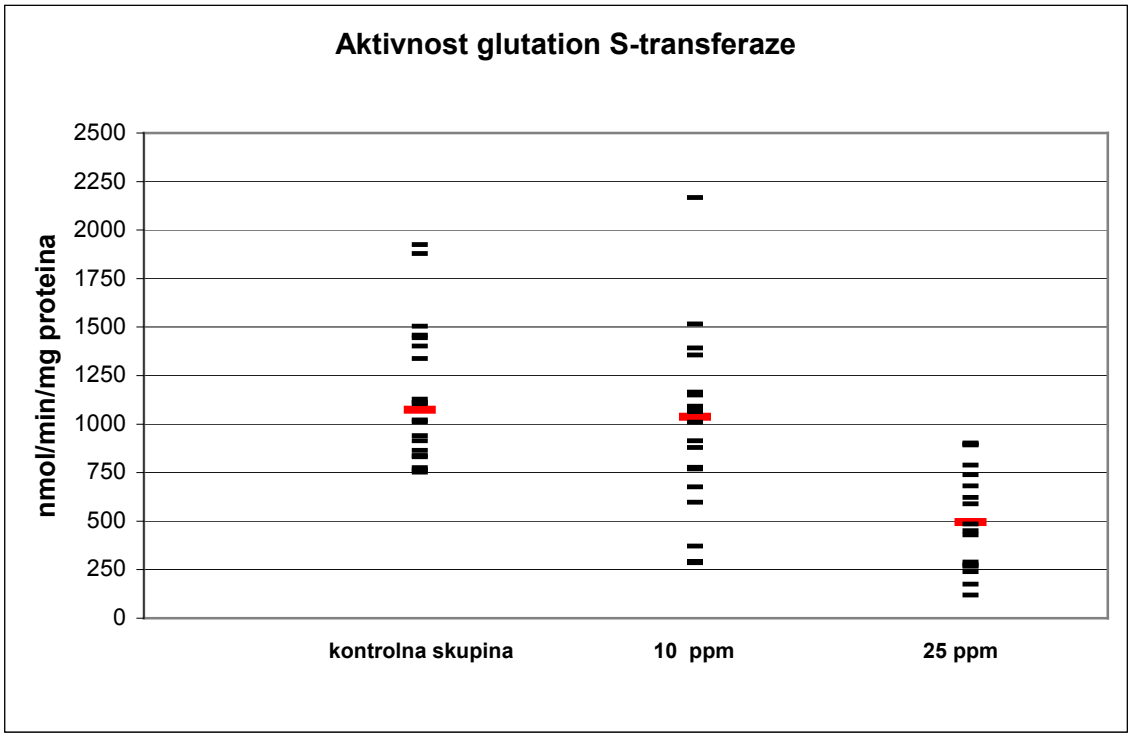
Slika 12: *Vsebnost proteinov (mg/mg telesne mase) v homogenatih testnih organizmov iz terarija in tistih, ki so bili izpostavljeni deionizirani vodi (kontrolna skupina) ter 10 in 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista. Daljše rdeče linije prikazujejo vrednosti median po posameznih skupinah. ($N_{kontrolna\ skupina}$=21, $N_{10\ ppm}$=20, $N_{25\ ppm}$=18, $N_{terarij}$=6).*

Vsebnost proteinov je bila variabilna pri živalih, ki niso bile izpostavljene acetamipridu in v skupini, izpostavljeni 10 µg acetamiprida/g suhe mase lista. Najvišja vsebnost proteinov je bila ugotovljena v kontrolni skupini, kjer je bila vrednost mediane 0,087 mg proteina na mg telesne mase živali zadnji dan izpostavljenosti. Za primerjavo smo preverili vsebnost proteinov tudi v živalih, ki jih v poskusu nismo uporabili. Tudi tu je bila vsebnost proteinov višja kot pri osebkih izpostavljenih acetamipridu, vendar je bilo število osebkov precej manjše, zato so ti rezultati niso zanesljivi.

V skupini, ki je bila izpostavljena 10 µg acetamiprida/g suhe mase lista, je bila vsebnost proteinov najmanjša z vrednostjo mediane 0,051 mg proteina na mg telesne mase živali zadnji dan izpostavljenosti. Skupina, izpostavljena 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista, pa je imela vrednost mediane nekoliko višjo, in sicer 0,062 mg proteina na mg telesne mase živali zadnji dan izpostavljenosti.

Statistično značilen upad vsebnosti proteinov (Mann-Whitney, $p<0,05$) je v primerjavi s kontrolno skupino prisoten v obeh skupinah, ki sta bili izpostavljeni acetamipridu.

4.1.7 Vpliv acetamiprida na aktivnost glutation S-transferaze v homogenatih kopenskih enakonožnih rakov vrste *Porcellio scaber*



Slika 13: *Aktivnost glutation S-transferaze (nmol/min/mg proteina) v homogenatih testnih organizmov, ki so bili izpostavljeni deionizirani vodi (kontrolna skupina) ter 10 in 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista. Daljše rdeče linije prikazujejo vrednosti median po posameznih skupinah. ($N_{kontrolna\ skupina}$=21, $N_{10\ ppm}$=20, $N_{25\ ppm}$=18).*

Aktivnost glutation S-transferaze je bila najbolj variabilna v skupini, izpostavljeni 10 µg acetamiprida/g suhe mase lista. Vrednost mediane je bila v tej in kontrolni skupini podobna, 1038,2 in 1078,9 nmol/min/mg proteina. Precej nižjo aktivnost je bilo opaziti pri skupini, izpostavljeni 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista. Tu je bila vrednost mediane 520 nmol/min/mg proteina.

Statistično značilen upad aktivnosti glutation S-transferaze (Mann-Whitney, $p<0,05$) je v primerjavi s kontrolno skupino prisoten v skupini, izpostavljeni 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista.

4.1.8 Diskusija

V dvotedenskem prehranjevalnem poskusu smo spremljali vplive acetamiprida na kopenske enakonožne rake vrste *Porcellio scaber*. V ta namen smo izpostavili acetamipridu preko hrane živali različnih starostnih skupin z maso med 15 in 45 mg. Za živali v kontrolni skupini (24 živali) smo na liste dodali le deionizirano vodo, za ostali dve skupini (v vsaki 24 živali) pa smo na liste dodali acetamiprid s končno koncentracijo na listih 10 µg acetamiprida/g suhe mase lista, oziroma 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista.

V vseh skupinah je tekom dvotedenskega poskusa nekaj živali poginilo, vendar so se razlike pokazale šele v drugem tednu izpostavljenosti. V prvem tednu je v vsaki skupini poginilo primerljivo število živali (v vsaki po tri), kar je verjetno posledica stresa in spremembe življenjskega okolja ter morebitne poškodovanosti. V drugem tednu je v skupini, izpostavljeni 10 µg acetamiprida/g suhe mase lista poginila še ena žival, v skupini, izpostavljeni 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista pa še tri. Blažič (2006) je v magisterskem delu ugotovila, da imidakloprid, neonikotinoid iz iste skupine insekticidov, pri enakih koncentracijah, kot smo jih uporabili v naših eksperimentih, ne vpliva na povečanje smrtnosti živali. Kljub rezultatom, ki sicer nakazujejo statistično pomembne vplive acetamiprida na preživetje, pa tudi mi ne moremo trditi, da je višja smrtnost testnih organizmov posledica izpostavljenosti izbranim koncentracijam. Smrtnost v drugem tednu je prav tako lahko posledica stresa in poškodovanosti, le da so bili ti osebki nekoliko odpornejši in so dalj časa kljubovali novim razmeram. Pomembno je upoštevati tudi število izpostavljenih organizmov, ki je bilo v primerjavi z Blažič (2006) skoraj za dve tretjini manjše.

Živali, ki so bile izpostavljene izbranim koncentracijam acetamiprida, so v primerjavi s kontrolno skupino pojedle manj hrane na enoto telesne mase. Rezultati kažejo, da so pri najvišji koncentraciji acetamiprida zaužile najmanj hrane. Tudi pri koncentraciji 10 µg acetamiprida/g suhe mase lista so zaužile manj hrane v primerjavi s kontrolno skupino, vendar več v primerjavi s skupino, izpostavljeno 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista. Razlog temu je verjetno dejstvo, da so enakonožni raki vrste *Porcellio scaber* sposobni ločiti med kontaminirano in nekontaminirano hrano (Zidar, 2005). Vnose visokih koncentracij kemikalij v telo lahko preprečijo z zmanjšano količino zaužite kontaminirane hrane; v nekaterih primerih lahko tudi prenehajo jesti (Drobne *et al*., 1995). Posledica manjših količin zaužite hrane in povečane učinkovitosti asimilacije z naraščanjem koncentracije acetamiprida, je tudi ustrezna količina iztrebkov. Ta je bila v kontrolni skupini največja, kar je posledica manj učinkovite asimilacije v primerjavi z organizmi, izpostavljenimi kontaminirani hrani, kjer je bila količina iztrebkov precej manjša.

Med poskusom so se spreminjale telesne mase izpostavljenih organizmov. Trendov, ki bi nakazovali vplive acetamiprida na spremembo telesne mase, nismo opazili. V vsaki izmed skupin so osebki izgubljali in pridobivali telesno maso. Tudi srednje vrednosti so se med seboj le malenkostno razlikovale. Podobne rezultate je v svoji raziskavi dobila tudi Blažič (2006) in pri tem ugotovila, da je to najverjetneje posledica višje asimilacijske učinkovitosti organizmov, ki so bili izpostavljeni insekticidu. Ta je odvisna od količine pojedene hrane in količine iztrebkov. Živali, ki so bile izpostavljene insekticidu so v primerjavi s kontrolno skupino zaužile precej manj hrane, vendar so jo zelo dobro izrabile, kar kažejo tudi izračunane vrednosti asimilacijske učinkovitosti v našem poskusu (*Priloge, Tabela 4*).

Ker smo tudi mi zabeležili asimilacijsko učinkovitost, ki narašča s koncentracijo acetamiprida v hrani, lahko trdimo, da so povečane vrednosti pri kopenskih enakonožnih rakih vrste *Porcellio scaber* posledica prehranjevanja s hrano, kateri je bil dodan acetamiprid.

V vseh preživelih živalih smo ob koncu prehranjevalnega poskusa določili vsebnost proteinov. Najnižje vrednosti so se pokazale pri skupini, izpostavljeni 10 µg acetamiprida/g suhe mase lista, nekoliko višje so bile v skupini, izpostavljeni 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista, najvišje pa v kontrolni skupini in pri živalih iz terarija.

Rezultati se sicer ujemajo s predpostavko, ki smo jo omenili v teoretičnem delu, da kemikalije zmanjšujejo vsebnost proteinov v organizmu zaradi spremembe njihovega delovanja in posledično večje porabe energijskih rezerv, vendar moramo upoštevati, da se taki vplivi pokažejo šele po daljšem časovnem obdobju (en mesec ali več) izpostavljenosti, kar je ugotovila tudi Blažič (2006). Da je dvotedenska izpostavitev prekratka lahko sklepamo tudi po tem, da so dobljene vrednosti z izjemo skupine, ki je bila izpostavljena 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista, precej variabilne in da so se najnižje vrednosti pokazale pri skupini, izpostavljeni 10 µg acetamiprida/g suhe mase lista, kar je v nasprotju s podatki iz literature. Variabilnost rezultatov lahko utemeljimo s tem, da so bolj občutljivi organizmi verjetno prej zaznali spremembe, ki jih povzroča izpostavljenost acetamipridu in se različno odzvali nanje. Ti rezultati so lahko deloma tudi posledica različnih starostnih skupin testnih organizmov, ki smo jih uporabili v poskusu, saj imajo mlade živali drugačno strukturo telesa, predvsem kutikule. Tudi stres in slabše zdravstveno stanje nekaterih testnih organizmov sta mogoče prispevala k spremenljivim in težko primerljivim rezultatom, ki smo jih v našem poskusu dobili.

Po končani izpostavitvi smo v homogenatih preživelih živali določili tudi aktivnost encima glutation S-transferaze. Ta je bila v kontrolni skupini in skupini, izpostavljeni 10 µg acetamiprida/g suhe mase lista zelo podobna, pri slednji le nekoliko bolj variabilna. Blažič (2006) je pri skupini, ki jo je izpostavila 10 µg imidakloprida/g suhe mase lista, ugotovila manjši porast in sklepala, da je posledica detoksifikacijskih procesov in nastajanja glutationskih konjugatov. Pri našem poskusu teh trendov nismo opazili.

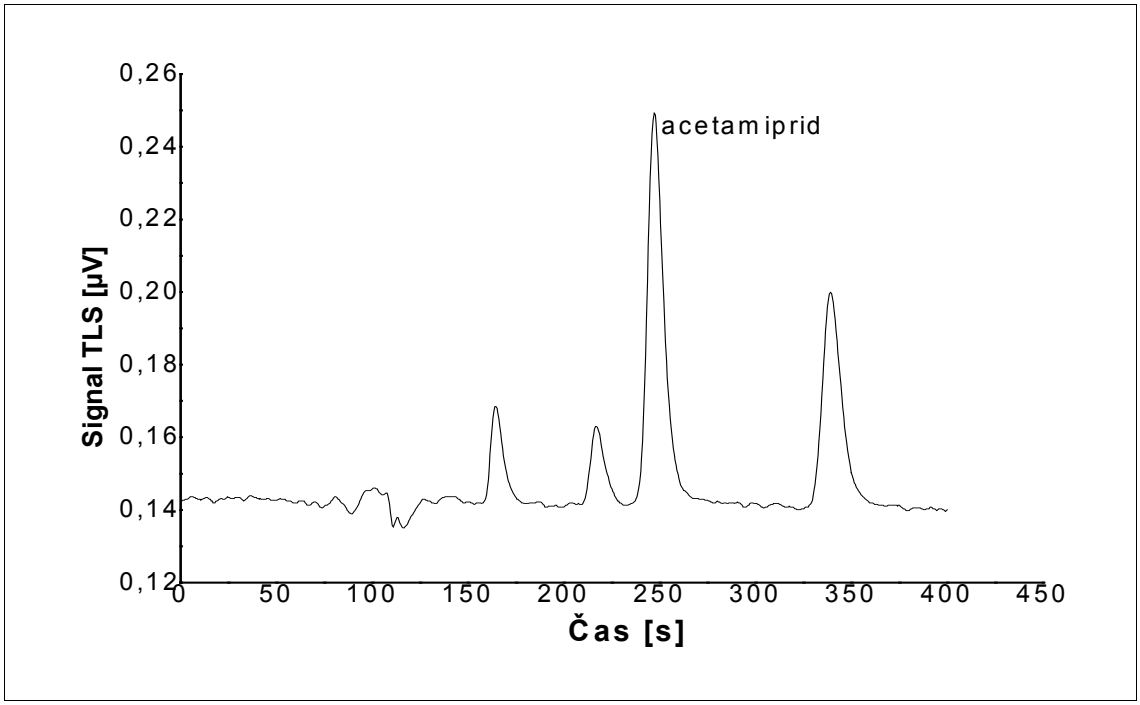
Aktivnost glutation S-transferaze je v določeni meri odvisna tudi od vsebnosti proteinov. Ta je bila v skupini, ki je bila izpostavljena 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista nekoliko nižja in manj variabilna, kar je vplivalo na dobljene rezultate. V tej skupini se je namreč pokazal znaten upad aktivnosti glutation S-transferaze, ki ga je pri svojem poskusu v skupini z enako koncentracijo imidakloprida na listih ugotovila tudi Blažič (2006). Sklepala je, da je zmanjšana aktivnost glutation S-transferaze posledica povišane asimilacijske učinkovitosti. Količino asimiliranega acetamiprida smo izračunali iz srednje vrednosti količine zaužite hrane na mg telesne mase in asimilacijske učinkovitosti. Živali, ki so bile izpostavljene 10 µg acetamiprida/g suhe mase lista, so v povprečju asimilirale 3,8 ng acetamiprida na mg telesne mase. Tiste, ki so bile izpostavljene 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista, pa kar 9,3 ng acetamiprida na mg telesne mase, kar je skoraj 2,5-krat več. Zaradi boljšega izkoristka pojedene hrane pride do vnosa bistveno večjih koncentracij insekticida v telo, kar povzroča izčrpanost organizma in posledično manjšo encimsko aktivnost. Ta se pri živalih, ki so bile izpostavljene 10 µg acetamiprida/g suhe mase lista verjetno ni pokazala zato, ker so bile koncentracije acetamiprida v organizmu še vedno obvladljive in niso porušile detoksifikacijskih mehanizmov.

4.2 Analitski del

4.2.1 Določanje acetamiprida s HPLC-TLS

4.2.1.1 Določanje znanih koncentracij acetamiprida s HPLC-TLS

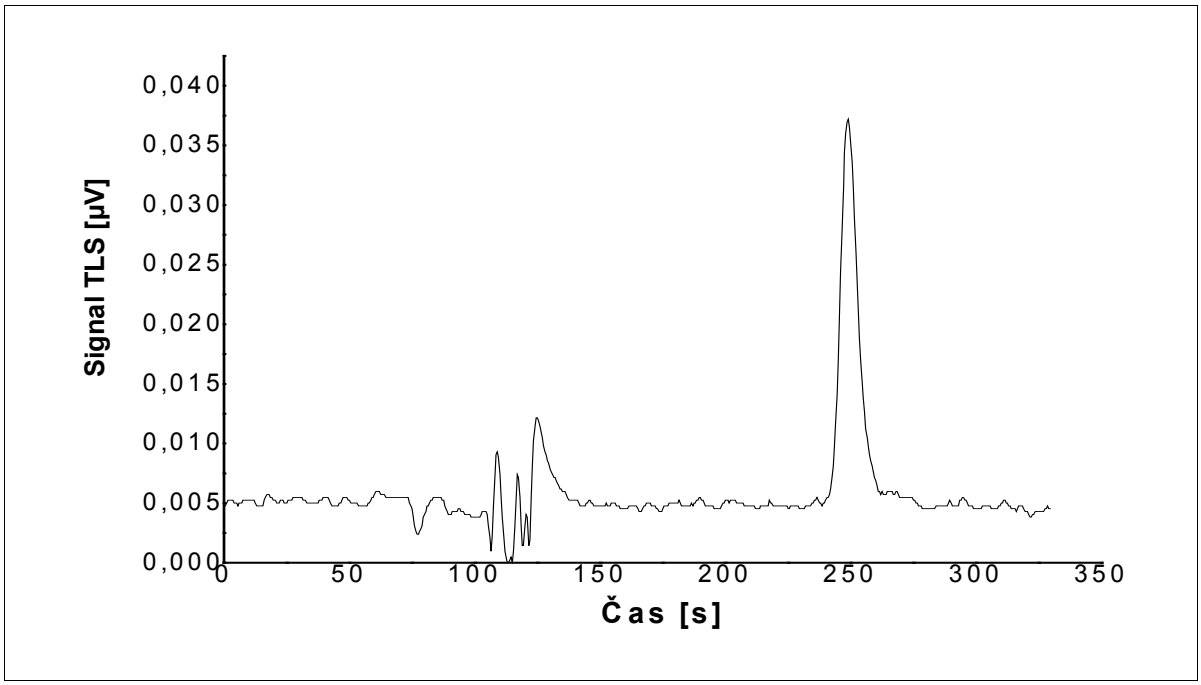
V poskusu določanja neonikotinoidov s HPLC-TLS (Guzsvany *et al*., 2006) so opazovali štiri različne neonikotinoide: tiametoksam, imidakloprid, acetamiprid in tiakloprid. Na *Sliki 14* je kromatogram, ki prikazuje vse štiri s koncentracijo 0,2 mg/L v deionizirani vodi. Acetamiprid je med vsemi najboljše viden, saj je njegov maksimum absorbcije svetlobe pri 242 nm, kar je zelo blizu valovni dolžini vzbujanja, ki je 244 nm.



Slika 14: *Kromatogram standardnih raztopin neonikotinoidov s koncentracijo 0,2 mg/L. Moč vzbujanja je 80 mW.*

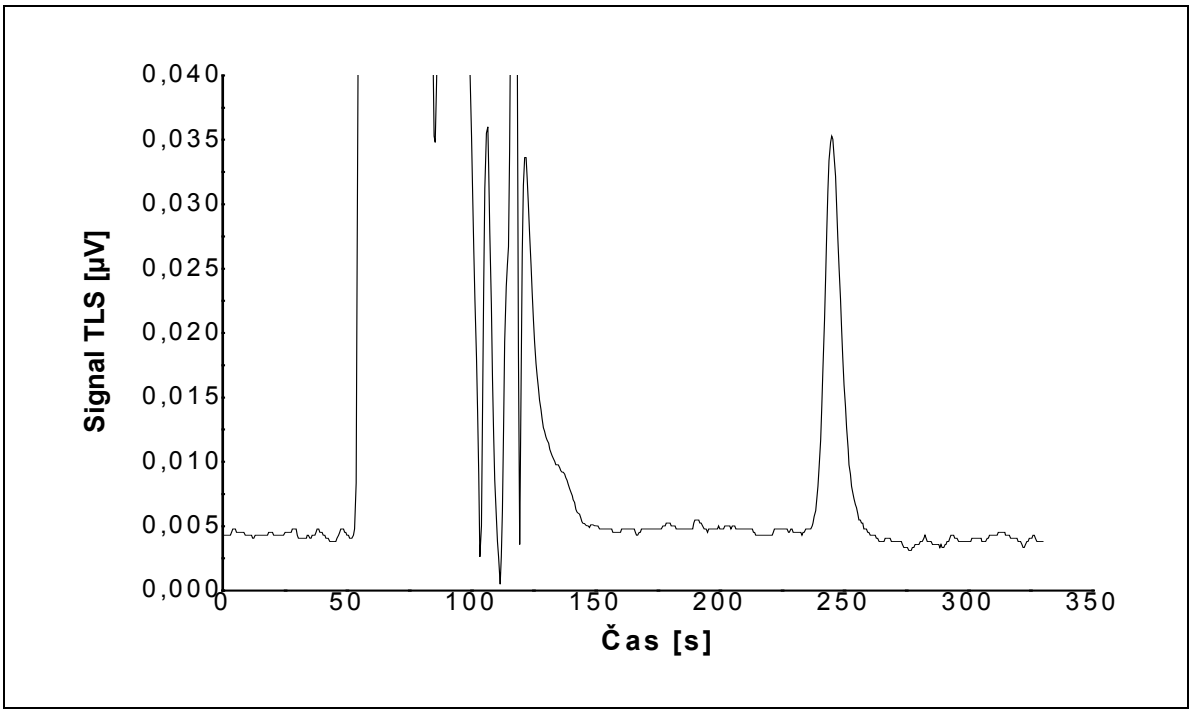
V našem poskusu smo s HPLC-TLS opravili nekaj meritev standardnih raztopin acetamiprida v deionizirani vodi, meritve znanih koncentracij acetamiprida v homogenatu neizpostavljenih živali in v živalih, ki smo jih uporabili pri testu strupenosti. Zaradi okvare instrumenta smo uspeli dobiti le nekaj preliminarnih rezultatov, ki jih posledično nismo uspeli izboljšati in nadgraditi.

Na *Sliki 15* je prikazan kromatogram, ki smo ga dobili s pomočjo standardne raztopine acetamiprida v deionizirani vodi s koncentracijo 0,25 mg/L. Kromatografski vrh je dobro in jasno viden, bazna linija pa je relativno stabilna. Na kromatogramu ni nobenih interferenc, dobro viden je le prehod frontne linije topila, ki pa ne vpliva na stabilnost merjenega signala.



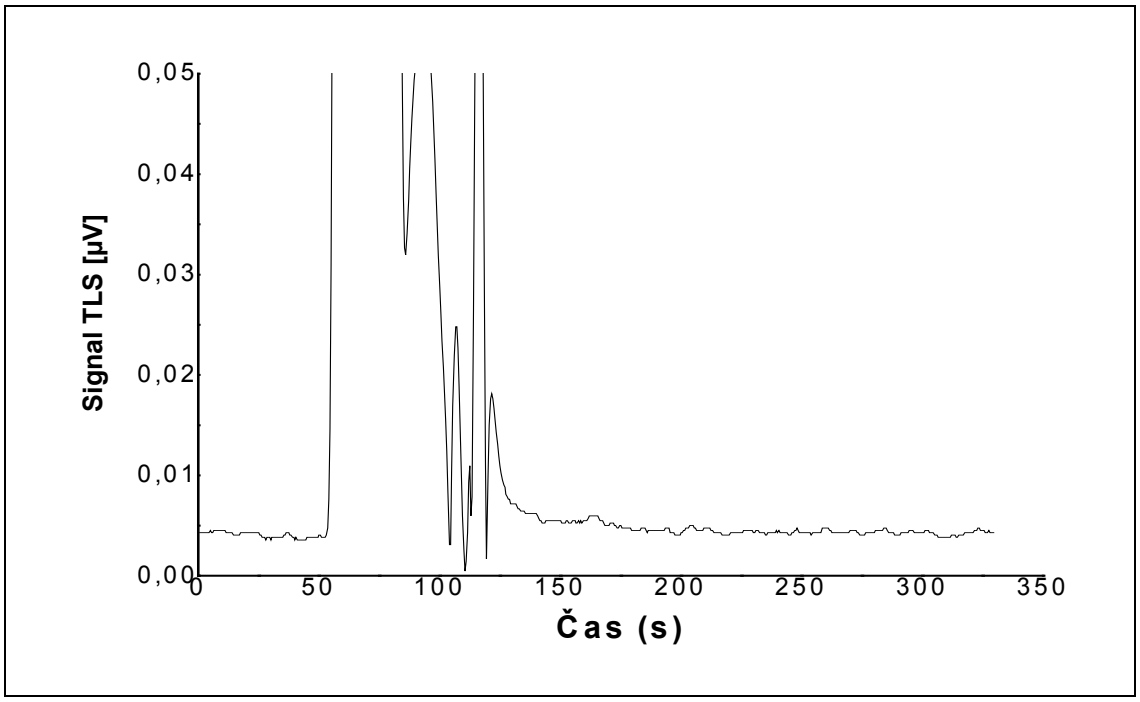
Slika 15: *Kromatogram standardne raztopine acetamiprida v deionizirani vodi s koncentracijo 0,25 mg/L. Moč vzbujanja je 60 mW, časovna konstanta pa 1 s.*

Podoben kromatogram smo dobili pri meritvi raztopine acetamiprida z znano koncentracijo, ki smo jo pripravili v homogenatu neizpostavljene živali (*Slika 16*). Tudi v tem primeru smo dobili jasen in dobro viden signal. Meritev je pokazala, da so v homogenatu prisotne različne sestavine v precejšnjih količinah.



Slika 16: *Kromatogram standardne raztopine acetamiprida v homogenatu neizpostavljene živali s koncentracijo 0,25 mg/L. Moč vzbujanja je 60 mW, časovna konstanta pa 1 s.*

V območju, kjer smo identificirali kromatografski vrh acetamiprida, ni prišlo do interferenc med acetamipridom in sestavinami matriksa, saj so imele te precej krajši retencijski čas. To smo ugotovili tudi z meritvijo vzorca homogenata, ki smo ga pripravili iz živali, ki ni bila v stiku z acetamipridom (*Slika 17*).



Slika 17: *Kromatogram homogenata živali, ki ni bila izpostavljena acetamipridu. Moč vzbujanja je 60 mW, časovna konstanta pa 1 s.*

Ugotovili smo, da so bile količine sestavin matriksa med posameznimi vzorci precej različne, kar smo pripisali učinkovitosti procesa homogenizacije.

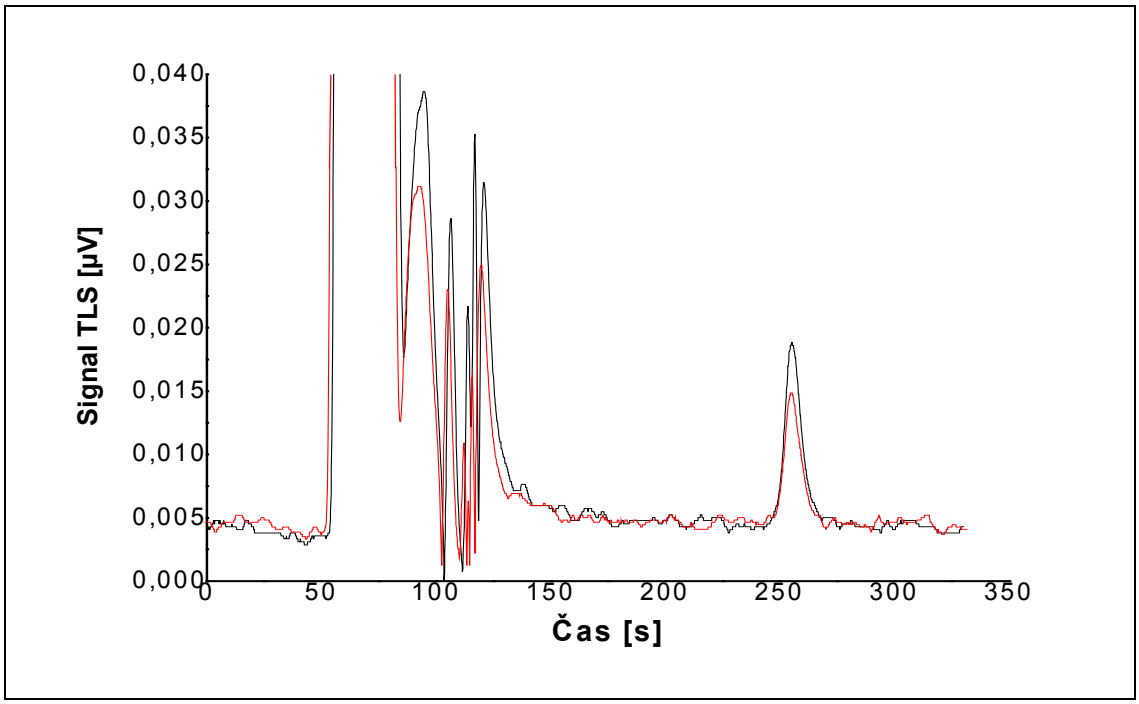
4.2.1.2 Določanje acetamiprida s HPLC-TLS v realnih vzorcih

Meritve s HPLC-TLS smo opravili tudi v homogenatih vseh preživelih živali, ki smo jih izpostavili acetamipridu in tudi tistih, ki smo jih izpostavili le deionizirani vodi (kontrolna skupina). Signala, ki bi ustrezal acetamipridu v kontrolni skupini in skupini, ki je bila izpostavljena 10 µg acetamiprida/g suhe mase lista, nismo dobili. Zaznali smo ga le v homogenatih dveh živali, ki sta bili izpostavljeni 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista (*Slika 18*). V ostalih homogenatih živali iz te skupine signala ni bilo.

Na podlagi rezultatov testa strupenosti, smo s pomočjo podatkov o masi zaužite hrane in učinkovitosti asimilacije izračunali približne pričakovane koncentracije acetamiprida v homogenatih teh dveh živali.

Prva žival je pojedla 0,94 mg kontaminiranih leskovih listov na mg telesne mase in imela učinkovitost asimilacije 62 %. Od tu sledi, da je žival asimilirala 0,58 mg zaužite hrane na mg telesne mase in s tem tudi 14,6 ng acetamiprida na mg telesne mase. Sklepamo lahko, da je bila koncentracija acetamiprida v tej živali približno 14,9 mg/kg.

Druga žival je pojedla 0,57 mg listov na mg telesne mase in imela učinkovitost asimilacije 53 %. Asimilirala je 0,30 mg zaužite hrane na mg telesne mase in s tem tudi 7,5 ng acetamiprida. Ocenjena koncentracija acetamiprida v tej živali je znašala 7,5 mg/kg.



Slika 18: *Signala, ki smo ju dobili pri določanju acetamiprida v homogenatih dveh živali, ki sta bili izpostavljeni 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista. Črna črta prikazuje signal TLS za žival, z ocenjeno koncentracijo acetamiprida v telesu 14,9 mg/kg telesne mase, rdeča črta pa signal TLS za žival z ocenjeno koncentracijo acetamiprida v telesu 7,5 mg/kg telesne mase.*

Mejo zaznavnosti LOD smo izračunali po formuli $LOD = (3 \times s_{bl})/k$, kjer je s_{bl} standardna deviacija bazne linije in k naklon umeritvene premice. To je najnižja koncentracija ali masa analita, ki jo lahko še z gotovostjo določimo (Skoog *et al*., 1998).

Umeritvene premice nismo uspeli narediti, zato smo k izračunali s pomočjo višine signala TLS v vzorcu homogenata s koncentracijo acetamiprida 0,25 mg/L. Vrednost LOD, ki smo jo izračunali za acetamiprid v homogenatu kopenskih enakonožnih rakov vrste *Porcellio scaber* je 0,014 mg/L homogenata.

Poskusi s HPLC-TLS so pokazali, da je meja zaznavnosti za acetamiprid v krompirju in rečni vodi 0,0032 mg/kg (Guszvany *et al*., 2006), oziroma 0,010 mg/kg v cvetnem prahu in medu (Mejač, 2006).

Meritve, ki smo jih opravili so pokazale, da sta bili koncentraciji acetamiprida v homogenatu testnih živali, v katerih smo zaznali signal 0,111 mg/L homogenata in 0,082 mg/L homogenata. Prva žival je imela telesno maso 17,3 mg, kar pomeni, da je bila koncentracija acetamiprida v njenem telesu 6,41 mg/kg telesne mase. Druga je bila precej težja, s telesno maso 45,5 mg; koncentracija acetamiprida v telesu je bila torej 1,8 mg/kg telesne mase.

Koncentraciji acetamiprida v telesih dveh testnih živali, ki smo ju določili s pomočjo HPLC-TLS, sta nižji od tistih dveh, ki smo ju izračunali na podlagi mase pojedene hrane in asimilacijske učinkovitosti, vendar primerljivi. Upoštevati moramo, da pri vseh ostalih živalih, ki so prav tako uživale acetamiprid, nismo uspeli dobiti signala, kljub temu da so imele v telesih podobne količine acetamiprida. Na podlagi tega lahko sklepamo, da se acetamiprid v telesu ne akumulira v taki meri, da bi bile lahko naše izračunane približne pričakovane koncentracije točne. Tudi podatki o metabolizmu acetamiprida v organizmih nekaterih vrst, ki smo jih predstavili v teoretičnem delu diplomske naloge kažejo, da se acetamiprid precej hitro razgrajuje in izloča iz telesa.

Ker smo dobili signal le pri dveh izpostavljenih organizmih lahko predvidevamo, da sta ti dve živali akumulirali bistveno večje količine acetamiprida od ostalih. Bolj verjetno pa je, da so ti rezultati posledica prisotnosti acetamiprida na telesih testnih živali. Med dvotedensko izpostavitvijo acetamipridu so se živali običajno zadrževale pod kontaminiranim listom in s tem celotno površino telesa izpostavljale insekticidu. Nekatere živali lista niso v celoti pojedle, zato so se ostanki drobili na manjše koščke. Ti so se lahko prilepili na telo, pred homogenizacijo pa jih nismo mogli opaziti. Njihova morebitna prisotnost v homogenatu je precej povečala koncentracijo acetamiprida. V petrijevki je bila tudi visoka vlažnost; voda se je nabirala v obliki kapljic na pokrovčku petrijevke. Če je bila količina vode prevelika, je kapljica lahko padla na dno petrijevke in žival je prišla v direkten stik z njo. Acetamiprid je zelo dobro topen v vodi, kroženje vode v petrijevki pa je omogočalo njegov prenos v vodo, ki je bila posledično kontaminirana.

4.2.2 Določanje acetamiprida s HPLC-DAD

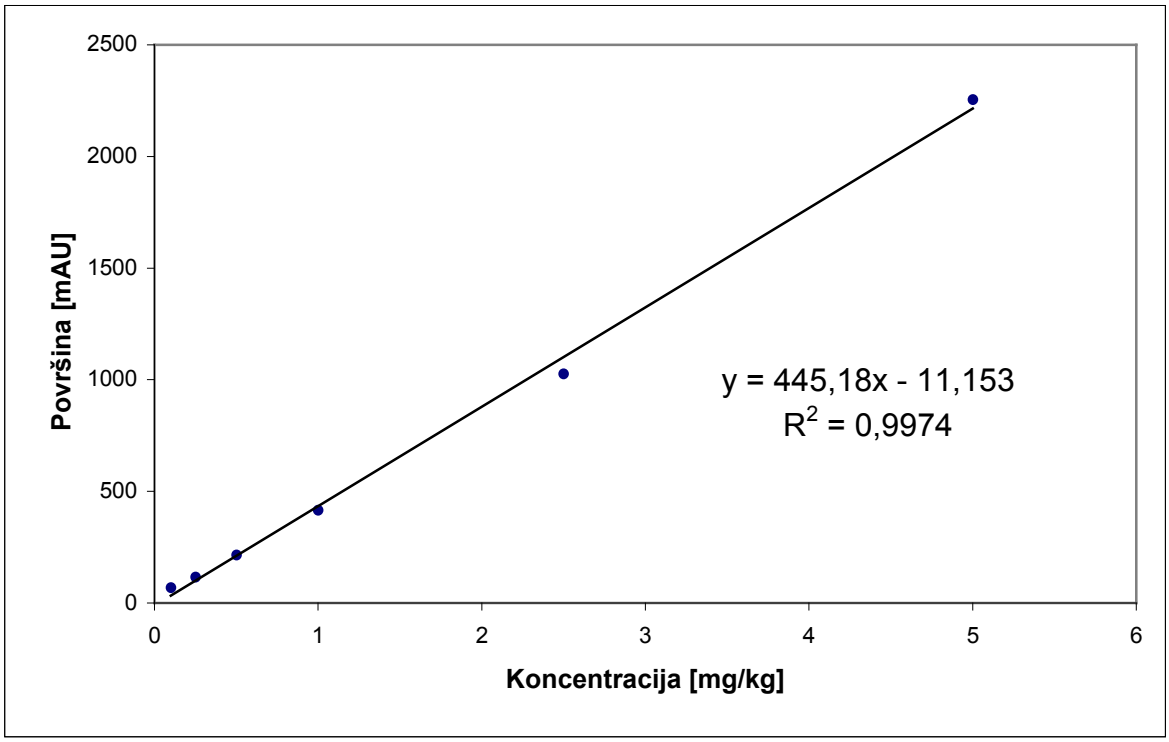
Določanje acetamiprida s HPLC-DAD smo opravili zato, da smo primerjali dobljene rezultate s tistimi, ki smo jih dobili na HPLC-TLS. Skušali smo dokazati, da je tehnika HPLC-TLS precej bolj občutljiva in omogoča doseganje nižjih mej zaznavnosti (Guzsvany *et al*., 2006)

4.2.2.1 Umeritvena premica za določanje acetamiprida s HPLC-DAD

Umeritveno premico za določanje acetamiprida v homogenatih testnih organizmov s HPLC-DAD smo pripravili iz začetne koncentracije 500 mg/kg v etanolu. Iz te smo pripravili raztopine v deionizirani vodi s koncentracijami 0,1, 0,25, 0,5, 1 in 5 mg/kg.

Tabela 7: *Površina kromatografskega vrha pri posameznih koncentracijah acetamiprida*

	Koncentracija [mg/kg]					
	0,1	0,25	0,5	1	2,5	5
Površina vrha [mAU]	68,27	116,26	215,26	415,33	1025,84	2254,61



Slika 20: *Umeritvena premica za določanje acetamiprida v vodi s HPLC-DAD*

4.2.2.2 Določanje znanih koncentracij acetamiprida s HPLC-DAD

Pred določanjem koncentracij acetamiprida v realnih vzorcih, smo opravili tudi nekaj meritev s standardnimi raztopinami acetamiprida v deionizirani vodi, ki smo jih dodali v homogenate neizpostavljenih živali. Kromatografski vrhovi acetamiprida so bili zelo jasni in dobro določljivi. Tudi v homogenatih smo acetamiprid dobro videli brez kakršnih koli interferenc. Kvalitativno določena meja zaznavnosti za acetamiprid v homogenatu kopenskih enakonožnih rakov vrste *Porcellio scaber* je bila 0,1 mg/kg.

4.2.2.3 Določanje acetamiprida s HPLC-DAD v realnih vzorcih

Po pričakovanjih s HPLC-DAD v realnih vzorcih nismo uspeli določiti acetamiprida, saj v nobenem primeru nismo dobili signala. To lahko utemeljimo s tem, da je meja zaznavnosti za acetamiprid v homogenatu kopenskih enakonožnih rakov vrste *Porcellio scaber* 0,1 mg/kg. Koncentraciji acetamiprida v dveh živalih, ki smo ju uspeli določili s HPLC-TLS sta bili zelo blizu, oziroma pod kvalitativno določeno mejo zaznavnosti s HPLC-DAD.

4.2.3 Določanje acetamiprida na listih

Koncentracije acetamiprida na listih, ki smo jih uporabili v testu strupenosti smo določili s pomočjo metode, ki smo jo opisali v eksperimentalnem delu. Po opravljenih ekstrakcijah smo vzorce pomerili na HPLC-TLS in HPLC-DAD.

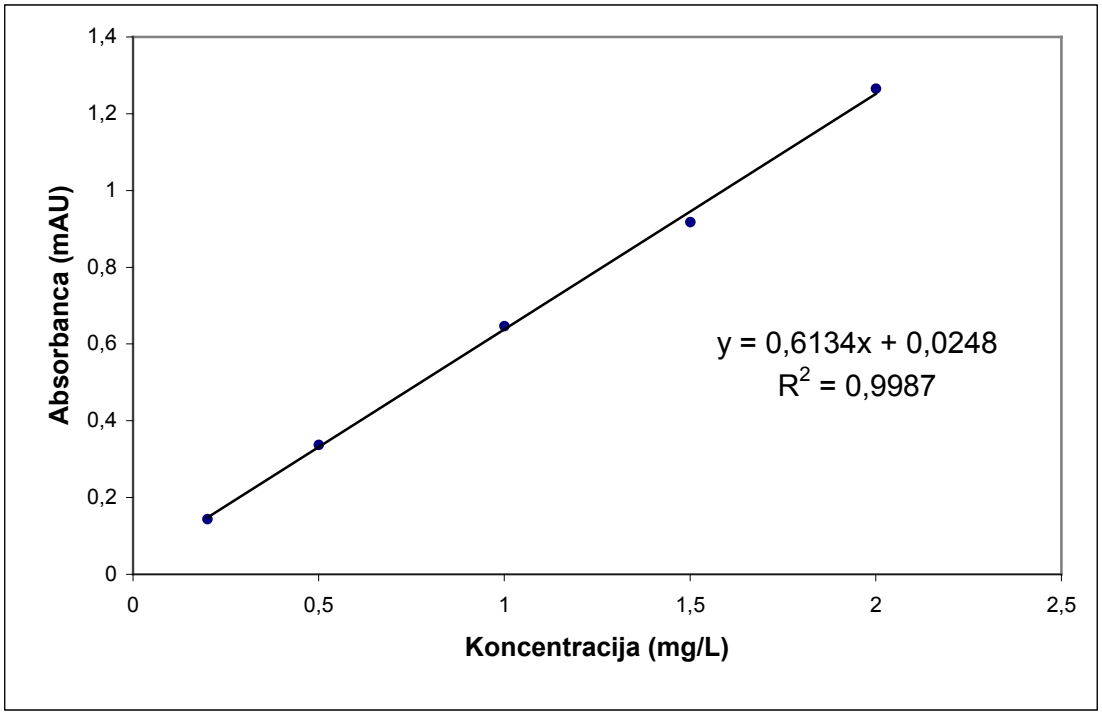
Kromatografske vrhove acetamiprida smo identificirali na obeh instrumentih, vendar koncentracij nismo mogli določiti, saj vrhovi niso bili lepo izraženi. To je verjetno posledica interferenc, ki so se pojavljale zaradi prisotnosti velikega števila snovi v listih, ki jih z ekstrakcijami in filtracijami nismo mogli izločiti. Nečistoče so imele kromatografske vrhove tudi v območju acetamiprida. Posledica absorbcije svetlobe le teh pri isti valovni dolžini je zelo nejasen signal, ki onemogoča določitev koncentracij acetamiprida na listih. Razlike v površinah kromatografskih vrhov v območju acetamiprida med 10 µg acetamiprida/g suhe mase lista in 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista so bile sicer vidne.

4.3 Umeritvena premica za proteine

Umeritveno premico za proteine smo naredili s pomočjo proteinskega standarda, ki smo ga pripravili iz govejega serumskega albumina. Uporabili smo njegove raztopine v vodi s koncentracijami 0,2, 0,5, 1, 1,5 in 2 mg/L. Absorbanco smo merili na spektrofotometru pri valovni dolžini 595 nm.

Tabela 9: *Absorbanca raztopin govejega serumskega albumina pri posameznih koncentracijah*

	Koncentracija [mg/L]				
	0,2	0,5	1	1,5	2
1. serija meritev [mAU]	0,19	0,31	0,64	0,93	1,29
2. serija meritev [mAU]	0,10	0,37	0,66	0,91	1,25
Povprečna vrednost [mAU]	0,15	0,34	0,65	0,92	1,27



Slika 21: *Umeritvena premica za proteine*

5 ZAKLJUČEK

Rezultati dvotedenskega prehranjevalnega poskusa s kopenskimi enakonožnimi raki vrste *Porcellio scaber* so pokazali, da acetamiprid vpliva na nekatere fiziološke parametre testnih živali, na primer na prehranjevanje. Živali, ki so bile izpostavljene insekticidu, so zaužile precej manj hrane kot tiste v kontrolni skupini. Posledično so tudi manj iztrebljale in hrano učinkoviteje asimilirale. Učinkovitost asimilacije je naraščala s koncentracijo acetamiprida na listih, povečana je bila že pri živalih, ki so bile izpostavljene 10 µg acetamiprida/g suhe mase lista, še bolj pa pri tistih, ki so bile izpostavljene 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista.

Vplive na molekularnem nivoju smo zabeležili v skupini živali, ki je bila izpostavljena acetamipridu, dodanemu v hrano v koncentraciji 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista. Pri teh organizmih smo izmerili precej manjšo aktivnost glutation S-transferaze kot pri tistih, ki so bili izpostavljeni 10 µg acetamiprida/g suhe mase lista, oziroma pri tistih v kontrolni skupini. Zmanjšana aktivnost encima je verjetno posledica večjih količin acetamiprida v telesu zaradi učinkovitejše asimilacije. Predvidevamo lahko, da je pri teh živalih že nastopila izčrpanost organizma, ker zaradi visokih koncentracij insekticida v telesu niso zmogle več uravnavati stresa, ena izmed posledic pa je tudi zmanjšanje aktivnosti glutation S-transferaze. Ta je odvisna tudi od vsebnosti proteinov v organizmu, vendar pri slednji nismo opazili vplivov, ki bi jih lahko pripisali acetamipridu. Nekoliko manjšo vsebnost smo zabeležili v skupini, ki je bila izpostavljena 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista, še manjšo pa v skupini, izpostavljeni 10 µg acetamiprida/g suhe mase lista. Prav ta rezultat nakazuje, da so vplivi acetamiprida na vsebnost proteinov sicer prisotni, vendar se v dveh tednih še ne pokažejo v pravi meri, zato smatramo, da sta dva tedna izpostavljenosti prekratka doba, da bi se pokazale spremembe energijskih rezerv v živalih.

Na podlagi rezultatov lahko sklepamo, da so se pri določenih parametrih, ki smo jih opazovali, pokazali odzivi, ki jih lahko pripišemo acetamipridu. Zaradi majhnega števila testnih organizmov so merjeni odzivi precej variabilni, kar pomeni, da so nekatere živali občutile spremembe prej in intenzivnejše kot druge. Za podrobnejše in natančnejše dokaze o vplivih acetamiprida na kopenske enakonožne rake vrste *Porcellio scaber*, bi bilo potrebno opraviti še vrsto poskusov skozi daljše časovno obdobje in spremljati še druge odzive organizma.

Z uporabo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti v kombinaciji z občutljivo analitsko metodo optotermične detekcije na osnovi spektrometrije s toplotnimi lečami smo skušali določiti koncentracije acetamiprida v homogenatih testnih organizmov, vendar zaradi okvare instrumenta nismo uspeli dobiti prepričljivih rezultatov. Potrdili smo, da s tehniko HPLC-TLS lahko dosežemo nižje meje zaznavnosti za acetamiprid, kot s tehniko HPLC-DAD. Pri meritvi realnih vzorcev s HPLC-TLS smo namreč zaznali signal v dveh živalih, s HPLC-DAD pa ne.

Instrument HPLC-TLS pri optimalnem delovanju omogoča doseganje zelo nizkih mej zaznavnosti za acetamiprid. Z optimizacijo HPLC-TLS instrumenta bi lahko dosegli še nižjo mejo zaznavnosti za acetamiprid v homogenatu kopenskih enakonožnih rakov vrste *Porcellio scaber* in skušali določiti dejanske koncentracije acetamiprida v teh živalih, ki so verjetno precej nižje od tistih, ki smo jih na podlagi podatkov iz testa strupenosti izračunali. To smo ugotovili tudi v preliminarnih poskusih, ker smo samo v dveh živalih zaznali signal, ki ustreza acetamipridu.

6 VIRI

- Ahmed, E.F. Analysis of pesticides and their metabolites in foods and drinks. Trends in Analytical Chemistry 20, 11(2001) 649-661.
- Baskaran, S., Kookana, R.S., Naidu, R. Determination of the insecticide imidacloprid in water and soil using high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A 787 (1997) 271-275.
- Blažič, M. 2006. Toxicity of imidacloprid to the terrestial isopod Porcellio scaber (Isopoda, Crustacea). Magistrska naloga. Politehnika Nova Gorica, Šola za znanosti o okolju. Nova Gorica.
- Bradford, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quatitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry 72 (1976) 248-254.
- California Environmental Protection Agency. Department of pesticide regulation. Medical toxicology branch. Summary of toxicology data: Acetamiprid. 2000 http://www.cdpr.ca.gov/docs/toxsums/pdfs/5762.pdf (oktober, 2006).
- Connel, D., Lam, P., Ridchardson, B., Wu, R. 1999. Introduction to Ecotoxicology. Great Britain, Blackwell Science: 170 str.
- Council Directive of 15 July 1991 concering the placing of plant protection products on the market (91/414/EEC), (OJ L 230, 19.8.1991, p.1).
- Cox, C. Insecticide factsheet Imidacloprid. Journal of Pesticide Reform 21, 1 (2001) 15-21.
- Devore, J., Farnum, N. 1999. Applied statistics for engineers and scientists. Brooks/Cole Publishing Company, International Thomson Publishing Inc: 577 str.
- Drobne, D. Terrestrial isopods – A Good Choice for Toxicity Testing of Pollutants in the Terrestrial Environment. Environmental Toxicology and Chemistry, 16, 6 (1997) 1159-1164.
- European Commission, Health & Consumer Protection Directorate. 2004. Acetamiprid SANCO/1392/2001-Final. Appendix I-IV. http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/newactive/acetamiprid.pdf (oktober 2006).
- Fernandez-Alba, A.R., Valver, A., Aguera, A., Contreras, M., Chiron, S. Determination of imidacloprid in Vegetables by high-performance liquid chromatography with diode-array detector. Journal of Chromatography A 721 (1996) 97-105.
- Fito-info. Informacijski sistem za varstvo rastlin. Biotehniška fakulteta. Ljubljana. http://fito-info.bf.uni-lj.si/ (oktober, 2006).
- Franko, M., Šikovec, M., Kožar-Logar, J., Bicanic, D. Thermal Lens Spectometry in Food Analysis and Environmental Research. Analytical sciences, 17 Special Issue (2001) 515-518.
- Franko, M., Tran, C.D., Analytical thermal lens instrumentation. Review of Scientific Instruments 67, 1 (1996) 1-18.
- Gabrijelčič, E. 2001. Sublethal toxicity of diazinon, an organophosphorous pesticide, to the terrestial isopod *Porcelio scaber* (*Isopoda, Crustacea*). Magistrska naloga. Politehnika Nova Gorica, Šola za znanosti o okolju. Nova Gorica.
- Gupta, S., Gaybhiye, Kalpana, V.T., Agnihotri, N.P. Leaching Behaviour of Imidacloprid Formulations in Soil. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 68 (2002) 502-508.
- Guzsvany, V., Madžgalj, A., Trebše, P., Gaal, F., Franko, M. Determination of Some Neonicotinoid Insecticides by liquid Chromatography with Thermal Lens Spectrometric Detection.

- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B.. Glutathione-S-Transferases, The first Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation. The Journal of Biological Chemistry, 249, 22 (1974) 7130-7139.
- Habig, W.H., Jakoby, W.B. Assays for Differentiation of Glutathione S-Transferases. Methods in Enzimology, 77 (1981) 398-405.
- Hodge, S., Longley, L., Booth, L., Heppelthwaite, V., O'Halloran, K. An Evaluation of Glutathione S-Transferase Activity in the Tasmanian Lacewing (*Micromus tasmaniae*) as a Biomarker of Organophosphate Contamination. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 65 (2000) 8-15.
- Hopkin, S. A Key to Woodlice of Britain and Ireland. Field studies, 7 (1991) 599-650.
- Iwasa, T., Motoyama, N., Ambrose, J.T., Roe, R.M. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. Crop protection 23 (2004) 371-378.
- Jeschke, P., Moriya, K., Lantzsch, R., Seifert, H., Linder W., Jelich, K., Gohrt, A. Beck, M. E., Etzel, W. Thiacloprid (Bay YRC 2894) – A new member of chloronicotnyl insecticides (CNI) family. Pflanzenschutz Nachrichten Bayer, 54, 2 (2001) 147-160.
- Jeschke, P., Uneme, H., Benet-Buchholz, J., Stolting, J., Sirges, W., Beck, M. E., Etzel, W. Clothianidin (TI-435) The third member of chloronicotnyl insecticides (CNI) family. Pflanzenschutz Nachrichten Bayer, 56, 1 (2003) 5-25.
- Jeschke, P., Nauen, R. 2005. Neonicotinoid Insecticides. Bayer CropScience, Manheim, Germany, Elsevier BV: 53-105.
- Keen, J.H., Jakoby W.B. Glutatione Transferases. Catalysis of Nucleophilic Reactions of Glutathione. The Journal of Biological Chemistry, 253, 16 (1978) 5654-5657.
- Marin, A., Martinez Vidal, J.L., Egea Gonzalez, F.J., Garrido Frenich, A., Glass, C.R., Sykes, M. Assessment of potential (inhalation and dermal) and actualexposure to acetamiprid by greenhouse applicators usingliquid chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B 804 (2004) 269-275.
- Mateu – Sanchez, M., Moreno, M., Arrebola, F.J., Martinez Vidal, F.J. Analysis of Acetamiprid in Vegetables using Gas Chromatography – Tandem Mass Spectrometry. Analitical Sciences 19 (2003) 701-704.
- Matsuda, K., Buckingam, S.D., Kleier, D., Rauh, J. J., Grauso, M., Satelle, D.B. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. Trends in Pharmacological Sciences 22, 11(2001) 573-580.
- Mejač, I., 2006. Določanje neonikotinoidov v medu in cvetnem prahu s HPLC-DAD in TLS detekcijo. Univerza v Novi Gorici, Fakulteta za znanosti o okolju. Nova Gorica.
- Roberts, T.R., Hutson, D.H., Jewess, P.J., Lee, P.W., Nicholls, P.H., Plimmer, J.R. 1999. Metabolic Pathways of Agrochemicals. Part 2: Insekticides and Fungicides. Cambridge, The Royal Society of Chemistry 105-120 str.
- Skoog, D.A., Hole,r F.J., Nieman ,T.A. 1998. Principals of Instrumental Analysis. 5th edition. Thomson Learning Inc.:13-14 str.
- Slike strukturnih formul: http://www.alanwood.net/pesticides (oktober 2006).
- Suchail, S., Guez, D., Belzunces, L.P. Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis Mellifera*. Environmental Toxicology and Chemistry 20, 11 (2001) 2482-2486.
- Štrus, J., Drobne, D., Zidar, P., Kostanjšek, R., Žnidaršič, N., Lapajne, A., Lešer, V., Malenšek, L., Pipan, Ž. Mokrice, živali leta 2005. Proteus, 67, 9 (2005) 466-470.

- Tokieda M., Ozawa , M., Kobayashi, S., Gmoyo, T. Method to Determination of Total Residues of the Insecticide Acetamiprid and its Metabolites in Crops by Gas Chromatography. Journal of Pesticide Science 22 (1998) 77-83.
- Tomizawa, M., Cowan, A., Casida, J.E. Analgesic and Toxic Effects of Neonicotinoid Insecticides in Mice. Toxicology and applied Pharmacology 177 (2001) 77-83.
- Tomlin, C. 2003. The Pesticide Manual. 13th edition. British Crop Protection Council. 958-959.
- U.S. EPA. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. 2002. Pesticide fact sheet: Acetamiprid. Washington, D.C., Mar.15. http://www.epa.gov/opprd001/factsheets/acetamiprid.pdf (oktober 2006).
- Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M., Peakall, D.B. 1996. Principles of Ecotoxicology. Reading, Taylor & Francis, University of Reading: 321 str.
- Wägele, J.W. 1992. Isopoda. Microscopic Anatomy of Invertebrates. Crustacea, 9 (1992) 529-617.
- Zidar, P., Božič, J., Štrus, J. Behavioural Response in the Terrestrial Isopod *Porcellio scaber* (*Crustacea*) Offered a choice of Uncontaminated and Cadmium Contaminated food. Ecotoxicology. The Nederlands, Springer Science and Business Media (2005) 439-502.

PRILOGE

Tabela 1: *Telesna masa (mg) organizmov vrste Porcellio scaber izpostavljenih deionizirani vodi ter 10 in 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista*

Kontrolna skupina	**Masa živali prvi dan (mg)**	**Masa živali zadnji dan (mg)**	**Sprememba mase (mg)**
0-1	15,7	15,8	0,1
0-2	15,4	15,7	0,3
0-3	16,3	21,7	5,4
0-4	18,7	17,0	/
0-5	21,7	Poginil 7. dan	1,8
0-6	20,4	21,9	0,1
0-7	18,1	18,4	1,1
0-8	17,9	17,2	-0,7
0-9	16,5	Poginil 6. dan	/
0-10	19,7	20,0	0,3
0-11	19,5	18,4	-1,1
0-12	19,1	18,5	-0,6
0-13	21,4	23,6	2,2
0-14	24,1	23,6	-0,5
0-15	55,8	Poginil 4. dan	/
0-16	26,6	23,7	-2,9
0-17	43,6	41,6	-2
0-18	18,5	18,3	-0,2
0-19	15,1	15,4	0,3
0-20	17,4	18,2	0,8
0-21	21,9	21,1	-0,8
0-22	14,5	16,3	1,8
0-23	14,8	14,3	-0,5
0-24	25,1	24,6	-0,5
Povprečno			**0,3**
10 ppm			
10-1	22,7	Poginil 3. dan	/
10-2	27,0	27,3	0,3
10-3	26,0	Poginil 3. dan	/
10-4	28,5	27,8	-0,7
10-5	27,8	Poginil 10. dan	/
10-6	28,0	28,9	0,9
10-7	21,9	22,3	0,4
10-8	25,0	25,2	0,2
10-9	26,4	26,0	-0,4
10-10	26,7	27,7	1
10-11	23,9	23,7	-0,2
10-12	20,2	19,3	-0,9
10-13	33,5	33,7	0,2
10-14	21,0	20,9	-0,1
10-15	43,8	46,6	2,8
10-16	21,0	19,1	-1,9
10-17	27,0	27,3	0,3
10-18	22,8	20,9	-1,9
10-19	18,0	17,6	-0,4
10-20	19,1	18,0	-1,1
10-21	17,2	16,6	-0,6
10-22	39,5	37,8	-1,7
10-23	14,7	15,6	0,9
10-24	20,1	Poginil 5. dan	/
Povprečno			**- 0,1**

25 ppm	**Masa živali prvi dan (mg)**	**Masa živali zadnji dan (mg)**	**Sprememba mase (mg)**
25-1	26,0	25,7	-0,3
25-2	20,2	20,7	0,5
25-3	26,1	25,7	-0,4
25-4	21,6	Poginil 3. dan	/
25-5	27,2	29,0	1,8
25-6	24,3	24,4	0,1
25-7	26,6	27,7	1,1
25-8	21,8	21,1	-0,7
25-9	20,3	21,0	0,7
25-10	25,6	26,5	0,9
25-11	20,9	Poginil 3. dan	/
25-12	29,8	29,6	-0,2
25-13	23,0	21,8	-1,2
25-14	37,7	38,0	0,3
25-15	44,2	43,1	-1,1
25-16	22,4	19,7	-2,7
25-17	19,0	Poginil 5. dan	/
25-18	18,3	Poginil 11. dan	/
25-19	19,1	Poginil 8. dan	/
25-20	17,8	17,3	-0,5
25-21	41,9	45,2	3,3
25-22	17,6	16,8	-0,8
25-23	18,1	16,5	-1,6
25-24	17,3	Poginil 9. dan	/
Povprečno			**- 0,04**

Tabela 2: *Količina zaužite hrane (mg lista/mg telesne mase) za vrsto Porcellio scaber izpostavljeno deionizirani vodi ter 10 in 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista*

Kontrolna skupina	**Masa pojedenih listov (mg)**	**Masa živali (mg)**	**Količina zaužite hrane na mg telesne mase živali**
0-1	9,6	15,8	0,61
0-2	16,9	15,7	1,08
0-3	23,3	21,7	1,07
0-4	15,3	17,0	0,9
0-5			Poginil 7. dan
0-6	17,3	21,9	0,79
0-7	21,3	18,4	1,16
0-8	14,6	17,2	0,85
0-9			Poginil 6. dan
0-10	17,1	20,0	0,86
0-11	14,0	18,4	0,76
0-12	15,3	18,5	0,83
0-13	12,7	23,6	0,54
0-14	18,7	23,6	0,79
0-15			Poginil 4. dan
0-16	18,6	27,7	0,67
0-17	27,3	41,6	0,66
0-18	15,0	18,3	0,82
0-19	11,2	15,4	0,73
0-20	19,4	18,2	1,07
0-21	24,5	21,1	1,16
0-22	14,1	16,3	0,87
0-23	13,6	14,3	0,95
0-24	17,7	24,6	0,72
Povprečno			**0,85**
10 ppm			
10-1			Poginil 3. dan
10-2	24,9	27,3	0,91
10-3			Poginil 3. dan
10-4	17,1	27,8	0,62
10-5			Poginil 10. dan
10-6	25,2	28,9	0,87
10-7	14,3	22,3	0,64
10-8	19,5	25,2	0,77
10-9	21,3	26,0	0,82
10-10	18,6	27,7	0,67
10-11	27,5	23,7	1,16
10-12	14,6	19,3	0,76
10-13	20,0	33,7	0,59
10-14	18,6	20,9	0,89
10-15	29,9	46,6	0,64
10-16	16,0	19,1	0,84
10-17	20,7	27,3	0,76
10-18	27,4	20,9	1,31
10-19	11,3	17,6	0,64
10-20	13,8	18,0	0,77
10-21	11,6	16,6	0,70
10-22	16,6	37,8	0,44
10-23	11,8	15,6	0,76
10-24			Poginil 5. dan
Povprečno			**0,78**

25 ppm	**Masa pojedenih listov (mg)**	**Masa živali (mg)**	**Količina zaužite hrane na mg telesne mase živali**
25-1	19,5	25,7	0,76
25-2	17,5	20,7	0,85
25-3	12,6	25,7	0,49
25-4			Poginil 3. dan
25-5	18,3	29,0	0,63
25-6	9,5	24,4	0,39
25-7	6,3	27,7	0,23
25-8	14,9	21,1	0,71
25-9	11,3	21,0	0,54
25-10	27,3	26,5	1,03
25-11			Poginil 3. dan
25-12	17,0	29,6	0,57
25-13	8,5	21,8	0,39
25-14	16,7	38,0	0,44
25-15	29,7	43,1	0,69
25-16	20,2	19,7	1,03
25-17			Poginil 5. dan
25-18			Poginil 11. dan
25-19			Poginil 8. dan
25-20	16,2	17,3	0,94
25-21	25,9	45,2	0,57
25-22	9,9	16,8	0,59
25-23	5,8	16,5	0,35
25-24			Poginil 9. dan
Povprečno			**0,62**

Tabela 3: *Količina iztrebkov (mg/mg telesne mase) za vrsto Porcellio scaber izpostavljeno deionizirani vodi ter 10 in 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista*

Kontrolna skupina	**Masa iztrebkov (mg)**	**Masa živali (mg)**	**Količina iztrebkov na mg telesne mase**
0-1	7,5	15,8	0,47
0-2	9,2	15,7	0,59
0-3	16,2	21,7	0,75
0-4	5,4	17,0	0,32
0-5			Poginil 7. dan
0-6	12,6	21,9	0,56
0-7	16,2	18,4	0,88
0-8	6,2	17,2	0,36
0-9			Poginil 6. dan
0-10	11,3	20,0	0,57
0-11	8,4	18,4	0,46
0-12	7,5	18,5	0,41
0-13	7,6	23,6	0,32
0-14	13,7	23,6	0,58
0-15			Poginil 4. dan
0-16	9,2	27,7	0,33
0-17	13,4	41,6	0,32
0-18	11,1	18,3	0,61
0-19	4,4	15,4	0,28
0-20	13,7	18,2	0,75
0-21	15,7	21,1	0,74
0-22	7,8	16,3	0,48
0-23	8,5	14,3	0,59
0-24	11,3	24,6	0,46
Povprečno			**0,52**
10 ppm			
10-1			Poginil 3. dan
10-2	11,4	27,3	0,42
10-3			Poginil 3. dan
10-4	12,3	27,8	0,44
10-5			Poginil 10. dan
10-6	12,6	28,9	0,44
10-7	8,3	22,3	0,37
10-8	8,6	25,2	0,34
10-9	11,8	26,0	0,45
10-10	12,5	27,7	0,45
10-11	13,7	23,7	0,58
10-12	8,3	19,3	0,43
10-13	9,7	33,7	0,29
10-14	6,9	20,9	0,33
10-15	14,7	46,6	0,32
10-16	9,1	19,1	0,48
10-17	14,6	27,3	0,53
10-18	15,6	20,9	0,75
10-19	4,3	17,6	0,24
10-20	6,2	18,0	0,34
10-21	2,5	16,6	0,15
10-22	10,8	37,8	0,29
10-23	2,8	15,6	0,18
10-24			Poginil 5. dan
Povprečno			**0,39**

25 ppm	**Masa iztrebkov (mg)**	**Masa živali (mg)**	**Količina iztrebkov na mg telesne mase**
25-1	10,4	25,7	0,40
25-2	7,3	20,7	0,35
25-3	5,2	25,7	0,20
25-4			Poginil 3. dan
25-5	9,8	29,0	0,34
25-6	2,1	24,4	0,09
25-7	1,5	27,7	0,05
25-8	5,2	21,1	0,25
25-9	5,2	21,0	0,25
25-10	11,2	26,5	0,42
25-11			Poginil 3. dan
25-12	8,0	29,6	0,27
25-13	2,1	21,8	0,10
25-14	6,6	38,0	0,17
25-15	11,4	43,1	0,26
25-16	7,4	19,7	0,37
25-17			Poginil 5. dan
25-18			Poginil 11. dan
25-19			Poginil 8. dan
25-20	6,2	17,3	0,36
25-21	12,2	45,2	0,27
25-22	3,7	16,8	0,22
25-23	1,7	16,5	0,10
25-24			Poginil 9. dan
Povprečno			**0,25**

Tabela 4: *Asimilacijska učinkovitost organizmov vrste Porcellio scaber izpostavljene deionizirani vodi ter 10 in 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista*

Kontrolna skupina	**Masa pojedenih listov (mg)**	**Masa iztrebkov (mg)**	**Asimilacijska učinkovitost**
0-1	9,6	7,5	0,21
0-2	16,9	9,2	0,46
0-3	23,3	16,2	0,30
0-4	15,3	5,4	0,65
0-5			Poginil 7. dan
0-6	17,3	12,6	0,27
0-7	21,3	16,2	0,24
0-8	14,6	6,2	0,58
0-9			Poginil 6. dan
0-10	17,1	11,3	0,34
0-11	14,0	8,4	0,40
0-12	15,3	7,5	0,51
0-13	12,7	7,6	0,40
0-14	18,7	13,7	0,27
0-15			Poginil 4. dan
0-16	18,6	9,2	0,51
0-17	27,3	13,4	0,51
0-18	15,0	11,1	0,26
0-19	11,2	4,4	0,61
0-20	19,4	13,7	0,29
0-21	24,5	15,7	0,36
0-22	14,1	7,8	0,45
0-23	13,6	8,5	0,38
0-24	17,7	11,3	0,36
Povprečno			**0,40**
10 ppm			
10-1			Poginil 3. dan
10-2	24,9	11,4	0,54
10-3			Poginil 3. dan
10-4	17,1	12,3	0,28
10-5			Poginil 10. dan
10-6	25,2	12,6	0,50
10-7	14,3	8,3	0,42
10-8	19,5	8,6	0,56
10-9	21,3	11,8	0,45
10-10	18,6	12,5	0,33
10-11	27,5	13,7	0,50
10-12	14,6	8,3	0,43
10-13	20,0	9,7	0,51
10-14	18,6	6,9	0,63
10-15	29,9	14,7	0,51
10-16	16,0	9,1	0,43
10-17	20,7	14,6	0,29
10-18	27,4	15,6	0,43
10-19	11,3	4,3	0,62
10-20	13,8	6,2	0,55
10-21	11,6	2,5	0,78
10-22	16,6	10,8	0,35
10-23	11,8	2,8	0,76
10-24			Poginil 5. dan
Povprečno			**0,49**

25 ppm	**Masa pojedenih listov (mg)**	**Masa iztrebkov (mg)**	**Asimilacijska učinkovitost**
25-1	19,5	10,4	0,47
25-2	17,5	7,3	0,58
25-3	12,6	5,2	0,59
25-4			Poginil 3. dan
25-5	18,3	9,8	0,46
25-6	9,5	2,1	0,78
25-7	6,3	1,5	0,76
25-8	14,9	5,2	0,65
25-9	11,3	5,2	0,54
25-10	27,3	11,2	0,59
25-11			Poginil 3. dan
25-12	17,0	8,0	0,53
25-13	8,5	2,1	0,75
25-14	16,7	6,6	0,60
25-15	29,7	11,4	0,62
25-16	20,2	7,4	0,63
25-17			Poginil 5. dan
25-18			Poginil 11. dan
25-19			Poginil 8. dan
25-20	16,2	6,2	0,62
25-21	25,9	12,2	0,53
25-22	9,9	3,7	0,63
25-23	5,8	1,7	0,59
25-24			Poginil 9. dan
Povprečno			**0,60**

Tabela 5: *Vsebnost proteinov (mg/mg telesne mase) v organizmih vrste Porcellio scaber izpostavljenih deionizirani vodi ter 10 in 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista*

Kontrolna skupina	**Absorbanca (mAU)**	**Proteini (mg/mL)**	**Masa živali (mg)**	**Vsebnost proteinov (mg na mg telesne mase)**
0-1	0,59842	1,351901	15,8	0,085563
0-2	0,78541	1,772576	15,7	0,112903
0-3	0,954872	2,153813	21,7	0,099254
0-4	0,658741	1,487606	17,0	0,087506
0-5				Poginil 7. dan
0-6	1,254872	2,828733	21,9	0,129166
0-7	0,895217	2,019611	18,4	0,109761
0-8	0,658744	1,487613	17,2	0,086489
0-9				Poginil 6. dan
0-10	0,458751	1,037685	20,0	0,051884
0-11	1,25482	2,828616	18,4	0,153729
0-12	0,652149	1,472775	18,5	0,079609
0-13	1,04084	2,347222	23,6	0,099459
0-14	0,57398	1,296918	23,6	0,054954
0-15				Poginil 4. dan
0-16	0,959555	2,164353	27,7	0,078135
0-17	1,21535	2,73982	41,6	0,065861
0-18	0,7226	1,631271	18,3	0,08914
0-19	0,61912	1,39847	15,4	0,09081
0-20	0,478275	1,081609	18,2	0,059429
0-21	0,76393	1,724252	21,1	0,081718
0-22	0,82271	1,85649	16,3	0,113895
0-23	0,51678	1,168234	14,3	0,081695
0-24	1,03375	2,331271	24,6	0,094767
Povprečno				**0,090749**
10 ppm				
10-1				Poginil 3. dan
10-2	0,758452	1,711928	27,3	0,062708
10-3				Poginil 3. dan
10-4	0,658451	1,486954	27,8	0,053488
10-5				Poginil 10. dan
10-6	0,75415	1,70225	28,9	0,058901
10-7	0,954125	2,152137	22,3	0,096508
10-8	0,523147	1,182558	25,2	0,046927
10-9	0,41258	0,933813	26,0	0,035916
10-10	0,321547	0,729015	27,7	0,026318
10-11	0,36587	0,828729	23,7	0,034967
10-12	0,421587	0,954076	19,3	0,049434
10-13	0,53913	1,218515	33,7	0,036158
10-14	0,487985	1,103393	20,9	0,052794
10-15	1,02905	2,320697	46,6	0,0498
10-16	0,727415	1,642103	19,1	0,085974
10-17	0,814185	1,837312	27,3	0,067301
10-18	0,564865	1,276412	20,9	0,061072
10-19	0,29132	0,661012	17,6	0,037558
10-20	0,241275	0,548452	18,0	0,030468
10-21	0,7381	1,666142	16,6	0,10037
10-22	0,80843	1,824364	37,8	0,048264
10-23	0,37649	0,852612	15,6	0,054655
10-24				Poginil 5. dan
Povprečno				**0,054479**

25 ppm	**Absorbanca (mAU)**	**Proteini (mg/mL)**	**Masa živali (mg)**	**Vsebnost proteinov (mg na mg telesne mase)**
25-1	0,45875	1,037683	25,7	0,040377
25-2	0,658754	1,487636	20,7	0,071866
25-3	0,95215	2,147694	25,7	0,083568
25-4				Poginil 3. dan
25-5	0,95654	2,15757	29,0	0,074399
25-6	0,854113	1,927138	24,4	0,078981
25-7	0,656974	1,483631	27,7	0,053561
25-8	0,754854	1,703834	21,1	0,08075
25-9	0,485122	1,097014	21,0	0,052239
25-10	0,458545	1,037222	26,5	0,03914
25-11				Poginil 3. dan
25-12	0,356985	0,80874	29,6	0,027322
25-13	0,3644	0,825422	21,8	0,037863
25-14	1,13305	2,554668	38,0	0,067228
25-15	1,0826	2,44117	43,1	0,05664
25-16	0,537175	1,214076	19,7	0,061628
25-17				Poginil 5. dan
25-18				Poginil 11. dan
25-19				Poginil 8. dan
25-20	0,60886	1,375388	17,3	0,079502
25-21	0,980175	2,210742	45,2	0,04891
25-22	0,53743	1,210742	16,8	0,072303
25-23	0,45899	1,038223	16,5	0,062923
25-24				Poginil 9. dan
Povprečno				**0,060511**
Terarij				
T-1	0,720995	1,62766	21,2	0,076776
T-2	1,1826	2,666142	36,5	0,073045
T-3	0,94776	2,137818	17,3	0,123573
T-4	0,52922	1,19622	18,5	0,064661
T-5	0,83512	1,884409	14,0	0,134601
T-6	0,691955	1,562328	23,6	0,0662
Povprečno				**0,089809**

Tabela 6: *Aktivnost GST (nmol/min/mg proteina) v organizmih vrste Porcellio scaber izpostavljenih deionizirani vodi ter 10 in 25 µg acetamiprida/g suhe mase lista*

Kontrolna skupina	**Razlika med absorbanco z vzorcem in absorbanco brez vzorca (m AU)**	**Aktivnost glutation S-transferaze (nmol/min/mg proteina)**
0-1	0,244475	753,4914
0-2	0,56934	1338,307
0-3	0,430845	833,4926
0-4	0,299787	839,6795
0-5		Poginil 7. dan
0-6	0,639764	942,3593
0-7	0,521532	1075,975
0-8	0,521063	1459,449
0-9		Poginil 6. dan
0-10	0,2155995	865,707
0-11	0,526905	776,1524
0-12	0,664341	1879,504
0-13	0,5699595	1011,763
0-14	0,599764	1926,889
0-15		Poginil 4. dan
0-16	0,5749045	1106,767
0-17	0,5035855	765,8433
0-18	0,4002365	1022,302
0-19	0,379066	1129,407
0-20	0,3641335	1402,747
0-21	0,598637	1446,61
0-22	0,407443	914,4562
0-23	0,42206	1505,335
0-24	0,6224385	1112,481
Povprečno		**1148,034**
10 ppm		
10-1		Poginil 3. dan
10-2	0,557655	1357,278
10-3		Poginil 3. dan
10-4	0,390395	1093,945
10-5		Poginil 10. dan
10-6	0,440745	1078,83
10-7	0,45525	881,3913
10-8	0,1925487	678,4329
10-9	0,2612548	1165,717
10-10	0,265512	1517,528
10-11	0,1548756	778,6805
10-12	0,2635548	1151,003
10-13	0,174983	598,3478
10-14	0,369015	1393,486
10-15	0,2077085	372,9276
10-16	0,4200605	1065,86
10-17	0,126741	287,424
10-18	0,3096115	1010,683
10-19	0,171605	1081,706
10-20	0,285511	2169,173
10-21	0,366107	915,5559
10-22	0,128541	293,5748
10-23	0,1574665	769,5218
10-24		Poginil 5. dan
Povprečno		**985,0533**

25 ppm	**Razlika med absorbanco z vzorcem in absorbanco brez vzorca (m AU)**	**Aktivnost glutation S-transferaze (nmol/min/mg proteina)**
25-1	0,1257852	505,0725
25-2	0,2645748	741,0384
25-3	0,3515685	682,0658
25-4		Poginil 3. dan
25-5	0,0625745	120,8429
25-6	0,0814235	176,0458
25-7	0,1532968	430,5226
25-8	0,1125468	275,2294
25-9	0,2351574	893,1723
25-10	0,223215	896,6864
25-11		Poginil 3. dan
25-12	0,175485	904,1068
25-13	0,0586865	269,245
25-14	0,147708	240,9119
25-15	0,1696765	289,6093
25-16	0,1317145	452,0394
25-17		Poginil 5. dan
25-18		Poginil 11. dan
25-19		Poginil 8. dan
25-20	0,1949735	590,6621
25-21	0,2580135	486,2874
25-22	0,1819075	623,9843
25-23	0,196713	789,4621
25-24		Poginil 9. dan
Povprečno		**520,338**
terarij		
T-1	0,7088685	1814,641
T-2	0,6334715	989,9941
T-3	0,575434	1121,537
T-4	0,607069	2114,538
T-5	0,6061055	1340,176
T-6	0,5933775	152,514
Povprečno		**1255,567**