

Usporedba toksičnoga djelovanja nanočestica i ionskoga srebra na vodenu leću (Lemna minor L.)

Glavaš Ljubimir, Katarina

Doctoral thesis / Disertacija

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:396331>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-23**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Katarina Glavaš Ljubimir

**Usporedba toksičnoga djelovanja
nanočestica i ionskoga srebra na
vodenu leću (*Lemna minor* L.)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Zagreb, 2021



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Katarina Glavaš Ljubimir

**Usporedba toksičnoga djelovanja
nanočestica i ionskoga srebra na
vodenu leću (*Lemna minor* L.)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor: izv.prof.dr.sc. Sandra Radić Brkanac

Zagreb, 2021



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE

Katarina Glavaš Ljubimir

**Comparison of nanosilver and ionic silver
toxicity in duckweed (*Lemna minor* L.)**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor: Dr. Sandra Radić Brkanac, Assoc.Prof.

Zagreb, 2021

Ovaj je doktorski rad izrađen je u Laboratoriju za fiziologiju bilja, Botaničkog zavoda, Biološkog odsjeka, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. Sandre Radić Brkanac u okviru Sveučilišnog poslijediplomskog dokorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

HVALA.....

....mojoj mentorici i prijateljici izv. prof. Sandri Radić Brkanac na velikoj pomoći, razumijevanju, svakom savjetu i velikoj vjeri da ja ovo sve mogu kada je izgledalo da je sve nemoguće.

....red. prof. Anamariji Domijan na nesebičnoj pomoći pri izradi dijela doktorskog istraživanja.

....mojoj Heleni na određivanju sadržaja srebra i na svakom prespavanju u Zagrebu.

....mojoj „dubrovačkoj obitelji“, Vukas-Džaići život piše neobične priče.

....mojim roditeljima, mama i tata bez vas bi ovo sve apsolutno bilo nemoguće. Hvala na brizi, pomoći, ljubavi i svakom čuvanju Lovra. Volim vas.

....mojoj jednoj „sister“ Korneliji. Znaš da ne stane sve u jednu rečenicu na koliko toga ti moram zahvaliti. Volim te.

Ovu doktorsku disertaciju posvećujem svom sinu Lovru, mojoj ljubavi, suncu i sreći najvećoj. Lovro, voli te mama najviše na svijetu i zbog tebe sve ima smisla.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doktorska disertacija

USPOREDBA TOKSIČNOGA DJELOVANJA NANOČESTICA I IONSKOGA SREBRA NA VODENU LEĆU (*Lemna minor* L.)

Katarina Glavaš Ljubimir

Botanički zavod Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
Rooseveltov trg 6, Zagreb

Kontinuirana proizvodnja i upotreba nanočestica rezultira njihovim značajnim otpuštanjem u okoliš. Zahvaljujući svojim antibakterijskim svojstvima, nanočestice srebra (nAg) spadaju u najčešće korištene nanočestice u proizvodima široke potrošnje. Otpuštanjem nAg u vodeni okoliš, može doći do njihove akumulacije u vodenim biljkama i daljnjeg prijenosa kroz hranidbeni lanac. Cilj ovog istraživanja bio je procijeniti i usporediti toksičnost nAg i AgNO₃ (ionsko srebro; iAg) na vodenu leću *Lemna minor* u rasponu koncentracija 0,5-25 mg/L. U tu svrhu nAg su karakterizirane, mjereno je nakupljanje Ag u biljci, stopa rasta, fluorescencija klorofila *a*, sadržaj fotosintetskih pigmenata te niz pokazatelja oksidacijskog stresa. Akumulacija Ag bila je višestruko veća u vodenoj leći izloženoj iAg nego u onoj izloženoj nAg. Smanjenje stope rasta, funkcionalnosti fotosustava II i sadržaja fotosintetskih pigmenata zabilježeno je u odgovoru na oba oblika Ag, no posebno pod utjecajem iAg. Sadržaj reaktivnih oblika kisika bio je povećan pod utjecajem oba oblika Ag, no iAg je uzrokovao znatnu veću razinu lipidne peroksidacije u vodenoj leći nego nAg. Aktivnost mjerenih antioksidacijskih enzima uglavnom je bila povećana pod utjecajem nAg te inhibirana pod utjecajem iAg, dok je sadržaj glutaciona bio podjednako smanjen u odgovoru na oba oblika Ag. Zaključno, utvrđeno je da je iAg toksičnije za vodenu leću nego nAg. Takvi se rezultati mogu povezati s većim nakupljanjem Ag u vodenoj leći izloženoj iAg u odnosu na kontrolu, i posljedično jačim oksidacijskim stresom, koje je dovelo do smanjenja antioksidacijskih obrambenih mehanizama.

(113 stranica / 24 slike / 4 tablice / 276 literaturni navod / jezik izvornika: hrvatski)

Disertacija je pohranjen u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu.

Ključne riječi: nanočestice /srebro / toksičnost / oksidacijski stres / antioksidacijski sustav /vodena leća

Mentor: dr. sc. Sandra Radić Brkanac, izvanredni profesor

Ocjenjivači: 1.Prof. dr. sc. Biljana Balen
2.Prof. dr. sc. Nada Oršulić
3.Prof. dr. sc. Anamarija Domijan

Zamjena: Prof. dr. sc. Janja Horvatić

Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral Thesis

COMPARISON OF NANOSILVER AND IONIC SILVER TOXICITY IN DUCKWEED (*Lemna minor* L.)

Katarina Glavaš Ljubimir

Division of Botany, Department of Biology, Faculty of Science, University of Zagreb
Rooseveltova trg 6, Zagreb

Continuous formation and utilization of nanoparticles have resulted with their significant discharge into the environment. Due to their antibacterial properties, silver nanoparticles (nAg) are increasingly used in consumer products. When released into the aquatic environment, nAg can be taken up by aquatic plants and transferred along the food chain. The aim of this work was to evaluate and compare toxicity of AgNO₃ (ionic silver; iAg) and nanosilver in the concentration range 0,5-25 mg/L using duckweed *Lemna minor* as a model plant. For that purpose, characterization of nAg was done, and Ag uptake by plants, growth rate, chlorophyll a fluorescence, photosynthetic pigments content as well as a number of oxidative stress parameters were determined. Accumulation of Ag was several times higher in plants treated with iAg compared to nAg. Both forms of Ag significantly reduced growth rate, photosystem II functionality and photosynthetic pigments content, but the effect of iAg was more pronounced. Reactive oxygen species content increased under both forms of Ag, though iAg caused much greater extent of lipid peroxidation than nAg. Induction of antioxidative enzyme activities was mostly observed in response to nAg, while iAg caused their inhibition. The content of glutathione decreased to the same degree under both iAg and nAg. The results indicate that ionic silver is more toxic to duckweed than nanosilver. Such findings can be correlated with higher Ag accumulation in duckweed exposed to iAg, and consequently greater extent of oxidative stress, leading to impaired antioxidative defense mechanisms.

(113 pages / 24 figures / 4 tables / 276 references / original in Croatian)

Key words: nanoparticles / silver / toxicity / oxidative stress / antioxidative system / duckweed

Supervisor: Dr. Sandra Radić Brkanac, Assoc.Prof.

Reviewers:

1. Dr. Biljana Balen, Prof.
2. Dr. Nada Oršulić, Prof.
3. Dr. Anamarija Domijan, Prof.

Replacement: Dr. Janja Horvat, Prof.

Thesis accepted:

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. CILJ RADA	3
1.2. HIPOTEZE DOKTORSKOG RADA	3
2. LITERATURNI PREGLED	4
2.1. PODJELA NANOMATERIJALA U PROIZVODNJI	5
2.2. KARAKTERIZACIJA NANOČESTICA	6
2.3. NANOČESTICE METALA I METALNIH OKSIDA	8
2.4. nAg U OKOLIŠU	11
2.4.1. Promjene nAg u biološkom i okolišnom mediju	13
2.4.2. Učinak nAg na biotu	15
2.4.3. Učinak nAg na biljke	16
2.4.3.1. Primanje i prijenos nanočestica	16
2.4.3.2. Fitotoksičnost nAg i putevi interakcije s biljkom	17
2.4.4. Oksidacijski stres	21
2.4.4.1. Lipidna peroksidacija	23
2.4.4.2. Oksidacija proteina	24
2.4.5. Antioksidacijski sustav	24
2.4.6. Vodena leća (<i>Lemna minor</i> L.)	26
3. MATERIJAL I METODE	28
3.1. BILJNI MATERIJAL	29
3.2. METODE	30
3.2.1. Metode karakterizacije nAg	30
3.2.2. Određivanje Ag metodom ICP-MS	31
3.2.3. Određivanje makro- i mikroelemenata metodom FAAS	32
3.2.3.1. Priprema uzoraka i određivanje sadržaja određivanje K, Ca, Mg i Fe	33
3.2.3.2. Priprema uzoraka i određivanje sadržaja N i P	34
3.2.4. Lemna-test (iso-20079) – stopa rasta	35
3.2.5. Mjerenje fluorescencije klorofila metodom saturacijskog pulsa	35
3.2.6. Određivanje sadržaja pigmenata	36
3.2.7. Određivanje sadržaja superoksidnog radikala in situ	36
3.2.8. Dokazivanje GSH in situ	37
3.2.9. Određivanje sadržaja prolina	37

3.2.10. Određivanje sadržaja MDA u vodenoj leći	38
3.2.11. Određivanje sadržaja karbonila u vodenoj leći	38
3.2.12. Ekstrakcija topivih proteina i aktivnost enzima	39
3.2.13. Statistička obrada podataka	41
4. REZULTATI	42
4.1. KARAKTERIZACIJA nAg	42
4.2. STOPA RASTA VODENE LEĆE	42
4.3. SADRŽAJ Ag U VODENOJ LEĆI	44
4.4. SADRŽAJ MAKRO- I MIKROELEMENATA	45
4.5. FUNKCIONALNOST FOTOSINTETSKOG APARATA	47
4.5.1. Optimalni i efektivni prinos fotosustava II	47
4.5.2. NPQ	49
4.5.3. ETR	50
4.6. SADRŽAJ FOTOSINTETSKIH PIGMENTA	51
4.6.1. Sadržaj klorofila	51
4.6.2. Sadržaj karotenoida	52
4.7. SADRŽAJ SUPEROKSIDNIH RADIKALA	54
4.8. SADRŽAJ MDA	56
4.9. SADRŽAJ KARBONILA	57
4.10. SADRŽAJ GST <i>IN SITU</i>	58
4.11. SADRŽAJ PROLINA	60
4.12. AKTIVNOST ENZIMA	61
4.12.1. Aktivnost SOD	61
4.12.2. Aktivnost POD	62
4.12.3. Aktivnost KAT	64
4.12.4. Aktivnost GST	65
4.13. KEMOMETRIJSKE ANALIZE	66
4.13.1. Korelacija	66
5. RASPRAVA	68
5.1. UČINAK nAg i iAg NA SADRŽAJ Ag I SADRŽAJ MAKRO- I MIKROELEMENATA	68
5.2. UČINAK nAg i iAg NA RAST VODENE LEĆE	70
5.3. UČINAK nAg i iAg NA FUNKCIONALNOST FOTOSINTETSKOG APARATA	72
5.4. UČINAK nAg i iAg NA POKAZATELJE OKSIDACIJSKOG STRESA	75

6. ZAKLJUČAK	85
7. ŽIVOTOPIS	86
8. LITERATURA	87

1. UVOD

Tijekom proteklih desetljeća nanotehnologija se uvelike razvila i implementirala u veliki raspon industrija, što je dovelo do neizbježnog oslobađanja nanomaterijala u okoliš i ekosustav. Sinteza nanočestica ima primjenu u raznim područjima znanosti i tehnologije, posebice na polju medicine i prirodnih znanosti (genska terapija, lijekovi, fluorescentne oznake itd.) optike i elektronike; nanočestice su našle primjenu u mnogim proizvodima široke potrošnje uključujući elektroničke komponente, kozmetiku, prehrambene proizvode, proizvode za čišćenje, antimikrobna vlakna i sprejeve (Savolainen i sur., 2010). Trenutno na tržištu postoji preko 5000 proizvoda koji sadrže nanomaterijale. Nanočesticama se smatraju tvari čije su sve 3 dimenzije manje od 100 nm. Zbog svojih dimenzija, nanočestice lako ulaze u biljnu stanicu preko stanične stijenke te na taj način ulaze u okoliš, te ujedno dolazi do njihove bioakumulacije u hranidbenom lancu. Osim kroz staničnu stijenku, nanočestice mogu ući u stanicu i pomoću proteinskih nositelja ili kroz ionske kanale. Ulaskom u citoplazmu, nanočestice se mogu vezati na različite organele i/ili makromolekule te tako utjecati na metaboličke procese na tom mjestu u stanici (McShan i sur., 2014). Nakupljanje nanočestica na fotosintetski aktivnoj površini uzrokuje zagrijavanje listova, što može rezultirati modifikacijama u izmjeni plinova i začepljenju puči (Nair i Chung, 2014).

Srebro (latinski *argentum*, simbol Ag) je lako obradiv i plemeniti metal koji se u prirodi nalazi samorodno (najčešće u društvu bakra (Cu) i zlata (Au)), ponajviše u obliku argentita (Ag_2S) (Behra i sur., 2013). Ag kao i drugi metali ima veliku električnu vodljivost i termički konduktivitet te stoga ima veliku upotrebu u elektroničkoj, fotokemijskoj (srebrov nitrat, AgNO_3) i metalurškoj industriji, kao i u medicini, farmaciji i prehrambenoj industriji. Prirodno Ag nije topljivo u vodi, no mnoge Ag soli su dobro topljive u vodi (Howe i Dobson, 2002). U prisutnosti vlage Ag može oksidirati, što rezultira oslobađanjem srebrovih iona (Ag^+). Ag ima snažna antibakterijska svojstva koja su prepoznata još u 17. stoljeću kada se AgNO_3 koristio u medicini (Klasen, 2000). Antibakterijska svojstva Ag temelje se na sposobnosti vezanja njegovih iona na stijenku i membranu bakterijskih stanica, što dovodi do inhibicije dišnih procesa u bakterija (Li i sur., 2017). Ionsko srebro (iAg) je jako elektronegativno tako da može zamijeniti druge katione, kao što su kationi u staničnim stijenkama i membranama te molekulama DNA. Ioni Ag^+ također mogu uzrokovati djelomično ili potpuno smanjenje aktivnosti brojnih enzima (inhibicija enzima u ciklusu fosfora, sumpora i dušika), što

dovodi do promjena u propusnosti membrane (Koontz i Berle, 1980; Domsch, 1984), ometanja transkripcije molekule DNA te uništavanja stanične stijenke bakterija, i u konačnici rezultira lizom stanice (Ratte, 1999).

Nanočestice srebra (nAg) su najčešće korišten nanomaterijal koji je našao primjenu u različitim proizvodima, poput elektroničkih naprava, u pakiranju prehrambenih proizvoda, u tekstilnim proizvodima koji djeluju baktericidno, u medicinskim uređajima, u zavojima te kao dezinficijens za vode, kao lijek za liječenje mentalnih bolesti, ovisnosti o nikotinu, a gel na bazi nAg koristi se za liječenje opekline, gastroenteritisa i zaraznih bolesti poput sifilisa i gonoreje (Chen i Schluesener, 2008). Posebice je uočena njihova primjena u poljoprivredi (Yan i Chen, 2019). Glavne promjene kojima podliježu nAg u okolišu su: gubitak i promjena površinskih agenasa, agregacija i aglomeracija, te površinska oksidacija i oslobađanje atoma srebra (Ag^0). Stoga se toksičnost nAg može povezati sa otpuštanjem Ag^+ i njihovim toksičnim učincima. No, fitotoksičnost se ne može objasniti samo aktivnošću oslobođenih Ag^+ jer je u nekim istraživanjima utvrđeno da su nAg toksičnije od slobodnih Ag^+ pri istoj koncentraciji (Yan i Chen, 2019). Ustvari, teško je odrediti koji se dio toksičnosti može pripisati nano obliku, a koji ionskom obliku Ag (McShan i sur., 2014). Brzina površinske oksidacije je usko povezana s površinskim omotačem nAg i s prisutnošću nekih molekula, posebice tiola, kao i s interakcijom nAg s nukleinskim kiselinama, lipidima i proteinima. Kada jednom uđe u stanicu, nAg često djeluje kao izvor Ag^+ u stanici. Jedan od glavnih mehanizama toksičnosti nAg je povećanje produkcije reaktivnih oblika kisika (ROS) te posljedično oštećenje staničnih komponenti uključujući oštećenje molekule DNA, aktivacija antioksidacijskih enzima, iscrpljivanje antioksidacijskih molekula primjerice glutationa (GSH), vezanje i inaktivacija proteina te oštećenje stanične membrane.

Zbog sve veće primjene nAg primjetna je i sve veća njihova količina u otpadnim vodama, a ujedno i u površinskim vodama, što rezultira toksičnim učinkom na vodeni ekosustav. Slijedom navedenog za testnu biljku u ovom istraživanju odabrana je vodena leća (*Lemna minor* L.) zbog svog velikog reproduktivnog kapaciteta, brzog rasta, male veličine i relativno jednostavne strukture te lakog uzgoja i dostupnosti. Taj se biljni model često koristi u istraživanjima utjecaja teških metala na vodeni okoliš zbog svoje iznimne sposobnosti apsorpcije i akumulacije istih (Gubbins i sur., 2011).

1.1. CILJ RADA

Povećana upotreba nAg u proizvodima široke potrošnje i vjerojatnost njihovog otpuštanja u okoliš opravdava istraživanje toksičnosti nAg. Dosadašnjim ekotoksikološkim istraživanjima je utvrđeno da su nAg među najtoksičnijim metalima nanometarskih dimenzija za vodene organizme.

Ciljevi ovog istraživanja su utvrditi toksičnost nAg na vodenu leću putem odabranih parametara, te usporediti toksične učinke nAg i iAg.

U ovom istraživanju korištene su nAg s omotačem od polivinilpirolidona (PVP) te AgNO₃ kao ionski oblik srebra (iAg). Biljke su bile izložene nAg ili iAg u nizu koncentracija od 0; 0,5; 1; 2; 5; 10 i 25 mg/L tijekom 7 dana. Učinak nAg i iAg određen je putem slijedećih parametara:

- sadržaja Ag i određenih makro- i mikroelemenata (dušik (N), fosfor (P), kalij (K), kalcij (Ca), magnezij (Mg) i željezo (Fe)) u vodenoj leći
- stope rasta vodene leće na temelju dva parametra - broja listića i mase svježe tvari
- fluorescencije klorofila *a in situ* (metoda saturacijskog pulsa) i sadržaj klorofila i karotenoida za procjenu funkcionalnosti fotosintetskog aparata
- količine molekula ROS u citosolu upotrebom fluorescentne boje dihidroetidij (DHE)
- sadržaja malondialdehida (MDA), krajnjeg produkta lipidne peroksidacije i sadržaja oksidiranih proteina putem karbonilnih grupa
- sadržaja prolina, kompatibilnog osmolita i antioksidansa
- aktivnosti antioksidacijskih enzima i sadržaj ukupnih topivih proteina
- sadržaja GSH upotrebom fluorescentne boje monoklorobiman (MCB)

1.2. HIPOTEZE DOKTORSKOG RADA

I. nAg su toksične za vodene leću

II. u mehanizam toksičnosti Ag je uključen oksidacijski stres

III. iAg obliku je toksičnije od nAg

2. LITERATURNI PREGLED

Nanočestice dospijevaju u okoliš iz prirodnih i antropogenih izvora. U zraku se nazivaju ultrafinim česticama, a u tlu i vodi koloidima s nešto drugačijim rasponom veličina (Klaine i sur., 2008).

Dizelska i benzinska vozila te stacionarni izvori izgaranja u gradovima dugi niz godina doprinose stvaranju čestica širokog raspona veličina, uključujući i nanočestice (više od 36% ukupnog broja čestica). Pored navedenih izvora, tu je još i prirodni izvor nanočestica u atmosferi, iako je ukupna koncentracija čestica iz tog izvora znatno niža od proizvedenih nanočestica (Oberdörster i sur., 2007). Zdravstveni učinci takvih čestica još uvijek se istražuju putem različitih aerodinamičnih promjera koje se kreću od tradicionalnih 10 μm do 5 i 2.5 μm i manjih promjera zbog utvrđene povećane toksičnosti sitnijih čestica. U vodenim sustavima nanočestice dolaze u obliku koloida. Koloid je generički izraz koji se primjenjuje na čestice u rasponu veličine od 1 nm do 1 μm . Vodeni koloidi sastoje se od makromolekularnih organskih materijala, kao što su huminska i fulvinska kiselina, proteini i peptidi, te anorganskih poput hidratiziranog Fe i manganovog oksida (MnO). Njihova mala veličina i velika površina po jedinici mase čine ih važnom poveznicom za organska i anorganska onečišćenja. Nanočestice se prirodno nalaze u tlu u sastavu gline, organskih tvari, željeznog oksida i drugih minerala koji imaju važnu ulogu u biogeokemijskim procesima, dok se proizvedeni nanomaterijali putem poroznih medija i koloidnog tla vrlo lako mogu kretati onečišćenim tlima i ostalim poroznim medijima. Onečišćivači apsorbirani u koloide ili ugrađeni u njih mogu se transportirati kada su uvjeti za koloidni prijenos povoljni, npr. prirodni koloidi tla služe kao vektori u prijenosu metala kroz slojeve tla (Klaine i sur., 2008).

Proizvedene nanočestice imaju različita svojstva u usporedbi s njihovim „dvojnicima“ mikrometarskih dimenzija. Te su čestice sastavljene od raznih materijala i dolaze u različitim veličinama i oblicima s raznovrsnim sintetičkim površinskim molekulama, što im daje različita svojstva u usporedbi s prirodnim nanočesticama. Nanočestice se koriste u industriji i u domaćinstvu nekoliko posljednjih desetljeća, a zbog njihove sve veće upotrebe u komercijalnim proizvodima, proizvode se nove nanočestice koje nadalje dovode do poboljšanja svojstava tih proizvoda. Nanočestice mogu onečistiti okoliš neprikladnim gospodarenjem industrijskog otpada ili neprimjerenim odlaganjem proizvoda iz kućanstava. U okolišu su nanočestice

podvrgnute različitim kemijskim i/ili fizičkim procesima, što utječe na njihovu stabilnost, a time i njihovu reaktivnost i dostupnost u ekosustavu (Wang i sur., 2013). Osnovni procesi koji mogu utjecati na sudbinu nanočestica u vodenom i kopnenom okolišu uključuju agragaciju/aglomeraciju, adsorpciju, taloženje, otapanje, sulfidaciju, mineralizacija i redoks reakcije (fotooksidacija i fotoredukcija) (Amde i sur. 2017).

2.1. PODJELA NANOMATERIJALA U PROIZVODNJI

Odavno je poznato da nanomaterijali imaju pojačana ili čak i jedinstvena mehanička, katalitička i optička svojstva te električnu provodljivost prvenstveno zahvaljujući svojim dimenzijama (Klaine i sur., 2008). Rezultat je to eksponencijalnog rasta razvoja proizvedenih ili projektiranih nanomaterijala u proteklih 20-ak godina zbog rasta industrijske nanotehnologije. Raspon produkata nanotehnologije je jako opsežan, no može se podijeliti u nekoliko različitih razreda koji uključuju ugljične nanomaterijale, metalne okside, poluprovodne materijale (uključujući i kvantne čestice), metale poput Fe, Ag i Au, te nanopolimere poput dendrimera. Trenutno su na tržištu različiti proizvodi koji uključuju nanočestice, nanovlakna, nanožice te je u skladu s tim raspon različitih nanomaterijala u stalnom porastu (Chen i Schluesener, 2008).

Priprema nanočestica uključuje ili izravni sintetski put, koji daje čestice u rasponu nano veličine, ili primjenu mljevenja i/ili usitnjavanja da se smanji veličina makročestica. Prva skupina nanomaterijala su ugljikove cjevčice i srodni materijali koje možemo pronaći u plastici, katalizatorima, baterijama i elektrodama, ortopedskim implantatima itd. Povećanjem proizvodnje istih povećava se i njihova prisutnost u okolišu. Druga skupina nanomaterijala su materijali koji sadrže metale uključujući i metalne okside poput titanijevog dioksida (TiO_2) i cinkovog oksida (ZnO). Treća skupina uključuje poluvodiče nanokristala ujedno poznatih kao kvantne čestice prisutne u solarnim i fotonaponskim sustavima, a koje se koriste i u telekomunikaciji. Metali bez valencije pripadaju 4. skupini nanomaterijala, a nastaju redukcijom otopina metalnih soli. Najveći broj nanomaterijala koji se primjenjuju u konzumacijskim proizvodima sadrže nAg ili iAg čemu ponajviše pridonose antimikrobna svojstva Ag. Peta skupina nanomaterijala su dendrimeri - multifunkcionalni polimeri čija se veličina, topologija, fleksibilnost i molekularna težina mogu kontrolirati. Nalazimo ih u nanolateksu, bojanom staklu, kemijskim senzorima itd. (Klaine i sur., 2008).

2.2. KARAKTERIZACIJA NANOČESTICA

Različite nanočestice pokazuju potpuno različita kemijska svojstva, što i nije neobično obzirom da nanočestice mogu biti u obliku micela, metalnih oksida, sintetskih polimera i velikih biomolekula. Stoga se za analizu ponašanja nanočestica koristi mnoštvo tehnika poput optičke mikroskopije, fluorescencije X-zračenja, Ramanove spektroskopije i nuklearne magnetske rezonancije čvrstog stanja. No, obično je ponašanje nanočestica značajno određeno njihovim nanometarskim dimenzijama. Ključni korak u razumijevanju i predikciji ponašanja nanočestica je njihova karakterizacija odnosno istraživanje veličine, oblika, površinskog naboja i poroznosti nanočestica (Bao i sur., 2016; Modena i sur., 2019).

Tehnike za karakterizaciju nanočestica mogu biti kategorizirane ovisno o tome da li se istražuju svojstva čvrstog uzorka, praha ili suspenzije. Čvrste tvari i prah često dolaze u obliku aerosola ili čestica nataloženih na površinu suspenzije. Distribucija veličine i morfologija takvih čestica mogu se proučavati nizom tehnika kao što su elektronska mikroskopija (EM), mikroskopija atomskih sila (eng. *atomic force microscopy*, AFM), raspršenje X-zraka ili spektrometrija masa (eng. *mass spectrometry*, MS) (Mourdikoudis i sur., 2018). Suhi uzorci mogu biti karakterizirani u zraku ili vakuumu gdje molekule otapala ne interferiraju s mjerenjem. Većinom, EM je metoda izbora za suhe uzorke jer je vrlo precizna i relativno jednostavna za upotrebu (posebno pretražna EM, eng. *scanning electron microscopy*, SEM) i široko rasprostranjena. No, neprovodni materijali nakupljaju naboj i često dolazi do njihove spore deformacije pod utjecajem snopa elektrona. Kako bi se mogli proučavati uzorci osjetljivi na elektronske zrake, trebaju biti omotani s tankim provodnim slojem (tipično platina (Pt), Au ili grafit) ili analizirani pod visokim tlakom pri niskoj dozi SEM-om. Zahvaljujući visokoj prostornoj rezoluciji i selektivnosti, transmisijaska elektronska mikroskopija (TEM) omogućava istraživanje veličine, oblika i kristalne strukture na nivou pojedinačnih čestica (Vilela i sur., 2012). No, tijekom karakterizacije nekih vrsta nanočestica, primjerice organskih, polimernih i hibridnih čestica primjenom TEM-a, problem mogu predstavljati visoki vakuum i velika energija elektronskih zraka. SEM koristi nižu energiju zraka nego TEM, što utječe i na dubinu prodiranja tih zraka, pa je zato SEM tehnika ograničena na površinu uzorka. No, istovremeno je SEM pogodan za istraživanje „gustih“ materijala (>100 nm). Kada se EM ne može upotrijebiti, obično je alternativa za karakterizaciju nanočestica tehnika AFM, koja omogućuje topografsku

rezoluciju u dimenzijama manjim od nanometra i može se upotrijebiti za analizu mehaničkih svojstava čestica. Raspršenje X-zračenja pod malim upadnim kutom (eng. *small-angle x-ray scattering*, SAXS) omogućava manje detalja nego mikroskopija u smislu distribucije veličine i morfologije, no omogućava dobivanje informacije o heterogenosti i agregaciji nanočestica iz uzoraka raspršenja (Modrow, 2005). Za karakterizaciju bioloških nanočestica se obično koristi tehnika MS jer je molekularna masa često relevantnija nego njihova fizička veličina ili morfologija. Ipak, mjerenje tehnikom MS zasniva se na omjeru mase i naboja, čime pruža ograničenu informaciju o stvarnoj veličini i morfologiji nanočestica (Montoro Bustos i sur., 2013).

Za analizu nanočestica u suspenziji, na raspolaganju je cijeli niz tehnika kao što su dinamičko raspršenje svjetlosti (eng. *dynamic light scattering*, DLS), statičko raspršenje svjetlosti (eng. *static light scattering*, SLS), elektroforetsko raspršenje svjetlosti (eng. *electrophoretic light scattering*, ELS), gel-filtracijska kromatografija, analitičko ultracentrifugiranje, fluorescencijska korelacijska spektroskopija i druge naprednije tehnike, primjerice tekućinski AFM koji omogućuje rezoluciju na nivou nanometra (Mourdikoudis i sur., 2018). No, zbog prednosti kao što su mala količina uzorka potrebna za analizu, brza akvizicija podataka i vremena analize, mogućnosti određivanja dinamičkog raspona od nanometra do otprilike 10 μm , i kompatibilnosti s različitim otapalima, DLS i nadalje ostaje glavna tehnika koja se koristi za rutinsko određivanje veličine nanočestica u otopini (Kato, 2012). DLS procjenjuje veličinu i distribuciju nanočestica na osnovu Brownovog gibanja čestica u otopini (Mourdikoudis i sur., 2018). Spomenuto Brownovo gibanje je gibanje čestica u otopini te se zapažaju nasumični sudari s otapalom te ima važno svojstvo da se male čestice gibaju brže, dok se velike čestice gibaju sporije. Sama veličina čestica izračunava se pomoću „Stokes-Einstenove jednadžbe“. Uređaj ima laserski snop koji obasjava čestice te potom raspršeno zračenje pada na detektor. Detektor analizira intenzitet fluktuacija raspršenog zračenja koje pokazuje specifičan uzorak (McNeil-Watson, 2013). Tehnika ELS služi za određivanje površinskog naboja suspenzije čestica ili makromolekula na temelju njihove elektroforetske pokretljivosti. Slično tehnici DLS, laser osvjetljava suspenziju te optički sustav spojen na fotodetektor detektira raspršenu svjetlost, a sustav za obradu signala mjeri pokretljivost čestica. Tehnika ELS razlikuje se od tehnike DLS u tome što se prate usmjerene kretnje izazvane električnim poljem. Kretanje čestica inducira pomak u frekvenciji, tzv. Dopplerov efekt u raspršenom svjetlu koji je proporcionalan brzini čestice. Spomenuti Dopplerovov pomak i smjer

kretanja prema pozitivnoj ili negativnoj elektrodi se zatim koriste za procjenu elektroforetske pokretljivosti čestica u suspenziji i njihovog zeta (ζ)-potencijala. Taj potencijal ovisi o okolišu čestica, pa tako vrijednost pH i ionska snaga otopine ili koncentracija čestica snažno utječu na njegovu vrijednost. Mjerenje tehnikom ELS često se izvodi istim instrumentom koji se koristi za karakterizaciju primjenom tehnike DLS (Ramírez-Garcia i sur., 2015; Huang i sur., 2020).

2.3. NANOČESTICE METALA I METALNIH OKSIDA

Nanočestice metala i metalnih oksida proizvode se dodatkom reducirajućih odnosno oksidirajućih/precipitirajućih agenasa tijekom njihove sinteze (Rastogi i sur., 2017). Obzirom na površinu, optička, termička i električna svojstva, čestice metala i metalnih oksida nanometarskih dimenzija pokazuju različita fizikalno-kemijska svojstva od onih mikrometarskih dimenzija. Upravo zahvaljujući jako izraženim električnim i magnetskim svojstvima, te su čestice među najčešće korištenim nanočesticama u različitim područjima poput komercijalnih proizvoda (Hendren i sur., 2011; Piccinno i sur., 2012), okolišnoj primjeni (remedijacija) (Amde i sur., 2016; Lee i sur., 2016) i održivoj kemiji (kataliza) (Almukhlifi i Burns, 2016) i zdravlju (antimikrobni učinak) (Saba i Amini, 2017). Poznat je veliki potencijal nanočestica u polju nanomedicine koja uključuje njihovu upotrebu za specifično prepoznavanje tumorskih stanica i medicinska snimanja. Primjerice, nanočestice željezovog (III) oksida ($n\text{Fe}_2\text{O}_3$) se naširoko upotrebljavaju kao kontrastna sredstva u magnetskoj rezonanci i u dostavi lijekova u stanice. Nanočestice silicijeva dioksida ($n\text{SiO}_2$) su se pokazale biokompatibilnim materijalom koji se koristi kao adjuvans u cjepivima i kao omotač za razne druge materijale kojima povećavaju biokompatibilnost (Sandhiya i sur., 2009). Nanočestice TiO_2 ($n\text{TiO}_2$) se koriste kao aditiv u proizvodima za sunčanje koji su u direktnom kontaktu s kožom (Castiglione i sur., 2011), dok se nanočestice cerijevog dioksida ($n\text{Ce}_2\text{O}$) naveliko upotrebljavaju u katalizi i automobilske industriji, a luminiscentne nanočestice tzv. "kvantne točke" u aplikacijama za praćenje stanica i dr. (Barrios i sur., 2016).

Širokom upotrebom nanočestica metala i metalnih oksida, dolazi do njihovog namjernog ili slučajnog oslobađanja u okoliš s različitim posljedicama (Amde i sur., 2017). Za reaktivnost nanočestica s biomolekulama odgovorno je nekoliko čimbenika koji uključuju veličinu nanočestica, oblik, površinska svojstva, stupanj čistoće,

stabilnost i metodu sinteze. Iako je mehanizam toksičnosti tih nanočestica još uvijek u potpunosti nepoznat, može se pripisati stvaranju molekula ROS, iako različite transformacije (kemijske, fizikalne, biološki posredovane i one posredovane interakcijama s makromolekulama) nanočestica u okolišu bitno utječu na njihovu sudbinu, transport, biodostupnost i u konačnici na njihovu toksičnost na biotu (Cross i sur., 2015). Dakle, neki procesi transformacije npr. adsorpcija mogu povećati toksičnost i postojanost nanočestica metalnih oksida u okolišu (Amde i sur., 2017), dok primjerice agregacija obično smanjuje koncentraciju nanočestica u suspenziji te povećava vjerojatnost njihovog taloženja i time može dovesti do smanjenja toksičnosti (Sendra i sur., 2017a).

Istraživanja toksičnosti nanočestica zlata (nAu) na humanim staničnim linijama i štakorima pokazuju relativnu inertnost tih nanočestica, a toksičnost utvrđena u nekoliko slučajeva je bila posljedica kemijskih otapala zaostalih u procesu sinteze nanočestica ili površinskih liganada (npr. cetiltrimetilamonijev bromid - CTAB) (Karlsson i sur., 2015). Međutim, postoje i istraživanja na humanim staničnim linijama i biljkama koja pokazuju toksičnost određenih nAu ovisno o njihovoj veličini (Tsoli i sur., 2005; Sabo-Attwood i sur., 2012). U radu Tsoli i sur. (2005) utvrđeno da je toksičnost nAu promjera 1,4 nm povezana s njihovom interkalacijom u veliki utor molekule DNA u staničnoj jezgri. Istraživanje na duhanu (*Nicotiana tabacum*) pokazalo je da su nAu promjera od 3,5 nm uzrokovala nekrozu lista nakon 14 dana izlaganja, dok agregati od 18 nm nisu pokazali toksični učinak te su utvrđeni samo u korijenu biljaka (Sabo-Attwood i sur., 2012). Recentno istraživanje učinka nAu promjera 12-15 nm u korijenu duhana pokazuje da je pri tretmanima koncentracije od 100 mg/L došlo do oštećenja molekule DNA nakon 8 tjedana izlaganja (Lovecká i sur., 2021). Dokazano je da nAu ulaze u stanicu endocitozom te se u periodu od 24 h raspoređuju oko perinuklearne regije i mogu uzrokovati oksidacijska oštećenja molekule DNA kao rezultat oksidacijskog stresa i lomova u lancima DNA ovisno o veličini nanočestica i tipu stanice (Sing i sur., 2009; Xie i sur., 2011). U radu Koo i sur. (2016) utvrđeno je da nAu ulaze u korijen uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) te se prenose provodnim sustavom do listova, dok su Kumar i sur. (2013) su uočili da nAu utječu na klijanje sjemenki vrste *Arabidopsis thaliana*. Dodatkom nAu veličine 24 nm u rasponu koncentracije 10-80 mg/L u hranjivu podlogu, uočeno je trostruko povećanje ukupnog prinosa sjemena u usporedbi s kontrolnim biljkama, te značajno povećanje duljine i promjera stabljike i korijena (Dykman i Shchyogolev, 2018). U radu Zhu i sur. (2012), utvrđeno je da

nakupljanje i distribucija nAu ovisi o njihovom površinskom naboju ali i o samoj biljnoj vrsti. Naime, kod negativno nabijenih nanočestica detektirana je njihova učinkovita translokacija iz korijena u peteljke i listove riže (*Oryza sativa*), dok su se pozitivno nabijene čestice nakupljale u korijenu biljaka i to u posebno visokoj koncentraciji u korijenu rotkvice (*Raphanus sativus*) i raži (*Secale cereale*).

Nanočestice bakra (nCu) i bakrovog (II) oksida (nCuO) u mnogim su istraživanjima pokazale visoku toksičnost i genotoksičnost na različitim staničnim linijama u usporedbi s nanočesticama drugih metala i metalnih oksida (Sun i sur., 2012; Cronholm i sur., 2013; Karlsson i sur., 2015). U potonjim je istraživanjima utvrđeno da je toksičnost nCuO povezana s ulaskom tih čestica u stanicu i masivnim otpuštanjem iona Cu^{2+} u stanici. Obzirom da su ioni Cu^{2+} redoks aktivni, u visokim koncentracijama dovode do jakog oksidacijskog stresa. Te su se nanočestice pokazale toksične i za biljke. Istraživanja s nCuO ukazuju na oštećenja DNA kod poljoprivrednih kultura i travnatih biljaka (Atha i sur., 2012). Rezultati istraživanja toksičnosti nCuO na riži ukazuju na njihov inhibitoran učinak na klijanje sjemena i rast sijanaca riže pri višim koncentracijama (500-2000 mg/L) tih čestica (Wang i sur., 2020). U tom je radu utvrđeno da toksičnost nCuO potječe prije svega od nanočestica, a ne od otpuštenih iona Cu^{2+} . Nakupljanje nCuO i oštećenja uzrokovana oksidacijskim stresom su posljedično dovela do inhibicije klijanja i rasta sijanaca riže. Slični rezultati su dobiveni i u istraživanju Singh i sur. (2017) na zlatnom grahu (*Vigna radiata*). U vodenoj salati (*Pistia stratiotes*) izloženoj nCuO utvrđeno je smanjenje sadržaja askorbinske kiseline, aminokiselina i acilkarnitina (Olkhovych i sur., 2016). Nakon izlaganja nekoliko biljnih vrsta (*Raphanus sativus*, *Lolium perenne*, *Lolium rigidum*) česticama nCuO u kontroliranim laboratorijskim uvjetima, primijećeno je značajno nakupljanje DNA lezija uzrokovanih oksidacijskim stresom i jaka inhibicija rasta. Istraživanja učinka nCu na zelenoj salati (*Lactuca sativa*) i lucerni (*Medicago sativa*) pokazala su da te nanočestice znatno inhibiraju rast testnih biljaka i uzrokuju promjene u sadržaju hranjivih tvari i aktivnosti antioksidacijskih enzima (Hong i sur., 2016; Arif i sur., 2018).

Morfološke promjene (povećanje ili smanjenje veličine korijena i izdanka) kod biljaka su često dokaz odgovora biljke na prisutnost teških metala, što je uočeno i kod istraživanja utjecaja nanočestica cinkova oksida (nZnO) i mikročestica ZnO (mZnO) na ječam (*Hordeum vulgare*) (Nemček i sur., 2020). Navedeno istraživanje ukazuje na trend smanjenja dužine korijena i izdanka ječma, te smanjenje prinosa nakon izlaganja biljaka nZnO i mZnO u rasponu koncentracija od 3 do 30 mmol/kg tijekom 10 dana. U

istraživanju Rajput i sur. (2021) utvrđeno je da nZnO uzrokuje inhibiciju rasta ječma i dovodi do morfoloških deformacija puči i trihoma, morfoloških promjena u obliku koroplasta i poremećaju grana tilakoida. Fitotoksičnost nanočestica kobaltovog (II) oksida ($n\text{Co}_3\text{O}_4$) i nZnO je istraživana na korijenu luka (*Allium cepa*) praćenjem inhibicije rasta korijena i morfologije korijena i stanica. Dužina korijena luka izloženih $n\text{Co}_3\text{O}_4$ je bila značajno smanjena nakon 72h, dok je nakon tretmana s nZnO pri koncentraciji od 20 mg/L došlo gotovo do potpune inhibicije rasta korijena. Što se tiče morfologije korijena, tretmani s $n\text{Co}_3\text{O}_4$ su pokazali vidljive promjene, dok je tretman s nZnO izazvao jaku dehidraciju korijenovog sustava i oštećenja. Oštećenja na razini stanice su bila prisutna u tretmanima s obje vrste nanočestica metalnih oksida (Ghodake i sur., 2011).

Zahvaljujući svojim fotokatalitičkim svojstvima, folijarno primijenjene nTiO_2 uglavnom pokazuju pozitivna svojstva na rast i fiziološke procese u biljkama (Rastogi i sur., 2017). Istraživanje genotoksičnosti nTiO_2 na luku ukazuju na visok potencijal interakcije nTiO_2 s molekulom DNA, što uzrokuje oštećenja u stanicama meristema korijena nakon 18 h izlaganja nanočesticama (promjera 21 i 50 nm) u koncentracijama od 10, 100 i 1000 $\mu\text{g/L}$ s (Demir i sur., 2014). Genotoksičnost nTiO_2 promjera 100 nm također je utvrđena u radu Ghosh i sur. (2010) nakon jednodnevnog izlaganja luka i duhana nTiO_2 pri koncentracijama 6, 8 i 10 mM. U radu Cox i sur. (2016) uočeno je da nTiO_2 nisu utjecale na klijanje salate, graha (*Phaseolus vulgaris*) i uljane repice (*Brassica napus*), a nije uočen ni negativan utjecaj na rast korijena kukuruza (*Zea mays*) i rajčice (*Solanum lycopersicum*).

Istraživanja nanočestica oksida željeza ($n\text{Fe}_2\text{O}_3$; željezovog (II, III) oksida, $n\text{Fe}_3\text{O}_4$; i željezovog (II) oksida, $n\text{FeO}$) pokazala su njihovu relativno nisku citotoksičnost. Nanočestice Fe_3O_4 i FeO pri niskim koncentracijama pokazale su pozitivan učinak na germinaciju i rast biljaka (Iannone i sur., 2016; Li i sur., 2016; Lau i sur., 2020).

2.4. nAg U OKOLIŠU

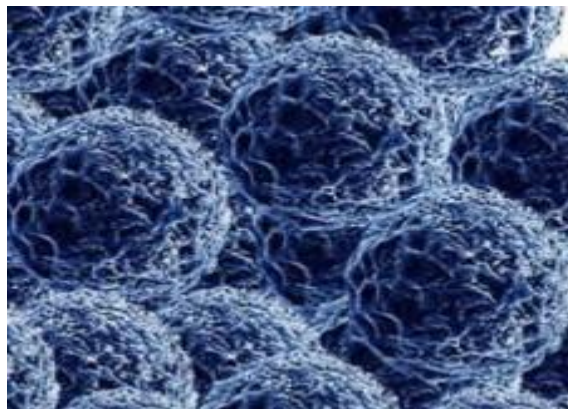
Koloidno srebro, nanočestice srebra i nanosrebro su neki od naziva koji se koriste za nAg čija je bar 1 od dimenzija 1-100 nm. Ag se koristilo kao antibiotik još od davnih vremena, a danas je u širokoj primjeni u medicini, optici, bojama i kozmetici zbog mnogih njegovih svojstava u formi nano veličine (Schluesener i Schluesener,

2013). Do sada je poznato preko 800 konzumnih proizvoda koji sadrže nAg. Povećanjem njihovog korištenja u komercijalnim proizvodima povećava se i njihov potencijal ispuštanja u okoliš, a sukladno tome i njihov toksičan učinak na okoliš i njegove sastavnice (McShan i sur., 2014).

U prirodi se Ag nalazi kao nusprodukt metalurgije, proizvodnje i odlaganja fotografske i elektroničke opreme, izgaranja ugljena te upotrebe srebrnog jodida (AgI) za umjetno izazivanje kiše i sprječavanje tuče (Eisler, 1997), dok su u novije vrijeme najznačajniji izvori Ag u okolišu tekstilna industrija i proizvodi za higijenu. Upravo zahvaljujući svojim antibakterijskim svojstvima, nAg spadaju u najčešće korištene nanočestice u prehrambenoj i tekstilnoj industriji te medicini (Luoma, 2008), a kao prekursor u njihovoj sintezi vrlo se često koristi AgNO_3 . Sve učestalija upotreba produkata koji u sebi sadrže Ag će za posljedicu imati porast koncentracije nAg u okolišu. Neki od glavnih puteva ulaska nanočestica u okoliš su putem pranja odjeće koja ih sadrži (Benn i Westerhoff, 2008) te putem kozmetičkih i higijenskih proizvoda poput sapuna i pasti za zube. Smatra se da 15 % Ag utvrđenog u površinskim vodama potiče iz biocida prisutnih u plastici i tekstilu (Blaser i sur., 2008). Koncentracija i biodostupnost Ag u okolišu uvelike ovisi o obliku Ag te fizikalno-kemijskim uvjetima u okolišu.

Zbog niske očekivane koncentracije nAg u usporedbi s ukupnom koncentracijom Ag, i ograničenosti trenutno dostupnih metoda, rijetka su istraživanja u kojima se posebno kvantificira doprinos nAg u okolišu (McGillicuddy i sur., 2017). Koncentracije ukupnog Ag u okolišu su procijenjene u rasponu ng/L za površinske vode i mg/kg za tlo i sediment (Blaser i sur., 2008). Na temelju modela, Gottschalk i sur. (2009), izvijestili su da su očekivane koncentracije nAg u površinskim vodama u SAD između 0,09 i 0,43 ng/L, u površinskim vodama u EU između 0,59 i 2,16 ng/L, a u rijeci Rajni očekivane koncentracije se kreću od 40 do 320 ng/L (Blaser i sur., 2008; Gottschalk i sur., 2009). Ag je u reduktivnim uvjetima u obliku metala ili u kompleksima sa sulfidima koji su netopivi u vodi, dok u oksidacijskim uvjetima stvara komplekse s bromidima, kloridima ili jodidima. Visoki toksični potencijal iAg se u prirodnim okolišnim uvjetima ne očekuje jer se veže u biološki nereaktivne spojeve; primjerice utvrđeno je da sulfidi, otopljena organska tvar, kloridi, tiosulfati i enzimi unutar biote smanjuju toksičnost iAg. Ag se u stanicu može unijeti različitim putevima poput adsorpcijom na površinu stanice ili ionskim kanalima i ligandima (Ratte, 1999). Unos iona Ag^+ u okoliš kao i njihova bioakumulacija su visoki (Luoma, 2008). Dokazano je da ioni Ag^+ imaju

velike biokoncentracijske faktore (veće od 10^5 za slatkovodne i morske alge) (Ratte 1999; Piccapietra i sur., 2012).



Slika 1. Nanočestice srebra (<https://www.lawandenvironment.com/tag/nanosilver/>)

nAg (*Slika 1.*) prolaze raznolike transformacije u okolišu i biološkom mediju. Stanje okoliša, aglomeracije ili agregacije, topivost u okolišnom i biološkom mediju ovise o specifičnosti nAg i vrsti njegova površinskog omotača. Sukladno prethodno navedenom stanje u okolišu je dosta varijabilno unutar raspona površinske funkcionalizacije koja može neke materijale činiti biokompatibilnima ili biološki opasnim (McShan i sur., 2014).

2.4.1. Promjene nAg u biološkom i okolišnom mediju

Slika 2. prikazuje glavne promjene koje nAg prolaze u okolišu i biološkom mediju:

1) gubitak i zamjena površinsko vezanih agenasa

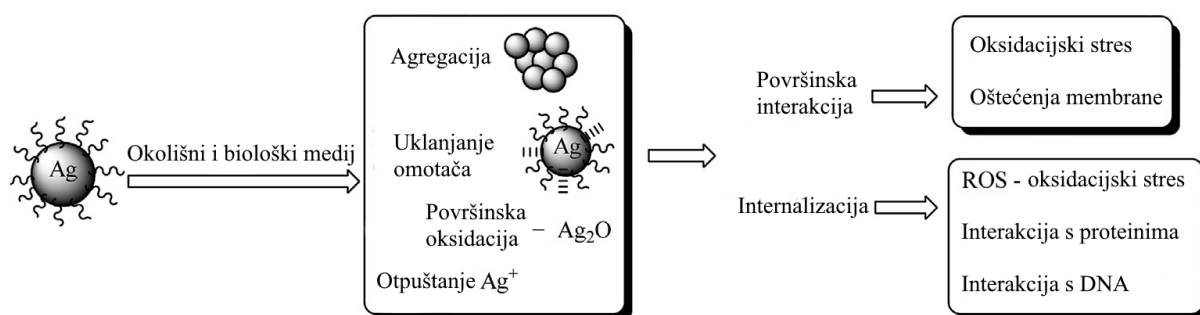
Površinski omotači kao što su limunska kiselina, aminokiseline, CTAB i natrijev dodecil-sulfat (SDS) su nekovalentno vezani za nanočestice, neki s jačim, a neki sa slabijim vezama. Disperzija nAg u biološkom ili okolišnom mediju uzrokovat će da površinsko vezani agensi uspostave ravnotežu uglavnom otpuštajući površinske molekule. Neki će biti zamijenjeni drugim slobodnim molekulama poput bioloških makromolekula, organskih ili anorganskih iona, dok će dio ostati slobodno bez omotača što dovodi do nestabilnosti nanočestica u takvom mediju (McShan i sur., 2014).

2) Agregacija i aglomeracija

Zbog zamjene površinskih agenasa drugim molekulama, poput vode ili iona, nAg se agregiraju jer postaju nestabilne (He i sur., 2012).

3) Površinska oksidacija i otpuštanje Ag^+

Ag^0 , koji se nalaze na površini nanočestice, kada dođu u kontakt s molekularnim kisikom (O_2) mogu oksidirati u srebrov oksid (Ag_2O) (Liu i sur., 2010). Također mogu biti u interakciji s drugim redoks aktivnim spojevima, pri čemu tvore iAg. Ag_2O može biti u interakciji s medijem u kojem se nalazi te otpuštati Ag^+ . Do oksidacije nAg u Ag_2O i otpuštanja iona Ag^+ može doći u okolišnom mediju, biološkom mediju kao i unutar same stanice. nAg, bilo u obliku pojedinih čestica ili aglomerata/agregata, također mogu polagano otpuštati Ag^+ i tako biti njihov izvor (McShan i sur., 2014).



Slika 2. Toksičnost nanočestica srebra u okolišu. Preuzeto i prilagođeno prema McShan i sur., (2014).

Neka istraživanja upućuju na to da je transformacija nAg u okolišnom i biološkom mediju pod jakim utjecajem iona sumpora (S^{2-} , SH^-) i spojeva koji sadrže sumpor (S), otopljenog O_2 , klora (Cl), bioloških makromolekula (DNA i proteini) i drugih organskih komponenata koje imaju jak afinitet za Ag^0 ili Ag^+ te svjetlosti (Liu i sur., 2011). Reakcijska kinetika i mehanizam, osim o koncentraciji sulfida, ovise i o otopljenom O_2 , pH vrijednosti, uvjetima osvjetljenja i drugim organskim materijama (Cheng i sur., 2011).

2.4.2. Učinak nAg na biotu

Povećanjem korištenja nAg zbog njihovog antimikrobnog učinka u proizvodnji zavoja za rane, kateterima i raznim proizvodima za domaćinstvo, porastao je i interes za istraživanje njihova učinka i na humane stanice. Korištenjem zavoja i katetera impregniranih nAg, nAg dolazi u direktan kontakt s kožom i sluznicom što omogućava lagan ulazak u stanicu. Istraživanja su izvođena na stanicama humanih plućnih fibroblasta i glioblasta, te je uočena redukcija sadržaja ATP-a stanice te oštećenja mitohondrija usporedno s povećanom produkcijom ROS (AshaRani i sur., 2008). Istraživanja učinka nAg i iAg provedena na humanim stanicama jetre (heptoblastomi) ukazuju na veću toksičnost iAg na stanice. nAg su uzrokovale oksidacijski stres i inducirale citotoksičnost, te je došlo do oštećenja membrane i redukcije funkcije stanice jetre i poremećaja antioksidacijskog sustava (Vinković Vrček i sur., 2014). Jedna od najpoznatijih bolesti uzrokovanih nAg je argirija – „bolest plavih ljudi“, koja se javlja se kod osoba koje su duži period izložene nAg ili konzumiraju koloidno Ag, ali njen mehanizam još nije u potpunosti poznat (Chen i Schluesener, 2008).

Zbog sve veće primjene nAg, sve je veća količina nAg u otpadnim vodama, a posljedično i u rijekama i potocima što rezultira toksičnim učinkom na vodeni ekosustav kao i na životinje koje žive u njemu. Dokazan je akutni učinak Ag^+ u slatkovodnih riba, prvenstveno na škrgama gdje dolazi do inhibicije aktivnosti bazolateralne Na^+ - i K^+ -ATP-aze (Griffitt i sur., 2008). Istraživanja provedena na slatkovodnoj ribi *Danio rerio* (zebrica) pokazala su da njihova izloženost nAg i iAg promjera 30-40 nm u koncentracijama nižim od 84 i 25 $\mu\text{g/L}$ tokom 48 h rezultira povećanom brzinom aktivnosti operkuluma i disanja, što sugerira respiratornu toksičnost (Bilberg i sur., 2011). Toksični učinak nAg dokazan je i kod vrsta *Daphnia magna* (vodenbuha), *Lumbriculus variegatus* (kalifornijski crv) i *Paleomonetes sp.*, koje su uginule pri koncentraciji nAg od 27 mg/L (Pand, 2006). Uočeno je da nAg pokazuju sekundarnu toksičnost, koja ima mogućnost utjecati na organizme u svim segmentima prehrambenog lanca, a može biti čak i veća od primarne toksičnosti jer sekundarna toksičnost može utjecati na organizme koji u pravilu nisu izvorno izloženi zagađivaču (Bharadwaj Punita, 2012).

Poznato je da nAg imaju antimikrobna svojstva, a posebno su toksične za nekoliko sojeva bakterija uključujući gram pozitivne bakterije kao što su *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus pneumoniae*, te na gram negativne bakterije,

uključujući vrste *Echerichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*. Razlog njihove toksičnosti je povećana reakcijska površina nanočestica. nAg oštećuju bakterijske stanice uništavajući enzime koji pomažu pri transportu hranjivih tvari u stanicu i oslabljuju stanične membrane što dovodi do povećanja propusnosti stanice i njene konačne smrti. Neka istraživanja upućuju da nAg uništavaju sposobnost replikacije bakterijske DNA (Bharadwaj Punita, 2012).

Istraživanja izvedena na bakterijama u tlu (heterotrofne i kemotrofne bakterije) pokazala su da Ag, čak i u obliku čestica većih dimenzija, inhibira rast mikroba što je jako važno jer ti organizmi osiguravaju hranjive tvari bitne u nastanku tla. Pokazujući potencijalni toksični učinak na denitrificirajuće bakterije, Ag narušava denitrifikacijske procese (Sondi i Salopek-Sondi, 2004). Zbog sve veće upotrebe nAg u potrošačkim proizvodima, od perilice rublja, tkanina za čišćenje u kućanstvu i sl. postoji rizik da će nastala otpadna voda biti ispuštena u kanalizaciju, u postrojenja za pročišćavanje te u konačni recipijent - more ili potoke. Također je otkriveno da nAg uništavaju i bakterije koje se koriste u obradi otpadnih voda (Choi i sur., 2008). nAg povećavaju stvaranje ROS, koji također inhibiraju rast bakterija potrebnih za obradu otpadnih voda (Wang, 2003).

2.4.3. Učinak nAg na biljke

2.4.3.1. Primanje i prijenos nanočestica

Biljke pružaju potencijalni put za prijenos nanočestica u okoliš i služe kao važan put za bioakumulaciju nanočestica u hranidbenom lancu. Nanočestice mogu ući u biljna tkiva kroz korijen ili nadzemne dijelove, pri čemu i ranjeno tkivo predstavlja mjesto za njihov ulaz (Rastogi i sur., 2017). Pri ulasku nanočestica u stanice, stanična stijenka je prva barijera za prolaz i unos nanočestica u biljne stanice. Promjer pora stanične stijenke u rasponu je od 5 do 20 nm pa prema tome u biljne stanice mogu lako ući same nanočestice ili njihovi agregati promjera manjeg od promjera pora stanične stijenke (Dietz i Herth, 2014). Stanična stijenka je porozna mreža polisaharidnih vlakana koja djeluje kao prirodno sito pa nanočestice manjeg promjera lakše prolaze kroz pore. No, kod uročnjaka utvrđeno je da nAg mogu inducirati formiranje pora s većim promjerom, što omogućava transport i velikim nanočesticama kroz staničnu stijenku (Navarro i sur., 2008). U istraživanju Geisler-Lee i sur. (2014),

uočeno je da nAg u kontaktu sa sustavom primarnog korijena ulaze u vrhove korijena uročnjaka u ranom stadiju izlaganja nanočesticama.

Da bi nanočestice ušle u stanicu, osim kroz staničnu stijenku moraju proći i staničnu membranu epidermalnog sloja korijena, kroz koju se mogu prenijeti pomoću proteinskih nositelja, kroz ionske kanale, plazmodezmijama i endocitozom (Onelli i sur., 2008; Koelmel i sur., 2013). Heinlein i Epel su još 2004. godine utvrdili mogućnost ulaska nAg u biljnu stanicu putem plazmodezmija. Kod *A. thaliana* je utvrđeno da se nAg skupljaju u plazmodezmijama i staničnoj stijenci (Geisler-Lee i sur., 2013) te na taj način blokiraju međustaničnu komunikaciju, što može biti uzrokovano mehaničkom prisutnošću nAg na tim mjestima i može utjecati na međustanični transport hranjivih tvari. Uz korijenski transport, nAg mogu u biljku ući i putem listova. Supke *Arabidopsisa* koje su bile izložene mediju s prisutnim nAg mogle su ih akumulirati u stanicama puči (Geisler-Lee i sur., 2013). U listovima zelene salate, nAg se efektivno zadržavaju nakon folijarnog izlaganja i imaju sposobnost ulaska u tkivo lista putem puči (Larue i sur., 2014). Istraživanja izvedena na soji (*Glycine max*) i riži ukazuju na 17-200 puta veću bioakumulaciju nAg u listovima nego u korijenu biljke (Li i sur., 2017). Istraživanja Cvjetko i sur. (2018) na duhanu dokazuju direktan ulazak nAg putem stanica korijena. Naime, meristemske stanice korijena postaju viosko vakuolizirane što ukazuje da bi vakuole mogle biti primarno skladište akumulacije Ag. nAg ulaze kroz staničnu stijenku i staničnu membranu korijena te se u biljkama prenose putem unutarstaničnih prostora (kratki prijenos) i putem vaskularnog tkiva (prijenos na veće udaljenosti). No, vaskularno tkivo tj. ksilem je najvažniji u transportu i distribuciji nanočestica (Aslani i sur., 2014), jer se one tim putem mogu transportirati u listove ili druge organe (Dietz i Herth, 2014); stoga je moguće da plodovi, sjemenke i drugi jestivi dijelovi biljaka mogu također biti kontaminirani s nAg.

2.4.3.2. Fitotoksičnost nAg i putevi interakcije s biljkom

Toksičnost nAg je usko povezana s transformacijom u biološkom i okolišnom mediju uključujući površinsku oksidaciju, otpuštanje Ag^+ i interakciju s biološkim molekulama. Na fitotoksičnost nAg mogu, izuzev veličine, oblika, koncentracije i stupnja agregacije, utjecati i površinski omotači koji ih stabiliziraju. Površinski omotači mogu utjecati na promjenu svojstava nAg, kao što su optička svojstva, disperzija i oblik (Pereira i sur., 2018; Tejamaya i sur., 2012). Dosadašnja istraživanja (Tejamaya i sur.,

2012; Silva i sur., 2014; Cvjetko i sur., 2017; Biba i sur., 2020; Peharec Štefanić i sur., 2021) pokazala su da su najčešće korišteni omotači kod tih nanočestica citrat, koji im daje negativan naboj i PVP, koji im daje slabije negativan naboj, iako je dosta korišten i CTAB, koji im daje pozitivan naboj.

Posljednja istraživanja upućuju na to da su i iAg i nAg izvor toksičnosti. No, često je teško utvrditi i razlikovati koji dio toksičnosti potiče od iona Ag^+ , a koji dio od nanočestica. No, u svakom slučaju dokazano je da kada su prisutne u većoj količini i nAg i otpušteni Ag^+ dovode do povećanog stvaranja ROS (Rastogi i sur., 2017; Yan i Zhong, 2019).

Mnoga su istraživanja pokazala da koncentracijan Ag bitno doprinosi njihovoj fitotoksičnosti. Mirzajani i sur. (2013) su primijetili da nAg prisutne u niskoj koncentraciji (do 30 $\mu\text{g/mL}$) nisu ušle u stanice korijena riže, dok su nakon primjene u većoj koncentraciji (60 $\mu\text{g/mL}$) oštetili stanične stijenke. U istraživanju Mazumdar i Ahmed (2011) primijećeno je da su nAg veličine 25 nm oštetile staničnu stijenk i vakuole stanice korijena riže, uzrokujući tako toksični učinak. Cvjetko i sur. (2017) su također utvrdili da su nAg sukladno koncentraciji uzrokovala i veći stupanj oksidacijskog stresa u korijenu luka. U tom je istraživanju također dokazan i utjecaj površinskog omotača na fitotoksičnost. Naime, korištene su nAg za čiju su stabilizaciju korištena 3 omotača: citrat (nAg-citrat), PVP (nAg-PVP) i CTAB (nAg-CTAB); rezultati su pokazali da su najveću toksičnost uzrokovala pozitivno nabijene nAg-CTAB, koje su ujedno bile i najmanje, što im je olakšalo unos u stanicu. U istom istraživanju, najslabiji toksični učinak pokazale su nAg-citrat koje su bile puno veće od nAg-CTAB, a pokazivale su i sklonost agregaciji u veće čestice. U istraživanju Pereira i sur. (2018), nAg-PVP su bile toksičnije nego nAg-citrat obzirom da su uzrokovala znatno snažniju redukciju rasta vodene leće. Istraživanja Biba i sur. (2021) bilježe također utjecaj površinskog omotača klijanje i rani rast duhana. Naime, nAg-PVP izaziva blažu toksičnost kod rasta duhana pri većim koncentracijama (50 i 100 μM), dok nAg-CTAB ima jači negativan učinak na rast što se pripisuje CTAB omotaču zbog njegova negativnog djelovanja na parametre rasta. nAg-PVP i nAg-CTAB također ostavljaju i teže posljedice na fotosintezu duhana kao rezultat veće stabilnosti i akumulacije Ag (Peharec Štefanić i sur., 2021).

Brojna istraživanja su pokazala da postoji korelacija između veličine nAg i njihovog toksičnog učinka na biljke u smislu da nanočestice manjeg promjera uzrokuju jači toksični učinak nego veće nanočestice (Yin i sur., 2012; Jiang i sur., 2014; Cvjetko

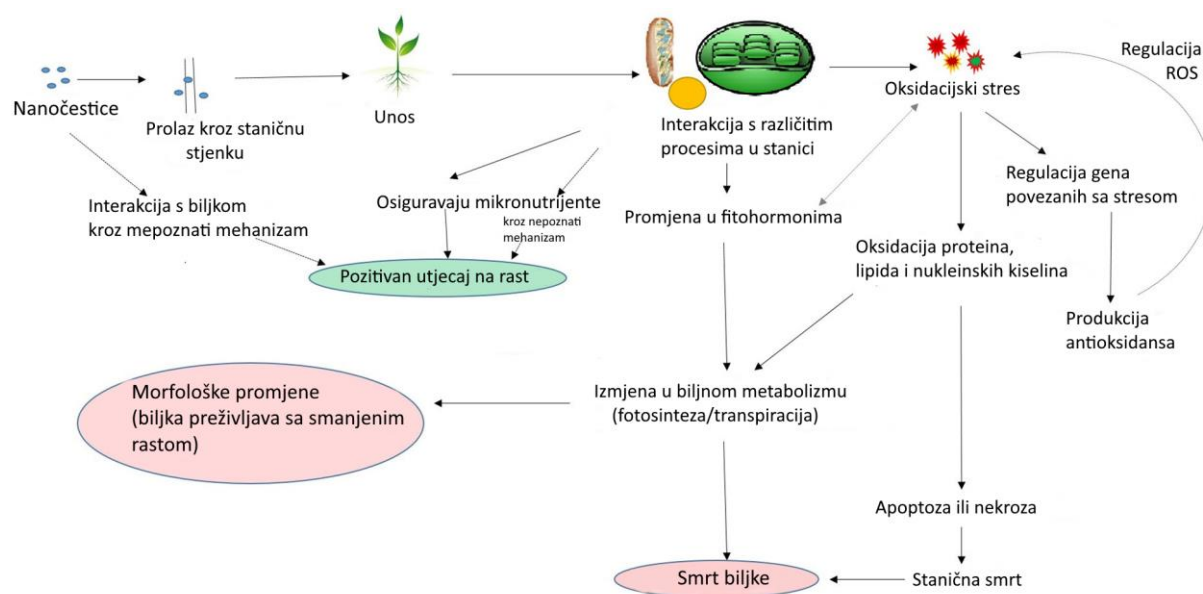
i sur., 2017). Naime, nAg manje veličine imaju veći omjer površine prema volumenu, što im omogućuje bolje djelovanje s membranom i time direktni utjecaj na funkcionalnost stanične membrane. Utvrđeno je da nAg veličine <30 nm aplicirane u visokoj koncentraciji inhibiraju rast korijena i izdanka kod različitih biljaka (Dimkpa i sur., 2013; Qian i sur., 2013; Tripathi i sur., 2017; Vinković i sur., 2017). Također, u spomenutim je istraživanjima dokazano da nAg dovode do povećanja ROS te povećane indukcije antioksidansa kao adaptivnog mehanizma (Dimkpa i sur., 2013; Jiang i sur., 2014; Cvjetko i sur., 2017; Tripathi i sur., 2017; Biba i sur., 2020). Količina nanočestica akumuliranih u biljci također ovisi i o redukcijskom potencijalu iona i redukcijskom kapacitetu biljke, što ovisi o prisutnosti različitih polifenola i drugih heterocikličkih spojeva u biljci (Huang i sur., 2007; Egerova i Revina, 2000). Istraživanja pokazuju da nAg prisutan u okolišu nekad može imati i pozitivan učinak na biljke, dok je unos nAg u biljna tkiva neophodan da izazove toksični učinak. Krishnaraj i sur. (2012) su zamijetili da biološki sintetizirane nAg nisu izazvale učinak ili su imale blagi učinak na biljku bakopu (*Bacopa monnieri*). U tom su istraživanju nAg inducirale sintezu proteina i ugljikohidrata i smanjile sadržaj ukupnih fenola. Istraživanja klijanja sjemena i rasta korijena tikvice u hidroponičnoj otopini zamijenjenoj s nAg nisu pokazala negativne učinke, dok je uočeno smanjenje biomase i transpiracije biljaka produženjem njihovog rasta u prisutnosti nAg (Stampolius i sur., 2009). Biba i sur. (2020) su istraživali učinak nAg stabiliziranim različitim omotačima, PVP i CTAB, i učinak AgNO₃ na rani rast i klijanje duhana te su uočili značajno smanjenje u postotku klijanja sjemena, a ujedno i smanjenje rasta korijena proporcionalno rastu koncentracija nAg i AgNO₃. Također, zamijećeno je da nAg mogu dovesti do smanjenja transpiracije te da nakupljanje nanočestica na fotosintetski aktivnoj površini uzrokuje zagrijavanje listova, što može rezultirati modifikacijama u izmjeni plinova i začepljenju puči (Hawthorne i sur., 2012). U nekim je istraživanjima zabilježen pad u koncentraciji klorofila i fluorescenciji klorofila (Mirzajani i sur., 2013; Qian i sur., 2013; Tripathi i sur., 2017; Biba i sur., 2020; Peharec Štefanić i sur., 2021). Obzirom da biljka fotosintezom dobiva energiju za brojne metaboličke procese, mjerenje fotosintetske aktivnosti i koncentracije fotosintetskih pigmenata smatra se dobrim parametrima za procjenu učinka stresnih čimbenika (Kalaji i sur., 2014). Dokazano je da nanočestice utječu i na fotosintetski aparat (Qian i sur., 2013; Perreault i sur., 2014; Tripathi i sur., 2017), što može rezultirati smanjenjem rasta biljke ili smrti biljke.

Značajne promjene u sadržaju lipida, proteina, lignina, pektina i celuloze su zabilježena u rotkvici izloženoj nAg veličine 2 nm u koncentraciji od 500 mg/L (Zuverza-Mena i sur., 2016). Pod utjecajem nAg dolazi i do promjene u koncentraciji biljnih hormona auksina i citokinina (Yin i sur., 2012; Vinković i sur., 2017). Citotoksičnost i genotoksičnost nAg istraživana je na vrhovima korijena luka te je dokazano da nAg smanjuju mitotski indeks i utječu na staničnu diobu uzrokujući kromosomske mostove, sljepljivanje, kromosomske lomove i dezintegraciju stanice (Kumari i sur., 2009, Cvjetko i sur., 2017). Zbog svoje fungicidne aktivnosti, učinak nAg bio je proučavan na različitim patogenim gljivama te je utvrđeno da nAg imaju značajan fungicidni učinak (Jo i sur., 2009). No, njihova upotreba u poljoprivredi je upitna obzirom da nAg s vremenom otpuštaju iAg te mogu štetno utjecati na biomasu u tlu (Johansson i sur., 1998; Liu i Hurt, 2010).

Navedena istraživanja potvrđuju da nAg pokazuju fitotoksični učinak na različite aspekte morfologije, fiziologije i biokemije biljaka, što ovisi o veličini, obliku, površinskom omotaču, koncentraciji i stupnju agregacije nAg. Također smatra se da tek prodiranjem nAg u biljno tkivo i interferencijom s različitim metaboličkim procesima dolazi do njihovog toksičnog učinka.

Nanočestice općenito mogu interferirati s metabolizmom biljke na različite načine, primjerice osiguravajući im mikronutrijente (Liu i Lal, 2015), utjecajem na regulaciju gena (Nair i Chung, 2014) ili utjecajem na različite oksidacijske procese, što za posljedicu ima oksidacijski stres (Hossain i sur., 2015) (*Slika 3*).

Ulaskom u stanicu, nanočestice općenito mogu interferirati s transportnim lancima elektrona u mitohondrijima i kloroplastima, što može dovesti do povećanja količine ROS i pojave oksidacijskog stresa (Dimkpa i sur., 2013; Faisal i sur., 2013; Jiang i sur., 2014; Pakrashi i sur., 2014; Cvjetko i sur., 2017; Peharec Štefanić i sur., 2019). Poznato je da je pod utjecajem različitih stresnih čimbenika ograničena fiksacija ugljika, što dovodi do povećanja fotoinhibicije i potencijalno može rezultirati pretjeranom produkcijom superoksidnih radikala (O_2^-) i vodikovog peroksida (H_2O_2) (Foyer i Noctor, 2003).



Slika 3. Općeniti mehanizam interakcije nanočestica s biljkom.

Preuzeto i prilagođeno prema Rastogi i sur., (2017).

Stvoreni ROS mogu ući u interakciju s gotovo svim staničnim komponentama, uzrokujući modifikacije proteina, lipidnu peroksidaciju i oštećenja molekule DNA (Van Breusegem i Dat, 2006). Dosadašnja istraživanja su pokazala da nAg dovode do lipidne peroksidacije i oštećenja DNA (Atha i sur., 2012; Belava i sur., 2017; Cvjetko i sur., 2017; Saha i Dutta Gupta, 2017; Lovecká i sur., 2021). Povećana produkcija ROS može dovesti do apoptoze ili nekroze i stanične smrti (Van Breusegem i Dat, 2006; Faisal i sur., 2013).

Osim svoje destruktivne aktivnosti, ROS imaju i signalnu ulogu u različitim staničnim procesima uključujući i toleranciju na okolišni stres (Sharma i sur., 2012). Za preciznu kontrolu količine ROS, stanice su razvile antioksidacijski sustav koji će detaljnije biti objašnjen u poglavlju 2.4.5. Utvrđeno je da nAg, nCu i nanočestice nikla (nNi) dovode do modulacije antioksidacijske obrane (Faisal i sur., 2013; Jiang i sur., 2014; Costa i Sharma, 2016).

2.4.4. Oksidacijski stres

Oksidacijski stres je stanje redoks neravnoteže u kojoj produkcija ROS prevlada nad antioksidacijskim kapacitetom obrane stanice, što dovodi to štetnih bioloških posljedica (Xia i sur., 2006).

ROS nastaju u biljnim stanicama kao produkt aerobnog metabolizma u procesima fotosinteze i staničnog disanja. U stresnim uvjetima, u biljnoj stanici se aktiviraju dodatni metabolički putevi pa dolazi do njihove pojačane sinteze. U tim slučajevima reakcije koje kataliziraju enzimi poput glikolat oksidaze, NADP oksidaze, aminooksidaze i peroksidaze prisutne u staničnoj stijenci mogu biti značajni izvori molekula ROS. Biljne stanice su tijekom evolucije razvile niz zaštitnih mehanizama kojima održavaju stanje ravnoteže u proizvodnji ROS, a narušavanje te ravnoteže dovodi do oksidacijskog stresa (Mittler, 2002). Najvažniji izvori ROS u stanici su mitohondriji, kloroplasti i peroksisomi (Foyer i Noctor, 2003).

U molekule ROS ubrajamo O_2^- , singletni kisik (1O_2), hidroksilni radikal ($\cdot OH$) i H_2O_2 . Navedene molekule, odnosno spojevi, izrazito su reaktivni i mogu oksidirati mnoge biološki važne makromolekule, što dovodi do inaktivacije enzima, denaturacije proteina, oštećenja molekule DNA i lipidnih membrana. Posebno je važna njihova uloga u kaskadnom prijenosu signala, tako da u stanici njihovo djelovanje predstavlja balansiranje između prijenosa signala i izazivanja oksidacijskog stresa (Apel i Hirt, 2004). U normalnim fiziološkim uvjetima koncentracija ROS u stanici je niska i iznosi $240\ \mu M$ za O_2^- , odnosno $0,5\ \mu M$ za H_2O_2 . Stresni uvjeti koji narušavaju homeostazu mogu povišiti koncentraciju O_2^- do $720\ \mu M$, a H_2O_2 na $5-15\ \mu M$ (Polle, 2001).

H_2O_2 nastaje u peroksisomima i kloroplastima u reakcijama oksidacije (Del Rio i sur., 1992). U mitohondrijima biljaka sudjeluju u transportnom lancu elektrona i oksidacijskoj fosforilaciji (Braidot i sur., 1999). Prirodni je produkt metabolizma biljaka, stoga nastaje u brojnim neenzimskim i enzimskim reakcijama. Primjerice, ksantin oksidaza kao donore elektrona može koristiti ksantin, hipoksantin ili acetaldehid, pri čemu nastaje O_2^- kojeg onda superoksid dismutaza (SOD) prevodi u H_2O_2 . Oksalat oksidaza katalizira stvaranje H_2O_2 i ugljikovog dioksida (CO_2) iz oksalata u prisutnosti kisika (O_2) (Bolwel i Wojtaszek, 1997), a amino oksidaza katalizira oksidaciju biogenih amina u aldehide uz oslobađanje amonijaka (NH_3) i H_2O_2 (Reggiani i Bertani, 1989). Razina H_2O_2 unutar stanice regulirana je enzimskim katalazama i peroksidazama. Obje skupine enzima imaju ulogu u otklanjanju H_2O_2 . Osim štetnog djelovanja, H_2O_2 ima i pozitivnu ulogu. Naime, H_2O_2 je neutralna molekula pri pH vrijednosti ispod 10 te zbog toga može difundirati kroz biomembrane i odigrati važnu ulogu kao signalna molekula (Hung i sur., 2005).

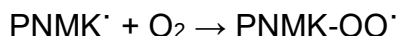
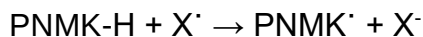
Oksidacijski stres se često može izraziti i kao omjer GSH i glutation disulfida (GSSG) u stanici. Redoks par GSH/GSSG ne samo da služi kao glavni homeostatski

regulator stanične redoks ravnoteže, već također ima i funkciju senzora koji pokreće stanični odgovor koji u ovisnosti o brzini pada i koncentracije GSH može biti zaštitne ili štetne prirode (Diaz-Vivancos i sur., 2015).

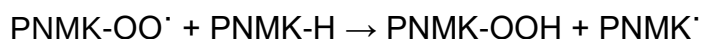
2.4.4.1. Lipidna peroksidacija

Dvoslojna lipidna membrana sastoji se od fosfolipida i glikolipida koji imaju lance masnih kiselina vezane esterskom vezom na prvom i drugom ugljikovom atomu alkohola glicerola. Mnogi stresni uvjeti uzrokuju promjene na staničnoj membrani, a lipidna peroksidacija jedan je od pokazatelja koji upućuju na indukciju oksidacijskog stresa u biljnom organizmu (Gutteridge i Halliwell, 1990).

Polinezasićene masne kiseline (PNMK) posebno su osjetljive na peroksidaciju. Njihova sinteza *de novo* zahtijevala bi mnogo energije, stoga je očuvanje membranskih lipida pomoću antioksidacijskog sustava najbolji način očuvanja funkcionalnih membrana (Blokina i sur., 2003). Lipidna peroksidacija zbiva se u 3 koraka: inicijacija, propagacija i terminacija. U 1. koraku $\cdot\text{OH}$ i $^1\text{O}_2$ reagiraju s metilenskom skupinom PNMK uz izdvajanje vodika s metilne skupine pri čemu nastaje peroksilni radikal.



Peroksilni radikal je vrlo reaktivan i u 2. koraku reagira s drugom PNMK, pri čemu nastaju lipidni hidroksiperoksid i lipidni radikal.



Lipidni hidroksiperoksid je nestabilan u prisustvu iona Fe i drugih metalnih katalizatora jer može sudjelovati u Fentonovoj reakciji u kojoj nastaju reaktivni aloksiradikali koji dodatno pojačavaju lančane reakcije peroksidacije.

Proces lipidne peroksidacije završava kada nastali radikali međusobno reagiraju formirajući stabilne produkte, nereaktivne konjugirane spojeve kao što su aldehidi (npr. MDA), alkoholi i ugljikovodici (etan, etilen), koji nisu sposobni nastaviti propagaciju lančanih reakcija peroksidacije (Bhattacharjee, 2014).

2.4.4.2. Oksidacija proteina

U odgovoru na stresne čimbenike okoliša, kroz različite mehanizme regulacije ekspresije gena, slijede i promjene u kvalitativnom i kvantitativnom sastavu proteina. Oksidacija proteina predstavlja kovalentnu modifikaciju proteina induciranu molekulama ROS i drugim produktima oksidacijskog stresa (Sohal i sur., 1993). Kao posljedica interakcije proteina i ROS nastaju karakteristične modifikacije aminokiselina, dolazi do fragmentacije peptidnih lanaca, agregacije unakrsno povezanih produkata, promjene u električnom naboju aminokiselinskih ostataka, ali i povećane osjetljivosti na proteolizu. Primarna, sekundarna i tercijarna struktura proteina su također čimbenici koji utječu na relativnu osjetljivost proteina. Različiti oblici ROS imaju različiti reaktivni potencijal kojim mogu modificirati lance aminokiselina, stoga se aminokiseline u peptidu razlikuju po osjetljivosti prema reaktivnim derivatima kisika. Aktivirani O_2 može eliminirati vodikov atom iz cisteinskih ogranaka, formirajući tiolni radikal koji se može unakrsno povezati s drugim O_2 radikalom stvarajući disulfidni most. Radikal O_2 može se i vezati na metioninske ogranke, stvarajući metionin sulfoksidne derivate (Farr i Kogoma, 1991). Ove reakcije uz pomoć određenih enzima mogu biti reverzibilne. Osim reverzibilnih modifikacija, postoje i oblici djelovanja slobodnih radikala na proteine koji su ireverzibilni poput oksidacije katalitičkih središta enzima Fe-S (željezo-sumpor proteini u kojima su prisutni kofaktori oblika *klastera* koje tvore međusobno kovalentno vezani željezovi i sulfidni ioni) radikalom O_2^- , koji ireverzibilno inhibira funkciju samog enzima (Gardner i Fridovich, 1991). Mnoge aminokiseline se ireverzibilno mijenjaju prilikom oksidacije proteina. Tako na primjer histidin, lizin, prolin, arginin i serin stvaraju karbonilne derivate, među kojima su najčešći ketoamini i ketoaldehidi (Stadtman, 1986). Karbonilacija proteina inhibira ili mijenja aktivnost proteina te povećava osjetljivost na proteolizu, stoga se sadržaj karbonilnih skupina često koristi kao marker oksidacije proteina. Oksidacijska razgradnja proteina povećana je u prisutnosti metalnih kofaktora, osobito Fe. Metal se veže na dvovalentni kation u aktivnom mjestu te reagira s H_2O_2 dajući $\cdot OH$ koji brzo oksidira aminokiselinski ogranak, inaktivirajući enzim (Gardner i Fridovich, 1991).

2.4.5. Antioksidacijski sustav

Budući da su biljke sesilni organizmi, tijekom evolucije su razvile učinkovite mehanizme odgovorne za održavanje homeostaze. Antioksidacijski sustav stoga

predstavlja niz obrambenih mehanizama kojima biljne stanice održavaju ravnotežnu koncentraciju ROS. Zajednička značajka svakog antioksidansa je sposobnost stabilizacije nesparenih elektrona i neutralizacija potencijalno štetnog djelovanja slobodnih radikala. ROS su stalni produkti normalnog staničnog metabolizma i nastaju u svim dijelovima stanice. Budući da se reaktivni derivati O_2 razlikuju po mjestu nastanka u stanici, reaktivnosti s pojedinim biološkim molekulama, topivosti i mogućnosti difuzije, biljci je potreban kompleksan antioksidacijski sustav obrane (Smirnoff, 1993).

Za kontrolu razine ROS i zaštitu stanica u stresnim uvjetima, biljna tkiva osim enzima za njihovo uklanjanje (SOD, katalaza (KAT) i peroksidaze (POD)), sadrže mnogobrojne antioksidacijske neenzimske molekule male molekularne mase (askorbat, GSH, karotenoidi, polifenoli i tokoferol) kojima reguliraju metabolizam ROS. Za regeneraciju tih molekula potreban je čitav niz enzima, od kojih je jedan i glutathion reduktaza. Uz njih postoje i enzimi za uklanjanje štetnih produkata lipidne peroksidacije (Blokchina i sur., 2003).

SOD je grupa metaloenzima koja predstavlja prvu liniju obrane od ROS-a u stanici. Taj enzim katalizira dismutaciju O_2^- na H_2O_2 i O_2 . O_2^- nastaje na svakom mjestu u stanici u kojoj je prisutan lanac elektrona (Elstner, 1991), stoga ih nalazimo u mitohondrijima, kloroplastima, peroksisomima, glioksisomima, apoplastu i citosolu. Fosfolipidne membrane su nepropusne za nabijene superoksidne molekule, stoga je važno da se SOD nalaze u odjeljcima u kojima O_2^- nastaje kako bi ga mogle razgraditi. Na temelju metalnih kofaktora SOD se dijele na 4 skupine. To su željezo (Fe SOD), mangan (Mn SOD), nikal (Ni^{3+} SOD) i bakar-cink (Cu-Zn SOD) SOD. One se nalaze u različitim odjeljcima unutar stanice: Mn SOD se nalazi u mitohondrijima, Fe SOD u kloroplastima, a Cu-Zn SOD u kloroplastima i citosolu. Svaki oblik enzima SOD je nezavisno reguliran, ovisno o stupnju stresa u pojedinom staničnom odjeljku (Takahashi i Asada 1983).

POD su glikoproteini koji sadrže protohematin IX kao prostetičku skupinu. Ovi enzimi kataliziraju oksidaciju staničnih komponenti, poput fenolnih spojeva, askorbinske kiseline, glutathiona i dr., koristeći H_2O_2 ili organski hidroperoksid kao supstrat. Dijelimo ih na nespecifične i specifične. Nespecifične POD koriste kao donore elektrona aromatske fenole poput gvajakola i pirogalola (Hiraga i sur., 2001). Više izoenzima gvajakol peroksidaze je u biljnom tkivu pronađeno u vakuolama, staničnoj stijenci i citosolu, ali ne i u drugim staničnim odjeljcima (Asada, 1992). Specifične

peroksidaze su askorbat peroksidaze (APOD), koje kao donor elektrona koriste askorbat i vrlo su učinkovite u brzom uklanjanju H_2O_2 . APOD su najvažnije za razgradnju H_2O_2 u citosolu te u stromi i tilakoidima kloroplasta. Izoenzimi APOD su pronađeni u stromi i tilakoidnim membranama kloroplasta, mitohondrija, glioksisomima i peroksisomima te staničnoj membrani i citosolu. Za redukciju jedne molekule H_2O_2 potrebne su 2 molekule askorbata, a produkt reakcije su 2 molekule H_2O i 2 molekule monodehidroksiaskorbata (Nakano i Asada, 1981).

KAT je tetramerni enzim koji sadrži hem skupinu, a katalizira dismutaciju H_2O_2 na O_2 i H_2O . Prisutna je u svim aerobnim eukariotima, a važna je zbog uklanjanja H_2O_2 u peroksisomima, koji nastaje uslijed oksidacije masnih kiselina i fotorespiracije. H_2O_2 može uklanjati na 2 načina: direktnom dismutacijom ili oksidacijom alkohola, formaldehida ili nitrita (Willekens i sur., 1995). KAT ima 3 glavne izoforme, a to su KAT1, KAT2 i KAT3. Geni koji ih kodiraju nalaze se na različitim kromosomima, a njihova je ekspresija je nezavisno regulirana; KAT1 i KAT2 nalaze se u peroksisomima i citosolu, dok se izoforma KAT3 nalazi u mitohondrijima (Scandalis, 1990).

GSH je tripeptid (γ -L-glutamyl-cisteinil-glicin), koji ima važnu ulogu u širokom rasponu organizama. To je vrlo važan stanični neproteinski tiol jer aminokiseline su međusobno povezane pseudopeptidnom vezom, tj. putem karboksilata u pokrajnjem aminokiselinskom lancu (Rouhier i sur., 2008). GSH se nalazi u mnogim tkivima i substaničnim odjeljcima u milimolarnim koncentracijama. U kloroplastima koncentracija GSH iznosi od 1 do 4,5 mM (Noctor i Foyer, 1998). Kod biljaka je neophodan ne samo zbog održavanja redoks ravnoteže, nego i za detoksikaciju uslijed izlaganja ksenobioticima i teškim metalima, kao i u regulaciji proteina (Rouhier i sur., 2008). Transferaze su enzimi koji kataliziraju prijenos funkcionalnih skupina s jedne molekule na drugu (Hacker i sur., 2009). Glutation-S-transferaza (GST) je biotransformacijski enzim koji reaktivne elektrofilne i hidrofobne tvari konjugira s glutationom i čini stabilnijima i bolje topivim. Supstrat za GST mogu biti lipidni peroksidi i aldehidni derivati (Modén i Mannervik, 2014).

2.4.6. Vodena leća (*Lemna minor* L.)

Sve vodene leće su malene, jednostavno građene jednosupnice. Porodica *Lemnaceae* obuhvaća četiri roda: *Lemna*, *Spirodela*, *Wolffia* i *Wolffiella*. Većina vrsta su slobodno plutajuće, dok se manji broj vrsta nalazi neposredno ispod površine vode

(*Lemna trisulca*, *Lemna tenera*, neke vrste rodova *Wolffiella* i *Wolffia*). Kao testni organizmi u biotestovima pogodnim se pokazalo više vrsta iz porodice *Lemnaceae*, ali najčešće se rabe *Lemna minor* (Slika 4.), *Lemna gibba*, *Spirodela polyrrhiza* i *Wolffia arrhiza*. Te vrste posjeduju brojne značajke koje ih čine prikladnim za rad u laboratoriju: 1. malih su dimenzija, no ipak dovoljno velike da se neke promjene uzrokovane dodatkom istraživanih tvari u podlogu mogu promatrati golim okom, 2. jednostavne su građe, 3. nije im potreban veliki prostor za uzgoj i izvođenja pokusa, 4. hranjiva podloga je jednostavna i jeftina, 5. brzo se razmnožavaju, 6. razmnožavaju se vegetativno, što osigurava genetičku homogenost testnih organizama i 7. osjetljive su na različite tvari u hranjivoj podlozi (Wang, 1990). U prirodi su vodene leće nađene na staništima koja su imala pH vrijednost prirodne vode u rasponu od 3,5 do 10,5 (Landolt, 1986). Dugotrajni rast bez uočljive inhibicije moguć je u uvjetima pH vrijednosti od 5 do 8, a taj podatak vrijedi za 15 vrsta vodenih leća (Landolt, 1986). Optimalna pH vrijednost ovisi o mnogim čimbenicima, npr. da li je izvor dušika (N) u obliku NH_3 ili nitrata (NO_3) te o stupnju raspoloživosti mikroelemenata, što osim njihove koncentracije u mediju, ovisi i o nazočnosti helatnih tvari poput etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) i citrata. Temperaturni optimum za većinu vrsta iz porodice *Lemnaceae* je između 20 i 30°C, a ovisi o intenzitetu svjetlosti i sastavu podloge (osobito o sadržaju šećera), dok je minimum između 4 i 18°C, a maksimum između 30 i 32°C (Hillman, 1961).

3. MATERIJAL I METODE

3.1. BILJNI MATERIJAL

Vodena leća (*Lemna minor*) sakupljena je u Botaničkom vrtu Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Prilikom uvođenja vodene leće u kulturu *in vitro* 1995. godine, biljke su sterilizirane etanolom i živinim kloridom postupkom po Krajnciću i Devidéu (1980) i dalje uzgajane u akseničnim uvjetima. Za dugotrajnu kultivaciju vodene leće korištena je modificirana Pirson-Seidel (PS) hranjiva podloga (Pirson i Seidel 1950), a za eksperimentalnu analizu hranjiva podloga po Steinbergu (1946), koje su sterilizirane autoklaviranjem pri temperaturi od 120°C i tlaku od 0,15 MPa u trajanju od 20 min. Sastav hranjivih podloga prikazan je u *Tablici 1*. Biljke sam uzgajala na modificiranoj Pirson-Seidel podlozi u uvjetima dugog dana (16h osvjetljenja i 8h tame) na temperaturi $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ uz rasvjetu bijelih fluorescentnih svjetiljki ($90\ \mu\text{Em}^{-2}\ \text{s}^{-1}$) u komori za uzgoj biljaka.

Prije izvođenja pokusa, biljke sam radi bolje adaptacije (predkultivacija) presadila na Steinbergovu podlogu i tijekom dva tjedna uzgajala u uvjetima kontinuiranog osvjetljenja na temperaturi $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ uz rasvjetu bijelih fluorescentnih svjetiljki ($90\ \mu\text{Em}^{-2}\ \text{s}^{-1}$) u klima-komori. Za izvođenje pokusa, pojedinačne zdrave kolonije s 10 listića (praćenje rasta – Erlenmeyerove tikvice od 100 mL sa po 60 mL hranjive podloge) ili veći broj kolonija (određivanje biokemijskih pokazatelja – Erlenmeyerove tikvice od 300 mL sa po 130 mL hranjive podloge) presadila sam na hranjive podloge po Steinbergu koje su sadržavale nAg veličine manje od 100 nm (Sigma-Aldrich) ili AgNO_3 (Sigma-Aldrich) u koncentracijama 0, 0.5, 1, 2, 5, 10 i 25 mg/L. Tijekom jednotjedne kultivacije za Lemna-test, biljke su također uzgajane u uvjetima kontinuiranog osvjetljenja na temperaturi $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ uz rasvjetu bijelih fluorescentnih svjetiljki ($90\ \mu\text{Em}^{-2}\ \text{s}^{-1}$) u komori za rast biljaka. Uzorke biljnog tkiva za određivanje sadržaja pojedinih elemenata i biokemijskih pokazatelja uzimala sam iz svih tikvica nakon tjedan dana pokusa.



Slika 4. Vodena leća (*Lemna minor* L.) (foto: S.Radić)

Tablica 1. Sastav hranjivih podloga po Pirsonu i Seidelu (1950) i Steinbergu (1946).

Pirson i Seidel			Steinberg		
MAKROELEMENTI	mg/L	mmol/L	MAKROELEMENTI	mg/L	mmol/L
KNO ₃	400	3,95	KNO ₃	350	3,460
KH ₂ PO ₄	200	1,47	KH ₂ PO ₄	90	0,660
			K ₂ HPO ₄	12,6	0,072
MgSO ₄ x 7H ₂ O	300	1,21	MgSO ₄ x 7H ₂ O	100	0,410
CaCl ₂ x 2H ₂ O	804	5,46	Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O	295	1,250
MIKROELEMENTI	µg/L	µmol/L	MIKROELEMENTI	µg/L	µmol/L
MnCl ₂ x 4H ₂ O	300	1,50	MnCl ₂ x 4H ₂ O	180	0,91
H ₃ BO ₃	500	8,10	H ₃ BO ₃	120	1,94
Na ₂ -EDTA x 2H ₂ O	1860	4,99	Na ₂ -EDTA x 2H ₂ O	1500	4,03
Željezni citrat	5000	20,00	FeCl ₃ x 6H ₂ O	760	2,81
			Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	44	0,18
			ZnSO ₄ x 7H ₂ O	180	0,63
ORGANSKI DODACI	g/L	mmol/L			
Saharoza	10,0	29,20			
Asparagin	0,1	0,66			

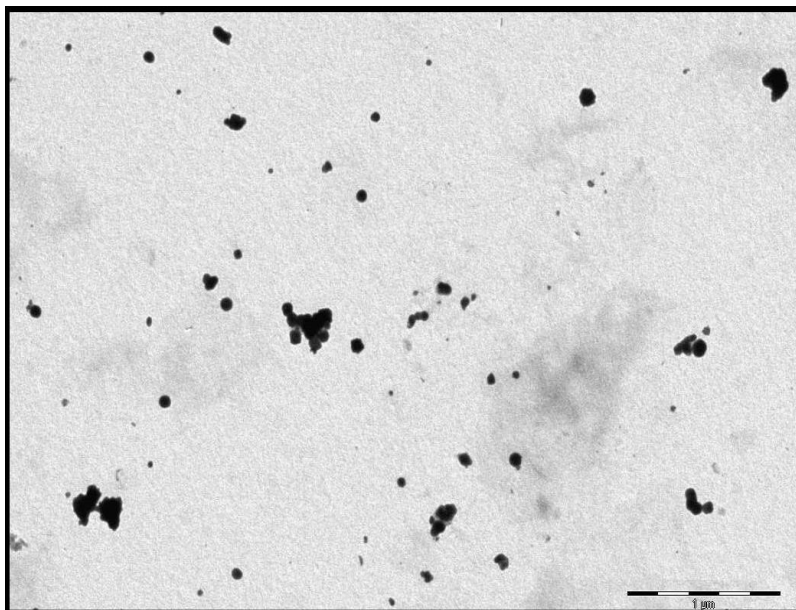
3.2. METODE

3.2.1. Metode karakterizacije nAg

U ovom istraživanju korištene su nAg s omotačem od PVP-a prosječne veličine 40 ± 10 nm (Sigma Aldrich, USA). AgNO_3 (iAg) također je nabavljen od tvrtke Sigma-Aldrich. Matične otopine nAg i AgNO_3 su pripremljene i držane u mraku te neposredno prije svih mjerenja sonificirane tijekom 30 min u ultrazvučnoj kupelji (35 kHz, 360 W) te zatim razrijeđene na eksperimentalne koncentracije u hranjivoj podlozi po Steinbergu (Steinberg, 1946).

Morfologija nAg napravljena je primjenom TEM-a, a za analizu uzorci su pripremljeni stavljanjem kapi suspenzije uzorka na bakrenu rešetku obloženu Formavarom. Uzorak je osušen na zraku na sobnoj temperaturi. Mikroskop (FEI Morgagni 268D, Nizozemska) je radio u svjetlom polju pri naponu ubrzanja od 70 kV.

Veličina čestica i distribucija veličine određeni su korištenjem instrumenta Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) opremljenog zelenim laserom (532 nm) metodom DLS. Ova metoda mjeri Brownovo gibanje čestica i povezuje ga s veličinom čestica putem Stokes-Einstein-ove jednadžbe. Intenzitet raspršenog svjetla detektiran je pod kutem od 173° . Hidrodinamički promjer (dH) i distribucija veličina nanočestica dobivene su iz distribucije volumena i intenziteta da bi se usporedile dobivene vrijednosti iz te dvije distribucije. Rezultati su prikazani kao prosječna vrijednost 6 mjerenja. Mjerenja su provedena na 25°C , a podaci su obrađeni u Zetasizer softwareu 6.32 (Malvern Instruments Ltd., 1997).



Slika 5. nAg stabilizirane polivinilpirolidonom. Fotografije su snimljene transmisijskim elektronskim mikroskopom. Veličina bara = 1 μm (Foto: P. Peharec Štefanić).

Površinski naboj nanočestica određen je mjerenjem elektroforetskog ζ -potencijala, također korištenjem instrumenta Zetasizer Nano ZS. ELS je analitička metoda koja mjeri elektroforetsku pokretljivost suspenzije čestica ili makromolekula. Rezultati su prikazani kao prosječna vrijednost 3 mjerenja. Mjerenja su provedena na 25°C i podaci su obrađeni u Zetasizer softwareu 6.32 (Malvern Instruments Ltd., 1997).

Suspenzije nAg korištene u karakterizaciji čestica su pripremljene u hranjivoj podlozi po Steinbergu u koncentracijama od 1 i 10 mg/L.

3.2.2. Određivanje Ag metodom ICP-MS

Uzorci eksperimentalnih podloga za analizu uzeti su u duplikatima u plastične posudice od 50 mL te su stabilizirani dodatkom 0,25 mL koncentrirane HNO_3 tako da je $\text{pH} < 2$. Na taj način stabilizirani uzorci analizirani su tehnikom spektrometrije masa s induktivno spregnutom plazmom (eng. *inductively coupled plasma mass spectrometry*, ICP-MS).

Uzorci biljnog materijala su posušeni na 60°C do konstantne mase (24 h). Svaki uzorak (~0,05 g) biljnog materijala je razoren metodom mokre digestije u 6 mL koncentrirane HNO_3 u mikrovalnom sustavu za razaranje uzoraka Anton Paar Multiwave 3000 opremljenom rotorom XFS-100 i teflonskim posudama volumena 100 mL. Parametri digestije primijenjeni na mikrovalnom sustavu bili su: $P_{\text{max}} = 1200 \text{ W}$,

$t_{\max} = 200\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p_{\max} = 60\text{ bar}$; τ (postupno zagrijavanje) = 10 min, τ (zagrijavanje pri maksimalnim t , p) = 15 min, τ (hlađenje) = 20 min. Nakon provedene digestije, dobivene otopine su kvantitativno prenesene u polipropilenske odmjerne tikvice i razrijeđene ultračistom vodom do 50 mL i analizirane tehnikom ICP-MS. Zajedno sa serijom od 6 uzoraka, tretirane su po 2 slijepe probe (HNO_3).

Određivanje sadržaja Ag u priređenim uzorcima izvedeno je tehnikom ICP-MS u kojoj se induktivno spregnuta plazma koristi kao ionizacijski izvor, a detekcija se vrši spektrometrijom masa. Fino raspršeni uzorak iz raspršivača (*nebulizer*) ulazi u struji argona u baklju (*torch*) gdje se razvija temperatura do 6000°C . Na toj temperaturi, dolazi do atomizacije i ionizacije plina i svega u njemu. Kvadrupolni spektrometar masa je zapravo magnetni maseni filter napravljen od 4 šipke tako da kroz njega mogu proći samo ioni od interesa, određene mase i naboja. Ioni zatim dolaze do detektora koji stvara pojačani signal procesuiran putem elektronike. Kvadrupol i detektor rade u području visokog vakuma koji stvara turbomolekularna pumpa. Koncentracija elementa u uzorku određuje se uspoređivanjem intenziteta uzorka s intenzitetom kalibracijskih otopina.

Uređaj je podešen na stabilne uvjete rada te je obavljena vanjska kalibracija izradom kalibracijskog pravca za očekivano koncentracijsko područje metala kojeg želimo determinirati koristeći slijepu probu i minimalno 4 kalibracijske otopine. Kalibracijske otopine priređene su razrjeđivanjem komercijalnog multielementnog standarda (*Perkin Elmer Pure plus, multi-element calibration standard 3*). Kalibracija je provjerena certificiranim referentnim materijalom (*Perkin Elmer pure, initial calibration verification standard*). Sve standardne otopine i slijepa proba stabilizirane su dodatkom koncentrirane HNO_3 tako da je konc. (HNO_3) = 5% w/w. Svaki uzorak analiziran je u najmanje 3 replike.

3.2.3. Određivanje makro- i mikroelemenata metodom FAAS

Sadržaj K, Ca, Mg i Fe u vodenoj leći određen je plamenom atomskom apsorpcijskom spektrometrijom (eng. *flame atomic absorption spectrometry*, FAAS). Metoda obuhvaća usisavanje uzorka zajedno sa strujom plina u plamen temperature 2300°C , pri čemu uzorak prelazi u plinovito stanje a kemijski spojevi se razaraju do atomske razine. Atomi u plinovitom stanju apsorbiraju svjetlost određene valne duljine pri čemu prelaze u pobuđeno stanje. Prilikom apsorpcije dolazi do smanjenja intenziteta svjetlosti koji je direktno proporcionalan koncentraciji atoma u plinovitom

stanju tj. u uzorku koji se analizira. U metodi FAAS kao izvor svjetlosti koriste se šuplje katodne lampe HCL (eng. *hollow cathode lamp*), koje isijavaju svjetlost određene valne duljine karakteristične za element koji se određuje. Osim na principu apsorpcije, koncentracija atoma određenog elementa metodom FAAS može se odrediti i na temelju emisijske linije koje neki atom proizvodi pri silasku iz pobuđenog u niže energetska stanje. Metoda je visoko specifična jer se spektralne linije atoma nikada ne preklapaju, a suvremeni monokromatori mogu lako razdvojiti čak i vrlo bliske spektralne linije. Sadržaj ukupnog dušika (N) i fosfora (P) u supstratu i listovima određen je spektrofotometrijski.

3.2.3.1. Priprema uzoraka i određivanje sadržaja K, Ca, Mg i Fe

Uzorci posušeni do konstantne mase (80°C, 48h) su razarani u smjesi koncentrirane HNO₃ i koncentrirane HClO₃ (omjer 1:3) u mikrovalnom uređaju za pripremu uzoraka Anton Paar Multiwave 3000 s rotorom XFS-100 i teflonskim posudama volumena 100 mL. Uvjeti su bili isti kao u poglavlju 3.2.2. Nakon provedene digestije, dobivene otopine su kvantitativno prenesene u polipropilenske odmjerne tikvice i razrijeđene ultračistom vodom do 50 mL i analizirane metodom FAAS. Zajedno sa serijom od 6 uzoraka, tretirane su po 2 slijepe probe (HNO₃).

Određivanje je izvedeno metodom FAAS na instrumentu Perkin Elmer AAnalyst 800 uz korekciju deuterijevom lampom. Uvjeti su bili jednaki kao i u poglavlju 3.2.2.

Željezo (Fe)

Instrumentalni uvjeti:

valna duljina emisijske linije: 248,3 nm

plamen: zrak:acetilen (17 L/min:2 L/min)

Natrij (Na)

Instrumentalni uvjeti:

valna duljina emisijske linije: 589 nm

plamen: zrak:acetilen (17 L/min:2 L/min)

Kalij (K)

Instrumentalni uvjeti:

valna duljina emisijske linije: 766,5 nm

plamen: zrak:acetilen (17 L/min:2 L/min)

Magnezij (Mg)

Instrumentalni uvjeti:

valna duljina emisijske linije: 285,2 nm

plamen: zrak:acetilen (16 L/min:7,8 L/min)

Uvjeti zajednički za sve navedene elemente su: slit: 0,2 nm; kalibracijske otopine: 0,1 0,5,1 µg/mL; program za kontrolu instrumenta i obradu podataka: Perkin Elmer AA Winlab.

3.2.3.2 Priprema uzoraka i određivanje sadržaja N i P

Uzorci posušeni do konstantne mase (80°C, 48h) razoreni su kuhanjem u smjesi koncentrirane sumporne i koncentrirane HCl uz dodatak H₂O₂ te su potom razrijeđeni do određenog volumena.

Dušik (N): Određivanje se vrši salicilatnom metodom na UV/Vis spektrofotometru Perkin Elmer Lambda 25.

Instrumentalni uvjeti: valna duljina 655 nm

Reagensi: salicilat-citratna otopina i Na-dikloroisocijanurat

Mjerenje apsorbancije nakon 2h od dodatka reagensa.

Kalibracijski standardi: 0,01, 0,05, 0,1, 0,5 i 1 µg/mL

Fosfor (P): Određivanje se vrši metodom s kiselim molibdatom na UV/Vis spektrofotometru Perkin Elmer Lambda 25.

Instrumentalni uvjeti: valna duljina 880 nm

Reagensi: Askorbinska kiselina i kiseli molibdat

Mjerenje apsorbancije nakon 15 min od dodatka reagensa.

Kalibracijski standardi: 0,01, 0,05, 0,1, 0,5 i 1 µg/mL

3.2.4. Lemna-test (ISO 20079) - stopa rasta

Rast biljaka određivala sam praćenjem 2 parametra: broj frondova tj. listića i masa svježe tvari nakon tjedan dana (ISO/DIS 20079 2004) izlaganja nAg ili iAg. Pri tome sam brojila svaki pa i najmanji listić vidljiv golim okom. Dobivene podatke uvrstila sam u slijedeći izraz:

$$\text{Stopa rasta} = \frac{\ln x t_2 - \ln x t_1}{t_2 - t_1}$$

$x t_1$ – vrijednost promatranog parametra u vremenu t_1 (dani)

$x t_2$ – vrijednost promatranog parametra u vremenu t_2 (dani)

$t_2 - t_1$ – vremenski period između dana uzimanja uzorka i početnog dana

Rezultate sam prikazala kao srednju vrijednost stope rasta broja biljaka ili mase svježe tvari u 6 Erlenmeyerovih tikvica $\pm$ standardna devijacija.

3.2.5. Mjerenje fluorescencije klorofila metodom saturacijskog pulsa

Fluorescencija klorofila *in situ* mjerena je metodom saturacijskog pulsa pomoću sustava za mjerenje fluorescencije „Qubit“. Metoda saturacijskog pulsa (Schreiber i sur. 1994) temelji se na primjeni dovoljno jakog (saturacijskog) svjetlosnog impulsa uslijed kojeg dolazi do potpune redukcije vezanog plastokinona (Q_A). Na taj način je fotokemijsko gašenje qP (eng. *quenching*) fluorescencije zaustavljeno, a preostalo gašenje je nefotokemijsko tj. toplina. Kada su svi plastokinoni potpuno oksidirani, reakcijski centri su potpuno otvoreni, pa elektroni sudjeluju u fotokemijskim reakcijama. Ovo se događa u uvjetima slabog osvjetljenja i tada se mjeri minimalni prinos fluorescencije (F_0). Maksimalni prinos fluorescencije (F_m) mjeri se u uvjetima jakog osvjetljenja kada su plastokinoni potpuno reducirani i reakcijski centri zatvoreni. Razlika između maksimalne i minimalne fluorescencije naziva se varijabilnom fluorescencijom (F_v). Iz tih podataka se računa optimalni prinos fotosustava II (eng. *photosystem II*, PSII), F_v/F_m . Ovaj omjer predstavlja mjeru potencijalnog maksimalnog prinosa kvanta PSII, a za većinu biljnih vrsta ima vrijednost oko 0,83. Uslijed osvjetljenja, a primjenom impulsa saturacijske svjetlosti mijenja se vrijednost maksimalne fluorescencije (F'_m). Razlika $F_m - F'_m$ predstavlja nefotokemijsko, a razlika $F'_m - F$ fotokemijsko gašenje fluorescencije. F je prinos fluorescencije uzorka

prilagođen određenoj količini svjetlosti. Iz ovih podataka računa se efektivni prinos PSII ($\Delta F/F'm$), te se može izračunati vrijednost rel. ETR (eng. *relative electron transport rate*) koja opisuje funkcioniranje transportnog lanca elektrona i vrijednost nefotokemijskog gašenja NPQ (eng. *non-photochemical quenching*) koja opisuje nefotokemijsko gašenje fluorescencije:

$$\begin{aligned}(F'm - F) / F'm &= \Delta F/F'm \\ \text{ETR} &= \Delta F/F'm \cdot \text{PPFD} \cdot 0,5 \\ \text{NPQ} &= (F_m - F'm) / F'm\end{aligned}$$

PPFD (eng. *photosynthetically active photon flux density*) predstavlja gustoću fotosintetski aktivnog toka fotona, a faktor 0,5 uzima se zbog pretpostavke o jednakoj eksitaciji PSII i PSI. Prije samog mjerenja, vodena leća je držana 30 min u potpunoj tami. Listići (5 listića) prilagođeni uvjetima tame korišteni su za mjerenje vrijednosti F_0 i F_m . Nakon toga, listići su osvijetljeni količinom svjetlosti od $100 \mu\text{mol}_{\text{FOTONA}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ tijekom 15 min, odnosno dok se vrijednosti F i $F'm$ nisu ustalile. Pretposljednje mjerenje za tu količinu aplicirane svjetlosti uzeto je kao relevantno za izračun vrijednosti $\Delta F/F'm$, qP , NPQ i relativne brzine prijenosa elektrona. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost 3 replike za pojedini parametar $\pm$ standardna devijacija.

3.2.6. Određivanje sadržaja pigmenata

Sadržaj pigmenata odredila sam spektrofotometrijski (UV/VIS spektrofotometar Specord, Analytik Jena). Uzorke svježeg tkiva (30 mg) ekstrahirala sam u 80%-tnom hladnom acetonu (1,5 mL) i centrifugirala (5000 g / 10 min) u rotoru 12154H visokookretajne centrifuge (Sigma 3K18) pri temperaturi $+4^\circ\text{C}$. Nakon toga sam mjerila i očitavala apsorbancije za svaki uzorak na tri valne duljine: 663, 646 i 470 nm (Arnon 1949). Sadržaj fotosintetskih pigmenata određen je prema Lichtenthaleru (1987). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost 6 replika $\pm$ standardna devijacija i izraženi u odnosu na kontrolu.

3.2.7. Određivanje sadržaja superoksidnog radikala *in situ*

Za mjerenje količine ROS u citosolu (Sunohara i Matsumoto, 2008) upotrijebljena je boja dihidroetidij (DHE; Sigma-Aldrich). Boja je prvo otopljena u 50 mM metanolu, a pripremljena otopina razrijeđena u vodi do konačne koncentracije od

10 μM . Listići vodene leće inkubirani su u otopini boje u periodu od 30 min. Boja DHE ulazi u stanicu gdje se pomoću ROS oksidira u fluorescentni etidij. Dokazano je da se DHE primarno veže na SOD (Becker i sur., 1999). Preparati su prekriveni pokrovnicom te pregledani fluorescencijskim mikroskopom Olympus BX51 (filter 03; ekscitacija 565 nm, emisija 580 nm) spojenim na računalo. Sadržaj ROS u pojedinoj stanici određen je pomoću računalnog programa Lucida 6.0 Kinetic Imaging Ltd. Analizirano je oko 50 stanica po tretmanu (prosječno dva preparata po tretmanu) te je pokus ponovljen dva puta. Stanice su snimljene digitalnom kamerom pri povećanju objektiva 20x.

3.2.8. Dokazivanje GSH *in situ*

Reducirani GSH u stanicama vodene leće *in situ* (u citosolu) određen je pomoću boje monoklorobimana (MCB, Sigma-Aldrich) koja formira fluorescentni adukt s GSH u reakciji koju katalizira GST (Fricker i Meyer, 2001). Boja je prvo otopljena u 44 mM koncentraciji, a pripremljena otopina razrijeđena u vodi do konačne koncentracije od 50 μM . Vodena leća je tijekom 4h inkubirana u otopini boje. Preparati su prekriveni pokrovnicom te pregledani fluorescencijskim mikroskopom Olympus BX51 (filter 02; ekscitacija 400 nm, emisija 420 nm) spojenim na računalo. Sadržaj MCB-GSH adukata u pojedinoj stanici određen je pomoću računalnog programa Lucida 6.0 Kinetic Imaging Ltd. Analizirano je oko 50 stanica po tretmanu (prosječno 2 preparata po tretmanu) te je pokus ponovljen 2 puta. Stanice su snimljene digitalnom kamerom pri povećanja objektiva 20x.

3.2.9. Određivanje sadržaja prolina

Po 100 mg vodene leće homogenizirala sam u 1,5 mL 3% sulfosalicilne kiseline u hladnom tarioniku (Bates i sur., 1973). Ekstrahirani biljni materijal centrifugirala sam u rotoru 12154H visokookretajne centrifuge (Sigma 3K18) pri temperaturi 4°C, na 2000 g 6 minuta. Supernatant sam prelila u staklene epruvete i dodala mu po 0,75 mL ledene octene kiseline i 0,75 mL prethodno pripremljenog kiselog ninhidrina (1,25 g ninhidrina zagrijavano je u 30 mL ledene octene kiseline s dodatkom 20 mL 6 M fosfatne kiseline). Pripremljenu smjesu inkubirala sam u sušioniku 60 min na temperaturi od 100°C. Nakon isteka inkubacije, reakciju sam zaustavila stavljanjem uzoraka u ledenu kupelj. Ohlađenim uzorcima dodala sam po 1,5 mL toluena i pomiješala smjesu kako bi se dobio kromofor u gornjoj, toluenskoj fazi. Zatim je

mjerena apsorbancija crvenkastog kromofora (koja odgovara sadržaju prolina) na 520 nm.

Sadržaj prolina određen je iz baždarne krivulje dobivene s poznatim koncentracijama prolina ($0,231 - 3,23 \times 10^{-6}$ M) i izračunat prema Lambert-Beerovom zakonu. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost 6 replika $\pm$ standardna devijacija i izraženi u odnosu na kontrolu.

3.2.10. Određivanje sadržaja MDA u vodenoj leći

Kako bih odredila sadržaj MDA, krajnjeg produkta lipidne peroksidacije, pomiješala sam 400 μ L uzorka s 1500 μ L reakcijske smjese (0,25% tiobarbiturna kiselina (TBA) otopljena u 10%-tnoj trikloroctenoj kiselini (TCA)). Kao slijepu probu koristila sam reakcijsku smjesu. Uzorke i slijepu probu prelila sam u staklene semimikroeprovete te sam ih zagrijavała u sušioniku 30 min na 95°C. Zatim sam uzorke naglo ohladila na ledu te centrifugirala 10 min na 10000 g. Nakon toga očitavala sam apsorbancije uzoraka na 532 te na 600 nm zbog korekcije na nespecifično замуćenje (Heath i Packer 1968). Tijekom zagrijavanja reakcijske smjese niske pH vrijednosti dolazi do raspadanja lipidnih peroksida nastalih kao posljedica stresa, pri čemu nastaje MDA. Jedna molekula MDA reagira s 2 molekule TBA, a time se stvara crvenkasti kromogen kojemu se mjeri apsorbancija. Sadržaj lipidnih peroksida izražen je kao MDA u jedinicama nmol po gramu svježje tvari uz ekstinkcijski koeficijent $\epsilon_{532} = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost 6 replika $\pm$ standardna devijacija.

3.2.11. Određivanje sadržaja karbonila u vodenoj leći

Uzorke vodene leće mase 100 mg homogenizirala sam u 1 mL 50 mM kalij fosfatnog pufera (pH 7,0) koji sadrži 0,1 mM EDTA. Homogenat sam centrifugirala 20 min na 22000 g te sam 200 μ L uzorka (supernatanta) koji sadrži najmanje 0,5 mg/mL proteina pomiješala s 300 μ L dinitrofenilhidrazina (DNPH) u 2 M HCl za cijepanje proteina. Kao slijepu probu koristila sam alikvot istog uzorka (200 μ L) pomiješan samo s 2 M HCl (300 μ L). Pripremljene uzorke inkubirala sam 1h na sobnoj temperaturi uz miješanje svakih 15 min. Nakon inkubacije, slijedila je precipitacija proteina s 500 μ L 10% TCA, hlađenje uzoraka par min na -20°C te centrifugiranje 10 min na 12000 g. Dobiveni talog sam ispirala u otopini etanol/etilacetat u omjeru 1:1 (3 x 500 μ L), kako

bi se uklonio nevezani reagens. Zatim sam talog otapala u 1 mL 6 M uree u 20 mM kalij-fosfatnom puferu (pH 2,4) u ultrazvučnoj kupelji oko 30 min. Sadržaj karbonila, koji se temelji na reakciji karbonilnih skupina s DNPH, odredila sam spektrofotometrijskim mjerenjem otopljenih uzoraka na valnoj duljini od 370 nm (Levine i sur. 1990). Količinu nastalih karbonila izrazila sam u nmol po gramu svježe tvari i miligramu proteina koristeći ekstinkcijski koeficijent $\epsilon_{370} = 22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost 6 replika $\pm$ standardna devijacija i izraženi u odnosu na kontrolu.

3.2.12. Ekstrakcija topivih proteina i aktivnost antioksidacijskih enzima

Nakon 7 dana pokusa, uzorke vodene leće (po 100 mg) homogenizirala sam u 50 mM kalij fosfatnom puferu (pH 7,0) uz dodatak 0,1 mM EDTA i netopivog PVP-a te zatim centrifugirala na 25000 g 30 min u rotoru 12154H visokookretajne centrifuge (Sigma 3K18) pri temperaturi +4°C. Dio dobivenog supernatanta iskorišten je za određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu (1976), a drugi dio za određivanje aktivnosti enzima. Metoda po Bradfordu temelji se na mjerenju apsorbancije smjese proteinskog ekstrakta i reagensa pri valnoj duljini od 595 nm. Koncentracija proteina u pojedinim uzorcima određena je očitavanjem baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije otopina goveđeg serumskog albumina poznatih koncentracija (od 0,1 do 0,8 mg/mL).

Aktivnost enzima SOD određena je spektrofotometrijski prema metodi Giannopolitisa i Riesa (1977). Reakcijska otopina je sadržavala 50 mM kalij fosfatni pufer (pH 7,8), 13 mM metionin, 75 μM kloridnu sol nitrotetrazolijevog plavila (NBT), 0,1 mM EDTA, 2 μM riboflavin te ekstrakcijski pufer ili enzimsku otopinu. Na 890 μL reakcijske otopine dodano je 100 μL ekstrakcijskog pufera (kontrola), dok je proba sadržavala isti volumen enzimске otopine koja je dobivena miješanjem pufera i određenih volumena originalnih proteinskih ekstrakata (10, 25 i 50 μL). Riboflavin (10 μL) je dodan u reakcijsku smjesu neposredno prije mjerenja. Uzorci su promiješani i stavljeni ispod izvora svjetlosti (15 W) u zamračenom prostoru. Reakcija se pokreće uključivanjem svjetlosti (fotoreaktivni riboflavin inicira stvaranje SOD) te se nakon 10 min mjerenja svjetlost ugasi. NBT se reducira u prisutnosti O_2 u netopivi plavo obojeni formazan koji pokazuje apsorpcijski maksimum pri valnoj duljini od 560 nm. Postotak inhibicije mjeri se prema sljedećoj formuli: % inhibicije = (kontrola A_{560} – uzorak A_{560}) /

kontrola A₅₆₀. Jedna jedinica aktivnosti enzima SOD izražava se kao količina enzima koja uzrokuje 50 % inhibicije redukcije NBT-a pri 560 nm u prisutnosti riboflavina na svjetlosti. Aktivnost SOD izražena je kao jedinica aktivnosti (1 U) po miligramu proteina (U/mg proteina). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost 6 replika ± standardna devijacija i izraženi u odnosu na kontrolu.

Reakcijska otopina za enzim KAT sadržavala je 50 mM kalij fosfatni pufer (pH 7), 10 mM H₂O₂ (Aebi 1984) i 30 µL proteinskog ekstrakta te je zbog razgradnje H₂O₂ mjeran pad apsorbancije svakih 10s tijekom 2 min pri valnoj duljini od 240 nm. Aktivnost KAT izrazila sam kao količinu potrošenog H₂O₂ u µmol/min (jedna jedinica, 1 U) po miligramu proteina (U/mg proteina), a izračunala sam je uz korištenje odgovarajućeg ekstinkcijskog koeficijenta ($\epsilon_{240} = 40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Rezultate sam prikazala kao srednju vrijednost 6 replika ± standardna devijacija.

Reakcijska otopina za određivanje aktivnosti GPOD sadržavala je 50 mM kalij fosfatnog pufera (pH 7) 18 mM gvajakol i 5 mM H₂O₂, koji sam u reakcijsku smjesu dodavala neposredno prije mjerenja. Nakon dodavanja 30 µL proteinskog ekstrakta mjerila sam povećanje apsorbancije uslijed stvaranja tetragvajakola svakih 15s tijekom 2,5 min pri valnoj duljini od 470 nm (Chance i Maehly 1955). Aktivnost GPOD sam izrazila kao količinu nastalih produkata u µmolima po min (jedna jedinica, 1 U) po miligramu proteina (U/mg proteina) koristeći ekstinkcijski koeficijent ($\epsilon_{470} = 26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) za gvajakol. Rezultate sam prikazala kao srednju vrijednost 6 replika ± standardna devijacija.

Reakcijska otopina za određivanje aktivnosti enzima APOD sadržavala je 50 mM kalij fosfatni pufer (pH 7), 0,2 mM askorbinsku kiselinu, 0,1 mM EDTA, 12 mM H₂O₂ (Nakano i Asada 1981) i 150 µL proteinskog ekstrakta. 10 µL H₂O₂ dodavala sam u reakcijsku smjesu neposredno prije mjerenja te sam pratila pad apsorbancije svaku s tijekom 15s zbog oksidacije askorbinske kiseline. Aktivnost APOD sam izračunala na isti način kao i aktivnost GPOD (U/mg proteina), no uz odgovarajući ekstinkcijski koeficijent ($\epsilon_{290} = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Rezultate sam prikazala kao srednju vrijednost 6 replika ± standardna devijacija.

Reakcijska otopina za određivanje aktivnosti GST sadržavala je 100 mM kalij fosfatni pufer (pH 6,5), 10 mM reducirani glutation, 1 mM EDTA, 100 mM 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) i 50 µL proteinskog ekstrakta (Habig i Jakoby 1981). Pratila sam porast apsorbancije zbog redukcije supstrata CDBN pomoću SH-grupe od glutationa svakih 15s tijekom 2,5 min pri valnoj duljini od 340 nm. Aktivnost GST je

izračunata uz odgovarajući ekstinkcijski koeficijent ($\epsilon_{340} = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost 6 replika $\pm$ standardna devijacija.

3.2.13. Statistička obrada podataka

Statistička analiza podataka i njihov grafički prikaz proveden je korištenjem računalnog programa STATISTICA 12.0 (Stat Soft Inc., SAD) i Excel programa Microsoft Office paketa.

Od mjera centralne tendencije izračunata je aritmetička sredina, a od mjera varijabilnosti izračunata standardna devijacija. Svaki brojčani podatak prikazan grafikonom ili tablicom aritmetička je sredina određenog broja replika. Statistička značajnost između kontrolnog uzorka i testnih uzoraka kao i između samih testnih uzoraka izračunata je neparametrijskim testovima - jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) te primjenom "Duncan's New Multiple Range Test" tj. post hoc testa višestrukih usporedbi. Statistički značajnim smatrani su rezultati koji su se razlikovali na razini $p \leq 0,05$. Također, izračunat je Pearsonov koeficijent korelacije za mjerene parametre.

4. REZULTATI

4.1. KARAKTERIZACIJA nAg

Na *Slici 5.* (prikazana u poglavlju 3.2.1., Materijali i metode) prikazana je morfologija i ultrastruktura nAg stabiliziranih omotačem PVP. Vidljivo je da su čestice pretežito okruglog oblika i da stvaraju male aglomerate. Prosječna veličina čestica iznosila je $45,78 \pm 7,46$ nm (srednja vrijednost $\pm$ SD; $n=20$).

U *Tablici 2.* prikazani su rezultati hidrodinamičkog promjera (d_h) i površinskog naboja čestica (ζ -potencijala) pri koncentracijama nAg 1 i 10 mg/L.

Tablica 2. Hidrodinamički promjer (d_h) i zeta potencijal (ζ) nAg. Rezultati mjerenja d_h izraženi su kao raspodjela po volumenu.

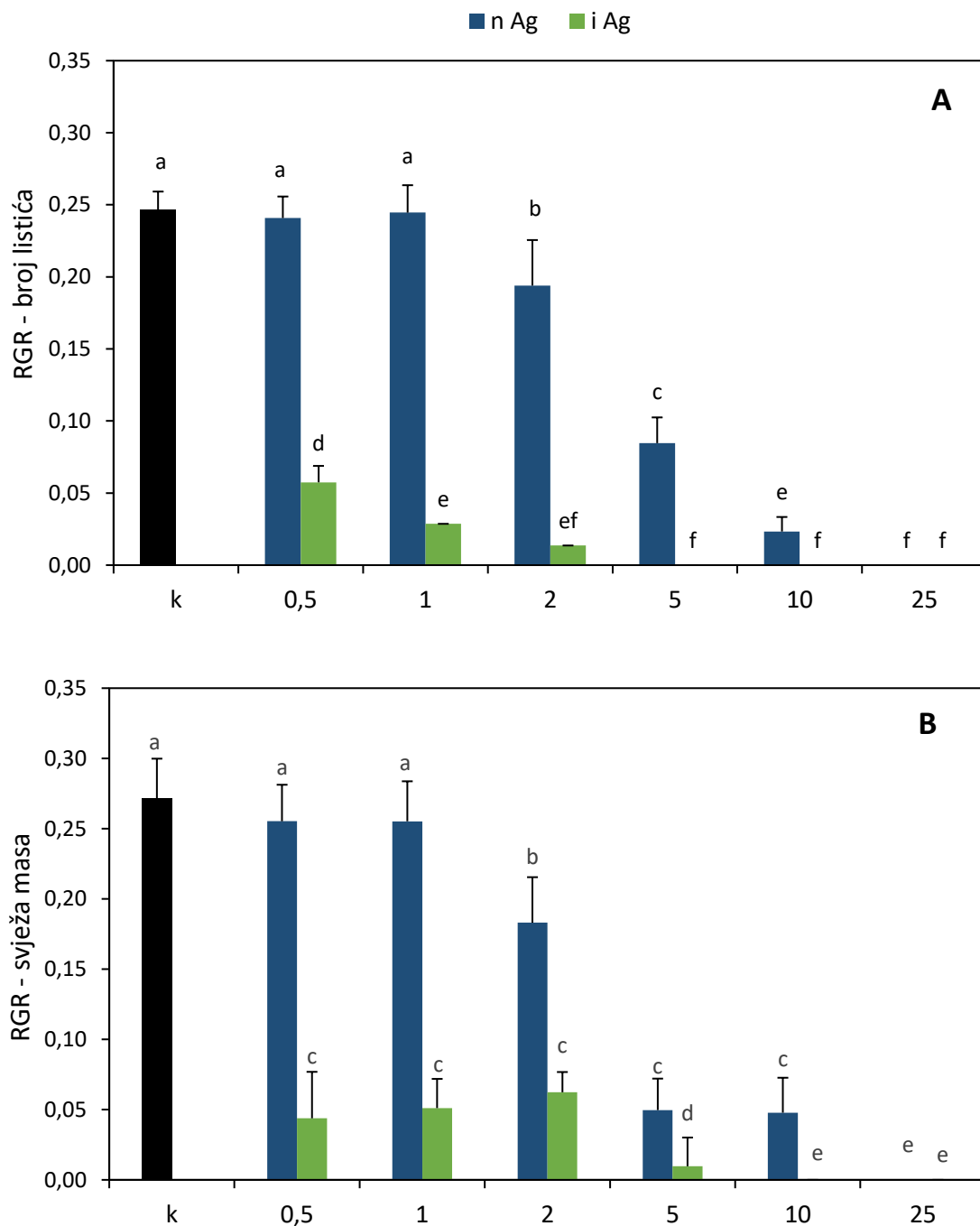
uzorak	Pik I		Pik II		ζ / mV
	d_h / nm	vol. %	d_h / nm	vol. %	
nAg 1 mg/L	$59,2 \pm 10,0$	$12,1 \pm 11,1$	$266,3 \pm 15,2$	$87,9 \pm 6,9$	$-7,75 \pm 0,4$
nAg 10 mg/L	$130,4 \pm 7,7$	$8,9 \pm 12,3$	$603,1 \pm 83,7$	$91,1 \pm 16,4$	$-12,3 \pm 3,4$

Rezultati dobiveni metodom DLS pokazuju bimodalnu raspodjelu veličine nAg pri čemu su dominantne veće čestice, a rezultati dobiveni metodom ELS pokazuju da su nAg slabije negativne.

4.2. STOPA RASTA VODENE LEĆE

Na *Slici 6.* prikazana je stopa rasta biljaka izražena po broju listića (A) i po masi svježe tvari (B) nakon 7 dana pokusa. nAg u koncentracijama 2-25 mg/L izazvale su statistički značajno smanjenje stope rasta u odnosu na kontrolu. Najviša koncentracija nAg uzrokovala je potpunu inhibiciju stope rasta neovisno o praćenom parametru. Stopa rasta vodene leće izložene najnižim koncentracijama nAg (0,5 i 1 mg/L) nije se bitno razlikovala od kontrolnih vrijednosti.

U usporedbi s nAg, puno jaču inhibiciju rasta, kod oba praćena parametra, uzrokovalo je iAg tj. AgNO_3 . iAg u koncentracijama od 10 i 25 mg/L izazvalo je potpunu inhibiciju rasta neovisno o praćenom parametru, a niže koncentracije (0,5-5 mg/L) uzrokovale su smanjenje stope rasta, u oba parametra, od 70-95 % u odnosu na odgovarajuću koncentraciju nAg.

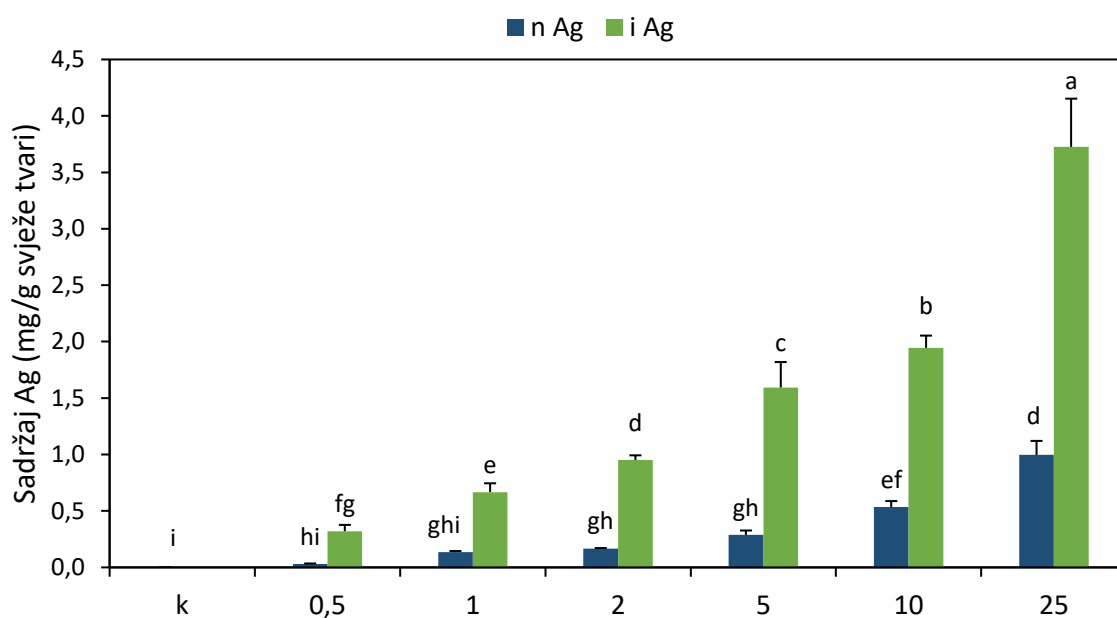


Slika 6. Relativna stopa rasta RGR (eng. *relative growth rate*) izražena po broju listića (A) i masi svježje (B) tvori vodene leće uzgajane 7 dana na podlogama s dodatkom nanočestica srebra (nAg) ili srebrovog nitrata (iAg) u koncentracijama: 0,5; 1; 2; 5; 10 i 25 mg/L ili bez njihovog dodatka – kontrolne biljke (k). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju od kontrole ($p < 0,05$).

4.3. SADRŽAJ Ag U VODENOJ LEĆI

Sadržaj Ag u vodenoj leći pokazao je linearan porast s povećanjem koncentracije nAg u podlogama (*Slika 7.*). Sadržaj Ag u biljkama izloženim najnižoj koncentraciji nAg bio je 30 puta veći u odnosu na kontrolu, dok je u onim izloženim najvećoj koncentraciji nAg taj sadržaj bio oko 100 puta veći u usporedbi s kontrolnim biljkama.

U usporedbi s nAg, vodena leća pokazala je veću sposobnost akumulacije iAg. Također se uočava linearan porast s povećanjem koncentracije iAg u podlogama (*Slika 7.*), pa je sadržaj Ag u vodenoj leći izloženoj najvišoj koncentraciji 300 puta veći u odnosu na biljke izložene najnižoj koncentraciji iAg (0,5 mg/L).



Slika 7. Sadržaj srebra (mg/g suhe tvari) u vodenoj leći nakon 7 dana rasta na podlogama s dodatkom nanočestica srebra (nAg) ili srebrovog nitrata (iAg) u koncentracijama: 0,5; 1; 2; 5; 10 i 25 mg/L ili bez njihovog dodatka – kontrolne biljke (k). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju od kontrole ($p < 0,05$).

4.4. SADRŽAJ MAKRO- I MIKROELEMENATA

Nakon tretmana s nAg uočava se porast sadržaja Ca i Fe u odnosu na kontrolni tretman, pri čemu je porast sadržaja Fe bio značajan pri koncentracijama od 10 i 25 mg/L (*Tablica 3.*). Sadržaj N pri nižim koncentracijama nAg nije se bitno razlikovao od kontrole, a u biljkama izloženim 10 i 25 mg/L bio je statistički značajno smanjen u odnosu na kontrolu. nAg nisu pokazale statistički značajan utjecaj na sadržaj K, Mg i P u vodenoj leći.

Tretman biljaka iAg uzrokovao je statistički značajan porast sadržaja Ca i P u odnosu na kontrolni tretman, posebice zamjetljiv pri višim koncentracijama. Sadržaj Fe u vodenoj leći je pod utjecajem iAg bio bitno povećan u odnosu na kontrolu, izuzev pri dvije najviše koncentracije gdje je bio sličan kontroli. Sadržaj K pokazuje statistički značajan pad u odnosu na kontrolu pri svim koncentracijama iAg, osim pri najnižoj. Sadržaj N i Mg u biljkama nije značajno odstupao od odgovarajućih kontrolnih vrijednosti, pri čemu je jedina iznimka bilo znatno povećanje Mg pri koncentraciji iAg od 2 mg/L (*Tablica 3.*).

Kod uporedbe tretmana istih koncentracija nAg i iAg uočen je značajan porast sadržaja Ca i P kod tretmana s iAg u usporedbi s nAg na svim koncentracijama. Sadržaj Mg, N i Fe je bio sličan kod istih koncentracija tretmana nAg i iAg, dok je sadržaj K bio niži kod tretmana s iAg pri istim koncentracijama u usporedbi s nAg.

Tablica 3. Sadržaj pojedinih makro- (Ca, K, Mg, N i P) i mikroelemenata (Fe) u vodenoj leći nakon 7 dana rasta na podlogama s dodatkom nanočestica srebra (nAg) ili srebrovog nitrata (iAg) u koncentracijama: 0,5; 1; 2; 5; 10 i 25 mg/L ili bez njihovog dodatka – kontrolne biljke (K). Prikazane su srednje vrijednosti $\pm$ standardna devijacija. Vrijednosti unutar pojedinog stupca označene različitim slovima statistički se značajno razlikuju od kontrole ($p < 0,05$).

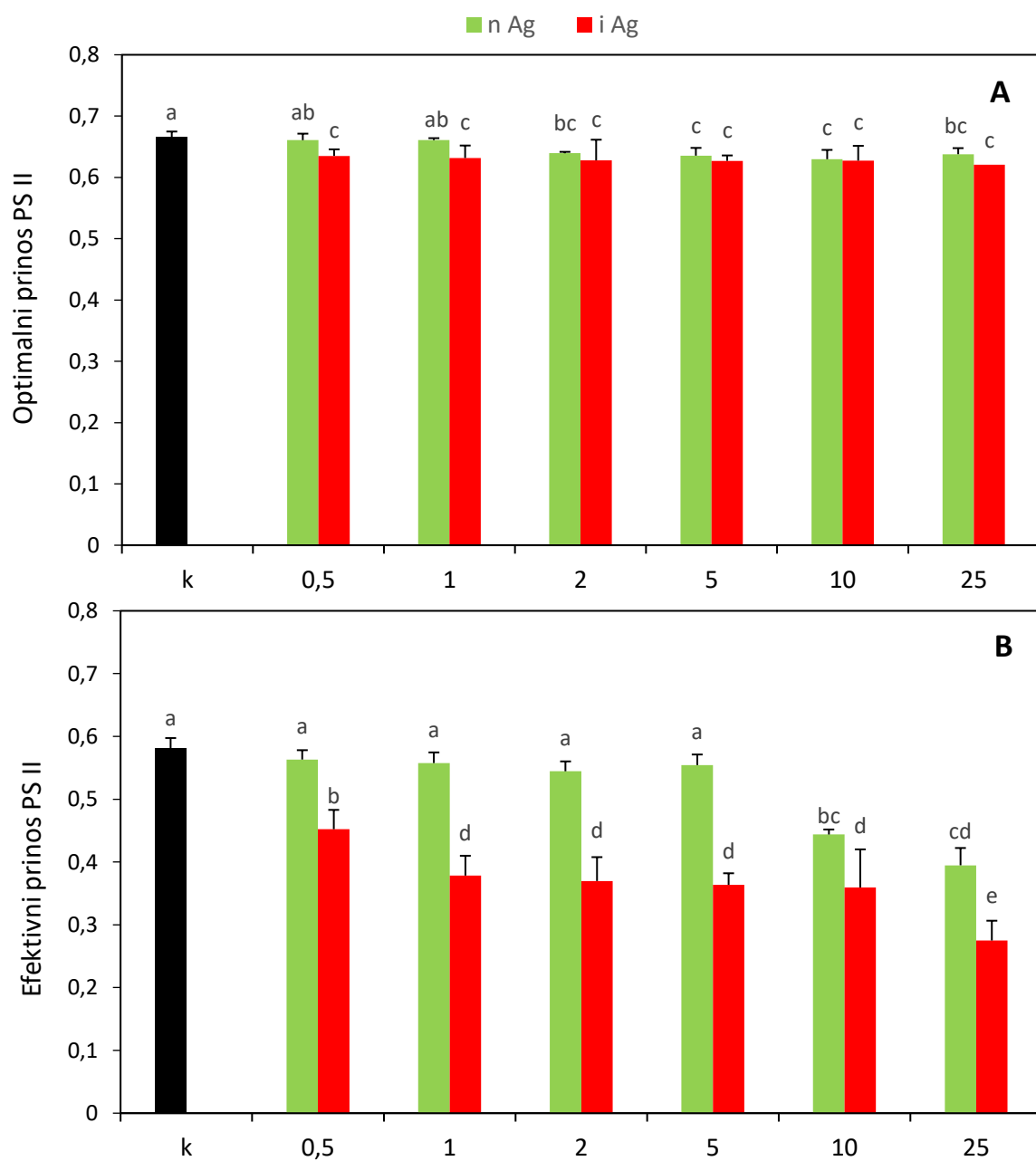
tretmani	Ca (mg/g)	K (mg/g)	Mg (mg/g)	P (mg/g)	N (mg/g)	Fe (mg/g)
K	14,84 $\pm$ 1,08 ^d	54,10 $\pm$ 0,94 ^a	2,578 $\pm$ 0,058 ^{bc}	21,58 $\pm$ 2,30 ^{ef}	41,77 $\pm$ 1,10 ^{ab}	149,18 $\pm$ 7,65 ^e
0,5 nAg	14,54 $\pm$ 1,12 ^d	54,01 $\pm$ 4,86 ^a	2,60 $\pm$ 0,042 ^{bc}	18,87 $\pm$ 2,96 ^f	40,11 $\pm$ 0,825 ^{abc}	185,97 $\pm$ 30,81 ^e
1 nAg	14,50 $\pm$ 0,27 ^d	46,67 $\pm$ 7,52 ^{ab}	2,313 $\pm$ 0,043 ^c	20,72 $\pm$ 1,57 ^{ef}	39,65 $\pm$ 1,45 ^{bcd}	238,44 $\pm$ 29,56 ^{cde}
2 nAg	14,76 $\pm$ 0,30 ^d	46,55 $\pm$ 3,26 ^{ab}	2,327 $\pm$ 0,154 ^c	23,20 $\pm$ 1,72 ^e	40,26 $\pm$ 0,549 ^{abc}	226,43 $\pm$ 29,47 ^{cde}
5 nAg	15,87 $\pm$ 1,48 ^{cd}	54,51 $\pm$ 1,36 ^{ab}	2,546 $\pm$ 0,402 ^{bc}	22,60 $\pm$ 0,37 ^{ef}	39,48 $\pm$ 0,445 ^{bcd}	215,61 $\pm$ 35,15 ^{de}
10 nAg	17,96 $\pm$ 3,01 ^{cd}	46,42 $\pm$ 2,22 ^{ab}	2,735 $\pm$ 0,617 ^{abc}	24,65 $\pm$ 0,85 ^e	38,24 $\pm$ 1,17 ^{de}	329,01 $\pm$ 2,57 ^a
25 nAg	17,64 $\pm$ 3,11 ^{cd}	48,37 $\pm$ 8,32 ^{ab}	3,140 $\pm$ 0,798 ^{ab}	23,84 $\pm$ 0,81 ^e	37,05 $\pm$ 1,45 ^e	299,29 $\pm$ 33,58 ^b
0,5 iAg	19,98 $\pm$ 1,35 ^b	46,83 $\pm$ 2,32 ^{ab}	2,558 $\pm$ 0,331 ^{bc}	34,79 $\pm$ 3,73 ^d	42,04 $\pm$ 1,190 ^a	294,16 $\pm$ 30,14 ^b
1 iAg	20,32 $\pm$ 2,15 ^b	40,09 $\pm$ 1,69 ^{bc}	2,930 $\pm$ 0,189 ^{abc}	34,60 $\pm$ 2,42 ^d	40,27 $\pm$ 0,81 ^{abc}	283,54 $\pm$ 49,84 ^{bc}
2 iAg	19,03 $\pm$ 3,66 ^{bc}	42,82 $\pm$ 5,24 ^{bc}	3,362 $\pm$ 0,327 ^a	35,54 $\pm$ 1,14 ^d	40,66 $\pm$ 1,13 ^{ab}	241,79 $\pm$ 13,62 ^{cde}
5 iAg	20,07 $\pm$ 2,71 ^b	37,84 $\pm$ 0,27 ^{bc}	2,857 $\pm$ 0,351 ^{abc}	51,62 $\pm$ 1,20 ^b	40,50 $\pm$ 1,99 ^{abc}	269,79 $\pm$ 42,36 ^{cd}
10 iAg	21,39 $\pm$ 1,49 ^b	40,09 $\pm$ 1,98 ^{bc}	2,752 $\pm$ 0,228 ^{abc}	57,67 $\pm$ 3,80 ^a	39,07 $\pm$ 1,99 ^{bcd}	216,67 $\pm$ 50,28 ^{de}
25 iAg	22,21 $\pm$ 6,44 ^a	32,95 $\pm$ 2,93 ^c	2,566 $\pm$ 0,038 ^{bc}	47,70 $\pm$ 3,42 ^c	41,01 $\pm$ 0,54 ^{ab}	189,88 $\pm$ 42,08 ^e

4.5. FUNKCIONALNOST FOTOSINTETSKOG APARATA

4.5.1. Optimalni i efektivni prinos PSII

Funkcionalnost fotosintetskog aparata vodene leće procijenjena je mjerenjem *in situ* fluorescencije klorofila *a* (*Slika 8. A i B*). Optimalni prinos PSII u vodenoj leći izloženoj nAg je statistički značajno smanjen kod koncentracija 2-25 mg/L u usporedbi s kontrolnim vrijednostima (*Slika 8. A*). nAg uzrokovale su i statistički značajno smanjenje efektivnog prinosa PSII vodene leće pri najvišim koncentracijama od 10 i 25 mg/L. Smanjenje tog parametra se kretalo od 25-35 % obzirom na kontrolne vrijednosti (*Slika 8. B*).

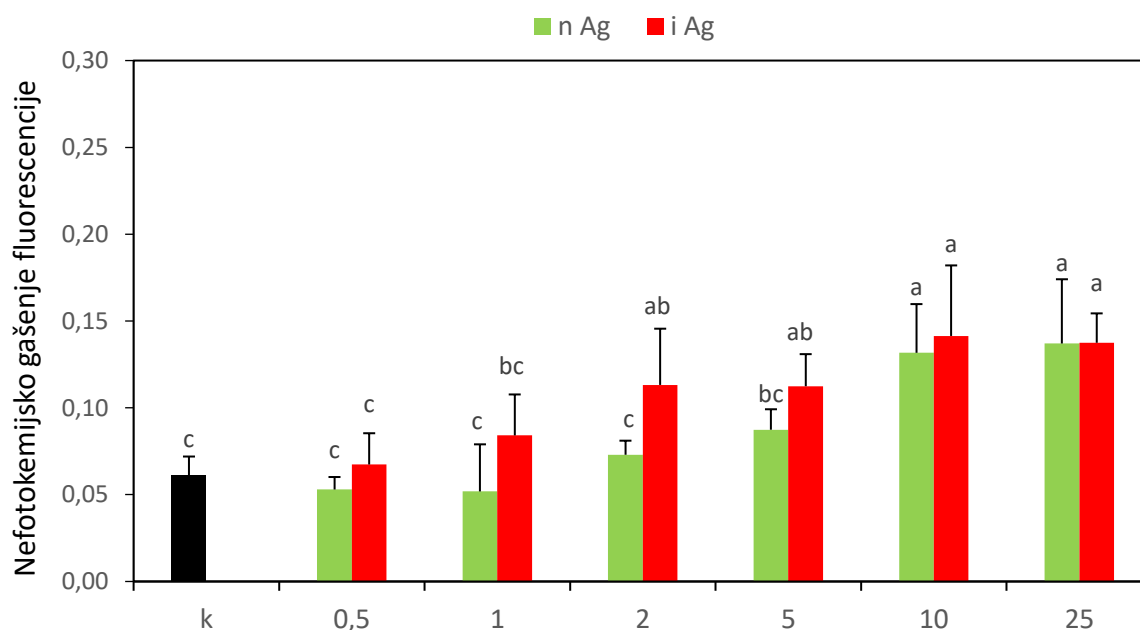
iAg uzrokovalo je statistički značajno podjednako smanjenje optimalnog prinosa PSII pri svim koncentracijama u odnosu na kontrolu (*Slika 8. A.*) Efektivni prinos PSII kod biljaka izloženih iAg je značajno smanjen u odnosu na kontrolne biljke i to u rasponu od 23 % kod najniže koncentracije do 54 % kod najviše koncentracije iAg (*Slika 8. B*).



Slika 8. Optimalni (A) i efektivni prinos (B) PSII vodene leće nakon 7 dana rasta na podlogama s dodatkom nanočestica srebra (nAg) ili srebrovog nitrata (iAg) u koncentracijama: 0,5; 1; 2; 5; 10 i 25 mg/L ili bez njihovog dodatka – kontrolne biljke (k). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju od kontrole ($p < 0,05$).

4.5.2. NPQ

Statistički značajan porast vrijednosti NPQ zabilježen je u vodenoj leći izloženoj koncentracijama 10 i 25 mg/L na podlogama s dodatkom nAg, dok je taj parametar statistički značajno povišen pri koncentracijama 2-25 mg/L na podlogama s dodatkom iAg. Porast vrijednosti NPQ linearno se povećavao s rastom koncentracija nAg i iAg (Slika 9.). Međusobnom usporedbom tretmana istih koncentracija nAg i iAg uočen je statistički značajan porast vrijednosti NPQ kod koncentracija 2 i 5 mg/L iAg u usporedbi s jednakim koncentracijama nAg, dok su pri ostalim koncentracijama vrijednosti NPQ bile podjednake.

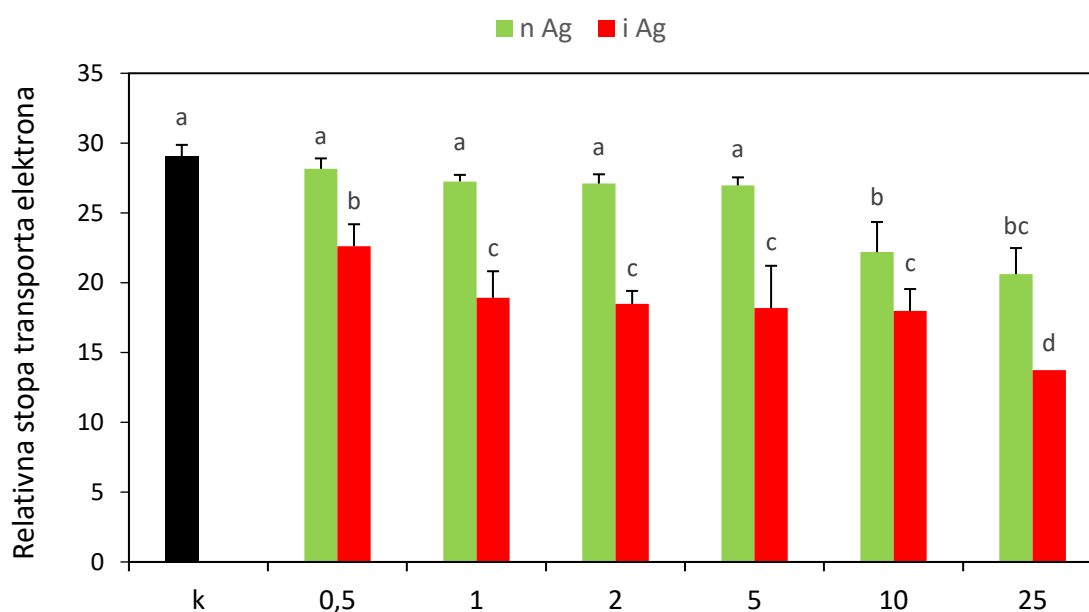


Slika 9. Nefotokemijsko gašenje fluorescencije (NPQ) vodene leće nakon 7 dana rasta na podlogama s dodatkom nanočestica srebra (nAg) ili srebrovog nitrata (iAg) u koncentracijama: 0,5; 1; 2; 5; 10 i 25 mg/L ili bez njihovog dodatka – kontrolne biljke (k). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju od kontrole ($p < 0,05$).

4.5.3. ETR

Na *Slici 10.* prikazana je ETR u vodenoj leći uzgajanoj na rastućim koncentracijama nAg ili iAg ili bez njihove prisutnosti.

Izlaganje vodene leće nAg statistički je značajno smanjilo ETR pri višim koncentracijama (10 i 25 mg/L). Smanjenje ovog parametra bilo je bitno veće u vodenoj leći izloženoj iAg, gdje je vidljivo statistički značajno smanjenje vrijednosti ETR već pri najnižoj koncentraciji iAg (0,5 mg/L), a jače je izraženo s porastom koncentracije iAg (*Slika 10.*).



Slika 10. Relativna stopa transporta elektrona (ETR) vodene leće nakon 7 dana rasta na podlogama s dodatkom nanočestica srebra (nAg) ili srebrovog nitrata (iAg) u koncentracijama: 0,5; 1; 2; 5; 10 i 25 mg/L ili bez njihovog dodatka – kontrolne biljke (k). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju od kontrole ($p < 0,05$).

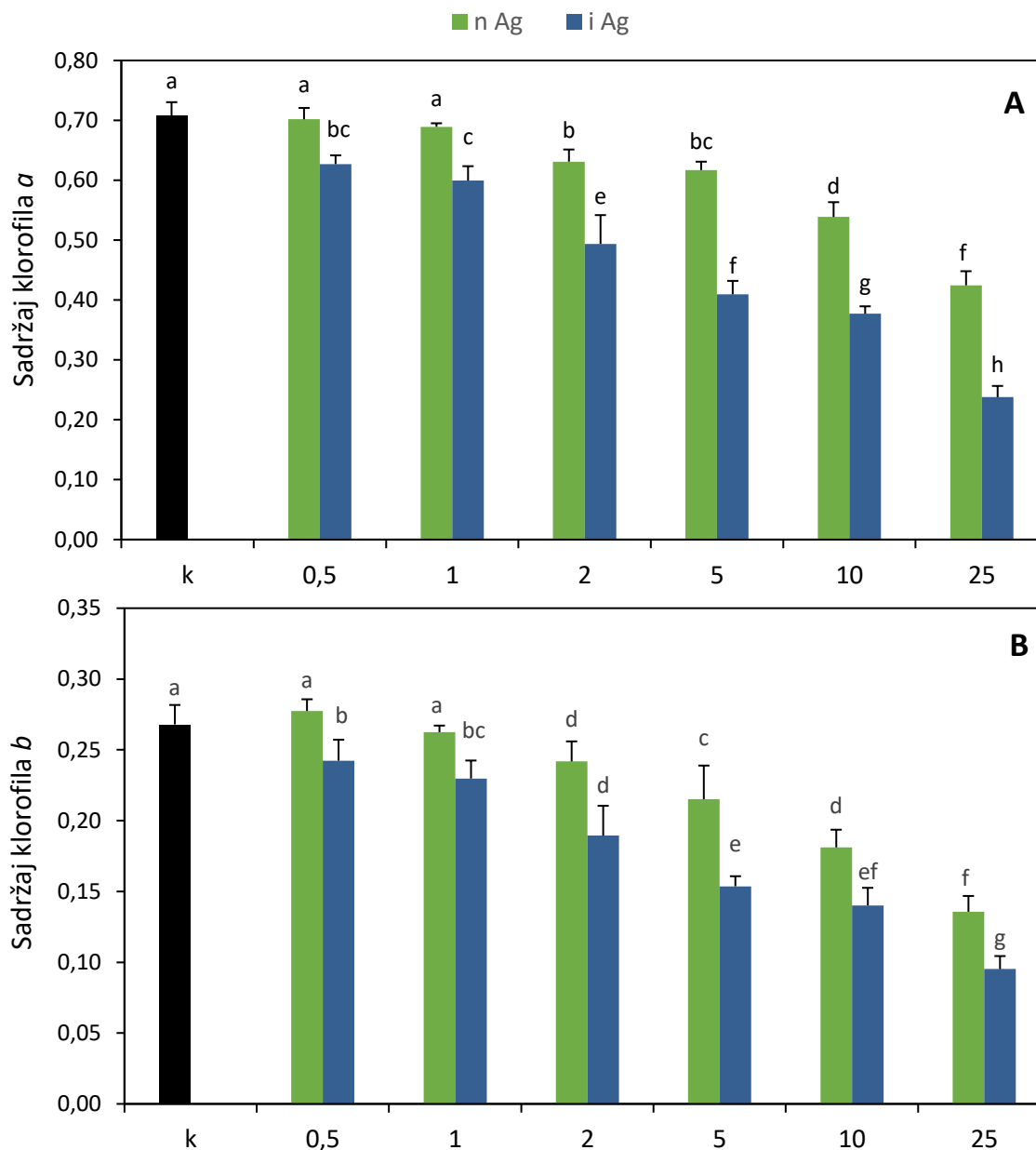
4.6. SADRŽAJ FOTOSINTETSKIH PIGMENATA

4.6.1. Sadržaj klorofila

Sadržaj klorofila *a* u vodenoj leći izloženoj nAg pri koncentracijama višim od 2 mg/L bio je statistički značajno smanjen u odnosu na kontrolne biljke (*Slika 11.A*). Sadržaj klorofila *b* pratio je dinamiku promjene klorofila *a*, i zabilježen je značajan pad sadržaja ovog pigmenta pri koncentracijama višim od 2 mg/L u odnosu na kontrolu (*Slika 11.B*).

Nakon tretmana s iAg uočeno je statistički značajno smanjenje sadržaja klorofila *a* i *b* već od najniže primijenjene koncentracije, a bilo je obrnuto proporcionalno rastućim koncentracijama iAg (*Slika 11.*).

Kod međusobne usporedbe tretmana nAg i i Ag pri istim koncentracijama uočen je značajan pad sadržaja klorofila *a* i *b* na svim tretmanima iAg u odnosu na tretmane s nAg (*Slika 11. A i B*).

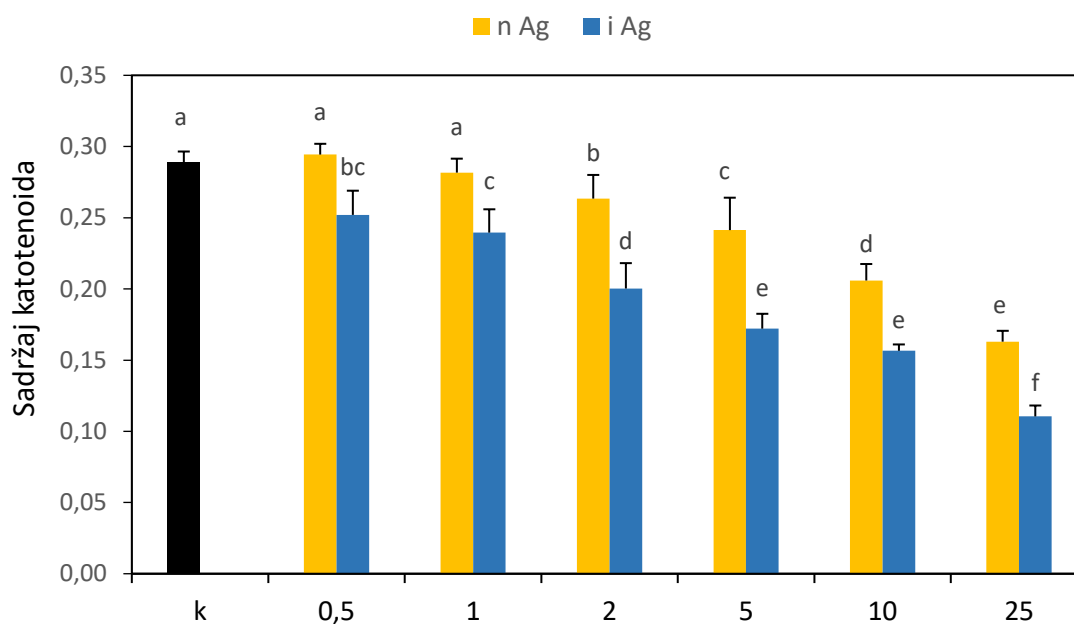


Slika 11. Sadržaj klorofila *a* (A) i *b* (B) (mg/g svježe tvari) u vodenoj leći nakon 7 dana rasta na podlogama s dodatkom nanočestica srebra (nAg) ili srebrovog nitrata (iAg) u koncentracijama: 0,5; 1; 2; 5; 10 i 25 mg/L ili bez njihovog dodatka – kontrolne biljke (k). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju od kontrole ($p < 0,05$).

4.6.2. Sadržaj karotenoida

U slučaju karotenoida, pomoćnih pigmenata iz skupine terpena, uočena je vrlo slična situacija kao i kod klorofila *a* i *b*, odnosno utvrđeno je statistički značajno smanjenje sadržaja karotenoida u vodenoj leći izloženoj nAg pri koncentracijama višim

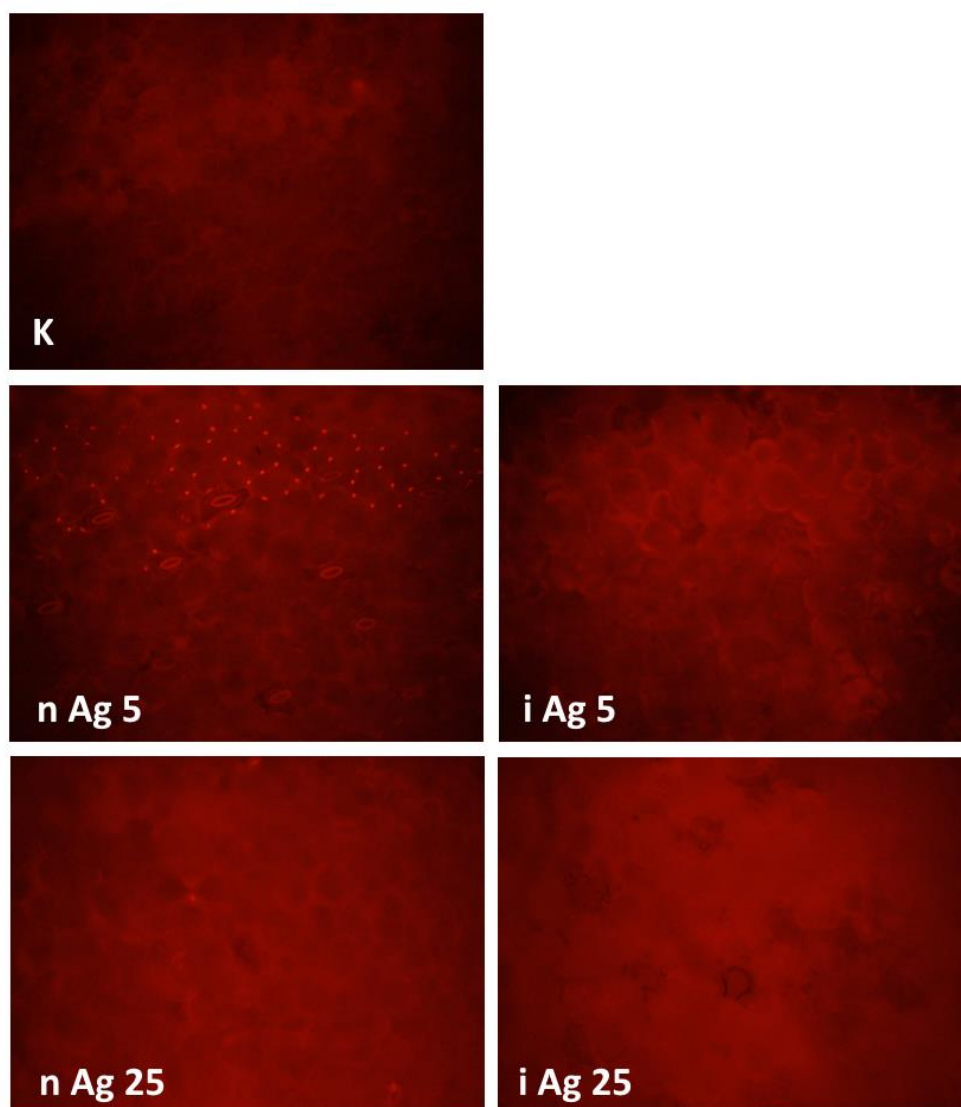
od 2 mg/L i iAg pri svim koncentracijama (*Slika 12.*). Najveće koncentracije Ag upotrijebljene u ovom istraživanju izazvale su i najveće smanjenje (između 30 i 60 %) sadržaja ovih pigmenata u odnosu na kontrolu. Međusobnom usporedbom tretmana nAg i iAg istih koncentracija vidljivo je značajno smanjenje sadržaja karotenoida kod tretmana s iAg, a posebice pri koncentracijama 2, 5, 10 i 25 mg/L, u odnosu na iste tretmane s nAg.



Slika 12. Sadržaj karotenoida (mg/g svježe tvari) u vodenoj leći nakon 7 dana rasta na podlogama s dodatkom nanočestica srebra (nAg) ili srebrovog nitrata (iAg) u koncentracijama: 0,5; 1; 2; 5; 10 i 25 mg/L ili bez njihovog dodatka – kontrolne biljke (k). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju od kontrole ($p < 0,05$).

4.7. SADRŽAJ SUPEROKSIDNIH RADIKALA

Boja DHE se pomoću O_2^- oksidira u etidij koji fluoresceira crveno. Stoga, povećanje intenziteta crvenog obojenja ukazuje na povećanje količine ROS u stanicama. Promatranjem stanica vodene leće izloženog rastućim koncentracijama nAg i iAg vidljivo je povećanje intenziteta crvenog obojenja u odnosu na kontrolu (*Slika 13.*).

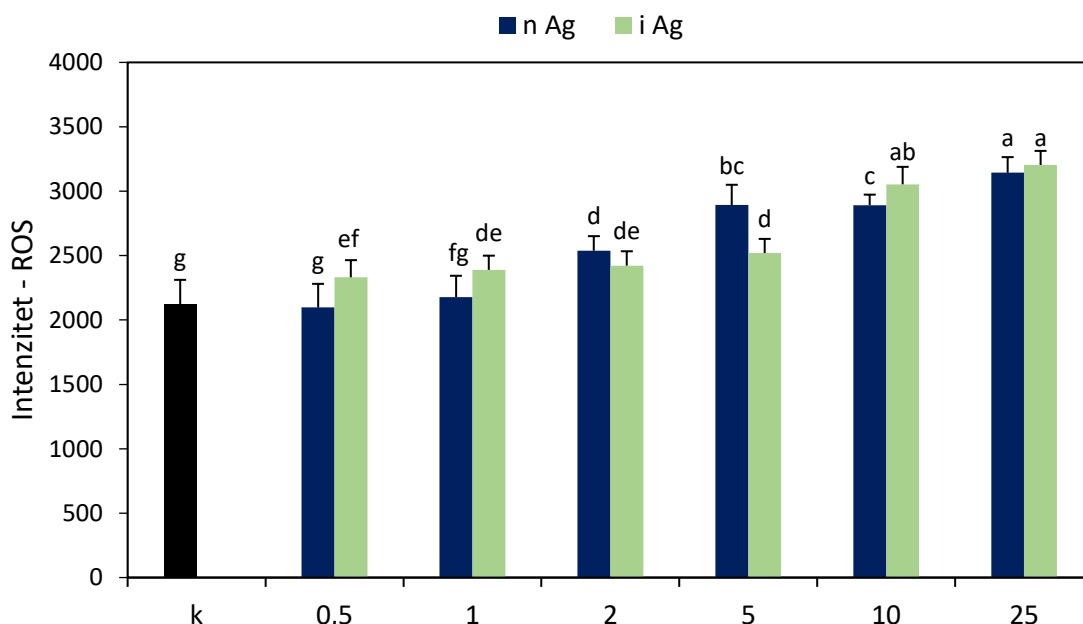


Slika 13. Stanice vodene leće (*Lemna minor*) snimljene fluorescencijskim mikroskopom (povećanje 20x) nakon 7 dana rasta na podlogama s dodatkom nanočestica srebra (nAg) ili srebrovog nitrata (iAg) u koncentracijama: 5 i 25 mg/L Ag ili bez njihovog dodatka – kontrolne biljke (K). Crvena boja potječe od fluorescencije superoksidnog radikala.

Analizom slika određen je sadržaj ROS u pojedinim stanicama. Sadržaj ROS u vodenoj leći izloženoj nižim koncentracijama (0,5 i 1 mg/L) nAg nije se značajno razlikovao od sadržaja ROS u kontrolnim biljkama, dok su više koncentracije (2, 5, 10 i 25 mg/L) izazvale statistički značajan porast (povećanje ROS 15-30 % u usporedbi s kontrolom) (*Slika 14.*).

Sadržaj ROS u vodenoj leći izloženoj iAg je pri svim ispitanim koncentracijama bio statistički značajno povišen u odnosu na kontrolne biljke (10-35 %) (*Slika 14.*).

Međusobnom usporedbom tretmana pri istim koncentracijama nAg i iAg, vidljivo je da je sadržaj ROS značajno povećan kod tretmana 0,5, 1 i 10 mg/L iAg u odnosu na iste tretmane s nAg. Kod tretmana s 2 i 5 mg/L nAg povišen je sadržaj ROS u usporedbi s iAg istih koncentracija. Sadržaj ROS pri koncentraciji od 25 mg/L nAg i iAg nije se međusobno razlikovao.



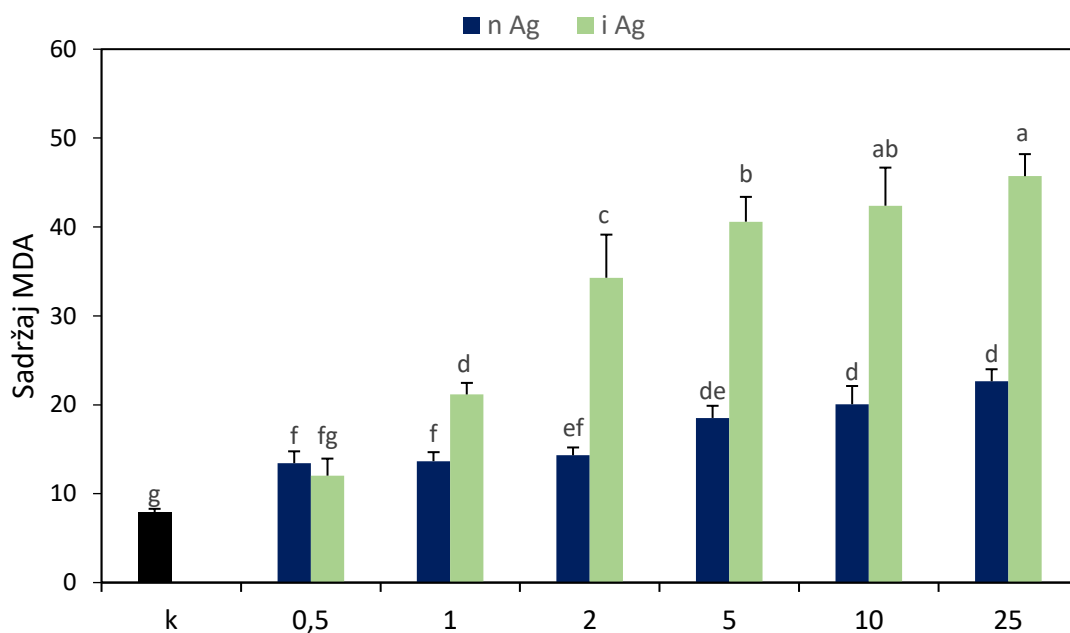
Slika 14. Sadržaj reaktivnih oblika kisika (intenzitet ROS) u stanicama vodene leće nakon 7 dana rasta na podlogama s dodatkom nanočestica srebra (nAg) ili srebrovog nitrata (iAg) u koncentracijama: 0,5; 1; 2; 5; 10 i 25 mg/L ili bez njihovog dodatka – kontrolne biljke (k). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju od kontrole ($p < 0,05$).

4.8. SADRŽAJ MDA

Stupanj lipidne peroksidacije, kao jednog od pokazatelja oksidacijskog stresa u biljaka, određuje se mjerenjem sadržaja MDA, koji je jedan od krajnjih raspadnih produkata tog procesa. Na *Slici 15.* vidljiv je statistički značajan porast sadržaja MDA u vodenoj leći tretiranoj nAg u odnosu na kontrolu, a porast je bio najveći pri najvišim koncentracijama nAg (10 i 25 mg/mL).

iAg je uzrokovalo znatno jaču lipidnu peroksidaciju u usporedbi s nAg. Sve koncentracije iAg, izuzev najniže, izazvale su statistički značajno povećanje sadržaja MDA u odnosu na kontrolu (*Slika 15.*), a najizraženiji porast zabilježen je u biljkama izloženim najvećoj koncentraciji iAg (porast od 83 % u usporedbi s kontrolom).

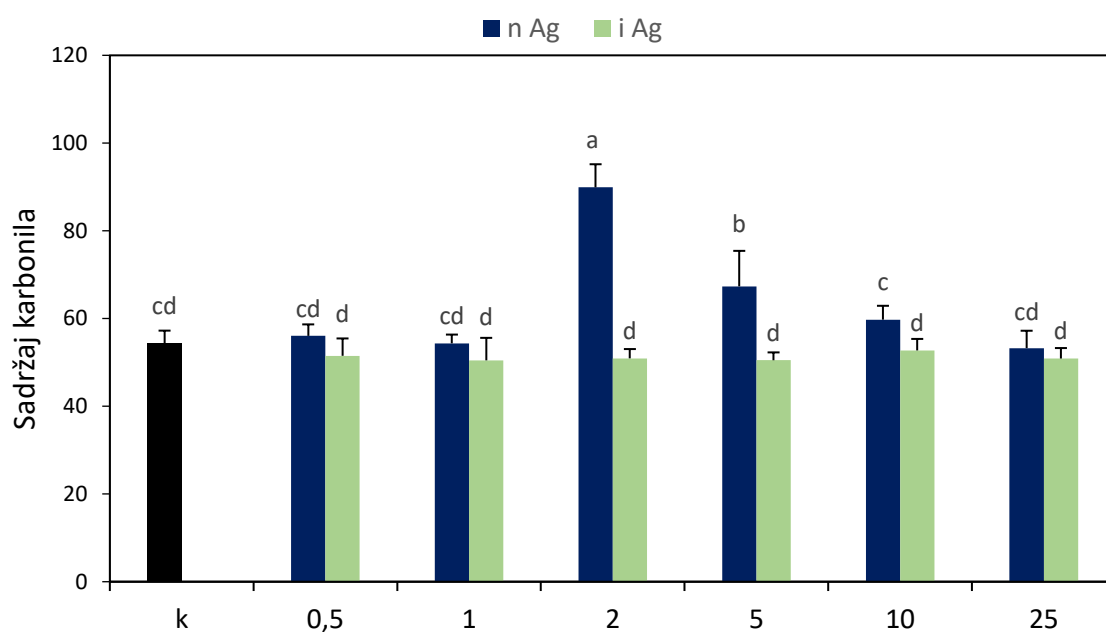
Usporedbom tretmana istih koncentracija nAg i iAg uočen je statistički značajan porast sadržaja MDA (35-60 %) pri svim koncentracijama osim najniže (*Slika 15.*)



Slika 15. Sadržaj malondialdehida (MDA; nmol/g svježe tvari) u vodenoj leći nakon 7 dana rasta na podlogama s dodatkom nanočestica srebra (nAg) ili srebrovog nitrata (iAg) u koncentracijama: 0,5; 1; 2; 5; 10 i 25 mg/L ili bez njihovog dodatka – kontrolne biljke (k). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju od kontrole ($p < 0,05$).

4.9. SADRŽAJ KARBONILA

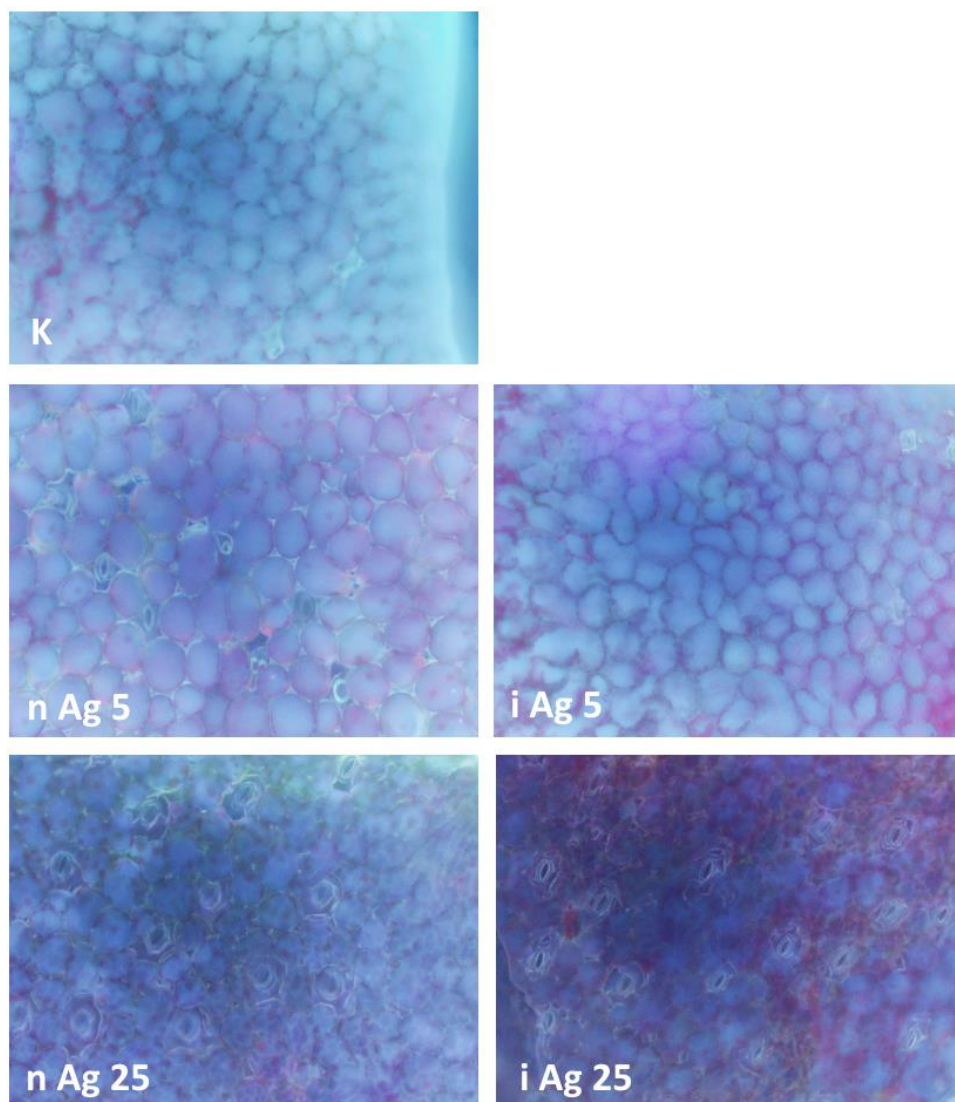
Oksidacijsko oštećenje proteina, procijenjeno putem sadržaja karbonila, bilo je statistički značajno povećano u biljkama izloženim 2 i 5 mg/L nAg, dok sadržaj karbonila u biljkama izloženim tretmanu s iAg nije znatno odstupao u odnosu na kontrolne vrijednosti (*Slika 16.*).



Slika 16. Sadržaj karbonila (nmol/mg proteina) u vodenoj leći nakon 7 dana rasta na podlogama s dodatkom nanočestica srebra (nAg) ili srebrovog nitrata (iAg) u koncentracijama: 0,5; 1; 2; 5; 10 i 25 mg/L ili bez njihovog dodatka – kontrolne biljke (k). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju od kontrole ($p < 0,05$).

4.10. SADRŽAJ GSH *IN SITU*

Više od 90 % sadržaja neproteinskih tiola čini reducirani GSH. Udio glutationa u stanicama vodene leće vidljiv je kao plavo obojenje promatranjem stanica fluorescencijskim mikroskopom (*Slika 17.*). Jači intenzitet plavog obojenja podrazumijeva veći udio GSH u stanici.

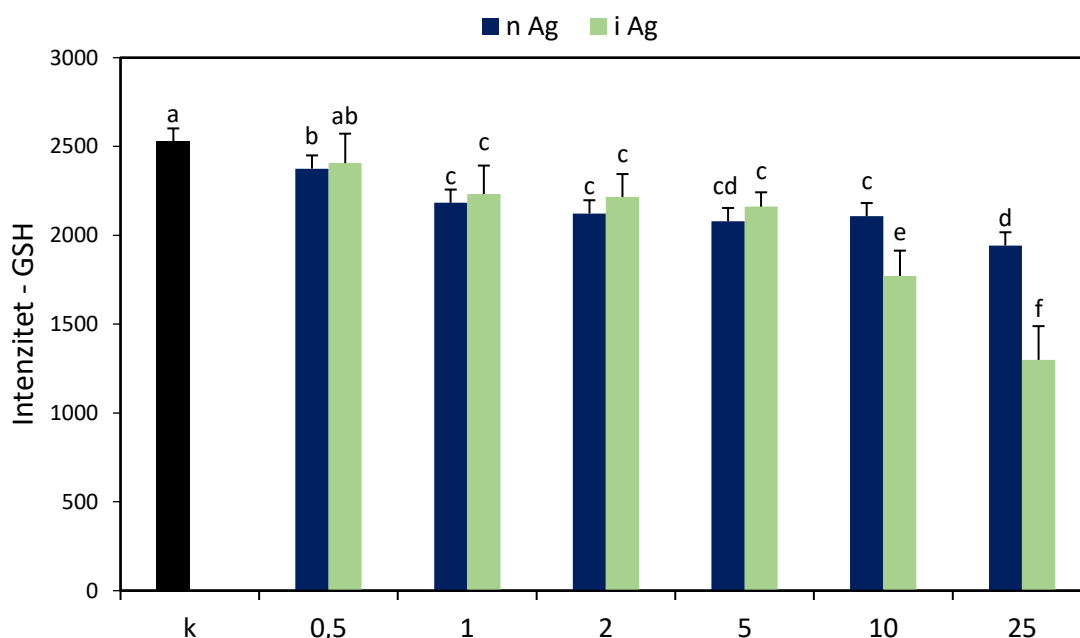


Slika 17. Stanice vodene leće (*Lemna minor*) snimljene fluorescencijskim mikroskopom (povećanje 20x) nakon 7 dana rasta na podlogama s dodatkom nanočestica srebra (nAg) ili srebrovog nitrata (iAg) u koncentracijama: 5 i 25 mg/L ili bez njihovog dodatka – kontrolne biljke (k). Plava boja potječe od fluorescencije adukta glutationa i boje monoklorobimana.

Sadržaj GSH u vodenoj leći izloženoj nAg tijekom 7 dana pokazuje značajan pad od najniže prema najvećoj koncentraciji nAg (*Slika 18.*). Koncentracija nAg od 25 mg/L uzrokovala je pad sadržaja glutaciona od 30 % u odnosu na kontrolu.

I nakon tretmana s iAg uočeno je statistički značajno smanjenje sadržaja GSH u odnosu na kontrolne biljke, izuzev pri najnižoj koncentraciji (0,5 mg/L). Koncentracija od 25 mg/L iAg je uzrokovala 50 %-tno sniženje sadržaja GSH u odnosu na kontrolne biljke.

Kod usporedbe tretmana 10 i 25 mg/L nAg i iAg uočen je značajan pad sadržaja GSH kod tretmana s iAg (15 % pri koncentraciji od 10 mg/L i 35 % pri koncentraciji od 25 mg/L) u usporedbi s nAg (*Slika 18.*).



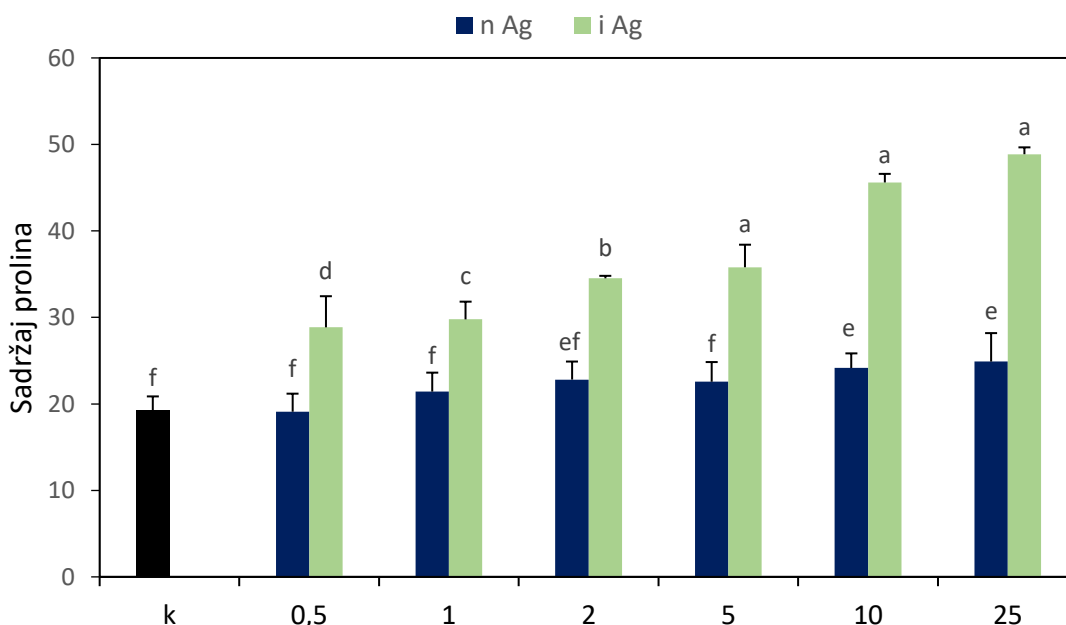
Slika 18. Sadržaj glutaciona (intenzitet GSH) u stanicama vodene leće nakon 7 dana rasta na podlogama s dodatkom nanočestica srebra (nAg) ili srebrovog nitrata (iAg) u koncentracijama: 0,5; 1; 2; 5; 10 i 25 mg/L ili bez njihovog dodatka – kontrolne biljke (k). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju od kontrole ($p < 0,05$).

4.11. SADRŽAJ PROLINA

Sadržaj kompatibilnog osmolita i antioksidansa prolina u vodenoj leći izloženoj različitim koncentracijama nAg tijekom perioda od 7 dana pokazuje statistički značajan porast u usporedbi s kontrolom tek pri višim koncentracijama nAg (10 i 25 mg/L) (*Slika 19.*).

Izloženost iAg rezultirala je statistički značajnim porastom na svim koncentracijama u odnosu na kontrolnu biljku; u rasponu od 35% povećanja pri 0,5 mg/L iAg do 60 % pri najvišoj koncentraciji iAg od 25 mg/L.

Usporedbom učinka nAg i i Ag može se uočiti da iAg pri svim koncentracijama uzrokuje značajno veću akumulaciju prolina u odnosu na nAg (*Slika 19.*).



Slika 19. Sadržaj prolina (nmol/g svježe tvari) u vodenoj leći nakon 7 dana rasta na podlogama s dodatkom nanočestica srebra (nAg) ili srebrovog nitrata (iAg) u koncentracijama: 0,5; 1; 2; 5; 10 i 25 mg/L ili bez njihovog dodatka – kontrolne biljke (k). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju od kontrole ($p < 0,05$).

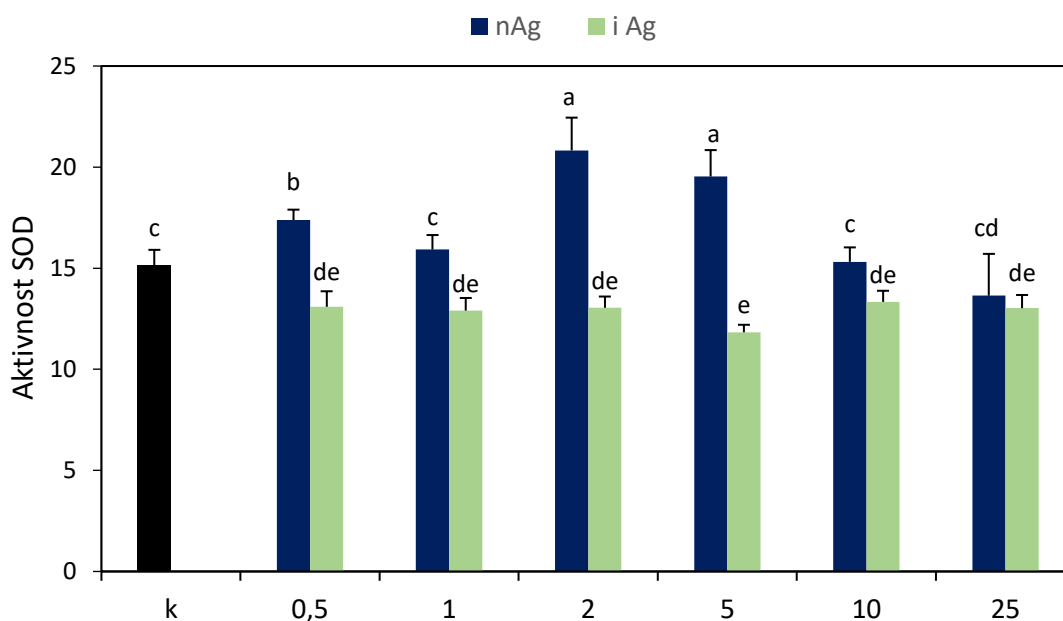
4.12. AKTIVNOST ENZIMA

4.12.1. Aktivnost SOD

SOD katalizira razgradnju O_2^- u H_2O_2 i O_2 . Aktivnost enzima SOD u biljkama izloženim najnižoj koncentraciji nAg bila je statistički značajno povišena u odnosu na listiće kontrolnih biljaka (*Slika 20.*). Statistički značajno povećanje aktivnosti tog enzima zamijećeno je i pri koncentracijama većim od 1 mg/L, a najveći porast aktivnosti (porast od 27% u odnosu na kontrolu) utvrđen je pri 2 mg/L nAg. Koncentracije od 0,5 i 10 mg/L nisu izazvale statistički značajne promjene u odnosu na kontrolne vrijednosti ovog enzima.

Nakon tretmana vodene leće iAg vidljiv je statistički značajan pad aktivnosti SOD u odnosu na kontrolne biljke (*Slika 20.*).

Usporedbom učinka nAg i iAg vidljivo je da iAg pri gotovo svim primijenjenim koncentracijama (izuzev najviše) uzrokuje značajan pad aktivnosti SOD u usporedbi s nAg (*Slika 20.*).



Slika 20. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD; U/mg proteina) u vodenoj leći nakon 7 dana rasta na podlogama s dodatkom nanočestica srebra (nAg) ili srebrovog nitrata (iAg) u koncentracijama: 0,5; 1; 2; 5; 10 i 25 mg/L ili bez njihovog dodatka – kontrolne biljke (k). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju od kontrole ($p < 0,05$).

4.12.2. Aktivnost POD

Aktivnost APOD u vodenoj leći tretiranoj nAg bila je statistički značajno povećana pri koncentracijama većim od 0,5 mg/L (porast od 15 do 50 %) u odnosu na kontrolu (*Slika 21.A*).

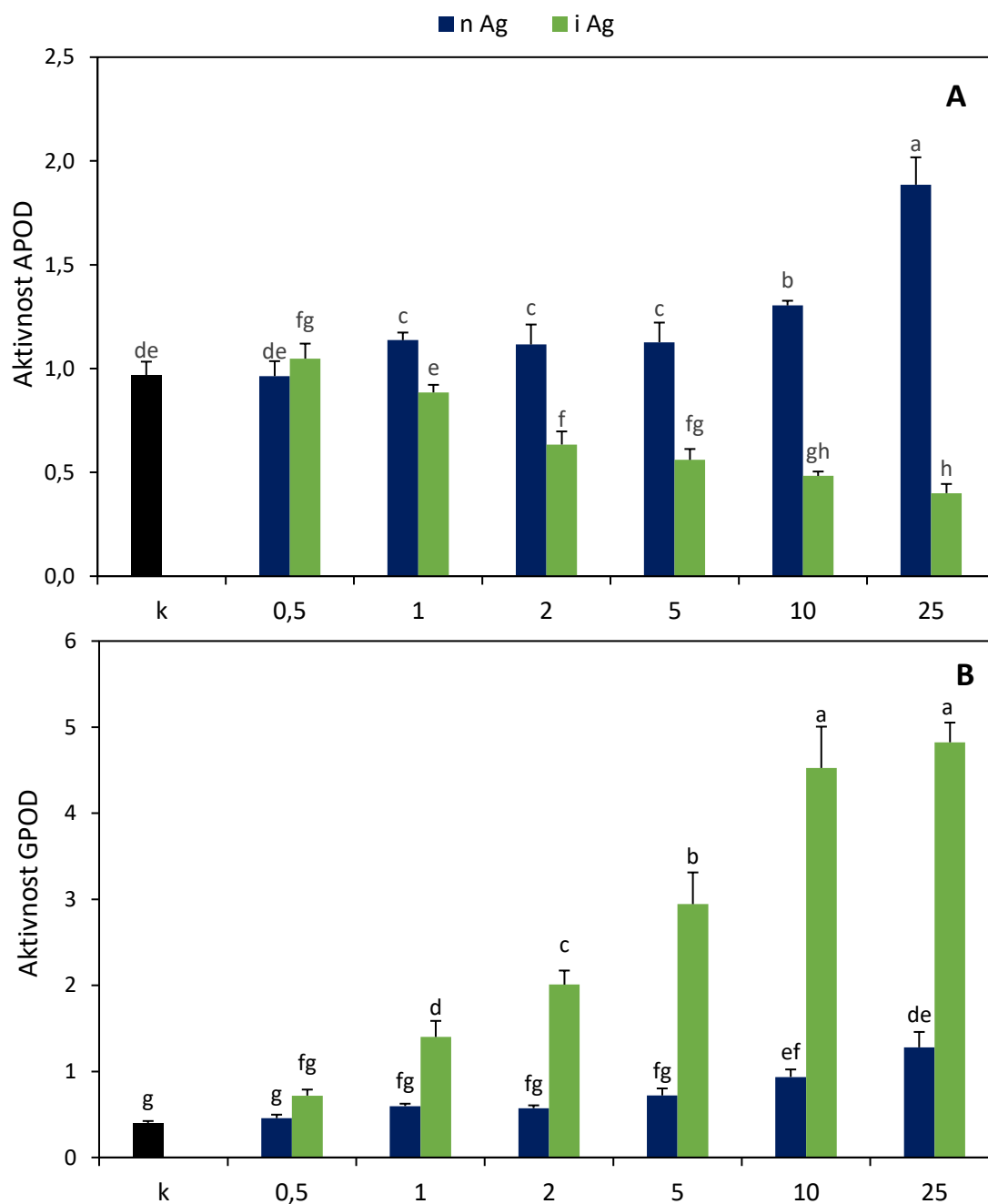
S druge strane, koncentracije iAg više od 0,5 mg/L značajno su inhibirale aktivnost APOD u odnosu na kontrolu; 10 mg/L iAg (iAg 10 za 49 %, a 25 mg/L iAg za 41 % u odnosu na kontrolne vrijednosti).

Usporedbom učinka nAg i iAg, može se uočiti da je aktivnost APOD značajno povećana pri koncentracijama 1, 2, 5, 10 i 25 mg/L nAg, dok je pri istim tretmanima s iAg aktivnost tog enzima značajno inhibirana (*Slika 21.A*).

Aktivnost GPOD u vodenoj leći izloženoj koncentracijama nAg do 5 mg/L nije pokazala statistički značajne promjene u odnosu na kontrolne biljke, dok su najviše koncentracije nAg inducirale su aktivnost ovog enzima (*Slika 21.B*).

Aktivnost GPOD u vodenoj leći izloženoj iAg bila je značajno povećana u odnosu na kontrolu pri svim ispitanim koncentracijama. Najveće statistički značajno povećanje zabilježeno je nakon tretmana s 10 i 25 mg/L iAg, kada je aktivnost GPOD bila 11 odnosno 12 puta veća u usporedbi s kontrolnim vrijednostima.

Međusobnom usporedbom tretmana nAg i i Ag također je uočena povećana aktivnost GPOD (u rasponu od 36 % do 74 %) na svim tretmanima s iAg u odnosu na iste tretmane s nAg (*Slika 21.B*).

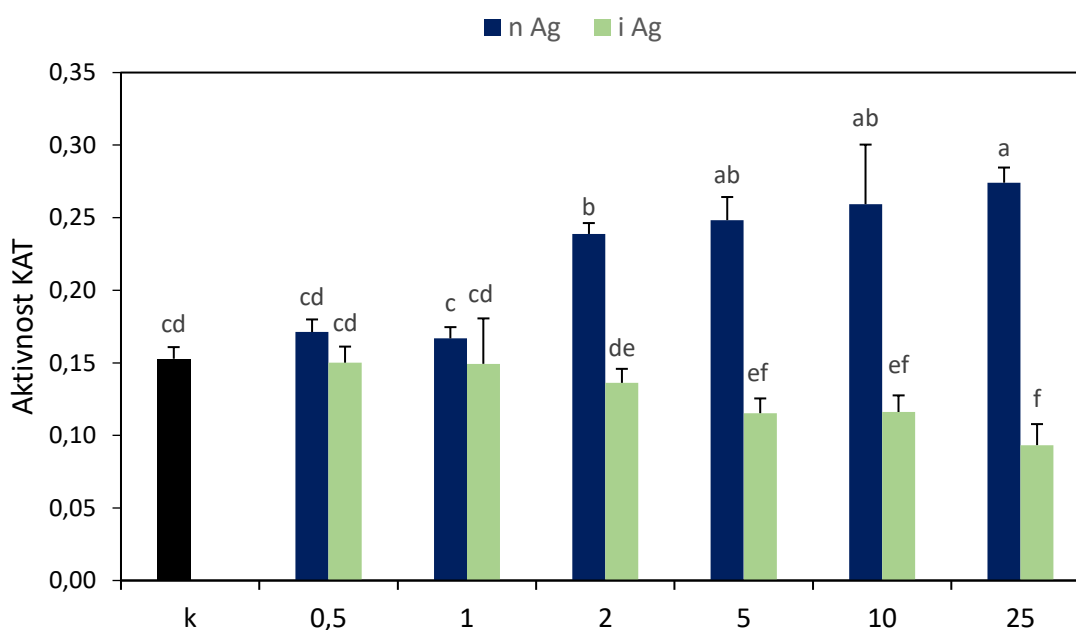


Slika 21. Aktivnost askorbat (APOD) (A) i gvajakol (GPOD) (B) peroksidaze (U/mg proteina) u vodenoj leći nakon 7 dana rasta na podlogama s dodatkom nanočestica srebra (nAg) ili srebrovog nitrata (iAg) u koncentracijama: 0,5; 1; 2; 5; 10 i 25 mg/L ili bez njihovog dodatka – kontrolne biljke (k). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju od kontrole ($p < 0,05$).

4.12.3. Aktivnost KAT

Jedan od enzimskih mehanizama antioksidacijskog sustava koji sudjeluje u razgradnji H_2O_2 je i enzim KAT. Aktivnost KAT u vodenoj leći tretiranoj koncentracijama nAg većim od 1 mg/L bila je statistički značajno povećana; utvrđena je oko 2 puta veća aktivnost u odnosu na kontrolne vrijednosti (Slika 22.).

S druge strane, više koncentracije iAg (i Ag 5, 10 i 25 mg/L) značajno su inhibirale aktivnost KAT u odnosu na kontrolu (smanjenje od prosječno 39% u odnosu na kontrolne vrijednosti). Sličan trend je prisutan i kod međusobne usporedbe nAg i iAg istih koncentracija - iAg je uzrokovao značajnu inhibiciju aktivnosti KAT pri većim koncentracijama u odnosu na iste tretmane s nAg, kod kojih je aktivnost tog enzima bila povećana (Slika 22.).



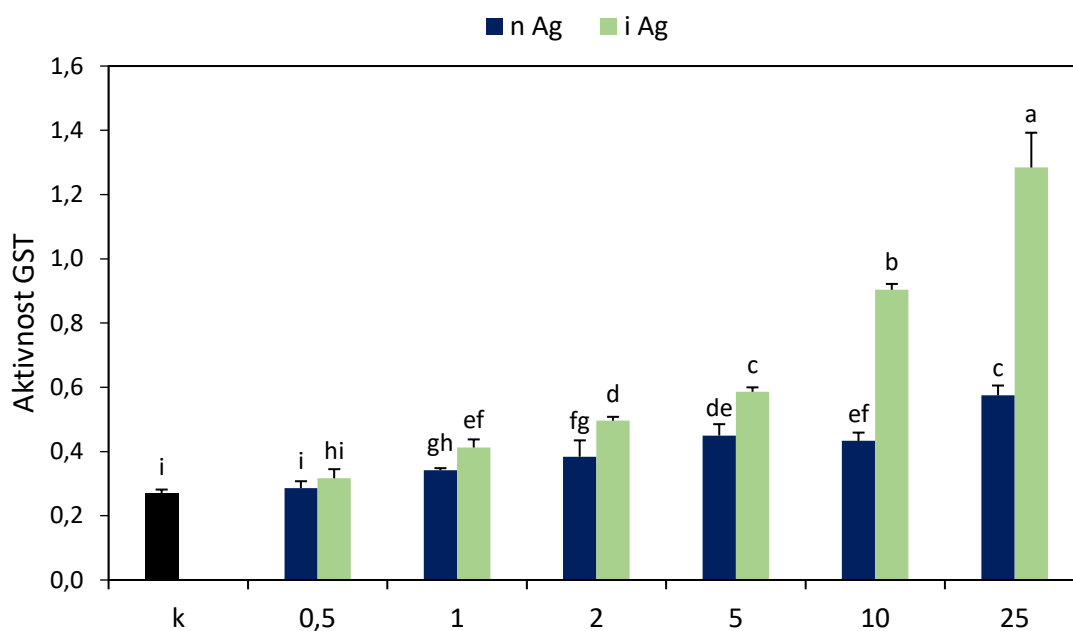
Slika 22. Aktivnost katalaze (KAT; U/mg proteina) u vodenoj leći nakon 7 dana rasta na podlogama s dodatkom nanočestica srebra (nAg) ili srebrovog nitrata (iAg) u koncentracijama: 0,5; 1; 2; 5; 10 i 25 mg/L ili bez njihovog dodatka – kontrolne biljke (k). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju od kontrole ($p < 0,05$).

4.12.4. Aktivnost GST

Aktivnost GST u vodenoj leći tretiranoj nAg bila je statistički značajno povećana u odnosu na kontrolne vrijednosti pri koncentracijama većim od 0,5 mg/L. Najveći porast aktivnosti tog enzima zabilježen je u vodenoj leći izloženoj koncentraciji nAg od 25 mg/L (2 puta veći u odnosu na kontrolu) (*Slika 24.*).

Isti trend porasta aktivnosti enzima je uočen i nakon tretmana sa iAg, a posebice pri koncentracijama 10 i 25 mg/L gdje je došlo do povećanja od 70 odnosno 80% u usporedbi s kontrolnim tretmanom (*Slika 23.*).

Usporedbom učinka nAg i iAg vidljivo je da iAg pri gotovo svim koncentracijama dovodi do značajno jače stimulacije aktivnosti GST u usporedbi s nAg, što je posebno uočljivo pri višim koncentracijama iAg (*Slika 23.*).



Slika 23. Aktivnost glutation-S-transferaze (GST; U/mg proteina) u vodenoj leći nakon 7 dana rasta na podlogama s dodatkom nanočestica srebra (nAg) ili srebrovog nitrata (iAg) u koncentracijama: 0,5; 1; 2; 5; 10 i 25 mg/L ili bez njihovog dodatka – kontrolne biljke (k). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju od kontrole ($p < 0,05$).

4.13. KEMOMETRIJSKE ANALIZE

4.13.1. Korelacije

U svrhu određivanja korelacija između izmjerenih parametara (izuzev sadržaja makro- i mikroelemenata) izračunat je Pearsonov koeficijent korelacije (*Tablica 4*).

Prema Evansu (1996) ako je koeficijent korelacije r_p između 0,00-0,19 radi se o jako slaboj korelaciji, od 0,20-0,39 slaboj korelaciji, od 0,40-0,59 umjerenoj korelaciji, od 0,60-0,79 jakoj korelaciji i od 0,80-1,00 o vrlo jakoj korelaciji.

Iz *Tablice 4*. vidljivo je da sadržaj Ag pokazuje vrlo jaku negativnu korelaciju sa sadržajem fotosintetskih pigmenata, stopom rasta, efektivnim prinosom PSII i ETR te sa sadržajem GSH. Vrlo jaka pozitivna korelacija utvrđena je između sadržaja Ag i aktivnosti GPOD, a jaka korelacija između sadržaja Ag i sadržaja ROS. Stopa rasta pokazuje vrlo jaku pozitivnu korelaciju s efektivnim prinosom PSII, ETR i sa sadržajem GSH a jaku pozitivnu korelaciju sa optimalnim prinosom PSII i sa sadržajem fotosintetskih pigmenata. Istovremeno stopa rasta snažno negativno korelira sa sadržajem ROS, MDA i aktivnosti GPOD.

Izuzev već navedenog odnosa sa gore spomenutim parametrima, sadržaj ROS pokazuje vrlo jaku negativnu korelaciju sa sadržajem fotosintetskih pigmenata i ETR, jaku negativnu korelaciju sa sadržajem GSH te jaku korelaciju sa aktivnosti GPOD.

Tablica 4. Matriks Pearsonovog koeficijenta za izmjerene parametre u vodenoj leći. Vrijednosti označene crvenom bojom pokazuju značajnu korelaciju na razini značajnosti $P \leq 0,05$.

	Ag	RGR-listić	RGR-sv.m	OPT PSII	EF PSII	NPQ	ETR	kl a	kl b	uk.kar.	prolin	MDA	CO	APOD	KAT	SOD	GPOD	GST	GSH
RGR-listić	-0.62165																		
RGR-sv.m	-0.59595	0.95962																	
OPT PSII	-0.45223	0.675851	0.739681																
EF PSII	-0.71217	0.927712	0.902172	0.671557															
NPQ	0.332452	-0.63101	-0.575767	-0.41167	-0.6435														
ETR	-0.75663	0.917868	0.88475	0.673005	0.975953	-0.57826													
kl a	-0.94969	0.744632	0.732358	0.532496	0.805172	-0.38616	0.85881												
kl b	-0.90425	0.8151	0.780091	0.542678	0.858424	-0.46499	0.899012	0.968908											
uk.kar.	-0.89974	0.808807	0.773416	0.550446	0.855552	-0.45097	0.901042	0.967563	0.991069										
prolin	0.54933	-0.59575	-0.589615	-0.63826	-0.62729	0.574481	-0.61356	-0.58731	-0.62157	-0.61247									
MDA	0.143604	-0.74878	-0.750452	-0.53735	-0.68087	0.481435	-0.65498	-0.29209	-0.35546	-0.36042	0.353659								
CO	-0.31234	0.40962	0.362191	-0.09697	0.395858	-0.18662	0.362929	0.367043	0.395423	0.371529	-0.02641	-0.13903							
APOD	0.469471	0.12866	0.136812	0.091613	0.086863	-0.42559	0.001562	-0.38105	-0.28216	-0.3114	0.025394	-0.46617	-0.05852						
KAT	0.373026	-0.02315	0.010849	0.232701	-0.05813	-0.38713	-0.09586	-0.35607	-0.31382	-0.32984	-0.15013	-0.23358	-0.49653	0.744809					
SOD	-0.28063	-0.17881	-0.178037	0.130114	-0.14065	0.024345	-0.08745	0.136977	0.069245	0.075885	-0.29555	0.42592	-0.46985	-0.40978	0.269846				
GPOD	0.902471	-0.71017	-0.653735	-0.45665	-0.81721	0.585017	-0.8487	-0.90468	-0.8907	-0.87958	0.599778	0.304778	-0.35798	0.161345	0.14729	-0.16011			
GST	0.490218	-0.57096	-0.555931	-0.51558	-0.67171	0.733465	-0.65725	-0.49591	-0.52669	-0.4947	0.586102	0.476978	-0.02282	-0.4444	-0.51677	-0.16859	0.720417		
GSH	-0.60291	0.817638	0.828669	0.743669	0.776316	-0.53032	0.790687	0.689885	0.717725	0.69718	-0.55673	-0.60913	0.009827	0.143206	0.183618	0.057402	-0.63672	-0.6419	
ROS	0.746991	-0.84447	-0.802061	-0.56869	-0.79076	0.382031	-0.83375	-0.82998	-0.8935	-0.89179	0.49209	0.495533	-0.39073	0.163705	0.230689	0.020937	0.71694	0.456017	-0.6845

Ag – sadržaj Ag u biljci, RGR-listić – stopa rasta izražena po broju listića, RGR-sv.m. – stopa rasta izražena po masi svježi tvari, OPT PSII – optimalni prinos PSII, EF PSII – efektivni prinos PSII, NPQ – nefotokemijsko gašenje fluorescencije, ETR – relativna stopa transporta elektrona: kl a – sadržaj klorofila a, kl b – sadržaj klorofila b, uk.kar. – sadržaj ukupnih karotenoida, prolin – sadržaj prolina, MDA – sadržaj malondialdehida, CO – sadržaj karbonilnih grupa, SOD – aktivnost superoksid dismutaze, GPOD – aktivnost gvajakol peroksidaze, GST – aktivnost glutation-S-transferaze, GSH – sadržaj glutatona, ROS – sadržaj reaktivnih oblika kisika.

5. RASPRAVA

U ovoj doktorskoj disertaciji uspoređivan je toksični učinak nAg i iAg na vodenu leću, *Lemna minor* L. Nanočestice utječu na rast biljaka i akumulaciju u hranidbenom lancu te na taj način remete homeostazu svakog organizma. U stresnim uvjetima, prilagodbe u cjelokupnom staničnom metabolizmu obuhvaćaju niz koordiniranih fizioloških procesa na staničnoj razini kojima se nastoji osigurati normalno funkcioniranje stanice za vrijeme trajanja stresa.

5.1. UČINAK nAg I iAg NA SADRŽAJ Ag I SADRŽAJ MAKRO- I MIKROELEMENATA

Vodena leća poznata je kao dobar akumulator teških metala jer ima iznimnu sposobnost i potencijal za akumulaciju iz vodenog okoliša (Khellaf i Zerdaoui, 2009; Kara i sur., 2003; Leblebici i Aksoy, 2011).

Rezultati istraživanja pokazuju linearan porast sadržaja Ag u biljkama s povećanjem koncentracije nAg, pri čemu je sadržaj Ag u vodenoj leći pri najvećoj koncentraciji nAg bio 100 puta veći u odnosu na kontrolne biljke. Kod biljne vrste *A. thaliana* također je uočeno povećanje sadržaja Ag u korijenu pri izlaganju višim koncentracijama nAg, dok kod izdanaka nije bilo razlike u akumulaciji Ag na tretmanima s različitim koncentracijama nAg (Geisler-Lee i sur., 2014).

U istraživanju Lee i sur. (2012), sadržaj Ag u poljoprivrednim kulturama *Phaseolus radiatus* (zlatni grah) i *Sorghum bicolor* (sirak) se povećavao sukladno s povećanjem koncentracija nAg, što je posebno uočeno u korijenu, dok u izdanku nije bilo u ovisnosti s povećanjem koncentracije. Također je uočena razlika u bioakumulaciji u ovisnosti o biljkama koje su uzgajane na umjetnoj podlozi (agar) i u tlu (zemlja). Kod tretiranih biljaka uzgajanih u zemlji uočena je slabija akumulacija Ag, što ukazuje na promjenu svojstava nanočestica u tlu njihovim vezanjem na različite komponente u tlu te posljedično na njihovu slabiju toksičnost (Lee i sur., 2012).

Vodena leća pokazuje ujedno i veliku sposobnost akumulacije iAg (u biljkama tretiranim s najnižom koncentracijom AgNO₃ 300 puta veća akumulacija u odnosu na kontrolu), te se također uočava linearni porast s povećanjem koncentracije iAg u podlogama. Sadržaj Ag u vodenoj leći *Spirodela polyrhiza* i u izdanku boražine *Borago officinalis* L. izloženim nAg i AgNO₃ također je bio povećan pri svim testnim

koncentracijama, iako je taj porast bio znatno veći pri tretmanima sa AgNO_3 (Jiang i sur., 2012; Seif Sahandi i sur., 2011). Znatno veća akumulacija Ag zabilježena je u korijenu luka izloženom AgNO_3 u usporedbi s nAg s različitim tipom površinskog omotača (Cvjetko i sur., 2017). Korijen duhana izložen različitim koncentracijama nAg i AgNO_3 (25, 50, 75, 100 i 500 μM) je također pokazao veliku sposobnost akumulacije Ag, dok je u listovima zabilježen znatno niži sadržaj Ag (30 do 100 puta niži sadržaj na tretmanima s nAg i 30 do 70 puta niži sadržaj na tretmanima s AgNO_3) u usporedbi s korijenom duhana (Cvjetko i sur., 2018). U radu Peharec Štefanić i sur. (2021) utvrđeno je da na akumulaciju Ag u listovima duhana bitno utječe tip površinskog omotača nAg. Naime, najveći porast Ag bio je zabilježen u listovima duhana izloženog nAg s omotačem CTAB (nAg-CTAB) i nAg s omotačem PVP (nAg-PVP) u odnosu na nAg s citratnim omotačem. Također, zanimljivo je da je akumulacija Ag u listovima duhana izloženog AgNO_3 bila niža nego u listovima duhana izloženog nAg-CTAB i nAg-PVP.

Zaključno, istraživanja pokazuju da biljke lakše akumuliraju Ag kada su izložene njegovom ionskom obliku što posljedično može dovesti do jačeg inhibicijskog učinka na staničnu diobu i na rast biljke (Seif Sahandi i sur., 2011; Jiang i sur., 2012; Cvjetko i sur., 2017, Peharec Štefanić i sur., 2021).

U ovom je istraživanju izuzev sadržaja Ag, u vodenoj leći određen i sadržaj pojedinih mikro- i makroelemenata (Ca, K, Mg, P, N, Fe) nakon 7-dnevnog izlaganja biljke tretmanima s nAg i AgNO_3 . Kod tretmana s nAg, uočen je porast sadržaja Ca i Fe, a sadržaji K, Mg i P bili su slični kontrolnim vrijednostima, dok je sadržaj N bio značajno smanjen samo na višim koncentracijama. Sličan utjecaj nAg na sadržaj N i P u vodenoj leći *S. polyrhiza* utvrđen je u istraživanju Jiang i sur. (2012), gdje je smanjenje N zabilježeno samo pri najvišim primijenjenim koncentracijama (5 i 10 mg/L), a sadržaj P se nije bitno razlikovao od kontrole. U tom je istraživanju Ag u ionskom obliku imalo sličan utjecaj na spomenuta hranjiva. U ovom je radu iAg uzrokovalo porast sadržaja Ca, P i Fe u odnosu na kontrolne biljke, sadržaji Mg i N nisu se razlikovali od kontrolnih vrijednosti, dok je sadržaj K bio smanjen. Rezultati dobiveni u ovom radu su djelomice suprotni rezultatima istraživanja Qian i sur. (2013) na uročnjaku, gdje je kod tretmana s nAg uočen pad sadržaja Ca i Fe, dok tretman s iAg nije utjecao na sadržaj mikro- i makroelemenata. Nadalje, Zuverza-Mena i sur. (2016) utvrdili su da je tretman s nAg veličine do 10 nm uzrokovao smanjenje sadržaja mikro- i makroelemenata (Ca, Mg, B, Cu, Mn, Zn) u klijancima rotkvice, što je posljedično utjecalo na smanjeni rast. Mogući razlozi u različitom utjecaju nAg i iAg na

vodu leću i gore spomenute biljne vrste prije svega bi se mogli objasniti u razlikama u veličini i površinskom omotaču korištenih nanočestica kao i u vrsti testne biljne vrste. Naime u spomenutim su istraživanjima korištene nAg manje veličine (manje od 10 nm) s citratnim omotačem i kopnene biljne vrste, dok su u ovom radu korištene veće nAg (oko 45 nm) s PVP-omotačem i vodena leća, poznata po svom potencijalu za nakupljanje teških metala.

5.2. UČINAK nAg I iAg NA RAST VODENE LEĆE

Biljke su sesilni organizmi koje su tijekom evolucije razvile niz morfoloških, fizioloških i biokemijskih prilagodbi u odgovoru na stresne učinke okoliša. Prilagodbe na pojedine vrste stresa su specifične, što se može objasniti činjenicom da različite vrste abiotičkih čimbenika djeluju na različite fiziološke procese ili na različite ciljne molekule očitujući se u morfološkim prilagodbama specifičnim za pojedini stresni čimbenik. Iako različite vrste stresa mogu inducirati specifičan odgovor biljke, u većini slučajeva taj je odgovor nespecifičan, tj. nije karakterističan za pojedinu vrstu stresa. Primjer za to je oksidacijski stres koji se javlja u većini nepovoljnih stresnih uvjeta koje mogu izazvati različiti abiotički čimbenici (Mittler, 2002). Prema nekim autorima i inhibicija rasta se može ubrojiti u kategoriju tzv. morfogenih prilagodbi kao općeniti odgovor biljke na stanje stresa (Potters i sur., 2007).

U ovom istraživanju tijekom 7-dnevnog izlaganja vodene leće nAg i iAg uočene su morfološke promjene (razdvojene kolonije, oštećeni korjenčići i nekroza listića), što je upućivalo na negativan učinak nAg i iAg na rast vodene leće. Koncentracija nAg od 25 mg/L je uzrokovala potpunu inhibiciju stope rasta vodene leće, no i niže koncentracije (2-5 mg/L) su također uzrokovale značajno smanjenje stope rasta vodene leće. iAg je pri svim koncentracijama uzrokovalo znatnu inhibiciju stope rasta i u odnosu na kontrolu i tretmane s nAg, a potpunu inhibiciju rasta već pri koncentraciji od 10 mg/L. Općenito, inhibicija rasta biljke je posljedica nedostatnog unosa hranjivih tvari ili inhibicije fotosinteze, pri čemu dolazi do promjena u sadržaju fotosintetskih pigmenata i strukturi kloroplasta (Qian i sur., 2013). Smanjena stopa rasta utvrđena u odgovoru na nAg i iAg mogla bi se objasniti akumulacijom Ag u biljnim stanicama i povećanom produkcijom ROS i MDA jer su ti parametri pokazali jaku negativnu korelaciju sa stopom rasta (*Tablica 4.*). Također, uočena je jaka pozitivna korelacija između stope rasta i parametara fluorescencije klorofila a (efektivni prinos PSII, ETR)

te fotosintetskih pigmenata (*Tablica 4.*). Poznato je da smanjeni sadržaj fotosintetskih pigmenata rezultira usporenim razvojem fotosintetskog aparata i nižom stopom fotosinteze (Myśliwa-Kurdziel i Strzałka, 2002). Sniženje sadržaja klorofila i funkcionalnosti PSII kao rezultat oksidacijskog stresa uzrokovanog izlaganju nAg i iAg je stoga vjerojatno razlog smanjene stope rasta vodene leće.

Slično rezultatima ovog rada, u istraživanju Oukarroum i sur. (2013) nAg primijenjene u rasponu koncentracija 0,01-10 mg/L uzrokovale su smanjenje broja listića vodene leće *L. gibba* nakon 7 dana izlaganja. Inhibicijski učinak nAg s citratom kao površinskim omotačem na rast vodene leće također potvrđuju i istraživanja Gubbins i sur. (2011) gdje je također, nakon 7-dnevnog izlaganja koncentraciji od 160 µg/L, uočeno smanjenje broja listića *L. minor* za 50 % u usporedbi s tretmanima s koncentracijama do 40 µg/L. I u tom je istraživanju iAg primijenjeno pri istim koncentracijama kao i nAg pokazalo znatno jači inhibicijski učinak na povećanje broja listića, a pri koncentraciji od 40 µg/L je uzrokovalo potpunu inhibiciju rasta. Također su bile vidljive i značajne morfološke promjene. Učinak nAg i iAg na rast na dvije vrste vodene leće, *L. minor* i *S. polyrhiza*, proučavan je i u radovima Jiang i sur. (2012) i Pereira i sur. (2018), te je također utvrđeno da iAg uzrokuje višestruko snažniju redukciju stope rasta nego nAg (neovisno o tipu površinskog omotača).

U istraživanjima koja su provedena na biljnoj vrsti *Bacopa monnieri* korištene su biološki sintetizirane nAg i iAg i praćen je njihov učinak na rast i metabolizam biljke. Kod tretmana s nAg promjera oko 24 nm te u rasponu koncentracija od 100 ppb do 10 ppm nije uočen utjecaj na klijanje sjemena. S druge strane, AgNO₃ je pri koncentraciji od 10 ppm izazvao značajno smanjenje klijavosti, a pri 100 ppm potpunu inhibiciju klijanja (Krishnaraj i sur., 2012). Ovi rezultati su suprotni od rezultata istraživanja Yin i sur. (2011), koji su dokazali da nAg pri najnižim koncentracijama utječu na klijanje sjemena, produljenje i rast korijena kod biljne vrste višecvjetni ljulj (*Lolium multiflorum*). No, u tom su istraživanju korištene nAg manje veličine nego u istraživanju s vrstom *B. monnieri* (Krishnaraj i sur., 2012), što ukazuje da toksičnost ovisi o veličini nanočestica. Istraživanja učinka nAg i AgNO₃ na gorušicu također ukazuju na značajnu inhibiciju rasta korijena i izdanka s povećanjem koncentracije AgNO₃ (1-3 mM), dok je kod tretmana s nAg inhibicija rasta bila slabije izražena (Vishwakarma i sur., 2017). Kod biljne vrste *A. thaliana* uočen je privremeni zastoj razvoja pri izlaganju koncentraciji nAg od 300 µg/L, što je rezultiralo prolongiranim vegetativnom fazom biljke. Niža koncentracija nAg, 75 µg/L, nije uzrokovala značajne promjene u razvoju rozete, ali je

također uočen prolongirani vegetativni razvoj (Geisler-Lee i sur., 2014). Istraživanja djelovanja AgNO_3 na rast i razvoj biljaka ukazuju da iAg značajno utječe na regulaciju aktivnosti biljnog hormona etilena (Kumar i sur., 2009) na način da inhibira njegovu sintezu (Lau i Yang, 1976), što vodi do usporavanja rasta (Beyer, 1976).

Istražujući učinke nanočestica kobaltovog oksida (nCoO) i nZnO na luk (*Allium cepa*), Ghodake i sur. (2011) su također uočili povećanje fitotoksičnosti s povećanjem koncentracija tih nanočestica. Toksični učinak nCoO se ogledao u značajnoj redukciji rasta korijena nakon izlaganja od 72 sata, dok su nZnO uzrokovale potpunu inhibiciju rasta korijena pri koncentraciji od 20 mg/L. Inhibicijski učinak nAg i iAg je dokazan i na rastu nitrificirajućih bakterija, iako je najveću inhibiciju rasta pokazalo Ag u obliku nanočestica. Rast *E. coli* je također inhibiran pri višim koncentracijama (4 i 2 μM) nAg (Okkyoung i sur., 2008).

Budući da se tone Ag ispuštaju u okoliš kao posljedica industrijskog otpada vjeruje se da toksičnost Ag u okolišu potiče većinom od slobodnih Ag^+ u vodenom mediju (Prabhu i Poulouse, 2012), što dovodi do lakšeg nakupljanja u okolišu i ulaska u hranidbeni lanac. U ovom istraživanju, kao i ostalim istraživanjima, uočena je veća toksičnost iAg gdje već pri malim koncentracijama dolazi do inhibicije rasta, otpadanja korjenčića i nekroze listova kod vodene leće, dok je takav učinak nAg uočen kod većih koncentracija. Navedene morfološke promjene ukazuju da je došlo i do fizioloških i staničnih promjena.

5.3. UČINAK nAg I iAg NA FUNKCIONALNOST FOTOSINTETSKOG APARATA

U ovom istraživanju mjerena je funkcionalnost fotosintetskog aparata vodene leće određivanjem optimalnog i efektivnog prinosa PSII, vrijednosti NPQ i ETR. nAg i iAg su doveli do smanjenja optimalnog i efektivnog PSII, dok je znatno veće smanjenje prisutno kod tretmana s iAg i to pri svim koncentracijama. Kod NPQ značajno povišenje je vidljivo kod svih tretmana s dodatkom iAg. Također je zabilježena smanjena vrijednost ETR pri višim koncentracijama nAg (10 i 25 mg/L), dok je AgNO_3 uzrokovao smanjenje ETR sukladno porastu koncentracije. Do smanjenja ETR-a moglo je doći zbog kompetitivne supstitucije Cu iz plastocijanina s Ag (Jansson i Hansson 2008; Sujak, 2005). Parametri efektivni prinos PSII i ETR pokazuju vrlo jaku pozitivnu korelaciju sa sadržajem fotosintetskih pigmenata, a jaku negativnu korelaciju sa sadržajem ROS i MDA (Tablica 3). Na osnovu toga bi se moglo zaključiti da je

funkcionalnost PSII narušena nakupljanjem ROS i posljedičnim oštećenjima koji uključuju peroksidaciju lipida stanične membrane.

Istražujući utjecaj nAg na zelene alge *Chlorella vulgaris* i *Dunaliella tertiolecta*, Navarro i sur. (2008) i Oukarroum i sur. (2011) također su utvrdili njihov negativan učinak na PSII, što je posljedično rezultiralo jakim smanjenjem fotosinteze. Jiang i sur. (2017) su u vodenoj leći *S. polyrhiza* dokazali da nAg, ali i AgNO_3 utječu na fotosintezu jer je nakon 72 sata izlaganja pokazano da oba oblika Ag (posebice ionsko) inhibiraju optimalni prinos PSII pri koncentracijama od 5 mg/L. Smanjenje vrijednosti F_0 i F_m , vrijednosti maksimalne fluorescencije i sadržaja klorofila *a* ukazuju na smanjenje broja antenskih kompleksa i reakcijskih centara PSII (Consoli i sur., 2005; Krause i Weis, 1984). Značajno smanjenje vrijednosti F_m i efektivnog prinosa PSII je uočeno i kod zelene alge *Chlamydomonas reinhardtii* već pri koncentraciji od 0,5 mg/L nAg (Dewez i Oukarroum, 2012). Ovi rezultati nam ukazuju da su fotosintetski aparati pojedinih biljaka osjetljiviji na nAg od drugih. Višak energije se može raspršiti putem NPQ (Ralph i Gademann, 2005), kao što je uočeno kod *S. polyrhiza* nakon tretmana s iAg (Jiang i sur., 2017). U ovom je istraživanju također uočen porast vrijednosti NPQ u vodenoj leći pri višim koncentracijama nAg (10 i 25 mg/L), dok je kod tretmana sa iAg porast vrijednosti zabilježen pri svim koncentracijama (0,5-25 mg/L). Kod istraživanja utjecaja nAg različitih omotača i AgNO_3 na listove duhana generalno nije uočeno smanjenje optimalnog i efektnog prinosa PSII, dok su tretmani s nAg-PVP smanjili NPQ pri najvišim koncentracijama (100 μM) kao i svi tretmani s nAg-CTAB, što ukazuje da omotači kod nAg utječu na njihovu bioraspoloživost i unos (Peharec Štefanić i sur., 2021).

Rezultati dobiveni u ovom radu sukladni su i sa istraživanjima u kojima je proučavan utjecaj drugih metalnih nanočestica na vodenu leću. Primjerice, u istraživanju učinka nCuO na vodenu leću *L. gibba* L. i rižu također je utvrđen negativan učinak na fotosintetsku aktivnost (Perreault i sur., 2014; Costa i Sharma, 2016). U tim je istraživanjima zamijećena inaktivacija reakcijskih centara PSII, smanjenje transporta elektrona, stope fotosinteze te sadržaja fotosintetskih pigmenata. Kod istraživanja s nanočesticama silicijevog dioksida (SiO_2) uočeno je da pospješuju rast i razvoj biljaka povećavajući izmjenu plinova i parametre fluorescencije klorofila poput neto stope fotosinteze, stope transpiracije, aktivnosti PS II, optimalni i efektivni prinos PSII, ETR i (qP) (Siddiqui i sur., 2014; Xie i sur., 2011). Većina rezultata istraživanja ukazuju da

nAg inhibiraju foto-zaštitni kapacitet PSII te ujedno i potvrđuju ograničenja fotokemijske potrošnje energije biljaka izloženim nAg (Jiang i sur., 2017).

Klorofil je jedan od najvažnijih pigmenata za pretvorbu energije Sunčeve svjetlosti u organski ugljik. U ovom istraživanju nAg su pri koncentracijama 2-25 mg/L uzrokovale značajno smanjenje sadržaja klorofila, a kod tretmana s iAg značajno smanjenje sadržaja je vidljivo pri svim koncentracijama. Ovi rezultati su u skladu s rezultatima koje su dobili Qian i sur., (2013), gdje su nAg uzrokovale smanjenje sadržaja klorofila i poremetile strukturu tilakoidnih membrana u uročnjaku. Smanjenje sadržaja klorofila zabilježeno je i u vodenoj leći *S. polyrhiza* pod utjecajem nAg i iAg u rasponu koncentracija 0,5-10 mg/L (Jiang i sur., 2017). Nair i Chung (2014) su također u svojim istraživanjima zabilježili značajno smanjenje sadržaja klorofila u riži nakon 7-dnevnog izlaganja nAg. Mnoga istraživanja ukazuju da teški metali mogu izmijeniti cijeli niz fizioloških procesa, a posebice smanjiti sintezu fotosintetskih pigmenata (Hou i sur., 2007; Kanounboule i sur., 2009 Xing i sur., 2010). Vishwarkarma i sur. (2017) su kod biljne vrste *Brassica sp.* uočili smanjenje sadržaja klorofila kad tretmana s nAg i iAg pri koncentracijama od 1 i 3 mM, no smanjenje sadržaja ovih fotosintetskih pigmenata je kod tretmana s nAg ipak bilo manje u odnosu na kontrolu. Smanjenje sadržaja klorofila također je zabilježeno i kod duhana, gdje su tretmani s nAg (50 i 100 μ M nAg-PVP i nAg-CTAB) pokazali jače učinke u usporedbi s AgNO_3 , kod kojeg je tek kod tretmana s 100 μ M došlo značajnog smanjenja sadržaja pigmenata (Peharec Štefanić i sur., 2021). U svim istraživanjima je vidljiv značajan pad sadržaja klorofila na višim koncentracijama nAg i iAg što može biti posljedica inhibicije enzimske aktivnosti (Padmaja i sur., 1990), supstitucije iona Mg^{2+} s ionom teškog metala u molekuli klorofila (Küpper i sur., 2006), razgradnje membrane kloroplasta uslijed lipidne peroksidacije ili smanjene koncentracije antioksidansa (Prasad i Strzalka, 1999). Smanjenje sadržaja klorofila utječe na fotosintezu i uzrokuje da se višak elektrona kombinira s molekularnim kisikom stvarajući ROS koji mogu nepovratno oštetiti strukturu kloroplasta (Foyer i sur., 1994; Aarti i sur., 2006).

Izuzev negativnog utjecaja na klorofile, u ovom je radu zabilježen i negativan utjecaj nAg i iAg na karotenoide u vodenoj leći. Kod tretmana s nAg značajno smanjenje sadržaja ukupnih karotenoida je bilo vidljivo već pri koncentraciji od 2 mg/L, dok je iAg izazvalo znatno smanjenje tih zaštitnih pigmenata pri svim koncentracijama. Kod duhana izloženog tretmanima s nAg različitih koncentracija (25, 50 i 100 μ M) tijekom 7 dana također je uočen pad sadržaja karotenoida, dok je kod

tretmana s AgNO_3 značajno sniženje sadržaja karotenoida zabilježeno samo pri najvećoj testnoj koncentraciji (100 μM) (Peharec Štefanić i sur., 2021). Budući da su karotenoidi važni dijelovi fotosintetskog sustava, te imaju odlučujuću ulogu u zaštiti klorofila, smanjenje njihovog sadržaja također ukazuje na negativan učinak Ag u obliku i nanočestica i iona. Karotenoidi su i važan građevni element membrana kloroplasta i glavni „hvatač“ $^1\text{O}_2$. Karotenoidi također mogu apsorbirati i preuzeti višak energije pobuđene molekule klorofila te dodatno spriječiti nastajanje $^1\text{O}_2$, stoga je njihova uloga dvojaka: smanjivanje koncentracije postojećih molekula $^1\text{O}_2$, te sprečavanje nastajanja novih (Sinha i sur., 2007). Kao neenzimski antioksidansi, karotenoidi sudjeluju u zaštiti klorofila, ali i u očuvanju membrana kloroplasta budući da mogu reagirati s peroksilnim i alkoksilnim radikalima te zaustaviti lančanu reakciju peroksidacije (Sinha i sur., 2007; Halliwell i Gutteridge, 1984). Rezultati slični onima dobivenim u ovom radu su uočeni u klijancima repe izloženim iAg i nAg (Vishwakarama i sur., 2017).

5.4. UČINAK nAg I iAg NA POKAZATELJE OKSIDACIJSKOG STRESA

Toksičnost nAg je usko povezana sa njegovom transformacijom u biološkom i okolišnom mediju, uključujući površinsku oksidaciju, oslobađanje Ag^+ i interakciju s biološkim makromolekulama (Sanford i Venkatapathy, 2010). nAg mogu ući u interakciju s membranskim proteinima i aktivirati signalne puteve, što vodi do inhibicije stanične proliferacije. Također nAg može ući u stanicu difuzijom ili endocitozom uzrokujući disfunkciju mitohondrija, nakupljanje ROS, što vodi do oštećenja proteina i nukleinskih kiselina u stanici i na kraju inhibicije rasta (Roh i sur., 2012). Oksidacijski stres se javlja kada stvaranje ROS molekula prelazi kapacitet antioksidacijskog sustava stanice (McShan i sur., 2014).

Mnoga istraživanja pokazala su da je produkcija ROS značajno povišena nakon izlaganja biljaka nAg (Yan i Chen, 2019), pa se može zaključiti da je u mehanizam fitotoksičnosti nAg uključena povećana produkcija ROS što rezultira oksidacijskim stresom (Tripathi i sur., 2017). No i drugi teški metali, kao i različiti stresni čimbenici poput ekstremnih temperatura, suše, organskih onečišćivača, saliniteta, manjka ili suviška hranjiva često dovode do povećanja proizvodnje ROS ($^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 i $\text{OH}^\cdot$).

U ovom istraživanju je razina ROS detektirana primjenom fluorescentne boje DHE koja se primarno veže na $\text{O}_2^{\cdot-}$. Izlaganjem vodene leće tretmanima s nAg uočena je značajno povećana količina ROS pri koncentracijama 2-25 mg/L, dok je iAg izazvalo

značajan porast produkcije ROS pri svim koncentracijama u usporedbi s kontrolnim biljkama. U sličnim istraživanjima na velikoj vodenoj leći (*S. polyrhiza*) Jiang i sur. (2014) su pokušali utvrditi toksičnost nAg zbog sve veće komercijalizacije tih nanočestica i njihove prisutnosti u okolišu. U tom su radu utvrdili značajno nakupljanje ROS nakon izlaganja *S. polyrhiza* česticama nAg veličine 6 nm u koncentraciji od 1 do 10 mg/L (Jiang i sur., 2014), te se pretpostavlja da je došlo do povećanog stvaranja ROS u kloroplastima. Naime, većina zelene fluorescencije koja potječe od fluorescentne boje diklorofluorescina (ukazuje na ROS) se preklapala s crvenom fluorescencijom (autofluorescencija kloroplasta), što ukazuje da su kloroplasti izvor ROS kod *S. polyrhiza*. Izvor ROS, izuzev kloroplasta, su naravno i drugi organeli poput peroksisoma i mitohondrija (Jaspers i Kangasjärvi, 2010); u ovom radu utvrdili su i da nAg veličine 20 nm uzrokuju povećano stvaranje ROS, dok znatno veće čestice Ag (veličine 1 µm) nisu dovele do znatnijeg stvaranja ROS u toj vrsti vodene leće. Slične rezultate su dobili i Oukarroum i sur. (2013) nakon izlaganja vodene leće *L. gibba* 7 dana 1 i 10 mg/L nAg. Autori tog rada su zaključili da je nakupljanje Ag u stanici dovelo do povećanog stvaranja ROS, što je posljedično dovelo do smanjenja stanične vijabilnosti. Mirzajani i sur. (2013) su uočili da nAg ulaze u korijen riže pri većim koncentracijama (60 µg/ml) i izazivaju toksičan učinak, dok pri nižim koncentracijama ne ulaze u biljku te mogu imati i pozitivan učinak. Panda i sur. (2011) i Cvjetko i sur. (2017) su u svojim istraživanjima na luku zabilježili značajno povećanje O_2^- tretiranjem biljaka s nAg i iAg. Inhibicija rasta u gorušici na tretmanima s $AgNO_3$ također je povezana s povećanim stvaranjem ROS koji su odgovorni za lipidnu peroksidaciju i oksidaciju proteina (Vishwakarma i sur., 2017). U istraživanjima Lin i Xing (2007) utvrđeno je da nZnO kod ljulja također uzrokuju povećanje ROS. Kod biljke *Clarkia unguiculata* nTiO₂ i nCeO₂ inhibirale su asimilaciju CO₂ te je višak elektrona uzrokovao povećano stvaranje ROS (Conway i sur., 2015). Povećana količina ROS zabilježena je u tkivu korijena duhana nakon izlaganja 100 i 500 µM $AgNO_3$, dok nAg pri istim koncentracijama nije uzrokovao bitnu razliku u sadržaju ROS u odnosu na kontrolne biljke. Takvi rezultati mogu upućivati da je osjetljivost na nAg jako ovisna o biljnoj vrsti (Cvjetko i sur., 2018).

Većina staničnih biomembrana je izgrađena od polinezasićenih masnih kiselina koje su sastavni dijelovi galaktolipida koje nalazimo u tilakoidnim membranama, te fosfolipida koji izgrađuju ostale membrane u stanici. Polinezasićene masne kiseline vrlo su podložne procesu peroksidacije, u kojem između ostalog, razgradnjom lipidnih

hidroperoksida nastaju brojni reaktivni aldehidi (Moller i sur., 2007). Porast sadržaja MDA, kao pokazatelja lipidne peroksidacije, ukazuje na postojanje oksidacijskog stresa u biljci uslijed pojačanog toksičnog djelovanja ROS (Guan i sur., 2009).

Prema dobivenim rezultatima ovog istraživanja vidljiv je porast sadržaja MDA u vodenoj leći izloženoj nAg i nAg pri svim koncentracijama. Međutim, tretmani s iAg su uzrokovali znatno veći opseg lipidne peroksidacije (povećanje MDA od 83% pri 25 mg/L) u odnosu na nAg, a istovremeno otprilike podjednak porast ROS kao i tretman s nAg. Razlog tome bi možda mogla biti znatno smanjena aktivnost antioksidacijskih enzima APOD i KAT (koji razgrađuju H_2O_2 nastao djelovanjem SOD), drugih enzima (npr. urat oksidaze, NADPH oksidaze) ili brojnih metaboličkih procesa u organelima (transportni lanci elektrona, fotorespiracija, β -oksidacija masnih kiselina) (Karuppanapandian i sur., 2011). Jiang i sur. (2014) su u svom istraživanju zabilježili značajno povećanje sadržaja MDA u vodenoj leći *S. polyrhiza* tretiranoj s nAg veličine 6 nm pri koncentraciji od 5 mg/L, što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja. U istraživanju učinka $AgNO_3$ na izdanke jagode, Qin i sur. (2005) su detektirali povećan sadržaj MDA proporcionalno koncentracijama iAg. Istražujući učinak iAg i nAg s različitim omotačima, Cvjetko i sur. (2017) su utvrdili povećan sadržaj MDA u korijenu luka na svim tretmanima. U korijenu duhana nije zabilježena razlika u sadržaju MDA na svim tretmanima s nAg, dok je do povećanja sadržaja MDA došlo kod većine tretmana s iAg; s druge strane, u listovima duhana je uočeno značajno povećanje sadržaja MDA kod viših koncentracija nAg (500 μM) i iAg (100 i 500 μM) (Cvjetko i sur., 2018). Sadržaj MDA je bio povišen na svim tretmanima (0,05-0,20 mg/L) i u istraživanju učinka teških metala (Fe, Cu i Zn) na cijanobakteriji *Spirulina platensis* (Choudhary i sur., 2007). U istraživanju učinka nAl_2O_3 na pšenici je također uočen isti trend povećanja sadržaja MDA na svim tretmanima (Yanik i Vardar, 2018).

Većina proteinskih modifikacija predstavlja ireverzibilnu kovalentnu modifikaciju proteina s izuzetkom nekoliko aminokiselina koje sadrže atom sumpora (S) i kod kojih modifikacije mogu biti reverzibilne (Ghezzi i sur., 2003). ROS mogu oštetiti proteine bilo direktno oksidacijom aminokiselinskih ostataka (His, Arg, Pro, Lys, Trp i Thr) ili indirektno sekundarnim reakcijama s aldehydним produktima lipidne peroksidacije. U ovom je istraživanju oštećenje proteina procijenjeno određivanjem sadržaja karbonilnih grupa, koje su najčešće korišten marker oksidacije proteina uzrokovane ROS u biljkama izloženim različitim stresnim čimbenicima (Anjum i sur., 2015). Nakon 7-dnevnog izlaganja vodene leće tretamina s nAg, uočen je značajan porast sadržaja

karbonila samo pri koncentracijama od 2 i 5 mg/L. S druge strane, iAg neovisno o koncentraciji nije dovelo do povećane oksidacije proteina u odnosu na kontrolne biljke i tretmane s nAg. Suprotno tome, Cvjetko i sur. (2017) su uočili porast karbonilnih grupa u korijenu luka tretiranom bilo iAg ili nAg (neovisno o tipu proteinskog omotača) pri koncentracijama 75 i 100 μM (što je otprilike 8 i 11 mg/L) tijekom 72 h. U drugom istraživanju, nAg-citrat nisu uzrokovala karbonilaciju proteina u listovima i korijenu duhana nakon 7 dana izlaganja ni pri koncentraciji većoj od 50 mL, dok je pod utjecajem AgNO_3 pri svim koncentracijama zamijećena oksidacija proteina (Cvjetko i sur. 2018).

U ovom istraživanju su nAg i iAg, neovisno o koncentraciji, izazvali značajno smanjenje sadržaja GSH, mjerenog putem fluorescentne boje MCB koja se veže na neproteinske tiole. No, iAg je pri najvišim koncentracijama (10 i 25 mg/L) uzrokovalo znatno jače smanjenje GSH u vodenoj leći u usporedbi s nAg. Obzirom da je utvrđena jaka negativna korelacija GSH sa sadržajem Ag, ROS, MDA i aktivnosti GST, moglo bi se zaključiti da se taj antioksidans vjerojatno troši za detoksikaciju suviška ROS nastalih nakupljanjem Ag, zatim u reakcijama enzima GST gdje služi kao supstrat, te za stvaranje fitohelatina. Naime, reducirani GSH je prekursor fitohelatina koji na sebe vežu metale i odvođe ih u vakuolu. Metali se vežu na $-\text{SH}$ helirajući grupu cisteina i nastaju kompleksi čime je spriječena slobodna cirkulacija metala u citosolu (Rouhier i sur., 2008). Nakon izlaganja uročnjaka različitim koncentracijama kadmijevog klorida (CdCl_2), zamijećeno je smanjenje sadržaja GSH u ovisnosti o koncentracijama iona Cd te je najviši pad uočen kod najviše koncentracije Cd od 400 μM (Xiang i Oliver, 1998), što je sukladno rezultatima dobivenim u ovom radu. Istraživanja učinka nTiO_2 (do 1000 $\mu\text{g/L}$) na luku nisu pokazala značajna odstupanja sadržaja GSH u odnosu na kontrolne biljke nakon 24h izlaganja što ukazuje na nedostatak toksičnog potencijala nTiO_2 u ovom slučaju (Cox i sur., 2016).

Osim što ima ulogu u osmotskoj prilagodbi i zaštiti proteina tijekom stresa, smatra se da prolin ima i funkciju ublažavanja štetnih učinaka ROS kod bakterija, životinja i biljaka odnosno da služi kao neenzimski antioksidans, a potencijalno i inhibitor programirane smrti stanice (Chen i Dickman, 2005; Szabados i Savouré, 2010). Naime, pokazano je da prolin u izoliranim tilakoidnim membranama može smanjiti štetno djelovanje $^1\text{O}_2$ i $\cdot\text{OH}$ na PSII. Također, povećana biosinteza prolina u kloroplastima tijekom stresa može održavati niski omjer $\text{NADPH} : \text{NADP}^+$, doprinijeti transportu elektrona između fotosustava i smanjiti oštećenje fotosintetskog aparata

osiguravajući staničnu homeostazu (Szabados i Saviouré, 2010). Brojna istraživanja bilježe značajnu akumulaciju prolina u uvjetima solnog stresa (Kumar i sur., 2008), suše (Grzesiak i sur., 2013), toplotnog stresa (Babu i Devraj, 2008), stresa uzrokovanog teškim metalima (Theriappan i sur., 2011), UV zračenja (Saradhi i sur., 1995) i biotičkog stresa (Haudecoeur i sur., 2009). Akumulacija te aminokiseline može biti posljedica njene povećane sinteze ili smanjene degradacije (Gill i Tuteja, 2010).

U ovom istraživanju je također uočen porast akumulacije prolina nakon 7 dana izlaganja vodene leće nAg i AgNO₃. No, dok je nAg dovelo do porasta sadržaja prolina samo pri koncentracijama od 10 i 25 mg/L u odnosu na kontrolne biljke, iAg je uzrokovalo višestruko veći porast prolina pri svim koncentracijama u usporedbi s nAg. Na temelju Pearsonovog koeficijenta, vidljivo je da prolin pokazuje umjereno pozitivnu korelaciju sa sadržajem Ag, GPOD, ROS i GST, a s parametrima rasta i funkcionalnosti fotosintetskog aparata i GSH umjereno negativnu korelaciju (*Tablica 4*). Te korelacije pokazuju da se prolin nakuplja sukladno povećanju Ag u stanici, ali i ROS, što ne ukazuje na vjerojatnu ulogu prolina kao neenzimskog antioksidansa. Međutim, u ovom je istraživanju sadržaj ROS utvrđen putem DHE koji se prvenstveno veže na O₂⁻, a dokazano je da prolin prije svega „gasi“ ¹O₂ (Matysik i sur., 2002), pa bi stoga trebalo više podataka da se procijeni uloga prolina kao antioksidansa. Također, negativna korelacija između prolina i rasta i fotosintetskih pokazatelja potencijalno upućuje da prolin značajno ne smanjuje oštećenje fotosintetskog aparata. Nadalje, negativna korelacija između prolina i GSH bi mogla upućivati na zaključak da se glutamat pojačano troši u biosintezi prolina, a manje u sintezi GSH *de novo*. Uloga prolina kao molekularnog šaperona u zaštiti proteina također u ovom istraživanju nije dokazana jer, s jedne strane aktivnost antioksidacijskih enzima SOD, KAT i APOD je u odgovoru na iAg bilo znatno smanjena, a s druge strane nije utvrđena značajna karbonilacija proteina. I najzad, i prijašnja istraživanja pokazuju da nakupljanje prolina često dovodi do smanjenog rasta, što se objašnjava time da prolin djeluje kao signalna/regulacijska molekula sposobna aktivirati više odgovara koji su dio adaptacijskog procesa (Maggio i sur., 2002). U istraživanju Barbasz i sur. (2016) također je uočen značajan porast prolina u kalusu pšenice izložene nAg i iAg pri koncentracijama od 20, 40 i 60 mg/L. Isti trend je uočen i u istraživanjima Sidiqi i sur. (2019) gdje je mrkva tretirana s nanočesticama ZnO te je pri koncentracijama od 0,1 i 0,5 mg/mL uočen značajan porast sadržaja prolina. U korijenu pšenice tretirane s nAl₂O₃ sadržaj prolina se

povećavao linearno s povećanjem koncentracija (5, 25 i 50 mg/mL) tih nanočestica (Yanik i Vardar, 2018).

U ovom radu istražena je i aktivnost antioksidacijskih enzima SOD, KAT, APOD i GPOD čija je uloga da štite stanicu od oksidacijskog stresa inaktivirajući slobodne radikale, te je njihova aktivnost stoga dobar pokazatelj stresa izazvan okolišnim zagađenjem. Rezultati ovog rada su pokazali da su nAg uzrokovale porast aktivnosti SOD, te posebice KAT i APOD, dok je iAg dovelo do smanjenja njihove aktivnosti gotovo pri svim koncentracijama. Smatra se da bi porast aktivnosti tih enzima mogao predstavljati sekundarni obrambeni mehanizam biljke protiv oksidacijskog stresa (Sanitá di Toppo i Gabbrielli, 1999), dok se smanjenje aktivnosti pojedinih antioksidacijskih enzima povezuje s vezanjem teških metala na ključna mjesta u enzimu (Stroinski i Kozłowska, 1997).

Metaloenzim SOD je najučinkovitiji enzimski antioksidans prisutan u svim aerobnim organizmima i svim subcelularnim odjeljcima i predstavlja prvu liniju obrane protiv toksičnog učinka povišenih razina ROS, pa je stoga vrlo važan u toleranciji biljke na stres (Gill i Tuteja, 2010). Tijekom ovog istraživanja, nakon 7 dana izlaganja vodene leće nAg, primijećen je porast aktivnosti SOD pri koncentracijama od 0,5, 1 i 5 mg/L, dok više koncentracije nisu značajno utjecale na aktivnost tog enzima u odnosu na kontrolu. S druge strane, AgNO₃ je izazvao inhibiciju aktivnosti SOD na svim tretmanima u odnosu na kontrolu. Utvrđena je umjerena pozitivna korelacija između SOD i MDA (Tablica 4), što bi moglo upućivati da se H₂O₂ nastao djelovanjem tog enzima nije sav razgradio nego je djelomice prešao u ·OH koji je doveo do lipidne peroksidacije, što je vidljivo kod učinka AgNO₃. Porast MDA, ali uz nepromijenjenu aktivnost SOD zabilježen je i u listovima duhana izloženom iAg tijekom 7 dana (Cvjetko i sur., 2018). Istovremeno, nAg nisu izazvale promjene u sadržaju MDA i aktivnosti SOD u listovima duhana. Zou i sur. (2016) su u vodenoj leći *Wolffia globosi*, izloženoj nAg tijekom 24 h, zabilježili porast aktivnosti SOD kao i sadržaja MDA, posebice pri koncentraciji 10 mg/L. Istraživanja toksičnosti nAg u vodenoj leći *Spirodela punctata* izloženoj tijekom 4 dana pokazuju povećanje aktivnosti SOD pri koncentracijama 0,01 i 1000 mg/L i smanjenje aktivnosti enzima pri koncentracijama od 0,1 i 1 mg/L, dok je izlaganje od 14 dana nAg uzrokovalo inhibiciju tog enzima pri svim koncentracijama (Thwala i sur., 2013). Ovi rezultati su djelomice slični rezultatima i ovog istraživanja, što upućuje da je vjerojatno došlo do inaktivacije enzima uslijed pojačanog stvaranja ·OH koji sprečavaju daljnje stvaranje SOD (Parlak i Yilmaz, 2013). nZnO su također

inhibirale aktivnost SOD pri najnižim koncentracijama, dok je povećanje aktivnosti tog enzima zabilježeno pri najvećoj koncentraciji od 1000 mg/L (Thwala i sur., 2013). Barbasz i sur. (2016) su proveli istraživanje učinka nAg i iAg na dvije sorte pšenice. Kod tolerantnije sorte pšenice, ni nAg ni AgNO₃ nisu utjecali na aktivnost SOD, što može ukazivati na uključenost drugih antioksidansa (poput GSH) u zaštitu stanica. U tom je istraživanju aktivnost SOD u osjetljivoj sorti pšenice rasla u ovisnosti o koncentraciji Ag, neovisno o tome da li se radilo o nanočesticama ili ionskom obliku. Filek i sur. (2008) u istraživanju utjecaja Cd na uljanu repicu također su zabilježili nespecifične degradacije u aktivnosti SOD; naime, pri tretmanima s 400 i 600 µM Cd došlo je do smanjenja aktivnosti SOD u izdanku u odnosu na kontrolne biljke, dok je u korijenu aktivnost tog enzima bila povišena pri višim koncentracijama Cd.

Smatra se da APOD ima jednu od najbitnijih uloga u „čišćenju“ ROS i zaštiti stanica u viših biljaka, algi i drugih organizama. Njena uloga je vezana uz redukciju H₂O₂ do vode uz askorbat kao donor elektrona (Gill i Tuteja, 2010). Ti su enzimi prisutni u različitim dijelovima stanice - stromi i tilakoidama kloroplasta, mikrotijelima i citosolu (Asada, 1992). U ovom istraživanju, aktivnost APOD je bila značajno povećana u vodenoj leći izloženoj koncentracijama nAg većim od 0,5 mg/L, a posebice pri najvišoj koncentraciji. Suprotno tome, iAg je uzrokovalo inhibiciju aktivnosti tog enzima (izuzev pri najnižoj koncentraciji) sukladno porastu koncentracije AgNO₃. Obzirom da je oksidacijsko oštećenje lipida bilo najveće u biljkama tretiranim s iAg, inhibicija APOD je vjerojatno posljedica povećanog stvaranja ROS uslijed visokih koncentracija Ag nakupljenog u stanicama vodene leće. Na takav zaključak upućuje i Pearsonov koeficijent koji pokazuje umjerenu negativnu korelaciju između APOD i MDA. Rezultati istraživanja utjecaja nAg i iAg u klijancima gorušice (*Brassica sp.*) pokazuju inhibiciju enzima APOD na tretmanima s oba oblika Ag, no u tom su radu upotrijebljene vrlo visoke koncentracije (oko 100 i 300 mg/L) (Vishwakarma i sur., 2017). Suprotno tome, u istraživanju Cvjetko i sur. (2017) utvrđena je veća inhibicija APOD u korijenu luka u odgovoru na nAg u usporedbi s iAg, no takvi su rezultati vjerojatno povezani s veličinom i nabojem nAg te tipom omotača (nAg-CTAB i nAg-PVP manji od 10 nm i jako negativni ζ-potencijal nAg-citrat). Inhibitorski učinak nAg i AgNO₃ na aktivnost APOD je zabilježena i u istraživanjima na korijenu duhana, gdje je kod viših koncentracija (100 i 500 µM) vidljiv značajan pad aktivnosti APOD (Cvjetko i sur., 2018). Istraživanja toksičnosti Cd na krutoj vošćiki (*Ceratophyllum demersum*) (Aravind i

Prasad, 2003) i smeđoj gorušici (Mobin i Khan, 2007) bilježe povećanu aktivnost APOD.

Nespecifične peroksidaze sudjeluju u katabolizmu indol-3-octene kiseline i imaju važnu ulogu u biosintezi lignina i suberina, u obrani od biotičkog i abiotičkog stresa uklanjanjem peroksida te u senescenciji (Halušková i sur., 2010). Imaju afinitet prema aromatskim elektron donorima poput gvajakola i pirogalola. Aktivnost GPOD ovisi o biljnoj vrsti i stresnim uvjetima (Aravind i Prasad, 2003). U ovom istraživanju aktivnost GPOD u vodenoj leći izloženoj koncentracijama nAg do 10 mg/L bila je slična onoj u kontrolnim biljkama, a značajan porast aktivnosti zapažen je tek pri koncentracijama od 10 i 25 mg/L. Suprotno tome, iAg je uzrokovalo snažan porast aktivnosti GPOD sukladno koncentraciji, a posebice je to bilo vidljivo pri najvišoj koncentraciji gdje je aktivnost bila 12 puta veća u odnosu na kontrolu i četiri puta veća u odnosu na najvišu koncentraciju nAg. Indukcija aktivnosti tog enzima je bila sukladna nakupljanju Ag u vodenoj leći, na što ukazuje vrlo jaka korelacija između GPOD i sadržaja Ag (*Tablica 4*). Također je uočena vrlo jaka ili jaka negativna korelacija između tog enzima i parametara fotosintetskog aparata (efektivni prinos PSII, ETR, sadržaj pigmenata) i stope rasta, što upućuje na ulogu tog enzima u inhibiciji rasta. Naime, istraživanja su pokazala značajnu korelaciju između inhibicije rasta uzrokovane teškim metalima i povećanog sadržaja lignina u korijenu biljaka (Chen i sur., 2002; Lin i sur., 2005). Također, utvrđeno je da neke izoforme POD u prisutnosti Mg^{2+} i fenolnih komponenti uz NADH kao substrat mogu sudjelovati i u produkciji H_2O_2 (Mäder i sur., 1980). U radu Halušková i sur. (2010) istraživana je oksidativna i peroksidativna aktivnost POD u korijenu ječma izloženog teškim metalima (Cd, Cu, Hg, Ni, Pb) te je općenito utvrđena indukcija POD, ali i indukcija izoformi POD uključenih u produkciju H_2O_2 . Autori su zaključili da je aktivacija nekih izoformi POD vjerojatno povezana s povećanom produkcijom H_2O_2 i lignifikacijom kao obrambenim mehanizmom u odgovoru na stres uzrokovan teškim metalima te da je utvrđeni obrambeni odgovor praćen inhibicijom rasta korijena zbog povećanja krutosti stanične stijenke. U ovom radu utvrđena je i značajna pozitivna korelacija između GPOD i ROS, što govori u prilog hipotezi da je GPOD možda i u vodenoj leći uključen u stvaranje H_2O_2 . Povećanje aktivnosti GPOD u različitim biljnim vrstama (luk, duhan i bob) uočeno je i u istraživanju učinka nZnO (Ghosh i sur., 2016). Porast aktivnosti GPOD pod utjecajem Cd u rasponu koncentracija 7,5-15 mg/kg zabilježen je i u smreki nakon 15 dana izlaganja (Radotić i sur., 2000).

Enzim KAT je tetramerni hem sadržavajući enzim koji ima potencijal direktne dismutacije H_2O_2 u H_2O i O_2 i neophodna je za detoksifikaciju ROS u stresnim uvjetima (Garg i Manchanda, 2009). Ti su enzimi vrlo aktivni, naime jedna molekula KAT može pretvoriti približno 6 miliona molekula H_2O_2 u H_2O i O_2 po minuti. KAT je važan enzim u uklanjanju H_2O_2 generiranog u peroksisomima oksidazom uključenom u β -oksidaciju masnih kiselina, fotorespiraciju i katabolizam purina (Gill i Tuteja, 2010). Aktivnost KAT u vodenoj leći je pokazala sličan trend promjene aktivnosti kao APOD, što pokazuje i jaka pozitivna korelacija između APOD i KAT (*Tablica 4*). Naime, pri koncentraciji nAg većoj od 1 mg/L zamijećen je porast aktivnosti KAT, dok niže koncentracije nisu utjecale na aktivnost tog enzima. Slično tome, nAg s 2 različita tipa omotača (citrat i PVP) nisu utjecale na aktivnost KAT do koncentracije od 0,8 mg/L nakon 1 tjedan i 2 tjedna izlaganja (Pereira i sur., 2018). S druge strane, AgNO_3 je u ovom radu u koncentracijama većim od 1 mg/L doveo do inhibicije KAT u vodenoj leći. Pad aktivnosti KAT zabilježen je i u listovima duhana i repe u odgovoru na iAg ali i na nAg (Vishwakarama i sur., 2017; Cvjetko i sur., 2018). S druge strane, porast aktivnosti KAT je uočen u krumpiru nakon izlaganja i nAg i iAg pri koncentracijama do 10 mg/L (Bagherzadeh Homaei i Ehsanpour, 2016). U istraživanju učinka Cd na trsku u koncentracijama od 50 i 100 μM , aktivnost KAT se nije promijenila u odnosu na kontrolu (Iannelli i sur., 2002), dok je u riži tijekom 24 h izlaganja taj teški metal izazvao povećanu aktivnost pri koncentracijama od 5 mM i 100 μM (Hsu i Kao, 2004).

GSH su raznolika grupa enzima koja katalizira konjugaciju elektrofilnih ksenobiotičkih supstrata s GSH. Biljne GST imaju ulogu u detoksifikaciji herbicida, hormonskoj homeostazi, izdvajanju antocijana u vakuolu, metabolizmu tirozina, detoksifikaciji H_2O_2 , regulaciji apoptoze i abiotičkom stresu (Dixon i sur., 2010). GST mogu reducirati H_2O_2 uz pomoć GSH i producirati „čistače“ citotoksičnih i genotoksičnih komponenti (Gill i Tuteja, 2010). GSH sudjeluje u održavanju redoks-ravnoteže, stoga smanjenjem kritične količine GSH u stanici dolazi do nakupljanja ROS (Mittler, 2002). Osim navedenog, GSH ima važnu ulogu u regeneraciji reduciranog askorbata, glavnog antioksidansa u biljnim stanicama (Rhouhier, 2008), ali i u sintezi fitohelatina. U vodenoj leći izlaganoj nAg i iAg utvrđen je značajan porast aktivnosti GST pri koncentracijama većim od 0,5 mg/L. Međutim, puno jača indukcija tog enzima u vodenoj leći zapažena je pod utjecajem iAg (povećanje 70-80 % pri 10 i 25 mg/L). Jaka negativna korelacija GST i sadržaja GSH, ukazuje da se reducirani GSH oksidira u reakcijama enzima GST gdje služi kao supstrat. U istraživanju Pereira

i sur. (2018), utvrđeno je da nAg, ovisno o koncentraciji i tipu omotača, ili ne utječu ili dovode do porasta tog enzima u vodenoj leći. Hassan i sur. (2018) su tretirali pšenicu s nZnO te je pri koncentracijama 0,75 i 1 mg/L uočena pojačana aktivnost GST, što je u skladu s ovim istraživanjem. Također i u istraživanjima učinka nCeO₂ i In₂O₃ na uročnjaku, uočen je porast aktivnosti GST pri većim koncentracijama nanočestica (1000 mg/L) (Ma i sur., 2016). Učinak teških metala na aktivnost GST u rotkvici ukazuje na njenu pojačanu aktivnost u uvjetima stresa (Sharma i sur., 2014). Dixit i sur. (2001) su u istraživanju učinka metala Cd na grašak također zabilježili povećanu aktivnost GST u korijenu biljke nakon izlaganja 4 i 40 µM Cd u usporedbi s kontrolnim biljkama, a dok je u listovima riže djelovanjem CdCl₂ došlo do smanjenja sadržaja GSH (Hsu i Kao, 2004).

Zaključno, diferencijalna aktivnost enzima zabilježena u brojnim istraživanjima nam ukazuje da porast ili pad aktivnosti antioksidacijskih enzima nije ovisan samo i intenzitetu stresa nego i o njegovom trajanju, starosti biljke i tipu tkiva (Benavides i sur., 2005).

Pregledom istraživanja, a ujedno i ovim istraživanjem, dokazano je da nAg i iAg uzrokuju oksidacijski stres u biljaka, što vodi do pojačane proizvodnje ROS, te posljedično promjene u aktivnosti antioksidacijskog sustava. Da bi se nosile sa stresom biljke povećavaju produkciju antioksidacijskih molekula (Sharma i sur., 2012). Usporedbom djelovanja nAg i iAg, može se zaključiti da su oba oblika Ag toksična, ali je ionski oblik znatno toksičniji za vodenu leću. *L. minor* je pokazala jako dobar kapacitet za akumulaciju Ag, koje je ipak pri većim koncentracijama onemogućilo njenu sposobnost da poveća svoj obrambeni mehanizam.

6. ZAKLJUČAK

Ovim je radom utvrđeno:

I. nAg i iAg su toksični za vodenu leću

- zaključak je utvrđen na temelju rezultata slijedećih parametara:

- znatne bioakumulacije Ag u biljkama u odgovoru na oba oblika Ag
- morfoloških promjena koje su se u uvjetima stresa očitovale u obliku inhibicije rasta, raspadanja kolonija, nekroze listića i otpadanja korjenčića
- promjena u sastavu određenih mikro- i makroelemenata
- smanjenja funkcionalnosti PSII (smanjen optimalni i efektivni prinos PSII, i ETR) i sadržaja fotosintetskih pigmenta

II. mehanizam toksičnosti oba oblika Ag uključuje oksidacijski stres

- zaključak je utvrđen na temelju rezultata slijedećih parametara:

- porasta sadržaja ROS (prvenstveno O_2^-)
- porasta sadržaja MDA, pokazatelja lipidne peroksidacije
- porasta sadržaja karbonila, pokazatelja oksidacijskog oštećenja proteina u odgovoru na nAg
- porasta sadržaja aminokiseline prolina
- sniženja sadržaja GSH, tripeptida neophodnog za detoksikaciju uslijed izlaganja ksenobioticima i teškim metalima
- promjena u aktivnostima antioksidacijskih enzima SOD, KAT i APOD u uvjetima stresa
- porasta aktivnosti GST koji je uključen u detoksikaciju teških metala

III. iAg je toksičnije od nAg

- zaključak je izveden na temelju rezultata mjerenih parametara jer je u vodenoj leći izloženoj iAg u usporedbi s nAg utvrđen(a):

- višestruko veći sadržaj Ag
- znatno veća inhibicija rasta i funkcionalnost fotosintetskog aparata
- bitno veći opseg lipidne peroksidacije
- inhibicija aktivnosti enzima SOD, KAT i APOD
- snažnija aktivacija enzima GST

IV. vodena leća je pokazala izuzetan kapacitet za nakupljanje Ag

7. ŽIVOTOPIS

Katarina Glavaš Ljubimir rođena je 29. studenog 1981. godine u Splitu, Hrvatska. Na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu (PMF) 2006. godine je diplomirala na smjeru diplomirani inženjer biologije – ekologija. Od 2006. do 2008. je radila u Glavnom vodnogospodarskom laboratoriju Hrvatskih voda u Zagrebu kao samostalni inženjer (hidrobiolog). Od listopada 2008. do 2013. je bila zaposlena na Botaničkom zavodu (Laboratorij za fiziologiju bilja), Biološki odsjek PMF-a u svojstvu znanstvenog novaka – asistenta na projektima „Molekularni mehanizmi odgovora hrvatskih endemičnih i rijetkih biljaka na stres“ i „Mikropropagacija, ex situ zaštita i očuvanje genofonda biljne vrste *Fritillaria meleagris* L“. Kao asistent sudjelovala je u izvođenju praktikumske nastave iz kolegija Fiziologije bilja. Katarina Glavaš Ljubimir je 2008. godine upisala poslijediplomski doktorski studij Biologije na PMF-u. Tijekom godina rada je svladala tehnike kulture biljnog tkiva i laboratorijske tehnike iz područja biljne fiziologije i ekotoksikologije. 2009. godine, je u sklopu stipendije poslijediplomskog dokorskog studija, boravila na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Padovi (Italija). Od studenog 2013. zaposlena je u Zavodu za javno zdravstvo Dubrovačko-neretvanske županije na mjestu stručnog suradnika, gdje je savladala vještine analize peludi i humane mikrobiologije. Od kolovoza 2015. do danas zaposlena je Vodnogospodarskom odjelu Hrvatskih voda u Splitu na mjestu samostalnog inženjera u Službi zaštite voda. 2016. godine nastavlja doktorski studij i upisuje drugu godinu poslijediplomskog dokorskog studija Biologije na PMF-u.

8. LITERATURA

Aarti PD, Tanaka R, Tanaka A (2006) Effects of oxidative stress on chlorophyll biosynthesis in cucumber (*Cucumis sativus*) cotyledons. *Physiologia Plantarum* 128, 186-197

Aebi H (1984) Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology* 105, 121-126A

Amde M, Liu J-F, Tan Z-Q, Bekana D (2016) Ionic liquid-based zinc oxide nanofluid for vortex assisted liquid liquid microextraction of inorganic mercury in environmental waters prior to cold vapor atomic fluorescence spectroscopic detection. *Talanta* 149, 341-346.

Amde M, Liu J, Tan Z-Q, Bekana D (2017) Transformation and bioavailability of metal oxide nanoparticle in aquatic and terrestrial environments. A review. *Environmental Pollution* 230, 250-267

Anjum NA, Sofo A, Scopa A, Roychoudhury A, Gill SS, Iqbal M, Lukatkin AS, Pereira E, Duarte AC, Ahmad I (2015) Lipids and proteins-major targets of oxidative modifications in abiotic stressed plants. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 4099-4121

Almukhlifi HA, Burns RC (2016) The complete oxidation of isobutane over CeO₂ and Au/CeO₂, and the composite catalysts MO_x/CeO₂ and Au/MO_x/CeO₂ (Mⁿ⁺=Mn, Fe, Co and Ni): the effects of gold nanoparticles obtained from n-hexanethiolate-stabilized gold nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 415, 131-143

Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55, 373-99

Aravind P, Prasad MNV (2003) Zinc alleviates cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* L: a free-floating freshwater macrophyte. *Plant Physiology and Biochemistry* 41, 391-397

Arnon DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplast: polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24, 1-15

Arif N, Yadav V, Singh S, Tripathi DK, Dubey NK, Chauhan DK, Giorgetti L (2018) Chapter 13 - Interaction of copper oxide nanoparticles with plants: uptake, accumulation and toxicity. *Nanomaterials in Plants, Algae and Microorganisms* 297-

310. Editors: Triapthi DK, Ahmad P, Sharma S, Chauhan DK, Dubey NK; Academic Press

Asada K (1992) Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum* 55, 235-241

AshaRani PV, Kah Mun GL, Prakash Hande M, Valiyaveetil S (2008) Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* 2, 279-290

Aslani F, Bagheri S, Muhd Julkapli N, Juraimi AS, Hashemi FSG, Baghdadi A (2014) Effects of engineered nanomaterials on plants growth. An overview. *Scientific World Journal* 2014, Article ID 641759

Atha DH, Huanhua W, Peterson EJ, Cleveland D, Holbrook RD, Jaruga P, Dizdaroglu M, Xing B, Nelson BC (2012) Copper oxide nanoparticle mediated DNA damage in terrestrial plant models. *Environmental Science & Technology* 46, 1819-1827

Babu NR, Devraj VR (2008) High temperature and salt stress response in French bean (*Phaseolus vulgaris*). *Australian Journal of Crop Science* 2, 40-48

Bagherzadeh Homaee M, Ehsanpour AA (2016) Silver nanoparticles and silver ions: Oxidative stress responses and toxicity in potato (*Solanum tuberosum* L.) grown in vitro. *Horticulture, Environment and Biotechnology* 57, 544-553

Bao D, Oh ZG, Chen Z (2016) Characterization of silver nanoparticles internalized by *Arabidopsis* plants using single particle ICP-MS analysis. *Frontiers in Plant Science*, 7, 32

Barbasz A, Kreczmer B, Oćwieja M (2016) Effects of exposure of callus cells of two wheat varieties to silver nanoparticles and silver salt (AgNO₃). *Acta Physiologiae Plantarum* 38, 76

Barrios AC, Rico CM, Trujillo-Reyes J, Medina-Velo IA, Perlata-Videa JR, Gardea-Torresdey JL (2016) Effects of uncoated and citric acid coated cerium oxide nanoparticles, bulk cerium oxide, cerium acetate, and citric acid on tomato plants. *Science of the Total Environment* 563-564, 956-964

Bates L, Waldren R and Teare I (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39(1), 205-207

Behra R, Sigg L, Clift MJD, Herzog F, Minghetti M, Johnston B, Petri-Fink A, Rothen-Rutishauser B (2013) Bioavailability of silver nanoparticles and ions: from a chemical and biochemical perspective. *Journal of the Royal Society Interface* 10, 20130396

Belava VN, Panyuta OO, Yakovleva GM., Pysmenna YM, Volkogon MV (2017) The effect of silver and copper nanoparticles on the Wheat-*Pseudocercospora herpotrichoides* pathosystem. *Nanoscale Research Letters* 12:250

Benavides MP, Galleg SM, Tomaro ML (2005) Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 1, 21-34

Benn TM, Westerhoff P (2008) Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. *Environmental Science & Technology* 42, 4133-4139

Beyer EM (1976) Silver ion: a potent anti-ethylene agent in cucumber and tomato. *HortScience* 11 (3), 175-196

Bharadwaj Punita S, (2012) Silver or silver nanoparticle a safety or a risk. *Journal of Environmental Research and Development* 7, 452-456

Bhattacharjee S (2014) Membrane lipid peroxidation and its conflict of interest: the two faces of oxidative stress. *Current Science* 107, 1811-1823

Biba R, Matić D, Lyons DM, Peharec Štefanić P, Cvjetko P, Tkalec M, Pavoković D, Letofsky-Papst I, Balen B (2020) Coating-dependent effects of silver nanoparticles on tobacco seed germination and early growth. *International Journal of Molecular Science* 21, 3441

Bilberg K, Hovgaard MB, Besenbacher F, Baatrup E (2011) In vivo toxicity of silver nanoparticles and silver ion in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Toxicology* 2012

Blaser SA, Scheringer M, MacLeod M, Hungerbühler K (2008) Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: Contribution of nano-functionalized plastics and textiles. *Science of Total Environment* 391, 396-409

Blokhina O, Virolainen E, Fagersted KV (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* 91, 179-194

Bolwell GP, Wojtaszek P (1997) Mechanisms for generation of reactive oxygen species in plant defence – a broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 51, 347-366

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254

Braidot E, Petrucci E, Vianello A, Macri F (1999) Hydrogen peroxide generation by higher plant mitochondria oxidising complex I or complex II substrates. *FEBS Letters* 451, 347-350

Castiglione MR, Giorgetti L, Geri C, Cremonini R (2011) The effects of nano-TiO₂ in seed germination, development and mitosis of root tip cells of *Vicia narbonensis* L. and *Zea mays* L. *Journal of Nanoparticle Research* 13, 2443-2449

Chance B, Maehly AC (1955) Assay of catalase and peroxidase. *Methods in Enzymology* 2, 764-775

Chen EL, Chen YA, Chen LM, Liu ZH (2002) Effect of copper on peroxidase activity and lignin content in *Raphanus Sativus*. *Plant Physiology and Biochemistry* 40, 439-444

Chen C, Dickman MB (2005) Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 3459-3464

Chen X, Schluesener HJ (2008) Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicology Letters* 176, 1-12

Cheng Y-W, Yin L-Y, Lin S-H, Wiesner MR, Bernhardt ES, Liu J (2011) Toxicity reduction of polymer-stabilized silver nanoparticles by sunlight. *Journal of Physical Chemistry C* 115, 4425-4432

Choi O, Kanungo D, Kim N-J, Ross Jr. L, Surampalli RY, Hu Z (2008) The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Research* 42, 3066-3074

- Choudhary M, Jetley UK, Khan MA, Zutshi S, Fatma T (2007) Effect of heavy metals on proline, malondialdehyde, and superoxide dismutase activity in the cyanobacterium *Spirulina platensis* – S5. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66, 204-209
- Consoli E, Croce R, Dunlap DD, Finzi L (2005) Diffusion of light-harvesting complex II in the thylakoid membranes. *EMBO Reports* 6, 782-786
- Conway JR, Beaulieu AL, Beaulieu NL, Mazer SJ, Keller AA (2015) Environmental stresses increase photosynthetic disruption by metal oxide nanomaterials in a soil-grown plant. *ACS Nano* 9, 11737-49
- Costa MVJD, Sharma PK (2016) Effect of copper oxide nanoparticles on growth, morphology, photosynthesis, and antioxidant response in *Oryza sativa*. *Photosynthetica* 54, 110-119
- Cox A, Venkatachalam P, Sahi Shivendra, Sharma N (2016) Silver and titanium dioxide nanoparticles toxicity in plants: A review of current research. *Plant Physiology and Biochemistry*
- Cronholm P, Karlsson HL, Hedberg J, Lowe TA, Winnberg L, Elihn K, Odnevall Wallinder I, Möller L (2013) Intracellular uptake and toxicity of Ag and CuO nanoparticles: A comparison between nanoparticles and their corresponding metal ions. *Small* 9 (7), 970-982
- Cross RK, Tyler C, Galloway TS (2015) Transformations that affect fate, form and bioavailability of inorganic nanoparticles in aquatic sediments. *Environmental Chemistry* 12, 627-642
- Cvjetko P, Zovko M, Peharec Štefanić P, Biba R, Tkalec M, Domijan A-M, Vinković-Vrčak I, Letofsky-Papst I, Šikić S, Balen B (2018) Phytotoxic effects of silver nanoparticles in tobacco plants. *Environmental Science and Pollution Research* 25, 5590-5602
- Cvjetko P, Milošić A, Domijan AM, Vinković-Vrčak I, Tolić, S., Peharec Štefanić P, Letofsky-Papst I, Tkalec M, Balen B (2017) Toxicity of silver ions and differently coated silver nanoparticles in *Allium cepa* roots. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 137, 18-28

Del Rio LA, Sandalio LM, Palma JM, Bueno P, Corpas FJ (1992): Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free Radical Biology and Medicine* 13, 557-580

Demir E, Kaya N, Kaya B (2014) Genotoxic effects of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles on root meristem cells of *Allium cepa* by comet assay. *Turkish Journal of Biology* 38(1), 31-39

Dewez D, Oukarroum A (2012) Silver nanoparticles toxicity effect on photosystem II photochemistry of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* treated in light and dark conditions. *Toxicological & Environmental Chemistry* 94, 1536-1546

Diaz-Vivancos P, de Simone A, Kiddle G, Foyer CH (2015) Glutathione-linking cell proliferation to oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 89, 1154-1164

Dietz K-J, Herth S (2014) Plant nanotoxicology. *Trends in Plant Science* 16, 582-589

Dimkpa CO, McLean JE, Martineau N, Britt DW, Haverkamp R, Anderson AJ (2013) Silver nanoparticles disrupt wheat (*Triticum aestivum* L.) growth in a sand matrix. *Environmental Science & Technology* 47, 1082-1090

Dixit V, Pandey V, Shyam R (2001) Differential oxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L cv. Azad). *Journal of Experimental Botany* 52, 1101-1109

Dixon DP, Skipsey M, Edwards R (2010) Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 71(4), 338-350

Domsch KH (1984) Effects of pesticides and heavy metals on biological processes in soil. *Plant and Soil* 76, 367-378

Duncan DB (1955) Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* 11, 1-42

Dykman LA, Shchyogolev SY (2018) The effect of gold and silver nanoparticles on plant growth and development. *Metal Nanoparticles* 6, 263-300

Egerova EM, Revina AA (2000) Synthesis of metallic nanoparticles in reverse micelles in the presence of quercetin. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 168, 87-96

Eisler R (1997) Silver hazards to fish, wildlife and invertebrates: A synoptic review. Biological report 32 and contaminant hazard reviews report 32. Washington, DC, US Department of Interior, National Biological Service, str.44.

Elstner EF (1991): Mechanism of oxygen activation in different compartments of plant cells. U: Pell EJ, Steffen KL (ur.). Active oxygen/oxydative stress and plant metabolism, Volume 26, Current Topics in Plant Physiology: An American Society of Plant Physiologists Series. Rockville, MD, str. 13-25

Evans JD (1996) Straightforward statistics for the behavioural sciences. Brooks/Cole Publishing, Pacific Grove.

Faisal M, Saquib Q, Alatar AA, Al-Khedhairi AA, Hegazy AK, Musarrat J (2013) Phytotoxic hazards of NiO-nanoparticles in tomato: a study on mechanism of cell death. Journal of Hazardous Materials 250-251, 318-332

Farr SB, Kogoma T (1991) Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Microbiological Reviews 55, 561-585

Filek M., Keskinen R, Harikainen H, Szarejko I, Janiak A, Miszalski Z, Golda A (2008) The protective role of selenium in rape seedlings subjected to cadmium stress. Journal of Plant Physiology 165, 833-844

Foyer CH, Descourvières P, Kunert KJ (1994) Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. Plant, Cell and Environment 17 (5), 507-523

Foyer CH, Noctor G (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. Physiologia Plantarum 119, 355-364

Gardner PR, Fridovich I (1991) Superoxide sensitivity of *Escherichia coli* 6-phosphogluconate dehydratase. Journal of Biological Chemistry 266, 1478-1483

Garg N, Manchanda G (2009) ROS generation in plants: boon or bane? Plant Biosystems 143, 8-96

Geisler-Lee J, Brooks M, Gerfen JR, Wang Q, Fotis C, Sparer A, Ma X, Berg RH, Geisler M (2014) Reproductive toxicity and life history study of silver nanoparticles effect, uptake and transport in *Arabidopsis thaliana*. Nanomaterials 4, 301-318

Geisler-Lee J, Wang Q, Yao Y, Zhang W, Geisler M, Li K, Huang Y, Chen Y, Kolmakov A, Ma X (2013) Phytotoxicity, accumulation and transport of silver nanoparticles by *Arabidopsis thaliana*. *Nanotoxicology* 7, 323-337

Ghezzi P, Bonetto V (2003) Redox proteomics: Identification of oxidatively, modified proteins. *Proteomics* 3, 1145-1153

Ghodake G, Deuk Seo Y, Sung Lee D (2011) Hazardous phytotoxic nature of cobalt and zinc oxide nanoparticles assessed using *Allium cepa*. *Journal of Hazardous Materials* 186, 952-955

Ghosh m, Bandyopadhyay M, Mukherjee A (2010) Genotoxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles at two trophic level Plant and human lymphocytes. *Chemosphere* 81(10), 1253-1262

Ghosh M, Jana A, Sinha S, Jothiramajayam M, Nag A, Chakraborty A, Mukherjee A, Mukherjee A (2016) Effects of ZnO nanoparticles in plants: cytotoxicity, genotoxicity, deregulation of antioxidant defenses, and cell-cycle arrest. *Mutation Research* 807, 25-32

Giannopolitis CN i Ries SK (1977) Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology* 59, 309-314

Gilbert B, Fakra SC, Xia T, Pokhrel S, Mädler L, Nel AE (2012) The fate of zno nanoparticles administered to human bronchial epithelial cells. *ACS Nano* 6, 4921–4930

Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machynery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 909-930

Gottschalk F, Sondere T, Schols R, Nowack B (2009) Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials for different regions. *Environmental Science & Technology* 43, 9216-9222

Griffitt RJ, Luo J, Gao J, Bonzongo JC, Barber DS (2008) Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Enviromental Toxicology and Chemistry* 27, 1972-7978

Grzesiak M, Filek M, barbasz A, Kreczmer B, Hartikainen H (2013) Relationship between polyamines, ethylen, osmoprotectants and antioxidant enzymes activities in

wheat seedlings after short-term PEG and NaCl induced stresses. *Plant and Growth Regulation* 69(2), 177-189

Guan Z, Chai T, Zhang Y, Jin X, Wei W (2009) Enhancement of Cd tolerance in transgenic tobacco plants overexpressing a Cd-induced catalase cDNA. *Chemosphere* 76, 623–630

Gubbins EJ, Batty LC, Lead JR (2011) Phytotoxicity of silver nanoparticles to *Lemna minor* L. *Environmental Pollution* 159, 1551-1559

Gulson B, McCall M, Korsch M, Gomez L, Casey P, Oytam Y, Taylor A, McCulloch M, Trotter J, Kinsley L, Greenoak G (2010) *Toxicological Sciences* 118 (1), 140-149

Gutteridge JMC, Halliwell B (1990) Lipid oxidation. *Trends in Biochemical Sciences* 15, 129-135

Habig WH, Jakoby WB (1981) Assay for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods in Enzymology* 77, 398-405

Hacker M, Bachmann K, Messer W (2009) *Pharmacology: Principles and Practise* 1st Ed. San Diego, CA. Academic Press Elsevier Inc.

Haghighi M, Heidarian S, da Silva JAT (2012) The effect of titanium amendment in *N*-withholding nutrient solution on physiological and photosynthesis attributes and micronutrient uptake of tomato. *Biological Trace Element Research* 150, 381–390

Halušková L, Valentovičová K, Huttová J, Mistrík I, Tamás L (2010) Effect of heavy metals on root growth and peroxidase activity in barley root tip. *Acta Physiologiae Plantarum* 32, 59

Halliwell B, Gutteridge JMC (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal* 219: 1-14

Hassan NS, Salah El Din TA, Hendawey MH, Borai IH, Mahd AA (2018) Magnetite and zinc oxide nanoparticles alleviated heat stress in wheat plants. *Current Nanomaterials* 3, 32-43

Haudecoeur E, Planamente S, Cirou A, Tannieres M, Shelp BJ, Moréra S, Faure D (2009) Proline antagonizes GABA-induced quenching of quorum-sensing in

Agrobacterium tumefaciens. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106(34), 14587-14592

Hawtorne J, Musante C, Sinha SK, White JC (2012) Accumulation and Phytotoxicity of Engineered Nanoparticles to *Cucurbita Pepo*. International Journal of Phytoremediation, Volume 14, Issue 4, 429-442

Hawthorne J, De la Torre Roche R, Xing B, Newman LA, Ma X, Majumdar S, Gardea-Torresdey J, White JC (2014) Particle-size dependent accumulation and trophic transfer of cerium oxide through a terrestrial food chain. Environmental Science & Technology 48, 13102-13109

He D, Dorantes-Aranda JJ, Waite TD (2012) Silver nanoparticle-algae interactions: oxidative dissolution. Reactive oxygen species generation and synergistic toxic effects. Environmental Science & Technology 46, 8731-8738

Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts.I- Kinetics and Stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics 125, 189-198

Hendren CO, Mesnard X, Droge J, Weisner MR (2011) Estimating production data for five engineered nanomaterials as a basis for exposure assessment. Environmental Science & Technology 45, 2562-2569

Heinlein M, Epel BL (2004) Macromolecular transport and signaling through plasmodesmata. International Review of Cytology 235, 93-164

Hillman WS (1961) The *Lemnaceae* or duckweeds. Botanical Review 27, 221-287

Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y, Matsui H (2001) A large family of class III peroxidases. Plant and Cell Physiology 42, 462-468

Hong J, Rico CM, Zhao L, Adeleye AS, Keller AA, Peralta-Videa JR, Gardea-Torresdey JL (2016) Toxic effects of copper-based nanoparticles or compounds to lettuce (*Lactuca sativa*) and alfalfa (*Medicago sativa*). Journal of Environmental Science 17, 177-185

Hossain Z, Mustafa G, Komatsu S (2015) Plant responses to nanoparticle stress. International Journal of Molecular Sciences 16, 26644-26653

- Hou W, Chen X, Song G, Wang Q, Chi Chang C (2007) Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*). *Plant Physiology and Biochemistry* 45, 62-69
- Howe PD, Dobson S (2002) Silver and silver compound: enviromental aspects. World Health Organization
- Hsu YT, Kao CH (2004) Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. *Plant and Growth Regulation* 42, 227-238
- Huang G, Xu B, Qiu J, Peng L, Luo K, Liu D, Han P (2020) Symmetric electrophoretic light scattering for determination of the zeta potential of colloidal systems. *Colloides and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 587, 124339
- Huang J, Li Q, Sun D, Lu Y, Su Y, Yang X (2007) Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. *Nanotechnology* 18, 105104-105114
- Hung SH, Yu CW, Lin CH (2005) Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 46, 1-10
- Iannelli MA, Pietrini F, Fiore L, Petrilli L, Massacci A (2002) Antioxidant response to cadmium in *Phragmites australis* plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 40, 977-982
- Iannone MF, Groppa MD, de Sousa ME, van Raap MBF, Benavides MP (2016) Impact of magnetite iron oxide nanoparticles on wheat (*Triticum aestivum* L.) development: evaluation of oxidative damage. *Environmental and Experimental Botany* 131, 77–88
- Jansson H, Hansson Ö (2008) Competitive inhibition of electron donation to photosystem 1 by metal-substituted plastocyanin. *Biochimica and Biophysica Acta* 1777, 1116-1121
- Jaspers P, Kangasjärvi J (2010) Reactive oxygen species in abiotic stress signaling. *Physiologia Plantarum* 138, 405-13
- Jiang HS, Li M, Chang FY, Li W, Yin LY (2012) Physiological analysis of silver nanoparticles and AgNO₃ toxicity to *Spirodela polyrhiza*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31(8), 1880-1886

Jiang HS, Qiu XN, Li GB, Li W, Yin LY (2014). Silver nanoparticles induced accumulation of reactive oxygen species and alteration of antioxidant systems in the aquatic plant *Spirodela polyrhiza*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33, 1398-1405

Jiang HS, Yin LY, Ren NN, Zhao ST, Li Z, Zhi Y, Shao H, Li W, Gontero B (2017) Silver nanoparticles induced reactive oxygen species via photosynthetic energy transport imbalance in an aquatic plant. *Nanotoxicology* 11, 157-167

Jo Y-K, Kim BH, Jung G (2009) Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic fungi. *Plant Disease* 93, 1037-1043

Johansson M, Pell M, Stenström J (1998) Kinetics of substrate induced respiration (SIR) and denitrification: applications to a soil amended with silver. *Ambio* 27, 40-44

Kalaji HM, Schansker G, Ladle RJ, Goltsev V, Bosa K, Allakhverdiev SI, i sur. (2014). Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: practical issues. *Photosynthesis Research* 122, 121-158

Kanounboule M, Vicente J, Nabais C, Prasad M, Freitas H (2009) Ecophysiological tolerance of duckweeds exposed to cooper. *Aquatic Toxicology* 91: 1-9

Kara Y, Basaran D, Kara I, Zeytunluoglu A, Genc H (2003) Bioaccumulation of nickel by aquatic macrophyta *Lemna minor* (Duckweed). *International Journal of Agriculture and Biology* 53, 281-283

Karlsson HL, Toprak MS, Fadeel B (2015) Chapter 4 - Toxicity of metal and metal oxide nanoparticles. U: Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M (ur.), *Handbook on the toxicology of metals* 4th edition. London, UK. Academic Press, Elsevier, str. 75-112.

Karuppanapandian T, Moon J-C, Kim C, Manoharan K, Kim W (2011) Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Australian Journal of Crop Science* 5(6):709-725

Kato H (2012) Size Determination of NPs by Dynamic Light Scattering. *Nanomaterials: Processing and Characterization with Lasers*, ed. S.C.Singh, H. Zeng, C. Guo and W. Cai, Wiley-VCH, ch.8

Khan NA, Samiullah S, Singh S, Nazar R (2007) Activities of antioxidative enzymes, sulphur assimilation, photosynthetic activity and growth of wheat (*Triticum aestivum*)

cultivars differing in yield potential under cadmium stress. *Journal of Agronomy and Crop Science* 193, 435-444

Khellaf N, Zerdaoui M (2009) Growth response of the duckweed *Lemna minor* to heavy metal pollution. *Journal of Environmental Health Science & Engineering* 6, 161-166

Klaine SJ, Alvarez PJJ, Batley GE, Fernandes TF, Handy RD, Lyon DY, Mahendra S, McLaughlin MJ i Lead JR (2008) Nanomaterials im the enviroment: behavior, fate, bioavailability and effects. *Enviromental Toxicology and Chemistry* 27, 1825-1851

Klasen HJ (2000) Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses. *Burns* 26(2), 117-30

Koelmel J, Leland T, Wang H, Amarasiriwardena D, Xing B (2013) Investigation of gold nanoparticles uptake and their tissue level distribution in rice plants by laser ablation-inductively coupled-mass spectrometry. *Environmental Pollution* 174, 222-228

Koo Y, Lukianova-Hleb EY, Pan J, Thompson SM, Lapotko DO, Braam J (2016) In planta response of *Arabidopsis* to photothermal impact mediated by gold nanoparticles. *Small* 12, 623-630

Koontz HV, Berle KL (1980) Silver uptake, distribution, and effect on calcium, phosphorius, and sulfur uptake. *Plant Physiology*. 65, 336-339.

Krajnčič B, Devidé Z (1980) Report on photoperiodic responses in *Lemnaceae* from Slovenia. *Berichte des Geobot. Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zurich*, 47, 75-86

Krause GH, Weis E (1984) Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology: II. Interpretion of fluorescence signals. *Photosynthesis Research* 5, 139-157

Krishnaraj C, Jagan EG, Ramachandran R, Abirami SM, Mohan K, Kalaichelvan PT (2012) Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *Bacopa monnieri* (Linn.) Wettst. plant growth metabolism. *Process Biochemistry* 47, 651-658

Kumar V, Shriram V, Nikam TD, Jawali N, Shitole MG (2008) Sodium chloride-induced changes in mineral nutrients and proline accumulation in indica rice cultivars differing in salt tolerance. *Journal of Plant Nutrition* 31 (11), 1999-2017

Kumar V, Parvatam G, Ravishankar GA (2009) AgNO₃ – a potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator. *Electronic Journal of Biotechnology* Vol. 12

Kumari M, Mukherjee A, Chandrasekaran N (2009) Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Science of the Total Environment* 407, 5243-5246

Küpper H, Küpper F, Siller M (2006) [Heavy metal]-chlorophylls formed *in vivo* during heavy metal stress and degradation products formed during digestion, extraction and storage of plant material. U: Grimm B, Porra RJ, Rüdiger W, Scheer H (ur.), *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls, Advantage in photosynthesis and respiration* Vol. 25. Springer, Netherlands, 67-77

Landolt E (1986) Biosystematic investigations in the family of duckweeds (Lemnaceae), volume 2. The family of Lemnaceae - a monographic study, Vol. 1. Zürich: Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes der ETH, Stiftung Rübel, in Zürich (71 Heft)

Larue C, castillo-Michel H, Sobanska S, Cecillion L, Bureau S, Barthes V, Ouerdane L, Carriere M, Sarret G (2014) Foliar exposure of the crop *Lactuca sativa* to silver nanoparticles: Evidence for internalization and changes in Ag speciation. *Journal of Hazardous Materials* 264, 98-106

Lau OL i Yang SF (1976) Inhibition of ethylene production by cobaltous ion. *Plant Physiology* 58 (1), 114-117

Lau E, Bragança Carvalho L, Pereira AES, Montanha G, Corrêa CG, de Carvalho HWP, Ganin AY, Fraceto L, Yiu HHP (2020) Localization of coated iron oxide (Fe₃O₄) nanoparticles on tomato seeds and their effects on growth. *ACS Applied Bio Materials*, Vol. 3; 4109-4117

Leblebici Z, Aksoy A (2011) Growth and lead accumulation capacity of *Lemna minor* and *Spirodela polyrhiza* (Lemnaceae): Interactions with nutrient enrichment. *Water, Air, & Soil Pollution* 214, 175-184

Lee W-M, Kwak JI, An Y-J (2012) Effect of silver nanoparticles in crop plants *Phaseolus radiatus* and *Sorghum bicolor*: Media effect on phytotoxicity. *Chemosphere* 86, 491-499

Lee KM, Lai CW, Ngai KS, Juan JC (2016) Recent developments of zinc oxide based photocatalyst in water technology: a review. *Water Research* 88, 428-448.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn B W, Shaltiel S, Stadtman ER (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* 186, 464-478

Li C, Dang F, Li M, Zhu M, Zhong H, Hintelmann H, Zhou D-M (2017) Effects of exposure pathways on the accumulation and phytotoxicity of silver nanoparticles in soybean and rice. *Nanotoxicology* 11, 699-709

Li J, Hu J, Ma C, Wang Y, Wu C, Huang J, Xing B (2016) Uptake, translocation and physiological effects of magnetic iron oxide (γ -Fe₂O₃) nanoparticles in corn (*Zea mays* L.). *Chemosphere* 159, 326-334

Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids, the pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148, 350-382

Lin D, Xing B (2007) Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution* 150, 243-50

Lin CC, Chen LM, Liu ZH (2005) Rapid effect of copper on lignin biosynthesis in soybean roots. *Plant Science* 168, 855-861

Liu R, Lal R (2015) Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic productions. *Science of the Total Environment* 514, 131-139

Liu J, Pennelli KG, Hurt RH (2011) Kinetics and mechanisms of nanosilver oxysulfidation. *Environmental Science & Technology* 44, 7345-7353

Liu J, Sonshine DA, Shervani S, Hurt RH (2010) Controlled release of biologically active silver from nanosilver surfaces. *ACS Nano* 223, 6903-6913

Liu J, Hurt RH (2010) Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids. *Environmental Science & Technology* 44, 2169-2175

Lovecká P, Macůrková A, Záruba K, Hubáček T, Siegel J, Valentová O (2021) Genomic damage induced in *Nicotiana tabacum* L. plants by colloidal solution with silver and gold nanoparticles. *Plants* 10, 1260

Luoma SN (2008) Silver nanotechnologies and the environment: Old problems or new challenges? Project on Emerging Nanotechnologies 15, PEW Charitable Trusts and Woodrow Wilson International Center for Scholars. www.pewtrusts.org/-/media/legacy/uploadedfiles/wwwpewtrustsorg/reports/nanotechnologies/nanopen15final.pdf

Ma C, Liu H, Guo H, Musante C, Hosbas Coskun S, Nelson B, White J, Xing B, Dhankher OB (2016) Defense mechanisms and nutrient displacement in *Arabidopsis thaliana* upon exposure to CeO₂ and In₂O₃ nanoparticles. *Environmental Science: Nano* 3(6), 1369-1379

Mäder M, Ungemach J, Schloß P (1980) The role of peroxidase isoenzyme groups of *Nicotiana tabacum* in hydrogen peroxide formation. *Planta* 147, 467-470

Maggio A, Miyazaki S, Veronese P, Fujita T, Ibeas JI, Damsz B, Narasimhan ML, Hasegawa PM, Joly RJ, Bressan RA (2002) Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? *Plant Journal* 31, 699-712

Matysik J, Alia, Bhalu B, Mohanty P (2002) Molecular mechanism of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Current Science* 82, 525-532

Mazumdar H, Ahmed GU (2011) Phytotoxicity effect of silver nanoparticles on *Oryza sativa*. *International Journal of ChemTech Research* 3, 1494-1500

McGillicuddy E, Murray I, Kavanagh S, Morrison L, Fogarty A, Cormican M, Dockery P, Prendergast M, Rowan N, Morris D (2017) Silver nanoparticles in the environment: Sources, detection and ecotoxicology. *Science of the Total Environment* 575, 231-246

McNeil-Watson F (2013) Electrophoretic Light Scattering. U: Roberts GCK (ur.), *Encyclopedia of Biophysics*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, str. 648-654

McShan D, Ray PC, Yu H (2014) Molecular toxicity mechanism of nanosilver. *Journal of Food and Drug Analysis* 22, 116-127

Mirzajani F, Askari H, Hamzelou S, Farzaneh M, Ghassempour A (2013) Effect of silver nanoparticles on *Oryza sativa* L. and its rhizosphere bacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 88, 48-54

Mirizajani F, Askari H, Hamzelou S, Schober Y, Römpp A, Ghassempour A, Spengler B (2014) Proteomics study of silver nanoparticles toxicity on *Oryza sativa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 108, 335-339

Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7, 405-410

Mobin M, Khan NA (2007) Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard (*Brassica juncea*) cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress. *Journal of Plant Physiology* 164, 459-481

Modén O, Mannervik B (2014) Glutathione transferases in the bioactivation of azathioprine. *Advances in Cancer Research* 122:6, 199-204

Modena MM, Rühle B, Burg TP, Wuttke S (2019) Nanoparticle Characterization: What to Measure? *Advanced Materials* 31, e1901556

Modrow H (2005) X-Ray Methods for the Characterization of NPs, in *Nanofabrication Towards Biomedical Applications: Techniques, Tools, Applications and Impact*, ed. C.S.S.S.R. Kumar, J. Hormes and C. Leuschner. Wiley-VCH, ch. 7

Moller IM, Jensen PE, Hansson A (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* 58, 459-481

Montoro Bustos AR, Ruiz Encinar J, Sanz-Medel A (2013) Mass spectrometry for the characterisation of nanoparticles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.*, 405, 5637-5643

Mourdikoudis S, Pallares RM, Thanh NTK (2018) Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *Nanoscale*, 10, 12871-12934

Myśliwa-Kurdiel B, Strzalka K (2002) Influence of metals on biosynthesis of photosynthetic pigments. *Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*, 201-227; Editors: Prasad MN, Strzalka K. Springer Science+Business Media B.V. 2002

- Nair PM, Chung IM (2014) Impact of copper oxide nanoparticles exposure on *Arabidopsis thaliana* growth, root system development, root lignification, and molecular level changes. *Environmental Science and Pollution Research* 21, 12709-12722
- Nakano Y, Asada K, (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22, 867-880
- Navarro E, Baun A, Behra R, Hartmann NB, Filser J, Miao A-J, Quigg A, Santschi PH, Sigg L (2008) Environmental behavior and ecotoxicology of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology* 17, 372-386
- Nemček L, Šebasta M, Urík M, Bujdoš M, Dobročka E, Vávra I (2020) Impact of bulk ZnO, ZnO nanoparticles and dissolved Zn on early growth stages of barley – a pot experiment. *Plants* 9, 1365
- Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49, 249–79
- Oberdörster E, Stone V., Donaldson K (2007) Toxicology of nanoparticles: a historical perspective. *Nanotoxicology* 1, 2–25
- Okkyoung C, Deng KK, Kim N-J, Ross Jr. L, surampalli RY, Hu Z (2008) The inhibitory effects of silver chloride colloids on microbial growth. *Water Research* 42, 3066-3074
- Olkhovych O, Volkogon M, Taran N, Batsmanova L, Kravchenko I (2016) The effect of copper and zinc nanoparticles on the growth parameters, contents of ascorbic acid, and qualitative composition of amino acids and acylcarnitines in *Pistia stratiotes* L. (Araceae). *Nanoscale Research Letters* 11, 218
- Onelli E, Prescianotto-Baschong C, Caccianiga M, Moscatelli A (2008) Clathrin-dependent and independent endocytic pathways in tobacco protoplasts revealed by labelling with charged nanogold. *Journal of Experimental Botany* 59, 3051-3068
- Oukkarroum A, Polchtchikov S, Perreault F, Popovic R (2011) Temperature influence on silver nanoparticles inhibitory effect on photosystem II photochemistry in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolectra*. *Environmental Science and Pollution Research* 19, 1755-62

- Oukarroum A, Barhoumi L, Pirastru L, Dewez D (2013) Silver nanoparticles toxicity effect on growth and cellular viability of the aquatic plant *Lemna gibba*. Environmental Toxicology and Chemistry 32, 902-907
- Padmaja K, Prasad DDK, Prasad ARK (1990) Inhibition of chlorophyll synthesis in *Phaseolus vulgaris* L. seedlings by cadmium acetate. Photosynthetica 24, 399-405
- Pakrashi S, Jain N, Dalai S, Jayakumar J, Chandrasekaran PT, Raichur AM, N Chandrasekaran, Mukherjee A (2014) In vivo genotoxicity assessment of titanium dioxide nanoparticles by *Allium cepa* root tip assay at high exposure concentrations. PLoS ONE 9:e87789
- Pand S, (2006) Environmental degradation due to the accumulation of particulates. Journal of Environmental Research and Development 1(1) 4, 22-25
- Panda KK, Archary VMM, Krishnaveni R, Padhi BK, sarangi SN, sahu SN, Panda BB (2011) In vitro biosynthesis and genotoxicity bioassay of silver nanoparticles using plants. Toxicology In Vitro 25, 1097-1105
- Parlak KU, Yilmaz DD (2013) Ecophysiological tolerance of *Lemna gibba* L. exposed to cadmium, Ecotoxicology and Environmental Safety 91, 79-85
- Peharec Štefanić P, Jarnević M, Cvjetko P, Biba R, Šikić S, Tkalec M, Cindrić M, Lefotsky-Papst I, Balen B (2019) Comparative proteomic study of phytotoxic effects of silver ions on tobacco plants. Environmental Science and Pollution Research. 26, 22529-22550
- Peharec Štefanić P, Košpić K, Lyons DM, Jurković L, Balen B, Tkalec M (2021) Phytotoxicity of silver nanoparticles on tobacco plants: evaluation of coating effects on photosynthetic performance and chloroplast ultrastructure. Nanomaterials 11, 744
- Pereira SPP, Jesus F, Aguiar S, de Oliveira R, Fernandes M, Renville J, Nogueira AJA (2018) Phytotoxicity of silver nanoparticles to *Lemna minor*: Surface coating and exposure period-related effects. Science of the Total Environment 618, 1389-1399
- Perreault F, Samadani M, Dewez D (2014) Effect of soluble copper released from copper oxide nanoparticles solubilisation on growth and photosynthetic processes of *Lemna gibba* L. Nanotoxicology 8, 374-382

Piccapietra F, Gil Allue C, Sigg L, Behra R (2012) Intracellular silver accumulation in *Chlamydomonas Reinhardtii* upon exposure to carbonate coated silver nanoparticles and silver nitrate. *Environmental Science & Technology* 46 (13), 7390-7397

Piccino F, Gottschalk F, Seeger S, Nowack B (2012) Industrial production quantities and uses nanomaterials in Europe and the world. *Journal of Nanoparticle Research* 14, 1109

Pirson A i Seidel F (1950) Zell-und stoffwechselphysiologische Untersuchngen an der Wurzel von *Lemna minor* unter besonderer Berücksichtigung von Kalium-und Calciummangel. *Planta* 38, 431-473

Polle A (2001) Dissecting the superoxide dismutase–ascorbate peroxidase–glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiology* 126, 445–462

Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Palme KJ, Jansen MAK (2007) Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends in Plant Science* 12, 98-105

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

Prasad MNV, Strzalka K (1999) Impact of heavy metals on photosynthesis. U: Prasad MNV, Hagemeyer J (ur.), Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems. Springer, Berlin, 117-138

Qian H, Peng X, Han X, Ren J, Sun L, Fu Z (2013) Comparison of the toxicity of silver nanoparticles and silver ions on the growth of terrestrial plant model *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Environmental Sciences* 25, 1947-1955

Qin Y, Zhang S, Zhang L, Zhu D, Syed A (2005) Response of in vitro strawberry to silver nitrate (AgNO₃). *HortScience* 40, 747-751

Radotić K, Dučić T, Mutavdžić D (2000) Changes in peroxidase activity and isoenzymes in spruce needles after exposure to different concentrations of cadmium. *Environmental and Experimental Botany* 44, 105-113

Rajput VD, Minkina T, Fedorenko A, Chernikova N, Hassan T, Mandzhieva S, Sushkova S, Lysenko V, Soldatov MA, Burachevskaya M (2021) Effects of zinc oxide nanoparticles on physiological and anatomical indices in spring barley tissues.

Ralph PJ, Gademann R (2005) rapid light curves: a powerful tool to assess photosynthetic activity. *Aquatic Botany* 82, 222-237

Ramírez-García G, d'Orlyé F, Gutiérrez-Granados S, Martínez-Alfaro M, Mignet N, Richard C, Varenne A (2015) Functionalization and characterization of persistent luminescence nanoparticles by dynamic light scattering, laser Doppler and capillary electrophoresis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 136, 272-281

Rastogi A, Zivcak M, Sytar O, Kalaji HM, He X, Mbarki S, Brestic M (2017) Impact of metal and metal oxide nanoparticles on plant: a critical review. *Frontiers in Chemistry* 5:78

Ratte HT (1999) Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: a review. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 89-108

Reggiani R, Bertani A (1989) Effect of decreasing oxygen concentration on polyamine metabolism in rice and wheat shoots. *Journal of Plant Physiology* 135, 375-377

Roh JY, Eom HJ, Choi J (2012) Involvement of *Caenorhabditis elegans* MAPK signaling pathways in oxidative stress response induced by silver nanoparticles exposure. *Toxicological Research* 28, 19-24

Rouhier N, Lemaire SD, Jacquot JP (2008) The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. *Annual Review of Plant Biology* 259, 143-166

Rout GR, Samantaray S, Das P (2001) Aluminium toxicity in plants: a review. *Agronomie* 21, 3-21

Saba MK, Amini R (2017) Nano-ZnO/carboxymethyl cellulose-based active coating impact on ready-to-use pomegranate during cold storage. *Food Chemistry*. 232, 721-726

Sabo-Attwood T, Unrine JM, Stone JW, Murphy CJ, Ghoshroy S, Blom D, Bertsch PM, Newman LA. (2012) Uptake, distribution and toxicity of gold nanoparticles in tobacco (*Nicotiana xanthi*) seedlings. *Nanotoxicology* 6, 353-360

Saha N, Dutta Gupta S (2017) Low-dose toxicity of biogenic silver nanoparticles fabricated by *Swertia chirata* on root tips and flower buds of *Allium cepa*. Journal of Hazardous Materials 330, 18-28

Sandhiya S, Dkhara SA, Surendiran A (2009) Emerging trends of nanomedicine – an overview. Fundamental and Clinical Pharmacology 23, 263-269

Sanford J, Venkatapathy R (2010) State of the science literature review: everything nanosilver and more. In: Varner K (ur.): Scientific, tehcnical, reaserch, engineering and modeling support final report. Washington DC: US Enviromental Protection Agency, Office of Reasearch and Development, 1-197

Sanità di Toppi L, Gabrielli R (1999) Response to cadmium in higher plants. Environmental and Experimental Botany 41, 105-130

Saradhi PP, Alia, Arora S, Prasad KV (1995) Proline accumulates in plants exposed to UV radiation and protects them against UV-induced peroxidation. Biochemical and Biophysical Research Communications 209(1), 1-5

Savolainen K, Alenius H, Norppa H, Pylkkänen L, Tuomi T, Kasper G (2010) Risk assessment of engineered nanomaterials and nanotechnologies - A review. Toxicology 269, 92-104

Scandalias JG (1990) Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. Advances in Genetics 28, 1-41

Schluesener JK, Schluesener HJ (2013) Nanosilver: application and novel aspects of toxicology. Archives of Toxicology 87, 569-576

Seif Sahandi M, Sorooshzadeh A, Rezazadeh S, Naghdibadi HA (2011) Effect of nano silver and silver nitrate on seed yield of borage. Journal of Medicinal Plants Research 5 (2), 171-175

Sendra M, Yeste MP, Gatica JM, Moreno-Garrido I, Blasco J (2017a) Homoagglomeration and heteroagglomeration of TiO₂, in nanoparticle and bulk form, onto freshwater and marine microalgae. Science of Total Environment 592, 403-411

Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. Jornal of Botany 2012: 217037

Sharma N, Hundal GS, Sharma I, Bhardwaj R (2014) 28-homobrassinolide alters protein content and activities of glutathione-s-transferase and polyphenol oxidase in *Raphanus sativus* L. plants under heavy metal stress. *Toxicology International* 21(1), 44-50

Siddiqui MH, Al-Whaibi MH, Faisal M, Al sahli AA (2014) Nano-silicon dioxide mitigates the adverse effects of salt stress on *Cucurbita pepo* L. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33 (11), 2429-2437

Siddiqui ZA, Parveen A, Ahmad L, Hashem A (2019) Effects of graphene oxide and zinc oxide nanoparticles on growth, chlorophyll, carotenoids, proline contents and diseases of carrot. *Scientia Horticulturae* 249, 374-382

Singh N, Manshian B, Jenkins GJ, Griffiths SM, Williams PM, Maffei TG, Wright CJ, Doak SH (2009) Nano genotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials* 30, 3891-3914

Singh A, Singh NB, Hussain I, Singh H, Yadav V (2017) Synthesis and characterization of copper oxide nanoparticles and its impact on germination of *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek. *Tropical Plant Biology* 4(2), 246-253

Silva T, Pokhrel LR, Dubey B, Tolaymat TM, Maier KJ, Liu X (2014) Particle size, surface charge and concentration dependent ecotoxicity of three organo-coated silver nanoparticles: comparison between general linear model-predicted and observed toxicity. *Science of the Total Environment* 468, 968-976

Sinha S, Mallick S, Misra RK, Singh S, Basant A, Gupta AK (2007) Uptake and translocation of metals in *Spinacia oleracea* L. grown on tannery sludge-amended and contaminated soils: Effect on lipid peroxidation, morpho-anatomical changes and antioxidants. *Chemosphere* 67, 167- 187

Smirnoff N (1993) The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist* 125, 27-58

Sohal, RS, Agarwal S, Dubey A, Orr WC (1993): Protein oxidative damage is associated with life expectancy of houseflies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 7255-7259

- Sondi I, Salopek-Sondi B (2004) Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E-coli as a model for gram-negative bacteria. *Journal of Colloid Interface Science* 275, 177-182
- Stadtman ER (1986) Oxidation of proteins by mixed-function oxidation systems: implication in protein turnover, aging and neutrophil function. *Trends in Biochemical Sciences* 11, 11-12
- Stampolius D, Sinha SK, White JC (2009) Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. *Environmental Science & Technology* 43, 9473-9479
- Steinberg RA (1946) Mineral requirements of *Lemna minor*. *Plant Physiology* 21, 42-48
- Stroinski A, Kozłowska M (1997) Cadmium induced oxidative stress in potato tuber. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 66, 189-195
- Sun T, Yan Y, Zhao Y, Guo F, Jiang C (2012) Copper oxide nanoparticles induce autophagic cell death in A549 cells. *PLoS One* 7 (8), 43442
- Sunohara Y, Matsumoto H (2008) Quinclorac-induced cell death is accompanied by generation of reactive oxygen species in maize root tissue. *Phytochemistry* 69, 2312-2319
- Sujak A (2005) Interaction between cadmium, zinc and silver-substituted plastocyanin and cytochrome b6f complex-Heavy metals toxicity towards photosynthetic apparatus. *Acta Physiologiae Plantarum* 27, 61-69
- Szabados L, Savaure A (2010) Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* 15(2), 89-97
- Takahashi MA, Asada K (1983) Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 226, 558-566
- Tejamaya M, Römer I, Merrifield RC, Lead JR (2012) Stability of citrate, PVP, and PEG coated silver nanoparticles in ecotoxicology media. *Environmental Science & Technology* 46, 7011-7017

- Theriappan P, Gupta AK, Dhasarrathan P (2011) Accumulation of proline under salinity and heavy metals stress in *Cauliflower seedlings*. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management* 15(2), 251-255
- Thwala M, Musee N, Sikhwivhilu L, Wepener V (2013) The oxidative toxicity of Ag and ZnO nanoparticles towards the aquatic plant *Spirodela punctata* and the role of testing media parameters. *Environmental Science: Processes Impacts*. 15, 1830-1843
- Tripathi DK, Singh S, Singh S, Srivastava PK, Singh VP, Singh S, Srivastava PK, Singh VP, Singh S, Prasad SM, Singh PK, Dubey NK, Pandey AC, Chauhan DK (2017) Nitric oxide alleviates silver nanoparticles (AgNps)-induced phytotoxicity in *Pisum sativum* seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* 110, 167-177
- Tsoli M, Kuhn H, Brandau W, Esche H, Schmid G (2005) Cellular uptake and toxicity of Au(55) clusters. *Small* 1, 841–844
- Van Breusegem F, Dat JF (2006) Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiology* 141, 384-390
- Vilela D, Gonzáles MC, Escarpa A (2012) Sensing colorimetric approaches based on gold and silver nanoparticles aggregation: Chemical creativity behind the assay. A review. *Analytica Chimica Acta*, 751, 24
- Vinković T, Novák O, Strnad M, Goessler W, Jurašin DD, Parađiković N, Vinković Vrček I (2017) Cytokinin response in pepper plants (*Capsicum annuum* L.) exposed to silver nanoparticles. *Environmental Research* 156, 10-18
- Vinković Vrček I, Žuntar I, Petlevski R, Pavičić I, Dutour Sikirić M, Ćurlin M, Goessler W (2014) Comparasion of *in vitro* toxicity of silver ions and silver nanoparticles on human hepatoma cells. *Enviromental Toxicology* 31, 679–692
- Vishwakarama K, Upadhyay SN, Singh J, Liu S, Singh VP, Prasad SM, Chauhan DK, Tripathi DK, Sharma S (2017) Differential phytotoxic impact of plant mediated silver nanoparticles (AgNPs) and silver nitrate (AgNO₃) on *Brassica* sp. *Frontiers in Plant Science* 8, 1501
- Wang W, Williams JM (1990) The use of phytotoxicity tests (common duckweed, cabbage, and millet) for determining effluent toxicity. *Enviromental Monitoring and Assessment*. 14, 45-58

Wang JM (2003) Interactions of silver with wastewater constituents. *Water Research* 37, 4444-4452

Wang P, Menzies NW, Lombi E, McKenna BA, Johannessen B, Glover CJ, Kappen P, Kopittke PM (2013) Fate of ZnO nanoparticles in soils and cowpea (*Vigna unguiculata*). *Environmental Science & Technology* 47, 13822-13830

Wang W, Liu J, Ren Y, Zhang L, Xeu Y, Zhang L, He J (2020) Phytotoxicity assessment of copper oxide nanoparticles on the germination, early growth, and physiological responses in *Oryza sativa* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 17, 1260

Willekens H, Inzé D, Van Montagu M, van Camp W (1995) Catalasis in plants. *Molecular Breeding* 1, 207-228

Xia T, Kovochich M, Brant J, Hotze M, Sempf J, Oberley T, Sioutas C, Yeh JI, Wiesner MR, Nel AE (2006) Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Letters* 6, 1794-1807

Xiang C, Oliver DJ (1998) Glutathione metabolic genes coordinately respond the heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10, 1539-1550

Xie H, Mason MM, Wise JP (2011) Genotoxicity of metal nanoparticles. *Reviews on Environmental Health* 26, 251-268

Xie Y, Zhang Q, Zhang C, Lu K, Tao G (2011) Effects of nano-TiO₂ on photosynthetic characteristics of *Indocalamus barbatus*. *Journal of Northeast Forestry University* 39, 22-25

Xing W, Huang WM, Liu GH (2010) Effects of excess iron and copper on physiology of aquatic plant *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleid. *Environmental Toxicology* 25, 103-112

Yan A i Chen Z (2019) Impacts of silver nanoparticles on plants: a focus on the phytotoxicity and underlying mechanism. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 1003

Yanik F, Vardar F (2018) Oxidative stress response to aluminium oxide (Al₂O₃) nanoparticles in *Triticum aestivum*. *Biologia* 73, 129-135

Yin L, Cheng Y, Espinasse B, Colman BP, Auffan M, Wiesner M, Rose J, Liu J, Bernhardt ES (2011) More than ions: the effects of silver nanoparticles on *Lolium multiflorum*. Environmental Science & Technology 45, 2360-2367

Yin L, Colman BP, McGill BM, Wright JP, Bernhardt ES (2012) Effects of silver nanoparticle exposure on germination and early growth of eleven wetland plants. PLoS ONE 7:e47674

Zhu Z-J, Wang H, Yan B, Zheng H, Jiang Y, Miranda OR, Rotello VM, Xing B, Vachet RW (2012) Effect of surface charge on the uptake and distribution of gold nanoparticles in four plant species. Environmental Science & Technology 46(22), 12391-12398

Zou X, Li P, Huang Q, Zhang H (2016) The different response mechanisms of *Wolffia globosa*: Light-induced silver nanoparticle toxicity. Aquatic Toxicology 176, 97-105

Zuverza-Mena N, Martínez-Fernández D, Du W, Hernandez-Viezcas JA, Bonilla-Bird N, López-Moreno ML, Komárek M, Peralta-Videa JR, Gardea-Torresdey JL (2017) Exposure of engineered nanomaterials to plants: insights into the physiological and biochemical responses-a review. Plant Physiology and Biochemistry 110, 236-264

Zuverza-Mena N, Armendariz R, Peralta-Videa JR, Gardea-Torresdey JL (2016) Effects of silver nanoparticles on radish sprouts: Root growth reduction and modifications in the nutritional value. Frontiers in Plant Science 7, 90