

Utjecaj nanočestica bakra na zelene alge

Duvančić, Iva

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:615241>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-21**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Iva Duvančić

Utjecaj nanočestica bakra na zelene alge

Završni rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Iva Duvančić

**The effect of copper nanoparticles on green
algae**

Bachelor thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa preddiplomskog studija Molekularne biologije na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Petre Peharec Štefanić.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Završni rad

Utjecaj nanočestica bakra na zelene alge

Iva Duvančić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Nanočestice se zbog svojih specifičnih svojstava koriste u različite svrhe. Veliki broj industrija ih koristi u svojim proizvodima kao što su baterije, plastični ili metalni premazi, antibakterijska sredstva te dijelovi elektroničkih uređaja kao što su elektronički čipovi. Povećana proizvodnja i upotreba nanočestica na kraju rezultira ulaskom nanočestica u vodene ekosustave u kojima zbog svoje veličine i posebnih svojstava mogu utjecati na vodene organizme. Proučavan je utjecaj nanočestica bakrova oksida na zelene alge. Uslijed djelovanja nanočestica bakrova oksida dolazi do povećanja količine reaktivnih oblika kisika, peroksidacije lipida, smanjenja aktivnosti antioksidativnih enzima te inhibicije rasta stanica alge.

Ključne riječi: bakrov oksid, toksičnost, oksidativni stres
(26 stranica, 10 slika, 0 tablica, 23 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: izv. prof. dr. sc. Petra Peharec Štefanić

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Bachelor thesis

The effect of copper nanoparticles on green algae

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Due to their specific properties, nanoparticles are used for various purposes. A large number of industries use them in products such as batteries, plastic or metal coatings, antibacterial agents and parts of electronic devices such as electronic chips. The increased production and use of nanoparticles eventually results in the entry of nanoparticles into aquatic ecosystems where, due to their size and special properties, they can affect aquatic organisms. The influence of copper oxide nanoparticles on green algae was studied. After exposure of algae to copper oxide nanoparticles, there is an increase in the amount of reactive oxygen species, lipid peroxidation, a decrease in the activity of antioxidant enzymes, and the inhibition of algae cell growth.

Keywords: copper oxide, toxicity, oxidative stress
(26 pages, 10 figures, 0 tables, 23 references, original in: Croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Petra Peharec Štefanić

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Nanomaterijali i njihova upotreba	1
1.2. Nanočestice bakrova oksida	3
2. Utjecaj nanočestica na alge	5
2.1. Utjecaj na rast i vijabilnost stanica alge	5
2.2. Oksidacijski stres	7
2.3. Oštećenje membrane i peroksidacija lipida	8
2.4. Aktivnost esteraze	10
2.5. Fotosinteza i sinteza pigmenata	10
3. Pozitivan utjecaj nanočestica bakrova oksida	13
4. Usporedba utjecaja nanočestica, mikročestica i iona bakra	14
5. Utjecaj kombinacije svjetlosti i nanočestica	15
6. Zaključak	16
Literatura	18
Životopis	20

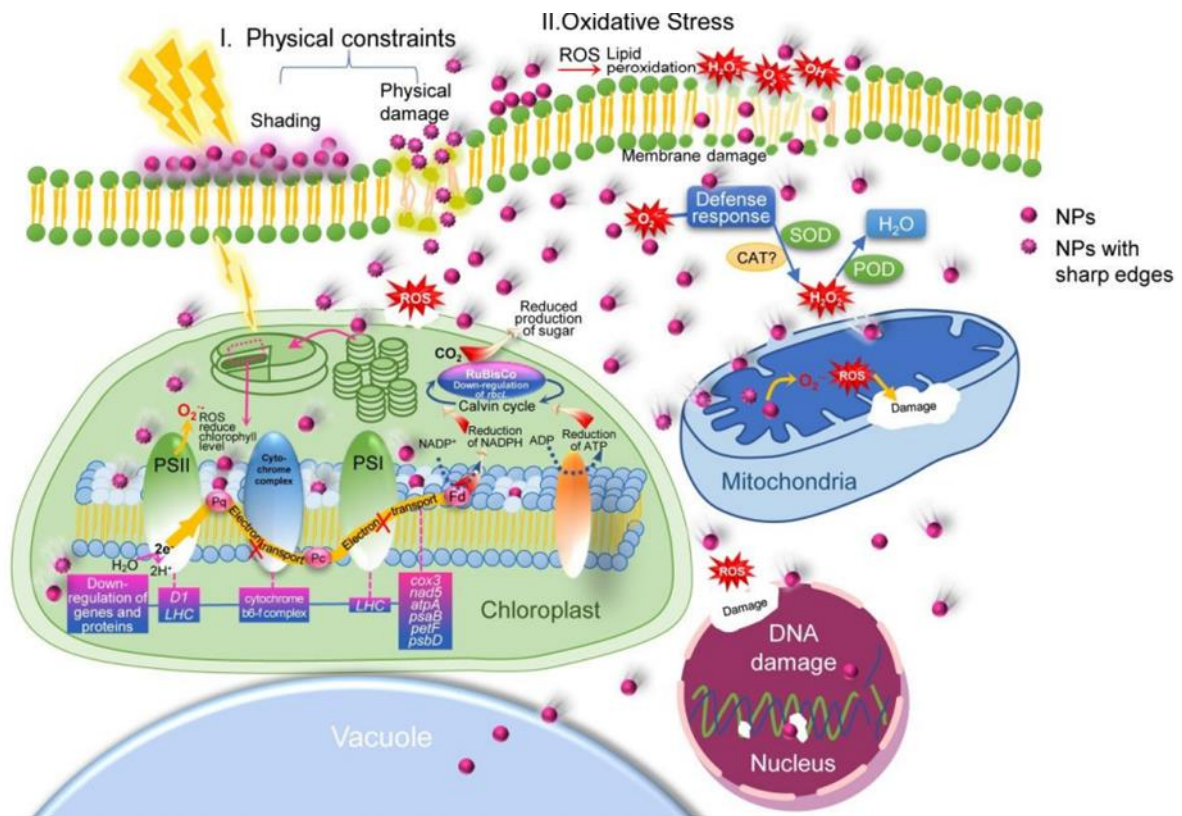
1. Uvod

1.1. Nanomaterijali i njihova upotreba

Razvojem nanotehnologije pojavljuju se potencijalni novi rizici za zdravlje i okoliš. Nanomaterijali su umjetno dizajnirani materijali koji se prema smjernicama Međunarodne organizacije za standardizaciju (2008) i SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks) (2007) definiraju kao proizvedeni materijali s najmanje jednom dimenzijom između 1 i 100 nm koji imaju jedinstvena kemijska i fizikalna svojstva. U jednoj dimenziji to su nanofilmovi i nanoploče, u dvije dimenzije to su nanocijevi i nanovlakna, a u tri dimenzije radi se o nanočesticama (Handy i sur. 2008). Nanočestice zapravo nisu revolucionarni ljudski izum, one u prirodi postoje od nastanka Zemlje u obliku atmosferske prašine, vulkanske prašine i sedimentnih stijena (Handy i sur. 2008). Uspoređujući s umjetno proizvedenim nanočesticama organizmi na Zemlji puno su više izloženi prirodnim nanočesticama. Pitanje toksičnosti umjetno proizvedenih nanočestica upravo proizlazi iz saznanja o toksičnosti nekih prirodnih nanočestica kao što je vulkanska prašina (Lee i Richards 2004). Istraživanja na nanočesticama jako su važna i zbog toga kakva se slika o njima stvara u javnosti. Naime u zadnjem desetljeću dogodilo se nekoliko situacija u kojima je upotreba nanočestica prikazana u lošem svijetlu, tako zvanih „nano scar-ova“ zbog kojih javnost sada nanočestice automatski smatra kao nešto negativno (Lewinski i sur. 2008). Američka agencija za zaštitu okoliša (United States Environmental Protection Agency) je objavila da nanočestice titanijevog dioksida koje su pronađene u kremama za sunčanje uzrokuju oštećenja na mozgu kod miševa (Lewinski i sur. 2008). S druge strane istražuje se korištenje nanočestica u medicinske svrhe gdje bi se nanočestice mogle koristiti kao prenositelji lijekova i biosenzori (Lewinski i sur. 2008). Također postoje istraživanja o upotrebi magnetnih nanočestica, kao što je manganov (II) oksid (MnO), kao kontrastnog sredstva za magnetsku rezonanciju (Cai i sur. 2019). U tom slučaju nanočestice se namjerno unose u organizam pa je važno odrediti njihov toksični potencijal. Kada nanočestice služe za unos nekih lijekova ili kada se koriste kao kontrastna sredstva uglavnom imaju omotač od proteina, antitijela ili DNA i potrebno je sa sigurnošću znati da neće uzrokovati štetu stanicama.

Nanočestice se razlikuju od običnih nakupina metalnih oksida jer imaju veću aktivnu površinu i tako im je povećana reaktivnost. Na taj način mogu prouzročiti veću štetu u živim

organizmima. Baš zato što imaju jedinstvena svojstva kao što je mala veličina, velika aktivna površina i iznimna stabilnost u vodi, postoji velika potražnja u svim industrijama za njihovo korištenje, ali isto tako raste i opasnost za žive organizme. Najviše se u industriji koriste nanočestice srebra te tako i postoji najviše istraživanja o utjecaju nanočestica srebra na različite organizme. Također provode se istraživanja i o utjecaju nanočestica bakrova oksida, silicijeva dioksida, titanijeva dioksida, cinkova oksida i ugljika (Vance i sur. 2015). Chen i suradnici (2019) istraživali su utjecaj različitih nanočestica na alge fokusirajući se na njihov ulazak u stanicu i detaljno djelovanje na strukture u stanici (Slika 1.). Uvidjeli su da u algama koje su tretirane nanočesticama dolazi do nagomilavanja reaktivnih oblika kisika (ROS) te da nastaju oštećenja na staničnoj membrani i da se smanjuje efikasnost fotosinteze.



Slika 1. Prikazani su mehanizmi toksičnosti nanočestica na staničnu membranu i organele alge *Chlorella sp.* Pq: plastokinon; Pc: plastocijanin; Fd: feredoksin; SOD: superoksid dismutaza; CAT: katalaza. Preuzeto i prilagođeno iz Chen i sur. 2019.

Toksičnosti najviše pridonosi oksidativni stres koji nastaje uslijed izlaganja alge nanočesticama koje fizički smetaju ulasku hranjivih tvari u algu. One uzrokuju nastanak reaktivnih oblika kisika (ROS) zbog kojih dolazi do peroksidacije lipida membrane i aktivacije antioksidativnih

enzima (npr. superoksid dismutaze (SOD) i peroksidaze (POD)). Prevelika akumulacija ROS-ova dovodi do oštećenja membrane mitohondrija, oštećenja molekule DNA i smanjenja fotosinteze. Izlaganje alge nanočesticama dovodi do utišavanja gena koji kodiraju protein reakcijskog centar PSII (*D1*), proteine fotosustava koji sakupljaju svjetlost (*LHC*), proteine koji sudjeluju u lancu prijenosa elektrona (*cox3*, *nad5*, *atpA*, *psaB*, *petF*, *psbD*) i protein RuBisCo (*rbcL*). Osim toga, nakon izlaganja alge nanočesticama, smanjena je ekspresija proteina (npr. kompleks citokroma b₆-f) koji su uključeni u fotosintezu. Također, smanjena sinteza NADPH i ATP-a tako inhibira asimilaciju CO₂ zbog čega se smanjuje količina šećera nastalog u Calvinovom ciklusu.

Bez obzira na veliku izloženost različitim nanočesticama dugoročan učinak na cjelokupni ekosistem još nije poznat te je potrebno provesti još mnogo istraživanja na različitim organizmima u različitim uvjetima kako bi široka upotreba proizvoda koji sadrže nanočestica bila što sigurnija.

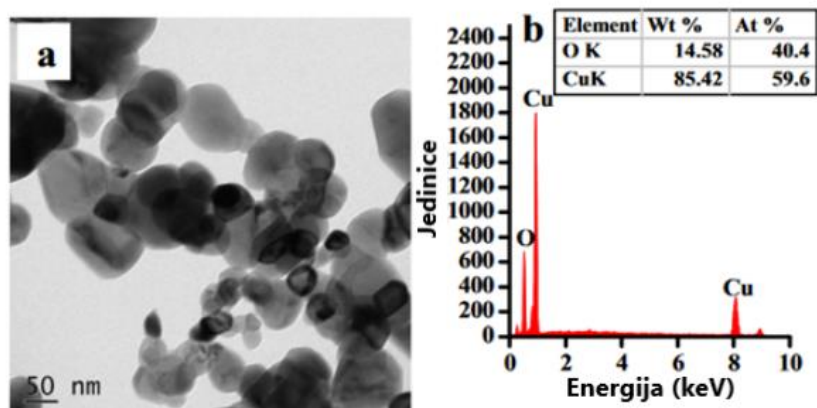
1.2. Nanočestice bakrova oksida

Nanočestice bakrova oksida (CuO) su sve više prisutne u proizvodima koji su široko dostupni, a kao rezultat toga dolazi do sve većeg nekontroliranog ispuštanja nanočestica u okoliš (Caballero-Guzman i Nowack 2018). Nanočestice CuO se mogu nalaziti u premazima za brodove protiv obraštaja (Neira i sur. 2013), antibakterijskim sredstvima i nekim keramičkim i tekstilnim proizvodima (Cheloni i sur. 2016), ali najčešće se koriste u dijelovima elektroničkih uređaja kao što su poluvodiči i elektronički čipovi (Bodarenko i sur. 2013). Organizmima u moru bakar je u nekoj mjeri potreban za normalno funkcioniranje stanica. Ima ulogu katalitičkog i strukturnog kofaktora za enzime koji sudjeluju u staničnom metabolizmu, transportu kisika i željeza te prijenosu signala (Kim i sur. 2008), ali ako je prisutan u većim količinama može na različite načine uzrokovati štetu stanicama (Janani i sur. 2020). Morski okoliš je lagano bazičan i nanočestice CuO se u takvom okolišu sporije otapaju (Che i sur. 2018). Posljedično nanočestice CuO koje završe u takvom okolišu ne razgrađuju se brzo već se dugo u njemu zadržavaju. Postoje istraživanja o toksičnom utjecaju CuO nanočestica na različite vrste biljaka, mikroorganizme i kralježnjake (Adam i sur. 2015; Bondarenko i sur. 2013; Huang i sur. 2019; Aruoja i sur. 2009; Janani i sur. 2020). Čini se da toksičnosti najviše

pridonosi topljivost nanočestica čime nastaju slobodni ioni bakra koji u većim koncentracijama mogu potaknuti nastajanje reaktivnih oblika kisika (ROS) koji posljedično uzrokuju oksidativni stres oksidirajući proteine i lipide u staničnoj membrani i ostale biomolekule u stanici (Melegari i sur. 2013; Aruoja i sur. 2009; Wang i sur. 2019). Također nanočestice prodiru u stanice vodenih organizama te uništavaju membrane stanica što uzrokuje istjecanje sadržaja stanice, a onda posljedično i smrt organizma (Wang i sur. 2019).

Najveći problem nanočestica bakrova oksida (Slika 2.a) nastaje zbog topljivosti u vodi i otpuštanja iona koji su konačan razlog toksičnosti kod organizama (Bondarenko i sur. 2013). Nanočestice CuO mogu agregirati i uglavnom nastaju agregati veći od 450 nm (Adam i sur. 2015). Zbog veličine agregata smanjuje se količina svjetlosti koja je algama potrebna za fotosintezu (Chen i sur. 2019). Potrebno je promatrati i neke parametre u okolišu koji bi potencijalno mogli utjecati na toksičnost. Naprimjer smanjenjem pH otopine povećava se topljivost nanočestica u toj otopini. Topljivost također ovisi i o ostalim komponentama koje se nalaze u otopini kao što su proteini, aminokiseline i druge organske tvari. Primijećena je manja topljivost nanočestica te i manja toksičnost kod rakova u slatkim vodama (Bondarenko i sur. 2013).

Na Slici 2.a mogu se vidjeti nanočestice CuO snimljene transmisijskim elektronskim mikroskopom visoke razlučivosti, dok Slika 2.b prikazuje EDS spektar (Energy-dispersive X-ray spectroscopy). Na EDS spektru je vidljivo da se analizirane nanočestice sastoje samo od bakra i kisika.



Slika 2. Nanočestice bakrova oksida snimljene transmisijskim elektronskim mikroskopom (a); EDS spektar (energy-dispersive X-ray spectroscopy) (b). Preuzeto iz Janani i sur. 2020.

U ovom radu fokusirat ću se na utjecaj nanočestica bakrova oksida (CuO) na vodene organizme s naglaskom na zelene alge. One su važni modelni organizmi jer čine značajnu biomasu mora i iznimno su bitne s obzirom na to da su primarni proizvođači u moru i služe kao hrana ostalim morskim organizmima. S druge strane alge su iznimno osjetljive na veće koncentracije nanočestica i uglavnom se radi o jednostaničnim organizmima zbog čega je lakše objasniti rezultate, pratiti metaboličke puteve i podrijetlo određenih molekula nakon izlaganja nanočesticama nego kada se istraživanja rade na mnogostaničnom organizmu (Wang i sur. 2019). Toksični utjecaj nanočestica bakra može se odrediti praćenjem rasta i razmnožavanja algi, promjenama u količini sintetiziranih pigmenta, smanjenju aktivnosti esteraze i na kraju kao najvažniji indikator je nastali oksidacijski stres u stanici.

2. Utjecaj nanočestica na alge

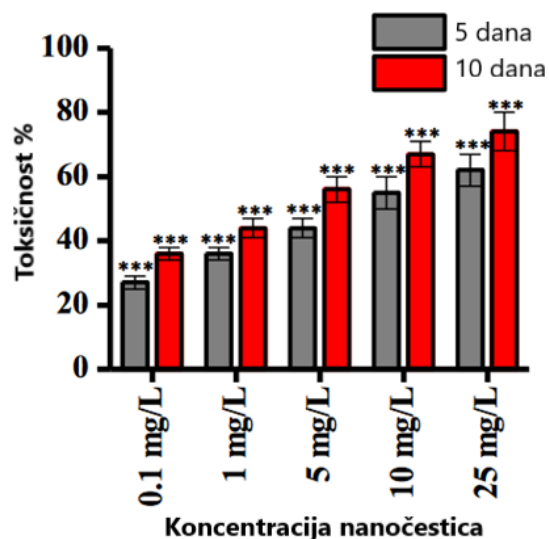
2.1. Utjecaj na rast i vijabilnost stanica alge

Aruoja i suradnici (2009) u svojem su istraživanju uspoređivali utjecaj različitih nanočestica (CuO, ZnO i TiO₂) i nakupina metalnih oksida na slatkovodnu mikroalgu *Pseudokirchneriella subcapitata*. Pokazali su da je ZnO jednako toksičan za alge u obliku nanočestica i nakupina dok su CuO i TiO₂ značajno toksičniji u obliku nanočestica. Veća toksičnost ZnO i CuO može

se pripisati topljivijim metalnim ionima koji dolaze s čestica. EC50 vrijednosti označavaju srednju učinkovitu koncentraciju i za 72 sata iznosile su 0.71 mg/L za nakupine CuO i 11.55 mg/L za CuO nanočestice. CuO nanočestice su topljivije i zato i toksičnije od nakupina CuO. Kada su provjeravali bioraspoloživost nanočestica i nakupina CuO neočekivano je bila vrlo slična i podudarala se s toksičnosti bakrova sulfata (CuSO₄), što pokazuje da su glavni uzrok toksičnosti upravo ioni bakra. Nagomilavanjem nanočestica u veće nakupine smanjuje se ukupna aktivna površina i posljedično se smanjuje i toksičnost za algu (Melegari i sur. 2013).

Janani i suradnici (2020) su s druge strane određivali broj živih stanica preko količine klorofila i na taj način odredili toksičan utjecaj nanočestica CuO na morsku algu *Lyngbya sp.* Izlagali su alge koncentracijama između 0.1 i 25 mg/L kroz period od 5 i 10 dana. Rezultati su pokazali da se povećanjem koncentracije nanočestica povećava i toksični učinak na alge. Pri koncentraciji od 0.1 mg/L dolazi do inhibicije rasta od 27±2%, a pri koncentraciji od 25 mg/L dolazi do inhibicije rasta od 62±5% nakon 5 dana inkubacije u prisutnosti nanočestica CuO (Slika 3.).

S druge strane postoje istraživanja (Wang i sur. 2019) koja su pokazala da pri niskim koncentracijama (0.08 mg/L) nanočestica CuO dolazi do malog povećanja rasta stanica. Smatra se da je to zato što stanice na taj način pokušavaju kompenzirati promjene u homeostazi koje se događaju kada dođu u doticaj s nanočesticama.

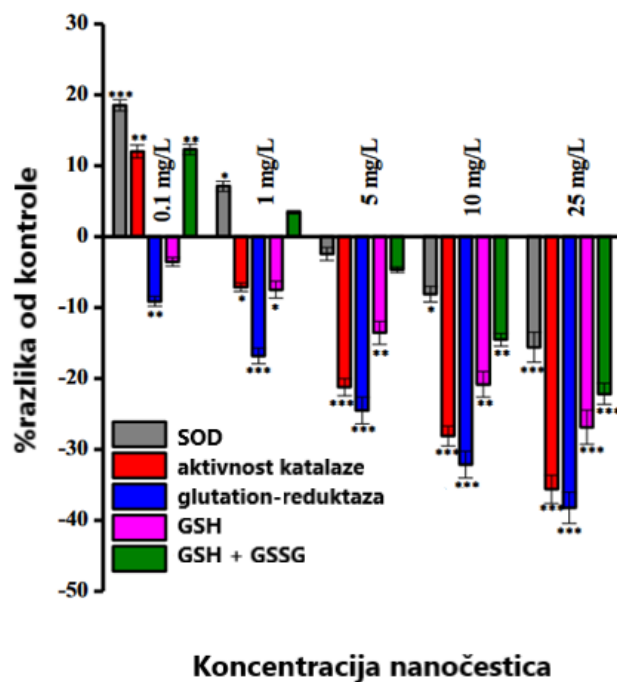


Slika 3. Toksični učinak nanočestica CuO na rast morske alge *Lyngbya sp.* Preuzeto i prilagođeno iz Janani i sur. 2020.

2.2. Oksidacijski stres

Postoji izravna poveznica između toksičnosti i oksidacijskog stresa. Najbolji pokazatelj oksidacijskog stresa u stanicama je nastanak reaktivnih oblika kisika (Janani i sur. 2020). Nastankom reaktivnih oblika kisika (ROS) povećava se oštećenje stanične membrane što posljedično uzrokuje lizu stanice i staničnu smrt. Mjerenjem količine diklorofluorescina nastalog oksidacijom diklorofluorescin diacetata može se ustanoviti količina reaktivnih oblika kisika (Janani i sur. 2020). Kako bi reagirali na oksidacijski stres i oštećenja membrane organizmi mogu regulirati nastanak membranskih lipida, antioksidansa i osmolita. Membranski lipidi i osmoliti stabiliziraju staničnu membranu dok su antioksidansi bitni za održavanje redoks homeostaze (Wang i sur. 2019).

Janani i suradnici (2020) u svom su radu pokazali utjecaj nanočestica CuO na aktivnost antioksidacijskih enzima (Slika 4.). Nakon što su slatkovodnu algu *Chlamydomonas reinhardtii* izlagali nanočesticama CuO različitih koncentracija primijećeno je da aktivnost antioksidacijskih enzima opada pri svim koncentracijama. Jedan od primjera je reducirani glutation čija se količina smanjila. Kako su enzimi inhibirani dolazi do povećanja oksidativnog stresa. Melegari i suradnici (2013) su također izlagali algu *Chlamydomonas reinhardtii* nanočesticama CuO, ali su došli do malo drugačijih rezultata. U njihovom slučaju pri koncentraciji od 1000 mg/L nanočestica CuO povećava se količina ROS-ova. Istraživanje rađeno na algi *Lyngbya sp.* pokazalo je da kada se nju izloži nanočesticama koncentracije od samo 0.1 mg/L već nastaju ROS-ovi (Janani i sur. 2020). Wang i suradnici (2019) u svom radu iznose kako nakon izlaganja alge *C. vulgaris* nanočesticama CuO nije primijećeno značajno povećanje ROS-ova. Također količina ROS-ova koja nastaje je manja nego u slučaju kada su istraživanja vršena na drugim vrstama alga.



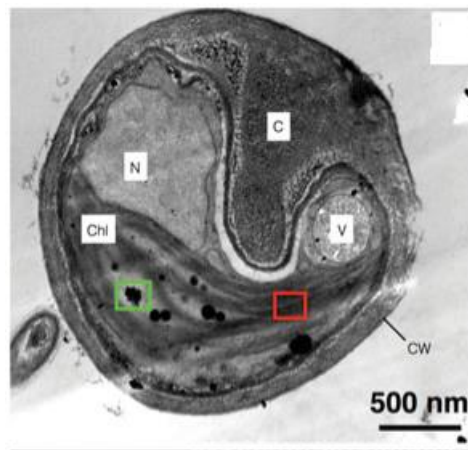
Slika 4. Utjecaj nanočestica CuO na aktivnost superoksid dismutaze (SOD), katalaze, glutation reduktaze, koncentracije reduciranog glutationa (GSH) i kombinacije koncentracije reduciranog glutationa (GSH) i glutation disulfida (GSSG) u algi *Lyngbya sp.* Rezultati su uspoređeni s kontrolnim uzorkom koji nije tretiran nanočesticama CuO. Preuzeto i prilagođeno iz Janani i sur. 2020.

Neka su pak istraživanja pokazala da manje ROS-ova nastaje nakon dužeg izlaganja nanočesticama CuO (više od 4 dana) za razliku od kraćeg izlaganja (1-4 dana) (Wang i sur. 2019). Do takvih rezultata dolazi jer se nakon nekog vremena alge priviknu na toksični učinak i krenu se oporavljati. Po ovim rezultatima se može zaključiti da postoji velika razlika u količini nastalih reaktivnih oblika kisika ako se u istraživanju koriste različiti organizmi, različito vrijeme izlaganja ili drugačije koncentracije.

2.3. Oštećenje membrane i peroksidacija lipida

Nanočestice CuO mogu uzrokovati oštećenja membrane tako što će ju oštetiti izravno prodiranjem i posljedično zbog peroksidacije lipida.

Na snimci koju su Che i suradnici (2018) dobili pomoću transmisijskog elektronskog mikroskopa vidljive su crne čestice veličine 20 nm koje se nalaze oko stanice i u kloroplastima algi koje su tretirane nanočesticama CuO (Slika 5.). Elektronskom difrakcijom je potvrđeno da se radi o nanočesticama CuO. Ovi rezultati dokazuju da nanočestice CuO prodiru u alge. Također mogu se vidjeti i čestice manje od 5 nm koje se nalaze u kloroplastima (Slika 5. crveni kvadratić). Mjerenjem međuplanarnog razmaka između kristala zaključili su da se radi o nanočesticama bakrova (I) oksida (Cu₂O). To bi značilo da se CuO nanočestice koje alge apsorbiraju mogu pretvoriti u Cu₂O nanočestice i koncentrirati u kloroplastima te tako uništavati njihovu strukturu.



Slika 5. Prikaz alge *Chlorella sp.* tretirane nanočesticama CuO koncentracije 100 mg/L. Zelenim kvadratićem označene su nanočestice CuO, a crvenim nanočestice Cu₂O.

Peroksidacija lipida je normalan proces u stanici u sklopu aerobnog metabolizma. Može postati štetan za stanicu kada se ona nađe u stresnim uvjetima. Kada reaktivni oblici kisika koji su nastali oksidativnim stresom, oksidiraju lipide dolazi do povećanja propusnosti i smanjenja fluidnosti stanične membrane (Von Moos i sur. 2013).

Kako bi izmjerili peroksidaciju lipida Janani i suradnici (2020) su pratili formiranje reaktivnih tvari tiobarbituratne kiseline (TBARS) nakon izlaganja nanočesticama. Utvrdili su da tretiranjem algi nanočesticama CuO koncentracije 0.1 mg/L nastaje 67% više TBARS u stanicama. Daljnjim povećanjem koncentracije nanočestica povećano je i formiranje TBARS u stanicama što pokazuje povećanu peroksidaciju lipida. Kao biomarker za lipidnu

peroksidaciju može se koristiti i malondialdehid (Janani i sur. 2020) koji nastaje kada se oksidiraju poluzasićene masne kiseline. Primijećena su značajna oštećenja membrane kod izlaganja alge *C. vulgaris* visokim koncentracijama nanočestica CuO (10 mg/L) (Wang i sur. 2019).

2.4. Aktivnost esteraze

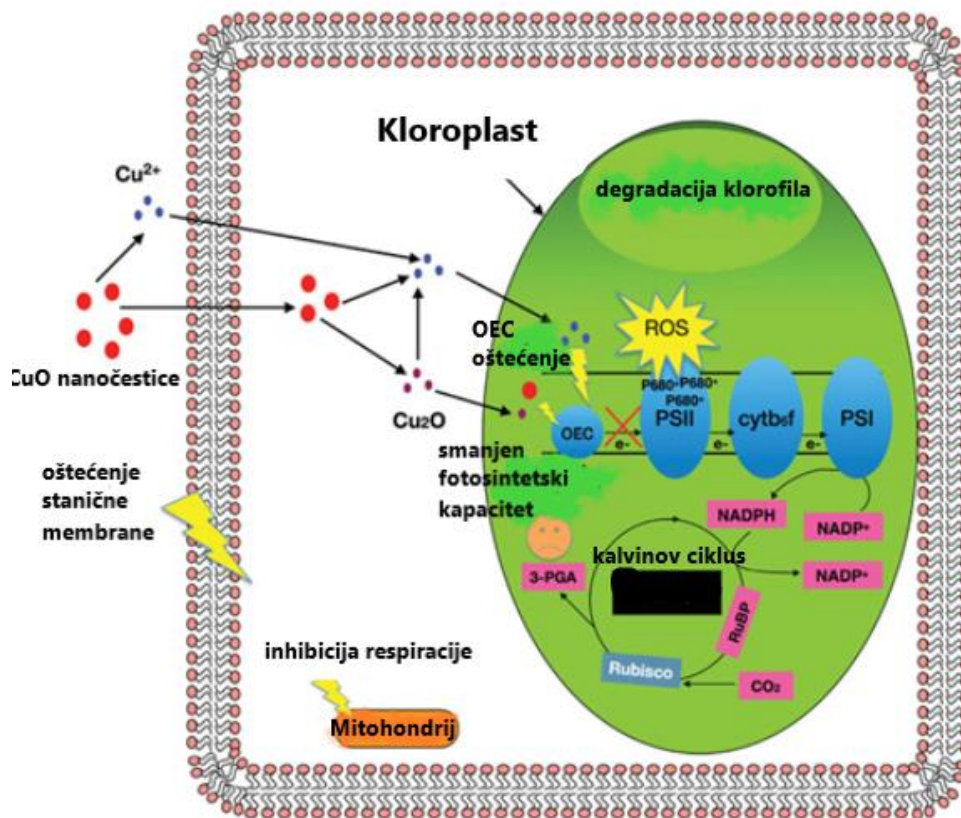
Aktivnost esteraze također je jedan od indikatora toksičnosti uzrokovane utjecajem CuO nanočestica (Janani i sur. 2020; Melegari i sur. 2013). Aktivnost esteraze u algama može se saznati mjerenjem fluorescencije fluorescein diacetata (FDA) (Janani i sur. 2020). Smanjenje fluorescencije označava da je došlo do oštećenja stanične membrane ili smanjenja enzimske aktivnosti i toksičnosti koja je iskazana u obliku postotka koji označava koliko se razlikuju rezultati uzorka s nanočesticama i kontrole bez nanočestica. Alge *Lyngbya sp.* su tretirane koncentracijama nanočestica od 1 do 25 mg/L. Povećanjem koncentracije nanočestica primijećeno je smanjenje aktivnosti esteraze. Pri koncentraciji od 1 mg/L smanjenje aktivnosti esteraze iznosilo je $-12\pm 2\%$, a za koncentraciju od 25 mg/L $-34\pm 3\%$. Slično smanjenje aktivnosti esteraze povećanjem koncentracije nanočestica primjetili su i Melegari i suradnici proučavajući algu *Chlamydomonas reinhardtii* (2013).

2.5. Fotosinteza i sinteza pigmenata

Fotosinteza je algama prijeko potrebna aktivnost za rast i preživljavanje, zato stanje fotosintetskog aparata te količina i kvaliteta pigmenata, prvenstveno klorofila, može puno reći o trenutnom stanju alge (Chen i sur. 2019; Che i sur. 2018).

Kompleks koji razvija kisik (OEC) poznat kao i kompleks za cijepanje vode dio je fotosustava II u kojem se događa oksidacija vode (Slika 6.) (Vogt i sur. 2015). Che i suradnici (2018) su pokazali da je od svih dijelova fotosintetskog lanca prijenosa elektrona OEC najosjetljiviji na izlaganje nanočesticama CuO. Prepostavili su da dolazi do disocijacije manganskog (Mn) klastera zbog djelovanja CuO nanočestica. Negativan utjecaj nanočestica CuO na OEC

primijećen je tek prilikom dužeg izlaganja algi nanočesticama CuO. Nakon 25 dana izlaganja primijećeno je značajno oštećenje fotosintetskog aparata.

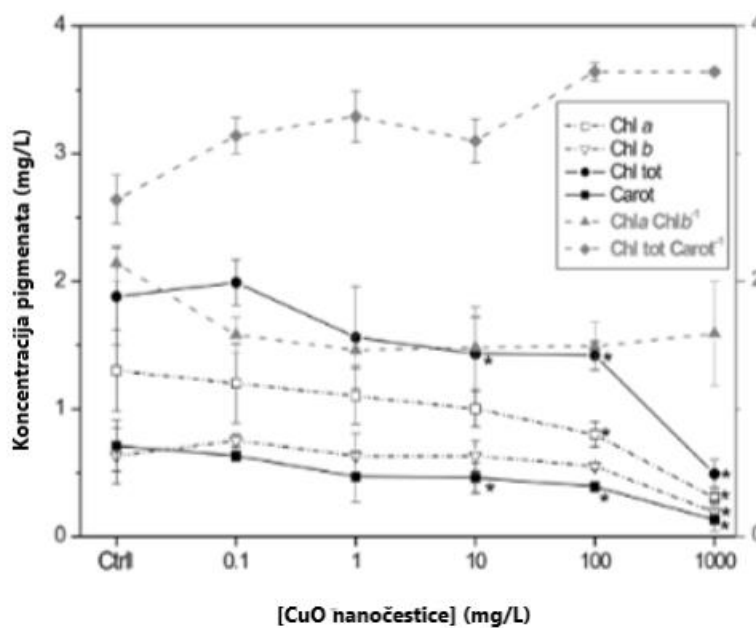


Slika 6. Prikaz mehanizma oštećenja alge nanočesticama CuO. Nanočestice CuO prolaze kroz staničnu membranu i jedan dio se pretvara u Cu₂O. CuO i Cu₂O nanočestice otpuštaju ione bakra i dolazi do degradacije kloroplasta i oštećenja OEC-a zbog čega se akumuliraju ROS-ovi i smanjuje se intenzitet fotosinteze. Također prodiranjem nanočestica oštećuje se membrana i inhibira se respiracija. OEC – kompleks za razvijanje kisika; PSII – fotosistem II; cytb₆f – citokrom b₆f; PSI – fotosistem I; RuBP – ribuloza-1,5-bisfosfat; 3-PGA – 3-fosfoglicerat. Preuzeto iz Che i sur. (2018).

Melegari i suradnici (2013) su ekstahirali klorofile i karotenoide iz alge *Chlamydomonas reinhardtii* i izmjerili su njihovu apsorbanciju pri valnim udaljenostima od 470, 652.4, 665.2 i 750 nm. Velika promjena u količini klorofila *a* i klorofila *b* primijećena je tek pri visokim koncentracijama nanočestica CuO (Slika 7.) i to 100 i 1000 mg/L za klorofil *a* i 1000 mg/L za klorofil *b* dok se omjer klorofil *a*/ klorofil *b* nije značajno promijenio nakon izlaganja

nanočesticama CuO. Veliko smanjenje koncentracije ukupnog klorofila izmjereno je u kulturi algi pri koncentraciji nanočestica CuO od 1000 mg/L, a iznosio je 0.49 $\mu\text{g/L}$ dok je u kontrolnom uzorku koncentracija ukupnog klorofila iznosila 1.88 $\mu\text{g/L}$ (Slika 7.). Također izmjereno je značajno smanjenje koncentracije karotenoida u kulturi algi pri koncentraciji nanočestica CuO od 1000mg/L, a iznosilo je 0.13 $\mu\text{g/L}$ dok je u kontrolnom uzorku koncentracija karotenoida iznosila 0.71 $\mu\text{g/L}$.

S druge strane Wang i suradnici (2019) primijetili su da izlaganjem alge *C. vulgaris* većim koncentracijama nanočestica CuO (10 mg/L) dolazi do povećanog nakupljanja klorofila *a* i *b* za razliku od kulture algi koja nije tretirana nanočesticama CuO. Moguće objašnjenje bi bilo da je alga *C. vulgaris* otpornija od drugih vrsta (Melegari i sur. 2013) ili nije bila izložena dovoljno velikoj koncentraciji nanočestica da bi se primijetila razlika.

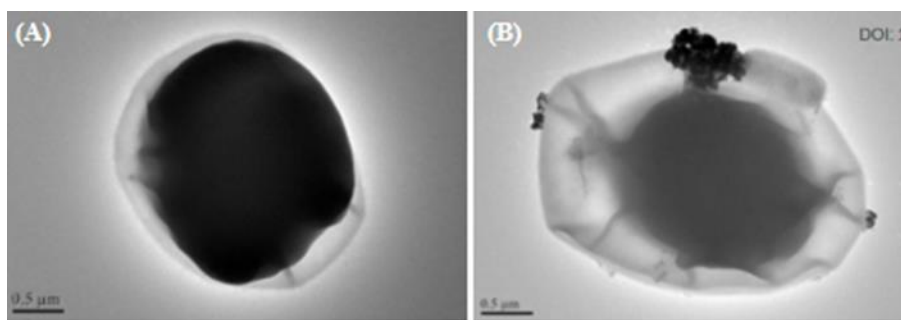


Slika 7. Količina nastalog klorofila i karotenoida u algi *C. reinhardtii* nakon 72 sata izlaganja nanočesticama CuO. Preuzeto i prilagođeno iz Melegari i sur. 2013.

3. Pozitivan utjecaj nanočestica bakrova oksida

Nanočestice bakrova oksida, cinkova oksida i srebra u nekim slučajevima se koriste kako bi se namjerno inhibirao rast bakterija, gljivica i algi (Bodarenko i sur. 2013).

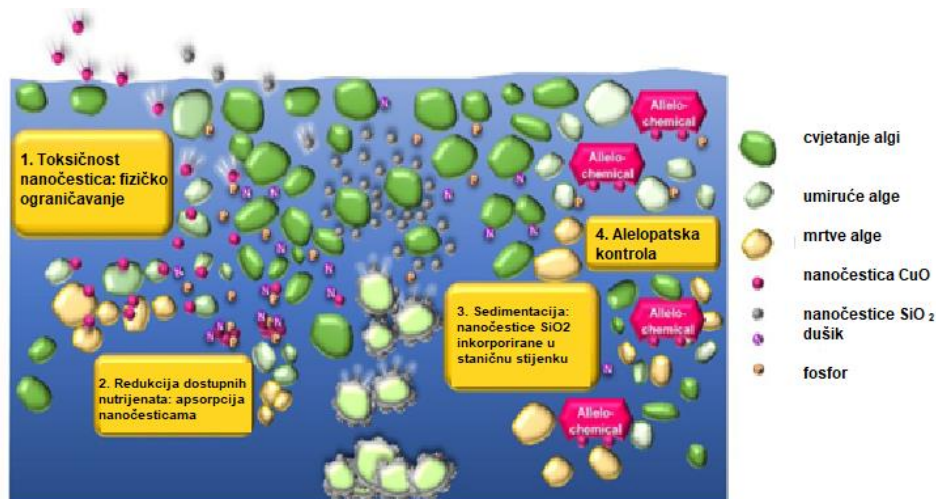
Nanočestice CuO koje se nađu u vodenom okruženju mogu ući u alge. Na Slici 8. se mogu vidjeti nanočestice CuO zarobljene u izvanstaničnom polimernom omotaču (matriksu) te da je omotač značajno zadebljan na mjestu prodora algi (Chen i sur. 2019). Omotač je građen pretežito od polisaharida i proteina te se alge pomoću njega brane od prodora stranih tvari u stanicu. Alge svoju energiju koja je bila namijenjena za rast i replikaciju u ovom slučaju koriste za podebljavanje izvanstaničnog polimernog omotača. Posljedično dolazi do inhibicije rasta samih algi.



Slika 8. *Chlorella pyrenoidosa* snimljena transmisivnim elektronskim mikroskopom (A) bez tretmana nanočesticama CuO i (B) tretirana nanočesticama CuO. Preuzeto i prilagođeno iz Chen i sur. 2019.

Ovaj fenomen iskorišten je u svrhu smanjenja cvjetanja algi. Cvjetanje algi uzrokuje smrt velikog broja vodenih organizama zbog stvaranja hipoksičnog okruženja i nastanka otrovnih citotoksina. Još nije otkrivena efikasna metoda za suzbijanje cvjetanja algi, ali znanstvenici pokušavaju dizajnirati odgovarajuće nanočestice koje bi inhibirale rast algi zbog nastanka oksidativnog stresa, ali i fizički ometale unos hranjivih tvari u stanice. Također nanočestice smanjuju apsorpciju nutrijenata tako da reduciraju dušik i fosfor koji su potrebni algama. Na Slici 9. može se vidjeti kako nanočestice CuO, ali i nanočestice Si₂O utječu na cvjetanje algi i na koje načine ga ograničavaju (Chen i sur. 2019). Nanočestice mogu biti i nositelji alelopatskih kemikalija koje mogu poticati ili inhibirati rast algi. Postoje i dizajnirane nanočestice bakrovog (II) hidroksid fosfata (Cu₂(OH)PO₄) koje efikasno ograničavaju

cvjetanje algi (Asgodom i sur. 2021). Naime, potrebna je koncentracija od 0.032 mg/mL kako bi se smanjio rast algi do 97%. Ove nanočestice su dobar kandidat za prevenciju cvjetanja algi, ali je prije masovne upotrebe potrebno napraviti još istraživanja o utjecaju ovih nanočestica na ostale vodene organizme.



Slika 9. Prikazani su mehanizmi koji ograničavaju cvjetanje algi koje su tretirane nanočesticama CuO i SiO₂. (1.) nanočestice mogu inhibirati rast algi tako da induciraju oksidativni stres ili fizički ograničavaju unos hranjivih tvari; (2.) nanočestice apsorbiraju nutrijente i tako reduciraju dušik i fosfor koji je potreban stanici; (3.) alge tretirane SiO₂ nanočesticama se talože na dno vode u kojoj se nalaze i voda iznad njih ostaje čista; (4.) nanočestice mogu biti nositelji alelopatskih kemikalija koje kontroliraju cvjetanje algi. Preuzeto iz Chen i sur. 2019.

4. Usporedba utjecaja nanočestica, mikročestica i iona bakra

Wang i suradnici (2019) istraživali su razlikuje li se utjecaj nanočestica i mikročestica bakrova oksida u odnosu na utjecaj iona bakra. Nisu primijetili velike razlike u rastu nakon izlaganja algi nanočesticama i mikročesticama. Kod algi koje su tretirane većim koncentracijama (10 mg/L) nanočestica i mikročestica vidljivo je značajno oštećenje membrane. Izlaganje algi

ionima bakra rezultiralo je puno manjim oštećenjima membrane nego u slučaju nanočestica i mikročestica. U usporedbi s mikročesticama, nanočestice uzrokuju veću štetu na staničnoj membrani jer se lakše probijaju kroz nju zbog svoje veličine.

Rezultati nakon izlaganja nanočesticama CuO podudarali su se s rezultatima nakon izlaganja algi mikročesticama bakrova oksida (CuO) i ionima bakra (Cu²⁺) kod većine metaboličkih puteva što podrazumijeva nakupljanje intermedijera klorofila, preuređenje strukture i sastava membranskih lipida, povećanje fosfatidnih i masnih kiselina, te je poremećen metabolizam glutaciona zbog povećanja oksidativnog stresa i akumulacija osmoregulanata.

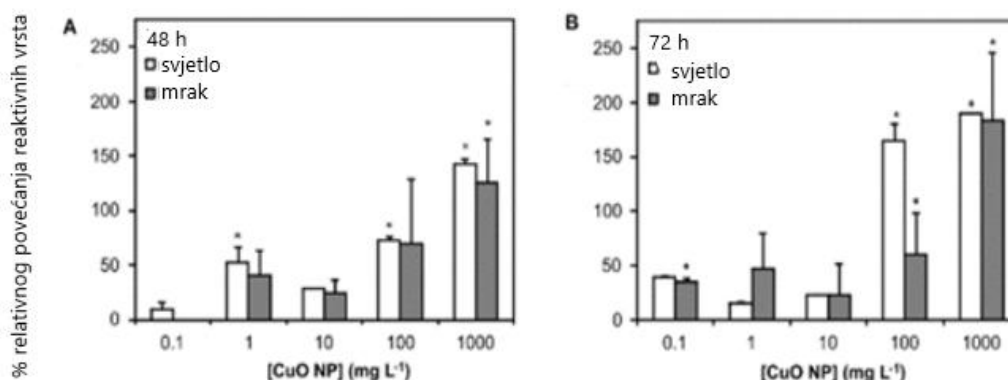
Jedina razlika je vidljiva u slučaju izlaganja ionima Cu²⁺ kod kojeg dolazi do nakupljanja produkata oksidacije masnih kiselina. U rezultatima izlaganja algi mikročesticama i nanočesticama nije utvrđena značajna razlika iz čega se može zaključiti da toksičnosti nanočestica i mikročestica najviše pridonosi disocijacija Cu²⁺ iona.

5. Utjecaj kombinacije svjetlosti i nanočestica

U svom radu iz 2016. Cheloni i suradnici napravili su prvo istraživanje koje proučava utjecaj kombinacije svjetlosti i nanočestica CuO. Istraživana je stabilnost suspenzije CuO nanočestica kada na nju djeluju svjetlosti različitih karakteristika te je pomoću protočne citometrije određen rast, fluorescencija klorofila, oštećenja membrane i oksidativni stres preko kojih je proučavan toksični odgovor zelene mikroalge *Chlamydomonas reinhardtii*. Zaključili su da ni simulirana prirodna svjetlost ni inkubatorska svjetlost ne mijenjaju značajno utjecaj nanočestica CuO na algu *C. reinhardtii*. Ultraljubičasto zračenje u kombinaciji s nanočesticama CuO daje sinergistički efekt, ali je teško utvrditi dolazi li do tog efekta zbog interakcije nanočestica i svjetlosti ili se radi o pojedinačnom utjecaju.

Postojala je pretpostavka da do smanjenja rasta dolazi zbog inhibicije fotosinteze pod utjecajem nanočestica. Melegari i suradnici (2013) su istraživali rast alge *C. reinhardtii* u uvjetima dana kada alge vrše fotosintezu i u noćnim uvjetima kada zbog nedostatka svjetlosti ne vrše fotosintezu. Rezultati nisu pokazali razliku u rastu za vrijeme dnevnih i noćnih uvjeta što

ukazuje da zasjenjenje fotosintetskog aparata nanočesticama nije zaslužno za toksičnost te da ne ovisi o fotosintetskoj sposobnosti algi (Slika 10.).



Slika 10. Odgovor na oksidativni stres. Kada su alge izložene CuO nanočesticama vidljivo je povećanje fluorescencije reaktivnih vrsta u usporedbi s kontrolom koja nije tretirana nanočesticama u uvjetima dana i noći nakon (A) 48 sati i (B) 72 sata. ($p < 0.05$ u odnosu na kontrolu). Prilagođeno i preuzeto iz Melegari i sur. 2013.

6. Zaključak

Nanočestice CuO su se na svim razinama u nekoj mjeri pokazale toksičnima za alge. Povećanjem koncentracije nanočestica postupno dolazi i do inhibicije rasta alge. Povećava se količina reaktivnih oblika kisika (ROS) i peroksidacija lipida što dovodi do oštećenja membrane i lize stanica. Istražiti utjecaj nanočestica na okoliš i ljudsko zdravlje je iznimno zahtjevan zadatak zbog velike količine faktora koji utječu na to kako će nanočestice reagirati u različitim organizmima. Sve su više dostupni materijali i proizvodi koji sadrže neke vrste nanomaterijala ili nanočestica i zato je potrebno što je brže moguće povećati broj istraživanja koja se bave ovom temom kako bi se što više spriječile štete i zagađenje u budućnosti. Još uvijek ne postoje metode koje bi mjerile količinu nanočestica koje završe u prirodi. Potrebno je napraviti još mnogo istraživanja koja će se fokusirati općenito na kemijska i fizikalna svojstva nanočestica kako bi se zatim mogao proučavati njihov trenutni utjecaj na različite organizme, ali i dugoročne posljedice na cijele ekosustave. Trenutno se istraživanja vrše na ograničenom broju modelnih organizama najviše na bakterijama [*P. aeruginosa*] (Von Moos i

sur. 2013; Janani i sur. 2020)] i algama [*Chlamydomonas reinhardtii* (Cheloni i sur. 2016; Melegari i sur. 2013), *Chlorella vulgaris* (Wang i sur. 2019)]. Potrebno je proširiti istraživanja na druge vrste i standardizirati protokole jer je teško uspoređivati rezultate i iznijeti konačan univerzalni zaključak o toksičnosti nanočestica bakra jer različiti istraživački timovi provode istraživanja na različitim organizmima u drugačijim uvjetima. Također utjecaj nanočestica se razlikuje ovisno o uvjetima. Na taj način utjecaj nanočestica na organizme u moru neće biti isti kao i utjecaj na organizme u slatkim vodama (Handy i sur. 2008). Smatram da bi bilo poželjno poraditi i na metodama i načinima kako da se nanočestice koje već zagađuju mora u nekoj mjeri uklone iz njega.

Literatura

- Adam, N., Vakurov, A., Knapen, D., and Blust, R. (2015): The chronic toxicity of CuO nanoparticles and copper salt to *Daphnia magna*. *Journal of Hazardous Materials* 283, 416-422.
- Aruoja, V., Dubourguier, H.-C., Kasemets, K., and Kahru, A. (2009): Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of The Total Environment* 407(4), 1461–1468.
- Asgodom, M. E., Liu, D., Fu, H., Xie, H., and Kong, J. (2021): Effect of the near-infrared activated photocatalyst Cu₂(OH)PO₄ nanoparticles on the growth of harmful algal blooms causing *Microcystis aeruginosa*. *Environmental Science and Pollution Research* 28(16), 20762–20771.
- Bondarenko, O., Juganson, K., Ivask, A., Kasemets, K., Mortimer, M. and Kahru, A. (2013): Toxicity of ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: A critical review. *Archives of Toxicology* 87(7), 1181-1200.
- Caballero-Guzman, A. and Nowack, B. (2018): Prospective nanomaterial mass flows to the environment by life cycle stage from five applications containing CuO, DPP, FeOx, CNT and SiO₂. *Journal of Cleaner Production* 203, 990-1002.
- Cai, X., Zhu, Q., Zeng, Y., Zeng, Q., Chen, X., and Zhan, Y. (2019): Manganese Oxide Nanoparticles As MRI Contrast Agents In Tumor Multimodal Imaging And Therapy. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 14, 8321–8344.
- Che, X., Ding, R., Li, Y., Zhang, Z., Gao, H., and Wang, W. (2018): Mechanism of long-term toxicity of CuO NPs to microalgae. *Nanotoxicology* 1–17.
- Cheloni, G., Marti, E. and Slaveykova, V.I. (2016): Interactive effects of copper oxide nanoparticles and light to green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology* 170, 120-128.
- Chen, F., Xiao, Z., Yue, L., Wang, J., Feng, Y., Zhu, X., Wang, Z. and Xing, B. (2019): Algae response to engineered nanoparticles: Current understanding, mechanisms and implications. *Environmental Science: Nano journal* 6(4), 1026-1042.

- Handy, R.D., Owen, R., and Valsami-Jones, E. (2008): The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology* 17, 315–325.
- Huang, Y., Adeleye, A.S., Zhao, L., Minakova, A.S., Anumol, T. and Keller, A.A. (2019): Antioxidant response of cucumber (*Cucumis sativus*) exposed to nano copper pesticide: Quantitative determination via LC-MS/MS. *Food Chemistry* 270, 47-52.
- ISO. 2008. Nanotechnologies – Terminology and definitions for nano-objects –Nanoparticles, nanofibre and nanoplate. In: Iso, International Standards Organization (ed.) ISO/TS 27687. Geneva, Switzerland: International Standards Organization (ISO).
- Janani, B., Al Farraj, D. A., Raju, L. L., Elshikh, M. S., Alkubaisi, N. A., Thomas, A. M., ... Sudheer Khan, S. (2020): Cytotoxicological evaluation of copper oxide nanoparticles on green algae, bacteria and crustacean systems. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*
- Kim, B.-E., Nevitt, T., and Thiele, D. J. (2008): Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nature Chemical Biology*, 4(3), 176–185.
- Lee, S.H. and Richards, R.J. (2004): Montserrat volcanic ash induces lymph node granuloma and delayed lung inflammation. *Toxicology* 195, 155–165.
- Lewinski, N., Colvin, V., and Drezek, R. (2008): Cytotoxicity of Nanoparticles. *Small* 4(1), 26–49.
- Melegari, S. P., Perreault, F., Costa, R. H. R., Popovic, R., and Matias, W. G. (2013): Evaluation of toxicity and oxidative stress induced by copper oxide nanoparticles in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology* 142-143, 431–440.
- Neira, C., Levin, L. A., Mendoza, G., and Zirino, A. (2013): Alteration of benthic communities associated with copper contamination linked to boat moorings. *Marine Ecology* 35(1), 46–66.
- SCENIHR. 2007. The existing and proposed definitions relating to products of nanotechnologies. Scientific Committee on Emerging and Newly-Identified Health Risks.

- Vance M.E., Kuiken T., Vejerano E.P., McGinnis S.P., Hochella M.F., Rejeski D. and Hull M.S. (2015): Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein Journal of Nanotechnology* 6, 1769-1780.
- Vogt L., Vinyard D.J., Khan S. and Brudvig G.W.(2015): Oxygen-evolving complex of Photosystem II: an analysis of second-shell residues and hydrogen-bonding networks. *Current Opinion in Chemical Biology* 25, 152-8
- Von Moos, N. and Slaveykova, V.I. (2014): Oxidative stress induced by inorganic nanoparticles in bacteria and aquatic microalgae - state of the art and knowledge gaps. *Nanotoxicology* 8(6), 605-630.
- Wang, L., Huang, X., Sun, W., Too, H.Z., Carrasco Laserna, A.K., Yau Li, and S.F., (2019): A global metabolomic insight into the oxidative stress and membrane damage of copper oxide nanoparticles and microparticles on microalga *Chlorella vulgaris*. *Environmental Pollution*.

Životopis

Zovem se Iva Duvančić. Osnovnu školu završila sam 2015. godine odličnim uspjehom. U Gimnaziji Lucijana Vranjanina završila sam srednjoškolsko obrazovanje također odličnim uspjehom 2019. godine. U srednjoj se školi povećalo moje zanimanje za prirodoslovne predmete prvenstveno biologiju i kemiju. Trenutno sam 3. godina preddiplomskog studija Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Za vrijeme srednje škole i studija radila sam razne učeničke i studentske poslove kao što je rad u skladištu, u dječjoj igraonici i kao animator na znanstvenim radionicama i kampovima. Cijeli život se bavim plesom i radila sam kao plesni voditelj dječjih skupina.