UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Polona GORKIČ

ABSORBCIJA BLIŽNJEGA ELEKTRIČNEGA POLJA PRI HROŠČIH MOKARJIH (*Tenebrio molitor*) V ODVISNOSTI OD RAZVOJNE FAZE IN DELOVANJA STRESNIH DEJAVNIKOV

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Polona GORKIČ

ABSORBCIJA BLIŽNJEGA ELEKTRIČNEGA POLJA PRI HROŠČIH MOKARJIH (*Tenebrio molitor*) V ODVISNOSTI OD RAZVOJNE FAZE IN DELOVANJA STRESNIH DEJAVNIKOV

DIPLOMSKO DELO Univerzitetni študij

NEAR ELECTRIC FIELD ABSORPTION OF MEALWORM BEETLES (*Tenebrio molitor*) IN DEPENDENCE OF DEVELOPMENTAL STAGE AND STRESS FACTORS

GRADUATION THESIS University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije na Oddelku za biologijo na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Inštitutu Bion v Ljubljani, kjer so bili izvedeni vsi poskusi.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je dne 5. 6. 2009 odobrila diplomsko delo z naslovom Absorbcija bližnjega električnega polja pri hroščih mokarjih (*Tenebrio molitor*) v odvisnosti od razvojne faze in delovanja stresnih dejavnikov. Za mentorja diplomskega dela je bil imenovan prof. dr. Igor Jerman.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:	doc. dr. Rok KOSTANJŠEK		
	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo		
Član:	doc. dr. Gregor ZUPANČIČ		
	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo		
Član:	prof. dr. Igor JERMAN		
	Inštitut Bion, Ljubljana		

Datum zagovora: 11. 5. 2010

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

Polona Gorkič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn

- DK UDK 591.1:537:595.76(043.2)=163.6
- KG elektromagnetno polje/bližnje električno polje/ontogenetski stadij/ogljikov dioksid/fiziološko stanje/*Tenebrio molitor*/mokar
- AV GORKIČ, Polona
- SA JERMAN, Igor (mentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2010
- IN ABSORBCIJA BLIŽNJEGA ELEKTRIČNEGA POLJA PRI HROŠČIH MOKARJIH (*TENEBRIO MOLITOR*) V ODVISNOSTI OD RAZVOJNE FAZE IN DELOVANJA STRESNIH DEJAVNIKOV
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
- OP XVI, 71 str., 6 pregl., 43 sl., 7 pril., 48 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI V diplomski nalogi smo ugotavljali povezavo med absorpcijo bližnjega električnega polja in ontogenetskim in fiziološkim stanjem mokarja (Tenebrio molitor). Za spremljanje absorpcije smo uporabili napravo Experimental Life Energy Meter (Heliognosis, Kanada). Absorpcijo bližnjega polja posredno merimo preko sprememb kapacitivnosti odprtega kondenzatorja, ki je vir bližnjega polja in na katerega ploščo postavimo vzorec hroščev. Primerjali smo izmerjene vrednosti pri hroščih, ki smo jih sočasno z merjenjem omamljali z ogljikovim dioksidom, pri čemer ločimo tri obravnavanja: 1) pred izpostavljenostjo ogljikovemu dioksidu, 2) med omamljenostjo in 3) po zbujanju iz omamljenosti. Primerjali smo tudi tri ontogenetske stadije: ličinke na začetku larvalnega stadija, ličinke tik pred stadijem bube in odrasle hrošče. Višje vrednosti smo izmerili pri ličinkah v skupini med omamljenostjo, in pri hroščih pred in po omamljenosti. Statistična analiza (test enosmerna ANOVA) na vrednostih, normiranih po masi, je pokazala statistično značilne razlike (p≤0,05) med obravnavanji tako pri izpostavljenosti ogljikovemu dioksidu kot pri različnih ontogenetskih stadijih. S kontrolnim vzorcem mrtvih hroščev smo potrdili, da so opažene razlike posledica živosti organizma. Kot moteči dejavnik smo zabeležili aktivno premikanje poskusnih živali, a dodatni kontrolni poskusi niso potrdili, da bi lahko s premikanjem hroščev zadovoljivo razložili opažene spremembe.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

- DC UDC 591.1:537:595.76(043.2)=163.6
- CX electromagnetic field/near electric field/ontogenetic state/carbon dioxide/physiological state/*Tenebrio molitor*/mealworm beetle
- AU GORKIČ, Polona
- AA JERMAN, Igor (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
- PY 2010
- TI NEAR ELECTRIC FIELD ABSORPTION OF MEALWORM BEETLES (*TENEBRIO MOLITOR*) IN DEPENDENCE OF DEVELOPMENTAL STAGE AND STRESS FACTORS
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO XVI, 71 p., 6 tab., 43 fig., 7 ann., 48 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB In this graduation thesis, we studied the relation of the absorption of near electric field to the ontogenetic and physiological state of mealworm beetle (Tenebrio *molitor*). For our measurements, we used a device named Experimental Life Energy Meter (Heliognosis, Canada). It employs an open capacitor as a source of the near field and the capacitance is affected by the near field absorption of the sample that is put on one of the plates of the capacitor. While being in position for measurement, animals in the sample were intoxicated using carbon dioxide. We compared three groups of samples that we measured in this way: 1) before exposure to carbon dioxide, 2) during the intoxicated state and 3) after the effect of carbon dioxide has worn off. We also measured samples of three ontogenetic stages: larvae at the beginning of the larval stage, larvae just before the pupa stage, and adults. Higher values were observed with larvae in the intoxicated state and with adults before the exposure and after the effect of the intoxication has worn off. Statistically analysed data, using one-way ANOVA, showed a significant difference ($p \le 0.05$) in values, normalized by weight, between groups regarding exposure to carbon dioxide as well as ontogenetic stage. A control sample of dead adults was used to confirm that the observed difference was due to living state of the organism. We noted our measurements may have been disrupted by the movements of the animals; however, further control experiments showed that not all the difference could be attributed to this factor.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIII
SLOVARČEK	XV
	1

2
2
3
5
DE 9
AH 12
12
14
14
16
18
18
19
19
26
nja z) 30

4.2.4	Ugotavljanje odvisnosti absorpcije bližnjega polja od mase (drugi sklop)	31
4.2.5	Kontrolni poskusi	33
4.2.5.1	Vpliv ogljikovega dioksida na absorpcijo bližnjega polja v sistemu brez poskusnih živali	33
4.2.5.2	Vpliv ogljikovega dioksida in mase na absorpcijo bližnjega polja destilirane vode	
4.2.5.3	Vpliv živosti na absorpcijo bližnjega polja	35
4.2.5.4	Kontrolni poskus vpliva lege poskusnih živali glede na elektrodo	36
4.3	STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV	38
5	REZULTATI	39
5.1	EXPERIMENTAL LIFE ENERGY METER (MERILNI SISTEM HELIOGNOSIS)	39
5.1.1	Kontrolni poskusi z ogljikovim dioksidom in destilirano vodo	39
5.1.1.1	Vpliv ogljikovega dioksida na absorpcijo bližnjega polja v sistemu brez poskusnih živali	39
5.1.1.2	Vpliv ogljikovega dioksida in mase na absorpcijo bližnjega polja destilirane vode	40
5.1.2	Ugotavljanje odvisnosti absorpcije bližnjega polja od omamljanja z ogljikovim dioksidom	43
5.1.2.1	Ličinke na začetku larvalnega stadija	44
5.1.2.2	Ličinke tik pred stadijem bube	45
5.1.2.3	Odrasli hrošči	46
5.1.3	Ugotavljanje odvisnosti absorpcije bližnjega polja od ontogenetskega stadija	48
5.1.4	Ugotavljanje odvisnosti absorpcije bližnjega polja od mase	50
5.1.5	Kontrolni poskusi z mokarji (<i>Tenebrio molitor</i>)	53
5.1.5.1	Vpliv živosti na absorpcijo bližnjega polja	53
5.1.5.2	Kontrolni poskus vpliva lege poskusnih živali glede na merilno elektrodo	55
6	RAZPRAVA	60
7	SKLEPI	64
8	POVZETEK	65
9	VIRI	67

9.1	CITIRANI VIRI	67
9.2	DRUGI VIRI	70

ZAHVALA PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 6: Največja razlika po masi normiranih vrednosti absorpcije bližnjega polja.58

KAZALO SLIK

Sl. 1: Gojišče z mokarji (<i>Tenebrio molitor</i>)19
Sl. 2: Shema merilnega sistema Heliognosis
Sl. 3: Vezje, sestavljeno iz upora in kondenzatorja
Sl. 4: Shema naprave Experimental Life Energy Meter (merilni sistem Heliognosis)22
Sl. 5: Poenostavljena shema naprave Experimental Life Energy Meter (merilni sistem
Heliognosis)
Sl. 6: Naprava Experimental Life Energy Meter – merilec in elektroda, na katero
postavimo vzorec
Sl. 7: Nastavitve na merilcu Experimental Life Energy Meter
Sl. 8: Posamezne komponente merilnega sistema Heliognosis
Sl. 9: Elektroda s čašo in cevjo za dovajanje ogljikovega dioksida vzorcu
Sl. 10: Jeklenka z ogljikovim dioksidom in cev za dovajanje ogljikovega dioksida28
Sl. 11: Posnetek meritve absorpcije bližnjega polja pri ličinkah mokarja (Tenebrio
<i>molitor</i>)29
Sl. 12: Posnetek meritve absorpcije bližnjega polja pri odraslih hroščih mokarjih (Tenebrio
<i>molitor</i>)
Sl. 13: Vzorci hrošča mokarja (<i>Tenebrio molitor</i>) v različnih ontogenetskih stadijih31
Sl. 14: Posnetek meritve absorpcije bližnjega polja pri ličinkah in hroščih mokarja
(<i>Tenebrio molitor</i>), drugi sklop meritev
Sl. 15: Posnetek meritve absorpcije bližnjega polja v sistemu brez poskusnih živali33
Sl. 16: Posnetek meritve absorpcije bližnjega polja pri destilirani vodi
Sl. 17: Posnetek meritve absorpcije bližnjega polja pri destilirani vodi, drugi sklop meritev.
Sl. 18: Posnetek meritve absorpcije bližnjega polja pri vzorcu mrtvih odraslih hroščev
mokarjev (<i>Tenebrio molitor</i>)
Sl. 19: Vzorec mrtvih odraslih hroščev mokarjev (Tenebrio molitor) v različnih
konfiguracijah
Sl. 20: Posnetek meritve absorpcije bližnjega polja ob spremembi konfiguracije vzorca
mrtvih odraslih hroščev mokarjev (<i>Tenebrio molitor</i>)
Sl. 21: Posnetek meritve absorpcije bližnjega polja v sistemu brez poskusnih živali

Sl. 22: Posnetek meritve absorpcije bližnjega polja pri destilirani vodi40
Sl. 23: Absorpcija bližnjega polja pri destilirani vodi glede na prisotnost ogljikovega
dioksida v sistemu41
Sl. 24: Posnetek meritve absorpcije bližnjega polja pri destilirani vodi, drugi sklop
meritev42
Sl. 25: Odvisnost absorpcije bližnjega polja od mase pri destilirani vodi (drugi sklop
meritev)
Sl. 26: Posnetek meritve absorpcije bližnjega polja pri ličinkah mokarja (Tenebrio
<i>molitor</i>)
Sl. 27: Posnetek meritve absorpcije bližnjega polja pri odraslih hroščih mokarjih (Tenebrio
<i>molitor</i>)
Sl. 28: Absorpcija bližnjega polja glede na omamljenost pri ličinkah hrošča mokarja
(<i>Tenebrio molitor</i>) na začetku larvalnega stadija45
Sl. 29: Absorpcija bližnjega polja glede na omamljenost pri ličinkah hrošča mokarja
(<i>Tenebrio molitor</i>) tik pred stadijem bube46
Sl. 30: Absorpcija bližnjega polja glede na omamljenost pri odraslih hroščih mokarjih
(Tenebrio molitor)
Sl. 31: Absorpcija bližnjega polja glede na omamljenost pri ličinkah na začetku larvalnega
stadija (oznaka LM), pri ličinkah tik pred stadijem bube (oznaka LV) in pri odraslih
osebkih (oznaka H) hrošča mokarja (<i>Tenebrio molitor</i>)48
Sl. 32: Absorpcija bližnjega polja glede na stadij ontogeneze pri hrošču mokarju (Tenebrio
<i>molitor</i>) pred dovajanjem ogljikovega dioksida49
Sl. 33: Posnetek meritve absorpcije bližnjega polja pri ličinkah mokarja (<i>Tenebrio molitor</i>)
na začetku larvalnega stadija (prvi sklop meritev)50
Sl. 34: Posnetek meritve absorpcije bližnjega polja pri ličinkah tik pred stadijem bube in
odraslih hroščih mokarjih (Tenebrio molitor), drugi sklop meritev
Sl. 35: Odvisnost absorpcije bližnjega polja pred omamljanjem od mase pri ličinkah hrošča
mokarja (<i>Tenebrio molitor</i>) na začetku larvalnega stadija (LM)
Sl. 36: Odvisnost absorpcije bližnjega polja pred omamljanjem od mase pri ličinkah hrošča
mokarja (<i>Tenebrio molitor</i>) tik pred stadijem bube (LV2)
Sl. 37: Odvisnost absorpcije bližnjega polja pred omamljanjem od mase pri odraslih
hroščih mokarjih (<i>Tenebrio molitor</i>) (H2)

Sl. 38: Posnetek meritve absorpcije bližnjega polja pri vzorcu mrtvih hroščev mokarjev
(Tenebrio molitor)
Sl. 39: Absorpcija bližnjega polja glede na omamljenost (živi osebki) oziroma prisotnost
ogljikovega dioksida v sistemu (mrtvi osebki) pri odraslih hroščih mokarjih (Tenebrio
<i>molitor</i>)55
Sl. 40: Posnetek meritve absorpcije bližnjega polja ob spremembi konfiguracije vzorca
mrtvih hroščev mokarjev (<i>Tenebrio molitor</i>)56
Sl. 41: Absorpcija bližnjega polja pri različnih legah vzorca mrtvih odraslih osebkov
hrošča mokarja (<i>Tenebrio molitor</i>)57
Sl. 42: Največja razlika vrednosti pri poskusu vpliva ogljikovega dioksida na absorpcijo
bližnjega polja pri odraslih hroščih (med obravnavanji Pred in Po*) in pri poskusu vpliva
lege hroščev na absorpcijo bližnjega polja (med konfiguracijo 1 in konfiguracijo 2).
Sl. 43: Absorpcija bližnjega polja pri obravnavanih skupinah vzorcev hrošča mokarja
(Tenebrio molitor) in destilirani vodi

KAZALO PRILOG

Pril. A: Absorpcija bližnjega polja destilirane vode

Pril. B1: Absorpcija bližnjega polja v odvisnosti od ogljikovega dioksida pri ličinkah na začetku larvalnega stadija

Pril. B2: Absorpcija bližnjega polja v odvisnosti od ogljikovega dioksida pri ličinkah tik pred stadijem bube

Pril. B3: Absorpcija bližnjega polja v odvisnosti od ogljikovega dioksida pri odraslih hroščih

Pril. C: Ontogenetski stadij in absorpcija bližnjega polja

Pril. D: Masa in absorpcija bližnjega polja

Pril. E: Kontrolni poskus vpliva lege poskusnih živali glede na elektrodo

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

- A/D analogno-digitalni (pretvornik)
- B gostota magnetnega polja
- C kondenzator oziroma kapacitivnost
- CO2-ogljikov dioksid
- D gostota električnega polja
- DC enosmerna električna napetost oziroma enosmerni električni tok
- DNK deoksiribonukleinska kislina
- DV destilirana voda
- E električno polje
- ELF izjemno nizke frekvence (Extremely Low Frequency)
- H magnetno polje (str. 2) / odrasli hrošči
- H2 odrasli hrošči v drugem sklopu meritev
- Hm mrtvi odrasli hrošči
- HSP -heat-shock protein
- i imaginarna enota
- I električni tok
- ICNIRP Mednarodna komisija za varstvo pred neionizirnimi sevanji (International
- Commission on Non Ionizing Radiation Protection)
- $I_C tok$ skozi kondenzator
- I_R tok skozi upor
- IR infrardeči valovi
- K1 konfiguracija 1 oziroma signal vzorca pri konfiguraciji 1
- K2 konfiguracija 2 oziroma signal vzorca pri konfiguraciji
- LM ličinke na začetku larvalnega stadija
- LV ličinke tik pred stadijem bube
- LV2 ličinke tik pred stadijem bube v drugem sklopu meritev
- Max maksimalna vrednost
- MCI Mobile Charge Interaction

Med – signal medtem ko so poskusne živali omamljene oziroma je ogljikov dioksid prisoten v sistemu

- Min minimalna vrednost
- MW mikrovalovi
- N število osebkov v vzorcu
- p verjetnost napake statistične hipoteze (signifikanca)
- P premor med stopnjami protokola (zaporedno oštevilčeni P1, P2, P3)
- Po signal po spihanju ogljikovega dioksida
- Po* signal po tem, ko se odrasli hrošči zbudijo iz omamljenosti
- Pred signal pred dovajanjem ogljikovega dioksida
- r razdalja od vira elektromagnetnega polja
- R upor oziroma upornost
- RC resistor/capacitor (vezje iz upora in kondenzatorja)
- REF referenčna vrednost
- RF radijske frekvence
- s kompleksna frekvenca
- Sl. pojem je razložen v slovarju
- St. deviacija standardna deviacija
- SE standardna napaka
- U vhodna napetost
- U_C napetost na kondenzatorju
- ULF ultra nizke frekvence (Ultra Low Frequency)
- U_R napetost na uporu
- UV ultravijolični valovi
- VLF zelo nizke frekvence (Very Low Frequency)
- VR variacijski razmik
- λ valovna dolžina
- τ časovna konstanta (produkt upornosti in kapacitivnosti)
- ω krožna frekvenca
- $\nu-frekvenca$

SLOVARČEK

Absorbanca: negativni desetiški logaritem transmitance.

Absorpcija: fizikalni pojav, ko elektromagnetno valovanje ob prehodu skozi snov oslabi; v tem primeru pravimo, da snov prestreže ali absorbira valovanje.

Adsorpcija: pojav, ko površina veže delce, na primer trdna površina veže delce tekočine.

Bližnje polje: elektromagnetno polje, ki sega za manj kot eno valovno dolžino od vira valovanja; izpolnjen je pogoj r $\ll \lambda$.

Daljnje polje: elektromagnetno polje, ki sega za več kot eno valovno dolžino od vira valovanja; izpoljnjen je pogoj r >> λ .

Dielektričnost: snovna konstanta, ki zadeva vedenje dielektrika v zunanjem električnem polju. Določena je kot razmerje med gostoto električnega polja v snovi, ki izpolnjuje ves prostor, kjer je električno polje, in gostoto električnega polja v praznem prostoru, če vzamemo snov iz električnega polja.

Dielektrik: snov, v kateri lahko obstaja električno polje, ne da bi tekel električni tok. Snovna konstanta, ki določa vedenje dielektrika v električnem polju, je dielektričnost.

Efektivni tok: efektivni tok oziroma efektivna vrednost izmeničnega toka ustreza enosmernemu toku, ki opravi enako delo kot izmenični tok.

Emisija: fizikalni pojav, ko kako telo (imenovano vir valovanja) oddaja valovanje.

Enosmerni tok: električni tok, ki teče ves čas v isti smeri.

Izmenični tok: električni tok, ki se mu spreminja smer.

Kapacitivnost: tudi kapaciteta; količina, ki je določena kot razmerje med nabojem na eni izmed obeh elektrod kondenzatorja in napetostjo med elektrodama. Kapacitivnost kondenzatorja, v katerem izpolnjuje prostor med elektrodama dielektrik z določeno dielektrično konstanto, je večja od kapacitivnosti praznega kondenzatorja za faktor vrednosti omenjene dielektrične konstante.

Permeabilnost: razmerje med gostoto magnetnega polja v snovi, ki napolnjuje ves prostor, kjer je polje, in gostoto magnetnega polja v praznem prostoru, če v polju ne bi bilo snovi.

Piezoelektričnost: pojav, ko ob natezanju ali stiskanju snovi nastane električna napetost v snovi; velja tudi, da se snov raztegne ali skrči v zunanjem električnem polju.

Premikalni tok: tok v vakuumu ali dielektriku zaradi spreminjanja električnega polja. Izmenični električni tok v električnem krogu s kondenzatorjem se med ploščama kondenzatorja sklene kot premikalni tok.

Transmisija: fizikalni pojav, ko snov prepusti elektromagnetno valovanje.

Transmitanca: delež vpadnega elektromagnetnega valovanja (svetlobe), ki ga prepusti snov oziroma kvocient med prepuščeno in vpadno svetlobo.

Vektorsko polje: fizikalni prostor, kjer obstaja fizikalna količina, ki vsaki točki prostora priredi vektor.

1 UVOD

Organizmi so se razvijali, obdani z elektromagnetnimi valovanji, in tudi razvili mehanizme za izkoriščanje njihove energije. Primarna produkcija na podlagi sončne energije je tak primer, ki daje nujno podlago večini življenja na Zemlji. Tudi toplota je bistvena, saj so temperaturno odvisni biokemijski procesi ključni za življenjske procese (Frey, 1993).

Živa bitja so se razvila tudi v okolju naravnih elektromagnetnih polj pod frekvenco infrardečih sevanj, ki so razmeroma šibka, vendar stalno prisotna (npr. nevihte, magnetni viharji, druga nihanja geomagnetnega polja). V zadnjih sto letih se je elektromagnetno okolje velikega števila organizmov močno "obogatilo" na račun sevanj, ki so posledica človekovega delovanja. Ker so nekatera od teh polj s stališča evolucije novost, na katero se živa bitja še niso imela časa prilagoditi, so primerno orodje za raziskovanje delovanja živih sistemov. Izhajajoč iz modelov ravnovesne termodinamike so raziskovalci predvideli, da ta polja ne pridejo v poštev za interakcijo z biomolekularnimi sistemi in zato ne morejo vplivati na fiziološke funkcije (Adey, 1993; Frey, 1993). Vendar so raziskave pokazale, da so organizmi občutljivi tudi na zelo šibka elektromagnetna polja (Bischof, 2000). Raziskave zadnjih petdesetih let so razkrile, da organizmi ne interagirajo zgolj z zunanjimi polji, temveč imajo tudi izrazit notranji (endogeni) elektromagnetni značaj (Liboff, 2004).

V pričujočem diplomskem delu nas je zanimalo, kako lahko merimo endogena elektromagnetna polja, ali so ta polja povezana z ontogenetskimi in fiziološkimi procesi ter kaj lahko iz meritve endogenih elektromagnetnih polj sklepamo o stanju organizma. Med potencialno uporabne metode za spremljanje stanja organizma štejemo tudi meritve absorpcije, transmisije in emisije bližnjega električnega polja (Plankar, 2007; Jejčič, 2008). V diplomski nalogi želimo potrditi predhodno pridobljene rezultate, ki nakazujejo povezavo fizioloških in razvojnih stanj z absorpcijo bližnjega električnega polja. Testiranje smo opravili z napravo Experimental Life Energy Meter (Heliognosis, Kanada), ki bi lahko omogočala spremljanje omenjenih stanj v organizmu na neinvaziven način. Prednost neinvazivnih metod vidimo v ohranjanju celovitosti organizma.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BIOELEKTROMAGNETIKA IN ELEKTROMAGNETNO POLJE

Bioelektromagnetika raziskuje, kako zunanja elektromagnetna polja in sevanja naravnega in tehnogenega izvora vplivajo na žive organizme in kakšne so lastnosti živih bitij kot generatorjev elektromagnetnih polj in sevanj (Hyland, 2003).

Elektromagnetno polje tvorijo štiri vektorska polja^{SI.} E, D, B in H. E je električno polje, ki je definirano kot prostor, v katerem na električni naboj deluje električna sila, neodvisno od tega, ali naboj miruje. B je gostota magnetnega polja, ki jo definiramo v smislu prostora, v katerem na gibajoči se električni naboj deluje magnetna sila. Električna in magnetna komponenta sile sestavljata tako imenovano Lorentzovo silo. D je gostota električnega polja, katere izvor je gostota električnega naboja. H je magnetno polje, katerega izvor je gostota električnega toka. Omenjene komponente elektromagnetnega polja variirajo v prostoru in času na način, ki ga predpisujejo Maxwellove enačbe. Elektrostatika in magnetostatika obravnavata primere, ko časovnih sprememb ni oziroma so izjemno počasne; v takih primerih posamezna polja niso sklopljena med seboj. Sicer obstaja sklopitev, na primer med časovno spreminjajočo se gostoto magnetnega polja, ki vpliva na električno polje (Hyland, 2003).

Vedenje elektromagnetnega polja v mediju oziroma odgovor medija na aplicirano elektromagnetno polje je odvisno od dielektričnosti^{*Sl.*} in permeabilnosti^{*Sl.*} medija, ki sta odvisni od prostorskih in časovnih sprememb polja ter temperature in gostote medija (Hyland, 2003). Dielektričnost je določena kot razmerje med gostoto električnega polja v snovi in gostoto električnega polja v praznem prostoru. Permeabilnost je razmerje med gostoto magnetnega polja v snovi in gostoto magnetnega polja v snovi in gostoto magnetnega polja v praznem prostoru (Strnad, 1991). V primeru biološke snovi je mogoče, da na dielektričnost in permeabilnost vpliva, ali je organizem živ ali ne. Mogoči so tudi nelinearni odzivi, ko je dielektričnost odvisna neposredno od jakosti električnega polja (Hyland, 2003).

Glede na frekvenco osciliranja vira razdelimo elektromagnetno polje na razrede, kot kaže Preglednica 1.

Preglednica 1: Razredi elektromagnetnega sevanja z določeno frekvenco in valovno dolžino (povzeto po Bistolfi, 1991: 154 in Electromagnetic radiation, 2009).

Razred	Frekvenca	Valovna dolžina
ULF (Ultra Low Frequency)	0 Hz – 3 Hz	100 Mm in več
ELF (Extremely Low Frequency)	3 Hz – 3 kHz	100 Mm - 100 km
VLF (Very Low Frequency)	3 kHz – 30 kHz	100 km – 10 km
Radijske frekvence (RF)	30 kHz – 300 MHz	10 km – 1 m
Mikrovalovi (MW)	300 MHz – 300 GHz	1 m – 1 mm
Infrardeči valovi (IR)	300 GHz – 395 THz	1 mm – 760 nm
Vidna svetloba	395 THz – 769 THz	760 nm – 390 nm
Ultravijolično sevanje (UV)	769 THz – 30 PHz	390 nm – 10 nm
Rentgensko sevanje (X-žarki)	30 PHz – 30 EHz	10 nm – 10 pm
Gama sevanje (y-žarki)	30 EHz in več	10 pm in manj

2.1.1 Bližnje in daljnje polje

Vir elektromagnetne energije ustvarja polje, ki ga glede na razdaljo od vira razdelimo v dve regiji. Imenujemo ju bližnje^{*Sl.*} in daljnje^{*Sl.*} polje. Meja med bližnjim in daljnim poljem je v primeru dipolne antene določena (dogovorjena) na razdalji od vira, kot jo opisuje enačba (1). Pri tem velja: r je razdalja od vira in λ je valovna dolžina valovanja, ki ga oddaja vir (Capps, 2001).

$$r = \frac{\lambda}{2\pi} \tag{1}$$

Električno nabit delec, na primer prost elektron, tvori kroglasto polje, ki se v času ne spreminja (statično polje). To polje shranjuje elektromagnetno energijo delca. Če je prisoten še en nabit delec, zaradi polja prvega nabitega delca nanj deluje sila, ob čemer pride do prenosa energije. Nabit delec, ki se premika pri konstantni hitrosti, majhni v primerjavi s hitrostjo svetlobe, ustvarja enako polje kot mirujoč delec. Mirujoče naboje in naboje, ki se gibljejo s konstantno hitrostjo, obdaja tako imenovano reakcijsko polje. Polje je omejeno na neposredno bližino vira oziroma ne seva v prostor (Schmitt, 2000).

Ko se nabiti delec giblje z neenakomerno hitrostjo, se polje popači in oddaja energijo (polje seva). Ko se pospeši delec, se pospeši tudi polje, za kar pa je potrebna energija, ki se širi stran od delca kot val in poveča kinetično energijo polja. Vsa elektromagnetna sevanja nastanejo ob spremembi energije nabitih delcev, kar velja tudi za nabite delce v snovi (elektroni v atomu). Vsak naboj, ki kroži oziroma na kakršen koli način niha (oscilira), se sinusoidalno pospeši. V tem primeru polje seva s frekvenco oscilacije naboja. Oscilirajoči naboj oddaja občasne valove elektromagnetnega polja, ki se širijo navzven, poleg tega pa še vedno vzdržuje reakcijsko polje v svoji neposredni bližini. Naboje, ki se gibljejo oziroma oscilirajo z neenakomerno hitrostjo, obdaja reakcijsko in radiacijsko polje (Schmitt, 2000).

Po žici teče enosmerni električni tok. V tem primeru za elektrone velja, da se lahko vsak zase gibljejo naključno, v povprečju pa potujejo s konstantno hitrostjo, kot da bi šlo za en sam naboj, ki se giblje s konstantno hitrostjo. Sevanja oziroma radiacijskega polja ni, prisotno je le reakcijsko polje. Zaradi trkov na ravni atomov sta prisotna tudi termalna radiacija in električni šum (Schmitt, 2000).

V primeru, da po žici teče izmenični tok, ki oscilira z določeno frekvenco, izmenični tok ustvarja polje, ki ima enako obliko kot polje pri enosmernem toku, a njegova jakost niha med pozitivnimi in negativnimi vrednostmi z že omenjeno frekvenco. V primeru, da frekvenci oscilacije ustreza valovna dolžina, ki je mnogo večja od dolžine žice, tok v žici niha sinusoidalno – kot bi se naboj sinusoidalno pospeševal. Imamo efektivni oscilirajoči naboj, ki seva elektromagnetno polje z že omenjeno frekvenco Izmenični tok ustvarja reakcijsko in radiacijsko polje (Schmitt 2000, 2002).

Glede na oddaljenost od vira, ki ustvarja elektromagnetno polje, torej ločimo reakcijsko polje, ki ga imenujemo tudi bližnje polje, ter radiacijsko (sevalno) polje, imenovano tudi daljnje polje. Razlikujeta se po lastnostih. Bližnje polje je omejeno na bližino vira in shranjuje energijo, medtem ko daljnje polje seva energijo oziroma je prisotno tudi daleč od vira. V primeru daljnjega polja pravimo tudi, da energija uhaja kot elektromagnetno sevanje. Oblika bližnjega polja je močno odvisna od vira, lahko je statično ali v obliki valov, medtem kot je daljnje polje v obliki sferičnih ali planarnih valov. Če v bližnjem

polju ni prevodnika, polje shranjuje energijo, medtem ko objekt iz prevodnega materiala absorbira energijo bližnjega polja in pri tem vpliva na vir polja. Prenos energije iz bližnjega polja na objekt, ki se nahaja v bližnjem polju, se lahko zgodi kapacitivno, to je preko električne komponente polja, ali induktivno, preko njegove magnetne komponente. Daljnje polje po drugi strani oddaja energijo v prostor ne glede na prisotnost sprejemnika in absorpcija energije v daljnem polju nima vpliva na vir. Na razdalji od vira, ki je mnogo večja od valovne dolžine, nimamo več bližnjega polja in samo še daljne polje (Hyland, 2003; Schmitt 2000, 2002).

Pogoj za elektromagnetno sevanje je izpolnjen tudi v gostem sistemu, v katerem se zaradi termalnih vibracij molekul pripadajoči naboji gibljejo z neenakomerno hitrostjo. To je vir nekoherentne termalne emisije iz ogretih teles (Hyland, 2003).

Elektromagnetno valovanje je zaporedje valovnih paketov. Valovni paket je skupina valov, v katerem komponente polja sinusno oscilirajo pri izbrani frekvenci in v dani fazi. Posamezni valovni paketi niso v isti fazi, torej makroskopsko gledano elektromagnetni val nima ene same frekvence, čeprav so frekvence v posameznih paketih enake. Za fazno stabilno sevanje pravimo, da je koherentno, pri čemer natančneje določimo stopnjo koherence s koherenčnim časom in koherenčno dolžino. Koherenca sevanja ima torej časovni in prostorski pomen (Hyland, 2003).

2.2 UČINKI ELEKTROMAGNETNIH POLJ NA ŽIVA BITJA

Elektromagnetno valovanje je prostorsko in časovno spreminjanje električnega in magnetnega polja. Fizikalni parametri elektromagnetnega valovanja, zlasti frekvenca in energija sevanja določajo, kako in v kolikšni meri sevanje vpliva na obsevano snov ter kakšna je interakcija z živo materijo. Na atomski oziroma molekularni ravni elektromagnetno sevanje vpliva na translacijsko, vibracijsko in rotacijsko energijo delcev. Pri ustreznih valovnih dolžinah sevanje vzbudi elektrone do preskoka na višji energetski nivo in v primeru, da se elektron loči od atoma, govorimo o ionizirnem sevanju (Bistolfi, 1991). Ionizirna sevanja so ultravijolično, rentgensko in gama sevanje (Ionizing radiation, 2009). Sposobnost sevanja, da prodira v tkiva, je odvisna od frekvence (Bistolfi, 1991).

V pregledu bioloških učinkov elektromagnetnih sevanj na živali pri frekvenci pod 100 Hz sta Marino in Becker (1977) ugotovila učinke električnih polj na vedenje rib in sesalcev v primeru akutne izpostavljenosti in učinke na rast in razvoj tako pri vretenčarjih kot nevretenčarjih v primeru kronične izpostavljenosti. Raziskovana sevanja so bila prešibka, da bi povzročila segrevanje tkiv, torej mehanizem interakcije med apliciranimi polji in biološkimi sistemi ne vključuje termalnih učinkov. Obravnava polj z izjemno nizkimi frekvencami (ELF) kot ionizirnih polj, ki delujejo na biološke sisteme v smislu pasivnih električnih lastnosti, naj ne bi ustrezno razložila opaženih učinkov. Polje naj bi povzročilo spremembo v biološkem sistemu prej v smislu preklopa iz enega stanja v drugega (Marino in Becker, 1977). Tudi kar se tiče bioloških učinkov na celični in molekularni ravni, so raziskave pokazale, da vplivi elektromagnetnih polj niso posledica segrevanja tkivnih komponent (Adey, 1993).

Zgodnje raziskovanje vpliva elektromagnetnih polj na organizme je temeljilo na modelu toksičnosti, ki predpostavlja, da so elektromagnetna polja organizmom tuja in da je učinek odvisen od doze. Novejši pogled upošteva, da so živa bitja elektrokemijski sistemi, in predlaga nov model, ki živa bitja primerja z radijskim sprejemnikom in pri njihovi interakciji z elektromagnetnimi polji upošteva dodatne parametre sevanja, na primer frekvenco. V skladu s tem modelom elektromagnetno polje pokaže biološki učinek le v nekaterih parametrih, učinek pa je prisoten tudi, če je polje šibko (Frey, 1990, cit. po Frey, 1993). Prav to so ugotovili, ko so raziskovali embrionalne spremembe piščančjih embrijev pod vplivom šibkih elektromagnetnih polj s frekvenco v ELF razredu in opazili nepravilnosti v razvoju organov, največ pri specifični frekvenci magnetnega polja 100 Hz. Ne večje ne manjše vrednosti parametra niso imele enakega učinka. Pri različnih jakostih polja niso opazili podobnega učinka. Energija apliciranega polja ni bila neposredno povezana z motnjami v razvoju, saj so pri ekvivalentni količini energije opazili različne učinke. Posamezni organi so se izkazali za različno občutljive (Delgado in sod., 1982).

Vpliv, ki ga ima dano električno oziroma magnetno polje in elektromagnetno sevanje na organizem, je odvisen od tega, ali je organizem živ. To nakazuje na možnost, da le v živem organizmu obstajajo elektromagnetne entitete, s katerimi je sklopljeno zunanje polje.

Električno polje je sklopljeno z električnimi naboji in električnimi dipoli, magnetno polje je sklopljeno z električnimi tokovi in magnetnimi dipoli, elektromagnetno sevanje je sklopljeno z električnimi naboji in endogenimi električnimi oscilatorji (Hyland, 2003). Ne glede na to, ali je organizem živ ali ne, je način, kako električna in magnetna polja interagirajo z živo materijo, odvisen od tipa apliciranega polja, dane frekvence in lastnosti tkiv (ICNIRP, 1998; Hyland, 2003):

a) sklopitev z nizkofrekvenčnimi električnimi polji. Zunanje električno polje inducira električne tokove v živi materiji, v kolikor so prisotni prosti naboji, povzroči polarizacijo vezanih nabojev (inducira dipole) in povzroči reorientacijo permanentnih električnih dipolov. Kateri učinek prevlada, je odvisno od električne prevodnosti in dielektričnosti tkiv ter od frekvence polja;

b) sklopitev z nizkofrekvenčnimi magnetnimi polji. Magnetno polje inducira električno polje in krožne električne tokove. Jakost električnega polja in gostota tokov sta odvisna od električne prevodnosti tkiva ter od gostote magnetnega pretoka in premera zanke;

c) absorpcija energije iz elektromagnetnega polja. Izpostavljenost nizkofrekvenčnemu električnemu in magnetnemu polju ne povzroči znatne absorpcije energije oziroma dviga temperature. Izpostavitev elektromagnetnemu polju s frekvenco, večjo od 100 kHz, povzroči znatno absorpcijo energije in dvig temperature.

Vsi omenjeni procesi potekajo tako v živem kot v mrtvem organizmu (Hyland, 2003).

V primeru človeškega telesa je električna prevodnost veliko večja v primerjavi z zrakom, medtem ko je magnetna permeabilnost približno enaka. Zato je interakcija električnega polja s telesom večja kot v primeru magnetnega polja, kar zadržuje električno polje na površni telesa in je penetracija polja v telo šibka. Magnetno polje po drugi strani z lahko prodira v telo (Hyland, 2003).

Elektromagnetna polja naj bi v organizmih vzbujala stanja povečanega reda oziroma nereda, kar bi po mnenju nekaterih avtorjev lahko pomenilo, da lahko elektromagnetna polja prispevajo k nastanku bolezni ali pripomorejo k zdravljenju (Bistolfi, 1991). Nekatere od raziskav, ki so se ukvarjale z vplivom elektromagnetnih polj na živo materijo, imajo tudi pomen na področju medicine (Adey, 1993):

- sklopitveni mehanizmi med elektromagnetnimi polji in tkivi (odzivi na celični ravni),
- vpliv elektromagnetnega polja na embrionalni razvoj,
- vpliv na centralno živčevje in nevroendokrine funkcije,
- vpliv na imunske reakcije,
- regulacija celične rasti in pomen elektromagnetnih polj pri razvoju tumorja,
- modulacija genske ekspresije,
- elektromagnetne terapije, na primer za zdravljenje zlomov.

Vpliv elektromagnetnih polj obsega tudi regeneracijo tkiv. Z aplikacijo enosmernega toka lahko spodbudimo rast živca v določeno smer (proti katodi) in prenehanje rasti na nasprotnem koncu (ob anodi). Ob spremembi smeri toka se zamenja tudi smer rasti živca (McCaig, 1987). Elektromagnetne terapije se že razmeroma dolgo uporabljajo za zdravljenje zlomov. Zgodnje raziskave učinkov elektromagnetnega polja na skelet so se osredotočale na obliko in fazo elektromagnetnih valov. Izkazalo se je, da je za pospešeno zdravljenje kosti ob aplikaciji elektromagnetnih polj pomembna frekvenca, da so enako učinkoviti preprosti valovi sinusne oblike ali kompleksni valovi, in da mora biti signal v stanju valovne koherence vsaj minimalni čas, da doseže želeni učinek (Litovitz in sod., 1991, cit. po Goodman in Blank, 2002). Pomembna predpostavka je, da elektromagnetno polje organizma generira lokalne električne tokove, ki sodelujejo pri procesih rasti in obnavljanja, lahko pa jih vzbudimo tudi z aplikacijo zunanjega elektromagnetnega polja (Liboff, 2004).

Učinki elektromagnetnih polj obsegajo tudi spremembo hitrosti encimsko kataliziranih reakcij in modulacijo ekspresije genov. Goodmanova in Blank (2002) povzemata modele, ki si prizadevajo razlagati omenjene učinke elektromagnetnih polj s stališča interakcije posameznih makromolekul. Pri t.i. modelu MCI – Mobile Charge Interaction (Blank, 1995a, cit. po Goodman in Blank, 2000) je pomembna magnetna komponenta elektromagnetnega polja. Premik vezanega naboja je povezan z biološko funkcijo beljakovin (Bezanilla, 2008) in prav pri tem se izkaže vpliv magnetnega polja, ki spreminja smer gibajočih se nabitih delcev. Preko opisanega mehanizma naj bi aplicirano

elektromagnetno polje vplivalo na encimsko katalizirane reakcije. Elektromagnetno polje lahko inducira ekspresijo specifičnih genov, vendar mehanizem še vedno ni znan (Goodman in Blank, 1998, cit. po Goodman in Blank, 2002; Lin in sod., 1999, cit. po Goodman in Blank, 2002). Raziskave se osredotočajo bodisi na poti signalne transdukcije kot tarčno mesto za elektromagnetno polje bodisi na elektrone v DNK. Goodmanova in Blank (2002) navajata tudi, da povišane temperature in elektromagnetna polja učinkujejo na ekspresijo gena za HSP70 beljakovino po različnih poteh in celo delujejo na različne dele promotorja preko specifičnih aktivatorjev transkripcije in ločenih signalnih poti. Znano je, da DNK prevaja elektrone (Dandliker in sod., 1997, cit. po Goodman in Blank, 2002; Wan in sod., 1999, cit. po Goodman in Blank, 2002), ki jih elektromagnetna polja pospešijo. Ob tem nastanejo odbojne sile med elektroni znotraj dvojne vijačnice (Blank in Goodman, 1997, cit. po Goodman in Blank, 2002; Blank in Goodman, 1999, cit. po Goodman in Blank, 2002; Blank in Goodman, 2001, cit. po Goodman in Blank, 2002), ki bi lahko v delih DNK z manjšo gostoto vodikovih vezi prispevale k ločitvi verig in iniciaciji transkripcije. Specifične sekvence, ki so občutljive na elektromagnetna polja, so tudi bogate s citozinom in timinom ter bolj verjetno podvržena ločitvi verig ob aplikaciji elektromagnetnega polja (Goodman in Blank, 1998, cit. po Goodman in Blank, 2002).

Eksperimente lahko razdelimo v dve skupini: prva kaže, da so živa bitja občutljiva in se odzivajo na zunanja elektromagnetna polja (tudi šibka), druga pa kaže na specifične električne lastnosti biostruktur, ki so nemalokrat povezane s procesi rasti, razvoja in regeneracije. Po mnenju nekaterih avtorjev se tako odpira pogled, ki omogoča razlaganje učinkov elektromagnetnih polj na živa bitja na osnovi inherentne elektromagnetne organizacije živih bitij. (Liboff, 2004).

2.3 ELEKTRIČNE LASTNOSTI MAKROMOLEKUL IN CELIČNE VODE

Prisotnost in struktura beljakovin določata delovanje celic. Zaradi proste vrtljivosti okrog vezi (izjema so peptidne vezi) so beljakovine izredno fleksibilne, to pa omogoča številne različne konformacije v dani primarni beljakovinski strukturi (Boyer, 2005). Sprememba beljakovinske konformacije je nelinearen proces, v katerem je mogoče le omejeno število specifičnih konformacij (Hameroff, 1988, cit. po Bistolfi, 1991). Gibanje atomov ali

skupin atomov znotraj beljakovin pokriva širok razpon vrednosti tako v časovnem smislu (10⁻¹⁵ s do nekaj sekund) kot v prostorskem smislu (manj kot nm do več nm) (Karplus in Petsko, 1990, cit. po Bistolfi, 1991). Da lahko celica opravlja funkcije v realnem času, je potrebna dinamična sprememba konformacije beljakovin (Hameroff in Tuszynski, 2004). Glavne sile, ki stabilizirajo terciarno strukturo beljakovin, so hidrofobne interakcije, ki se vzpostavijo med nepolarnimi stranskimi verigami aminokislin v osrednjem delu beljakovin, v jedru (Boyer, 2005). To so šibke nekovalentne vezi, imenovane tudi van der Waalsove sile, ki se vzpostavijo med polarnimi molekulami s stalnim dipolnim momentom, in nepolarnimi molekulami, v katerih pride do kratkotrajne asimetrične porazdelitve elektronov oziroma do indukcije dipola. Interakcije med induciranimi dipoli so t.i. Londonove sile, ki delujejo med nepolarnimi oziroma hidrofobnimi molekulami (Hameroff in Tuszynski, 2004). Hidrofobno jedro beljakovine, ki ga gradijo nepolarne stranske skupine aminokislin, je področje z nizko dielektrično konstanto in zato primerno elektromagnetnega valovanja. Periodične spremembe za prenos beljakovinske konformacije povzročijo prav tako periodična nihanja električnega polja in so vir elektromagnetnega sevanja. V beljakovinah je omogočeno prevajanje elektronskih in protonskih tokov ter elektromagnetnih polj s frekvenco od 3 Hz do 300 GHz. Hkrati so v beljakovinah prisotne tudi mehanske vibracije (Bistolfi, 1991).

Beljakovinske α -vijačnice in β -stukture imajo močan dipolni moment zaradi poravnave dipolnih momentov posameznih peptidnih enot. Ustvarjajo električno polje, ki je v primeru α -vijačnice tem močnejše, čim daljša je vijačnica, kar velja zlasti v področjih z nizko dielektrično konstanto, kot so hidrofobne regije. Za α -vijačnice verjetno veljajo tudi piezoelektrične lastnosti, ki omogočajo pretvorbo kemijske oziroma električne energije v mehansko in obratno (Bistolfi, 1991). Piezoelektričnost^{SI} je lastnost nekaterih materialov, da ob mehanskem stresu pride do ločitve naboja oziroma električne polarizacije in po drugi strani ob aplikaciji zunanjega električnega polja pride do mehanske deformacije v snovi (Gautschi, 2002). Absorpcija fotona je lahko stimulus za spremembo konformacije; ta nato povzroči mehanske vibracije, ki potujejo vzdolž beljakovinske strukture. Podobni procesi naj bi potekali v mikrotubulih, ki so tako kot α -vijačnice in β -stukture sestavljeni iz polarnih enot: α -tubulin nosi negativen naboj in β -tubulin pozitivnega. Tubulinski dimer je torej funkcionalno dipol. Mikrotubul je urejena struktura organiziranih dipolov in kaže piezoelektrično aktivnost v smislu prenosa in pretvorbe elektromagnetnih in mehanskih energij. Kot druge beljakovine imajo mikrotubuli nizko dielektrično konstanto in so primerno okolje za prenos elektromagnetne energije v obliki polarizacijskih valov ter mehanskih vibracij (Bistolfi, 1991).

Pri tem je pomembno okolje, ki obdaja beljakovino, in razen pri membranskih beljakovinah je to okolje voda, ki deluje kot del sistema za prenos elektromagnetnih signalov. Vodne molekule so permanentni dipoli, ki se povezujejo z vodikovimi vezmi. Le-te omogočajo različne načine povezovanja vodnih molekul z različno stopnjo urejenosti. Voda pri 20°C ima visoko dielektrično konstanto (Bistolfi, 1991). Tako imenovana površinsko strukturirana voda nastane ob stiku proste vode s trdnimi površinami in kaže nekatere fizikalne posebnosti, na primer nizko dielektrično konstanto in od temperature odvisne nelinearne odzive (Peschel in Belouschek, 1978, cit. po Bistolfi, 1991). Do podobnega pojava pride tudi v celični citoplazmi. Površine, ob katerih lahko pride do strukturiranja vode, so številne in ob njih pride do urejenega stanja vode z nižjo entropijo in nižjo dielektrično konstanto v primerjavi s prosto vodo, ki je bolj oddaljena od celičnih ultrastruktur (Bistolfi, 1991). Citoplazma se nahaja v gel stanju, ki aktivno zadržuje molekule. To potrjujejo eksperimenti, ki kažejo, da celica zadrži vodo tudi ob poškodbah ali izgubi membrane. Za nastanek gelov so ključni dolgoverižni polimeri, ki se navzkrižno povezujejo in tvorijo matriks. Mehanizem zadrževanja vode v gelu je adsorpcija^{Sl} vodnih dipolov na nabite površine. Molekule vode ob makromolekulah se orientirajo v plasti, ki je dovolj stabilna, da se po njej orientirajo tudi bolj oddaljene vodne molekule. Tako nastanejo številne plasti vode, ki obdajajo celične strukture. Matriks polimerov skupaj z adsorbirano vodo tvori gel, ki zadržuje vodne molekule zaradi privlaka med vodo in nabitimi površinami ter zaradi privlaka med molekulami vode (Pollack, 2001).

Znane elektromagnetne oscilacije so na primer električna aktivnost srca in možganov, ki ju merimo z elektrokardiogramom in elektroencefalogramom. Makroskopska organizirana električna aktivnost obstaja tudi na celični in subcelični ravni in sicer kot koherentne oscilacije električnih dipolov. Poleg nekoheretne termalne radiacije biološka telesa sevajo tudi koherentno, primer za to sta biofotonska emisija in mikrovalovna sevanja. (Hyland, 2003).

2.4 VPLIV ELEKTROMAGNETNIH POLJ NA RAZVOJ PRI ŽUŽELKAH

Tako vinska mušica (*Drosophila*) kot mokar (*Tenebrio molitor*) sta predmet raziskav vpliva eksogenih elektromagnetnih polj na razvojne procese. Primer poskusa na larvah vinske mušice je pokazal, da šibko statično magnetno polje povzroči kutikularne deformacije (Ho in sod., 1992). Izpostavljenost magnetnemu polju vpliva tudi na preobrazbo bub v odrasle živali pri mokarju, in sicer pospeši izleganje hroščev iz bub (Prolić in Nenadović, 1995). Vpliv zunanjih magnetnih polj na različne lastnosti pri žuželkah so dokazali tudi pri majskih hroščih, termitih, sršenih in čebelah (povzeto po Prolić in Nenadović, 1995).

Pri raziskavah bioloških učinkov elektromagnetnih polj je pogosta slaba ponovljivost rezultatov, ki kaže na to, da so učinki elektromagnetnih polj močno odvisni od fiziološkega stanja in razvojnega stadija proučevanega organizma (Ho in sod., 1992). Po drugi strani je elektromagnetne pojave v organizmih zlasti primerno proučevati v povezavi z velikimi spremembami v strukturi in funkciji organizma, kakršne nastopijo med preobrazbo pri holometabolnih žuželkah. Že omenjena vinska mušica in mokar sta holometabolni žuželki, poleg tega pa sta kot poskusni objekt primerna zaradi kratkega generacijskega časa, nezahtevnosti, kar se tiče gojenja, (Klots AB in Klots EB, 1970) in preproste manipulacije v laboratorijskih razmerah; slednja je posebej poudarjena pri mokarjih, ki ne letajo.

2.4.1 Značilnosti razvoja pri žuželkah

Stopnje v življenjskem ciklu žuželk so tri: jajce, ličinka in odrasel osebek. Stadij med dvema levitvama se imenuje instar. Ličinka se levi večkrat, medtem ko se odrasli osebki ponavadi ne levijo. Odrasel osebek, ta je spolno dozorel in ima krila, imenujemo tudi imago (Ruppert in sod., 2004).

Preobrazba iz ličinke v odraslo žival je lahko nepopolna ali popolna. Nepopolna preobrazba (hemimetabolija) je postopni razvoj ličink, ki so v vsaki stopnji bolj podobne odraslim živalim, dokler se končno ne prelevijo v odrasle, običajno krilate osebke. Popolna preobrazba (holometabolija) pomeni, da so ličinke zelo različne od odraslih žuželk, se

večkrat levijo in nato preobrazijo v bubo, ki je negibna in iz bube se izleže odrasla žival (Gogala, 2003).

Holometabolni razvoj je značilen za hrošče, kožekrilce, mladoletnice, metulje, dvokrilce in druge (Ruppert in sod., 2004). Juvenilni osebek, ki se izleže iz jajca, imenujemo larva. Larve niso podobne odraslim, temveč so črvaste oblike in nimajo zasnov kril. Levijo se večkraz zaporedoma in ob vsaki levitvi pridobijo na velikosti, vendar se po obliki ne spreminjajo. Število levitev je odvisno od taksona in trenutnih okoljskih dejavnikov. Z zadnjo levitvijo se larva zabubi. Buba je mirujoč stadij, znotraj katerega poteče metamorfoza (Ruppert in sod., 2004; Gilbert, 2006).

Transformacija iz larve v odraslo žival poteka znotraj bubine kutikule. Večina telesa larve se sistematično razgradi. Celice propadejo v procesu programirane celične smrti, medtem ko se novi organi odraslega stadija razvijejo iz nediferenciranih skupkov imaginalnih celic. Že znotraj larve ločimo dve populaciji celic: larvalne celice, ki ohranjajo pri življenju juvenilni osebek, in imaginalne celice, ki so razporejene znotraj larve v skupkih in so pod vplivom ustreznega signala sposobne diferenciacije (Gilbert, 2006).

Poznamo več tipov imaginalnih celic. Imaginalni diski tvorijo kutikulo in kutikularne strukture, tudi krila, razvijejo pa se še v noge, antene, oči, glavo, oprsje in spolne organe. Histoblastna gnezda so skupki celic, ki tvorijo zadek. Znotraj vsakega larvalnega organa se nahaja še skupina imaginalnih celic, ki oblikuje organe odrasle živali, ko se larvalne celice razgradijo. Imaginalne diske vidimo pri pravkar izvaljenih larvah kot lokalne odebelitve epidermisa. Večina larvalnih celic ima omejeno sposobnost proliferacije, celice imaginalnih diskov pa se delijo hitro v specifičnih časovnih intervalih. Ob tem tvorijo tubularni epitelij, ki se zavije v kompaktno spiralo. V procesu metamorfoze se celice nadalje delijo, povečajo in diferencirajo (Gilbert, 2006). Celice imaginalnih diskov pri vinski mušici so determinirane, še preden se žuželka zabubi. Fragmenti, ki jih presadimo v larvo, se tekom preobrazbe diferencirajo glede na originalni položaj v disku (Meinhardt, 1982).

2.5 MOKAR (Tenebrio molitor)

Hrošči (Coleoptera) so ločenih spolov. Njihov razvoj poteka preko stadija bube. Ličinke niso podobne odraslim živalim in se tudi hranijo drugače. Buba je stadj mirovanja. Iz bub se razvijejo odrasli hrošči (Drovenik, 2003).

Črnivci (Tenebrionidae) imajo močno hitinizirano telo. Večina živi v toplih podnebnih razmerah, stepah in pustinjah. Znanih je okoli 15 000 vrst, v Sloveniji jih je le nekaj nad 30. Odrasle živali se hranijo z gnilim lesom, lesnimi gobami, hifami plesni, gnilim rastlinjem in listi. Ličinke se prehranjujejo zelo različno. Nekatere vrste najdemo v človeških bivališčih in skladiščih hrane in so lahko celo škodljivci, kot na primer mokar (Drovenik, 2003).

Mokar (*Tenebrio molitor*) je dolg 12 do 18 mm in temnorjave barve. Med spoloma ni na zunaj opaznih razlik. Zadržujejo se na temnih, vlažnih krajih. Živijo dva do tri mesece. Jajce je ovalno, belkasto, podolgovato in veliko 1,5 mm. Samica posamič ali v skupkih odloži 250 do 1000 jajc. Jajca se izvalijo po 4 do 18 dneh. Ko ličinka prileze iz jajca, je bela in postane obarvana pri velikosti 2 mm. Je podolgovata, cevasta in svetlorjava. Zraste do 2,5 cm, ko se zabubi. Do stadija bube se levi desetkrat do dvajsetkrat v povprečnem času 6 do 9 mesecev. Nekaj dni, preden se zabubi, se premakne na površino gojišča. Buba je velika 1,5 cm in najprej bela, pozneje rumenorjava. Nima zaščitnega ovoja in se le malo giblje. Po 6 do 18 dneh se prelevi v odraslega hrošča. Časovni potek življenjskega cikla pri mokarjih je odvisen od okoljskih razmer. V ugodnih pogojih od jajca do odraslega stadija poteče 120 dni, v manj ugodnih pogojih pa celo dve leti. V laboratorijskih razmerah pri 25°C celotni življenjski cikel traja 6 mesecev (Drovenik, 2003; Singh, 1998).

2.6 OGLJIKOV DIOKSID KOT STRESNI DEJAVNIK

Ogljikov dioksid je pri sobnih pogojih plin, brezbarven in v nizkih koncentracijah brez vonja. Uporablja se za kratkotrajno anestezijo in evtanazijo majhnih laboratorijskih živali. Glede na to, da je ogljikov dioksid težji od zraka, lahko žival omrtvičimo v majhni odprti posodi oziroma komori. Značilno je, da učinek nastopi hitro in po prenehanju izpostavljenosti kmalu popusti (povzeto po Kohler in sod., 1999). Splošna praksa je, da se žuželke omrtviči z izpostavljanjem visokim koncentracijam ogljikovega dioksida. Tako pri odraslih osebkih kot ličinkah nastopi zelo hiter odziv v obliki paraliziranosti in neodzivnosti na senzorične dražljaje (povzeto po Badre in sod., 2005). Ogljikov dioksid vpliva na fiziološke procese tako pri žuželkah kot pri sesalcih preko hitrega znižanja pH, ki nastopi ob kemijski reakciji (enačba (2)), ki jo katalizira karboanhidraza (Stone in Koopowitz, 1974, cit. po Badre in sod., 2005; Baker in Honerjager, 1978, cit. po Badre in sod., 2005).

$$CO_2 + H_2O \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$$
 ...(2)

Badre in sod. (2005) so raziskovali fiziološke in vedenjske vplive ogljikovega dioksida na ličinke vinske mušice (*Drosophila melanogaster*). Pokazali so, da se ličinke hitro (v manj kot eni minuti) odzivajo na visoke koncentracije ogljikovega dioksida. Ličinke se zvijajo in nato postanejo mlahave pri izpostavitvi ogljikovemu dioksidu, ne pa tudi dušiku, torej ne gre za odziv na odstranitev kisika. Proučili so tudi vpliv ogljikovega dioksida oziroma nizkega pH na srčni utrip in periferno živčevje. Ogljikov dioksid povzroči zastoj srca, međtem ko fiziološka raztopina (pH=5) poveča hitrost srčnega utripa. Izbrana vrednost pH ustreza fiziološki raztopini, nasičeni z ogljikovim dioksidom. Međtem ko ogljikov dioksid blokira sinaptični prenos v živnomišičnih stikih, kisla fiziološka raztopina nima tega učinka. Po drugi strani ogljikov dioksid ne blokira sinaps v centralnem živčevju. Badre in sod. (2005) so prišli do sklepa, da opisani hitri vedenjski in fiziološki odzivi niso posledica vpliva ogljikovega dioksida na centralno živčevje, hkrati pa učinkov ogljikovega dioksida ni mogoče razložiti le z delovanjem nizkega pH. Prav tako ni verjetno, da bi na sinaptično aktivnost vplivala precipitacija kalcijevega karbonata oziroma padec koncentracija kalcija (Badre in sod., 2005).

3 NAMEN IN HIPOTEZE

Namen diplomskega dela je detekcija endogenih elektromagnetnih polj v organizmu preko meritev absorpcije zunanjega (eksogenega) bližnjega polja v organizmu. Ob tem smo predpostavili, da je absorpcija bližnjega polja v organizmu odvisna tako od klasičnih fizikalnih parametrov, ki jih upoštevamo pri obravnavanih neživih objektih, kot tudi od stanja organizma, ki ga na fizikalni ravni celostno predstavlja endogeno elektromagnetno polje. Zanimala nas je starost oziroma razvojni stadij ter vitalnost organizma, ki jo zmanjša določen stresni dejavnik. Od klasičnih parametrov smo ugotavljali odvisnost absorpcije od mase, medtem ko smo odvisnost absorpcije bližnjega polja od stanja organizma ugotavljali s primerjavo osebkov različnih starosti ter s primerjavo kontrolne skupine in skupine, ki je bila izpostavljena stresu. S tem smo želeli pokazati, da so znani fiziološki procesi pri hroščih mokarjih prepleteni oziroma sklopljeni s šibkim eksogenim bližnjim električnim poljem.

Za preverjanje hipotez smo uporabili detekcijsko napravo Experimental Life Energy Meter, ki posredno meri absorpcijo bližnjega električnega polja.

Hipoteza 1:

Absorpcija bližnjega električnega polja kaže odvisnost od mase, ki je klasični fizikalni parameter.

Hipoteza 2:

Stadij ontogeneze vpliva na absorpcijo bližnjega električnega polja, kar smo dokazovali s primerjavo ličink na začetku larvalnega stadija, ličink, za katere smo predpostavili, da se bodo kmalu zabubile, in hroščev v prvem mesecu starosti. Procesi, značilni za posamezni razvojni stadij, se odražajo tudi v endogenem polju organizma, ki posledično vpliva na absorpcijo bližnjega polja drugače kot pri organizmu v drugem stadiju razvoja.

Hipoteza 3:

Omamljanje z ogljikovim dioksidom vpliva na absorpcijo bližnjega električnega polja. Molekula ogljikovega dioksida preko molekularnih interakcij vpliva na celične procese in posledično na organizem, pri tem pa se spremeni notranje električno polje, ki interagira z zunanjim bližnjim poljem, kar ima za posledico spremenjeno absorpcijo bližnjega polja, v katerem se nahaja organizem.

4 MATERIAL IN METODE

Posredno smo merili absorpcijo bližnjega električnega polja v odvisnosti od ontogenetskega stadija in izpostavljenosti stresnemu dejavniku ter ugotavljali odvisnost od mase. Kot izbrani stresni dejavnik smo uporabili omamljanje z ogljikovim dioksidom. Meritve smo opravili z napravo Experimental Life Energy Meter (Heliognosis, Kanada). Poskuse smo izvedli na Inštitutu Bion v času od aprila do oktobra 2009. Izbrani poskusni objekt so bili hrošči mokarji (*Tenebrio molitor*).

4.1 ŽIVALI V POSKUSU

Testne živali so mokarji (*Tenebrio molitor*). Med poskusom smo jih gojili v terariju (Slika 1) na gojišču iz mešanice pšeničnega in koruznega zdroba v razmerju 1:1, ki jim je predstavljala hrano. Kot vir vode smo jih dajali koščke banininih olupkov, ki smo jih odstranili iz terarija 24 ur pred meritvami. Na ta način smo želeli preprečiti, da bi razlike v vsebnosti vode vplivale na rezultate. Terarij se je nahajal v prostoru meritev pri sobni temperaturi. Živali različnih razvojnih stadijev smo gojili v različnih posodah. Zaradi dolgega časovnega razpona med meritvami in lastnega velikega razmnoževalnega potenciala so bile živali po določenem času ponovno v kontinuiranem gojišču, vendar smo z občasno menjavo substrata in prerazporejanjem osebkov ponovno vzpostavili ločenost ontogenetskih stadijev. Z opazovanjem smo ugotovili, da v danih razmerah stadij bube traja 9 do 11 dni.



Slika 1: Gojišče z mokarji (Tenebrio molitor).

4.2 EXPERIMENTAL LIFE ENERGY METER (MERILNI SISTEM HELIOGNOSIS)

4.2.1 Merilni sistem

Eksperimentalni sistem so sestavljali naprava Experimental Life Energy Meter, model LM2 (Heliognosis, Kanada), voltmeter (Fluke 289), vhodna stopnja s frekvenčnim filtrom in predojačevalnikom, ojačevalnik, analogno digitalni (A/D) pretvornik, računalnik in povezovalni kabli. Naprava Experimental Life Energy Meter vključuje ploščato elektrodo dimenzij 40 x 40 mm in merilec. Splošno shemo eksperimentalnega sistema prikazuje Slika 2. Ker smo ta merilni sistem uporabljali tudi za ugotavljanje vpliva ogljikovega dioksida na absorpcijo bližnjega polja pri mokarjih (razdelek 4.2.2), Slika 2 vključuje tudi stimulacijski del.


Slika 2: Shema merilnega sistema Heliognosis.

Osnovni princip delovanja naprave Experimental Life Energy Meter predstavljata zaporedno vezana upor in kondenzator. Pri kondenzatorju gre za odprti kondenzator, ki ga sestavljata ploščata elektroda (Slika 2), na katero postavimo vzorec, medtem ko je druga elektroda v merilcu (Slika 2). Shemo takega vezja prikazuje Slika 3 (zaradi preglednosti uporabljamo simbol za običajni kondenzator).



Slika 3: Vezje, sestavljeno iz upora in kondenzatorja. Razlaga oznak: U – vhodna napetost, R – upor, U_R – napetost na uporu, I_R – tok skozi upor, C – kondenzator, U_C – napetost na kondenzatorju, I_C – tok skozi kondenzator (premikalni tok^{SL}).

Za vezje, kot ga prikazuje Slika 3, velja enačba (3).

$$U_{R}(s) = \frac{R}{R + 1/Cs} U(s) \qquad ...(3)$$

pri čemer je

$$s = i\omega = 2i\pi\nu \qquad \dots (4)$$

U(s) je vhodna izmenična napetost s frekvenco (v). $U_R(s)$ je napetost na uporu, ki je odvisna od frekvence, pa tudi od upornosti (R) in kapacitivnosti^{SL} (C).

Prav tako velja enačba (5).

$$U_{c}(s) = \frac{1/Cs}{R + 1/Cs} U(s) \qquad ...(5)$$

 $U_C(s)$ je napetost na kondenzatorju, ki je, kot kaže enačba (5), odvisna od frekvence, pa tudi od upornosti (*R*) in kapacitivnosti (*C*).

Glede na to, da sta v danem vezju (Slika 3) upor in kondenzator vezana zaporedno, velja tudi enačba (6), ki je za naš primer najbolj zanimiva.

$$I_{R} = I_{C} = I = \frac{U(s)}{R + 1/Cs}$$
...(6)

Napravo Experimental Life Energy Meter poleg opisanega vezja sestavljajo frekvenčni generator s fiksno frekvenco 32 kHz, vezje za zaznavo toka ter ojačevalnik in usmernik (Slika 4, 5). Frekvenčni generator je priključen na zaporedno vezana upor in kondenzator. Ker je generirana frekvenca fiksna, glede na enačbi (3) in (6) sledi, da je padec napetosti na uporu (U_R) oziroma tok (I) določen s kapacitivnostjo (C) odprtega kondenzatorja, to pa določajo električne lastnosti (prevodnostjo, dielektričnostjo) snovi v okolici elektrod.

Največji vpliv ima prisotnost in konfiguracija predmetov v bližini ploščate elektrode. V praksi je ta vpliv omejen na približno 1,5 m, kar smo med meritvijo upoštevali.

Vezje torej deluje na podlagi frekvenčnega generatorja s fiksno frekvenco, ki je priključen na zaporedno vezana upor in kondenzator. Kondenzator je, kot že omenjeno, odprti kondenzator, katerega eno ploščo uporabljamo kot nosilec za vzorec (Slika 2, 5). Kapacitivnost kondenzatorja je odvisna od snovi (njenih prevodnih in dielektričnih lastnosti) v njegovi okolici, pri čemer ima največji vpliv snov tik ob plošči.

Spreminjanje toka (*I*) v odvisnosti od omenjene spremembe kapacitivnosti se meri preko efektivnega toka^{*Sl.*} skozi upor R. Kako je to izvedeno, nam ni natančno znano, ker gre za komercialni inštrument.



Slika 4: Shema naprave Experimental Life Energy Meter (merilni sistem Heliognosis). Oznake: R – upor, U_R – napetost na uporu, C – kondenzator, U_C – napetost na kondenzatorju, I –električni tok (v danem primeru izmenični tok).

V poenostavljeni shemi lahko bolje prikažemo princip meritve (Slika 5).



Slika 5: Poenostavljena shema naprave Experimental Life Energy Meter (merilni sistem Heliognosis). Razlaga oznak: I – električni tok, R – upor.

Signal v nadaljevanju ustrezno ojačamo (v našem primeru 10-kratno, Slika 7) in spremenimo v enosmeren signal za lažje odčitavanje, kot prikazujeta Sliki 4 in 5. Enosmerni (DC) izhod daje napetost med 0 in 12 V, kar smo preverili s kontrolnim voltmetrom (Slika 2). Kot kaže Slika 2, je izhod preko vhodne stopnje, ojačevalnika in analogno-digitalnega pretvornika priključen na računalnik.

Vhodna stopnja vključuje frekvenčni filter in predojačevalnik. Frekvečni filter je RC vezje (sestavljeno iz upora in kondenzatorja), ki deluje kot nizkopasovni (»low pass«) filter s časovno konstanto $\tau = 0,05$ s. Predojačevalnik je obračajoči (invertirajoči) ojačevalnik z operacijskim ojačevalnikom TL074CN. V nadaljevanju se raven signal po potrebi ojača in pretvori v digitalno obliko. Računalniško kontrolirano vezje omogoča elektronsko meritev signala v obliki električne napetosti.

Voltmeter (Slika 2) uporabljamo kot kontrolni inštrument, medtem ko podatke zajemamo z računalnikom. Signal spremljamo v realnem času s programsko nastavljeno časovno resolucijo posameznih detekcij 300 ms. Ker je signal na izhodu merilca (Slika 2) enosmeren, je neodvisen od frekvenčnih lastnosti vhodne stopnje ter od frekvence vzorčenja (časovne resolucije meritev).

Med elektrodama odprtega kondenzatorja je bližnje električno polje, ki sega v prostor okrog ploščate elektrode in niha s frekvenco 32 kHz. Z omenjenim poljem interagira snov v okolici ploščate elektrode oziroma pride do absorpcije bližnjega polja v snovi. Glede na električne lastnosti (prevodnost, dielektričnost) snovi v bližnjem polju se spremeni kapacitivnosti kondezatorja, ki je vir tega polja, posledično pa tudi tok (*I*) oziroma napetost v vezju, v katerega je vključen kondenzator (Slika 4, 5). Padec napetosti na uporu R (Slika 4, 5), do katerega pride zaradi spremembe kapacitivnosti kondenzatorja, je odvisen od absorpcije bližnjega polja v predmetih v bližini plošče. Organizem, ki ima prav tako svoje prevodne in dielektrične lastnosti, prav tako absorbira bližnje polje, ki ga obdaja. Absorpcija je prikazana kot odklon kazalca na monitorju merilca (Slika 6) in pada z oddaljenostjo objekta od plošče (Heliognosis ..., 2009). Primerjava je mogoča le med objekti, ki so enako oddaljeni od plošče.

Napravo Experimental Life Energy Meter smo večkrat testirali tako, da smo po več ur, preko noči in preko vikenda izvajali meritve, brez da bi na elektrodo postavili vzorec, in ugotavljali, da so motnje, ki bi vplivale na meritve, zelo malo verjetne. Med omenjenimi testnimi meritvami so se občasno pojavile kratkotrajne izrazite motnje, ki bi jih, če bi se pojavile med meritvijo, prepoznali, meritev pa izločili. Kratkotrajne motnje z veliko amplitudo so neznanega izvora, verjetno so posledica vklopa večjih porabnikov električne energije v stavbi.



Slika 6: Naprava Experimental Life Energy Meter – merilec in elektroda, na katero postavimo vzorec. Ploščata elektroda iz galvaniziranega železa je vgrajena v leseno ploščo. Na monitorju merilca odklon kazalca v desno (skrajno leva lega ustreza ničli) pokaže spremembo absorpcije v bližnjem polju.



Slika 7: Nastavitve na merilcu Experimental Life Energy Meter. Na levem gumbu nastavimo ojačanje, v našem primeru 10-kratno. Na srednjem in desnem gumbu nastavimo začetno vrednost, tj. vrednost absorpcije praznega prostora, ki je v našem primeru blizu ničle.



Slika 8: Posamezne komponente merilnega sistema Heliognosis. Merilec in elektroda, (na sredini), jeklenka in cev, vpeta v stojalo, za dovajanje ogljikovega dioksida vzorcu (zgoraj), voltmeter (desno) in vhodna stopnja/ojačevalnik/pretvornik (levo).

4.2.2 Protokol meritev

Vzorce smo merili v stekleni čaši (50 mL), ki smo jo postavili na elektrodo. Do konca meritve čaše nismo več premikali, tako smo zagotovili dobro referenčno vrednost. Meritev je potekala, kot sledi:

- nastavili smo ojačanje na merilcu: 10-kratno (Slika 7),

- izmerili smo vrednost praznega prostora (30 s),

- čašo smo postavili na elektrodo in pokrili s kartonastim pokrovom dimenzij 75 x 65 mm tako, da je daljša stranica pokrova vzporedna z robom delovnega pulta (Slika 9). Izmerili smo vrednost pokrite čase (30 s). To je bila izbrana referenčna vrednost (oznaka REF, Slika 11, 12),

 v čašo smo z naključno izbranega kota stresli vzorec in jo ponovno pokrili. Merili smo 2 minuti in pol (oznaka PRED, Slika 11, 12), - omamljanje. Ogljikov dioksid smo počasi dovajali iz 16-gramske jeklenke po plastični cevi dolžine 1,6 m in premera 20 mm, ki je bila vpeta v stojalo tako, da je bil konec cevi neposredno nad čašo (Slika 9). S tem smo zagotovili, da pritisk iz jeklenke ni vplival na lego poskusnih živali v časi in da se sistem ni ohlajal. Ogljikov dioksid se zaradi raztezanja močno ohladi, ko ga spustimo iz jeklenke, vendar se je v danem primeru med potjo po cevi segrel na sobno temperaturo. Uhajanje plina iz jeklenke na drugi strani cevi smo preprečili tako, da smo staknili nastavek za jeklenko in cev ter vmesni prostor zatesnili z lepilnim trakom (Slika 10). Ogljikov dioksid smo spuščali v čašo toliko časa, da so se živali pokazale povečano aktivnost (hitro, trzajoče gibanje), ki ji je sledilo mirovanje. Čašo smo ponovno pokrili,

- merili smo vrednosti omamljenih (mirujočih) živali (1 min) (oznaka MED, Slika 11, 12),

 po približno 1 - 2 minutah mirovanja se živali začnejo premikati, kar štejemo za zbujanje iz omamljenosti,

- počakali smo 5 min po koncu faze mirovanja (omamljenosti), čašo odkrili in izpihali ogljikov dioksid s sapo, ob čemer se je izmenjal vsaj 20-kratni volumen čaše (preračunano glede na volumen čaše in povprečni volumen izdihanega zraka; slednjega smo podcenili). Opazili smo, da se pri tem lega živali v čaši ni spremenila. Čašo smo pokrili in ponovno merili (2,5 min) (oznaka PO, Slika 11).

Reference po končani meritvi nismo merili, ker smo lahko vzorec odvzeli iz čaše le tako, da smo čašo premaknili z elektrode. Primer meritve prikazuje Slika 11.

Pri hroščih smo po 1-3 min po koncu faze mirovanja opazili velik dvig vrednosti. Te vrednosti navajamo namesto meritev 5 min po koncu faze mirovanja in jih označujemo z zvezdico (PO*, Slika 12). Ko smo čašo odkrili in izpihali ogljikov dioksid (5 minut po koncu faze mirovanja), so se vrednosti pri nekaterih vzorcih spremenile, pri drugih pa je vrednost ostala enaka. Primer meritve prikazuje Slika 12.

Pred začetkom poskusa se je vrednost signala spreminjala zaradi termičnih učinkov ob segrevanju sistema. Čas ogrevanja, po katerem smo dobili stabilno vrednost signala, smo določili na 3 ure. Za stabilen signal vzamemo, ko vrednost niha za največ 0,02 V. Kot

vrednost meritve na vseh stopnjah protokola smo pri statistični analizi upoštevali povprečno vrednost.

Beležili smo tudi čas dovajanja ogljikovega dioksida, ki je potreben, da poskusne živali omamimo do zgoraj omenjenega vedenjskega odziva (od tu najprej čas, potreben za omrtvičenje). Opazili smo, da je ta čas v veliki meri odvisen od izrabljenosti jeklenke, torej od tlaka plina v njej, in sicer manjši kot je tlak, torej bolj kot je jeklenka prazna, daljši je potreben čas, potreben za omrtvičenje živali.



Slika 9: Elektroda s čašo in cevjo za dovajanje ogljikovega dioksida vzorcu. Čaša je bila med potekom meritve pokrita (desno).



Slika 10: Jeklenka z ogljikovim dioksidom in cev za dovajanje ogljikovega dioksida.

Sliki 11 in 12 (spodaj) prikazujeta posnetek meritve. Zaradi postavitve vezja in računalniških nastavitev območja zajema podatkov so vrednosti tem bolj negativne, večja

kot je absorpcija bližnjega polja. To smo preverili z opazovanjem odklona kazalca na merilcu Experimental Life Energy Meter. V besedilu ves čas navajamo in interpretiramo pozitivne vrednosti signala, kar ustreza dejanskemu dogajanju.



Slika 11: Posnetek meritve absorpcije bližnjega polja pri ličinkah mokarja (*Tenebrio molitor*). Označene so referenčna vrednost (REF – pokrita prazna čaša) in faze omrtvičenja (PRED – pred dovajanjem ogljikovega dioksida, MED – omamljenost (ravni plato), PO – 5 minut po zbujanju iz omamljenosti). Posamezne faze meritve so ločene s premori (P1, P2, P3). Modra črta označuje prisotnost ogljikovega dioksida v čaši.



Slika 12: Posnetek meritve absorpcije bližnjega polja pri odraslih hroščih mokarjih (*Tenebrio molitor*). Označene so referenčna vrednost (REF – pokrita prazna čaša) in faze omrtvičenja (PRED – pred dovajanjem ogljikovega dioksida, MED – omamljenost (ravni plato), PO* – 1 do 3 minute po zbujanju iz omamljenosti). Posamezne faze meritve so ločene s premori (P1, P2, P3). Modra črta označuje prisotnost ogljikovega dioksida v čaši.

4.2.3 Ugotavljanje odvisnosti absorpcije bližnjega polja od omamljanja z ogljikovim dioksidom, ontogenetskega stadija ter mase (prvi sklop)

Vse potrebne podatke smo dobili ob uporabi protokola, opisanega v prejšnjem razdelku. Pred meritvijo smo vzorec stehtali s tehtnico Vibra AJ. En dan pred meritvijo smo izbrali osebke za posamezen vzorec in iz gojišča odstranili vir vode. Merili smo ličinke na začetku larvalnega stadija, ličinke tik pred stadijem bube in odrasle hrošče, stare 0-35 dni (Slika 13)

Vzorec ličink na začetku larvalnega stadija je obsegal 140 osebkov, manjših od 15 mm, v večini primerov manjših od 10 mm. Za to število osebkov v vzorcu smo se odločili, da bi bile mase vzorcev med razredi različno starih ličink primerljive. Izmerili smo 10 vzorcev.

Vzorec ličink tik pred stadijem bube je obsegal 40 osebkov. Pri izbiri smo upoštevali sledeče kriterije: velikost 20 mm ali več, mirujoče na površini gojišča, v katerem so že prisotne bube. Izmerili smo 8 vzorcev.

Vzorec odraslih hroščev je obsegal 30 osebkov, starih do 35 dni. Izbirali smo hrošče brez deformacij pokrovk in poškodb zadka. Izmerili smo 9 vzorcev.



Slika 13: Vzorci hrošča mokarja (*Tenebrio molitor*) v različnih ontogenetskih stadijih. Vzorec ličink na začetku larvalnega stadija v čaši (1-LM). Vzorec ličink tik pred stadijem bube v čaši (2-LV). Ličinka tik pred stadijem bube (levo) in ličinka na začetku larvalnega stadija (desno) (3-LV/LM). Vzorec odraslih hroščev v čaši (4-H).

4.2.4 Ugotavljanje odvisnosti absorpcije bližnjega polja od mase (drugi sklop)

Med pregledovanjem zbranih podatkov smo prišli do zaključka, da bi bilo primerno ponoviti meritve pri ličinkah tik pred stadijem bube in pri odraslih hroščih pred omamljanjem z ogljikovim dioksidom. Zaradi časovnega razmika med tem in prvim sklopom meritev ter zaradi različnih nastavitev ojačevalnika izmerjenih vrednosti ne primerjamo s predhodnimi, čeprav smo se trudili približati nastavitve, kolikor je bilo mogoče.

Število osebkov v vzorcu smo prilagodili tako, da smo zajeli razpon mas med 2 in 7 gramov. Tak razpon mas smo postavili pri prvotno izmerjenih vzorcih ličink na začetku larvalnega stadija. Vzorec ličink na začetku larvalnega stadija je obsegal 140 osebkov,

manjših od 15 mm. Za to število osebkov v vzorcu smo se odločili, da bi bile mase vzorcev med razredi različno starih ličink primerljive. Bolj ugodno bi bilo izbirati ličinke na začetku larvalnega stadija iz ožjega velikostnega razreda, vendar smo bili omejeni z razpoložljivim številom osebkov. Zato smo pri ličinkah na začetku larvalnega stadija nabrali vzorce v razponu mas 2 do 7 gramov.

Pričakovali smo, da bi pri enakem razponu mas pri vseh ontogenetskih stadijih lahko zanesljivo primerjali odvisnost izmerjenih vrednosti od mase. V drugem sklopu meritev smo izmerili vrednosti pri 10 vzorcih ličink tik pred stadijem bube in pri 10 vzorcih odraslih hroščev. Pri slednjih smo zaradi majhnega števila razpoložljivih poskusnih živali vzorce različnih mas dobili tako, da smo najmanjšemu vzorcu zaporedoma dodajali določeno število osebkov. Iz istega razloga pri izboru osebkov nismo upoštevali kriterija starosti. Uporabili smo enak protokol kot pri prejšnjih vzorcih, ki smo ga primerno skrajšali, saj živali nismo omamljali (Slika 14). Vzorce smo stehtali z laboratorijsko tehtnico Vibra AJ.



Slika 14: Posnetek meritve absorpcije bližnjega polja pri ličinkah in hroščih mokarja (*Tenebrio molitor*), drugi sklop meritev. Označeni sta referenčna vrednost (REF – pokrita prazna čaša) in vrednost absorpcije vzorca (PRED). Vzorcu nismo dovajali ogljikovega dioksida. Fazi meritve loči premor (P1).

4.2.5 Kontrolni poskusi

Zanimalo nas je, ali pri omamljanju z ogljikovim dioksidom merimo vpliv ogljikovega dioksida na fiziološko stanje organizma in posledično na njegovo sposobnost absorpcije zunanjega (eksogenega) polja.

4.2.5.1 Vpliv ogljikovega dioksida na absorpcijo bližnjega polja v sistemu brez poskusnih živali

Preverjali smo, kako ogljikov dioksid vpliva na izmerjene vrednosti absorpcije bližnjega polja v poskusnem sistemu brez poskusnih živali. Uporabili smo enak protokol kot pri omamljanju poskusnih živali, pri tem smo namesto 5 min po koncu faze mirovanja (omamljenosti) merili 8 minut po dovajanju ogljikovega dioksida. Izmerili smo tri ponovitve. Čas dovajanja ogljikovega dioksida smo prilagodili tlaku v jeklenku. Z eno jeklenko smo naenkrat izvedli tri meritve. Časi dovajanja ogljikovega dioksida 5 s, 10 s, 20 s, v tem zaporedju. Primer meritve prikazuje Slika 15.



Slika 15: Posnetek meritve absorpcije bližnjega polja v sistemu brez poskusnih živali. Označene so referenčna vrednost (REF – pokrita prazna čaša) in faze dovajanja ogljiovega dioksida (PRED – pred dovajanjem ogljikovega dioksida, MED – ogljikov dioksid prisoten v sistemu, PO – po spihanju ogljikovega dioksida). Posamezne faze meritve so ločene s premori (P1, P2, P3). Modra črta označuje prisotnost ogljikovega dioksida v čaši.

4.2.5.2 Vpliv ogljikovega dioksida in mase na absorpcijo bližnjega polja destilirane vode

Želeli smo se prepričati, da opažene spremembe v absorpciji bližnjega polja ne nastopijo zaradi raztapljanja ogljikovega dioksida v tkivih poskusnih živali. Uporabili smo enak protokol kot pri merjenju s poskusnimi živalmi, pri tem smo namesto 5 min po koncu faze mirovanja (omamljenosti) merili 8 minut po dovajanju ogljikovega dioksida. Izmerili smo 9 vzorcev destilirane vode (3 ml), ki smo jih tudi stehtali z laboratorijsko tehtnico Vibra AJ. Čas dovajanja ogljikovega dioksida smo prilagodili tlaku v jeklenki. Z eno jeklenko smo naenkrat izmerili tri vzorce, ob tem so bili časi dovajanja ogljikovega dioksida 5s, 10s, 20s, v tem zaporedju. Primer meritve prikazuje Slika 16.



Slika 16: Posnetek meritve absorpcije bližnjega polja pri destilirani vodi. Označene so referenčna vrednost (REF – pokrita prazna čaša) in faze dovajanja ogljiovega dioksida (PRED – pred dovajanjem ogljikovega dioksida, MED – ogljikov dioksid prisoten v sistemu, PO – po spihanju ogljikovega dioksida). Posamezne faze meritve so ločene s premori (P1, P2, P3). Modra črta označuje prisotnost ogljikovega dioksida v čaši.

Kot pri mokarjih, smo tudi pri destilirani vodi v drugem sklopu meritev izmerili vrednosti pri vzorcih z razponom mase 2 do 7 gramov. Različne mase vzorcev smo dobili z odmerjanjem ustreznega volumna destilirane vode v merilnem valju. Vzorce smo tudi stehtali z laboratorijsko tehtnico Vibra AJ. Uporabili smo enak protokol kot pri prejšnjih vzorcih, ki smo ga primerno skrajšali, saj nismo dovajali ogljikovega dioksida. Izmerili smo vrednosti 6 vzorcev. Poudarjamo, da teh naknadno izmerjenih vrednosti ne primerjamo s predhodnimi. Primer meritve prikazuje Slika 17.



Slika 17: Posnetek meritve absorpcije bližnjega polja pri destilirani vodi, drugi sklop meritev. Označeni sta referenčna vrednost (REF – pokrita prazna čaša) in vrednost absorpcije vzorca (PRED). Vzorcu nismo dovajali ogljikovega dioksida. Fazi meritve loči premor (P1).

4.2.5.3 Vpliv živosti na absorpcijo bližnjega polja

Izmerili smo tudi vrednost absorpcije bližnjega polja vzorca 30 mrtvih hroščev, ki so poginili in smo jih pobrali iz gojišča ter zamrznili pri – 5 °C. Na dan poskusa smo jih odtajali v pokriti petrijevki (1 ura pri sobni temperaturi) in stehtali, uporabili smo laboratorijsko tehtnico Vibra AJ. Merili smo ob ob dovajanju ogljikovega dioksida (10 s) po protokolu, ki je bil, kolikor se je dalo, enak kot pri živih živalih; časi merjenja so bili po 2 minuti in pol za vsako stopnjo protokola. Vzorec smo izmerili enkrat. Primer meritve prikazuje Slika 18.



Slika 18: Posnetek meritve absorpcije bližnjega polja pri vzorcu mrtvih odraslih hroščev mokarjev (*Tenebrio molitor*). Označene so referenčna vrednost (REF – pokrita prazna čaša) in faze dovajanja ogljiovega dioksida (PRED – pred dovajanjem ogljikovega dioksida, MED – ogljikov dioksid prisoten v sistemu, PO – po spihanju ogljikovega dioksida). Posamezne faze meritve so ločene s premori (P1, P2, P3). Modra črta označuje prisotnost ogljikovega dioksida v čaši.

4.2.5.4 Kontrolni poskus vpliva lege poskusnih živali glede na elektrodo

Večino poskusov smo izvajali na živih živalih, pri čemer smo morali upoštevati, da se njihovo premikanje odraža na nihanju izmerjenih vrednosti. Zaradi tega smo izračunali povprečje izmerjenih vrednosti v času po posameznih stopnjah protokola in jih upoštevali pri analizi rezultatov. Na vzorcu mrtvih hroščev smo izvedli tudi poskus, s katerim smo ugotavljali vpliv lege živali v čaši oziroma konfiguracije vzorca na izmerjene vrednosti. Izbrane konfiguracije (Slika 19) predstavljajo skrajne lege, saj se podobne konfiguracije niso pojavile med predhodno opisanimi poskusi in tudi pri poskusih z živimi hrošči nismo opazili takih razlik v legi glede na elektrodo. Prednost uporabe mrtvih živali je, da lahko poljubno spreminjamo konfiguracijo. Za ugotavljanje vpliva konfiguracije na izmerjene vrednosti smo prilagodili protokol, kot je opisano v nadaljevanju:

nepokrito čašo smo z navadnim lepilnim trakom pritrdili na ploščo tako, da se lepilni trak
ni dotikal kovine,

- izmerili smo referenčno vrednost (30 s), oznaka REF1 (Slika 20),
- v tako pritrjeno čašo smo položili kos polivinila dimenzij 180 x 25 mm,
- ponovno smo izmerili referenčno vrednost (30 s), oznaka REF2 (Slika 20),

v čašo smo stresli vzorec. Ker se polivinil ni tesno prilegal čaši, so bili hrošči ob robovih
čaše odmaknjeni od elektrode (označena kot konfiguracija 1),

- merili smo 30 s, oznaka K1 (Slika 20),

- iz čaše smo izvlekli polivinil, ne da bi pri tem premaknili čašo, ob tem se je naključno spremenila lega hroščev v čaši (označena kot konfiguracija 2),

- ponovno smo merili 30 s. oznaka K2 (Slika 20).

Vzorec smo izmerili desetkrat. Primer meritve prikazuje Slika 20.



Slika 19: Vzorec mrtvih odraslih hroščev mokarjev (*Tenebrio molitor*) v različnih konfiguracijah. Konfiguracija 1, pogled od zgoraj (K1-L). Konfiguracija 1, pogled od strani (K1-D). Konfiguracija 2, pogled od zgoraj (K2-L). Konfiguracija 2, pogled od strani (K2-D).



Slika 20: Posnetek meritve absorpcije bližnjega polja ob spremembi konfiguracije vzorca mrtvih odraslih hroščev mokarjev (*Tenebrio molitor*). Označeni sta izmerjeni referenčni vrednosti (REF1, REF2) in vrednost absorpcije vzorca v konfiguraciji 1 (K1) in konfiguraciji 2 (K2). Posamezne faze meritve so ločene s premori (P1, P2, P3).

4.3 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV

Za prikaz in statistično analizo smo uporabili računalniški program Microsoft Excel 2002 in SPSS, verziji 13.0 ter 16.0.

Statistično analizo smo začeli z izbiro primerne statistične metode. V ta namen smo uporabili Kolmogorov-Smirnov test, s katerim smo testirali normalno porazdelitev naših podatkov. Ugotovili smo, da so podatki normalno porazdeljeni, zato smo se odločili za uporabo parametričnih metod: parni t test in test enosmerna ANOVA, odvisno od števila obravnavanj. Za preverjanje hipotez smo primerjali povprečja po obravnavanjih, ob upoštevanju predpostavk izbrane statistične metode. Vpliv dodatnih spremenljivk (mase) smo upoštevali tako, da smo statistične analize izpeljali na podatkih, normiranih po masi. Uporabili smo Levenov preizkus homogenosti varianc. Kadar smo imeli več kot dve obravnavanji, smo za dodatni vpogled v rezultate analize variance uporabili metodo načrtovanih primerjav (kontrastov) in *post hoc* teste. Poleg tega smo, kadar smo ocenili kot primerno, izračunali Pearsonov koeficient korelacije med spremenljivkama.

5 REZULTATI

5. 1 EXPERIMENTAL LIFE ENERGY METER (MERILNI SISTEM HELIOGNOSIS)

5.1.1 Kontrolni poskusi z ogljikovim dioksidom in destilirano vodo

5.1.1.1 Vpliv ogljikovega dioksida na absorpcijo bližnjega polja v sistemu brez poskusnih živali

Preverjali smo, kako ogljikov dioksid vpliva na vrednosti absorpcije bližnjega polja v poskusnem sistemu brez poskusnih živali. Slika 21 prikazuje primer meritve (označene so posamezne stopnje protokola). Izmerili smo 3 vzorce pri različnem času dovajanja ogljikovega dioksida. Rezultate smo prikazali v Preglednici 2.



Slika 21: Posnetek meritve absorpcije bližnjega polja v sistemu brez poskusnih živali. Označene so referenčna vrednost (REF – pokrita prazna čaša) in faze dovajanja ogljiovega dioksida (PRED – pred dovajanjem ogljikovega dioksida, MED – ogljikov dioksid prisoten v sistemu, PO – po spihanju ogljikovega dioksida). Posamezne faze meritve so ločene s premori (P1, P2, P3). Modra črta označuje prisotnost ogljikovega dioksida v čaši.

Preglednica 2: Absorpcija bližnjega polja glede na prisotnost ogljikovega dioksida v sistemu brez poskusnih živali. Razlaga oznak: Pred – pred dovajanjem ogljikovega dioksida, Med – ogljikov dioksid prisoten v sistemu, Po – po spihanju ogljikovega dioksida. Izračunan je variacijski razmik (VR – razlika med največjo in najmanjšo vrednostjo).

Čas dovajanja	Absorpcija bližnjega polja(V)			
$CO_2(s)$	Pred	Med	Po	VR
5	0,000	0,019	0,020	0,020
10	0,007	0,017	0,027	0,020
20	0,003	0,017	0,022	0,019

Ugotovili smo, da razlika med največjo in najmanjšo vrednostjo ne presega 0,02 V (Preglednica 2), torej ustreza pričakovanim nihanjem vrednosti stabilnega signala. Zaključimo, da sam ogljikov dioksid ne vpliva na vrednosti absorpcije bližnjega polja.

5.1.1.2 Vpliv ogljikovega dioksida in mase na absorpcijo bližnjega polja destilirane vode

Želeli smo se prepričati, da opažene spremembe v absorpciji bližnjega polja ne nastopijo zaradi raztapljanja ogljikovega dioksida v tkivih poskusnih živali. Primer meritve prikazuje Slika 22, v kateri označene posamezne stopnje protokola. Izmerili smo 9 vzorcev; vrednosti prikazuje Priloga A.



Slika 22: Posnetek meritve absorpcije bližnjega polja pri destilirani vodi. Označene so referenčna vrednost (REF – pokrita prazna čaša) in faze dovajanja ogljiovega dioksida (PRED – pred dovajanjem ogljikovega dioksida, MED – ogljikov dioksid prisoten v sistemu, PO – po spihanju ogljikovega dioksida). Posamezne faze meritve so ločene s premori (P1, P2, P3). Modra črta označuje prisotnost ogljikovega dioksida v čaši.

Za statistično analizo podatkov smo izmerjene vrednosti absorpcije bližnjega polja delili z maso in tako dobili normirane vrednosti, na katerih smo testirali normalnost porazdelitve (Kolmogorov-Smirnov test, p>0,05) in izvedli test enosmerna ANOVA. Levenov preizkus je pokazal, da so variance homogene (p=0,919). Ugotovili smo, da se povprečja po obravnavanjih med seboj razlikujejo (p=0,002). Z metodo kontrastov smo ugotovili, da se vrednosti absorpcije bližnjega polja pred dovajanjem ogljikovega dioksida statistično značilno (Slika 23) razlikujejo od ostalih dveh (p=0,001), ki pa se med seboj ne razlikujeta (p=0,699). To smo potrdili tudi s *post hoc* testi (LSD preizkus).



ABSORPCIJA BLIŽNJEGA POLJA PRI DESTILIRANI VODI

Slika 23: Absorpcija bližnjega polja pri destilirani vodi glede na prisotnost ogljikovega dioksida v sistemu. Vrednosti so normirane po masi; prikazano je povprečje s standardno napako. Razlaga oznak: Pred – pred dovajanjem ogljikovega dioksida, Med – ogljikov dioksid prisoten v sistemu, Po – po spihanju ogljikovega dioksida. Statistično značilne razlike med obravnavanji so ponazorjene z zvezdicami (razlaga v besedilu zgoraj).

V drugem sklopu meritev (razdelek 4.2.5.2) smo izmerili vrednosti absorpcije bližnjega polja pri vzorcih destilirane vode z razponom mase 2 do 7 gramov. Izmerili smo 6 vzorcev; izmerjene vrednosti in mase prikazuje Priloga A. Uporabili smo enak protokol kot pri ugotavljanju vpliva ogljikovega dioksida, ki smo ga primerno skrajšali (Slika 24).

Error Bars: +/- 1. SE



Slika 24: Posnetek meritve absorpcije bližnjega polja pri destilirani vodi, drugi sklop meritev. Označeni sta referenčna vrednost (REF – pokrita prazna čaša) in vrednost absorpcije vzorca (PRED). Vzorcu nismo dovajali ogljikovega dioksida. Fazi meritve loči premor (P1).

S Kolmogorov-Smirnovim testom smo potrdili, da se podatki porazdeljujejo normalno (p>0,05). Izračunali smo Pearsonov koeficient korelacije med maso in absorpcijo bližnjega polja, ki je bil 0,989 (p<0,0001) (Slika 25).



Slika 25: Odvisnost absorpcije bližnjega polja od mase pri destilirani vodi (drugi sklop meritev). Na grafu je označena trendna črta, črti, ki označujeta interval zaupanja (95%) ter izpisan koeficient determinacije.

5.1.2 Ugotavljanje odvisnosti absorpcije bližnjega polja od omamljanja z ogljikovim dioksidom

Hipotezo, da omamljanje z ogljikovim dioksidom vpliva na absorpcijo bližnjega polja, smo testirali na vseh ontogenetskih stadijih. Izmerili smo 10 vzorcev ličink na začetku larvalnega stadija, 8 vzorcev ličink tik pred stadijem bube in 9 vzorcev odraslih hroščev. Podatke smo dobili s protokolom, kot je opisan v razdelku 4.2.2, in ga povzemamo s Slikama 26 in 27. Vpliv ogljikovega dioksida na absorpcijo bližnjega polja smo ugotavljali tako, da smo primerjali vrednosti absorpcije bližnjega polja neposredno pred dovajanjem ogljikovega dioksida (oznaka PRED, Sliki 26, 27), po dovajanju ogljikovega dioksida oziroma v času omamljenosti (oznaka MED, Sliki 26, 27) in 5 minut po prenehanju omamljenosti pri ličinkah (oznaka PO, Slika 26) oziroma 1-3 minute po prenehanju omamljenosti v primeru odraslih hroščev (oznaka PO*, Slika 27). Izvorni podatki so zbrani v Prilogah B1, B2 in B3. Statistično analizo smo izvedli na vrednostih absorpcije bližnjega polja, ki smo jih delili z maso in tako dobili normirane vrednosti, na katerih smo izvedli test enosmerna ANOVA, pri čemer smo stanja PRED, MED, PO (PO*) upoštevali kot obravnavanja. Pred izbiro metode smo s Kolmogorov-Smirnovim testom potrdili, da so podatki normalno porazdeljeni (p>0,05).



Slika 26: Posnetek meritve absorpcije bližnjega polja pri ličinkah mokarja (*Tenebrio molitor*). Označene so referenčna vrednost (REF – pokrita prazna čaša) in faze omrtvičenja (PRED – pred dovajanjem ogljikovega dioksida, MED – omamljenost (ravni plato), PO – 5 minut po zbujanju iz omamljenosti). Posamezne faze meritve so ločene s premori (P1, P2, P3). Modra črta označuje prisotnost ogljikovega dioksida v čaši.

Pri odraslih hroščih smo po 1-3 min po koncu faze mirovanja opazili velik dvig absorpcije bližnjega polja. Te vrednosti navajamo namesto meritev 5 min po koncu faze mirovanja in jih označujemo z zvezdico (PO*, Slika 27). Poleg tega, da je absorpcija bližnjega polja močno narasla, smo opazili, da se v nekaterih primerih hrošči sprimejo v skupke in tako ostanejo še nekaj časa po koncu meritve. S tem se spremeni lega vzorca glede na elektrodo. Vpliv tega dejavnika smo ocenili v razdelku 5.1.5.2.



Slika 27: Posnetek meritve absorpcije bližnjega polja pri odraslih hroščih mokarjih (*Tenebrio molitor*). Označene so referenčna vrednost (REF – pokrita prazna čaša) in faze omrtvičenja (PRED – pred dovajanjem ogljikovega dioksida, MED – omamljenost (ravni plato), PO* – 1 do 3 minute po zbujanju iz omamljenosti). Posamezne faze meritve so ločene s premori (P1, P2, P3). Modra črta označuje prisotnost ogljikovega dioksida v čaši.

5.1.2.1 Ličinke na začetku larvalnega stadija

Kot že omenjeno, smo po masi normirane vrednosti absorpcije bližnjega polja (Priloga B1) testirali za normalnost porazdelitve in izvedli test enosmerna ANOVA. Levenov preizkus homogenosti varianc je pokazal, da so variance homogene (p=0,774). Ugotovili smo, da med obravnavanji ni statistično značilnih razlik v povprečju (p=0,094). Ker smo dobili nižjo verjetnost, smo ugotovitev dodatno preverili z metodo kontrastov, ki je pokazala, da se obravnavanji Pred in Po statistično značilno razlikujeta od obravnavanja Med (p=0,031), kot kaže Slika 28.



Slika 28: Absorpcija bližnjega polja glede na omamljenost pri ličinkah hrošča mokarja (*Tenebrio molitor*) na začetku larvalnega stadija. Vrednosti so normirane po masi; prikazano je povprečje s standardno napako. Razlaga oznak: Pred – pred dovajanjem ogljikovega dioksida, Med – omamljenost, Po – 5 minut po zbujanju iz omamljenosti. Statistično značilne razlike med obravnavanji so ponazorjene z zvezdicami (razlaga v besedilu zgoraj).

5.1.2.2 Ličinke tik pred stadijem bube

Po masi normirane vrednosti absorpcije bližnjega polja (Priloga B2) smo testirali za normalnost porazdelitve in izvedli test enosmerna ANOVA. Levenov preizkus homogenosti varianc pokazal, da variance med obravnavanji niso homogene (p=0,038). Ugotovili smo, da se obravnavanja statistično značilno razlikujejo (p=0,009), kar smo potrdili z Welchevim preizkusom (p=0,019). Z metodo kontrastov smo pokazali, da se povprečje pri omamljenih ličinkah statistično značilno razlikuje od povprečnih vrednosti, izmerjenih pred dovajanjem ogljikovega dioksida in po prenehanju omamljenosti (p=0,020), kot kaže Slika 29.



Slika 29: Absorpcija bližnjega polja glede na omamljenost pri ličinkah hrošča mokarja (*Tenebrio molitor*) tik pred stadijem bube. Vrednosti so normirane po masi; prikazano je povprečje s standardno napako. Razlaga oznak: Pred – pred dovajanjem ogljikovega dioksida, Med – omamljenost, Po – 5 minut po zbujanju iz omamljenosti. Statistično značilne razlike med obravnavanji so ponazorjene z zvezdicami (razlaga v besedilu zgoraj).

5.1.2.3 Odrasli hrošči

Po masi normirane vrednosti absorpcije bližnjega polja (Priloga B3) smo testirali za normalnost porazdelitve in izvedli test enosmerna ANOVA. Levenov preizkus homogenosti varianc je pokazal, da variance med obravnavanji niso homogene (p=0,014). Ugotovili smo, da se obravnavanja statistično značilno razlikujejo (p<0,0001), kar smo potrdili z Welchevim preizkusom (p<0,0001). *Post hoc* test (Games-Howell preizkus) je pokazal, da se vsa obravnavanja med seboj statistično značilno razlikujejo (p<0,0001), kot kaže Slika 30. Do enakih ugotovitev smo prišli tudi z metodo kontrastov.



Slika 30: Absorpcija bližnjega polja glede na omamljenost pri odraslih hroščih mokarjih (*Tenebrio molitor*). Vrednosti so normirane po masi; prikazano je povprečje s standardno napako. Razlaga oznak: Pred – pred dovajanjem ogljikovega dioksida, Med – omamljenost, Po* – 1 do 3 minute po zbujanju iz omamljenosti. Statistično značilne razlike med obravnavanji so ponazorjene z zvezdicami (razlaga v besedilu zgoraj).

Primerjali smo vrednosti absorpcije bližnjega polja pri vseh obravnavanih ontogenetskih stadijih v odvisnosti od dovajanja ogljikovega dioksida (Slika 31). Ugotovili smo, da odziv hroščev na ogljikov dioksid med omamljanjem daleč presega odziv ličink.



Slika 31: Absorpcija bližnjega polja glede na omamljenost pri ličinkah na začetku larvalnega stadija (oznaka LM), pri ličinkah tik pred stadijem bube (oznaka LV) in pri odraslih osebkih (oznaka H) hrošča mokarja *(Tenebrio molitor)*. Vrednosti so normirane po masi; prikazano je povprečje s standardno napako. Razlaga oznak: Pred – pred dovajanjem ogljikovega dioksida, Med – omamljenost, Po – 5 minut po zbujanju omamljenosti (LM, LV) oziroma 1-3 minute po zbujanju iz omamljenosti (H).

5.1.3 Ugotavljanje odvisnosti absorpcije bližnjega polja od ontogenetskega stadija

Postavili smo hipotezo, da stadij ontogeneze vpliva na absorpcijo bližnjega polja. Preverjali smo jo tako, da smo primerjali tri stadije v ontogenetskem razvoju mokarja glede na povprečne vrednosti absorpcije bližnjega polja, normirane po masi. Izmerili smo 10 vzorcev ličink na začetku larvalnega stadija, 8 vzorcev ličink tik pred stadijem bube in 9 vzorcev odraslih hroščev. Podatke (Priloga C) smo dobili s protokolom, kot je opisan v razdelku 4.2.2, pri čemer smo upoštevali le podatke, zbrane pred dovajanjem ogljikovega dioksida (Sliki 26, 27, oznaka PRED). Za statistično analizo smo uporabili test enosmerna ANOVA, pri čemer smo ontogenetske stadije upoštevali kot obravnavanja. Pred izbiro metod smo s Kolmogorov-Smirnovim testom potrdili, da so podatki normalno porazdeljeni (p>0,05). Z Levenovim preizkusom smo potrdili predpostavko o homogenosti varianc (p=0,123). Test enosmerna ANOVA je pokazal, da se povprečja med obravnavanji statistično značilno razlikujejo (p<0,0001). Zaradi neenakega števila vzorcev po obravnavanjih smo statistično značilne razlike med povprečji potrdili z Welchevim preizkusom (p<0,0001). S *post hoc* testi (LSD preizkus) smo ugotovili, da se vsak ontogenetski stadij statistično značilno razlikuje od ostalih dveh (Preglednica 3), kot prikazuje tudi Slika 32.

Preglednica 3: Rezultati *post hoc* testa za ugotavljanje odvisnosti absorpcije bližnjega polja pred dovajanjem ogljikovega dioksida od ontogenetskega stadija hrošča mokarja (*Tenebrio molitor*). Razlaga oznak: LM – ličinke na začetku larvalnega stadija, LV – ličinke tik pred stadijem bube, H – odrasli hrošči.

Obravnavanji, ki ju primerjamo med sabo	Pripadajoča verjetnost (p)		
LM in LV	0,011		
LM in H	0,031		
LV in H	0,000		



Error Bars: +/- 1. SE

Slika 32: Absorpcija bližnjega polja glede na stadij ontogeneze pri hrošču mokarju (*Tenebrio molitor*) pred dovajanjem ogljikovega dioksida. Vrednosti so normirane po masi; prikazano je povprečje s standardno napako. Statistično značilne razlike med obravnavanji so ponazorjene z zvezdicami (razlaga v besedilu zgoraj).

5.1.4 Ugotavljanje odvisnosti absorpcije bližnjega polja od mase

Odvisnost absorpcije bližnjega polja od mase smo primerjali pri meritvah, ki smo jih opravili v kar najbolj podobnem razponu mase vzorcev (2 do 7 gramov). Podatke smo dobili v dveh sklopih meritev (razdelek 4.2.3 in 4.2.4). V prvem sklopu meritev smo izmerili vrednosti absorpcije bližnjega polja pri 10 vzorcih ličink na začetku larvalnega stadija. Uporabili smo le podatke, zbrane v začetnem delu protokola, tj. pred dovajanjem ogljikovega dioksida (Slika 33, oznaka PRED). V drugem sklopu meritev smo izmerili vrednost absorpcije bližnjega polja pri 10 vzorcih ličink tik pred stadijem bube in pri 10 vzorcih odraslih hroščev. Uporabili smo enak protokol kot pri prejšnjih vzorcih, ki smo ga primerno skrajšali, saj živali nismo omamljali (Slika 34). Izvorne podatke navajamo v Prilogi D.



Slika 33: Posnetek meritve absorpcije bližnjega polja pri ličinkah mokarja (*Tenebrio molitor*) na začetku larvalnega stadija (prvi sklop meritev). Označene so referenčna vrednost (REF – pokrita prazna čaša) in faze omrtvičenja (PRED – pred dovajanjem ogljikovega dioksida, MED – omamljenost (ravni plato), PO – 5 minut po zbujanju iz omamljenosti). Posamezne faze meritve so ločene s premori (P1, P2, P3). Modra črta označuje prisotnost ogljikovega dioksida v čaši.



Slika 34: Posnetek meritve absorpcije bližnjega polja pri ličinkah tik pred stadijem bube in odraslih hroščih mokarjih (*Tenebrio molitor*), drugi sklop meritev. Označeni sta referenčna vrednost (REF – pokrita prazna čaša) in vrednost absorpcije vzorca (PRED). Vzorcu nismo dovajali ogljikovega dioksida. Fazi meritve loči premor (P1).

S Kolmogorov-Smirnovim testom potrdili, da se podatki porazdeljujejo normalno (p>0,05). Izračunali smo Pearsonov koeficient korelacije med maso in vrednostmi absorpcije bližnjega polja, ki smo jih s pripadajočimi verjetnostmi (p) prikazali v Preglednici 4. Ugotovili smo, da pri vseh ontogenetskih stadijih dobimo visoko in statistično značilno korelacijo. Grafični prikaz podajajo Slike 35, 36, 37.

Preglednica 4: Korelacija med maso in absorpcijo bližnjega polja pred omamljanjem pri hrošču mokarju (*Tenebrio molitor*). Razlaga oznak: LM – ličinke na začetku larvalnega stadija, LV2 – ličinke tik pred stadijem bube, H2 – odrasli hrošči.

Ontogenetski stadij	Pearsonov koeficient	Verjetnost (p)
LM	0,996	0,000
LV2	0,999	0,000
H2	0,994	0,000



Slika 35: Odvisnost absorpcije bližnjega polja pred omamljanjem od mase pri ličinkah hrošča mokarja (*Tenebrio molitor*) na začetku larvalnega stadija (LM). Na grafu je označena trendna črta, črti, ki označujeta interval zaupanja (95%) ter izpisan koeficient determinacije.



Slika 36: Odvisnost absorpcije bližnjega polja pred omamljanjem od mase pri ličinkah hrošča mokarja (*Tenebrio molitor*) tik pred stadijem bube (LV2). Na grafu je označena trendna črta, črti, ki označujeta interval zaupanja (95%) ter izpisan koeficient determinacije.



Slika 37: Odvisnost absorpcije bližnjega polja pred omamljanjem od mase pri odraslih hroščih mokarjih (*Tenebrio molitor*) (H2). Na grafu je označena trendna črta, črti, ki označujeta interval zaupanja (95%) ter izpisan koeficient determinacije.

5.1.5 Kontrolni poskusi z mokarji (Tenebrio molitor)

5.1.5.1 Vpliv živosti na absorpcijo bližnjega polja

Izmerili smo vrednosti absorpcije bližnjega polja vzorca 30 mrtvih hroščev z dovajanjem ogljikovega dioksida. Vzorec smo izmerili enkrat. Posnetek meritve prikazuje Slika 38, v kateri so značene posamezne stopnje protokola. Rezultat smo prikazali v Preglednici 5.



Slika 38: Posnetek meritve absorpcije bližnjega polja pri vzorcu mrtvih hroščev mokarjev (*Tenebrio molitor*). Označene so referenčna vrednost (REF – pokrita prazna čaša) in faze dovajanja ogljiovega dioksida (PRED – pred dovajanjem ogljikovega dioksida, MED – ogljikov dioksid prisoten v sistemu, PO – po spihanju ogljikovega dioksida). Posamezne faze meritve so ločene s premori (P1, P2, P3). Modra črta označuje prisotnost ogljikovega dioksida v čaši.

Preglednica 5: Absorpcija bližnjega polja glede na prisotnost ogljikovega dioksida pri mrtvih odraslih osebkih hrošča mokarja (*Tenebrio molitor*). Razlaga oznak: Pred – pred dovajanjem ogljikovega dioksida, Med – ogljikov dioksid prisoten v sistemu, Po – po spihanju ogljikovega dioksida. Izračunan je variacijski razmik (VR – razlika med največjo in najmanjšo vrednostjo).

Masa (g)	Absorpcija bližnjega polja (V)					
	Pred	Med	Po	VR		
1,64	0,777	0,795	0,794	0,019		

Ugotovili smo, da razlika med največjo in najmanjšo vrednostjo ne presega 0,02 V (Preglednica 5), torej ustreza pričakovanim nihanjem vrednosti stabilnega signala in sam ogljikov dioksid ne vpliva na vrednosti absorpcije bližnjega polja.

Nadalje smo primerjali vrednosti absorpcije bližnjega polja pri živih in mrtvih hroščih glede na dovajanje ogljikovega dioksida. Sklepali smo, da se razlike v odzivu na ogljikov dioksid pojavijo zaradi živosti organizma (Slika 39).



Slika 39: Absorpcija bližnjega polja glede na omamljenost (živi osebki) oziroma prisotnost ogljikovega dioksida v sistemu (mrtvi osebki) pri odraslih hroščih mokarjih (*Tenebrio molitor*). Vrednosti so normirane po masi; prikazana je povprečna (živi osebki) oziroma izmerjena vrednost (mrtvi osebki). Razlaga oznak: Pred – pred dovajanjem ogljikovega dioksida, Med – ogljikov dioksid prisoten v sistemu oziroma omamljenosti, Po - po spihanju ogljikovega dioksida, Po* – 1-3 minute po zbujanju iz omamljenosti.

5.1.5.2 Kontrolni poskus vpliva lege poskusnih živali glede na elektrodo

Na vzorcu mrtvih hroščev smo izvedli poskus, s katerim smo ugotavljali vpliv lege živali v čaši oziroma konfiguracije vzorca na izmerjene vrednosti. Opravili smo 10 meritev, pri katerih smo med meritvijo spremenili lego vzorca glede na elektrodo. Postavili smo dve konfiguraciji vzorca, ki ju označujemo konfiguracija 1 (K1) in konfiguracija 2 (K2). Izbrane konfiguracije predstavljajo skrajne lege, saj se podobne konfiguracije niso pojavile med predhodno opisanimi poskusi in tudi pri poskusih z živimi hrošči nismo opazili tako velikih razlik v legi glede na elektrodo. Primer meritve prikazuje Slika 40, v kateri so označene posamezne stopnje protokola. Izvorni podatki so prikazani v Prilogi E.


Slika 40: Posnetek meritve absorpcije bližnjega polja ob spremembi konfiguracije vzorca mrtvih hroščev mokarjev (*Tenebrio molitor*). Označeni sta izmerjeni referenčni vrednosti (REF1, REF2) in vrednost absorpcije bližnjega polja vzorca v konfiguraciji 1 (K1) in konfiguraciji 2 (K2). Posamezne faze meritve so ločene s premori (P1, P2, P3).

Statistično analizo smo izvedli na vrednostih absorpcije bližnjega polja, ki smo jih normirali po masi. Potrdili smo, da se podatki normalno porazdeljujejo (Kolmogorov-Smirnov test, p>0,05) in izvedli t test za parne vzorce. Ugotovili smo, da povprečji med konfiguracijo 1 in 2 statistično značilno razlikujeta (p=0,001), kar prikazuje tudi Slika 41.



Slika 41: Absorpcija bližnjega polja pri različnih legah vzorca mrtvih odraslih osebkov hrošča mokarja (*Tenebrio molitor*). Vrednosti so normirane po masi; prikazano je povprečje s standardno napako. Statistično značilne razlike med obravnavanji so ponazorjene z zvezdicami (razlaga v besedilu zgoraj).

Glede na to, da smo pokazali, da sprememba lege vzorca v čaši lahko vpliva na izmerjene vrednosti, smo primerjali maksimalno razliko vrednosti med obravnavanji. Primerjali smo poskus vpliva ogljikovega dioksida na pri odraslih hroščih, pri čemer upoštevamo obravnavanji Pred in Po*, ter poskusu vpliva lege hroščev, pri čemer smo kot obravnavanji upoštevali konfiguracijo 1 in konfiguracijo 2 (Preglednica 6). Za izračun smo uporabili podatke, normirane po masi, prikazane v Prilogah B3 in E. Glede na Sliko 42 smo ugotovili, da je največja sprememba v vrednostih absorpcije bližnjega polja, ki jo lahko opazimo pri spremljanju odziva odraslih hroščev na ogljikov dioksid, dvakrat večja od največje spremembe vrednosti absorpcije bližnjega polja, ki jo lahko izzovemo z načrtovano spremembo konfiguracije. Iz tega smo sklepali, da sprememba lege vzorca v čaši lahko vpliva na izmerjene vrednosti, vendar ne more razložiti vseh opaženih sprememb.

Preglednica 6: Največja razlika po masi normiranih vrednosti absorpcije bližnjega polja. Primerjamo obravnavanja pri poskusu vpliva ogljikovega dioksida pri odraslih hroščih ter pri poskusu vpliva lege poskusnih živali glede na elektrodo (Priloga B3 in E). Razlaga oznak: Pred– pred dovajanjem ogljikovega dioksida, Po* – 1 do 3 minute po zbujanju iz omamljenosti, K1 – konfiguracija 1, K2 – konfiguracija 2.

Poskus	Obravnavanje	Absorpcija bližnjega polja normirana po masi (V/g)	Razlika
Vpliv ogljikovega dioksida	Pred	0,311	0,436
pri odraslih hroščih	Po*	0,747	
Vpliv lege poskusnih živali	K1	0,336	0,223
glede na elektrodo	K2	0,559	



Slika 42: Največja razlika vrednosti pri poskusu vpliva ogljikovega dioksida na absorpcijo bližnjega polja pri odraslih hroščih (med obravnavanji Pred in Po*) in pri poskusu vpliva lege hroščev na absorpcijo bližnjega polja (med konfiguracijo 1 in konfiguracijo 2). Za izračun smo uporabili podatke, normirane po mase. Razlaga oznak: Pred– pred dovajanjem ogljikovega dioksida, Po* – 1 do 3 minute po zbujanju iz omamljenosti.

Primerjali smo tudi po masi normirane vrednosti absorpcije bližnjega polja pri vseh obravnavanih skupinah vzorcev (Slika 43). Ugotavili smo, da odziv hroščev na ogljikov dioksid daleč presega odziv ličink. Glede na primerjavo z mrtvimi hrošči in vzorci v dveh različnih konfiguracijah smo sklepali, da je ta odziv odraz živosti organizma, vendar ni povsem razložljiv s spremembo lege vzorca glede na elektrodo.



Slika 43: Absorpcija bližnjega polja pri obravnavanih skupinah vzorcev hrošča mokarja (*Tenebrio molitor*) in destilirani vodi. Vrednosti so normirane po masi. Razlaga oznak: LM – ličinke na začetku larvalnega stadija, LV – ličinke tik pred stadijem bube, H – odrasli hrošči, Hm – mrtvi osebki odraslih hroščev, DV – destilirana voda, K1 – konfiguracija 1, K2 – konfiguracija 2, Pred – pred dovajanjem ogljikovega dioksida, Med – omamljenost/ogljikov dioksid prisoten v sistemu, Po/Po* – 5 minut po zbujanju iz omamljenosti (LM, LV) oziroma 1-3 minute po zbujanju iz omamljenosti (H) oziroma po spihanju ogljikovega dioksida (Hm, DV).

6 RAZPRAVA

Zanimala nas je absorpcija zunanjega električnega polja pri hroščih mokarjih (*Tenebrio molitor*). Predpostavili smo, da na absorpcijo vpliva stadij v razvoju in fiziološko stanje, ki se spremeni zaradi vpliva stresnega dejavnika (ogljikovega dioksida). Tem predpostavkam je skupna misel, da je absorpcija bližnjega polja v organizmu odvisna od klasičnih fizikalnih parametrov, kot je na primer masa, ter do neke mere tudi od parametrov, ki so značilni za živa bitja.

Vpliv, ki ga ima dano električno oziroma magnetno polje in elektromagnetno sevanje na organizem, je odvisen od tega, ali je organizem živ. To nakazuje na možnost, da obstajajo v živem organizmu entitete, s katerimi je sklopljeno zunanje polje (Hyland, 2003). Predpostavili smo (str. 16), da bi na interakcijo organizma z zunanjim poljem lahko vplivalo endogeno polje organizma, preko katerega bi bilo zunanje polje sklopljeno s fiziološkimi in ontogenetskimi procesi. Povečana ali zmanjšana absorpcija zunanjega polja bi bila v tem primeru lahko posledica sprememb v interakciji med apliciranim in endogenim poljem oziroma sprememb v endogenem polju, ki bi bile povezane s spremenjenim stanjem organizma. Poudarjamo, da v diplomski nalogi te predpostavke nismo preverjali neposredno in jo zato obravnavamo le kot teoretično ozadje poskusov.

Za preverjanje hipotez smo uporabili detekcijsko napravo Experimental Life Energy Meter, ki posredno meri absorpcijo bližnjega polja. Naprava vključuje zaporedno vezana upor in odprti kondenzator. Med elektrodama odprtega kondenzatorja obstaja bližnje električno polje, s katerim interagira snov v okolici ploščate elektrode oziroma pride do absorpcije polja, glede na to pa se spremeni kapacitivnost kondenzatorja. Spreminjanje toka v odvisnosti od omenjene spremembe kapacitivnosti se meri preko upora.

Preverjali smo, ali je absorpcija bližnjega polja odvisna od mase. Pri vseh obravnavanih ontogenetskih stadijih smo ugotovili, da je Pearsonov koeficient korelacije med maso in absorpcijo bližnjega polja okrog 0,99; dobljena korelacija je visoka in tudi statistično značilna (Slika 35, 36, 37, str. 52, 53). Postavili smo hipotezo, da absorpcija bližnjega električnega polja kaže odvisnost od mase. Menimo, da smo hipotezo potrdili.

Z uporabo Experimental Life Energy Meter smo primerjali absorpcijo bližnjega polja glede na stadij ontogeneze in ugotovili statistično značilne razlike med vsemi obravnavanimi ontogenetskimi stadiji (Slika 32, str. 49). Menimo, da smo našo hipotezo, da stadij ontogeneze vpliva na absorpcijo bližnjega polja, potrdili.

Vpliv ogljikovega dioksida smo ugotavljali glede na razvojni stadij. Pri ličinkah na začetku larvalnega stadija smo pokazali statistično značilno razliko pri omamljenih ličinkah (Slika 28, str. 45), prav tako pri ličinkah tik pred stadijem bube (Slika 29, str. 46) Pri odraslih hroščih smo ugotovili, da se vsa obravnavanja med seboj statistično značilno razlikujejo (Slika 30, str. 47). Menimo, da ti rezultati potrjujejo našo hipotezo, da omamljanje z ogljikovim dioksidom vpliva na absorpcijo bližnjega polja. Ugotovili smo tudi, da odziv hroščev na ogljikov dioksid med omamljanjem daleč presega odziv ličink (Slika 31, str. 48). Tako smo razliko med ontogenetskimi stadiji potrdili tudi v odzivu na omamljanje. V nadaljnjih raziskavah bi bilo smiselno ugotavljati, kako na absorpcijo bližnjega polja vplivajo druga sredstva za omamljanje, ki bi imela tudi dolgotrajnejši učinek kot ogljikov dioksid, na primer etanol.

Izvedli smo tudi nekaj kontrolnih poskusov. Ugotovili smo, da prisotnost ogljikovega dioksida ne vpliva na izmerjene vrednosti absorpcije bližnjega polja (Preglednica 2, str. 40).

Pri kontrolnem poskusu z destilirano vodo smo pokazali, da se po dovajanju ogljikovega dioksida vrednost absorpcije bližnjega polja spremeni in ostane nespremenjena tudi po določenem času in spihanju ogljikovega dioksida (Slika 23, str. 41), medtem ko smo pri ličinkah mokarja ugotovili, da se je po spihanju ogljikovega dioksida vrednost absorpcije bližnjega polja vrnila na prejšnjo raven (Slika 28, str.45 in Slika 29, str. 46).

Glede na primerjavo med živimi (Slika 30, str. 47) in mrtvimi (Preglednica 5, str. 54) osebki odraslih hroščev glede na dovajanje ogljikovega dioksida (Slika 39, str. 55) sklepamo, da je odziv na ogljikov dioksid odraz živosti organizma. Pri tem imamo v mislih tako premikanje osebkov kot spremembo stopnje absorpcije bližnjega polja zaradi spremenjenega fiziološkega stanja.

Pokazali smo, da sprememba lege vzorca glede na elektrodo vpliva na absorpcijo bližnjega polja (Slika 41, str. 57). Vpliva lege osebkov glede na elektrodo na izmerjene vrednosti ne moremo izključiti kot motečega dejavnika in njegov vpliv v posameznih primerih težko ovrednotimo.

Ugotovili smo, da je največja sprememba absorpcije bližnjega polja, ki jo lahko opazimo pri spremljanju odziva odraslih hroščev na ogljikov dioksid (Slika 30, str. 47), dvakrat večja od največje spremembe absorpcije bližnjega polja, ki jo lahko izzovemo z načrtovano spremembo konfiguracije (Slika 41, str. 57), kot smo prikazali v Sliki 42 (str. 58). Pri tem izbrane konfiguracije (Slika 19, str. 37) predstavljajo skrajne lege v smislu, da se podobne konfiguracije niso pojavile med poskusi z živimi mokarji; tudi pri poskusih z živimi odraslimi hrošči nismo opazili tako velikih razlik v legi glede na elektrodo. Iz tega sklepamo, da sprememba lege vzorca v čaši lahko vpliva na izmerjene vrednosti absorpcije bližnjega polja, vendar ne more razložiti vseh opaženih sprememb. Zaključili smo, da z lego vzorca glede na elektrodo v primeru hroščev ne moremo pojasniti razlik v absorpciji bližnjega polja med vzorci pred dovajanjem ogljikovega dioksida in po zbujanju iz omamljenosti.

Ob opazovanju med poskusi smo prišli do ugotovitve, da je najprimernejše, če je vzorec take velikosti, da enakomerno pokrije površino elektrode. Vzorec ličink na začetku larvalnega stadija je zadostil tem pogojem. Ugotovili smo tudi, da bi bilo primerneje uporabiti čašo, ki bi bila v premeru ožja od elektrode, ki je vir bližnjega polja in na katero postavimo čašo z organizmi.

Na podlagi opazovanj smo postavili domnevo, da je velikost ličink v vzorcu močno povezana s spremembo lege živali v čaši, in sicer je večja verjetnost, da se bo konfiguracija vzorca spremenila, če so ličinke večje. To lahko dodatno vpliva na izmerjene vrednosti in zamegli učinke, ki jih raziskujemo. Naš zaključek je, da so za poskuse z napravo Experimental Life Energy Meter najprimernejši organizmi velikosti do enega centimetra.

Obvezen podatek pri analizi rezultatov je tudi masa, primerno bi bilo tudi spremljati temperaturo vzorca, ambientnega zraka in same elektrode. Teh parametrov med poskusov nismo spremljali, vendar smo poskuse, katerih rezultate smo primerjali med sabo, opravljali v istem prostoru, v istem delu dneva, po enakem času ogrevanja naprave ter v istem letnem času. Iz tega smo sklepali, da smo zagotovili stalne ambientne razmere.

7 SKLEPI

1 Vpliv ontogenetskega stadija na absorpcijo bližnjega polja smo potrdili neposredno ter tudi v povezavi z omamljanjem, kjer stadij hrošča povsem drugače reagira kot stadij ličinke.

2 Omamljanje z ogljikovim dioksidom vpliva na absorpcijo bližnjega polja pri vseh ontogenetskih stadijih. Zlasti pri odraslih hroščih smo opazili velik dvig vrednosti absorpcije bližnjega polja, ki ga ne moremo razložiti zgolj s premikanjem živali.

3 Spremembe absorpcije bližnjega polja ob omamljanju se pojavijo zaradi živosti organizma.

4 Premikanje živali vpliva na izmerjene vrednosti. Hkrati s spremembo lege vzorca glede na elektrodo v primeru odraslih hroščev ne moremo pojasniti razlik v vrednostih absorpcije bližnjega polja med vzorci pred dovajanjem ogljikovega dioksida in po prenehanju omamljenosti.

5 Verjetnost, da se bo lega vzorca (N≥30) v bližnjem polju znotraj določenega prostora spremenila, je večja, če so poskusne živali večje.

8 POVZETEK

Organizmi so občutljivi na zelo šibka zunanja (eksogena) elektromagnetna polja in imajo tudi izrazit notranji (endogeni) elektromagnetni značaj (Bischof, 2000; Liboff, 2004). Zanimala nas je detekcija endogenih elektromagnetnih polj v organizmu preko meritev absorpcije zunanjega (eksogenega) bližnjega polja v organizmu. Za bližnje polje je značilno, da ob absorpciji bližnjega polja pride do povratnega vpliva na vir polja (Schmitt 2000, 2002).

Ob tem smo predpostavili, da je absorpcija bližnjega polja v organizmu odvisna tako od klasičnih fizikalnih parametrov, ki jih upoštevamo pri obravnavi neživih objektov, kot tudi od ontogenetskega in fiziološkega stanja organizma, ki ga na fizikalni ravni celostno predstavlja endogeno elektromagnetno polje. Izbrani poskusni objekt je hrošč mokar (*Tenebrio molitor*).

Pri napravi Experimental Life Energy Meter imamo odprt kondenzator, med elektrodama katerega je bližnje električno polje. Plošča kondenzatorja ustreza elektrodi, na katero postavimo vzorec. Absorpcija bližnjega polja v vzorcu se odraža na spremembi kapacitivnosti kondenzatorja; to spremembo merimo preko upora, ki je zaporedno zvezan s kondenzatorjem.

Meritve smo izvajali na številčno velikih vzorcih različnih ontogenetskih stadijev mokarja in glede na omamljanje z ogljikovim dioksidom. Ugotavljali smo tudi odvisnost izmerjenih vrednosti od mase. Hipotezo, da je absorpcija bližnjega polja odvisna od mase, smo potrdili, saj smo ugotovili, da pri vseh ontogenetskih stadijih dobimo visoko (okrog 0,99) in statistično značilno korelacijo med maso in izmerjenimi vrednostmi.

Vpliv ontogenetskega stadija na absorpcijo bližnjega polja smo ugotavljali s primerjavo ličink na začetku larvalnega stadija, ličink tik pred stadijem bube in odraslih hroščev. Ugotovili smo statistično značilne razlike med vsemi obravnavanimi ontogenetskimi stadiji. Pri ugotavljanju vpliva ogljikovega dioksida na absorpcijoo bližnjega polja smo primerjali vrednosti neposredno pred dovajanjem ogljikovega dioksida, v času omamljenosti in 5 minut (1-3 minute pri odraslih hroščih) po zbujanju iz omamljenosti. Vpliv ogljikovega dioksida smo ugotavljali pri vseh ontogenetskih stadijih.

Pri ličinkah na začetku larvalnega stadija in pri ličinkah tik pred stadijem bube smo pokazali, da se absorpcija bližnjega polja pri omamljenih ličinkah razlikuje od predhodnih in sledečih meritev. Do enake ugotovitve smo prišli pri odraslih hroščih, pokazali pa smo tudi, da se po prenehanju omamljenosti absorpcija močno poveča. Naš zaključek je, da je absorpcija bližnjega polja odvisna od vitalnosti organizma, ki jo zmanjša stresni dejavnik, v našem primeru ogljikov dioksid.

Izvedli smo tudi kontrolne poskuse, s katerimi smo ugotovili, da niti prisotnost ogljikovega dioksida niti morebitno raztapljanje ogljikovega dioksida v tkivih poskusnih živali ne vpliva na absorpcijo bližnjega polja na način, kot smo ga zasledili pri poskusnih živalih.

Primerjali smo tudi absorpcijo bližnjega polja pri živih in mrtvih hroščih glede na dovajanje ogljikovega dioksida, iz česar smo sklepali, da se razlike pojavijo zaradi živosti organizma. Premikanje živali oziroma sprememba konfiguracije vzorca sicer vpliva na izmerjene vrednosti, vendar s tem ne moremo pojasniti razlik v absorpciji bližnjega polja med vzorci odraslih hroščev glede na omamljanje.

9 VIRI

9.1 CITIRANI VIRI

- Adey W.R. 1993. Biological Effects of Electromagnetic Fields. Journal of Cellular Biochemistry, 51: 410-416
- Badre N.H., Martin M.E., Cooper R.L. 2005. The physiological and behavioral effects of carbon dioxide on *Drosophila melanogaster* larvae. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular and Integrative Physiology, 140, 3: 363-376
- Bezanilla F. 2008. How membrane proteins sense voltage. Nature Reviews. Molecular Cell Biology, 9: 323-332
- Bischof M. 2000. Field Concepts and the Emergence of a Holistic Biophysics. In:Biophotonics and Coherent systems. Proceedings of the 2nd Alexander GurwitschConference ans Additional Contibutions. Beloussov L., Popp F.-A., Voeikov V. and vanWijk R. Moscow, Moscow University Press: 460 str.
- Bistolfi F. 1991. Biostructures and radiation order disorder. Torino, Edizioni Minerva Medica: 302 str.
- Boyer R.F. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 634 str.
- Capps C. 2001. Near field or far field? Electronics Design, Strategy, News, 8: 95-102 http://www.edn.com/article/CA150828.html (12. jun. 2009)
- Delgado J.M.R., Leal J., Monteagudo J.L., Gracia M.G. 1982. Embryological changes induced by weak, extremely low frequency electromagnetic fields. Journal of Anatomy, 134, 3: 533-551
- Drovenik B. 2003. Hrošči Coleoptera. V: Živalstvo Slovenije. Sket B., Gogala M., Kuštor V. (ur.). Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 370-400
- Electromagnetic radiation. From Wikipedia, the free encyclopedia. Wikimedia Foundation, Inc. (29. jul. 2009)

http://en.wikipedia.org/wiki/Electromagnetic_radiation (29. jul. 2009)

Frey A.H. 1993. Electromagnetic field interactions with biological systems. The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal, 7: 272-281

- Gautschi GH. 2002. Piezoelectric Sensorics. Force, Strain, Pressure, Acceleration and Acoustic Emission Sensors, Materials and Amplifiers. Berlin, Heidelberg, New York, Springer: 264 str.
- Gilbert S.F. 2006. Developmental Biology. 8th edition. Sunderland, Sinauer Associates Inc.: 817 str.
- Gogala M. 2003. Žuželke Insecta. V: Živalstvo Slovenije. Sket B., Gogala M., Kuštor V. (ur.). Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 262-265
- Goodman R., Blank, M. 2002. Insights Into Electromagnetic Interaction Mechanism. Journal of Cellular Physiology, 192: 16-22
- Hameroff S.R., Tuszynski J.A. 2004. Quantum states in proteins and protein assemblies: The essence of life? V: Abott D., Bezrukov S.M., Der A., Sanchez A. (Eds.).Fluctuations and Noise in Biological, Biophysical, and Biomedical Systems II.Proceedings of the SPIE, 5467: 27-41

http://www.valdostamuseum.org/hamsmith/SHJTQprotein.pdf (12. jun. 2009)

- Heliognosis manufacturer of the Life Energy Meter. http://www.heliognosis.com (3. avg. 2009)
- Ho M.-W., Stone T.A., Jerman I., Bolton J., Bolton H., Goodwin B.C., Saunders P.T., Robertson F. 1992. Brief exposures to weak static magnetic field during early embryogenesis cause cuticular pattern abnormalities in *Drosophila* larvae. Physics in Medicine and Bioogy, 37, 5: 1171-1179
- Hyland G.J. 2003. Bio-electromagnetism. V: Integrative Biophysics: Biophotonics. PoppF.-A. in Beloussov L. (Eds.) Dordrecht, Boston, London, Kluwer Academic Publishers: 117-148
- ICNIRP (International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection. 1998. Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic, and electromagnetic fields (up to 300 GHz). Health Physics, 74, 4: 494-522
- Ionizing radiation. From Wikipedia, the free encyclopedia. Wikimedia Foundation, Inc. (14. avg. 2009)

http://en.wikipedia.org/wiki/Ionizing_radiation (16. avg. 2009)

- Jejčič L. 2008. Bližnje električno polje kot kazalnik fiziološkega in ontogenetskega stanja pri mokarju (*Tenebrio molitor*). Diplomsko delo. Univerzitetni študij. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 44 str. http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/biologija.htm (18. dec. 2008)
- Klots A.B., Klots E.B. 1970. Žuželke. Ljubljana, Mladinska knjiga: 356 str.
- Kohler I., Meier R., Busato A., Neiger-Aeschbacher G., Schatzmann U. 1999. Is carbon dioxide (CO2) a useful short acting anaesthetic for small laboratory animals? Laboratory Animals, 33, 2: 155-161
- Liboff A.R. 2004. Toward an Electromagnetic Paradigm for Biology and Medicine. The Journal of Alternative and Complementary Medicine, 10, 1: 41-47
- Marino A.A., Becker R.O. 1977. Biological effects of extremely low frequency electric and magnetic fields: a review. Physiological Chemistry and Physics, 9, 2: 131-147
- McCaig C.D. 1987. Spinal neurite reabsorption and regrowth in vitro depend on the polarity of an applied electric field. Development, 100: 31-41
- Meinhardt H. 1982. Models of biological pattern formation. London, Academic Press.
- Plankar M. 2007. Bližnje električno polje kot kazalnik človekovega fiziološkega stanja. Diplomsko delo. Univerzitetni študij. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 67 str.

http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/biologija.htm (23. dec. 2008)

- Pollack G.H. 2001. Is the Cell a Gel and Why Does It Matter? Japanese Journal of Physiology, 51, 6: 649-660
- Prolić Z.M., Nenadović V. 1995. The influence of a permanent magnetic field on the process of adult emergence in *Tenebrio molitor*. Journal of Insect Physiology, 41, 12: 1113-1118
- Ruppert E.E., Fox R.S., Barnes R.D. 2004. Invertebrate Zoology. A functionalEvolutionary Approach. 7th edition. Belmont, Brooks/Cole, Thomson Learning Inc.: 963 str.
- Schmitt R. 2000. Understanding electromagnetic fields and antenna radiation takes (almost) no math. Electronics Design, Strategy, News, 3: 77-88 http://www.edn.com/article/CA82250.html (12. jun. 2009)

- Schmitt R. 2002. Electromagnetics explained: a handbook for wireless/RF, EMC, and high-speed electronics. Amsterdam, Boston, London, Oxford, New York, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, Newness, Elsevier: 359 str.
- Singh P. HortFACT. Yellow Mealworm Life Cycle. 1998. The Horticulture and Food Research Institute of New Zealand Ltd.

http://www.hortnet.co.nz/publications/hortfacts/hf401013.htm (16. jul. 2009)

Strnad J. 1991. Fizika. 4. izdaja. Leksikoni Cankarjeve založbe. Ljubljana, Cankarjeva založba.

9.2 DRUGI VIRI

- Barnes A.I., Siva-Jothy M.T. 2000. Density-dependent prophylaxis in the mealworm beetle *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae): cuticular melanization is an indicator of investment in immunity. Proceedings of the Royal Society B, 267: 177-182
- Darkling Beetle/Mealworm Information. 1997. Center for Insect Science Education Outreach. The University of Arizona.

http://insected.arizona.edu/mealinfo.htm (16. jul. 2009)

- Falugi C., Grattarola M., Prestipino G. 1987. Effects of low-intensity pulsedelectromagnetic fields on the early development of sea urchins. Biophysical Journal, 51:999-1003
- Fröhlich H. 1975. The extraordinary dielectric properties of biological materials and the action of enzymes (metastable states in enzymes/coherent vibrations in biological materials). Proceedingsof the National Academy of Sciences of the United States of America, 72, 11: 4211-4215
- Ho M.-W. 1994. What is (Schrödinger's) Negentropy? Modern Trends in BioThermoKinetics, 3: 50-61
- Ho M.-W. 1995. Bioenergetics and the Coherence of Organisms. Neuronetwork World, 5: 733-750
- Ho M-W. 1997. Quantum Coherence and Conscious Experience. Kybernetes, 26: 265-276
- Ho M.-W. 2004a. Nature is Quantum, Really. Institute of Science in Society Report 16.03.04
 - http://www.i-sis.org.uk/quantumworldcoming.php (12. jun. 2009)

Ho M.-W. 2004b. Quantum Phases and Quantum Coherence. Institute of Science in Society Report 17.03.04

http://www.i-sis.org.uk/QPAQC.php (12. jun. 2009)

- Jerman I., Štern A. 1996. Gen v valovih: porajanje nove biologije. Ljubljana, Znanstveno in publicistično središče: 300 str.
- Mealworm. From Wikipedia, the free encyclopedia. Wikimedia Foundation, Inc. (10. jul. 2009)

http://en.wikipedia.org/wiki/Mealworm (16. jul. 2009)

Mesquita M.V., Vasconcellos A.R., Luzzi R., Mascarenhas S. 2004. Systems Biology : An Information-Theoretic-Based Thermo-Statistical Approach. Brazilian Journal of Physics, 34, 2A : 459-488

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju, prof. dr. Igorju Jermanu, za vodstvo, pomoč in navdih pri pripravi in izdelavi diplomske naloge.

Zahvaljujem se recenzentu, doc. dr. Gregorju Zupančiču, za natančno branje, številne razlage in potrpežljivost.

Zahvaljujem se predsedniku komisije, doc. dr. Roku Kostanjšku, za hitro pomoč v zadnjih tednih pred diplomo in veliko prijaznosti.

Zahvaljujem se vsem, ki sem jih spoznala na Inštitutu Bion, za neprecenljivo pomoč in potrpežljivost, zlasti Petru in Robertu za strokovno pomoč ter Nadi, Mateju in Luki za pogovore in šale.

Na tem mestu bi se rada zahvalila tudi svoji družini za cele gore podpore, razumevanja in optimizma, še posebej pa svoji mami, ki je vskočila v ravno pravem trenutku. Svoji nečakinji bi se rada zahvalila, ker mi je dala pravo perspektivo na dosežke.

Zahvaljujem se vsem sorodnikom, prijateljem in znancem, da so pokazali zanimanje, še preden je diplomska naloga sploh nastala.

Želim se tudi zahvaliti vsem, ki sem jih spoznala tekom študija, zlasti Moniki, Katji, Idi, Pini in Heleni. Posebna misel gre Bojanu – brez njega bi bil študij biologije povsem drugačna izkušnja.

Nenazadnje se želim zahvaliti tudi svojemu učitelju za smeh, zmagovalni duh in zaupanje.

PRILOGA A

Absorpcija bližnjega polja destilirane vode

Destilirano vodo smo uporabili kot kontrolo za ugotavljanje vpliva ogljikovega dioksida na vrednosti absorpcije bližnjega polja in ugotavljali tudi odvisnost od mase. Izračunani vrednosti sta povprečje in standardna deviacija.

Preglednica 1: Absorpcija bližnjega polja destilirane vode (izmerjene vrednostii in vrednosti, normirane po masi) glede na prisotnost ogljikovega dioksida v sistemu; čas dovajanja ogljikovega dioksida in masa za posamezne vzorce. Razlaga oznak: Pred – pred dovajanjem ogljikovega dioksida, Med – ogljikov dioksid prisoten v sistemu, Po – po spihanju ogljikovega dioksida.

Posamezni	Absorpcija		Absorpc	ija bližnje	Čas	Masa		
vzorci	bližnjega polja (V)			normira	na po mas	dovajanja	(g)	
	Pred	Med	Po	Pred	Med	Po	CO ₂ (s)	
1	1,167	1,245	1,249	0,409	0,437	0,438	5	2,85
2	1,234	1,318	1,310	0,430	0,459	0,456	10	2,87
3	1,191	1,250	1,250	0,424	0,445	0,445	20	2,81
4	1,284	1,361	1,348	0,432	0,458	0,454	5	2,97
5	1,230	1,320	1,300	0,454	0,487	0,480	10	2,71
6	1,272	1,344	1,334	0,446	0,471	0,468	20	2,85
7	1,275	1,328	1,313	0,451	0,469	0,464	8	2,83
8	1,232	1,317	1,310	0,437	0,467	0,465	10	2,82
9	1,289	1,351	1,348	0,457	0,479	0,478	20	2,82
Min	1,167	1,245	1,249	0,409	0,437	0,438	5	2,71
Max	1,289	1,361	1,348	0,457	0,487	0,480	20	2,97
Povprečje	1,242	1,315	1,307	0,438	0,464	0,461	12	2,84
St. deviacija	0,043	0,041	0,037	0,016	0,016	0,014	6,3	0,07

Posamezni vzorci	Masa (g)	Absorpcija bližnjega polja (V)
1	2,13	0,856
2	2,84	1,002
3	4,03	1,437
4	4,82	1,680
5	5,88	1,855
6	7,09	2,091
Min	2,13	0,856
Max	7,09	2,091
Povprečje	4,47	1,487
St. deviacija	1,86	0,485

Preglednica 2: Izmerjene vrednosti absorpcije bližnjega polja in mase pri 6 vzorcih destilirane vode pred dovajanjem ogljikovega dioksida z razponom mase med 2 in 7 g (drugi sklop meritev)

PRILOGA B1

Absorpcija bližnjega polja v odvisnosti od ogljikovega dioksida pri ličinkah na začetku larvalnega stadija

Preglednica prikazuje vrednosti absorpcije bližnjega polja glede na omamljenost, čas, ki je potreben za omrtvičenje, in maso pri ličinkah hrošča mokarja (*Tenebrio molitor*) na začetku larvalnega stadija. Preglednica prikazuje tudi vrednosti absorpcije, normirane po masi. Razlaga oznak: Pred – pred dovajanjem ogljikovega dioksida, Med – omamljenost, Po - 5 minut po zbujanju iz omamljenosti. Izračunani vrednosti sta povprečje in standardna deviacija.

Posamezni	Absorpcija			Absorpcija bližnjega polja			Čas	Masa
vzorci	bližnjega polja (V)			normira	na po ma	dovajanja	(g)	
	Pred	Med	Po	Pred	Med	Po	CO ₂ (s)	
1	1,180	1,357	1,233	0,282	0,324	0,294	5	4,19
2	1,321	1,535	1,355	0,264	0,307	0,271	5	5
3	1,595	1,709	1,593	0,261	0,280	0,261	5	6,1
4	1,707	1,900	1,703	0,250	0,278	0,249	7	6,84
5	1,062	1,208	1,060	0,299	0,340	0,299	8	3,55
6	1,192	1,270	1,113	0,291	0,310	0,272	7	4,09
7	1,068	1,228	1,054	0,284	0,327	0,280	8	3,76
8	0,857	0,920	0,847	0,332	0,357	0,328	10	2,58
9	1,109	1,426	1,127	0,290	0,373	0,295	10	3,82
10	0,815	0,940	0,820	0,395	0,456	0,398	13	2,06
Min	0,815	0,920	0,820	0,250	0,278	0,249	5	2,06
Max	1,707	1,900	1,703	0,395	0,456	0,398	13	6,84
Povprečje	1,190	1,349	1,191	0,295	0,335	0,295	7,8	4,20
St. deviacija	0,286	0,310	0,290	0,042	0,052	0,043	2,6	1,46

PRILOGA B2

Absorpcija bližnjega polja v odvisnosti od ogljikovega dioksida pri ličinkah tik pred stadijem bube

Preglednica prikazuje vrednosti absorpcije bližnjega polja glede na omamljenost, čas, ki je potreben za omrtvičenje, in maso pri ličinkah hrošča mokarja (*Tenebrio molitor*) tik pred stadijem bube. Preglednica prikazuje tudi vrednosti absorpcije, normirane po masi. Razlaga oznak: Pred – pred dovajanjem ogljikovega dioksida, Med – omamljenost, Po - 5 minut po zbujanju iz omamljenosti. Izračunani vrednosti sta povprečje in standardna deviacija.

Posamezni	Absorpcija			Absorpo	cija bližnj	Čas	Masa	
vzorci	bližnje	ega polj	a (V)	normira	na po ma	dovajanja	(g)	
	Pred	Med	Po	Pred	Med	Po	CO ₂ (s)	
1	1,480	1,557	1,332	0,275	0,289	0,247	8	5,39
2	1,285	1,308	1,283	0,256	0,261	0,255	5	5,02
3	1,398	1,491	1,300	0,253	0,270	0,235	20	5,52
4	1,315	1,457	1,315	0,259	0,287	0,259	10	5,07
5	1,154	1,230	1,219	0,238	0,254	0,251	20	4,85
6	1,131	1,184	1,139	0,244	0,255	0,245	20	4,64
7	1,095	1,206	1,064	0,259	0,286	0,252	20	4,22
8	1,231	1,186	1,154	0,264	0,255	0,248	20	4,66
Min	1,095	1,184	1,064	0,238	0,254	0,235	5	4,22
Max	1,480	1,557	1,332	0,275	0,289	0,259	20	5,52
Povprečje	1,261	1,327	1,226	0,256	0,270	0,249	15,4	4,92
St. deviacija	0,135	0,152	0,098	0,011	0,016	0,007	6,5	0,42

PRILOGA B3

Absorpcija bližnjega polja v odvisnosti od ogljikovega dioksida pri odraslih hroščih

Preglednica prikazuje vrednosti absorpcije bližnjega polja glede na omamljenost, čas, ki je potreben za omrtvičenje, in maso pri odraslih hroščih mokarjih (*Tenebrio molitor*). Preglednica prikazuje tudi vrednosti absorpcije, normirane po masi. Razlaga oznak: Pred – pred dovajanjem ogljikovega dioksida, Med – omamljenost, Po* - 1-3 min po zbujanju iz omamljenosti. Izračunani vrednosti sta povprečje in standardna deviacija.

Posamezni	Absorpcija		Absorpc	ija bližnje	Čas	Masa		
vzorci	bližnje	ega polj	a (V)	normira	na po ma	dovajanja	(g)	
	Pred	Med	Po*	Pred	Med	Po*	CO ₂ (s)	
1	1,011	1,077	/	0,351	0,374	/	10	2,88
2	0,904	1,359	1,859	0,288	0,433	0,592	7	3,14
3	1,004	1,182	1,772	0,338	0,398	0,597	10	2,97
4	0,944	1,113	1,843	0,327	0,385	0,638	7	2,89
5**	0,781	1,183	1,874	0,311	0,471	0,747	3	2,51
6	0,848	1,077	1,740	0,301	0,382	0,617	10	2,82
7	0,945	1,328	1,939	0,355	0,499	0,729	15	2,66
8	0,996	1,354	1,895	0,346	0,470	0,658	20	2,88
9	0,852	1,248	1,859	0,320	0,469	0,699	20	2,66
Min	0,781	1,077	1,740	0,288	0,374	0,592	3	2,51
Max	1,011	1,359	1,939	0,355	0,499	0,747	20	3,14
Povprečje	0,920	1,214	1,848	0,326	0,431	0,659	11,3	2,82
St. deviacija	0,080	0,114	0,064	0,023	0,048	0,059	5,9	0,19

**Sklic na str. 57 in 58, Preglednica 6.

PRILOGA C

Ontogenetski stadij in absorpcija bližnjega polja

Preglednica prikazuje izmerjene vrednosti absorpcije bližnjega polja pri treh ontogenetskih stadijih: pri ličinkah na začetku larvalnega stadija (oznaka LM), pri ličinkah tik pred stadijem bube (oznaka LV) in pri odraslih hroščih (oznaka H). Merili smo brez ogljikovega dioksida. Preglednica prikazuje tudi vrednosti, normirane po masi. Izračunani vrednosti sta povprečje in standardna deviacija.

Posamezni	Absor	pcija		Absorpcija bližnjega polja			
vzorci	bližnje	ega polj	a (V)	normirana po masi (V/g)			
	LM	LV	Η	LM	LV	Н	
1	1,180	1,480	1,011	0,282	0,275	0,351	
2	1,321	1,285	0,904	0,264	0,256	0,288	
3	1,595	1,398	1,004	0,261	0,253	0,338	
4	1,707	1,315	0,944	0,250	0,259	0,327	
5	1,062	1,154	0,781	0,299	0,238	0,311	
6	1,192	1,131	0,848	0,291	0,244	0,301	
7	1,068	1,095	0,945	0,284	0,259	0,355	
8	0,857	1,231	0,996	0,332	0,264	0,346	
9	1,109	/	0,852	0,290	/	0,320	
10	0,815	/	/	0,395	/	/	
Min	0,815	1,095	0,781	0,250	0,238	0,288	
Max	1,707	1,480	1,011	0,395	0,275	0,355	
Povprečje	1,190	1,261	0,920	0,295	0,256	0,326	
St. deviacija	0,286	0,135	0,080	0,042	0,011	0,023	

PRILOGA D

Masa in absorpcija bližnjega polja

Preglednica prikazuje izmerjene vrednosti absorpcije bližnjega polja ter pripadajoče mase in število osebkov v vzorcu pri treh ontogenetskih stadijih: pri ličinkah na začetku larvalnega stadija (oznaka LM, prvi sklop meritev), pri ličinkah tik pred stadijem bube (oznaka LV2, drugi sklop meritev) in pri odraslih hroščih (oznaka H2, drugi sklop meritev). Navedene vrednosti smo izmerili brez ogljikovega dioksida.

Posamezni	Števi	ilo oset	okov	Masa	ı (g)		Absorpci	ja bližnjega	a polja (V)
vzorci	LM	LV2	H2	LM	LV2	H2	LM	LV2	H2
1	140	10	20	4,19	1,68	2,09	1,180	0,499	0,727
2	140	15	25	5	2,19	2,88	1,321	0,664	0,940
3	140	20	30	6,1	3,04	3,22	1,595	0,849	1,122
4	140	25	35	6,84	3,82	3,88	1,707	1,064	1,226
5	140	30	40	3,55	4,26	4,28	1,062	1,145	1,488
6	140	35	45	4,09	5,36	4,94	1,192	1,444	1,498
7	140	40	50	3,76	5,71	5,39	1,068	1,514	1,813
8	140	45	55	2,58	6,42	6,08	0,857	1,655	1,974
9	140	55	60	3,82	7,44	6,59	1,109	1,928	2,135
10	140	60	65	2,06	7,54	7,06	0,815	1,983	2,245
Min	/	/	/	2,06	1,68	2,09	0,815	0,499	0,727
Max	/	/	/	6,84	7,54	7,06	1,707	1,983	2,245
Povprečje	/	/	/	4,20	4,75	4,64	1,190	1,275	1,517
St. deviacija	/	/	/	1,46	2,08	1,66	0,286	0,514	0,517

PRILOGA E

Kontrolni poskus vpliva lege poskusnih živali glede na elektrodo

Izvedli smo poskus, s katerim smo ugotavljali vpliv lege živali v čaši oziroma konfiguracije vzorca na izmerjene vrednosti. Preglednica spodaj prikazuje vrednosti absorpcije v dveh različnih legah (konfiguracija 1, 2) vzorca mrtvih odraslih hroščev (*Tenebrio molitor*); prikazane so tudi vrednosti, normirane po masi.

Zaporedne	Absorpcija		Absorpcija bližnjega polja,			
meritve	bližnjega polja (V	V)	normirana po masi (V/g)			
	Konfiguracija 1	Konfiguracija 2	Konfiguracija 1	Konfiguracija 2		
1	0,586	0,681	0,357	0,415		
2	0,591	0,761	0,361	0,464		
3	0,584	0,840	0,356	0,512		
4**	0,551	0,917	0,336	0,559		
5	0,586	0,630	0,357	0,384		
6	0,632	0,823	0,386	0,502		
7	0,659	0,736	0,402	0,449		
8	0,651	0,700	0,397	0,427		
9	0,627	0,915	0,382	0,558		
10	0,650	0,807	0,397	0,492		
Min	0,551	0,630	0,336	0,384		
Max	0,659	0,917	0,402	0,559		
Povprečje	0,612	0,781	0,373	0,476		
St. deviacija	0,037	0,097	0,022	0,059		

** Sklic na str. 57 in 58, Preglednica 6.