DIFERENCIRANJE BIOKEMIJSKIH MARKERA IZLOŽENOSTI PESTICIDIMA I NANOČESTICAMA KOD ENHITREIDA

Oršolić, Ana

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:968931

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Preddiplomski studij biologije

Ana Oršolić

DIFERENCIRANJE BIOKEMIJSKIH MARKERA IZLOŽENOSTI PESTICIDIMA I NANOČESTICAMA KOD ENHITREIDA

Završni rad

Mentor: doc. dr. sc. Davorka Hackenberger Kutuzović

Osijek, 2017.

Ovaj rad je izrađen u okviru projekta „Različiti učinci okolišno relevantnih mješavina metal temeljenih nanočestica i pesticida na faunu tla: Nove smjernice za procjenu rizika (DEFENSoil)“ financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost (IP-09-2014-4459); voditelj projekta prof. dr. sc. Branimir K. Hackenberger.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Završni rad

Preddiplomski sveučilišni studij biologije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

DIFERENCIRANJE BIOKEMIJSKIH MARKERA IZLOŽENOSTI PESTICIDIMA I NANOČESTICAMA KOD ENHITREIDA

Ana Oršolić

Rad je izrađen: Odjel za biologiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Zavod za kvantitativnu ekologiju

Mentor: doc. dr. sc. Davorka Hackenberger Kutuzović

Enhitreide imaju važnu ulogu u poboljšavanju strukture tla i razgrađivanju organske tvari. Koriste se kao standardni modelni organizmi za kemijska testiranja. U ovom radu; vrsta *Enchytraeus albidus* izlagana je TiO_2 i ZnO različite veličine čestica (nano i ne-nano), koristeći tri različita načina izlaganja – umjetno tlo, ekstrakt tla i rekonstruiranu vodu. Krajnje točke mjerenja bile su mortalitet i biokemijski markeri: aktivnost katalaze (CAT), acetilkolinesteraze (AChE), glutation-S-transferaze (GST) i količina metalotionenina (MT). Korištenje enhitreida za evaluaciju toksičnosti nanočestica i pesticida ih čini adekvatnim modelnim organizmima za široku primjenu u procjenjivanju toksičnosti kemikalija u terestričkim i akvatičnim ekosustavima.

Ključne riječi: enhitreide, nanočestice, pesticidi, terestrička toksičnost, akvatična toksičnost, biomarkeri

Broj stranica: 14

Broj slika: 3

Broj tablica: 1

Broj literaturnih navoda: 38

Broj priloga: 0

Jezik izvornika: Hrvatski

Rad je pohranjen u: Knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i u Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, u elektroničkom obliku, te je objavljen na web stranici Odjela za biologiju

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Department of Biology

Bachelor's thesis

Undergraduate University Study Programme in Biology

Scientific Area: Natural science

Scientific Field: Biology

DIFFERENTIATION OF BIOCHEMICAL MARKERS OF EXPOSURE TO PESTICIDES AND NANOPARTICLES IN ENCHYTRAEIDS

Ana Oršolić

Thesis performed at: Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Subdepartment of Quantitative Ecology

Supervisor: Davorka Hackenberger Kutuzović, PhD, Assistant Professor

Soil enchytraeids play a significant role in improving the soil pore structure and the degradation of organic matter. They are used as standard organism models for chemical testing. In this study, *Enchytraeus albidus* was exposed to both nano and bulk forms of titanium dioxide and zinc oxide using three different exposure routes – artificial soil, soil extract and reconstituted water. The measured endpoints were survival and biochemical markers, activity of catalase (CAT), acethylcholinesterase (AChE), glutathione S-transferase (GST) and content of methallothioneins (MT). The use of enchytraeids for evaluating pesticide toxicity was also discussed making these invertebrates adequate model organisms for a broad use in assessing both soil and aquatic toxicity.

Keywords: Enchytraeids, Nanoparticles, Pesticides, Soil toxicity, Aquatic toxicity, Biomarkers

Number of pages: 14

Number of images: 3

Number of tables: 1

Number of references: 38

Number of appendices: 0

Original in: Croatian

Thesis deposited in: Library of Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek and in National university library in Zagreb in electronic form. It is also available on the web site of Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek.

Sadržaj

1. Uvod 1
2. Materijali i metode 2
2.1 Modelni organizam 2
2.2 Eksperimentalne postavke 2
2.3 Biokemijske analize 4
2.4 Statistička analiza 5
3. Rezultati 5
4. Rasprava 7
4.1 Izloženost nanočesticama 7
4.2 Izloženost pesticidima 8
5. Zaključak 10
6. Literatura 11

1. Uvod

Tlo i voda često se antropogeno zagađuju tvarima kao što su pesticidi, gnojiva ili otpadni međuprodukti tvorničkih proizvoda, a procjena toksičnosti direktno na organizmima u ekosustavu je skupa i zahtijeva puno vremena. Iz tog razloga se koriste laboratorijski testovi u kojima se indikatorski organizmi kao što su enhitreide, kratkotrajno izlažu toksičnim tvarima. Enhitreide (Oligochaeta, Clitellata, Annelida) su organizmi koji se lako uzgajaju i imaju relativno brz reproduktivni ciklus. Kao laboratorijske organizme prvi puta ih je opisao Weuffen (Weuffen, 1968). Enhitreide imaju veliku ekološku važnost te su izuzetno osjetljive na zagađenja i promjene drugih ekoloških čimbenika. Zagađenjima su izloženi izravno preko površine tijela, ali ih mogu unijeti u organizam tijekom hranjenja.

Štetne tvari se u okolišu ne pojavljuju individualno, nego često u kombinaciji s drugima ili u različitim koncentracijama tijekom određenog vremenskog perioda. Samim time, dolaze u međusobnu interakciju i tako utječu na toksičnost. Nanočestice se u zadnje vrijeme, zbog svojih karakteristika, koriste u industriji u proizvodnji novih materijala sa poboljšanim svojstvima, u medicini za transport lijekova do ciljnih organa, u suzbijanju širenja naftnih mrlja u vodi te u energetici za poboljšanu proizvodnju goriva (Chen i sur., 2015; Gong i sur., 2009; . Iako imaju niz pozitivnih osobina, postoji zabrinutost oko njihovog otpuštanja u okoliš te se zato provode brojne studije utjecaja istih na ekosustave. Pesticidi se, s druge strane, dugo vremena koriste za suzbijanje nametnika u poljoprivredi i vektora bolesti kao što su komarci. Unatoč poboljšanim svojstvima, pesticidi i dalje predstavljaju opasnost za zdravlje čovjeka i drugih organizama. Nanočestice titanijeva dioksida (TiO_2) i cinkovog oksida (ZnO) imaju široku primjenu u zaštiti od ultraljubičastog (UV) zračenja, kao katalizatori ili za uklanjanje zagađenja iz vode i tla (Chen i sur., 2003). Osim što imaju izravan utjecaj na tkiva, Ti i Zn oksidi su fotoaktivni (Carp i sur., 2004) te se zna da njihov fotoaktivacijski mehanizam vodi ka stvaranju reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) te samim time do oksidativnog stresa. Tek nedavno su rađena istraživanja fokusirana na toksičnost nanočestica Ti i Zn na akvatične organizme koja su pokazala da UV povećava toksičnost navedenih nanočestica (Ma i sur., 2014)

Iako postoji velik broj istraživanja i radova koji se bave upravo toksičnošću nanočestica i pesticida u ekosustavima, mali broj istih kao modelne organizme koristi enihtreide. Najčešće se u istraživanjima koriste testovi reprodukcije (OECD, 2004) i testovi izbjegavanja (engl. *Avoidance test*) (Amorim i sur., 2008). Kako bi se stekao uvid u toksičnost tvari na organizam, potrebno je detaljnije proučiti kako te tvari mijenjaju fiziološke procese u tijelu, a uvid u te promjene može se ostvariti mjerenjem aktivnosti različitih enzima ili količine različitih tvari u organizmu.

2. Materijali i metode

2.1 Modelni organizam

Enchytraeus albidus (Slika 1) predstavlja jednu od većih vrsta u rodu *Enchytraeus* te može doseći dužinu do 4 cm. Tijelo je prekriveno tankom kutikulom preko koje tvari iz okoliša ulaze u tijelo i sastoji se od kolutića i kliteluma, a broj kolutića raste sa starošću. Prednji dio tijela se naziva prostomij. Hrana prolazi kroz ždrijelo i jednjak do crijeva i izlazi zajedno sa česticama tla kroz pigidijum. Nemaju respiratorni sustav, nego plinovi prolaze kroz kutikulu. Imaju kloragogene stanice, a celomska tekućina sadrži limfocite koji variraju u obliku, veličini, boji i granulaciji (Nielsen i Christensen, 1959) Enhitreide su hermafroditi, a životni ciklus im je kratak te postaju spolno zrele između 33 dana (18° C) i 74 dana (12 °C). Klitelum se pojavljuje kada je jedinka spolno zrela i zadržava se tijekom ostatka života, a za laboratorijska testiranja se koriste spolno zrele jedinke sa vidljivim klitelumom koje su u laboratorijskim uvjetima uzgajane kroz jedan reprodukcijski ciklus.



Slika 1 - Modelni organizam Enchytraeus albidus

2.2 Eksperimentalne postavke

U eksperimentalnom dijelu ovog rada korišteno je OECD umjetno tlo (OECD, 2004) vlažnosti 50% i pH=6.4 koje se sastoji od:

- 10 % treseta, osušenog i usitnjenog do čestica veličine 2 ± 1 mm;
- 20 % kaolin gline (sadržaj kaolinita iznad 30%);
- 0.3 do 1.0% kalcij karbonata ($CaCO_3$, analitički) kako bi se dobio pH od 6.0 ± 0.5; količina dodanog kalcij karbonata može ovisiti o kvaliteti treseta;
- oko 69% kvarcnog pijeska (količina ovisi o dodanom kalcij karbonatu), po mogućnosti fini pijesak sa više od 50% čestica veličine između 50 i 200 µm.

Kao vodeni medij korištena je rekonstruirana voda (Römbke i Knacker, 1989) napravljena otapanjem 222 mg $CaCl_2$, 123 mg $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 65 mg $NaHCO_3$ i 5.8 KCL u 1 L destilirane vode pH vrijednosti 7.7. Za ekstrakt tla je korišteno tlo bogato organskom tvari, a priprema ekstrakta je rađena prema literaturi (Van der Ploeg i sur., 2010) s tim da tlo nakon miješanja sa destiliranom vodom nije filtrirano kako bi se dobio ekstrakt, nego centrifugirano 10 minuta na 5 000 G. pH vrijednost tla je podešena na 6.4.

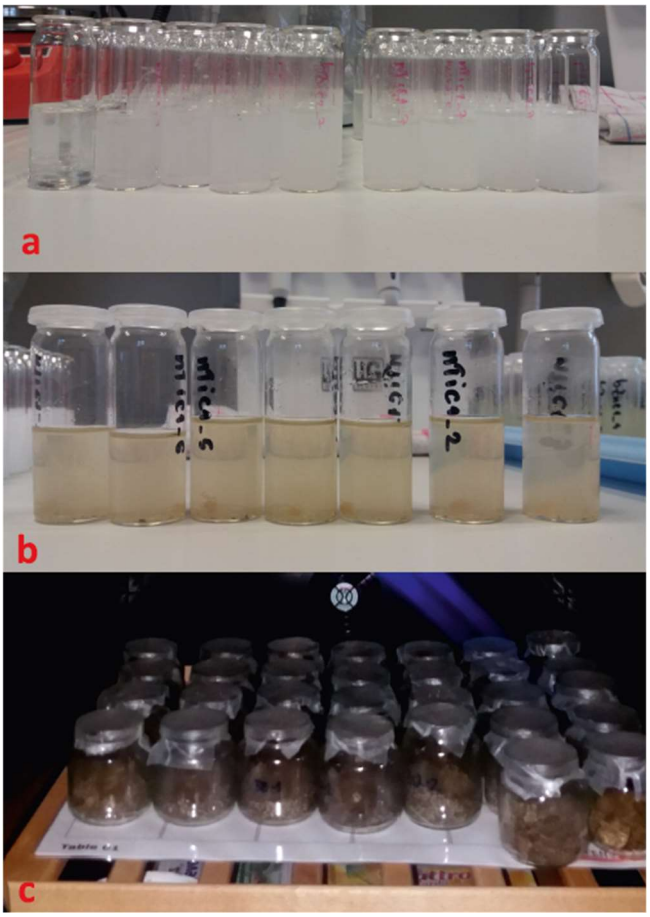
U prvom eksperimentu korištene su dvije koncentracije titanijevog i cinkovog oksida. Za TiO_2: 1000 mg/kg i 2000 mg/kg za umjetno tlo te 100 mg/L i 200 mg/L za ekstrakt tla i rekonstuiranu vodu. Za ZnO su korištene koncentracije od 500 mg/kg i 750 mg/kg za umjetno tlo te 50 mg/L i 75 mg/L za akvatične testove. Nanočestice i ne nano oblici oksida su u umjetnom tlu pomiješani, a u vodenim otopinama disperzirani pomoću ultrasonične kupelji.

U drugom dijelu eksperimenta korištene su četiri koncentracije, također jednake za nano i ne nano oblike tvari. Za TiO_2 su korištene koncentracije od 100, 1000, 2000 i 3000 mg/kg (umjetno tlo), 100, 200, 400 i 600 mg/L (rekonstruirana voda) i 0.08, 0.4, 2 i 10 mg/L (ekstrakt tla). Korištene koncentracije za ZnO su bile 100, 500, 750 i 1500 mg/kg (umjetno tlo), 0.08, 0.4, 2 i 10 mg/L (rekonstruirana voda) i 0.04, 0.2, 1 i 5 mg/L (ekstrakt tla) (Tablica 1).

Tablica 1 - Koncentracije nano i ne nano oblika metalnih oksida za izlaganje u umjetnom tlu, rekonstruiranoj vodi i ekstraktu tla

	Umjetno tlo [mg/kg]		**Rekonstruirana voda [mg/L]**		**Ekstrakt tla [mg/L]**	
	TiO_2	**ZnO**	**TiO_2**	**ZnO**	**TiO_2**	**ZnO**
C1	100	100	100	0.08	0.08	0.04
C2	1000	500	200	0.4	0.4	0.2
C3	2000	750	400	2	2	1
C4	3000	1500	600	10	10	5

Prilikom postavke eksperimenata odabrano je po petnaest odraslih jedinki *E. albidus* sa razvijenim klitelumom koje su stavljene u staklene bočice sa poklopcem koje su sadržavale 23 g umjetnog tla ili 23 mL vodene otopine (ekstrakt tla i rekonstruirana voda) (Slika 2). Korišteno je sedam replika po koncentraciji, a izlaganje je trajalo 72h na 20°C. Na kraju izlaganja, jedinke iz svake replike su izvagane i homogenizirane u K-fosfatnom puferu te čuvane na -80°C za daljnju analizu.



Slika 2 - Tri različita načina izlaganja vrste E. albidus nanočesticama; a) rekonstruirana voda; b) ekstrakt tla i c) umjetno tlo.

2.3 Biokemijske analize

Krajnje točke eksperimenta bili su biokemijski markeri katalaza (CAT), acetilkolinesteraza (AChE), glutation-S-transferaza (GST) i metalotioneini (MT). Katalaza je enzim koji se pronalazi u gotovo svim organizmima gdje igra važnu ulogu u zaštiti stanica od oksidativnog stresa, tj. reaktivnih kisikovih vrsta koje nastaju u stanici koja je izložena stresu kao što su toksikanti. Katalizira razgradnju vodikovog peroksida na vodu i kisik, a njegova dekompozicija se mjeri spektrofotometrijski (Clairborne, 1985)

Acetilkolinesteraza predstavlja primarnu kolinesterazu u oranizmima i inhibirana je raznim zagađivačima kao što su pesticidi i nanočestice. Katalizira razgradnju neurotransmitera acetilkolina (i drugih kolinskih estera) na acetat i kolin (George i sur., 1961)

Toksini se u stanici mogu vezati na glutation-S-transferazu koja u tom slučaju može služiti kao transportni protein. Samim time je jedan od mjerenih biomarkera nakon izlaganja organizama štetnim tvarima. Ovaj enzim katalizira konjugaciju reduciranog oblika glutationa u svhru detoksifikacije stanice (Habig i sur., 1974).

Metali u stanicama se vežu na proteine lokalizirane u membrani Golgijev-a aparata, metalotioneine koji imaju sposobnost vezanja istih zbog svoje tiolne skupine cisteinskih

ostataka. Samim time služe kao pogodni biomarkeri za mjerenje akumulacije metala u stanici (Linde, 2006) koji se tu mogu naći iz nanočestica, kao što su nanočestice ZnO, ili iz pesticida koji u sebi sadrže metale.

Količina proteina je određena metodom po Lowry-u (Lowry i sur., 1951).

2.4 Statistička analiza

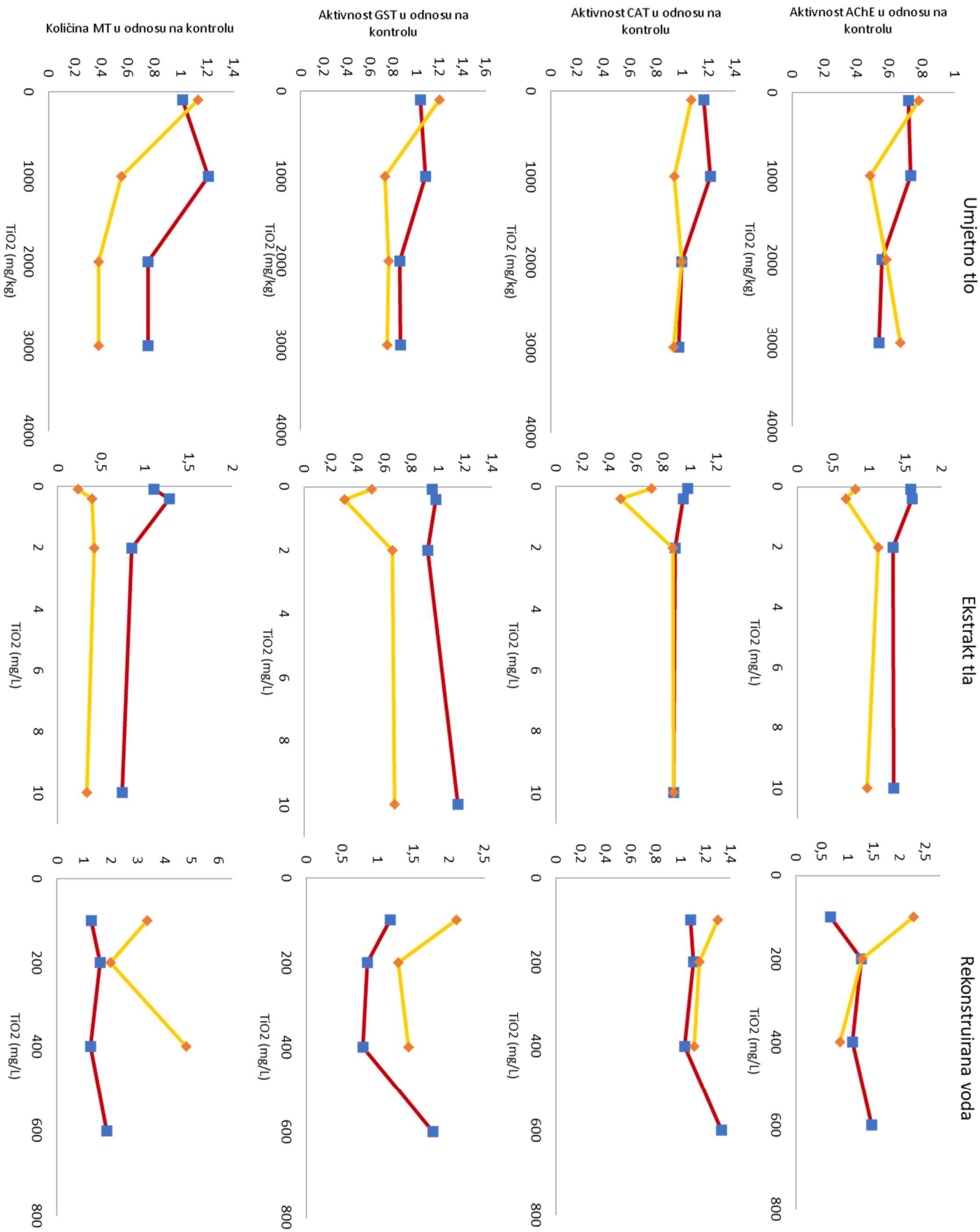
Obrada podataka je urađena pomoću statističkog softvera R 3.4.0 (R Core Team, 2017) Najprije je provjerena normalnost koristeći Shapiro-Wilks test te homogenost varijance pomoću Levene-ovog testa. Kako su podaci normalno distribuirani, uzorci tretirani nanočesticama su uspoređeni sa kontrolom i međusobno koristeći jednofaktorsku analizu varijance. Za određivanje značajnih razlika je korišten Tukey-ov test ($p<0.05$).

3. Rezultati

Preliminarni eksperiment sa dvije koncentracije pokazao je 100% mortalitet na obje koncentracije i kod oba metalna oksida u akvatičnom načinu izlaganja sa ekstraktom tla. Visoka stopa mortaliteta je uočena i nakon izlaganja ZnO u testu s rekonstruiranom vodom. U testu s umjetnim tlom sve su jedinke preživjele.

Nakon preliminarnog testa, u drugome su odabrane druge, prikladnije koncentracije, uzimajući u obzir stopu mortaliteta iz prethodnog dijela rada. Sukladno tome, odabrane su najviše koncentracije sa umjetno tlo te najmanje za ekstrakt tla. Odgovarajući podacima iz prošlog eksperimenta, ponovno nije bilo mortaliteta u testu sa umjetnim tlo, no u testu s rekonstruiranom vodom mortalitet enhitreida izloženih nano i ne nano obliku ZnO bio je gotovo 100%. Što se tiče TiO_2, viša stopa mortaliteta je uočena na najvišim koncentracijama nano oblika u tlu; najviša koncentracija ne nano oblika je pokazala 100% mortalitet, te nešto manji u ostalim. U akvatičnom testu s ekstraktom tla gdje su primjenjene najniže koncentracije, jedinke su ugibale nakon izlaganja nano ZnO u najvišoj koncentraciji te gotovo u svim koncentracijama ne nano oblika. Nakon izlaganja nano TiO_2 sve jedinke u ekstraktu tla su preživjele, a jedinke izlagane ne nano obliku su pokazale zanemarivu stopu mortaliteta.

Aktivnost mjerenih biomarkera u prvom eksperimentu je bila nejednolika. U drugom eksperimentu odgovori enzimskih aktivnosti bili su različiti između ne nano i nano oblika TiO_2 i ZnO. Također, aktivnosti biomarkera mjerenih nakon izlaganja u rekonstruiranoj vodi su se razlikovali od onih u umjetnom tlu i ekstraktu tla, kao i generalno između izlaganja u umjetnom tlu i vodenim otopinama. (Slika 3).



Slika 3 - Aktivnosti AChE, CAT, GST i količina MT u odnosu na kontrolu nakon izlaganja enhitreida nano i bulk oblicima TiO_2

– $nTiO_2$, – $bTiO_2$

4. Rasprava

4.1 Izloženost nanočesticama

S ciljem istraživanja osjetljivosti enhitreida na toksikante u različitim medijima, eksperimenti su provedeni u dva sustava – akvatičkom i terestričkom. Kao terestrički sustav korišteno je umjetno tlo, a kao akvatični sustav ekstrakt tla i rekonstruirana voda. Testovi toksičnosti na enhitreidama u umjetnom tlu počeli su se provoditi sredinom devedesetih godina prošlog stoljeća kako bi se mjerila bioakumulacija toksičnih tvari (OECD, 1996). Eksperimenti rađeni sa insekticidima i fungicidima na enihtreidama rađeni su po pravilniku opisanom od strane OECD (Amorim i sur., 2002; Bruns i sur., 2002), no niti u jednom slučaju nisu mjereni biomarkeri izloženosti toksičnim tvarima. Istraživanja na enhitreidama nisu rađena samo u tlu, nego i u vodi (Römbke i Knacker, 1989; Achazi i sur., 1995). Krajnja točka mjerenja je uobičajeno mortalitet, ali mogu se mjeriti patološke promjene kao i biomarkeri izloženosti toksičnim tvarima nakon vremena izlaganja. (Römbke i Knacker, 1989; Šuteková, 2007). Prednosti testa su jednostavni dizajn i kratko trajanje (96 h), ali je uočeno da tvar u vodi za enhitreide može biti i do 600 puta toksičnija nego u tlu (Römbke i Knacker, 1989).

Najčešće korišteni test toksičnosti za enhitreide, s umjetnim tlom kao medijem, u ovom slučaju nakon izlaganja TiO_2 i ZnO nije pokazao visok mortalitet neovisno o obliku oksida. U akvatičnim sustavima je mortalitet izražen, s varijacijama ovisno o koncentraciji tvari u otopini. Ovakav rezultat se može objasniti činjenicom da organizmi u tlu sporije upijaju čestice toksikanata s obzirom da ih unose u organizam hranom, zajedno sa česticama tla. U vodenim otopinama enhitreide, osim hranom, toksikante unose u organizam i preko kutikule. Također, u otopinama se s vremenom tvari istalože na dnu i samim time postaju dostupnije enhitreidama koje su u akvatičnim testovima manje pokretne nego u tlu i većinom se nalaze na dnu staklene bočice gdje se talože i nanočestice ili ne nano oblici testiranih oksida.

Aktivnosti analiziranih biomarkera nisu pokazali jednolike rezultate u ova dva eksperimenta. Također, isti se razlikuju u organizmima izlaganim u umjetnom tlu i ekstraktu tla te u rekonstruiranoj vodi. Aktivnost AChE, CAT, GST i sadržaj MT u organizmima izlaganim u umjetnom tlu pada sa povećanjem koncentracije nanočestica, ali i ne nano oblika. U usporedbi dvaju oblika oksida, aktivnosti istih su podjednake, osim sadržaja metalotioneina koji je veći u slučaju izlaganja nanočesticama. Isti slučaj, sa manjim varijacijama, je i kod akvatičnog testa sa ekstraktom tla, mada se sadržaj metalotioneina, nakon početnog povećanja, smanjuje, što može bit posljedica povećane razine H_2O_2. U ovom slučaju više razine H_2O_2 uzrokuju oksidaciju MT i zajedno sa oslobađanjem metalnih iona dolazi do degradacije MT te se njihova koncentracija smanjuje (Bertrand i sur., 2016). Drugo objašnjenje za smanjeni

sadržaj MT je da se metali u enhitreidama ne vežu prvenstveno na metalotioneine nego na protein CRP koji ima istu funkciju, ali je enhitreidama primarni transportni protein za metale (Tschuschke i sur., 2002). S obzirom da se aktivnosti biomarkera kod organizama izlaganih u rekonstruiranoj vodi znatno razlikuju, smatra se da pH vode, kao i promjena pH uzrokovana dodatkom metalnih oksida dovodi to ovakvih rezultata. (Gomes i sur., 2015). Organizmi izlagani nanočesticama u rekonstruiranoj vodi pokazuju povećane aktivnosti svih mjerenih enzima proporcionalno s povećanjem koncentracije istih, dok je kod izlaganja ne nano obliku oksida situacija suprotna – aktivnosti se smanjuju.

Rezultati eksperimenta su također pokazali da su nanočestice Zn, kao i njegovi ne nano oblici, toksičniji od Ti, što se poklapa sa prijašnjim istraživanjima na gujavicama (Cañas i sur., 2011). Povećana toksičnost od strane Zn je rezultat solubiliziranih iona Zn (Liu i sur.,2016). Iako se u mnogim istraživanjima pokazalo da su nanočestice metalnih oksida toksičnije od njihovih ne nano oblika, ovdje to nije slučaj. Iako su otopljeni ioni cinka iz oba oblika oksida toksični organizmima, agregacija i sedimentacija nano oblika reducira toksičnost istih (Yu i sur., 2011)

Veća toksičnost ZnO od TiO_2 utvrđena u ovim eksperimentima potvrđuje ostala istraživanja o utjecajima ovih oksida na akvatične i terestričke organizme. Heinlaan i suradnici (2008) su istraživali utjecaje nano Ti i Zn oksida na bakterije i dvije vrste rakova (*Daphnia magna*, *Thamnocephalus platyurus*) te utvrdili da TiO_2 nije bio toksičan prema niti jednoj vrsti, dok je ZnO inhibirao rast bakterija. ZnO i TiO_2 su inhibirali rast mikroalga, ali je ZnO rezultirao većom toksičnošću zbog slobodnih Zn^{2+} iona (Arujoa i sur., 2009). Kod gujavica kao što je vrsta *Eisenia fetida*, s kojom se provodi većina testova toksičnosti, ZnO izaziva oksidativni stres, inhibira staničnu aktivnost te uzrokuje oštećenja mitohondrija (Hu i sur., 2010). Manja toksičnost TiO_2 u terestričkim ekosustavima može se objasniti nemogućnošću prolaska nano Ti kroz membrane unutar organizma gujavica, pa tako i enhireida (Lapied i sur., 2011).

4.2 Izloženost pesticidima

Pesticidi se redovno koriste u poljoprivredi diljem svijeta, a njihov utjecaj na bioraznolikost i organizme terestričkih, ali i ostalih ekosustava, izaziva zabrinutost te se kontinuirano istražuje s ciljem kontrole uporabe istih. Pesticidi mogu imati štetan utjecaj na organizme izravno utječući na gensku ekspresiju, ponašanje, reprodukciju, ili neposredno mijenjajući odnose između jedinki i populacija. S obzirom da enhitreide imaju važnu ulogu u ekosustavima i činjenicu da su osjetljivije na zagađenja u odnosu na druge organizme. Iako se

zna da su prikladni indikatorski organizmi, broj radova o utjecajima pesticida na enhitreide je malobrojan.

S obzirom da enhitreide bježe od nepovoljnih uvjeta u okolišu, takvo njihovo ponašanje može se koristiti kao krajnja točka eksperimentalnih testova. Takav test (engl. *Avoidance test*) razvijen je prije 20 godina i do danas je standardiziran (OECD, 2008). Ovakvi eksperimenti su pokazali da enhitreide nisu osjetljivije na karbendazim u ovom testu u odnosu na kronične testove (Amorim i sur., 2005) Eksperimenti su ponavljani sa različitim umjetnim tlima gdje se mijenjala koncentracija gline ili pH vrijednost. Osjetljivost je i dalje ostala niska, a rezultati vrlo varijabilni (Amorim i sur., 2008). Također, nije pokazana nikakva povezanost između izbjegavanja toksikanata i ekološki važnijih krajnjih točaka mjerenja kao što je reprodukcija (Novais i sur., 2010).

Standardizirani laboratorijski reproduktivni testovi na enhitreidama postoje duže vremena i koriste se u procjeni toksičnosti pesticida (OECD, 2004). Za razliku od populacije, utjecaj pesticida na jedinke na molekularnoj i staničnoj razini je slabo istražen. Koristeći mikročipove modificirane za *E. albidus* istražen je utjecaj organopesticida u usporedbi sa metalima. Na reprodukciju su štetni utjecaj imali pesticidi, dok su lipidni metabolički procesi bili pod utjecajem metala (Novais i sur., 2012). Na razini genske ekspresije su istrženi i utjecaji dimetoata, atrazina i karbendazima koji su proporcionalno s koncentracijom mijenjali ekspresiju gena. S obzirom da postoji sekvencirani genom *E. albidus*, istraživanja na razini genske ekspresije imaju visok potencijal u određivanja štetnosti toksikanata.

Pesticidi, kao i nanočestice, uzrokuju oksidativni stres stvarajući slobodne radikale. Svi organizmi imaju zaštitu na staničnoj razini od kisikovih slobodnih vrsta, kao što su vitamini i enzimi (AChE, CAT, GST). Nakon izlaganja fenmedifamu (komercijalno Betanal) vrsta *E. albidus* je pokazala povećane razine tiobarbiturne kiseline (TBARS), povećane aktivnosti CAT, glutation peroksidaze (GPx) te smanjenu aktivnost GST i ChE (Howcroft i sur., 2009, 2011). Osim biomarkera, razvijen je i standardni bioakumulacijski test za enhitreide. U usporedbi s testom s gujavicama on je kraći te je za njegovo provođenje potrebno manje prostora.

5. Zaključak

Vrsta *E. albidus* kao indikatorski organizam u tlu je pogodna za istraživanja toksičnosti nanočestica i pesticida u raznim medijima. Osimizlaganja s umjetnim tlom, rezultati istraživanja pokazuju da su ekstrakt tla i rekonstruirana voda kao mediji pogodni za preliminarne toksične testove na enhitreidama. Međutim, iako su jednostavniji i praktičniji za rad, akvatični testovi su i 100 – 1000 puta osjetljiviji od testa s umjetnim tlom zbog agregacije čestica na dno i izravne izloženosti kutikule enihtreida toksikantima.

Unatoč generalnom mišljenju da su nanočestice metalnih oksida toksičnije od njihovih ne nano oblika, eksperimentalni dio ovog rada, kao i druga istraživanja, dokazuju da unatoč štetnom djelovanju nanočestica na organizme, ne nano oblici izazivaju veću toksičnost na staničnoj razini. S obzirom na nejednolike rezultate u vidu aktivnosti enzima, obrađeni testovi toksičnosti se trebaju prilagoditi i usavršiti te se trebaju obraditi i dodatna mjerenja koja detaljnije pokazuju utjecaj nanočestica i pesticida na enhitreide, kao što su tiobarbiturna kiselina (TBARS), superoksid dismutaza (SOD) i glutation peroksidaza (GSx).

Tijekom zadnjih nekoliko godina povećan je interes za razumijevanjem utjecaja kemikalija na enhitreide zbog njihove osjetljivosti. S obzirom na napredak tehnologije i poznavanje genoma vrste *E. albidus*, danas je moguće odrediti biokemijske osnove osjetljivosti enhitreida na toksikante u okolišu. Iako je reprodukcija jedna od najčešće korištenih krajnjih točaka izlaganja pesticidima, biokemijski markeri pružaju uvid u promjene na fiziološkoj razini organizma i time daju detaljnije razumijevanje o mehanizmima toksičnosti pesticida i sukladno tome je potrebno proširiti istraživanja o utjecaju pesticida na enhitreide. S obzirom da nanočestice smanjuju svoju toksičnost u akvatičnim ekosustavima, bilo bi poželjno istražiti kombinirani utjecaj nanočestica i pesticida na enhitreide.

6. Literatura

Achazi, R.K., Düker, C., Henneken, M., Rothe, B. (1995) Einfluss von anthropogenen Schadstoffen auf terrestrische Invertebraten: 2. Einfluss von BaP, Fla und Cd auf Lebenszyklusparameter von *Enchytraeus crypticus* in Labor-Testsystemen. Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie 24, 535–540

Amorim, M. J. B., Novais, S., Römbke, J., and Soares, A. M. V. M. (2008) Avoidance test with *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae): effects of different exposure time and soil properties. Environmental Pollution 155, 112–116.

Amorim, M.J.B., Römbke, J., and Soares, A.M.V.M. (2005) Avoidance behaviour of *Enchytraeus albidus*: effects of benomyl, carbendazim, phenmedipham and different soil types. Chemosphere 59, 501–510

Amorim, M. J., Sousa, J. P., Nogueira, A. J. A., Soares, A. M. V. M. (2002): Bioaccumulation and elimination of 14 C-lindane by *Encyhtraeus albidus* in artificial (OECD) and a natural soil. Chemosphere, 49: 323-329

Arujoa V., Dubourguier H.C., Kasmets K. and Kahru A. (2009) Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO 2 to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata.* Science of the Total Environment, 407: 1461–1468

Bertrand, L., Monferran, M.V., Mouneyrac, C., Bonansea, R.I., Asis, R., Ame, M.V. (2016) Sensitive biomarker responses of the shrimp *Palaemonetes argentinus* exposed to chlorpyrifos at environmental concentrations: Roles of alpha-tocopherol and metallothioneins. Aquatic Toxicology 179: 72-81

Bruns, E., Egeler, P., Römbke, J., Scheffczyk, A., Spoerlein, P. (2001) Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). Hydrobiologia, 463: 185-196

Cañas, J.E., Qi, B., Li, S., Maul, J.D., Cox, S.B., Das, S., Green, M.J. (2011) Acute and reproductive toxicity of nano-sized metal oxides (ZnO and TiO 2) to earthworms (*Eisenia fetida*). Journal of Environmental Monitoring 13.12: 3351-3357

Carp O, Huisman C.L., Reller A. (2004) Photoinduced reactivity of titanium dioxide. Progress in Solid State Chemistry 32: 33–177

Chen J, Liu M, Zhang L, Zhang J, Jin L. (2003) Application of nano TiO_2 towards polluted water treatment combined with electro-photochemical method. Water Research 37: 3815–3820

Chen, L.Y., Xu, J.Q., Choi, H., Pozuelo, M., Ma, X., Bhowmick, S., Li, X.C. (2015) Processing and properties of magnesium containing a dense uniform dispersion of nanoparticles. Nature, 528; 539-543

Claiborne, A. (1985) Catalase activity. Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. CRC Press, Boca Raton, 283-284.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V.J., Featherstone, R.M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical pharmacology 7.2: 891-909

Gomes, S.I.L, Caputo, G., Pinna, N., Scott-Fordsmand, J.J., Amorim, M.J.B. (2015) Effect of 10 different TiO_2 and ZrO_2 (nano)materials on the soil invertebrate *Enchytraeus crypticus*. Environmental Toxicology and Chemistry, 34-10: 2409-2416

Gong, K., Du, F., Xia, Z., Durstock, M., Dai, L. (2009). Nitrogen-doped carbon nanotube arrays with high electrocatalytic activity for oxygen reduction. Science, 323: 760-764

Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. (1974) Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. Journal of Biological Chemistry, 22: 7130-7139

Heinlaan M., Ivask A., Blinova I., Dubourguier H., Kahru A. (2008) Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO_2 to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. Chemosphere, 71: 1308–1316

Howcroft, C.F., Amorim, M.J.B., Gravato, C., Guilhermino, L., Soares, A.M.V.M. (2009) Effects of natural and chemical stressors on *Enchytraeus albidus*: can oxidative stress parameters be used as fast screening tools for the assessment of different stress impacts in soils? Environment International, 35: 318–324

Howcroft, C.F., Gravato, C., Amorim, M.J.B., Novais, S.C., Soares, A.M.V.M., Guilhermino, L. (2011) Biochemical characterization of cholinesterases in Enchytraeus albidus and assessment of in vivo and in vitro effects of different soil properties, copper and phenmedipham. Ecotoxicology, 20: 119–130

Hu C.W., Li M., Cui Y.B., Li D.S., Chen J., Yang L.Y. (2010) Toxicological effects of TiO 2 and ZnO nanoparticles in soil on earthworm *Eisenia fetida.* Soil Biology and Biochemistry, 43: 586–591

Lapied E., Nahmani J.Y, Moudilou E., Chaurand P., Labille J., Rose J., Exbrayat J.M., Oughton D.H., Joner E.J. (2011) Ecotoxicological effects of an aged TiO2 nanocomposite measured as apoptosis in the anecic earthworm *Lumbricus terrestris* after exposure through water, food and soil. Environment International, 37: 1105–1110

Linde A.R., Garcia-Vazquez E. (2006) A simple assay to quantify metallothionein helps to learn about bioindicators and environmental health. Biochemistry and Molecular Biology Education, 34:360-363

Liu, J., Feng, X., Wei, L., Chen, L., Song, B., Shao, L. (2016) The toxicology of ion-shedding zinc oxide nanoparticles. Critical reviews in toxicology, 46.4: 348-384

Lowry, O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall, R.J. (1951) Protein Measurement with the folin phenol reagent. The Journal of Biological Chemistry, 193: 265-275

Ma H, Wallis L.K., Diamond S., Li S., Canas-Carrell J., Parra A. (2014). Impact of solar UV radiation on toxicity of ZnO nanoparticles through photocatalytic reactive oxygen species (ROS) generation and photoinduced dissolution. Environmental Pollution, 193: 165-72

Nielsen, C. O., Christemsen, B. (1959) The Enchytraeidae, critical revision and taxonomy of European species. Naturalia Jutlandica, 8–9: 1–160

Novais, S. C., Soares, A. M. V. M., Amorim, M. J. B. (2010). Can avoidance in *Enchytraeus albidus* be used as a screening parameter for pesticides testing? Chemosphere, 79: 233–237

Novais, S.C., de Coen, W., Amorim, M.J.B. (2012) Gene expression responses linked to reproduction effect concentrations (EC 10, 20, 50, 90) of dimethoate, atrazine and carbendazim, in *Enchytraeus albidus*. PLoS ONE 7

Organisation for Economic Co-operation and Development (1984) Earthworm, acute toxicity tests. OECD guideline for testing of chemicals, No. 207

Organisation for Economic Co-operation and Development (1996) Guidelines for Testing of Chemicals No. 305.

Organisation for Economic Co-operation and Development (2004) Guideline for the Testing of Chemicals, Enchytraeid Reproduction Test, No. 220.

Römbke, J., Knacker, T. (1989): Aquatic toxicity test for enchytraeids. Hydrobiologia, 180: 235-242

R Core Team 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: https://www.R-project.org/.

Šuteková, E., Hilscherová, K., Hofman, J. (2007) Oxidative stress in enchytraeidae (*E. albidus, E. crypticus*) - Establishment and optimalization of methods. Folia Facultatis scientiarum naturalium Universitatis Masarykianae Brunensis.

Tschuschke, S., Schmitt-Wrede, H.P., Greven, H., Wunderlich, F. (2002) Cadmium Resistance Conferred to Yeast by a Non- metallothionein-encoding Gene of the Earthworm *Enchytraeus*. Journal of Biological Chemistry, 277.7: 5120-5125

Van der Ploeg, M. J. C., Baveco, J.M., van der Hout, A., Bakker, R., Rietjens, J.M.C.M., van den Brink, N.W. (2011) Effects of C 60 nanoparticle exposure on earthworms (*Lumbricus rubellus*) and implications for population dynamics. Environmental pollution 159: 198-203

Weuffen, W. (1968). Zusammenhänge zwischen chemischer Konstitution und keimwidriger Wirkung – 20. Archiv für Experimentelle Veterinärmedizin, 22: 127-132

Yu L.P., Fang T., Xiong D.W., Zhu W.T., Sima X.F. (2011) Comparative toxicity of nano-ZnO and bulk ZnO suspensions to zebrafish and the effects of sedimentation, ˙OH production and particle dissolution in distilled water. Journal of Environmental Monitoring, 13:1975-1982