

UNIVERZA V NOVI GORICI
FAKULTETA ZA ZNANOSTI O OKOLJU

**LIPIDNA PEROKSIDACIJA KOT POKAZATELJ STRESA
PRI MODELNEM ORGANIZMU *Porcellio scaber* ZARADI
IMIDAKLOPRIDA V HRANI**

DIPLOMSKO DELO

Petra PLOŠNIK

Mentorici: prof. dr. Damjana DROBNE in
prof. dr. Polonca TREBŠE

Nova Gorica, 2010

IZJAVA

Izjavljam, da je diplomsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Rezultati, ki so nastali v okviru skupnega raziskovanja z drugimi raziskovalci, ali so jih prispevali drugi raziskovalci (strokovnjaki), so eksplicitno prikazani oziroma navedeni (citirani) v diplomskem delu.

Petra Plošnik

ZAHVALA

Posebej se zahvaljujem asistentki Malgorzati Piecha za strokovno pomoč v laboratoriju ter asistentki Romini Žabar za pomoč pri mokricah in nastajanju diplomskega dela.

Zahvaljujem se tudi obema mentoricama, prof. dr. Polonci Trebše in prof. dr. Damijani Drobne, za razumevanje, dobro sodelovanje ter za strokovne napotke in posredovanje literature.

Zahvaljujem se Mirku Nidorferju in Lidiji Sobočan za lektorski ter slovnični pregled naloge.

Posebna zahvala gre moji družini, prijateljem in Juretu, ki so me podpirali v najtežjih trenutkih, potrpežljivo spremljali moj študij, verjeli vame in me optimistično spodbujali pri nastajanju diplomske naloge!

NAJLEPŠA HVALA VSEM!

POVZETEK

V okviru diplomskega dela sem opravila dva 14-dnevna prehranjevalna poskusa, v katerih sem kopenske enakonožne rake *Porcellio scaber* izpostavila imidaklopridu, dodanem v hrano v koncentracijah 0, 10 in 25 μg imidakloprida g^{-1} suhe mase lista. Spremljala sem preživetje živali in sem živali ter pojedene liste tehtala pred in na koncu poskusa. Po končanem poskusu sem živalim odstranila žleze, jih homogenizirala in dodala ustrezne reagentne za spektrofotometrično določanje malondialdehida (MDA). Vzorcem sem izmerila absorbance pri različnih valovnih dolžinah (535, 600 in 280 nm) ter po enačbi iz literature izračunala odstotek vsebnosti MDA. Namen diplomske naloge je bil ugotoviti: ali lahko lipidno peroksidacijo uporabljamo kot biomarker pri ugotavljanju učinka imidakloprida v hrani pri modelnem organizmu *Porcellio scaber* ali obstaja povezava med fiziološkimi parametri in lipidno peroksidacijo. Rezultati prehranjevalnega dela obeh poskusov so pokazali razlike med obema poskusoma, predvsem v stopnji umrljivosti in količini zaužite hrane. Posebnost rezultatov je bila, da so živali v prvem poskusu pri vseh izpostavljenih koncentracijah, razen pri koncentraciji 10 μg imidakloprida g^{-1} suhe mase pridobivale na masi, v drugem, ponovljenem poskusu, pa so živali pri vseh izpostavljenih koncentracijah izgubile na masi. Razlike med poskusoma so bile tudi pri vsebnosti MDA. Najvišjo vsebnost MDA v prvem poskusu sem določila pri živalih, ki so bile izpostavljene 25 μg imidakloprida g^{-1} suhe mase, v drugem poskusu pa pri živalih, izpostavljenih 10 μg imidakloprida g^{-1} suhe mase. Statistična obdelava rezultatov prvega poskusa je pokazala statistično značilne razlike med kontrolno skupino in obema izpostavljenima skupinama le pri asimilacijski učinkovitosti. Statistično značilne razlike spremembe mase sem ugotovila pri primerjavi kontrolne skupine s skupino, izpostavljeno koncentraciji 10 μg imidakloprida g^{-1} suhe mase. Statistična obdelava podatkov ni pokazala statistično značilnih razlik med skupinami pri vsebnosti MDA (Mann-Whitney test). V drugem poskusu nisem ugotovila statistično značilnih razlik med skupinami, razen pri primerjavi rezultatov vsebnosti MDA kontrolne skupine s skupino, izpostavljeno 10 μg imidakloprida g^{-1} suhe mase (Mann-Whitney test).

KLJUČNE BESEDE: prehranjevalni poskus, *Porcellio scaber*, imidaklopid, biomarker, lipidna peroksidacija.

ABSTRACT

Practical work was divided into two parts. The first part of the practical work was carried out by two-week feeding experiment where isopods *Porcellio scaber* were exposed to imidacloprid through food. The concentrations of imidacloprid used in the experiments were 0, 10 and 25 μg imidacloprid g^{-1} of dry mass of the leaf. At the end of the feeding experiment the results for mortality, consumption rate, faecal pellets production were obtained. In the second part of the practical work I measured the absorbance at three different wavelengths (535, 600 and 280 nm) and I determined the content of MDA. I made the same experiments twice which gave me the possibility to compare the results and made more accurate conclusion. Purposes of the study were to determine whether lipid peroxidation is used as a biomarker to determine the impact of imidacloprid in food in model organism *Porcellio scaber* and to identify the link between physiological parameters and lipid peroxidation. There were some differences noticed between the first and the second feeding experiment. In the first experiment the animals have obtained mass, with the exception of those animals in the group of 10 μg imidacloprid g^{-1} of dry mass of the leaf who lost their mass with no exception. However, all the animals involved in the second feeding experiment lost their mass. MDA content differences between the first and the second experiment were unexpected. The highest content of MDA in the first experiment was in the group of 25 μg imidacloprid g^{-1} of dry mass of the leaf. This result was though expected. However, in the second experiment there was the highest MDA content in the group of 10 μg imidacloprid g^{-1} of dry mass of the leaf. Statistical analysis for the first experiment have shown statistically significant differences between control group and groups exposed to 10 and 25 μg imidacloprid g^{-1} of dry mass of the leaf only at assimilation ratio. Statistically significant differences were only at mass changes between control group and group exposed to 10 μg imidacloprid g^{-1} of dry mass of the leaf. Statistically significant differences were not found for MDA content (Mann-Whitney test). Statistical analysis for the second experiment for all parameters has not shown statistically significant differences among groups. The only exception was found in the case of MDA content between control group and group exposed to 10 μg imidacloprid g^{-1} of dry mass of the leaf (Mann-Whitney).

KEY WORDS: feeding experiment, *Porcellio scaber*, imidacloprid, biomarkers, lipid peroxidation.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
1.1	Splošno	1
1.2	Namen in cilji naloge.....	2
2	TEORETIČNE OSNOVE	3
2.1	Testiranje strupenosti	3
2.1.1	Delovanje snovi v posameznem organizmu	5
2.1.2	Porazdelitev snovi v organizmu	6
2.1.3	Testi strupenosti	6
2.1.4	Metabolizem pesticidov	6
2.2	Biomarkerji	7
2.2.1	Biomarkerji izpostavljenosti	8
2.2.2	Biomarkerji občutljivosti	8
2.2.3	Biomarkerji učinka	8
2.3	Lipidi	9
2.4	Lipidna peroksidacija	9
2.4.1	Malondialdehid (MDA).....	10
2.5	Neonikotinoidi	11
2.6	Imidakloprid	12
2.6.1	Fizikalno-kemijske lastnosti in strupenost imidakloprida za določene organizme	13
2.6.2	Delovanje imidakloprida.....	14
2.7	Kopenski enakonožni rak – <i>Porcellio scaber</i>	15
2.7.1	Uvrstitev izopoda <i>Porcellio scaber</i> v sistem.....	15
2.7.2	Raki (<i>Crustacea</i>)	15
2.7.3	Kopenski raki enakonožci (<i>Isopoda</i>).....	16
2.8	Uporaba kopenskih enakonožnih rakov v ekotoksikoloških študijah.....	18
2.8.1	Acetilholin esteraza (AChE) – klasifikacija in fiziološke funkcije	20
2.8.2	Glutation-S-transferaze (GST).....	20
3	EKSPERIMENTALNI DEL	21
3.1	Uporabljeni materiali	21
3.1.1	Kemikalije	21
3.1.2	Laboratorijski instrumenti	21
3.1.3	Laboratorijski pripomočki.....	21
3.2	Priprava raztopin	22
3.2.1	Priprava raztopine imidakloprida.....	22
3.2.2	Priprava raztopin za lipidno peroksidacijo.....	22
3.2.3	Priprava raztopine in homogenizacija za določanje vsebnosti imidakloprida v listih s tekočinsko kromatografijo	22
3.3	Priprava in potek dela prehranjevalnega poskusa	23
3.4	Priprava in potek dela pri lipidni peroksidaciji	24
3.5	Obdelava podatkov.....	25
3.5.1	Izračuni asimilacije, prirasti in odstotka lipidne peroksidacije.....	25
3.5.2	Statistična obdelava in prikaz rezultatov.....	25

3.6	Merjenje koncentracije imidakloprida v hrani živali	26
4	REZULTATI.....	27
4.1	I. poskus.....	27
4.1.1	Vpliv imidakloprida na smrtnost živali in fiziološke parametre v I. poskusu.....	27
4.1.2	Vpliv imidakloprida na asimilacijsko učinkovitost (AE) v I. poskusu.....	28
4.1.3	Vpliv imidakloprida na spremembo mase v I. poskusu	29
4.1.4	Vpliv imidakloprida na lipidno peroksidacijo v I. poskusu	30
4.2	II. poskus.....	31
4.2.1	Vpliv imidakloprida na vedenje in smrtnost živali v II. poskusu.....	31
4.2.2	Vpliv imidakloprida na asimilacijsko učinkovitost (AE) v II. poskusu.....	32
4.2.3	Vpliv imidakloprida na spremembo mase v II. poskusu	33
4.2.4	Vpliv imidakloprida na lipidno peroksidacijo v II. poskusu	34
4.3	Koncentracija imidakloprida v prehrani živali	35
5	RAZPRAVA	36
6	ZAKLJUČKI.....	38
7	VIRI	39
	PRILOGE	

SEZNAM PREGLEDNIC

<i>PREGLEDNICA 1: RAZLIKE MED BIOMARKERJI IN BIOINDIKATORJI</i>	<i>8</i>
<i>PREGLEDNICA 2: FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI IMIDAKLOPRIDA (CALIFORNIA DEPARTMENT OF PESTICIDE</i>	<i>13</i>
<i>PREGLEDNICA 3: STRUPENOST IMIDAKLOPRIDA NA IZBRANE ORGANIZME (CALIFORNIA DEPARTMENT OF PESTICIDE</i>	<i>13</i>
<i>PREGLEDNICA 4: ODSOTEK POGINULIH ŽIVALI PO DVOTEDENSKEM POSKUSU IZPOSTAVLJANJA KONTAMINIRANI HRANI</i>	<i>27</i>
<i>PREGLEDNICA 5: ODSOTEK POGINULIH ŽIVALI PO 14 DNEVNEM POSKUSU IZPOSTAVLJANJA Z IMIDAKLOPRIDOM</i>	<i>31</i>
<i>PREGLEDNICA 6: ODSOTEK OSEBKOV, KI SO SE MED DRUGIM 14- DNEVNIM POSKUSOM LEVILI</i>	<i>31</i>

SEZNAM SLIK

<i>SLIKA 1: SPLOŠEN PROCES PRENOSA SNOVI IZ OKOLJA DO MESTA DELOVANJA (CONNELL, 2005).</i>	4
<i>SLIKA 2: MODEL DELOVANJA, INTERAKCIJ IN BIOTRANSFORMACIJE PRI VSTOPU SNOVI V ORGANIZEM</i>	5
<i>SLIKA 3: REAKCIJA TBA IN MDA, KI TVORITA OBARVAN KOMPLEKS, KATEREGA ABSORBANCO MERIMO PRI VALOVNI DOLŽINI MED 532 IN 535 NM (CHANCERELLY IN SOD., 1998)</i>	10
<i>SLIKA 4: KEMIJSKE FORMULE S STRUKTURNIMI OBLIKAMI NIKOTINOIDNIH INSEKTICIDOV (COMPEDITUM OF PESTICIDED COMMON NAMES, 2010).</i>	11
<i>SLIKA 5: DELOVANJE SINAPSE (PICKERING, 2002).</i>	14
<i>SLIKA 6: KOPENSKI ENAKONOŽNI RAKI PORCELLIO SCABER (FOTO: P. PLOŠNIK, 2010)</i>	16
<i>SLIKA 7: TREBUŠNA STRAN MOKRICE PORCELLIO SCABER (WOODLICE ON LINE, 2010)</i>	17
<i>SLIKA 8: HRBTNA STRAN MOKRICE PORCELLIO SCABER (WOODLICE ON LINE, 2010)</i>	17
<i>SLIKA 9: RAZLIKA MED SPOLOMA PRI PORCELLIO SCABER (DISCOVER LIFE, 2010)</i>	17
<i>SLIKA 10: SHEMATSKI PRIKAZ POTEKA DELA PRI LIPIDNI PEROKSIDACIJI</i>	24
<i>SLIKA 11: ASIMILACIJSKA UČINKOVITOST MED 14- DNEVNIM PREHRANJEVALNIM POSKUSOM PRI KONTROLNI SKUPINI IN PRI ŽIVALIH, KI SO BILE IZPOSTAVLJENI KONCENTRACIJAM 10 IN 25 μG IMIDAKLOPRIDA G^{-1} SUHE MASE LISTA. (N = 11 ZA KONTROLNO SKUPINO, N = 8 ZA SKUPINO IZPOSTAVLJENO 10 μG IMIDAKLOPRIDA G^{-1} SUHE MASE LISTA IN N = 10 ZA SKUPINO IZPOSTAVLJENO 25 μG IMIDAKLOPRIDA G^{-1} SUHE MASE LISTA). DALJŠE, RDEČE LINIJE OZNAČUJEJO MEDIANO. RDEČ TRIKOTNIK PRI SKUPINI, IZPOSTAVLJENI 10 μG IMIDAKLOPRIDA G^{-1} SUHE MASE LISTA OZNAČUJE STATISTIČNO ZNAČILNO RAZLIKO (MANN-WHITNEY TEST)</i>	28
<i>SLIKA 12: SPREMEMBA MASE MED 14- DNEVNIM PREHRANJEVALNIM POSKUSOM PRI KONTROLNI SKUPINI IN PRI ŽIVALIH, KI SO BILE IZPOSTAVLJENI KONCENTRACIJAM 10 IN 25 μG IMIDAKLOPRIDA G^{-1} SUHE MASE LISTA. (N = 11 ZA KONTROLNO SKUPINO, N = 8 ZA SKUPINO IZPOSTAVLJENO 10 μG IMIDAKLOPRIDA G^{-1} SUHE MASE LISTA IN N = 10 ZA SKUPINO IZPOSTAVLJENO 25 μG IMIDAKLOPRIDA G^{-1} SUHE MASE LISTA). DALJŠE, RDEČE LINIJE OZNAČUJEJO MEDIANO. RDEČ TRIKOTNIK PRI SKUPINI, IZPOSTAVLJENI 10 μG IMIDAKLOPRIDA G^{-1} SUHE MASE LISTA, OZNAČUJE STATISTIČNO ZNAČILNO RAZLIKO (MANN-WHITNEY TEST)</i>	29
<i>SLIKA 13: LIPIDNA PEROKSIDACIJA PRI KONTROLNI SKUPINI TER PRI ŽIVALIH, IZPOSTAVLJENIM KONCENTRACIJI 10 IN 25 μG IMIDAKLOPRIDA G^{-1} SUHE MASE LISTA. (N = 11 ZA KONTROLNO SKUPINO, N = 8 ZA SKUPINO, IZPOSTAVLJENO 10 μG IMIDAKLOPRIDA G^{-1} SUHE MASE LISTA IN N = 10 ZA SKUPINO, IZPOSTAVLJENO 25 μG IMIDAKLOPRIDA G^{-1} SUHE MASE LISTA). DALJŠE, RDEČE LINIJE OZNAČUJEJO MEDIANO</i>	30
<i>SLIKA 14: ASIMILACIJSKA UČINKOVITOST MED 14- DNEVNIM PREHRANJEVALNIM POSKUSOM, PRI KONTROLNI SKUPINI IN PRI ŽIVALIH, KI SO BILE, IZPOSTAVLJENE KONCENTRACIJAM 10 IN 25 μG IMIDAKLOPRIDA G^{-1} SUHE MASE LISTA. (N = 8 ZA KONTROLNO SKUPINO IN SKUPINO, IZPOSTAVLJENO 10 μG IMIDAKLOPRIDA G^{-1} SUHE MASE LISTA, N = 10 ZA SKUPINO, IZPOSTAVLJENO 25 μG IMIDAKLOPRIDA G^{-1} SUHE MASE LISTA). DALJŠE, RDEČE LINIJE OZNAČUJEJO POVPREČNE VREDNOSTI</i>	32
<i>SLIKA 15: SPREMEMBA MASE MED 14- DNEVNIM PREHRANJEVALNIM POSKUSOM, PRI KONTROLNI SKUPINI IN SKUPINAH, IZPOSTAVLJENIM 10 IN 25 μG IMIDAKLOPRIDA G^{-1} SUHE MASE LISTA. (N = 8 ZA KONTROLNO SKUPINO IN SKUPINO, IZPOSTAVLJENO 10 μG IMIDAKLOPRIDA G^{-1} SUHE MASE LISTA, N = 10 ZA SKUPINO, IZPOSTAVLJENO 25 μG IMIDAKLOPRIDA G^{-1} SUHE MASE LISTA). DALJŠE, RDEČE LINIJE OZNAČUJEJO MEDIANO</i>	33
<i>SLIKA 16: LIPIDNA PEROKSIDACIJA PRI KONTROLNI SKUPINI TER PRI ŽIVALIH, KI SEM JIH IZPOSTAVILA KONCENTRACIJI 10 IN 25 μG IMIDAKLOPRIDA G^{-1} SUHE MASE LISTA. (N = 8 ZA KONTROLNO SKUPINO IN SKUPINO, IZPOSTAVLJENO 10 μG IMIDAKLOPRIDA G^{-1} SUHE MASE LISTA, N = 10 ZA SKUPINO, IZPOSTAVLJENO 25 μG IMIDAKLOPRIDA G^{-1} SUHE MASE LISTA). DALJŠE, RDEČE LINIJE OZNAČUJEJO MEDIANO</i>	34
<i>SLIKA 17: KROMATOGRAM HPLC- DAD, KI PREDSTAVLJA ZADRŽEVALNI ČAS IMIDAKLOPRIDA (KONCENTRACIJE 10 MG IMIDACLOPRID G^{-1} SUHE MASE LISTA), EKSTRAHIRAN IZ LISTOV. (RETENTION TIME – ČAS ZADRŽEVANJA, RESPONSE – ODZIV)</i>	35

1 UVOD

1.1 Splošno

Posodabljanje ter pospeševanje kmetijstva po 2. svetovni vojni, imenovano tudi »zelena revolucija«, je pripomoglo k pogostejši uporabi namakanja kmetijskih površin in uporabi gnojil, pesticidov ter drugih sredstev za pridobivanje večjih količin pridelkov. Novi pristopi so trenutno povečali produktivnost obdelovalnih površin, hkrati pa so povzročili resne spremembe na obdelovalnih površinah. Z razvojem mehanizacije se je kmetovanje preselilo tudi na območja, primernejša za intenzivno kmetijstvo (Inštitut za trajnostni razvoj, 2010).

Uporabljati se je pričelo številne različne fitofarmacevtske pripravke, za zatiranje insektov in drugih živali kot tudi za zatiranje raznih plevelov ter drugih rastlin. Danes se pesticidi oz. fitofarmacevtska sredstva ne uporabljajo zgolj v kmetijstvu za zatiranje škodljivcev, plevelov in rastlinskih bolezni, pač pa tudi v gozdarstvu, lesarstvu, ladjedelništvu, turizmu in celo v športu (npr. igrišča za golf). Po nastanku jih delimo na naravne in sintetično pridobljene snovi. Naravne so izolirane iz rastlin, medtem ko s sintezo dobimo sintetične snovi, ki lahko ob neustrezni uporabi zaradi svojih učinkov ogrožajo človeka in ekosfero. Uporaba pesticidov je vodila do onesnaževanja okolja, kar je potrjeno s številnimi analizami, ki prikazujejo, da je na področjih intenzivnega kmetijstva onesnažena tudi podtalnica (Inštitut za trajnostni razvoj, 2010).

Onesnaženost okolja s pesticidi je posledica njihove vse večje, nepravilne uporabe in prekomerne rabe omenjenih sredstev. Pesticidi in njihovi metaboliti se lahko nalagajo v različnih živilih, vodi, tleh in organizmih. Pogosto delujejo na netarčne¹ organizme, povzročajo različne učinke, lahko pa jih tudi ubijajo (npr. ptice, ki se prehranjujejo z ubitimi listnimi ušmi) (Inštitut za trajnostni razvoj, 2010).

Čeprav pesticide uporabljamo za boj proti določenim rastlinskim škodljivcem, lahko povzročijo velike spremembe celotnega ekosistema. Če iz ekosistema izgine ena vrsta organizmov, to povzroči spremembo strukture, funkcije in porušenje ravnotežja, ki temelji na bioloških kontrolah², ki so se razvile skozi čas. Z bojem proti škodljivcem v kmetijskih kulturah zmanjšujemo tudi hrano za druge organizme, katerih število se zmanjšuje. Podoben pojav opazimo pri onesnaževanju voda. Zaradi izginjanja zooplaktona in ličink žuželk primanjkuje hrane za nekatere vrste vodnih organizmov (Inštitut za trajnostni razvoj, 2010).

Pesticidi delujejo na mnogo organizmov, ki so z vidika kmetijstva koristni in prispevajo k stabilnosti ekosistema (npr. polonice, strigalice ter oprasovalci, npr. čebele in čmrlji). Zato uničevanje življenjskih združb zaradi uporabe pesticidov pogosto povzroči povečanje populacij in njihove intenzivnosti. Primer takšnih motenj je uporaba piretroidov v nasadih bombaža za zatiranje žuželk iz reda metuljev (*Lepidoptera*), ko hkrati uničujemo tudi njihove biotične sovražnike, kar povzroči porast populacij teh v nasadih bombaža (Inštitut za trajnostni razvoj, 2010).

Omeniti velja, da uporaba pesticidov povzroči prilagodljivost vrste na pesticid, ki jo zatiramo, rezultat pa je pojav odpornih osebkov. Dejstvo je, da žuželke zaradi svojega hitrega razmnoževanja, kratkih življenjskih krogov in genske pestrosti razvijejo sposobnost, da se

¹ So organizmi, na katere ima snov ne vpliva direktno, ampak posredno.

² Skupina organizmov na osnovi katere lahko ugotovimo spremembe, ki jih spremljamo.

prilagodijo na naša prizadevanja za zatiranje. Danes je na svetu preko 450 vrst žuželk, ki so odporne na številne pesticide (Inštitut za trajnostni razvoj, 2010).

Običajen ukrep kmetov, ki se soočajo s takšnimi razmerami, je povečanje količin uporabljenih pesticidov ali pa uporaba bolj strupenih sredstev. Značilen primer je pridelovanje bombaža v grških pokrajinah Tesalonija in Makedonije (Inštitut za trajnostni razvoj, 2010), kjer se je povečala odpornost gosenic, škodljivca bombaža na pesticide. Kmetje, ki so se soočili z nevarnostjo uničenja svojih pridelkov, so uporabili velike količine različnih pesticidov, kar je povzročilo resno onesnaženje tal in vode (Inštitut za trajnostni razvoj, 2010).

1.2 Namen in cilji naloge

Imidakloprid je aktivna snov v fitofarmaceutskih sredstvih, ki se pogosto uporabljajo v Sloveniji. Je v kmetijstvu najpogosteje uporabljen predstavnik neonikotinoidov. Čeprav se v okolju relativno hitro razgradi (razgradnja pod naravnimi pogoji traja 57,3 min pri 24 °C in pH 7), moramo upoštevati, da je njegova strupenost za posamezne organizme, kot so na primer čebele, visoka (California department of pesticide regulation, 2010). Dosedanje raziskave so pokazale, da vendarle učinkuje tudi na netarčne organizme.

Pri dosedanjih raziskavah se je merila aktivnost encimov acetilholinesteraze (AChE), glutation-S-transferaze (GST), fiziološke parametre ter vsebnost proteinov v mokricah, izpostavljenih imidaklopridu v hrani. Študije so pokazale vpliv imidakloprida na izgubo telesne mase in povišano asimilacijsko učinkovitost. Upadla je aktivnost encimov AChE in GST. Oba omenjena encima sta specifična, zato sem si v okviru diplomskega dela zastavila cilj ugotoviti, ali lahko lipidno peroksidacijo uporabim kot splošni pokazatelj stresa zaradi izpostavljenosti imidaklopridu.

V nalogi sem si kot cilje zastavila:

- ugotoviti, ali se lahko lipidno peroksidacijo uporablja kot biomarker pri ugotavljanju učinka imidakloprida v hrani na modelni organizem, kopenskem enakonožnem raku (*Porcellio scaber*);
- ugotoviti povezavo med fiziološkimi parametri (prehranjevanje, iztrebljanje, asimilacijska učinkovitost) ter lipidno peroksidacijo pri modelnem organizmu *Porcellio scaber*.

2 TEORETIČNE OSNOVE

2.1 Testiranje strupenosti

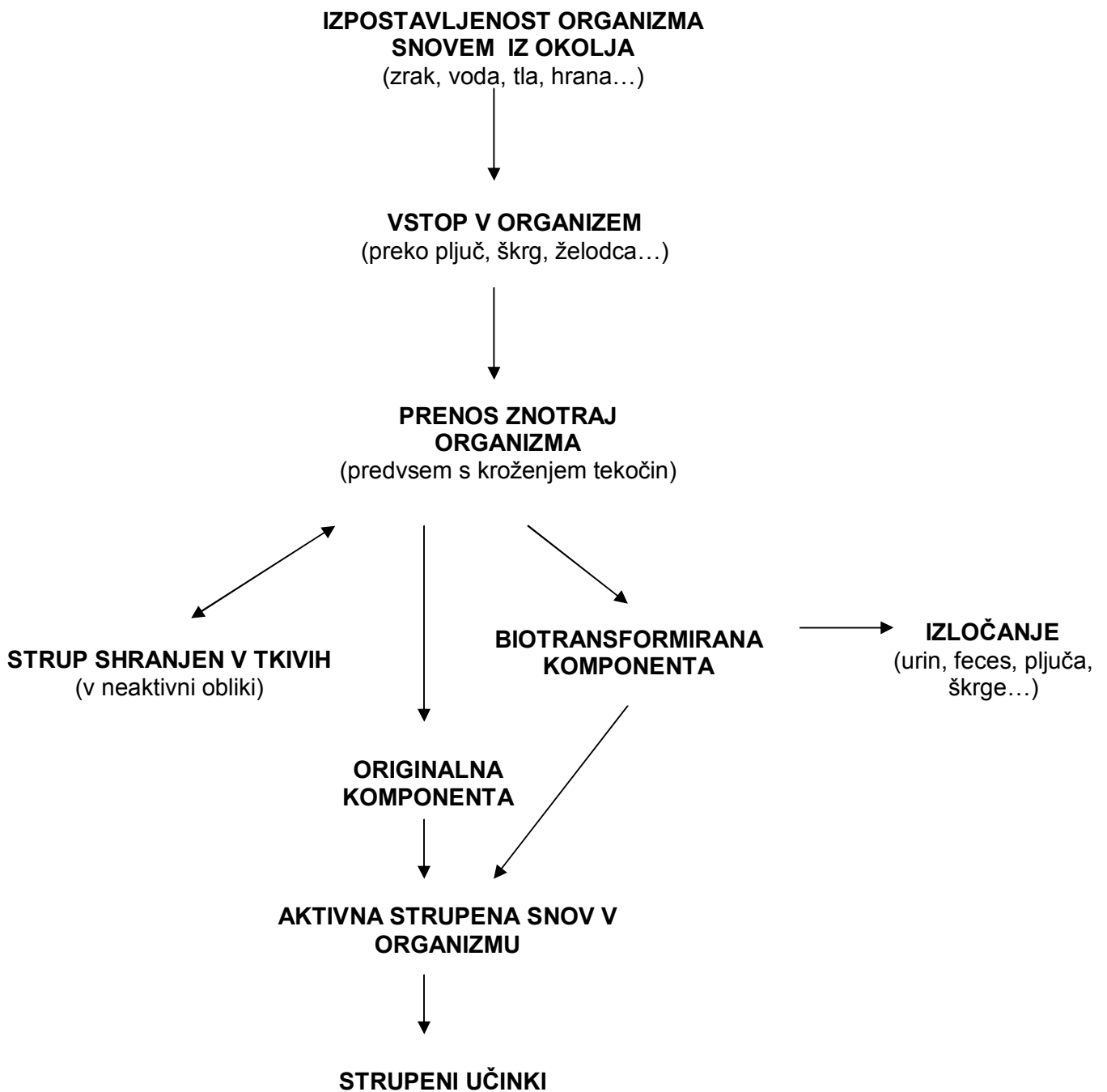
Osnova toksikologije in ekotoksikologije je odnos med količino snovi, kateri je organizem izpostavljen, naravo snovi in stopnjo posledice škodljivega učinka. Odnos med odmerkom in odzivom («dose-response») je temelj za ocenjevanje tveganj in nevarnosti snovi iz okolja. Že Paracelsius (1493- 1541) je dejal, da je vse odvisno od odmerka. Vsaka snov je strupena, če je odmerek dovolj visok (Walker, 2001).

Za testiranje strupenosti obstaja več parametrov, med katerimi je najpogostejši umrljivost testnih organizmov. Strupenost lahko testiramo s spremljanjem biokemijskih, fizioloških parametrov, reproduktivnostjo ter s spremljanjem vedenja (Walker, 2001).

Strupenostne učinke delimo na reverzibilne in ireverzibilne. V primeru reverzibilnega strupenega učinka se interakcije z receptorji ali encimi popravijo. Pri ireverzibilnem strupenem učinku pride do kovalentnih interakcij z encimom oz. receptorjem, pojavi se poškodba oz. disfunkcija, napaka ni popravljena in nastopi lahko smrt celic oz. organizma (Walker, 2001).

Snov, ki deluje kvarno v povišanih koncentracijah, najprej deluje lokalno strupeno, nato se snov absorbira in ni več lokalna, temveč sistemska. V tem primeru se razširi na oddaljena mesta, kot je celica, organ, tkivo. Absorbcijo snovi in nadaljnjo dogajanje nam pomaga razložiti toksikokinetika. Poznamo štiri procese toksikokinetike: absorbcija, porazdelitev, metabolizem in izločanje.

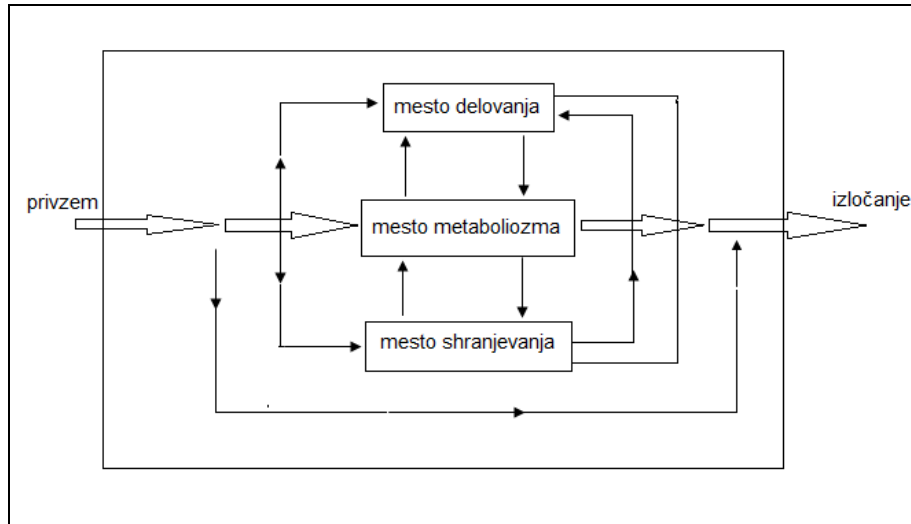
Pri absorbciji mora snov, ki deluje kvarno v povišanih koncentracijah, prečkati celično membrano, kar lahko naredi s pasivnim ali aktivnim transportom, olajšano difuzijo ali fagocitozo in pinocitozo. Od lastnosti snovi je odvisna njena porazdelitev po organizmu in izločanje (Walker, 2001).



Slika 1: Splošen proces prenosa snovi iz okolja do mesta delovanja (Connell, 2005).

2.1.1 Delovanje snovi v posameznem organizmu

Delovanje snovi po vstopu v posamezni organizem je prikazano na sliki 2. Model prikazuje, kako snovi v organizem vstopajo, možne interakcije v organizmu in biotransformacije ter končno izločanje snovi (Walker, 2001).



Slika 2: Model delovanja, interakcij in biotransformacije pri vstopu snovi v organizem (Walker, 2001).

Model prikazuje poti: pot vnosa, metabolizma, aktivnosti in pot izločanja. Puščice v modelu prikazujejo delovanje snovi in odnos med snovmi. Kadar je snov že v organizmu, se izrazijo štiri poti, ki si sledijo po vrstnem redu (Walker, 2001).

1. Mesto reakcije. Toksična oblika snovi se poveže z endogeno makromolekulo (npr. protein ali DNK) ali strukturo (npr. membrana). Te molekulske interakcije vodijo do toksičnega delovanja v celotnem organizmu (snov deluje na organizem).
2. Mesto metabolizma. Tukaj so encimi, ki metabolizirajo snovi. Običajno metabolizem sproži detoksikacijo, vendar v določenih primerih lahko sproži tudi aktivacijo (organizem deluje na snov).
3. Mesto shranjevanja. Snov obstaja v inertni obliki s toksikološkega vidika. Ne deluje na organizem in tudi organizem ne deluje nanjo.
4. Mesto izločanja. Izloči se nespremenjena snov (takšna, kot vstopi), ali pa se izloči biotransformiran produkt (metabolit ali konjugant). V primeru, da v organizmu vstopi lipofilna oblika snovi, iz organizma izstopi biotransformiran produkt in ne originalna komponenta.

To je preprost model, ki prikazuje posamezna mesta kot kategorije, vendar je v realnosti lahko več kot eno mesto za posamezno kategorijo in v organizmu več kot eno mesto za posamezni tip poti (Walker, 2001).

Po privzemu snovi, telesne tekočine, kot so kri, limfa (vretenčarji) ali hemolimfa (žuželke), prenesejo to snov v druge celice, organe. Prenos v organe in tkiva poteka z difuzijo preko membranskih barrier, ali s pomočjo lipidov v primeru zelo lipofilne substance. Prevzemi snovi so odvisni od parametrov topnosti, lipofilnosti/lipofobnosti in s tem od difuzije (aktivne ali pasivne) ali endocitoze. Večina snovi se po privzemu prenese po telesu (Walker, 2001).

2.1.2 Porazdelitev snovi v organizmu

Pri vretenčarjih absorbirane snovi potujejo po krvi in manjši del po limfi. V primeru absorbiranja iz črevesja, se večina absorbiranih snovi najprej zadrži v jetrih, saj gre večji del snovi v hepatocite. Vstop v hepatocite je z difuzijo preko membrane ali s ko-transportom z lipo-proteinskimi fragmenti, ki se prenašajo z endocitozo (Walker, 2001).

Po absorbiranju snovi preko pljuč ali kože, je pot porazdelitve drugačna. Kri potuje najprej do ostalih tkiv. Organske molekule so različno topne v krvi in limfi, zato se bodo tudi različno porazdelile. Lipofilne komponente (visoka vrednost K_{ow}) se bodo povezale z lipoproteini in membranami krvnih celic, z manjšo verjetnostjo, da se bodo raztopile v krvi. Polarne komponente (nizke vrednosti K_{ow}) bodo težile k raztopitvi v vodi in se ne bodo povezale z lipoproteini ali membranami krvnih celic (Walker, 2001).

Nekatere organske molekule lahko preidejo tudi v možgane. Za prehod v možgane morajo organske molekule preiti čez »krvno-možgansko« bariero. Splošno povedano, to bariero lahko prečkajo lipofilne komponente, medtem ko polarne molekule (nizke vrednosti K_{ow}) tega ne morejo (Walker, 2001).

Pri nevretenčarjih poteka prenos snovi po hemolimfi, drugače so poti prenosa zelo podobne kot pri vretenčarjih (Walker, 2001).

2.1.3 Testi strupenosti

(Eko)toksikološki testi so biološki poskusi z različnimi testnimi vrstami pod vplivom različnih kemijskih substanc ali snovi iz okolja. Pri vsakem testu se spremlja in meri učinke snovi na enega ali več testnih organizmov. Ločimo dve vrsti ekotoksikoloških testov:

- kratkotrajni testi in
- dolgotrajne teste.

Pri kratkotrajnih testih se spremlja predvsem smrtnost in/ali imobilizacija. Večina teh testov ima v ospredju raziskave in vpliv na posamezne organizme (Walker, 2001).

Pri dolgotrajnih testih spremljamo vplive na razmnoževanje, rast in ostale fiziološke procese. (Walker, 2001).

2.1.4 Metabolizem pesticidov

Pesticidi v živalsko telo vstopajo z vdihavanjem, preko kože ali zaužitjem. V vseh primerih prihaja do metabolizma, kjer sodelujejo različni mehanizmi. To so kemične in biokemične transformacije, ki pretvarjajo pesticide v organizmu (Dikshith, 2000).

Večina pesticidov v naravi je lipofilnih in vsebujejo funkcionalne skupine, ki nato opravijo kompleksne biokemične reakcije, pri katerih nastajajo komponente, ki so bolj polarne kot izhodna molekula in se zato enostavneje izločijo iz telesa (Dikshith, 2000).

Metabolizem pesticidov poteka v dveh stopnjah:

Faza I: biotransformacija

Faza II: konjugacija

V prvi fazi poteka veliko kemijskih reakcij, kot so: hidroliza, oksidacija, redukcija, hidroksilacija, izomerizacija, epoksidacija, dehidrohalogenacija, desulfuracija, dehalogenacija, nitrozacija (Dikshith, 2000).

V drugi fazi, fazi konjugacije, potekajo sintezne reakcije. Pri teh se endogene molekule združijo s pesticidom ali enim izmed glavnih metabolitov za tvorbo polarne molekule, saj se ta lažje izloči. Druga faza metabolizma vključuje formacijo konjugantov preko tvorbe glikozida, sulfo-konjugacije, glutation-konjugacije, konjugacije amino kislin (AK), acetiliranja in metiliranja (Dikshith, 2000).

Odzivi na snovi, ki deluje kvarno v povišanih koncentracijah, so različni: od poškodbe tkiv, farmakoloških in fizioloških učinkov, mutageneze, karcinogeneze in razvojni. Vsak organizem se na snovi, ki delujejo kvarno v povišanih koncentracijah, odzove na različne načine. V primeru celičnih poškodb ločimo primarne, sekundarne in terciarne učinke (Dikshith, 2000).

Med celične poškodbe primarnih učinkov štejemo oksidativni stres. Kadar v organizmu nastajajo radikali, kar pomeni, da potekajo vnetni procesi ali so prisotne snovi, ki povzročijo nastanek prostih radikalov, takrat prisotni kisik povzroči verižno reakcijo tvorbe hidroperoksidov, hidroksilnih in drugih radikalov. Posledica teh reakcij so poškodbe DNK, proteinov, lipidov in drugih sestavin celice. Oksidativne poškodbe proteinov vodijo v spremenjeno encimsko aktivnost, ki je lahko vzrok za mnoga obolenja (Dikshith, 2000).

2.2 Biomarkerji

Biološki označevalci ali biomarkerji so snovi v telesu, ki kažejo odgovor organizma na neko spremembo. Stresorji, kot so ksenobiotiki, bolezni ter fiziološke spremembe organizma, povzročijo spreminjanje fizioloških parametrov v celicah, biokemičnih komponentah ali procesih, strukturah in njihovih funkcijah.

Biomarkerji se uporabljajo tudi v medicini, biokemiji, okoljskih znanostih ter drugje. V medicini z njimi potrjujejo diagnoze, ocenjujejo zdravljenje (npr. odziv na kemoterapijo pri zdravljenju s citostatiki), v biokemiji in v okoljskih znanostih pa si z njimi pomagajo pri boljšem razumevanju metabolizma učinkovin, njihovem delovanju in učinkovitosti. Zato so lastnosti dobrega biomarkerja, da je lahko merljiv, predvidljiv, nedestruktiven, občutljiv in specifičen (Markert, 2003).

Bioindikatorji so odzivi višjih nivojev biološke organizacije na stresor. To so predvsem odzivi združb, populacij in celotnega ekosistema (Markert, 2003).

Glavna razlika med bioindikatorji in biomarkerji je predvsem glede specifičnosti in organizacijskega nivoja. Seveda je vse odvisno od tega, kar želimo doseči. Glavne razlike med biomarkerji in bioindikatorji so v preglednici 1.

Preglednica 1: Razlike med biomarkerji in bioindikatorji

Glavne lastnosti	Biomarker	Bioindikator
Prikazujejo predvsem	izpostavitvev	učinek
Občutljivost na stresor	visoka	nizka
Specifičnost odgovora	visoka	nizka
Variabilnost odgovora	visoka	nizka
Hitrost odziva	visoka	nizka
Ekološki pomen	nizka	visoka

Poznamo tri tipične skupine biomarkerjev, ki jih je določil IPCS (The international programme on chemical safety of the WHO (World Health Organization)) (Markert, 2003):

- biomarkerje izpostavljenosti
- biomarkerje občutljivosti in
- biomarkerje učinka

2.2.1 Biomarkerji izpostavljenosti

Z njimi lahko ugotavljamo izvor in koncentracijo izpostavljenosti posameznega organizma snovi, saj so v ospredju eksogene substance oz. njihovi metaboliti ter interakcije med tarčnimi molekulami in ksenobiotiki.

Biomarkerji na molekularnem nivoju imajo hitre odzive in so običajno specifični za določeno skupino snovi (Stanek in sod., 2006). S tem lahko ugotovimo, čemu in kakšne odzive povzročajo določene snovi na organizme. Primer je aktivacija biomarkerja acetilholin esteraze (AChE) kot posledica izpostavljenosti organofosfatnim insekticidom.

2.2.2 Biomarkerji občutljivosti

Organizmi se običajno odzivajo na ksenobiotike, kar je posledica genetskega polimorfizma ali epigenetskih faktorjev. Drugačni odzivi na ksenobiotike tako pomenijo drugačen metabolizem, kar pomeni različno encimsko kinetiko in odsotnost encimov.

Glavni predstavniki biomarkerjev občutljivosti so encimi, ki metabolizirajo učinkovine. Med te spadajo citokromi (CYP), glutation-S-transferaza (GST) in acetyl transferaze. Ostali biomarkerji občutljivosti so še: jedrni in citosolni receptorji, onkogeni, tumor supresorski geni in komponente imunskega sistema (Markert, 2003).

2.2.3 Biomarkerji učinka

Ti biomarkerji so predvsem spremembe, ki jih lahko opazimo, merimo in so posledica neželenih kemijskih interakcij med snovmi in encimom ali drugo molekulo. Takšne spremembe pa lahko pripeljejo do patoloških posledic. Te biomarkerje opredelimo na vseh nivojih biološke organizacije, saj jih najdemo v posameznih molekulah v organizmu (npr. DNA), encimih, organelih (mitohondrij), celicah, tkivih, organih, organizmih... (Markert, 2003).

2.3 Lipidi

Lipidi so sestavljeni iz ogljika in vodika, lahko še iz kisika, dušika in fosforja. Vezi, ki povezujejo atome med seboj, so lahko estrske, fosfoestrske in amidne. Napolarni lipidi, ki jih imenujemo maščobe, so po kemijski sestavi večinoma estri propan-1,2,3-triola (glicerola) in višjih maščobnih kislin. So najpomembnejše molekule za shranjevanje energije. Običajno tem spojinam pravimo triacilgliceroli. Polarni lipidi so pomembne sestavine bioloških membran, te pa poleg lipidov sestavljajo še proteini (Boyer, 2005).

Med lipide prištevamo steroide, katerih predstavnik je holesterol. Lipidi pa so lahko tudi pigmenti, ki absorbirajo svetlobo (β -karoten, retinal), encimski kofaktorji (vitamin K), hormoni (estrogeni, testosteron), signalne molekule (prostaglandini) in prenašalci elektronov (ubikinon) (Boyer, 2005).

2.4 Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija je že dolgo znana in dobro opisana radikalska poškodba biološke membrane. Ta vodi do porušitve membranske strukture in njene funkcije. V literaturi so omenjene poškodbe opisane kot lipidna peroksidacija, ki je definirana kot porušenje ravnotežja med prooksidativnimi in antioksidativnimi procesi v celici. Do porušenja pride zaradi naslednjih razlogov (Mitjavila, 1990; Niki in sod., 2005):

- zaradi okvare (mutacije) ali zmanjšane prisotnosti encimov (superoksid dismutaza, glutation peroksidaza), ki v telesu skrbijo za odstranjevanje superoksidnega radikala ($O_2^{\cdot-}$) in vodikovega peroksida, ki sta normalna intermedijata v metaboličnih procesih;
- zaradi zmanjšane ali motenega vnosa antioksidantov s hrano;
- zaradi povečanega vnosa železovih in nekaterih drugih kovinskih ionov;
- zaradi povečane produkcije reaktivnih dušikovih zvrsti, ker je organizem izpostavljen povečani koncentraciji kisika, zaradi ekstremnih fizičnih obremenitev netreniranega organizma, zaradi psihičnih stresov, zaradi radioaktivnega sevanja in toksinov, zaradi aktiviranja imunskega sistema pri kroničnih vnetnih procesih (Mitjavila, 1990 in Niki in sod., 2005).

Membranska lipidna peroksidacija je degenerativni proces, ki se dogaja v polinenasičenih maščobnih kislinah. Pri procesu oksidacije nastajajo različni razgradni produkti, pri čemer se membranske strukture modificirajo. S poškodbami, ki jih povzroči lipidna peroksidacija membranskim proteinom, DNA in RNA, glede na radikale ali reaktivne vrste, lahko razložimo za katero vrsto gre (Mitjavila, 1990; Niki in sod., 2005).

Kisik, kot nujno potreben element za življenje, lahko v tem primeru sodeluje v ekstremno škodljivih reakcijah za organizem, pri čemer je strupenost odvisna od aerobnega življenja in oksidacijskih procesov, ki so v normalnih pogojih v organizmu kontrolirani (Mitjavila, 1990; Niki in sod., 2005).

2.4.1 Malondialdehid (MDA)

Malondialdehid (MDA) je spojina, ki nastane pri neencimski lipidni peroksidaciji nenasičenih maščobnih kislin. MDA reagira *in vivo* in *in vitro* s prostimi aminoskupinami proteinov, fosfolipidov ali nukleinskih kislin (Chancerelly in sod., 1998).

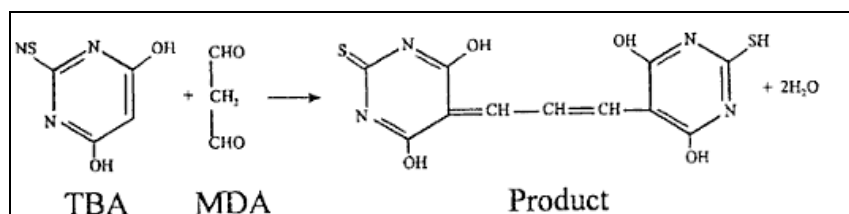
Aldehidi nastanejo na dva načina. Pri prvem načinu nastanejo aldehidi, ko se lipidni hidroperoksid metabolizira v bioloških sistemih. Pri drugem načinu nastanka aldehida nastanejo oksidativne poškodbe, katerih rezultat je lipidna peroksidacija (Chancerelly in sod., 1998).

MDA je aldehyd, ki nastane pri lipidni peroksidaciji in ga lahko določimo z merjenjem obarvanega produkta, ki se tvori s tiobarbiturno kislino (TAB – (thiobarbituric acid)). To je najbolj pogost način za proučevanje lipidne peroksidacije (Chancerelly in sod., 1998).

2.4.1.1 Določitev MDA

Pri reakciji TBA (tiobarbiturna kislina) ena molekula MDA reagira z dvema molekulama TBA. Ob tem se tvori pigment z absorbančijskim maksimumom pri 532-535 nm (slika 3).

Številne metode raziskujejo določitev TBA reaktivnih substanc (TBARS) v bioloških vzorcih. Vse se nanašajo na spektrofotometrično detekcijo pri valovni dolžini 532 nm v kislem mediju in inkubaciji pri 95 °C. Metoda, ki vključuje fluorometrično detekcijo TBARS, je občutljivejša in bolj specifična, kot spektrofotometrično določanje MAD, saj obstajajo spojine, ki absorbirajo pri enaki valovni dolžini, kot MDA (Chancerelly in sod., 1998).



Slika 3: Reakcija TBA in MDA, ki tvori obarvan kompleks, katerega absorbanco merimo pri valovni dolžini med 532 in 535 nm (Chancerelly in sod., 1998)

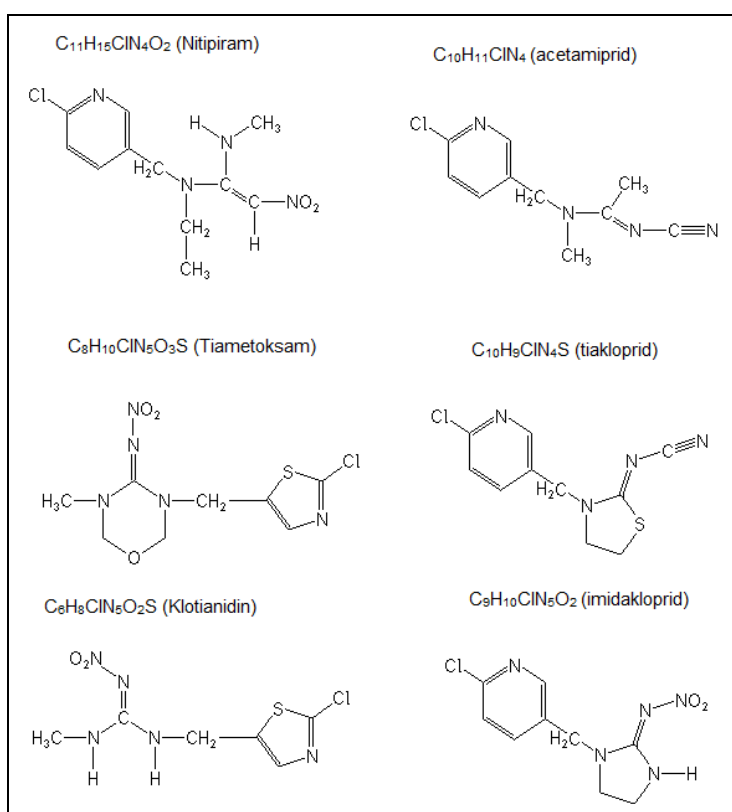
Literaturni podatki še vedno ne dokazujejo, da se lipidno peroksidacijo uporablja kot pokazatelj stresa pri testnih organizmih. Mansour in sod. (2009) v svoji študiji navaja lipidno peroksidacijo kot molekularni mehanizem strupenosti za nekatere pesticide.

2.5 Neonikotinoidi

Neonikotinoidi so skupina sintetično pripravljenih insekticidov, ki so podobni naravnemu nikotinu. Na tržišču so se pojavili v začetku devetdesetih let prejšnjega stoletja pod različnimi imeni, kot so nitroguanidini, neonikotinili, neonikotinoidi, kloronikotini in redkeje kloronikotinili. Danes se uporablja izraz neonikotinoidi (Jemec in sod., 2009). Najširše zastopan predstavnik neonikotinoidov je imidakloprid, ki je bil v Evropi in na Japonskem vpeljan v kmetijsko prakso že leta 1990, leta 1992 pa prvič registriran v ZDA (Drobne in sod., 2008).

Med neonikotinoide uvrščamo poleg imidakloprida še nitenpiram, acetamiprid, tiakloprid, klotianidini, tiametoksam.

Komercialno pomembne neonikotinoide, kot je imidakloprid, sestavlja 6-kloro-3-piridilni del molekule, ki jim daje podobnost nikotinu. Poleg omenjenega dela sestavljajo neonikotinoidne spojine še druge različne skupine, kot so nitrometilenska, nitroiminska ali cianoimiska skupina (Matsuda in sod., 2001). Slika 4 prikazuje strukturne prikaze in formule neonikotinoidov.



Slika 4: Kemijske formule s strukturnimi oblikami nikotinoidnih insekticidov (*Compendium of pesticides common names, 2010*).

2.6 Imidaklopid

Imidaklopid se kot aktivna snov v fitofarmaceutskih sredstvih uporablja predvsem za zatiranje termitov, žuželk v prsti, koloradskega hrošča, belih uši. Lahko ga nanašajo na liste, ali ga uporabljajo za tretiranje semen in prsti, in sicer na rastlinah, kot so bombaž, riž, krompir, zelenjava, pečkato sadje, arašidi (Drobne in sod., 2008).

Imidaklopid se zaradi svojih kemijskih in fizikalnih lastnosti v okolju in organizmih ne akumulira. Je namreč zelo dobro topen v vodi (514 mg imidakloprida L⁻¹ pri 20 °C in pH 7), v prisotnosti sončne svetlobe pa se hitro razgradi (57,3 min pri 24 °C in pH 7). Nizka hlapnost oz. nizek parni tlak (1,33 x 10⁻⁵ Pa pri 20 °C) pa preprečujeta širjenje imidakloprida po velikih površinah (California department of pesticide regulation, 2010).

V Priročniku fitofarmaceutskih sredstev (FFS) iz leta 2007 so bila v Sloveniji na tržišču naslednja štiri različna fitofarmaceutska sredstva, katerih aktivna snov je imidaklopid:

- CONFIDOR SL 200
- GAUCHO FS 350
- GAUCHO WS 70
- KOHINOR SL 200

CONFIDOR SL 200 in KOHINOR SL 200 sta še vedno v uporabi in sta registrirana vse do leta 2016, medtem ko so FFS GAUCHO FS 350 in GAUCHO WS 70 umaknili iz liste registriranih pripravkov (registracija od leta do 2003 do aprila 2010).

Navedena fitofarmaceutska sredstva se uporabljajo za tretiranje rastlin, kot so koruza, hmelj, hruške, češnje, breskve, jabolane, paradižnik, paprika, jačevce, sladkorna pesa. Tarčni organizmi so različni. Z njimi lahko zatirajo predvsem liste uši, strune, švedsko mušico, mahovinarje, pesno muho, pesnega bolhača, resarje, hmeljeve listne uši, bolšice, sadnega listnega duplinarja in sadnega listnega zavrtača (Registrirana fitofarmaceutska sredstva 2010; PAN, 2010).

Količina uporabe fitofarmaceutskih sredstev, pri katerih je imidaklopid aktivna snov, se giblje med 0,05 do 0,4 kg na hektar, razen v Indiji na čajnih poljih kjer je priporočljiva koncentracija 0,03 kg aktivne komponente na hektar (Registrirana fitofarmaceutska sredstva 2010).

2.6.1 Fizikalno-kemijske lastnosti in strupenost imidakloprida za določene organizme

Fizikalno-kemijske lastnosti imidakloprida so prikazane v preglednici 2. Koncentracije strupenosti imidakloprida za izbrane tarčne organizme pa so prikazane v preglednici 3.

Preglednica 2: Fizikalno-kemijske lastnosti imidakloprida (California department of pesticide regulation, 2010)

Ime	Imidaklopid
Kemijsko ime (IUPAC ³)	1-[(6-chloro-3-pyridinyl)methyl]-N-nitro-2-imidazolidinimine)
Formula	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂
Molekulska masa	255,7 g mol ⁻¹
Topnost v vodi	5,14 x 10 ² µg L ⁻¹ pri 20 °C in pH 7
Parni tlak ⁴	1,33 x 10 ⁻⁵ Pa pri 20 °C
Razpolovni čas s fotolizo	57,3 min pri 24 °C in pH 7
Razpolovni čas s hidrolizo	>30 dni pri 25 °C in pH 7
Razpolovni čas v anaerobnih razmerah	27,1 dni
Razpolovni čas v aerobnih razmerah	997 dni
Razpolovni čas s fotolizo v tleh	38,9 dni
Razpolovni čas razpada na prostem	Med 26,5 do 299 dni
Henrijeva konstanta	6,5 x 10 ⁻¹¹ atm m ³ mol ⁻¹ pri 20 °C
Adsorpcijski koeficient v tleh:	
K _d	0,956 do 4,18 ml g ⁻¹
K _{oc}	132 do 310 µg g ⁻¹

Preglednica 3: Strupenost imidakloprida na izbrane organizme (California department of pesticide Regulation, 2010)

Organizem	Koncentracija
Vodne bolhe (<i>Daphnia magna</i>) LC ₅₀ (48 h)	85 mg L ⁻¹
Misidni rakci (<i>Americamysis bahia</i>) LC ₅₀ (96 h)	34 µg L ⁻¹
Šarenka (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) LD ₅₀ (96 h)	>83 µg L ⁻¹
Raca mlakarica (<i>Anas platyrhynchos</i>) LD ₅₀	283 mg kg ⁻¹
Akutni oralni vnos pri podganah LC ₅₀	450 mg kg ⁻¹
Čebele LD ₅₀ (48 h)	0,008 µg/ čebelo
Virginjska jerebica (<i>Colinus virginianus</i>) LD ₅₀	152 mg kg ⁻¹

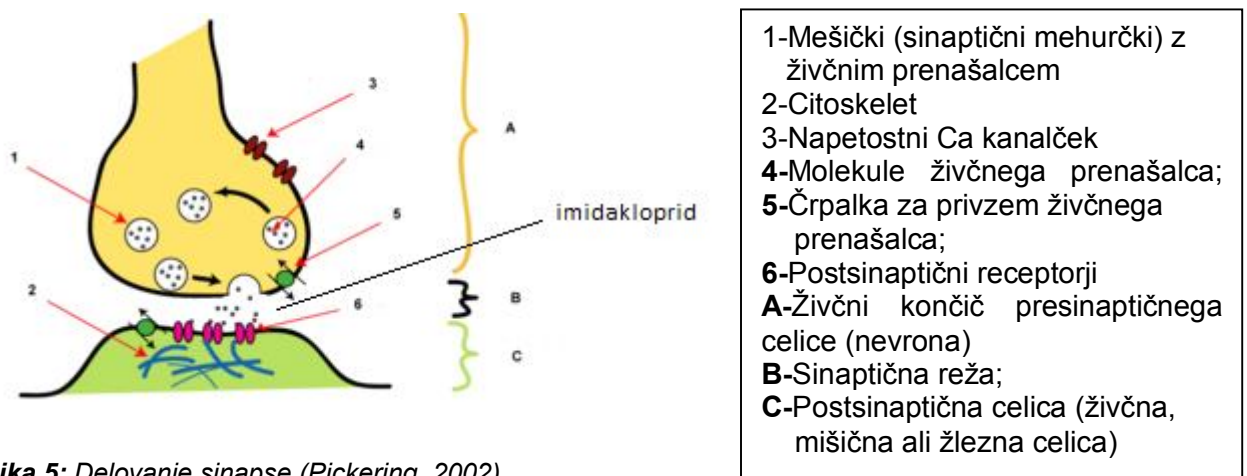
³ IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry)

⁴ Pretvorjeno iz mm Hg v Pa (http://www.engineeringtoolbox.com/pressure-units-converter-d_569.html)

2.6.2 Delovanje imidakloprida

Imidakloprid deluje kot agonist na postsinaptični nikotin acetilholinske receptorje (nAChR), ki izzovejo modifikacijo v obnašanju in delovanju, lahko tudi smrt, saj moti delovanje centralnega živčnega sistema. Ciljno mesto so acetilholinske sinapse, pri čemer je imidakloprid nikotinski acetilholinski receptor (nAChR) (Drobne in sod., 2008).

Afiniteta vezave nAChR se od organizma do organizma razlikuje. Pri vretenčarjih so nAChR izraženi pri stikih med mišicami in živčnim sistemom, centralnim živčnim sistemom, periferalnim živčnim sistemom ter pri mehano-senzoričnih celicah. Pri živalih so nAChR omejeni na živčni sistem, obenem so živčna tkiva žuželk zgrajena iz velike količine nAChR, kar pripomore k temu, da je afiniteta imidakloprida na žuželke mnogo višja kot na vretenčarje (Matsuda in sod., 2001).



Slika 5: Delovanje sinapse (Pickering, 2002).

Vezava acetilholina na receptor povzroči konformacijsko spremembo receptorja, katere posledica je odprtje ionskega kanalčka (slika 5). Z odprtjem kanalčka preidejo kationi v notranjost celice in povzročijo depolarizacijo membrane. Poznamo natrijeve, kalijeve in kalcijeve ionske kanalčke, preko katerih prehajajo Na^+ , Ca^{2+} oz. K^+ ioni. Potovanje električnih impulzov do naslednje celice poteka po aksonih in preko sinaps.

Ca^{2+} ion povzroči izločanje ACh, ki se sprosti v sinaptično režo (slika 5) in aktivira Na^+ in Ca^{2+} kanalčke na postsinaptični celici. AChE katalizira hidrolizo AChE. Podobno poteka vezava nikotina, kar pomeni, da podobno deluje imidakloprid. V primeru, da se na postsinaptično celico veže imidakloprid, pride do inhibicije nikotin acetilholin esteraze, kar pomeni, da se prenaša napačen signal po celicah in izzove poškodbe celice, t.i. oksidativni stres, posledica česar je lipidna peroksidaza (Funkcije proteinov, 2010).

2.7 Kopenski enakonožni rak – *Porcellio scaber*

2.7.1 Uvrstitev izopoda *Porcellio scaber* v sistem

Kraljestvo: živali (*Animalia*)
Deblo: členonožci (*Arthropoda*)
Poddeblo: raki (*Crustacea*)
Razred: višji raki (*Malacostracans*)
Red: Enakonožci (*Isopoda*)
Podred: Mokrice (*Oniscidea*)
Družina: *Porcellionidae*
Rod: *Porcellio*
Vrsta: *Porcellio Scaber*

2.7.2 Raki (*Crustacea*)

Raki so obsežna skupina členonožcev, katerih večina živi v morju in celinskih vodah, a jih najdemo tudi na kopnem.

Telo raka je sestavljeno iz dveh parov členjenih tipalnic in cepljene noge. Kožo pokriva hitinasta pokožnica. Kutikula, ki raste s hrbtne strani glave, obdaja in ščiti sprednji del rakovega telesa, lahko pa tudi celo telo. Ta oklep imenujemo koš (Muedra, 1972).

Prebavila potekajo skozi celo telo. Iz ust vodi kratek požiralnik v obsežen želodec, ki ima notranjo steno obloženo z zobatimi, hitinastimi ploščicami za drobljenje hrane. V kratko sprednje črevo se izteka velika žleza, ki ima vlogo jeter in trebušne slinavke; zadnje črevo poteka naravnost in se končuje na zadnjem zadkovem obročku (Podobnik in Devetak, 1998).

Izločala so podobna kolčkovim žlezam pri pajkovcih. To sta vejnati cevki, ki se izlivata v zadnji del srednjega črevesa (Podobnik in Devetak, 1998).

Večina rakov je vodnih, zato so njihova **dihala** škrge, ki so v obliki peresastih izrastkov, in sicer na osnovi drugega in tretjega para čeljustnih nožic ter prvih štirih parov nog hodičk (Podobnik in Devetak, 1998).

Krvožilni sistem rakov ni sklenjen. V krvni plazmi je raztopljeno barvilo hemocianin, ki vsebuje baker in daje oksidirani krvi rahlo modrikasto barvo. Srce je na hrbtni strani (Podobnik in Devetak, 1998).

Osrednje **živčevje** je razvito kot lestvičasta trebušnjača. Nadgoltna živčna vozla sta združena v enega. Čutilo za ravnotežje sta mešička z živčnimi končiči v osnovnem členu prvega para tipalk (Podobnik in Devetak, 1998).

Oko rakov je pikčasto ali sestavljeno, odvisno od skupine rakov.

Za višje rake (*Malacostraca*) je značilno, da je ličinka naprednejše razvita ali je sploh ni več in se iz jajčeca neposredno razvije mlad rakec (Podobnik in Devetak, 1998).

2.7.3 Kopenski raki enakonožci (*Isopoda*)

Kopenski enakonožni raki (slika 6) so prebivalci tal, ki so odvisni od vodnega okolja. Spadajo med makro-dekompozitorje. To pomeni, da je njihova hrana stelja, ki jo mehansko obdelajo in zaužijejo. Z razgradnjo stelje prispevajo h kroženju hranil in imajo pomembno vlogo v prehranjevalni verigi detrita. Njihova vloga je torej fragmentacija odpadnega rastlinskega materiala, kar omogoča nadaljnjo razgradnjo (Drobne, 2009).

Kljub svoji pomembnosti v naravi imajo te živali plenilce, med katere uvrščamo ptice, žabe, strige, pajke in rovke. Tem živalim predstavlja *Porcellio scaber* hrano in s tem energijo (Drobne, 2009).



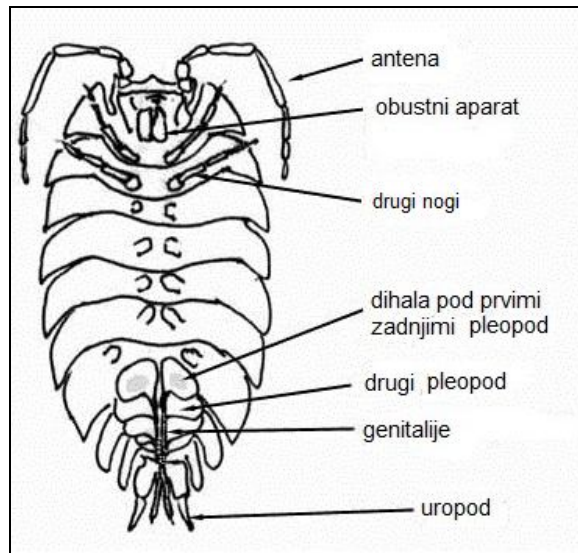
Slika 6: Kopenski enakonožni raki *Porcellio scaber* (Foto: P. Plošnik, 2010)

Mokrice so 17 mm velike živali, temno sive do rjave barve, ki imajo dorzi-ventralno sploščeno telo brez oklepa. Prvi prsni člen je združen z glavo v glavoprsje, oprsje pa je vidno členjeno. Na glavi ima dva para anten, vendar je prvi par zakrnel in zelo težko viden. Oprsje je sestavljeno iz sedmih členjenih delov, oprsne noge so skoraj enako dolge. Oko imajo sestavljeno iz 22 enostavnih oči, kij jih imenujemo oceli. Obustni aparat mokric je sestavljen iz enega para mandibul in dveh parov maksil. Dihanje pri izopodih poteka s lističastimi notranjimi vejami zadkovih nožic, ki jih imenujemo pseudotraheje in so vidne kot bele lise na zadku na trebušni strani živali (Blažič, 2006, povzeto po <http://www.geocities.com/CapeCanaveral/Hangar/7649/wlice.htm>).

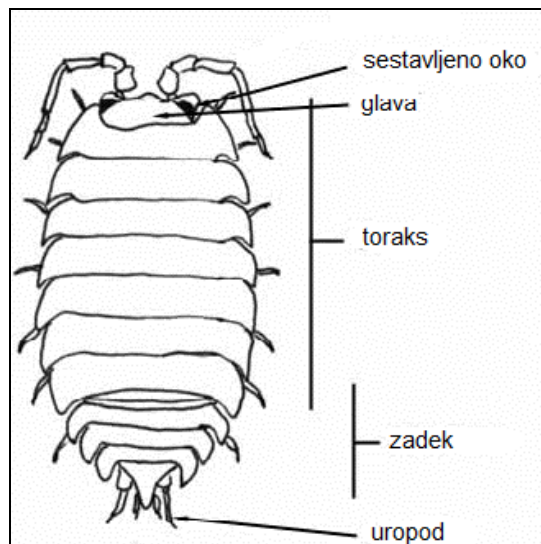
Mokrice so ločenih spolov. Po parjenju samica prilepi jajčeca na svoje zadnje nožice, v valilne vrečke in jih nosi s seboj, dokler se ne razvijejo mladi rakci in so tako veliki, da jih lahko zaščitijo. Nato se mladiči levijo, medtem ko rastejo. Prva levitev poteče po približno 24 urah iz izvalitve iz valilne vrečke, takrat mladiči dobijo tudi sedmi par nog. Levitev poteka tudi do 3 leta, da mlad rak doseže stadij odrasle živali. Razlika med samcem in samico je v prvem pleopodu, saj je glede na spol drugače izoblikovan (slika 6) (Drobne, 2009).

Levitev enakonožcev poteka v dveh korakih in traja nekaj dni, saj se najprej levi zadnji del, vključno s prebavno cevjo, ki je iz kutikule, nato se levi še sprednji del. Olevke običajno pojedjo, da nadomestijo potrebo kalcijevega karbonata v telesu (Blažič, 2006, povzeto po <http://www.geocities.com/CapeCanaveral/Hangar/7649/wlice.htm>).

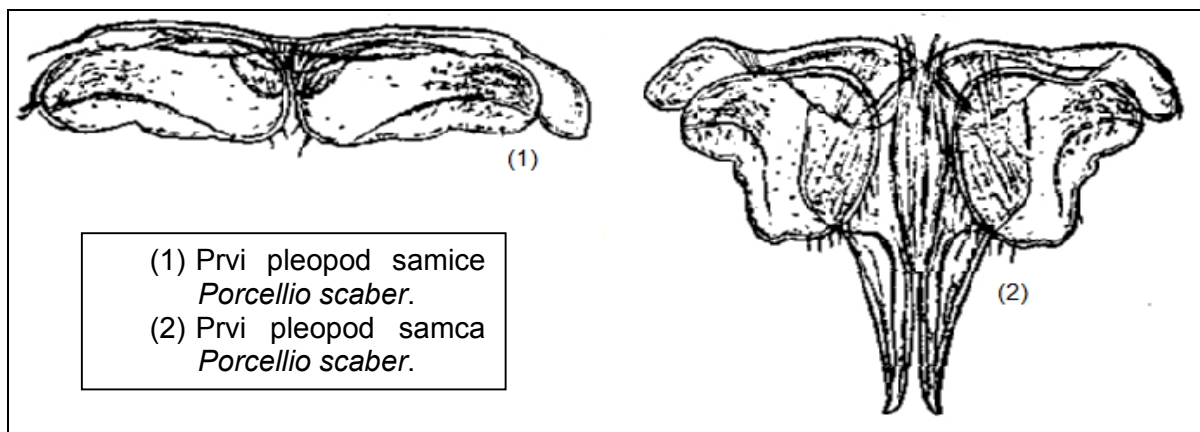
Iz slik 7 in 8 je razviden dorzalni in ventralni pregled mokrice *Porcellio scaber*. Medtem ko slika 9 prikazuje prve pleopode pri samcih in samicah in s tem razliko med spoloma.



Slika 7: Trebušna stran mokrice *Porcellio scaber* (Woodlice on line, 2010)



Slika 8: Hrbtna stran mokrice *Porcellio scaber* (Woodlice on line, 2010)



Slika 9: Razlika med spoloma pri *Porcellio scaber* (Discover life, 2010)

2.8 Uporaba kopenskih enakonožnih rakov v ekotoksikoloških študijah

(Eko)toksikološke teste s kopenskimi izopodi se uporablja za identifikacijo kemične nevarnosti in nevarnosti nanodelcev ter za teste odzivnosti (odziv posamezne vrste na snovi) (Drobne, 2009).

Testne živali se običajno izpostavi preko hrane ali substrata, kamor dodamo različne koncentracije testnih snovi za nekaj tednov. Spremlja se odzive na različnih nivojih biološke kompleksnosti. Sem uvrščamo encimsko indukcijo oz. inhibicijo, histološke spremembe in fiziološke spremembe, kot so rast, reprodukcija in smrtnost testnih živali (Drobne, 2009).

Kopenske izopode se običajno ne uporablja kot izbran test odziva na odmerek, saj testi s kopenskimi enakonožnimi raki niso standardizirani in ne potekajo pod enakimi pogoji v vseh laboratorijih in tako pridobljenih podatkov ne moremo uporabiti za oceno tveganje za okolje (ERA - Environmental Risk Assessment) (Drobne, 2009).

Kopenski izopodni raki vrste *Porcellio scaber* so zaradi svoje pogostosti, razširjenosti in pomembnosti v razgradnji pogosti organizmi za testiranje. Testira se predvsem pesticide, nanodelce in PAH (policiklične aromatske ogljikovodike). Med pesticidi so najbolj razširjeni organofosfatni pesticidi, testirajo se tudi neonicotinski pesticidi.

Testiranja organofosfatnih pesticidov, natančneje parationa in endosulfana na netarčne kopenske enakonožne rake *Porcellio scaber*, je potekalo 21 dni, pri čemer so bile živali izpostavljene koncentracijam 0,1, 1, 10, 25, 50, 100, 250, in 500 $\mu\text{g g}^{-1}$ mase. Rezultati testiranja parationa so pokazali, da ta nima posebnega vpliva na rast in prehranske parametre (pojedena hrana in asimilacija). Ugotovili so, da je prišlo do upada glikogena ter vsebnosti lipidov in proteinov. Rezultati pri endosulfanu so bili podobni kot pri kontrolni skupini, predvsem pri prehranjevalnih parametrih, medtem ko je bil pri koncentraciji 500 $\mu\text{g g}^{-1}$ mase zaznan upad v količini pojedene hrane in asimilacijski učinkovitosti. Znižala se je tudi rast živali (Ribeiro in sod., 2001).

Ob parationu in endosulfanu so testirali tudi diazinon. Raziskovanje razlik v aktivnosti AChE zaradi diazinona pri mladica in odraslih živalih je bilo razdeljeno v tri dele. V prvem delu so izmerili aktivnost AChE pri mladica in odraslih živalih (kontrolna skupina), pri čemer je bila aktivnost AChE mladic nižja od odraslih živali. V drugem delu so mladice živali izpostavili visokim koncentracijam pesticida (50, 100, 150, 200 in 300 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe hrane). Spremljali so smrtnost, rast, AE in aktivnost AChE. Pri koncentracijah 300 in 200 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe mase hrane so mladice poginile že v prvih dveh tednih. Smrtnost mladic pri ostalih koncentracijah je bila 25 % pri koncentraciji 50 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe mase hrane, pri koncentraciji 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe mase hrane 93 % in pri koncentraciji 150 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe mase hrane 75 %. Povprečna asimilacijska učinkovitost kontrolne skupine je bila 50 %, med tem ko je bilo povprečje AE pri koncentracijah 100 in 150 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe mase hrane višje kot pri kontrolni skupini. Aktivnost AChE je pri koncentracijah 50 in 150 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe mase hrane bistveno nižja, kot pri kontrolni skupini. V tretjem delu poskusa so bile odrasle živali izpostavljene nižjim koncentracijam diazinona (0,1, 1, 10, 50 in 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe mase hrane) kot mladice. V kontrolni skupini in pri koncentracijah 0,1 in 1 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe mase hrane ni poginila nobena žival, medtem ko je bila pri koncentracijah 10 in 50 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe mase hrane smrtnost 6 %. Smrtnost pri koncentraciji 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe mase hrane pa 50 %. V rasti in asimilacijski učinkovitosti ni bilo posebnih razlik glede na kontrolno skupino. Aktivnost AChE v kontrolni skupini in pri koncentraciji 0,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe mase hrane je bila enaka. Povprečje AChE aktivnosti pri koncentraciji 1 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe mase hrane je bilo višje kot pri kontrolni skupini, vendar razlika ni bila statistično značilna. Zmanjšano je bilo delovanje AChE pri koncentraciji 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe

mase hrane, medtem ko je bila pri koncentraciji 50 in 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe mase hrane bistveno zmanjšana encimska aktivnost AChE (Gabrijelčič, 2001).

Primerjava vpliva diazinona na fiziološke parametre in aktivnost AChE je bila testirana med mladnicami in odraslimi živalmi *Porcellio scaber* v dvotedenskem poskusu. Za mladice in odrasle živali so uporabili enake koncentracije (5, 10, 50 in 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe mase hrane). Rezultati so pokazali bistvene razlike pri aktivnosti AChE v skupinah izpostavljenim 50 in 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe mase hrane pri mladnicah in odraslih živalih. Mann-Whitney test je pokazal, da pri rasti, pojedeni hrani in količini iztrebkov ni bilo bistvenih statističnih razlik med skupinami izpostavljenim diazinonu in kontrolno skupino pri mladnicah. Tudi vsebnost glikogena ni bila statistično značilna. Rezultati pri odraslih živalih so bili statistično značilni glede na izpostavljenost diazinonu in kontrolni skupini (Stanek, 2004).

Porcellio scaber skupaj z *Oniscus asellus* so uporabili tudi v toksikoloških študijah s policikličnimi aromatskimi ogljikovodiki (PAH). Živali so bile s hrano izpostavljene 9 tednov benzo[a]pirenu (BaP) koncentracij 3,16, 10, 31,6, 100 in 316 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe mase hrane. Pri obeh vrstah je bil učinek na rast pri koncentracijah 100 in 316 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe mase hrane. Pri obeh vrstah so se pri najvišji koncentraciji zmanjšale zaloge energije. Pri *Porcellio scaber* je izpostavljenost BaP povzročila zmanjšanje vsebnosti proteinov. Pri koncentraciji 316 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe mase hrane se je vsebnost proteinov zmanjšala za 31 % v primerjavi s kontrolno skupino (Van Brummelen, 1993).

Dosedanje raziskave vpliva imidakloprida na *Porcellio scaber* so se osredotočile na delovanje encimov glutation-S-transferaze (GST), acetilholinesteraze (AChE) ter spremljanje fizioloških parametrov.

Bratina (2006) je v diplomskem delu ugotovila majhen upad aktivnosti GST pri koncentraciji 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe mase hrane glede na kontrolno skupino ter znaten upad aktivnosti GST pri koncentraciji 25 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe mase hrane. To lahko pripišemo večji količini pesticida. Predvidevali so tudi, da je pri koncentraciji 25 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe mase hrane prišlo do izčrpanosti organizma in ni bil več sposoben uravnavati stresa v telesu. Rezultati fizioloških parametrov so pokazali, da so živali izpostavljene imidaklopridu izgubile na masi, največ pri koncentraciji 25 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe mase hrane. Smrtnost organizmov je naraščala z naraščajočo koncentracijo, pri čemer je bila pri koncentraciji 25 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe mase hrane smrtnost 50 %. Tudi asimilacijska učinkovitost in upad količine zaužite hrane naraščata s koncentracijo (Bratina, 2006).

Blažič (2006) je ugotovila, da je aktivnost GST pri 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe mase hrane glede na kontrolno skupino rahlo porasla. Vendar koncentracija 25 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe mase hrane ima tako kot pri Bratina bistven upad aktivnosti GST. Vzrok za razliko pri koncentraciji 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe mase hrane lahko pripisujemo različnemu številu testnih organizmov. Bratina je uporabila za svoj poskus manj testnih živali kot Blažičeva. Fiziološki parametri pri testiranju so pokazali, da se je smrtnost gibala od 10 do 50 %. V kontrolni skupini je bila smrtnost 20 %, pri koncentracijah 10 in 50 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe mase hrane 40 %, medtem ko je bila 50 % smrtnost pri koncentraciji 5 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe mase hrane. Masa živali med poskusom je variirala, razen pri koncentraciji 50 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe mase hrane, tako so bila nihanja vse do 3,3 mg pri tistih, ki so pridobili na masi in do 8,4 mg pri tistih, ki so izgubili na masi. Mann-Whitney test je pokazal, da so bile statistične značilnosti pri koncentraciji 1 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe mase hrane, pri ostalih ni bilo statistične značilnosti. Asimilacijska učinkovitost ni bila statistično značilna, največja je bila pri koncentraciji 50 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe mase hrane. Statistične razlike so bile pri količini iztrebkov, pri koncentraciji 10 in 50 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe mase hrane (Mann-Whitney test) (Blažič, 2006).

2.8.1 Acetilholin esteraza (AChE) – klasifikacija in fiziološke funkcije

Encim acetilholin esteraza (AChE) pripada skupini serin hidrolaze, ločeno od serin proteinov, ki vsebujejo skupen strukturni element. Poleg AChE, ta skupina vključuje tudi butirilholin esterazo (BChE), holesterol esteraze, različne lipide in karboksilesteraze (Thompson in Richardson, 2004).

Holinesteraze (AChE in BChE) so markerski encimi skupine proteinov. Aktivne holinesteraze, so učinkovite zlasti v kataliziranju hidrolitskega razpada estrov, ki nosi kvartarno amonijevo skupino ($-NR_3^+$) (Thompson in Richardson, 2004).

AChE imajo specifično biološko vlogo, kar pomeni, da sodelujejo pri hitri transmiciji (prenosu) živčnih impulzov, ki se pojavijo, ko je acetilholin (ACh) povezan z intrasinaptično špranjo (prostor med sinapsama). Pomemben je tudi pri depolarizaciji post-sinaptičnih celic. AChE odstrani ACh iz subsinaptičnega prostora s pospešeno hidrolizo do acetata (CH_3COO^-) in holina ($HOCH_2CH_2N(CH_3)_3^+$) (Thompson in Richardson, 2004).

Ireverzibilni inhibitor se poveže z encimom s kovalentnimi ali zelo močnimi nekovalentnimi vezmi. Pri tem se veže na funkcionalno skupino aminokislina, ki sodeluje pri vezavi substrata ali pri katalitičnem delovanju ter tako permanentno inaktivira encim (Boyer, 2005). Enačba (1) nam prikazuje kemijsko enačbo delovanja AChE.



E-H je aktivni encim

R-X je ireverzibilni inhibitor

E-R je kemično spremenjen encim, ki je katalitično neaktiven

HX je stranski produkt

2.8.2 Glutation-S-transferaze (GST)

Glutation-S-transferaze so skupina encimov, ki imajo pomembno vlogo pri detoksifikacijskih procesih (metabolizem ksenobiotikov). GST katalizirajo konjugacijo ksenobiotikov z glutationom (GSH).

GST katalizira reakcijo $-SH$ (tiol) skupine glutationa in s tem nevtralizirajo elektrofilna mesta. Tako se tvorijo produkti, ki so bolj vodotopni. Konjugati bi nastali tudi brez encimov, vendar ti pospešijo hitrost reakcije, da vežejo reduciran glutation v neposredno bližino ksenobiotika. Pomembno vlogo imajo tudi pri detoksifikaciji prostih kisikovih radikalov v celici in s tem varujejo tkiva pred oksidativnim stresom (Walker in sod., 2001).

3 EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 Uporabljeni materiali

3.1.1 Kemikalije

- TBA (tiobarbiturna kislina – $C_4H_4N_2O_2S$), (>99 % čistost), Merck
- acetonitril (CH_3CN), J. T. Baker, HPLC grade
- fosforjeva (V) kislina H_3PO_4 , (85 % p.a.), Riedel de Haen
- klorovodikova kislina (HCl), (37 % p.a.), Sigma-Aldrich
- butilhidroksitoluen ($C_{15}H_{24}O$), (99 % čistost), Merck
- butanol (C_4H_9OH), LiChromasolv, Merck
- etanol (C_2H_5OH), (absolut, p.a.), Sigma-Aldrich
- trikloroocetna kislina (CCl_3COOH), (99.9 % čistost), Calbiochem
- imidaklopid (99,8 % čistost), Bayer Cropscience Slovenija
- dvakrat deionizirana voda

3.1.2 Laboratorijski instrumenti

- laboratorijska tehtnica – Mettler Toledo AB104
- sonikator - Labsonic M Sartorius
- spektrofotometer - Perkin Elmer Lambda 35 UV/VIS
- centrifuga - Eppendorf centrifuge 5415R
- peč, grelnik - eppendorf thermomixer compact
- rotavapor – Laborota 4000, Heidolph

3.1.3 Laboratorijski pripomočki

- listi navadne leske (*Corylus avellana*)
- testne živali – *Porcellio scaber*
- škarje
- 50 mL ter 1 L merilne bučke
- petrijevke
- pincete
- mikrocentrifugirke
- avtomatske pipete
- kvarčna kiveta
- steklena palčka
- filter papir
- C_{18} kolona
- bučke za rotavapor, 10 in 50 mL

3.2 Priprava raztopin

3.2.1 Priprava raztopine imidakloprida

Za pripravo raztopine sem v 50 mL merilno bučko odtehtala 0,5 mg imidakloprida ter jo do oznake napolnila z dvakrat deionizirano vodo. Za pripravo listov s koncentracijo 10 oz. 25 μg imidakloprida g^{-1} suhe mase lista sem nanela 100 μL oz. 2 x 125 μL raztopine imidakloprida koncentracije 10 mg L^{-1} na suhe liste mase 100 mg.

3.2.2 Priprava raztopin za lipidno peroksidacijo

Pufersko raztopino sem pripravila tako, da sem zmešala 7,5 g CCl_3COOH , 12 mL 1 M HCl in 0,188 g TAB. Nato sem pripravljeno zmes segrevala na 40 °C 10 min oz. tako dolgo, da so se kristali CCl_3COOH raztopili, pomagala sem si tudi z magnetnim mešalom in dopolnila 50 mL bučko z dvakrat deionizirano vodo.

0,055 g butilhidroksitoluena sem raztopila v 5 mL etanola in tako dobila raztopino antioksidanta, koncentracije 0,05 mol L^{-1} . Za vsak test sem pripravila svežo raztopino.

Dodatek antioksidanta prepreči, da bi posamezne snovi v zmesi oksidirale in bi potekle reakcije, ki bi vplivale na rezultate. Puferska raztopina običajno pomaga pri vzdrževanju konstantnega pH, kar z drugimi besedami pomeni nereaktiven medij.

3.2.3 Priprava raztopine in homogenizacija za določanje vsebnosti imidakloprida v listih s tekočinsko kromatografijo

Po končanem prehranjevalnem poskusu sem preostale liste strla v keramični tarilnici v prah. Za pripravo vzorcev za HPLC analizo sem uporabila 500 mg listov vsake od uporabljenih koncentracij (0, 10 in 25 μg imidakloprida g^{-1} suhe mase).

Za pripravo 0,2 % fosforne kisline (H_3PO_4) sem v merilno bučko (1 L) odmerila 2 mL H_3PO_4 in do oznake napolnila z dvakrat deionizirano vodo.

Mobilno fazo sem pripravila tako, da sem za 1 L mešanice zmešala 300 mL acetonitrila ter 700 mL 0,2 % vodne raztopine fosforne kisline.

3.3 Priprava in potek dela prehranjevalnega poskusa

Za prehranjevalni poskus sem pripravila:

- petrijevke,
- herbarizirane liste leske (*Corylus avellana*),
- mokrice *Porcellio scaber*.

Testne živali sem nabrala pod kamenjem v zmerno vlažnem okolju, v okolici Maribora. Dala sem jih v pripravljen kozarec. Dno kozarca sem najprej prekrila z zemljo, ki sem jo dobro poškropila z vodo, potem sem dodala liste za hrano in živali. Do prenosa v laboratorij sem živali hranila v steklenih kozarcih ter jih redno vlažila z vodo.

Herbarizirane, posušene in stisnjene liste leske (*Corylus avellana*) sem najprej stehtala ter jih pripravila tako, da so tehtali 100 mg z napako 3 mg (100 mg \pm 3 mg). Na petrijevke sem zapisali zaporedne številke od 1 do 36.

Na liste leske (*Corylus avellana*) v prvih 12 petrijevkah sem nanesc 100 μ L deionizirane vode. Vodo sem s čopičem enakomerno razmazala po celi spodnji strani lista (kontrolna skupina, koncentracija imidakloprida 0 μ g g⁻¹ suhe mase lista).

Na leskove liste (*Corylus avellana*) v petrijevkah od 13 do 24 sem nanesc 100 μ L pripravljene raztopine pesticida, jo s čopičem enakomerno razmazala po celi spodnji strani lista (koncentracija imidakloprida 10 μ g imidakloprida g⁻¹ suhe mase lista).

Na leskove liste (*Corylus avellana*) petrijevke od 25 do 36 sem nanesc 125 μ L pripravljene raztopine pesticida ter jo s čopičem enakomerno razmazala po celi spodnji strani lista in postopek ponovili še enkrat (koncentracija imidakloprida 25 μ g imidakloprida g⁻¹ suhe mase lista).

Tovrsten način nanosa sem uporabila zato, da sem se izognila napakam zaradi tehtanja oz. redčenja. Pri koncentraciji 25 μ g imidakloprida g⁻¹ suhe mase sem počakala približno 2 uri, da so se listi leske s pesticidom posušili.

V pripravljene petrijevke sem dodala živali, ki so tehtale od 23 mg do 90 mg. Živali sem po masi razdelili v skupine (približno enako število živali višje oz. nižje telesne mase sem razdelila v vse tri koncentracije). Spola nisem določila.

Vsake dva do tri dni sem živali v poskusu pregledala ter zabeležila število mrtvih. Redno sem jih škropila z vodo ter pazila, da sem z razpršilko poškropila najprej v zrak in nato iz zraka ujela kapljice vode na pokrov. Petnajsti dan poskusa sem rake odstranila iz petrijevke, stehtala in jih pripravila za določanje stopnje lipidne peroksidacije. Liste sem pustila na zraku, da so se posušili. Po približno sedmih dneh sem stehtala liste in iztrebke.

3.4 Priprava in potek dela pri lipidni peroksidaciji

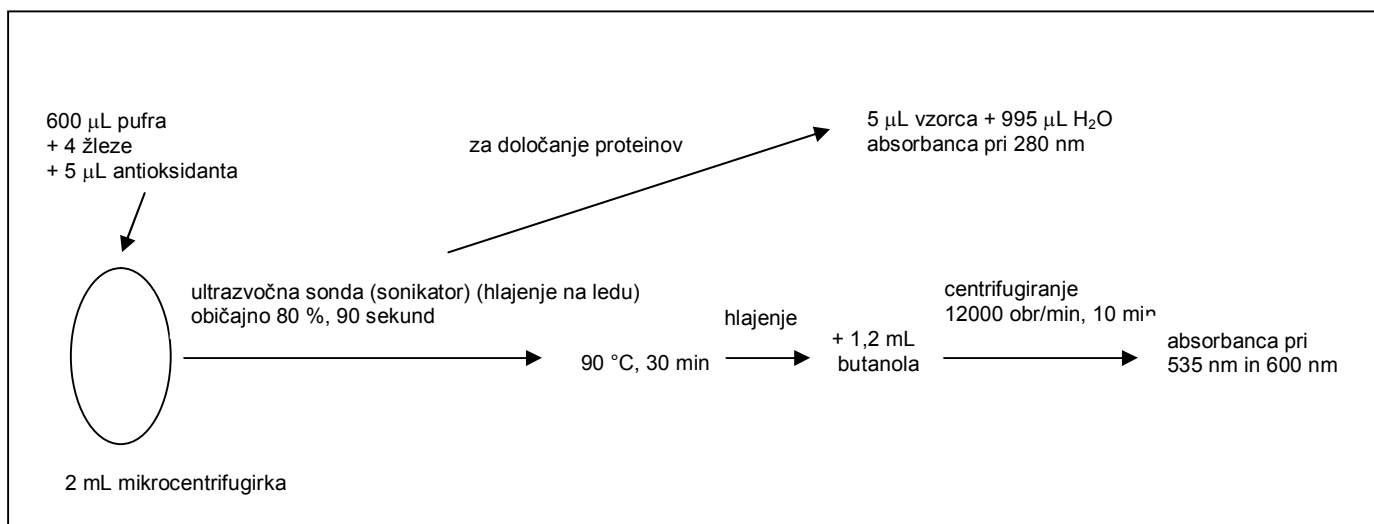
Živali, ki so poskus preživele, sem pred nadaljnji meritvami uspavala z etrom ter jim nato odstranila žleze. Najprej sem jim s pinceto odstranila glavo, nato izvlekla žleze, ki so rumene barve. Poleg žlez se nahaja še prebavni trakt, ki je rjave barve in je za delo v diplomski nalogi neuporaben. K žlezam sem dodala 600 μL pufra, 5 μL antioksidanta butilhidroksitoluen in etanol.

Žleze s pufrom in antioksidantom butilhidroksitoluen in etanol sem dala v čašo z ledom in jih homogenizirala s sonikatorjem (nastavitev 80 %, 1 cikel). Homogenizirane vzorce sem nato ponovno dala na led.

5 μL homogeniziranega vzorca sem prenesla v novo mikrocentrifugirko ter dodala 995 μL deionizirane vode. Vzorcem sem nato izmerila absorbanco pri 280 nm. Pripravila sem še slepi vzorec (blank). V mikrocentrifugirko sem dala 1000 μL dvakrat deionizirane vode.

Absorbanco pripravljenih vzorcev sem merila spektrofotometrično. Za merjenje absorbance sem uporabljala kvarčno kiveto. Pri menjavi vzorcev sem kiveto očistila z dvakrat deionizirano vodo.

Preostali del vzorca sem segrevala na 90 °C približno 30 min. Nato sem dodala 1,2 mL butanola ter ga prenesla v mikrocentrifugirke. Vzorce sem centrifugirala 10 minut na 12000 obratov min^{-1} . Po centrifugiranju sem ločila supernatant in usedlino. V kiveto za merjenje absorbance sem odmerila supernatant (približno 100 μL). Med meritvami različnih vzorcev sem kiveto očistila z butanolom. Lahko bi uporabila tudi plastične kivete, za enkratno uporabo.



Slika 10: Shematski prikaz poteka dela pri lipidni peroksidaciji

3.5 Obdelava podatkov

3.5.1 Izračuni asimilacije, prirasti in odstotka lipidne peroksidacije

Za izračune asimilacijske učinkovitosti, učinkovitosti rasti, asimilacijskega razmerja in deleža pojedene hrane sem uporabila naslednje formule, pri katerih je:

AE: učinkovitost asimilacije [%],

GE: prirast [%],

W_{Li} : začetna masa lista [mg],

W_{Lf} : končna masa lista [mg],

W_{isop} : začetna masa izopoda [mg],

$W_{isop f}$: končna masa izopoda [mg],

F: iztrebki [mg].

MDA: malondialdehid

A_{535} : absorbanca merjena pri valovni dolžini 535 nm

A_{600} : absorbanca merjena pri valovni dolžini 600 nm

A_{280} : absorbanca merjena pri valovni dolžini 280 nm

Pojedena hrana: $W_{Li} - W_{Lf}$

(2)

$$AE = [(W_{Li} - W_{Lf}) - F] / (W_{Li} - W_{Lf}) \times 100$$

(3)

$$GE = (W_{isop} - W_{isop f}) / W_{isop} \times 100$$

(4)

$$\text{Vsebnost MDA} = (A_{535} - A_{600}) / A_{280} \times 100$$

(5)

Z enačbo (2) sem izračunala delež hrane, ki jo je žival zaužila med poskusom. Učinkovitost asimilacije sem izračunala z enačbo (3). Prirast, to je, za koliko odstotkov je žival zrasla v času poskusa, pa sem izračunala s pomočjo enačbe (4). Enačba (5) nam poda vsebnost malondialdehida (MDA), ki je merilo za lipidno peroksidacijo (Loureiro in sod., 2006).

3.5.2 Statistična obdelava in prikaz rezultatov

Rezultate sem ustrezno ovrednotila z uporabo t-testa in z uporabo neparametrijskega Mann-Whitney testa, kjer sem posamezne skupine primerjala s kontrolno skupino. Statistično značilno razliko sem upoštevala v primeru $p < 0,05$.

Dobljene vrednosti sem grafično prikazala:

- z linearno točkovno porazdelitvijo (asimilacijska učinkovitost, sprememba mase in lipidna peroksidacija),
- s tabelo (smrtnost in levitev) in
- s premičnim linearnim grafom (koncentracija imidakloprida v prehrani živali).

3.6 Merjenje koncentracije imidakloprida v hrani živali

Pripravljenim listom (kot je opisano v poglavju 3.2.3) sem dodala 20 mL acetonitrila in mešala s stekleno palčko približno 10 min. Po tem sem supernatant prenesla preko filter papirja v bučko za uparevanje. Postopek sem dvakrat ponovila, vendar sem drugič oz. tretjič dodala 15 mL acetonitrila. Vse tri ekstrahirane frakcije sem združila in jih uparila do suhega (50 °C, 90 obratov/min).

Suhemu ostanku sem dodala 5 mL dvakrat deionizirane vode in mešanico ekstrahirala po postopku ekstrakcije na trdnem nosilcu (solid phase extraction) z uporabo kolone C₁₈. Ekstakcija preko C₁₈ kolone je potekala tako, da sem najprej čez kolono spustila 1 mL dvakrat deionizirane vode, in nato 1 mL vzorca.

Preiskovana komponenta, v našem primeru pesticid, se je zadržala na koloni, ki sem jo nato eluirala z 1 mL metanola. Ekstrahirani vzorec sem znova uparila in suhi ostanek raztopila v 1 mL mobilne faze, 1 mL acetonitril: voda s fosforno kislino (30: 70). Dobljeno raztopino sem pred HPLC analizo še prefiltrirala preko 0,45 µm filtra v vialo za HPLC.

Pripravljene vzorce sem analizirala na tekočinskem kromatografu HP 1100 z DAD detektorjem (diode array detector).

Kromatografski pogoji HPLC-DAD:

- kolona Zorbax C₈ (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), predkolona Alltech 10 x 4 mm,
- detektor: Diode array detector (270 nm),
- volumen iniciranja: 20 µL,
- pretok: 1 mL min⁻¹,
- mobilna faza: deionizirana voda s fosforno kislino (0,2 %) (70 vol %),
Acetonitril HPLC grade (30 vol %),
- elucija: izokratična,
- temperatura kolone: 25 °C,
- čas analize: 15 min.

4 REZULTATI

4.1 I. poskus

4.1.1 Vpliv imidakloprida na smrtnost živali in fiziološke parametre v I. poskusu

Smrtnost v kontrolni skupini je bila po 14 dneh 8,3 %, kar pomeni, da je preživel 11 osebkov. V drugi skupini, to je pri izpostavljenosti 10 µg imidakloprida g⁻¹ suhe mase lista, je preživel 8 osebkov in je smrtnost 33,3 %. Pri skupini, izpostavljeni 25 µg imidakloprida g⁻¹ suhe mase lista, je smrtnost 16,7 %, kar pomeni, da je preživel 10 osebkov (preglednica 4).

Preglednica 4: Odstotek poginulih živali po dvotedenskem poskusu izpostavljanja kontaminirani hrani z imidaklopridom in v kontrolni skupini

Koncentracija [µg imidakloprida g ⁻¹ suhe mase]	Smrtnost [%]
0	8,3
10	33,3
25	16,7

Opazovala sem tudi levitev posameznih osebkov. V kontrolni skupini se jih je levilo 16,7 %, kar predstavlja 3 osebkke. Pri skupini, izpostavljeni 10 µg imidakloprida g⁻¹ suhe mase lista, je bil odstotek levitve najvišji, 25 %, to pomeni 4 osebkke, vendar je eden izmed njih poginil v času med tehtanjem in pripravo na lipidno peroksidacijo. Pri skupini izpostavljeni 25 µg imidakloprida g⁻¹ suhe mase lista, se je levilo 33,3 % organizmov, kar so 4 osebkki (preglednica 5).

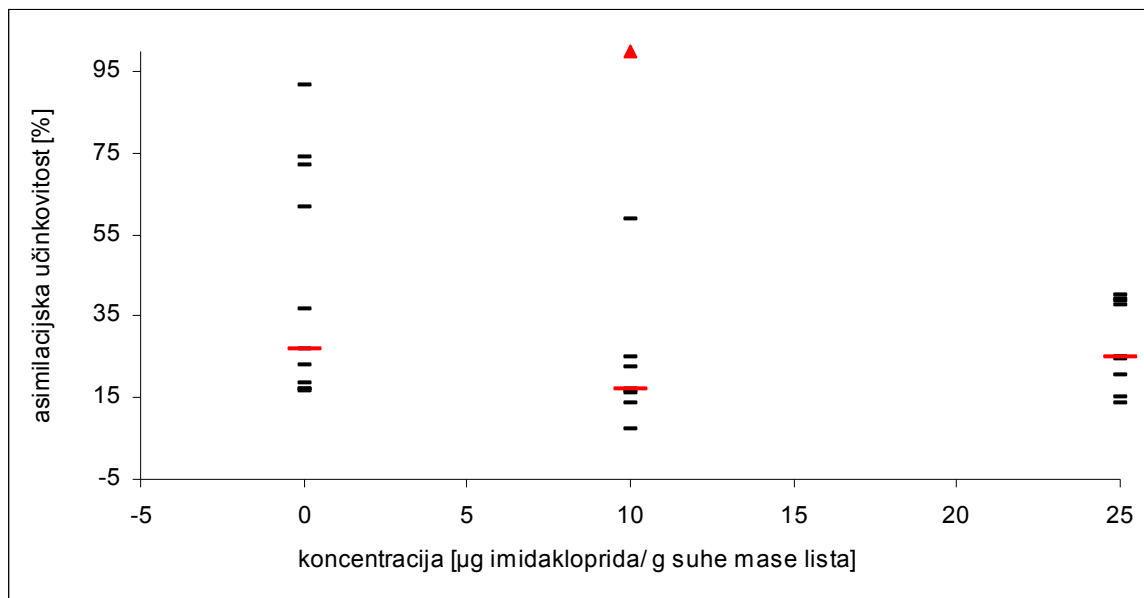
Preglednica 5: Odstotek osebkov, ki so se med poskusom (14 dni) levili

Koncentracija [µg imidakloprida g ⁻¹ suhe mase]	Levitev [%]
0	25,0
10	25,0 ⁵
25	33,3

⁵ Pri skupini, izpostavljeni 10 µg imidakloprida g⁻¹ suhe mase, so se levili 4 osebkki, kar predstavlja 33,3%, vendar sem uporabila odstotke živali, ki sem jih lahko uporabila v postopku lipidne peroksidacije. Eden izmed teh osebkov je poginil.

4.1.2 Vpliv imidakloprida na asimilacijsko učinkovitost (AE) v I. poskusu

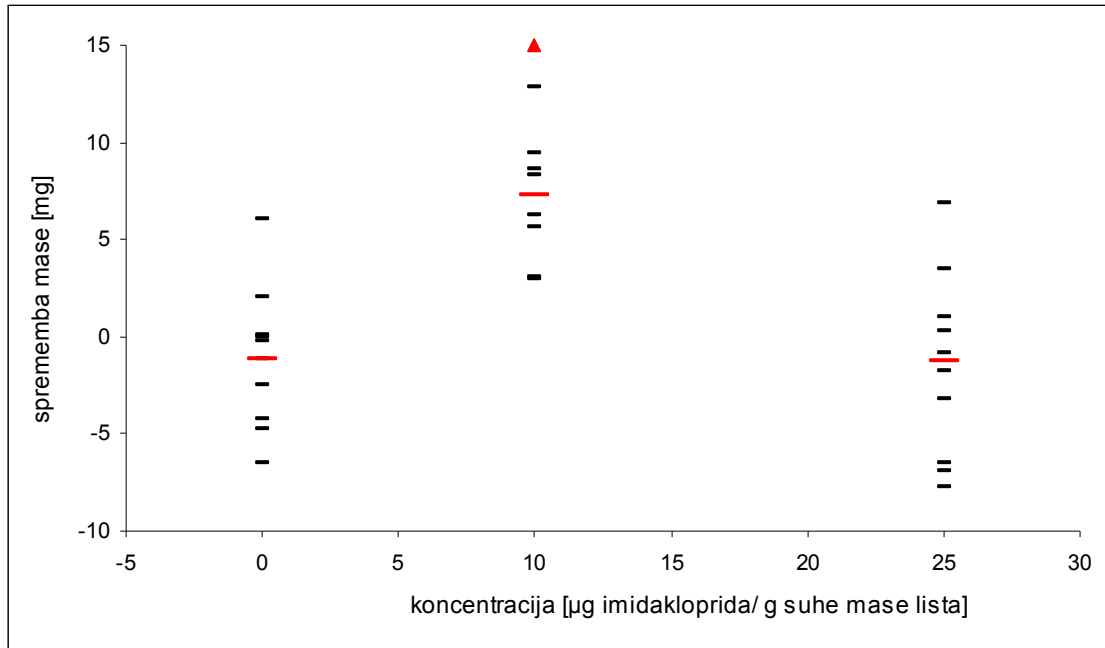
Izračuni merjenih parametrov (m (živali), m (listov), m (iztrebkov)) so pokazali, da je bila asimilacijska učinkovitost najvišja pri kontrolni skupini.



Slika 11: Asimilacijska učinkovitost med 14- dnevnim prehranjevalnim poskusom pri kontrolni skupini in pri živalih, ki so bile izpostavljene koncentracijam 10 in 25 µg imidakloprida g⁻¹ suhe mase lista. (N = 11 za kontrolno skupino, N = 8 za skupino izpostavljeno 10 µg imidakloprida g⁻¹ suhe mase lista in N = 10 za skupino izpostavljeno 25 µg imidakloprida g⁻¹ suhe mase lista). Dajšje, rdeče linije označujejo mediano. Rdeč trikotnik pri skupini, izpostavljene 10 µg imidakloprida g⁻¹ suhe mase lista označuje statistično značilno razliko (Mann-Whitney test)

Pri kontrolni skupini je znašala asimilacijska učinkovitost povprečno 41,4 % in je bila najvišja. Najnižja asimilacijska učinkovitost je bila pri skupini, ki sem jo izpostavila 10 µg imidakloprida g⁻¹ suhe mase lista. Pri skupini izpostavljene 25 µg imidakloprida g⁻¹ je bila asimilacijska učinkovitost 28,0 %.

4.1.3 Vpliv imidakloprida na spremembo mase v I. poskusu

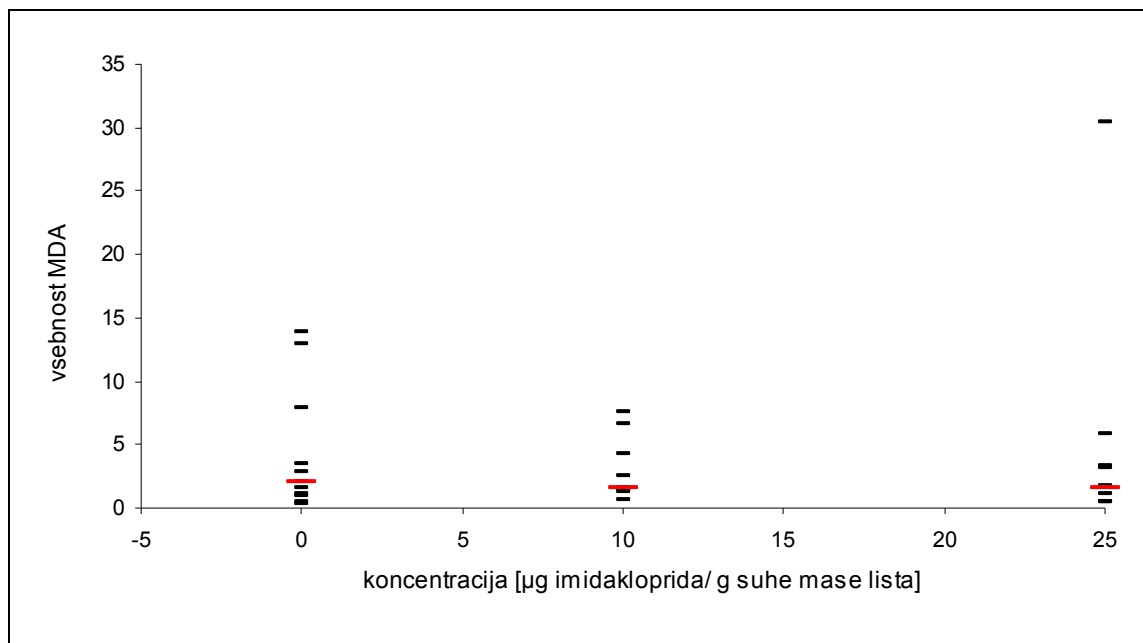


Slika 12: Sprememba mase med 14- dnevni prehranjevalni poskusom pri kontrolni skupini in pri živalih, ki so bile izpostavljene koncentracijam 10 in 25 µg imidakloprida g⁻¹ suhe mase lista. (N = 11 za kontrolno skupino, N = 8 za skupino izpostavljeno 10 µg imidakloprida g⁻¹ suhe mase lista in N = 10 za skupino izpostavljeno 25 µg imidakloprida g⁻¹ suhe mase lista). Daljše, rdeče linije označujejo mediano. Rdeč trikotnik pri skupini, izpostavljene 10 µg imidakloprida g⁻¹ suhe mase lista, označuje statistično značilno razliko (Mann-Whitney test)

Pri kontrolni skupini so živali pridobile na masi v povprečju za 2,1 mg, medtem ko so pri skupini izpostavljene 10 µg imidakloprida g⁻¹ suhe hrane izgubile na masi v povprečju za 7,1 mg. Pri skupini izpostavljene 25 µg imidakloprida g⁻¹ suhe hrane so živali pridobile na masi v povprečju za 1,5 mg. Statistična analiza je pokazala, da je pri skupini s koncentracijo 10 µg imidakloprida g⁻¹ suhe mase bila statistično značilna razlika glede na kontrolno skupino. Pri primerjanju kontrolne skupine s skupino, izpostavljeno koncentraciji 25 µg imidakloprida g⁻¹ suhe mase, pa ni bilo statistično značilne razlike (Mann-Whitney test).

4.1.4 Vpliv imidakloprida na lipidno peroksidacijo v I. poskusu

Lipidno peroksidacijo sem izrazila z vsebnostjo MDA, saj se MDA ob prisotnosti TBA obarva in ga lahko na ta način izmerimo.



Slika 13: Lipidna peroksidacija pri kontrolni skupini ter pri živalih, izpostavljenim koncentraciji 10 in 25 µg imidakloprida g⁻¹ suhe mase lista. (N = 11 za kontrolno skupino, N = 8 za skupino, izpostavljeno 10 µg imidakloprida g⁻¹ suhe mase lista in N = 10 za skupino, izpostavljeno 25 µg imidakloprida g⁻¹ suhe mase lista). Daljše, rdeče linije označujejo mediano

V kontrolni skupini je znašala vsebnost MDA povprečno 4,3. Pri večini vzorcev (pri 8 vzorcih, od skupno 11) je bila vsebnost MDA od 0,3 do 4, medtem ko je bila vsebnost MDA pri treh vzorcih med 8 in 14.

Pri skupini, izpostavljeni 10 µg imidakloprida g⁻¹ suhe hrane, je bila vsebnost MDA povprečno 3,0, in sicer v razponu med 0,6 in 7,5.

Pri skupini, izpostavljeni 25 µg imidakloprida g⁻¹ suhe hrane, je bila vsebnost MDA povprečno 4,8. Pri večini vzorcev (pri 9 od 10 vzorcev) je bila vsebnost med 0,4 in 5,9, le eden izmed vzorcev je izstopal, saj je bila vsebnost MDA 30,5.

Glede na to, da se lipidna peroksidacija pojavi v primeru snovi v organizmu, lahko povzamemo, da so bili organizmi iz kontrolne skupine tudi v stresu, saj je bila vsebnost MDA celo višja kot pri skupini, izpostavljeni 10 µg imidakloprida g⁻¹ suhe mase lista. Statistična obdelava podatkov kontrolne skupine s skupinama, izpostavljenima 10 in 25 µg imidakloprida g⁻¹ suhe mase, ni pokazala statistično značilnih razlik (Mann-Whitney test).

4.2 II. poskus

4.2.1 Vpliv imidakloprida na vedenje in smrtnost živali v II. poskusu

Pri skupini, izpostavljeni 25 μg imidakloprida g^{-1} suhe mase lista, so se trem samičkam izlegli mladički. Glede na visoko koncentracijo sem pričakovali, da bodo ti poginili v obdobju nekaj dni, vendar ni bilo tako. Nekaj jih je poginilo, a se jih je velika večina borila za življenje.

Smrtnost osebkov v drugem poskusu je bila v kontrolni skupini in pri skupini, izpostavljeni 10 μg imidakloprida g^{-1} suhe mase lista, enaka, 33,3 %, kar pomeni, da je preživel 8 osebkov v vsaki skupini. Pri skupini, izpostavljeni 25 μg imidakloprida g^{-1} suhe mase lista, je bila smrtnost 16,7 %, kar pomeni, da je preživel 11 osebkov (preglednica 5).

Preglednica 5: Odstotek poginulih živali po 14 dnevnom poskusu izpostavljanja z imidaklopridom kontaminirani hrani in v kontrolni skupini

Koncentracija [μg imidakloprida g^{-1} suhe mase]	Smrtnost [%]
0	33,3
10	33,3
25	16,7

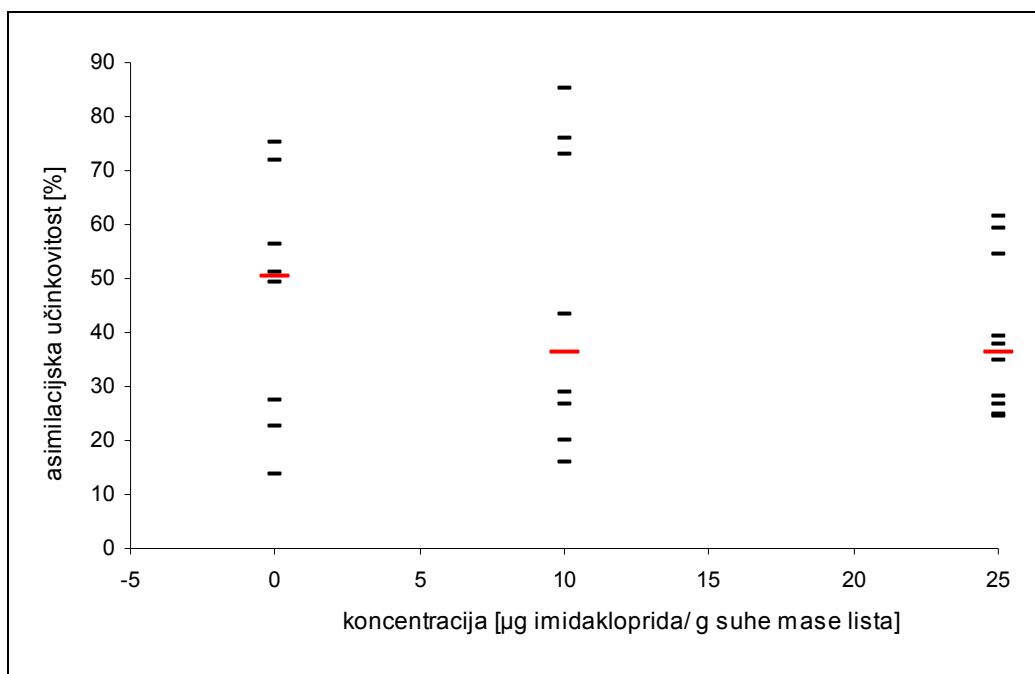
Levitev osebkov je bila skupno 33,3 %, kar pomeni, da so se skupno levili 4 osebki. Pri kontrolni skupini se je levilo 8,3 %, kar je en osebek. Pri skupini, izpostavljeni 10 μg imidakloprida g^{-1} suhe mase lista, se je levilo 16,7 %, kar predstavlja 2 osebka in pri skupini, izpostavljeni 25 μg imidakloprida g^{-1} suhe mase lista, se je levilo 8,3 %, kar je en osebek (preglednica 6).

Preglednica 6: Odstotek osebkov, ki so se med drugim 14- dnevnom poskusom levili

Koncentracija [μg imidakloprida g^{-1} suhe mase]	Levitev [%]
0	8,3
10	16,7
25	8,3

4.2.2 Vpliv imidakloprida na asimilacijsko učinkovitost (AE) v II. poskusu

Za razliko od prvega poskusa so rezultati asimilacijske učinkovitosti v drugem poskusu pokazali, da je bila AE najvišja pri skupini, izpostavljeni 10 μg imidakloprida g^{-1} suhe mase lista.



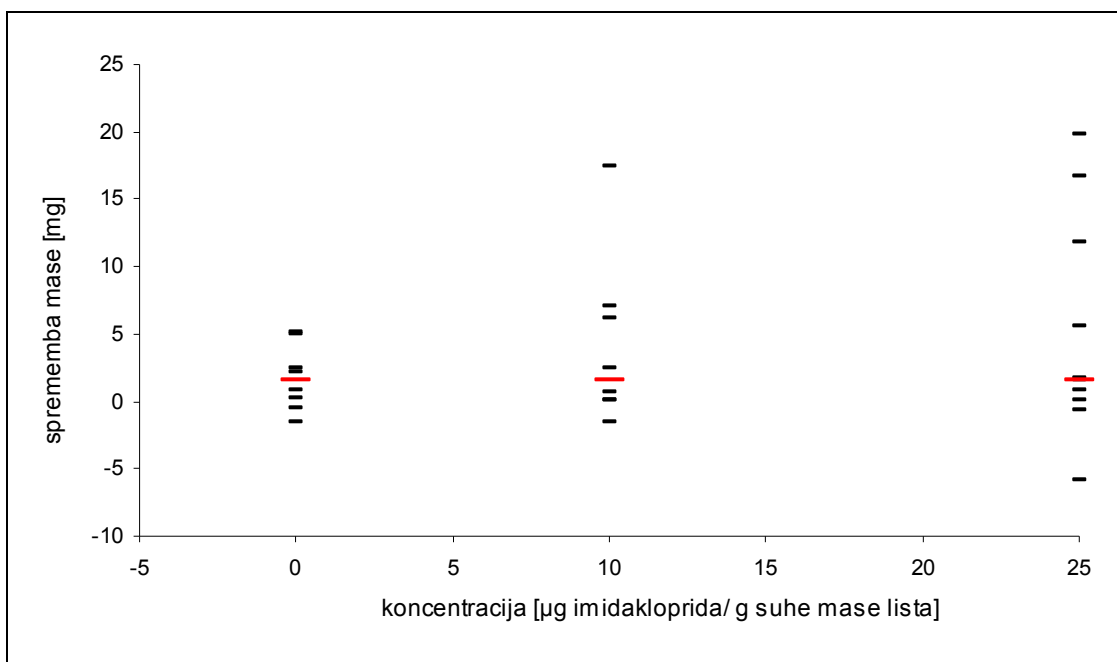
Slika 14: Asimilacijska učinkovitost med 14- dnevnim prehranjevalnim poskusom, pri kontrolni skupini in pri živalih, ki so bile, izpostavljene koncentracijam 10 in 25 μg imidakloprida g^{-1} suhe mase lista. ($N = 8$ za kontrolno skupino in skupino, izpostavljeno 10 μg imidakloprida g^{-1} suhe mase lista, $N = 10$ za skupino, izpostavljeno 25 μg imidakloprida g^{-1} suhe mase lista). Daljše, rdeče linije označujejo povprečne vrednosti

Pri kontrolni skupini je asimilacijska učinkovitost bila povprečno 45,9 %, to pomeni, da je organizem povprečno 45,9 % zaužite hrane pretvoril v energijo in za gradnjo. Asimilacijska učinkovitost posameznih vzorcev se je gibala med 13,6 % in 75,1 %.

Pri skupini, izpostavljeni 10 μg imidakloprida g^{-1} suhe mase lista, je bila asimilacijska učinkovitost 50,0 %, kar pomeni, da so organizmi povprečno polovico hrane pretvorili v energijo in osnovne gradnike. Pri skupini, izpostavljeni 25 μg imidakloprida g^{-1} suhe mase lista, pa je bila asimilacijska učinkovitost 39,1 %.

Statistična obdelava podatkov je pokazala, da pri primerjavi kontrolne skupine in skupin, izpostavljenih 10 in 25 μg imidakloprida g^{-1} suhe mase, ni bilo statistično značilne razlike (Mann-Whitney test).

4.2.3 Vpliv imidakloprida na spremembo mase v II. poskusu

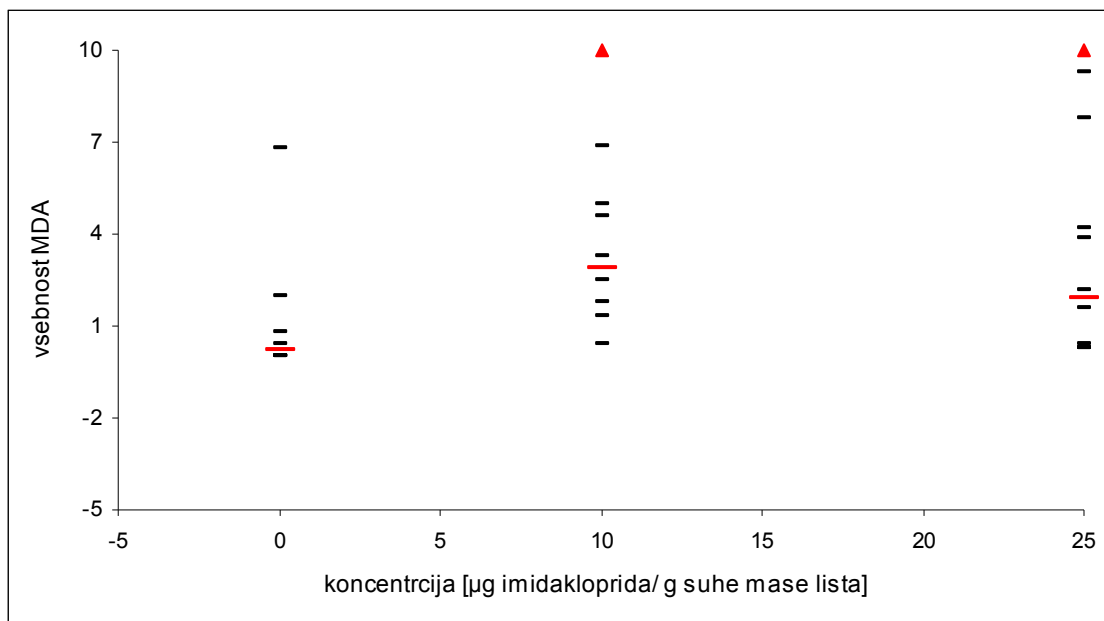


Slika 15: Sprememba mase med 14- dnevnim prehranjevalnim poskusom, pri kontrolni skupini in skupinah, izpostavljenim 10 in 25 µg imidakloprida g⁻¹ suhe mase lista. (N = 8 za kontrolno skupino in skupino, izpostavljeno 10 µg imidakloprida g⁻¹ suhe mase lista, N = 10 za skupino, izpostavljeno 25 µg imidakloprida g⁻¹ suhe mase lista). Daljše, rdeče linije označujejo mediano

Pri kontrolni skupini in pri skupinah, izpostavljenih 10 in 25 µg imidakloprida g⁻¹ suhe mase, so živali med poskusom izgubile na telesni masi. Pri kontrolni skupini je bila izguba v povprečju 1,7 mg. Pri skupini, izpostavljeni 10 µg imidakloprida g⁻¹ suhe mase so živali izgubile povprečno 4,1 mg. Pri skupini, izpostavljeni 25 µg imidakloprida g⁻¹ suhe mase, so živali izgubile povprečno 5,1 mg mase.

Statistična obdelava podatkov je pokazala, da pri primerjanju kontrolne skupine z ostalima skupinama (10 in 25 µg imidakloprida g⁻¹ suhe mase) ni bilo statistično značilnih razlik (Mann-Whitney test).

4.2.4 Vpliv imidakloprida na lipidno peroksidacijo v II. poskusu



Slika 16: Lipidna peroksidacija pri kontrolni skupini ter pri živalih, ki sem jih izpostavila koncentraciji 10 in 25 µg imidakloprida g⁻¹ suhe mase lista. (N = 8 za kontrolno skupino in skupino, izpostavljeno 10 µg imidakloprida g⁻¹ suhe mase lista, N = 10 za skupino, izpostavljeno 25 µg imidakloprida g⁻¹ suhe mase lista). Daljše, rdeče linije označujejo mediano

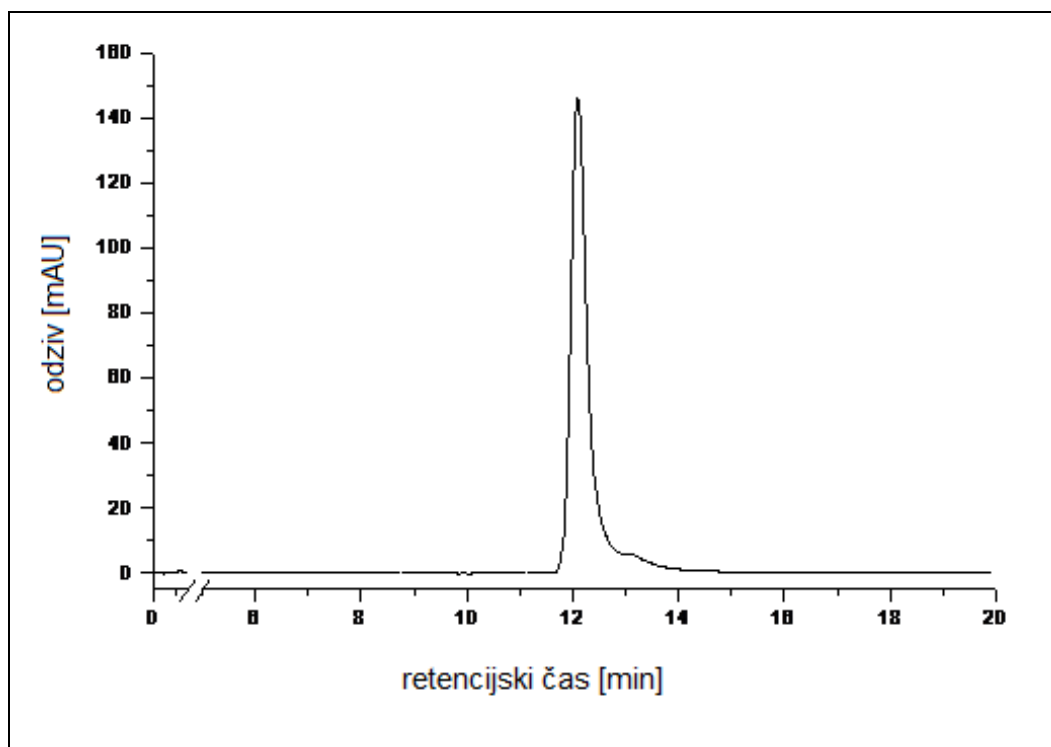
V kontrolni skupini je povprečna vsebnost MDA 1,3, kar nam pove, da organizmi niso bili pod takšnim stresom kot v prvem poskusu. Pri večini vzorcev (pri 4 od skupno 8 vzorcev) drugega poskusa vsebnost MDA in s tem lipidna peroksidacija ni bila zaznana. Samo v enem vzorcu je bila skoraj 7,0.

Pri skupini, izpostavljeni 10 µg imidakloprida g⁻¹ suhe mase lista, je bila povprečna vsebnost MDA 3,2 in pri posameznem vzorcu vsebnost MDA ni bila večja od 7,0.

Pri skupini, izpostavljeni 25 µg imidakloprida g⁻¹ suhe mase lista, je bila povprečna vsebnost MDA nižja kot pri koncentraciji 10 µg imidakloprida g⁻¹ suhe mase lista in je znašala 3,0. Vsebnost MDA pri posameznih vzorcih je bila različna in je zajemala vrednosti od 0,2 do 9,0.

Statistično primerjanje kontrolne skupine s skupino, izpostavljeno 10 µg imidakloprida g⁻¹ suhe mase, je pokazalo statistično značilno razliko. Statistično značilno razliko je pokazalo primerjanje kontrolne skupine s skupino izpostavljeno 25 µg imidakloprida g⁻¹ suhe mase (Mann-Whitney test). Vzorec, ki je pri kontrolni skupini pokazal vsebnost MDA 7,0 je bil že pod stresom, zato ga pri statistični obdelavi podatkov nisem dodala.

4.3 Koncentracija imidakloprida v prehrani živali



Slika 17: Kromatogram HPLC- DAD, ki predstavlja zadrževalni čas imidakloprida (koncentracije $10 \mu\text{g}$ imidakloprid g^{-1} suhe mase lista), ekstrahiran iz listov. (Retention time – čas zadrževanja, response – odziv)

S pomočjo HPLC-DAD (opis v poglavju 3.6) sem ugotavljala dejansko koncentracijo imidakloprida v hrani živali.

Površina vrha (peak) vzorca s koncentracijo $25 \mu\text{g}$ imidakloprida g^{-1} suhe mase lista je bila 2,5 x večja kot območje pri koncentraciji $10 \mu\text{g}$ imidakloprida g^{-1} suhe mase, kar ustreza količini pesticida, ki sem ga nanesla na liste. Učinkovitost ekstrakcije sem določila z umeritveno krivuljo za vzorce s koncentracijami od $0,5$ do $10 \mu\text{g}$ imidakloprida g^{-1} suhe mase lista, pri čemer je bila učinkovitost ekstrakcije 93 % v primeru, ko je bila koncentracija $10 \mu\text{g}$ imidakloprida g^{-1} suhe mase.

5 RAZPRAVA

V nalogi sem ugotovila, da ima imidakloprid učinek na kopenske enakonožne rake *Porcellio scaber*. Z merjenjem in spremljanjem prehranjevalnega poskusa ter z izračuni sem ugotovila, da se vpliv imidakloprida izraža na spremembi mase živali, asimilacijski učinkovitosti in lipidni peroksidaciji.

Študija je pokazala, da je bila smrtnost v prvem poskusu višja kot v drugem le pri kontrolni skupini, ostali dve skupini sta imeli enako smrtnost. Živali so bile v obeh poskusih v kletnem laboratoriju, več ali manj v temi in pokrite s črno vrečko. V primerjavi z raziskovalnim delom Blažič (2006), pri katerem so bili raziskovalni pogoji podobni, je bila smrtnost v preliminarnem poskusu nižja kot pri meni, kljub višjemu številu živali v celotni študiji. Blažič (2006) v svoji študiji uporabi enako število živali in jih izpostavi enaki koncentraciji imidakloprida kot v mojem poskusu in so rezultati smrtnosti višji kot pri mojem prvem poskusu, a nižji kot moji v drugem poskusu.

Pričakovala sem, da se bo vpliv imidakloprida na spremembo mase izrazil z zmanjševanjem telesne mase živali z naraščajočo koncentracijo. Vendar so živali prvega poskusa v kontrolni skupini in v skupini, izpostavljeni najvišji koncentraciji (25 μg imidakloprida g^{-1} suhe mase), pridobivale na telesni masi, le v skupini nižje koncentracije (10 μg imidakloprida g^{-1} suhe mase) so izgubile na masi. V drugem poskusu so živali vseh treh skupin izgubile na masi. Izguba mase se je večala z naraščajočo koncentracijo. V študiji Bratina (2006) so vse živali izgubile telesno maso, vključno s kontrolno skupino, medtem ko so živali v raziskavi Blažič (2006) večinoma izgubile na telesni masi (8 od 41 je težo pridobilo).

Z asimilacijsko učinkovitostjo (AE) lahko ugotovimo učinkovitost potrošnika pri odvzemu energije iz hrane. Del hrane gre za energijo, del pa v zalogo in za izgradnjo in delovanje ostalih delov telesa. V prvem poskusu je bila AE najvišja pri kontrolni skupini, kjer je bilo zaznano tudi največje nihanje med posameznimi organizmi. Pri ostalih dveh skupinah, ki sta bili izpostavljeni 10 in 25 μg imidakloprida g^{-1} suhe mase, je bila AE nekoliko višja pri skupini izpostavljeni 25 μg imidakloprida g^{-1} suhe mase. Z razliko od prvega poskusa je bila v drugem poskusu AE najvišja pri skupini, izpostavljeni 10 μg imidakloprida g^{-1} suhe mase, ter najnižja pri skupini, izpostavljeni 25 μg imidakloprida g^{-1} suhe mase. Pri kontrolni skupini in skupini, izpostavljeni 10 μg imidakloprida g^{-1} suhe mase lista, so zaznana tudi največja nihanja med posameznimi vzorci. Največje nihanje asimilacijske učinkovitosti je bilo v raziskavah Blažič (2006) zaznano pri skupinah, izpostavljenih koncentraciji 10 in 50 μg imidakloprida g^{-1} suhe mase lista. Ostale skupine so imele zelo podobne rezultate, saj so tudi vrednosti median približno enake. Bratina (2006) ima v svoji študiji najvišja nihanja asimilacijske učinkovitosti pri skupini, izpostavljeni koncentraciji 10 μg imidakloprida g^{-1} suhe mase lista, vendar odstotek asimilacijske učinkovitosti narašča z naraščajočo koncentracijo.

Z razliko od moje naloge, v kateri ugotavljam, ali lahko lipidno peroksidacijo uporabljamo kot biomarker pri ugotavljanju učinka imidakloprida v hrani, Blažič (2006) in Bratina (2006) ugotavljata aktivnost encimov AChE in GST. Aktivnost AChE je bila merjena le pri kontrolni skupini in skupinah, izpostavljenim 1, 2,5, 5 in 10 μg imidakloprida g^{-1} suhe mase lista. Raziskava je pokazala, da se pri skupinah izpostavljenim 1, 2,5 μg imidakloprida g^{-1} suhe mase lista aktivnost povečuje. Največja aktivnost je pri skupini, izpostavljeni 5 μg imidakloprida g^{-1} suhe mase lista, nato pa občutno upade pri skupini, izpostavljeni 10 μg imidakloprida g^{-1} suhe mase lista. Ker se je aktivnost AChE merila pri majhnem številu preživetih živali, rezultati niso bili statistično obdelani (Blažič, 2006). Aktivnost GST je pri skupini, izpostavljeni 10 μg imidakloprida g^{-1} suhe mase lista, glede na kontrolno skupino, minimalno upadla. Pri skupini, izpostavljeni 25 μg imidakloprida g^{-1} suhe mase lista, pa je bil upad delovanja GST občuten (Bratina, 2006). Pri svojih raziskavah sem pričakovala, da bo

vsebnost MDA v vzorcih naraščala z naraščajočo koncentracijo. MDA je aldehyd, ki nastane pri lipidni peroksidaciji. Ker s TBA reagira v obarvan pigment, ga lahko spektrofotometrično določimo in tako ugotovimo, ali je prišlo do radikalne poškodbe biološke membrane. Vsebnost MDA je bila v prvem poskusu bistveno višja kot v drugem poskusu. Nihanja vsebnosti MDA so v prvem poskusu najbolj izrazita pri kontrolni skupini. Pri skupinah, izpostavljenih 10 in 25 μg imidakloprida g^{-1} suhe mase lista, vrednosti skoraj ne nihajo in so podobne mediani. V prvem poskusu ni statistično značilnih razlik (Mann-Whitney). Glede na rezultate vsebnosti MDA lahko sklepamo, da so živali v prvem poskusu bile pod stresom tudi v kontrolni skupini. V prvem poskusu so se živali tudi levile v večjem številu kot v drugem poskusu, kar je razvidno iz dobljenih rezultatih. V drugem poskusu je vsebnost MDA pri kontrolni skupini glede na skupine, izpostavljene 10 in 25 μg imidakloprida g^{-1} suhe mase, nižja. Omeniti je potrebno osebek, katerega vsebnost MDA bistveno odstopa od mediane. Ta osebek je bil pod dodatnim stresom. Med možne stresorje lahko štejemo, da je bil pred levitvijo, da je bila samička z mladiči, da je bil bolan. Prišlo je sicer do višje vsebnosti MDA pri skupini, izpostavljeni 10 μg imidakloprida g^{-1} suhe mase lista, glede na skupino, izpostavljeno 25 μg imidakloprida g^{-1} suhe mase lista. Pa vendar se pojavijo statistično značilne razlike glede na kontrolno skupino (Mann-Whitney test). Vsebnost MDA nam pove, da prihaja do poškodb, vendar to še ne pomeni, da je imidakloprid strup za kopenske enakonožne rake *Porcellio scaber*.

Iz študije je razvidno, koliko telesna pripravljenost živali vpliva na poskus (primerjava rezultatov prvega in drugega poskusa). Levitev in mladiči lahko povzročijo še dodaten stres organizmu. Upoštevati moramo, da so živali bile nabrane v naravi, prenesene v terarij, stehtane in nato ponovno dane v petrijevke s pesticidom. To povzroči dodaten stres, ki ga je potrebno upoštevati. Zanimivo bi bilo ugotoviti, kaj se dogaja z vsebnostjo MDA (lipidno peroksidacijo) pri višjih koncentracijah od 25 μg imidakloprida g^{-1} suhe mase lista, npr. pri 40, 50 in 100 μg imidakloprida g^{-1} suhe mase lista.

Kakorkoli, upoštevati je potrebno, da *Porcellio scaber* ni tarčni organizem za imidakloprid in da delovanje nanj ni zagotovljeno v takšni meri, kot je na druge, tarčne organizme. S tem lahko tudi pojasnimo nihanja med skupinami in samimi poskusi. A kljub vsemu, lahko lipidno peroksidacijo uporabimo kot biomarker in jo lahko povežemo s fiziološkimi spremembami pri kopenskem enakonožnem raku *Porcellio scaber*.

6 ZAKLJUČKI

V diplomskem delu sem izvedla dva zaporedna poskusa, v katerih sem živali izpostavila imidaklopridu v hrani za dva tedna ter beležila naslednje fiziološke parametre: smrtnost, levitev, prehranjevanje ter iztrebljanje. Po dvotedenski izpostavitvi sem preživelim organizmom spektrofotometrično izmerila stopnjo lipidne peroksidacije kot biomarker pri izpostavitvi testnih organizmov *Porcellio scaber* imidaklopridu v hrani.

Študija je pokazala, da:

- lipidno peroksidacijo lahko uporabljamo kot biomarker pri ugotavljanju učinka, zaužitega imidakloprida pri kopenskem enakonožnem raku *Porcellio scaber*,
- obstaja povezava med fiziološkimi parametri in lipidno peroksidacijo;
- imidakloprid nima izrazitega učinka na modelni organizem *Porcellio scaber*, saj je ta netarčni organizem.

Rezultati so sicer potrdili predvidevanja, kljub temu pa moram opozoriti še na nekatera dejstva, povezana z eksperimentalnim delom. Živalim nisem mogla določiti spola in nisem mogla ugotoviti, katera od samičk nosi mladiče. To je privedlo do tega, da so nekatere samice med poskusom imele mladiče. Zato ne moremo z gotovostjo vedeti, koliko hrane so dejansko pojedle samice in koliko mladiči, čeprav je masa hrane, ki so jo pojedli mladiči, lahko zanemarljiva. Temu bi se lahko izognila, da bi živalim določila spol in samice že v naprej izločila.

Nekatere živali so se med poskusom levile in del svojega olevka tudi pojedle, kar je predstavlja dodatno hrano. Da bi se temu izognila bi morala živali vsakodnevno vzeti iz petrijevke in preveriti, ali se levi, vendar bi to bil dodaten stres za živali.

Pri izvedbi poskusov sem vedno uporabljala iste pipete, vsako sem pred uporabo preverila tako, da sem na analitski tehtnici trikrat zaporedoma odtehtala določeno prostornino dvakrat deionizirane vode.

Oba navedena primera (mladiči in levitev) predstavljata dodatni stres za živali in tudi lahko posredno vplivata na lipidno peroksidacijo. Ker sem živali nabirala v naravnem okolju, kjer je bilo na voljo omejeno število živali na enem mestu, sem v poskus vključila živali z večjo oz. manjšo maso. Nabor živali je predstavljal skupino z velikim razponom mas. Predvidevam, da bi s povečanjem števila osebkov v posamezni skupini (kontrolni in izpostavljenim imidaklopridu), dobila bolj natančne rezultate in tudi variabilnost parametrov, ki sicer obstaja tudi v naravi, ne bi bila več tako izrazita.

7 VIRI

Blažič M. 2006. Toxicity of imidacloprid to the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea). Master's thesis. Nova Gorica Šola za znanosti o okolju, Politehnika Nova Gorica, Nova Gorica .

Boyer R. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 207-225.

Bratina P. 2006. Testiranje strupenosti imidakloprida in njegovih kmetijskih pripravkov s kopenskimi enakonožnimi raki *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea). Diplomsko delo. Univerza v Novi Gorici, Fakulteta za znanosti o okolju, Nova Gorica.

California department of pesticide regulation

<http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/fatememo/imid.pdf> (pregledano 22. april 2010).

Carrera C., Periquet A. 2000. Metabolism and toxicokinetics of pesticides in animals. Toxicology of pesticides in animals: 67-105. CRC Press.

Chancerelly Y., Mathieu J., Kergonou F. J. 1998. Antibodies against malondialdehyde – modified proteins; Methods in molecular biology, vol. 108. Str. 111-118. Free radical and antioxidant protocols.

Compendium of pesticied common names; Insecticides; neonicotinoids.

(http://www.alanwood.net/pesticides/class_insecticides.html) (pregledano 3. maj 2010).

Connell D. W. 2005. Basic concepts of environmental chemistry, 2nd ed. New York, Lewis Publishers.

Dikshith T. S. S. Neurotoxicity of pesticiedes. Toxicology of pesticides in animals Str. 171-183. CRC Press.

Discover life

http://www.discoverlife.org/mp/20p?see=I_SD/0047 (pregledano 2. maj 2010).

Drobne D. 2009. (Eco)toxicity tests with terrestrial isopods (isopoda, Crustacea). University of Ljubljana, študijsko gradivo.

Drobne D. Blažič M., Van Gestel C. A. M., Lešer V., Zidar P., Jemec A., Trebše P. 2008. Toxicity of imidacloprid to the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea). *Chemosphere* 71: 1326-1334.

Funkcije proteinov

ibk.mf.uni-lj.si/people/lenasi/8FunkcProtBiosign.ppt (pregledano 26. April 2010).

Gabrijelčič E. 2001. Sublethal toxicity of diazinon, organophosphorous pesticide, to the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea). Master thesis. Nova Gorica. Šola za znanosti o okolju, Politehnika Nova Gorica, Nova Gorica.

Inštitut za trajnostni razvoj

http://www.itr.si/javno/youth_farm/sl/agriculture1.html (pregledano 7. maj 2010).

Loureiro S. Sampaio A. Brandao A., Nogueira A. J. A., Soares A. M. V. M. 2006. Feeding behaviour of the terrestrial isopod *Porcellionides pruniosus* Brant, 1883 (Crustacea, Isopoda) in response to changes in food quality and contamination. *Science of the total environment* 369: 119-128.

Markert B. A., Breure A. M., Zechmeister H. G. 2003 Bioindicators & Biomonitoring. Principles, concepts and applications. Oxford, Elsevier: 201-257.

Mansour S. A. Mossa A. T. H. 2009 Lipid peroxidation and oxidative stress in rat erythrocytes induced by chlorpyrifos and the protective effect of zinc. *Pesticide biochemistry and physiology* 93: 34-39.

Matsuda K. Buckingham S. D., Kleier D., Rauh J. J., Grauso M., Sattelle D. B. 2001 Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in pharmacological sciences* 22, 11: 573-580.

Mitjavila S. 1990. Pesticides and lipid peroxidation. Toxicology of pesticides in animals: 119-147.

Muedra W. 1972 Anatomija živali. Ljubljana . Mladinska knjiga.

Niki E., Yoshida Y., Satio Y., Noguchi N. 2005. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects (review). *Biochemical and biophysical research communications* 338: 668-676.

PAN Pesticide database - chemicals

http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp?Rec_Id=PC35730 (pregledano 16. april 2010).

Pickering, W.R. 2002. Biologija: Shematski pregledi. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije.

Podobnik A., Devetak D., 1998. Biologija 4 in 5, Raznolikost živih bitij, DZS.

Registrirana fitofarmacevtska sredstva.

<http://spletni2.furs.gov.si/FFS/FFSCD/CD/index.htm> (pregledano 5. maj 2010).

Ribeiro, S., Sousa, J.P., Nogueira, A.J.A., Soares, A.M.V.M. 2001. Effect of endosulfan and parathion on energy reserves and physiological parameters of the terrestrial isopod *Porcellio dilatatus*. *Ecotoxicol. Environmental Safety* 49: 131-138.

Stanek. K., 2004. Sensitivity and specificity of acetylcholinesterase activity in *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea) as a biomarker of diazinon exposure. Master thesis. Nova Gorica, Šola za znanosti o okolju, Politehnika Nova Gorica, Nova Gorica.

Stanek K., Drobne D., Trebše P. 2006. Linkage of biomarkers along levels of biological complexity in juvenile and adult diazinon fed terrestrial isopod (*Porcellio scaber*, Isopoda, Crustacea). *Chemosphere* 64: 1745-1752.

Thomson C. M., Richardson R. J. 2004 Anticholinesterase insecticides. Pesticides toxicology and international regulation: 89-127. England, Wiley & Sons Ltd

http://books.google.com/books?id=2w35kILe820C&pg=PA89&lpg=PA89&dq=Anticholinesterase+insecticides.+Pesticides+toxicology+and+international+regulation&source=bl&ots=3pslxOv_Ol&sig=7V_7FGc8VEBw_Je2jMJXSzISi2M&hl=sl&ei=62GsTOyQIY7IswaE_ljBA&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=3&ved=0CCIQ6AEwAg#v=onepage&q&f=false (pregledano 20. april 2010).

Van Brummelen, T.C., Stuijzand, S.C. 1993. Effects of benzo[a]pyrene on survival, growth and energy reserves in the terrestrial isopods *Oniscus asellus* and *Porcellio scaber*. The Science of the Total Environment, Supplement.

Walker C. H, Hopkin S. P., Sibly R. M., Peakall D. B. 2001 Principles of ecotoxicology 2nd ed. New York, T&F informa.

Woodlice on line

<http://www.porcellio.scaber.org/wlice.htm> (pregledano 2. maj 2010).

PRILOGE

Priloga A

Prvi poskus

Preglednica A 1: Živali (levitev, masa živali, sprememba mase živali, masa iztrebkov, povprečne vrednosti, prirast).

Št. živali	levitev	začetna masa [mg]	končna masa [mg]	razlika v masi [mg]	masa iztrebkov [mg]	GE [%]
0 $\mu\text{g g}^{-1}$						
1		47,6	41,6	6,0	4,5	12,6
2	o	47,8				
3		40,9	45,7	- 4,8	8,9	-11,7
4		53,9	58,1	- 4,2	42,5	-7,8
5		53,5	56,0	- 2,5	27,2	-4,7
6		40,1	51,6	- 11,5	39,0	-28,7
7		35,3	35,3	0	0,7	0
8		33,8	35,0	- 1,2	14,6	-3,6
9		80,0	86,5	- 6,5	5,7	-8,1
10	o	74,0	73,9	+ 0,1	14,0	0,1
11	o	59,3	57,3	+ 2,0	7,9	3,4
12		23,6	23,8	- 0,2	13,4	-0,8
Povp.		49,2	51,3	-2,1	16,2	-4,5
Mediana		47,7	51,6	-1,2	13,4	-3,6
10 $\mu\text{g g}^{-1}$						
13		43,4	37,1	6,3	15,3	15,0
14		49,1	43,5	5,6	14,6	11,0
15		47,6				
16	o	43,6	35,3	8,3	16,5	19,0
17	o	37,3	34,2	3,1	16,0	8,3
18	o	36,3	33,3	3,0	5,2	8,3
19	o	83,1				
20		71,5				
21		63,6	54,2	9,4	12,8	14,8
22		58,1	49,5	8,6	17,5	15,1
23		61,0	48,2	12,8	17,6	21,0
24		26,8				
Povp.		51,8	41,9	7,2	14,4	14,1
Mediana		48,4	40,3	7,3	15,7	14,9
25 $\mu\text{g g}^{-1}$						
25	o	27,2	26,2	+ 1,0	7,1	3,7
26		84,9	91,4	- 6,5	7,4	-7,7
27		82,6	90,3	- 7,7	9,6	-9,3
28		90,5	97,4	- 6,9	25,9	-7,6
29	o	78,4	80,2	- 1,8	22,0	-2,3
30	o	38,9	32,0	+ 6,9	23,3	17,7
31		37,6	34,1	+ 3,5	25,4	9,3
32	o	33,3	33,6	+ 0,3	7,2	0,9
33		44,4	47,6	- 3,2	11,7	-7,2
34		45,1	45,9	- 0,8	10,6	-1,8
35		42,8				
36		45,9				
Povp.		54,3	57,9	-1,5	15,0	-0,4
Mediana		44,8	46,8	-1,3	11,2	-2,1

Preglednica A 2: Listi (masa lista, končna masa lista in razlika v masi).

Št. živali	začetna masa [mg]	končna masa [mg]	razlika v masi [mg]
0 $\mu\text{g g}^{-1}$			
1	101,4	89,7	11,7
2	100,0		
3	100,4	68,1	31,9
4	101,2	49,1	52,1
5	100,0	67,1	32,9
6	101,0	54,0	47,0
7	101,0	92,5	8,5
8	101,1	82,1	19,0
9	101,2	79,4	21,8
10	100,7	78,6	22,1
11	101,4	90,6	10,8
12	101,2	85,1	16,1
Povp.	100,9	76,0	24,9
Mediana	101,1	79,4	21,8
10 $\mu\text{g g}^{-1}$			
13	100,0	80,2	19,8
14	100,6	83,0	17,6
15	100,8		
16	100,5	80,8	19,7
17	101,0	82,5	18,5
18	101,5	88,8	12,7
19	101,4		
20	100,4		
21	101,1	84,0	17,1
22	100,8	79,8	21,0
23	101,0	82,0	19,0
24	101,3		
Povp.	100,9	82,6	18,2
Mediana	100,9	82,3	18,8
25 $\mu\text{g g}^{-1}$			
25	100,4	89,0	11,4
26	99,8	87,4	12,4
27	101,4	86,2	11,1
28	100,0	65,4	34,6
29	100,9	75,0	25,9
30	100,6	69,5	31,1
31	100,3	68,4	31,9
32	101,1	89,3	11,8
33	100,2	84,7	15,5
34	101,0	83,7	17,3
35	100,8		
36	101,4		
Povp.	100,7	79,9	17,1
Mediana	100,7	84,2	16,4

Preglednica A 3: Asimilacijska učinkovitost *Porcellio scaber* med prvim poskusom.

Št. živali	Količina pojedenih listov [mg]	Količina iztrebkov [mg]	AE [%]
0 $\mu\text{g g}^{-1}$			
1	11,7	4,5	61,5
2			
3	31,9	8,9	72,1
4	52,1	42,5	18,4
5	32,9	27,2	17,3
6	47,0	39,0	17,0
7	8,5	0,7	91,8
8	19,0	14,6	23,2
9	21,8	5,7	73,9
10	22,1	14,0	36,7
11	10,8	7,9	26,9
12	16,1	13,4	16,8
Povp.	24,9	16,2	41,4
Mediana	21,8	13,4	26,9
10 $\mu\text{g g}^{-1}$			
13	19,8	15,3	22,7
14	17,6	14,6	17,0
15			
16	19,7	16,5	16,2
17	18,5	16,0	13,5
18	12,7	5,2	59,0
19			
20			
21	17,1	12,8	25,1
22	21,0	17,5	16,7
23	19,0	17,6	7,4
24			
Povp.	18,2	14,4	22,2
Mediana	18,8	15,7	16,9
25 $\mu\text{g g}^{-1}$			
25	11,4	7,1	37,7
26	12,4	7,4	40,3
27	11,1	9,6	13,5
28	34,6	25,9	25,1
29	25,9	22,0	15,0
30	31,1	23,3	25,1
31	31,9	25,4	20,4
32	11,8	7,2	39,0
33	15,5	11,7	24,5
34	17,3	10,6	38,7
35			
36			
Povp.	17,1	15,0	28,0
Mediana	16,4	11,2	25,1

Preglednica A 4: Lipidna peroksidacija pri prvem poskusu.

Št. živali	A ₅₃₅	A ₆₀₀	A ₂₈₀	LIPIDNA PEROKSIDACIJA
0 µg g⁻¹				
1	0,077	0,075	0,236	0,9
2				
3	0,093	0,090	0,279	1,1
4	0,200	0,161	0,299	13,0
5	0,082	0,078	0,290	13,8
6	0,084	0,077	0,200	3,5
7	0,103	0,097	0,293	2,0
8	0,117	0,114	0,585	0,5
9	0,100	0,098	0,137	1,5
10	0,079	0,074	0,063	7,9
11	0,075	0,074	0,307	0,3
12	0,190	0,179	0,370	2,9
Povp.				4,3
Mediana				2
10 µg g⁻¹				
13	0,085	0,082	0,210	1,4
14	0,131	0,129	0,148	1,4
15				
16	0,278	0,267	0,147	7,5
17	0,086	0,082	0,153	2,6
18	0,114	0,111	0,253	1,2
19				
20				
21	0,205	0,190	0,228	6,6
22	0,099	0,091	0,188	4,3
23	0,078	0,077	0,172	0,6
24	0,098	0,096	0,125	1,6
Povp.				3,0
Mediana				1,6
25 µg g⁻¹				
25	0,081	0,080	0,189	0,5
26	0,079	0,076	0,167	1,8
27	0,181	0,176	0,155	3,2
28	0,102	0,099	0,281	1,1
29	0,102	0,092	0,169	5,9
30	0,110	0,098	0,363	3,3
31	0,294	0,179	0,377	30,5
32	0,075	0,074	0,285	0,4
33	0,076	0,074	0,410	0,5
34	0,075	0,074	0,232	0,4
35				
36				
Povp.				4,8
Mediana				1,5

Priloga B:

Drugi poskus

Preglednica B 1: Živali (levitev, masa živali, sprememba mase živali, masa iztrebkov, povprečne vrednosti in prirast).

Št. živali	levitev	začetna masa [mg]	končna masa [mg]	razlika v masi [mg]	masa iztrebkov [mg]	GE [%]
0 $\mu\text{g g}^{-1}$						
1		63,6	58,4	5,2	34,4	8,2
2	o	35,1	33,0	2,1	2,1	6,0
3		32,6				
4		67,2	62,1	5,0	24,6	7,4
5		37,6				
6		31,0	28,6	2,4	6,6	7,7
7		24,7	24,5	0,2	7,7	0,9
8		58,1	58,6	-0,5	21,3	-0,9
9		56,7	58,2	-1,5	20,5	-2,6
10		46,6				
11		53,3	52,4	0,9	38,8	1,7
12		26,4				
Povp.		44,4	47,0	1,7	19,5	3,4
Mediana		42,1	55,3	1,5	20,9	3,9
10 $\mu\text{g g}^{-1}$						
13		29,7				
14		55,0				
15	o	72,6	55,2	17,4	6,8	24,0
16		33,4	32,7	0,7	20,1	2,1
17		70,3	64,2	6,1	27,1	8,7
18		58,1	51,0	7,1	15,0	12,2
19		42,2				
20		33,1				
21		42,0	39,5	2,5	7,7	6,0
22		40,3	41,9	-1,6	3,6	-4,0
23		31,7	31,6	0,1	3,6	0,3
24		32,3	32,2	0,1	4,7	0,3
Povp.		45,1	43,5	4,1	11,1	6,2
Mediana		41,2	40,7	1,6	7,3	4,1
25 $\mu\text{g g}^{-1}$						
25		45,1				
26		39,3	40,0	-0,7	5,6	-1,8
27		38,4	37,6	0,8	11,3	2,1
28		34,7	34,6	0,1	7,3	0,3
29		52,3	50,8	1,5	14,9	2,9
30	•	95,3	75,5	19,8	23,3	20,8
31		92,3				
32		50,7	49,0	1,7	16,5	3,4
33	•	56,5	44,7	11,8	5,2	20,9
34		31,8	37,7	-5,9	8,8	-18,6
35	•	61,2	44,5	16,7	13,8	27,3
36		41,0	35,5	5,5	11,2	13,4
Povp.		53,2	44,5	5,1	11,8	7,1
Mediana		47,9	42,3	1,6	11,3	3,2

- Mladički (samice so med poskusom izlegle mladiče)

Preglednica B 2: Listi (masa lista, končna masa in razlika v masi listov).

Št. živali	začetna masa [mg]	končna masa [mg]	razlika v masi [mg]
0 $\mu\text{g g}^{-1}$			
1	100,4	60,6	39,8
2	99,9	92,4	7,5
3	97,4		
4	99,0	67,2	31,8
5	102,3		
6	100,1	85,0	15,1
7	102,0	86,3	15,7
8	98,8	69,5	29,3
9	97,8	66,5	31,3
10	100,1		
11	100,9	52,5	48,4
12	101,3		
Povp.	100,0	72,5	27,4
Mediana	100,1	68,4	30,3
10 $\mu\text{g g}^{-1}$			
13	100,5		
14	99,6		
15	102,0	93,5	8,5
16	101,8	73,5	28,3
17	100,6	68,4	32,2
18	101,8	81,3	20,5
19	101,7		
20	99,9		
21	98,0	84,4	13,6
22	101,0	86,1	14,9
23	100,8	76,5	24,3
24	101,0	83,5	17,5
Povp.	100,7	80,9	20,0
Mediana	100,9	82,4	19,0
25 $\mu\text{g g}^{-1}$			
25	101,2		
26	101,7	87,2	14,5
27	101,8	86,1	15,7
28	101,6	85,1	16,5
29	99,0	75,1	23,9
30	98,7	67,7	31,0
31	99,6		
32	97,6	75,1	22,5
33	100,0	93,1	6,9
34	100,7	79,0	21,7
35	99,2	76,5	22,7
36	99,1	81,9	17,2
Povp.	100,0	80,7	19,3
Mediana	99,8	80,5	19,5

Preglednica B 3: Asimilacijska učinkovitost *Porcellio scaber* med drugim poskusom.

Št. živali	Količina pojedenih listov [mg]	Količina iztrebkov [mg]	AE [%]
0 $\mu\text{g g}^{-1}$			
1	39,8	34,4	13,6
2	7,5	2,1	72,0
3			
4	31,8	24,6	22,6
5			
6	15,1	6,6	56,3
7	15,7	7,7	51,0
8	29,3	21,3	27,3
9	31,3	20,5	75,1
10			
11	48,4	38,8	49,4
12			
Povp.	27,4	19,5	45,9
Mediana	30,3	20,9	50,2
10 $\mu\text{g g}^{-1}$			
13			
14			
15	8,5	6,8	20,0
16	28,3	20,1	29,0
17	32,2	27,1	15,8
18	20,5	15,0	26,8
19			
20	13,6		
21	14,9	7,7	43,4
22	24,3	3,6	75,8
23	17,5	3,6	85,2
24	20,0	4,7	73,1
Povp.	20,0	11,1	50,0
Mediana	20,0	7,5	36,2
25 $\mu\text{g g}^{-1}$			
25			
26	14,5	5,6	61,4
27	15,7	11,3	28,0
28	16,5	7,3	54,5
29	23,9	14,9	37,7
30	31,0	23,3	24,8
31			
32	22,5	16,5	26,7
33	6,9	5,2	24,6
34	21,7	8,8	59,4
35	22,7	13,8	39,2
36	17,2	11,2	34,9
Povp.	19,3	11,8	39,1
Mediana	19,5	11,3	36,3

Preglednica B 4: Lipidna peroksidacija pri drugem poskusu.

Št. živali	A ₅₃₅	A ₆₀₀	A ₂₈₀	LIPIDNA PEROKSIDACIJA
0 µg g⁻¹				
1	0,005	0,003	0,249	0,8
2	0,000	0,000	0,247	0,0
3				
4	0,002	0,002	0,243	0,0
5				
6	0,025	0,020	0,251	2,0
7	0,003	0,003	0,213	0,0
8	0,000	0,000	0,235	0,0
9	0,020	0,019	0,244	0,4
10				
11	0,027	0,012	0,220	6,8
12				
Povp.				1,3
Mediana				0,2
10 µg g⁻¹				
13				
14				
15	0,027	0,011	0,045	0,4
16	0,020	0,010	0,217	4,6
17	0,023	0,005	0,259	6,9
18	0,008	0,004	0,220	1,8
19				
20				
21	0,008	0,005	0,225	1,3
22	0,020	0,011	0,273	3,3
23	0,024	0,012	0,240	5,0
24	0,007	0,001	0,238	2,5
Povp.				3,2
Mediana				2,9
25 µg g⁻¹				
25				
26	0,035	0,012	0,247	9,3
27	0,042	0,020	0,283	7,8
28	0,005	0,004	0,288	0,3
29	0,010	0,004	0,278	2,2
30	0,008	0,004	0,246	1,6
31				
32	0,012	0,011	0,344	0,3
33	0,025	0,024	0,280	0,4
34	0,010	0,009	0,295	0,3
35	0,016	0,003	0,335	3,9
36	0,014	0,002	0,285	4,2
Povp.				3,0
Mediana				1,9