

# Utjecaj nanočestica cinka na ekspresiju biokemijskih biljega izloženosti kod kompostne gujavice (*Eisenia fetida*)

---

Vrbat, Gordana

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:577688>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-31**



**ODJEL ZA  
BIOLOGIJU**  
Sveučilište Josipa Jurja  
Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

[Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**ODJEL ZA BIOLOGIJU**

Diplomski sveučilišni studij: Zaštita prirode i okoliša

Gordana Vrbat

**UTJECAJ NANOČESTICA CINKA NA EKSPRESIJU BIOKEMIJSKIH  
BILJEGA IZLOŽENOSTI KOMPOSTNE GUJAVICE (*Eisenia fetida*)**

Diplomski rad

**Osijek, 2017.**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Odjel za biologiju  
Diplomski sveučilišni studij: Zaštita prirode i okoliša

Diplomski rad

Znanstveno područje: Prirodne znanosti  
Znanstveno polje: Biologija

**UTJECAJ NANOČESTICA CINKA NA EKSPRESIJU BIOKEMIJSKIH BILJEGA  
IZLOŽENOSTI KOMPOSTNE GUJAVICE (*Eisenia fetida*)**

Gordana Vrbat

**Rad je izrađen:** Odjel za biologiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

**Mentor:** Dr.sc. Branimir K. Hackenberger, izv.prof.

Nanotehnologija je tehnologija dizajna, sinteze i primjene materijala izrađenih na nano razini veličine. Nanočestice su čestice veličine od 1 do 100 nm. Nanočestice i nanotehnologija sve se više primjenjuju u gotovo svim granama ljudske djelatnosti (medicina, farmaceutska industrija, industrija boja, kozmetika i dr.). Sve veća prisutnost nanočestica u svakodnevnoj uporabi podrazumijeva i sve veću prisutnost nanočestica u okolišu. Utjecajem nanočestica na okoliš i njegove sastavnice bavi se nanotoksikologija tj. nanoekotoksikologija. Biokemijski biljezi (biomarkeri) su kvantitativne mjerljive promjene u biološkim sustavima kao odgovor na izloženost ksenobioticima. Rani odgovor biomarkera na izloženost ksenobioticima koristi se kao alat za predviđanje mogućeg utjecaja izloženosti. Biomarkeri gujavica predstavljaju koristan alat za monitoring tla i procjenu okolišnog rizika te posljednjih godina postaju sve važniji u procjeni utjecaja zagađivala na organizme tla te je zbog toga kao eksperimentalni organizam korištena kompostna gujavica *Eisenia fetida*. Ovim radom istražen je učinak nanočestica ZnO na ekspresiju biomarkera (AChE, CAT, GST, MT, TBARS) kod kompostne gujavice.

**Ključne riječi:** nanočestice, ZnO, *Eisenia fetida*, biomarkeri

**Broj stranica:** 51

**Broj slika:** 21

**Broj tablica:** 0

**Broj literaturnih navoda:** 82

**Jezik izvornika:** Hrvatski

**Datum obrane:** 26. travnja 2017

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. doc. dr. sc. Davorka K. Hackenberger
2. doc. dr. sc. Sandra Ečimović
3. izv. prof. dr. sc. Branimir K. Hackenberger
4. doc.dr.sc. Goran Palijan

**Rad je pohranjen u:**

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 Nature and Environmental Protection**

**Scientific Area:** Natural science

**Scientific Field:** Biology

### **THE INFLUENCE OF ZINC NANOPARTICLES ON THE EXPRESSION OF BIOMARKERS OF EXPOSURE ON THE COMPOST EARTHWORM (*Eisenia fetida*)**

**Gordana Vrbat**

**Thesis performed at:** Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

**Supervisor:** Branimir K. Hackenberger, PhD, Associate Professor

Nanotechnology is a technology of design, synthesis and application of the materials developed at the nanoscale. Nanoparticles are particles with a size of 1 to 100 nm. Nanoparticles and nanotechnology are increasingly being used in almost all branches of human activity (medicine, pharmaceuticals, paint industry, cosmetics, etc.). The increasing presence of nanoparticles in everyday use includes increasing the presence of nanoparticles in the environment. Nanotoxicology ie. nanoecotoxicology deals with influence of nanoparticles on the environment and its components. Biomarkers are quantitative measurable changes in biological systems as a response to exposure to xenobiotics. Early response of biomarkers of exposure to xenobiotics is used as a tool to predict the potential impact of exposure. Biomarkers of earthworms are a useful tool for monitoring soil and assessment of environmental risks, and in recent years have become increasingly important in the assessment of the effects of pollutants on soil organisms, and therefore a compost earthworm *Eisenia fetida* has been used as an experimental organism. This study investigated the effects of ZnO nanoparticles on expression of biomarkers (AChE, CAT, GST, MT, TBARS) in the compost earthworm.

**Key words:** nanoparticles, ZnO, *Eisenia fetida*, biomarker

**Number of pages:** 51

**Number of figures:** 21

**Number of tables:** 0

**Number of references:** 82

**Original in:** Croatian

**Date of the thesis defence:** 26. travnja 2017

#### **Reviewers:**

1. Davorka K. Hackenberger, PhD, assistant professor
2. Sandra Ećimović, PhD, assistant profesor
3. Branimir K. Hackenberger, PhD, associate professor
4. Goran Palijan, PhD, assistant professor

#### **Thesis deposited in:**

Library of Department of Biology, J.J. Strossmayer University of Osijek and in National university library in Zagreb in elektronic form. It is also disposable on the web site of Department of Biology, J.J. Strossmayer University of Osijek

*Zahvaljujem se svom mentoru izv.prof.dr.sc Branimiru K. Hackenbergeru na velikoj pomoći i savjetima tijekom izrade ovog diplomskog rada, te svima na Zavodu za kvantitativnu ekologiju.*

*Posebno, se želim zahvaliti mojim roditeljima, bliskoj obitelji i prijateljima koji su mi pružili bezuvjetnu podršku tijekom studiranja.*

*Hvala svim kolegama s diplomskog studija, koji su mi bili podrška i pomoć tijekom studiranja.*

*Želim zahvaliti svim članovima Odjela za biologiju Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku koji su svojim znanjima dali veliki doprinos mom obrazovanju.*

# Sadržaj

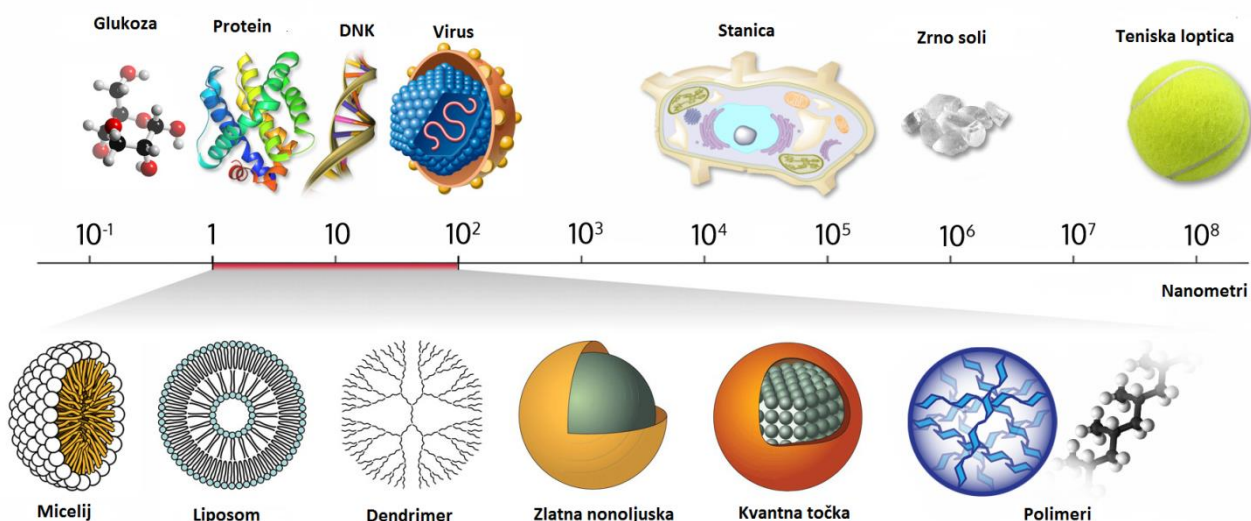
|  |           |
|--|-----------|
| <b>1.UVOD</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>1.1. Nanotehnologija i nanotoksikologija</b> .....                            | <b>1</b>  |
| <b>1.2.Nanočestice cinkovog oksida ZnO</b> .....                                 | <b>4</b>  |
| <b>1.3 Biokemijski biljezi</b> .....   | <b>6</b>  |
| 1.3.1 Acetilkinolin-esteraza (AChE) .....  | 6         |
| 1.3.2 Katalaza (CAT) .....   | 7         |
| 1.3.3 Glutation-S-transferaza.....   | 7         |
| 1.3.4 Metalotioneini (MT).....   | 8         |
| 1.3.5 TBARS (reaktivne supstance 2-tiobarbiturne kiseline).....                  | 8         |
| <b>1.4. Cilj istraživanja</b> .....  | <b>9</b>  |
| <b>2.MATERIJALI I METODE</b> .....   | <b>10</b> |
| <b>2.1.Eksperimentalni organizam</b> .....                                       | <b>10</b> |
| 2.1.1. Sistematika eksperimentalnog organizma .....                              | 10        |
| 2.1.2 Biologija eksperimentalnog organizma .....                                 | 10        |
| <b>2.2.Izlaganje gujavica nanočesticama ZnO</b> .....                            | <b>12</b> |
| <b>2.3.Kontakt test na filter papiru</b> .....                                   | <b>12</b> |
| <b>2.4.Test u umjetnom tlu</b> .....   | <b>13</b> |
| <b>2.5.Ekstrakt tla</b> .....  | <b>14</b> |
| <b>2.6.Priprema postmitohondrijske frakcije gujavica</b> .....                   | <b>15</b> |
| <b>2.7.Mjerenje aktivnosti enzima acetilkolin esteraze (AChE)</b> .....          | <b>16</b> |
| <b>2.8. Mjerenje aktivnosti katalaze (CAT)</b> .....                             | <b>16</b> |
| <b>2.9. Mjerenjeaktivnosti glutacion S-transferaze (GST)</b> .....               | <b>17</b> |
| <b>2.10.Određivanje metalotioneina (MT)</b> .....                                | <b>17</b> |
| <b>2.11.Određivanje reaktivne supstance 2-tiobarbiturne kiseline–TBARS</b> ..... | <b>18</b> |
| <b>3. REZULTATI</b> .....  | <b>19</b> |
| <b>3.1. Umjetno tlo (artificial soil AS)</b> .....                               | <b>19</b> |
| 3.1.1. Aktivnost AChE u homogenatu gujavica .....                                | 19        |
| 3.1.2. Aktivnost katalaze (CAT).....   | 20        |
| 3.1.3. Aktivnost glutacion S-transferaze (GST).....                              | 22        |
| 3.1.4. Mjerenje TBARS - reaktivne supstance 2-tiobarbiturne kiseline .....       | 23        |
| 3.1.5. Mjerenje metalotioneina MT .....  | 25        |
| <b>3.2.Kontakt test na filter papiru (Filter paper contact test- FPT)</b> .....  | <b>27</b> |
| 3.2.1.Aktivnost acetilkolin – esteraze AChE.....                                 | 27        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.2.2. Mjerenje aktivnosti katalaze (CAT) .....                             | 28        |
| 3.2.3. Mjerenje aktivnosti glutathion S- transferaze (GST) .....            | 30        |
| 3.2.4. Mjerenje TBARS - reaktivne supstance 2-tiobarbiturine kiseline ..... | 31        |
| 3.2.5. Mjerenje metalotioneina (MT) .....                                   | 32        |
| <b>3.3. Ekstrakt tla (Soil extract test SE) .....</b>                       | <b>34</b> |
| 3.3.1. Mjerenje aktivnosti AChE .....                                       | 34        |
| 3.3.2. Mjerenje aktivnosti katalaze (CAT) .....                             | 35        |
| 3.3.3. Mjerenje aktivnosti glutathion S- transferaze (GST) .....            | 37        |
| 3.3.4. Mjerenje TBARS - reaktivne supstance 2-tiobarbiturine kiseline ..... | 38        |
| 3.3.5. Mjerenje metalotioneina MT .....                                     | 39        |
| <b>4. RASPRAVA .....</b>  | <b>40</b> |
| <b>5. ZAKLJUČAK .....</b>   | <b>44</b> |
| <b>6. LITERATURA .....</b>  | <b>45</b> |
| <b>7. PRILOG .....</b>  | <b>52</b> |

# 1.UVOD

## 1.1. Nanotehnologija i nanotoksikologija

Nanotehnologija se može definirati kao dizajn, sinteza i primjena materijala i uređaja čija su veličina i oblik izrađeni na nano razini (Slika1). Iskorištava jedinstvena kemijska, fizikalna, električna i mehanička svojstva koja se pojavljuju kada je materija strukturirana na nano ljestvici (Buzea i sur., 2007). Prefiks *nano* u svijetu nano tehnologije znači milijarditi ( $1 \times 10^{-9}$ ), nano tehnologija bavi se različitim strukturama materije dimenzija milijarditog dijela metra (Poole i Owens, 2003). Istražuje električnu, optičku, i magnetnu aktivnost kao i strukturalna ponašanja na molekularnoj i submolekularnoj razini. Nanotehnologija ima potencijal revolucionarizirati brojne medicinske i biotehnoške alate da bi bili jednostavniji za korištenje, jeftiniji, sigurniji i lakši za prijenos. Nanočestice koriste se u različite svrhe, od medicinskih tretmana, korištenja u različitim granama industrije, optičkim uređajima, elektroničkim uređajima, senzornoj tehnologiji te za biološko označavanje i liječenje karcinoma. Zbog svojih izvanrednih svojstava kao što su antibakterijska aktivnost, visoka otpornost na oksidaciju te visoku toplinsku vodljivost, nano čestice su posljednjih godina privukle veliku pozornost. (Hasan, 2015).



Slika 1- Nanometarska ljestvica, veličina na nanometarskoj razini

(izvor: web 1)



Nanomaterijali stekli su veliku pozornost zbog svojih novih svojstava, uključujući i veliku specifičnu površinu te veliku reakcijsku aktivnost (Yan i sur., 2012). Nanočestice pokazuju potpuno različita svojstva bazirana na specifičnim karakteristikama kao što su veličina, distribucija i morfologija, u usporedbi sa većim česticama materijala od kojega su nastale. (Song i Kim, 2009).

Iako je riječ *nanotehnologija* relativno nova, postojanje funkcionalnih struktura nanometarskih dimenzija nije novo, zapravo takve strukture postoje na Zemlji od kada i život na njoj. Puzlatke, mekušci, konstruiraju vrlo snažne školjke, tako što posjeduju unutrašnju površinu u duginim bojama, nastalu, organiziranjem kalcijevog karbonata u snažne nanostrukturirane cigle međusobno povezane ljepilom od ugljikohidrata i proteina. Pukotine sa vanjske strane ne mogu se kretati kroz školjku zbog nanostrukturiranih cigli. Ova pojava predstavlja prirodnu demonstraciju da strukture građene od nanočestica mogu biti puno jače (Poole i Owens, 2003).

Iako nova, povijest nanomaterijala datira unazad čak od 1959. kada je fizičar Richard P. Feynman predvidio dolazak nanomaterijala (Appenzeller, 1991). Kako je područje nanotehnologije napredovalo postalo je očigledno da novi nanomaterijali imaju drugačija svojstva u usporedbi sa njihovim većim pandanom. Zbog svojih jedinstvenih svojstava, postaju izvrsnim kandidatom za biomedicinsku primjenu zbog toga što se razni biološki procesi odvijaju na nanometarskoj razini (Mody i sur., 2010). S obzirom na svoja specifična svojstva i širok raspon mogućih primjena, na različitim poljima znanosti, osamdesetih godina prošlog stoljeća započinje intenzivan razvoj nanotehnologije. Međutim razvojem nanotehnologije i njezinom sveprisutnosti u svakodnevnoj uporabi, javila se i zabrinutost o mogućim toksičnim svojstvima nanočestica. Različite studije izvijestile su o potencijalnim rizicima nanočestica za ljudsko zdravlje, što je bazirano na upalnoj reakciji uzrokovanoj nanočesticama željezovog oksida kod štakora (Zhu i sur., 2008). Također postoje dokazi toksičnih efekata nanočestica silicija na fibroblaste i tumorske stanice (Chang i sur., 2007).

Nekoliko nanomaterijala već je dospjelo u široku uporabu kao  $\text{TiO}_2$  u bojama (Tran i sur, 2005) i kozmetičkim formulama, te  $\text{ZnO}$  u kremama za sunčanje (Reijnders, 2006). No postoje i ambiciozniji pokušaji korištenja nanomaterijala kao što je bioremedijacija zagađenog okoliša, što podrazumijeva namjerno otpuštanje nanomaterijala (Boxall i sur., 2007).

Brzi razvoj nanotehnologije vjerojatno će postati novi izvor opasnosti za ljude i okoliš kroz udisanje, probavu, preko kože, ili ubrizgavanjem proizvedenih nanomaterijala na područje

rada ili kroz potrošačke proizvode. (Zhao i sur.,EOLSS2013). Kao odgovor na moguće opasnosti sve više prisutne nanotehnologije, u zadnje se vrijeme, sve više razvija i nanotoksikologija.

Nanotoksikologija, tremin nastao 2004.g, odnosi se na proučavanje potencijalnih toksičnih utjecaja nanočestica na biološke i ekološke sustave (Love i sur, 2012). Područje nanotoksikologije bavi se efektima izloženosti nanomaterijalima. Najvažnije kod nanotoksikologije je imati jasne spoznaje o izvorima nanomaterijala u okolišu. S obzirom da nanočestice istih materijala koje nisu u nano obliku pokazuju drukčija svojstva kao što su veličina, površina, fizikalno-kemijska struktura, oblik i naboj, i njihova toksičnost može biti bitno drugačija. S druge strane, jako je malo podataka o, od strane ljudi, napravljenim nanočesticama (Bacanli i Basaran, 2014).Mehanizme interakcije između nano čestica i živih sustava još uvijek ne razumijemo u potpunosti. Kompleksnost mehanizama dolazi od sposobnosti čestica da se vežu i vrše interakciju sa biološkom materijom te izmjene karakteristike njihove površine, u ovisnosti o okolišu u kojem se nalaze. Znanje o mehanizmima interakcije između nanočestica i stanica, posljednjih godina, rapidno raste uočeno je da stanice propuštaju nanočestice pasivnim i aktivnim mehanizmima. Međutim, unutar stanične putove i mehanizme puno je teže razumjeti(Elsaesser i Howard, 2011).

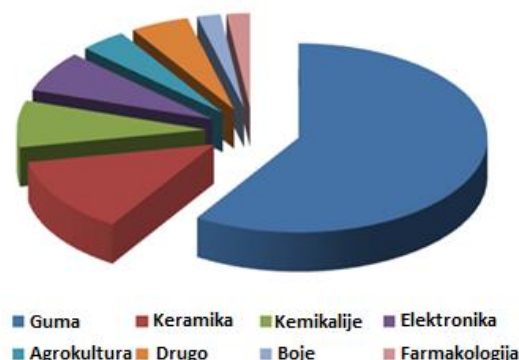
Nanočestice dospjele u okoliš u interakciji su sa zrakom, vodom i tlom(Elsaesser i Howard,2011). Za procjenurizika korištenja nanomaterijala u komercijalnim proizvodima i njihove primjene u okolišu potrebno je bolje razumijevanje njihove mobilnosti, biodostupnosti i toksičnosti. Da bi nanočestice predstavljale rizik mora postojati i potencijal za izlaganje i opasnost kao rezultat izlaganja. Oslobađanje nanočestica može doći iz različitih izvora kao što su proizvodna postrojenja, odlagališta, postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda ili izvora kao što je trošenje materijala koji sadrže nanočestice, također moguće je i oslobađanje kroz proizvodni proces i transport (Nowack i Bucheli, 2007).

Interakcija nanočestica sa elementima okoliša često mijenja površinska svojstva čestica te može dovesti do nakupljanja (agregacije) čestica i promijene naboja čestica ili drugih površinskih svojstava(Handy i sur., 2008).

## 1.2. Nanočestice cinkovog oksida ZnO

Nanočestice metalnih oksida imaju široku primjenu, primarno u području tehnologije, uključujući njihovo korištenje kao polu-vodiči, elektroluminescentne ili termoelektrične materijale, također se koriste u biomedicinske svrhe kao sustavi za dostavu lijekova za liječenje i dijagnosticiranje te u okolišu za primjenu u dekontaminaciji (Corr, 2013). Mnoštvo proizvedenih nanočestica metalnih oksida se razvijaju i ugrađuju u proizvode gdje ih njihova jedinstvena katalitička moć, optoelektronička svojstva, antimikrobno djelovanje i druge karakteristike čine atraktivnim za širok spektar primjena (Oskam, 2006).

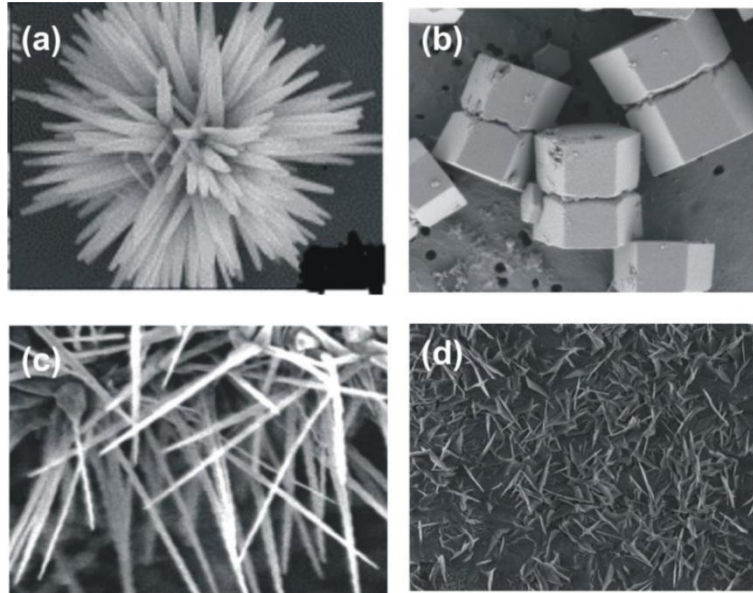
Veliki broj istraživanja pokazao je da neke nanočestice metalnih oksida kao što su nanočestice ZnO imaju selektivnu toksičnost prema bakterijama te pokazuju minimalne efekte na ljudske stanice što preporučuje njihovu upotrebu u agrokulturi i industriji hrane (Ravishankar Rai i Jamuna Bai, 2011). Nanočestice ZnO pokazale su antimikrobnu aktivnost na *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* i *E. coli* (Kesić i Horozić, 2016). Cinkov oksid je metalni oksid široke uporabe njegove nanočestice imaju specifičnu kristalnu strukturu koja doprinosi njegovim jedinstvenim optoelektričnim svojstvima. ZnO je također učinkovit fotokatalizator te je dokazano da je učinkovit u raznim tehnologijama kontrole okoliša od remedijacije okolišnih zagađivača do medicinske dezinfekcije (Hoffmann i sur., 1995). Nanočestice ZnO danas su sveprisutne, nanoprah trenutno se koristi u različitim proizvodima uključujući plastiku, keramiku, staklo, gumu, maziva, boje, hranu, baterije (Slika 2). Ove nanočestice uobičajeni su sastojci proizvoda za osobnu higijenu i krema za sunčanje zbog svoje izvanredne sposobnosti UV apsorpcije i reflektivnih svojstava (Maa i sur., 2013).



Slika 2- Prikaz zastupljenosti ZnO u industriji.

(izvor: web 2)

Raznolikost struktura nanometarskog ZnO pokazuje da se može svrstati među nove materijale sa potencijalnim primjenama u mnogim poljima nanotehnologije. Cinkov oksid može se pojavljivati u jednodimenzionalnim, dvodimenzionalnim i trodimenzionalnim strukturama.(Slika 3)



Slika 3: Primjeri različitih struktura ZnO (a)cvijet, (b)-šipke,(c) i (d)-žice (Kołodziejczak-Radzimska i Jesionowski,2014)

Jednodimenzionalne strukture čine najveću grupu, uključujući nanošipke, -igle, -spirale, -opruge i drugo. Može se dobiti i u dvodimenzionalnoj strukturi kao što su nanoploče ili nanokugle. Primjeri trodimenzionalnih struktura cinkovog oksida su cvijet, maslačak, pahulje itd. (Kołodziejczak-Radzimska i Jesionowski, 2014).

Cink je esencijalan za život, no u velikim dozama je toksičan(Chang i sur., 2012). Neke studije izvještavaju da ZnO i njegove nanočestice imaju jaku sposobnost apsorpcije za niz organskih spojeva i teških metala(Yang i sur.,2009). Nanočestice ZnO one bolje reflektiraju UV svjetlost od istih mikročestica te se, iz toga razloga, često koriste kao sastojci u kozmetici i modernim kremama za sunčanje. Informacije o njegovoj sigurnosti/toksičnim efektima na koži u stalnom su porastu, no postoji nedostatak toksikoloških podataka(Sharma i sur.,2009). Povećanje komercijalne uporabe i proizvodnja širokih razmjera može dovesti do nenamjerne izloženosti ljudi i okoliša. S obzirom na to vrlo je važno razumjeti njegovu toksičnost za organizme i okoliš kroz procese apsorpcije, biološku distribuciju, metabolizam i izlučivanje nanomaterijala *in vivo*. Da bi se osigurala njihova sigurna primjena te pružile korisne informacije za razvoj sigurnosnih standarda nanomaterijala (Chang i sur., 2012).

### **1.3 Biokemijski biljezi**

Biokemijski biljezi (biomarkeri) koriste se kao alati za procjenu bioloških promjena koje mogu otkriti izloženost organizama kemikalijama okoliša. U nekim slučajevima, biomarkeri mogu ukazati da kemikalije mogu utjecati na specifične metaboličke putove ili fiziološke funkcije izloženih jedinki. Dakle, biomarkeri se mogu upotrijebiti i kao dijagnostički alati i kao alati za predviđanje. Brojne analize ukazuju da su biomarkeri korisni alati za otkrivanje prisutnosti ksenobiotika u živim organizmima te za dijagnosticiranje zdravlja pojedinca (Osman, 2013). Postoje mnogi različiti biomarkeri koji se pojavljuju na različitim razinama organizacije od sub-staničnih do cijelih organizama (Connel i sur., 1999). Biomarkeri na molekularnoj razini reagiraju prvi, nakon čega slijedi reakcija na staničnoj (biokemijska i fiziološka) zatim na morfološko/histološkoj i razini cijeloga tijela. Tako praćenjem molekularnih, biokemijskih i fizioloških parametara biomarkeri se mogu upotrijebiti kao sustav ranog upozorenja i potencijalna šteta se može procijeniti prije nego nastupe ozbiljnije smetnje/posljedice (Lam i Gray, 2003).

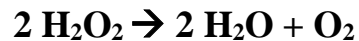
#### **1.3.1 Acetilholin-esteraza (AChE)**

Acetilholin-esteraza jedan je od najvažnijih enzima u mnogim živim organizmima uključujući ljude i kralješnjake, a nalazi se u živčanom sustavu i mišićima (Massoulie i sur., 1993). AChE odgovorna je za reguliranje koncentracije acetilholina tijekom prijenosa živčanih signala. AChE hidrolizira acetilholin u acetat i kolin nakon aktivacije acetilholinskih receptora u postsinaptičkim membranama. Aktivnost AChE služi za prekidanje sinaptičke transmisije, što prevenira kontinuirano slanje signala na živčanim završetcima. Stoga je ključna za normalno funkcioniranje središnjeg i perifernog živčanog sustava (Lionetto i sur., 2013).

Poznato je da su organofosfati i karbamati specifični inhibitori katalitičke aktivnosti acetilholin-esteraze (Hobbiger, 1961). Oni se vežu na estersko mjesto enzima te reakcijama fosforilacije i dekarbamilacije deaktiviraju enzim (Lionetto i sur., 2013).

### 1.3.2 Katalaza (CAT)

Katalaza je vrlo čest enzim i može se naći u gotovo svim živim organizmima izloženim kisiku, ona katalizira razgradnju vodikovog peroksida na kisik i vodu (Chelikani i sur., 2004), reakcijom:



Također koristi vodikov peroksid da bi oksidirala toksine uključujući fenole, mravlju kiselinu, formaldehid i alkohole (Scandalios i sur., 1997). Katalaza je jedan od najučinkovitijih enzima, jedna molekula enzima može pretvoriti milijune molekula vodikovog peroksida u kisik i vodu po sekundi (Goodsell, 2004). Katalaza je tetramer izgrađen od četiri polipeptidna lanca, svaki sa više od 500 aminokiselina (Boon i sur., 2007). Sadrži četiri porfirinska hema, uz pomoć kojih enzim reagira sa vodikovim peroksidom. Optimalni pH među vrstama varira između 4 i 11, a katalaza je osjetljiva i na temperaturu koja također varira među vrstama (Toner i sur., 2007).

### 1.3.3 Glutation-S-transferaza

Glutation S-transferaze pripadaju obitelji enzima detoksifikacije koji kataliziraju konjugaciju reduciranog glutationa sa skupinom spojeva koje imaju elektrofilne centre kao npr. nitrospojevi, organofosfati i organokloridi (Clark i sur., 1986). S obzirom da je glutacion vrlo važan pri staničnoj detoksifikaciji mnogih toksičnih ksenobiotika, praćenje ovoga endogenog tiola pri izlaganju toksinima, vrlo je važno (Otitoju i Onwurah, 2007). Ovi enzimi kataliziraju reakciju takvih spojeva s -SH skupinom glutationa, i tako neutraliziranja njihovih elektrofilnih mjesta pri čemu produkt postaje više topljiv u vodi (Habig, 1974).

### **1.3.4 Metalotioneini (MT)**

Otkriće kadmij (Cd)- vezujućih, cistein-bogatih proteina iz bubrega konja, (Margoshes i Vallee, 1957), obilježilo je nastajanje područja istraživanja usmjerenog na proučavanje polipeptida niske molekularne mase super obitelji metalotioneina. Metalotioneini su neenzimatski proteini male molekularne mase (6-7kDa) sveprisutni u životinjskom svijetu. Ima neobičan sastav aminokiselina, ne sadrži aromatske aminokiseline te što je najvažnije, jednu trećinu ostataka čini cistein (Klaassen i sur.,1999). Metalotionein veže metale kroz tiolnu(-SH) skupinu njegovih cisteinskih ostataka. MT ima visok afinitet i prema dvovalentnim esencijalnim metalima kao što su Zn i Cu, i neesencijalnim (ili toksičnim) kao što su Cd i Hg(Robbins i sur., 1991). MT je ključni spoj uključen u unutar stanično manipuliranje raznih esencijalnih i neesencijalnih post-tranzicijskih metalnih iona. Osim sposobnosti vezanja teških metala, sugerira se i uloga u unutar staničnoj fiksaciji esencijalnih elemenata u tragovima, u kontroli koncentracije i neutralizaciji štetnih utjecaja izloženosti toksičnim elementima (Sakulsak, 2012).

### **1.3.5 TBARS (reaktivne supstance 2-tiobarbiturne kiseline)**

Reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline (TBARS) prirodno su prisutne u biološkim uzorcima uključujući lipidne hidroperoksida i aldehide čija se koncentracija povećava kao odgovor na oksidacijski stres. Rezultati TBARS testa obično iskazuju se kao ekvivalent malonaldehidu (malondialdehida, MDA), spoj koji nastaje kao rezultat razgradnje polinezasićenih masnih kiselina lipidnih peroksida. TBARS test je dobro poznat, osnovana metoda za kvantifikaciju tih lipidnihperoksida.

#### 1.4. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi kakav je utjecaj nano- i nenanočestica ZnO na ekspresiju biokemijskih biljega (AChE, CAT, GST, MR i TBARS) kod kompostne gujavice *Eisenia fetida*. Naime, kompostna gujavica *Eisenia fetida* se u dosadašnjim istraživanjima pokazala kao vrsta s izuzetno dobrim svojstvima indikatora utjecaja ksenobiotika na ekosustav u kojem obitava te se standardno koristi u procjenama okolišnog rizika kao testni organizam. Stoga je potpuno očekivano pitanje utjecaja nanočestica na pojedina indikatorska svojstva. Kako bi se ustanovili utjecaji tvari u obliku nanočestica koje su posljedica veličine na nano skali potrebno je bilo paralelno izvesti pokuse s istom tvari u ne nano obliku. S obzirom da su nanočestice sve više prisutne u okolišu kroz razne upotrebe u gotovo svim granama ljudske djelatnosti, a još uvijek je velika nepoznanica njihov utjecaj na elemente okoliša, promjene u ekspresiji biomarkera se nameću kao odličan alat za određivanje primarnih utjecaja nanočestica na okoliš. Biomarkeri proučavani u ovome diplomskom radu mogu ukazati i na potencijalan utjecaj nanočestica ZnO na kompostnu gujavicu, i na primarni utjecaj nanočestica na okoliš. Osim spoznaje o tome kakav je utjecaj nanočestica na ekspresiju biomarkera, cilj ovog rada bio je i potaknuti dodatna istraživanja u smjeru boljeg razumjevanja ponašanja nanočestica u okolišu.



## 2.MATERIJALI I METODE

### 2.1.Eksperimentalni organizam

#### 2.1.1. Sistematika eksperimentalnog organizma

Carstvo: Animalia

Koljeno: Annelida

Razred: Oligochaeta

Podrazred: Diplostesticulata

Red: Opisthopora

Porodica: Lumbricidae

Rod: *Eisenia*

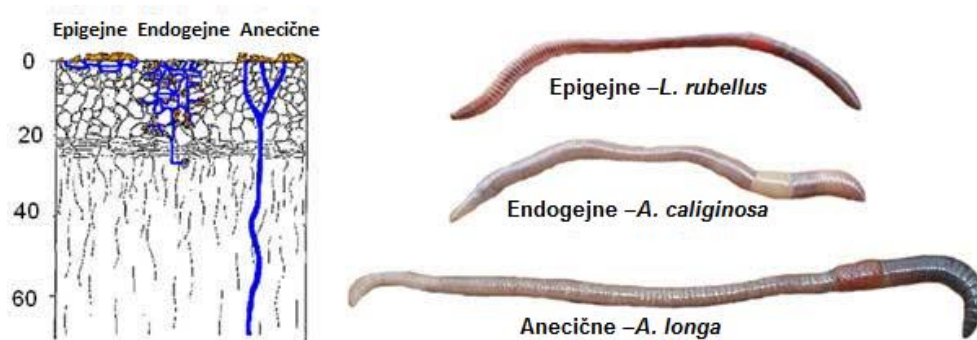
Vrsta: *Eisenia fetida* (Savigny, 1826)

#### 2.1.2 Biologija eksperimentalnog organizma

Gujavice se mogu nazvati „inženjerima ekosustava“ (Lavelle i sur., 1997; Hale i sur., 2005), jer imaju veliki potencijal za promjenu tla i biljnih zajednica. Gujavice pripadaju makro fauni obično se mogu naći u obrađenim tlima, travnjacima i drugim agro ekosustavima. Gujavice utječu na strukturu tla procesom probave, što dovodi do razgradnje organske tvari iz (Nijhawan i Kanwar, 1952).

Bouche (1972) dijeli gujavice u tri osnovne skupine(Slika 4):

- 1) Epigejne – hrane se i aktivne su u gornjem, površinskom sloju,*Eisenia andrei*, *Eisenia fetida*,*Lumbricus rubellus*.
- 2) Endogejne – horizontalni hodnici, dublji sloj tla, *Aporrectodea caliginosa*.
- 3) Anecične – aktivni su u dubljim slojevima tla i grade vertikalne hodnike, *Aporrectodea longa*, *Lumbricus terrestris*.



Slika 4- Prikaz tri osnovne skupine gujavica i njihova pozicija u tlu

(izvor: web 3)

*Eisenia fetida* (Savigny, 1826) je crvene, ljubičaste ili smeđe boje dok joj je abdominalni dio žućkastog obojenja. Broj kolutića je između 80 i 110 te doseže dužinu između 20 i 130 mm. Odrasle jedinke odrasle jedinke teže od prilike 1,5g, a već 50-55 dana po nastanku jedinke su spremne za reprodukciju. Zrela jedinka, u prosjeku, proizvede jedan kokon svaki treći dan i iz njega se izlegu 1-3 jedinke. *Eisenia fetida* je epigejna vrsta, odnosno živi na površini tla, ispod biljnih ostataka, dnevno mogu konzumirati ekvivalent pola svoje težine organske tvari. Podnosi širok raspon klimatskih promjena i aktivna je tokom svih godišnjih doba. Ova vrsta je dendritivor i hrani se organskom tvari biljnog i životinjskog podrijetla, te zbog tih svojih kvaliteta nazivaju ih i graditeljima humusa. *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) je vrsta koja se može naći u okruženjima s visokim sadržajem organske tvari i njihove prirodne populacije pojavljuju se u velikim gustoćama fragmentirane distribucije (Elvira i sur., 1996). Na rast i razmnožavanje ove vrste gujavice utjecaj ima nekoliko čimbenika kao što su kvaliteta hrane, vlaga, temperatura i gustoća naseljenosti (Monroy i sur., 2006).

*E. fetida* je vrsta koja se koristi u komercijalne svrhe za proizvodnju komposta za uporabu upoljoprivredi. Zbog otporne prirode ove vrste mogu tolerirati široki raspon kolebanja temperature i vlažnosti. Što omogućuje jednostavan uzgoj jedinki ove vrste. Ima jako dobru toleranciju na temperaturu, ali ne tolerira dobro izravno sunčevo svjetlo.

## **2.2. Izlaganje gujavica nanočesticama ZnO**

Izlaganje gujavica nanočesticama ZnO postavljeno je tako da su gujovice izložene na tri različita načina, odnosno u tri različita medija, i to kontakt test na filter papiru (engl. *Filter paper contact test*), izlaganje u umjetnom tlu (engl. *Artificial soil test*) te izlaganje gujavica nanočesticama ZnO u ekstraktu tla (engl. *Soil extract test*).

## **2.3. Kontakt test na filter papiru**

Kontakt test na filter papiru je akutni test toksičnosti supstance i izvodi se prema OECD 207 protokolu (OECD, 1984), i to tako da se gujovice, pojedinačno, izlažu ispitivanoj tvari u staklenim posudicama ravnoga dna obloženih filter papirom (površina 60 cm<sup>2</sup>) bez preklapanja. Posudice su zatvorene poklopcem sa malim otvorom na vrhu za ventilaciju.

Za pripremu različitih koncentracija i nanočestica ZnO (20nm) i nenanočestica (*bulk*) korištena je destilirana voda. 1,5 ml ispitivane koncentracije ZnO (nanočestica i nenanočestica) nanosi se na površinu filter papira, a nakon toga filter papir se suši pod laganim tokom komprimiranoga zraka. Nakon sušenja, na filter papir se dodaje 1,5 ml destilirane vode. U svaku posudu stavi se jedna gujavica, posude se zatvore i stave u komoru na temperaturu od 20 ± 2°C. Test traje 48 sati, a mortalitet se utvrđuje nakon 24 i 48 sati. Mortalitet se određuje mehaničkim podražajem na prednjem dijelu gujavice, ukoliko nema odgovora gujavica se smatra mrtvom.

Dvanaest sati prije početka izlaganja gujavice su stavljene u Petrijeve zdjelice na vlažni filter papir da bi očistile svoj probavni trakt.

U ovome eksperimentu korišteno je 5 različitih koncentracija ZnO (nanočestice i nenanočestice): 0,0001 mg/cm<sup>2</sup>, 0,001 mg/cm<sup>2</sup>, 0,01 mg/cm<sup>2</sup>, 0,1 mg/cm<sup>2</sup> i 0,4 mg/cm<sup>2</sup>. Kontrola sadrži samo destiliranu vodu. Gujovice su izlagane različitim koncentracijama pojedinačno, za svaku koncentraciju izlagano je po 7 jedinki.

## 2.4. Test u umjetnom tlu

Test u umjetnom tlu je akutni test toksičnosti supstance i izvodi se prema OECD 207 protokolu (OECD, 1984).

Priprema supstrata umjetnog tla:

- 10 % Sphagnum treseta (što bliže pH području od 5,5 do 6,0, bez vidljivih ostataka biljaka i fino usitnjen),
- 20 % kaolinitske gline, po mogućnosti s više od 50 % kaolinita,
- 70 % industrijskog pijeska (u kojemu prevladava fini pijesak s više od 50 % )

Suhe sastojke uklopljene u ispravnim postocima temeljito promiješati. Sadržaj vlage tada se određuje sušenjem maloga uzoraka na  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$  i ponovnim vaganjem dok se ne dosegne stalna masa. Dodaje se destilirana voda do ukupne vlažnosti od oko 35% od mase suhe tvari.

U staklene spremnike zapremine oko jedne litre stavlja se mokri supstrat mase 500g suhe tvari supstrata. U supstrat su zatim dodane različite količine nanočestica ZnO, i to 5 koncentracija: 0,30 g/kg, 0,60 g/kg, 1,2 g/kg, 3,0 g/kg, 4,8 g/kg nanočestica ZnO. Korištene nanočestice ZnO su veličine 20nm.

Iste koncentracije i na isti način postavljene su i za nenanočestice ZnO.

Kontrola sadrži samo osnovni supstrat i vodu.

U svaki supstrat stavljeno je 7 jedinki gujavica te su posude zatvorene poklopcem sa ventilacijskim otvorom i stavljene u komoru na temperaturu od  $20 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  uz neprekidno osvjetljenje od 400 do 800 luksa.

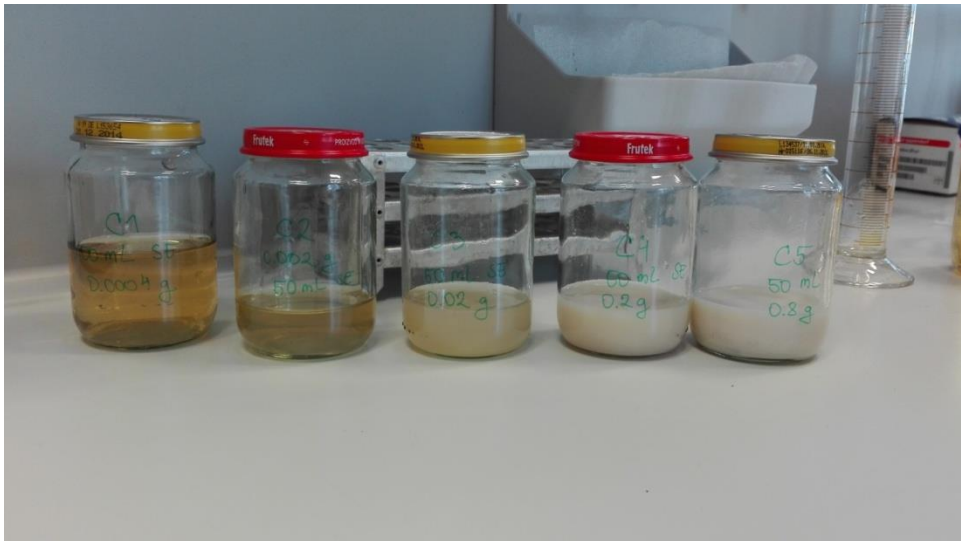
Izlaganje gujavica ispitivanim supstratima trajalo je 7 dana.

## 2.5. Ekstrakt tla

Ekstrakt tla je pripremljen prema metodi Van der Ploeg i sur. (2011).

Tlo je bilo prvo sušeno na 60°C preko noći da bi se uklonila fauna tla. Da bi pripremili ekstrakt tla korišteno je, prethodno sušeno, tlo pomiješano sa vodom u omjeru 2 : 5 (w/v).

Tlo za eksperiment uzorkovano na lijevoj obali Drave. Suspenzija je postavljena na magnetnu miješalicu na 180 rpm kroz period od 1 sat. Tako pripremljena otopina filtrirana je na vakuum i centrifugirana na 12000g. Tako dobivenom ekstraktu tla dodavane su različite količine nanočestica ZnO da bi dobili otopine različitih koncentracija, i to 0,0001 mg/cm<sup>2</sup>, 0,001 mg/cm<sup>2</sup>, 0,01 mg/cm<sup>2</sup>, 0,1 mg/cm<sup>2</sup> i 0,4 mg/cm<sup>2</sup> (Slika 5).



Slika 5 - Pripremljen ekstrakt tla različitih koncentracija nano ZnO  
(foto Gordana Vrbat)

Korištene su nanočestice veličine 20nm. Tako pripremljen ekstrakt tla različitih koncentracija nanočestica, zatim je tretiran u ultrazvučnoj kupelji tijekom 30 sekundi, da bi se spriječila aglomeracija nanočestica ZnO (Slika6).



Slika 6- Ekstrakt tla sa nanočesticama ZnO u ultrazvučnoj kupelji

(fotoGordana Vrbat)

Kontrola je sadržavala samo ekstrakt tla. Gujavice su tretirane pojedinačno, u staklenim posudicama s ravnim dnom. U svaku posudu dodano je 1,5 ml smjese ekstrakta tla i nanočestica ZnO, različitih koncentracija, posude su zatvorene poklopcem sa ventilacijskim otvorom. U svaku posudu stavi se jedna gujavica, posude se zatvore i stave u komoru na temperaturu od  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ . Mortalitet se mjeri nakon 24 i 48 sati.

Vrijeme izlaganja je 48 sati. Gujavice su izlagane različitim koncentracijama supstrata, i to po 7 jedinki za svaku koncentraciju.

## **2.6.Priprema postmitohondrijske frakcije gujavica**

Nakon izlaganja gujavica ispitivanim supstratima, gujavice su kratko isprane destiliranom vodom. Zatim su prenesene u homogenizator uz dodatak hladnog fosfatnog pufera u omjeru 1: 5 (masa tkiva gujavice : volumen pufera). Homogenizacija se izvodila upotrebom homogenizatora uronjenog u posudu sa ledom, kroz kratak vremenski period cca 40-60 sekundi. Homogenat je zatim centrifugiran na 9000g kroz period od 30 minuta na temperaturi od  $+4^\circ\text{C}$ . Supernatant, postmitohondrijska frakcija,odnosno S9 frakcija potom je odlivena u Eppendorf epruvetice s poklopcem i spremljena na  $-80^\circ\text{C}$  do uporabe.

## 2.7. Mjerenje aktivnosti enzima acetilkolin esteraze (AChE)

Aktivnost AChE mjerena je spektrofotometrijski metodom po Ellmanu (1961) u postmitohondrijskoj frakciji gujavica na 412 nm. Aktivnost enzima određuje se mjerenjem nastanka tiokolina kao nusprodukta hidrolize acetilkolina. Odmah po nastanku, tiokolin, reagira sa Ellmanovim reagensom, odnosno 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzojevim) anionom (DTNB) pri čemu nastaje žuto obojeni anion 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline.

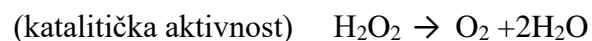


Reakcija se odvija pri neutralnom ili alkalnom pH.

Mjerenje se vrši u staklenoj kiveti volumena 1,5 ml, u koju ide reakcijska smjesa koju čini 1,4 ml fosfatnog pufera, 25  $\mu\text{l}$  DTNB, 40  $\mu\text{l}$  S9 i 35  $\mu\text{l}$  acetiltiokolin jodida. U referentnoj kiveti nalazi se samo fosfatni pufer. Mjeri se na 412 nm tijekom 30 sekundi.

## 2.8. Mjerenje aktivnosti katalaze (CAT)

Za mjerenje aktivnosti katalaze korištena je metoda po Claiborneu (1985.). Enzim katalaza katalizira reakciju razgradnje dvaju molekula  $\text{H}_2\text{O}_2$  na dvije molekule  $\text{H}_2\text{O}$ . Razgradnja vodikovog peroksida prati se na 240 nm, a razlika u apsorbanci po jedinici vremena mjera je aktivnosti enzima.



Mjerenje se vrši u kvarcnoj kiveti volumena 1,5, apsorbancija se mjeri na 240nm tijekom 30 sekundi. Reakcijska smjesa sastoji se od 780 $\mu\text{l}$  fosfatnog pufera, 20 $\mu\text{l}$  S9 i 700 $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Referentna kiveta sadrži samo fosfatni pufer.

## 2.9. Mjerenje aktivnosti glutation S-transferaze (GST)

Za mjerenje aktivnosti glutation S-transferaze korištena je metoda po Habigu (1974.).

Glutation S-transferaza katalizira konjugaciju L-glutaciona sa 1-kloro-2,4-dinitrobenzenom (CDNB) kroz tiolnu skupinu L-glutaciona:



Brzina porasta apsorbancije direktno je proporcionalna aktivnosti GST u uzorku.

Mjerenje se vrši u kiveti volumena 1,5 ml, apsorbancija se mjeri na 340 nm tijekom 30 sekundi. Reakcijska smjesa sastoji se od 1 ml CDNB, 250  $\mu\text{l}$  GSH i 25  $\mu\text{l}$  S9. Referentna kiveta sadrži samo fosfatni pufer.

## 2.10. Određivanje metalotioneina (MT)

Za spektrofotometrijsko određivanje metalotioneina korištena je metoda po Linde i Garcia-Vazquez (2006).

Postupak određivanja metalotioneina odvija se u nekoliko stupnjeva. Nakon homogenizacije tkiva slijedi koncentriranje otopine metalotioneina tako da se izdvoji 200  $\mu\text{l}$  uzorka i u njega se doda 210  $\mu\text{l}$  hladnog apsolutnog etanola ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) i 16  $\mu\text{l}$  hladnog kloroforma ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Dobiveni uzorci se vorteksiraju i centrifugiraju na 6000g tijekom 10 minuta. Supernatant je izdvojen i odliven u Eppendorf epruvetice od 1,5 ml. U supernatant se zatim doda 1050  $\mu\text{l}$  hladnog apsolutnog etanola ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Uzorak se vorteksira i pohrani na  $-20^{\circ}\text{C}$  1 sat.

Zatim je slijedi postupak pročišćavanja i kvantifikacije metalotioneina. Dobiveni uzorci secentrifugiraju na 6000g tijekom 10 minuta ( $0 - 4^{\circ}\text{C}$ ). dobiveni talog se sačuva i resuspendira sa 60  $\mu\text{l}$  5 mM tris-HCl + 1 mM EDTA(etilendiaminotetraoctena kiselina), pH7. Talog se potpuno otopi i potom vorteksira. U resuspendiranu frakciju metalotioneina doda se 840  $\mu\text{l}$  0,43 mM DTNB(5,5'- ditio-bis-(2-nitrobenzojeva kiselina)) + 0,2 M fosfatni pufer,



pH=8.dobiveni uzorak ostavi se 30 min na sobnoj temperaturi apsorbancija se očitava na 412nm.

U referentnoj kiveti nalazi se 0,43 mM DTNB + 0,2 M fosfatni pufer, pH=8. Koncentracija metalotioneina izračunava se iz kalibracijske krivulje GSH (glutation, reducirani).

## **2.11.Određivanje reaktivne supstance 2-tiobarbiturne kiseline–TBARS**

Korištena je metoda prema Buege i Aust (1978).

Malondialdehid je produkt lipidne peroksidacije. Jedna molekula malondialdehida reagira sa dvije molekule 2-tiobarbiturne kiseline u kiselom mediju) u reakciji Knoevenagel-ove kondenzacije, pri čemu nastaje kromofor sa maksimumom apsorpcije na 532 nm.

Uzorak razrijediti 5x (100µl S9 + 400 µl fosfatnog pufera). u slijepoj probi nalazi se samopufer (500µl) i dalje se obrađuje kao i uzorci. Zatim se pomiješa 500µl uzorka S9 i 1ml TCA-TBA-HCl. Kratko se vorteksira te se uzorci, u vodenoj kupelji, zagrijavaju na 100 °C tijekom 15 min. Uzorci se zatim ohlade na sobnu temperaturu, te se uklanja pahuljasti precipitat centrifugiranjem 10 min na 15000g.

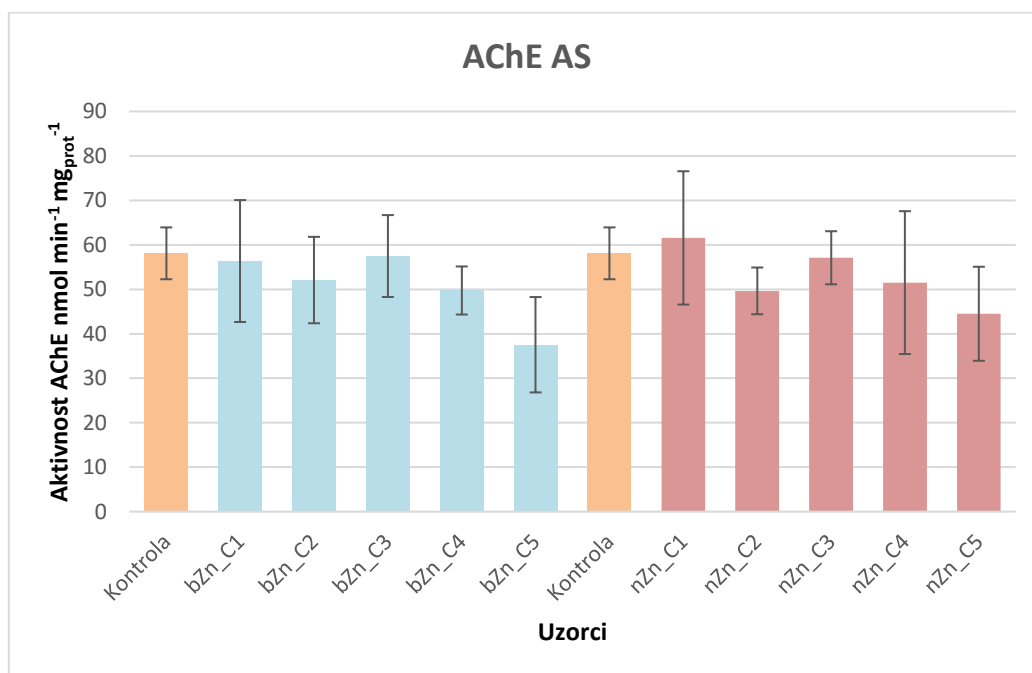
Apsorbanca uzorka se očitava na 532 nm. Pri mjerenju koristi se staklena kiveta, u referentnoj kiveti nalazi se slijepa proba.

### 3. REZULTATI

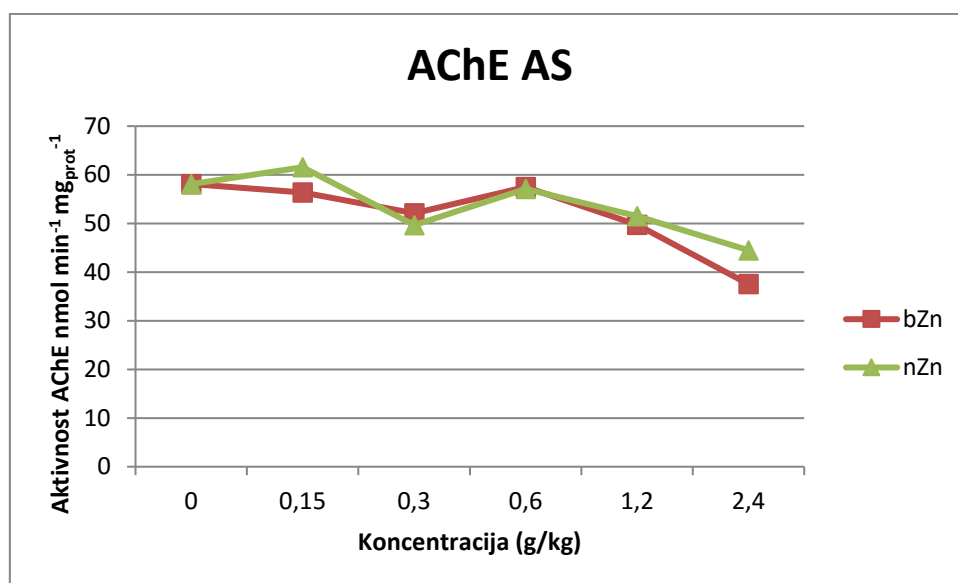
#### 3.1. Umjetno tlo (artificial soil AS)

##### 3.1.1. Aktivnost AChE u homogenatu gujavica

Rezultati mjerenja aktivnosti acetilkolin- esteraze prikazani su na slici 7 (a) i (b). Iz rezultata je vidljiva razlika aktivnosti enzima različitih uzoraka. Odnosno između kontrole i nekih uzoraka vidljiva je statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ). U odnosu na kontrolu, statistički značajnu, razliku vidimo kod uzoraka bZn\_C4 i bZn\_C5 (kod ne nanočestica), te nZn\_C2 i nZn\_C5. Usporedbom rezultata između istih koncentracija ne nanočestica ZnO i nanočestica ZnO nije utvrđena statistički značajna razlika. Uz pomoć izmjerenih apsorbanci izračunata je specifična enzimska aktivnost za uzorke i utvrđene su sljedeće srednje vrijednosti bZn\_C4 ( $49,73477 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ), bZn\_C5 ( $37,53151 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}_{\text{prot}}^{-1}$ ), nZn\_C2 ( $49,64811 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}_{\text{prot}}^{-1}$ ), nZn\_C5 ( $44,4958 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}_{\text{prot}}^{-1}$ ) i za kontrolu ( $58,09743 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}_{\text{prot}}^{-1}$ ).



7 (a)- usporedba vrijednosti mjerenja aktivnosti AChE svih koncentracija ZnO

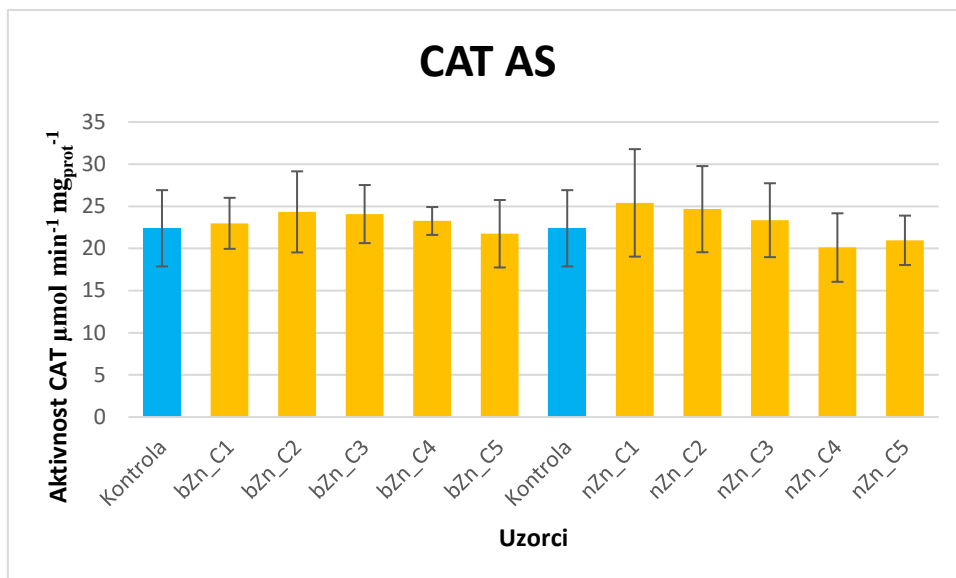


7 (b)- usporedba parova vrijednosti nanočestica ZnO i nenanočestica ZnO

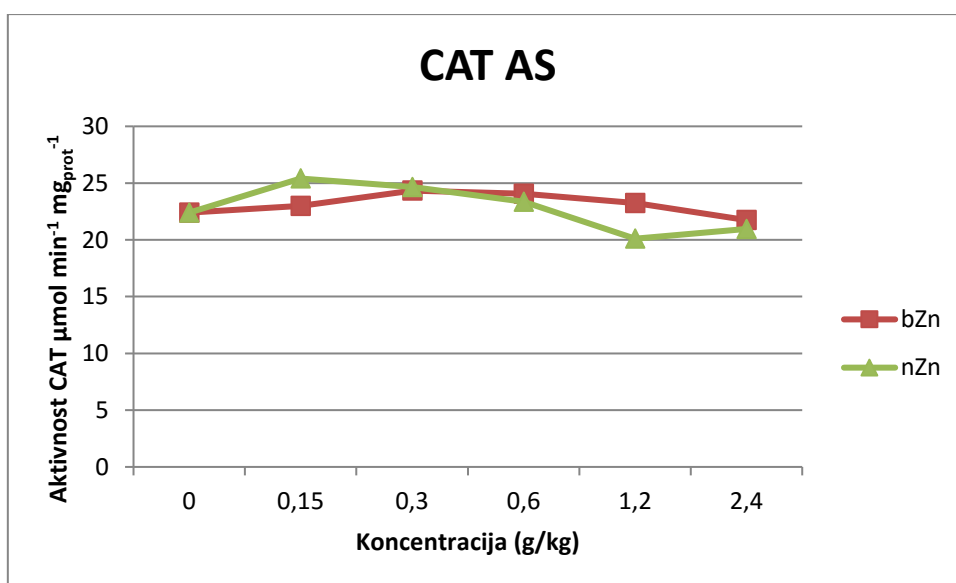
Slika 7 (a) i (b) - aktivnost AChE u homogenatu gujavica

### 3.1.2. Aktivnost katalaze (CAT)

Rezultati mjerenja aktivnosti katalaze prikazani su na slici 8 (a) i (b). Iz rezultata nije vidljiva statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) niti kod ne nanočestica ZnO niti kod nanočestica ZnO u odnosu na kontrolu. Usporedbom istih koncentracija ne nanočestica ZnO i nanočestica ZnO, također nije utvrđena statistički značajna razlika, na niti jednoj koncentraciji.



8 (a)- usporedba vrijednosti mjerenja aktivnosti CAT svih koncentracija ZnO



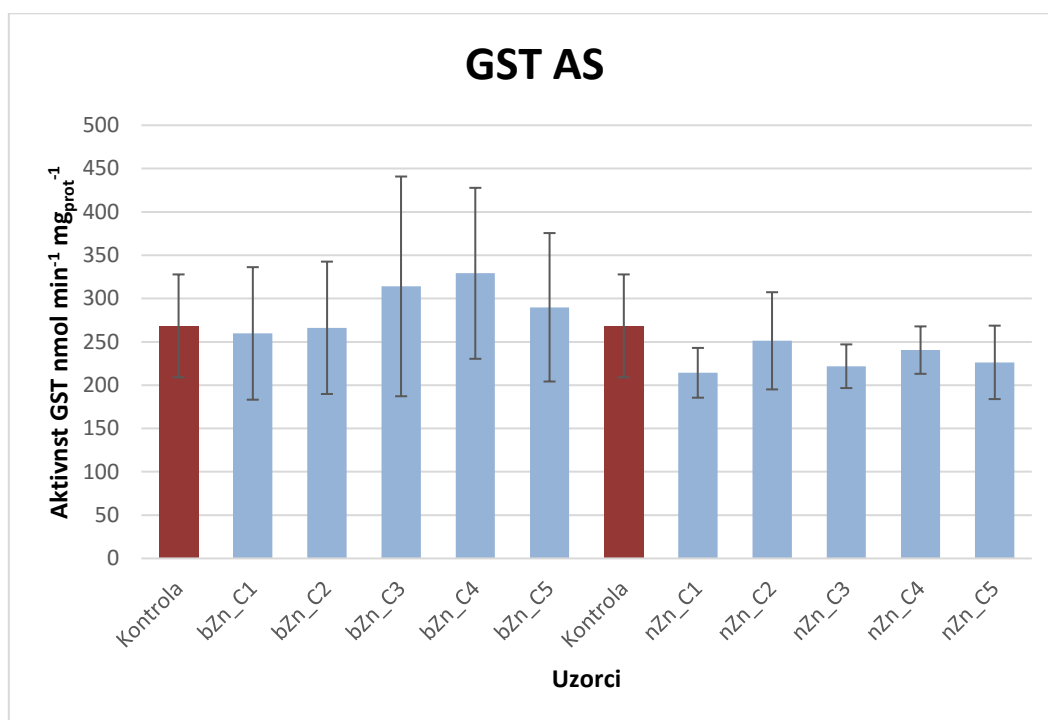
8 (b)- Usporedba parova vrijednosti nanočestica ZnO i nenanočestica ZnO

Slika 8 (a) i (b) - aktivnost CAT u homogenatu gujavica

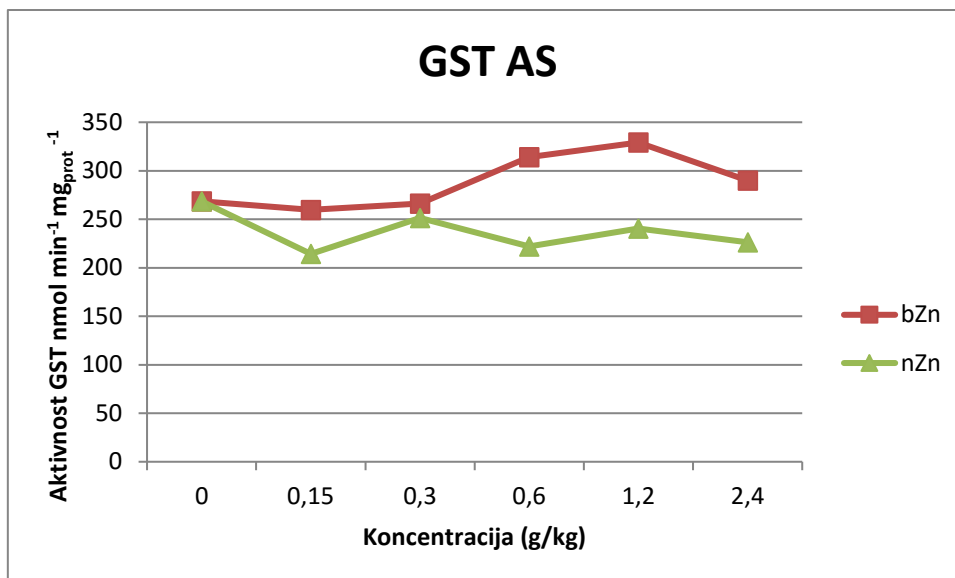
### 3.1.3. Aktivnost glutation S-transferaze (GST)

Rezultati mjerenja aktivnosti glutation S- transferaze (GST) prikazano je na slici 9 (a) i (b).

Iz rezultata nije vidljiva statistički značajna razlika između aktivnosti GST kod ne nanočestica i nanočestica ZnO u odnosu na kontrolu. Usporedbom rezultata kod istih koncentracija ne nanočestica i nanočestica ZnO uočena je statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) kod nZn\_C4/bZn\_C4. Za navedene koncentracije izmjerena je apsorbancija za sve uzorke izložene ne nanočesticama ZnO, nanočesticama ZnO i kontrolu uz pomoć kojih je izračunata specifična enzimska aktivnost te njezina srednja vrijednost koja je za bZn\_C4 ( $329,117 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}_{\text{prot}}^{-1}$ ) i za nZn\_C4 ( $240,4741 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}_{\text{prot}}^{-1}$ ).



9 (a)- Usporedba vrijednosti mjerenja aktivnosti GST svih koncentracija ZnO



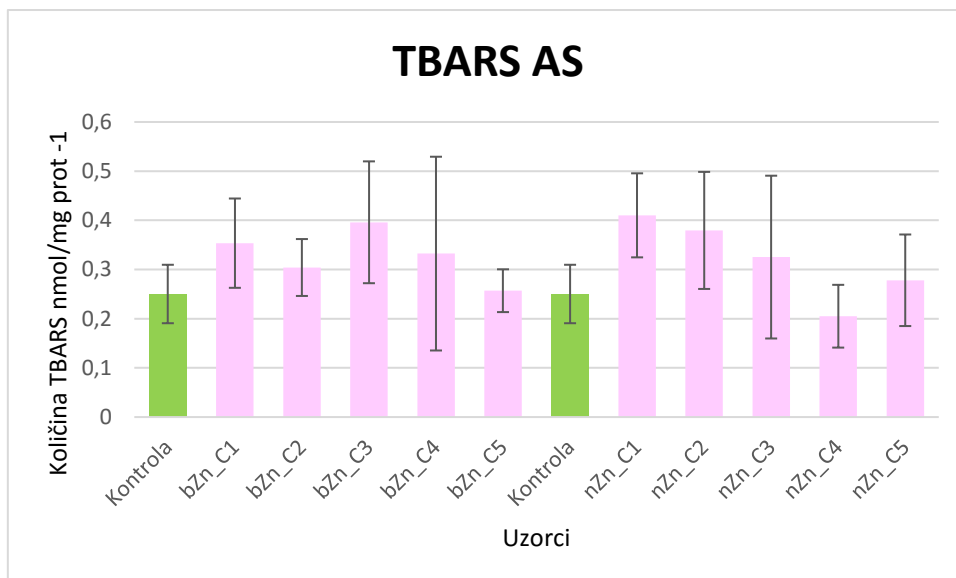
9 (b)- Usporedba parova vrijednosti nanočestica ZnO i nenanočestica ZnO

Slika 9 (a) i (b) - aktivnost GST u homogenatu gujavica

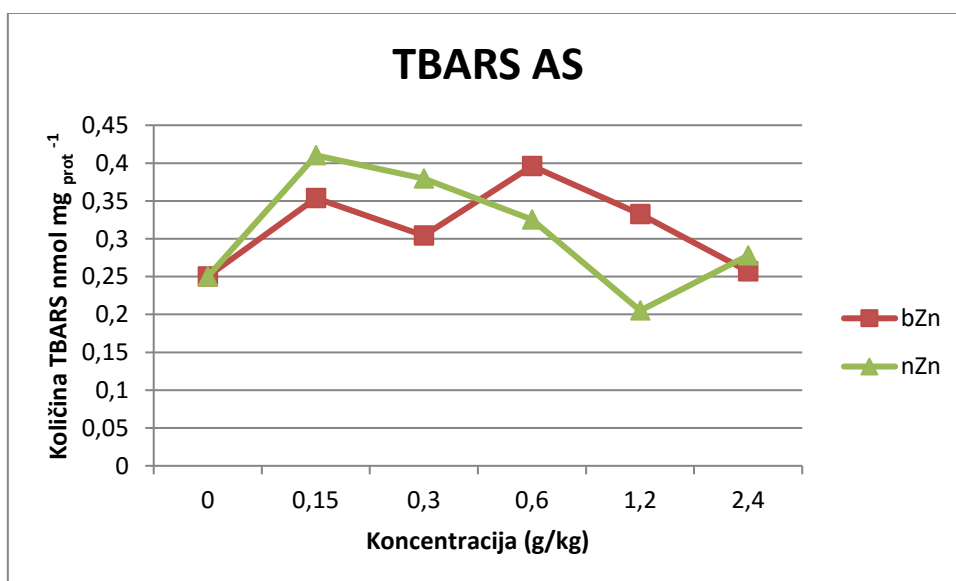
### 3.1.4. Mjerenje TBARS - reaktivne supstance 2-tiobarbiturne kiseline

Rezultati mjerenja TBARS prikazano je na slici 10 (a) i (b).

Iz rezultata mjerenja vidljiva je statistički značajna razlika na uzorcima nZn\_C2, bZn\_C3, nZn\_C1 i bZn\_C1 u odnosu na kontrolu. Za navedene koncentracije izmjerena je apsorbancija za sve uzorke izložene nenanočesticama, nanočesticama ZnO i kontrolu te je uz pomoć apsorbance izračunata količina MDA te njihova srednja vrijednost za svaku koncentraciju za nZn\_C2 (0,379538 nmolmg<sub>prot</sub><sup>-1</sup>), bZn\_C3(0,396039604 nmolmg<sub>prot</sub><sup>-1</sup>), nZn\_C1(0,410184 nmolmg<sub>prot</sub><sup>-1</sup>) i bZn\_C1(0,353607 nmolmg<sub>prot</sub><sup>-1</sup>). Usporedbom mjerenja T-BARS istih koncentracija ne nanočestica ZnO i nanočestica ZnO nije uočena statistički značajna razlika.



10 (a)- usporedba vrijednosti mjerenja prisutnosti TBARS svih koncentracija ZnO



10 (b)- Usporedba parova vrijednosti nanočestica ZnO i nenanočestica ZnO

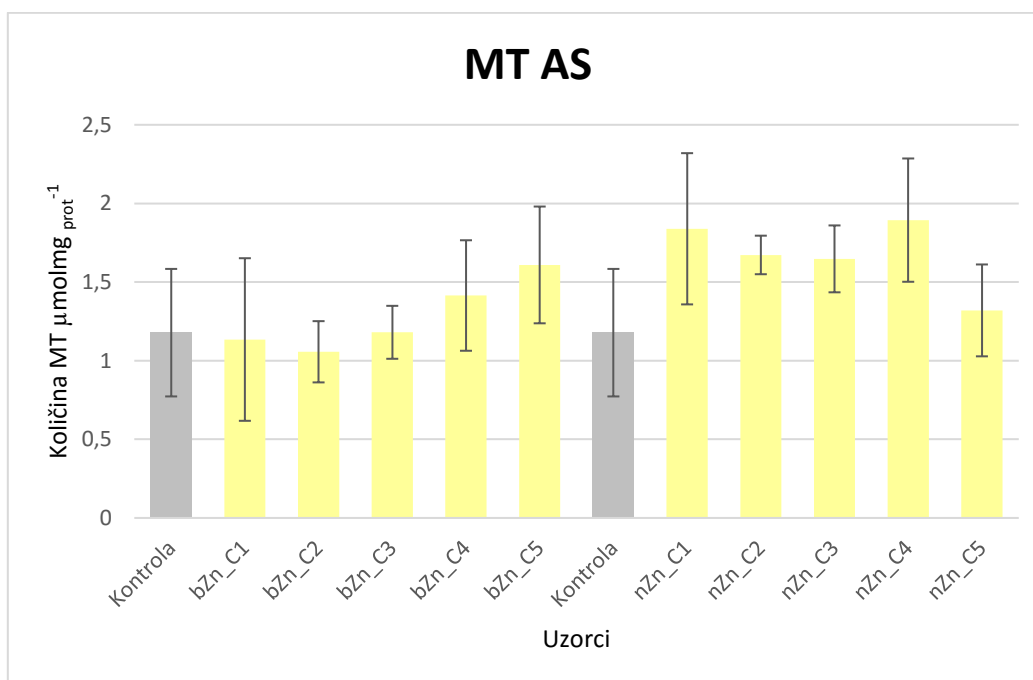
Slika 10 (a) i (b) - TBARS u homogenatu gujavica

### 3.1.5. Mjerenje metalotioneina MT

Rezultati mjerenja metalotioneina prikazana su na slici 11 (a) i (b).

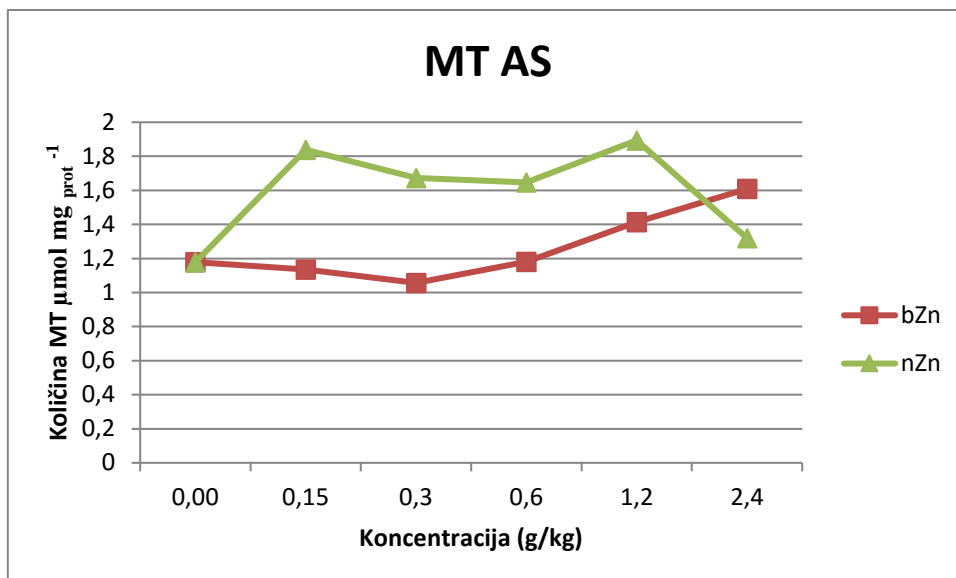
Iz rezultata je vidljiva statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između uzoraka i kontrole i to za koncentracije nZn\_C1, nZn\_C2, nZn\_C3 i nZn\_C4. Za navedene koncentracije izmjerena je apsorbancija za sve uzorke te uz pomoć iste izračunata je količina MTu uzorku iz kojih je izračunata srednja vrijednost za nZn\_C1( $1,838755 \mu\text{molmg}_{\text{prot}}^{-1}$ ), nZn\_C2( $1,672352 \mu\text{molmg}_{\text{prot}}^{-1}$ ), nZn\_C3( $1,647392 \mu\text{molmg}_{\text{prot}}^{-1}$ ) i nZn\_C4( $1,893876 \mu\text{molmg}_{\text{prot}}^{-1}$ ) te za kontrolu ( $1,178169 \mu\text{molmg}_{\text{prot}}^{-1}$ ).

Usporedbom mjerenja metalotioneina istih koncentracija ne nanočestica ZnO i nanočestica ZnO uočena je statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) na slijedećim koncentracijama bZn\_C1/nZn\_C1, bZn\_C2/nZn\_C2 i bZn\_C3/nZn\_C3. Za navedene koncentracije izmjerena je apsorbancija za sve uzorke izložene nanočesticama ZnO i kontrolui izračunata je srednja vrijednost i to za nZn\_C1( $1,838755 \mu\text{molmg}_{\text{prot}}^{-1}$ ), nZn\_C2( $1,672352 \mu\text{molmg}_{\text{prot}}^{-1}$ ), nZn\_C3( $1,647392 \mu\text{molmg}_{\text{prot}}^{-1}$ ), bZn\_C1( $1,134662 \mu\text{molmg}_{\text{prot}}^{-1}$ ), bZn\_C2 ( $1,05666 \mu\text{molmg}_{\text{prot}}^{-1}$ ) i bZn\_C3( $1,180423 \mu\text{molmg}_{\text{prot}}^{-1}$ ).



11 (a)- Usporedba vrijednosti mjerenja prisutnosti MT svih koncentracija ZnO





11 (b)- Usporedba parova vrijednosti nanočestica ZnO i nenanočestica ZnO

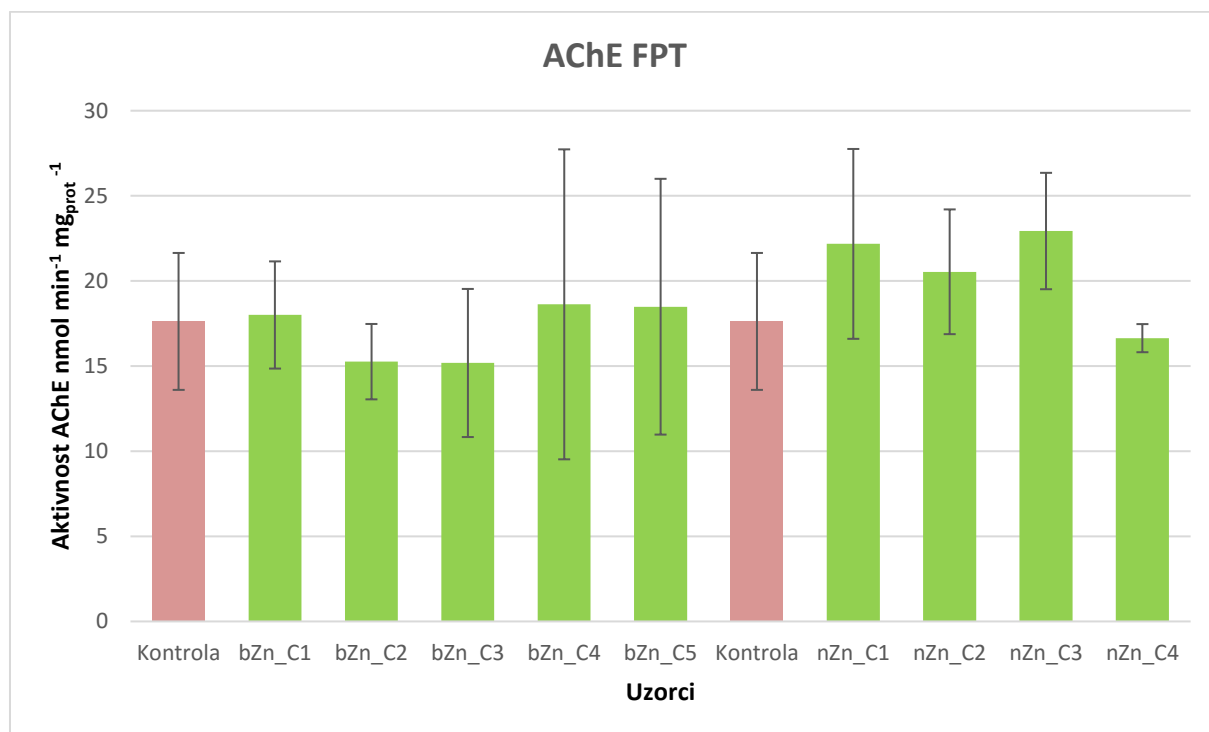
Slika 11 (a) i (b) – MT u homogenatu gujavica

## 3.2. Kontakt test na filter papiru (Filter paper contact test- FPT)

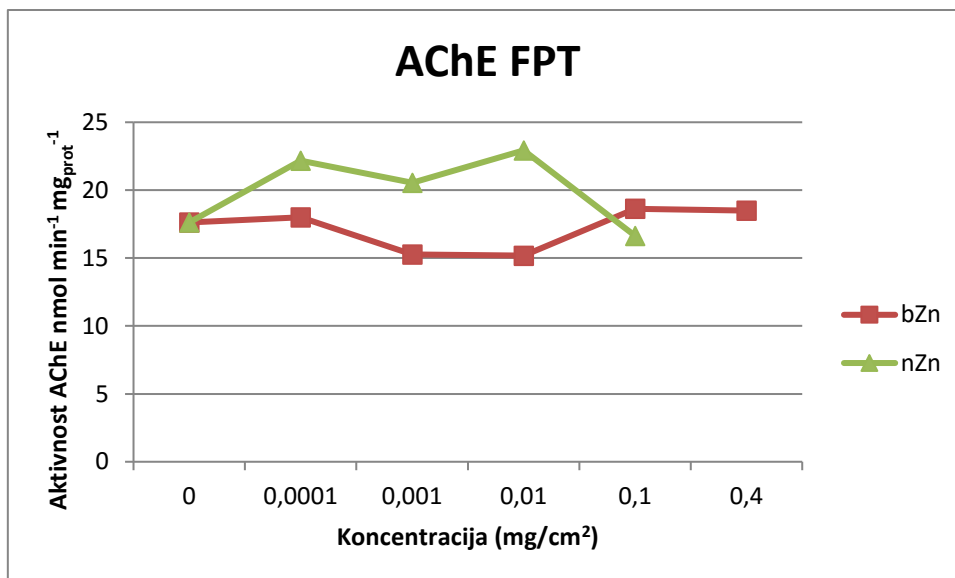
### 3.2.1. Aktivnost acetilkolin – esteraze AChE

Rezultati mjerenja aktivnosti AChE prikazani su na slici 12 (a) i (b).

Iz rezultata je vidljiva statistički značajna razlika između kontrole i nZn\_C3. Izmjerena je apsorbanca za sve uzorke izložene ne nanočesticama, nanočesticama ZnO i kontrolu i izračunata je specifična enzimska aktivnost i srednja vrijednost iste tako je za nZn\_C3 (22,932  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) i za kontrolu (17,6234  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ). Usporedbom rezultata istih koncentracija ne nanočestica ZnO i nanočestica ZnO utvrđena je statistički značajna razlika i to između bZn\_C2/nZn\_C2 i bZn\_C3/nZn\_C3. Izmjerena aktivnost bila je sljedeća bZn\_C2(15,26  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ), nZn\_C2(20,538  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ), bZn\_C3(15,181  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) i nZn\_C3(22,932  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ).



12 (a)- Usporedba vrijednosti mjerenja aktivnosti AChE svih koncentracija ZnO



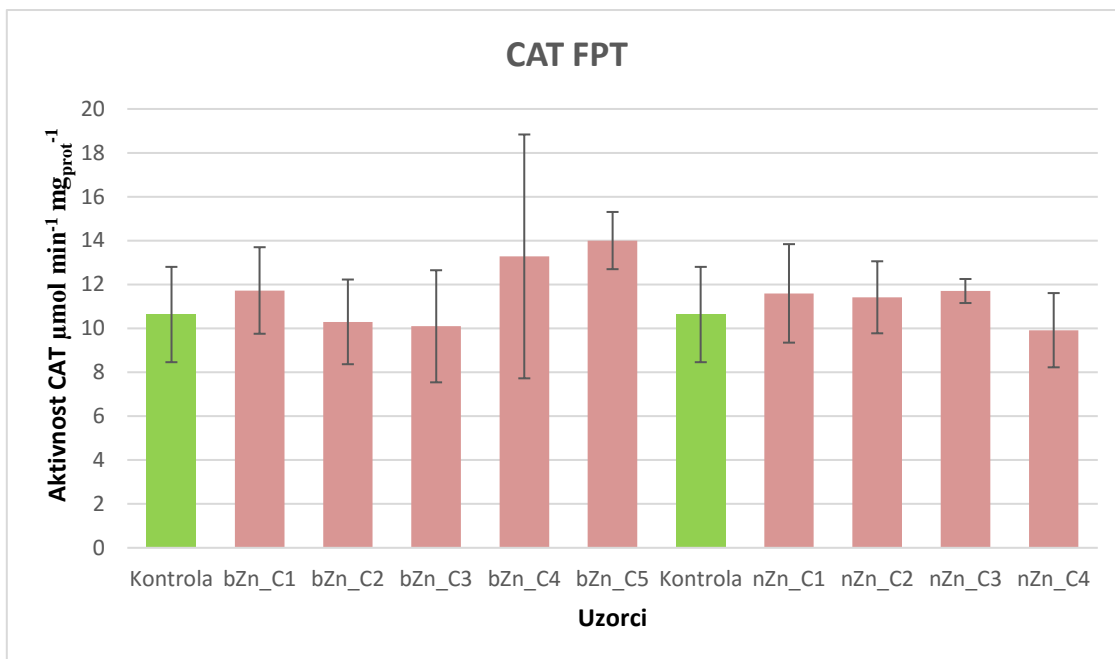
12 (b)- Usporedba parova vrijednosti nanočestica ZnO i nenanočestica ZnO

Slika 12 (a) i (b) – AChE u homogenatu gujavica

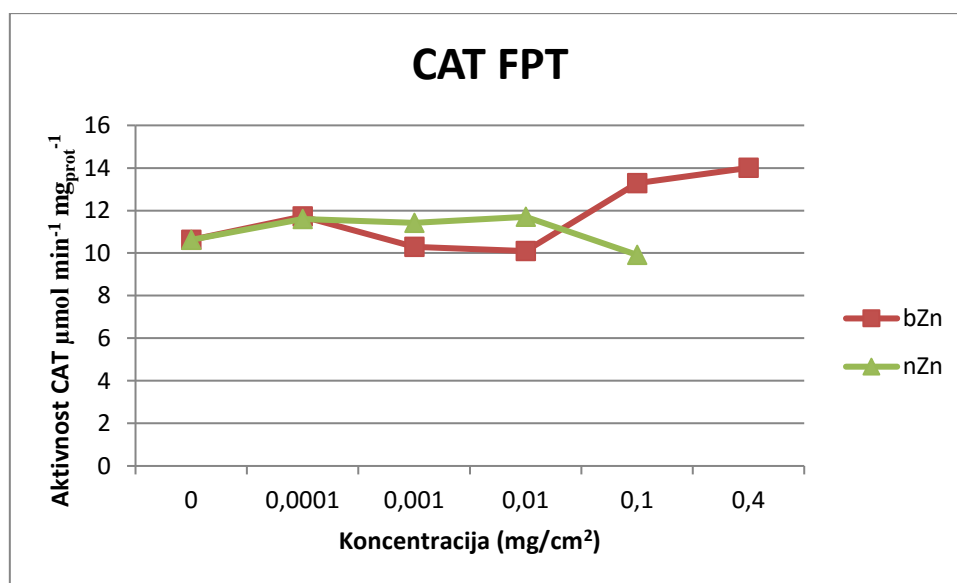
### 3.2.2. Mjerenje aktivnosti katalaze (CAT)

Rezultati mjerenja aktivnosti katalaze (CAT) prikazana je na slici 13 (a) i (b).

Iz rezultata je vidljiva statistički značajna razlika između koncentracije i bZn\_C5. Izmjerena je apsorbancija za sve uzorke izložene ne nanočesticama, nanočesticama ZnO i kontrolu i izračunata specifična enzimski aktivnost i srednja vrijednost za bZn\_C5 (14,002  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}_{\text{prot}}^{-1}$ ) i kontrola (10,6307  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}_{\text{prot}}^{-1}$ ). Usporedbom rezultata istih koncentracija ne nanočestica ZnO i nanočestica ZnO nije uočena statistički značajna razlika.



13 (a)- Usporedba vrijednosti mjerenja aktivnosti CAT svih koncentracija ZnO



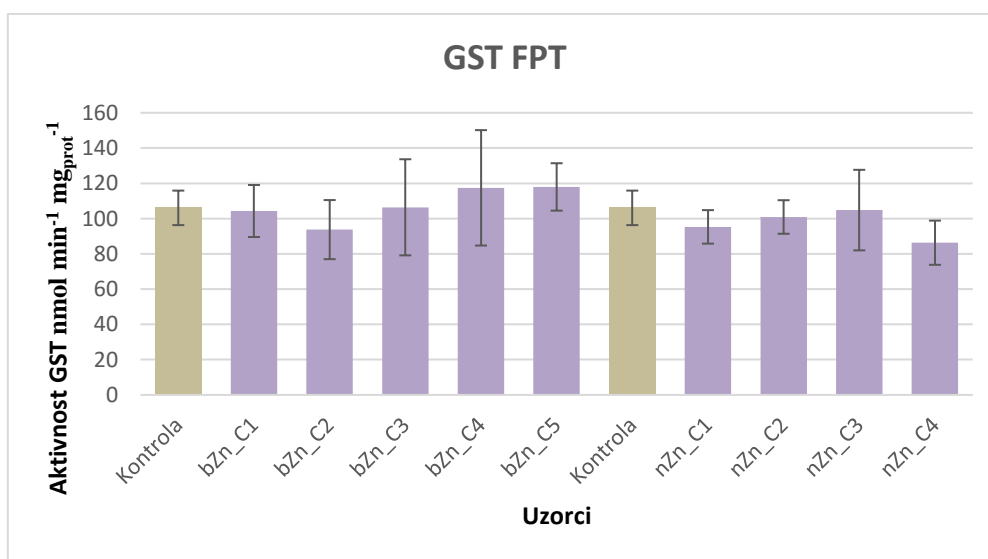
13 (b)- Usporedba parova vrijednosti nanočestica ZnO i nenanočestica ZnO

Slika 13 (a) i (b) – CAT u homogenatu gujavica

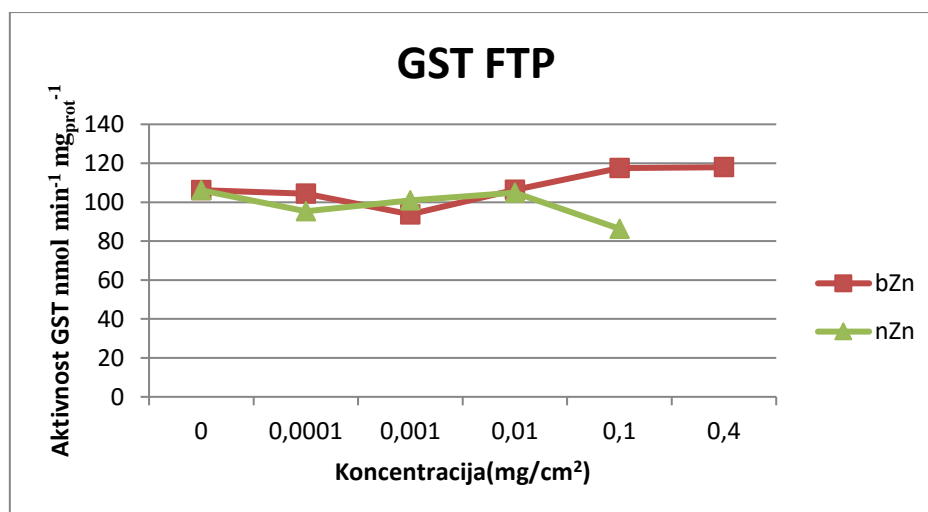
### 3.2.3. Mjerenje aktivnosti glutation S- transferaze (GST)

Rezultati mjerenja glutation S- transferaze (GST) prikazani su na slici 14 (a) i (b).

Iz rezultata je vidljiva statistički značajna razlika između kontrole i nZn\_C4. Izmjerena je apsorbanca za sve uzorke izložene ne nanočesticama, nanočesticama ZnO i kontrolu i izračunata je specifična enzimska aktivnost i njen srednja vrijednost koja je za nZn\_C4 iznosila  $86,328 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}_{\text{prot}}^{-1}$  i kontrola  $106,1 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}_{\text{prot}}^{-1}$ . Usporedbom istih koncentracija nanočestica ZnO i ne nanočestica ZnO nije utvrđena statistički značajna razlika.



14 (a)- Usporedba vrijednosti mjerenja aktivnosti GST svih koncentracija ZnO



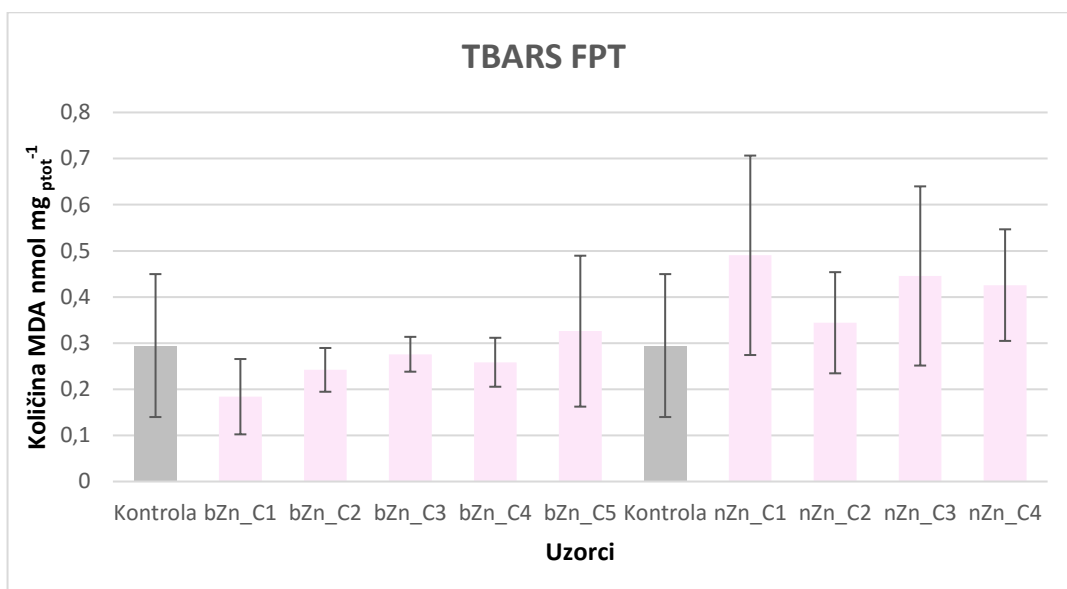
14 (b)- Usporedba parova vrijednosti nanočestica ZnO i nenanočestica ZnO

Slika 14 (a) i (b) – GST u homogenatu gujavica

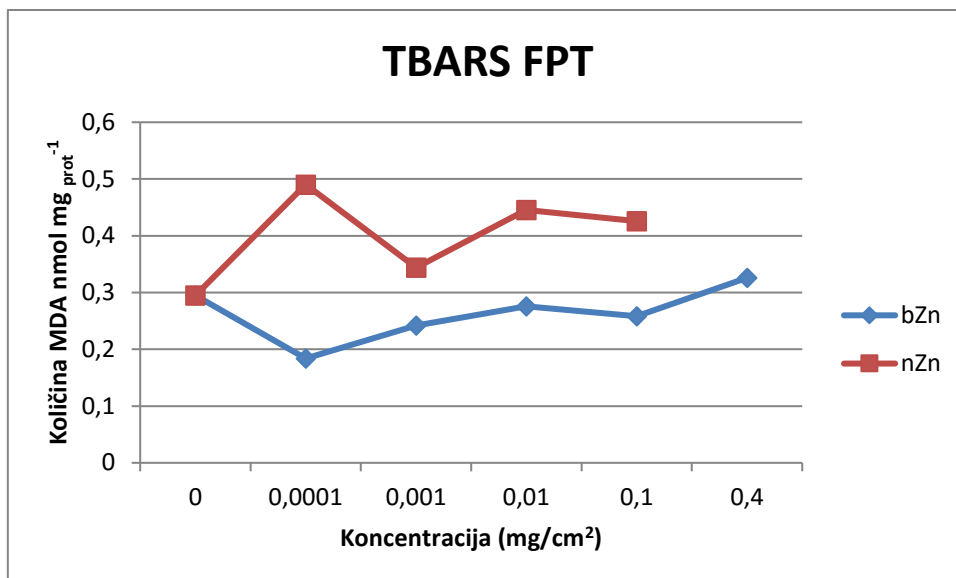
### 3.2.4. Mjerenje TBARS - reaktivne supstance 2-tiobarbiturne kiseline

Rezultati mjerenja TBARS prikazani su na slici 15 (a) i (b).

Usporedbom rezultata različitih koncentracija ne nanočestica ZnO i nanočestica ZnO i koncentracije nije uočena statistički značajna razlika. Razlika između uzoraka uočena je usporedbom istih koncentracija ne nanočestica ZnO sa istim koncentracijama nanočestica ZnO i to na bZn\_C1/nZn\_C1 i bZn\_C3/nZn\_C3. Izmjerene su apsorbance za sve uzorke izložene različitim koncentracijama ZnO i kontrolu i zatim izračunata količina i njezine srednje vrijednosti za bZn\_C1 ( $0,183876 \text{ nmol mg}_{\text{prot}}^{-1}$ ), nZn\_C1 ( $0,490335 \text{ nmol mg}_{\text{prot}}^{-1}$ ), bZn\_C3 ( $0,275813 \text{ nmol mg}_{\text{prot}}^{-1}$ ) i nZn\_C3 ( $0,445545 \text{ nmol mg}_{\text{prot}}^{-1}$ ) i kontrola ( $0,294672 \text{ nmol mg}_{\text{prot}}^{-1}$ ).



15 (a)- Usporedba vrijednosti mjerenja prisutnosti TBARS svih koncentracija ZnO



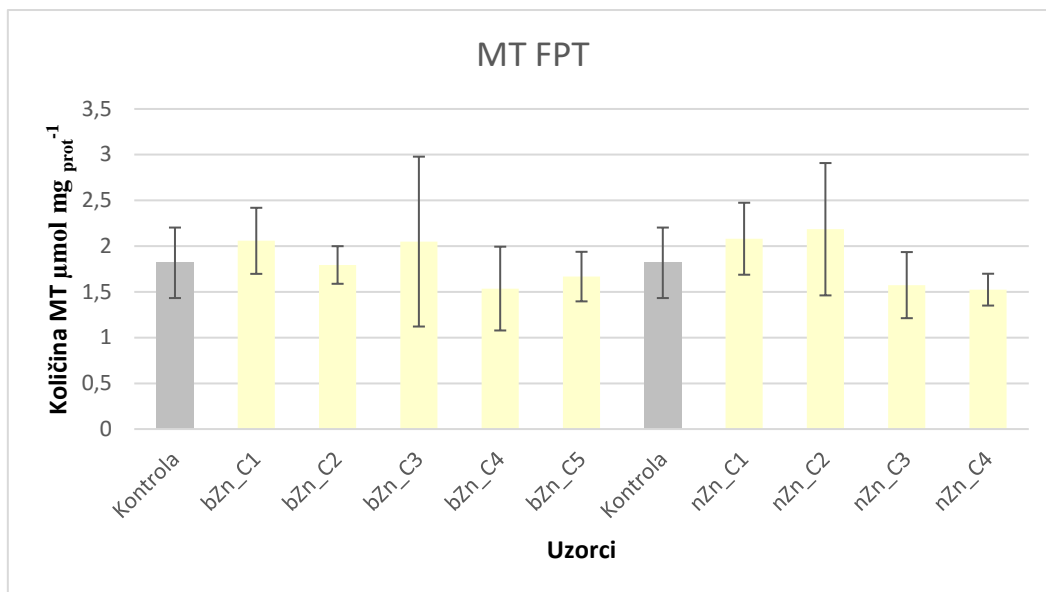
15 (b)- Usporedba parova vrijednosti nanočestica ZnO i nenanočestica ZnO

Slika 15 (a) i (b) – TBARS u homogenatu gujavica

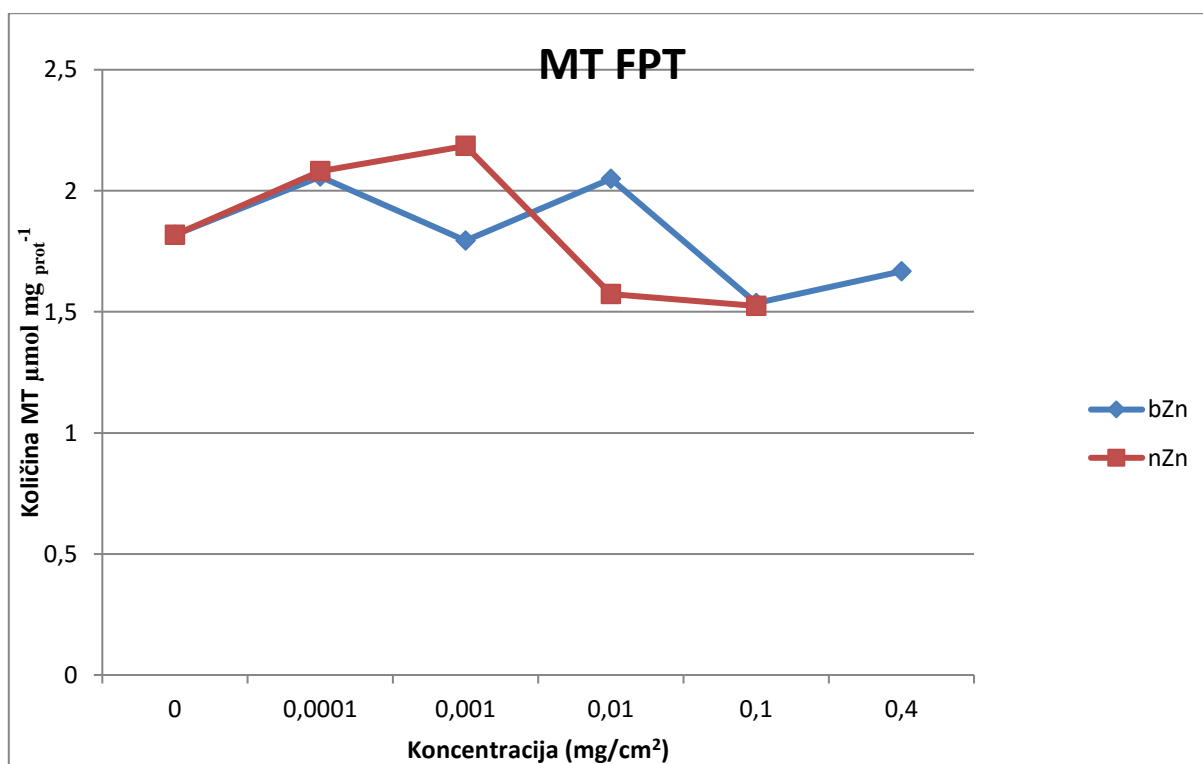
### 3.2.5. Mjerenje metalotioneina (MT)

Rezultati mjerenja metalotioneina vidljivi su na slici 16 (a) i (b).

Usporedbom rezultata mjerenja između koncentracije i različitih koncentracija ne nanočestica ZnO i nanočestica ZnO nije utvrđena statistički značajna razlika. Usporedbom rezultata mjerenja istih koncentracija ne nanočestica ZnO i nanočestica ZnO iste koncentracije utvrđeno je da nema statistički značajne razlike.



16 (a)- usporedba vrijednosti mjerenja prisutnosti MT svih koncentracija ZnO



16 (b)- Usporedba parova vrijednosti nanočestica ZnO i nenanočestica ZnO

Slika 16 (a) i (b) – MT u homogenatu gujavica

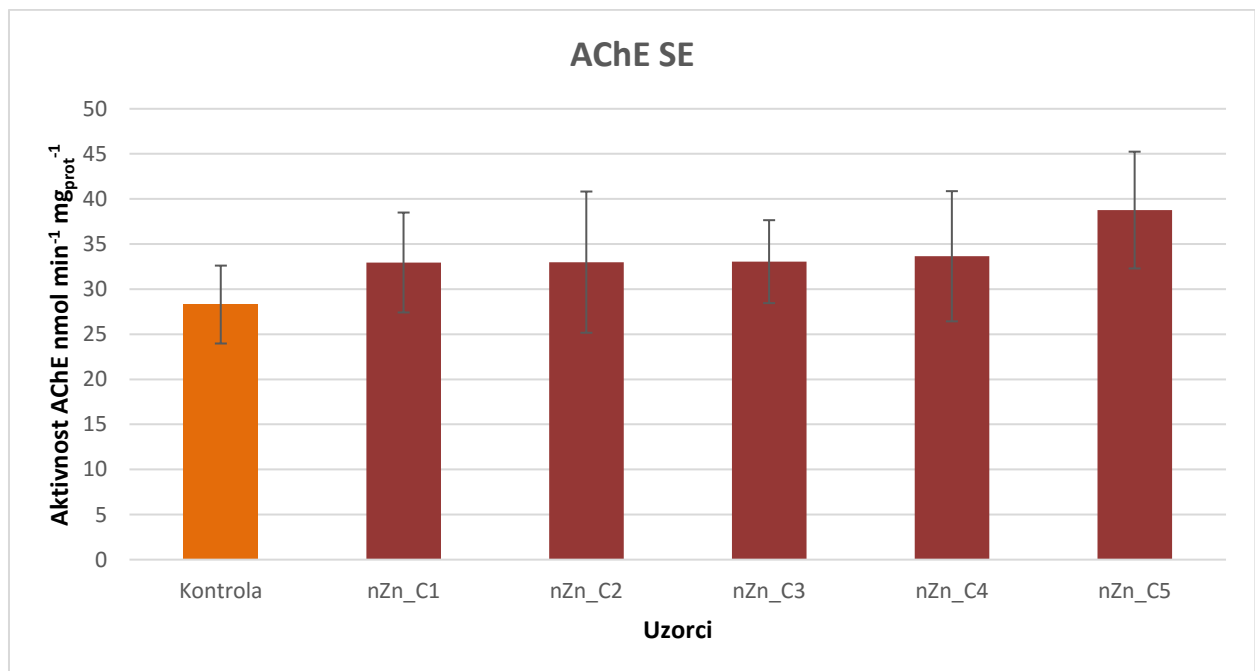


### 3.3. Ekstrakt tla (Soil extract test SE)

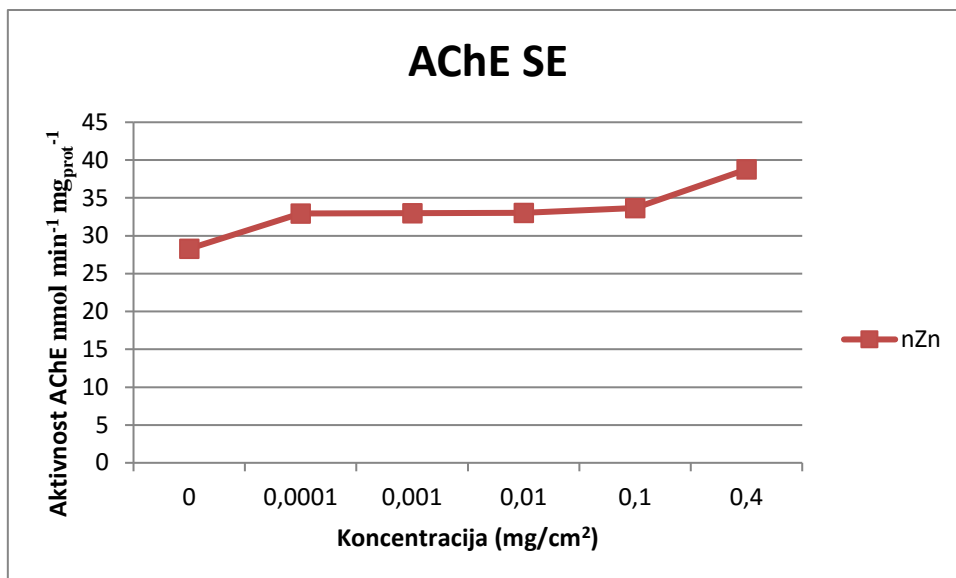
#### 3.3.1. Mjerenje aktivnosti AChE

Rezultati mjerenja aktivnosti AChE vidljivi su na slici 17 (a) i (b).

Usporedbom rezultata između kontrole i različitih koncentracija nanočestica ZnO uočena je statistički značajna razlika između kontrole i nZn\_C5. Izmjerena je apsorbancija za sve uzorke izložene različitim koncentracijama nanočestica ZnO i kontrolu i izračunata je specifična enzimska aktivnost i srednja vrijednost za nZn\_C5 ( $38,76838 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ) i kontrola ( $28,29044 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ).



17 (a)- Usporedba vrijednosti mjerenja aktivnosti AChE svih koncentracija ZnO



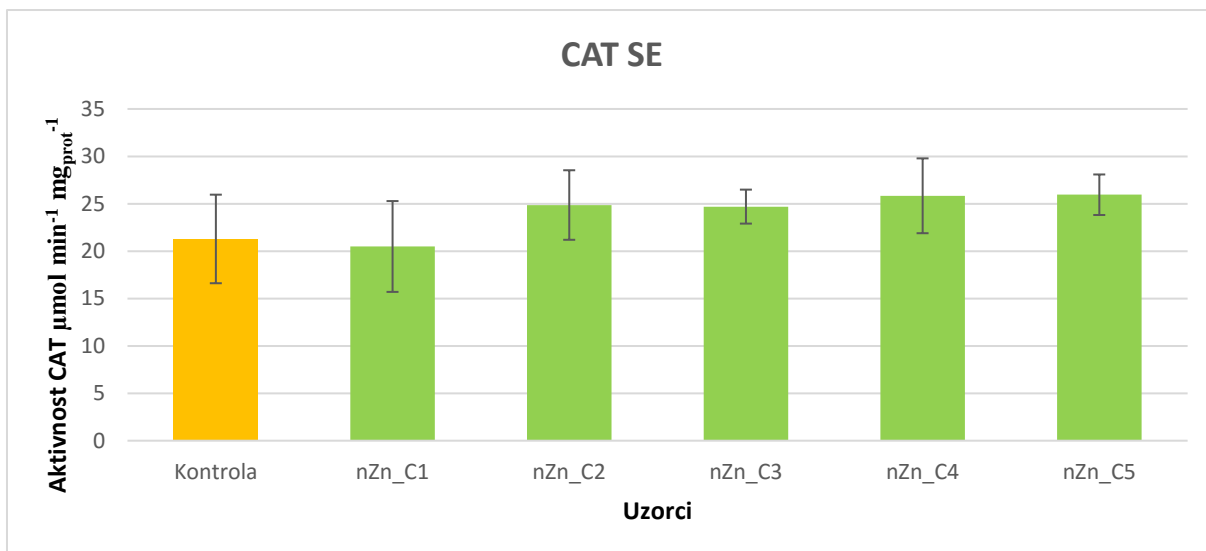
17 (b)- Usporedba parova vrijednosti nanočestica ZnO i nenanočestica ZnO

Slika 17 (a) i (b) – aktivnosti AChE u homogenatu gujavica

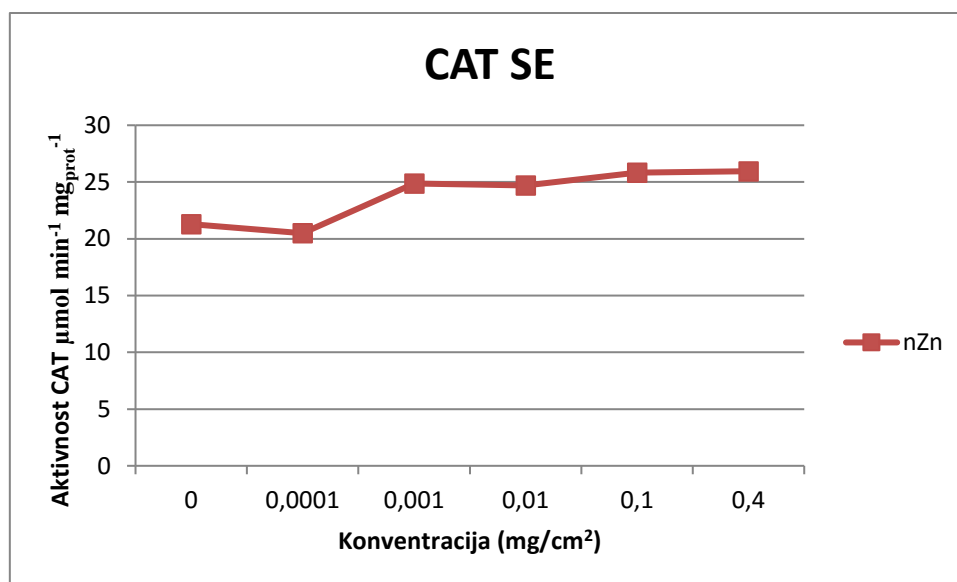
### 3.3.2. Mjerenje aktivnosti katalaze (CAT)

Rezultati mjerenja aktivnosti katalaze (CAT) vidljivi su na slici 18 (a) i (b).

Usporedbom rezultata mjerenja aktivnosti CAT između kontrole i različitih koncentracija nanočestica ZnO, utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između kontrole i nZn\_C5. Izmjerene su apsorbance svih uzoraka izloženih nanočesticama ZnO i kontrolu i izračunata specifična enzimska aktivnost i srednja vrijednost koja je iznosila za nZn\_C5 ( $25,9502 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}_{\text{prot}}^{-1}$ ) i kontrolu ( $21,28604 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}_{\text{prot}}^{-1}$ ).



18 (a)- Usporedba vrijednosti mjerenja aktivnosti CAT svih koncentracija ZnO



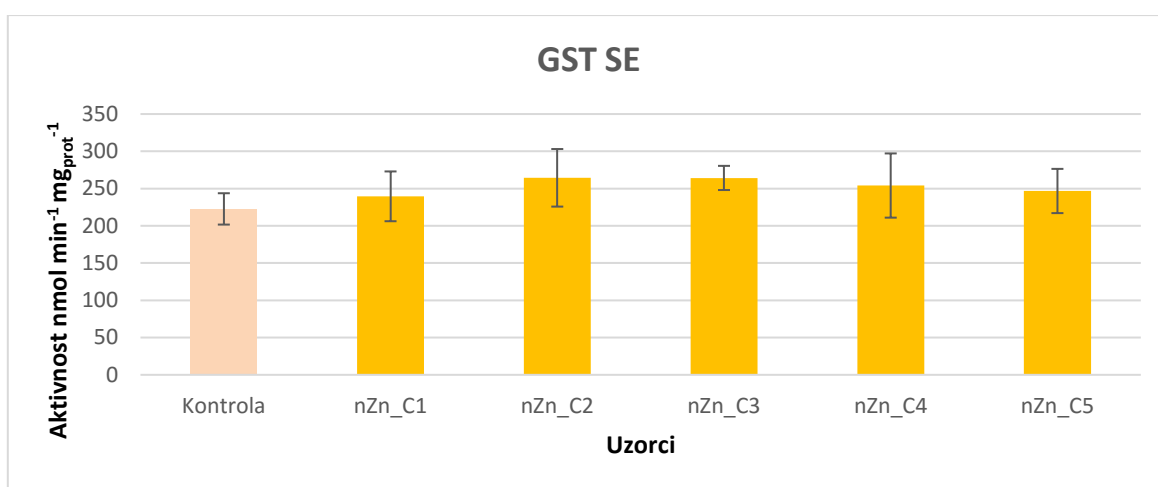
18 (b)- Usporedba parova vrijednosti nanočestica ZnO i nenanočestica ZnO

Slika 18 (a) i (b) – aktivnosti CAT u homogenatu gujavica

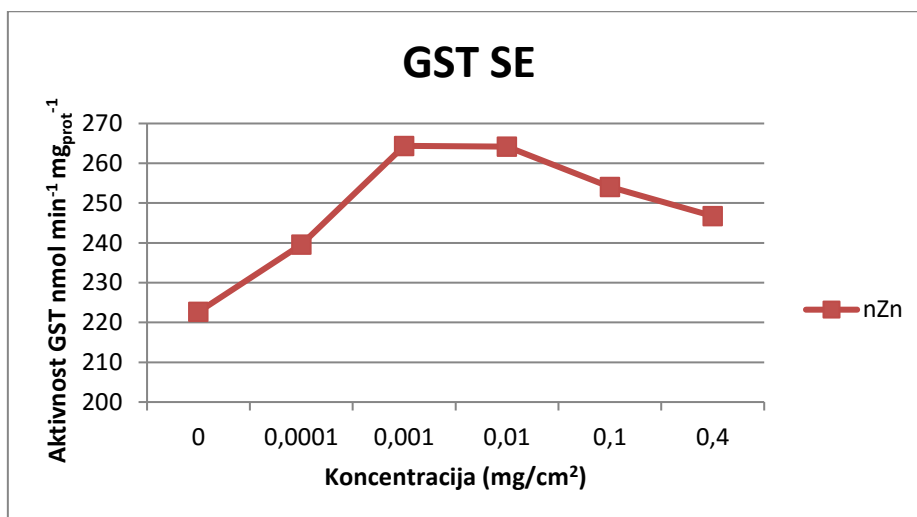
### 3.3.3. Mjerenje aktivnosti glutation S- transferaze (GST)

Rezultati mjerenja aktivnosti glutation S- transferaze vidljivi su na slici 19 (a) i (b).

Usporedbom rezultata mjerenja aktivnosti GST između kontrole i različitih koncentracija nanočestica ZnO utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između kontrole i nZn\_C2 i nZn\_C3. Izmjerene su apsorbance za sve uzorke izložene različitim koncentracijama nanočestica ZnO i kontrolu i izračunata je specifična enzimska aktivnost i srednja vrijednost za sve koncentracije nZn\_C2 ( $264,3804 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}_{\text{prot}}^{-1}$ ) i nZn\_C3 ( $264,1982 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}_{\text{prot}}^{-1}$ ) i kontrola ( $222,6545 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}_{\text{prot}}^{-1}$ ).



19 (a)- Usporedba vrijednosti mjerenja aktivnosti GST svih koncentracija ZnO



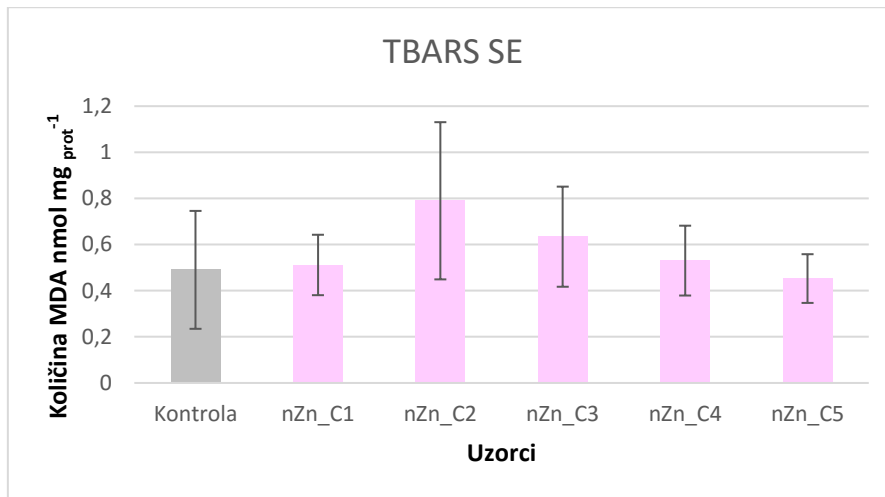
19 (b)- Usporedba parova vrijednosti nanočestica ZnO i nenanočestica ZnO

Slika 19 (a) i (b) – aktivnosti GST u homogenatu gujavica

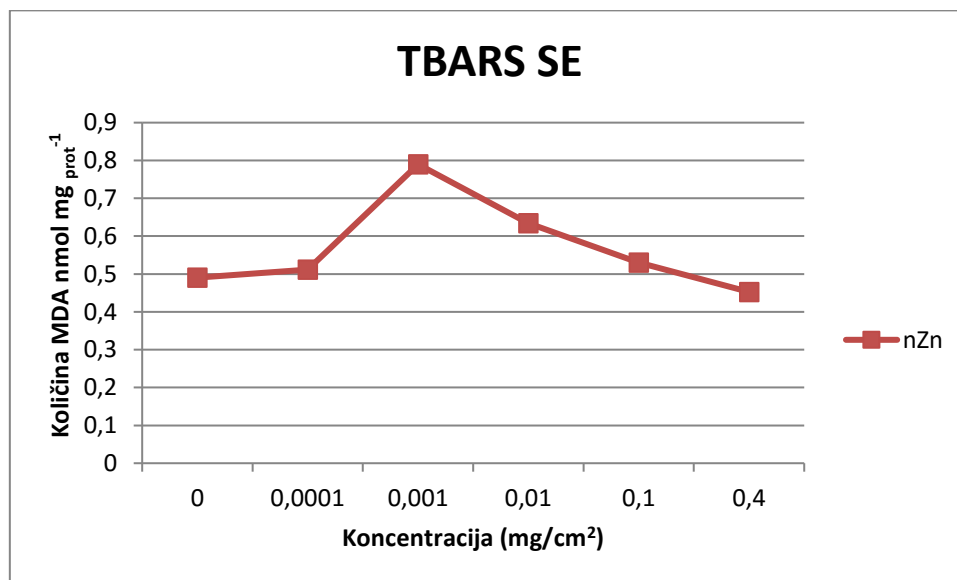
### 3.3.4. Mjerenje TBARS - reaktivne supstance 2-tiobarbiturne kiseline

Rezultati mjerenja T-BARS vidljivi su na slici 20 (a) i (b).

Usporedbom rezultata mjerenja utvrđeno je da nema statistički značajne razlike između kontrole i uzoraka izloženih različitim koncentracijama nanočestica ZnO.



20 (a)- Usporedba vrijednosti mjerenja prisutnosti T-BARS svih koncentracija ZnO



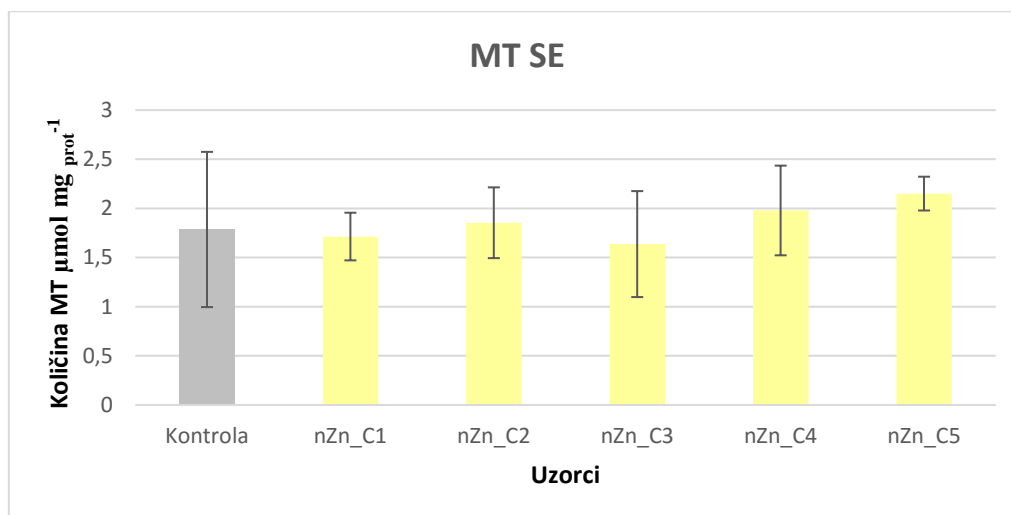
20 (b)- Usporedba parova vrijednosti nanočestica ZnO i nenanočestica ZnO

Slika 20 (a) i (b) – aktivnosti T-BARS u homogenatu gujavnica

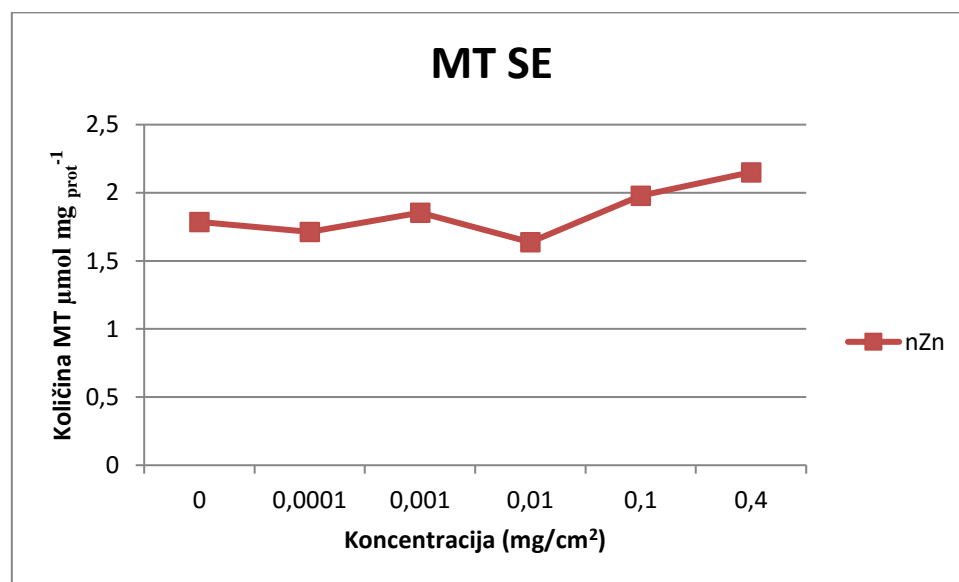
### 3.3.5. Mjerenje metalotioneina MT

Rezultati mjerenja metalotioneina (MT) vidljivi su na slici 21 (a) i (b).

Usporedbom rezultata između kontrole i uzoraka izloženih različitim koncentracijama nanočestica ZnO, utvrđeno je da nema statistički značajne razlike.



21 (a)- Usporedba vrijednosti mjerenja prisutnosti MT svih koncentracija ZnO



21 (b)- Usporedba parova vrijednosti nanočestica ZnO i nenanočestica ZnO

Slika 21 (a) i (b) – aktivnosti MT u homogenatu gujavica

## 4. RASPRAVA

Mjerenje staničnih i substancijskih odgovora na ksenobiotike kod živih organizama predstavlja relativno novi alat u monitoringu okoliša kao odgovor na potrebe otkrivanja i procjene učinka ksenobiotika na biotu (Legadic i sur., 2000). Biomarkeri su kvantitativno mjerljive promjene u biološkim sustavima kao odgovor na izloženost ksenobioticima (Lam i Gray, 2003). Korištenje termina biomarker, općenito se odnosi na biokemijske, molekularne, stanične i fiziološke promjene mjerene u tjelesnim tekućinama, stanicama i tkivima u organizmu. Jedna od najvažnijih značajki biomarkera jest ta da imaju potencijal predviđanja promjene na višim razinama biološke organizacije kao što su populacije ili ekosustavi. Rani odgovor biomarkera može se koristiti kao alat predviđanja najvećeg utjecaja što omogućuje npr. početak korištenja raznih strategija bioremedijacije prije nego što dođe do ireverzibilnih oštećenja okoliša (Moore, 2004).

U ovom radu kao eksperimentalni organizam korištena je kompostna gujavica *Eisenia fetida*. Biomarkeri gujavica predstavljaju koristan alat za monitoring tla i procjenu okolišnog rizika, kao rano upozorenje na štetne ekološke učinke. Posljednjih godina biomarkeri postaju sve važniju evaluaciji utjecaja zagađivala na organizme tla (Sanchez-Hernandez, 2006). Upravo zbog sve veće važnosti istraživanja biomarkera na gujavicama, kao dobrih indikatora utjecaja zagađivala na organizme u tlu, ovaj rad je kao eksperimentalni organizam koristio upravo njih. S obzirom na sve veću prisutnost nanočestica u industriji, medicini, tehnologiji, kozmetičkim preparatima pa tako i u okolišu u posljednje se vrijeme sve više postavlja pitanje mogućeg negativnog utjecaja nanočestica na organizme u okolišu kao i na sam ekosustav. Kako su se biomarkeri pokazali vrlo osjetljivima na prisutnost ksenobiotika, te se koriste za rano upozoravanje na negativne utjecaje na organizme u okolišu, tako je i ovaj rad ispitao utjecaj nanočestica na biomarkere. U ovome eksperimentu istraživani su utjecaji nanočestica i nenanočestica ZnO. Istraživanje je obuhvatilo ispitivanje utjecaja na pet različitih biomarkera, AChE, CAT, MT, TBARS, GST.

Mjerenjem prethodno navedenih biomarkera dobiven je uvid o utjecaju nanočestica i nenanočestica ZnO na gujavice.

Rezultati istraživanja pokazali su utjecaj nanočestica i nenanočestica ZnO na aktivnost AChE. Pri većim koncentracijama i dužem izlaganju (AS-test) došlo je do inhibicije aktivnosti

enzima. Međutim, pri kratkoročnom izlaganju od 48 sati na filter papir kontakt testu kao i u ekstraktu tla, dobili su se drukčiji rezultati. Naime, pri kratkotrajnom izlaganju na najvišim koncentracijama izloženosti došlo je do povećanja aktivnosti enzima. Takav odgovor biomarkera karakterističan je za hormezu. Pojava hormeze je karakterizirana stimulacijom na malim dozama i inhibicijom na većim dozama (Stenersen, 1980). Velki i Hackenberger (2013) su pri istraživanju utjecaja deltametrina (insekticid) i primifos-metila na gujavicama *E. andrei*, dokazali hormezu kod aktivnosti AChE pri izlaganju na filter papiru. Izmjereni rezultati za AChE u okvirima ovog rada su slični podacima opisanim u literaturi.

Istraživanjem utjecaja nanočestica TiO<sub>2</sub> na gujavicama vrste *Pheretima hawayana*, (Khalil i sur., 2015), pokazali su da nanočestice inhibiraju aktivnost AChE, te da je aktivnost enzima sve manja što je duže izlaganje. Njihovo istraživanje uzimalo je u obzir i duljinu izlaganja. Mjerenjem rezultata nakon 3, 14 i 28 dana pokazali su da je najveći pad inhibicije nakon prva tri dana izlaganja te da se smanjenje aktivnosti AChE nastavlja i nakon 7. te 24. dana. Međutim smanjenje je najizraženije nakon prva tri dana. Osim toga, oni su pokazali i da je smanjenje aktivnosti ovisno o koncentraciji TiO<sub>2</sub> kojoj su gujavice izložene (dose-response) što u našem radu nije bio slučaj. Rezultati našeg rada ne pokazuju odgovor prema povećanju koncentracije nanočestica, što se može objasniti manjim vremenskim periodom izlaganja, te korištenjem drukčijih koncentracija izlaganja. Testiranje aktivnosti AChE kod gujavica uz korištenje drugih supstanci kao što su azodrin (Rao i sur., 2004) i 1,2,4-triklorobenzen (Wu i sur., 2012), također je pokazalo smanjenje aktivnosti enzima (inhibicija) u ovisnosti o duljini izlaganja i korištenim koncentracijama.

Najnovija istraživanja utjecaja pesticida na AChE kod gujavica u obzir uzimaju i temperaturu kao i međusobne interakcije pesticida u mješavinama (Bednarska i sur., 2016). Rezultati istraživanja pokazali su da djelovanje pesticida u mješavinama ima utjecaj na smanjenje aktivnosti AChE no temperatura nije pokazala statistički značajan učinak na aktivnost AChE.

Mjerenjem aktivnosti CAT pokazao se utjecaj na enzim samo pri najvećim koncentracijama izloženosti nenanočesticama ZnO, pri kratkotrajnom izlaganju. Zanimljivo je što su rezultati pokazali da nema statistički značajnog utjecaja nanočestica ZnO na aktivnost CAT. Statistički značajna razlika izmjerena je samo na najvišim koncentracijama kod izlaganja nenanočesticama ZnO. Usporedbom dobivenih rezultata s literaturnim podacima uočene su se značajne razlike. Tako, su Khalil i sur. (2015) na gujavicama *P. hawayana*, pokazali povećanje aktivnosti CAT u ovisnosti o koncentraciji nanočestica TiO<sub>2</sub>. Prema Hu i sur.



(2010) aktivnost CAT se povećala pri manjim dozama izlaganja nanočesticama ZnO, a pri većim dozama je dolazilo do smanjenja aktivnosti CAT. Iako u našem radu nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu, vidljive su naznake povećanja aktivnosti CAT pri manjim koncentracijama, te smanjenje aktivnosti CAT pri najvećim koncentracijama. Razlog smanjenja aktivnosti može se objasniti mogućnošću preopterećenja prirodne antioksidativne obrane organizma pri najvećim koncentracijama izlaganja. Za razliku od literaturnih podataka za gujavice, kod viših životinja kao što su ribe, rezultati su bitno drukčiji. Rezultati mjerenja kod riba ukazuju na povećanje utjecaja čestica ZnO u ovisnosti o koncentraciji. Osim toga, kod riba djelovanje različitih nanočestica (uključujući i ZnO) (Jun, 2012) uzrokuje inhibiciju aktivnosti CAT. U navedenim publikacijama postavlja se hipoteza da nanočestice mijenjaju aktivnost CAT peroksidativnim oštećenjima tkiva.

Mjerenja aktivnosti GST je pokazalo da nema statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu pri izlaganju u umjetnom tlu. No, pri kratkotrajnom izlaganju (filterpapir test, ekstrakt tla) su uočeni kontradiktorni rezultati. Pri izlaganju filter papir kontakt testom izmjereno je smanjenje aktivnosti pri većim koncentracijama nanočestica ZnO, dok je pri izlaganju u ekstraktu tla izmjerena povećana aktivnost GST. Slične rezultate dobili su Sanchez i Hernandez(2014) pri izlaganju gujavice *Aporrectodea caliginosa* klorpirifosu, mjerenjem GST. Oni su utvrdili da je kratkotrajno izlaganje (3 dana) povećalo aktivnost enzima, dok izlaganje kroz duži vremenski period (21 dan) nije dalo značajne razlike u odnosu na kontrolu. Temeljem takvih rezultata su izveli zaključak da ovaj, o vremenu ovisan, odgovor sugerira da GST ima veliku detoksifikacijsku ulogu pri inicijalnom izlaganju organofosfatima (OP). Maiaty i sur. (2008) izlagali su gujavice *L. mauritii* olovu i cinku. Mjerenje aktivnosti GST pokazalo je povećanu aktivnost nakon izlaganja olovu nakon 2. i 7. dana, dok nakon tog vremena nije više bilo statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu. Izlaganje Zn nije imalo statistički značajnog učinka na aktivnost GST. Razlika se može pripisati karakteru Zn kao esencijalnom metalu u organizmima, zbog kojega regulatorni mehanizmi organizma dozvoljavaju metalu da održava homeostazu u različitim uvjetima okoliša. Naravno, prisutnost Zn u većim količinama u tkivu može imati štetne efekte na gujavice (Panda i sur., 1999). U našem radu su vidljivi kontradiktorni rezultati pri istom vremenskom periodu i istim koncentracijama izlaganja nano- i nenanočesticama ZnO te između filter papir testa i testa u ekstraktu tla. S obzirom da je jedina razlika između ova dva načina izlaganja u tome da je ekstrakt tla, kao što je objašnjeno u poglavlju materijali i metode, pripreman iz tla na taj način da su u ekstraktu preostale organske tvari iz samoga tla,

može se zaključiti kako ta organska tvar ima značajan utjecaj na aktivnost GST. Korištenje ekstrakta tla nije uobičajen način izlaganja gujavica ispitivanim tvarima, pa literaturnih podataka o mjerenju GST nismo uspjeli pronaći. Stoga se ovaj zaključak u obliku znanstvene hipoteze nameće kao jedini.

Rezultati mjerenja količine TBARS pokazali su veću prisutnost, u odnosu na kontrolu, pri manjim koncentracijama kojima su gujavice bile izložene. Naši podaci su slični podacima iz literature. Izlaganje nanočesticama  $\text{TiO}_2$  i  $\text{ZnO}$ , pokazalo je da dolazi do naglog povećanja TBARS pri manjim koncentracijama, dok je pri izlaganju većim koncentracijama došlo do smanjenja količine TBARS (Hu i sur., 2010). Ova se pojava u literaturi objašnjava time što aktivni kisikov atom generiran peroksidom rezultira sa nestabilnošću plazma membrane, te dolazi do usporavanja biokemijskog metabolizma u gujavica (Hu i sur., 2010.). Pri izlaganju u umjetnom tlu literaturni podatci istraživanja T-BARS na gujavicama izloženim  $\text{TiO}_2$  pokazali su povećanje količine TBARS u ovisnosti o koncentraciji kojoj su izlagani (Khalil i sur., 2015). Pri izlaganju pesticidima također je uočeno povećanje TBARS (Wang i sur., 2017). Istraživanje djelovanja nanočestica  $\text{ZnO}$  na višim životinjama ukazuju na povećanje količine TBARS nakon izlaganja nanočesticama. Tako istraživanje djelovanja nanočestica  $\text{ZnO}$  na ribama vrste *Oreochromis niloticus* (Kaya i sur., 2015), pokazuje povećanje količine TBARS u svim ispitivanim tkivima (mišići, crijeva, jetra, škrge).

Rezultati mjerenja MT pokazuju odgovor na izloženost nanočesticama  $\text{ZnO}$  samo pri najduljem izlaganju u umjetnom tlu u odnosu na kontrolu na svim koncentracijama osim najveće. Ovaj rezultat ukazuje da MT imaju aktivnu ulogu u uklanjanju  $\text{Zn}$  iz organizma. Rezultati dobiveni u našem radu slični su rezultatima opisanim u literaturi. Tako su Miaty i sur. (2011) nakon izlaganja gujavica vrste *Lampito mauritii* cinku i olovu (75, 150, 300  $\text{mg/kg}^{-1}$ ) uočili porast MT nakon drugog dana izlaganja  $\text{Zn}$ , a nakon 14. dana izlaganja su uočili stabilizaciju MT. Ovi rezultati potvrđuju zaključak da MT imaju značajnu ulogu u eliminaciji  $\text{Zn}$ . Curieses i sur. (2017) radili su ispitivanja na gujavicama vrste *Eisenia fetida* izloženih nanočesticama i nenanočesticama srebra. Gujavice su izlagane kroz period od 14 dana, a mjerenja su bila nakon 1., 3. i 14. dana, pri čemu su gujavice bile izložene koncentracijama od 0,05 i 50  $\text{mg/kg}$ . Mjerenja su pokazala povećanje MT, na obje koncentracije, nakon 3 dana izlaganja, te stabiliziranje razine MT nakon 14 dana izlaganja. Ovi rezultati potvrđuju rezultate djelovanja nano  $\text{Zn}$  dobivenih u ovome radu, ako se uzme u obzir da je ovaj rad izlagao gujavice većim koncentracijama  $\text{Zn}$  što onda objašnjava činjenicu da nismo dobili odgovor na najvišoj koncentraciji nanočestica kojima smo izlagali gujavice.

## 5. ZAKLJUČAK

Ovaj rad je obuhvatio spektar 5 biomarkera kako bi se utvrdio utjecaj nanočestica ZnO na kompostnu gujavicu *Eisenia fetida*. Mjerenja su pokazala statistički značajna odstupanja aktivnosti enzima AChE, CAT, GST i prisutnosti MT i TBARS od normalnih. Iz rezultata je također vidljiva ovisnost razine ekspresije biomarkera o vremenu izlaganja, mediju u kojem su gujavice izlagane ZnO te koncentracijama kojima su bile izložene. Iako nije vidljiv jasno i na uobičajen način definiran odnos koncentracije i učinka (engl. *dose-response*) ipak su uočene naznake ovisnosti razine učinka o koncentracijama. Rezultati istraživanja pokazali značajan utjecaj nano- i nenanočestica ZnO na istraživanu vrstu (*Eisenia fetida*) što ukazuje i na mogućnost negativnog utjecaja u okolišu. Rezultati našeg istraživanja u skladu su s dostupnim literaturnim podacima koji također pokazuju utjecaj na ekspresiju biomarkera, kako nanočestica tako i drugih istraživanih supstanci.

Iako su dobiveni rezultati u skladu s dostupnim literaturnim podacima, istraživanja utjecaja nanočestica na organizme, populacije organizama i same ekosustave, kasne za sve prisutnijom nanotehnologijom. Iako su nanotoksikološka istraživanja u sve većem porastu, još uvijek je dosta nepoznanica o ponašanjima nanočestica u okolišu zbog njihovih specifičnih svojstava. Stoga su potrebna dodatna daljnja istraživanja kako bi se utvrdilo i kvantificiralo utjecaj nanočestica na okoliš.

## 6. LITERATURA

**Appenzeller T., 1991.** The man who dared to think small. *Science*. 254:1300.

**Bacanli M., Bařaran N. 2014.** Nanotoxicology - New Research Area in Toxicology. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences* 11(2), 231-240.

**Bednarska A. J., Choczynski M., Laskowski R., Walczak M., 2016.** Combined effects of chlorpyrifos, copper and temperature on acetylcholinesterase activity and toxicokinetics of the chemicals in the earthworm *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution* xxx (2016) 1-10.

**Boon E M, Downs A. and Marcey D. 2007.** Proposed Mechanism of Catalase in Catalase:  $H_2O_2$ :  $H_2O_2$  Oxidoreductase. *Catalase Structural Tutorial Text*.

**Bouché M.B. 1972.** Lombriciens de France. *Ecologie et systématique*. *Ann. Soc. Ecol. Anim.* 72: 1671.

**Boxall A. B. A., Chaudhry Q., Sinclair C., Jones A., Aitken R., Jefferson B. and Watts C. 2007.** Current and future predicted environmental exposure to engineered nanoparticles.

**Buzea C., Pacheco Blandino I.I., Robbie K. 2007.** Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases* 2(4) MR17 - MR172.

**Buege J.A., Aust S.D., 1978.** Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*. 52, 302-310.

**Chang Y., Mingyi Z., Lin X. , Jun Z and Gengmei X., 2015.** The Toxic Effects and Mechanisms of CuO and ZnO Nanoparticles. *Materials* 5, 2850-2871.

**Chang, J.S., Chang, K.L.B., Hwang, D.F., Kong, Z.L., 2007.** In vitro cytotoxicity of silica nanoparticles at high concentrations strongly depends on the metabolic activity type of the cell line. *Environmental Science and Technology* 41, 2064-2068.

**Chelikani P., Fita I., Loewen P.C. 2004.** Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61, 192-208

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

**Clark A., Shamaan N., Sinclair M., Deuterman W. 1986.** Insecticide metabolism by multiple glutathione S-transferase in two strains of the house fly, *Musca domestica* (L). *Pesticide Biochemistry Physiology* 25: 169-175.

**Connell D., Lam P., Richardson B. and Wu R., 1999.** Introduction to Ecotoxicology. UK., Blackwell Science Ltd.

**Corr, S.A. 2013.** Metal oxide nanoparticles. *Nanoscience* 1, 180–234.

**Curieses S. P., García-Velasco N., Urionabarrenetxea E., Sáenz M. E., Bilbao E., Di Marzio W. D., Soto M., 2017.** Responses to silver nanoparticles and silver nitrate in a battery of biomarkers measured in coelomocytes and in target tissues of *Eisenia fetida* earthworms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 141 57-63.

**Elsaesser A., Howard V.C., 2012.** Toxicology of nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64 129–137.

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

**Elvira C., Dominguez J., Briones M.J.I. 1996.** Earthworm community composition in an uncontrolled rubbish dump, a pig farm dunghill, and a deposit of primary sludges, *Nova Acta Scientifica Compostelana Biologia*. 6 123–129.

**Goodsell DS. 2004.** "Catalase". Molecule of the Month. RCSB Protein Data Bank.

**Habig W.H., Pabst M.J., Jakobi W., 1974.** Glutathione S-Transferases The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The journal of biological chemistry* 249, 22, 7130-7139.

**Handy R.D., F. von der Kammer, J.R. Lead, M. Hasselov, R. Owen, M. Crane, 2008.** The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles, *Ecotoxicology* 17, 287–314.

**Hale, C.M., L.E. Frelich, P.B. Reich, and J. Pastor. 2005.** Effects of European earthworm invasion on soil characteristics in northern hardwood forest of Minnesota USA. *Ecosystem*. 8: 911-927.

**Hasan S. 2015.** Review on Nanoparticles: Their Synthesis and Types. *Research Journal of Recent Sciences* 4, 9-11.

**Hobbiger F., 1961.** The inhibition of acetylcholinesterase by organophosphorus compounds and its reversal. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 54, 403–405.

**Hoffmann, M.R., Martin, S.T., Choi, W., Bahnemann, D.W., 1995.** Environmental applications of semiconductor photocatalysis. *Chemical Reviews* 95 (1), 69-96.

**Hu C.W., Li M., Cui Y.B., Li D.S., Chen J., Yang L.Y. 2010.** Toxicological effects of TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles in soil on earthworm *Eisenia fetida*. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 586-591.

**Jun X., ZHAO H. Z., and Guang Hua L., 2013.** Effects of Selected Metal Oxide Nanoparticles on Multiple Biomarkers in *Carassius auratus*. *Biomedical and Environmental Sciences.*, 26(9): 742-749.

**Kaya H., Aydın F., Gurkan M., Yılmaz S., Ates M., Veysel D., Zikri A., 2015.** Effects of zinc oxide nanoparticles on bioaccumulation and oxidative stress in different organs of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2015.

**Kesić Aldina, Horozić Emir, 2016.** Prednosti i neželjeni efekti metalnih nanočestica i metalnih oksida u farmaceutskim i kozmetičkim preparatima. VI Međunarodni Kongres Biomedicine i geonauke – uticaj životne sredine na zdravlje ljudi, Beograd, 18-19. travnja 2016.

[https://www.researchgate.net/publication/303838513\\_PREDNOSTI\\_I\\_NEZELJENI\\_EFEKTI\\_PRIMJENE\\_METALNIH\\_NANOCESTICA\\_I\\_METALNIH\\_OKSIDA\\_U\\_FARMACEUTSKIM\\_I\\_KOZMETICKIM\\_PREPARATIMA](https://www.researchgate.net/publication/303838513_PREDNOSTI_I_NEZELJENI_EFEKTI_PRIMJENE_METALNIH_NANOCESTICA_I_METALNIH_OKSIDA_U_FARMACEUTSKIM_I_KOZMETICKIM_PREPARATIMA)

**Khalil A. M., 2015.** Neurotoxicity and biochemical responses in the earthworm *Pheretima hawayana* exposed to TiO<sub>2</sub>NPs. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 122, 455-461.

**Klaassen C. D., Liu J., Choudhuri S., 1999.** Metallothionein: An intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annual Review Pharmacology Toxicology*. 39: 267–94.

**Kołodziejczak-Radzimska A., Jesionowski T., 2014.** Zinc Oxide - From Synthesis to Application: A Review *Materials* 7, 2833-2881.

**Kool P.L.W., Ortiz M.D., van Gestel C.A.M. , 2011.** Chronic toxicity of ZnO nanoparticles, non-nano ZnO and ZnCl<sub>2</sub> to *Folsomia candida* (Collembola) in relation to bioavailability in soil. *Environmental Pollution* 159, 2713-2719.

- Lam, P. K. S. and Gray, J. S. 2003.** The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Marine Pollution Bulletin* 46: 182–186.
- Lavelle P. 1997.** Faunal activities and soil processes: adaptive strategies that determine ecosystem function. *Advances in Ecological Research*, 27: 93-132.
- Legadic, L., Caquet T., Amiard, J. C. and Ramade, F. (2000).** Use of biomarkers for environmental quality assessment. A. A. Balkema, Rotterdam , Netherlands.
- Linde A.R., Garcia-Vazquez E., 2006.** A simple assay to quantify metallothionein helps to learn about bioindicators and environmental health. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 34:360-363.
- Lionetto M. G., Caricato R., Calisi A., Schettino T., 2013.** Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives. *BioMed Research International*, Volume 2013, Article ID 321213.
- Love S. A., Maurer-Jones M. A., Thompson J. W., Lin Y., Haynes C. L. 2012.** Assessing nanoparticle toxicity. *Annual Review of Analytical Chemistry* 5: 181-205.
- Maa H., Williams P. L., Diamond S. A. 2013.** Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles - A review *Environmental Pollution* 172, 76-85.
- Maity S., Roy S., Chaudhury S., Bhattacharya S., 2008.** Antioxidant responses of the earthworm *Lampito mauritii* exposed to Pb and Zn contaminated soil. *Environmental Pollution* 151 1-7.
- Maity S., Sonali R., Shelley B., Shibani C., 2011.** Metallothionein responses in the earthworm *Lampito mauritii* (Kinberg) following lead and zinc exposure: A promising tool for monitoring metal contamination. *European Journal of Soil Biology* 47 69-71.
- Margoshes M., Vallee B.L., 1957.** A cadmium protein from equine kidney cortex. *Journal of the American Chemical Society*. 79:1813.
- Massoulie J., Pezzementi L., Bon S., Krejci E., Vallette F.M., 1993.** Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progresses in Neurobiology* 41:31–91.

**Mody V. V., Siwale R., Singh A., and Mody H. R. J., 2010.** Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences. 282–289.

**Monroy F., Domínguez J., Aira M., Velando A., 2006.** Seasonal population dynamics of *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) (Oligochaeta, Lumbricidae) in the field. Comptes Rendus Biologies. 329, 912–915.

**Moore M.N., Depledge M.H., Readman J.W. and Leonard D.R.P. 2004.** An integrated biomarker-bases strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. Mutation Research, 552, 247-268.

**Nijhavan, S.D. and Kanwar, J.S., 1952.** Physiochemical properties of earthworm casting and their effect on the productivity of soil. Indian Journal of agricultural Sciences. 22, 357-373.

**Nowack B., Bucheli T. D., 2007.** Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. Environmental Pollution 150 (2007) 5-22.

**OECD, 1984.** Guideline for testing of chemicals. In: Earthworm Acute Toxicity Tests, No. 207. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris.

**Otitoju O. and Ikechukwu N.E.O., 2007.** Glutathione S-transferase (GST) activity as a biomarker in ecological risk assessment of pesticide contaminated environment. African Journal of Biotechnology 6 (12), 1455-1459.

**Oskam, G., 2006.** Metal oxide nanoparticles: synthesis, characterization and application. Journal of Sol-Gel Science and Technology 37 (3), 161-164.

**Osman A. G. M., 2013.** Biochemical and Physiological Biomarkers in Aquatic Environmental Research. 1857-8179.

**Panda R., Pati S.S., Sahu S.K., 1999.** Accumulation of zinc and its effects on the growth, reproduction and life cycle of *Drawida willsi* (Oligochaeta), a dominant earthworm in Indian crop fields. Biology and Fertility of Soils 29, 419-423.

**Poole Jr.C.P., Owens F. J., 2003.** Introduction to nanotechnology. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA.



**Ravishankar Rai V., Jamuna Bai A., 2011.** Nanoparticles and their potential application as antimicrobials. Science against microbial pathogens, communicating current research and technological advances. A. Méndez-Vilas (Ed.), 197-209.

**Rao J. Venkateswara, Kavitha P., 2004.** Toxicity of azodrin on the morphology and acetylcholinesterase activity of the earthworm *Eisenia foetida*. Environmental Research 96 323–327.

**Reijnders L. 2006.** Cleaner nanotechnology and hazard reduction of manufactured nanoparticles. Journal of Cleaner Production, 14, 124-133.

**Robbins A. H., McRee D. E., Williamson M., Collett S. A., Xuong N. H., Furey W. F., Wang B. C., and Stout C. D. 1991.** Refined crystal structure of Cd, Zn metallothionein at 2.0 Å resolution. Journal of Molecular Biology. 221:1269-93.

**Sakulsak N., 2012.** Metallothionein: An overview on its metal homeostatic regulation in mammals. International Journal of Morphology. 30(3):1007-1012.

**Sanchez-Hernandez, J.C. 2006.** Earthworms biomarkers in ecological risk assessment. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. 188, 85-126.

**Sanchez-Hernandez J. C., Narvaez C., Sabat P., Martínez Mocillo S., 2014.** Integrated biomarker analysis of chlorpyrifos metabolism and toxicity in the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. Science of the Total Environment 490 445–455.

**Scandalios J.G., Guan L.M. and Polidoros AN. 1997.** Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, New York, 343-406.

**Sharma, V.; Shukla, R.K.; Saxena, N.; Parmar, D.; Das, M.; Dhawan, A. 2009.** DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. Toxicology Letters. 185, 211–218.

**Song , J.Y. and Kim, B.S., 2009.** Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. Bioprocess and Biosystems Engineering. 32,79-84.

**Stenersen, J., 1980.** Esterases of earthworms. Part II: Characterisation of the cholinesterases in the earthworm *Eisenia foetida* (Savigny) by ion exchange chromatography and electrophoresis. Comparative Biochemistry and Physiology. C 66, 45–51.

**Toner K., Sojka G., Ellis R. 2007.** A Quantitative Enzyme Study; CATALASE. <http://web.archive.org/web/20000612104029/http://www.facstaff.bucknell.edu/toner/gb/lab121/labs34.html>

**Tran, C. L., Donaldson, K., Stones, V., Fernandez, T., Ford, A., Christofi, N., Ayres, J. G., Steiner, M., Hurley, J. F., Aitken, R. J. and Seaton, A. 2005.** A scoping study to identify hazard data needs for addressing the risks presented by nanoparticles and nanotubes. Research Report. Institute of Occupational Medicine.

**Velki M., Hackenberger B.K., 2013.** Biomarker responses in earthworm *Eisenia andrei* exposed to pirimiphos-methyl and deltamethrin using different toxicity tests. Chemosphere 90, 1216–1226.

**Wang C., Zhang Q., Wang F., Liang W., 2017.** Toxicological effects of dimethomorph on soil enzymatic activity and soil earthworm (*Eisenia fetida*). Chemosphere 169, 316-323.

**Wu Shi-jin, Zhang H., Hu Y., Li H., Chen J., 2012.** Effects of 1,2,4-trichlorobenzene on the enzyme activities and ultrastructure of earthworm *Eisenia fetida*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 76, 175–181.

**Yan, L.; Zheng, Y.B.; Zhao, F.; Li, S.; Gao, X.; Xu, B.; Weiss, P.S.; Zhao, Y., 2012.** Chemistry and physics of a single atomic layer: Strategies and challenges for functionalization of graphene and graphene-based materials. Chemical Society Reviews., 41, 97–114.

**Yang, K.; Xing, B.S. 2009.** Sorption of phenanthrene by humic acid-coated nanosized TiO<sub>2</sub> and ZnO. Environmental Science and Technology. 43, 1845–1851

**Zhu, M.T., Feng, W.Y., Wang, B., Wang, T.C., Gu, Y.Q., Wang, M., Wang, Y., Ouyang, H., Zhao, Y.L., Chai, Z.F., 2008.** Comparative study of pulmonary responses to nano and submicron-sized ferric oxide in rats. Toxicology 247, 102-111.

**Zhao Y., Wang B., Feng W., Bai C. 2013.,** Nanotoxicology: toxicological and biological activities of nanomaterials. Encyclopedia of life support systems (EOLSS).

## 7. PRILOG

**Web 1:**<http://www.wichlab.com/wp-content/uploads/2013/04/Size-comparison-Bio-nanoparticles.jpg>

**Web 2:**[http://www.zinc.org.in/wp-content/uploads/2013/06/img\\_compounds\\_ZnO\\_applications\\_chart.jpg](http://www.zinc.org.in/wp-content/uploads/2013/06/img_compounds_ZnO_applications_chart.jpg)

**Web**

**3:**[https://www.sciencelearn.org.nz/system/images/images/000/000/016/original/WRM\\_SCI\\_ART\\_02\\_NichesWithinEarthwormHabitat\\_FunctionalGroups.jpg?1455156625](https://www.sciencelearn.org.nz/system/images/images/000/000/016/original/WRM_SCI_ART_02_NichesWithinEarthwormHabitat_FunctionalGroups.jpg?1455156625)