

# Ispitivanje toksičnosti insekticida permetrina na dagnjama *Mytilus galloprovincialis* u prisustvu nanočestica srebra

---

Tadić, Melina

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Pula / Sveučilište Jurja Dobrile u Puli**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:137:635266>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**



Repository / Repozitorij:

[Digital Repository Juraj Dobrila University of Pula](#)



Sveučilište Jurja Dobrile u Puli  
Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru

**MELINA TADIĆ**

**ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI INSEKTICIDA PERMETRINA NA DAGNJAMA  
*MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* U PRISUSTVU NANOČESTICA SREBRA**

Završni rad

Pula, rujan 2020.

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli  
Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru

MELINA TADIĆ

ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI INSEKTICIDA PERMETRINA NA DAGNJAMA *MYTILUS*  
*GALLOPROVINCIALIS* U PRISUSTVU NANOČESTICA SREBRA

Završni rad

JMBAG : 0303061101

Status : redovna studentica

Predmet: Nanotehnologija u istraživanju mora

Mentor: prof. dr. sc. Daniel Mark Lyons

Pula, rujan 2020.



### **IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI ( završni rad )**

Ja, dolje potpisana Melina Tadić, kandidatkinja za prvostupnika (baccalaureus) Znanosti o moru ovime izjavljujem da je ovaj Završni rad rezultat isključivo mogega vlastitog rada, da se temelji na mojim istraživanjima te da se oslanja na objavljenu literaturu kao što to pokazuju korištene bilješke i bibliografija. Izjavljujem da niti jedan dio Završnog rada nije napisan na nedozvoljen način, odnosno da je prepisan iz kojega necitiranog rada, te da ikoji dio rada krši bilo čija autorska prava. Izjavljujem, također, da nijedan dio rada nije iskorišten za koji drugi rad pri bilo kojoj drugoj visokoškolskoj, znanstvenoj ili radnoj ustanovi.

Studentica: Melina Tadić

---

U Puli, rujan 2020. godine



## **IZJAVA**

### **o korištenju autorskog djela**

Ja, Melina Tadić dajem odobrenje Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli, kao nositelju prava iskorištavanja, da moj završni rad pod nazivom “Ispitivanje toksičnosti insekticida permetrina na dagnjama *Mytilus galloprovincialis* u prisustvu nanočestica srebra” koristi na način da gore navedeno autorsko djelo, kao cjeloviti tekst trajno objavi u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli te kopira u javnu internetsku bazu završnih radova Nacionalne i Sveučilišne knjižnice (stavljanje na raspolaganje javnosti), sve u skladu s Zakonom o autorskom pravu i drugim srodnim pravima i dobrom akademskom praksom, a radi promicanja otvorenoga, slobodnoga pristupa znanstvenim informacijama. Za korištenje autorskog djela na gore navedeni način ne potražujem naknadu.

U Puli, 2020.

Potpis

---

Ovaj rad izrađen je u Centru za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju pod vodstvom prof. dr. sc. Daniela Marka Lyonsa. Predan je na ocjenu Sveučilišnom preddiplomskom studiju Znanost o moru Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli radi stjecanja zvanja prvostupnice (baccalaureus) Znanosti o moru.

Voditelj Sveučilišnog preddiplomskog studija Znanost o moru je za mentora završnog rada imenovao prof. dr. sc. Daniela Marka Lyonsa

Povjerenstvo za ocjenjivanje i obranu:

Predsjednik: doc. dr. sc. Paolo Paliaga

Član: izv. prof. dr. sc. Dijana Pavičić-Hamer

Mentor: prof. dr. sc. Daniel Mark Lyons

Datum i mjesto obrane završnog rada: 30. 9. 2020., Pula

Rad je rezultat samostalnog istraživačkog rada.

## **Zahvala**

Zahvaljujem se mentoru prof. dr. sc. Danielu Marku Lyonsu na pomoći, uloženom vremenu, podijeljenom znanju, danim savjetima i strpljenju tijekom praktične izvedbe i prilikom pisanja ovog završnog rada.

Zahvaljujem se Centru za istraživanje mora u Rovinju za mogućnost izrade završnog rada u Laboratoriju za morsku nanotehnologiju i biotehnologiju.

Ovaj je završni rad izrađen u Laboratoriju za morsku nanotehnologiju i biotehnologiju Centra za istraživanje mora, Institut Ruđer Bošković, pod vodstvom prof. dr. sc. Daniela Marka Lyonsa, u sklopu Sveučilišnog preddiplomskog studija Znanosti o moru na Odsjeku za prirodne i zdravstvene studije, Sveučilište Jurja Dobrile u Puli. Rad je vezan uz projekt Hrvatske zaklade za znanost IP-2018-01-5351 pod naslovom “Određivanje fizikalno-kemijskih svojstava i toksičnosti nanočestica srebra, bakra i plastike kao potencijalno štetnih novih materijala u obalnim vodama”.

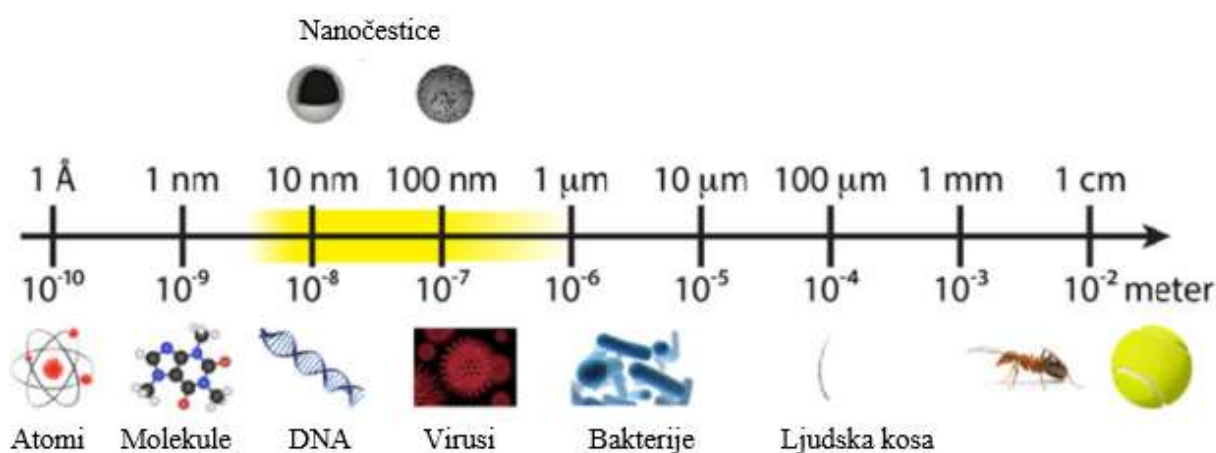
## Sadržaj

|                                                                              |           |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. UVOD .....</b>                                                         | <b>1</b>  |
| 1.1 Nanočestice i nanočestice srebra .....                                   | 1         |
| 1.1.1 Ponašanje nanočestica u morskim ekosustavima .....                     | 3         |
| 1.1.2 Mehanizmi unosa nanočestica i učinci na žive organizme .....           | 4         |
| 1.2. Permetrin .....                                                         | 7         |
| 1.2.1 Ponašanje permetrina u morskom ekosustavu i utjecaj na organizme ..... | 9         |
| 1.3. Mediteranska dagnja, <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....             | 11        |
| 1.3.1 Modelni organizam <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....               | 14        |
| <b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....</b>                                            | <b>15</b> |
| <b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>                                          | <b>16</b> |
| 3.1 Kemikalije .....                                                         | 16        |
| 3.2 Sinteza nanočestica srebra .....                                         | 16        |
| 3.3 SOS test .....                                                           | 17        |
| 3.4. Određivanje stabilnost lizosomalne membrane .....                       | 18        |
| 3.4.1 Priprema radne otopine i neutralnog crvenila .....                     | 18        |
| 3.4.2 Određivanje stabilnosti lizosomalne membrane .....                     | 19        |
| 3.5 Određivanje aktivnosti enzima acetilkolinesteraze .....                  | 20        |
| 3.5.1 Određivanje koncentracije proteina prema Bradfordu .....               | 21        |
| <b>4. REZULTATI .....</b>                                                    | <b>22</b> |
| 4.1 SOS test .....                                                           | 22        |
| 4.2 Stabilnost lizosomalne membrane .....                                    | 24        |
| 4.3 Određivanje aktivnosti enzima acetilkolinesteraze .....                  | 26        |
| <b>5. DISKUSIJA .....</b>                                                    | <b>28</b> |
| <b>6. ZAKLJUČAK .....</b>                                                    | <b>34</b> |
| <b>7. LITERATURA .....</b>                                                   | <b>35</b> |
| 7.1 Internetski izvor .....                                                  | 39        |

## 1. UVOD

### 1.1 Nanočestice i nanočestice srebra

Nanočestice su oduvijek prisutne u okolišu iz prirodnih ili antropogenih izvora (Kleine i sur., 2008). Prepoznato je da neki proizvedeni nanomaterijali posjeduju posebna mehanička, katalitička i optička svojstva te električnu provodljivost, prvenstveno radi svoje nanoveličine. Nanočestice srebra imaju opseg veličine od 1 do 100 nm (Slika 1.) (Prabhu i Poullose, 2012.).



Slika 1. Opseg veličina nanočestica. Usporedba sa biološkim i staničnim komponentama (Bloemen, 2015.).

Rezultat tih svojstva je eksponencijalna proizvodnja i razvoj novih nanomaterijala tijekom zadnjeg desetljeća i njihova eksploatacija u nano industriji (Kleine i sur., 2008), a poznate su i u mnogim fizikalnim, biološkim i farmaceutskim primjenama (Prabhu i Poullose, 2012.). Nanočestice mogu biti korištene u medicinskom dijagnosticiranju i u terapijama. Kod dijagnosticiranja služe kao fluorescentne oznake koje pomažu prilikom detekcije biomolekula i patogena ili kao kontrast za magnetsku rezonancu. Kod terapija se koriste od pomaganja prilikom transporta lijeka prema cilnog područja do kemoterapija (Sukhanova i sur., 2018.). Razvoj sigurnih i biokompatibilnih nanočestica koji se koriste u dijagnozama i tretmanima može biti bazirano jedino na potpunom razumijevanju interakcija između svih čimbenika i mehanizama toksičnosti nanočestica (Sukhanova i sur., 2018.).

Do sada najveću primjenu u potrošačkim proizvodima nanomaterijala uključuju nanočestice srebra. (Kleine i sur., 2008). Nanočestice srebra se koriste u tekstilnoj industriji, elektronici, optičkim spravama, u medicini kao terapijski i antibakterijski agensi, u dentalnim procedurama, premaz kod medicinskih uređaja, antibakterijski premaz kod filtera za zrak, jastuci, respiratori, čarape, detergents, sapuni (Prabhu i Poulouse, 2012.).

U nekim slučajevima se koriste nanočestice metalnog srebra, dok se u drugim slučajevima koriste elektrokemijsko generirano ionsko srebro. Ionsko srebro je jako reaktivno i brzo ga apsorbiraju makročestice i koloidne čestice ili se adsorbira u organski materijal u prirodnim vodama. (Kleine i sur., 2008)

Nanočestice srebra imaju jedinstvena svojstva koja za mikroorganizme imaju antimikroban i citotoksičan učinak (Sukhanova i sur., 2018.). Toksični učinak može biti uzrokovan zbog posebnih kemijskih i fizikalnih svojstva koji podliježu specifičnim mehanizmima interakcije u živim organizmima (Sukhanova i sur., 2018.). Kod povećane upotrebe i povećane proizvodnje postavljaju se pitanje o sigurnosti AgNP i njihovog toksičnog učinka na okoliš (Gambardella i sur., 2015.).

Proizvedeni nanomaterijali ulaze u okoliš putem namjernih i slučajnim ispuštanjem (emisijom u atmosferu) te u obliku tekućeg ili krutog otpada iz tvornica. Nanočestice koje dopijaju u okoliš mogu i kontaminirati tlo, dopijeti u površinske i podzemne vode te dolaze u interakciju s biotom. Čestice u krutom otpadu ili slučajna izlijevanja mogu biti transportirana do vodenih ekosustava putem vjetrova ili ispiranjem površine kišom. Najveći rizik za okoliš dolazi od izlijevanja povezanih sa transportom proizvedenih nanočestica iz tvornica, namjernog otpuštanja u okoliš i difuznim otpuštanjem iz odjeće (Kleine i sur., 2008). Iako korištenje nanočestica srebra ima veliku primjenu, postoji i problem njihove velike toksičnosti te može uzrokovati probleme zdravlja i okoliš. Problem kod fizikalnih i kemijskih metoda proizvodnje nanočestica srebra je taj da uključuje toksične kemikalije koje su potencijalno opasne za okoliš i predstavljaju veliki biološki rizik (Prabhu i Poulouse, 2012.).

Razvoj novih strategija za ispitivanje toksičnosti nanočestica i usporedba učinaka na različite biološke sustave postao je prioritetni cilj. Neki spojevi u većem rasponu veličina nisu toksični, ali mogu biti kad su u nanoveličini (Vazquez-Muñoz i sur., 2017.). Meta-analiza podataka pokazuje da neovisno o razlikama širokog spektra nanočestica srebra, većina ima inhibicijska svojstva u istom rasponu koncentracije srebra te su inhibicijska svojstva posljedica otpuštanja iona srebra, a ne karakteristike nanočestica (Vazquez-Muñoz i sur., 2017.) Mogući toksički

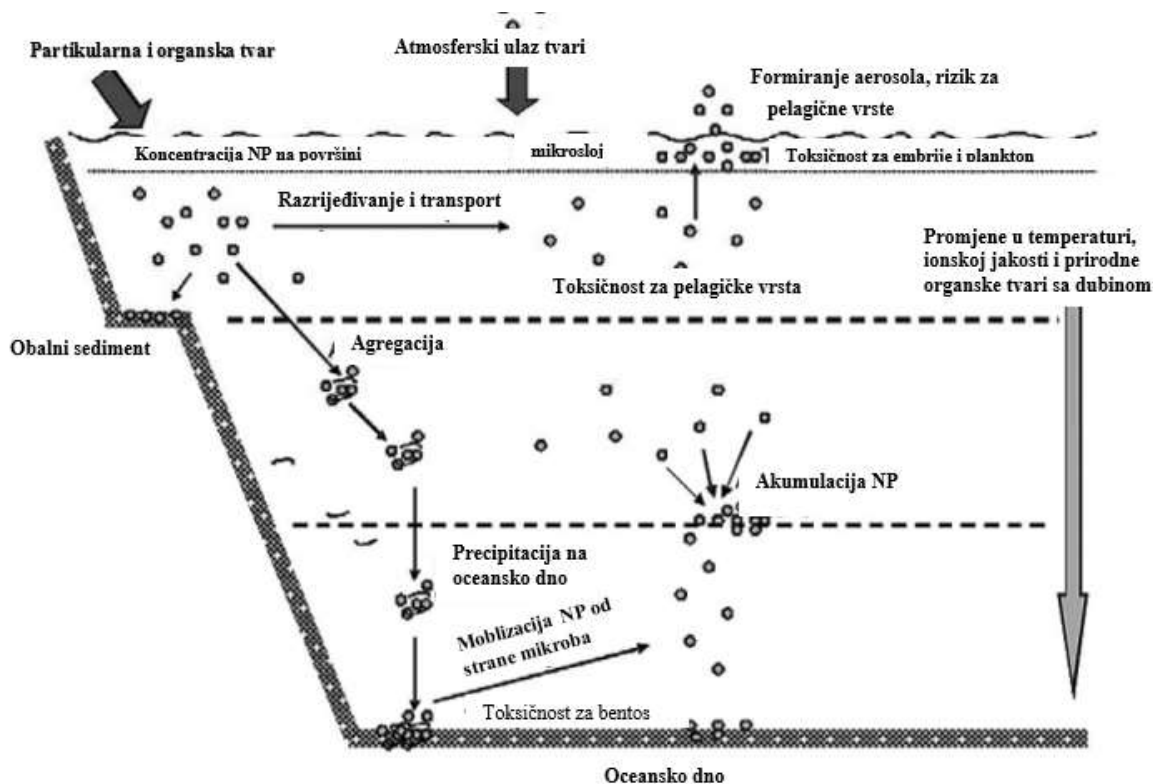
učinci nanočestica ovisi o njihovoj koncentraciji, trajanju interakcije sa organizmom ili živom tvari, stabilnost bioloških fluida i kapacitet akumulacije u organima i tkivima. (Sukhanova i sur., 2018.)

#### 1.1.1 Ponašanje nanočestica u morskim ekosustavima

Ispitivanja učinaka nanočestica srebra u vodenim ekosustavima su od velike važnosti radi njihove raznolike uporabe koje na razne načine mogu dospjeti u vodene ekosustave tijekom odlaganja otpada ili izlivanja otpadnih voda (Gambardella i sur., 2015.). Odnos fizioloških svojstva nanočestica i ponašanja u prirodnim vodama ovisi o sljedećim svojstvima: kemijski sastav; masa, broj i koncentracija čestica; površinska koncentracija; distribucija veličine; specifična površina; zeta potencijal; površinska kontaminacija i stabilnost (Kleine i sur., 2008). Nanočestice srebra mogu se agregirati i/ili otopiti se u vodenom okolišu, što može određivati sudbinu, transport i toksičnost takvih nanočestica (Gambardella i sur., 2015.). Ponašanje i toksičnost nanočestica u morskoj vodi je jako različit u odnosu na slatku vodu, čak i pri visokim koncentracijama (Mantraga i Corsi, 2012.).

Morski okoliš je lužnatiji, ima veću ionsku jakost, veliku raznolikost koloida i prirodne organske tvari. Obalni donos i atmosfersko taloženje mogu doprinijeti kontaminaciji morskog ekosustava. U moru mijenjaju se fizikalno kemijska svojstva s dubinom koja može utjecati na agregaciju i kemiju koloida (npr. termoklina) (Kleine i sur., 2008.). U morskoj vodi aglomeracija, agregacija i precipitacija utječu na ponašanje nanočestica (Mantraga i Corsi, 2012.), a mogu rezultirati taloženjem i akumulacijom nanočestica u sedimentu te mogu toksično utjecati na bentoske i sedentarne organizme (Kleine i sur., 2008.). Agregati polako tonu prema morskom dnu, osim ako ne naiđu na značajne promjene u temperaturi, ionskoj jakosti i prirodnoj organskoj tvari (Mantraga i Corsi, 2012.), ali još nije jasno da li se akumuliraju na prijelazu toplih i hladnih struja ili su akumulirani od strane biote. Potencijalni rizik od nanočestica mogu imati pelagične vrste u tim zonama (vertikalne migracije kod tuna) ili bentonski organizmi prilikom akumulacije nanočestica iz sedimenta. Rizik također može postojati prilikom akumulacije nanočestica u površinskom sloju oceana gdje površinska napetost može zarobiti nanočestice i time ugroziti morske sisavce i ptice (Kleine i sur., 2008.) (Slika 2.). Transformacija nanočestica i biodostupnost organizmima ovise o lokalnim kemijskim svojstvima određenog područja. Transformacija uključuje fizičke, kemijske,

fotokemijske i biološke reakcije unutar organizma. Način i u kojoj mjeri nanočestice stupaju u interakciju s abiotičkom i biotičkom komponentom, što uključuje i mogućnost da postanu nositelji i drugih ekoloških onečišćivača i/ili zagađivača, trebao bi biti cilj kod istraživanja morskog okoliša (Mantraga i Corsi, 2012.).



Slika 2. Shematski dijagram moguće sudbine nanočestica u morskom okolišu i rizik izloženosti organizama (Klein sur., 2008.)

### 1.1.2 Mehanizmi unosa nanočestica i učinci na žive organizme

Organizmi koji žive u kontaminiranom okolišu, inkorporirati će nanočestice u svom tijelu uglavnom preko crijeva (probavnim sustavom) s mogućnošću distribucije nanočestica u druge sustave u tijelu (Kleine i sur., 2008.), a nanočestice se unose u tijelo oralnim putem, preko površine kože, dišnim sustavom koji je kontaminiran nanočesticama (Sukhanova i sur., 2018.).

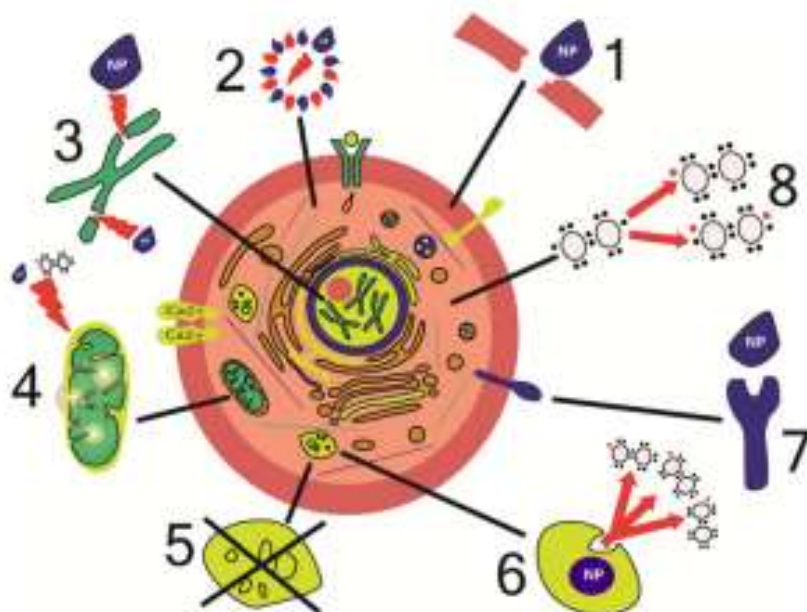
Veličina nanočestica uvelike određuje kako će nanočestice doći u interakciju s transportnim i obrambenim mehanizmom stanica i tkiva. Interakcija utječe na kinetiku njihove distribucije i akumulacije u tijelu (Sukhanova i sur., 2018.). Nanočestice mogu ući u stanice difuzijom preko stanične membrane te endocitozom (Kleine i sur., 2008.), a mogu biti transportirane u stanice mehanizmima transcitoze (Sukhanova i sur., 2018.). Stanična membrana je polupropusna membrana koja ima važnu ulogu u staničnim funkcijama, kao što je regulacija staničnog transporta, transdukcija energije i unutarstanične komunikacije (Kleine i sur., 2008.).

Veličina nanočestica od 1 do 100 nm usporedive su s veličinom globularnih proteina (2-10 nm), dijametrom DNA helix uzvojnice (2 nm) i debljinom stanične membrane (10 nm) što im omogućuje neometan transport u stanice i stanične organele. Nanočestice manje od 5 nm uobičajeno prodiru u stanične barijere putem translokacije, dok veće nanočestice ulaze u stanicu fagocitozom, makropinocitozom i specifičnim ili nespecifičnim mehanizmima. *In vivo* eksperimenti su pokazali da nanočestice manje od 10 nm brzo šire po cijelom organizmu, dok su veće nanočestice (50-250 nm) pronađene u jetri, krvi i slezeni. To objašnjava da tijelo ima specifičan obrambeni sustav koji mononuklearnom fagocitozom sprječava širenje nanočestica u druge dijelove tijela. Mala veličina nanočestica dozvoljava im da uđu kroz epitel u limfu i krv te se transportiraju preko optjecajnog sustava u dijelove organe i tkiva uključujući mozak, srce, jetru, bubrege, koštanu srž i živčani sustav (Sukhanova i sur., 2018.).

Nanočestice mogu indirektno uzrokovati oštećenje membrane preko reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) koji mogu oksidirati duple veze masnih kiselina u procesima lipidne peroksidaze u membrani fosfolipida. Povećana propusnost membrane uzrokuje veći osmotski stres na stanice ili ometa prilikom preuzimanja nutrijenta. Peroksidirane masne kiseline mogu potaknuti reakcije koje stvaraju druge slobodne radikale koji dovode do još većih oštećenja u stanicama naročito DNA. Toksične interakcije između nanočestica i proteina povezane su ili s fizikalnim interakcijama nanočestica s proteinima ili nanočesticama koje proizvode ROS i druge štetne radikale (Kleine i sur., 2008.).

Nanočestice mogu uzrokovati (Slika 3.):

- oksidaciju i formaciju ROS ili drugih slobodnih radikala
- oštećenje stanične membrane
- oštećenje citoskeleta
- poremećaji unutarstaničnog transporta
- poremećaji transkripcije DNA i oštećenja DNA te mutageneze
- oštećenje mitohondrija i poremećaje metabolizma što dovodi do neravnoteže u energiji
- apoptoza
- promjene u strukturi membranskih proteina i transportu tvari u i iz stanice uključujući i unutarstanični transport
- aktiviranje sinteze upalnih medijatora i smetnje pri normalnim mehanizmima staničnog metabolizma kao i metabolizam tkiva i organa (Sukhanova i sur., 2018.).
- 



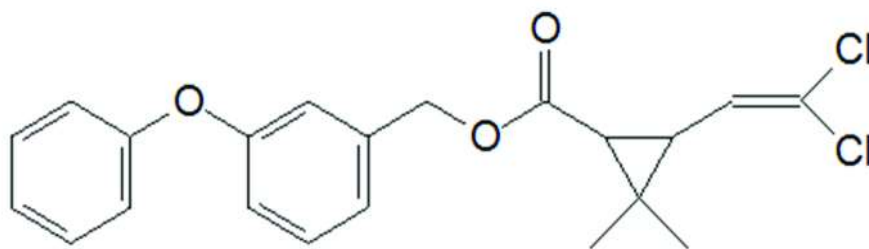
Slika 3. Mehanizmi oštećenja stanica uzrokovanih djelovanjem nanočestica. 1) fizikalna oštećenja membrane; 2) stukturalne promjene u citoskeletnim elementima; 3.)transkripcija i oksidativna oštećenja DNA; 4) oštećenje mitohondirja; 5) promjene u funkcioniranju lizosoma; 6) reakcije reaktivnih kisikovih vrsta; 7) promjene u funkcioniranju membranskih proteina; 8) sinteza upalnih faktora i medijatora (Sukhanova i sur., 2018.).

Mnoge nanočestice nisu prepoznate od obrambenog mehanizma tijela ili stanice i može doći do značajne akumulacije letalnih koncentracija u organima i tkivima. Vodeni beskralješnjaci koji se hrane filtriranjem su posebno ugrožene utjecajem nanočestica jer imaju razvijen sustav preuzimanja čestica makro i nano veličina koji je sastavni dio fizioloških funkcija unutarstanične probave i staničnog imuniteta (Sukhanova i sur., 2018.).

Gambardella i sur., 2015 istraživali su toksične učinki nanočestica srebra na morske ekosustave analizirajući učinke na vrstama beskralješnjaka koji pripadaju različitim trofičkim razinama, od primarnih proizvođača do sekundarnih potrošača. Koristili su skupine: alge *Algae* (*Skeletonema costatum* i *Dunelia teriolecta*), žarnjaci *Cnidaria* (*Aurelia aurata*), raci *Crustacea* (*Artemia salina* i *Amphibaanus amphitrite*) i bodljikaši *Echinodermata* (*Paracentrotus lividus*). Ispitivanjem ovih organizama htjeli su proširiti znanje učinka nanočestica srebra na morski ekosustav analizirajući različite odgovore kao što je rast alga; nepokretnost meduze i frekvenciju pulsiranja; mortalitet kod rakova *Crustacea* i ponašanje prilikom plivanja; pokretljivost sperme kod morskog ježinca. Rezultati su pokazali da je meduza *Aurelia aurata* najosjetljivija vrsta od svih ispitivanih organizama, dok su najotpornije larve vrste *Artemia salina*. U istraživanju su zaključili da izlaganje AgNP toksično za sve organizme ovisno o dozi i da nanočestice srebra mogu utjecati na različitim trofičkim razinama u morskom ekosustavu. (Gambardella i sur., 2015.).

## 1.2. Permetrin

Pesticidi su posebna grupa stresora, jer su jedine kemikalije koje su namjerno unesene u okoliš s namjerom da izazovu toksične učinke (DeLorenzo i Fulton, 2012.). Primjena velikog broja pesticida ključno je za poljoprivredu radi kontrole štetočina i bolesti koje uzrokuju oštećenja biljnih produkata (Khazri i sur., 2015.). Cilj korištenja pesticida je pronalazak kemikalija koje će imati efektivan utjecaj na specifičnu štetnu ciljnu vrstu (DeLorenzo i Fulton, 2012.) ali ugrožavaju i mnoge ne ciljne organizme (Khazri i sur., 2015.). Kako bi stresor imao sposobnost da izazove štetne učinke i pritom imao rizične posljedice, stresor mora biti u kontaktu s ekološkom komponentom dovoljno dugo i pri dovoljnoj visokoj koncentraciji da bi izazvao učinak. Proces ispitivanja ekološkog rizika procjenjuje mogućnost pojave ekoloških učinaka koji su rezultat izloženosti jednom ili više stresora (DeLorenzo i Fulton, 2012.)



Slika 4. Struktura permetrina (Zhan i sur., 2018.).

Struktura permetrina (Slika 4.) dobivena je od prirodno dostupnog piretroida (iz biljke *Tanacetum cinerariifolium* (Slika 5.)). Prvi su je otkrili Elliott Janes i suradnici 1970. godine u Londonu, na Rothamsted institutu za istraživanja. Permetrin je nesistematski piretroidni insekticid koji se koristi u agronomiji (DeLorenzo i Fulton, 2012.) komercijalno je u upotrebi i u urbanim sredinama, a toksičan je za insekte i sisavce (Harp, 2014.). Permetrin je insekticid sa širokim spektrom upotrebe za suzbijanje termita; ektoparazita kod životinja; u losionima i šamponima za tretiranje nametnika uši i šuge; za tretiranje uniforma vojnika i za suzbijanje bolesti koje se prenose insektima; široko je rasprostranjen za suzbijanje komaraca (Harp, 2014.), prisutan je u antivegetativnim (antiobraštajnim) bojama za brodove (DeLorenzo i Fulton, 2012.). Koristi se u obliku dima, prašine, vlažnog praha, koncentrirane emulzije i u obliku koncentrata malog volumena (Harp, 2014.).



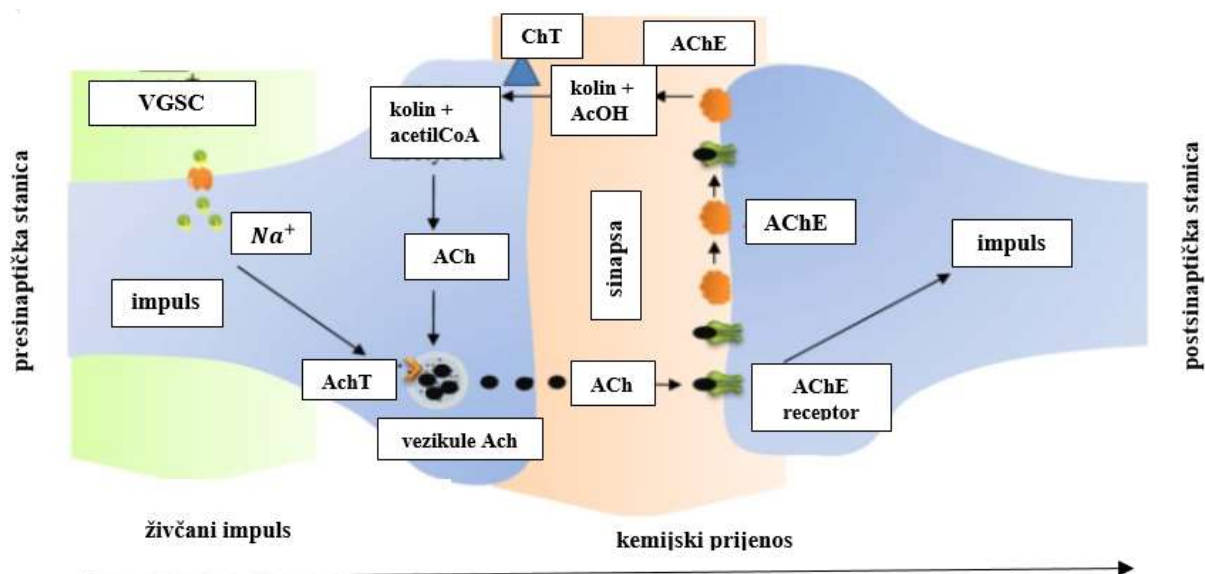
Slika 5. *Tanacetum cinerariifolium* (Yamashiro i sur., 2019.).

### 1.2.1 Ponašanje permetrina u morskom ekosustavu i utjecaj na organizme

Obalna područja i estuariji podložna su unosu permetrina. Prekomjerno korištenje pesticida u obalnom području rezultira unosom smjesa raznih pesticida u more. Smjesa predstavlja još jedan oblik nesigurnosti u procjeni rizika jer su mnogi pesticidi pokazali sposobnost povećanja toksičnosti i sinergistički učinak. Da bi se poboljšala pouzdanost u ispitivanjima obalnog rizika, treba proširiti praćenje obalnih i estuarijskih ekosustava. Predviđanje rizika također će poboljšati razumijevanje toksičnih učinaka pesticida permetrina na rane faze životih ciklusa vrsta (DeLorenzo i Fulton, 2012.).

Ove kemikalije predstavljaju ozbiljan problem za zdravlje ljudi i ekosustava zbog hidrofobne i lipofilne prirode, što znači da imaju visoki stupanj biodostupnosti kod biljaka i životinja. Bioakumuliraju se u masnim stanicama živih organizama i biomagnificiraju se kroz hranidbeni lanac (Firth i sur., 2019.). Permetrin ima visoku akutnu toksičnost za akvatične organizme (Firth i sur., 2019.), posebice za beskrležnjake (EU Comission, 2012.).

Permetrin je neurotoksikant, a glavni mehanizam djelovanja ovog spoja je hiperstimulacija živčanog sustava koji blokira kretanje natrijevog iona kroz živčanu membranu (DeLorenzo i Fulton, 2012.). Naponski natrijev kanal (Slika 6.) (eng. VGSC- voltage gated sodium channel) smatra se glavnim ciljanim mjestom djelovanja permetrina. Permetrin ima učinak aksonskog inhibitora i veže se na proteine u živcima koji stimuliraju daljni rad živaca (EU Comission, 2012.). Osim toga, ima učinke na integralne proteine ATPaze u neuralnoj membrani (Khazri i sur., 2015.) te inhibirajuće učinke na aktivnost acetil kolinesteraze koja ima ključnu ulogu u živčanom prijenosu. Kod insekata i drugih beskrležnjaka permetrin uzrokuje usporavanje zatvaranja naponskog natrijevog kanala što ima za posljedicu produljeno propuštanje natrija i ponavljanje živčane stimulacije aksona (Harp, 2014.). Istraživanja su pokazala da permetrin i drugi derivati proizvode reaktivne kisikove vrste (ROS) i uzrokuju oksidativan stres. ROS može reagirati s biološkim makromolekulama što dovodi do enzimske inhibicije, lipidne peroksidacije i oštećenja DNA (Khazri i sur., 2015.).



Slika 6. Biokemijski putevi u naponskom natrijevom kanalu (VGSC). AChE, enzim acetilkolinesteraza; ACh, acetilkolin; AchT, transporter acetilkolina; ChT, transporter kolina; AcOH, octena kiselina. (David i sur., 2013.).

Izloženost organizama toksikantima rezultira indukcijom antioksidativnih enzima, štiteći ciljne molekule protiv oksidativnog oštećenja. Oksidativni stres nastaje kada je prisutna neravnoteža u omjeru bioloških oksidansa ili antioksidanata, a može dovesti do promjene lipida i proteina. Abnormalna generacija slobodnih radikala može dovesti do oštećenja stanica i smatra se važnim signalom oksidativnog oštećenja. Stoga, različiti organizmi mogu stimulirati antioksidativnu enzimsku aktivnost kao što je superoksid dismutaza (SOD) ili katalaza (CAT) koji mogu rastaviti vodikov superoksid kako bi se smanjio oksidativni stres. Ti enzimi djeluju zajedno kako bi eliminirali reaktivne vrste kisika koje imaju potencijalan toksični učinak na stanične lipide, proteine i DNA. Permetrin mijenja fluidnost lipidne baze stanične membrane i hidrofobnim interakcijama između proteina i lipida mogu promijeniti konfiguracije proteina (kontrola propusnosti stanične membrane) koje utječu na brzinu prijenosa i enzimsku aktivnost (Khazri i sur., 2015.).

Zbog lipofilnih svojstva permetrin ima tendenciju da se akumulira u masnom tkivu (EU Comission, 2012.). Dokazano je da se visoke koncentracije permetrina i njegovih derivata mogu bioakumulirati kod školjaka. Permetrin lako prolazi kroz škrge i akumulira se probavom direktnim ili indirektnim putem (Khazri i sur., 2015.), ali su i kopneni i vodeni organizmi pokazali sposobnost izlučivanja permetrina putem ekskrecije (EU Comission, 2012.). Zbog lipofilnog karaktera imaju visoki stupanj adsorpcije preko škrga čak i pri niskim

koncentracijama koja dovodi do visoke osjetljivosti riba (Khazri i sur., 2015.) te su uočeni učinci na reprodukciju riba i preživljavanje (EU Comission, 2012.)

### 1.3. Mediteranska dagnja, *Mytilus galloprovincialis*

Carstvo: Animalia

Koljeno: Mollusca

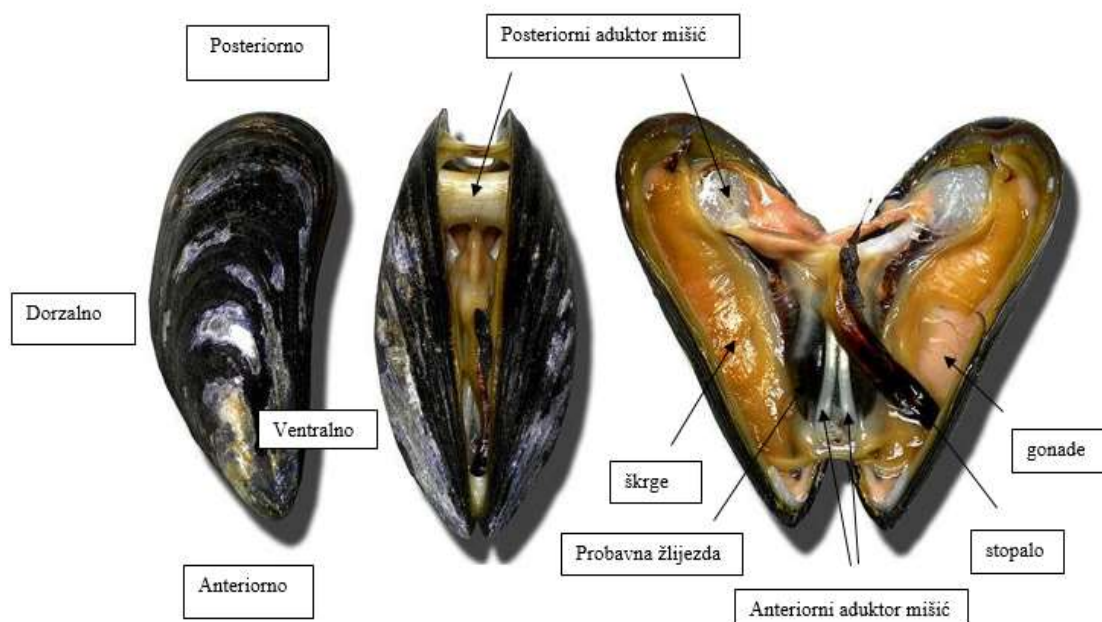
Razred: Bivalvia

Red: Mytiloida

Porodica: Mytilidae

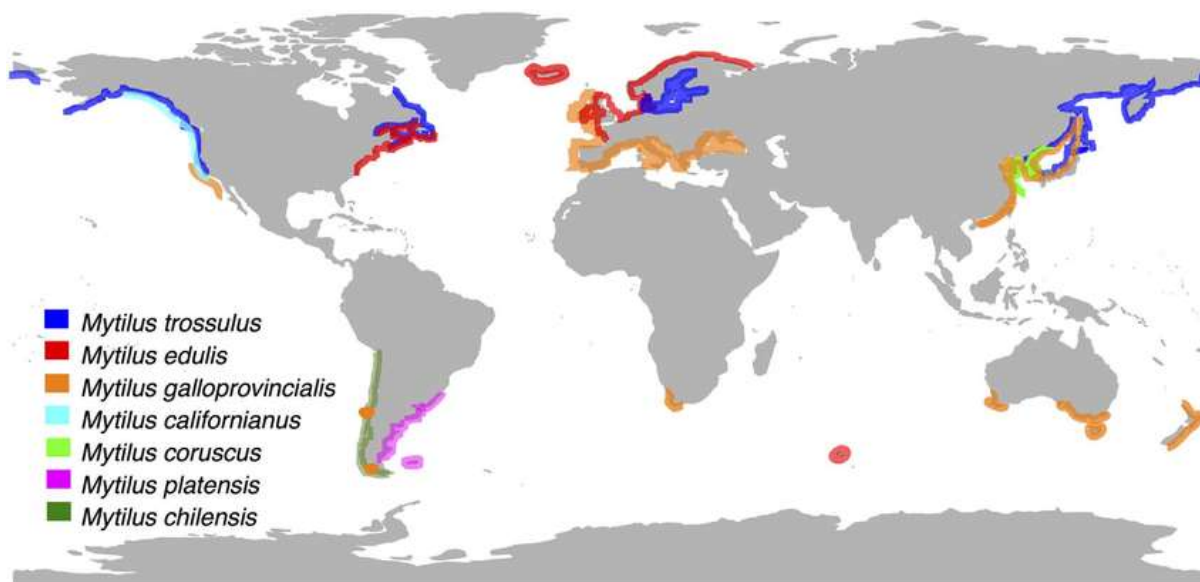
Rod: *Mytilus*

Vrsta: *galloprovincialis* (Lamark, 1819)



Slika 7. Vanjski izgled i unutarnja građa mediteranske dagnje, *Mytilus galloprovincialis* (Paiva, 2014.).

Mediteranska dagnja, *Mytilus galloprovincialis* je školjkaš koji pripada rodu *Mytilus*. Školjkaši roda *Mytilus* široko su rasprostranjeni u toplim morima gdje brzo kolonizira umjereno tople i suptropske obale (Hockey i Schurink, 1992.) te u hladnijim vodama na sjevernoj i južnoj hemisferi (Seed i Suchanek, 1992.) (Slika 8.).



Slika 8. Geografska distribucija vrsta roda *Mytilus*. (Gaitán-Espitia i sur., 2016.).

Vrste roda *Mytilus* se najčešće pojavljuju u intertidalnim staništima na zaštićenim ili izloženim stjenovitim obalama i uglavnom su odsutne na muljevitim ili pješčanim područjima (Hockey i Schurink, 1992.), ponekad su nađene u izobilju i u subtidalnim staništima (Seed i Suchanek, 1992.). Ova ograničena distribucija je najčešće kontrolirana biološkim čimbenicima predacije i kompeticije. Gornje distribucijske granice za *Mytilus spp.* su konstantne za duži vremenski period. Fiziološka tolerancija na ekstremne temperature i isušenje predstavljaju najvažnije čimbenike u određivanju gornjih granica distribucije za populacije *Mytilus galloprovincialis* na kamenitim obalama. Naseljavanje i kretanje u pukotine ili bazene omogućuje bolju zaštitu dagnji od fizikalnih utjecaja temperature i sušenja, iako takva područja mogu također štititi školjkaše od utjecaja olujnih valova. Učinci takvih mikrostaništa povećavaju preživljavanje školjkaša. Donje zonalne granice distribucije (eng. lower zonal limits) za mnogu sesilnu faunu, uključujući i školjkaše, pokazalo se da su pod velikim utjecajem bioloških čimbenika, posebno predacije. Najznačajnije predatorske vrste su morske zvijezde (npr. morske zvijezde roda *Pisaster* (Slika 9.)) koje određuju donju granicu distribucije za *M. galloprovincialis* i druge vrste roda *Mytilus* (Seed i Suchanek, 1992.).



Slika 9. Morska zvijezda *Pisaster ochraceus* i dagnja *Mytilus californianus* (<https://www.nps.gov/pore/learn/nature/intertidal.htm>).

Proučavanje prirodnih reproduktivnih ciklusa su ključna za istraživanje dinamike populacija kako bi se bolje razumjela biogeografija i specijacija. Vrste roda *Mytilus* se sezonski razmnožavaju (Seed i Suchanek, 1992. ) i imaju visoku brzinu stope rasta i plodnosti (Griffith i sur., 1992). Nakon mrijesta i vanjske oplodnje, larve školjaka su privremeni dio meroplanktona te su pasivno nošene valovima i vodenim strujama (Seed i Suchanek, 1992. ).

*M. galloprovincialis* ima različite utjecaje na trofičku dinamiku u ekosustavu, uključujući brzo uklanjanje partikularne tvari iz vodenog stupca. Radi velike brzine filtracije, dagnja može potrošiti hranu drugim filtratorskim organizmima. Pri gustoći od 5000 jedinki po  $m^2$ , zajednica *M. galloprovincialis* filtrira 11  $m^3$  vode po satu. (Griffiths i sur., 1992).

Zajednica ili kolonija dagnji čine strukturno složena staništa te pružaju utočište raznolikoj zajednici organizama čiji sastav i abundancija ovisi o starosti i strukturalnoj kompleksnosti staništa i njegove zonalne rasprostranjenosti. U zajednicama *M. galloprovincialis* često se koloniziraju juvenilni akvatični puževi i raznolika infaunalna zajednica beskralješnjaka (Griffiths i sur., 1992.). *M. galloprovincialis* pokazuje nekoliko karakteristika tipičnih za agresivnu invazivnu vrstu, ali njezina invazivnost na makrofaunu nije određena. Najvažnije karakteristike vrste su brzi rast pri različitim temperaturama mora, visoka plodnost, otpornost na isušivanje i dominantni kompetitori za stanište (Hockey i Schurink, 1992.).

### 1.3.1 Modelni organizam *Mytilus galloprovincialis*

Dagnja se široko koristi kao modelni organizam u ekotoksikološkim istraživanjima (Khazri i sur., 2015.), te za razna fiziološka, biokemijska i genetička istraživanja biomonitoring obalne kvalitete vode (Seed i Suchanek, 1992. ), procjenu onečišćenja obalnih područja (Khazri i sur., 2015.), ali i u terenskim i laboratorijskim eksperimentima (Domouhtsidou i sur., 2004). Zbog svoje distribucije, sedentarnog načina života, prehrane putem filtriranja vode, dugog životnog vijeka, dagnje se koriste kao bioindikatorska vrsta za procjene toksičnosti pesticida (Khazri i sur., 2015.) te za proučavanje zajedničkih bioloških odgovora na okolišne kontaminante uključujući i nanočestice (Canesi i Procházková, 2014.).

Biomarkeri se koriste za procjenu kvalitete ekosustava i omogućuju otkrivanje ranih bioloških promjena koje mogu rezultirati dugotrajnim fiziološkim poremećajima u organizmu (Domouhtsidou i sur., 2004). Stabilnost lizosomalne membrane predstavlja biomarker općeg stresa na široki raspon zagađivača i vrlo je pouzdan i osjetljiv u studijama biomonitoringa (Domouhtsidou i sur., 2004). Kod ispitivanja neurotoksičnosti pesticida, ispituje se aktivnost enzima acetilkolinesteraze u tkivima morskih organizama kao biomarker ranog odgovora izloženosti. Preživljavanje na zraku ili stres na stres test „SOS“ pokazatelj je općeg fiziološkog stanja školjaka, odnosno pokazatelj je općeg stresa na razini cijelog organizma te se koristi u monitoringu onečišćenih obalnih područja. Prednost korištenja SOS testa za praćenje homeostaze organizma, jest u tome što je njegova izvedba jeftina i jednostavna . U testu se mjeri vrijeme preživljavanja (LT<sub>50</sub>) dagnji izloženih na zraku, a prije toga su bile izložene nekom onečišćenju/toksikantu.. Istraživanja su pokazala da su dagnje izložene onečišćenju umrle na zraku mnogo ranije nego neizložene dagnje (Ayad i sur., 2011.).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja bio je ispitati toksične učinke insekticida permetrina u prisustvu srebrnih nanočestica kod dagnji *Mytilus galloprovincialis* pomoću SOS testa, biomarkera stabilnosti lizosomalne membrane i aktivnosti enzima acetil kolinesteraze.

- SOS testom, odnosno preživljavanjem na zraku, ispitivalo se opće fiziološko stanje jedinki
- Stabilnost lizosomalne membrane koristio se kao biomarker stresa na membranu stanice, induciran insekticidom permetrinom u prisustvu srebrnih nanočestica (AgNP).
- Aktivnost enzima acetil kolinesteraze ispitivala se u škrga dagnji kao biomarker izloženosti pesticidima kako bi se dokazalo djelovanje na neurotransmitere i prijenos živčanih signala u stanicama.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1 Kemikalije

Za izradu ovog završnog rada koristio se insekticid permetrin (dobavljača Unichem) ( $w=1,05\%$ ; 10,5 g/L) i nanočestice srebra koncentracije 50 mg/L (dobavljača SIGMA). Ostale kemikalije koje su se koristile su od dobavljača Sigma-Aldrich, Kemika, Roth i Fluka.

- Kemika: srebrov nitrat, natrijev klorid, magnezijev sulfat, kalijev klorid, homogenizacijski pufer TRIS (0.1 M tris-hidroksimetil aminometan),
- Sigma-Aldrich: natrijev citrat ( $w=1\%$ ), kalcijev klorid, natrijev hidroksid, sigmacote, poly-L-Lysine, BSA (Albumin, protein iz goveđeg seruma), Bradfordov reagens, di-metil-sulfooksid (DMSO)
- Roth: Hepes pufer, Ellmanov reagens (5,5-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina ili DTNB u TRIS puferu )
- Fluka: supstrat za acetilkolin (ATC, acetiltiokolin), prah neutralnog crvenila

Tijekom eksperimenta koristila se destilirana voda i ultračista voda ( $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ ) dobivena na CIM Rovinj iz TKA GenPure sustava za dobivanje ultračiste vode.

#### 3.2 Sinteza nanočestica srebra

Nanočestice srebra sintetizirane su na način da se izvagana količina od 0,0062 g srebrena nitrata ( $\text{AgNO}_3$ ) otopila u tikvici sa 36 mL ultračiste vode. Tikvica sa otopinom se zagrijavala na magnetskoj miješalici gdje se otopina zagrijavala do ključanja. Prilikom pojave prvih mjehurića dodano je 1,8 mL natrijevog citrata (1% w/v). Natrijev citrat se dodaje za stvaranje omotača oko nanočestica srebra kako ne bi došlo do koagulacije u morskoj vodi. Kada je postignuta promjena boje u žutu, tikvica je maknuta s grijača te se ostavila na sobnoj temperaturi na hlađenje.



Slika 10. Disperzija nanočestica srebra dobivenih u laboratoriju za morsku nanotehnologiju i biotehnologiju (CIM, Rovinj).

### 3.3 SOS test

U ožujku dagnje, dobivene iz Limskog kanala, stavljene su na aklimatizaciju u bazen s protočnom morskom vodom tijekom 48 sati. Nakon aklimatizacije dagnje su očišćene od obraštaja i sedimenta te su raspoređene u devet aeriranih bazena tako da je u svakom bazenu bilo 30 dagnji. Svakoj je dagnji potrebno minimalno 0,75L morske vode kako bi preživjele tijekom 24h te je stoga svaki bazen napunjen s 22,5 L morske vode (slika 10., A). U prvom bazenu nalazila se kontrolna skupina dagnji koja nije bila tretirana dok su dagnje u preostalih osam bazena bile tretirane različitim koncentracijama i kombinacijama nanočestica srebra i insekticida permetrina. Kombinacije su sljedeće: A1, A2, P1, P2, A1P1, A2P2, A1P2, A2P1; pri čemu A1 (50 ppb; 50  $\mu\text{g/L}$ ) i A2 (5 ppb; 5  $\mu\text{g/L}$ ) označuju višu i nižu koncentraciju nanočestica srebra, dok P1 (100 ppb; 100  $\mu\text{g/L}$ ) i P2 (1 ppb; 1  $\mu\text{g/L}$ ) označuju višu i nižu koncentraciju insekticida permetrina. Dagnje su bile izložene toksikantu tijekom 24h. Nakon 24h dagnje su se izvadile iz bazena i postavile su se u devet polistirenskih kutija (slika 10., B). Tijekom idućih 30 dana broj umrlih i preživjelih dagnji svakodnevno se brojao u isto vrijeme.



Slika 10. A) Tretiranje dagnji raspoređenih u 9 bazena (kontrola, A1, A2, P1, P2, A1P1, A2P2, A1P2, A2P1); B) postavljanje dagnji u polistirenske kutije za izvedbu SOS testa

### 3.4. Određivanje stabilnost lizosomalne membrane

#### 3.4.1 Priprema radne otopine i neutralnog crvenila

Za pripremu radne otopine (Slika 11.) otopilo se 4.77g Hepes pufera, 25.48 g NaCl, 13.06g MgSO<sub>4</sub>, 0.75g KCl i 1.47g CaCl<sub>2</sub> u 1L destilirane vode. Boca se stavila na magnetsku miješalicu dok se svi kristali nisu otopili. Nakon otapanja kristala, otopina se aerirala 15 min. U međuvremenu se pripremila 1M otopina NaOH, te se zatim pH radne otopine prilagodila pomoću NaOH do pH 7.3 uz konstanto miješanje i provjeravanje pH vrijednosti pomoću digitalnog pH-metra. Pripremljenu otopinu trebalo je skladištiti na hladnom, ali prije uporabe radne otopine otopinu je bilo potrebno dovesti do sobne temperature.



Slika 11. Kemikalije potrebne za pripremu radne otopine.

Priprema štok otopine otapanjem 20 mg praha neutralnog crvenila sa 1 mL di-metil-sulfooksid (DMSO). Štok otopinu je potrebno svaki put svježu pripremiti prije analize. U Eppendorf tubicu se stavi 955  $\mu$ L radne otopine (koja je prethodno dovedena na sobnu temperaturu) i 5  $\mu$ L štok otopine neutralnog crvenila. Kad se ne koristi, neutralno crvenilo se skladišti na hladnom i u mraku jer je otopina fotosenzibilna, odnosno gubi svoja svojstva na svijetlu.

### 3.4.2 Određivanje stabilnosti lizosomalne membrane

Dagnje su otvarane na ventralnoj strani (Slika 7.), oprezno i pomoću škara, kako se ne bi oštetio mišić aduktor (slika 7.) te kako bi se izbjegnulo razlijevanje hemolimfe i lizosomalnih stanica. Dagnja se otvarala tek nekoliko milimetara koliko je potrebno za prolazak igle do mišića. Nakon otvaranja dagnje međuljuštarna tekućina se ocijedila i potom se hemolimfa uzela pomoću igle i šprice, dok je u šprici prethodno dodano 0.5mL radne tj. fiziološke otopine. Hemolimfa je uzeta iz mišića aduktora iz posteriornog dijela dagnje (slika 7.) koje su bile *in vivo* izložene toksikantu 24 sata. Za ispitivanje koristile su se tri dagnje po koncentraciji, a za svaku dagnju napravio se triplikat uzorka.

Izvađena hemolimfa stavljena je u silikoniziranu eppendorf tubicu, tretirana je sa sigmacote (SIGMA). Sigmacote djeluje kao silikonski zaštitni sloj koji sprječava lijepljenje lizosomalnih stanica iz hemolimfe na stjenku tubice. Na predmetno stakalce je stavljeno 2 $\mu$ L Poly-L-Lysina (SIGMA) i uz pomoć pokrovnog stakalca raširen je po predmetnom stakalcu. Predmetno stakalce je potom stavljen u vlažnu komoru 30 minuta na sušenje. Poly-L-Lysin omogućuje lijepljenje lizosomalnih stanica na predmetno stakalce. Na predmetno stakalce dodano je 40  $\mu$ L uzorka hemolimfe i predmetno stakalce je opet stavljeno u vlažnu komoru na 30 minuta kako bi se lizosomalne stanice mogle zalijepiti. Oprezno se ocijedio višak hemolimfe stavljajući stakalce u bočnu poziciju. Na uzorak dodano je 40  $\mu$ L neutralnog crvenila pritom pazeći da neutralno crvenilo dospije u svaki dio uzorka. Stakalce je odloženo u tamnu i vlažnu komoru na 15 minuta. Na predmetno stakalce postavljeno je pokrovno stakalce i uzorak se prvih sat vremena mikroskopirao svakih 15 minuta, a potom svakih 30 minuta iduća dva sata. Broj stanica koji se po tripletu brojao bio 100, a gledao se odnos između normalnih stanica i stanica koje su ispustile neutralno crvenilo. Cilj je odrediti vrijeme pri kojem 50% lizosoma u uzorku stanica otpušta neutralno crvenilo u citosol. Povećana stopa otpuštanja neutralnog crvenila iz lizosoma u citosol upućuje na veći stanični stres radi zagađenja i utjecaja toksikanta.

### 3.5 Određivanje aktivnosti enzima acetilkolinesteraze

Za određivanje aktivnosti enzima acetilkolinesteraze koristila su se 2 skupa uzorka dagnji. Prva skupina dagnji bila je kroz 24 sati *in vivo* izložena toksikantima, dok je druga *in vivo* bila izložena 48 sati. Za svaku koncentraciju koristile su se 3 dagnje, a za analizu aktivnosti enzima acetilkolinesteraze koristilo se tkivo škrge (slika 7.) i aktivnost enzima određena je prema Ellman-ovoj metodi. Dagnje su otvarane tako što im je prerezan mišić aduktor. Nakon otvaranja dagnji, izvađene su im škrge koje su potom stavljene u eppendorf tubicu i na temperaturu od -80°C.

Zaleđeno tkivo škrge ručno je homogenizirano u epruveti pomoću homogenizacijskog TRIS pufera (0.1M tris-hidroksimetil aminometan, pH 8, temp +4 °C) u omjeru 1:3. Homogenat škrge je centrifugiran na 10 000g, na +4°C u trajanju od 30 minuta. Supernatant je uzet pomoću pipete i prebačen u drugu eppendorf tubicu te je pohranjen na -80 °C.

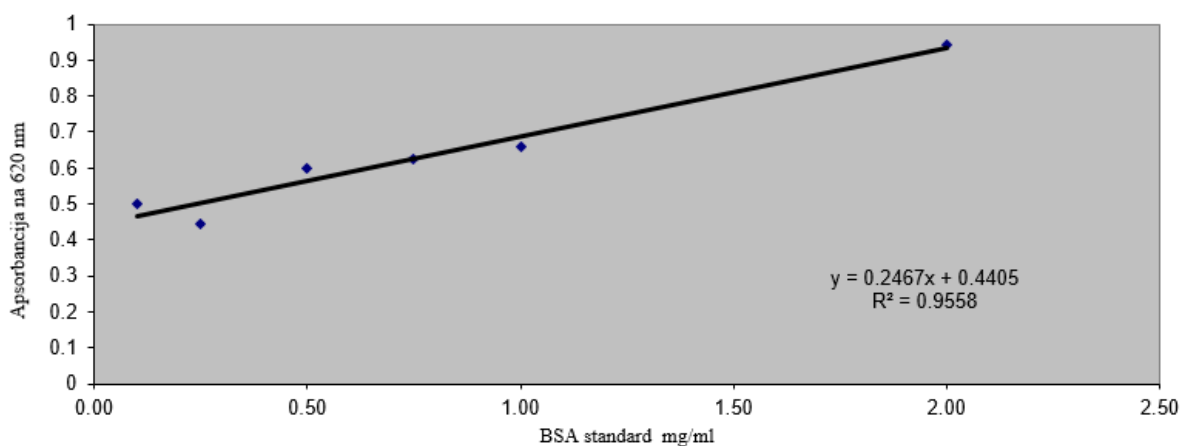
Aktivnosti enzima acetilkolinesteraze mjeri se u mikrotitratskim pločicama u koje je redom dodano 50μL uzorka, 200 μL Ellmanovog reagensa i na kraju 50 μL supstrata acetilkolina (ATC). Ukupni volumen reakcijske smjese je 300μL. U „BLANK“ jažicu nije dodan uzorak za ispitivanje nego je dodano 50μL pufera, dok je u svaku treću paralelnu jažicu dodan supstrat. Apsorbancija „BLANK“ jažice oduzima se od svih ostalih, a apsorbancija jažice u kojoj nema supstrata oduzima se uz „BLANK“ kod svih ostalih jažica koje imaju supstrat i ispitan uzorak. Apsorbancija je čitana na valnoj duljini od 405 nm. Aktivnost enzima acetilkolinesteraze određena je prema izrazu:

$$A_{ACnE} = \left( \frac{\Delta A}{min} \right) * V_{reakcijske\ smjese} * 1000 \frac{1}{\epsilon * d * V_{uzorka}}$$

$$(\epsilon = 13.3 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}, d = 1 \text{ cm})$$

### 3.5.1 Određivanje koncentracije proteina prema Bradfordu

Za određivanje koncentracije ukupnih proteina u tkivu škrge, za enzim acetilkolinesteraze, koristila se metoda prema Bradfordu. Metoda opisana prema Bradfordu (Bradford, 1976.) koristi se kvantitativno određivanje koristeći proteinom iz goveđeg seruma, albumin. Za izradu standardne krivulje koristio se albumin, a pripremljena je početna standardna otopina, s destiliranom vodom, koncentracije 2mg/ml. Standardna krivulja koristi se za određivanje koncentracije proteina u uzorku (slika 12.). Razrijeđenja BSA za izradu standardne otopine bila su: 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 i 2.0 mg/ml. U svaku jažicu dodano je 5μL svakog razrijeđenja, 5μL uzorka i 250μL Bradfordova reagensa. Mikrotitarska pločica je inkubirana 5 minuta u mraku. Nakon inkubacije mjerena je na valnoj duljini od 620 nm. Za određivanje koncentracije proteina u uzorcima acetilkolinesteraze razrijeđeni su 3 puta sa destiliranom vodom.

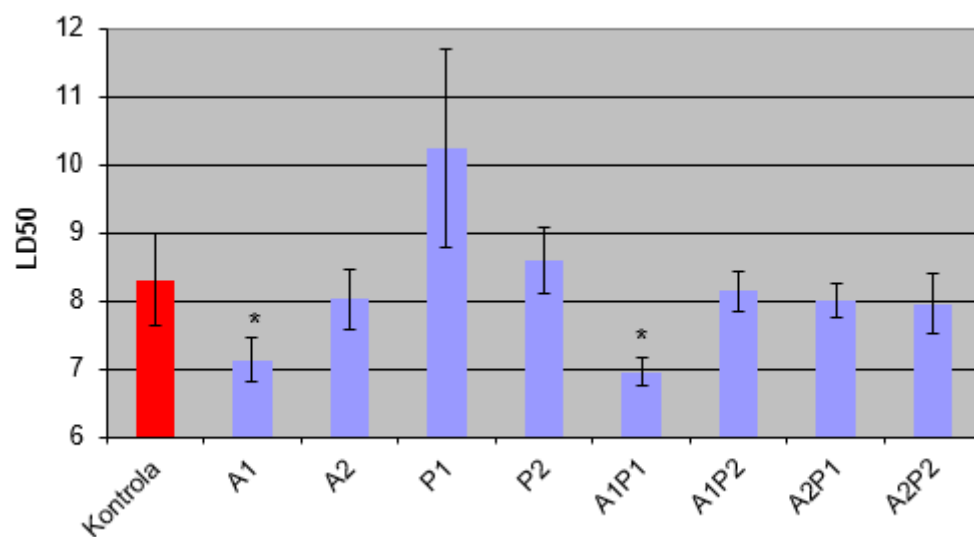


Slika 12. Standardna krivulja za određivanje koncentracije proteina prema Bradfordovoj metodi.

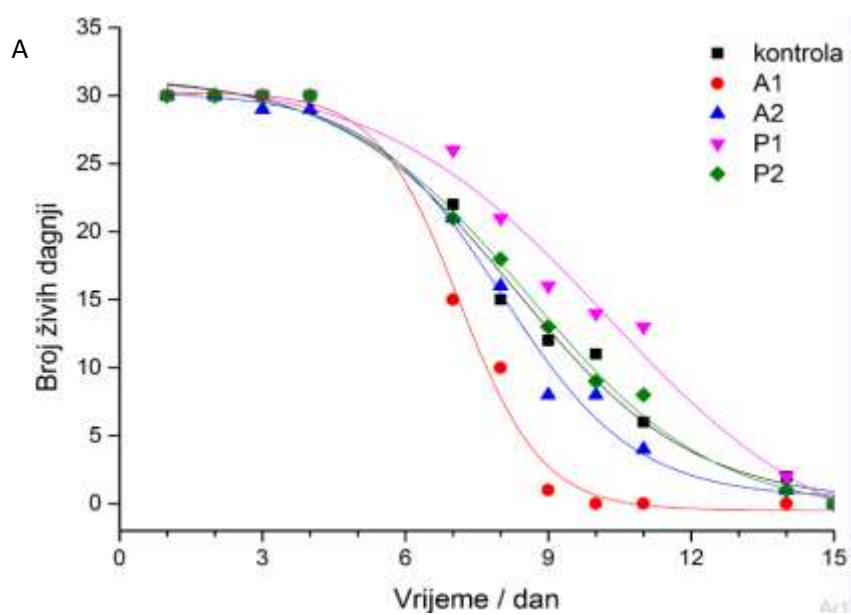
## 4. REZULTATI

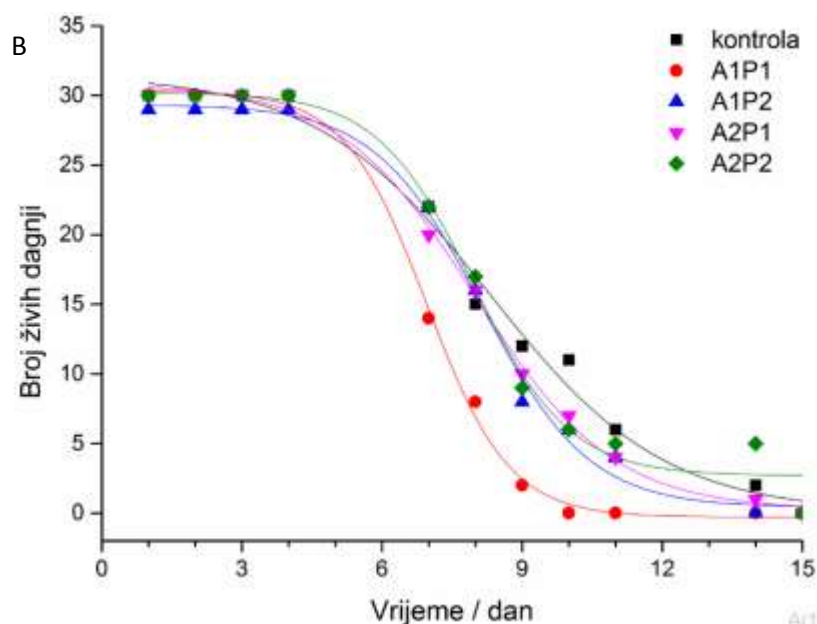
### 4.1 SOS test

Pratilo se preživljavanje tretiranih dagnji kroz 30 dana izloženosti zraku (stres na stres) . U rezultatima (Slika 13.) dvije ispitane skupine su se značajno razlikovale (interval pouzdanosti od 95%), a to su skupine A1 koja je tretirana nanočesticama srebra koncentracije 50 µg/l, skupina A1P1 tretirana sa 50 µg/l nanočesticama srebra i insekticidom permetrinom koncentracije 100 µg/l. Treća skupina koja se ističe je skupina tretirana permetrinom koncentracije 100 µg/l koja je pokazala najbolje preživljavanje od svih ispitivanih skupina. Slično preživljavanje od 8,5 dana, u odnosu na kontrolu ima skupina tretirana s koncentracijom permetrina 1µg/l (P2). Najduže preživljavanje od 10 dana, u odnosu na kontrolu registrirano je kod skupine tretirane koncentracijom P1. Skupine s nešto nižim preživljavanjem u odnosu na kontrolnu skupinu su redom: A1P2, A2, A2P1 i A2P2, a preživljavanje tih skupina je bilo 8 dana (Slika 14).



Slika 13. Grafički prikaz  $LT_{50}$ , SOS testa tretiranih dagnji *Mytilus galloprovincialis*. Skupine trenirane s koncentracijama A1 i A1P1 pokazuju značajne razlike u odnosu na kontrolu (\* intervala pouzdanosti od 95%).



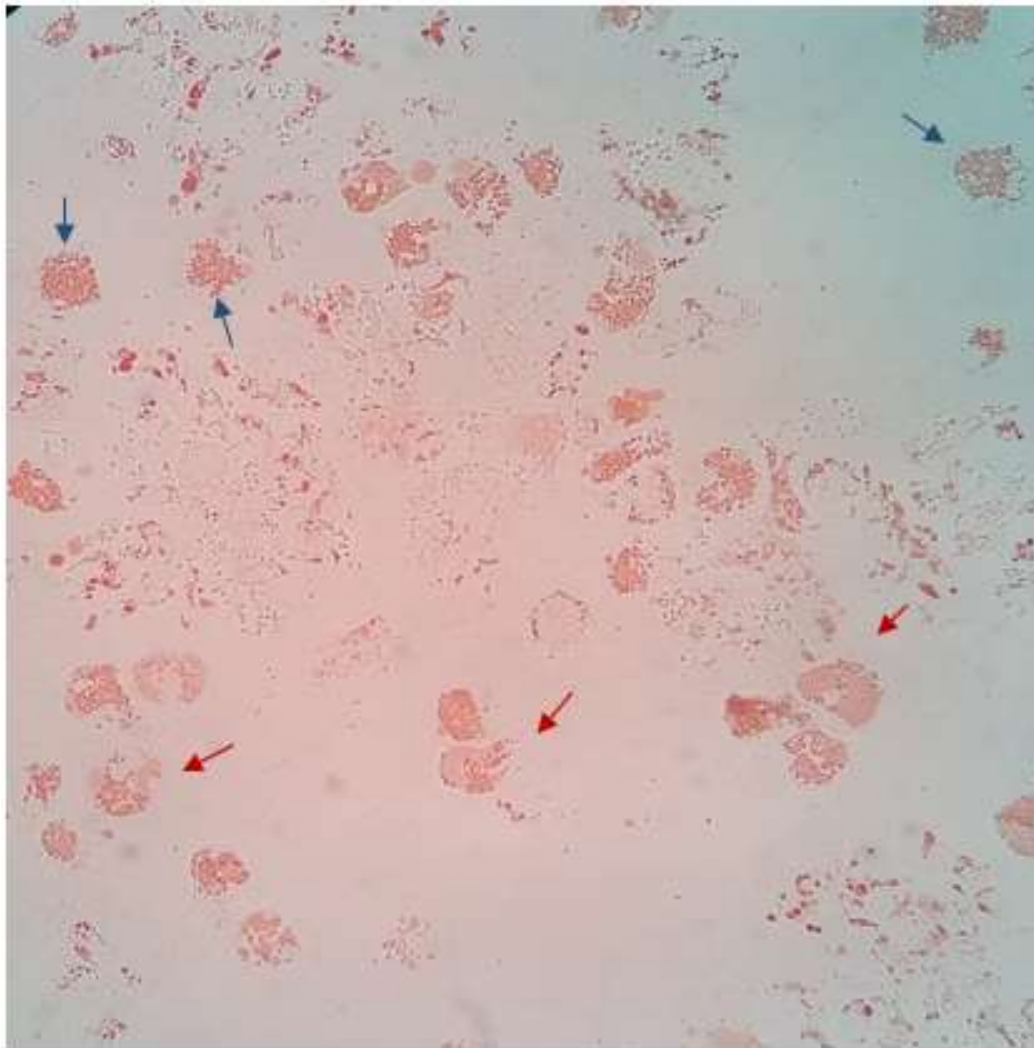


Slika 14. Preživljavanje dagnji *Mytilus galloprovincialis* na zraku u odnosu na vrijeme. Krivulja A prikazuje preživljavanje dagnji kontrolne skupine i dagnji tretiranih samo nanočesticama srebra ili insekticida permetrina, dok krivulja B prikazuje preživljavanje kontrolne skupine dagnji i onih tretiranih kombinacijama nanočestica srebra i permetrina.

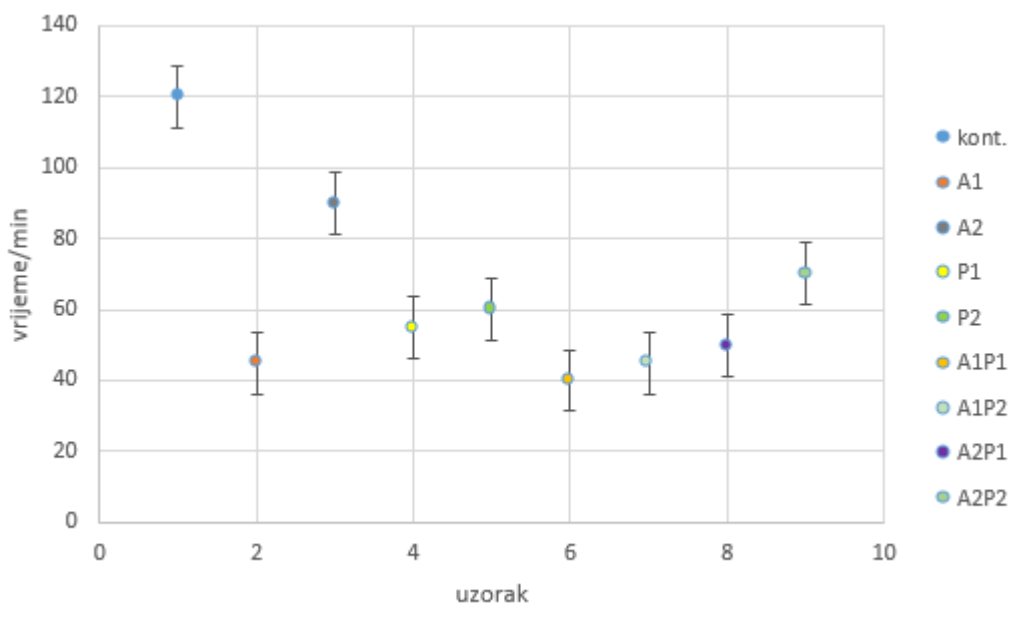
#### 4.2 Stabilnost lizosomalne membrane

Rezultati stabilnost lizosomalne membrane iz hemolimfe dagnje dobivene brojanjem stanica koje su otpustile neutralno crvenilo iz lizosomalnih stanica u citosol (Slika 15.) prikazani su na Slici 16.

Otpuštanje neutralnog crvenila u citosol iz stanice kod kontrole iznosi 120 minuta. Dobivene vrijednosti pokazuju da najveću stabilnost stanica imaju dagnje koje su bile tretirane nanočesticama srebra koncentracije A2, odnosno 5  $\mu\text{g/l}$ . Najmanju stabilnost lizosomalne membrane imaju dagnje tretirane kombinacijom A1P1 (koncentracija permetrina od 100  $\mu\text{g/l}$  i nanočestica srebra 50  $\mu\text{g/l}$ ) i vrijeme stabilnosti je 40 minuta. Zatim slijede dagnje tretirane A1 (koncentracija nanočestica srebra 50  $\mu\text{g/l}$ ) i A1P2 (koncentracija nanočestica srebra 50  $\mu\text{g/l}$ ; koncentracija permetrina 1  $\mu\text{g/l}$ ). Razmatrajući koncentraciju, najduži labilizacijski period imaju dagnje tretirane koncentracijom A2 koji iznosi 90 minuta.



Slika 15. Obojani hemociti hemolimfe dagnje *Mytilus galloprovincialis* . Prikaz kompromiranih stanica i otpuštanje neutralnog crvenila u citosol. Crvenim strijelicama su označene stanice koje su otpustile neutralno crvenilo iz stanice, a plavim strelicima su označene stabilne stanice.



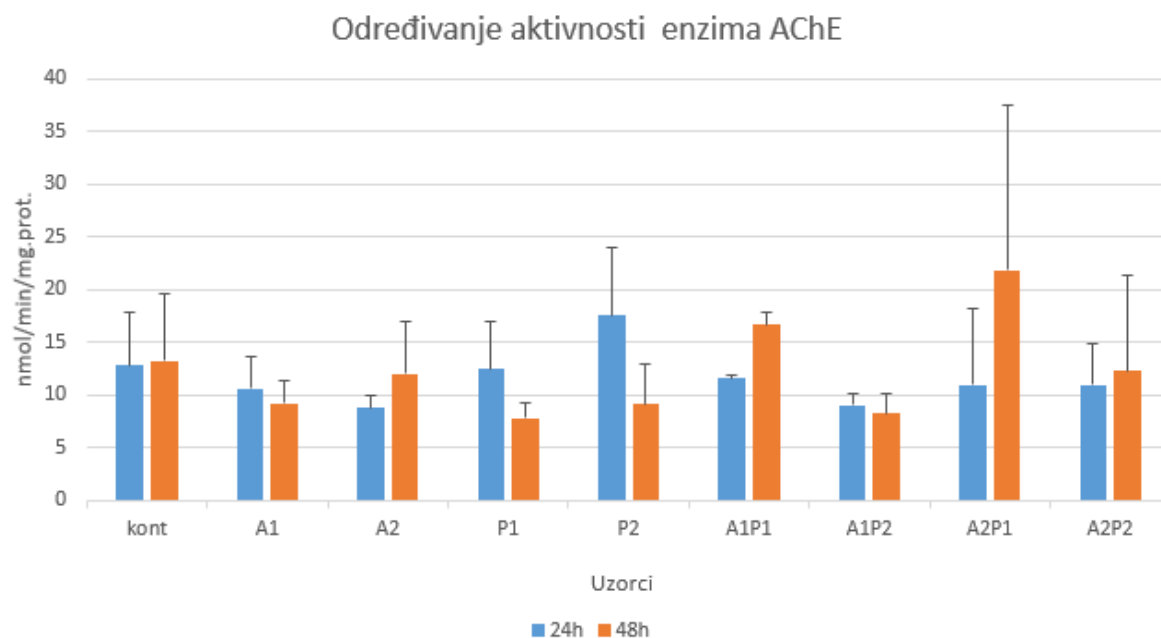
Slika 16. Vrijeme otpuštanja (labilizacijski period) neutralnog crvenila iz stanice u citosol dagnje *Mytilus galloprovincialis* po koncentracijama nanočestica srebra (5 ili 50  $\mu\text{g/L}$ ), permetrina (1 ili 100  $\mu\text{g/L}$ ) i kombinacijama.

#### 4.3 Određivanje aktivnosti enzima acetilkolinesteraze

Aktivnost enzima acetyl kolinesteraze u vremenu po količini proteina za kontrolu je  $12,85 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg.prot}^{-1}$ . Kod izlaganja dagnji toksikantima tijekom 24 sata vidi se najveća aktivnost enzima u vremenu po količini proteina kod koncentracije P2, dok je najmanja aktivnost enzima pri koncentracijama A1 i A1P2. Aktivnost enzima u vremenu po količini proteina za koncentraciju P2 iznosi  $17,53 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg.prot}^{-1}$ , za koncentraciju A1 iznosi  $10,67 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg.prot}^{-1}$ , a za koncentraciju A1P2 je  $9,05 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg.prot}^{-1}$ . Aktivnost enzima u vremenu po količini proteina koja je najbližnja kontroli je kod dagnji tretiranih P1 i A1P1. Aktivnost enzima kod dagnji tretiranih koncentracijom P1 iznosi  $12,63 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg.prot}^{-1}$ , a za koncentraciju A1P1 je  $11,57 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg.prot}^{-1}$ .

Nakon izlaganja dagnji toksikantima tijekom 48 sati aktivnost enzima u vremenu po količini proteina za kontrolu iznosi  $13,28 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg.prot}^{-1}$  a vidi se najveća aktivnost enzima kod koncentracije A2P1 dok je najmanja pri koncentracijama P1 i A1P2 (Slika 17.). Aktivnost enzima u dagnji izlaganim koncentraciji A2P1 je  $21,85 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg.prot}^{-1}$ ; za P1 iznosi  $7,83 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg.prot}^{-1}$ , a za koncentraciju A1P2 iznosi  $8,23 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg.prot}^{-1}$ . Za uzorke tretiranih dagnji koncentracijama A2 i A2P2 enzimatska aktivnost je najbližnja

kontroli, a iznose  $12,07 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg.prot}^{-1}$  za koncentraciju A2 i  $12,28 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg.prot}^{-1}$  za koncentraciju A2P2.



Slika 17. Izmjerene aktivnosti enzima po količini proteina u tkivu škrga dagnje *Mytilus galloprovincialis* nakon izloženosti toksikantima tijekom 24 i 48 sati.

## 5. DISKUSIJA

Dagnje su u svojem litoralnom staništu na prvoj liniji izloženosti onečišćenju koji dolazi s kopna, kao što su na primjer ispiranje voda s poljoprivrednih površina (pesticidi i umjetna gnojiva), a i prve koje se „bore“ s visokim koncentracijama onečišćivala prije nego što dođe do razrjeđivanja u moru. Kod bentonskih organizama kao *Mytilus galloprovincialis*, koji nastanjuje medio- i gornji dio infra- litorala postoji potencijalni rizik direktnog kontakta ili ingestije kontaminirane suspendirane tvari i česticama sedimenta koje dolaze s kopna (Ayad i sur, 2011.).

Organizmi koji se hrane filtriranjem mogu koncentrirati kemikalije u svom tkivu i do tisuću puta više od koncentracija u vodenom stupcu. (Donkin i sur., 1997.). *Mytilus spp.* su ciljana skupina organizama za procjenu toksičnosti nanočestica zbog njihovog kapaciteta da filtriraju veliki volumen vode i akumuliraju partikularnu tvar i ksenobiotike koje se distribuiraju kroz njihova tkiva i stanične komponente (Gomes i sur., 2014.). Kao filtratorski organizmi, školjkaši imaju sposobnost da prenose nanočestice kroz organe i stanice, gdje se hvatanje i gutanje (ingestija) smatraju glavnim putevima unutarnjeg izlaganja. Jednom izložena, stanica će unijeti nanočestice fagocitozom, pinocitozom, endocitozom i direktnom penetracijom ili kroz ionske kanale, ovisno o veličini čestice (Gomes i sur., 2013.). Dva mehanizam mogu se desiti istovremeno što može rezultirati sinergističkim učincima (npr. endocitoza i transport kroz ionski kanal) (Ale i sur., 2019.).

Preživljavanje na zraku ili stres na stres test („SOS“ test), je pokazatelj općeg učinka stresa na razini cijelog organizma, a dagnje izložene onečišćenju ugibaju na zraku mnogo brže od onih koje nisu izložene (Ayad i sur., 2011.). Iz rezultata se može zaključiti da nanočestice srebra mogu imati toksične učinke na dagnje na razini cijele jedinke. Kod rezultata dobivenih proučavanjem djelovanja insekticida permetrina na dagnje pokazuju različite, suprotne i nejasne učinke od onih uzrokovanih nanočesticama srebra.

Tijekom izvedbe SOS testa, učinak nanočestica srebra na preživljavanje dagnji vidljiv je kod visoke koncentracije i kod kombinacije s visokom koncentracijom permetrina. Suprotno tome, dagnje tretirane najvišom koncentracijom insekticida permetrina imaju najbolje preživljavanje, dok se preživljavanje tretiranih dagnji nižom koncentracijom permetrina ne razlikuje bitno od preživljavanja kontrolnih jedinki. Kod skupine dagnji tretiranih niskom koncentracijom nanočesticama srebra i ostale tri skupine koje su tretirane kombinacijom nanočestica srebra i permetrina, ne vidi se velika razlika u preživljavanju. Stoga se može

pretpostaviti da permetrin koncentracije 1 µg/l nema značajne toksične učinke na razini cijele jedinke tj. utjecaj na opće zdravlje jedinke. Veće preživljavanje jedinki tretiranih s visokom koncentracijom permetrina, u odnosu na preživljavanje jedinki tretiranih niskom koncentracijom permetrina, može upućivati na to da dagnje pri visokim koncentracijama razvijaju obrambene mehanizme zaštite ili da SOS test nije dovoljno osjetljiv na utjecaje permetrina.

Ayad i sur. (2011.) istraživali su učinke piretroidnog insekticida (Cypermetrin) na aktivnost zatvaranja ljuštura, formaciju bisusnih niti i preživljavanje na zraku kod dagnje *Mytilus galloprovincialis*. Dagnje su tijekom 24 sata bile izložene toksikantu, bile su tretirane koncentracijama 50, 100, 200, 400 i 800 µg/l. SOS test pokazao je da ove koncentracije nisu bile toksične za *Mytilus galloprovincialis*. Kod svih ispitivanih koncentracija varijacije u preživljavanju bile su vrlo male, čak i pri visokim subletalnim dozama. Dokazano je da Piretroidni insekticid utječe na aktivnost zatvaranja ljuštura, a učinak je bio vidljiv s duljim vremenom izlaganja pri nižim koncentracijama ili pri kraćim vremenom izlaganja i većim koncentracijama. Formiranje bisusnih niti je mjerilo metaboličke aktivnosti i fiziološkog stanja školjkaša, a rezultati pokazuju da je sposobnost *Mytilus galloprovincialis* za stvaranjem novih bisusnih niti smanjena kod svih koncentracija, posebno pri visokim koncentracijama (Ait Ayad i sur., 2011).

Gowland i sur. (2002.) ispitivali su isti insekticid za preživljavanje *Mytilus edulis*. Rezultati su pokazali da visoke doze cypermetrina, čak i pri 1000 µg/l i izloženosti tijekom 16 dana toksikantu, nisu značajno utjecali na preživljavanje *Mytilus edulis*. Cypermetrin također nije utjecao na stabilnost lizosomalne membrane i zadržavanje neutralnog crvenila, što upućuje da piretrodini insekticidi nemaju akutnu citotoksičnost (Gowland i sur., 2002). U usporedbi s rezultatima stabilnosti lizosomalne membrane ovog završnog rada, može se pretpostaviti da u prisutnosti nanočestica srebra permetrin povećava svoju toksičnost u stanicama. Također, ispitivanje općeg fiziološkog zdravlja dagnji putem SOS testa pokazalo je da dagnje nisu toliko osjetljive za ispitivani pesticid. Za ispitivanje opće homeostaze dagnji mogli bi se koristiti neki drugi parametri za procjenu stanja, kao na primjer stvaranje bisusnih niti.

Škrge su primarni organ za respiraciju i digestiju, filtriranjem vode sekundarno sudjeluju u obrani tijela i stanica od utjecaja ksenobitika (Ale i sur., 2019.), u izravnom su kontaktu s nanočesticama srebra ili s Ag<sup>+</sup>, što ih čini podložnijim oksidacijskom stresu i posljedično oksidacijskim oštećenjima (Gomes i sur., 2014.). Nakon izlaganja školjkaša nanočesticama srebra u kratkom vremenu ili nakon kroničnog izlaganja uočeno je nekoliko štetnih učinaka.

Uočena je destabilizacija lizosomalne membrane uzrokovana interakcijom  $\text{Ag}^+$  iona sa fosfolipidnim dvoslojem, fagocitoza, oksiradikalna produkcija, oštećenje DNA i apoptoza, disfunkcija hemocita (Ale i sur., 2019.), točkaste mutacije, kromosomske fragmentacije, i prekomjerna proizvodnja ROS-ova (Gomes i sur., 2013.).

Nanočestice unesene u tijelo filtracijom kroz škrge tijekom hranjenja, nakupljaju se u probavnoj žlijezdi i djelomično se transportiraju u hemolimfu, što može utjecati na obrambene funkcije i imunitet školjkaša (Ale i sur., 2019.). Nanočestice utječu na veliki broj funkcionalnih parametara u hemocitima *Mytilus galloprovincialis* od lizosomalne funkcije do fagocitotne aktivnosti (Canesi i Procházková, 2014.). Lizosomalni sustav je stanična komponenta koja je vrlo osjetljiva na prisutnost zagađenja, a važnost lizosoma leži u degradacijskoj ulozi staničnih i vanstaničnih makromolekula pomoću hidrolitičkih enzima (proteaze, lipaze, nukleaze, fosfataze). Oštećenja lizosoma često uključuje gubitak i destabilizaciju cijelovitosti njegovih membrana, što dovodi do funkcionalnih promjena i na kraju oslobađanja hidrolitičkih enzima u citosol te stanične nekroze. Negativna posljedica promjena u lizosomima je poremećaj intracelularne probave, koja brzo utječe i na prehrambeni (metabolički) sustav stanice i cjelokupnog organizma (UNEP, 1999.). Pretpostavlja se da se kod filtratorskih organizama događa izvanstanično otapanje AgNP, popraćeno unosom i digestijom u kiselu endosomalnu ili lizosomalnu sredinu te oslobađanje slobodnih  $\text{Ag}^+$  toksičnih iona u lizosomu (Ale i sur., 2019.).

Kod ispitivanja stabilnosti lizosomane membrane jasno se vide razlike ispuštanja neutralnog crvenila iz stanice u citosol kod hemolimfe dagnji tretiranih nanočesticama srebra visoke i niske koncentracije. Stabilnost lizosomalne membrane kod visoke koncentracije (A1) iznosi 45 minuta, dok je kod niske (A2) 90 minuta. Dagnje tretirane koncentracijama permetrina P1 i P2 stabilnosti su slične i iznose 55 minuta za koncentraciju P1, a za P2 60 minuta. Za kombinacije A1P1 (40 minuta), A2P1 (45 minuta) i A1P2 (50 minuta) može se pretpostaviti da nanočestice srebra i permetrina imaju sinergističke učinke ili da prisutnost jednog toksikanta povećava toksičan učinak drugog.

Franzellitti i sur. (2010.) ispitivali su vrijeme potrebno za razvoj sindroma stresa kod dagnji tijekom izlaganja u zagađenoj laguni. Dagnje *Mytilus galloprovincialis* su bile u zagađenom (teški metali, PAH, PCB, PVC) području u Italiji, obalna laguna Pialassa Baiona. Dagnje su izložene zagađenju u periodu od 2, 4, 7, 14 i 30 dana. Kod dagnji izloženih 2, 4 i 7 dana nisu uočene velike razlike u odnosu na neizložene jedinke (vrijeme stabilnosti lizosomalne membrane bilo je 25 minuta). Velike promjene u stabilnosti lizosomalne membrane

primijećene su kod dagnji koje su izložene 14 do 30 dana gdje je vrijeme zadržavanja neutralnog crvenila u hemocitama reducirana na 10 minuta. Smanjenje stabilnosti lizosomalne membrane upućuje na pogoršano zdravstveno stanje jedinki. Uočili su korelaciju između stabilnosti lizosomalne membrane i drugih odgovora na stres; smanjenjem stabilnosti povećala se akumulacija lipofuscina i količina metalotioneina. Biomarkeri su pokazali konstantan trend s povećanjem trajanja izloženosti. Iako su dagnje iznimno tolerantne na temperaturne promjene, temperatura može drastično utjecati na metabolizam enzimatiku aktivnost, na fiziologiju cijelog organizma, rast, stopu filtracije, apsorpciju hrane, preživljavanje, razmnožavanje, distribuciju i abundanciju vrste (Franzellitti i sur., 2010.). Vrijeme i uspješnost reprodukcije usko su vezani za temperaturu i dostupnost hrane. Kad je toplije, dagnje ulažu manje energije u reprodukciju te je manje energije potrebno za fiziološku obranu organizma.

Domouhtsidou i sur. (2004.) zaključili su da ekstremni fiziko kemijski uvjeti kao što je temperaturni stres, hipoksija, razdoblje gladi i niži salinitet mogu utjecati na vrijednosti stabilnosti lizosomalne membrane, kao i prirodni čimbenici hormonske regulacije tijekom reproduktivnog ciklusa. U znanstvenom radu ispitivali su učinke teških metala Cd, Zn, Cu i Pb na dagnjama koje su sakupljene u listopadu i lipnju na 6 različitih lokacija. Većina teških metala je pokazala povećanu akumulaciju u lipnju u odnosu na listopad, te su također uočene sezonske fluktuacije kod stabilnosti lizosomalne membrane s manjim vrijednostima u listopadu. Sezonske promjene parametara mogu utjecati na promjene u biološkoj i lizosomalnoj aktivnosti koje su povezane s povećanjem fitoplanktona u lipnju, ali mogu biti i rezultat reorganizacije unutarnjih stanica i tkiva tijekom ili nakon mrijesta.

Duroudier i sur. (2021.) također su ispitivali stabilnost lizosomalne membrane u različitim sezonama. Za istraživanje koristila se probavna žlijezda *Mytilus galloprovincialis*. Dagnje su hranjene tretiranim makroalgama nanočesticama srebra koncentracije 1 µg/l (u proljeće) i 10 µg/l (u proljeće i jesen). U istraživanju primijećeno je da u proljeće i jesen akumulacija srebra bila je značajna, ali veća akumulacija srebra zabilježena je u jesen. Ove razlike mogu biti zbog fizioloških promjena, promjena temperature, količine hrane i saliniteta. Manje akumuliranog srebra mogu biti povezano s povećanjem mase dagnji tijekom razvoja gameta koji se dogodio u proljeće. Promjene u stabilnosti lizosomalne membrane bile su značajne u proljeće i jesen pri koncentraciji od 10 µg/l. Pri koncentraciji od 1 µg/l u odnosu na kontrolu u proljeće nisu uočili značajne promjene iako je primijećen trend smanjenja stabilnosti

lizosmalne membrane što dokazuje da niske koncentracije također mogu utjecati na opće zdravstveno stanje dagnji.

Točan mehanizam djelovanja pesticida još treba razjasniti, ali mehanizam njegovog utjecaja na insekte može pružiti korisne informacije (Donkin i sur., 1997.). Permetrin ima inhibirajući učinak na aktivnost aceti lkolinesteraze (AChE), potiče ionski protok membrane i igra ključnu ulogu u neuronskom procesu (Sellami i sur., 2012.). Toksični učinak permetrina je preko naponskog natrijskog ionskog kanala, koji je esencijalan za transmisiju signala kroz živčane stanice (Donkin i sur., 1997.) i neuralnoj membrani kao ciljnom mjestu djelovanja (Ayad i sur., 2011.). Držanje naponskog natrijskog ionskog kanala otvorenim, uzrokuje depolarizaciju membrane, sinaptičke smetnje, ponavljajuće ispuštanje što dovodi do pretjerane stimulacije. Ti mehanizmi djelovanja mogu biti početne točke razumijevanja učinka permetrina na zatvaranje ljuštura. Učinci kao i postupni odgovor dagnji na toksični stres ovise o koncentraciji toksikanta (Ayad i sur., 2011.). Prijašnja su istraživanja pokazala da izloženost permetrinu potiče oksidativni stres kod dagnji (Khazri i sur., 2015.), kao i toksičnost koja se očituje u aktivnosti hranjenja kod dagnji, za što je potrebna minimalna količina permetrina da prouzroči narkotične učinke kod hranjenja (Donkin i sur., 1997.).

Rezultati ispitivanja aktivnosti acetil kolinesteraze bilježe povećanje aktivnost enzima kod skupine tretiranih permetrinom niže (1 µg/l) i više koncentracije (100 µg/l) tijekom 24 sata, uz smanjenje aktivnosti enzima tretiranih dagnji nakon 48 sati. Povećana aktivnost nakon izlaganja tijekom 48 sati, u odnosu na izlaganje tijekom 24 sata, vidi se kod skupina tretiranih kombinacijama A2P1 (5 mg/l AgNP i 100 mg/l permetrina), A2P2 (5 mg/l AgNP i 1 mg/l permetrina) i nižom koncentracijom srebra A2 (5 mg/l). Oba obrasca ponašanja aktivnosti enzima mogu ukazivati na toksičnost, odnosno uzrokuju poremećaj u ravnoteži enzimske aktivnosti. Inhibicija aktivnosti enzima acetil kolinesteraze upućuje na veću toksičnost, te predstavlja klasičan odgovor na učinak toksikanta. Organizam reagira na toksikant na način da sprječava inhibiciju enzima. Promjene u enzimskoj aktivnosti mogu biti posljedica promjena u abiotičkim i biotičkim parametrima, sezonske promjene, količini dostupne hrane ili može biti povezana s godišnjim reproduktivnim ciklusom dagnji.

Sellami i sur. (2014.) su u istraživanju djelovanje permetrina na inhibiciju aktivnosti enzima acetil kolinesteraze. Istraživanje se provodilo na školjkašu *Ruditapes decussatus* koji je bio izložen permetrinu koncentracijama 50, 100 i 150 µg/l u razdoblju od 5, 10, 15, 20 i 25 dana. Značajne razlike u inhibiciji enzima uočene su nakon 10 dana izloženosti koncentracijama od 100 i 150 µg/l. Maksimalna inhibicija bila je uočena nakon izlaganja od 25 dana kod najveće

koncentracije. Permetrin inducira oksidativni stres, a inhibira aktivnost enzima acetil kolinesteraze (Sellami i sur., 2014.). Enzim acetil kolinesteraza hidrolizira neurotransmiter acetilkolin u kolinergičnoj sinapsi centralnog i perifernog živčanog sustava (Sturm i sur, 2007.), inhibicija enzima acetil kolinesteraze je biomarker ranog odgovora na ekološki rizik (Dellali i sur., 2004). Permetrin može promijeniti obrasce ponašanja biomarkera. Kod njegovog preuzimanja iz okoliša može se ponašati na dva načina u organizmu; može uzrokovati male promjene pri niskim koncentracijama ili velike učinke pri višim koncentracijama (Sellami i sur., 2014). U njihovoj studiji zaključili su da učinci permetrina na aktivnost acetil kolinesteraze ovisi o vremenu izloženosti. Zabilježeno je da permetrin ima sposobnost vezanja na čestice u vodi i u sedimentu koji povećavaju njegovu biodostupnost (Sellami i sur., 2014.). U ispitivanju odgovora acetil kolinesteraze u dagnji *Mytilus galloprovincialis*, Perić i sur. (2017.) određivali su učinke klorpirifosa (CHP, koncentracije: 0,03, 0,1, 5, 10 i 100 µg/L), benzopirena (0,01, 0,5, 1, 10, 100 µg/L), Cd (0,2, 1, 2,5, 10, 100 i 200 µg/L) i Cu (0,2, 2, 10, 15, 20, 50 i 100 µg/L). Rezultati su pokazali da su se svi kontaminanti akumulirali u probavnoj žlijezdi dagnje. Uočena je inhibicija aktivnosti enzima acetil kolinesteraze pri koncentraciji CHP 0,1 µg/L, što upućuje na osjetljivost biomarkera kod izloženosti dagnji klorpirifosu. Inhibicijski učinci na aktivnost enzima acetil kolinesteraze uočeni su i kod bakra pri koncentracijama od 15 i 100 µg/L. Rezultati su pokazali da učinci benzopirena i Cd nemaju inhibirajuće učinke na aktivnost enzima acetil kolinesteraze. Nedostatak odgovora aktivnosti enzima na benzopiren, autori su objasnili neodgovarajućim izabranim tkivom ili uvjetima izloženosti, a nedostatak odgovora/rezultata kod Cd objašnjava se kao rezultat detoksikacijskih mehanizama metalotioneina (Perić i sur., 2017.).

## 6. ZAKLJUČAK

Uslijed sve veće upotrebe pesticida u obalnim i priobalnim područjima te eksponencijalnom proizvodnjom i upotrebom nanočestica, njihov utjecaj na okoliš i morske ekosustave ostaje nepoznat, kao i mehanizmi djelovanja na organizme. Ovaj rad ispituje toksične učinke insekticida permetrina u prisustvu nanočestica srebra različitih koncentracija i kombinacija na mediteransku dagnju *Mytilus galloprovincialis*. Procjena toksičnih učinaka provodila se na razini općeg zdravlja jedinki (SOS test), na razini stanica (stabilnost lizosomalne membrane) i reakcija unutar stanica (aktivnost enzima acetilkolinesteraze). Rezultati SOS testa upućuju na toksično djelovanje nanočestica srebra, dok permetrin pospješuje preživljavanje dagnji izloženih zraku. Rezultati dobiveni ispitivanjem stabilnosti lizosomalne membrane pokazuju da nanočestice srebra i permetrin uzrokuju promjene u stabilnosti. Bitno je napomenuti da drugi biotički i abiotički faktori mogu utjecati na stabilnost lizosomalne membrane, te da mogu djelovati sinergistički iako je teško definirati utjecaj na promjene u lizosomima. Kod određivanja aktivnosti enzima acetilkolinesteraze uočeno je povećana aktivnost tijekom izlaganja od 24 sata, te smanjena kod izlaganja tijekom 48 sati. Prisutan je i obrnuti trend, smanjena aktivnost tijekom izlaganja od 24 sata i povećanje aktivnosti kod izlaganja 48 sati. Oba ponašanja aktivnosti enzima mogu predstavljati toksičnost. Inhibicija aktivnosti enzima acetilkolinesteraze predstavlja klasičan odgovor na učinak toksikanta. Promjene u enzimskoj aktivnosti mogu biti posljedica promjena u abiotičkim i biotičkim parametrima, sezoni, količini dostupne hrane ili može biti povezana s godišnjim i reproduktivnim ciklusom dagnji, što je bitno uzeti u obzir tijekom budućih istraživanja.

## 7. LITERATURA

Ait Ayad, M., Ait Fdil, M., Mouabad, A. (2011.) Effects of Cypermethrin (Pyrethroid Insecticide) on the Valve Activity Behavior, Byssal Thread Formation, and Survival in Air of the Marine Mussel *Mytilus galloprovincialis*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 60:462–470.

Ale, A., Liberatori, G., Vannuccini, M.L., Bergami, E., Ancora, S., Mariott, G., Bianchi, N., Galdopórpora, J.M., Desimone, M.F, Cazenave, J., Corsi, I. (2019.) Exposure to a nanosilver-enabled consumer product results in similar accumulation and toxicity of silver nanoparticles in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. Aquatic Toxicology 211, 46-56.

Bloemen, M. (2015.) Immunomagnetic separation of bacteria by iron oxide nanoparticles. (PhD thesis) KU Leuven – Faculty of Sciences.

Canesi, L., Procházková, P. (2014.) The Invertebrate Immune System as a Model for Investigating the Environmental Impact of Nanoparticles. Invertebrate Immunity and Nanoparticles, 91:112.

David, J.P., Ismail, H.M., Chandor-Proust, A., Paine, M.J. (2013.) Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth. Philosophical Transactions of the Royal Society; London, B: Biological Sciences. 368 (1612): 20120429.

DeLorenzo, M.E, Fulton, M.H (2012.) Comparative risk assessment of permethrin, chlorothalonil, and diuron to coastal aquatic species. Marine Pollution Bulletin 64, 1291-1299.

Dellali, M., Roméo, M., Gnassia-Barelli, M., Aissa, P. (2004.) A multivariate 298 data analysis of the clam *Ruditapes decussatus* as sentinel organism of the Bizerta lagoon (Tunisia). Water, Air and Soil Pollution 156(1): 131-144.

Domouhtsidou, G. P., Dailianis, S., Kaloyianni, M., Dimitriadis, V. K. (2004.) Lysosomal membrane stability and methallothionein content in *Mytilus galloprovincialis* (L.), as biomarkers Combination with trace metal concentrations. Marine Pollution Bulletin 48, 572-586.

Donkin, P., Widdows, J., Evans, S.V., Staff, F.J, Yan, T. (1997.): Effect of Neurotoxic Pesticides on the Feeding Rate of Marine Mussels (*Mytilus edulis*). Pesticide Science, 49, 196-209.

Duroudier, N., Katsumiti, A., Mikolaczyk, M., Schäfer, J., Bilbao, E., Cajaraville, M.P (2021.) Cell and tissue level responses in mussels *Mytilus galloprovincialis* dietarily exposed to PVP/PEI coated Ag nanoparticles at two seasons. Science of the Total Environment 750 141303.

EU Commission (2012.), Assessment Report, Evaluation of active substances related to regulation (EU) 528/2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products.

Firth, D.C, O'Neil, B., Salie, K., Hoffman, L.C. (2019.) Monitoring of organic pollutants in *Choromytilus meridionalis* and *Mytilus galloprovincialis* from aquaculture facilities in Saldanha Bay, South Africa. Marine Pollution Bulletin 149, 110637.

Franzellitti, S., Buratti, S., Donnini, F., Fabbri, E., (2010.) Exposure of mussels to a polluted environment: Insights into the stress syndrome development. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 152, 24 – 33.

Gaitán, E., Juan, D., Quintero, G.J, Mesas, A., D'Elía, G. (2016.) Mitogenomics of southern hemisphere blue mussels (Bivalvia: Pteriomorpha): Insights into the evolutionary characteristics of the *Mytilus edulis* complex. Scientific Reports. 6. 1-10.

Gambardella, C., Costa, E., Piazza, V., Fabbrocini, A., Magi, E., Faimali, M., Garaventa, F. (2015.) Effect of silver nanoparticles on marine organisms belonging to different trophic levels. Marine Environmental Research 111, 41-49.

Gomes, T., Araújo, O., Pereira, R., Almeida, A.C., Cravo, A., Bebianno, M.J (2013.) Genotoxicity of copper oxide and silver nanoparticles in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Marine Environmental Research 84, 51-59.

Gomes, T., Pereira, C.G., Cardoso, C., Sousa, V.S., Teixeira, M.R., Pinheiro, J.P, Bebianno, M.J (2014.) Effects of silver nanoparticles exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Marine Environmental Research, volume 101, 208-214.

- Gosling, E. M. (1992.) Systematics and geographic distribution of *Mytilus*. In: Gosling, E. M. (ed.) *The Mussel Mytilus: Ecology, Physiology, Genetics and Culture Developments in Aquaculture and Fisheries*. Elsevier, Amsterdam. 1–20 pp.
- Gowland, B., Webster, L., Fryer, R., Davies, I., Moffati, C., Stagg, R. (2002.) Uptake and effects of the cypermethrin-containing sea lice treatment Excis in marine mussel, *Mytilus edulis*. *Environ. Pollut.* 120:805-811.
- Green, A. (2014.) Invasive species report, University of Washington
- Griffiths C. L., Hockey P. A. R., van Erkom Schurink C., Le Roux P. J. (1992.) Marine invasive aliens on South African shores: Implications for community structure and trophic functioning. *South African Journal of Marine Science* 12, 713–722.
- Harp, P.R, Gammon, W. (2014.) Permethrin. FMC Corporation, Agricultural Chemicals Group, volume 3, pp 358–360, 2005, Elsevier Inc.
- Hockey C. L., van Erkom Schurink C. (1992.) The invasive biology of the mussel *Mytilus galloprovincialis* on the southern African coast. *Transactions of the Royal Society of South Africa* 48, 123–139.
- Hui, Z., Wang, H., Liao, L., Feng, Y., Fan, X., Zhang, L., Chen, S. (2018.) Kinetics and Novel Degradation Pathway of Permethrin in *Acinetobacter baumannii* ZH-14. *Frontiers in Microbiology*, 9-98.
- Khazri, A., Sellami, B., Dellali, M., Corcellas, C., Eljarrat, E., Barceló, D., Mahmoudi, E. (2015.) Acute toxicity of cypermethrin on the freshwater mussel *Unio gibbus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 115, 62-66.
- Klaine, J.S., Alvarez, J.J.P., Batley, E.G., Fernandes, F.T., Handy, D.R., Lyon, Y.D., Mahendra, S., McLaughlin, J.M., Lead, R.J. (2008.) Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability and affects. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 27, 1825-1851.
- Matranga, V., Corsi, I. (2012.) Toxic effects of engineered nanoparticles in the marine environment: Model organisms and molecular approaches. *Marine Environmental Research*. 76. 32–34.
- Martínez-Gómez, C., Bignell, J. and Lowe, D. 2015. Lysosomal membrane stability in mussels. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences* No. 56, 41 pp.

Paiva, F. (2014.) "Ship transport of marine invasive species and its stress resistance". (Masters thesis), University De Évora.

Perić, L., Nerlović, V., Žurga, P., Žilić, L., Ramšak, A. (2017.). Variations of biomarkers response in mussels *Mytilus galloprovincialis* to low, moderate and high concentrations of organic chemicals and metals. *Chemosphere* 174, 554-562.

Prabhu, S. and Poulouse, E. (2012.) Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters* 2012, 2:32.

Seed, R., Suchanek (1992.) Population and community ecology of *Mytilus*, Chapter 4. The mussel *Mytilus*: ecology, physiology, genetics and culture. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, 25.

Sellami, B., Khazri, A., Louati, H., Boufahja, F., Dellali, M., Sheehan, D., Aissa, P., Ridha Driss, M., Mahmoudi, E., Beyrem, H. (2014.): Effects of Permethrin on Biomarkers in Mediterranean Clams (*Ruditapes decussatus*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 92:574–578.

Sukhanova, A., Bozrova, S., Sokolov, P., Berestovoy, M., Karaulov, A., & Nabiev, I. (2018.) Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties. *Nanoscale Research Letters*, 13: 44.

Sturm, A., Radau, T.S., Hahn, T., Schultz, R., (2007.) inhibition of rainbow trout acetylcholinesterase by aqueous and suspended particle-associated OP insecticides. *Chemosphere* 68:605-612

Tyne, W., Little, S., Spurgeon, D.J., Svendsen, C. (2015.) Hormesis depends upon the life-stage and duration of exposure: Examples for a pesticide and a nanomaterial. *Ecotoxicology and Environmental Safety*.120. str. 117–123.

UNEP/RAMOGGE (1999.): Manual on the Biomarkers Recommended for the MED POL Biomonitoring Programme.

Vazquez-Muñoz, R., Borrego, B., Juárez-Moreno, K., García-García, M., Mota Morales, J.D., Bogdanchikova, N., Huerta-Saquero, A. (2017.): Toxicity of silver nanoparticles in biological systems: Does the complexity of biological systems matter?. *Toxicology Letters* 276 11-20.

Wang, H., Ho, K.T, Shecke, K.G., Wu, F., Cantwell, M.G, Katz, D.R, Horowitz, D.B, Boothman, W.S, Burgess, R.M (2014.): Environmental Science and Technology. 2014, 48, 13711–13717.

Yamashiro, T., Shiraishi, A., Satake, H., Nakayama, K. (2019.). Draft genome of *Tanacetum cinerariifolium*, the natural source of mosquito coil. Scientific Reports 9, 18249.

Zippay, M.L, Helmuth, B., (2012.): Effects of temperature change on mussel, *Mytilus*. Integrative Zoology 2012; 7: 312–327.

## 7.1 Internetski izvor

National Park Service, Point Reyes, National seashore California (15. rujan 2020.)

<https://www.nps.gov/pore/learn/nature/intertidal.htm>

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

Završni rad

Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru

### **Ispitivanje toksičnosti insekticida permetrina na dagnjama *Mytilus galloprovincialis* u prisustvu nanočestica srebra**

Melina Tadić

Institut Ruđer Bošković, Centar za istraživanje mora, G. Paliaga 5, 52210 Rovinj

#### **Sažetak:**

Zbog sve veće upotrebe pesticida u obalnim i priobalnim područjima te eksponencijalnom proizvodnjom i upotrebom nanočestica tijekom zadnjeg desetljeća, njihov utjecaj na okoliš i morske ekosustave je zabrinjavajući, ali je i dalje nepoznat, kao i mehanizmi djelovanja na organizme. Cilj ovog rada bio je ispitati toksičnost permetrina i nanočestica srebra na mediteransku dagnju *Mytilus galloprovincialis*. Dagnje su tretirane nanočesticama srebra (5-50 µg/L) i permetrina (1-100 µg/L) i kombinacijama istih. Procjena toksičnih učinaka određivala se putem SOS testa, stabilnosti lizosomalne membrane i aktivnosti enzima acetilkolinesteraze. Rezultati SOS testa upućuju na toksično djelovanje nanočestica srebra, permetrin pospješuje preživljavanje dagnji izloženih zraku, dok se preživljavanje jedinki tretiranih kombinacijama nisu bitno razlikovali od kontrolne skupine. Rezultati dobiveni ispitivanjem stabilnosti lizosomalne membrane pokazuju da nanočestice srebra i permetrin uzrokuju promjene u stabilnosti, te je mogući sinergistični efekt kod dagnji tretiranih kombinacijama. Aktivnost acetilkolinesteraze povećala se (indukcija) tijekom 24 sata izloženosti, dok je smanjenje aktivnosti (inhibicija) zabilježeno nakon 48 sati izloženosti. Povećana aktivnost acetil kolinesteraze može ukazivati na aktiviranje obrambenih mehanizama organizama, s tim što smanjenje aktivnosti pokazuje inhibicijsku ulogu

toksikanata, bilo kroz postupke agregacije koji smanjuju brzinu oslobađanja ionskog srebra ili sekvestraciju permetrina adsorpcijom na nanočesticama.

**Ključne riječi:** Nanočestice srebra, pesticid permetrin, *Mytilus galloprovincialis*, SOS test, stabilnost lizosomalne membrane, aktivnost enzima acetilkolinesteraze

**Mentor:** prof. dr. sc. Daniel Mark Lyons

**Ocjenjivači:** doc. dr. sc. Paolo Paliaga

izv. prof. dr. sc. Dijana Pavičić-Hamer

prof. dr. sc. Daniel Mark Lyons

**Datum obrane:** 30. 9. 2020

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Juraj Dobrila University of Pula

Bachelor thesis

University Undergraduate Study Programme – Marine Sciences

### **Investigation the toxicity of the insecticide permethrin on mussel *Mytilus galloprovinicalis* in the presence of silver nanoparticles**

Melina Tadić

Ruđer Bošković Institute, Center for Marine Research, G. Paliaga 5, 52210 Rovinj

#### **Abstract:**

Due to the increasing use of pesticides in coastal areas and the exponential growth in production and use of nanoparticles in the last decade, their impact on the environment and marine ecosystems, as well as mechanisms and effects on organisms, remain unresolved and hence a cause for concern. The goal of this study was to investigate the toxicity of co-exposure to permethrin and silver nanoparticles in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovinicalis*. Mussels were treated with silver nanoparticles at concentrations in the range 5-50 µg/L, permethrin concentrations in the range 1-100 µg/L and combinations thereof. Evaluation of toxic effects was determined by SOS test, lysosomal membrane stability and acetylcholinesterase enzyme activity. The results of the SOS test indicate toxic effects of silver nanoparticles with a reduction of mussel survival in air, mussels treated with permethrin showed enhanced survival, while the survival of individuals treated with silver nanoparticle-permethrin combinations did not differ significantly from the control group. The results of tests on stability of lysosomal membranes indicate that silver nanoparticles and permethrin cause reductions in membrane stability with possible synergistic effects in mussels treated with toxicant combinations. Acetylcholinesterase activity increased during 24 h of exposure, while a decrease in exposure was noted after 48 hours. The increased acetylcholinesterase activity may indicate the activation of the organisms' defense mechanisms, with a reduction in activity showing a reduced role of the toxicants, either

through aggregation processes which reduce the rate of ionic silver release or sequestration of permethrin by adsorption on nanoparticles.

**Key words:** Silver nanoparticles, pesticide permethrin, *Mytilus galloprovincialis*, SOS test, lysosomal membrane stability, acetylcholinesterase activity

**Supervisor:** Prof. Daniel Mark Lyons

**Reviewers:** Asst. prof. Paolo Paliaga  
Assoc. prof. Dijana Pavičić-Hamer  
Prof. Daniel Mark Lyons

**Thesis defence:** 30. 9. 2020