POJEDINAČNI I SKUPNI UČINCI PROPIKONAZOLA I CINKOVOG OKSIDA NA POPULACIJSKE I BIOKEMIJSKE MARKERE ENHITREIDA (Enchytraeus albidus)

Ćurčić, Nikola

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:181:530533

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

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

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Diplomski sveučilišni studij Biologija i kemija; smjer: nastavnički

Nikola Ćurčić

Pojedinačni i skupni učinci propikonazola i cinkovog oksida na populacijske i biokemijske markere enhitreida (*Enchytraeus albidus*)

Diplomski rad

Osijek, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku **Diplomski rad**
Odjel za biologiju
Diplomski sveučilišni studij: Biologija i kemija; smjer: nastavnički

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

POJEDINAČNI I SKUPNI UČINCI PROPIKONAZOLA I CINKOVOG OKSIDA NA POPULACIJSKE I BIOKEMIJSKE MARKERE ENHITREIDA (*Enchytraeus albidus)*

Nikola Ćurčić

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

Mentor: doc. dr.sc. Davorka K. Hackenberger

Sažetak: Štetni učinci pesticida na okoliš i neciljne organizme dobro su poznati. Kako bi se smanjio štetan utjecaj pesticida pojavljivale su se različite metode kojima je cilj smanjiti njihovu uporabu. Jedan od načina smanjenja pesticida je primjena nanočestica kao pesticida ili primjena istih kao nosača pesticida. Cilj ovog rada je bilo utvrditi pojedinačne i kombinirane učinke cinkovog oksida (ZnO) u nano i ne nano obliku te propikonazola (PCZ) na reprodukcijski uspjeh te biokemijske markere (acetilkolinesteraza (AChE), katalaza (CAT), glutation S-transferaza (GST) i reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline (TBARS)) enhitreida (*Enchytraeus albidus*). Izračunata je manja EC50 vrijednost za ne nano čestice nego za nanočestice cinkovog oksida (ZnO). Rezultati eksperimenta pokazuju kako PCZ uzrokuje lipidnu peroksidaciju kod kombiniranog izlaganja. Kombinirano izlaganje nije utjecalo na povećanje oksidativnog stresa u usporedbi s pojedinačnim izlaganjem.

Ključne riječi: pesticidi, nanočestice, reprodukcija, AChE, CAT, GST, TBARS

Broj stranica: 57
Broj slika: 26
Broj tablica: 5
Broj literaturnih navoda: 49
Jezik izvornika: Hrvatski

Datum obrane: 18.06.2018.

Stručno povjerenstvo za obranu:
1. Dr.sc. Branimir K. Hackenberger, prof., predsjednik
2. Dr.sc. Vesna Peršić, doc., član,
3. Dr.sc. Davorka K. Hackenberger, doc., član,
4. Dr.sc. Goran Palijan, doc., zamjena člana.

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 **MS Thesis**
Department of Biology
Graduate university study programme in Biology and Chemistry Education

Scientific Area: Natural sciences
Scientific Field: Biology

SINGLE AND BINARY EFFECT OF PROPICONAZOLE AND ZINC OXIDE ON POPULATION AND BIOCHEMICAL MARKERS OF ENCHYTRAEIDS (*Enchytraeus albidus)*

Nikola Ćurčić

Thesis performed at: Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Subdepartment of quantitative ecology

Supervisor: Davorka K. Hackenberger, PhD, Assistant Professor

Abstract: The adverse effects of pesticides on the environment and non-taget organisms are well known. To reduce that influence many alternative methods have been proposed, and one of those is a usage of nanoparticles as pesticides or as pesticide carriers. This study investigated single and combined effect of nano and bulk particles of zinc oxide (ZnO) and propiconazole (PCZ) on reproduction and biochemical markers (acetylcholine-esterase (AChE), catalase (CAT), gluthation S-transferase (GST), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)) of enchytraeids (*Enchytraeus albidus*). Calculated EC50 value of bulk ZnO particles is lower than EC50 value of ZnO nanoparticles. Results of the experiment show that PCZ causes lipid peroxidation in a binary exposure, although binary exposure did not increase oxidative stress in comparison with a single exposure.

Keywords: pesticides, nanoparticles, reproduction, AChE, CAT, GST, TBARS

Number of pages: 57
Number of figures:26
Number of tables:5
Number of references:49
Original in: Croatian

Date of the thesis defence: 18th June 2018.

Reviewers:
1. **Branimir K. Hackenberger**, PhD, Associate professor, commision president
2. **Vesna Peršić**, PhD, Assistant professor, member
3. **Davorka K. Hackenberger**, Assistant professor, supervisor and member
4. **Goran Palijan**, PhD, Assistant professor, substitute

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

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 naklade za znanost (IP-09-2014-4459); voditelj projekta prof. dr. sc. Branimir K. Hackenberger.

Zahvaljujem mojoj mentorici doc. dr. sc. Davorki K. Hackenberger na strpljenju, savjetima i vodstvu prilikom izrade ovog diplomskog rada čija izrada bez nje ne bi bila moguća.
Hvala svim članovima Zavoda za kvantitatvnu ekologiju na srdačnoj podršci i pomoći, a posebnu zahvalu upućujem Luci Zelić na pomoći pri eksperimentalnom dijelu rada
Hvala mojim roditeljima koji su uvijek bili tu za mene prilikom studiranja
Zahvaljujem svima koji su bili tu za mene kada mi je trebala pomoć i podrška

SADRŽAJ

1. UVOD ……1

1.1. Nanotehnologija i nanočestice …..……....1

1.2. Zaštita u poljoprivrednoj proizvodnji …...……..……4

1.2.1. Pesticidi ...……..…….……4

1.2.2. Triazolni fungicide ...……...…….…..5

1.3. Beskralježnjaci tla kao eksperimentalni organizmi u testovima toksičnost 7

1.4. Molekularni biomarkeri kao pokazatelji stresa na organizam……...…....…..8

1.4.1. Acetilkolin esteraza (AChE) ...……...…….…..…….8

1.4.2. Katalaza (CAT) ……...…….……..……9

1.4.3. Glutation S-transferaza (GST) ...……...…….……..…….9

1.4.4. Reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline ...…….…..…….……..10

1.5. Cilj istraživanja ……..…….…….....…..…11

2. Materijali i metode ……...…….....…12

2.1. Eksperimentalni organizmi ...……...……..….12

2.1.1. Sistematika enhitreida (Oligochaeta: Enchytraeidae) ……..…...….12

2.1.2. Građa enhitreida (Oligochaeta: Enchytraeidae) ……..….13

2.2. Ispitivane tvari ……..……....14

2.2.1. Cinkov oksid (ZnO) ……..……...14

2.2.2. Propikonazol (PCZ) …….……16

2.3. Reprodukcijski test toksičnosti s enhitreidama ….……....17

2.3.1. Pojedinačno izlaganje cinku i propikonazolu …….……17

2.3.1.1. Cinkov oksid (ZnO) ……17

2.3.1.2. Propikonazol …….……...……..…..17

2.3.2. Binarno izlaganje cinku i propikonazolu ……...……..18

2.3.3. Tijek reprodukcijskog testa ……..…….……...19

2.4. Mjerenje enzimske aktivnosti ……..……...……....21

2.4.1. Acetilkolin esteraza (AChE) ……..……..…...…….21

2.4.2. Katalaza (CAT) …….……..……22

2.4.3. Glutation S-transferaza (GST) ……..…….…….22

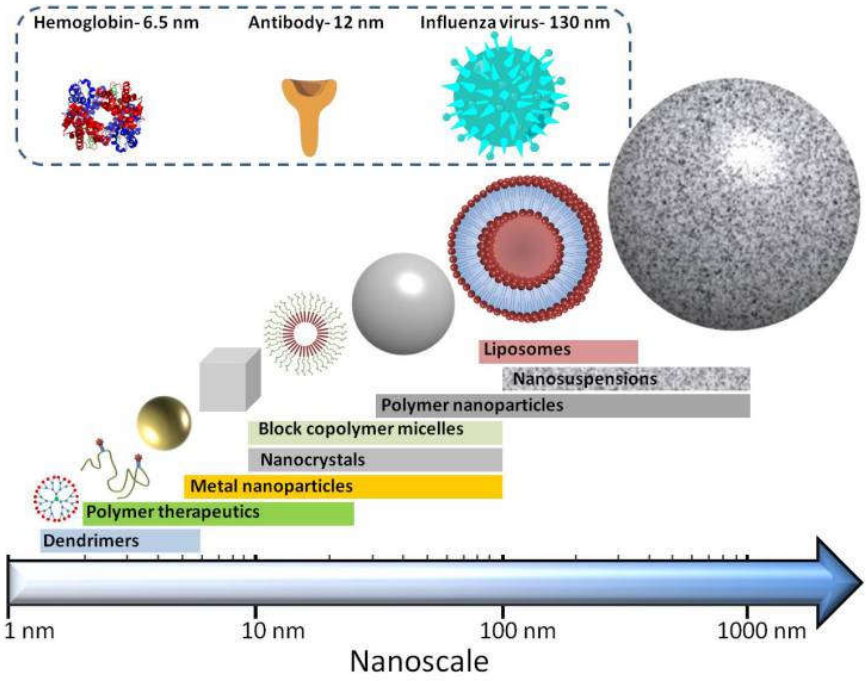
2.4.4. Reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline (TBARS) ……..……...……22

2.5. Statistička obrada podataka ...……...…….……...….23
3. Rezultati ...……...……...….....24
3.1. Reprodukcijski test ...……...…….…..…….....24
3.1.1. Pojedinačno izlaganje ...……...……..…….…….24
3.1.2. Binarno izlaganje ...…...……...……..……..26
3.2. Enzimska aktivnost AChE, CAT, GST I TBARS ..…….…….…..……..27
3.2.1. Acetilkolin-esteraza ……...…….……...……..….27
3.2.2. Katalaza ...……...…..……29
3.2.3. Glutation S-transferaza ...…….……...…….31
3.2.4. TBARS ...……..……..……..32
4. Rasprava ……...…….....….35
5. Zaključak .....……..……..…….....……..40
6. Metodički dio ……...…….……41
7. Literatura ...…….....….….45

1. UVOD

1.1 Nanotehnologija i nanočestice

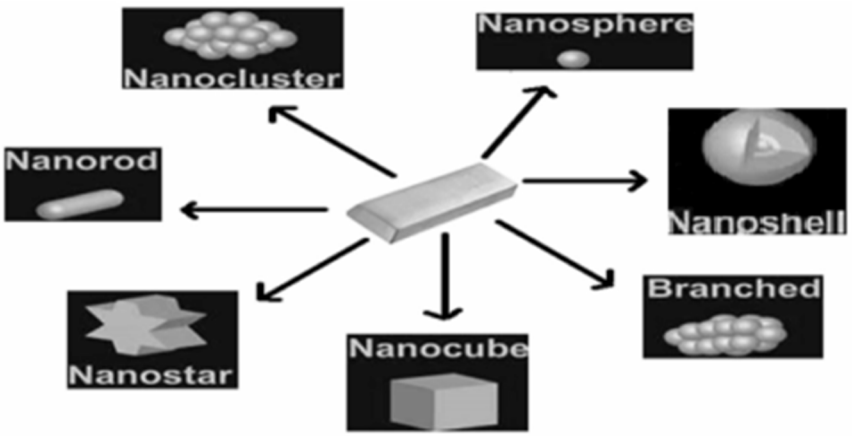
Prema izvješću OECD-a (OECD, 2011), nanočestice su čestice čija veličina se nalazi u rasponu od 1 do 100 nm. Prema nekim izvorima veličina nanočestica seže čak i do 1000 nm, dok se prema nekim izvorima donja granica dimenzija nanočestica ne smatra relevantnom (Balogh, 2010). Međutim, među samim ekspertima na području nanotehnologije ne postoji jedan točno određeni koncenzus kojim se definiraju nanočestice, pa je stoga moguće pronaći cijeli niz definicija nanoznanosti, nanotehnologije i nanočestica. Te definicije možemo podijeliti na tri skupine: znanstvene, javne i pravno orijentirane definicije (koje omogućuju zakonsku osnovu za donošenje odluka o proizvodnji nanočestica). Tijekom svoga rada znanstvenici kontinuirano formuliraju nove definicije koje su u skladu sa njihovim područjem istraživanja. Prilikom iznošenja znanstvenih otkrića javnosti novinari formuliraju definicije koje su prigodnije za laike, pa na taj način nastaju tzv. javne definicije, a kada je potrebno djelatnost koja se bavi nanotehnologijom učiniti legalnom, nastaju pravno orijentirane definicije (engl. *decision making definitions*) (Balogh, 2010).



Slika 1: Usporedba veličina različitih čestica na skali od 1 do 1000 nm

(Izvor: Web 1)

Slavni fizičar Richard P. Feynman predvidio je uporabu nanočestica zbog njihovih svojstava još 1959. godine (Rai i sur, 2009). Svojstva nanočestica ne ovise samo od materijala od kojega su čestice napravljene, nego i sama dimenzija čestica doprinosi pojavi jedinstvenih svojstava koja se ne ispoljavaju kod čestica većih dimenzija načinjenih od iste tvari. Ukupna površina nanočestica jako je velika što im daje jedinstvena električna i kemijska svojstva. Tako nanočestice pronalaze primjenjivost u velikom spektru grana ljudske djelatnosti, kao što je komercijalna, zdravstvena, vojna te u granama koje proučavaju okoliš (Drobne, 2007). Također i sam oblik nanočestica doprinosi različitim svojstvima koja omogućuju različitu primjenu istih. Nastanak različitih oblika nanočestica regulira se prilagođavanjem uvjeta sinteze nanočestica, kao što su temperatura, tlak i sastav atmosfere u kojoj se provodi sinteza (Wang, 2004).



Slika 2: Spektar oblika nanočestica zlata

(Izvor: Web 2)

Razvojem nanotehnologije postavlja se pitanje kakav je utjecaj proizvedenih nanočestica na okoliš te na zdravlje čovjeka. Grana znanosti koja se bavi ovim pitanjima naziva se nanotoksikologija i relativno je mlada, ali sve više značajna te se razvija velikom brzinom (Drobne, 2007). Iako je mnogo toga još nepoznato te su potrebna mnogobrojna istraživanja kako bi se utvrdili točni mehanizmi toksičnog djelovanja nanočestica, utvrđeno je kako nanočestice metala imaju negativan utjecaj na organizme. U nekim slučajevima je utjecaj nanočestica metala izraženiji nego kod čestica koje nisu nanodimezija (čestice većih dimenzija). Tako je primjerice negativan utjecaj bakrovih nanočestica daleko veći od utjecaja čestica bakra koje su mikrodimenzija, što se moglo primjetiti histološkim promjenama, ali i makroskopskim promjenama na bubregu miša (Chen, 2006).

Jedan od načina kako bi nanočestice metala mogle dospjeti u okoliš je njihova uporaba kao pesticida. U prilog tome govore istraživanja koja potvrđuju njihovo djelovanje na štetočine. U jednom od istraživanja dokazan je negativan utjecaj Ag i Ag-Zn nanočestica na uš *Aphis nerii* koja napada ukrasno bilje iz porodica Apocynaceae i Sclepiadaceae (Rouhani i sur., 2012). Nanočestice se mogu koristiti i kao nosači pesticida što bi količinski smanjilo uporabu pesticida u poljoprivredi, ali bi bio još jedan način kojim bi nanočestice završavale u okolišu (Qian i sur., 2010).

1.2. Zaštita u poljoprivrednoj proizvodnji

U posljednjih se 50 godina ljudska populacija značajno povećala (više nego udvostručila) što je za intenziviralo poljoprivrednu proizvodnju kako bi se namirila potreba za hranom. S obzirom da povećanje obradivih površina nije pratilo rast populacije (obradiva površina na svijetu se u istom periodu povećala za nekih 10%), bilo je potrebno povećati iskoristivost postojećih obradivih površina. To je postignuto primjenom pesticida kojima je smanjen gubitak zbog raznih nametnika (Gaupp-Berghausen, 2015).

1.2.1. Pesticidi

Pesticidi su kemijske tvari, prirodnog ili umjetnog podrijetla, te se mogu podijeliti prema organizmima na koje djeluju. Tako razlikujemo insekticide, akaricide, fungicide, herbicide, moluscide i rodenticide (Ware i Whitacre, 2004). Ukratko, to su toksične tvari čiji cilj primjene je selektivno suzbijanje štetnih organizama.

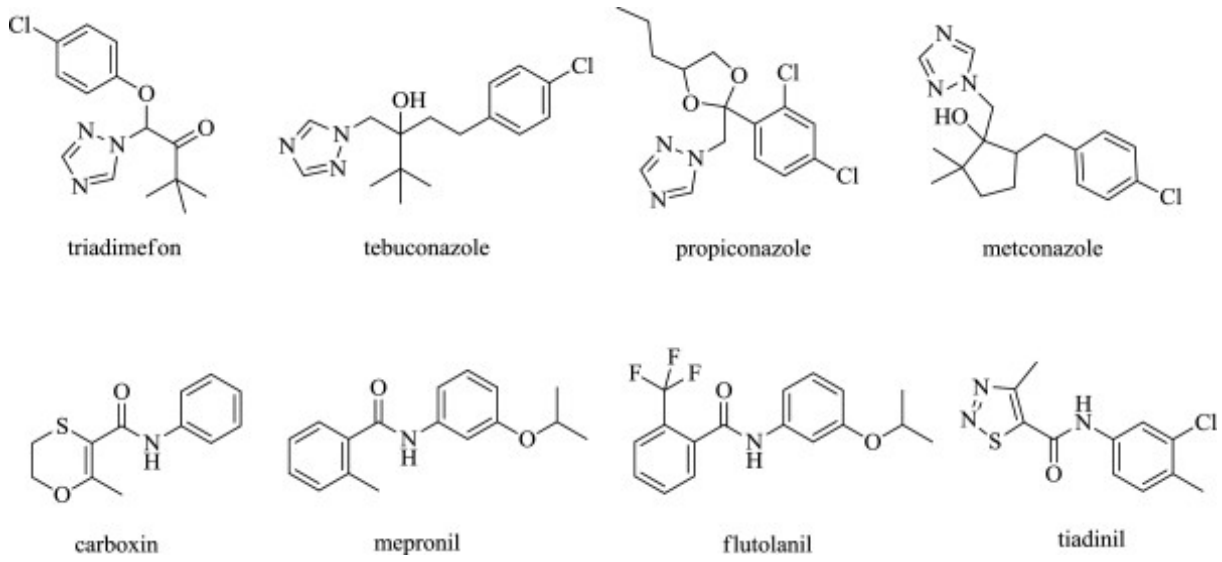
Iako je primjena pesticida nužna kako bi se postigla potrebna iskoristivost obradivih površina za uzgoj hrane, njihova primjena ima dugoročno loše učinke zbog zagađenja okoliša. Oni se zadržavaju u tlu, zraku, vodi te u tkivima organizama, koji uključuju i ljude (Otitoju i Onwurah, 2011.). Ovisno o njihovoj topivosti u vodi ili u mastima, put kontaminacije je različit. Pesticidi topivi u vodi ispiru se iz tla u vode (podzemne vode, rijeke, jezera) te uzrokuju štetu vodenim organizmima koji nisu bili primarni cilj primjene pesticida. Pesticidi topivi u mastima završavaju u hranidbenim lancima gdje se zadržavaju u organizmima, preciznije njihovom masnom tkivu procesom biomagnifikacije (Mahmood i sur., 2016).

Zbog svoga štetnog djelovanja pokušava se u praksi pesticide koristiti u što manjoj količini, odnosno pokušava se iz što manje količine pesticida izvući maksimum njihovog djelovanja. Pri određivanju treba li uopće koristiti pesticide stručnjaci za kontolu brojnosti nametnika koriste se konceptom „ekonomske granice“. Taj koncept temelji se na činjenici da sve biljke koje se koriste u poljoprivrednom uzgoju mogu tolerirati određnu količinu nametnika bez značajne ekonomske štete, odnosno štete za rast same biljke. Ukoliko je brojnost nametnika manja od „ekonomske granice“, pesticidi se ne primjenjuju. Ukoliko se pesticidi trebaju koristiti, prije same uporabe potrebno je odrediti točno koji pesticid treba koristiti kako bi se postigao maksimum suzbijanja određenog nametnika. Nakon što se odredi pesticid potrebno je odrediti količinu koja će se primjenjivati po jedinici površine. Osim vrste pesticida i količine veliku važnost ima i vrijeme kada će se pesticid primjenjivati. Ako se pesticid primjeni rano nametnici

su prisutni u premalom broju da bi ih se kontroliralo, odnosno ne može se pouzdano odrediti brojnost nametnika, a posljedično niti količina pesticida. Ukoliko se pesticid primjeni kasno, broj nametnika je obično velik, te je potrebno primjenjivati veću količinu pesticida. U poljoprivrednom uzgoju pribjegava se i alternativnim metodama koje zamjenjuju uporabu pesticida. Sam izbor kultura koje su otporne na nametnike može biti dobra prevencijska metoda. Također promjena kulture koja se uzgaja na nekoj obradivoj površini može smanjiti negativan učinak nametnika. Kao metoda suzbijanja biljnih nametnika (korova) može se koristiti i alelopatija, svojstvo da kemijski spojevi koje otpušta korijen jedne biljke smetaju rastu i razvoju biljaka koje rastu u blizini. Također se može koristiti i biološka kontrola nametnika, što uključuje primjenu vrsta koje ne čine štetu kulturi koja se uzgaja, a suzbijaju nametnike (Fluck, 1992).

1.2.2. Triazolni fungicidi

Triazolni fungicidi su fungicidi koji u svojoj strukturi sadrže peteročlani heterociklički prsten koji sadrži dva atoma ugljika i i tri atoma dušika (po tom svojstvu su i dobili ime). Skupina sadrži sljedeće fungicide: bitertanol, ciprokonazol, difenokonazol, epoksikonazol, fenbukonazol, flukvinkonazol, flusilazole, flutriafol, heksakonazol, ipkonazol, miklobutanil, penkonazol, propikonazol, protiokonazol, tebukonazol, tetrakonazol, triadimefon, triadimenol, tritikonazol. Triazolni fungicidi inhibiraju demetilaciju koja je jedan od koraka u sintezi ergosterola, koji je važan za rast stanične membrane gljivica čime se zaustavlja njihov rast (Web 3). Premda su triazolni fungicidi danas najviše korištena skupina fungicida, pokazalo se da imaju izrazito negativan utjecaj na vodene organizme (Castillo i sur., 1996), ali isto tako i na terestričke organizme. Tako prilikom izlaganja jedinki gujavice *E. fetida* propikonazolu dokazan je njegov negativan učinak na proteine, GSH-Px te su vidljive i histopatološke promjene (Gao i sur., 2013).



Slika 3: Strukture nekih triazolnih fungicida

(Izvor: Web 4)

1.3. Beskralježnjaci tla kao eksperimentalni organizmi u testovima toksičnosti

Beskralježnjaci tla su se s vremenom pokazali kao vrlo korisna skupina organizama za ekotoksikološka ispitivanja toksičnosti. Prednosti uporabe beskraljžnjaka leže u tome što su sama ispitivanja cijenovno pristupačna, sami testovi kraju relativno kratko zbog brzog životnog ciklusa organizama te su jednostavni za provedbu. Kratki životni ciklus i veliki broj jedinki koje nastaju u svakoj idućoj generaciji omogućuju laku i brzu proizvodnju komercijalnih standardiziranih kompleta testova namijenjenih za ekotoksikološka ispitivanja. Također i raznovrsnost staništa koje beskralježnjaci naseljavaju, ali i sama raznovrsnost sistematskih skupina beskralježnjaka te njihova evolucijska udaljenost omogućuje široki izbor kombinacija eksperimentalnog organizma i tvari. Prilikom testiranja toksičnosti tvari u tlu koriste se kolutićavci maločetinaši, preciznije gujavice, i enhitreide. Iako su nakon oštećenja tijela sposobni se regenerirati, u ekotoksikološkim testovima se ispituje njihova sposobnost spolnog razmnožavanja. Osim ove skupine organizama koristi se i vrsta skokuna (Collembola) *Folsomia candida* (Lock i Janssen, 2004).

Enhitreide do prije petnaest godina nisu bile korištene u ekotoksikološkim istraživanjima zbog nepostojanja standardiziranih protokola za testove. Stjecanjem saznanja u tom području došlo se do zaključka kako su ovi organizmi vrlo osjetljivi na kemijske tvari u okolišu što se vidi po promjenama koje se pojavljuju na organizmima (morfološki te bihevioralno). Iako je prva dokumentirana uporaba enhitreida u eksperimentu bila još 1968. godine, prvi standardizirani protokoli pojavili su se '80-ih godina na vrstama *E. albidus* i *E. crypticus*. Do danas enhitreide su korištene u brojnim znanstvenim radovima, a korištene su za ispitivanje raznih toksičnih tvari uključujući pesticide i metale (uključujući i nanočestice istih) (Römbke, 2003).

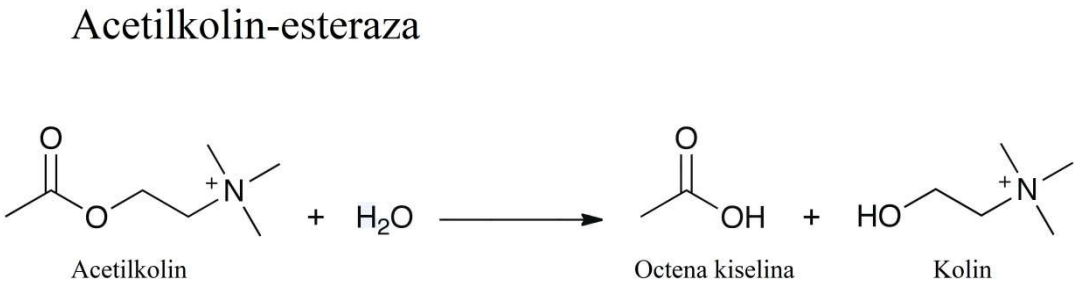
Kao pokazatelj stupnja toksičnosti u testovima s enhitreidama učestalo se koriste vrijednosti LC50 i EC50. LC50 (engl. *lethal concentration, 50%*) predstavlja koncentraciju tvari pri kojoj ugiba 50% populacije na kojoj se radi testiranje tvari u određenom vremenu, a EC50 predstavlja onu koncentraciju tvari čiji je učinak polovica koncentracije maksimalnog učinka te tvari u određenom vremenu. Usporedbom tih koncentracija za različite tvari možemo ustanoviti koja tvar ima veći učinak na eksperimentalni organizam, kao i koji organizam je osjetljiviji na tvar koja se testira. Prilikom istraživanja komparativne toksičnosti cinkovog-II-klorida ($ZnCl_2$), elementarnog cinka u prahu te cinkovog oksida (ZnO) na testirane terestričke organizme (*E. fetida*, *E. albidus* i *F. candida*) dobivene su različite vrijednosti LC50 i EC50 za svaku od navedenih tvari. (Lock i Janssen, 2004).

1.4. Molekularni biomarkeri kao pokazatelji stresa na organizam

Pod pojmom biomarkeri smatraju se biokemijski, fiziološki ili histološki indikatori koji su uzrokovani izlaganjem ili djelovanjem ksenobiotičkih kemikalija. Neki autori pod biomarkere također smatraju i promjene ponašanja eksperimentalnih organizama, međutim danas se takve promjene smatraju odgovorom cijelog organizma, zajedno sa stupnjem preživljavanja, rasta i reprodukcije. Prvo korištenje biomarkera kao pokazatelja stresa na organizam je bilo u humanoj toksikologiji, gdje su se pokazali kao učinkovita mjera za stupanj izloženosti nekoj određenoj kemikaliji ili kao rani pokazatelj specifičnih bolesti ili sindroma (Forbes, 2005). U ekotoksikologiji molekularni biomarkeri se koriste kao pokazatelj toksičnosti tvari u okolišu (Gastaldi i sur., 2007). Postoji više klasifikacija biomarkera, ali najprihvaćenija podjela biomarkera je na biomarkere učinka i biomarkere izloženosti (Hopkin i sur., 2012). Biomarkeri učinka su oni biomarkeri čija pojava označava utjecaj neke kemijske tvari na organizam te mogu pokazati stupanj djelovanja kemijske tvari na organizam, dok biomarkeri izloženosti se koriste kao dokaz izloženosti organizma nekom određenom agensu, ali ne mogu pokazati stupanj utjecaja nekog kemijskog spoja na organizam.

1.4.1. Acetilkolin esteraza (AChE)

Acetilkolin esteraza je enzim čija je uloga u organizmu hidrolitička razgradnja acetilkolina na kolin i octenu kiselinu. Acetilkolin u organizmu ima ulogu neurotransmitera, odnosno kemijskog prijenosnika živčanog signala u sinapsama. Nemogućnost njegovog funkcioniranja uzrokovanog inhibicijom od strane kemijskih tvari odražava se nemogućnošću prekida prijenosa živčanog impulsa u sinapsi. Primarno se acetilkolin esteraza nalazi u mišićnom tkivu u sinapsama između živčanih stanica te u živčano-mišićnim sinapsama, a grupa enzima kojoj pripada naziva se serinske esteraze (skupina enzima koja u aktivnom mjestu ima aminokiselinu serin). Izloženost gujavice *E. andrei* pesticidima (endosulfan, temefos, malation i pirimifos-metil) pokazuje smanjenje aktivnosti AChE sa porastom koncentracije samih pesticida (Stepić i sur., 2013).



Slika 4: Kemijska reakcija hidrolitičkog cijepanja acetilkolina na kolin i octenu kiselinu
(Izvor: Web 5)

1.4.2. Katalaza (CAT)

Uloga enzima katalaze u stanici je razgradnja vodikovog peroksida na kisik i vodu

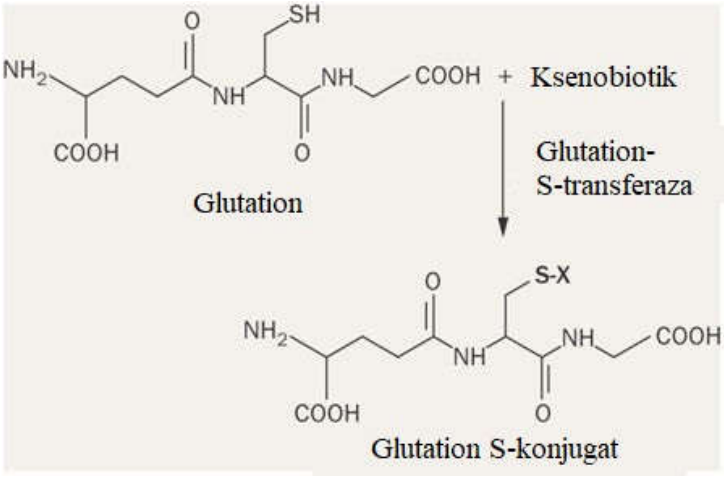
$$H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$$

Vodikov peroksid u stanicama nastaje kao nusprodukt aerobnog metabolizma te kako bi organizam mogao normalno funkcionirati mora biti metabolički uklonjen jer ima izrazit oksidativni učinak na stanične strukture, odnosno jedan je od kemijskih tvari koje u stanicama neposredno izazivaju oksidativni stres. Kvartarna struktura katalaze se sastoji od četiri domene uz koje su prisutne četiri porfirinske skupine koje su ujedno i aktivno mjesto ovog enzima. Izloženost enhitreida (*E. albidus*) nanočesticama bakra pokazala je utjecaj na aktivnost katalaze. Nakon 4 dana izloženosti nanočesticama aktivnost katalaze se povećala, ali nakon 8 dana izloženosti aktivnost katalaze opada ispod razine aktivnosti koju je pokazala kontrolna skupina (Novais i sur., 2011).

1.4.3. Glutation -S-transferaza (GST)

Glutation -S-transferaza (GST) je skupina enzima koji u organizmu imaju ulogu kataliziranja konjugacije elektrofilnih dijelova endogenih i egzogenih molekula sa sulfhidrilnom skupinom tripeptida glutationa, čime se smanjuje oksidativni utjecaj tih molekula na organizam (Malavolta i Mocchegiani, 2016). Prilikom izlaganja gujavica vrste *Aporrectodea calliginosa nocturna* smjesi šest pesticida (klorpirifos-etil, λ-cihalotrin, folpet, metalaksil-M,

fosetil-Al i miklobutanil) primjećena je promjena u aktivnosti GST. Nakon 3 dana izloženosti pesticidima aktivnost GST bila je povećana. Nakon 7 dana nije primjećena statistički značajna razlika razlika u aktivnosti, ali nakon 14 dana aktivnost GST bila je značajno smanjena (Schreck i sur., 2008)



Slika 5: Reakcija vezanja ksenobiotika na tripeptid glutation
(Izvor: Web 6)

1.4.4. Reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline (TBARS)

TBARS test kvantitativno određuje stupanj oksidativnog stresa mjereći peroksidativnu razgradnju lipida koja je uzrokovana slobodnim radikalima. Produkt tih reakcija je malonildialdehid (MDA), koji u reakciji sa tiobarbiturnom kiselinom pri uvjetima kiselosti i visoke temperature stvara produkt koji se može mjeriti spektrofotometrijski (Oakes i sur., 2002). Samo mjerenje slobodnih radikala je teško zbog njihovog kratkog razdoblja poluživota. Svojim djelovanjem pesticidi kod terestričkih organizama povećavaju oksidativni stres koji se može očitovati mjerenjem koncentracije TBARS (Wu i sur, 2010).

1.5. Cilj istraživanja

- Istražiti učinak izlaganja enhitreida (*E. albidus*) pojedinačno cinkovom oksidu u nano i ionskom obliku te fungicidu propikonazolu na aktivnosti biomarkera (AChE, CAT, GST i TBARS)
- Odrediti EC50 vrijednosti za reprodukciju nano i ionskog ZnO i propikonazola
- Utvrditi postoje li razlike u učinku nano i ionskog ZnO i propikonazola prilikom binarnog izlaganja na aktivnosti biomarkera
- Utvrditi postoje li razlike u učinku nano i ionskog ZnO i propikonazola prilikom binarnog izlaganja na reprodukciju

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Eksperimentalni organizmi

Organizam koji je korišten u ovom pokusu je *Enchytraeus albidus* (Henle, 1837), maločetinaš iz porodice Enchytraeidae. Jedinke su uzgojene u laboratorijskoj kulturi na Odjelu za biologiju u vlažnom tlu, a hranjene su se autoklaviranom i usitnjenom zobi.

2.1.1. Sistematika eksperimentalnog organizma

Carstvo: Animalia
Koljeno: Annelidae
Razred: Clitellata
Red: Enchytraeida
Porodica: Enchytraeidae
Rod: *Enchytraeus*
Vrsta: *Enchytraeus albidus* (Henle, 1837.)



Slika 6: *Enchytraeus albidus* (Henle, 1837)
(Izvor: Web 7)

2.1.2. Građa eksperimentalnog organizma

Vrsta *E. albidus* pripada u podrazred maločetinaša. Izvana tijelo je jasno metamerno podijeljeno na kolutiće. Na svakom kolutiću nalazi se po četiri vrećice iz kojih rastu četine (dvije vrećice postavljene su s trbušne strane, a sa svake strane nalazi se još po jedna vrećica). Na osnovici svake četine nalaze se mišići protraktori i retraktori (Habdija i sur., 2011). Na površini epiderme nalazi se tanka kutikula koju izlučuju sluzne žlijezde koje se nalaze u epidermi. Ispod epiderme nalazi se sloj prstenastih mišića, a oni prekrivaju uzdužne mišiće podijeljene u 4 snopa.

Živčani sustav građen ljestvičave je građe, a gradi ga ljestvičava živčana vrpca koja se nalazi duž tijela sa trbušne strane. U prednjem dijelu tijela nalaze se cerebralni i podždrijelni ganglij koji su međusobno povezani konektivama. Fotoreceptori su jednostanični i nalaze se na epidermi te su gušće grupirani s prednje i gornje strane tijela.

Probavni sustav je prohodan i započinje ustima koja se nalaze ispod prostomija. Iza usta nalazi se ždrijelo koje ima ulogu crpke za uvlačenje hrane, a također sadrži i ždrijelne žlijezde koje izlučuju slinu. Nakon ždrijela slijedi jednjak koji sa posteriorne strane prelazi u mišićni želudac, a uloga mu je usitnjavanje hrane. Na mišićni želudac nastavlja se trepetljikavo crijevo. Prednji dio crijeva ima ulogu izlučivanja probavnih enzima, a stražnji dio ima apsorpcijsku ulogu. Površina crijeva je povećana tzv. tiflozolisom, odnosno crijevnim uvrnućem. Probavni sustav završava sa otvorom pigidijem.

Optjecajni sustav građen je od leđne i trbušne krvne žile koje su međusobno povezane prstenastim žilama. Krv u leđnoj žili teče prema naprijed, a u trbušnoj prema natrag. U prednjem dijelu tijela nalaze se bočna srca. Izmjena plinova odvija se preko površine tijela, a respiratorni pigment je hemoglobin.

U odraslih jedinki za ekskreciju zadužen je metanefridijalni sustav. Nefrostom se nalazi na kolutiću ispred, početni dio tubula prolazi kroz pregradu između kolutića te se u sljedećem kolutiću stvara klupko.

Gonade su smještene u nekoliko prednjih kolutića (spolni kolutići). Ženski spolni kolutići nalaze se iza muških, što znači da su jedinke vrste *E. albidus* su hermafroditi. U ranoj fazi razvoja gamete se otpuštaju i ulaze u celomske odjeljke, tzv. sjemene mjehuriće (gdje odlaze spermiji) i jajne vrećice (gdje odlaze jajne stanice) u kojima se događa sazrijevanje spolnih stanica. Pojas (clitellum) je pomoćna reproduktivna struktura koja ima trostruku ulogu. U površinskom dijelu nalaze se sluzne žlijezde, u srednjem dijelu se nalaze žlijezde koje izlučuju

kokon, a najdublji sloj zadužen je za izlučivanje albumina, čija je uloga prehrana embrija (Habdija i sur, 2011).

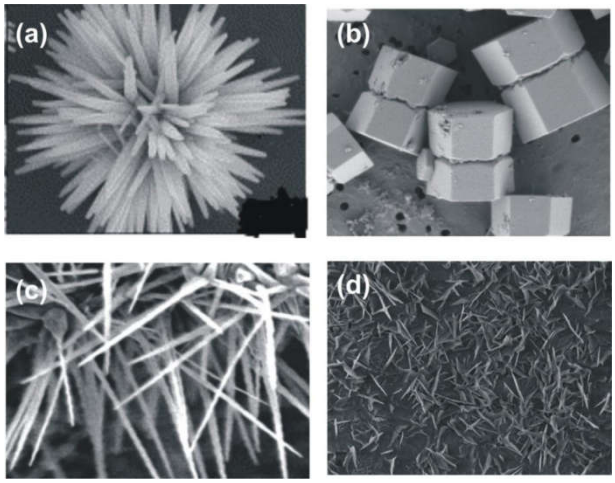
2.2. Ispitivane tvari

Ispitivane tvari u ovom pokusu su bile čestice cinkovog oksida (ZnO), u nano i ne nano obliku, te fungicid propikonazol (PCZ).

2.2.1. Cinkov oksid (ZnO)

Nanočestice ZnO privukle su pažnju širokog spektra struka zbog posebne iskoristivosti na području optoelektronike, senzora, vodiča i biomedicine. Već 1960-ih započeta je sinteza i istraživanja tankih ZnO filmova zbog primjene kao senzora, vodiča i katalizatora, a u zadnjih nekoliko desetljeća fokus proučavanja je prebačen na jednodimenzionalne (1D) nanomaterijale jer se smanjenjem veličine čestica na nano razinu pojavljuju svojstva (električna, mehanička, optička i kemijska) koja nisu karakteristična za isti materijal pri većim dimenzijama čestica. ZnO je višestruko iskoristiv materijal sa mogućnošću sinteze raznolike morfologije, koja može varirati u nizu oblika: nanočešalj, nanoprsten, nanoheliks, nanožica i nanokavez (Wang, 2004)

Sinteza nanočestica ZnO odvija se pomoću *solid-vapour* tehnike. ZnO koji se nalazi u praškastom obliku vaporizira se povećanjem temperature nakon čega u kontroliranim uvjetima promjenom parametara kao što je tlak, temperatura i sastav atmosfere u kojoj se odvija sinteza kondenziraju nanočestice ZnO (Wang, 2004).

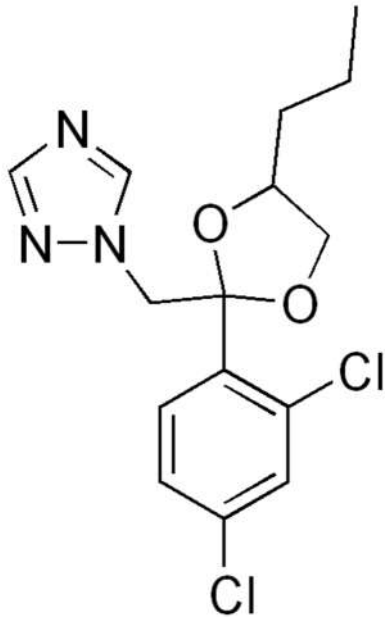


Slika 7: Primjeri raznolikosti morfologije nanočestica Zno
(Izvor: Web 8)

Proizvođač nanočestica ZnO je tvrtka Io-li-tec, a prosječna veličina nanočestica je od 90-210 nm. Proizvođač ne nano čestica ZnO je tvrtka T.T.T. d.o.o.

2.2.2. Propikonazol (PCZ)

Propikonazol (PCZ) je fungicid koji pripada u skupinu triazolnih fungicida. Također je poznat pod imenom DMI (*engl. demethylation inhibiting fungicide*). Propikonazol djeluje tako da se veže (te inhibira) 14-alfa demetilazu koja fiziološki demetilira prekursor u ergosterol. Posljedično ergosterol se ne može ugraditi u rastuću staničnu membranu gljivica što zaustavlja stanični rast gljivica.



Slika 8: Strukturna formula propikonazola
(Izvor: Web 9)

Propikonazol, kao i ostali triazolni fungicidi, imaja kraći period poluraspada i manju stopu bioakumulacije od organoklorida, ali značajan negativan utjecaj na vodene ekosustave. U ovom radu korišten je komercijalni pripravak propikonazola pod nazivom „Bumper 25 EC“ proizvođača Irvita Plant Protection N.V., čija je koncentracija propikonazola 250 g/L. Koristi se kod gljivičnih infekcija pšenice i ječma, vinove loze te ukrasnog bilja. Prilikom tretiranja pšenice i ječma na površinu od 1000 m^2 primjenjuje je 50 ml koncentrata koji se razrjeđuje u 30-60 L vode. Prilikom tretiranja vinove loze koristi se 0.010-0.015% otopina koncentrata (10-15 mL sredstva se razrijedi u 100 L vode) (Web 10).

2.3. Reprodukcijski test toksičnosti s enhitreidama

Reprodukcijski test toksičnosti s enhitreidama radi se prema OECD protokolu br. 220 (OECD, 2004), a cilj testa je utvrditi utjecaj kemijske tvari na reprodukcijsku sposobnost enhitreida. Test traje ukupno 6 tjedana, a sastoji se od 2 dijela po 3 tjedna. Nakon prva 3 tjedna iz tla se odstranjuju odrasle jedinke te im se utvrđuje broj. Nakon druga 3 tjedna se utvrđuje broj juvenilnih jedinki.

Prije testa potrebno je pripremiti umjetno tlo, čiji je sastav:

10% treset
20% gline (udio kaolinita veći od 30%)
1% $CaCO_3$
69% pijesak

pH tla koje se koristi za provođenje ovog reprodukcijskog testa iznosi 6.0 ± 0.5

2.3.1. Pojedinačno izlaganje cinku i propikonazolu

2.3.1.1. Cinkov oksid (ZnO)

U pripremljeno (suho) umjetno tlo dodan je cinkov oksid (nano i ne nano oblik odvojeno) u 5 različitih koncentracija: 100 mg/kg, 250 mg/kg, 500 mg/kg, 750 mg/kg i 1000 mg/kg te je po 20 g smjese stavljeno u svaku staklenku. Veličina nanočestica ZnO iznosila je 20 nm. Za svaku koncentraciju napravljen je pentaplikat, kao i pentaplikat kontrolnog uzorka (bez cinkovog oksida). U pripremljeno tlo s umiješanim cinkom dodana je voda kako bi se postigla željena vlažnost od 50% WHC (engl. *water holding capacity*), odnosno kapaciteta tla za vodu. Enhitreide su dodane nakon 24 h, 10 odraslih jedinki po uzorku.

2.3.1.2. Propikonazol

Kako je propikonazol u tekućem stanju, napravljene su vodene otopine različitih koncentracija propikonazola koje su potom dodavane u pripremljeno suho umjetno tlo. Napravljeno je 5 koncentracije propikonazola, a one su iznosile: 0.3125 mg/kg, 0.625 mg/kg, 1.225 mg/kg, 2.450 mg/kg i 4.9 mg/kg. U svaku teglicu se prethodno stavilo 20 g umjetnog tla. Dodana količina otopine pesticida odgovarala je vlažnosti tla od 50% WHC (engl. *water*

holding capacity), odnosno kapaciteta tla za vodu. Za svaku koncentraciju napravljen je pentaplikat, kao i pentaplikat kontrole (bez propikonazola). Enhitreide su dodane nakon 24 h, 10 odraslih jedinki po uzorku.

2.3.1.3. Binarno izlaganje cinku i propikonazolu

Nakon provedenog pokusa s pojedinačnim izlaganjem cinku i propikonazolu izračunate su EC50 vrijednosti za svaku od njih. Određena EC50 vrijednost za nano ZnO je 640 mg/kg za ne nano ZnO je 446 mg/kg, a za propikonazol 3.63 mg/kg. U C1 tretman dodan je samo ZnO koncentracije EC50, a u C5 EC50 koncentracija propikonazola. Koncentracije za nanočestice ZnO i propikonazol nalaze se u tablici 1, a u tablici 2 nalaze se koncentracije za ne nano čestice ZnO i propikonazol. Kao i u pokusu s pojedinačnim izlaganjem prvo je umješan cink u suho umjetno tlo, a zatim su dodane otopine propikonazola određenih koncentracija i volumena kako bi postigli željenu vlažnost tla (50% WHC).

Tablica 1: Koncentracije nanočestica ZnO i PCZ u binarnim uzorcima

K		C1		C2		C3		C4		C5	
0% Zn 0% PCZ		100% ZnO, 0% PCZ		75% ZnO, 25% PCZ		50% ZnO, 50% PCZ		25% ZnO, 75% PCZ		0% ZnO, 100% PCZ	
ZnO	PCZ	ZnO (mg/20g)	PCZ (mg/20g)	ZnO (mg/20g)	PCZ (mg/20g)	ZnO (mg/20g)	PCZ (mg/20g)	ZnO (mg/20g)	PCZ (mg/20g)	ZnO (mg/20g)	PCZ (mg/20g)
0	0	12.8	0	9.6	0.01815	6.4	0.0363	3.2	0.05445	0	0.0726

Tablica 2: Koncentracije ne nano čestica ZnO i PCZ u binarnim uzorcima

K		C1		C2		C3		C4		C5	
0% Zn 0% PCZ		100% ZnO, 0% PCZ		75% ZnO, 25% PCZ		50% ZnO, 50% PCZ		25% ZnO, 75% PCZ		0% ZnO, 100% PCZ	
ZnO	PCZ	ZnO (mg/20g)	PCZ (mg/20g)	ZnO (mg/20g)	PCZ (mg/20g)	ZnO (mg/20g)	PCZ (mg/20g)	ZnO (mg/20g)	PCZ (mg/20g)	ZnO (mg/20g)	PCZ (mg/20g)
0	0	8.92	0	6.69	0.01815	4.46	0.0262	2.23	0.05445	0	0.0726

Za svaki uzorak napravljen je pentaplikat. Enhitreide su dodane nakon 24 h, 10 odraslih jedinki po uzorku.

2.3.2. Tijek reprodukcijskog testa

Nakon što su pripremljeni uzorci sa dodanim odraslim jedinkama *E. albidus*, test se provodio na temperaturi od 20±2 °C. Svakih 7 dana provjeravana je vlažnost tla te se gubitak vode iz tla (uzrokovan evaporacijom) nadoknađivao. Svakih 14 dana dodavana je usitnjena zob u uzorke kao hrana. Nakon 3 tjedna prebrojane su odrasle jedinke, te su odstranjene iz uzoraka kako bi se izmjerila enzimska aktivnost. U sljedeća 3 tjedna na isti način nadoknađivana je vlažnost i hrana. Završetkom šestog tjedna izvedeno je bojanje prema aneksu 6 OECD protokola br. 220 (OECD, 2004). U staklenke sa uzorcima prvo je dodano 5 mL etanola kako bi se jedinke fiksirale. Nakon fiksacije do vrha staklenki je dodana voda te je naposljetku dodano po nekoliko kapi otopine boje Bengalred (1% otopina u etanolu).



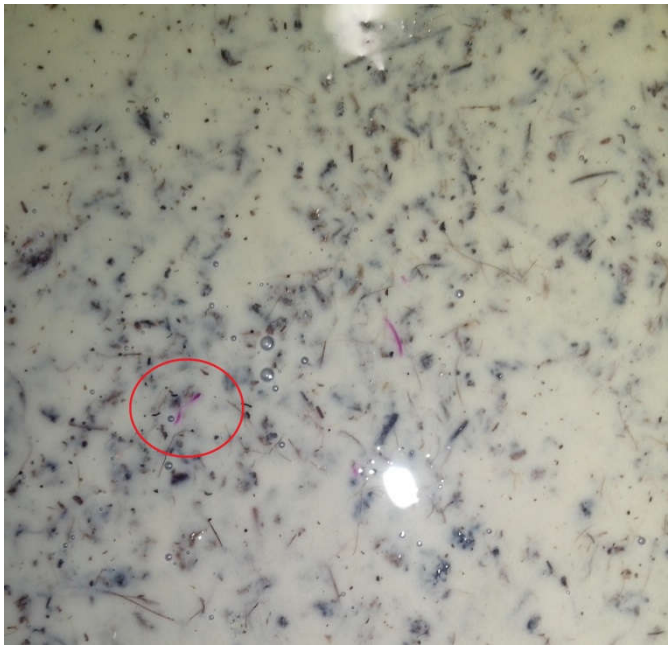
Slika 9: Bojanje juvenilnih jedinki prije brojanja
Fotografirao: Nikola Ćurčić

Nakon 24 sata bojanja, tlo sa bojom prebačeno je u aluminijske kadice kako bi se lakše moglo izvesti brojanje jedinki. Zbog dodatnog olakšanja korištena je plastika u obliku simbola „+“ kako bi se površina kadice podijelila na 4 manja kvadranta.



Slika 10: Kadice sa obojanim uzorcima juvenilnih jedinki

Fotografirao: Nikola Ćurčić



Slika 11: Obojane juvenilne jedinke *E. albidus*

Fotografirao: Nikola Ćurčić

2.4. Mjerenje enzimske aktivnosti

Nakon tri tjedna odrasle jedinke *E. albidus* su odstranjene iz uzoraka kako bi se pripremila postmitohondrijska frakcija (S9) za mjerenje aktivnost sljedećih enzima:

- Acetilkolin esteraza (AchE)
- Katalaza (CAT)
- Glutation-S-transferaza (GST)
- Reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline (TBARS)

Odrasle jedinke *E. albidus* nakon uklanjanja iz uzoraka su izvagane te homogenizirane u kalij-fosfatnom puferu (pH=7,2). Nakon homogenizacije homogenat je centrifugiran na 9000 x g pri temperaturi od 4 °C. Supernatant je na prije mjerenja enzimske aktivnosti pohranjen u Eppendorf epruvetice na temperaturi od -80 °C.

2.4.1. Acetilkolin esteraza (AchE)

Aktivnost acetilkolin esteraze mjerena je metodom po Ellman i sur. (1961). Metoda se zasniva na činjenici da iz acetiltiokolina enzimatski potpomognutom hidrolizom nastaju acetat i tiokolin. U smjesu se dodaje Ellmanov reagens – 5,5'-Ditio-bis-(2-nitrobenzojev) anion (DTNB) koji reagira sa tiokolinom i nastaje žuto obojeni produkt, anion 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline (TNB). Nakon pojave žutog obojenja mjerena je apsorbanca uzoraka pri 412 nm (maksimum apsorbancije za TNB). Apsorbancija je mjerena u staklenim kivetama sa trajanjem od 30 sekundi.

acetiltiokolin → acetat + tiokolin

tiokolin + ditiobisnitrobenzoat → anion 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline

2.4.2. Katalaza (CAT)

Aktivnost katalaze mjerena je metodom po Claiborne i sur. (1985). Metoda mjeri katalitičku razgradnju vodikovog peroksida od strane katalaze tako da prati opadanje apsorbancije na valnoj duljini od 240 nm tijekom 30 sekundi. Mjerenje se odvija u kvarcnoj kiveti.

$$2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$$

2.4.3. Glutation-S-transferaza (GST)

Aktivnost glutation-S-transferaze mjerena je metodom po Habig i sur. (1974). Metoda se zasniva na mjerenju rasta apsorbancije pri valnoj duljini od 340 nm tijekom 30 sekundi. GST katalizira konjugaciju L-glutationa i 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) preko tiolne skupine L-glutationa. Mjerenje se odvija u kvarcnoj kiveti.

$$GSH + DTNB \rightarrow GS\text{-}DNB \text{ konjugat} + HCl$$

2.4.4. Reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline (TBARS)

Prilikom određivanja koncentracije TBARS korištena je metoda prema Buege i Aust (1978). Ova metoda mjeri koncentraciju malondialdehida koji nastaje kao produkt peroksidacije polinezasićenih lipida. Molekula malondialdehida reagira sa dvije molekule tiobarbiturne kiseline (Knoevogelova kondenzacija), a pri tome nastaje produkt koji ima maksimum apsorbancije pri 532 nm.

Uzorak se razrijeđuje 5 puta sa fosfatnim puferom. U uzorke pomiješane s puferom dodaje se smjesa TCA-TBA-HCl, nakon čega slijedi vorteksiranje. Nakon vorteksiranja uzorci se zagrijavaju na 100 °C u trajanju od 15 min. Nakon hlađenja uzorci se centrifugiraju pri sili 15 000 g, nakon čega se uklanja precipitat. Iz dobivenog produkta očitava se apsorbancija pri 532 nm.

2.5. Statistička obrada podataka

Svi dobiveni podaci obrađeni su u R software-u za statističku obradu podataka. Za izračun EC50 vrijednosti korišten je paket drc, te su krivulje fitane 4-parametarskim logističkim modelom. Od statističkih metoda korišteni su Shapiro-Wilk-ov test normalnosti i Bartlett-ov test homogenosti varijance. Shapiro-Wilk-ov test testira nul-hipotezu je li distribucija podataka normalna. Nakon potvrde normalne distribucije proveden je Bartlett-ov test homogenosti čime je potvrđena homogenost varijance. Nakon analize varijance (ANOVA) korišten je Dunnet-ov post-hoc test (modificirani t-test koji uspoređuje svaku eksperimentalnu skupinu sa kontrolnom skupinom). Grafički prikazi izrađeni su u programu Excell 2016 (MS Office 2016).

3. REZULTATI

3.1. Reprodukcijski test

3.1.1. Pojedinačno izlaganje

EC50 i EC10 vrijednosti za enhitreide prilikom izlaganja nanočesticama ZnO, ne nano česticama ZnO i propikonazolu određene su pomoću reprodukcijskog testa (Tablica 3, 4 i 5). Rezultati su također prikazani kao doza-odgovor krivulje za svaku od navedenih tvari (Slika 12, 13 i 14).

Tablica 3. EC10 i EC50 vrijednost za izlaganje enhitreida nanočesticama ZnO

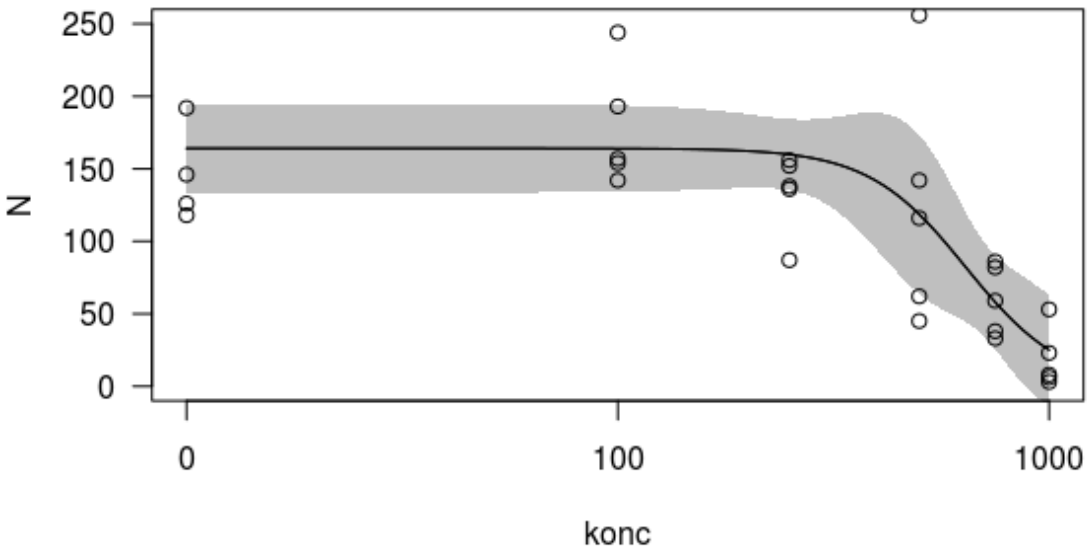
nZnO	Procjenjena vrijednost	Standardna greška	Donja asimptota	Gornja asimptota
EC50 (mg/kg)	641,205	88,824	458,953	823,457
EC10 (mg/kg)	362,325	157,246	39,683	684,967

Tablica 4. EC10 i EC50 vrijednost za izlaganje enhitreida ne nano česticama ZnO

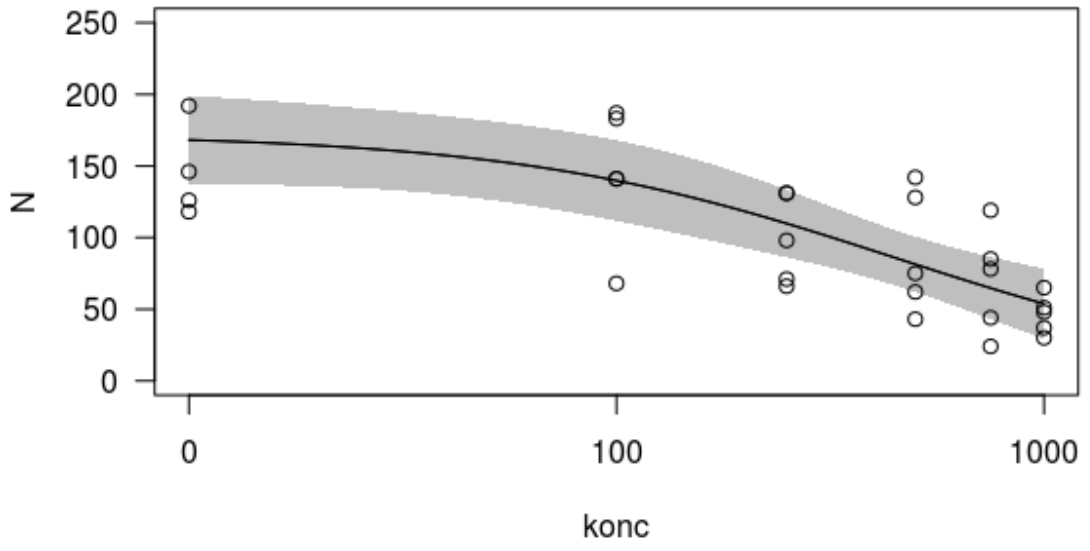
bZnO	Procjenjena vrijednost	Standardna greška	Donja asimptota	Gornja asimptota
EC50 (mg/kg)	445,780	148,402	141,283	750,276
EC10 (mg/kg)	46,962	44,792	-44,942	138,867

Tablica 5. EC10 i EC50 vrijednosti za izlaganje enhitreida propikonazolu

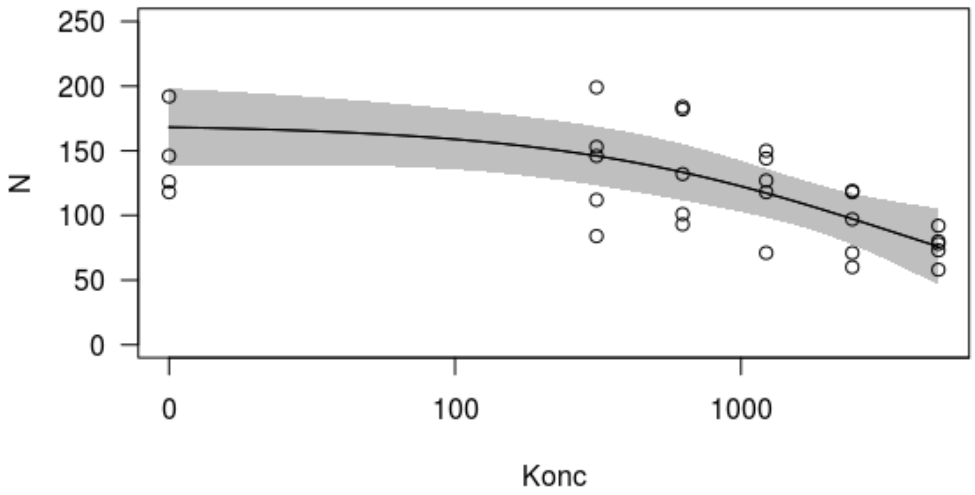
PCZ	Procjenjena vrijednost	Standardna greška	Donja asimptota	Gornja asimptota
EC50 (µg/kg)	3620,89	1685,35	162,83	7078,94
EC10 (µg/kg)	177,23	237,71	-310,51	664,97



Slika 12. Doza-odgovor krivulja za nanočestice ZnO prilikom pojedinačnog izlaganja enhitreida



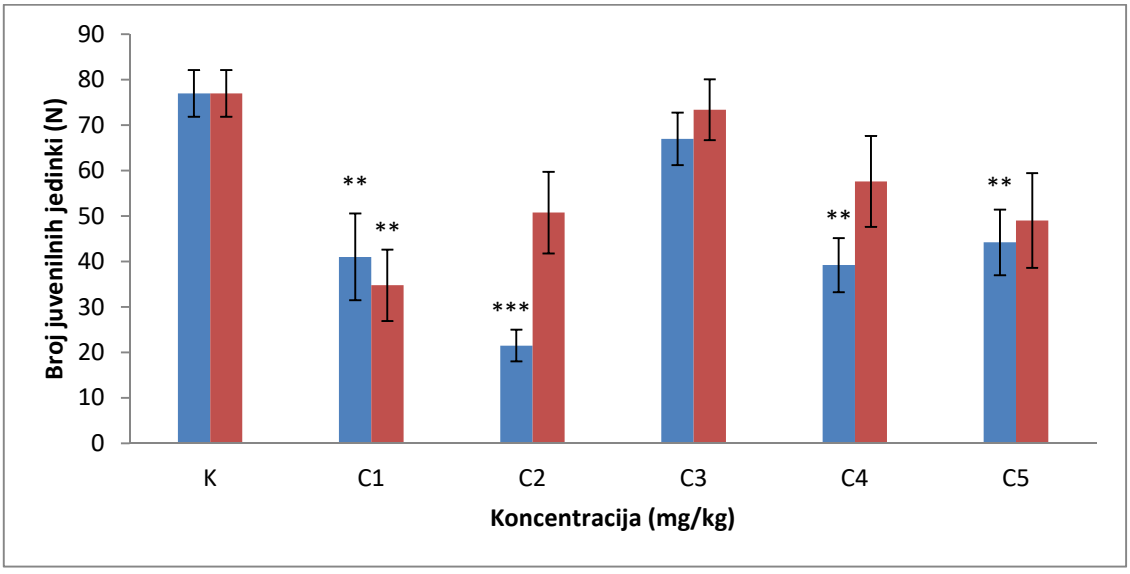
Slika 13. Doza-odgovor krivulja za ne nano čestice ZnO prilikom pojedinačnog izlaganja enhitreida



Slika 14. Doza-odgovor krivulja za propikonazol prilikom pojedinačnog izlaganja enhitreida

3.1.2. Binarno izlaganje

Statistički značajna razlika u broju juvenilnih jedinki nakon binarnog izlaganja nZnO/PCZ prisutna je kod koncentracija C1, C2, C4 i C5, a nakon binarnog izlaganja bZnO/PCZ prisutna je kod koncentracije C1 (Slika 15).

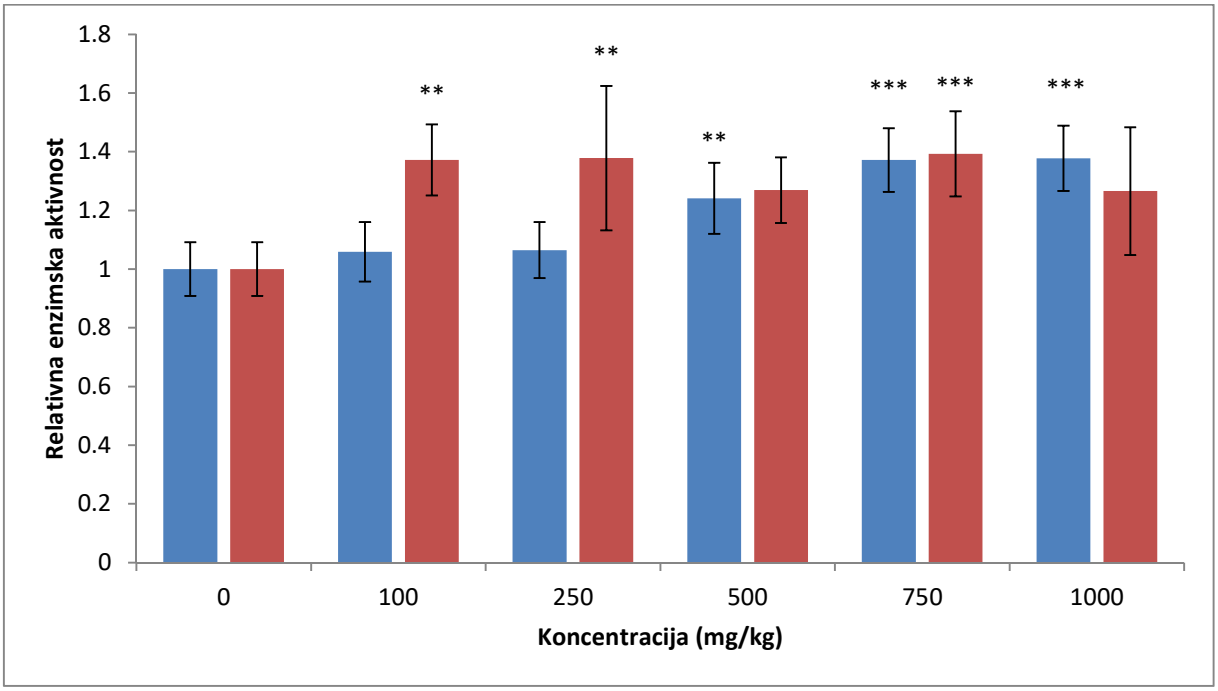


Slika 15: Usporedba prosječnog broja juvenilnih jedinki prilikom binarnog izlaganja nZnO/PCZ (plavo) i bZnO/PCZ (crveno)

3.2. Enzimska aktivnost AChE, CAT i GST

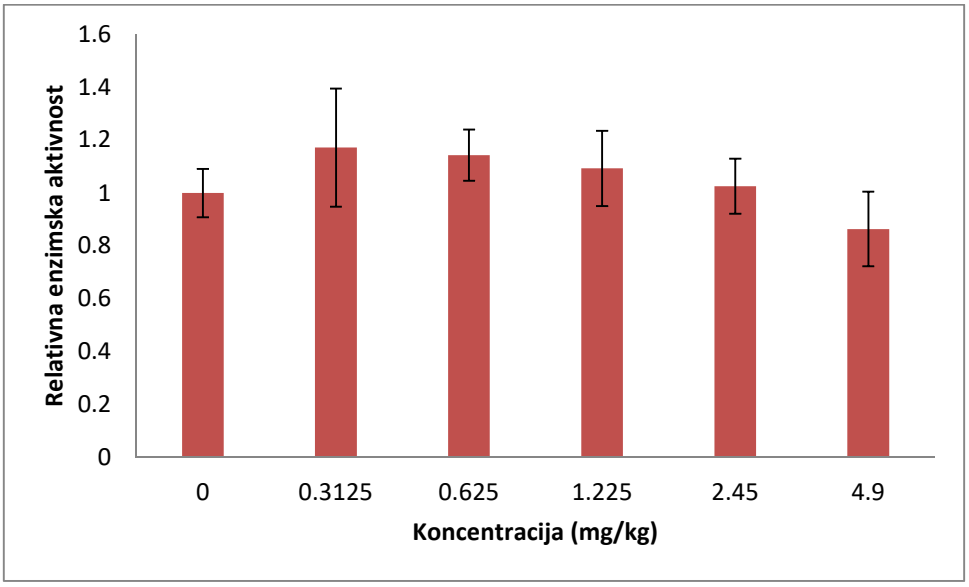
3.2.1. Acetilkolin-esteraza

Statistički značajna razlika u aktivnosti AChE nakon pojedinačnog izlaganja nZnO prisutno je kod koncentracija 500, 750 i 1000 mg/kg, a nakon pojedinačnog izlaganja bZnO prisutno je kod koncentracija 100, 500 i 750 mg/kg (Slika 16).



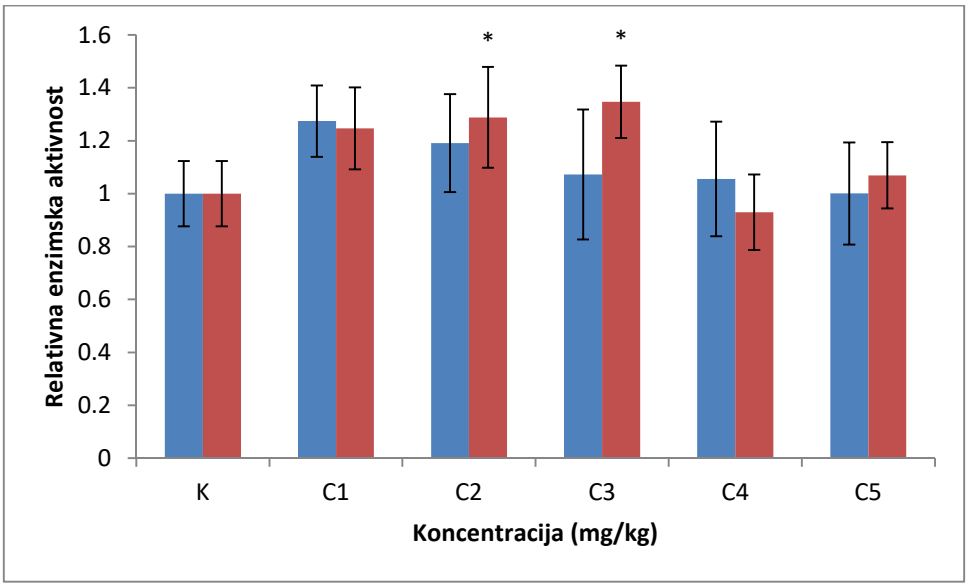
Slika 16: Usporedba relativne aktivnosti AChE u usporedbi sa kontrolom prilikom pojedinačnog izlaganja nanočesticama (plavo) i ne nano česticama (crveno) ZnO

Prilikom izlaganja propikonazolu nije primjećena statistički značajna razlika u enzimskoj aktivnosti AChE (Slika 17).



Slika 17: Relativna aktivnost AChE u odnosu na kontrolnu skupinu prilikom pojedinačnog izlaganja propikonazolu

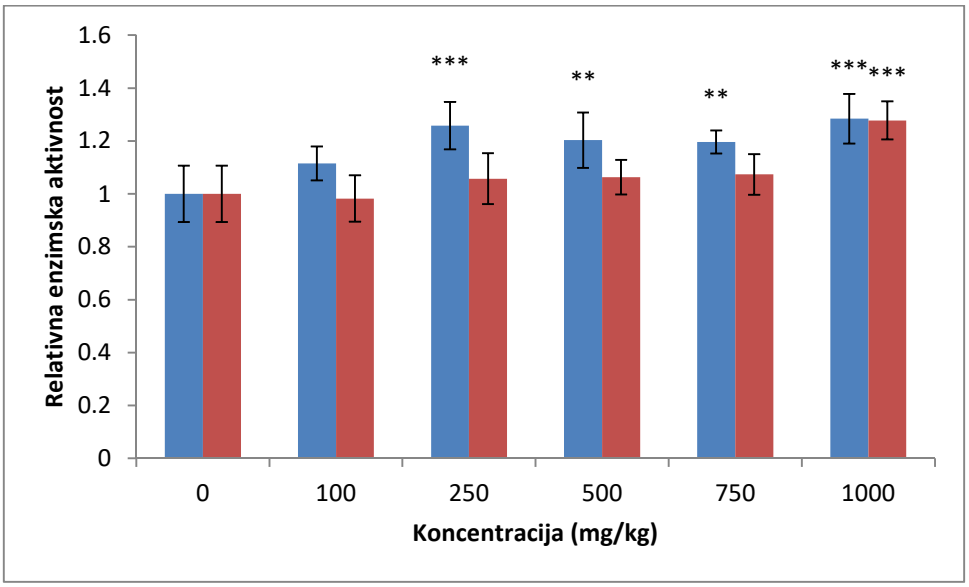
Prilikom binarnog izlaganja nZnO/PCZ nije primjećena statistički značajna razlika u aktivnosti AChE u usporedbi sa kontrolnom skupinom, dok kod binarnog izlaganja bZnO/PCZ postoji statistički značajna razlika za koncentracije C2 i C3 (Slika 18).



Slika 18: Usporedba relativnih enzimskih aktivnosti AChE prilikom binarnih izlaganja nZnO/PCZ (plavo) i bZnO/PCZ (crveno)

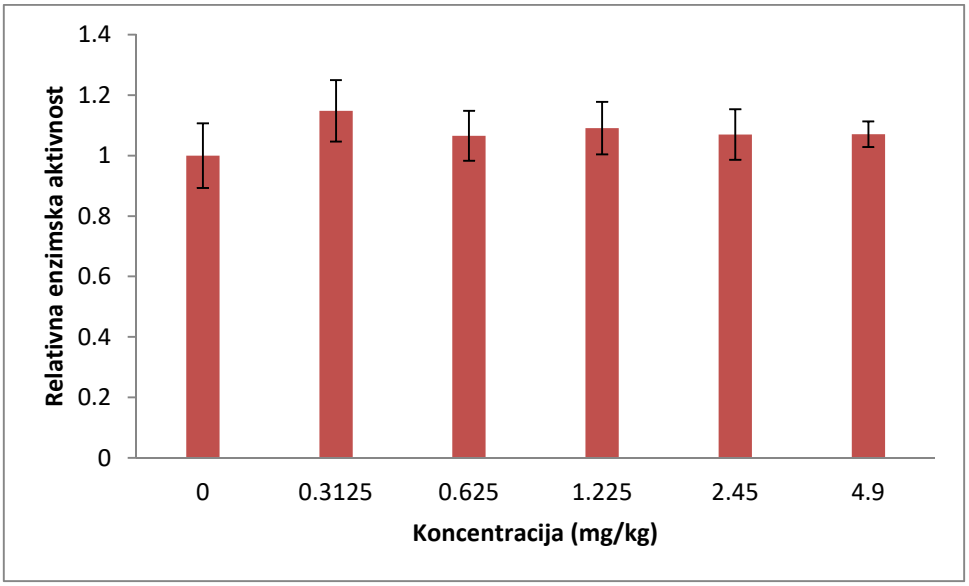
3.2.2. Katalaza

Prilikom pojedinačnog izlaganja nZnO statistički značajna razlika enzimske aktivnosti CAT u usporedbi sa kontrolom prisutna je kod koncentracija 250, 500, 750 i 1000 mg/kg, dok prilikom izlaganja bZnO značajna razlika je prisutna samo kod koncentracije 1000 mg/kg (Slika 19).



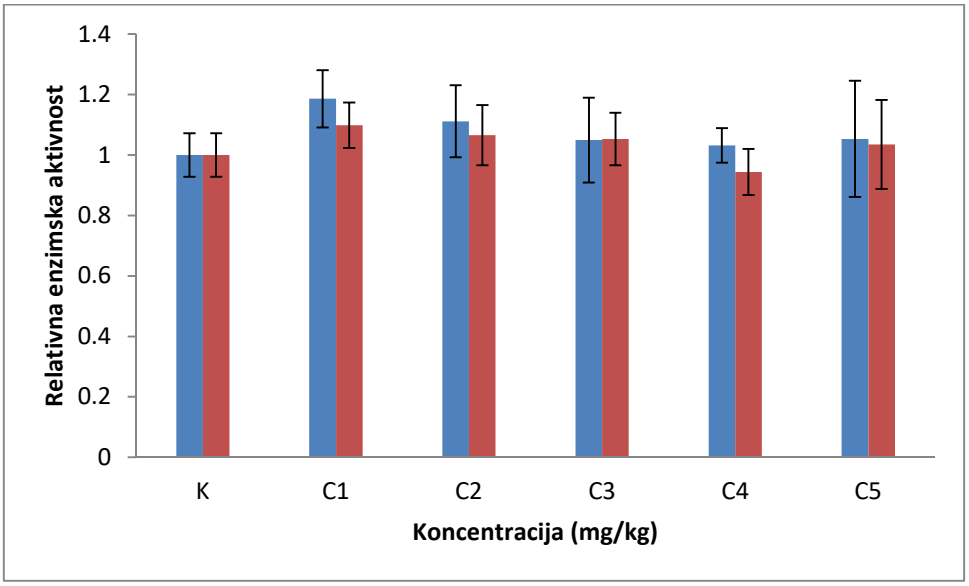
Slika 19: Usporedba relativne enzimske aktivnosti CAT nakon pojedinačnog izlaganja nZnO (plavo) i bZnO (crveno)

Prilikom pojedinačnog izlaganja propikonazolu nije primjećena statistički značajna razlika u aktivnosti CAT u usporedbi sa kontrolnom skupinom (Slika 20).



Slika 20: Relativna enzimska aktivnost CAT nakon pojedinačnog izlaganja propikonazolu

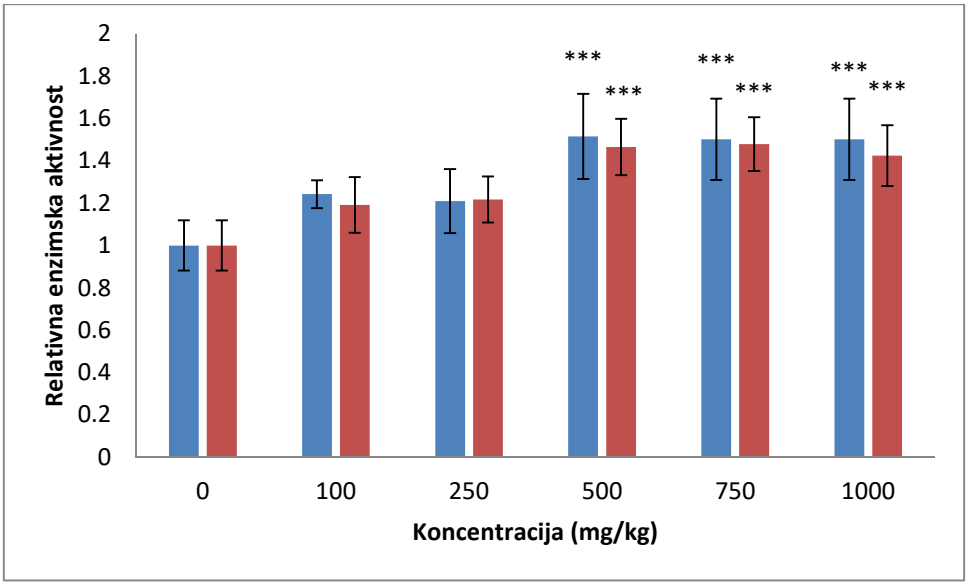
Prilikom binarnih izlaganja nije prisutna statistički značajna razlika u enzimskoj aktivnosti CAT u usporedbi sa kontrolnom skupinom (Slika 21).



Slika 21: Usporedba relativne enzimske aktivnosti CAT nakon binarnog izlaganja nZnO/PCZ (plavo) i bZnO/PCZ

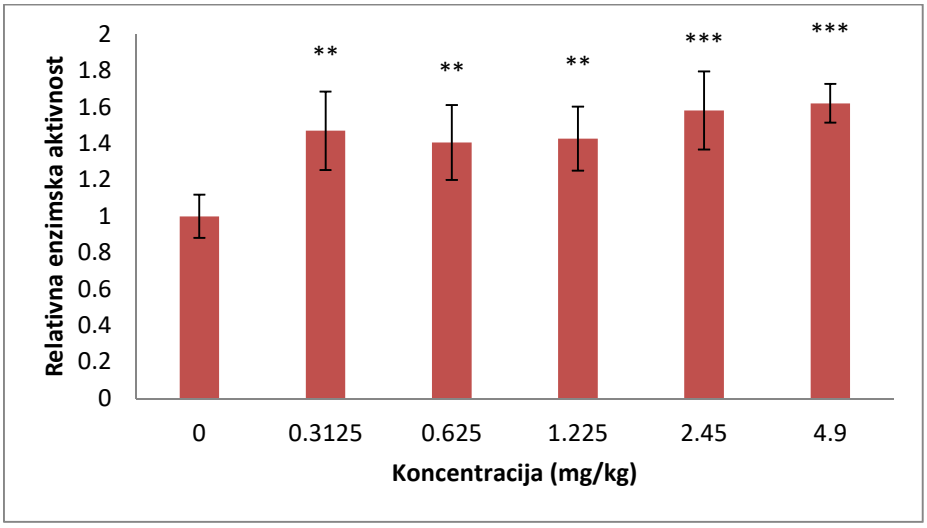
3.2.3. Glutation – S – transferaza

Statistički značajna razlika enzimske aktivnosti GST u usporedbi sa kontrolom nakon pojedinačnih izlaganja nZnO i bZnO prisutna je pri koncentracijama 500, 750 i 1000 mg/kg (Slika 22).



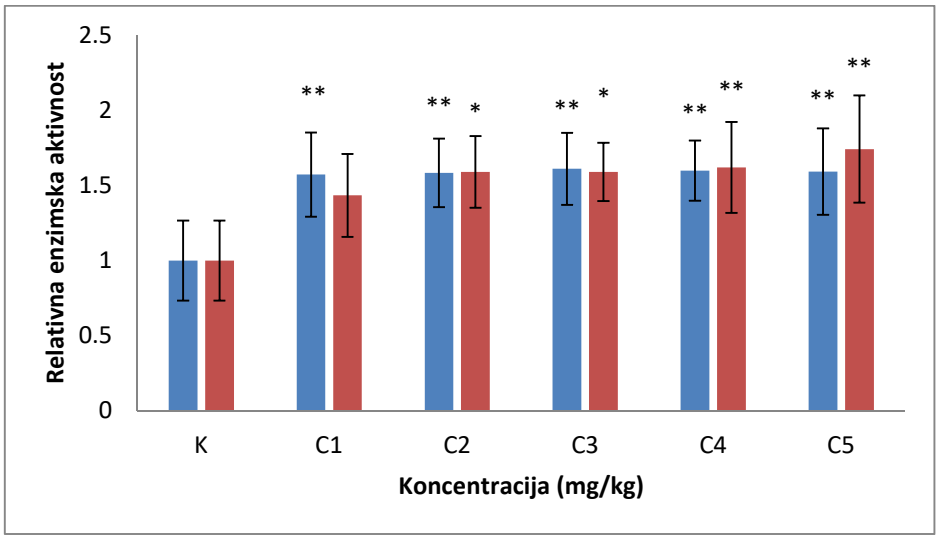
Slika 22: Usporedba relativne enzimske aktivnosti GST nakon izlaganja nZnO (plavo) i bZnO (crveno)

Statistički značajna razlika enzimske aktivnosti CAT u usporedbi sa kontrolom prilikom izlaganja propikonazolu prisutna je kod svih koncentracija (Slika 23).



Slika 23: Relativna enzimska aktivnost GST nakon izlaganja propikonazolu

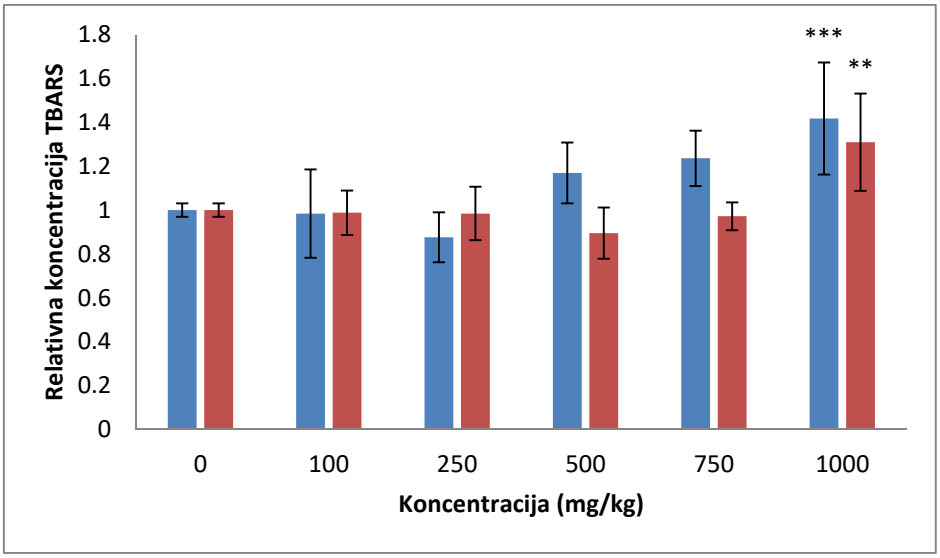
Prilikom binarnog izlaganja nZnO/PCZ statistički značajna razlika u enzimskoj aktivnosti GST u usporedbi sa kontrolnom skupinom prisutna je kod svih koncentracija, dok kod binarnog izlaganja bZnO/PCZ nije prisutna samo pri koncentraciji C1 (Slika 24).



Slika 24: Usporedba relativne enzimske aktivnosti između binarnih izlaganja nZnO/PCZ i bZnO/PCZ

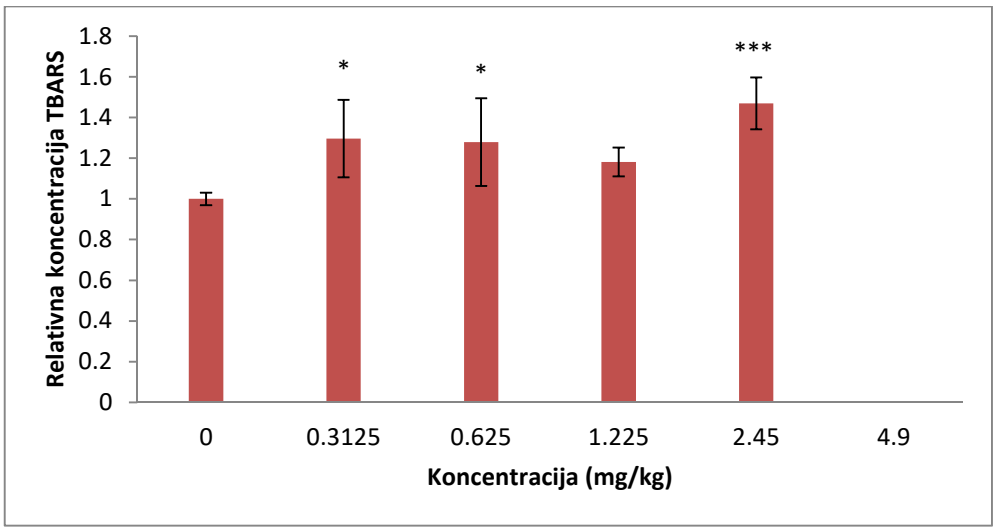
3.2.4. TBARS

Statistički značajna razlika u koncentraciji TBARS u usporedbi sa kontrolnom skupinom nakon projedinačnih izlaganja nZnO i bZnO prisutna je pri koncentraciji 1000 mg/kg (Slika 25).



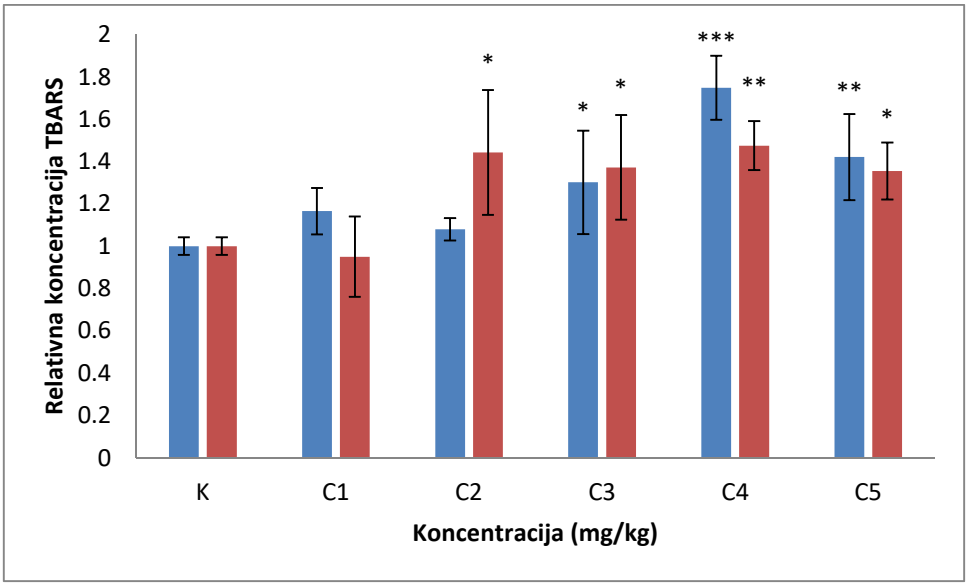
Slika 25: Usporedba relativne koncentracije TBARS nakon pojedinačnih izlaganja nZnO i bZnO

Statistički značajna razlika u koncentraciji TBARS u usporedbi sa kontrolnom skupinom nakon izlaganja propikonazolu prisutna je pri koncentracijama 0.3125, 0.625 i 2.45 mg/kg (Slika 26).



Slika 26: Relativna koncentracija TBARS nakon pojedinačnog izlaganja propikonazolu

Statistički značajna razlika koncentracije TBARS u uporedbi sa kontrolnom skupinom nakon binarnog izlaganja nZnO/PCZ prisutna je pri koncentracijama C3, C4 i C5, a nakon binarnog izlaganja bZnO/PCZ je prisutna kod koncentracija C2, C3, C4 i C5 (Slika 27).



Slika 27: Usporedba relativne koncentracije TBARS između dvaju Binarnih izlaganja (nZnO/PCZ i bZnO/PCZ)

4. RASPRAVA

Poljoprivredna aktivnost u suvremeno doba nezamisliva je bez uporabe pesticida. Pesticidi su omogućili povećanje poljoprivrednih prinosa na jednakoj površini obradive površine koja se koristila i prije primjene pesticida (primjenom pesticida smanjeni su gubici) (Gaupp-Berghausen, 2015). Međutim, unatoč prednostima koje je primjena pesticida donijela u poljoprivrednoj proizvodnji, velikim brojem istraživanja dokazano je negativno djelovanje pesticida na okoliš (Otitoju i Onwurah, 2011). Kako bi se što više smanjili negativni učinci pesticida posebna pažnja posvećuje se određivanju količine, ali i vrste pesticida koji će se primjenjivati na određenoj poljoprivrednoj površini, što se određuje s obzirom na kulturu koja se uzgaja te nametnika koji smanjuje poljoprivredni prinos. Jedan od prijedloga kako smanjiti uporabu pesticida, koji su po prirodi organski spojevi, je primjena nanočestica metala kao nosača pesticida (Bhattacharyya, 2010), čime bi se količina pesticida smanjila. Nanočestice nosači su zapravo nanoporozni zeoliti koji postupno otpuštaju pesticid u tlo. Stopa otpuštanja pesticida sa nosača ovisi o koncentraciji pesticida u tlu koje se nalazi oko nosača. Tako bi bez obzira na ispiranje tla padalinama koncentracija pesticida bila na željenoj razini. Osim toga u tlu se ne bi nalazila veća koncentracija pesticida od željene, jer nosači ne bi otpuštali prekomjernu količinu pesticida. Unatoč smanjenju količine pesticida koje bi se ovom primjenom nanočestica metala postigli, istraživanja su pokazala negativan utjecaj samih nanočestica metala na okoliš, odnosno organizme. Tako je u nekim slučajevima dokazan veći negativan utjecaj nanočestica metala od čestica istog metala koje imaju veću dimenziju (Chen i sur., 2006).

Eksperimentalni organizam korišten u ovom radu je *Enchytraeus albidus* (Henle, 1837), maločetinaš (Oligochaeta) iz porodice Enchytraeidae. Prednost primjene enhitreida kao eksperimentalnog organizma je njihova veličina te relativno kratak vremenski period potreban za razmnožavanje. Manja dimenzija enhitreida u usporedbi sa gujavicama omogućuje provođenje testa u manjim uzorcima tla. Osim manjih uzoraka sam test toksičnosti koji se provodi na enhitreidama kraći je od testa toksičnosti na gujavicama zbog kraćeg vremenskog razdoblja potrebnog za razmnožavanje.

Nakon provedenog reprodukcijskog testa enhitreida određena je EC50 vrijednost za sljedeće tvari: nanočestice ZnO, ne nano čestice ZnO i propikonazol. EC50 za nanočestice ZnO iznosila je 640 mg/kg, za ne nano čestice ZnO 446 mg/kg, a za propikonazol 3.36 mg/kg. Rezultat

dobiven u ovom radu u suglasnosti je sa Lock i Janssen (2003) koji su odredili EC50 vrijednost za ne nano čestice ZnO na *E. albidus* i ona je iznosila 461 mg/kg.

U toksikološkim istraživanja veću prednost od samog određivanja koncentracije toksičnih tvari u okolišu daje se biomarkerima. Biomarkeri predstavljaju promjenu u kvantitativnom udjelu nekih tvari koje se nalaze u organizmu fiziološki. Isto tako, kao biomarkeri se koriste promjene enzimske aktivnosti nakon izlaganja eksperimentalnih organizama toksičnim tvarima. U ovom radu kao dokaz utjecaja nanočestica i ne nano čestica ZnO te propikonazola na enhitreide kao biomarkeri su se koristili: acetilkolinesteraza, katalaza, glutation S – transferaza (promjena u njihovoj enzimskoj aktivnosti u usporedbi sa kontrolnom skupinom) te promjene koncentracije reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline (TBARS).

Acetilkolinesteraza u organizmu ima ulogu razgradnje acetilkolina na kolin i acetat. Acetilkolin ima ulogu neurotransmitera, odnosno prijenosa kemijskog signala između živčanih stanica ili između živčane stanice i mišićne stanice u neuromuskularnoj pukotini. Uloga enzima acetilkolinesteraze je regulacija normalnog prijenosa signala, odnosno normalno funkcioniranje živčanog i mišićnog tkiva. Vezanjem inhibitora (neki pesticidi imaju inhibitorno djelovanje na AChE) na aktivno mjesto enzima onemogućuju njegovu katalitičku ulogu, što dovodi do nakupljanja acetilkolina u sinapsama ili neuromuskularnim pukotinama, a posljedično do paralize. Statistički značajna promjena u enzimskoj aktivnosti nakon izlaganja nanočesticama ZnO zapažena je kod koncentracija od 500, 750 i 1000 mg/kg, a nakon izlaganja ne nano česticama ZnO razlika je primijećena pri koncentracijama 100, 250 i 750 mg/kg. Enzimska aktivnost pri svim koncentracijama čestica ZnO povećana (čak i kod koncentracija gdje promjena aktivnosti nije statistički značajna). Također, povećanje enzimske aktivnosti AChE kod enhitreida primijećena je i nakon izlaganja nanočesticama bakra (Gomes i sur., 2011). Povećanje enzimske aktivnosti AChE zabilježeno je i u mozgu pčele (*Apis mellifera*) nakon izlaganja nanočesticama ZnO te Zn u ionskom obliku (Milivojević i sur., 2014). Iako nakon izlaganja propikonazolu nije primijećena statistički značajna razlika u aktivnosti AChE u usporedbi sa kontrolnom skupinom, aktivnost zabilježena pri manjim koncentracijama bila je veća od kontrolne (aktivnost postupno opada od najmanje koncentracije do najveće koncentracije), a samo je pri najvećoj koncentraciji (4,9 mg/kg) enzimska aktivnost AChE bila manja od aktivnosti koja je izmjerena u kontrolnoj skupini. Nakon binarnog izlaganja nZnO/PCZ statistički značajna razlika u enzimskoj aktivnosti AChE nije bila prisutna kod niti jedne koncentracije, a nakon izlaganja bZnO/PCZ statistički značajna razlika u enzimskoj aktivnosti AChE primjećena je kod koncentracija C2 (75% EC50 bZnO; 25% EC50 PCZ) i C3 (50% EC50 bZnO; 50% EC50 PCZ).

Katalaza je enzim čija je uloga razgradnja vodikovog peroksida na vodu i kisik. Ona se u stanici aerobnih organizama nalazi u peroksisomima te je jedan od enzima koji imaju ulogu obrane organizma od oksidativnog stresa. Promjena u aktivnosti katalaze može se koristiti kao biomarker oksidativnog stresa upravo zbog njezinog katalitičkog djelovanja koje je usmjereno na smanjenje oksidativnog stresa u stanici. Nakon pojedinačnih izlaganja nanočesticama i ne nanočesticama ZnO statistički značajna promjena enzimske aktivnosti prisutna je kod izlaganja nanočesticama ZnO pri koncentracijama od 250, 500, 750 i 1000 mg/kg, a kod izlaganja ne nanočesticama ZnO statistički značajna razlika u aktivnosti bila je prisutna samo pri koncentraciji od 1000 mg/kg. Kod svih statistički značajnih razlika enzimske aktivnosti za pojedinačna izlaganja česticama ZnO aktivnost je bila povećana u usporedbi sa kontrolnom skupinom. Ovakvi podaci upućuju na povećanu toksičnost nanočestica ZnO u usporedbi sa česticama koje imaju veću dimenziju. Slična razlika u utjecaju na aktivnost katalaze primijećena je kod istraživanja utjecaja nanočestica i ne nanočestica ZnO na tkivo jetre, škrga i crijeva na ribe vrste *Danio rerio* (Xiong i sur., 2011). Nakon pojedinačnog izlaganja propikonazolu nije primijećena statistički značajna razlika u enzimskoj aktivnosti katalaze u usporedbi sa kontrolnom skupinom, iako je enzimska aktivnost katalaze bila blago povećana prilikom izlaganja propikonazolu u usporedbi s kontrolnom skupinom. Hackenberger i sur., (2017) pri određenim uvjetima temperature i vlage tla (20 °C i 50% vlažnosti tla) utvrdili su porast enzimske aktivnosti CAT nakon izlaganja gujavica *Eisenia fetida* propikonazolu. Također nakon binarnih izlaganja nije primijećena statistički značajna razlika u enzimskoj aktivnosti katalaze u usporedbi sa kontrolnom skupinom.

Glutation S – transferaza (GST) enzim je koji se nalazi u citosolu stanica, a čija je uloga kataliziranje vezanja endogenih ili egzogenih elektrofilnih molekula sa tripeptidom glutationom, što je jedan od načina obrane organizma od oksidativnog stresa. Prilikom izlaganja enhitreida nanočesticama i ne nano česticama ZnO enzimska aktivnost GST bila je veća pri svim koncentracijama u usporedbi sa kontrolnom skupinom. Statistički značajna razlika u aktivnosti GST bila je pri koncentracijama 500, 750 i 1000 mg/kg. Važna uloga GST-a je uklanjanje ksenobiotičkih molekula iz organizma te održavanje homeostaze organizma. Posljedica djelovanja ovog enzima smanjenje je oksidativnog stresa uzrokovanog elektrofilnim molekulama čije se djelovanje neutralizira vezanjem sa glutationom. Ovo povećanje aktivnosti GST nakon izlaganja nanočesticama metala već je zabilježeno u drugim istraživanjima. Tako su Gomes i sur., (2011) zabilježili povećanje enzimske aktivnosti GST nakon izlaganja nanočesticama bakra i bakru u ionskom obliku ($CuCl_2$), pri čemu je veća enzimska aktivnost prilikom izlaganja nanočesticama bakra. To je slučaj i u ovome istraživanju jer je izlaganje

nanočesticama ZnO za posljedicu imalo veću enzimsku aktivnost GST u usporedbi sa izlaganjem ne nano česticama ZnO. Također Mwaanga i sur., (2014) zabilježili su povećanje enzimske aktivnosti GST u vodenbuhe *Daphnia magna* nakon izlaganja nanočesticama ZnO i CuO u usporedbi sa kontrolnom skupinom. Nakon pojedinačnog izlaganja propikonazolu enzimska aktivnost GST bila je statistički značajno povećana pri svim korištenim koncentracijama. U istraživanju utjecaja različite temperature i vlage na biomarkere gujavice *Eisenia fetida* prilikom izlaganja propikonazolu povećanje aktivnosti GST bilo je prisutno pri svim koncentracijama i kombinacijama vlage i temperature tla (Hackenberger i sur., 2017). Prilikom binarnih izlaganja za kombinaciju nZnO/PCZ statistički značajno povećanje enzimske aktivnosti GST bilo je prisutno kod svih koncentracija, a za kombinaciju bZnO/PCZ statistički značajno povećanje bilo je prisutno pri koncentracijama C2 (75% EC50 bZnO; 25% EC50 PCZ), C3 (50% EC50 bZnO; 50% EC50 PCZ), C4 (25% EC50 bZnO; 75% EC50 PCZ) i C5 (0% EC50 bZnO; 100% EC50 PCZ).

Povećana prisutnost TBARS u uzorcima u usporedbi sa kontrolnom skupinom ukazuje na povećani oksidativni stres. Povećanjem koncentracije slobodnih radikala u stanici posljedično uzrokuje povećanje oksidativnog stresa, čiji je jedan od produkata i malonildialdehid koji se u ovome istraživanju mjerio po metodi Buege i Aust (1978). Statistički značajno povećanje koncentracije TBARS za izlaganja nanočesticama i ne nano česticama ZnO zabilježeno je pri koncentraciji od 1000 mg/kg ZnO. Pri koncentracijama od 100 i 250 mg/kg ZnO zabilježena je veća koncentracija TBARS prilikom izlaganja ne nano česticama, dok pri koncentracijama 500, 750 i 1000 mg/kg ZnO veća je koncentracija TBARS zabilježena prilikom izlaganja nanočesticama. Prilikom mjerenja oksidativnog stresa u jetri i mozgu miša uzrokovanih izlaganjem nanočesticama TiO_2, ZnO i AlO_3 zabilježeno je značajno povećanje koncentracije TBARS uzrokovano od strane nanočestica sva tri navedena oksida metala (Shrivastava i sur., 2013). Prilikom pojedinačnog izlaganja enhitreida propikonazolu primjećeno je statistički značajno povećanje koncentracije TBARS u usporedbi sa kontrolnom skupinom pri koncentracijama od 0.3125, 0.625 i 2.45 mg/kg. Li i sur., (2011) zabilježili su povećanje koncentracije TBARS nakon izlaganja juvenilnih jedinki *Oncorhynchus mykiss* propikonazolu u tkivu jetre, škrga i crijeva. Ovakvi rezultati upućuju na povećano oksidativno djelovanje propikonazola ili spojeva koji nastaju njegovim raspadanjem na žive organizme. Gao i sur. (2013) zabilježili su negativan utjecaj propikonazola na terestričke vrste. Tako prilikom izlaganja gujavica vrste *Eisenia fetida* primjećen je značajan udio piknotičnih jezgara, što je indikacija povećane stope apoptoze. Osim toga, smanjena je i sposobnost pokretanja gujavica. Prilikom binarnih izlaganja statistički značajna razlika pri izlaganju nZnO/PCZ bila je prisutna

pri koncentracijama C3 (50% EC50 bZnO; 50% EC50 PCZ), C4 (25% EC50 bZnO; 75% EC50 PCZ) i C5 (0% EC50 bZnO; 100% EC50 PCZ). Prilikom izlaganja bZnO/PCZ osim ovih koncentracija značajna razlika od kontrolne skupine bila je prisutna i pri koncentraciji C2 (50% EC50 bZnO; 50% EC50 PCZ). Usporedbom rezultata najveći oksidativni stres bio je pri koncentraciji C4 (25% EC50 bZnO; 75% EC50 PCZ), i to za obje kombinacije binarnog izlaganja. Prema TBARS veći utjecaj na povećanje oksidativnog stresa ima smjesa koja sadrži veći udio propikonazola u usporedbi sa udjelom čestica ZnO.

5. Zaključak

Razlika utjecaja nanočestica i ne nano čestica ZnO pojedinačno i u kombinaciji sa propikonazolom utvrđeno je pomoću reproduktivnog testa te mjerenjem sljedećih biokemijskih biomarkera: acetilkolin-esteraza (AChE), katalaza (CAT), glutation S – transferaza (GST) i reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline (TBARS). Nakon provedenih testova utvrđeni su sljedeći zaključci:

1. Vrijednost EC50 je manja za ne nano čestice nego za nanočestice cinkovog oksida (ZnO)
2. Ne nano čestice ZnO imaju veći učinak na povećanje enzimske aktivnosti AChE u usporedbi sa nanočesticama ZnO. Prilikom binarnih izlaganja sa propikonazolom značajan utjecaj ima smjesa sa ne nanočesticama ZnO (omjeri 75% EC50 ZnO:25% EC50 PCZ i 50% EC50 ZnO:50% EC50)
3. Nanočestice ZnO imaju veći učinak na povećanje enzimske aktivnosti CAT u usporedbi sa ne nano česticama ZnO. Prilikom binarnih izlaganja nije utvrđena statistički značajna razlika u utjecaju čestica ZnO i PCZ
4. Nanočestice i ne nano čestice ZnO imaju podjednak učinak na povećanje enzimske aktivnosti GST. Prilikom binarnih izlaganja utvrđen je podjednak utjecaj pri svim omjerima koncentracija ZnO:PCZ.
5. Nanočestice i ne nano čestice ZnO imaju podjednak učinak na povećanje enzimske aktivnosti TBARS. Prilikom binarnih izlaganja utvrđen je veći utjecaj propikonazola na povećanje koncentracije TBARS u odnosu na čestice ZnO

6. Metodički dio

U ovom dijelu diplomskog rada nalazi se priprema za nastavni sat biologije za nastavnu temu „Kolutićavci“. Priprema je namjenjena za jedan nastavni sat biologije u sedmom razredu osnovne škole.

Ime i prezime nastavnika	**Škola**	**Datum**
Nikola Ćurčić		2018.

Nastavna jedinica /tema	**Razred**
Kolutićavci	**7.**
Temeljni koncepti	**Ključni pojmovi**
Građa tijela kao prilagodba na uvjete života	**Gujavica, kolutićava građa tijela**
Cilj nastavnog sata (nastavne teme)	
Upoznati unutarnju i vanjsku građu kolutićavaca te prepoznati njihovu biološku važnost	

Ishodi učenja

1. Temeljem promatranja opisati kretanje gujavice
2. Opisati osobitosti kolutićave građe tijela
3. Navesti evolucijski napredak u građi tijela (zatvoreni krvotok)
4. Obrazložiti značenje gujavice za kakvoću tla

Br.	**Razrada ishoda nastavne jedinice**	**Zadatak/ primjer ključnih pitanja za provjeru ostvarenosti ishoda**	**KR**	**PU**
1		*Koje strukture na tijelu omogućuju kretanje gujavice?* *Kako se naziva kretanje gujavice?*	I I	
2.		*Opiši unutarnju i vanjsku građu jednog kolutića gujavice!* *Kako se građa živčanog sustava prilagodila građi tijela kolutićavaca?* *Kakav probavni sustav imaju gujavice?* *Kako se razmnožavaju gujavice?* *Što je to regeneracija?*	II II I I I	
3.		*Koja je razlika u građi krvotoka između kolutićavaca i ostalih beskralježnjaka koje smo do sada spominjali?* *Zašto gujavice imaju crvenu krv?* *Koje su glavne krvne žile kolutićavaca i kako su povezane?*	II I II	
4.		*Kako gujavice svojim djelovanjem pospješuju kvalitetu tla?*	I I	

Kognitivna razina (KR): I. reprodukcija, II. konceptualno razumijevanje i primjena znanja, III. rješavanje problema
Procjena uspješnosti učenja (PU): – odgovara manje od 5 učenika, +/- odgovara otprilike polovina učenika, + odgovara većina učenika

Tijek nastavnog sata

Tip sata	Obrada novih sadržaja	Trajanje	45 min

STRUKTURNI ELEMENT NASTAVNOG SATA	DOMINANTNA AKTIVNOST	BR. ISHODA	KORISTITI U IZVEDBI	METODA	SOCIOLOŠKI	TRAJANJE (min)
Uvodni dio	N ⇨ Motivirati učenike za nastavnu jedinicu demonstracijom kretanja žive gujavice koju će donijeti na nastavni sat. Pokušati motivirati što veći broj učenika kako bi uzeli gujavicu u ruku i osjetili trenje četina. Nakon što svi učenici promotre kretanje gujavice postaviti pitanja: „Kako biste opisali kretanje gujavice?“ „Osim valovitog kretanja uzrokovanog mišićima gujavice što još potpomaže njezino kretanje?“ Nakon demonstracije najaviti naslov nastavne jedinice i zapisati je na ploču U ⇨ Učenici promatranjem sudjeluju u demonstraciji kretanja gujavice te dobrovoljci primaju gujavicu u ruku kako bi osjetili četine. Učenici odgovaraju na postavljena pitanja te komentiraju građu i kretanje gujavice. Zapisuju naslov nastavne jedinice	1	PM	D R	F	15
Središnji dio	N ⇨ Nakon napisanog naslova osvrnuti se na demonstraciju sa gujavicom te postaviti pitanja: „Kako biste opisali građu gujavice?“, „Kako je tijelo gujavice podijeljeno?“ te povezati odgovor učenika sa nazivom skupine beskralježnjaka koja se obrađuje. Pomoću slika i skica koje se nalaze u udžbeniku dočarati građu kolutićavaca na primjeru gujavice. Privući pozornost na građu zatvorenog krvožilnog sustava te ga usporediti sa građom krvožilnog sustava organizama koji su do sada obrađeni. Postaviti pitanje: „Prema građi kako se naziva krvožilni sustav organizama koje smo do sada obradili?“ Opisati pozitivno djelovanje gujavica u tlu U ⇨ Odgovaraju na pitanja, komentiraju i zapisuju u bilježnicu	2 3 4	PP	I	F	15
Završni dio	N ⇨ Pustiti učenicima video snimke morskih kolutićavaca (mnogočetinaša) i pijavica kako bi učenici vidjeli i ostale oblike skupine kolutićavaca. Snimci se nalaze na sljedećim poveznicama: (https://www.youtube.com/watch?v=ExF5oJfarfs, https://www.youtube.com/watch?v=d7bpaIDoQ6M, https://www.youtube.com/watch?v=0fGGz6d3vC4) Nakon projekcije podijeliti učenicima listiće za ponavljanje znanja usvojenih u nastavnom satu U ⇨Gledaju video snimke, rješavaju listiće za ponavljanje usvojenih znanja		RL	T	I	15
Nositelji aktivnosti: N – nastavnik, U - učenici (dodati i mijenjati uloge ukoliko je potrebno uz svaku aktivnost) **Koristiti u izvedbi**: RL – radni listić za učenike, UDŽ – udžbenik, RB – radna bilježnica, P – ploča, PM – prirodni materijal, E – pokus/eksperiment, MD – model, AP – aplikacija, PP – projekcija prezentacije, V – video zapis, A – animacija, I – igra, IU – igranje uloga, RS – računalna simulacija, M – mikroskop, L – lupa, F – fleks kamera, T – tablet, MO – mobitel, OP – organizator pažnje, AL – anketni listić TM – tekstualni materijali (dodati prema potrebi) **Metode**: PR – praktični radovi, D – demonstracija, C – crtanje, I – usmeno izlaganje, R – razgovor, T – rad na tekstu i pisanje **Oblici rada**: I – individualno, P – rad u paru, G – grupni rad, F – frontalno						

Materijalna priprema

Nastavna sredstva: Udžbenik „Biologija 7“, D. Bendelja i sur., Školska knjiga, 2014.
Nastavna pomagala: ploča, kreda, računalo, projektor

Plan učeničkog zapisa

Kolutićavci

- Primjer organizma: gujavica
- Tijelo građeno od kolutića

- Valovito kretanje uz pomoć mišića i četina na površini kože
- Koža: pokrovna i dišna funkcija
- Ljestvičast živčani sustav: svaki kolutić ima 2 ganglija koji su povezani međusobno i sa ganglijima u prethodnom i idućem kolutiću
- Prohodni probavni sustav: probavna cijev započinje ustima i završava izmetnim otvorom
- Razmnožavanje: dvospolci (jedinke sadrže i muške i ženske spolne žlijezde

Prilagodba za učenike s posebnim potrebama

Sadržaj nastavne teme prilagoditi mogućnostima učenika sa posebnim potrebama

Prilozi

- Radni listići

Literatura

- Udžbenik „Biologija 7“, D. Bendelja i sur., Školska knjiga, 2014.

Zabilješke nakon izvedbe

PRILOZI

Radni listić

Nastavna jedinica: Kolutićavci

1. Tijelo kolutićavaca podijeljeno je na _____.
2. Kretanje gujavice naziva se _____ kretanje, a njega omogućuju _____ i _____.
3. Koje uloge ima koža gujavice?

   _____

   _____.
4. Živčani sustav je građen od 2 _____ u svakom kolutiću koji su međusobno povezani poprečnom _____ _____, a također su povezani sa _____ iz prethodnog i idućeg kolutića. Zbog svog izgleda živčani sustav kolutićavaca naziva se _____ živčani sustav.
5. Za razliku od životinjskih organizama koje smo do sada učili kolutićavci imaju _____ krvožilni sustav koji je građen od _____ i _____ krvne žile koje su međusobno povezane.
6. Probavilo gujavice je:
   a. Prohodno
   b. Neprohodno
7. Gujavice imaju _____ i _____ spolne žlijezde. Takve organizme nazivamo _____.
8. Svojstvo gujavice da se oporavi nakon što joj je dio tijela oštećen naziva se _____.
9. Koja je važnost gujavica u tlu?

   _____

   _____

   _____.

7. LITERATURA

Balogh, L.P. (2010) Why do we have so many many definitions for nanoscience and nanotechnology? Nanomedicine 6:397-398

Bhattacharyya A., Bhaumik A., Rani P.U., Mandal S., Epidi T.T. (2010) Nanoparticles – A recent approach to insect pest control. African Journal of Biotechnology 9:3489-3493

Buege J.A., Aust S.D. (1978) Microsomal lipid peroxidation. Mehods in Enzymology 52:302-310

Castillo L.E. Cruz E., Ruepert C. (1997) Ecotoxicology and Pesticides in Tropical Aquatic Ecosystems of Central America. Environmental Toxicology and Chemistry 16:41-51

Chen Z., Meng H., Xing G., Chen C., Zhao Y., Jia G., Wang T., Yuan H., Ye C., Zhao F., Chai Z., Zhu C., Fang X., Ma B., Wan L. (2006) Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. Toxicology Letters 163:109-120

Claiborne A. (1985) Catalase activity. In : R. A. Greenwald (ed.), CRC Handbook of methods of oxygen radical research, pp. 283-284

Drobne D. (2007) Nanotoxicology for safe and sustainable nanotechnology. Arh Hig Rada Toksikol 58:471-478

Ellman G.L., Courtney K.D., Andreas V., Featherstone R.M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology 7:88-95

Fluck R.C. (1992) Energy in Farm Production. Elsevier Amsterdam, pp.

Forbes V.E., Palmqvist A., Bach L. (2005) The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. Environmental Toxicology and Chemistry 25:272-280

Gastaldi L., Renzato E., Capri F., Hankard P., Peres G., Canesi L., Varengo A., Pons G. (2007) Application of a biomarker battery for the evaluation of the sublethal effects of pollutants in the earthworm *Eisenia andrei*. Comparative Biochemistry and Physiology 146:398-405

Gao M., Song W., Zhang J., Guo J. (2013) Effect on enzymes and histopathology in earthworm (*Eisenia foetida*) induced by triazole fungicides. Environmental Toxicology and Pharmacology 35:427-433

Gaupp-Berghausen M., Hofer M., Rewald B., Zaller J. G. (2015) Glyphosate-based herbicides reduce the activity and reproduction of earthworms and lead to increased soil nutrient concentrations. Scientific Reports 5:12886

Gomes S.I.L., Novais S.C., Gravato C., Guilhermino L., Scott-Fordsmand J.J., Soares A.M.V.M., Amorim M.J.B. (2011) Effect of Cu-nanoparticles versus one Cu-salt: Analysis of stress biomarkers response in *Enchytraeus albidus* (Oligochaeta). Nanotoxicology 6:134-143

Habdija I., Habdija B.P., Radanović I., Špoljar M., Matoničkin Kepčija R., Vujčić Karlo S., Miliša M., Ostojić A., Sertić Perić M. (2011). Protista-Protozoa i Metazoa-Invertebrata. Strukture i funkcije. Alfa d.d., Zagreb

Habig WH, Pabst MJ, Jakobi W. (1974) Glutathione S-Transferases The first enzymatic step in mercapturic acid formation. The journal of biological chemistry 249:22

Hackenberger D.K., Palijan G., Lončarić Ž., Glavaš O.J., Hackenberger B.K. (2018) Influence of soil temperature and moisture on biochemical biomarkers in earthworm and microbial activity after exposure to propiconazole and chlorantaniliprole. Ecology and Environmental Safety 148:480-489

Hopkin, S.P., Peakall D.B., Sibly R.M., Walker C.H. (2012) Principles of Ecotoxicology, 4th ed. CRC Press Boca Raton, London, New York

Li Z. Zlabek V., Grabic R., Li P., Machova J., Velisek J., Randak T. (2010) Effects of exposure to sublethal propiconazole on the antioxidant defense system and Na+-K+-ATPase activity in brain of rainbow trout, *Onycorhynchus mykiss*. Aquatic Toxicology 98:297-303

Li Z., Zlabek V., Velisek J., Grabic R., Machova J., Kolarova J., Li P., Randak T. (2011) Multiple Biomarkers Responses in Juvenile Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, After Acute Exposure to a Fungicide Propiconazole. Environmental Toxicology

Lock K., Janssen C.R. (2004) Comparative toxicity of a zinc salt, zinc powder and zinc oxide to *Eisenia fetida*, *Enchytraeus albidus* and *Folsomia candida*. Chemosphere 53:851-856

Mahmood I., Imadi S., Shazadi K., Gul A., Hakeem K.R. (2016) Effects of Pesticides on Environment. Plant, Soil and Microbes 254-266

Malavolta M., Mocchegiani E. (2016) Molecular Basis of Nutrition and Aging. Elsevier Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo

Milivojević T., Glavan G., Božič J., Sepčić K., Mesarič T., Drobne D. (2015) Neurotoxic potential of ingested ZnO nanomaterials on bees. Chemosphere 120:547-554

Mwaanga P., Carraway E.R., van den Hurk P. (2014) The induction of biochemical changes in *Daphnia magna* by CuO and ZnO nanoparticles. Aquatic Toxicology 150:201-209

Novais S.C., Gomes S.I.L., Gravato C., Guilhermino L., Coen W.D., Soares A.M.V.M., Amorim M.J.B. (2011) Reproduction and biochemical responses in *Enchytraeus albidus* (Oligochaeta) to zinc or cadmium exposures. Environmental Pollution 159:1836-1843

Oakes K.D., Kraak G.J.V.D. (2003) Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. Aquatic Toxicology 63:447-463

OECD (2004) Guidelines for the testing of chemicals; Enchytraeid Reproduction Test

Otitoju O., Onwurah I.N.E. (2011) Biomarkers of Pesticide – Contaminated Environment, Pesticides in the Modern World – Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment. In Tech. 141-152

Qian K. Shi T., Tang T., Zhang S., Liu X., Cao Y. (2010) Preparation and characterization of nano-sized calcium carbonate as controlled release pesticide arrier for validamycin against *Rhizoctonia solani*. Microchimica Acta

Rai M., Yadav A., Gade A. (2009) Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. Biotechnology Advances 27:76-83

Rouhani M., Samih M. A., Kalantari S. (2012) Insecticide effect of silver and zinc nanoparticles against *Aphis nerii* Boyer de Fonscolombe (Hemiptera: Aphididae). Chilean journal of agricultural research 72:590-594

Römbke J. (2003) Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review. Pedobiologia 47:607-616

Schreck E., Geret F., Gontier L., Treilhou M. (2008) Neurotoxic effect and metabolic responses induced by a mixture of six pesticides on the earthworm *Aporrectodea caliginosa nocturna*. Chemosphere 71:1832-1839

Shrivastava R., Raza S., Yadav A., Kushawaha P., Flora S.J.S. (2013) Effects of sub-acute exposure to TiO_2, ZnO and Al_2O_3 nanoparticles on oxidative stress and histological changes in mouse liver and brain. Drug and Chemical Toxicology. Early Online 1-12

Stepić S., Hackenberger B.K., Velki M., Lončarić Ž., Hackenberger D.K. (2013) Effects of individual and binary-combined commercial insecticides endosulfan, temephos, malathion and pirimiphos-methyl on biomarker responses in earthworm *Eisenia andrei*. Environmental Toxicology and Pharmacology 36:715-723

Wang L. W. (2004) Zinc oxide nanostructures: growth, properties and applications. Journal of Physics 16:829-858

Ware G.W., Whitacre D.M. (2004) The Pesticide Book. 6th ed. Meister Media Worldwide, Willoughby, Ohio

Wu S., Wu E., Qiu L., Zhong W., Chen J. (2011) Effects of phenanthrene on the mortality, growth, and anit-oxidant system of earthworms (*Eisenia fetida*) under laboratory conditions Chemosphere 83:429-434

Xiong D., Fang T., Yu L., Sima X., Zhu W. (2011) Effects of nano-scale TiO_2, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: Acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. Science of the Total Environment 409:1444-1452

Web izvori:

Web 1:
https://anotherverse.files.wordpress.com/2016/07/nanomedicines-comparison.jpg?w=736

Web 2:
http://www.oatext.com/img/NMBI-2-122-g001.gif

Web 3:
apvma.gov.au

Web 4:
https://www.researchgate.net/profile/Song_Yang4/publication/235602879/figure/fig1/AS:213394301952008@1427888575003/Commercialized-fungicides-containing-1-2-4-triazole-or-amide-substructures.png

Web 5:
http://www.worthington-biochem.com:8080/resources/images/enzyme-manual/ECH/reaction.jpg

Web 6:
https://media.nature.com/m685/nature-assets/nrurol/journal/v6/n5/images/nrurol.2009.49-f1.jpg

Web 7:
http://assets.theaquariumwiki.com/w/images/thumb/0/01/Whiteworm1.jpg/300px-Whiteworm1.jpg

Web 8: :
http://www.mdpi.com/materials/materials-07-02833/article_deploy/html/images/materials-07-02833f1-1024.png

Web 9:

http://www.toxipedia.org/download/attachments/6008695/Propiconazole.png?version=1&modificationDate=1285531817000&api=v2

Web 10:

http://pinova.hr/hr_HR/katalog-proizvoda/sredstva-za-zastitu-bilja/fungicidi/kontaktno-sistemicni-fungicidi/bumper-25-ec