



# **VPLIV KOFEINA NA SRČNI UTRIP**

## **VODNIH BOLH (*Daphnia magna*)**

Področje: Biologija

Šifra: 2812

Mestna občina Celje, Mladi za Celje

Laško, 2025

**Vsebina**

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 1.     | UVOD .....                                | 6  |
| 1.1    | METODOLOGIJA RAZISKOVALNEGA DELA .....    | 7  |
| 1.2    | NAMEN IN CILJI RAZISKOVALNEGA DELA .....  | 7  |
| 1.3    | HIPOTEZE.....                             | 7  |
| 2.     | TEORETIČNI DEL.....                       | 8  |
| 2.1    | TAKSONOMIJA .....                         | 8  |
| 2.2    | MORFOLOGIJA.....                          | 8  |
| 2.3    | ANATOMIJA.....                            | 9  |
| 2.3.1  | PREBAVNI SISTEM.....                      | 9  |
| 2.3.2  | KRVOŽILNI SISTEM.....                     | 10 |
| 2.3.3  | ŽIVČNI SISTEM .....                       | 11 |
| 2.3.4  | REPRODUKTIVNI SISTEM .....                | 11 |
| 2.3.5  | RAZMNOŽEVANJE IN ŽIVLJENJSKI CIKEL .....  | 11 |
| 2.4    | PREHRANA .....                            | 14 |
| 2.5    | HABITAT IN EKOLOŠKA VLOGA.....            | 14 |
| 2.6    | RAZVOJ RAZISKOVANJA VODNIH BOLH .....     | 15 |
| 2.7    | GOJENJE VODNIH BOLH IN SKRB ZA NJIH ..... | 15 |
| 2.8    | KOFEIN .....                              | 16 |
| 2.9    | ZGODOVINA KOFEINA .....                   | 17 |
| 2.10   | VIRI KOFEINA .....                        | 17 |
| 2.11   | VPLIVI KOFEINA NA ČLOVEKA .....           | 18 |
| 2.11.1 | PRESNOVA KOFEINA .....                    | 18 |
| 2.11.2 | VPLIV NA ZDRAVJE ČLOVEKA .....            | 18 |
| 2.11.3 | POZITIVNI UČINKI .....                    | 19 |
| 2.11.4 | NEGATIVNI UČINKI.....                     | 19 |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 2.12   | VPLIV KOFEINA NA SRCE.....                          | 20 |
| 2.12.1 | KOFEIN IN SRČNI UTRIP VODNIH BOLH .....             | 20 |
| 3.     | EKSPERIMENTALNI DEL .....                           | 22 |
| 3.1    | UVOD K EKSPERIMENTU .....                           | 22 |
| 3.2    | PRIPOMOČKI .....                                    | 22 |
| 3.3    | MASNE KONCENTRACIJE RAZTOPIN .....                  | 23 |
| 3.4    | PRIPRAVA RAZTOPIN KOFEINA IN DESTILIRANE VODE ..... | 24 |
| 3.5    | PRIPRAVA MIKROSKOPSKIH PREPARATOV .....             | 24 |
| 3.6    | KONTROLNI DEL EKSPERIMENTA .....                    | 25 |
| 3.7    | PREPARATI Z RAZTOPINAMI KOFEINA.....                | 25 |
| 3.8    | MIKROSKOPIRANJE.....                                | 26 |
| 3.9    | KONTROLNI EKSPERIMENT .....                         | 26 |
| 3.10   | EKSPERIMENT Z RAZTOPINAMI KOFEINA.....              | 26 |
| 3.11   | ZBIRANJE PODATKOV .....                             | 27 |
| 4.     | REZULTATI.....                                      | 28 |
| 4.1    | VPLIV ČASA IZPOSTAVLJENOSTI.....                    | 30 |
| 5.     | RAZPRAVA .....                                      | 33 |
| 6.     | ZAKLJUČEK.....                                      | 35 |
|        | Hipoteza 1 .....                                    | 35 |
|        | Hipoteza 2 .....                                    | 36 |
|        | Hipoteza 3 .....                                    | 36 |
|        | Hipoteza 4 .....                                    | 36 |
| 7.     | LITERATURA.....                                     | 37 |

## KAZALO SLIK

|  |    |
|--|----|
| Slika 1: Ventralni pogled na odraslo samico vodne bolhe. (Dieter, 2005) .....  | 9  |
| Slika 2: Črevesje <i>Daphnia magna</i> . (Dieter, 2005).....   | 10 |
| Slika 3: Skica notranjosti telesa samice vodne bolhe. (Fox, 2006).....   | 10 |
| Slika 4: Srce vodne bolhe pri srednji (100x) povečavi mikroskopa. ....   | 11 |
| Slika 5: Odrasla samica vodne bolhe s tremi jajci v zaležni komori. (Dieter, 2005).....  | 12 |
| Slika 6: Samice vodne bolhe s haploidnim jajčecem, ki zahteva oploditev. (Dieter, 2005) ....   | 13 |
| Slika 7: Življenjski cikel vodne bolhe. (Dieter, 2005) .....   | 14 |
| Slika 8: Molekularna struktura kofeina. (Kupka, 2024).....   | 17 |
| Slika 9: Pripomočki; a:Kamera za mikroskop, b: čaša prostornine 50ml, c:stojalo za epruvete, d: precizna tehtnica KERN, e: zatemnjena steklenica, f:brezvodni kofein v prahu. .... | 23 |
| Slika 10: Preparati z vodno bolho in raztopine kofeina. ....   | 24 |
| Slika 11: Vodne bolhe v pladnju pred začetkom eksperimenta. ....   | 25 |
| Slika 12: Mikroskop in računalnik, ki sta bila uporabljena pri eksperimentu.....   | 26 |

## KAZALO GRAFOV

|   |    |
|---|----|
| Graf 1: Povprečne vrednosti števila srčnih utripov po 5 minutah v primerjavi s kontrolo. .... | 28 |
| Graf 2: Povprečne vrednosti števila srčnih utripov po 10 minutah v primerjavi s kontrolo. ... | 29 |
| Graf 3: Povprečne vrednosti števila srčnih utripov po 10 minutah v primerjavi s kontrolo. ... | 30 |
| Graf 4: Število srčnih utripov pri koncentraciji 0,08 g/L. ....                               | 31 |
| Graf 5: Število srčnih utripov pri koncentraciji 0,16 g/L.....                                | 31 |
| Graf 6: Število srčnih utripov pri koncentraciji 0,24 g/L. ....                               | 32 |

## POVZETEK

Kofein postaja vse bolj vsakdanji človekov spremljevalec v prehrani in prehranskih dopolnilih. Hrani je danes dodanih veliko kemičnih spojin, med njimi tudi kofein, zato raziskovalci preučujejo njihove vplive na človeški organizem. Pri testih toksičnosti se uporabljajo testni organizmi. Namen naše raziskovalne naloge je bil z metodo eksperimenta preučiti, kako različne koncentracije kofeina vplivajo na hitrost srčnega utripa testnih organizmov. Pri tem smo kot testne organizme uporabili vodne bolhe (*Daphnia magna*) in s pomočjo svetlobne mikroskopije raziskali vpliv kofeina na njihov srčni utrip. Uporabljene so bile tri različne koncentracije kofeina in destilirane vode: 0,08 g/L, 0,16 g/L in 0,24 g/L. Poleg tega so bili posnetki izvedeni po dveh časovnih postavkah, po 5 in 10 minutah. Raziskava je pokazala, da kofein zniža število srčnih utripov vodnih bolh. Poleg tega smo zaradi različnih koncentracij kofeina dokazali tudi, da različne koncentracije različno vplivajo na srčni utrip, in sicer večja kot je koncentracija, večje je znižanje utripa. Rezultati so pokazali tudi vpliv časa izpostavljenosti – daljši kot je bil čas izpostavljenosti, večje znižanje srčnega utripa je bilo opazno pri organizmih. Ker kofein postaja vse bolj prisoten v izdelkih, se povečuje verjetnost njegovega pojavljanja tudi v naravnih (predvsem vodnih) ekosistemih, zato je poznavanje njegovega vpliva na organizme ključnega pomena.

**Ključne besede:** Vodne bolhe, kofein, srce, srčni utrip, *Daphnia magna*

## ABSTRACT

Caffeine is becoming an increasingly common component of human diets and dietary supplements. Similar to caffeine, many other chemical compounds are added to food, prompting researchers to study their effects on the human body. Test organisms are commonly used in toxicity tests. The aim of our research was to experimentally investigate how different concentrations of caffeine affect the heart rate of test organisms. We used water fleas (*Daphnia magna*) as test organisms and examined the effect of caffeine on their heart rate using light microscopy. Three different caffeine concentrations in distilled water were tested: 0.08 g/L, 0.16 g/L, and 0.24 g/L. Additionally, observations were recorded at two time points: after 5 and 10 minutes. The study demonstrated that caffeine decreases the heart rate of water fleas. Furthermore, we confirmed that different concentrations have varying effects on heart rate: the higher the caffeine concentration, the greater the reduction in heart rate. The results also revealed the influence of exposure time, showing that prolonged exposure led to a more pronounced decrease in heart rate. As caffeine becomes increasingly prevalent in consumer products, its presence in natural ecosystems, particularly aquatic environments, is also rising. Therefore, understanding its impact on organisms is of critical importance.

**Keywords:** Water fleas, caffeine, heart, heart rate, *Daphnia magna*

## 1. UVOD

Od prvih poskusov prodaje energijskih pijač v ZDA, kot so Dr Pepper in pozneje Red bull, je popularnost in prodaja le-teh eksponentno narasla. Danes poznamo nešteto podjetij, svetovno znanih in manj znanih, ki proizvajajo energijske pijače. Oglaševanje in vabljive embalaže ter malo podatkov o nevarnostih za zdravje omogočajo industriji energijskih pijač veliko prodajnost njihovih izdelkov in velike dobičke.

Danes so energijske pijače izredno lahko dostopne vsem starostnim skupinam. To pomeni, da lahko otroci in najstniki dostopajo do izdelkov, katerih negativnih učinkov se ne zavedajo oz. jih ne poznajo.

Ena glavnih sestavin energijskih pijač je kofein, naravni stimulant in droga, ki je danes dodan tudi mnogim drugim živilom in prehranskim dodatkom. Splošna javnost pozna njegove pozitivne učinke na telo, kot so povečana budnost in pozornost. Vse bolj zaskrbljujoča pa je vse večja prisotnost kofeina v živilih in vse večji vnos kofeina v telo. Slednje je povzročilo vse večje zanimanje za kofein in njegove vplive na človeški organizem med pristojnimi organi in raziskovalci.

Dosedanje študije so že dokazale, da je prekomerno uživanje kofeina škodljivo za nosečnice, otroke in mladostnike ter med drugim tudi za ljudi s srčnimi težavami.

Vpliv kofeina na srce in srčni ritem ter njegovo delovanje je še vedno slabo raziskano. Raziskave o vplivih kofeina podajajo različne rezultate. Zanimalo nas je, kakšne rezultate bi podala še ena raziskava na področju vpliva kofeina na srce in srčni ritem.

Neposrednega vpliva kofeina na človeka v okviru raziskave ni bilo mogoče izvesti, zato smo si pomagali s testnimi organizmi, v tem primeru vodnimi bolhami (*Daphnia magna*). Slednje so relativno preprost in široko uporabljen organizem za testiranje vpliva različnih snovi. Tokrat so bile vodne bolhe izpostavljene različnim masnim koncentracijam kofeina.

## 1.1 METODOLOGIJA RAZISKOVALNEGA DELA

V raziskovalni nalogi smo uporabili naslednje raziskovalne metode:

- Z deskriptivno metodo smo predstavili teoretična izhodišča.
- Z metodo eksperimenta smo pridobili podatke o vplivu kofeina na srčni utrip vodnih bolh.
- Z metodo analize podatkov smo interpretirali dobljene rezultate.
- Z metodo komparacije smo naše dobljene rezultate primerjali z že opravljenimi podobnimi študijami.

## 1.2 NAMEN IN CILJI RAZISKOVALNEGA DELA

Namen raziskovalne naloge je bil preučiti, kako različne koncentracije kofeina vplivajo na hitrost srčnega utripa vodne bolhe vrste *Daphnia magna*.

Cilji raziskovalne naloge so bili:

- Raziskati, kako je mogoče testne organizme vodne bolhe vrste *Daphnia magna* gojiti v laboratorijskih razmerah.
- Izračunati ustrezne masne koncentracije in pripraviti ustrezne raztopine za eksperiment.
- Spoznati računalniški program Program Motic Images Plus 3.0(x64) in z njim ustvariti mikroskopske posnetke srčnega utripa vodne bolhe (*Daphnia magna*).
- Raziskati, kako različne koncentracije kofeina vplivajo na srčni utrip vodnih bolh (*Daphnia magna*).
- Raziskati, kako različna časovna obdobja izpostavljenosti različnim koncentracijam kofeina vplivajo na spremembo srčnega utripa.

## 1.3 HIPOTEZE

Hipoteza 1: Prisotnost kofeina bo vplivala na srčni utrip vodnih bolh (*Daphnia magna*).

Hipoteza 2: Zaradi prisotnosti kofeina se bo srčni utrip vodne bolhe povišal.

Hipoteza 3: Število srčnih utripov se bo med posameznimi koncentracijami razlikovalo.

Hipoteza 4: Razlika med normalnim srčnim utripom in srčnim utripom po izpostavljenosti kofeinu bo po daljšem času izpostavljenosti (10 min) večja.

## 2. TEORETIČNI DEL

### 2.1 TAKSONOMIJA

Splošno slovensko ime organizma je vodna bolha. Rod vodnih bolh (*Daphnia sp.*) spada v domeno evkarionti, znotraj nje pa v kraljestvo živali. Organizmi so del debela členonožci in poddebla raki, kamor sodijo tudi kozice, jastogi in raki.

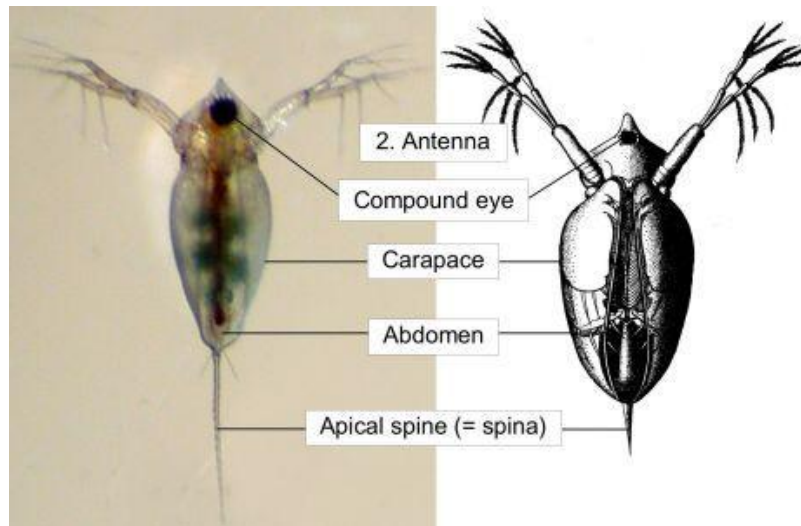
Vodne bolhe spadajo v razred Branchiopoda oz. raki listonožci, znotraj slednjega pa v red Cladocera ali Amnopaoda/vodne bolhe. Rod vodnih bolh uvrščamo v družino vodnih bolh ali Daphniade. Poznamo več kot 100 vrst vodnih bolh, med njimi sta na primer: *Daphnia magna* in *D. pulex*.

### 2.2 MORFOLOGIJA

Telo odraslih osebkov vodnih bolh je prosojno, bočno stisnjeno in izrazito trebušasto. Obdaja ga dvodelni oklep oz. lupina, imenovana karapaks. Slednji je po hrbtnem delu gredljat, konča pa se s trnastim izrastkom. Zgrajen je večinoma iz hitina. Celotno telo je prosojno, kar omogoča pogled v njihovo notranjo anatomijo. (Fox, 2006)

Vodne bolhe imajo pigmentirano sestavljeno oko, sestavljeno iz 22 omatidijev. Oko nastane iz dveh delov, ki se združita pri embrionalnem razvoju. Oko je obdano z očesnimi mišicami, ki mu omogočajo premikanje. (Mee, in drugi, 2022)

Glava je kljunasta in upognjena navzdol. Ventralni (na trebušni strani) del glave tvori koničast rostrum. Dorzalno (hrbta stran) je glava povezana s preostalim delom telesa, ventralno pa je ločena z razpoko. Na glavi imajo vodne bolhe dva para anten oz. tipalnic. Drugi par je povečan in preoblikovan v plavalni organ. Slednji izhaja iz enega bazalnega člana, peclja, ki ga upravljajo mišice. Na vrhu peclja se struktura razcepi v dva dela. Oba dela imata na vrhu ščetinaste strukture, ki povečajo površino antene in tako pomagajo pri plavanju. Prvi par je zelo majhen in se nahaja na konici rostruma. (Fox, 2006) (Dieter, 2005)

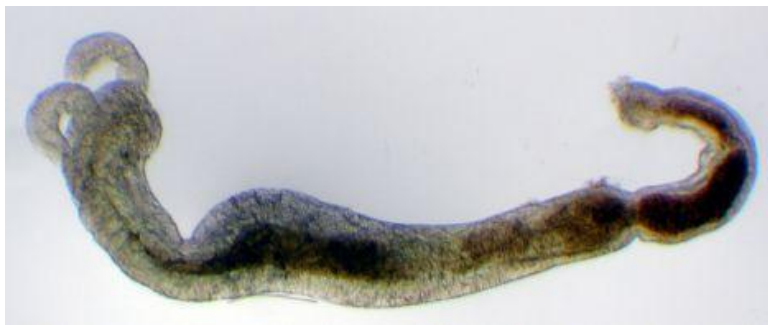


Slika 1: Ventralni pogled na odraslo samico vodne bolhe. (Dieter, 2005)

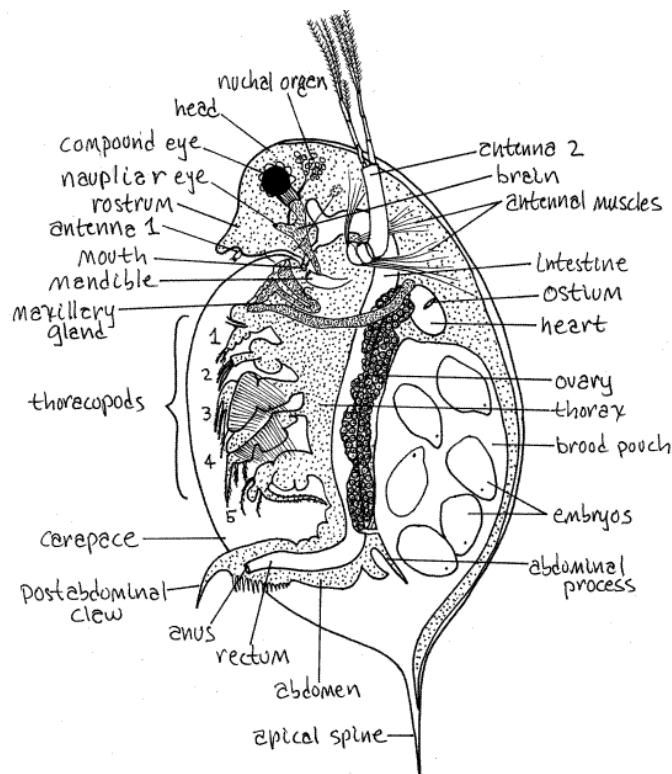
## 2.3 ANATOMIJA

### 2.3.1 PREBAVNI SISTEM

Vodne bolhe so filtratorji, prehranjujejo se s filtriranjem snovi iz vode. Hrano filtrirajo s pomočjo petih (pri *D. magna*) okončin v prsnem košu (Slika 3). Sploščene, listom podobne okončine ustvarjajo vodni tok od sprednje strani proti zadnji in tako lovijo hrano. Hrano nato zadrži filtrirni aparat (ang. setal filter), dokler ta ne doseže ust. Nato potuje skozi mandibulo (ang. mandibles) (Slika 3) in vstopi v požiralnik, ki je prvi del prebavnega sistema vodnih bolh. Poleg požiralnika prebavni sistem sestavljajo še parna jetrna čreva, srednje črevo in zadnje črevo. Srednje črevo je obloženo z visokoprizmatskimi epitelnimi celicami mikrovili. Peristaltika črevesa omogoča premikanje hrane skozi celotno črevo. Zadnje črevo je obloženo z izoprizmatskimi epitelnimi celicami. Del prebavil je tudi labrum (ang. labrum) (Slika 3), ki vsebuje labralno žlezo, ki sodelujejo pri prebavi hrane. Črevo se konča z anusom, ki se nahaja na zadnji strani trebuha vodne bolhe. Poleg anusa je par krempljev, ki skrbi za čiščenje. (Mee, in drugi, 2022) (Fox, 2006) (Dieter, 2005)



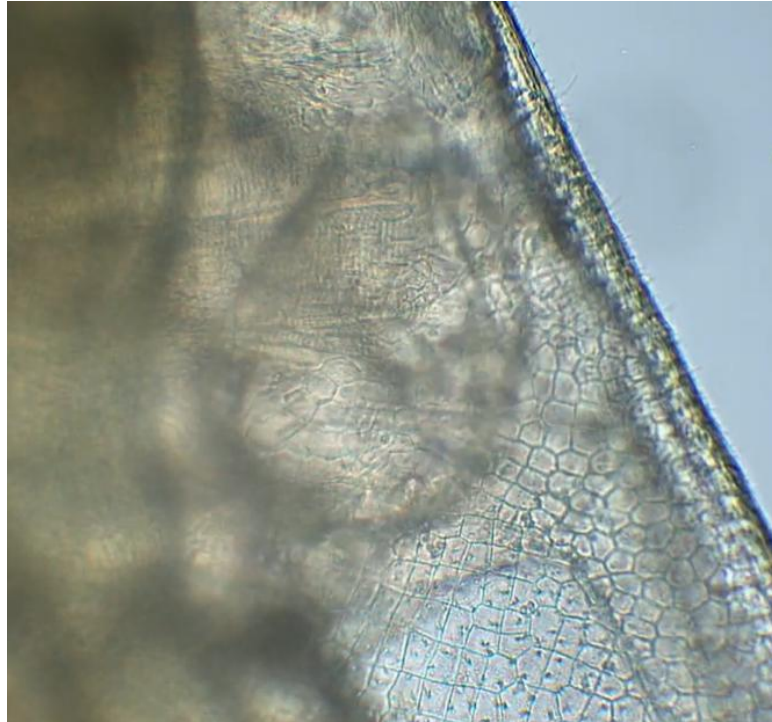
Slika 2: Črevesje *Daphnia magna*. (Dieter, 2005)



Slika 3: Skica notranjosti telesa samice vodne bolhe. (Fox, 2006)

### 2.3.2 KRVOŽILNI SISTEM

Vodne bolhe imajo odprt krvožilni sistem. Ovalno srce se nahaja dorzalno (Slika 3) in ga lahko vidimo pri veliki in srednji povečavi mikroskopa (Slika 4). Pri sobni temperaturi srce utripne približno 200-krat na minuto, pri nižji temperaturi pa se število utripov na minuto zmanjša. Zaradi prosojne lupine se pod mikroskopom vidi tudi pretakanje hemolimfe, ki v nekaterih primerih vsebuje tudi beljakovino hemoglobin, ki pomaga pri transportu kisika. (Dieter, 2005) (Fox, 2006) (Mee, in drugi, 2022)



Slika 4: Srce vodne bolhe pri srednji (100x) povečavi mikroskopa.

### 2.3.3 ŽIVČNI SISTEM

Vsak izmed 22 omatidijev sestavljenega očesa ima optični živec, ki se povezuje z možganskim ganglijem. Možganski ganglij je preko dveh verig živčnih vrvic povezan do preostalih struktur. (Mee, in drugi, 2022)

### 2.3.4 REPRODUKTIVNI SISTEM

Spolne žleze, jajčniki pri samicah in testisi pri samcih, so parne in se nahajajo vzdolž črevesja. Pri samicah je jajčnik preko jajcevoda povezan z valilnikom, kjer se razvijajo zarodki. Pri samcih pa so spolne žleze preko semenovoda povezane z odprtino na spodnji strani trebuha, kjer se, med razmnoževanjem, semenska tekočina izloči iz telesa. (Mee, in drugi, 2022) (Fox, 2006)

### 2.3.5 RAZMNOŽEVANJE IN ŽIVLJENJSKI CIKEL

Vodne bolhe in tudi vsi predstavniki reda Cladocera se lahko razmnožujejo spolno ali nespolno – s partenogenezo. (Mee, in drugi, 2022)

V ugodnih okoljskih razmerah se vodne bolhe razmnožujejo partenogenetsko (Slika 7). Takrat nastanejo gensko enaki zarodki in le ženski osebki. Partenogenetska jajčeca so

diploidna ( $2n$ ) in shranjena v valilniku (Slika 3). Jajčeca imajo malo rumenjaka in v valilniku ostanejo, dokler se ne izležejo zarodki. (Fox, 2006) Pri sobni temperaturi ( $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) se zarodki izležejo iz jajčec po približno enem dnevu. Pri večini vrst nato ostanejo v valilniku še za nadaljnji razvoj. Po približno treh dneh samica jajčeca izpusti, tako da pomakne svoj trebuh navzdol. Število jajčec v posameznem leglu se med vrstami vodnih bolh razlikuje. Za *D. magna* je značilno deset do petnajst jajčec. Samica proizvede leglo takšnih jajčec v obdobjih med posameznimi levitvami. (Science, 2021) (Dieter, 2005) (Mee, in drugi, 2022)



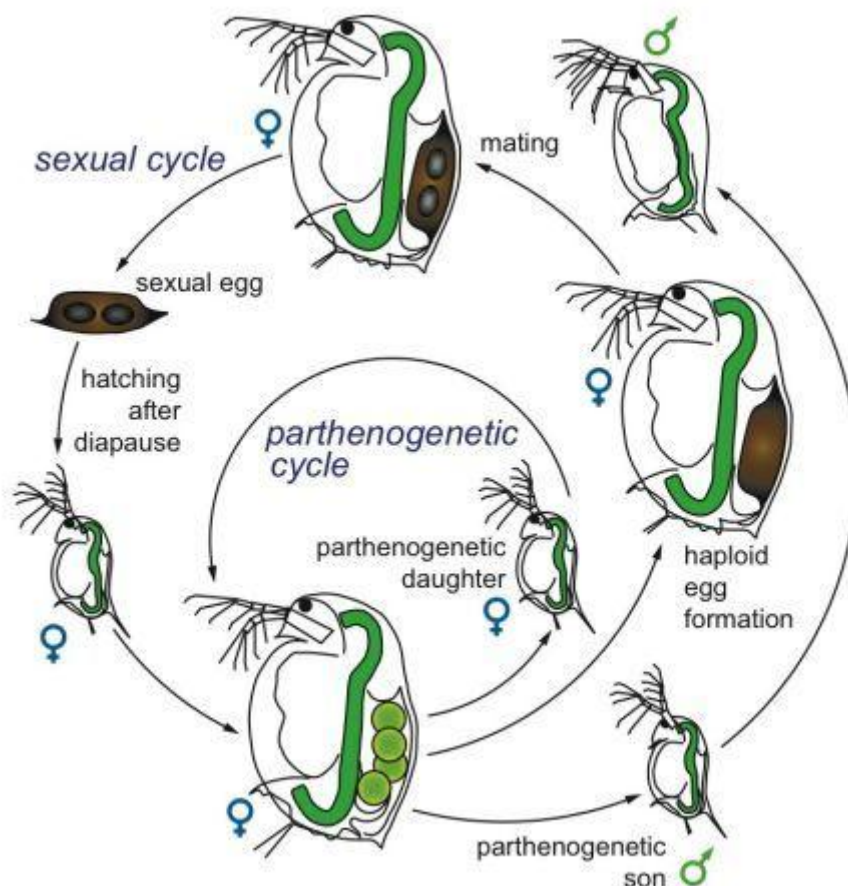
Slika 5: Odrasla samica vodne bolhe s tremi jajci v zaležni komori. (Dieter, 2005)

Spolno razmnoževanje (Slika 7) vodnih bolh se običajno pojavi, kadar so razmere v okolju neugodne, kot na primer povečana gostota samic, zmanjšanje zaloga hrane, sprememba temperature ... V takšnem obdobju se samci pari s specializiranimi samicami, ki proizvajajo haploidna ( $n$ ) jajčeca. Samica vedno proizvede le dve takšni haploidni jajčeci. Po oploditvi imajo jajčeca debelo lupino in veliko rumenjaka, za razliko od partenogenetskih jajčec se razvoj "zimskih jajčec" ustavi na stopnji 3.000 celic. (Mee, in drugi, 2022) Stene valilnika se zgostijo in tvorijo zimski jajčeca (efipij). Samica jajčeca odloži med levitvijo. Jajčeci nato lebdita v vodi ali pa potoneta na dno vodnega telesa. Efipij in mirujoči zarodek v njem sta zmožna prenesti spremenljive okoljske razmere, kot so poletne in zimske suše, celo več let. (Fox, 2006) (Science, 2021)

Ko se mlada bolha izleže iz jajčeca, je že precej podobna odrasli vodni bolhi, le valilnik še ni v polnosti razvit. Preden vodna bolha prvič proizvede jajčeca, preide štiri do šest stopenj, kar doseže v 5–10 dneh. Odrasla samica vodne bolhe lahko proizvede jajčeca vsake tri do štiri dni, dokler ne umre. (Dieter, 2005)



Slika 6: Samice vodne bolhe s haploidnim jajčecem, ki zahteva oploditev. (Dieter, 2005)



Slika 7: Življenjski cikel vodne bolhe. (Dieter, 2005)

## 2.4 PREHRANA

Vodne bolhe so rastlinojede živali. Njihova prehrana je večinoma sestavljena iz zooplanktona, alg in fitoplanktona, vendar lahko iz vode prefiltrirajo tudi baterije. Hrana, ki jo uživajo vodne bolhe, ima vpliv tudi na barvo telesa. Vodne bolhe, ki uživajo veliko zelenih alg, bodo prozorne z zelenim odtenkom. Organizmi, ki pa se večinoma hranijo z bakterijami, bodo bele ali rožnate barve. Dobro prehranjeno vodno bolho lahko spoznamo po tem, da bo močnejše obarvana kot tista, ki je slabše hranjena. (Dieter, 2005) (Elenbaas, 2013)

## 2.5 HABITAT IN EKOLOŠKA VLOGA

Populacije vodnih bolh najdemo v različnih vodnih telesih: v jezerih, potokih in tudi majhnih začasnih lužah. Najpogostejši vrsti, ki ju srečamo v naravi, sta *D. magna* in *D. Pulex*. Živijo kot plankton prosto v vodi ali pritrjene na rastline. Vodne bolhe so pelagični organizmi, ki imajo pomembno vlogo v prehranjevalnih spletih. So pomembni porabniki fitoplanktona in s tem povzročijo sezonsko čiščenje vode. Ker se poleg fitoplanktona in zooplanktona

prehranjujejo tudi z bakterijami, vplivajo tudi na mikrobne skupnosti. Pogosto so prevladujoči organizmi zooplanktona ter tako najpogostejša hrana za ribe in nevretenčarje, ki se prehranjujejo z zooplanktonom. Vodne bolhe so zelo hranljiv vir hrane, saj vsebujejo veliko fosforja. Vodne bolhe v ekosistemu igrajo tudi vlogo gostitelja, saj pri njih srečamo mnoge bakterijske in glivične parazite. (Dieter, 2005) (Miner, De Meester, Pfrender, Lampert, & Hairston, 2012)

## 2.6 RAZVOJ RAZISKOVANJA VODNIH BOLH

Vodna bolha je pomemben organizem za raziskovanje na interdisciplinarnih področjih, kot so evolucijska biologija, toksikologija in ekologija. Leta 1944 je Bertil G. Anderson začel z uporabo *Daphnia magna* v toksikoloških študijah za oceno toksičnosti snovi v odpadnih vodah. Pred njim sta vodne bolhe preučevala tudi August Weismann in Élie Metchnikof. (Anderson, 1944)

Danes je izvajanje toksikoloških raziskav s pomočjo vodnih bolh zelo pogosto, predvsem pri ocenjevanju toksičnosti različnih spojin. V raziskavah se najpogosteje uporabljajo *D. magna* in *D. pulex*. (Ebert, 2022) Pogosto se uporabljajo testi toksičnosti, ki temeljijo na imobilizaciji in smrtnosti, testi akutne imobilizacije (test kratkotrajne in akutne toksičnosti) in testi razmnoževanja. Podrobnejše analize vodnih bolh omogočajo razlikovanje parametrov obnašanja pri plavanju, na primer: hitrost plavanja, preplavana razdalja, sposobnost obračanja in fiziološke aktivnosti, kot so srčni utrip in hitrost plavanja. (Angelika, Adam, Jarosław, Krzysztof, & Brygida, 2021)

V 20. in 21. stol. so se začele intenzivno uporabljati tudi molekularno-genetske metode. Uporaba slednjih je privedla do hitrega napredka v taksonomiji in evolucijski biologiji. Za vodne bolhe je bil idealen integriran pristop; kombinirane morfološke in molekularne metode so pomagale pri določanju med sorodnimi taksoni in razkrile neopisane vrste. (Uykova, Bochkarev, Taylor, & Kotov, 2019)

## 2.7 GOJENJE VODNIH BOLH IN SKRB ZA NJIH

Vodne bolhe za preživetje potrebujejo dovolj prostora in primerno temperaturo vode. Najustreznejša temperatura je cca 20°C. Pri višjih temperaturah bi lahko organizmi pomrli, pri nižjih pa se upočasni razmnoževanje. Za preživetje vodnih bolh zadostuje že od 2- do 20-

litraska posoda, vendar je za dolgotrajnejše gojenje primernejša posoda večje prostornine. (Science, 2021)

Za izdelavo gojišča lahko uporabimo vodo iz ribnika, vendar mora ta stati nekaj dni, da se izločijo zračni mehurčki, saj bi ti lahko povzročili smrt vodne bolhe. Lahko uporabimo tudi vodovodno vodo, ki jo nalijemo v posodo, na dno pa položimo šotni humus. (Science, 2021)

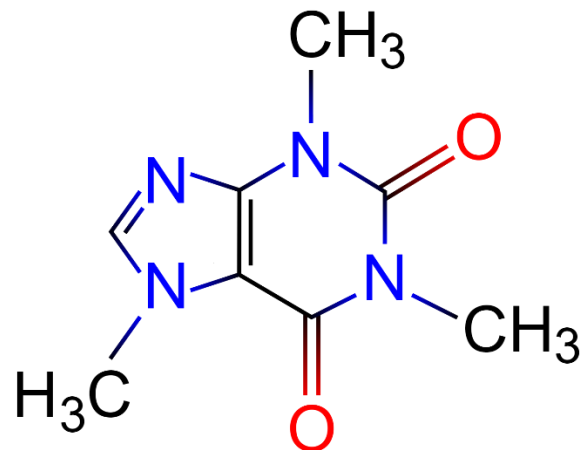
Vodne bolhe se najpogosteje hranijo z zelenimi algami ali evglenami. Hranjenje poteka enkrat do trikrat na teden. Prekomerno hranjenje lahko onesnaži vodo in škoduje organizmom. (Science, 2021) (Ebert, 2022)

Nekatere vrste vodnih bolh imajo rade sončno svetlobo, vendar se voda pri tem ne sme segreti. *D. magna* uspeva pri posredni in neposredni sončni svetlobi. (Science, 2021)

Vodo v posodi z vodnimi bolhami je priporočljivo vsak mesec zamenjati, in sicer približno polovico vode v celotni posodi. (Science, 2021)

## 2.8 KOFEIN

Kofein (1,3,7-trimetilksantin) je alkaloid (organska spojina z dušikom) s purinsko strukturo (ciklične spojine iz dveh obročev) (Kupka, 2024), ki se uporablja že več tisočletij in je danes ena najpogosteje zaužitih prehranskih sestavin po vsem svetu. Elementi, ki tvorijo kofein, so vodik, kisik, ogljik in dušik. (Kupka, 2024) Snov je topna v vodi in lipidih ter s tem zlahka prehaja krvno-možgansko pregrado (pregrada, ki preprečuje prehod strupenih snovi in povzročiteljev bolezni iz krvi v možgane (2021)) (Temple, in drugi, 2017). Je sestavina mnogih vsem poznanih pijač, npr. kave, čaja, mnogih brezalkoholnih pijač in izdelkov, ki vsebujejo kakav, ter različnih prehranskih dopolnil in zdravil. (Pavithra, 2020) (Melanie A., Jorga, & Mejia, 2010)



Slika 8: Molekularna struktura kofeina. (Kupka, 2024)

## 2.9 ZGODOVINA KOFEINA

Zgodovinarji menijo, da se kofein uživa že vsaj od leta 2737 pred našim štetjem. Takrat naj bi kitajski cesar Šen Nung skuhal prvi čaj. Veliko pozneje, v 9. stol., so v Etiopiji odkrili kavo. Pastir naj bi začel uživati kavna zrna, potem ko je opazil, da so njegove živali po zaužitju kavnih zrn dobile več energije. V 19. stol. se je začela proizvodnja energijskih pijač, ki so vsebovale kofein. Ena izmed prvih je bila Dr. Pepper, sledile pa so ji Coca-cola in Pepsi. Do 20. stol. je trgovina z energijskimi pijačami močno narasla in še raste, energijske pijače postajajo vse bolj razširjene in vse več ljudi energijske pijače s kofeinom uživa dnevno. (Melanie A., Jorga, & Mejia, 2010) Slednje ima posledice, kot so zastrupitve s kofeinom in odvisnost od kofeina. (Reissig, Strain, & Griffiths, 2009)

## 2.10 VIRI KOFEINA

Kofein kot naravni alkaloid najdemo v različnih delih (semena, listi, plodovi) več kot 60 rastlin po svetu. Najbolj znani viri kofeina so zrna koničastolistnega kolovca (*Cola acuminata*), kakavova zrna (*Theobroma cacao*) in gvaranine jagode (*Paullinia cupana*). Za glavni vir kofeina, ki se ga uporablja v prehranski industriji, pa veljajo pražena kavna zrna vrst arabski kavovec (*Coffea Arabica*), robusta (*Coffea robusta*) in čajni listi (*Camelia siniensis*). (Melanie A., Jorga, & Mejia, 2010). Poleg naravnega kofeina pa se izdelkom dodaja tudi sintetični kofein.

Največ zaužitega kofeina v državah severne Amerike se nahaja v kavi in čaju (Melanie A., Jorga, & Mejia, 2010). Prehranski viri kofeina pa so tudi mnoga zdravila, npr. zdravila za lajšanje bolečin in za lajšanje migrenskega glavobola. Zdravila na recept po navadi vsebujejo

od 30 do 60 mg kofeina. Pomemben vir vnosa kofeina v telo predstavljajo energijske pijače, ki postajajo vse bolj problematične, saj so dostopne otrokom in mladostnikom. Kofein je dodan tudi nekaterim dodatkom za hujšanje (od 50 do 200 mg kofeina). (Temple, in drugi, 2017)

## **2.11 VPLIVI KOFEINA NA ČLOVEKA**

### **2.11.1 PRESNOVA KOFEINA**

Po zaužitju se kofein relativno hitro absorbira iz prebavil v kri, v celoti se absorbira v tankem črevesu v manj kot eni uri, in se nato presnavlja v jetrih. Primarno se presnavlja z encimskim sistemom citokrom P450 (okrajšava CYP), najpogosteje z encimom CYP1A2. Razpolovna doba kofeina pri odraslem človeku je od 3 do 7 ur, kar je razmeroma dolgo. (Temple, in drugi, 2017) Pri presnovi kofeina nastanejo trije glavni metaboliti: 3,7-dimetilksantin, 1,7-dimetilksantin in 1,3-dimetilksantin. Približno 3 % metabolitov se kot kofein pojavijo v urinu. Ko se kofein absorbira v kri, začne učinkovati na različne organe v človeškem telesu. (Melanie A., Jorga, & Mejia, 2010).

Kofein deluje tako, da se veže na adenzinske receptorje perifernega (periferni živci) in centralnega (možgani in hrbtenjača) živčnega sistema ter tudi na receptorje, ki se nahajajo v različnih organih, npr. krvne žile in srce. (Temple, in drugi, 2017) Adenzin je spojina, ki upočasni delovanje možganov, ljudje pa to občutimo kot občutek utrujenosti. Ker ima kofein podobno kemijsko strukturo kot adenzin se lahko veže na iste receptorje kot adenzin. Poznamo dve glavni vrsti teh receptorjev to sta  $A_1$  in  $A_{2a}$ . Ko kofein prepreči delovanje adenzina, se poveča delovanje dopamina, spojine, ki vpliva na razpoloženje in motivacijo. Kofein tako prepreči adenzinu, da opravlja svojo nalogo, in povzroči, da so možgani bolj aktivni. (Melanie A., Jorga, & Mejia, 2010)

### **2.11.2 VPLIV NA ZDRAVJE ČLOVEKA**

Nekatere študije trdijo, da kofein nima negativnih učinkov na človeka, in poudarjajo predvsem njegove pozitivne učinke. Marsikateri pa se osredotočajo na negativne učinke kofeina, ki pa se pojavijo predvsem pri njegovem prekomernem vnosu. Nedvomno pa skodelica kave ali čaja človeku ne povzroči akutnih težav.

### 2.11.3 POZITIVNI UČINKI

Znano je, da kofein izboljša razpoloženje, reakcijski čas, budnost ... Slednje je glavna naloga kofeina v kavi in podobnih pijačah, ki vsebujejo kofein.

Poleg tega ima kofein še druge pozitivne učinke na človeški organizem. Študije so pokazale, da kofein zmanjšuje simptome Parkinsonove bolezni (poslabšanje motoričnih sposobnosti in tresenje).

Študije so tudi pokazale, da ima kofein pozitivno vlogo pri kožnem raku. Sončna svetloba in z njo UV-sevanje povzročata poškodbe na DNA. Kofein naj bi imel v tem primeru zaščitno vlogo in tako preprečeval nastanek kožnega raka. (Melanie A., Jorga, & Mejia, 2010)

Debelost je problem, na katerega opozarja tudi svetovna zdravstvena organizacija (WHO). Kofein, ki ga lahko najdemo npr. v zelenem čaju, naj bi glede na študije pripomogel k zmanjšanju prekomerne telesne teže. Podobna metoda kot uživanje čaja je tudi dodajanje kofeina hrani. (Melanie A., Jorga, & Mejia, 2010)

### 2.11.4 NEGATIVNI UČINKI

Kljub nekaj pozitivnim učinkom kofeina danes prevladuje zaskrbljenost zaradi velike vsebnosti kofeina v energijskih pijačah. Ena izmed mogočih škodljivih posledic prevelike uporabe kofeina je zastrupitev s kofeinom, ki je tudi priznana kot klinični sindrom oz. kot zdravstveno stanje. (Benčina, 2013) Posledice zastrupitve s kofeinom so živčnost, tesnoba, nemir, nespečnost ... Poleg tega pa se je pojavil problem tudi pri tem, da so energijske pijače danes zelo dostopne, kar pomeni, da lahko do njih dostopajo tudi otroci in mladostniki, ki pa so na kofein manj tolerantni, s tem pa obstaja večje tveganje za zastrupitev s kofeinom. Tudi v medijih lahko najdemo primere negativnih posledic prevelikega uživanja energijskih pijač s kofeinom. (Reissig, Strain, & Griffiths, 2009)

Opravljen je bila študija, ki je pokazala potencialno možnost za odvisnost od kofeina. Problematična je lahko tudi kombinirana uporaba kofeina in alkohola, saj kofein v kombinaciji z alkoholnimi pijačami zmanjša občutek zastrupitve z alkoholom in vinjenosti. To povzroči hujše posledice, povezane s pitjem alkohola. (Reissig, Strain, & Griffiths, 2009)

## 2.12 VPLIV KOFEINA NA SRCE

Znano je, da uživanje kofeina povzroča rahlo povišanje krvnega tlaka. Poznamo dve vrsti krvnega tlaka, sistoličnega (tlak v arterijah, ko se srce stisne) in diastoličnega (tlak v arterijah, ko se srčna prekata sprostita); kofein vpliva na obe vrsti. Poleg tega povzroča tudi neuroendokrine (neuroendokrini sistem je sistem celic, ki sestavljajo hormone in neurotransmitorje) učinke. (Temple, in drugi, 2017)

Mnoge raziskave so pokazale vpliv kofeina na srce in srčni utrip, vendar je še precej dvoumno, ali se slednji poveča ali zmanjša. (Temple, in drugi, 2017)

Kofein med drugim v telesu spodbuja sproščanje noradrenalina (neurotransmitter) in norepinefrina (hormon in živčni prenašalec). Spojini lahko pri nekaterih ljudeh povzročita povišanje srčnega utripa. (Liam, 2023)

Trajno uživanje kofeina v velikih količinah lahko vodi v atrijsko fibrilacijo. Atrijska fibrilacija je bolezen, za katero je značilen nenormalen srčni utrip, predvsem pospešen srčni utrip. Kljub temu naj za bolnike s srčnimi boleznimi ne bi bilo nevarno uživanje manjših količin kofeina dnevno. (Liam, 2023)

Drugačne rezultate pa je podala raziskava o vplivu kofeina na športnike med vadbo. Prostovoljci so prejeli tablete z 1,5 in 3,0 mg/kg kofeina. Rezultati raziskave so pokazali znižanje srčnega utripa, predvsem med nizko in zmerno vadbo. (Steven & Thomas, 2007)

Eve Simmons v članku opisuje, kako naj bi prevelika količina energijskih pijač s kofeinom, natančneje Red Bulla, povzročila srčni zastoj 34-letnega moškega. Moški naj bi užival dve do tri pločevinke energijske pijače na dan in kavo. (Simmons, 2024)

### 2.12.1 KOFEIN IN SRČNI UTRIP VODNIH BOLH

Opravljen je bilo tudi nekaj raziskav, ki so prvenstveno preučevale vpliv kofeina in drugih snovi na vodne bolhe (*Daphnia spp.*). Rezultati raziskav se med seboj razlikujejo (podobno kot rezultati raziskav vpliva kofeina na človeka), vendar se raziskave razlikujejo tudi v koncentracijah kofeina, ki je bil uporabljen pri eksperimentu, kar bi lahko vplivalo na različne rezultate.

V raziskavi Aman in Gyamesh navajata, da se je srčni utrip vodnih bolh, izpostavljenih kofeinu, zvišal. Uporabljene so bile koncentracije od 0,08 do 0,32 g/l, srčni utrip pa je bil izmerjen takoj po vnosu kofeina k vodni bolhi. (Aman & Gyanesh, 2018)

V neki drugi raziskavi pa Corotto s sodelavci navaja, da se srčni utrip vodnih bolh po izpostavljenosti kofeinu zniža. Uporabljene so bile koncentracije 0,5–2-% raztopine kofeina, vendar je v primerjavi s prejšnjim eksperimentom štetje srčnega utripa potekalo šele po od 30 do 90 minut izpostavljenosti. (Corotto, Ceballos, & Lee, 2010)

### **3. EKSPERIMENTALNI DEL**

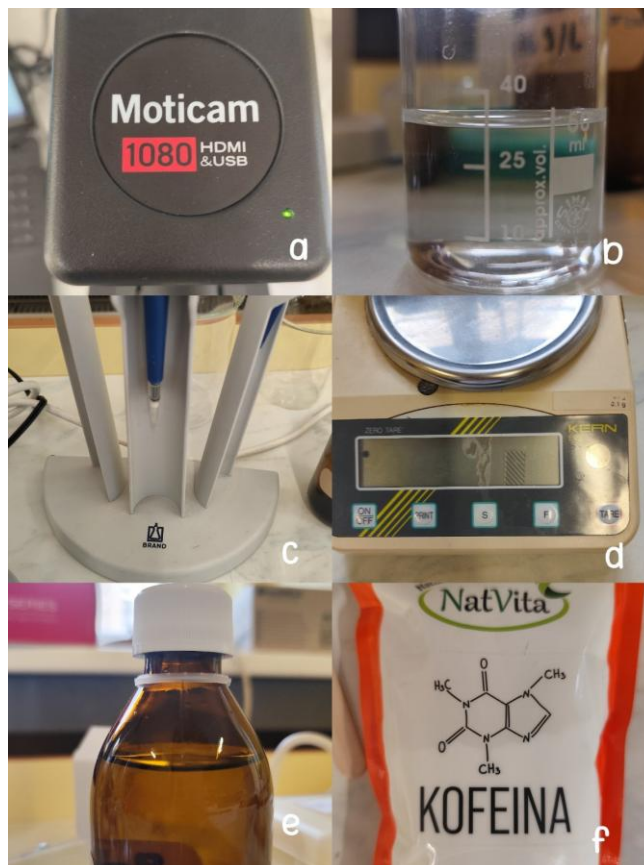
#### **3.1 UVOD K EKSPERIMENTU**

Pred začetkom laboratorijskega eksperimentalnega dela smo morali poskrbeti, da je delovni prostor primerno pripravljen. Pri uporabi aparatur in pripomočkov smo ravnali skladno z navodili z uporabo.

Za pripravo raztopin je bila uporabljena destilirana voda. Slednja je para vrele vode, ki je utekočinjena in vrnjena v tekoče stanje. V tekoči vodi so vedno raztopljeni vsaj nekateri minerali. Z destilacijo iz vode tako odstranimo večino mineralov in nečistoč.

#### **3.2 PRIPOMOČKI**

- Bučka 500 ml 3 kos
- Zamašek za bučko 1 kos
- Steklen lij 3 kos
- Tehnica KERN EW600-2M
- Zatemnjena steklenica z zamaškom 3 kos
- Računalnik
- Mikroskop Motic
- Kamera za mikroskop Moticam 1080
- Program Motic Images Plus 3.0 (x64) za snemanje mikroskopskih preparatov
- Plastična kapalka
- Čaša 50 ml 3 kos
- Čaša 100ml 1 kos
- Enokanalna mikropipeta Biohit 10-100  $\mu$ l 1 kos
- Enokanalna mikropipeta Mline 10-100  $\mu$ l 1kos
- Stojalo za pipete BRAND 1 kos
- Objektna stekelca z vdolbino 102 in krovna stekelca
- Brezvodni kofein v prahu 120 g (Nat Vita)
- Destilirana voda 2000 ml



Slika 9: Pripomočki; a: Kamera za mikroskop, b: čaša prostornine 50ml, c: stojalo za epruvete, d: precizna tehtnica KERN, e: zatemnjena steklenica, f: brezvodni kofein v prahu.

### 3.3 MASNE KONCENTRACIJE RAZTOPIN

- Raztopina kofeina, masna koncentracija 0,16 g/l. Pripravljena iz 500 ml destilirane vode in 0,08 g kofeina v prahu ...
- Raztopina kofeina, masna koncentracija 0,24 g/l. Pripravljena iz 500 ml destilirane vode in 0,16 g kofeina v prahu ...
- Raztopina kofeina, masna koncentracija 0,48 g/l. Pripravljena iz 500 ml destilirane vode in 0,24 g kofeina v prahu ...

Opomba: Masne koncentracije, ki so jim bile izpostavljene vodne bolhe, so polovico manjše od zgoraj navedenih (0,08 g/l, 0,16 g/l in 0,23 g/l), saj jim je bila med eksperimentom dodana voda iz gojišča, v kateri je bil testni organizem.

### 3.4 PRIPRAVA RAZTOPIN KOFEINA IN DESTILIRANE VODE

Za pripravo raztopin kofeina v destilirani vodi so bile uporabljene tri 500-mililitrske steklene bučke. S pomočjo tehtnice je bilo v bučke natehtano 0,08 g, 0,16 g in 0,24 g kofeina v prahu. Nato je bilo v vsako bučko nalitih 500 mililitrov destilirane vode. S pomočjo zamaška je bila bučka zaprta in z vrtenjem bučke se je kofein povsem raztopil v destilirani vodi.

Po mešanju je bila vsaka tekočina iz bučke, s pomočjo steklenega lija, prelita v stekleno zatemnjeno posodo. Izvedba slednjega je bila potrebna, saj kofein ni obstojen na svetlobi.

### 3.5 PRIPRAVA MIKROSKOPSKIH PREPARATOV

Za pripravo preparatov smo uporabili objektna stekelca z vdolbino, zaradi česar je bilo mogoče pripraviti večjo količino preparata. Nekaj vodnih bolh je bilo pred začetkom eksperimenta skupaj z vodo iz gojišča prestavljenih v manjši pladenj. V pladnju so ostale nekaj časa, tako da stres ne bi vplival na eksperiment. Del raztopin kofeina je bilo prelitih v manjše, 50-mililitrske čaše, vendar s časovnim zamikom (posamezna raztopina je bila prelita pred začetkom dela eksperimenta, pri katerem smo jo potrebovali).



*Slika 10: Preparati z vodno bolho in raztopine kofeina.*



*Slika 11: Vodne bolhe v pladnju pred začetkom eksperimenta.*

### **3.6 KONTROLNI DEL EKSPERIMENTA**

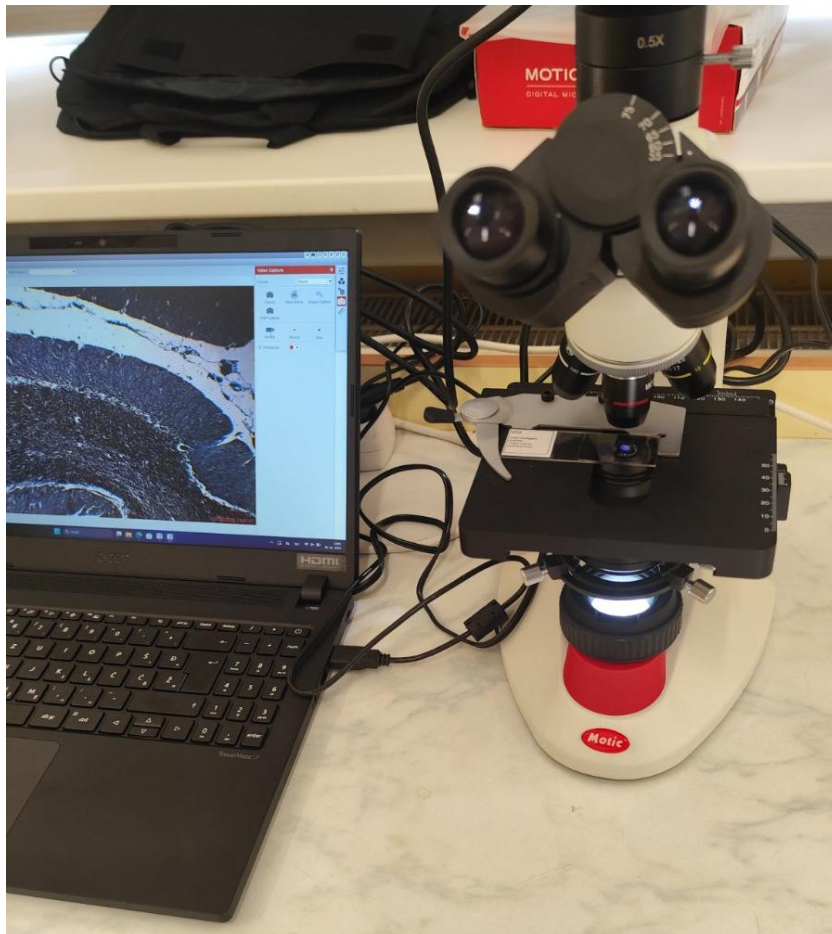
Pred delom eksperimenta, ki vsebuje raztopine kofeina je bilo treba izvesti kontrolni eksperiment z 10 organizmi. Slednji niso bili izpostavljeni raztopinam kofeina. Na objektno stekelce z vdolbino je bilo s pomočjo pipete nanosenih 25  $\mu$ l destilirane vode in nato 25  $\mu$ l vode iz pladnja z organizmi, skupaj s testnim organizmom (vodno bolho). Uporabljeni sta bili dve različni pipeti. Pipeta, s katero smo iz pladnja ulovili organizem, je imela prirezano konico, da smo organizem lažje ulovili. Tako pripravljen preparat smo pokrili s krovnim stekelcem. Postopek smo ponovili z desetimi organizmi.

### **3.7 PREPARATI Z RAZTOPINAMI KOFEINA**

Na objektno stekelce smo najprej s pomočjo pipete nanесли 25  $\mu$ L raztopine kofeina. Preparatu smo nato s pomočjo pipete s prirezano konico dodali 25  $\mu$ L vode iz gojišča vodnih bolh, v kateri je plavala tudi vodna bolha. Takšen preparat je bil nato prekrit s krovnim stekelcem. Preparati so bili pripravljeni tik pred mikroskopiranjem, da smo lahko kontrolirali čas izpostavljenosti vodnih bolh kofeinu. Takšen postopek je bil desetkrat ponovljen z vsako masno koncentracijo. Na koncu je bilo eksperimentalnim pogojem izpostavljenih trideset vodnih bolh, deset pri vsaki masni koncentraciji.

### 3.8 MIKROSKOPIRANJE

Mikroskopiranje je bilo opravljeno pri srednji povečavi mikroskopa (100x), snemano s kamero in beleženo s pomočjo programa Motic Images Plus 3.0 (x64).



Slika 12: Mikroskop in računalnik, ki sta bila uporabljena pri eksperimentu.

### 3.9 KONTROLNI EKSPERIMENT

Vodni bolhi v vodi iz gojišča in dodani destilirani vodi smo izmerili srčni utrip. S pomočjo kamere na mikroskopu in računalniškega programa je bil posnet 60-sekundni posnetek vodne bolhe, na katerem se razločno vidi bitje srca vodne bolhe. Organizem smo nato vrnili v posebej pripravljeno čašo z vodo, ne v pladenj k preostalim, da smo se izognili možnosti ponovnega izbora iste vodne bolhe, saj bi v takšnem primeru povečanje stresa lahko vplivalo na srčni utrip in pridobljene rezultate.

### 3.10 EKSPERIMENT Z RAZTOPINAMI KOFEINA

Vsak organizem je bil najprej 5 minut izpostavljen pogojem v preparatu. Nato je bilo objektno stekelce preneseno na mikroskop. S pomočjo kamere na mikroskopu in

računalniškega programa je bil posnet 60-sekundni posnetek vodne bolhe, na katerem se razločno vidi bitje srca vodne bolhe. Preparat je bil nato odstranjen z mikroskopske mizice, tako da sta segrevanje mikroskopa in svetloba minimalno vplivala na rezultate poskusa.

Po prvi opravljeni meritvi (posnetek) je bil organizem pogojem v preparatu izpostavljen še 4 minute. Končni čas izpostavljenosti je bil tako 10 min ( $\pm 1$  min). Po dodatnih štirih minutah smo bitje srca vodne bolhe ponovno posneli. Po izvedbi obeh posnetkov smo vodno bolho vrnili v posebej pripravljeno čašo z vodo, da je ne bi slučajno ponovno zajeli pri izbiranju poskusnega organizma.

Postopek je bil ponovljen desetkrat pri vsaki koncentraciji. Na koncu je bilo posnetih 60 posnetkov organizmov, izpostavljenim kofeinu.

### **3.11 ZBIRANJE PODATKOV**

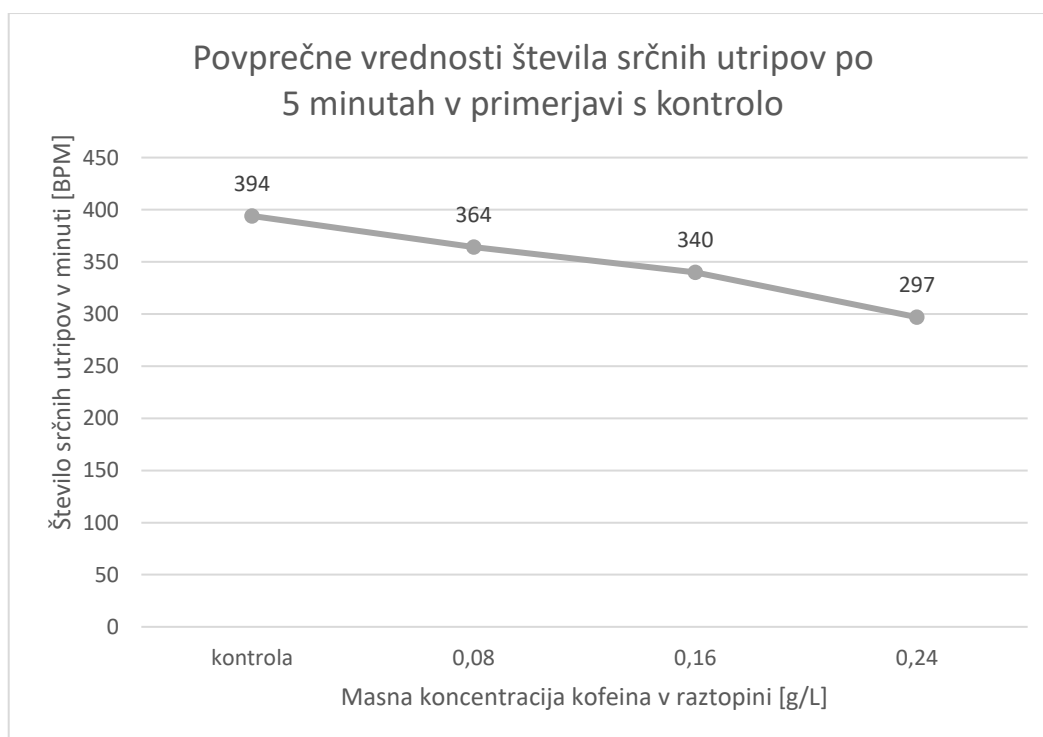
Ko je bil eksperiment končan, smo pregledali vse posnetke. Število srčnih utripov v minuti smo prešteli s pomočjo upočasnitve posnetka. Posnetek smo pogledali z 0,2-kratno hitrostjo. Prešteli smo število srčnih utripov v 15 sekundah, nato pa slednje pomnožili s 4. Podatke, ki so jih podali posnetki, smo s pomočjo računalniškega programa Excel uredili v tabelo in grafe.

## 4. REZULTATI

Tabela 1: Vrednosti srčnih utripov pri vsaki meritvi.

| Kontrola | 0,08 g/L<br>5 min | 0,08 g/L<br>10 min | 0,16 g/L<br>5 min | 0,16 g/L<br>10 min | 0,24 g/L<br>5 min | 0,24 g/L<br>10 min |
|----------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| 416      | 376               | 364                | 388               | 380                | 384               | 320                |
| 412      | 360               | 358                | 292               | 260                | 344               | 320                |
| 360      | 400               | 392                | 390               | 364                | 356               | 332                |
| 372      | 360               | 356                | 300               | 280                | 288               | 268                |
| 368      | 340               | 356                | 380               | 360                | 348               | 304                |
| 416      | 384               | 336                | 376               | 384                | 228               | 210                |
| 424      | 304               | 280                | 328               | 364                | 188               | 160                |
| 368      | 380               | 284                | 296               | 272                | 272               | 174                |
| 436      | 384               | 356                | 304               | 252                | 300               | 208                |
| 364      | 352               | 296                | 400               | 372                | 264               | 240                |

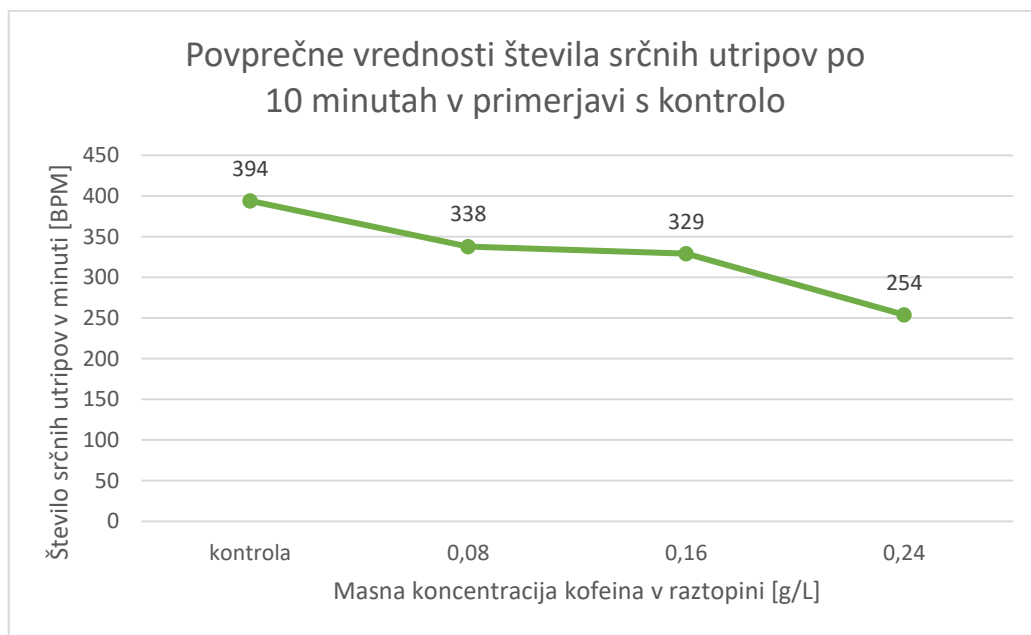
S pomočjo svetlobne mikroskopije smo opazovali srčni utrip vodnih bolh *Daphnia magna*.



Graf 1: Povprečne vrednosti števila srčnih utripov po 5 minutah v primerjavi s kontrolo.

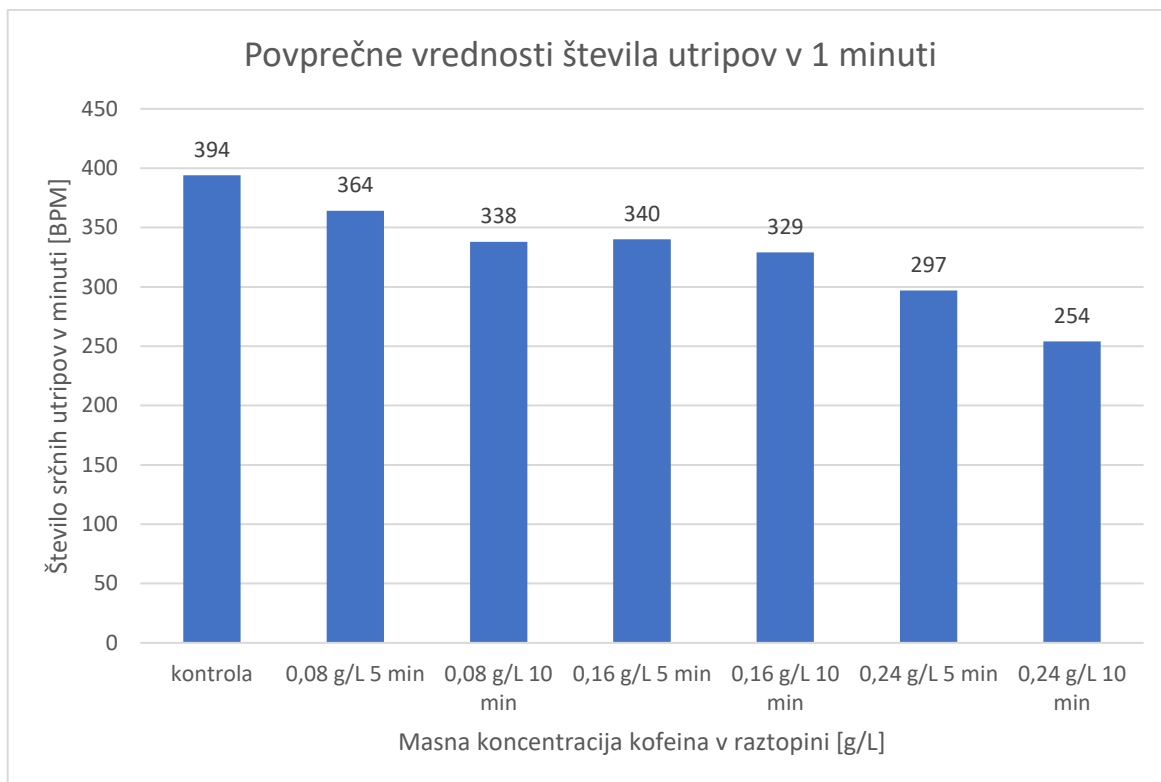
Povprečje števila srčnih utripov pri kontrolnem eksperimentu je bilo 394, najnižje število utripov je bilo 360 BPM (beats per minute), najvišje pa 436 BPM. Povprečno število utripov pri koncentraciji 0,08 g/L, po petih minutah, je bilo 364. Od povprečne vrednosti pri kontrolnem eksperimentu je bila višja le ena meritev. 90 % meritev je bilo nižjih od povprečne vrednosti pri kontrolnem eksperimentu. Pri koncentraciji 0,16 g/L je bilo

povprečno število utripov 340 BPM. Zanimivo je, da je tudi pri tej koncentraciji ena meritev višja kot povprečje meritev kontrolnega eksperimenta. Pri največji koncentraciji, 0,24 g/L, so bile vse meritve nižje od povprečja kontrolnega eksperimenta. Povprečno število utripov po 5 minutah je bilo 297 BPM. Iz grafa (Graf 1) je razvidno, da se je število srčnih utripov po 5 minutah zmanjšalo. Zmanjšanje števila srčnih utripov je razvidno tudi iz grafa 2, ki prikazuje povprečne vrednosti po 10 minutah.



Graf 2: Povprečne vrednosti števila srčnih utripov po 10 minutah v primerjavi s kontrolo.

Graf 3 prikazuje zmanjšanje povprečnih vrednosti števila srčnih utripov tako po 5 kot tudi po 10 minutah.

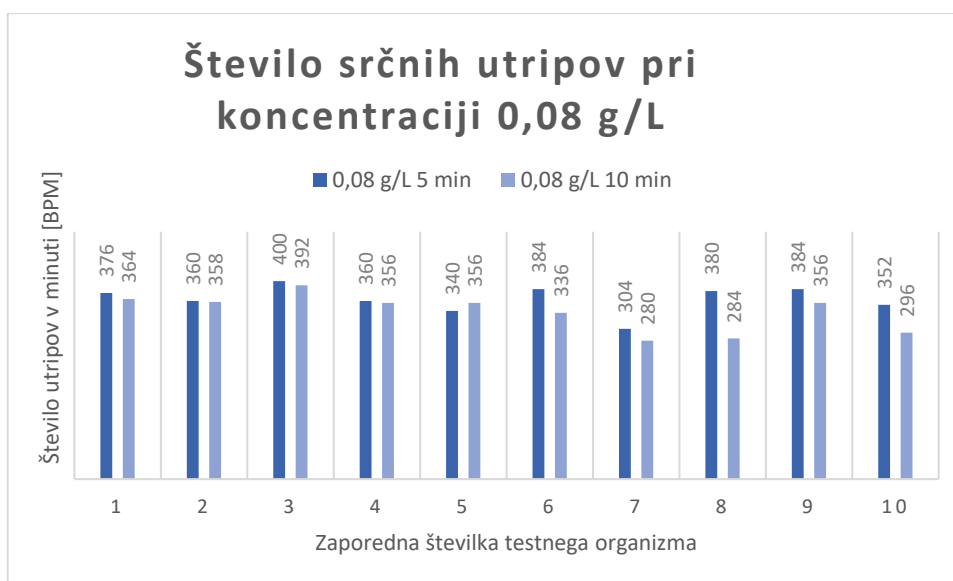


Graf 3: Povprečne vrednosti števila srčnih utripov po 10 minutah v primerjavi s kontrolo.

#### 4.1 VPLIV ČASA IZPOSTAVLJENOSTI

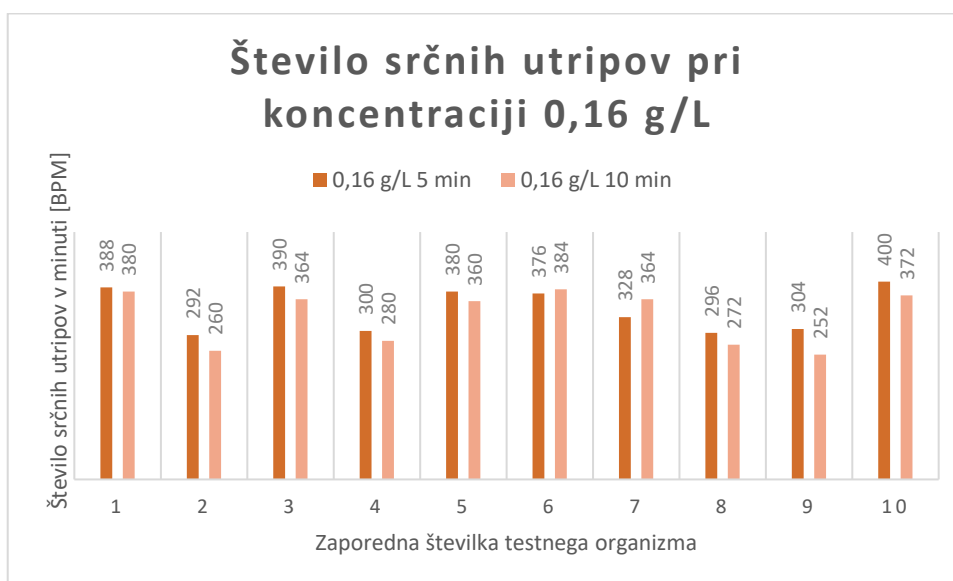
Pri našem eksperimentu je na srčni utrip vplival tudi daljši čas izpostavljenosti.

Srčni utrip se je po 10 minutah izpostavljenosti še dodatno znižal. Pri koncentraciji 0,08 g/L je bilo povprečje utripov od povprečja po 5 minutah manjše za 26 BPM. Pri koncentraciji 0,16 g/L se je vrednost po 10 minutah zmanjšala še za 11 BPM. Pri najvišji koncentraciji pa za 43 BPM.



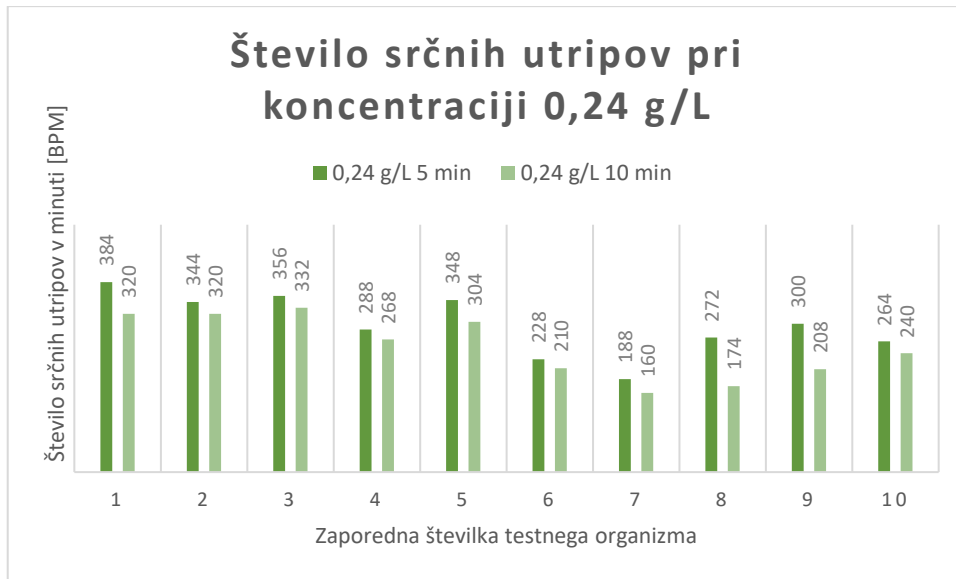
Graf 4: Število srčnih utripov pri koncentraciji 0,08 g/L.

V 90 % poskusov se je srčni utrip še dodatno znižal. Pri 5. meritvi pa je vidno odstopanje od večine, kar je lahko posledica drugačnega odziva vodne bolhe na kofein, njene starosti ali drugih dejavnikov.



Graf 5: Število srčnih utripov pri koncentraciji 0,16 g/L.

Pri koncentraciji 0,16 g/L se je srčni utrip znižal po 10 minutah v 80 % meritev. Pri dveh meritvah pa se je število srčnih utripov povečalo.



Graf 6: Število srčnih utripov pri koncentraciji 0,24 g/L.

Pri najvišji koncentraciji se je srčni utrip po 10 minutah zmanjšal pri vseh meritvah.

Iz grafov (Graf 4, 5 in 6) je tako jasno razvidno, da je čas izpostavljenosti vplival na srčni utrip, še dodatno ga je znižal.

## 5. RAZPRAVA

Rezultati našega eksperimenta so primerljivi z rezultati raziskav nekaterih drugih raziskovalcev.

Courtney Zang (2019) s sodelavci je izvedel eksperiment z isto vrsto vodnih bolh (*D. magna*), kot smo jih tudi mi uporabili v našem eksperimentu. Poleg kofeina so v raziskavi testirali tudi vpliv acetilholina, kemičnega transmittorja. Pri eksperimentu so uporabili stekelca z vdolbino, vendar so preparatu dodali manjši košček vate, kar pri našem eksperimentu ni bilo potrebno, saj je vodna bolha ostala na mestu. Za lovljenje vodnih bolh z gojišča so uporabili podobno metodo kot mi, pipeto s prirezano konico. Vodna bolha je bila izpostavljena 1-% raztopini kofeina. Če masne koncentracije, ki so bile uporabljene v naši raziskavi, pretvorimo v odstotke, dobimo:

1. 0,08 g/L ... 0,8 %
2. 0,16 g/L ... 1,6 %
3. 0,24 g/L ... 2,4 %

Vodno bolho so najprej posneli v preparatu z le akvarijsko vodo, nato pa so ji dodali še kofein. 1-% raztopini kofeina je bil organizem izpostavljen 7 minut. Med tem ni stal na mikroskopski mizici. Po sedmih minutah so posneli 10-sekundni posnetek in nato dobljeno število srčnih utripov pomnožili s 6. Njihovi rezultati so pokazali, da se je srčni utrip zmanjšal pri vseh štirih ponovitvah poskusa.

Podobne rezultate so dobili tudi raziskovalci v drugih raziskavah. Camri Austin s sodelavci (2019) je s podobnimi metodami izvedel eksperiment na *Daphnia magna*. Uporabili so dve koncentraciji kofeina, in sicer 0,5-% in 1-%. Rezultati so tudi pri tej raziskavi pokazali, da se je srčni utrip pri vseh treh ponovitvah znižal (zmanjšalo se je število srčnih utripov).

V naši raziskavi na podlagi podatkov, urejenih v grafe s povprečnimi vrednostmi srčnih utripov pri posamezni koncentraciji in kontrolnem delu eksperimenta, govorimo o podobnih rezultatih. Tudi pri nas se je srčni utrip znižal (Graf 1, 2, 3).

Pri nekaterih meritvah smo naleteli tudi na odstopanja. Pri nekaterih vodnih bolhah je kofein pospešil srčni utrip, vendar ne v taki meri, da bi to vplivalo na rezultate. Pri rezultatih, izmerjenih po 5 minutah, smo opazili odstopanje pri eni meritvi koncentracije 0,08 g/L in eno pri 0,16 g/L. Pri obeh je bila ena meritev višja od povprečne vrednosti kontrole, vendar le za 6 utripov. Preostale meritve so potrdile hipotezo, bile so nižje od povprečja kontrole.

Camri Austin (2019) s sodelavci je v svoji raziskavi spremljal tudi vpliv različnih koncentracij kofeina na srčni utrip. Uporabljeni sta bili dve različni koncentraciji, 0,5-% in 1,0-%. Statistični testi njihove raziskave so pokazali, da koncentracija kofeina ni vplivala na srčni utrip, torej je bil srčni utrip pri posamezni koncentraciji podoben. V naši raziskavi so rezultati pokazali, da so koncentracije vplivale na število utripov v minuti, saj se je z višjo koncentracijo število srčnih utripov dodatno znižalo (Graf 1, 2, 3).

Drugačni rezultati so verjetno posledica manjšega števila ponovitev, saj so Camri Austin in sodelavci (2019) izvedli le 3 ponovitve poskusa pri vsaki koncentraciji.

Pri času izpostavljenosti 5 minut smo povprečne vrednosti meritev primerjali s povprečno vrednostjo kontrole. Pri najnižji koncentraciji se je povprečje zmanjšalo za 30 BMP, pri koncentraciji 0,16 g/L za 54 BMP in pri najvišji koncentraciji (0,24 g/L) za 97 BMP. Višje koncentracije so torej še dodatno znižale srčni utrip.

Pri času izpostavljenosti 10 minut so rezultati podobni. Pri koncentraciji 0,08 g/L se je povprečje zmanjšalo za 56 BPM, pri koncentraciji 0,16 g/L se je zmanjšalo za 65 BPM, pri koncentraciji 0,24 g/L pa za 140 BPM.

Morgan Birney (2018) s sodelavci je v raziskavi vpliva kofeina na srčni utrip vodnih bolh prišel do drugačnih rezultatov. Pri eksperimentu so uporabili vodne bolhe (*D. magna*). Vsakemu preparatu, ki je vseboval vodno bolho in vodo iz gojišča organizmov, so dodali dve kapljici 1-% raztopine kofeina. Eksperiment je bil ponovljen petkrat. Rezultati so pokazali zvišanje srčnega utripa pri organizmih, izpostavljenih kofeinu.

Tudi rezultati raziskave Franka Corotta s sodelavci (2010) so bili drugačni. Uporabili so raztopine: 0,1-%, 0,5-% in 2-%. Rezultati eksperimenta so pokazali, da kofein sploh ni vplival na srčni utrip vodnih bolh (*D. magna*). Le pri enem izmed testnih organizmov je bilo opaženo zvišanje srčnega utripa, in sicer pri 0,1-% koncentraciji. Zanimivo je, da je bil srčni utrip organizmov za kontrolni eksperiment 354 BPM, kar je precej manj kakor v naši raziskavi (394 BPM). Vzrok drugačnih rezultatov je zelo verjetno precej daljši čas izpostavljenosti organizmov kofeinu. V raziskavi so bili namreč posnetki opravljeni šele po 30 min, 60 min in 90 min. (Corotto, Ceballos, & Lee, 2010)

Različni rezultati raziskav so verjetno posledica razlik med testnimi organizmi. Vsak posamezni organizem se na kofein odziva delno drugače, poleg tega pa lahko na podatke vpliva tudi starost organizma, prehrana in stanje, v kakršnem je živel v gojišču.

V omenjenih raziskavah so posnetke izvedli le po enem časovnem intervalu. Večina raziskav, s katerimi smo primerjali rezultate naše raziskave, tako ni raziskala vpliva daljšega časa izpostavljenosti. Frank Corotto in sodelavci (2010) so v svoji raziskavi sicer imeli tri različne časovne intervale, vendar precej daljše kot mi, in sicer 30, 60 in 90 minut. V naši raziskavi smo ugotovili, da čas vpliva na število srčnih utripov v minuti. (Graf 4, 5, 6)

Nekatere raziskave so vpliv kofeina na srčni utrip postavile na višji nivo. Anne Clark in Camile B. Olson (1973) sta raziskovali, kakšen vpliv ima dodatek kofeina na srčno mišico sesalca in vitro. Njuni rezultati so pokazali, da kofein povzroči močnejše pokrčenje mišice in podaljša njeno maksimalno aktivnost. Ugotovili sta, da kofein pospeši sprejemanje ionov ( $\text{Na}^+$  in  $\text{Ca}^{2+}$ ) v srčno mišico in pospeši njihovo izločanje ( $\text{K}^+$ -ioni). Tako srčna mišica hitreje preide v stanje mirovanja.

Vplivi kofeina na vodne bolhe so bili preučeni tudi na drugačen način.

Zanimiva je raziskava Ashleigh O'Reilly (2012), ki je preučevala, kakšen vpliv ima kofein na obnašanje vodne bolhe. Organizme so vstavili v valjasto posodo in opazovali, ali bodo snovi vplivale na globino njihovega plavanja. Ob dodatku kofeina so organizmi plavali globlje.

Preučevanje vedenja vodnih bolh bi tudi za nas lahko predstavljalo zanimivo nadaljnje raziskovanje vpliva kofeina.

## 6. ZAKLJUČEK

Raziskovalno delo so usmerjali cilj in hipoteze.

**Hipoteza 1:** Prisotnost kofeina bo vplivala na srčni utrip vodnih bolh (*Daphnia magna*).

Hipoteza je potrjena.

Prisotnost kofeina je povzročila spremembo srčnega utripa pri vodnih bolhah. Število srčnih utripov se je ob dodatku kofeina zmanjšalo.

Dodatek kofeina je spremenil okolje, v katerem je bila vodna bolha. V našem eksperimentu smo se odločili raziskati, kakšen vpliv je imel kofein na njen srčni utrip, vendar je kofein verjetno povzročil še mnoge druge spremembe pri organizmu, ki jih v tem eksperimentu

bodisi nismo spremljali bodisi nismo zaznali. Raziskovanje teh vplivov bi lahko predstavljalo smiselno nadaljevanje in razširitev našega eksperimenta.

**Hipoteza 2:** Zaradi prisotnosti kofeina se bo srčni utrip vodne bolhe povečal.

Hipoteza je ovržena.

Pri vplivih kofeina na človeka je splošno znano, da poveča motivacijo, nam da dodatno energijo. Pri vodnih bolhah bi pričakovali podobne rezultate. Naša raziskava je ovrгла hipotezo 2, saj se je, kakor je pokazala primerjava povprečnega števila srčnih utripov kontrolne in eksperimentalnih skupin osebkov, srčni utrip znižal. Vse povprečne vrednosti so bile nižje od vrednosti kontrole.

**Hipoteza 3:** Število srčnih utripov se bo med posameznimi koncentracijami razlikovalo.

Hipoteza je potrjena.

Število srčnih utripov se je med posameznimi koncentracijami razlikovalo. Različne koncentracije so torej vplivale na srčni utrip.

V naši raziskavi so rezultati pokazali, da večja kot je koncentracija, nižji bo srčni utrip.

**Hipoteza 4:** Razlika med normalnim srčnim utripom in srčnim utripom po izpostavljenosti kofeina bo po daljšem času izpostavljenosti (10 min) večja.

Hipoteza je potrjena.

Eksperiment je pokazal, da se je organizmom po 5 minutah srčni utrip sicer znižal, vendar so meritve srčnih utripov po 10 minutah potrdile našo hipotezo, saj se je število srčnih utripov še dodatno zmanjšalo.

Pri koncentraciji 0,08 g/L je dodatno zmanjšanje vidno pri 90 % vseh meritev, pri koncentraciji 0,16 g/L prav tako le ena meritev odstopa od večine, pri največji koncentraciji pa so pri vseh meritvah rezultati po 10 minutah nižji kot po 5.

Pri raziskovalni nalogi je bil izpolnjen njen namen in doseženi vsi cilji. Preučili smo vpliv različnih koncentracij na srčni utrip vodne bolhe vrste *Daphnia magna*. Kljub težavam smo uspeli nekaj časa gojiti populacijo vodnih bolh, da smo lahko izvedli poskus. Za izvedbo eksperimenta smo uporabili računalniški program Motic Image Plus 3.0 (x64), s katerim smo posneli srčni utrip vodne bolhe. S pomočjo eksperimenta in različnih neodvisnih spremenljivk (koncentracij in časovnih obdobj) smo preverili raziskovalne hipoteze.

Čeprav nam je eksperiment dal dragocene podatke, smo se pri izvedbi raziskovalne naloge srečali tudi z omejitvami, kot so na primer opremljenost šolskega laboratorija, prostorske možnosti za gojenje vodnih bolh (med eksperimentom se je zgodil pogin populacije) in dostopnost vodnih bolh, okvara kamere. Prav tako pa bi bilo smiselno pri sami izvedbi eksperimenta kakšno stvar še izboljšati. Za natančnejše rezultate bi na primer pri eksperimentiranju lahko povečali število testnih organizmov. Rezultati bi bili natančnejši tudi, če bi v eksperimentu uporabili isto starost organizmov. V nadaljnjih raziskavah bi lahko uporabili še višje oz. še nižje koncentracije in podaljšali čas izpostavljenosti. Smiselna bi bila tudi uporaba drugih vrst organizmov, saj bi tako lahko rezultate primerjali med posameznimi organizmi.

Z našim eksperimentom smo raziskali vpliv kofeina na srčni utrip vodnih bolh, kar bi lahko z dodatnim raziskovanjem in literaturo prenesli na druge organizme in človeka. Ker kofein postaja vse bolj prisoten v prehranskih izdelkih, obstaja verjetnost, da se lahko vsebnost kofeina, kljub kratki razpolovni dobi, povečuje tudi v naravnih (predvsem vodnih) ekosistemih. Naša in podobne raziskave nam tako podajo določen uvid v potencialne vplive kofeina kot onesnaževala v ekosistemih na organizme.

## 7. LITERATURA

- Aman, K., & Gyanesh, S. (2018). Dopamine synergizes with caffeine to increase the heart rate of daphnia. *F1000 Research*, 7. Pridobljeno 23. januar 2025 iz <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6024234/>
- Anderson, B. G. (1944). The Toxicity Thresholds of Various Substances Found in Industrial Wastes as Determined by the Use of *Daphnia magna*. *Sewage Works Journal*, 1156–1165.
- Angelika, T., Adam, B., Jarosław, D., Krzysztof, K., & Brygida, Ś. (2021). *Daphnia magna* model in the toxicity assessment of pharmaceuticals: A review. *Science of The Total Environment*. Pridobljeno december 2024 iz <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0048969720365682>
- Anne, C., & Camille B, O. (1973). Effects of caffeine and isoprenaline on mammalian ventricular muscle. *British journal of pharmacology*, 1-11. Pridobljeno 1. marec 2025 iz <https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1476-5381.1973.tb08153>
- Ashleigh, O. (2012). Response of *Daphnia mendotae*, *Daphnia pulicaria*, and *Holopedium gibberum* to presence of. Pridobljeno 1. marec 2025 iz <https://underc.nd.edu/assets/155490/fullsize/oreilly2012.pdf>
- Austin, C., Saryu, O., Brett, W., & Rodet, S. (2019). Caffeine concentration shows no significant effect on. *Journal of undergraduate Biology Laboratory investigations*. Pridobljeno 26. februar 2025

- Benčina, K. (marec 2013). Kako nevaren je kofein? *Vizita.si*. Pridobljeno 19. januar 2025 iz <https://vizita.si/zdravozivljenje/kako-nevaren-je-koferin.html>
- Corotto, F., Ceballos, D., & Lee, A. (2010). Making the Most of the 'Daphnia' Heart Rate Lab: Optimizing the Use of Ethanol, Nicotine & Caffeine. *American Biology Teacher*. Pridobljeno 23. januar 2025 iz <https://research.ebsco-com.evirilook.sik.si/c/6z2qbo/viewer/html/jjizytiv4r>
- Courtney, Z., Natalie, L., Abigail, G., Caitlin, C., & Michael, F. (2019). Caffeine and acetylcholine decrease daphnia magna heart rate. *Journal of undergraduated Biology laboratory investigations*. Pridobljeno 25. februar 2025
- D., E. (2005). Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in Daphnia. Pridobljeno december 2024 iz <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2042/>
- Ebert, D. (2022). Daphnia as a versatile model system. *EvoDevo*.
- Elenbaas, M. (2013). Daphnia magna. (A. G. Jeremy Wright, Ured.) Pridobljeno 2. januar 2025 iz [https://animaldiversity.org/accounts/Daphnia\\_magna/#contributors](https://animaldiversity.org/accounts/Daphnia_magna/#contributors)
- Fox, R. (2006). Daphnia magna. *Invertebrate Anatomy OnLine*. Pridobljeno iz <https://lanwebs.lander.edu/faculty/rsfox/invertebrates/daphnia.html>
- Kupka, T. M. (2024). Caffeine—Legal Natural Stimulant with Open Research Perspective: Spectroscopic and Theoretical Characterization. *Molecules*, 29(18), 4382. Pridobljeno 10. januar 2025 iz <https://doi.org/10.3390/molecules29184382>
- Liam, C. (2023). Q&A: What effect does caffeine have on your heart? *UC Davis health*. Pridobljeno 20. januar 2025 iz <https://health.ucdavis.edu/news/headlines/qa-what-effect-does-caffeine-have-on-your-heart/2023/12>
- Mee, S. N., Daniel, J. V., Carolyn, R. Z., Alex, Y. L., Jean, E. C., Margaret, J. B., . . . Khai, C. A. (2022). Web-based Daphnia histology reference atlas.
- MELANIE A., H., JORGE, W., & MEJIA, E. G. (2010). Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in Foods: *Journal of food science*. Pridobljeno 6. januar 2025 iz <https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdfdirect/10.1111/j.1750-3841.2010.0156>
- Miner, B. E., De Meester, L., Pfrender, M. E., Lampert, W., & Hairston, N. G. (2012). Linking genes to communities and ecosystems: Daphnia as an ecogenomic model. *Proceedings of the royal society B biological sciences*. Pridobljeno 3. januar 2025 iz <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rspb.2011.2404>
- Morgan, B., Breanna, B., Grace, C.-T., Mark, W., & Emily, H. (2018). THE EFFECT OF ETHANOL, NICOTINE, AND. *Journal of undergraduate Biology Laboratory investigations*. Pridobljeno 26. februar 2025

- Pavithra, V. (2020). Review Article on Caffeine Activity. *Journal of Nanotechnology Research* 3, 001-005. Pridobljeno 6. januar 2025 iz <https://www.fortunejournals.com/articles/review-article-on-caffeine-activity.html>
- Reissig, C. J., Strain, E. C., & Griffiths, R. R. (2009). Caffeinated Energy Drinks -- A Growing Problem. Pridobljeno 6. januar 2025 iz <https://europepmc.org/backend/ptpmcrender.fcgi?accid=PMC2735818&blobtype=pdf>
- Science, W. s. (2021). Working with. Pridobljeno iz [https://www.wardsci.com/www.wardsci.com/images/Working\\_with\\_Daphnia2021.pdf](https://www.wardsci.com/www.wardsci.com/images/Working_with_Daphnia2021.pdf)
- Simmons, E. (avgust 2024). Man, 34, suffers cardiac arrest 'triggered by drinking daily Red Bull' - and it wasn't as many cans as you might think... *Mail Online*. Pridobljeno 19. januar 2025 iz <https://www.dailymail.co.uk/health/article-13780269/cardiac-arrest-energy-drink-link-dehydration-risks.html>
- Steven, R. M., & Thomas, J. W. (2007). Low doses of caffeine reduce heart rate during submaximal cycle ergometry. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. Pridobljeno 20. januar 2025 iz <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1186/1550-2783-4-11?needAccess=true>
- Temple, J. L., Bernard, C., Lipshultz, S. E., Czachor, J. D., Westphal, J. A., & Mestre, M. A. (26. maj 2017). The Safety of Ingested Caffeine: A Comprehensive Review. (J. Witkin, Ured.) *Frontiers in Psychiatry*. Pridobljeno 19. januar 2025 iz <https://www.frontiersin.org/journals/psychiatry/articles/10.3389/fpsy.2017.00080/full>
- Uykova, E. I., Bochkarev, N. A., Taylor, D. J., & Kotov, A. A. (2019). Unexpected endemism in the *Daphnia longispina* complex (Crustacea: Cladocera) in Southern Siberia. *PLoS ONE*, 9/2/2019, *Academic Search Elite*.
- Varujte svojo krvno-možgansko pregrado – 1. del. (2021). *Avita*. Pridobljeno 19. januar 2025 iz <https://www.avita.si/varujte-svojo-krvno-mozgansko-pregrado/>