

Ekotoksikološki učinci nanočestica na gujavice

Černi, Marta

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:181:086526>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-19**



**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

Preddiplomski sveučilišni studij biologije

Marta Černi

Ekotoksikološki učinci nanočestica na gujavice

Završni rad

Osijek, 2019.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

EKOTOKSIKOLOŠKI UČINCI NANOČESTICA NA GUJAVICE

Marta Černi

Rad je izrađen na: Zavod za zoologiju

Mentor: dr.sc. Sandra Ečimović

Kratak sadržaj završnog rada: Napretkom tehnologije i znanosti svakodnevno nastaju novi spojevi među kojima su i nanočestice koje danas imaju široku upotrebu. Budući da se nanočestice koriste u raznovrsnim područjima industrije, često, primjerice putem otpadnih voda, dospijevaju u okoliš. Dolaskom u okoliš, nanočestice postaju sastavni dio tla, te na taj način postaju raspoložive i organizmima koji u njemu žive. Gujavice kao široko rasprostranjeni organizmi u tlu, vrlo često se koriste kao modelni organizmi u ekotoksikološkim istraživanjima, pa tako i u istraživanju štetnih učinaka nanočestica. Zbog sve veće prisutnosti nanočestica u okolišu razvila se i posebna grana toksikologije, nanoekotoksikologija koja proučava interakcije nanostrukture s biološkim sustavima. U ovom radu su, uz pojmove nanočestica i nanoekotoksikologija, opisani i rezultati nekih od dosadašnjih istraživanja ekotoksikoloških učinaka nanočestica na gujavice.

Broj stranica: 22

Broj slika: 10

Broj literaturnih navoda: 29

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: nanočestice, nanoekotoksikologija, gujavice

Rad je pohranjen: na mrežnim stranicama Odjela za biologiju te u Nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu.

BASIC DOCUMENTATION CARD**Bachelor thesis****University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek****Department of Biology****Undergraduate university study programme in Biology****Scientific Area:** Natural sciences**Scientific Field:** Biology**ECOTOXICOLOGICAL EFFECTS OF NANOPARTICLE ON EARTHWORMS****Marta Černi****Thesis performed at:** SubDepartment of Zoology**Supervisor:** Sandra Ečimović, PhD, Assistant Professor

Short abstract of bachelor thesis: With the development of technology and science, new compounds are emerging on a daily basis, including nanoparticles that are widely used today. Since nanoparticles are used in a variety of industries, they can be released into the environment, for example through wastewater. By coming into the environment, nanoparticles become an integral part of the soil, and thus become available to the organisms that live in it. Earthworms as a widespread soil organism are often used as a model organism in ecotoxicological research, as well as in research of the harmful effects of nanoparticles. Due to the increasing presence of nanoparticles in the environment, a special branch of toxicology has been developed, nanoecotoxicology, that studies the interactions of nanostructures with biological systems. In this paper, along with the concepts of nanoparticle and nanoecotoxicology, results were described of some of the current researches of ecotoxicological effects of nanoparticles on earthworms.

Number of pages: 22**Number of figures:** 10**Number of references:** 29**Original in:** Croatian**Key words:** nanoparticles, nanoecotoxicology, earthworms

Thesis deposited: on the Department of Biology website and the Croatian Digital Theses Repository of the National and University Library in Zagreb.

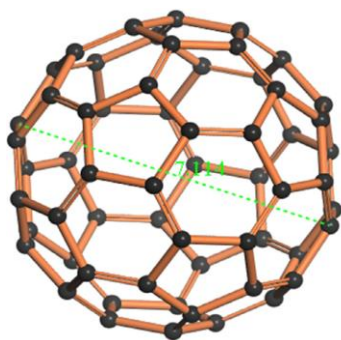
SADRŽAJ:

1.UVOD.....	1
1.1 NANOČESTICE.....	1
1.2 EKOTOKSIKOLOGIJA NANOMATERIJALA	3
1.2.1 EKOTOKSIKOLOGIJA	3
1.2.2 NANOEKOTOKSIKOLOGIJA.....	3
1.3 GUJAVICE.....	4
2.NANOČESTICE U OKOLIŠU	6
3.EKOTOKSIKOLOŠKI UČINCI NANOČESTICA NA GUJAVICE	7
3.1 EKOTOKSIKOLOŠKI UČINCI NANOČESTICA SREBRA NA GUJAVICE	7
3.2 EKOTOKSIKOLOŠKI UČINCI NANOČESTICA CERIJEVA OKSIDA NA GUJAVICE.....	9
3.3 EKOTOKSIKOLOŠKI UČINCI NANOČESTICA BAKRA, BAKROVA OKSIDA I CINKOVA OKSIDA NA GUJAVICE.....	9
3.4 EKOTOKSIKOLOŠKI UČINCI NANOČESTICA TITANIJEVA DIOKSIDA NA GUJAVICE.....	11
3.5 EKOTOKSIKOLOŠKI UČINCI NANOČESTICA FULERENA C60 NA GUJAVICE.....	12
4.ZAKLJUČAK.....	13
5.LITERATURA	14
6. PRILOZI.....	

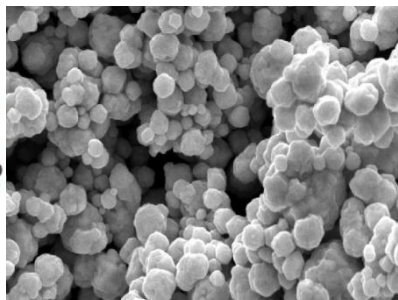
1.UVOD

1.1 NANOČESTICE

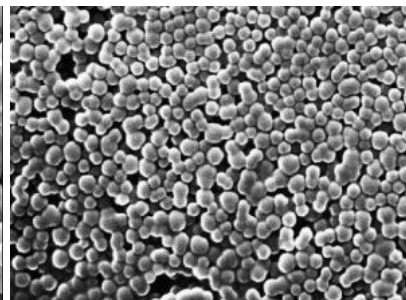
Jednom od novijih područja istraživanja i tehnološkog razvoja, nanotehnologijom, dobivaju se nanočestice, odnosno čestične tvari veličine od 1 do 100 nanometara s različitim karakteristikama koje im daju raznovrsna svojstva. Važnost su nanočestice dobile kada je otkriveno da veličina čestice utječe na fiziokemijska svojstva tvari. Postoje čestice u jednoj, dvije ili tri dimenzije, a mogu se podijeliti i prema veličini i kemijskim svojstvima. Nanočestice se sastoje od tri sloja od kojih je prvi površinski, koji može biti u interakciji s malim molekulama ili ionima metala. Zatim, sloj ljuske kemijski različit od središta i treći središnji sloj koji čini jezgru. Zbog svojih karakterističnih svojstava upotrebljavaju se u različitim područjima znanosti i industrije. Primjenjuju se kao biološki i kemijski senzori, u separacija plinova, u proizvodnji lijekova, kozmetičkih proizvoda, pesticida i elektroničkih uređaja (Khan, 2017).



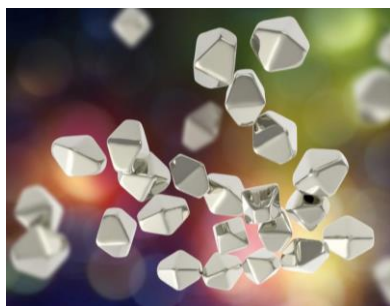
Slika1: Fuleren C₆₀ (preuzeto i prilagođeno prema (Khan, 2017)



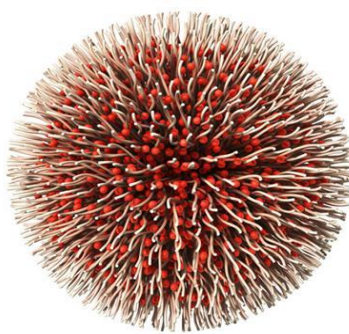
Slika2: Nanočestice srebra (Web3.)



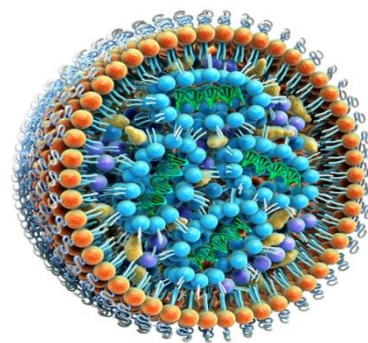
Slika3: Keramičke nanočestice (SiO₂) (Web4.)



Slika4: Semikonduktorske nanočestice (CdTe) (Web5.)



Slika5: Polimerske nanočestice (Web6.)



Slika6: Lipidne nanočestice (Web7.)

Prema fizikalnim i kemijskim svojstvima nanočestice se mogu podijeliti na ugljikove nanočestice, metalne, keramičke, semikonduktorske, polimerske i nanočestice temeljene na lipidima. Ugljikovim nanočesticama pripadaju fulereni i ugljikove nanocijevi. Fulereni zbog svoje pentagonalne i heksagonalne građe provode struju, struktura im je visoke čvrstoće što povećava njihovu upotrebu. Ugljikove nanocijevi koriste se zbog šupljikave građe kao adsorbensi za štetne plinove u industriji te kao punila ili kao katalizatori u organskim i anorganskim reakcijama. Metalne nanočestice sastoje se od alkalijskih, prijelaznih ili plemenitih metala koji prilikom kontrolirane sinteze daju čestice određene veličine, oblika i svojstva. Primjenu nalaze u mnogim znanstveno-istraživačkim područjima zbog svojih jedinstvenih optičkih i električnih svojstava, npr. upotrebljavaju se kod skenirajućeg elektronskog mikroskopa (SEM) jer poboljšavaju tok elektrona i omogućuju nastanak kvalitetne fotografije. Amorfni, gusti, porozni ili šuplji oblici keramičkih nanočestica nastali su iz nemetala anorganskom sintezom. Keramičke nanočestice primjenjuju se u katalizama, fotokatalizama, fotodegradacijama boja i prilikom nastajanja fotografija. Semikonduktorske ili poluvodičke nanočestice se zbog svojih djelomično metalnih i nemetalnih svojstava upotrebljavaju u procesima fotokatalize, kod elektroničkih uređaja i foto optike. Nadalje, postoje polimerne organske nanočestice koje su čvrste tvari, a oblikom nanosfere ili nanokapsule. Lipidne nanočestice sa svojim kuglastim oblikom nalaze primjenu u biomedicini kao nosači lijekova ili služe za dostavljanje i oslobađanje RNA pri liječenju raka (Khan, 2017).

Kako bi se otkrile morfološke karakteristike nabrojanih nanočestica najčešće se koriste skenirajući elektronski mikroskop (SEM), transmisijski elektronski mikroskop (TEM) i polarizirani optički mikroskop (POM). Morfološke karakteristike su od velikog značaja zato što obično utječu na svojstva nanočestica, a na morfologiju utječu sastav nanočestica i prirodne veze među spojevima, odnosno strukturne karakteristike. Prednosti nanočestica su mala veličina, reaktivnost i dobar kapacitet zbog čega one široku primjenu nalaze u proizvodnji lijekova, mehaničkoj i elektroničkoj industriji, zaštiti okoliša i generiranju energije. Postoji i mogućnost njihovog štetnog utjecaja, kako na okoliš tako i na sastavnice okoliša. Jedan od štetnih utjecaja je ulazak kroz dišni i probavni sustav u različite organe te prenošenje kroz organe i tkiva izazivajući pritom nepovoljne učinke u stanicama. U stanicama se nanočestice mogu vezati i organizirati oko proteina o čemu ovisi veličina, oblik, površinski naboj, slobodna energija i različite funkcionalne grupe nanočestica. Vezivanjem nanočestica na proteine može doći do odvijanja proteina, umrežavanja tiolnih skupina i smanjenja enzimske aktivnosti. Stanični sok može biti

pogodan za disocijaciju iona nanočestica, što za posljedicu može imati toksično djelovanje (Khan, 2017).

1.2 EKOTOKSIKOLOGIJA NANOMATERIJALA

1.2.1 EKOTOKSIKOLOGIJA

Ekotoksikologija je interdisciplinarna znanost koja se bavi istraživanjem učinaka nastalih kao posljedica prisutnosti prirodnih i umjetno stvorenih toksičnih opasnih tvari na ekosustav i njegove sastavnice (Truhaut, 1977). Ona je integrirana znanost nastala povezivanjem ekologije, znanosti o okolišu, i toksikologije, znanosti o utjecaju toksičnih tvari na živi svijet. Termin ekotoksikologija uveo je 1969. godine Rene Truhaut, francuski toksikolog, s ciljem spajanja ekologije i toksikologije u zasebno specijalizirano područje (Lynch i Stretesky, 2016). Ekotoksikologija bavi se istraživanjem dotoka štetnih tvari u okoliš, njihovim protokom kroz ekološki sustav te njihovim utjecajem na žive organizme. Štetne tvari koje se istražuju prvenstveno su kemijski spojevi koji se svakodnevno ispuštaju iz različitih sektora industrije, zrakom ili otpadnim vodama.

Velik broj zagađivala najčešće završi u tlu, te na taj način dođu i u direktan doticaj s organizmima koji u njemu obitavaju (Jurandy, 2012). Beskralježnjaci ili mikroorganizmi u tlu imaju jedinstvene i vrlo važne uloge u biološkim i kemijskim procesima koji se odvijaju ispod površine tla, a jedna od tih uloga je i razgradnja organskog materijala uginulih biljaka i životinja. Osim što tim organizmima organski ostatci služe kao hrana i izvor energije, novonastale i prerađene organske tvari služe biljkama kao izvor nutrijenata. Unošenjem kemijskih spojeva i teških metala u tlo dolazi do akumulacije tih tvari u organizmima koji u njemu žive. Zbog različitih utjecaja kemikalija može doći do neuravnoteženosti unutar ekosustava tla, a posljedično i do poremećaja u ravnoteži cijelog ekosustava određenog područja (Jurandy, 2012).

1.2.2 NANOEKOTOKSIKOLOGIJA

Nanoekotoksikologija grana je ekotoksikologije nastala s ciljem procjene opasnosti sintetiziranih nanočestica na okoliš zbog njihove sve veće prisutnosti. Područje nanoekotoksikologije obuhvaća ispitivanja utjecaja različitih nanočestica na žive organizme kako bi se mogle primijeniti najučinkovitije mjere za sprječavanje ili saniranje štetnih učinaka (Hedge, 2015). Svojstva koja mogu dovesti do toksičnih učinaka nanočestica, zahvaljujući specifičnoj površini i reaktivnosti, su mogućnost otapanja, redoks reakcije i stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta. Nanoekotoksikološkim istraživanjima

utvrđuje se je li za toksičnost odgovoran naboj, masena koncentracija, količinska koncentracija, ukupna površina ili veličina nanočestica. Konzumacijom poljoprivrednih proizvoda tretiranih nanopesticidima ili nanognojivima čovjek je izravno izložen ulasku nanočestica u krvotok i vitalne organe. Stoga, nanoekotoksikološka sveobuhvatna i pažljivo osmišljena istraživanja uključuju *in vivo* i *in vitro* uvjete kako bi se mogle primjeniti mjere za zaštitu okoliša i zdravlja ljudi (Mwaanga, 2018). Nanoekotoksikološka ispitivanja provode se, između ostalog i prema protokolu OECD-a za determinaciju i potencijalne ekotoksikološke učinke. Krajnje točke ispitivane prema OECD protokolu i korištene za procjenu rizika pokrivaju parametre kao što su smrtnost, reprodukcija i rast organizama. Često se, uz zadane smjernice, u istraživanjima primjenjuju i alternativne metode pomoću kojih se povećava specifičnost i mogućnost razumijevanja na koji način neka vrsta nanomaterijala uzrokuje toksični učinak. Pored ispitivanja na pojedine vrste organizama, procjenjuje se opasnost za okoliš predviđanjem koncentracije bez učinka. Za takvu procjenu koriste se dva pristupa, deterministički i probablistički. Deterministički je faktorijalni pristup u kojem se kao faktori procjene upotrebljavaju kemikalije. Probablistički pristup, temeljen na distribuciji, koristi se za obrađenu procjenu opasnosti i bazira se na različitim osnovnim pretpostavkama kao što je npr. težina. Uz dosadašnja utvrđena pravila i smjernice za ekotoksikološka ispitivanja nanomaterijala, potrebno je razvijati specifičnije metode kojima bi se mogli odrediti relevantni učinci na žive organizme i okoliš (Scott-Fordsmand, 2017).

1.3 GUJAVICE

Gujavice su protostomične životinje iz koljena Annelida (kolutićavci), razreda Clitellata (pojasnici) i podrazreda Oligochaeta (maločetinaši). Oligochaetama pripadaju tri reda među kojima je u red Haplotaxida svrstana porodica Lumbricidae ili gujavice (Habdija, 2011). Široko su rasprostranjeni organizmi u tlu i čine više od 80% biomase tla, osim u ekstremnim područjima kao što su pustinje ili područja vječnog snijega i leda. Rasprostranjenost i veličina populacije na nekom području ovisi prvenstveno o kiši, zatim o tipu tla, kapacitetu vlažnosti, pH vrijednosti, temperaturi te dostupnoj organskoj tvari i oborinama. Biomasa gujavica najčešće je puno veća od biomase drugih beskralježnjaka tla. Reproaktivna aktivnost sezonska je pojava i obično je najveća u proljeće i rano ljeto kada nastaje najviše kokona. Ovisno o vrsti nastaju jedan do dvadeset kokona po parenju, a postoje i vrste koje razvijaju kokone partenogenetski (Edwards, 2004).



Slika 7: *Aporectodea caliginosa* (Web7)

Slika 8: *Eisenia andrei* (Web8)

Slika 9: *Eisenia fetida* (Web7)

Slika 10: *Lumbricus rubellus* (Web9)

Prehrana gujavica sastoji se od organskih tvari nastalih raspadom uginulih organizama ili od anorganski tvari, to jest minerala koji su sastavni dio tla. Tvoreći nove čestice tla tijekom hranjenja pridonose promjeni sastava nutrijenata i strukture površinskog sloja zemlje u kojemu žive te indirektno utječu na aktivnosti drugih beskralježnjaka u tlu mijenjajući njihov okoliš, gustoću ili utječu na sastav biljnih zajednica (Velki i Ečimović, 2016; Edwards, 2004). Prilikom hranjenja gujavice selektivno uzimaju organske i mineralne tvari iz tla, probavljaju ih i izbacuju iz tijela u obliku produkta bogatijeg organskim tvarima i nutrijentima od okolnog tla. Prolaskom hrane kroz njihov probavni sustav od organskih i anorganskih tvari nastaju agregati koji su stabilni u prisutnosti vode te poboljšavaju drenažu tla i kapacitet opterećenja vlagom (Edwards, 2004). Stabilnost nastalih agregata glavni je faktor za fizičku plodnost tla i upotrebljava se kao indikator njegove strukture (Velki i Ečimović, 2016). Na drenažu, porozitet tla i dostupnost kisika u tlu utječu i tuneli nastali prolaskom gujavica, a trajnijima ih čini njihova mukozna sluz koja ih učvršćuje (Edwards, 2004).

Populacije gujavica ugrožene su na obradivim površinama pretežito zbog mehaničkog uništavanja staništa oranjem te zbog pretjeranog izlaganja gnojivima. Organska gnojiva često mogu biti štetna zbog prisutnosti amonijaka i amonijevih soli na koje su gujavice osjetljive (Edwards, 2004). Pokrovni sustav gujavica sastoji se od tanke kutikule ispod koje se nalazi jednoslojna epiderma koja čini njihovu kožu lako propusnom za tvari otopljene u vodi u tlu (Habdija, 2011). Gujavice dolaze u dodir i sa zagađivalima poput pesticida, teških metala i brojnih drugih kemikalija u otpadnim vodama (Web2.). Među navedenim zagađivalima mogu se pronaći i nanomaterijali čiji učinak može biti štetan za normalne životne funkcije gujavica (Edwards, 2004). Zagađivala se u okolišu nalaze u obliku smjese, a njihovom međusobnom interakcijom često može doći do pojačane toksičnosti. U organizmu zagađivalo može promijeniti detoksifikacijski proces druge vrste zagađivala i time utjecati na njegovu toksičnost. Ispitivanjem učinaka smjese

zagađivala na gujavice utvrđene su različite interakcije među sastojcima, a to su antagonizam, sinergizam i aditivnost (Velki i Ečimović, 2016).

Gujavice su u tlu izložene zagađivalima koje apsorbiraju kroz kožu ili ih hranom unose u organizam, stoga se koriste kao model za ekotoksikološka istraživanja utjecaja zagađujućih tvari na ekosustav tla (Velki i Ečimović, 2017).

2.NANOČESTICE U OKOLIŠU

Nanočestice u okoliš dolaze iz različitih sektora ljudske djelatnosti. Povećana upotreba dovodi i do povećane koncentracije ovih spojeva u podzemnim vodama i tlu (Khan, 2017). Načini na koje nanočestice mogu doći u okoliš su ispuštanje tijekom proizvodnje sirovina, oslobađanje tijekom uporabe i oslobađanje nakon odlaganja otpada koji sadrži nanomaterijale. Ispuštanje u okoliš može biti direktno ili indirektno iz postrojenja za pročišćavanje voda ili odlagališta. Indirektno nanočestice dopijevaju preko otpadnih voda iz sustava za pročišćavanje, primjene biokrutine u tlu ili preko procjednih voda iz odlagališta. Također, antropogeno djelovanje u prometu i primjena nanopesticida u poljoprivredi još su jedni od načina dolaska nanočestica u okoliš (Bundschuh, 2018).

Dolaskom u okoliš putem zraka ili vode nanočestice djeluju kao jezgrice za stvaranje većih čestica koje mogu utjecati na atmosferu, globalne klimatske promjene, transport bioloških vrsta i zagađivala (Sajid, 2015). Stvaranje agregata s organskim tvarima veće molekulske mase u vodenom okolišu dovodi do taloženja nanočestica u sediment i time smanjuje njihovu bioraspodivnost. Dostupnost i mobilnost nanočestica veća je prilikom otapanja u organskim tvarima manje molekulske mase. Na promjenu ekotoksičnosti nanočestica utječe stanje njihove disperzije, pH vrijednost, salinitet i prisutnost organske tvari (Hedge, 2015). Nanočestice u zraku mogu kondenzacijom ili agregiranjem dostići određenu masu te pasti na tlo (Hedge, 2015; Sajid, 2015). Krajnje odredište nanočestica u okolišu je tlo čiji sastav i elektrokemijska svojstva uvelike utječu na ponašanje nanočestica. Agregacija ili mobilnost nanočestica ovisi o poroznosti tla, površinskom naboju i reaktivnosti čestica tla (Hedge, 2015). U okolišu dolazi do kemijske transformacije, agregacije ili disagregacije nanočestica, odnosno odvijaju se procesi starenja. Djelovanje tih procesa, uz svojstva nanočestica i okolišnih uvjeta, određuju budućnost i ekotoksikološki potencijal čestica koje dopiju u okoliš (Bundschuh, 2018).

Osim umjetno sintetiziranih nanočestica u okolišu se nalaze i prirodne nanočestice koje lako mogu stupiti u interakcije sa zagađivalima (teški metali, polumetali,

organski spojevi) zbog svoje velike aktivne površine u odnosu na masu (Khan, 2017; Theng i Yuan, 2008). Neki od prirodnih nanočestica su alumosilikati, manganovi, željezovi i aluminijevi oksidi i hidroksidi, zatim humusne tvari i pokretni koloidi. Rijetko se nanočestice mogu pronaći zasebno jer su one organske čestice koje povezane s anorganskima tvore dijelove tla koje je teško razdvojiti na individualne nanočestice. Na temelju različitih svojstava prirodne nanočestice sudjeluju u reguliranju vode, kruženju elemenata, apsorpciji i prijenosu onečišćivača te služe kao izvor ugljika i nutrijenata biljkama (Theng i Yuan, 2008). Čestice zagađivala mogu se adsorbirati na površinu prirodnih nanočestica, kotaložiti prilikom stvaranja prirodnih nanočestica ili mogu biti zarobljeni u procesu njihova agregiranja. Površina, morfologija, porozitet, taloženje i agregiranje prirodnih nanočestica neki su od svojstava o kojima ovisi vezanje onečišćivača (Khan, 2017).

Različita svojstva i sve veća antropogena upotreba nanočestica potaknuli su znanstvena istraživanja kojima je cilj ustanoviti utjecaj potencijalne toksičnosti nanočestica na žive organizme (Khan, 2017). Neka od provedenih ispitivanja odnose se na utjecaj nanočestica srebra, cerijeva oksida, bakra, bakrovog oksida, cinkova oksida, titanijeva oksida te fulerena na gujavice.

3.EKOTOKSIKOLOŠKI UČINCI NANOČESTICA NA GUJAVICE

3.1 EKOTOKSIKOLOŠKI UČINCI NANOČESTICA SREBRA NA GUJAVICE

Srebrove nanočestice pronalaze primjenu u različitim znanostima kao što su medicina, fizika i kemija, a u prošlosti su se koristile za liječenje inficiranih rana. Danas se zbog novih svojstava antibakterijskog djelovanja nanočestice srebra upotrebljavaju u proizvodnji nanosrebrovih dentalnih materijala, katetera, sredstva za zacjeljivanje opekline, kontejnera za hranu, proizvoda za bebe, filtere za vodu itd. (González Linares, 2016; Khalil, 2016). Nanočestice srebra dopijevaju iz industrijske proizvodnje u otpadne vode, zatim u pročišćivače otpadnih voda u kojima kao nusproizvod nastaje mulj koji se obrađuje i može završiti u okolišu (Shoults-Wilson, 2011).

S ciljem otkrivanja štetnog utjecaja nanočestica srebra provedena su istraživanja o ulozi veličine i koncentracije nanočestica, tipu tla u kojem se nalaze, te o fiziološkom i genotoksičnom odgovoru gujavica na nanočestice (Khalil, 2016; Shoults-Wilson, 2011).

Veličina nanočestica srebra nema utjecaj na toksičnost srebra, dok s povećanjem koncentracije njihova toksičnost raste. Istraživanje Shoults-Wilson i suradnika (2011)

pokazalo je da nanočestice srebra izazivaju smanjenje rasta i reprodukcije kod gujavica vrste *Eisenia fetida* (Slika 9). Vrsta tla važan je faktor pri akumulaciji srebra zato što gujavice u prirodnom tlu apsorbiraju puno veće količine srebra nego u umjetnom. Razlog tome je veća dostupnost iona srebra na koju utječu pH vrijednost tla, sadržaj gline, kapacitet izmjene kationa i manje količine organske tvari u prirodnom tlu. Također, na razinu apsorpcije može utjecati prisutnost i aktivnost raznovrsnih zajednica mikroorganizama u tlima (Shoults-Wilson, 2011).

Istraživanje Van der Ploeg (2012) pokazalo je da nanočestice srebra utječu na smanjen rast i reprodukciju kod vrste *Lumbricus rubellus* (Slika 10). Pored toga, ovo istraživanje pokazalo je da iako izloženost nanočesticama ne uzrokuje smrtnost odraslih jedinki, dolazi do oštećenja epitelnog tkiva, kružnih mišića i mišića kliteluma. Porast koncentracije srebrovih nanočestica uzrokuje pad vitalnosti celomocita zbog čega dolazi do preusmjeravanja energije potrebne za normalne životne funkcije što za posljedicu ima smanjenje rasta i reprodukcije. Veće koncentracije srebra dovode do manjeg broja izleglih jedinki koje i ugibaju (van der Ploeg, 2012).

Nanočestice srebra uzrokuju i smanjenje aktivnosti celulaze u probavnom sustavu paralelno s povećanjem njihove koncentracije što je utvrđeno eksperimentom Khalila (2016) na gujavicama vrste *Aporrectodea caliginosa* (Slika 7). Također, porastom koncentracije nanočestica došlo je do opadanja produkcije kokona i izlijeganja, te oštećenja DNA što se detektira na temelju veće frekvencije mikronukleusa u stanicama. Abnormalnosti prouzrokovane djelovanjem nanočestica srebra pokazuje i povećanje brojnosti binuklearnih stanica kod celomocita i stanica crijeva (Khalil, 2016). Zaključeno je da su nanočestice srebra toksične upravo zbog disocijacije iona srebra s površine nanočestica što predstavlja dugoročni problem. Budući da su nanočestice veoma malene, lako mogu ući u stanicu i vezati se za makromolekule u citoplazmi. Za procjenu ekotoksičnosti nanočestica srebra na gujavice veoma je važna gustoća populacije koja bi se zbog smanjene reprodukcije uzrokovane nanočesticama mogla umanjiti, iako su odrasle gujavice pokazale dobru otpornost. Na razvoj kokona utječe i hrana kojom se gujavice hrane, stoga i nanočestice indirektno mogu utjecati na reproduktivnost (Khalil, 2016). Pretpostavlja se da će u budućnosti površinski sloj zemlje u kojem žive i gujavice biti kronično izložen česticama srebra koje u njega dospijevaju zajedno s kanalizacijskim muljem. Također, antimikrobno djelovanje nanočestica srebra može narušiti ravnotežu u mikrobiološkom svijetu tla (Van der Ploeg, 2012).

3.2 EKOTOKSIKOLOŠKI UČINCI NANOČESTICA CERIJEVA OKSIDA NA GUJAVICE

Cerij je lantanoidni metal čiji se oksid koristi kao apsorber ultraljubičaste svjetlosti, agens za poliranje, senzore plinova, a nanočestice cerijeva oksida u kozmetici, potrošačkim proizvodima i visokoj tehnologiji. Nanočestice cerijeva oksida dobri su oksidni ionski vodiči kod oksidnih gorivih ćelija te se upotrebljavaju za izradu elektroda koje se upotrebljavaju u sensorima za plinove. Kako bi se omogućila potencijalna upotreba nanočestica u biomedicini one se prevlače slojevima drugih kemijskih spojeva kako bi bile biokompatibilne, stabilne ili topljive u vodi. Nanočestice cerijeva oksida slabije su topljive u vodi, stoga se mogu, primjerice, obložiti slojem dekstrana koji im omogućuje antioksidativna svojstva. Te se nanočestice mogu primijeniti za bolesti povezane s reaktivnim kisikovim vrstama kao što su bolesti srca, Alzheimerova bolest i rak (Rajeshkumar i Naik, 2018). Nakon upotrebe, veći dio nanočestica cerijeva oksida dospijeva u okoliš putem mulja nastalog u procesima pročišćavanja otpadnih voda (Lahive, 2014).

Ispitivanja Lahive i sur. (2014) o utjecaju nanočestica cerijeva oksida na gujavice vrste *Eisenia fetida* (Slika 9) pokazala su da nanočestice ne utječu na preživljavanje i reprodukciju. Uspoređujući s istraživanjima o utjecaju drugih nanočestica, utvrđeno je da veličina ne utječe na toksičnost, međutim nanočestice cerijeva oksida pokazuju znatno manju toksičnost u odnosu na druge vrste ispitivanih nanočestica. Porast koncentracije dovodi do povećanja količine akumuliranog cerija u organizmu gujavica koji uzrokuje oštećenja tkiva kutikule i crijevnog epitela. Histološki rezultati ukazuju i na eroziju i fibrozu kružnih mišića dok na longitudinalne mišiće nanočestice cerijeva oksida ne utječu. Slabije otapanje, odnosno disocijaciju nanočestica cerijeva oksida u vodi objašnjava slabije toksične učinke na gujavice i slabiju reaktivnost zbog koje mogu opstati u okolišu (Lahive, 2014).

3.3 EKOTOKSIKOLOŠKI UČINCI NANOČESTICA BAKRA, BAKROVA OKSIDA I CINKOVA OKSIDA NA GUJAVICE

Nanočestice bakra se zbog svojih fiziokemijskih svojstava kao što su visoka temperatura taljenja, magnetizam, električna i kemijska vodljivost, apsorpcija svjetlosti i prijenos topline, upotrebljavaju u različitim industrijskim granama. Zbog svoje velike aktivne površine u odnosu na volumen i lake interakcije s drugim česticama, nanočestice bakra vrlo su dobri i učinkoviti antimikrobni agensi. Primjenu nalaze u sensorima,

sustavima za prijenos topline, materijalima visoke čvrstoće i katalizatorima zahvaljujući visokoj reaktivnosti. Biokompatibilne su, hidrofilne i sposobne odupirati se agregiranju, stoga imaju biološku i biosenzornu primjenu (Tamilvanan, 2014). Nanočestice bakrova oksida koriste se za magnetnu keramiku, senzore plinova, solarne ćelije, kao materijali za izradu elektroda i skladištenje vodika te u fotokatalitičkim reakcijama. Zbog sposobnosti detekcije plinova kao što su ugljikov i dušikov dioksid potencijalnu primjenu pronalaze u procesima separacije i skladištenja štetnih plinova (Davaranah, 2015). Dokazana toksičnost nanočestica cinkova oksida prema bakterijama dovodi do moguće primjene u biomedicinske i antibakterijske svrhe uz preduvjet biokompatibilnosti i topljivosti u vodi. Prema jednom od istraživanja nanočestice cinkova oksida uzrokovale su i preferencijalnu smrt stanica raka i aktiviranih ljudskih T-stanica (Vaseem, 2009). Kao i mnoge metalne nanočestice, nanočestice cinkova oksida koriste se u solarnim ćelijama, kemijskim i biosenzorima, diodama, foto-detektorima, u fotokatalizi, pastama za zube, premazima, bojama i zbog svojstva blokiranja UV zraka koriste se u kremama za sunčanje (Mwaanga, 2017; Vaseem, 2009). Uspoređujući s drugim metalnim nanočesticama, u mnogim istraživanjima utvrđena je visoka toksičnost nanočestica bakra, bakrova oksida i cinkova oksida (Karlsson, 2015). Oksidativni stres jedna je od posljedica toksičnih utjecaja tih nanočestica na organizma, a očituje se prestankom rada mehanizama koji brane organizam od štetnih djelovanja slobodnih radikala i reaktivnih kisikovih vrsta (Mwaanga, 2017).

U radu Mwaanga i sur. (2017) istraživane su razlike u sposobnosti različitih koncentracija nanočestica bakra, bakrova i cinkova oksida u uzrokovanju oksidativnog stresa kod gujavica vrste *Eisenia fetida* (Slika 9) u umjetnom i prirodnom tlu. Mjerenjem akumulacije metala bakra i cinka atomskom apsorpcijskom spektroskopijom utvrđeno je da akumulacija metala u tkivima raste kako i koncentracija nanočestica kod gujavica u obje vrste tla. Nakon provedenog eksperimenta nije bilo uginulih gujavica, ali je uočeno smanjenje mase organizama povezano s dozom kemikalija. Rezultati su pokazali da u prirodnom tlu aktivnost superoksid dismutaze raste porastom koncentracije nanočestica sve do određene točke kada počinje opadati. Objašnjenje inaktivacije je prisutnost stvorenog vodikovog peroksida čija je koncentracija bila dovoljna za smanjenje aktivnosti enzima. U umjetnom tlu uočena je manja aktivnost superoksid dismutaze zbog prisutnosti veće količine organskih tvari. Između čestica metala i organskih tvari u tlu može doći do interakcije i stvaranja kompleksa koji nije biodostupan što rezultira smanjenom toksičnošću čestica. Kod gujavica u prirodnom tlu prisutnost nanočestica uzrokovala je porast količine glutaciona, no porastom koncentracije nanočestica došlo je do smanjenja

sinteze glutationa. Uzrok takvoj pojavi je djelovanje glutationa samo tijekom blagog oksidativnog stresa. Prisutnost veće količine organske tvari u umjetnom tlu je, zbog kompleksacije s nanočesticama, omogućila minimalnu promjenu u aktivnosti glutationa pri različitim koncentracijama nanočestica. Na kraju ispitivanja potvrđeno je da toksični učinci prisutnih metala ovise o vrsti tla zato što su kod jednakih koncentracija nanočestica razine oksidativnog stresa bile različite u različitim vrstama tla. Također, akumulacija nanočestica značajno je veća od akumulacije krupnijih čestica što znači da razina akumuliranih čestica u organizmu ovisi o njihovoj veličini (Mwaanga, 2017).

3.4 EKOTOKSIKOLOŠKI UČINCI NANOČESTICA TITANIJEVA DIOKSIDA NA GUJAVICE

Titanijev dioksid se zbog svoje kemijske stabilnosti, dobre optičke transparentnosti, visokog indeksa loma, niske cijene i netoksičnosti upotrebljava kao fotokatalizator prilikom pretvorbe sunčeve energije i za građevinske materijale pločice, beton, boje i stakla. Koristi se i kao fotoaktivni premaz koji ima sposobnost samočišćenja aktivacijom pomoću sunčeve svjetlosti (fotoaktivacijom), svojstvo hidrofilnosti koje doprinosi samočišćenju i vrlo dobra antibakterijska svojstva (Haider, 2017). Zbog dobre katalitičke sposobnosti upotrebljava se i u potrošačkim proizvodima (Shi, 2013). Nanočestice titanijeva dioksida dospijevaju u okoliš putem mulja nastalog u procesu pročišćavanja otpadnih voda koji je u direktnom dodiru s tlom ili u njega dolazi na odlagalištima (Bundschuh, 2018).

U istraživanju Schlich i sur. (2012) djelovanjem nanočestica titanijeva dioksida na vrstu *Eisenia fetida* (Slika 9) tijekom duljeg razdoblja došlo je do poremećaja u cirkaanualnom ritmu gujavica. Titanijev dioksid uzrokuje veću reproduktivnu aktivnost zimi u odnosu na ljetne mjeseci što je suprotno normalnoj reproduktivnoj aktivnosti gujavica. Utjecaj na reprodukciju nisu imale nanočestice s prevlakom (Schlich, 2012). Eksperimentom kojeg su proveli McShane i sur. (2010) koristeći vrste *Eisenia fetida* i *Eisenia andrei* (Slika 8) utvrđeno je da nanočestice titanijeva dioksida nemaju značajan utjecaj na preživljavanje odraslih gujavica kao ni na preživljavanje i rast mladih jedinki, produkciju kokona te izlijevanje mladih. Brojnost mladih jedinki vrste *Eisenia fetida* bila je značajno smanjena tek pri ekstremno visokoj koncentraciji nanočestica titanijeva dioksida. Iako se pokazalo da nanočestice titanijeva dioksida nisu toksične za gujavice, one su ih detektirale i izbjegavale. Pretpostavlja se da su mogući uzroci takve osjetljivosti gujavica direktan odgovor na stimulaciju receptora, indirektan odgovor na promjene u

kemijskom sastavu tla ili rezultat učinka nanočestica na mikroorganizme u tlu. Na temelju istraživanja predviđa se da količina nanočestica titanijeva oksida koji dopijeva u okoliš ne predstavlja značajan rizik za gujavice (McShane, 2010).

3.5 EKOTOKSIKOLOŠKI UČINCI NANOČESTICA FULLERENA C60 NA GUJAVICE

Fulereni (C₆₀), ugljikove nanočestice, imaju ulogu poboljšavanja svojstava proizvoda kao što je plastika, upotrebljavaju se u kozmetičkoj industriji i industriji sportske opreme. Zahvaljujući visokom afinitetu za elektrone, nanočestice fulerena imaju sposobnost apsorbirati slobodne radikale zbog čega su se počele upotrebljavati u kozmetičkim proizvodima protiv starenja. Mogućnost dobivanja tankih, laganih i čvrstih struktura predstavlja prednost koja se koristi u proizvodnji teniskih i badminton reketa, te golf štapova (Web1.).

Doktorski rad znanstvenice van der Ploeg (2012) obuhvaća istraživanje utjecaja nanočestica fulerena na gujavice vrste *Lumbricus rubellus* (Slika 10) tijekom različitih stadija života, od kokona, preko juvenilnog i subadultnog do odraslog stadija. Na temelju podataka dobivenih na kraju eksperimenta utvrđeno je da nanočestice fulerena ne utječu značajno na preživljavanje i stopu rasta odraslih gujavica. Veoma značajan utjecaj imale su nanočestice na produkciju kokona koja je pri višoj koncentraciji fulerena bila manja i od 60% u odnosu na kontrolu. Također, stopa smrtnosti mladih jedinki bila je visoka kod više koncentracije nanočestica, dok manja koncentracija nije utjecala na mortalitet. Manja koncentracija nanočestica fulerena utjecala je na smanjenje stope rasta mladih jedinki, a kod mladih tretiranih s većom koncentracijom nije uočena značajna razlika u stopi rasta uspoređujući s kontrolom. Iako je izlaganje nanočesticama fulerena izazvalo smanjenu stopu rasta i veći mortalitet, preživjele mlade jedinke imale su veće proporcije tijela. Ovo istraživanje ukazuje na ozbiljne posljedice koje bi nanočestice fulerena mogle izazvati tijekom duljeg izlaganja populacijama gujavica u tlu, uz naglasak na veću osjetljivost mladih jedinki (Van der Ploeg, 2012).

4.ZAKLJUČAK

Široka upotreba uzrokuje dospijevanje značajnih količina nanočestica u tlo gdje mogu štetno utjecati na organizme koji u njemu žive, kao npr. gujavice. U ovom radu iznesen je pregled nekih od dosadašnjih istraživanja ekotoksikoloških učinaka nanočestica na različite vrste gujavica koje žive u tlu. Eksperimenti su pokazali da izravan štetan utjecaj na gujavice imaju nanočestice srebra, bakra, bakrova oksida, cinkova oksida i fulerena, dok je toksično djelovanje nanočestica cerijeva oksida umanjeno zbog slabije reaktivnosti. Veoma malen utjecaj na organizam gujavica imaju nanočestice titanijeva dioksida. Opasnost za narušavanje homeostaze gujavica predstavljaju ioni srebra nastali disocijacijom nanočestica koje dulje stoje u tlu. Akumulacija srebra dovodi do potencijalnog smanjivanja jačine imunološkog sustava gujavica, zatim oštećenja DNA molekula i različitih tkiva. Opadanje produkcije kokona, smanjenje izlijeganja mladih i smanjenje biomase jasan su pokazatelj negativnog učinka srebra na gujavice. Dobra akumulacija metala bakra, bakrova oksida i cinkova oksida doprinosi oksidativnom stresu koji ovi spojevi izazivaju u organizmu gujavica. Vrsta tla u kojem gujavice žive je važna zato što organske tvari mogu vezati metale stvarajući kompleksne spojeve. Stoga, što je veća koncentracija organskih tvari, više se metalnih iona veže i manji postotak metala može ući u organizam gujavica i izazvati oksidativni stres. Vrlo toksičan utjecaj na organizam gujavica imaju i fulereni uzrokujući manju stopu rasta i veći mortalitet kod mladih jedinki koje su pokazale i mnogo veću osjetljivost od odraslih. Nanočestice cerijeva oksida se dobro akumuliraju u organizam gujavica i zbog slabije reaktivnosti dovode samo do oštećenja tkiva ne izazivajući smanjenje stope preživljavanja ili reprodukcije. Iako nisu toksične za organizam, nanočestice titanijeva dioksida mogu narušiti prirodni ritam gujavica mijenjajući razdoblje reproduktivne aktivnosti.

Sva dosadašnja istraživanja utvrdila su da veličina nanočestica nema značajan utjecaj na toksičnost. Za većinu nanočestica dokazano je kako duljim stajanjem u tlu dolazi do otpuštanja iona s njihove površine koji zatim imaju negativan učinak na gujavice. Ekotoksikološkim istraživanjima ukazuje se na mogućnost postizanja neravnoteže ekološkog sustava u budućnosti zbog utjecaja nanočestica na gujavice o kojima ovisi sastav tla. Struktura i sastav tla utječu na rast biljaka koje su važan faktor u prvenstveno prehrani životinja i ljudi. Kako bi se spriječile negativne posljedice prisutnosti nanočestica u okolišu, potrebno je razviti sustave koji će ih na efikasan način zadržati izvan doticaja s okolišem.

5.LITERATURA

Bundschuh, M., Filser, J., Lüderwald, S., McKee, M.S., Metreveli, G., Schaumann, G.E., Schulz, R., Wagner, S. (2018) Nanoparticles in the environment: where do we come from, where do we go to?. *Environmental Sciences Europe* 30: 1-17.

Davarpanah, S.J., Karimian, R., Goodarzi, V., Piri, F. (2015) Synthesis of Copper (II) Oxide (CuO) Nanoparticles and Its Application as Gas Sensor. *Journal of Applied Biotechnology Reports* 2: 329-332.

Edwards, C.A. (ur.) (2004) *Earthworm ecology*. CRC Press LLC, Florida.

González Linares, M. (2016) Ecotoxicological Effects of Silver Nanoparticles in Biosolid-Amended Soils to the Earthworm *Eisenia fetida* and the Crop *Hordeum vulgare*. Diplomski rad. Department of Natural Resource Sciences McGill University, Montréal.

Habdija, I., Primc Habdija, B., Radanović, I., Špoljar, M., Matoničkin Kepčija, R., Vujčić Karlo, S., Miliša, M., Ostojić, A., Sertić Perić, M. (2011) Koljeno:Annelida (kolutičavci). U: Novoselić, D. (ur.) *Protista-Protozoa-Metazoa-Invertebrata*. Alfa, Zagreb, str. 288-306.

Haider, A.J., Al-Anbari, R.H., Kadhim, G.R., Salame, C.T. (2017) Exploring potential Environmental applications of TiO₂ Nanoparticles. *Energy Procedia* 119: 332-345.

Hedge, K., Goswami, R., Sarma, S.J., Veeranki, V.D., Brar, S.K. (2015) Nano-Ekotoxicology of Natural and Engineered Nanomaterials for Different Ecosystems. U: Brar, S.K., Zhang, T.C., Surampalli, R.Y., Verma, M., Tvagi, R.D. (ur.) *Nanomaterials in the Environment*. American Society of Civil Engineers, SAD, 487-511.

Jurandy, E., Lopes Alves, P.R., Nogueira Cardoso, B. (2012) Soil Ecotoxicology. U: Begum G., *Ecotoxicology*. InTech, Rijeka, Hrvatska, 27-51.

Karlsson, H.L., Toprak, M.S., Fadeel, B. (2015) Toxicity of Metal and Metal Oxide Nanoparticles. U: Nordberg, G.F., Fowler, B.A., Nordberg, M. (ur.) *Handbook on the Toxicology of Metals*. Academic Press, SAD, 75-112.

Khalil, A.M. (2016) Physiological and genotoxic responses of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* exposed to sublethal concentrations of AgNPs. *The Journal of Basic & Applied Zoology* 74: 8-15.

Khan, I., Khan, I., Saeed, K. (2017) Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry* 10: 2-20.

Lahive, E., Jurkschat, K., Shaw, B.J., Handy, R.D., Spurgeon, D.J., Svendsen, C. (2014) Toxicity of cerium oxide nanoparticles to the earthworm *Eisenia fetida*: subtle effects. *Environmental Chemistry* 11: 268-278.

Lynch, M.J., Stretesky, P.B. (ur.) (2014) *Exploring Green Criminology: Toward a Green Criminological Revolution*. Routledge, Ujedinjeno kraljevstvo.

McShane, H., Sarrazin, M., Whalen, J.K., Hendershot, W.H., Sunahara, G.I. (2010) Reproductive and behavioral responses of earthworms exposed to nano-sized titanium dioxide in soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31: 184-193.

Mwaanga, P. (2018) *Risks, Uncertainties, and Ethics of Nanotechnology in Agriculture*. U: Çelik, Ö. (ur.) *New Visions in Plant Science*. InTech Open, Ujedinjeno Kraljevstvo, 143-160.

Mwaanga, P., Mbulwe, S., Shumbula, P., Nyirenda, J. (2017) Investigating the Toxicity of Cu, CuO and ZnO Nanoparticles on Earthworms in Urban Soils. *Journal of Pollution Effects & Control* 5: 1-9.

Rajeshkumar, S., Naik, P. (2018) Synthesis and biomedical applications of Cerium oxide nanoparticles. *Biotechnology Reports* 17:1-5.

Sajid, M., Ilyas, M., Basheer, C., Tariq, M., Daud, M., Baig, N., Shehzad, F. (2015) Impact of nanoparticles on human and environment: review of toxicity factors, exposures, control strategies, and future prospects. *Environmental Science and Pollution Research* 22: 4122-4143.

Schlich, K., Terytze, K., Hund-Rinke, K. (2012) Effect of TiO₂ nanoparticles in the earthworm reproduction test. *Environmental Science Europe* 24: 1-10.

Scott-Fordsmand, J.J., Peijnenburg, W.J.G.M., Semenzin, E., Nowack, B., Hunt, N., Hristozov, D., Marcomini, A., Irfan, M.A., Sánchez Jiménez, A., Landsiedel, R., Tran, L., Oomen, A.G., Bos, P.M.J., Hund-Rinke, K. (2017) Environmental Risk Assessment Strategy for Nanomaterials. *Environmental Research and Public Health* 14: 1-20.

Shi, H., Magaye, R., Castranova, V., Zhao, J. (2013) Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Particle and Fibre Toxicology* 10: 1-33.

Shoults-Wilson, W.A., Reinsch, B.C., Tsyusko, O.V., Bertsch, P.M., Lowry, G.V., Unrine J.M. (2011) Role of Particle Size and Soil Type in Toxicity of Silver Nanoparticles to Earthworms. *Soil Science Society of America Journal* 75: 365-377.

Tamilvanan, A., Balamurugan, K., Ponappa, K., Madhan Kumar, B. (2014) Copper Nanoparticles: Synthetic Strategies, Properties and Multifunctional Application. *International Journal of Nanoscience* 13: 1-22.

Theng, B.K.G., Yuan G. (2008) Nanoparticles in the Soil Environment. *Elements* 4: 395-399.

Truhaut, R. (1977) Ecotoxicology: Objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 1: 151-173.

Van der Ploeg, M. (2012) Unravelling hazards of nanoparticles to earthworms, from gene to population. Doktorski rad. Wageningen University, Wageningen, Nizozemska.

Vaseem, M., Umar, A., Hahn, Y.B. (2009) ZnO Nanoparticles: Growth, Properties, and Applications. U: Umar, A., Hahn, Y.B. (ur.) *Metal Oxide Nanostructures and Their Applications*. American Scientific Publishers, SAD, 1-36.

Velki, M., Ečimović, S. (2016) Important Issues in Ecotoxicological Investigations Using Earthworms. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 239: 157-184.

Velki, M., Ećimović, S. (2017) Earthworms As A Suitable Organisms For Soil Pollution Monitoring–Possibilities And Limitations. U: Horton, C.G. (ur.) Earthworms: Types, Roles and Research. Nova Science Publishers, SAD, 179-206.

Xanthopoulou, L., Delhanty, JDA, Mania, A., Mamas, T., Serhal, P., SenGupta, SB., Mantzouratou, A. (2011) The nature and origin of binucleate cells in human preimplantation embryos: relevance to placental mesenchymal dysplasia. *Reproductive BioMedicine Online* 22: 362-370.

6. PRILOZI

1.Web1. DaNa2.0 (Information about nanomaterials and their safety assessment):
Fullerenes–Overview.

<https://www.nanopartikel.info/en/nanoinfo/materials/fullerenes/overview> (25.6.2019.)

2.Web2. Soil Science Society of America <https://www.soils.org/discover-soils/soils-in-the-city/soil-contaminants> (5.7.2019.)

3. Web3. <http://www.getnanomaterials.com/ag-100-20-nm/> (26.6.2019.)

4. Web4. <https://www.nanoshel.com/product/sio2-nanoparticles> (26.6.2019.)

5. Web5. <https://www.rdmag.com/news/2018/05/new-method-studying-semiconductor-nanoparticles-has-been-tested> (26.6.2019.)

6. Web6. <https://www.precisionnanosystems.com/areas-ofinterest/formulations/polymeric-nanoparticles> (26.6.2019.)

7. Web7. <https://www.precisionnanosystems.com/areas-of-interest/formulations/lipidnanoparticles> (26.6.2019.)

8. Web8. <https://www.gbif.org/occurrence/2247946316> (26.6.2019.)

9. Web9. <https://solanacompost.wordpress.com/tag/eisenia-andrei/> (26.6.2019.)

10. Web10. https://www.discoverlife.org/mp/20p?see=I_MWS80349&res=640
(26.6.2019.)